

**Design, Charakterisierung und Prozessintegration nicht-partikulärer  
Medien für bio-chromatographische Trennaufgaben**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
**Doktor der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)**

vorgelegt von  
**M. Sc. Jan Schwellenbach**  
geboren in Stade/Deutschland

genehmigt von der Fakultät für Mathematik / Informatik und Maschinenbau der Technischen  
Universität Clausthal,

Tag der mündlichen Prüfung

01. Dezember 2016

### **Dekan**

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dix  
Institut für Informatik  
Technische Universität Clausthal

### **Vorsitzender der Promotionskommission**

Prof. Dr.-Ing. Norbert Müller  
Institut für Maschinenwesen  
Technische Universität Clausthal

### **Betreuer**

Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube  
Institut für thermische Verfahrens- und Prozesstechnik  
Technische Universität Clausthal

### **Gutachter**

Prof. Dr.-Ing. Marcus Grünewald  
Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik  
Ruhr-Universität Bochum

Prof. Dr. rer. nat. Alfred Weber  
Institut für mechanische Verfahrenstechnik  
Technische Universität Clausthal

Dissertation TU Clausthal

2016

D 104

Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik

**Jan Schwellenbach**

**Design, Charakterisierung und Prozessintegration  
nicht-partikulärer Medien für bio-chromatographische  
Trennaufgaben**

D 104 (Diss. TU Clausthal)

Shaker Verlag  
Aachen 2017

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Clausthal, Techn. Univ., Diss., 2016

Copyright Shaker Verlag 2017

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-5077-6

ISSN 2193-6560

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## **Vorwort**

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als Doktorand im Institut für thermische Verfahrens- und Prozesstechnik der Technischen Universität Clausthal und in Zusammenarbeit mit dem Bereich für Membranmodifikation und Chromatographie der Sartorius Stedim Biotech GmbH.

Mein besonderer Dank an dieser Stelle gilt meinem Doktorvater, und Leiter des Instituts für thermische Verfahrens- und Prozesstechnik, Herrn Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube für die fachliche Unterstützung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Diskussionsbereitschaft. Sein in mich gesetztes Vertrauen und die Möglichkeit zur freien wissenschaftlichen Entfaltung haben diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht.

Ich danke Herrn Prof. Dr.-Ing. Marcus Grünewald und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Alfred Weber für die freundliche Übernahme des 2. und 3. Gutachtens sowie Prof. Dr.-Ing. Norbert Müller für die Mitwirkung in der Promotionskommission als Vorsitzender.

Ich habe die Arbeit sowohl bei der Sartorius Stedim Biotech GmbH als auch am Institut für thermische Verfahrens- und Prozesstechnik zu jeder Zeit genossen und möchte mich an dieser Stelle bei allen ehemaligen Kollegen und Mitarbeitern bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Louis Villain, Dr. Florian Taft und Dr. Dieter Melzner für die Betreuung, die fachliche Unterstützung und die produktive Zusammenarbeit. Dipl.-Ing. Steffen Zobel danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft, Zeit und Geduld. Allen Mitarbeitern des Modifizierungslabors und des Arbeitskreises danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und Motivation.

Allen Korrekturlesern dieser Arbeit danke ich für ihre Zeit, Mühen und die Bereitschaft mir diese Unterstützung zukommen zu lassen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Ria und Edgar, meiner Schwester Iris und ganz besonders meiner Ehefrau Helena danken. Ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Verständnis haben mir stets geholfen mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und meinen Weg, begleitet von Liebe und Vertrauen, beschreiten zu können.



## Abstract

Das Decken der stetig wachsenden Nachfrage nach biopharmazeutischen Produkten wird weitestgehend eingeschränkt durch die verfügbare Herstellungskapazität sowie durch die Effizienz und die Kosten des jeweiligen Produktionsprozesses. Wesentliche Limitierungen entstehen dabei im Bereich der chromatographischen Aufreinigung des Zielproduktes, welche eine wichtige Rolle in nahezu jedem industriellen Produktionsprozess spielt. Um diese Limitierungen erfolgreich zu adressieren, stellt die Entwicklung und Prozessintegration neuer effektiver und kosteneffizienter chromatographischer Medien ein Feld intensiver Forschung für die biopharmazeutische Industrie dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Entwicklung eines nicht-partikulären chromatographischen Mediums, basierend auf oberflächenmodifizierten thermoplastischen Polymerfasern, beschrieben. Die Arbeitsschwerpunkte umfassen dabei die Methodenentwicklung zum Design einer optimierten adsorptiven Polymernanoschicht, darauf aufbauend die Herstellung und Charakterisierung eines faserbasierten starken Kationentauschermediums sowie dessen modellbasierte Prozessintegration.

Es kann anhand eines Membranadsorbermodellsystems gezeigt werden, dass mittels oberflächeninitiiertes Atom Transfer Radikal Polymerisation (ATRP) wesentliche Architekturparameter der adsorptiven Polymernanoschicht gezielt eingestellt werden können. Dies führt zu einer Verbesserung der Proteinbindungskapazität von mehr als 30 % gegenüber kommerziell verfügbaren Produkten bei identischer Permeabilität. Ein Übertrag dieser Methodik erlaubt die Herstellung eines hochkapazitiven starken Kationentauschermediums auf Grundlage thermoplastischer Kurzschnittfasern, das im Fall von Immunglobulin G (IgG) als Modellmolekül 85 % der Bindungskapazität kommerziell verfügbarer Partikeln und 200 % eines Membranadsorbers erreicht. Die Charakterisierung eines aus diesen Fasern bestehenden chromatographischen Bettes zeigt vorteilhafte und konkurrenzfähige Eigenschaften verglichen mit klassischen Systemen in Bezug auf dynamische Bindungskapazität ( $> 40 \text{ mg/mL IgG}$ ), Permeabilität, Fluidynamik und Stofftransport. Im Hinblick auf eine Prozessintegration der neu entwickelten faserbasierten stationären Phase kann gezeigt werden, dass die Beschreibung und Vorhersage einer Aufreinigung monoklonaler Antikörper (mAb) mittels eines physiko-chemischen Modells

---

erreicht werden kann. Eine Kombination aus Modellentwicklung, Simulation und Parameterbestimmung in unabhängigen Experimenten führt zu einer hinreichenden prädiktiven Genauigkeit ( $R^2 > 90\%$ ) der Simulationsergebnisse, auch für komplexe reale Zellkulturlösungen.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen das Potential des neuen chromatographischen Mediums, sowie die Durchführbarkeit einer designorientierte Herstellung und modellgestützten Prozessintegration.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>III</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>2</b>
1.1 Biotechnologische Prozesse und <i>Downstream Processing</i> therapeutischer Biomoleküle: Trends und Herausforderungen .....	2
1.1.1 Grundlagen biotechnologischer Prozesse .....	2
1.1.2 <i>Downstream Processing</i> .....	4
1.1.3 Chromatographie als essentielle Grundoperation im <i>Downstream Processing</i> monoklonaler Antikörper .....	6
1.2 Chromatographische Medien und Oberflächenmodifikation: Trends und Herausforderungen.....	8
1.2.1 Entwicklung chromatographischer Medien.....	8
1.2.2 Nicht-partikuläre chromatographische Medien .....	9
1.2.3 Oberflächenmodifikation.....	13
1.3 Modellbasierte Prozessintegration chromatographischer Medien: Trends und Herausforderungen.....	16
1.3.1 <i>Quality by Design</i> (QbD).....	16
1.3.2 Physiko-chemische Modellierung chromatographischer Systeme .....	17
1.4 Problemstellung, Zielsetzung und Lösungsansatz.....	19
<b>2. Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>24</b>
2.1 Chromatographie zur Aufreinigung therapeutischer Biomoleküle .....	24
2.1.1 Affinitätschromatographie .....	25
2.1.2 Ionenaustauschchromatographie (IEX) .....	25
2.1.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	26
2.2 Strukturparameter chromatographischer Medien .....	28
2.2.1 Porosität, Lückengrad und Porengrößenverteilung .....	28
2.2.2 Spezifische Oberfläche.....	30
2.2.3 Ligandendichte.....	31
2.3 Stofftransport.....	33

---

2.3.1	Axiale Dispersion.....	33
2.3.2	Filmdiffusion .....	34
2.3.3	Porendiffusion.....	35
2.4	<i>General Rate Model</i> .....	37
2.4.1	Massenbilanz der mobilen Phase .....	37
2.4.2	Massenbilanz der stationären Phase.....	38
2.4.3	Randbedingungen .....	39
2.4.4	Initialbedingungen .....	39
2.4.5	Adsorptionsgleichgewicht.....	40
2.5	Oberflächenmodifikation mittels Pfropfpolymerisation .....	41
2.5.1	Konventionelle radikalische Polymerisation.....	41
2.5.2	Kontrollierte radikalische Polymerisation.....	42
2.5.3	Oberflächeninitiierte ATRP .....	45
<b>3.</b>	<b>Design und Kontrolle der Polymernanoschichtarchitektur auf nicht-partikulären chromatographischen Medien .....</b>	<b>48</b>
3.1	Einleitung: Polymernanoschichtdesign .....	48
3.2	Materialien und Methoden.....	51
3.2.1	Materialien.....	51
3.2.2	Oberflächenmodifikation mittels SI-ATRP .....	51
3.2.3	Physiko-chemische Charakterisierung der Membranadsorber.....	54
3.3	Ergebnisse und Diskussion .....	60
3.3.1	Initiatorimmobilisierung und Quantifizierung.....	60
3.3.2	Kettenlänge innerhalb der Polymernanoschicht .....	61
3.3.3	Kettendichte innerhalb der Polymernanoschicht.....	63
3.3.4	Ligandendichte innerhalb der Polymernanoschicht.....	69
3.3.5	Vernetzung innerhalb der Polymernanoschicht .....	72
3.3.6	Optimierung der Polymernanoschichtarchitektur.....	74
3.4	Zusammenfassung: Polymernanoschichtdesign .....	77
<b>4.</b>	<b>Design und Charakterisierung eines faserbasierten starken Kationentauschermediums.....</b>	<b>80</b>
4.1	Einleitung: Design und Charakterisierung von Kationentauscherfasern .....	80
4.2	Materialien und Methoden.....	83

---

4.2.1	Materialien.....	83
4.2.2	Herstellung starker Kationentauscherfasern.....	84
4.2.3	Physiko-chemische Charakterisierung.....	86
4.3	Ergebnisse und Diskussion.....	91
4.3.1	Oberflächenmodifikation.....	91
4.3.2	Salzabhängige Bindungskapazität.....	95
4.3.3	Chromatographische Performance.....	99
4.4	Zusammenfassung: Design und Charakterisierung von Kationentauscherfasern ..	111
<b>5.</b>	<b>Aufreinigung monoklonaler Antikörper auf Grundlage eines faserbasierten starken Kationentauschermediums: Parameterbestimmung und Modellierung .....</b>	<b>114</b>
5.1	Einleitung: Parameterbestimmung und Modellierung.....	114
5.2	Materialien und Methoden.....	117
5.2.1	Materialien.....	117
5.2.2	Methoden.....	118
5.3	Modellanpassung und Parameterbestimmung.....	122
5.3.1	Säulenmodell.....	122
5.3.2	Anlagendisersion.....	126
5.3.3	Parameterbestimmung.....	127
5.4	Ergebnisse und Diskussion.....	132
5.4.1	Parameterbestimmung und fluiddynamische Modellvalidierung.....	132
5.4.2	Modellvalidierung.....	145
5.5	Zusammenfassung: Parameterbestimmung und Modellierung.....	151
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>154</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>.....</b>	<b>157</b>
	Literaturverzeichnis.....	157
	Abbildungsverzeichnis.....	172
	Tabellenverzeichnis.....	177
	Symbolverzeichnis.....	178
	Abkürzungsverzeichnis.....	182
	Lebenslauf.....	184