

| | |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| AiF-Nr. | 14053 N |
| Thema: | Optimierung der Produktqualität bei der Fällung von Proteinen |
| Forschungsstelle: | Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg |
| Leiter des Projektes: | Prof. Wolfgang Peukert |
| Betreut durch: | AK 4 |
| Laufzeit: | 01.06.2004 – 31.08.2006 |

Zusammenfassung:

Im vorgestellten Forschungsprojekt wurde eine Strategie zur Optimierung der Produktqualität von Proteinpräzipitat untersucht. Ein wesentlicher Kostenfaktor bei der Aufreinigung und Abtrennung von Proteinen liegt zum einen im Auffinden geeigneter Fällungs- und Kristallisationsbedingungen und zum anderen in der anschließenden Fest-Flüssig-Trennung. Diese zwei Fragestellungen wurden bisher häufig unabhängig voneinander betrachtet, lassen sich jedoch gemeinsam wirkungsvoller optimieren. Daher wurden grundlegende Mechanismen der Fällung unter Berücksichtigung systemimmanenter Parameter sowie verfahrenstechnischer Komponenten untersucht, um dem industriellen Anwender ein Programm zur messtechnischen Erfassung einiger weniger, leicht zugänglicher Größen mit dem Ziel der Optimierung des Filtrationsverhaltens von Proteinpräzipitaten zu liefern. Im Projekt lag deshalb der Schwerpunkt auf der Untersuchung und Optimierung der Kristallisationsbedingungen im Hinblick auf die Präzipitateigenschaften wie u.a. Filtrierbarkeit.

Es wurde der Frage nachgegangen, welche bei der Fällung relevanten Protein- bzw. Prozessparameter welchen Einfluss auf die Beschaffenheit der gebildeten Niederschlagsphase ausüben. Ein Ausräumen der bestehenden Schwierigkeiten durch Abkehr von reiner Empirie und Hinwendung zu einer wissenschaftlich fundierten, auf systematischen Untersuchungen der relevanten Einflussgrößen basierenden Vorgehensweise vereinfacht die Optimierung der gesamten Aufarbeitungskaskade.

Die Forschungsarbeiten zeigen, dass der zweite osmotische Virialkoeffizient B_{22} ein relativ einfach zu messender Wechselwirkungsparameter ist, mit dem Vorhersagen über die Qualität von Kristallisationsbedingungen (ohne Kristallisationsexperiment) gemacht werden können. Somit können zeit- und materialaufwändige Kristallisationsexperimente reduziert werden. Für die analytische Proteinkristallisation zur Röntgenstrukturanalyse empfehlen sich Kristallisationsbedingungen mit einem Virialkoeffizienten im so genannten „crystallization slot“ von $-8 \cdot 10^{-4} \text{ mol ml g}^{-2} < B_{22} < 0$ [1, 2]. Für die präparative Proteinkristallisation bzw. Fällung zur Abtrennung kann gezeigt werden, dass ein kleinerer Virialkoeffizient, d.h. eine attraktivere Bedingung zweckmäßiger ist [3], da somit in kürzerer Kristallisationszeit Proteinpräzipitat hergestellt werden kann, das zwar eine geringere Partikelgröße und Reinheit aufweist, aber für die Abtrennung durch Filtration genauso oder z.T. besser geeignet ist. Hierbei spielen vor allem die verfahrenstechnischen Parameter wie Energieeintrag im Rührkessel eine Rolle, die einen Einfluss auf die vorherrschenden Kristallisationsmechanismen wie Abrieb, sekundäre Keimbildung und Aggregation haben.

Da der Virialkoeffizient über die Wechselwirkungen mit der Proteinlöslichkeit gekoppelt ist, kann er auch Löslichkeitsmessungen einsparen. Die Kenntnis der Löslichkeit ist notwendig zur Berechnung der Übersättigung, die ein sehr wichtiger Parameter zum Verständnis und zur Auslegung der Kristallisation ist. Ohne ein aufwändiges Phasendiagramm zu ermitteln, können mithilfe des Virialkoeffizienten geeignete Übersättigungen und damit Kristallisationsbedingungen abgeschätzt werden.

Zunächst wird demonstriert, dass der Virialkoeffizient den Einfluss der Parameter pH-Wert, Fällungsmittelart und -konzentration ebenso wie Temperatur auf die herrschenden Wechselwirkungen zwischen den Proteinen in einem Parameter abbildet. Zusätzlich zu den Messungen mit statischer Lichtstreuung wurde der Virialkoeffizient mit Hilfe von DLVO-Potentialen berechnet. Bei geringen Salzkonzentrationen stimmen die berechneten B_{22} -Werte quantitativ sehr gut mit den gemessenen Werten überein, sogar ohne Parameterfitting. Mit steigender Ionenstärke wird die Übereinstimmung qualitativ, da die DLVO-Theorie nur für geringe Salzkonzentrationen gültig ist [4]. Die an-

schließenden Kristallisationsexperimente bestätigen den „crystallization slot“ auch für die batch-Kristallisation und zeigen die Proteinkonzentration als zusätzlichen Parameter. Zusätzlich konnten wichtige und detaillierte Einblicke in Keimbildungs- und Wachstumsmechanismen gewonnen werden.

Der Zusammenhang zwischen den Wechselwirkungen, d.h. zwischen Virialkoeffizient, dem Kristallisationsprozess und den Präzipitateigenschaften konnte für die Proteine Lysozym und BSA gezeigt und quantifiziert werden. Darauf basierend wurde ein Leitfaden für den industriellen Anwender zur Optimierung seiner Aufarbeitung entwickelt.

Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht.

- [1] Wilson WW. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth - A practical approach. *J Struct Biol* 2003;142(1):56-65.
- [2] George A, Wilson WW. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. *Acta Crystallogr D* 1994;50:361-65.
- [3] Wanka J, Peukert W. Die Bedeutung des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten für die Proteinkristallisation. *Chem-Ing-Tech* 2006;78(3):273-78.
- [4] Curtis RA, Pophale RS, Deem MW. Monte Carlo simulations of the homopoly-peptide pair potential of mean force. *Fluid Phase Equilibria, A Festschrift in Honor of John M Prausnitz* 2006;241(1-2):354-67.