

Abschlussbericht

Förderperiode 2006-2008

Doktorand: Dipl.-Ing. Constantin Frerick

Universität Dortmund, Lehrstuhl für Thermische Verfahrenstechnik,
Emil-Figge Str. 70, 44227 Dortmund

Betreuer: Prof. Dr.-Ing. A. Górak

Universität Dortmund, Lehrstuhl für Thermische Verfahrenstechnik,
Emil-Figge Str. 70, 44227 Dortmund

MBFSt-Kennziffer 2692

Dynamische Modellierung, Simulation und Optimierung generischer Aufreinigungsprozesse von Biomolekülen

Kurzfassung

In dieser Arbeit wird ein generisches Prozessmodell zur dynamischen Simulation von Proteinaufreinigungsprozessen vorgestellt. Durch dessen Kopplung mit einem evolutionären Optimierungsalgorithmus können die Sequenz und das Design der Grundoperationen von Aufreinigungsprozessen auf Basis detaillierter Modelle simultan optimiert werden. Die Anwendbarkeit dieses Optimierungswerkzeugs wird anhand eines Beispielprozesses zur Aufreinigung von humanem Serumalbumin demonstriert.

1. Einleitung

Die Herstellung von biotechnologischen Wirk- und Wertstoffen, wie fermentativ produzierten Proteinen, ist mit zum Teil sehr aufwändigen Aufbereitungs- und Reinigungsschritten verbunden. Dieses so genannte Downstream Processing besitzt einen hohen Stellenwert für die pharmazeutische Industrie, da es mehr als 50% der gesamten Produktionskosten verursachen kann [1]. Die komplexen dynamischen Vorgänge, welche in der Aufbereitung biologisch aktiver Produkte auftreten, machen eine auf Experimenten beruhende Prozessauslegung, wie sie zurzeit noch Stand der Technik ist, zeitaufwendig, teuer und kompliziert. Durch die zunehmende Bedeutung biotechnologischer Produkte wird der Bedarf an geeigneten Methoden für eine effektive Prozessauslegung zusätzlich verstärkt. In der chemischen Industrie ist es bereits Stand der Technik detaillierte mathematische Modelle der verwendeten Grundoperationen unter Berücksichtigung komplexer Wärme- und Stofftransportvorgänge sowie Reaktionskinetiken zum Scale-Up, zur Prozessanalyse und zur Prozessoptimierung zu nutzen. Im Gegensatz dazu ist die Anwendung von detaillierten Modellen zur Auslegung biotechnologischer Prozesse nicht verbreitet. Hier werden im Bereich der Kostenabschätzung und der Optimierung von Prozessabläufen bislang Simulationsprogramme auf der Basis von Short Cut Modellen eingesetzt [2, 3, 4]. Diese Short Cut Modelle liefern eine grobe Abschätzung der in der Grundoperation ablaufenden Vorgänge und erreichen daher häufig nicht die für eine Prozessauslegung erforderliche Genauigkeit. Weiterhin können die Auswirkungen veränderter Betriebsbedingungen auf das Prozessverhalten nicht zufrieden stellend abgebildet werden. Somit ergibt sich die Notwendigkeit detaillierte dynamische Modelle zu entwickeln, welche die Stofftransportvorgänge in den Grundoperationen mit einer adäquaten Genauigkeit wiedergeben und prädiktive Aussagen über deren Prozessverhalten zulassen. Obwohl detaillierte Modelle für einige Grundoperationen (z.B. die Chromatographie [5]) in der Literatur beschrieben werden, existiert bisher noch kein Ansatz, der es erlaubt detaillierte dynamische Modelle für verschiedene Grundoperationen zu einem Gesamtprozessmodell zusammenzufassen, um damit eine Optimierung des Gesamtprozesses durchführen zu können. Daher wurde in dieser Arbeit eine generische Simulations- und Optimierungsmethode für Aufreinigungsprozesse biopharmazeutischer Produkte auf der Basis detaillierter dynamischer Modellansätze entwickelt.

2. Modellentwicklung

2.1. Generisches Prozessmodell

Ein typischer Aufreinigungsprozess für Biomoleküle umfasst in der Regel mehrere Aufreinigungsschritte, wie z.B. Produktgewinnung, Produktreinigung und Feinreinigung [6]. Da jedoch für jeden Verfahrensschritt diverse alternative Grundoperationen existieren, resultieren verschiedene mögliche Varianten der Prozesssequenz. So kann z.B. die Feinreinigung mit Hilfe einer konventionellen Chromatographie oder einem Membranadsorber durchgeführt werden. Mit dem entwickelten generischen Prozessmodell ist es möglich, diese unterschiedlichen

Verschaltungsmöglichkeiten der Grundoperationen in einem Prozess abzubilden. Die flexible Modellstruktur des Prozessmodells, welche es auf einfache Weise ermöglicht beliebige Prozessvarianten zu generieren, ist in Abbildung 1 dargestellt.

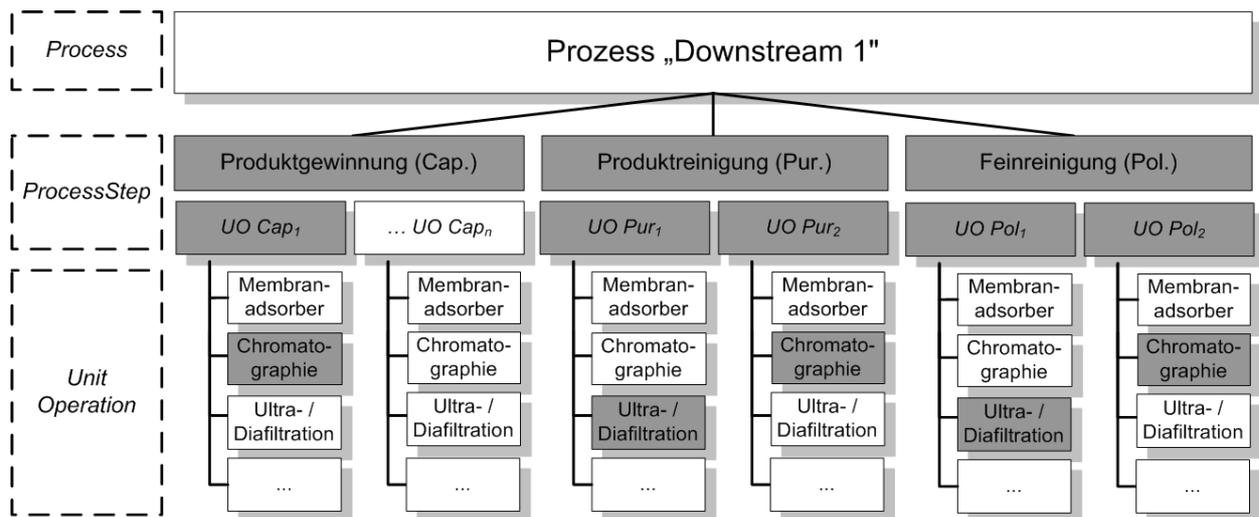


Abbildung 1: Modellhierarchie des generischen Prozessmodells

In dem Modul *Process* des generischen Prozessmodells wird die Konfiguration des Aufreinigungsprozesses, also die Anzahl und der Typ der Grundoperation für jeden Prozessschritt und deren Verschaltung, festgelegt. Zusätzlich erfolgt die Modellierung von zeitdiskreten Ereignissen, die die während eines Aufreinigungsprozesses auftretenden Operationen, wie z.B. Beladen, Produktfraktionierung, Leeren eines Tanks, charakterisieren. Hierdurch wird es ermöglicht, einen kompletten Batchaufreinigungsprozess zu simulieren. In dem Untermodell *ProcessStep* werden die einzelnen ausgewählten Grundoperationen für den jeweiligen Prozessschritt aufgerufen. Die Modellgleichungen der Grundoperationen sind in dem Model *UnitOperation* hinterlegt. Die nachfolgenden Grundoperationen sind bisher in das generische Prozessmodell implementiert worden:

- Ionenaustausch (IEX) Membranadsorber,
- Ionenaustausch (IEX) Chromatographie,
- Gelfiltration (SEC)
- Ultra-/ Diafiltration (UF/ DF) und
- Zentrifugation.

Der Aufreinigungszyklus mit einer Chromatographiesäule, bzw. mit einem Membranadsorber, umfasst verschiedene Operationen, wie Beladen, Waschen, Elution etc. Diese können mit Hilfe der implementierten dynamischen Modelle abgebildet werden. Um dem Anwender eine größtmögliche Modellierungsflexibilität zu bieten, wurden Modelle unterschiedlicher Modellierungstiefe, wie in Abbildung 2 dargestellt, implementiert.

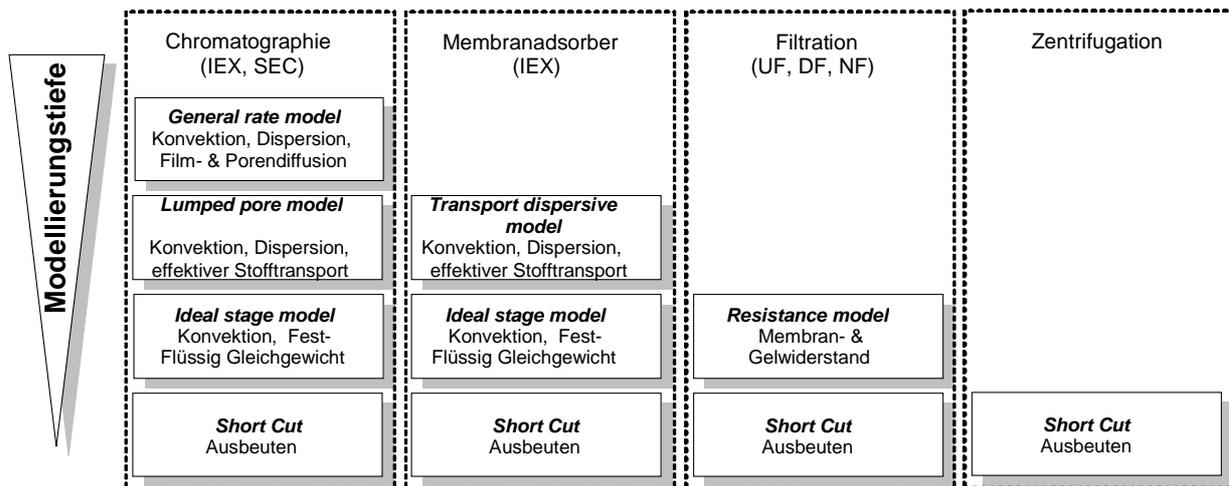


Abbildung 2: Modellierungstiefen der Grundoperationen

Der Detaillierungsgrad im Prozessmodell reicht von Short Cut Modellen [7] bis zum komplexen *General Rate Model* der Chromatographie [8]. Im Folgenden werden die für die Optimierungsstudie verwendeten Modelle im Detail vorgestellt.

2.2. IEX Membranadsorber

Das *Transport Dispersive Model* für Ionenaustauschmembranadsorber basiert auf der Annahme, dass die Strömung durch die als zylindrisch angenommenen Membranporen einer dispersen Pfropfenströmung entspricht. Ferner wird von einer isothermen konkurrierenden Adsorption der Komponenten ausgegangen. Die Ionenaustauschliganden sind auf der inneren Oberfläche der Membranporen immobilisiert, wodurch die Bindungsplätze frei zugänglich für die Proteine sind. Konzentrationsgradienten sind in radialer Richtung vernachlässigbar [9]. Abbildung 3 zeigt die schematische Darstellung des Membranadsorbermodells.

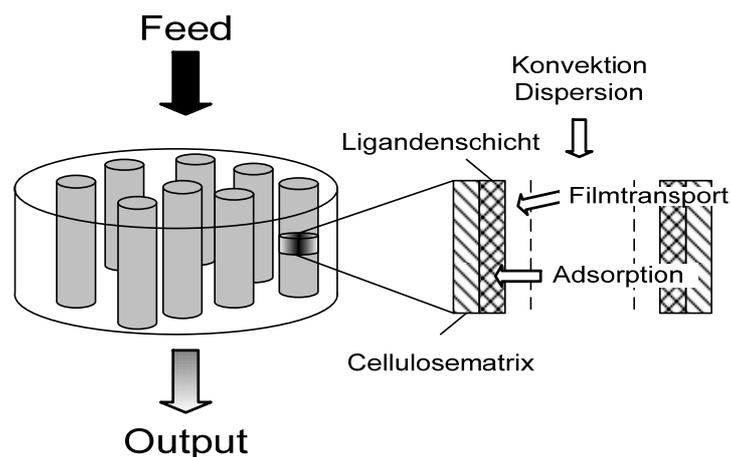


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Membranadsorbermodells

Modellierung der mobilen, fluiden Phase

Durch Bilanzierung der mobilen fluiden Phase wird für die einzelnen Komponenten folgende partielle Differentialgleichung formuliert [9]:

$$\frac{\partial \mathbf{c}_i}{\partial t} + u_{int} \frac{\partial \mathbf{c}_i}{\partial x} + \frac{1 - \varepsilon_{mem}}{\varepsilon_{mem}} \frac{\partial \mathbf{q}_i}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 \mathbf{c}_i}{\partial x^2} \quad i = 1 \dots N \quad (1)$$

Stofftransportwiderstände durch den flüssigen Grenzfilm und die Ligandenschicht werden durch einen effektiven Stoffübergangskoeffizienten berücksichtigt:

$$\frac{\partial \mathbf{q}_i}{\partial t} = k_{eff,i} a_{Mem} (\mathbf{c}_i - \mathbf{c}_i^*) \quad i = 1 \dots N \quad (2)$$

An der Phasengrenzfläche steht die stationäre Phase mit der flüssigen Phase im Gleichgewicht:

$$\mathbf{q}_i = f(\mathbf{c}_1^*, \dots, \mathbf{c}_N^*) \quad i = 1 \dots N \quad (3)$$

Adsorptionsisotherme

Das Phasengleichgewicht zwischen stationärer und fluider Phase wird mit Hilfe des *Steric Mass Action* (SMA) Modells [10] berechnet. Dieses Modell wurde für die konkurrierende Adsorption von Proteinen auf Ionenaustauscharzen entwickelt [11]. In dieser Arbeit erfolgt eine Übertragung des SMA Modells auf die kompetitive Adsorption von Proteinen auf IEX Membranadsorbentien. Für ein System mit $N-1$ Proteinen und einer Salzkomponente ($i=1$) können $N-1$ Reaktionsgleichungen, die den stöchiometrischen Austausch jedes einzelnen Proteins mit dem Salzgegenion beschreiben, formuliert werden als:



Hierbei wird die unspezifische Adsorption aufgrund hydrophober Wechselwirkungen oder anderer Bindungsmechanismen zwischen den Proteinen und den Liganden vernachlässigt. Die Gleichgewichtskonstante für den Ionenaustausch-Prozess ist definiert als:

$$K_i \equiv \left(\frac{\mathbf{q}_i}{\mathbf{c}_{p,i}} \right) \left(\frac{\mathbf{c}_{p,1}}{\bar{\mathbf{q}}_1} \right)^{\nu_i} \quad i = 2 \dots N \quad (5)$$

Die Elektroneutralitätsbedingung erfordert [11]:

$$\lambda \equiv \frac{\bar{\mathbf{q}}_1}{M_{W,1}} + \sum_{i=2}^n (\nu_i + \sigma_i) \frac{\mathbf{q}_i}{M_{W,i}} \quad i = 2 \dots N \quad (6)$$

Anfangs- und Randbedingungen

Unter der Annahme, dass der Membranadsorbent mit dem Beladungspuffer äquilibriert ist, lauten die Anfangsbedingungen für das Salzgegenion:

$$\mathbf{c}_1(t = 0, 0 < z < l_{mem}) = \mathbf{c}_{1,0} \quad (7)$$

$$\mathbf{q}_1(t = 0, 0 < z < l_{mem}) = \Lambda \quad (8)$$

und für die Proteine gilt:

$$c_i(t = 0, 0 < z < l_{mem}) = 0 \quad i = 2 \dots N \quad (9)$$

$$q_i(t = 0, 0 < z < l_{mem}) = 0 \quad i = 2 \dots N \quad (10)$$

Am Membraneintritt und –austritt gelten die *Danckwerts* Randbedingungen für geschlossene Systeme [12]:

$$c_i(t, z = 0) = c_{i,in} - \frac{D_{ax}}{u_{int}} \frac{\partial c_i(t)}{\partial z} \Big|_{z=0} \quad i = 1 \dots N \quad (11)$$

$$\frac{\partial c_i(t)}{\partial z} \Big|_{z=l_{mem}} = 0 \quad i = 1 \dots N \quad (12)$$

2.3. Ionenaustausch und Größenausschlusschromatographie

Die Modelle zur Beschreibung der chromatographischen Trennverfahren wurden auf der Basis eines existierenden Chromatographiemodells von *Altenhöner et al.* [13] und *Epping* [5] entwickelt. Das beschriebene Modell basiert auf dem sogenannten *Transport Dispersive* Modell in welchem neben dem konvektive Stofftransport der Komponenten in axialer Richtung Nichtidealitäten hervorgerufen durch Stofftransportwiderstände zwischen der mobilen und der stationären Phase und konkurrierende Mehrkomponentenadsorption berücksichtigt werden. Das existierende Modell wurde in dieser Arbeit um das oben beschriebene *Steric Mass Action* Modell zur Beschreibung des Ionenaustauschprozesses erweitert. Die Anfangs- und Randbedingungen zur Lösung der partiellen differentiellen Differentialgleichung werden analog zum Membranadsorbermodell formuliert.

2.4. Ultra- / Diafiltration

Zur Beschreibung des Permeatflusses bei der Ultra- bzw. Diafiltration wird ein Deckschichtmodell verwendet. Die Massenbilanzen für den Filtrationsprozess lauten unter der Annahme stationärer Bedingungen in dem Membranmodul [14] wie folgt:

$$\frac{d(c_{tank,i} V_{tank,ret})}{dt} = \dot{V}_{tank,in} c_{tank,in,i} - \dot{V}_{per} c_{per,i} \quad i = 1 \dots N \quad (13)$$

Der Zusammenhang zwischen der Feed- und Permeatkonzentration lautet:

$$c_{per,i} = (1 - f_{r,i}) c_{tank,i} \quad i = 1 \dots N \quad (14)$$

Für den Permeatfluss gilt:

$$j_P = \frac{\Delta p}{\eta(R_{mem} + R_{gel})} \quad (15)$$

Hierbei ist der Deckschichtwiderstand R_{get} eine Funktion des Permeatvolumens V_P [15].

3. Optimierungsalgorithmus

Zur gemischt-ganzzahligen, globalen Prozessoptimierung wird ein evolutionärer Algorithmus basierend auf differentieller Evolution verwendet [16]. In dem implementierten Algorithmus (Abbildung 4) werden in einem ersten Schritt die Optimierungsvariablen (z.B. Typ der Grundoperation, Säulendurchmesser, Membranflächen, Elutionsgradientensteigung, etc.) definiert und die Parameter zur Steuerung des Algorithmus, wie maximale Generationszahl Gen_{max} , Anzahl der Eltern NP , Mutationswahrscheinlichkeit MR , Crossoverrate CR , dem Verstärkungsfaktor F und der maximalen Abweichung vom Optimum ε_{max} festgelegt.

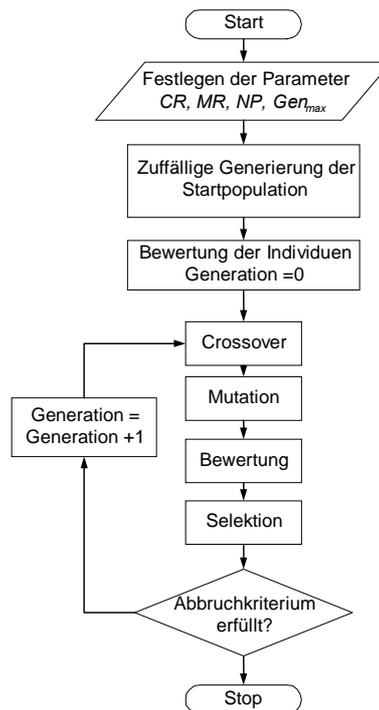


Abbildung 4: Ablaufschema des evolutionären Algorithmus

Die Startpopulation wird zufällig über den gesamten zulässigen Suchraum generiert. Anschließend werden die Hauptoperationen des Algorithmus Crossover, Mutation und Selektion durchgeführt. Die Operation Mutation dient dazu, lokalen Minima zu entkommen. Ein durch Mutation und Crossover erzeugter Elter, der durch Änderung diskreter Strukturvariablen und kontinuierlicher Variablen entstehen kann, wird hinsichtlich seiner Fitness mit dem Originalelter verglichen. Wenn die Fitness des neuen Elters besser ist als die des Originals, so wird dieser durch den Neuen ersetzt. Ansonsten wird der Originalelter in die nächste Generation übernommen. Die Abfolge von Crossover, Mutation und Selektion wird solange durchgeführt bis das Abbruchkriterium erfüllt ist. Die Einhaltung von Randbedingungen während der Optimierung wird durch Einführung geeigneter Strafterme in der Fitnessfunktion gewährleistet.

4. Optimierungsstudien

Die vorgestellten Modelle wurden in die kommerzielle gleichungsorientierte Simulationssoftware Aspen Custom Modeler™ implementiert. Über eine Visual Basic Schnittstelle ist der evolutionäre Optimierungsalgorithmus mit dem Simulationsprogramm verknüpft. Anhand einer Fallstudie wird die Anwendbarkeit dieses Optimierungswerkzeugs demonstriert. Als Beispielprozess wurde die chromatographische Aufreinigung von humanem Serumalbumin aus euglobulinfreiem Plasma ausgewählt [17]. Dieser Prozess besteht aus einem Anionenaustauschschritt (AIEX) bei pH= 5.4 gefolgt von einer Diafiltration zum Pufferwechsel und einem Kationenaustauschschritt (CIEX) bei pH= 4,2. Anschließend erfolgt einer Aufkonzentrierung der Proteinlösung auf 50 g HSA/l bevor das Produkt einer weiteren Feinreinigung durch Gelfiltration unterzogen wird (Abbildung 5 A).

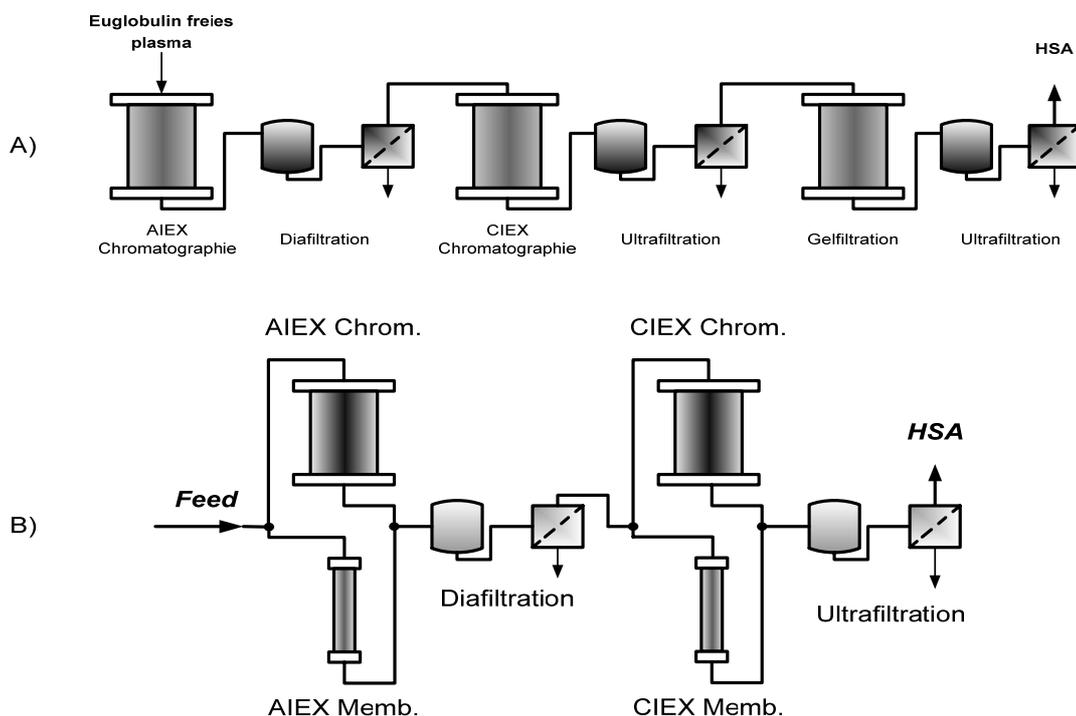


Abbildung 5: A) Der HSA Aufreinigungsprozess B) Die in der Optimierungsstudie verwendete Überstruktur

In dieser Fallstudie wird der vierstufige Aufreinigungsprozess bis zur Feinreinigung betrachtet (Abbildung 5 B). Es sollen 15 l eines Proteingemisches aufgereinigt werden, dessen Zusammensetzung, und einige Eigenschaften der Proteine in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Tabelle 1: Zusammensetzung und Eigenschaften der Proteine im Feed [18, 19]

	c_{feed} [g/l]	M_w [kg/mol]	pI [-]
HSA	1	67	4.8
IgG	0,5	152	5.9
Komponente C	0,12	162	4.5
Komponente D	0,26	50	4.1
HSA Dimer	0,01	134	4.8
HSA Trimer	0,05	201	4.8

Alternativ zu den konventionellen Chromatographieschritten können IEX Membranadsorber eingesetzt werden, wodurch sich vier unterschiedliche Prozessvarianten ergeben (Tabelle 2, Abbildung 5 B).

Tabelle 2: Prozessvarianten

<i>Prozessvariante</i>	<i>Konfiguration</i>
DSP ₁	AIEX Chrom. / CIEX Chrom.
DSP ₂	AIEX Chrom. / CIEX Memb.
DSP ₃	AIEX Memb. / CIEX Chrom.
DSP ₄	AIEX Memb. / CIEX Memb.

Mit Hilfe des evolutionären Optimierungsalgorithmus soll der kostenoptimale Prozess ermittelt werden. Somit ergibt sich als zu minimierende Zielfunktion die Summe der Kosten aller Grundoperationen bezogen auf die Produktmenge:

$$Z = \text{Min fitness} = \text{Min} \left(\frac{1}{m_{\text{product}}} \sum_{n=1}^4 TC_n \right) \quad (16)$$

Im Rahmen der Fallstudie gelten folgende Randbedingungen für das Produkt:

$$Pur_{HSA} > 0.93 \quad Y_{HSA} \geq 0.75 \quad (17)$$

Als diskrete Optimierungsvariablen y_1 und y_2 werden in dieser Fallsstudie die Materialien des ersten und zweiten Ionenaustauschschrittes verwendet. Für diese gilt:

$$y_1 \in [Mat_1, Mat_2] \quad (18)$$

$$y_2 \in [Mat_3, Mat_4] \quad (19)$$

Simultan zu der Prozessstruktur werden die kontinuierlichen Variablen, Säulendurchmesser d_{col} bzw. die Höhe des zylindrischen Membranadsorbermoduls h_{mem} und die Lineargeschwindigkeit u_s , mit der die Ionenaustauschprozesse betrieben werden, optimiert.

Die für die Simulation benötigten Stofftransportparameter, wie zum Beispiel Stoffübergangs-, Dispersionskoeffizienten und Filtrationswiderstände, wurden mit Hilfe von Korrelationen aus der Literatur bestimmt [20, 21]. Die SMA Parameter zur Beschreibung des Anionenaustauschs wurden für HSA und IgG auf AIEX Membranadsorbern bei der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH experimentell bestimmt [22]. Durch Korrelation anhand des isoelektrischen Punktes und der Molmasse werden die SMA Parameter für die Komponenten C und D abgeschätzt. Das Adsorptionsverhalten der Proteine auf Kationenaustauschmaterialien wurde anhand des isoelektrischen Punktes und der Molmasse korreliert bzw. SMA Parameter der Literatur entnommen [23]. Da IEX Membranadsorber und IEX Chromatographiematerialien die gleiche Ligandenchemie besitzen [24], werden in den Simulationsstudien für Ionenaustauschmembranadsorber und -chromatographie in erster Näherung die gleichen SMA Parameter verwendet, wobei die ionische Kapazität λ für Ionenaustauschharze um den Faktor 3 höher liegt als für IEX Membranadsorber. Die Berechnung der Betriebskosten erfolgt nach der Annuitätenmethode. Hierbei werden die Investitionskosten auf periodische Zahlungen umgerechnet und zu den Produktionskosten addiert. Die einmaligen Investitionskosten werden mit Hilfe der faktoriellen Methode nach *Lang* [25] bestimmt, wobei die Kosten für die einzelnen Apparate der Literatur [26] entnommen wurden. Die Produktionskosten resultieren aus den Rohstoff-, Betriebsmittel-, Energie- und Personalkosten.

4.1. Ergebnisse

Das Konvergenzverhalten des gemischt-ganzzahligen Optimierungsproblems ist in Abbildung 6 dargestellt. Hier ist die Fitness der jeweiligen Eltern gegen die Generationszahl aufgetragen. Ausgehend von einer zufällig erzeugten Startpopulation bestehend aus insgesamt sieben unterschiedlichen Eltern wird durch den Optimierungsalgorithmus nach 70 Generationen die optimale Prozesskonfiguration DSP₃ bestehend aus einem AIEX Membranadsorber zur Produktgewinnung und einer CIEX Chromatographiesäule zur Produktreinigung gefunden.

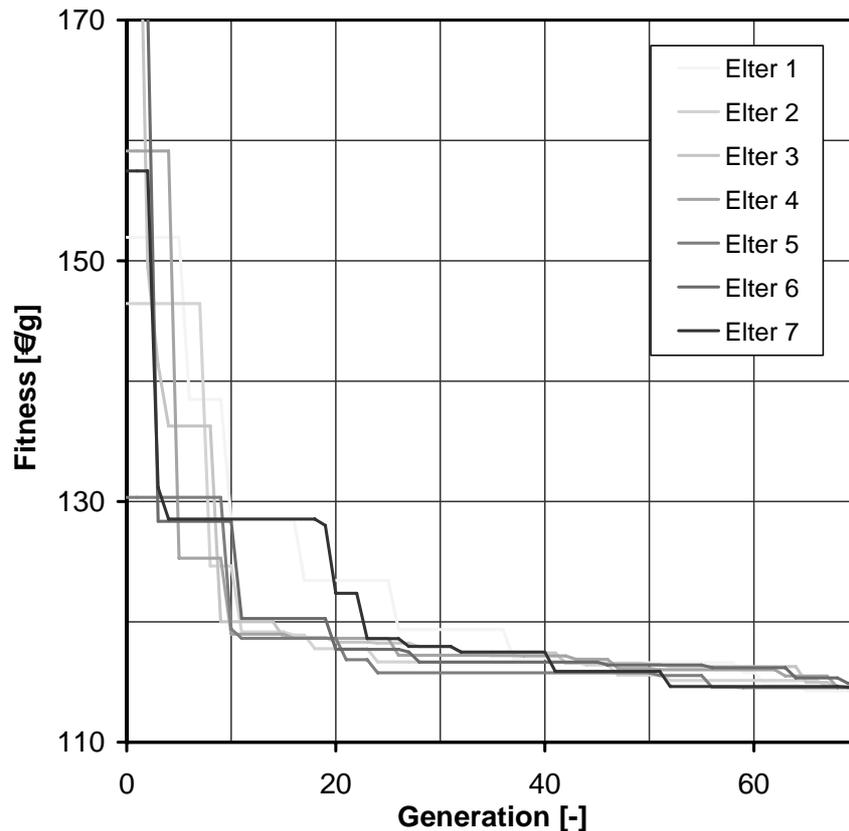


Abbildung 6: Konvergenzverhalten des evolutionären Algorithmus

In

Tabelle 3 sind die Ergebnisse für die optimale Prozesskonfiguration DSP_3 und für den optimierten konventionellen Prozess DSP_1 zusammengefasst. Verglichen mit dem optimierten DSP_1 sind die Kosten bei der optimalen DSP_3 -Konfiguration um 20% reduziert. Der Austausch der AIEX Chromatographie mit einer AIEX Membran führt zu einer Steigerung der Ausbeute bei der Produktgewinnung von 96% in DSP_1 auf 99.6% in DSP_3 . Durch die erhöhte Ausbeute im ersten Ionenaustauschschritt kann die Lineargeschwindigkeit in der CIEX Chromatographiesäule beim DSP_3 im Vergleich zum optimierten DSP_1 von 282 cm/h auf 294 cm/h gesteigert werden, ohne dass die Gesamtausbeute unter den Grenzwert $Y_{tot,HSA} \geq 75\%$ sinkt. Im optimalen Prozess DSP_3 wird bei der Produktgewinnung mittels Membranadsorber im ersten Aufreinigungsschritt eine geringere Produktreinheit erzielt als beim optimierten DSP_3 . Diese geringere Reinheit wird jedoch durch die nachfolgenden Aufreinigungsschritte kompensiert, so dass die resultierenden Produktreinheiten für beide Prozesse vergleichbar sind und mit $Pur_{tot,HSA} = 94\%$ oberhalb der geforderten Mindestgrenze liegen. Die gesteigerte Produktivität des AIEX Membranadsorbers im Vergleich zur konventionellen AIEX Chromatographiesäule führt in dieser Fallstudie zu einer signifikanten Reduktion der Prozesszeit um 50%, woraus die verringerten Betriebs- und Gesamtkosten resultieren.

Tabelle 3: Simulationsergebnisse für den optimalen Prozess DSP_3 und den optimierten DSP_1

	<i>Optimaler Prozess DSP₃</i>		<i>Optimierter DSP₁</i>	
<i>Fitness</i> [€/g]	114		148	
<i>Pur_{tot,HSA}</i> [%]	93,9		94,1	
<i>Y_{tot,HSA}</i> [%]	79,0		75,4	
	<i>AIEX Memb.</i>	<i>CIEX Chrom.</i>	<i>AIEX Chrom.</i>	<i>CIEX Chrom.</i>
<i>h_{mem}</i> bzw. <i>d_{col}</i> [cm]	35,1	7,0	7,8	7,0
<i>u_s</i> [cm/h]	252	294	294	282
<i>Y_{HSA}</i> [%]	99,6	99,1	96,0	99,4
<i>Pur_{HSA}</i> [%]	69,5	94,0	79,5	94,2
<i>Pr</i> [kg/l/d]	12,5	1,3	0,5	1,2

Da die Optimierungsstudien mit detaillierten, dynamischen Modellen durchgeführt werden, ist es möglich die Konzentrationsverläufe der einzelnen Komponenten in den jeweiligen Grundoperationen über die Zeit aufzutragen und für eine detaillierte Prozessanalyse zu nutzen. In Abbildung 7 sind die Konzentrationsverläufe für HSA, IgG, die Komponente C und das Trimer von HSA für den optimalen DSP₃ über die Zeit dargestellt. In dem AIEX Membranadsorber wird IgG als Hauptverunreinigung abgetrennt, weil IgG bei einem pH= 5.4 positiv geladen ist und daher nicht auf der Membran bindet. Anschließend wird das Eluat mit dem Produkt ($c_{HSA} \approx 10$ g/l) einer Diafiltration unterzogen.

Da HSA durch die ausgewählte 10 kDA Filtermembranen nicht vollständig zurückgehalten wird ($f_{R,HSA} = 0.99$), ist eine Abnahme von HSA während des Filtrationsprozesses zu beobachten. Für die kleinere Komponente C beträgt der Retentionsfaktor $f_{R,Komp.C} = 0.92$, wodurch eine stärkere Abnahme der Konzentration dieser Komponente als bei HSA während des Diafiltrationsprozesses resultiert und sich somit eine weitere Aufreinigung des HSA ergibt. Während der CIEX Chromatographie bricht die bei pH= 4.2 nicht bindende Komponente C mit dem Totvolumen der Chromatographiesäule durch. Die Asymmetrie des Elutionspeaks für HSA wird durch Stofftransporteffekte und vornehmlich durch den verwendeten Elutionsgradienten erzeugt. Das Eluat wird anschließend auf $c_{HSA} = 50$ g/l aufkonzentriert. Die Produktlösung mit der HSA Reinheit 94% enthält noch die Oligomere von HSA und die Komponente D als Verunreinigung.

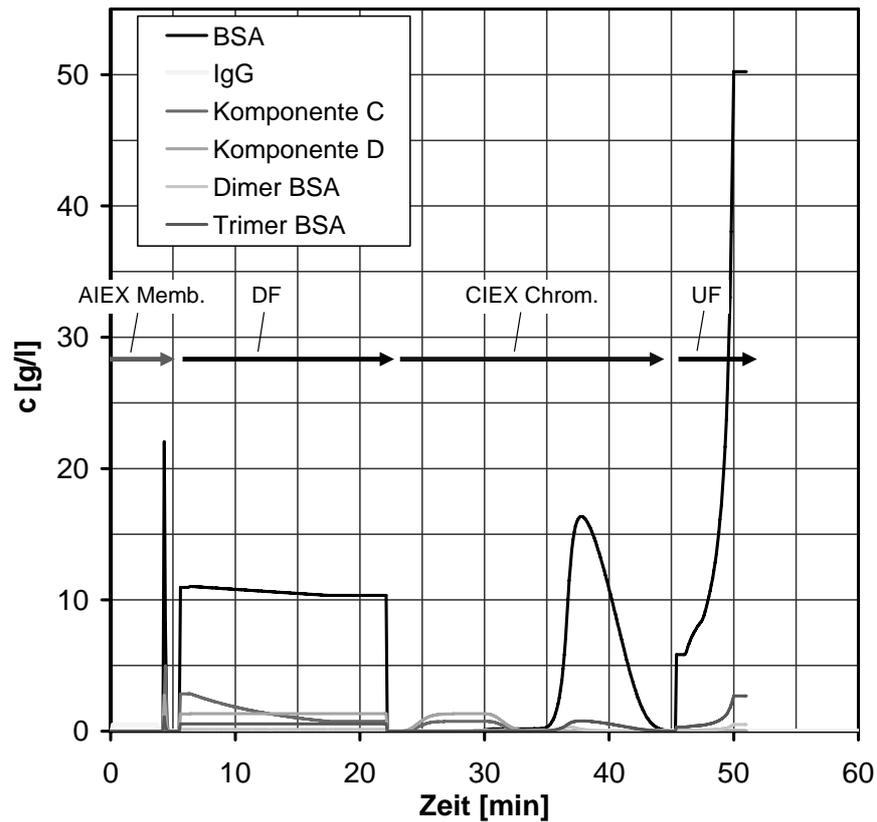


Abbildung 7: Konzentrationsprofile für HSA, IgG, die Komponenten C und D und das Dimer bzw. das Trimer von BSA

Eine Auftragung der Schaltzeiten für die jeweiligen Grundoperationen in einem Gantt-Diagramm liefert den Prozessablaufplan. In Abbildung 8 sind die Prozessablaufpläne für den Referenzfall DSP_1 und für den optimalen Prozess DSP_3 dargestellt. Mit einer Batchzeit von ca. 1,5 Stunden ist die AIEX Chromatographie der zeitintensivste Aufreinigungsschritt im optimierten DSP_1 . Durch Einsatz eines AIEX Membranadsorbers anstatt einer konventionellen Chromatographiesäule kann in diesem Fallbeispiel die Prozesszeit im ersten Aufreinigungsschritt auf ca. 10 min reduziert werden. Hierdurch resultiert beim optimalen Prozess DSP_3 eine Verringerung der gesamten Prozesszeit um 50% im Vergleich zum DSP_1 .

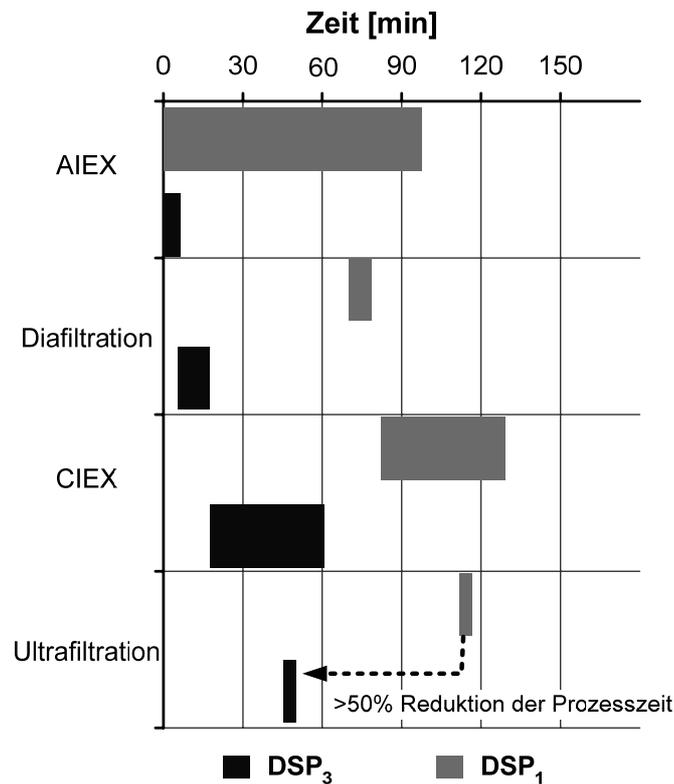


Abbildung 8: Prozessabläufe für DSP₁ und DSP₃

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist die Entwicklung eines generischen Prozessmodells für die Simulation von Proteinaufreinigungsverfahren basierend auf detaillierten dynamischen Modellen für Ionenaustauschmembranadsorber, -chromatographie und Ultra-/ Diafiltration vorgestellt worden. Durch die flexible Struktur dieses Prozessmodells können beliebige Downstream Prozesse simuliert werden und in Hinblick auf das Prozessverhalten miteinander verglichen werden. Im Gegensatz zu kommerziellen Simulationsprogrammen, welche auf Short Cut Modellen basieren, können mit dem generischen Prozessmodell Vorhersagen über das Gesamtprozessverhalten bei geänderten Prozessbedingungen getroffen werden. Die dynamischen Konzentrationsprofile der einzelnen Komponenten können für eine detaillierte Prozessanalyse genutzt werden. Eine Möglichkeit zur Gesamtprozessoptimierung wurde durch die Kopplung des Simulationswerkzeugs mit einem evolutionären Algorithmus realisiert. Hierdurch ist die simultane Optimierung von Prozessstruktur und -design simultan unter Minimierung der Prozesskosten möglich. Eine Fallstudie für die Aufreinigung von HSA hat gezeigt, dass der Einsatz von Membranadsorbentien anstelle von konventionellen Ionenaustauschmaterialien die Prozesszeit und gleichzeitig die Betriebskosten bei gleicher Ausbeute und Produktreinheit signifikant verringern kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit fließen in die an der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen geplante Simulationsplattform für Herstellungsverfahren biotechnologischer Produkte, welche auf einem ereignisorientierten Softwaretool [27] basiert, ein.

Veröffentlichungen im Rahmen dieses Max-Buchner Forschungsstipendiums

Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A.; Tappe, A.; Melzner, D.; Simulation of a human serum albumin downstream process incorporating ion-exchange membrane adsorbers, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47 (2008), p. 1128-1138.

Frerick, C., P. Kreis, and A. Górak, Optimierung von Proteinaufreinigungsprozessen basierend auf einem generischen Prozessmodell, *Chemie Ingenieur Technik*, 80(2008), p. 97-106.

Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A. Simulation and Optimisation of Protein Downstream Processes based on a Dynamic Generic Process Model, PREP Baltimore, Maryland, USA (2007)

Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A.; Dynamische Simulation und Optimierung von Proteinaufreinigungsprozessen auf der Basis eines generischen Prozessmodells, *Gemeinsame Sitzung der ProcessNet-Fachausschüsse „Prozess- und Anlagentechnik“ und „Fluidverfahrenstechnik“* Karlsruhe, Germany (2007)

Frerick C.; Kreis, P.; Górak, A.; Development of a Generic Process Model for Dynamic Simulation of Protein Downstream Processes, *AIChE Annual Meeting* San Francisco, USA (2006)

Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A.; Mixed Integer Dynamic Optimisation of Protein Purification Processes, *SPICA* Innsbruck, Austria (2006)

Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A.; Melzner, D.; Simulation and optimisation of the downstream process for purification of human serum albumin by using ion exchange membrane adsorbers, *Euromembrane* Taormina, Italien (2006)

Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A.; Detailed Modelling and Simulation of Downstream Processes for Biological Products, *ACHEMA* Frankfurt/Main, Germany (2006)

Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A.; Melzner, D.; Simulation and optimisation of the downstream process for purification of human serum albumin by using ion exchange membrane adsorbers, *Desalination* 200 (2006) p. 468-69.

Formelzeichen:

a_{mem}	m^2/m^3	Spezifische Membranoberfläche
A_s	m^2	Frontale Oberfläche
c_i	kg/m^3	Konzentration der Komponente i
c_i^*	kg/m^3	Gleichgewichtskonzentration der Komponente i
$c_{i,0}$	kg/m^3	Anfangskonzentration der Komponente i
$c_{in,i}$	kg/m^3	Eintrittskonzentration der Komponente i
$c_{tank,in,i}$	kg/m^3	Feedkonzentration der Komponente i im Filtertank
$c_{tank,i}$	kg/m^3	Konzentration der Komponente i im Filtertank
$c_{p,i}$	kg/m^3	Konzentration der Komponente i an der Ligandenschicht
$\bar{c}_{p,i}$	kg/m^3	Porenkonzentration der Komponente i
$c_{per,i}$	kg/m^3	Permeatkonzentration der Komponente i
d_{mem}	m	Membrandurchmesser
D_{ax}	m^2/s	Axialer Diffusionskoeffizient
D_i	m^2/s	Diffusionskoeffizient in freier Lösung
$f_{R,i}$	-	Retentionsfaktor
i		Komponente: i=1 entspricht dem Salzgegenion
j_p	$m^3/m^2/s$	Permeatfluss
K_i	-	SMA Gleichgewichtskonstante
$k_{eff,i}$	m/s	Effektiver Stoffübergangskoeffizient
$k_{l,i}$	m/s	Stoffübergangskoeffizient im Flüssigfilm
h_{col}	m	Säulenlänge
l_{mem}	m	Membrandicke
$m_{product}$	kg	Produktmenge
$M_{w,i}$	kg/mol	Molmasse
Mat_j		Material, j= 1 AIEX Chrom., j= 2 AIEX Membran, j=3 CIEX Chrom. J= 4 CIEX Membran
N	-	Anzahl der Komponenten
Δp	Pa	Druckverlust

q_i	kg/m ³	Konzentration der Komponente i in der stationären Phase
\bar{q}_1	kg/m ³	Freie Bindungsplätze in der stationären Phase
R_{gel}	m ⁻¹	Gelwiderstand
R_{mem}	m ⁻¹	Filterwiderstand
R_p	m	Porenradius
Pr	kg Produkt/ l Adsorbens / d	Produktivität
Pur_i	-	Reinheit der Komponente i
$Pur_{tot,i}$	-	Reinheit der Komponente i im Gesamtprozess
t	s	Zeit
TC_n	€/g	Herstellkosten der Grundoperation n
u_s	m/s	Lineargeschwindigkeit $u_s = \dot{V} / A_s$
u_{int}	m/ s	Zwischenkorngeschwindigkeit = u_s / ε
\dot{V}	m ³ / s	Volumenstrom
$\dot{V}_{tank,in}$	m ³ / s	Feedvolumenstrom in den Filtertank
$\dot{V}_{per,i}$	m ³ / s	Permeatvolumenstrom
$V_{tank,ret}$	m ³	Retentatvolumen
V_p	m ³	Permeatvolumen
y_k		Strukturvariable
Y_i	%	Ausbeute der Komponente i
$Y_{tot,i}$	%	Ausbeute der Komponente i im Gesamtprozess
Z	€/g	Zielfunktion der Optimierung

Griechische Symbole

ε_{max}	-	Maximale Abweichung vom Optimum
ε_{mem}	-	Membranporosität
ε_p	-	Festbettporosität
η	Pa s	Dynamische Viskosität
Λ	mol/m ³	Ionenaustauschkapazität
v_i	-	Charakteristische Ladung
σ_i	-	Sterischer Faktor

Literaturverzeichnis:

- [1] J. Thömmes, M.-R. Kula, Membrane Chromatography- An integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins, *Biotechnol. Prog.*, **1995**, 11, 357.
- [2] S. Sommerfeld, J. Strube, Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies, *Chem. Eng. Proc.*, **2005**, 44, 1123. DOI: 10.1016/j.cep.2005.03.006
- [3] S. S. Farid, J. Washbrook, N. J. Titchener-Hooker, Modelling biopharmaceutical manufacture: Design and implementation of SimBiopharma, *Comp. Chem. Eng.*, 2007, 31, DOI: 10.1016/j.compchemeng.200610020
- [4] K. Bauer, G. Schembecker, Synthese und Simulation von Downstreamprozessen, *Gemeinsame Sitzung der ProcessNet-Fachausschüsse Prozess- und Anlagentechnik und Fluidverfahrenstechnik*, Karlsruhe, 2007
- [5] M. Michel, A. Epping, A. Jupke, in *Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents* (Ed: H. Schmidt-Traub), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [6] E. N. Lightfoot, Bioseparations, *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 873, 259.
- [7] J. M. Montagna, *et al.*, Optimal design of protein production plants with time and size factor process models, *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 228. DOI: 10.1002/bit.1136
- [8] T. Gu, New Approach to a General Nonlinear Multicomponent Chromatography Model, *AIChE J.*, **1990**, 36, 784.
- [9] H.-C. Liu, J. R. Fried, Breakthrough of Lysozyme through an Affinity Membrane of Cellulose-Cibacron Blue, *AIChE J.*, **1994**, 40, 40.
- [10] V. Natarajan, S. Ghose, S. M. Cramer, Comparison of linear gradient and displacement separations in ion-exchange systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 78, 365. DOI: 10.1002/bit.10231
- [11] C. A. Brooks, S. M. Cramer, Solute affinity in ion-exchange displacement chromatography, *Chem. Eng. Sci.*, **1996**, 51, 3847. DOI: 10.1016/0009-2509(95)00287-1
- [12] P.V. Danckwerts, Continuous flow systems. Distribution of residence times, *Chem. Eng. Sci.*, **1953**, 2, 1.

- [13] Altenhöner, U., M. Meurer, J. Strube, and H. Schmidt-Traub, Parameter estimation for the simulation of liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, **1997**, 769: 59.
- [14] M. N. Tekics, Mathematical Model of Batch Ultrafiltration, *Hung. J. Ind. Chem.* **1993**, 22, 1.
- [15] A. Fane, C. J. Fell, M. T. Nor, in *Ultrafiltration: Membranes and Applications*, (Ed: A.R. Cooper), Plenum Press, New York, **1980**.
- [16] R. Storn, K. Price, Differential Evolution – A Simple and Efficient Heuristic for global Optimization over Continuous Spaces, *J. Global Optimization*, **1997**, 11, 341.
- [17] J. M. Curling, in *Methods of Plasma Protein Fractionation* (Ed: J.M. Curling), Academic Press, London, **1980**, 77–90.
- [18] T. Peters, *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*, Academic Press San Diego, **1996**.
- [19] *Wissenschaftliche Tabellen Geigy 2*, Teilband: Hämatologie und Humangenetik, Ciba-Geigy Basel, **1979**.
- [20] S. F. Chung, C. Y. Wen, Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidised beds, *AIChE J.*, **1968**, 14, 857.
- [21] G. Guiochon, S. Goshan-Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Boston, US, **1994**.
- [22] C. Frerick, P. Kreis, A. Górak, A. Tappe, D. Melzner, Simulation of a human serum albumin downstream process incorporating ion-exchange membrane adsorbers, *Chem. Eng. Proc.*, **2007**, in press. DOI:10.1016/j.cep.2007.07.013
- [23] A. Ladiwala, K. Rege, C.M. Breneman, S.M Cramer, A priori prediction of adsorption isotherm parameters and chromatographic behavior in ion-exchange systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 11710.
- [24] C. Charcosset, Purification of Proteins by Membrane Chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1998**, 71, 95.
- [25] H. J. Lang, Simplified approach to preliminary cost estimates, *Chem. Eng.*, **1948**, 55, 112.
- [26] R. Harrison, P. T., S. R. Rudge, D. P. Petrides, *Bioseparations Science and Engineering*, Oxford University Press, New York, **2003**.
- [27] A. Kaya, P. Balling, Einsatz der Simulation bei der Anlagenplanung, *Chemie Technik*, **2004**, 12, 12.