

Thermodynamische Untersuchung wässriger Zweiphasensysteme basierend auf hypervverzweigten Polymeren

Einleitung

Ein wässriges Zweiphasensystem (engl. Aqueous Two-Phase System (ATPS)) ist ein ternäres, wässriges System mit einer möglichst großen Mischungslücke. ATPS können durch die wässrige Lösung geeigneter Polymere, Salze oder ionische Flüssigkeiten gebildet werden. Sie werden eingesetzt, um Proteine voneinander zu trennen [1]. Die zu trennenden Proteine verteilen sich auf die beiden koexistierenden Phasen, die aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung neuer Trennverfahren bzw. bei der Optimierung spielt die Auswahl des phasenbildenden Systems für die jeweilige Trennaufgabe. Aufgrund der stofflichen Vielfalt der Proteine, deren biologische Aktivität aufrechterhalten werden muss, erfordert die Auswahl des ATPS aufwendige experimentelle Untersuchungen. Dabei spielt vor allem die ausreichende hohe Löslichkeit der Proteine eine herausragende Rolle. Bisher werden vor allem ATPS, basierend auf Polyethylenglycol (PEG) und Phosphatsalzen, zur Aufreinigung von Proteinen verwendet. Bei der Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern mit diesen ATPS kommt es allerdings zu einem erheblichen Ausfall des Antikörpers (Abbildung 1).

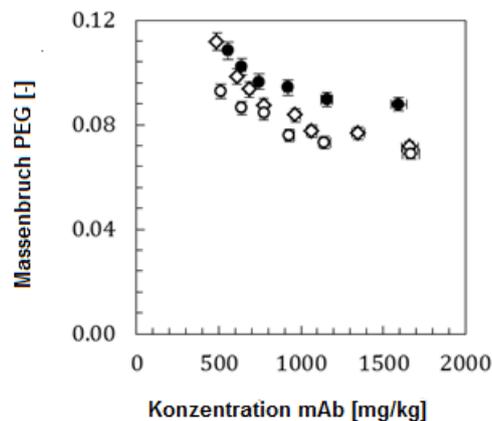


Abbildung 1: Löslichkeit von mAbs in wässriger PEG-Lösung: (●) PEG 2000; (◇) PEG 3000; (○) PEG 4000 [2].

Um die Beladung mit diesen Proteinen zu erhöhen ist es notwendig, alternative ATPS zu finden. Dies kann zum Beispiel durch die Untersuchung verschiedener ATPS, basierend auf unterschiedlichen Salzen oder Polymeren als Phasenbildner realisiert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Nutzung eines Plattformsystems mit einer oder mehreren Komponenten, die funktionalisierbar sind. Ein solches Plattformsystem kann durch die Verwendung von hypervverzweigten Polymeren (HP) als Phasenbildner in wässrigen Zweiphasensystemen realisiert werden. Interessant an der Verwendung von HP ist die niedrige Viskosität dieser Polymere in Schmelze bzw. Lösung und die große Anzahl verschiedener funktioneller Gruppen, die an die Polymere angebracht werden können. Die niedrige Viskosität hat ihren Ursprung in der verzweigten Struktur des HP, da diese nicht wie ein lineares Polymer verschlaufen. Durch die funktionellen Gruppen können die HP für verschiedene Anwendungen maßgeschneidert werden. HP zeigen außerdem eine gute Bioverträglichkeit und eine hohe thermische und chemische Stabilität. Durch deren Einsatz, zur Bildung eines

ATPS werden so die Mikroorganismen in Fermentationsbrühen nicht beeinträchtigt und es wird die thermische Rückgewinnung der Polymere ermöglicht.

ATPS basierend auf hyperverzweigten Polymeren

Hier wurden zwei verschiedene Möglichkeiten zur Bildung von ATPS auf Basis hyperverzweigter Polymere untersucht. Zunächst wurden ATPS basierend auf einem hyperverzweigten Polyesteramid und Dextran T40 untersucht. Neben der experimentellen Untersuchung wurde auch eine thermodynamische Modellierung durchgeführt. Diese Modellierung basiert auf der Lattice Cluster Theory (LCT) in Kombination mit der Wertheim Assoziationstheorie [3]. Mit Hilfe der LCT kann die Struktur der Moleküle direkt in der Helmholtz-Energie berücksichtigt werden. Durch die Kombination mit der Wertheim Theorie kann auch der Einfluss polarer Gruppen auf das Phasenverhalten berücksichtigt werden.

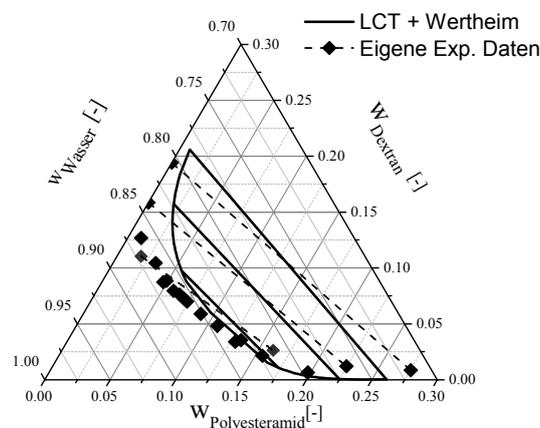


Abbildung 2: ATPS basierend auf einem hyperverzweigten Polyesteramid + Dextran T40 + Wasser. Durchgezogene Linien sind Berechnungen mit LCT+Wertheim und Rechtecke sind experimentelle Punkte [3].

Für die Bestimmung der experimentellen Daten des ATPS in Abbildung 2 wurde eine Analytik basierend auf der Größenausschlusschromatographie genutzt. Die Abweichungen zwischen den experimentellen Daten und der Modellierung mit der LCT, kombiniert mit der Wertheim Theorie, ist durch die Polydispersität des HB zu erklären. Durch Vergleich eines klassischen ATPS (PEG8000+Dextran T40+Wasser) mit dem in Abbildung 2 gezeigten erkennt man, dass für die Bildung des hyperverzweigten ATPS eine hohe Konzentration an Polyesteramid benötigt wird.

Darüber hinaus wurden auch ATPS basierend auf zwei verzweigten PEG und Dextran T40 untersucht. Diese beiden verzweigten PEG sind PEG-G2 und PEG-G3, wobei das G2 zwei Verzweigungen hat und G3 hat drei Verzweigungen. Neben der experimentellen Untersuchung der beiden ATPS, wurden die Phasengleichgewichte auch noch mit der LCT+Wertheim modelliert (Abbildung 3). Wenn man diese beiden ATPS mit klassischen ATPS basierend auf PEG und Dextran mit ähnlichen Molmassen vergleicht, erkennt man, dass die verzweigten ATPS steilere Konoden aufweisen.

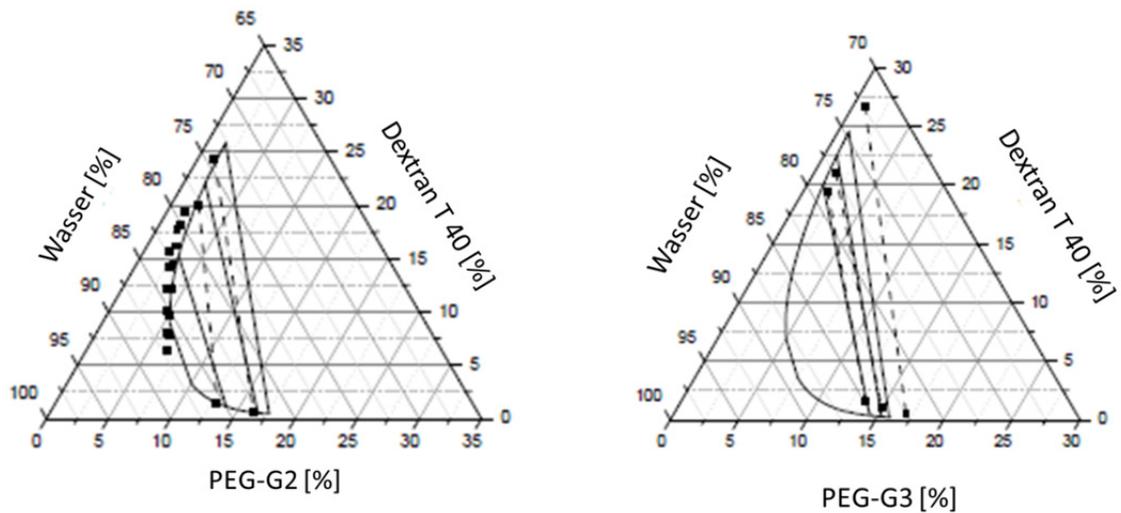


Abbildung 3: Links: ATPS basierend auf PEG-G2 und Dextran T40; Modellierung mit LCT+Wertheim sind durchgezogene Linien und Rechtecke sind experimentelle Daten. Rechts: ATPS basierend auf PEG-G3 und Dextran T40; Modellierung mit LCT+Wertheim sind durchgezogene Linien und Rechtecke sind experimentelle Daten.

Neben den ATPS, welche durch die wässrige Lösung eines hypervernetzten Polymers und von Dextran T40 gebildet wurden, wurde auch ein ATPS basierend auf einem hypervernetzten Polymer und einem Phosphatsalz untersucht. Als hypervernetztes Polymer wurde hier ein hypervernetztes Polyglycerol eingesetzt (Abbildung 4).

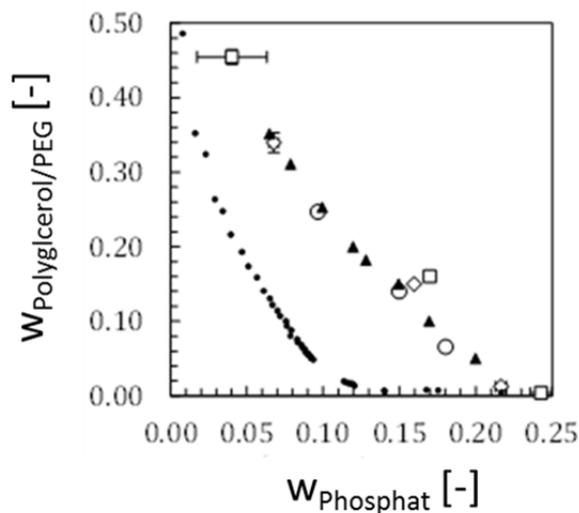


Abbildung 4: Phasengleichgewichte des Polyglycerol – Phosphat ATPS verglichen mit der Binodale des PEG – Phosphat ATPS: Gefüllte Kreise: PEG – Phosphat Binodale; andere Symbole: Polyglycerol-Phosphat ATPS: Konnoden und Trübungspunkte [4].

Für die Analytik des Phosphats wurde hier eine Ionenaustauschchromatographie genutzt. Man erkennt auch hier, dass mehr Polyglycerol aufwendet werden muss, um ein ATPS zu bilden im Vergleich zu PEG. Dieses ATPS wurde auch verwendet, um die Beladbarkeit mit einem monoklonalen Antikörper zu erhöhen.

Verteilung von mAbs in hyperverzweigtem Polyglycerol- Phosphatsalz ATPS

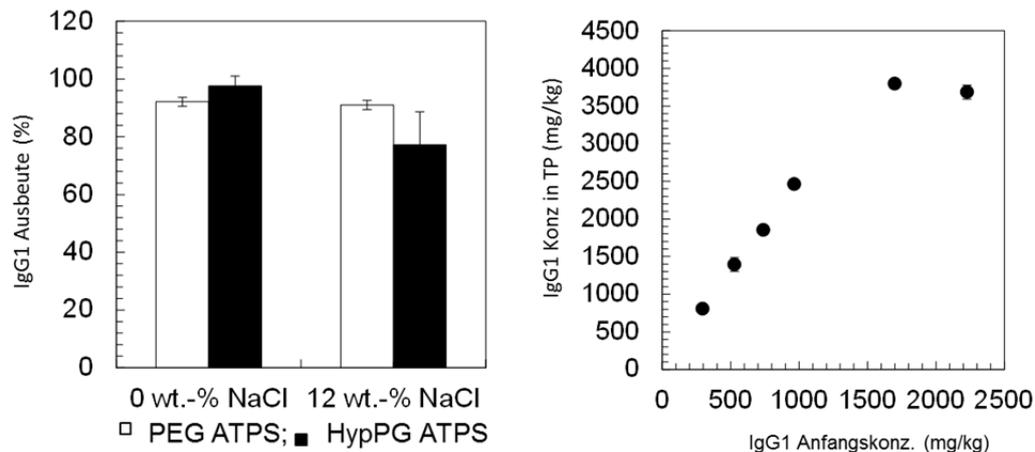


Abbildung 5: Links: Ausbeute von IgG1 in einem hyperverzweigtem Polyglycerol ATPS und in einem klassischen PEG-basierten ATPS. Rechts Beladbarkeit der Topphase (Polyglycerol - reiche Phase) mit Antikörper (IgG1) [4].

In Abbildung 5 (links) erkennt man, dass die Beladbarkeit des ATPS basierend auf dem hyperverzweigtem Polyglycerol höher ist (~98%). Diese Beladbarkeit nimmt allerdings ab, wenn Kochsalz hinzugefügt wird. Die Kochsalzzugabe wurde hier durchgeführt, da man in klassischen PEG-Phosphat ATPS die Verteilung des Antikörpers durch Zugabe von Kochsalz beeinflussen kann. Dies gilt allerdings nicht für Polyglycerol basierte ATPS. Die Versuche wurden mit einer Beladung von 100 mg/kg IgG1 durchgeführt. In Abbildung 5 (rechts) wurde das Beladungslimit des neuartigen ATPS getestet. Es wurde experimentell bestimmt, dass in das neuartige ATPS mit bis zu 1500 mg/kg IgG1 beladen werden kann und in der Polyglycerol-reichen Phase eine maximale Beladung von 4000 mg/kg möglich ist. Dies ist im Vergleich zu klassischen PEG-Phosphat Systemen eine 30-fache Steigerung der Beladbarkeit.

Zusammenfassung & Ausblick

Es wurde in dieser Arbeit die Bildung von ATPS basierend auf hyperverzweigten Polymeren untersucht. Hierbei wurden sowohl ATPS basierend auf einem hyperverzweigten Polymer und Dextran T40, als auch ATPS basierend auf einem hyperverzweigten Polyglycerol und einem Phosphatsalz experimentell untersucht. Es wurde festgestellt, dass für die Bildung von ATPS auf Basis hyperverzweigter Polymere, eine höhere Polymerkonzentration zur Bildung eines ATPS benötigt wird. Außerdem wurden die hyperverzweigten ATPS genutzt, um die Beladbarkeit von ATPS mit einem Antikörper zu erhöhen. Allerdings müssen weitere Versuche durchgeführt werden, um mögliche Verdrängersalze für dieses System zu finden. Weiterhin wird auch eine thermodynamische Modellierung für salzhaltige hyperverzweigte ATPS angestrebt.

Literatur

- [1] Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Bäcker, W., & Aires-Barros, M. R. (2011). Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability. *Biotechnology advances*, 29(6), 559-567.
- [2] Muendges, J., Stark, I., Mohammad, S., Górak, A., & Zeiner, T. (2015). Single stage aqueous two-phase extraction for monoclonal antibody purification from cell supernatant. *Fluid Phase Equilibria*, 385, 227-236.
- [3] Kulaguin-Chicaroux, A., & Zeiner, T. (2014). Novel aqueous two-phase system based on a hyperbranched polymer. *Fluid Phase Equilibria*, 362, 1-10.
- [4] Mündges, J., Zierow, J., Langer, U., & Zeiner, T. (2015). Possibilities to intensify and integrate aqueous two-phase extraction for IgG purification. *Separation and Purification Technology*, 154, 217-227.