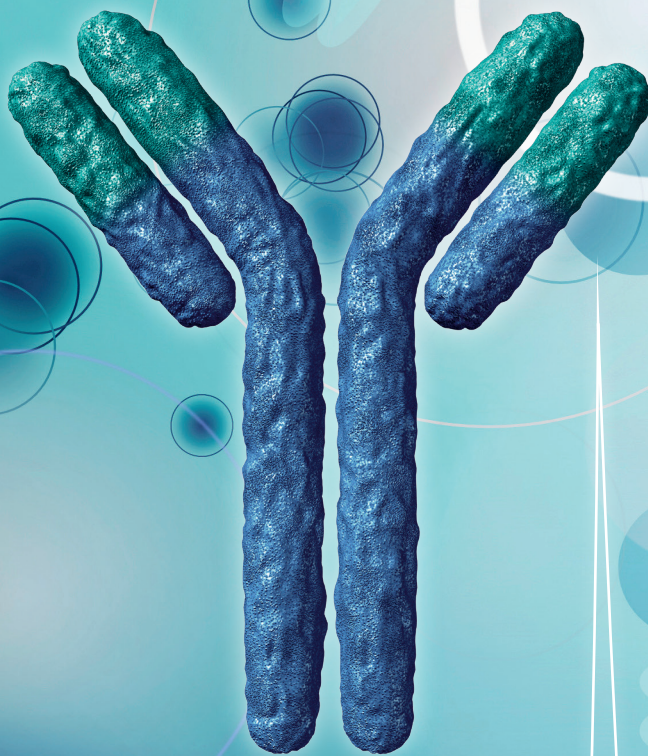




Aufreinigung von Antikörpern und Proteinen mittels Ionenaustauschchromatographie

THEORETISCHE UND PRAKTISCHE ASPEKTE BEI DER METHODENENTWICKLUNG

Dieses Whitepaper ...

... ist eine praktische Anleitung für die Entwicklung einer präparativen Methode zur Aufreinigung von Biomolekülen mittels Ionenaustauschchromatographie (IEX). Dieser Ansatz beinhaltet die Methodenentwicklung und Beladungsstudien im analytischen Maßstab sowie die Aufskalierung in den finalen Prozessmaßstab. Diese Herangehensweise spart wertvolle Kosten und Ressour-

cen und führt zu einem sicheren und erfolgreichen Ergebnis.

Zusätzlich werden zahlreiche Applikationen für die Aufreinigung von Proteinen und Antikörpern gezeigt.

Dieses Whitepaper ist daher eine exzellente Unterstützung für das Labor. Sie werden Schritt für Schritt durch die folgenden Aspekte geleitet:

1. Downstream-Strategien für eine erfolgreiche Aufreinigung

2. Anwendbare Trennmodi

3. Resinauswahl und Partikelgröße

4. Puffer und pH-Wert

5. Festlegung der Elutionsbedingungen

6. Gradientenanpassung und Optimierung der Elution

7. Flussraten-Optimierung

8. Reinigungsstrategien

Inhalt des Whitepapers

1. Einleitung.....	4
2. Schritte bei der Methodenentwicklung für IEX.....	6
2.1. Downstream Strategie: Implementierung von IEX in einen Prozess	8
2.2. Trennprinzip: Ionentauscher-Typ und Trennmodus	9
2.3. Auswahl eines passenden Resins.....	12
2.4. Auswahl und Zusammensetzung der mobilen Phase	14
2.5. Festlegung der Elutionsbedingungen.....	16
2.6. Gradienten- und Step-Elution: Wie Sie Ihre Zielsubstanz effizient eluieren	18
2.7. Optimierung der Flussrate	20
2.8. Cleaning-in-Place Prozesse	22
3. Beladungsstudien.....	24
4. Scale up.....	26
5. Schlussfolgerung.....	28

Die folgenden Icons leiten Sie durch dieses Whitepaper:



Anwendung: Aufreinigung von Antikörpern



Anwendung: Aufreinigung von Proteinen



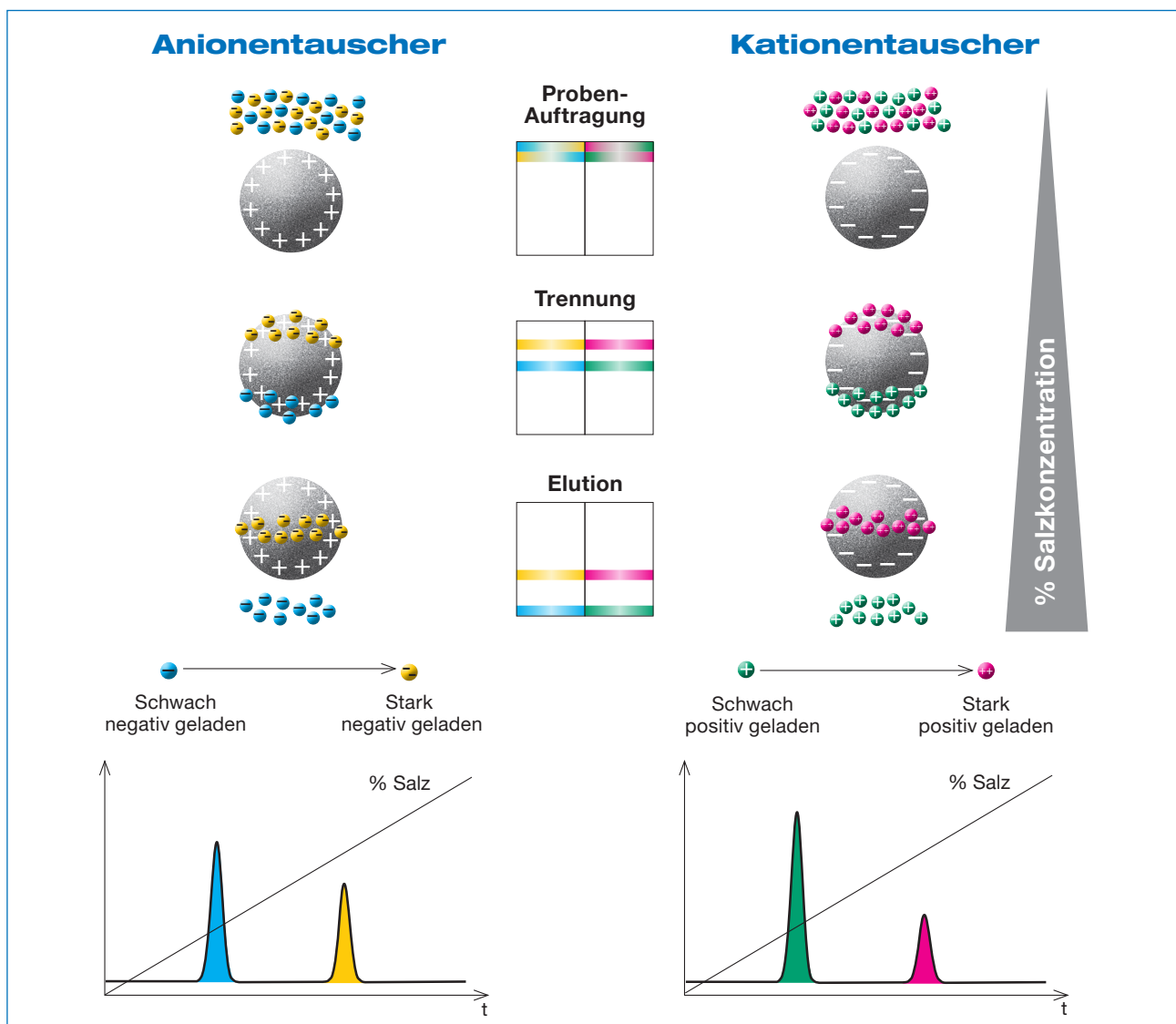
Praktische Beispiele und Expertentipps

1. Einleitung

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie bei der Aufreinigung von Antikörpern und Proteinen

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX) ist eine weitverbreitete Methode für die Aufreinigung von Biomolekülen. Diese Trenntechnik basiert auf der Wechselwirkung unterschiedlicher Ladungen der Zielmoleküle und der positiv oder negativ geladenen stationären Phase. Ein Anionentauscher (AEX)-Resin trägt eine positiv geladene Modifikation und interagiert bzw. bindet daher negativ geladene Ionen und Moleküle. Ein Kationentauscher (CEX)-Resin hingegen hat eine negativ geladene Modifikation und eignet sich daher für die Bindung von positiven Ladungen.

Proteine und Antikörper sind Polymere aus unterschiedlichen Aminosäure-Resten und bilden dreidimensionale Strukturen mit unterschiedlichen Oberflächenladungen – abhängig von den zugänglichen Aminosäure-Resten und möglichen Modifikationen. Aus diesem Grund eignen sie sich perfekt zur Trennung mittels IEX. Basierend auf ihrem Ladungsprofil interagieren sie mit der geladenen Oberfläche des Resins und eluieren bei einer Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase. Da nahezu jedes Protein bzw. Antikörper eine Oberflächenladung aufweist, ist IEX eine hervorragende und universelle chromatographische Trenntechnik für Biomoleküle.



Downstream-Prozesse: Aufreinigung von Biomolekülen

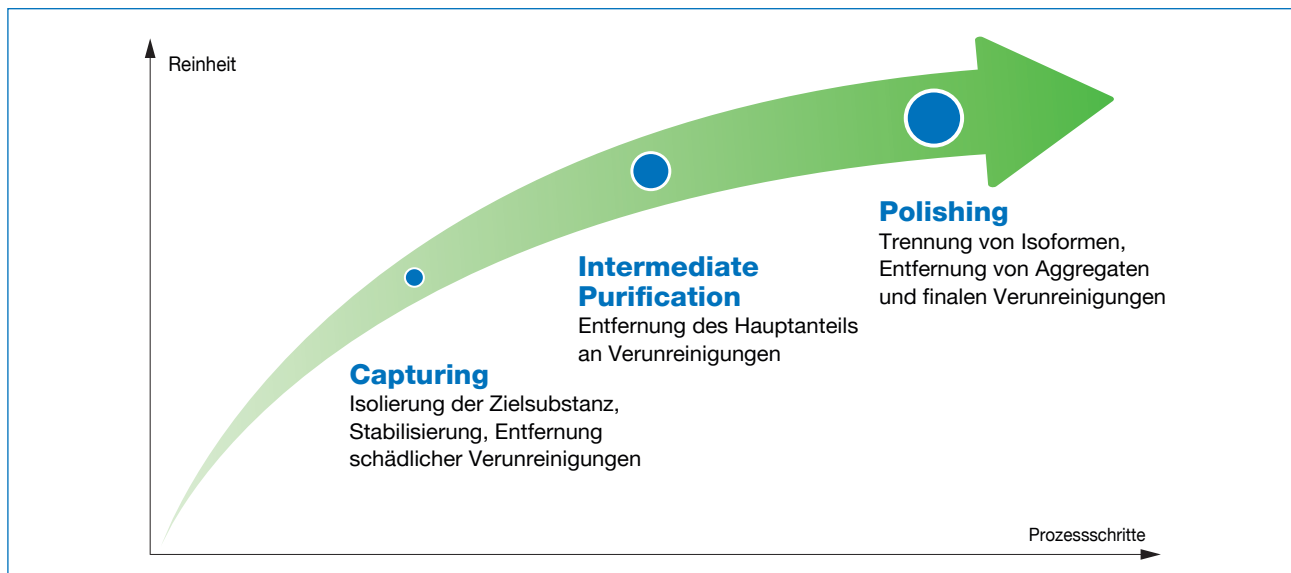
Die Aufreinigung von Biomolekülen ist ein anspruchsvoller Prozess. Die Zielsubstanzen werden in der Regel durch Expression in entsprechenden Zellsystemen hergestellt. Die Feed-Lösung nach dem Upstream-Prozess ist eine sehr heterogene Matrix aus verschiedenen Wirtszell-Proteinen (Host Cell Proteins, HCP), DNA-Verunreinigungen und Metaboliten.

Die Zusammensetzung des Feeds hängt vom Expressionssystem und -typ ab. Die Aufreinigung des Zielmoleküls aus diesem Feed wird Downstream Process (DSP) genannt und beinhaltet verschiedene Trenn- und Aufbereitungsschritte, bis die finale Reinheit erreicht ist. Ein typischer DSP besteht in der Regel aus einer Abfolge von drei chromatographischen Schritten.

Probenvorbereitung

Bevor die Lösung auf eine chromatographische Säule geladen werden kann, muss der Feed erst entsprechend vorbereitet werden. Generell sind hier eine Filtration der Lösung, sowie die Einstel-

lung des Puffers und pH-Werts wichtig, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Darüber hinaus wird so die Zielsubstanz stabilisiert und eine Bindung an die chromatographische Säule sichergestellt.



Initiales Capturing

In diesem initialen Schritt werden die Zielmoleküle aus der Feed-Lösung „aufgefangen“ und isoliert. Das Ergebnis ist eine Aufkonzentrierung der Zielsubstanz und die Abtrennung von ersten Verunreinigungen und niedermolekularen Substanzen. Auch schädigende Verunreinigungen wie Proteasen werden so entfernt. Die Zielsubstanz ist nun bereits teilweise aufgereinigt.

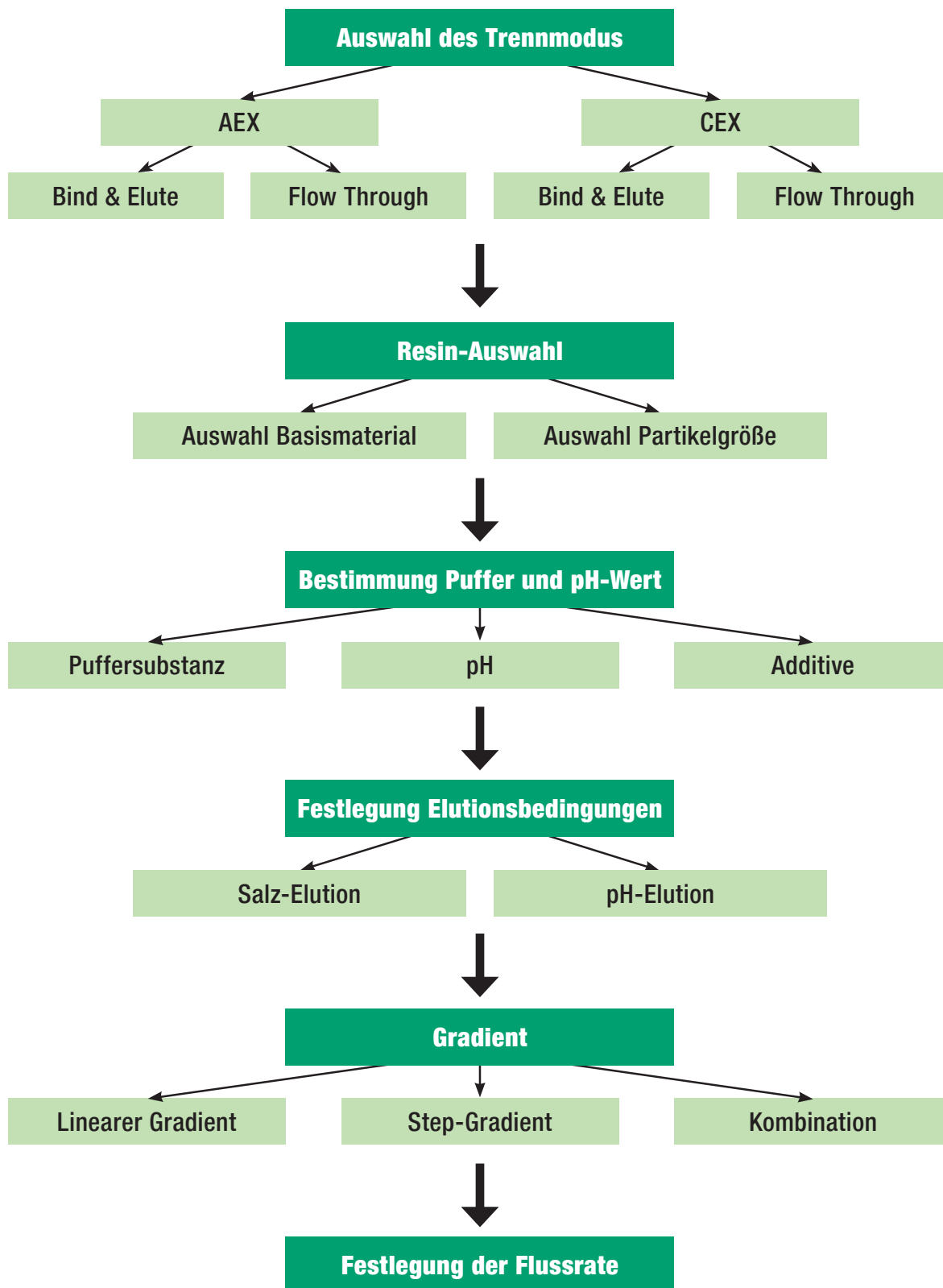
Intermediate Purification-Schritt

Dieser Reinigungsschritt entfernt den Großteil an Verunreinigungen. Die enthaltenen HCP sind sehr komplex, weshalb der chromatographische Schritt viele unterschiedliche Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften abtrennen muss. Nach diesem Schritt sollte die Reinheit des Produkts deutlich gesteigert sein.

Polishing-Schritt

Der Polishing-Schritt ist nötig, um Verunreinigungen mit sehr ähnlichen Eigenschaften wie die der Zielsubstanz zu entfernen. Dazu zählen beispielsweise Isoformen, Multimere aber auch Degradationsprodukte. Aus diesem Grund wird eine Trenntechnik benötigt, die zwischen sehr ähnlichen Molekülen unterscheiden und diese durch hohe Auflösung trennen kann. Nach diesem Schritt ist die finale Reinheit des Produkts erreicht.

2. Schritte bei der Methodenentwicklung für IEX



In diesem Kapitel werden alle wichtigen Aspekte der Methodenentwicklung für eine robuste und effiziente Aufreinigung mittels IEX diskutiert. Die folgenden Schritte werden im Detail und anhand von theoretischen und praktischen Beispielen vorgestellt:

- 1. Downstream-Strategien für eine erfolgreiche Aufreinigung**
- 2. Anwendbare Trennmodi**
- 3. Resinauswahl und Partikelgröße**
- 4. Puffer und pH-Wert**
- 5. Festlegung der Elutionsbedingungen**
- 6. Gradientenanpassung und Optimierung der Elution**
- 7. Flussraten-Optimierung**
- 8. Reinigungsstrategien**

Nachdem die generelle Methode entwickelt wurde und die Parameter zur Trennung festgelegt wurden, sind Beladungsstudien im analytischen Maßstab und Planungen des Scale-Ups in den Prozessmaßstab die nächsten Schritte. Diese Aspekte werden in den Kapiteln 3 und 4 besprochen.

Der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche und kosteneffiziente Aufreinigung ist die Auswahl eines passenden Resins. In der Regel wird dieses in einem umfangreichen Screening verschiedener Resins bestimmt. Die folgende Checkliste hilft dabei, bereits vor dem Screening wichtige Voraussetzungen und Kriterien zu prüfen. Das final ausgewählte Resin sollte folgende Punkte erfüllen:

Checkliste

Bei der Auswahl von Phasen für ein Methodenscreening im Bereich der präparativen LC ist folgende Checkliste hilfreich:

-  **1. Verfügbarkeit des Resins**
-  **2. Hohe Produktivität**
-  **3. Reproduzierbarkeit**
-  **4. Gute Packeigenschaften**
-  **5. Liefersicherheit**

2.1. Downstream Strategie: Implementierung von IEX in einen Prozess

Für einen effizienten Downstream-Prozess werden mehrere Aufreinigungsschritte benötigt, bis die gewünschte Reinheit des Produkts erreicht ist. Dabei werden häufig verschiedene Trenntechniken miteinander kombiniert, um die Verunreinigungen von der Zielsubstanz abzutrennen. Dabei ist die Ionenaustauschchromatographie die vielseitigste Methode im DSP.

Die Trenntechnik ist eine relativ schnelle und vielseitige Methode, sodass sie für jeden Schritt in einem Aufreinigungsprozess eingesetzt werden kann. Das folgende Schema zeigt, dass IEX die einzige Trennmethode ist, die effizient für das Capturing, Intermediate Purification-Schritte und das finale Polishing verwendet wird. IEX-Chromatographie lässt sich darüber hinaus sehr gut mit anderen Trenntechniken kombinieren:

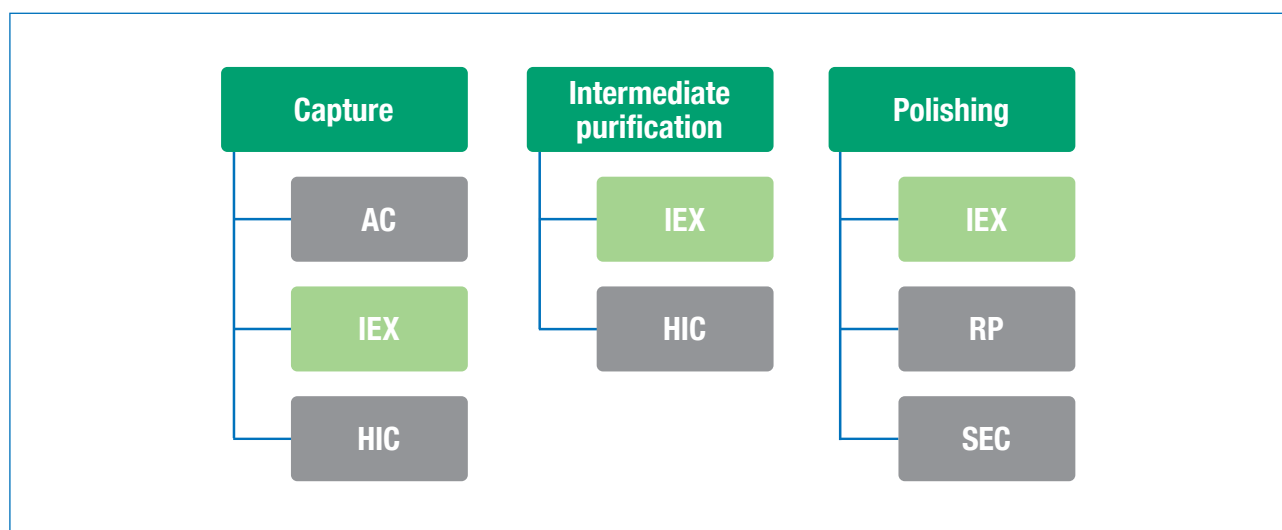


Abbildung 1: Typische chromatographische Trenntechniken für die einzelnen Schritte im Downstream-Prozess:

AC = Affinitäts-Chromatographie;
HIC = hydrophobe Interaktions-Chromatographie;
IEX = Ionenaustausch-Chromatographie;
RP = Umkehrphasen- (Reversed-Phase-) Chromatographie;
SEC = Größenausschluss (Size Exclusion)-Chromatographie

Kombination von IEX mit HIC

Bei der hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) werden hohe Salzkonzentrationen für die Beladung des Feeds auf die Säule benötigt. Da die Elution bei IEX-Schritten in der Regel durch eine Erhöhung der Salzkonzentration erfolgt, ist die Elutionsfraktion ideal für einen nachgeschalteten

HIC-Schritt geeignet. Das gilt natürlich auch für die entgegen gesetzte Richtung: die eluierte Zielfraktion nach einer HIC-Reinigung enthält in der Regel wenig Salz und kann daher gut auf eine IEX-Säule geladen werden.

Kombination von IEX und SEC

IEX lässt sich auch gut mit einer nachgeschalteten Größenausschluss-Chromatographie (SEC) kombinieren. Bei IEX-Trennungen sind die Puffer eher gering konzentriert und die Salzkonzentration ist

hoch. Das sind gute Startbedingungen für eine präparative SEC-Trennung. Zusätzlich eignet sich ein nachgeschalteter SEC-Schritt sehr gut zur Entsalzung der IEX-Fraktion.

2.2. Trennprinzip: Ionentauscher-Typ und Trennmodus

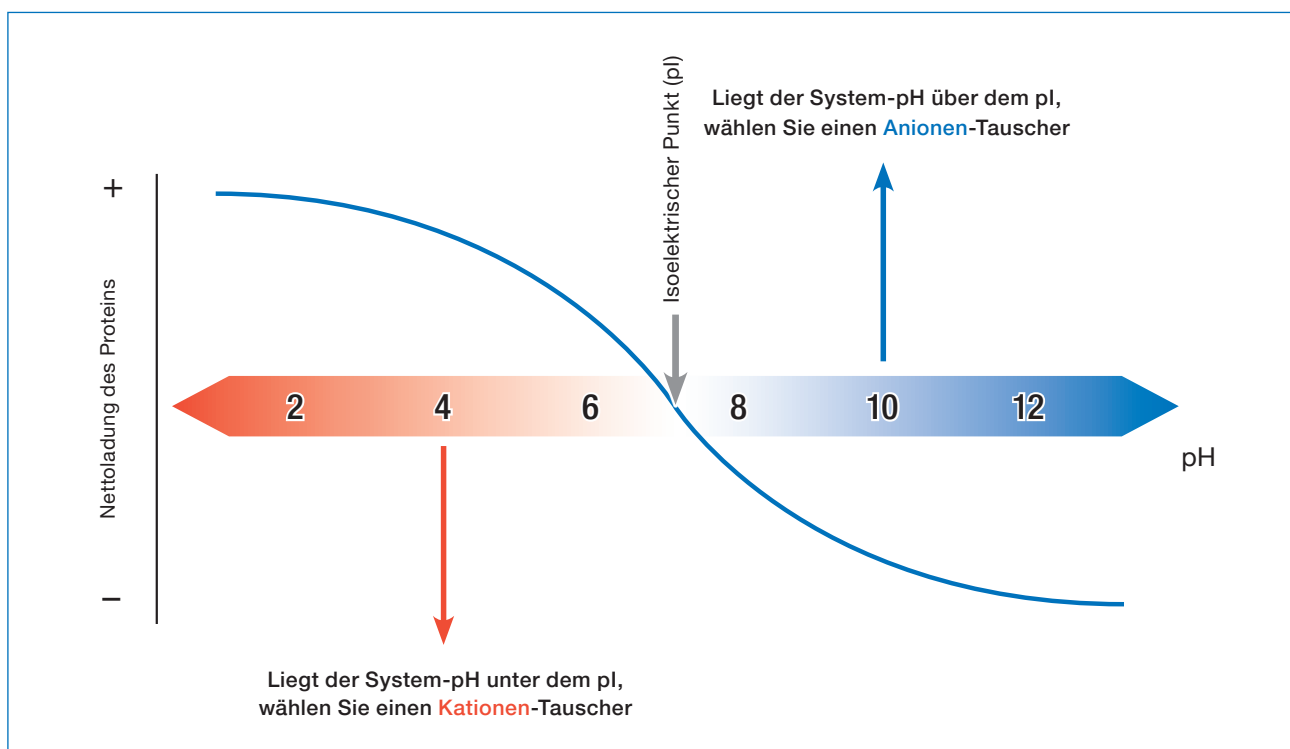
Der nächste Schritt bei der Prozessentwicklung ist die Festlegung des Trennmodus, also die Entscheidung, ob ein Anionen- oder Kationentauscher besser für die Aufreinigung geeignet ist. Das hängt sowohl vom Zielprotein selbst, als auch von den

Verunreinigungen ab, die entfernt werden sollen. In diesem Zusammenhang ist auch die Auswahl zwischen Bind-and-Elute und Flow-Through-Methoden mit inkludiert.

2.2.1. CEX oder AEX

Die Entscheidung zwischen Anionentauscher (AEX) und Kationentauscher (CEX) Chromatographie hängt von der Gesamtladung des Zielmoleküls ab – und von dem Verunreinigungsprofil. Die Gesamtladung des Proteins bzw. Antikörpers ist durch dessen isoelektrischen Punkt (pI) bestimmt. Dieser entspricht jenem pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Moleküls Null ist – sich also alle positiven und negativen Ladungen gegenseitig aufheben. Ist der pH-Wert des Puffers, in dem das Protein gelöst ist über dem pI des Zielproteins, überwiegt die negative Ladung. In diesem Fall ist ein AEX-Resin

mit positiv geladener Oberfläche der Ionentauscher der Wahl, um das Protein zu binden. Liegt der pH des Puffersystems unterhalb des pI überwiegt die positive Gesamtladung des Proteins und ein negativ geladener Kationentauscher ist die bevorzugte stationäre Phase, um das Protein zu binden. Der pI-Wert eines Proteins bzw. Antikörpers leitet sich direkt von dessen Aminosäure-Zusammensetzung ab und lässt sich mithilfe von Online-Tools berechnen. Modifikationen des Zielmoleküls können dabei den pI und somit auch die Gesamtladung beeinflussen.



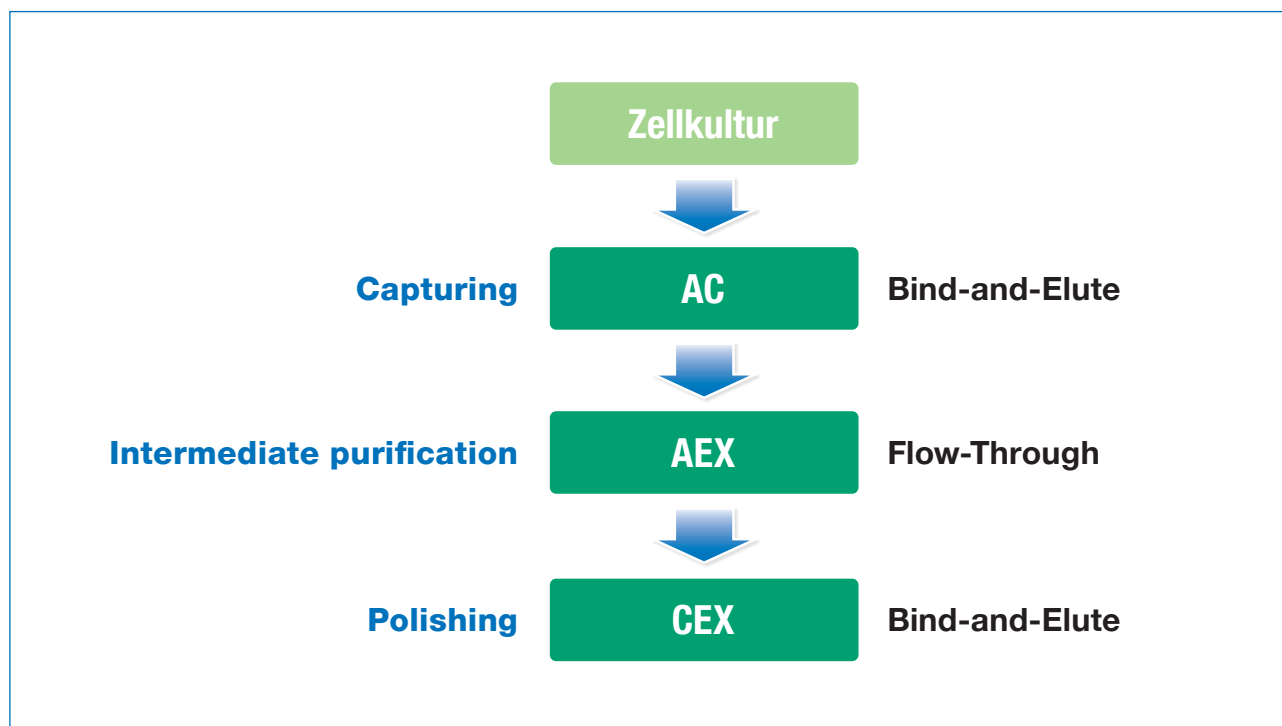
Durch die Auswahl des Ionentauscher-Typs und des pH-Werts des Systems kann die Bindung des Zielmoleküls und der Verunreinigungen angepasst werden. Deshalb werden die besten Bindeeigenschaften bestimmt.



Praktisches Beispiel: eine DSP-Strategie mit zwei IEX-Schritten für eine effiziente Antikörper-Aufreinigung

Für die effiziente Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern (monoclonal antibodies, mAb) ist die IEX-Chromatographie bestens geeignet. Dabei ist es auch möglich, zwei unterschiedliche IEX-Schritte miteinander zu kombinieren – um die maximale Effizienz des Prozesses zu erhöhen. In dem hier gezeigten Fall wird das initiale Capturing mittels Af-

finitäts-Chromatographie mit einem Protein-A Resin gemacht. Anschließend wird der größte Teil der verbleibenden Verunreinigungen mit einem AEX-Schritt entfernt. Das finale Polishing erfolgt mittels CEX. Dabei wird der Antikörper an das Resin gebunden und die verbleibenden Verunreinigungen effizient abgetrennt.



2.2.2. Bind-and-Elute und Flow-Through Anwendungen

Die klassisch angewendete IEX-Trennung basiert auf der Bindung eines Zielmoleküls an ein IEX-Resin und der anschließenden Elution und Trennung von anderen gebundenen Molekülen. Bei dieser Form der Anwendung interagieren sowohl die Zielsubstanz als auch Verunreinigungen mit ähnlicher Ladung mit der Säule. Andere Moleküle mit keiner signifikanten Ladung oder einem andere Ladungsprofil hingegen binden nicht an die Säule, sondern fließen durch. Das Prinzip nennt sich **Bind-and-Elute** (BE)-Prinzip.

Andererseits ist es auch möglich, dieses Prinzip umzudrehen. In einer **Flow-Through** (FT)-Anwendung interagiert die Zielsubstanz nicht mit der Stationärphase und fließt direkt durch die Säule. Hierfür wird ein Resin mit gleicher Ladung wie die

Zielsubstanz ausgewählt. Gleichzeitig werden jene Verunreinigungen an die Säule gebunden, die eine entgegengesetzte Ladung besitzen und somit von der Zielsubstanz abgetrennt. Der Vorteil dieser Anwendung ist die Geschwindigkeit. Darüber hinaus bleiben die Bedingungen für die das Zielmolekül bei der Beladung und Fraktionierung im FT-Modus gleich. Somit haben eine Erhöhung der Salzkonzentration oder eine Änderung der Pufferbedingungen hier keinen Einfluss auf das Produkt. Nachdem die gesamte Feed-Lösung durch die Säule gepumpt wurde bzw. sobald die Bindekapazität der Säule erreicht ist, werden die gebundenen Verunreinigungen eluiert. Dies geschieht durch ein einzelnen Waschriff mit hoher Elutionsstärke. Anschließend wird die Säule für den nächsten Zyklus regeneriert.

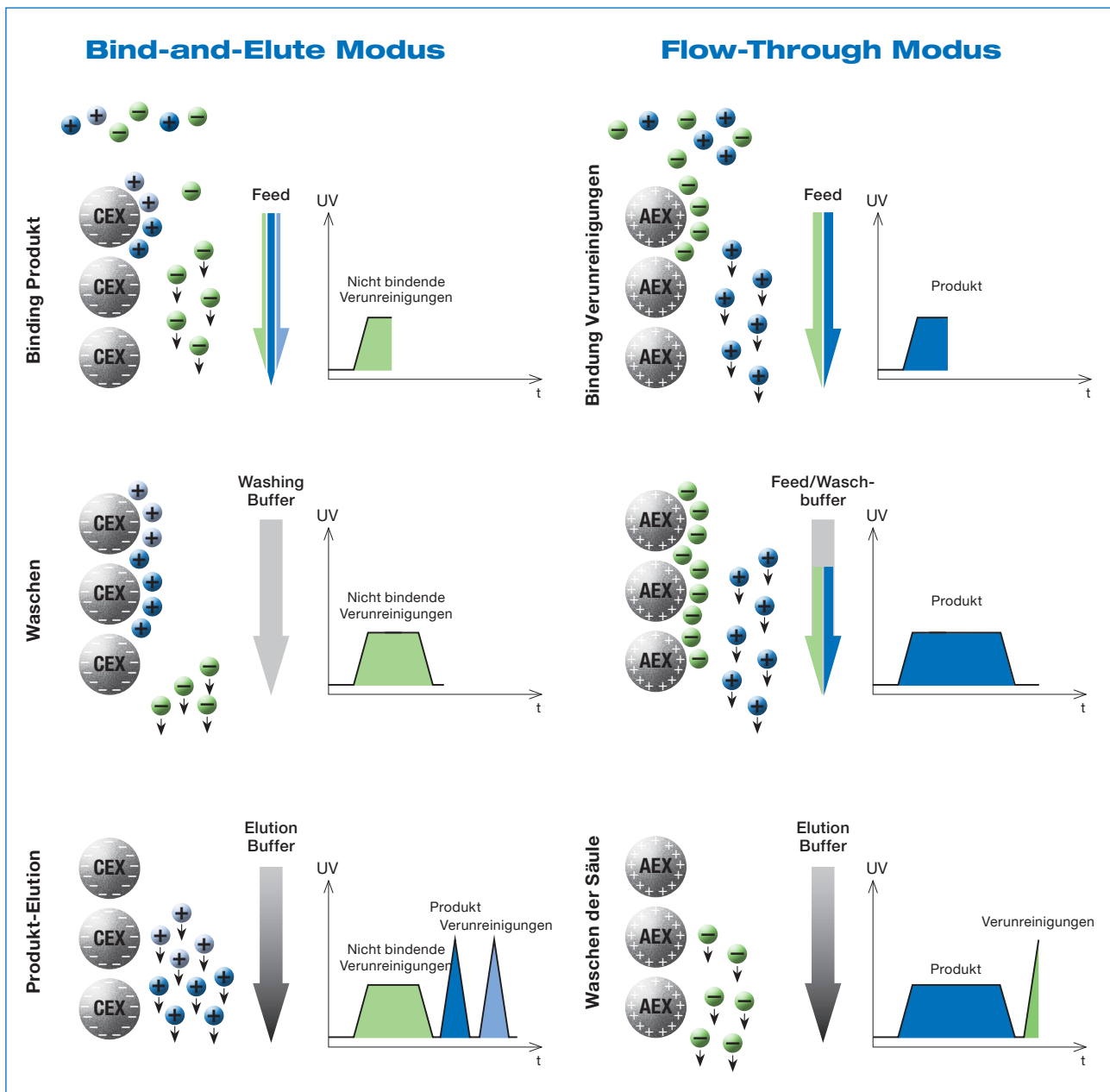


Abbildung 2: Schematisches Prinzip von Bind-and-Elute und Flow-Through Reinigungen

Das Prinzip wird anhand eines positiv geladenen Zielmoleküls (dunkelblau) gezeigt. Bei der Bind-and-Elute Methode (links) wird die Feed-Lösung auf eine CEX-Säule geladen. Die positiv geladene Zielsubstanz sowie Verunreinigungen mit ähnlicher Ladung binden dabei an die stationäre Phase, während negativ geladene Verunreinigungen (dunkelgrün) durchfließen. Die gebundenen Moleküle werden anschließend eluiert und anhand unterschiedlicher Ladungsschwerpunkte voneinander getrennt. Bei der Flow-Through-Anwendung (rechts) bindet die positiv geladene Zielsubstanz nicht an die Säule, son-

dern fließt durch, während negativ geladene Verunreinigungen gebunden werden. Der Durchfluss mit der Zielsubstanz wird dabei gesammelt und die Verunreinigungen werden anschließend eluiert.

Die Auswahl der am besten geeigneten Methode hängt von der Zielsubstanz und dem Verunreinigungsprofil ab. Wenn beispielsweise DNA mit starker negativer Ladung die Hauptverunreinigung darstellt, kann eine FT-Aufreinigung, bei der die DNA im AEX-Modus gebunden wird, eine nützliche Strategie sein.

2.3 Auswahl eines passenden Resins

Der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche und effiziente Aufreinigung mittels IEX ist die Wahl des passenden Resins. Hier gibt es verschiedene Resins, die auf verschiedenen Basismaterialien und Modifikationen basieren und in unterschiedlichen Partikelgrößen verfügbar sind.

Wichtige Überlegungen für Resin-Auswahl und Scale-Up

Es ist sinnvoll, bereits im Vorfeld der ersten Screenings den finalen Maßstab des Prozesses zu berücksichtigen. Dabei sind die folgenden Kriterien des Resins und des Suppliers von entscheidender Bedeutung (siehe hierzu auch die Checkliste mit generellen Punkten auf Seite 7)

- ✓ **Dynamische Bindekapazität**
- ✓ **Druck-Fluss-Eigenschaften**
- ✓ **Verfügbarkeit unterschiedlicher Partikelgrößen**
- ✓ **Liefersicherheit und Verfügbarkeit großer Mengen**
- ✓ **Unterstützung bei regulatorischen Fragestellungen und Dokumentationen**

Auswahl des Resin-Typs und des passenden Basismaterials

IEX-Resins basieren auf unterschiedlichen Basis-Materialien. Manche Partikel haben eine Agarose-Basis, andere wiederum bestehen aus synthetischen Polymeren wie Polystyren/Divenylbenzol (PS/DVB) oder Polymethacrylat. Das Basismaterial hat einen massiven Einfluss auf die Resin-Eigenschaften. Synthetische Polymere ermöglichen generell eine höhere chemische und physikalische

Stabilität, was besonders für alkalische Reinigungsprozeduren und beim Einsatz höherer Flussraten von Bedeutung ist. Hydrophile Polymere ermöglichen zudem ein einfaches Säulenpacken auch unter 100% wässrigen Bedingungen. Aus diesem Grund ist Polymethacrylat – ein hydrophiles Polymer mit exzellenten Eigenschaften – ein häufig eingesetztes Basismaterial bei modernen Prozess-Resins.

Auswahl der Partikelgröße

Kleinere Partikel ermöglichen generell eine bessere Trennleistung und daher ein höheres Auflösungsvermögen. Andererseits führen kleinere Partikel zu höheren Rückdrücken. Aus diesem Grund ist die

Auswahl der Partikelgröße immer ein Kompromiss zwischen der nötigen Auflösung und dem maximalen Rückdruck im Hinblick auf das chromatographische System.

Wichtig für den Scale-Up

Der Einfluss der Partikelgröße auf den Rückdruck sollte bereits möglichst früh bei der Prozessplanung bedacht werden, denn das System, das für den finalen Maßstab verwendet wird, muss dem

Druck der Partikel entsprechen. Aus diesem Grund hängt die Wahl der Partikelgröße auch vom Drucklimit des final eingesetzten Systems ab.

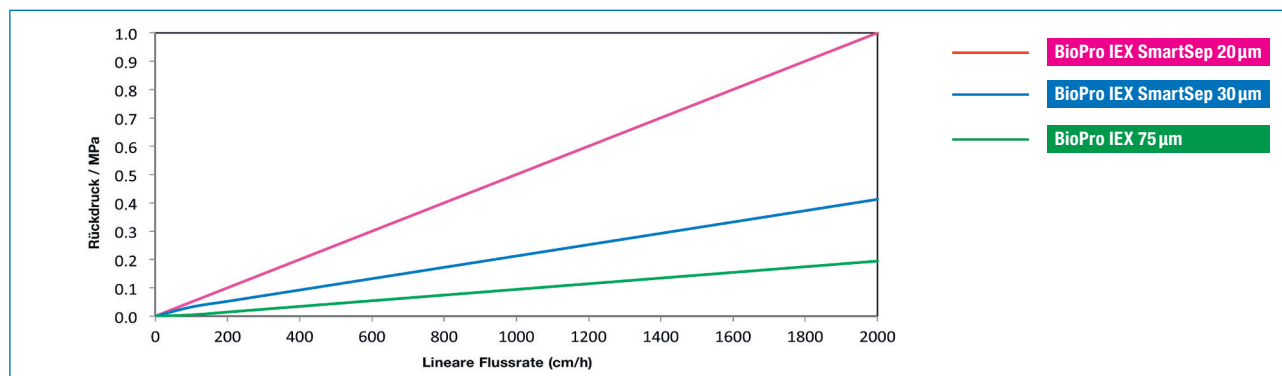


Abbildung 3: Druck-Fluss-Kurven für die unterschiedlichen Partikelgrößen (20 µm, 30 µm und 75 µm) von BioPro IEX gepackt in eine 5x0,5 cm ID-Säule. Die lineare Flussrate wurde von 0–2000 cm/h erhöht und der resultierende Rückdruck (in MPa) aufgezeichnet. Die Druck-Fluss-Kurve des 20 µm-Material zeigt den stärksten Anstieg.

Für initiale Capturing-Prozesse sind größere Partikel generell die erste Wahl. Bei diesen Trennungen wird in der Regel keine maximale Auflösung benötigt. Das gleiche gilt für Flow-Through-Methoden. Für intermediate-Purification- und Polishing-Me-

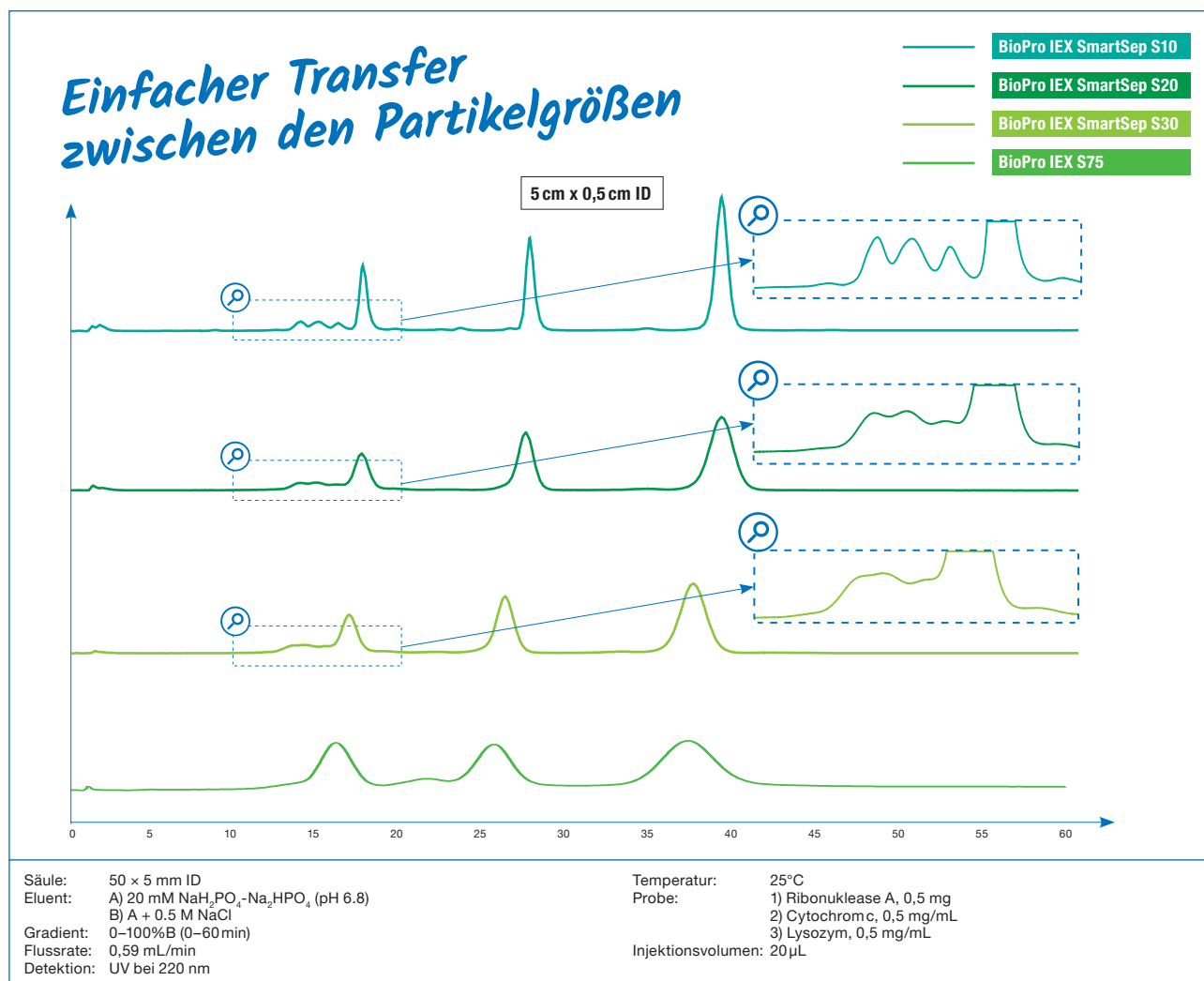
thoden hingegen wird eine hohe Trenneffizienz und damit auch ein hohes Auflösungsvermögen benötigt. In diesem Fall sind kleinere Partikel vorteilhaft, um die benötigte Reinheit und Produktivität zu erreichen.



Expertentipp: Nutzen Sie ein IEX-Resins für Ihr Screenings, dass in verschiedenen Partikelgrößen verfügbar ist - für mehr Flexibilität

Manche Resins werden in verschiedenen Partikelgrößen angeboten. Falls diese Resins und die Partikelgrößen voll skalierbar sind, kann das für die Prozessentwicklung sehr vorteilhaft sein. Diese Eigenschaft ermöglicht eine identisches Retentionsverhalten über alle Partikelgrößen hinweg. So kann die optimale Partikelgröße abhängig von der gewünschten Auflösung ausgewählt werden. Das erlaubt komplette Flexibilität bei der Prozessentwicklung und maßgeschneiderte Lösungen.

Das unten gezeigte Beispiel zeigt die Trennung der drei Enzyme Ribonuklease A, Cytochromc und Lysozym. Hier zeigt sich, dass die Peaks über alle vier Partikelgrößen hinweg stabil bleiben. Wird die höchste Auflösung für die Trennung benötigt, sind die 10 µm-Partikel die beste Wahl. Diese Partikel erlauben sogar die Isolierung von Spurenverunreinigungen. Für Capturing-Prozesse hingegen führen die 75 µm-Partikel zu einer ausreichenden Trennung. Hier sind alle drei Hauptpeaks gut getrennt.



2.4. Auswahl und Zusammensetzung der mobilen Phase

Die verwendete mobile Phase entscheidet darüber, ob das Zielmolekül an die IEX-Säule bindet oder durchfließt. Darüber hinaus kann die Stärke der Bindung durch die Auswahl der mobilen Phase

eingestellt werden. Um eine optimale Bindung über Ladungszustände sicherzustellen, muss der passende Puffer und pH-Wert sowie die Zugabe von Additiven und Salz genau bewertet werden.

2.4.1. Puffer und pH-Wert

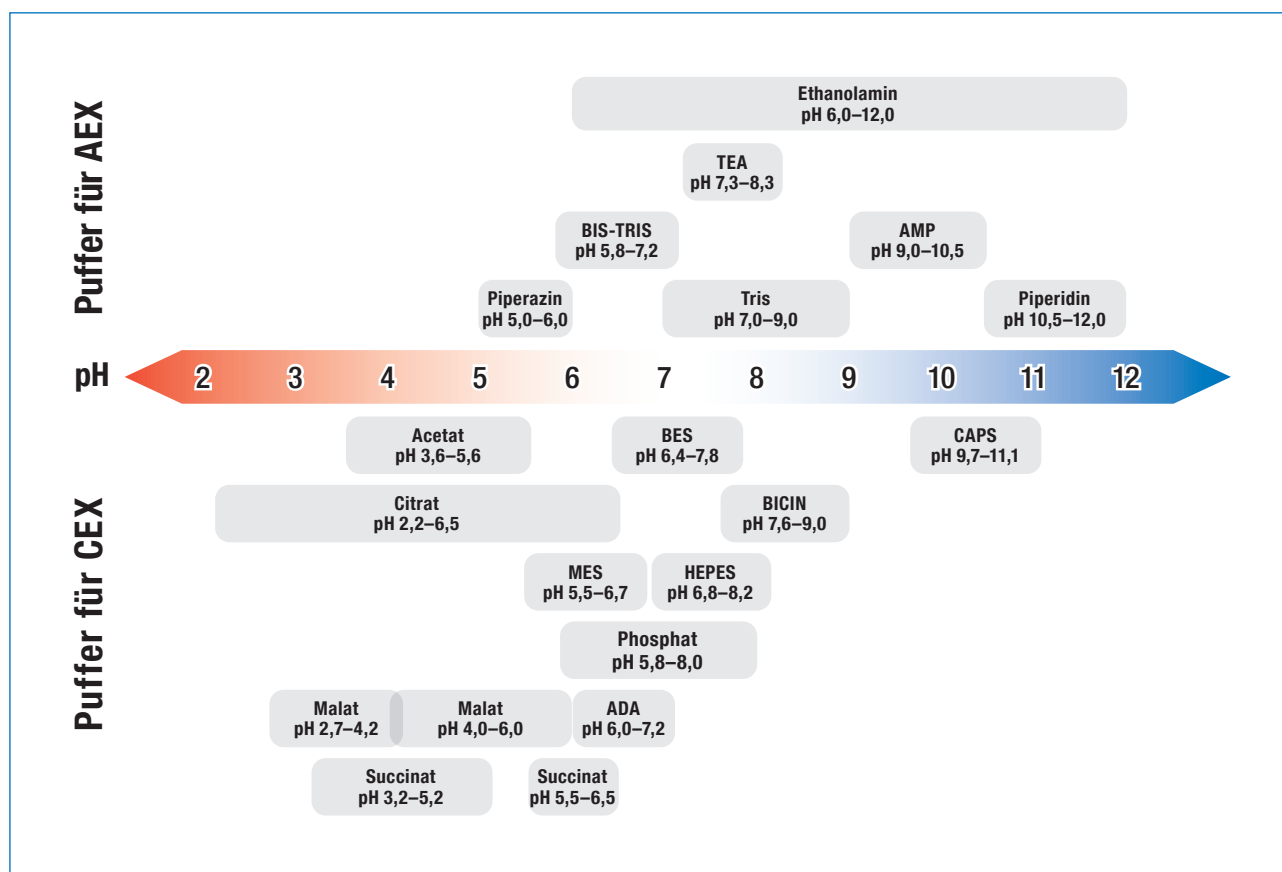
Da Ionenaustauschchromatographie auf der Trennung verschiedener Ladungen der Zielmoleküle beruht, ist die Auswahl eines passenden Puffersystems und des pH-Werts entscheidend für eine effiziente Aufreinigung. Der pH-Wert der

Lösung hat direkten Einfluss auf die Bindung des Zielmoleküls bzw. der Verunreinigung an das Ionentauscher-Material. Aus diesem Grund sollte ein Puffersystem ausgewählt werden, das eine optimale Bindung erlaubt.

Generelle Empfehlungen:

- ✓ Wählen Sie einen pH-Wert mit mehr als 0,5 –1-Einheiten unter- oder oberhalb des pI des Proteins oder Antikörpers (falls bekannt), um sicherzustellen, dass das Molekül ionisiert und löslich ist.
- ✓ Die Konzentration des Puffers sollte so niedrig wie möglich sein, gleichzeitig aber hoch genug, um ausreichend Pufferkapazität zu gewährleisten. Ein Richtwert für initiale Versuche liegt bei einer Konzentration von ca. 15–20 mM in Abhängigkeit vom Puffertyp.
- ✓ Die Ionenstärke des Puffers sollte gering sein, damit die Bindung des Zielmoleküls an die Säule nicht reduziert wird (im Falle von Bind-and-Elute-Methoden).

Die folgende Grafik zeigt typische Puffersysteme für AEX- und CEX-Anwendungen sowie den jeweils üblichen pH-Bereich, in dem die Puffer eingesetzt werden können.

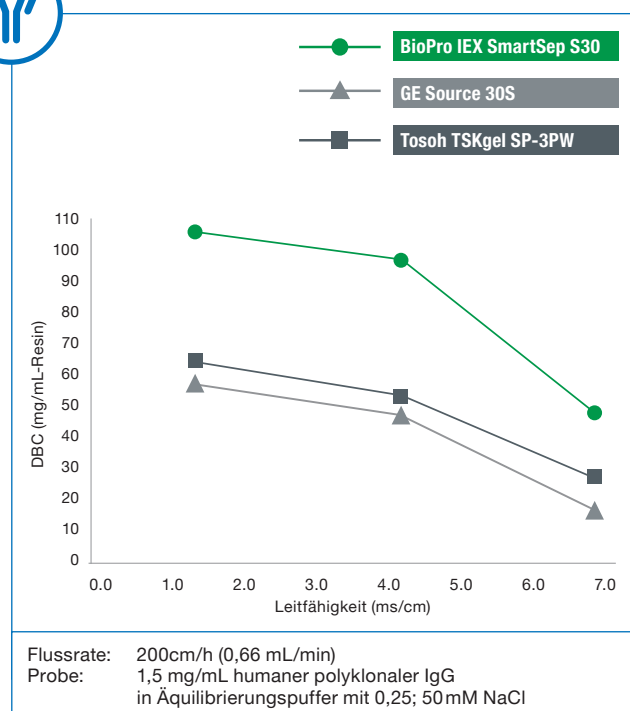
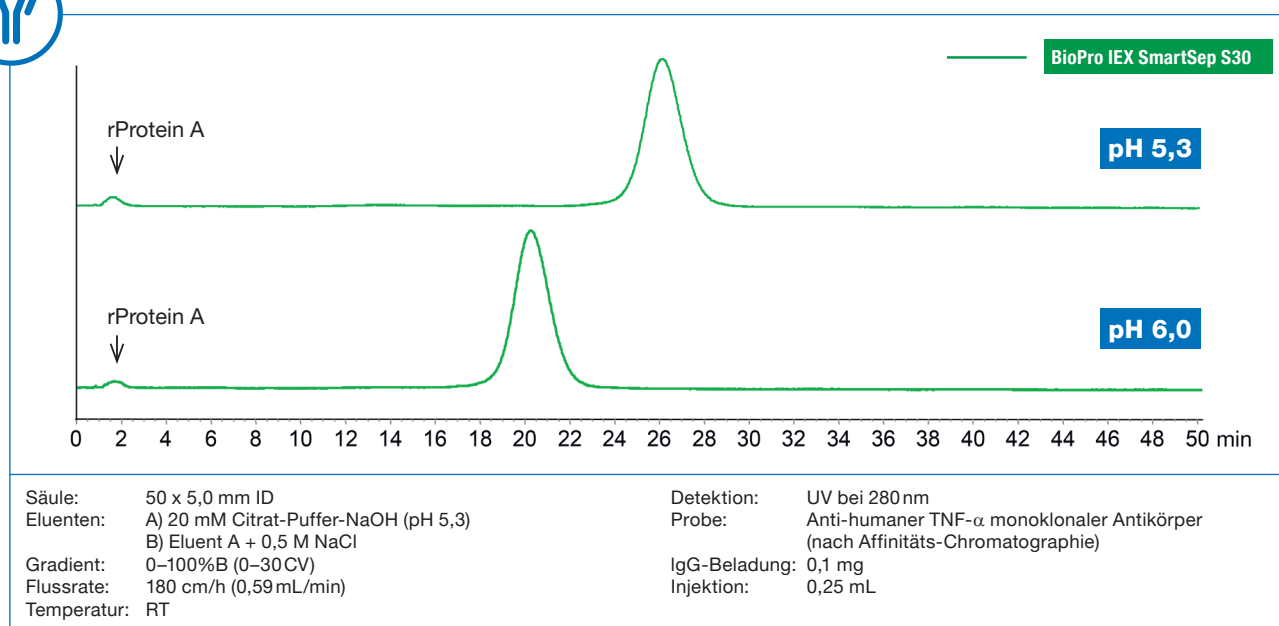




Praktisches Beispiel: Anpassung des Retentionsverhaltens von Antikörpern durch verschiedene pH-Werte

Der Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase kann sehr groß sein. In diesem Beispiel wurde die Retentionszeit eines IgG-Antikörpers bei zwei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Obwohl der Unterschied beider pH-Werte nur bei 0,7-Einheiten liegt, ist der Einfluss auf die Retentionszeit den-

noch enorm. Somit kann das Retentionsverhalten einer Zielsubstanz direkt durch eine Änderung im pH-Wert beeinflusst werden. Aus diesem Grund kann ein Screening verschiedener pH-Werte sehr sinnvoll sein.



2.4.2. Salzkonzentration

Da durch die Zugabe von Salz die Ionenstärke der Lösung erhöht wird, kann die Interaktion des Proteins oder Antikörpers mit der stationären Phase geschwächt werden. Aus diesem Grund sollte die Salzkonzentration der Feed-Lösung möglichst gering sein, um eine optimale Bindung sicherzustellen. In vielen Fällen lässt sich eine erhöhte Salzkonzentration nicht vermeiden, da diese vom vorigen Prozessschritt abhängt und viele Proteine eine gewisse Salzkonzentration zur Stabilisierung benötigen.

Die Abbildung links zeigt den Einfluss variierender Salzkonzentrationen auf die dynamische Bindekapazität verschiedener Resins. Die Gesamtkapazität sinkt mit einer Erhöhung der Leitfähigkeit. Resins mit generell höherer dynamischer Bindekapazität vertragen somit auch höhere Salzkonzentrationen.

2.5. Festlegung der Elutionsbedingungen

Im Regelfall basiert IEX auf Bind-and-Elute-Methoden. In diesem Fall binden die Zielsubstanzen an die Ionenaustausch-Phase, während andere Moleküle ohne signifikante Interaktion durch die Säule durchfließen. Das gilt natürlich auch in die entgegengesetzte Richtung (siehe Kapitel 2.1). Die Elution der gebundenen Moleküle wird durch eine Reduzierung der Interaktion der geladenen

Moleküle mit der Stationärphase erreicht, sodass die Bindung dissoziiert. Das kann prinzipiell über zwei Arten erreicht werden: durch eine Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase durch eine **Erhöhung der Salzkonzentration** oder durch eine **Änderung im pH-Wert der mobilen Phase**. Eine Kombination der beiden Methoden ist ebenfalls möglich.

2.5.1. Elution durch Erhöhung der Ionenstärke/Salzkonzentration

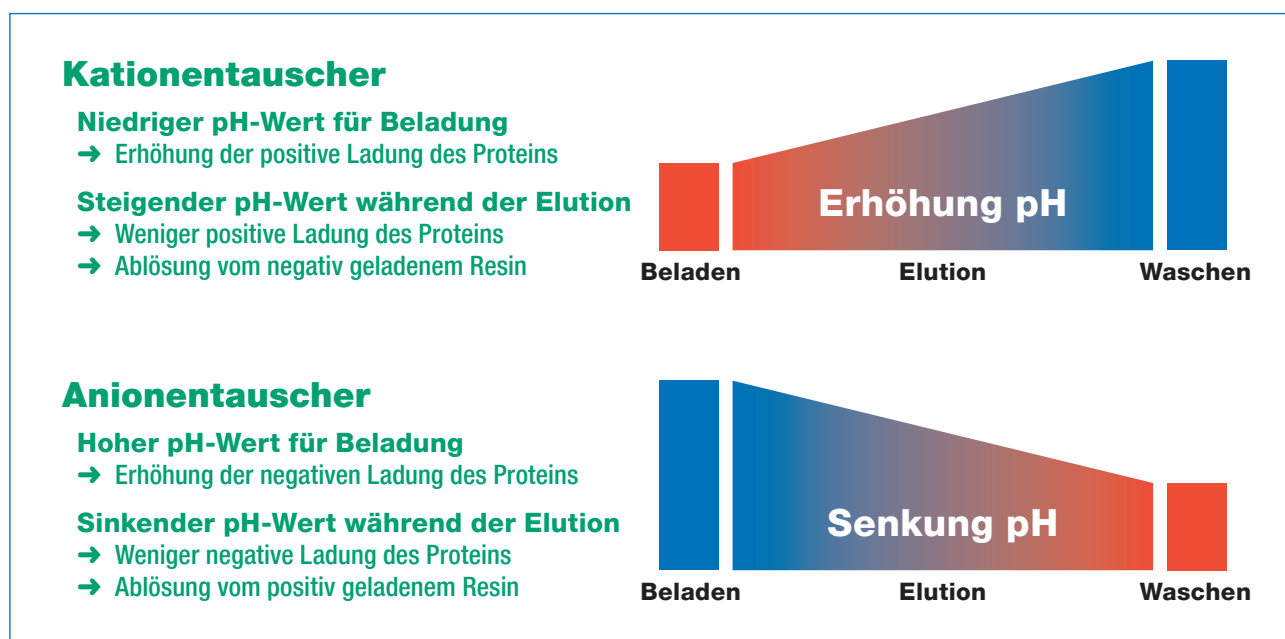
Diese Elutionsmethode ist die weit verbreitetste Art der Elution bei IEX. Die Erhöhung der Salzkonzentration führt zu einer höheren ionischen Stärke der mobilen Phase und dadurch zu einer Ablösung der

gebundenen Proteine von der Stationärphase. Die Salzionen konkurrieren mit den gebundenen Molekülen um die Bindungsstellen des Resins, was zu einer Dissoziation des Zielmoleküls führt.



2.5.2. Elution durch Veränderung des pH-Wertes

Eine andere Methode zur Elution ist die Veränderung des pH-Werts der mobilen Phase. In diesem Fall wird der pH-Wert so angepasst, dass das Zielmolekül weniger stark ionisiert und damit weniger geladen ist. Dies führt direkt zu einer Schwächung der Bindung an die geladene Resin-Oberfläche und zu einer Elution.



Die Etablierung eines stabilen, linearen pH-Gradienten ist eine große Herausforderung. Das Mischen von Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten führt nicht zu einem linearen pH-Gradienten (außer im Falle von speziellen Multikomponenten-Puffern). Darüber hinaus wird für die Überwachung und Detektion von pH-Gradienten spezielles Equipment benötigt. Die kontinuierliche Aufzeichnung des pH-Wertes ist dabei nicht so genau wie beispielsweise die der Leitfähigkeit.

Das macht die pH-Elution mittels Gradienten sehr anspruchsvoll. Aufreinigungen, die im großen Prozessmaßstab stattfinden, werden zuvor im kleinen Maßstab entwickelt und anschließend mit gleicher chromatographischer Performance in den Prozessmaßstab transferiert. Im Falle von pH-Gradienten ist dies sehr schwierig, da die Fluktuation in diesen Fällen sehr groß ist.

Wichtige Hinweise

- ✓ Salzelution ist die häufigste Methode und sehr einfach und kosteneffizient
- ✓ Elution mittels pH-Gradienten ist sehr anspruchsvoll, da ein stabiler Gradient sehr schwer zu realisieren ist
- ✓ Die Reproduzierbarkeit und der Scale-up von pH-Gradienten ist deutlich komplizierter
- ✓ Die Kontrolle der Leitfähigkeit während der Salzelution ist sehr einfach
- ✓ Elution mittels pH kann für schwierige Trennungen sehr vorteilhaft sein (z.B. die Trennung von Aggregaten)



Expertentipp: Kombination von Salzgradienten und pH-Elution

Da eine Elution über einen veränderten pH-Wert die Trennung bei vielen sehr anspruchsvollen Fällen verbessern kann, allerdings auch sehr schwer zu etablieren ist, kann eine Kombination aus beiden Elutionsmethoden eine effiziente Lösung sein.

In diesem Fall erfolgt die Elution mittels Salzgradient, allerdings unterscheidet sich der pH-Wert des Beladungs- und Elutionspuffers, sodass die gesamte Elution noch feiner angepasst werden kann. Das erlaubt deutlich robustere Methoden im Vergleich zu reinen pH-Gradienten.

2.6. Gradienten- und Step-Elution: Wie Sie Ihre Zielsubstanz effizient eluieren

Im Falle von Bind-and-Elute-Methoden bestimmt die Wahl der Elutionsbedingungen den Erfolg der Aufreinigung. Generell kann eine Elution mittels linearem Gradienten mit erhöhter Elutionsstärke oder mittels Step-Elution erfolgen. Eine Kombina-

tion beider Methoden ist ebenfalls möglich, um die Auflösung und damit die Ausbeute zu verbessern, aber auch um Elutionsmittel zu sparen. In diesem Kapitel werden die Prinzipien der Elution ausgehend von einem initialen Gradienten erklärt.

2.6.1. Initialer Gradient und Gradientenoptimierung

Die Empfehlung für die Elution bei initialen Experimenten ist ein flacher Gradient mit steigender Elutionsstärke für ungefähr 20–30 Säulenvolumina (column volumes, CV). Nachdem die Feed-Lösung auf die Säule geladen wurde, empfiehlt sich ein Waschschrift, um ungebundene bzw. leicht gebundene Verunreinigungen zu entfernen, bevor mit der

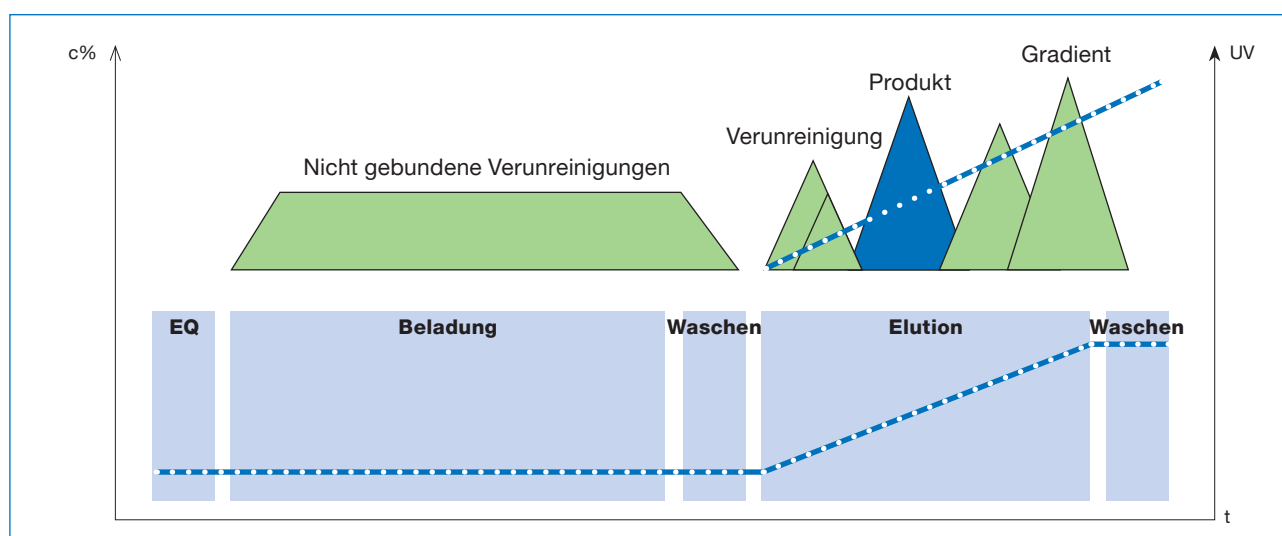
Elution begonnen wird. Der Beladungspuffer (Puffer A) sollte eine möglichst geringe Ionenstärke (geringe Salzkonzentration) aufweisen, während der Elutionspuffer (Puffer B) hinsichtlich der Ionenstärke stark konzentriert sein sollte. Während der ersten Elutionsexperimente wird das generelle Elutionsprofil und die Elutionszeit der Zielsubstanz bestimmt.

Initiales Elutionsexperiment

Puffer A: möglichst geringe Ionenstärke (0–50 mM NaCl)

Puffer B: hohe Ionenstärke unter Berücksichtigung der Trenneffizienz (z.B. 0,5–1 M NaCl)

Gradient: 0–100%B in 20–30 CV



2.6.2. Linearer Gradient: Optimierung

Der initiale lineare Gradient hat den Sinn, das Elutionsverhalten des Zielmoleküls zu bestimmen. Diese initialen Gradienten sind in der Regel jedoch nicht praktikabel für den finalen Prozess, da diese sehr zeitintensiv sind. Aus diesem Grund ist eine Optimierung dieses Gradienten abhängig vom Elutionsprofil sinnvoll. Eine gute Regel ist dabei, den Gradienten vor und nach dem Elutionszeitpunkt der Zielsubstanz zu straffen. Die Ionenstärke am

Startpunkt sollte dabei leicht unter jenem Punkt liegen, an dem das Zielmolekül anfängt zu eluieren (z.B. einige ms/cm unterhalb des Leitfähigkeits-Punkts des Peakbeginns). Der Endpunkt des Gradienten sollte leicht über der Ionenstärke nach komplett erfolgter Elution der Zielsubstanz liegen. Eine Gesamtlänge des Gradienten von 5 CV ist empfehlenswert. Flachere Gradienten führen zu größeren Fraktionsvolumina.

Optimierte Elutionsexperimente

Puffer A: Ionenstärke, die leicht *unterhalb* der Elutionskonzentration der Zielsubstanz liegt

Puffer B: Ionenstärke, die leicht *oberhalb* der Elutionskonzentration der Zielsubstanz liegt

Gradient: 0–100%B in 5 CV

Um sicherzustellen, dass die Verunreinigungen, die vor und nach der Zielsubstanz eluieren abgetrennt und gewaschen werden, empfehlen sich Waschschrte mit ausreichender Menge an Waschpuffer.

2.6.3. Step-Elution und Kombination mit Gradientenelution

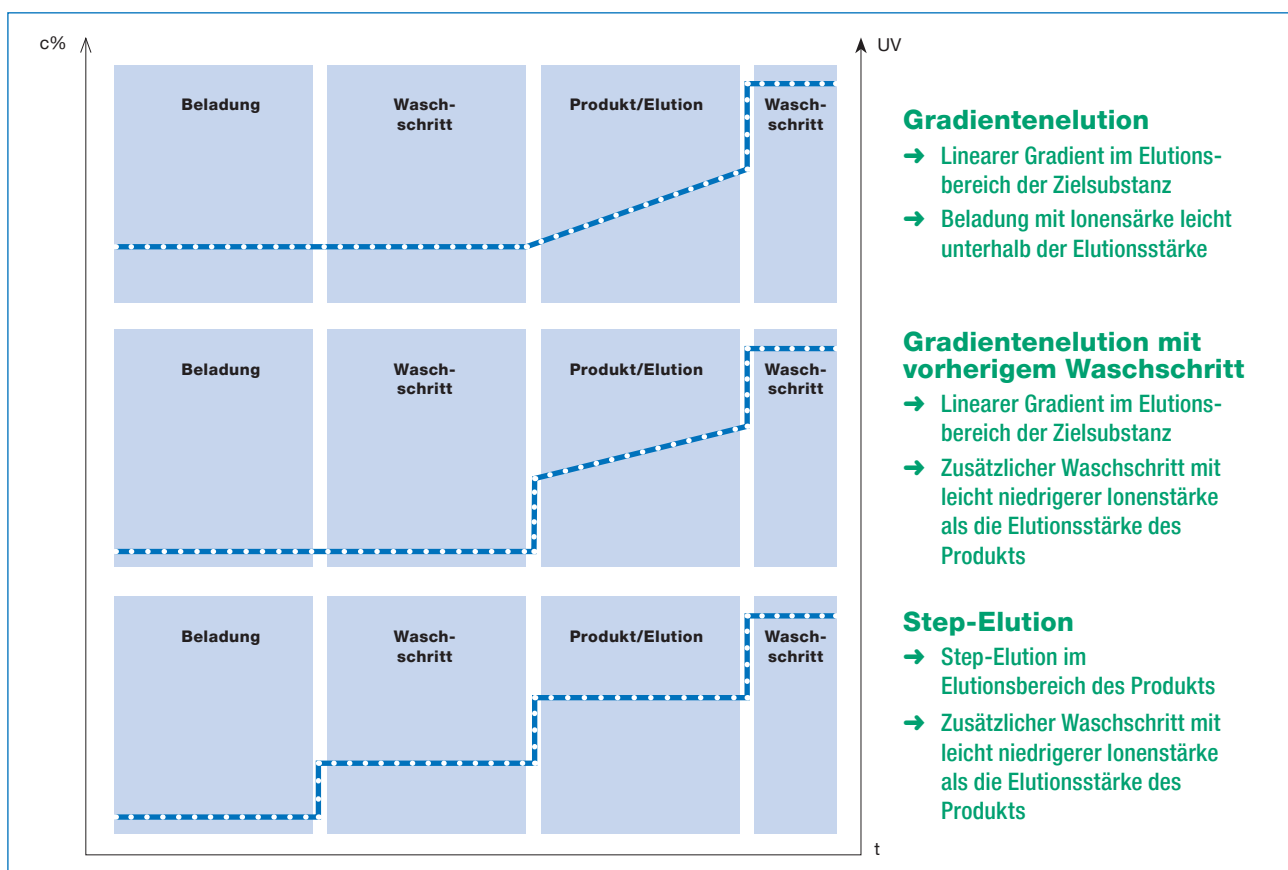
Die Alternative zur Gradientenelution ist die Step-Elution. In diesem Fall wird ein einzelner Elutionsschritt mit definierter Ionenstärke bzw. Leitfähigkeit durchgeführt. Dieser führt zur gleichzeitigen Elution aller Moleküle mit diesem bzw. darunter liegendem Elutionspunkt. Der Elutionspunkt ist jene Konzentration des Elutionspuffers (z.B. die Salzkonzentration), bei der die Zielsubstanz anfängt zu eluieren. Dieser Punkt wird durch den initialen Gradienten bestimmt, bei dem die Elution der Zielsubstanz und der Verunreinigungen über einen breiten Gradienten-Bereich beobachtet wird.

Der Elutionsschritt wird mit einer Elutionsstärke durchgeführt, die dem Elutionspunkt entspricht. Das führt zu einer Elution der Zielsubstanz und aller

Verunreinigungen, die im initialen Gradienten vor dem Produkt eluiert sind. Weiter Schritte mit niedrigerer und höherer Elutionsstärke können dem Elutions-Prozess hinzugefügt werden, um weitere Verunreinigungen, die vor und nach der Zielsubstanz eluieren zu entfernen. Während einer Step-Elution sind die Peaks schärfer und die Elution erfolgt deutlich schneller und es werden weniger Ressourcen verbraucht. Jedoch fällt die Trenneffizienz hier geringer aus.

In der Praxis kommt eine Kombination aus Gradienten- und Step-Elution häufig in optimierten Methoden vor.

Beispiele für Elutionen finden die Sie im nachfolgenden Schema.



2.7. Optimierung der Flussrate

Die Flussrate hat generell einen enormen Einfluss auf das Auflösungsvermögen und die Produktivität eines Prozesses. Je schneller der Aufreinigungszyklus, desto höher ist die daraus resultierende Produktivität, da mehr Zielsubstanz in einem Zyklus aufgereinigt werden kann.

Die Flussrate hat darüber hinaus einen enormen Einfluss auf die dynamische Bindekapazität.

Mit steigender Flussrate während der Beladung nimmt die Bindung der Zielsubstanz an die stationäre Phase ab, da die Kontaktzeit reduziert wird. Die folgende Abbildung zeigt die Elution von BSA nach einer Beladung mit unterschiedlichen Flussraten. Die Bindung reduziert sich mit zunehmenden Flussraten.

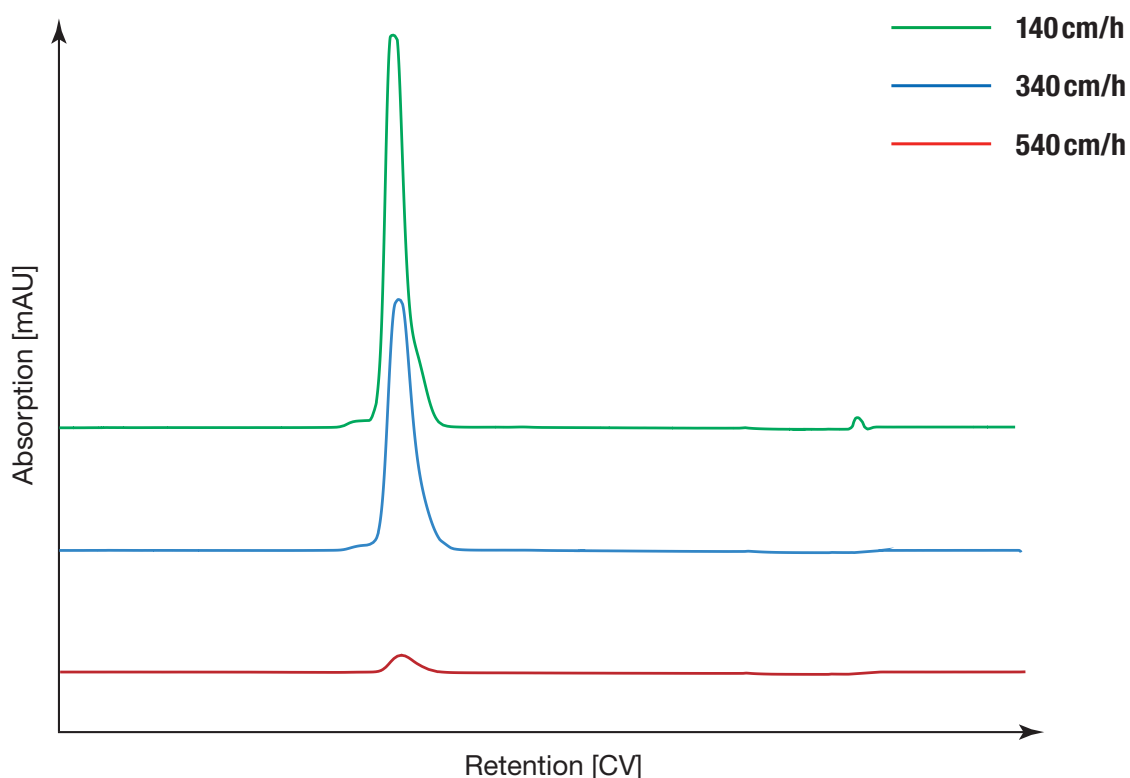


Abbildung 4: Beladung und anschließende Elution von BSA-Proben bei unterschiedlichen Flussraten von 140 – 540 cm/h. Mit steigender Flussrate nimmt die Menge an BSA ab, die an die Säule gebunden hat.

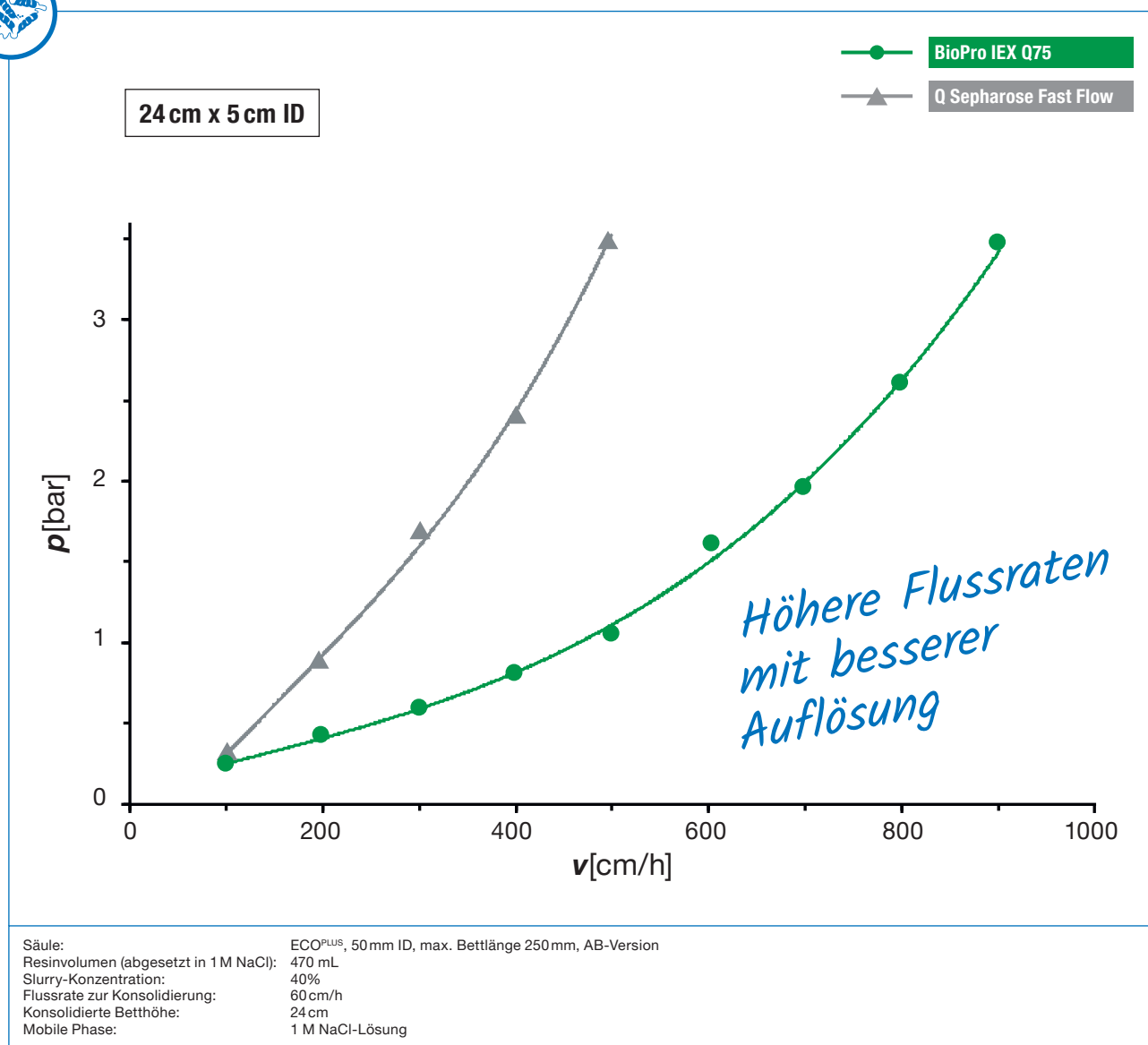
Die Flussrate ist immer auch ein Kompromiss zwischen Prozessgeschwindigkeit, Bindeeffizienz und ausreichender Auflösung während der Elution. In manchen Fällen kann eine Steigerung der Flussrate zu einer Erhöhung der Auflösung führen, während bei anderen Trennungen dasselbe Set-Up mit gleicher Flussrate zu einer geringeren Ausbeute aufgrund schlechterer Auflösung führt. Aus diesem Grund ist das Testen verschiedener Flussraten ein wichtiger Schritt bei robusten und effizienten Methodenentwicklungen.

Es ist auch möglich, die Flussraten in den einzelnen Methodenschritten (Beladung, Waschen, Elution und Regeneration) zu variieren. So kann z.B. eine Beladung bei geringerer Flussrate effizienter sein und an eine Elution bei erhöhter Geschwindigkeit gekoppelt sein. Die muss für jede Methode neu bestimmt werden, um einen möglichst effizienten Prozess zu entwickeln.

Wichtiger Hinweis

Resins, die gute Druck-Fluss-Eigenschaften aufweisen, erlauben mehr Flexibilität und eine höhere Produktivität. Materialien, die einen geringeren Rückdruck erzeugen, ermöglichen generell höhere Flussraten. Aus diesem Grund sind die Druck-Fluss-Eigenschaften und der Maximaldruck des Resins so wichtige Faktoren, die bereits möglichst früh in der Entwicklung berücksichtigt werden sollten.

Dieses praktische Beispiel in der folgenden Abbildung zeigt die Druck-Fluss-Kurve zweier Prozess-Resins: in diesem Fall zeigt das BioPro IEX Q75 einen deutlich niedrigeren Rückdruck im Vergleich zur Q Sepharose FF. Somit kann die maximale Flussrate gesteigert werden. Die kleinere Partikelgröße von BioPro IEX Q75 (75 µm) im Vergleich zur Q Sepharose FF (90 µm) ermöglichen zudem ein höheres Auflösungsvermögen.





2.8. Cleaning-in-Place Prozesse

Cleaning-in-Place (CIP)-Prozesse sind für den ökonomischen Einsatz gepackter chromatographischer Säulen essentiell. Effiziente Reinigungen erhöhen die Lebensdauer des Trennprozesses und tragen

dabei entscheidend zur Kosteneffizienz bei. Darüber hinaus erhöhen CIP-Prozesse auch deutlich die Sicherheit und Produktivität jedes Downstream Prozesses.

Die Reinigungsprozedur hängt dabei vom Verunreinigungsprofil und damit von den Verunreinigungen, die an das Resin binden, ab.

Stark bindende und stark geladene Verunreinigungen (wie Nukleinsäuren)

Bei stark gebundenen Verunreinigungen, die nicht mit 100% des Elutionspuffers eluieren, kann eine höhere Ionenstärke wie 1–2 M NaCl oder 1 M NaClO₄ hilfreich sein, um diese von der Säule zu entfernen.

Hydrophobe Verunreinigungen, Lipide und Lipoproteine

Organische Lösungsmittel sind für die Elution hydrophob gebundener Moleküle wie hydrophobe Proteine, Lipoproteine und Lipide am besten geeignet. Hierfür kann 20–70% Ethanol oder 30% Isopropanol verwendet werden.

Präzipitierte Proteine

Präzipitiertes Material kann mittels NaOH-Lösungen gelöst und damit entfernt werden. Chaotrope Salze und Agentien (Substanzen, die die Hydrathüllen-Struktur aufbrechen, wie z.B. 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium-HCl) sind der nächste Schritt. Falls diese Prozeduren nicht ausreichen, um das präzipitierte Material zu entfernen, kann ein enzymatischer Verdau (beispielsweise mit Pepsin) helfen.

Entfernung von Metallionen

Zitronensäure ist die Lösung der Wahl, um typische Metallionen wie Eisen von Kationen- und Anionentauscher Resins zu entfernen. Darüber hinaus können Chelatoren wie EDTA in niedriger Konzentration helfen, diese komplett vom Resin zu entfernen, falls nötig.

Viren und Endotoxine

Mögliche Verunreinigungen mit Viren und Endotoxinen müssen effizient von der Säule entfernt werden. Die Anwendung von NaOH-Lösungen ist dabei eine effektive Methode.

Sterilisierung der Säule

Ein weiterer wichtiger Faktor, weshalb CIP-Prozessen im DSP-Bereich so wichtig sind, ist das Risiko von mikrobiellem Wachstum. Aus diesem Grund muss die Säule regelmäßig sterilisiert werden. Dies kann über mehrere Wege geschehen.

Am weitesten verbreitet ist dabei die Behandlung mit alkalischen Lösungen (z.B. 0,1–1 M NaOH). Für eine Langzeit-Lagerung empfiehlt sich 20% Ethanol zur Verhinderung mikrobiellen Wachstums.

Empfohlenes Standard-Protokoll

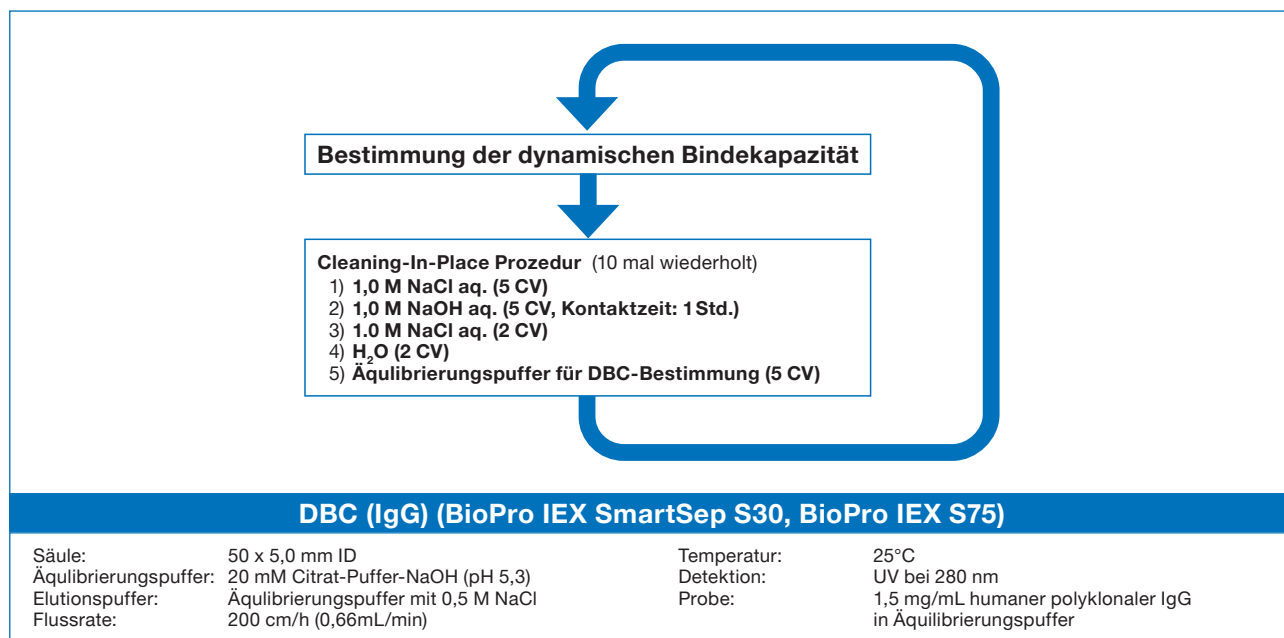
Die effektivste CIP-Methode für Standard-Reinigungen ist eine Behandlung mit starker Ionenstärke (1–2 M NaCl) und mit Natriumhydroxid (0,1–1 M NaOH):

- 1) 1,0 M NaCl aq. (5 CV)
- 2) 1,0 M NaOH aq. (5 CV, Kontaktzeit: 1 Std.)
- 3) 1,0 M NaCl aq. (2 CV)
- 4) H₂O (2 CV)
- 5) Äquilibrationsspeicher für DBC-Bestimmung (5 CV)



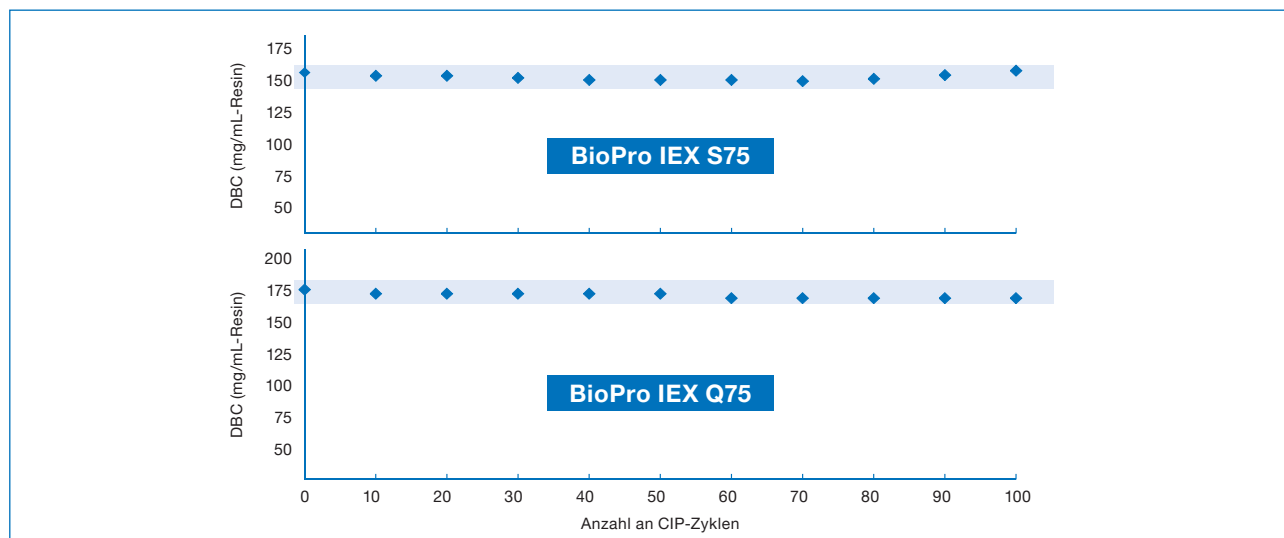
Prakt. Beispiel: Stabilität gegenüber alkalischen CIP-Prozessen

In dieser Studie wurde die Stabilität der BioPro IEX-Resins gegenüber CIP-Reinigungen mit 1 M NaOH als Standardmethode untersucht. Hier wurde der Effekt von mehreren CIP-Zyklen auf die Bindekapazität eines monoklonalen Antikörpers mit dem folgenden Protokoll getestet:



CIP-Zyklus	Säule:	50 x 5,0 mm ID
	Flussrate:	200 cm/h (1,0 M NaCl, H ₂ O, Puffer) 30 cm/h (1,0 M NaOH)
	Temperatur:	25°C

Die dynamische Bindungskapazität der BioPro IEX-Resins für das IgG-Molekül war konstant hoch. Es konnte auch nach 100 CIP-Zyklen keine Abnahme der Kapazität für die beiden Resins festgestellt werden.



Die Resins sind sehr stabil gegenüber CIP-Prozeduren mit 1 M NaOH. Aus diesem Grund ist die Lebenszeit des Resins, trotz dieser harschen aber sehr effektiven Behandlung, nicht beeinflusst. Das ermöglicht eine robuste und produktive Antikörper-Aufreinigung.

3. Beladungsstudien

Nachdem das generelle Methoden-Set-Up festgelegt wurde, sind Beladungsstudien im analytischen Maßstab der nächste Schritt in der Prozessentwicklung mittels IEX. In diesem Schritt wird die maximale Menge an Feedlösung bestimmt, die auf die Säule geladen und mit ausreichender Auflösung wieder eluiert werden kann.

Die maximale Beladungsmenge für die IEX-Säule ist durch die gesamte Bindekapazität des Resins und durch die nötige Auflösung der eluierten Peaks

limitiert. Je höher die dynamische Bindekapazität des Resins, desto mehr Substanz kann an die stationäre Phase gebunden werden und umso höher ist die allgemeine Beladbarkeit. Auf der anderen Seite bestimmt die Auflösung zwischen dem Produkt-Peak und den Verunreinigungs-Peaks während der Elution die maximale Beladung. Beides wird im analytischen Maßstab untersucht, um so Zeit, Geld und Zielsubstanz zu sparen.

Bestimmung der dynamischen Bindekapazität

Die DBC eines Resins als wichtigster Faktor hinsichtlich Produktivität wird durch das Pumpen einer definierten Substanzmenge über die Säule und das anschließende Messen des Durchbruch-

punkts bestimmt. Die DBC pro mL Resins kann im Anschluss berechnet werden. Das Schema und die zugehörige Formel für die DBC-Bestimmung sind in Abbildung 5 dargestellt.

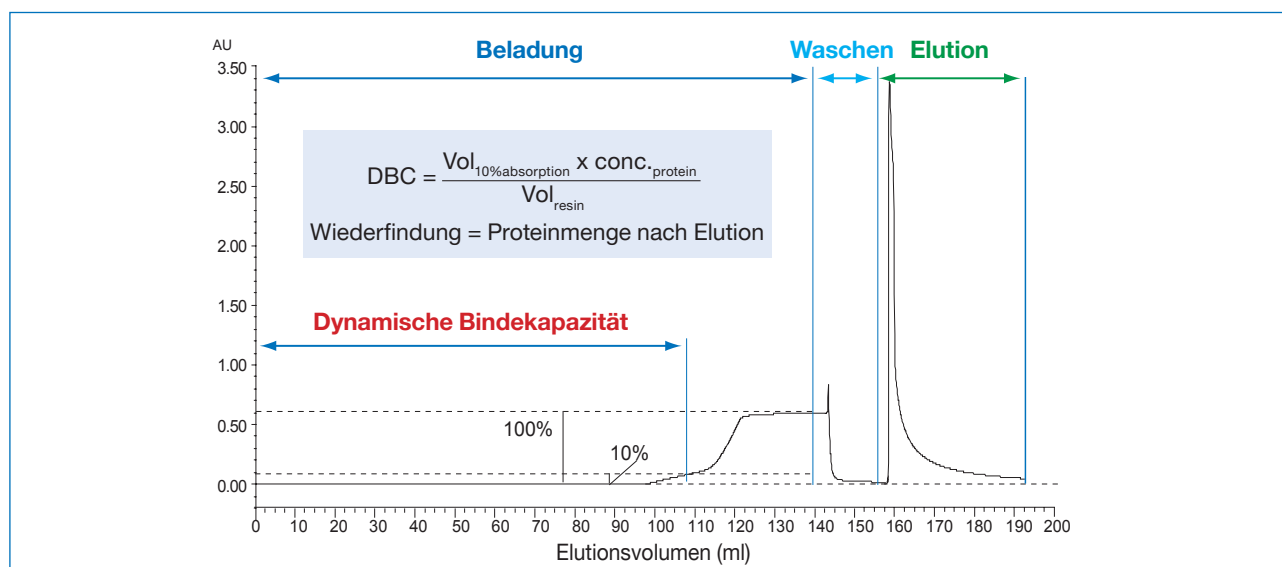
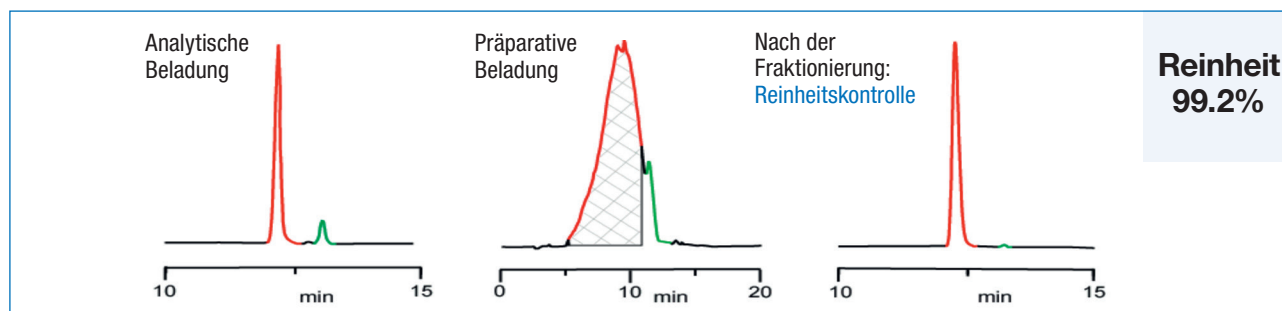


Abbildung 5: Prozedur zur DBC-Bestimmung mit einem Durchbruch der beladenen Substanz bei 10%

Optimierte Beladung und Fraktionierungskriterien

Das nachfolgende Beispiel zeigt ein Chromatogramm mit analytischer Beladung und guter Auflösung. Durch die nachfolgenden Überladungsstudien wird die maximale Beladung festgelegt. Entlang

des Elutionsprofils wird fraktioniert. Die Fraktionen werden nach Reinheit und Spezifikation qualifiziert. Basierend auf dem Reinheitsgrad kann die Fraktionierung und damit die Ausbeute optimiert werden.





Praktisches Beispiel: Erhöhte Proteinbeladung und der Effekt auf die Auflösung, Reinheit und Ausbeute

Dieses Beispiel zeigt die Trennung drei verschiedener Zielproteine. Das Elutionsprofil der initialen Beladungsmenge (3mg Protein) zeigt drei gut getrennte Peaks. Mit steigender Beladung (15mg Protein) nimmt die Auflösung ab, da sich die Peakflächen vergrößern.

Mit höherer Beladung von bis zu 30mg Protein nimmt die Auflösung insbesondere zwischen Peak 1 und 2 weiter ab. Trotzdem ist die Ausbeute für alle drei Proteine nach wie vor auf einem hohen Level (90,7% Ausbeute mit > 98% Reinheit).

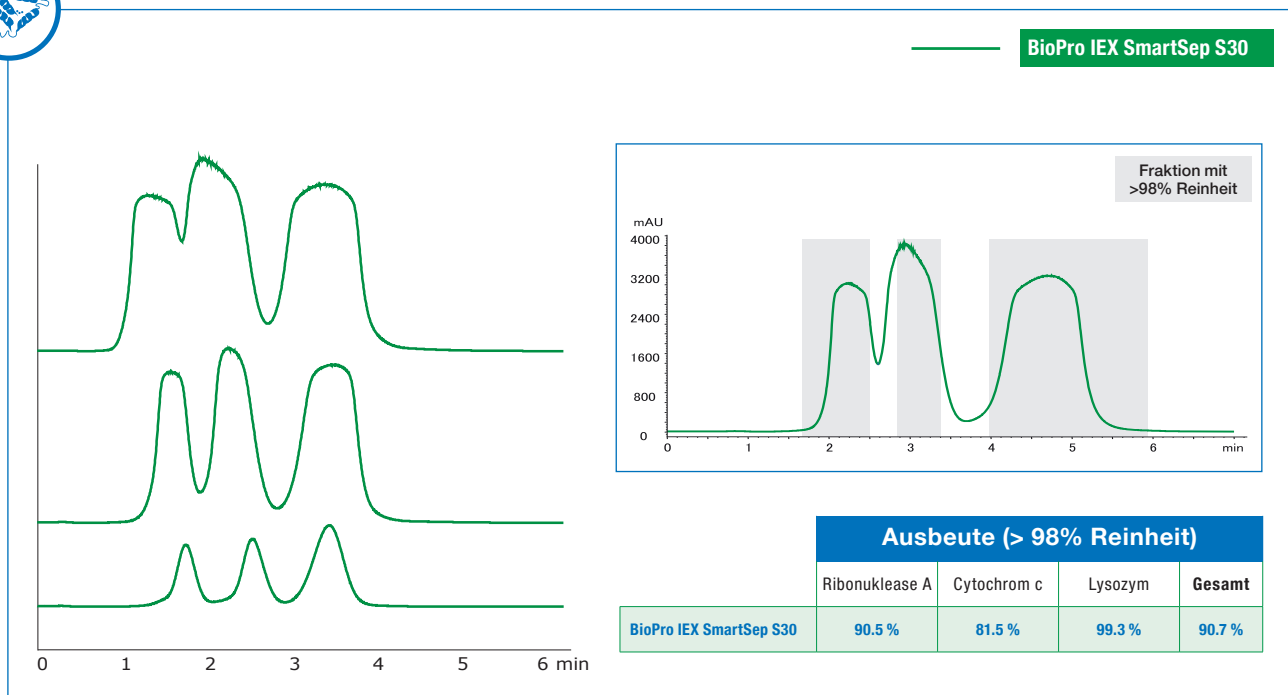


Abbildung 6: Abtrennung von drei Zielproteinen bei unterschiedlichen Beladungen.
Bei der höchsten Beladung von 30mg wurden hohe Wiederfindungsraten erzielt.

Die Auflösung der eluierenden Peaks hängt auch von der Elution selbst und dem Gradienten ab, der verwendet wurde. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Elutionsbedingungen hinsichtlich des

Auflösungsvermögens zu optimieren. Eine erhöhte Auflösung erlaubt anschließend eine höhere Beladung und damit auch eine höhere Produktivität.

Flow-Through-Methoden

Im Falle von Flow-Through-Methoden ist die Auflösung nicht relevant, da die Zielsubstanz durch die Säule durchfließt. Die Verunreinigungen werden an die Säule gebunden und in einem Schritt schlagartig eluiert. Somit hängt die maximale Beladung

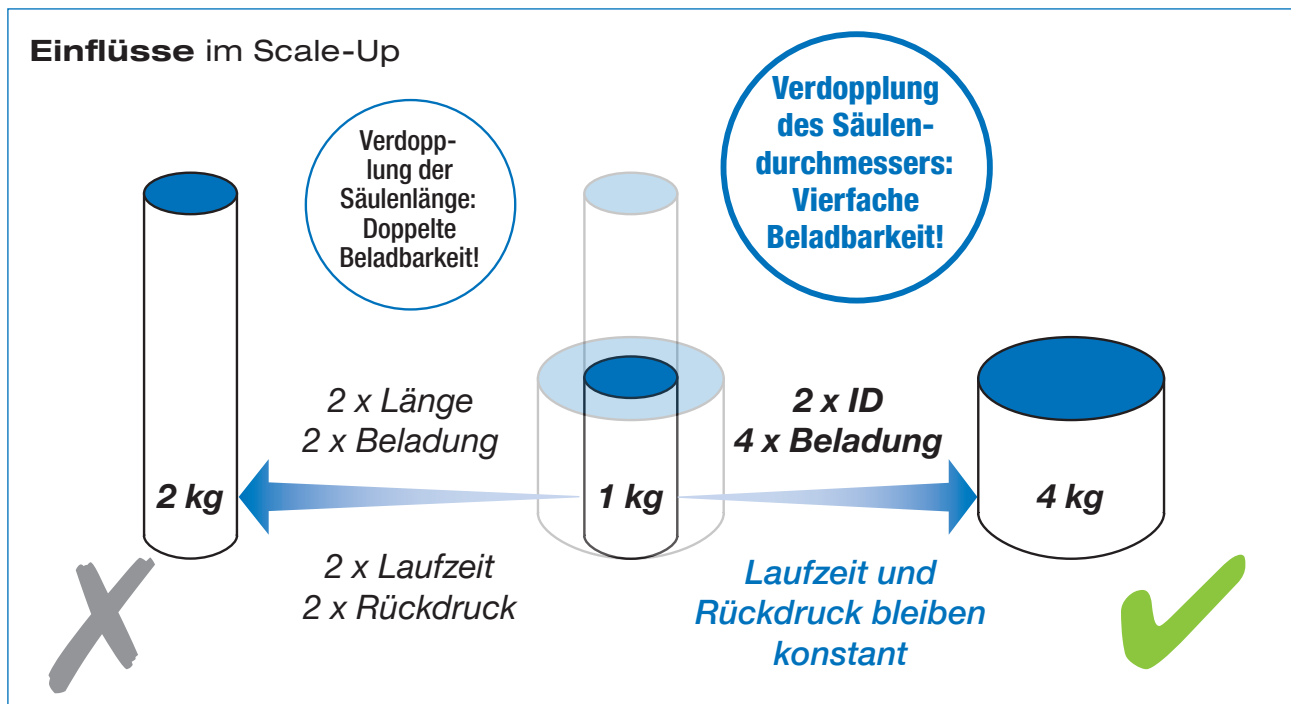
in diesem Fall von der maximalen Bindekapazität des Resins für die jeweiligen Verunreinigungen ab. Je höher die DBC des Resins, umso höher ist die Produktivität des Prozesses, da mehr Feed-Lösung pro Zyklus aufgereinigt werden kann.

4. Scale-Up

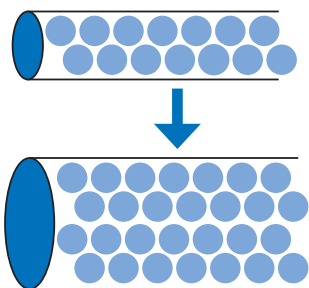
Nachdem alle Methoden-Parameter festgesetzt wurden, kann der Prozess aufskaliert werden. Der lineare Scale-Up ist dabei eine einfache Vorgehensweise, um den bestehenden Prozess in einen größeren Maßstab zu transferieren.

4.1. Der lineare Scale-Up

Während des linearen Scale-Ups werden Säulenhöhe und Partikelgröße aus Methodenentwicklung und Beladungsstudien beibehalten. Der effizienteste Ansatz, um die Kapazität zu erhöhen, ist die Vergrößerung des inneren Säulendurchmessers (ID). Durch die Vergrößerung des Säulendurchmessers, erhöht sich die Beladung, wie im folgenden Diagramm gezeigt wird.



Der lineare Scale-up **Faktor (SF)**



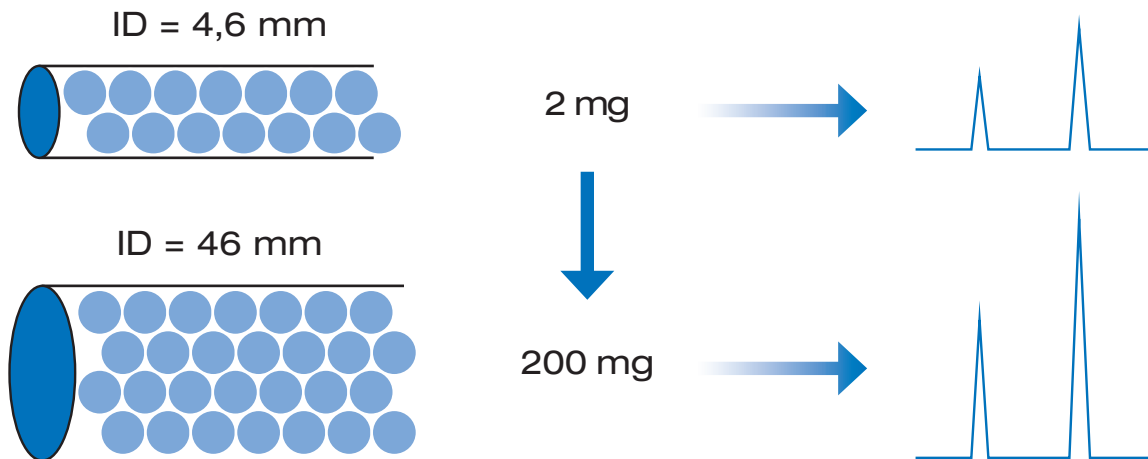
$$\mathbf{SF} = \frac{A_{ID \text{ präp.}}}{A_{ID \text{ analyt.}}} = \frac{ID^2_{\text{präp.}}}{ID^2_{\text{analyt.}}}$$

- ➔ Säulenhöhe bestimmt die Retentionszeit
- ➔ Durchmesser bestimmt die Beladbarkeit

Linearer Scale-Up: **Beladung**

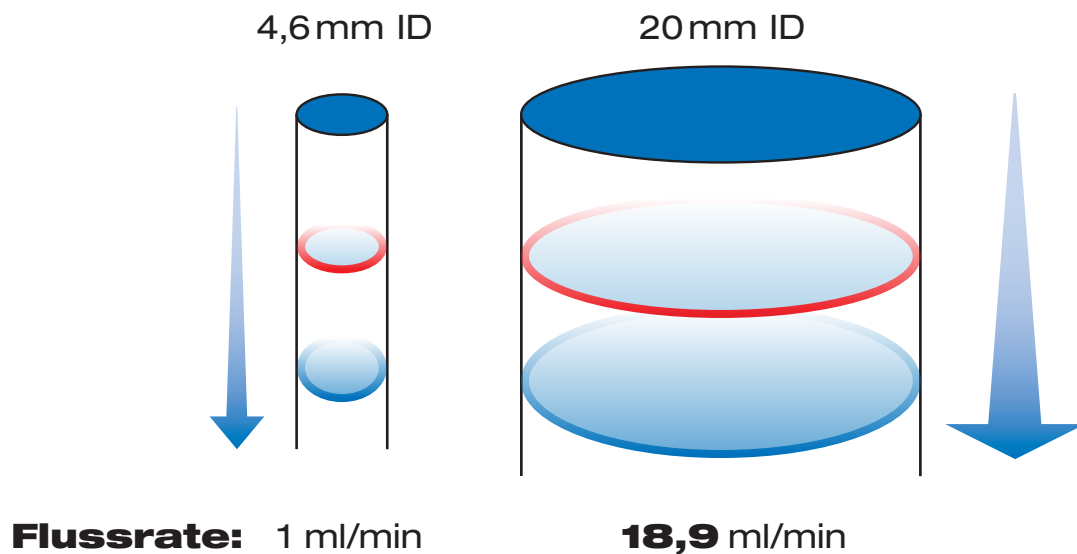
$$SF = \frac{ID_{\text{präp.}}^2}{ID_{\text{analyt.}}^2} = \frac{m_{\text{präp.}}}{m_{\text{analyt.}}} \rightarrow SF = \frac{(46 \text{ mm})^2}{(4,6 \text{ mm})^2} = \frac{200 \text{ mg}}{2 \text{ mg}} = \mathbf{100}$$

$$SF = 100$$



Linearer Scale-Up: **Flussrate und Retentionszeit**

$$SF = \frac{ID_{\text{präp.}}^2}{ID_{\text{analyt.}}^2} \rightarrow SF = \frac{(20 \text{ mm})^2}{(4,6 \text{ mm})^2} = \mathbf{18,9}$$



5. Zusammenfassung

Der Schlüssel für effiziente Aufreinigungen mittels Ionenaustauschchromatographie ist die Bestimmung der Prozess-Parameter und die Auswahl des am besten passenden IEX-Resins.

Die Methodenentwicklung und die Optimierung der einzelnen Schritte werden im kleinen Maßstab durchgeführt. Das beinhaltet die folgenden Schritte:

1. Downstream-Strategien für eine erfolgreiche Aufreinigung
2. Anwendbare Trennmodi
3. Resinauswahl und Partikelgröße
4. Puffer und pH-Wert
5. Festlegung der Elutionsbedingungen
6. Gradientenanpassung und Optimierung der Elution
7. Flussraten-Optimierung
8. Reinigungsstrategien

Der erste Schritt in der Prozessentwicklung ist die Festlegung des Trennmodus, gefolgt von der **Auswahl eines passenden Resins**. Dies erfolgt am besten im Rahmen eines umfangreichen Resin-Screenings. Die Partikelgröße des Resins bestimmt das Auflösungsvermögen, aber auch den resultierenden Rückdruck.

Der nächste Schritt ist die Festlegung der passenden **mobilen Phase** inklusive der Bestimmung der Puffer-Zusammensetzung, pH-Wert und initiale Salzkonzentration, um eine optimale Bindung der Zielsubstanzen an das Resin zu gewährleisten. Die Elution kann generell über einen Gradienten oder über Step-Elution durch erhöhte Salzkonzentration oder eine Veränderung des pH-Werts erfolgen. Eine Kombination dieser Methoden ist ebenfalls möglich. Initiale Gradienten-Experimente können als Startpunkt dienen, um die Elution zu optimieren.

Die Flussrate sollte so angepasst werden, dass eine optimale Bindung, als auch Elution ermöglicht wird und ist generell eine sehr potente Möglichkeit, die Effizienz von Prozessen zu erhöhen. Regelmäßig angewendete Cleaning-in-Place (CIP)-Zyklen steigern die Effizienz des Prozesses. Resins mit hoher Stabilität gegenüber alkalischen CIP-Prozeduren verbessern somit die Kosteneffizienz.

Nachdem die Methodenparameter der IEX-Aufreinigung festgelegt wurden, werden **Beladungsstudien** durchgeführt, um die gesamte Produktivität zu erhöhen. Der **lineare Scale-Up** ist schließlich eine einfache und effektive Methode, um den Prozess in größere Maßstäbe zu transferieren.



Unterstützung bei regulatorischen Fragestellungen

Detaillierte Informationen bezüglich der Unterstützung bei regulatorischen Fragestellungen finden Sie im YMC-Whitepaper über Methodenentwicklung für präparative LC. Sie können einfach Ihr Exemplar über eine Anfrage auf unserer Homepage bestellen. Oder Sie fragen direkt bei Ihrem YMC-Ansprechpartner nach.

Schulungs- und Trainingsmöglichkeiten

Für Mitarbeiter im Tätigkeitsfeld der präparativen Chromatographie sind regelmäßige Weiterbildungen empfehlenswert. Gerade in diesem komplexen und für die Produktionseffizienz kritischen Bereich führen verbesserte Fähigkeiten zu einer Steigerung der Sicherheit, Zuverlässigkeit und Effizienz in der täglichen Arbeit.

YMC-Schulungen gib es für alle Arten der Flüssigkeitschromatographie für die Analytik bis zum Prozessmaßstab und von den Grundprinzipien bis zur fortgeschrittenen Anwendungsunterstützung. Wenn Sie spezielle Aufgaben ansprechen möchten, stellen wir Ihnen gerne ein maßgeschneidertes Seminar zusammen.



Lernen Sie, eine präparative Methode zu entwickeln – von der Phasenauswahl über das Scale-up bis hin zur Aufreinigung!

Inhalte und Lernziele

- In welchem Fall ist eine präparative Methode – wie gehen Sie bei der präparativen Methodenentwicklung vor?
- Welche Schritte sind bei der präparativen Methodenentwicklung zu beachten?
- Wie wählen Sie die richtige Säule aus?
- Wie wählen Sie die richtige Phase aus?
- Wie wählen Sie die richtige Eluentenkomposition aus?
- Wie wählen Sie die richtige Flussrate aus?
- Wie wählen Sie die richtige Packung aus?
- Wie wählen Sie die richtige Packung aus?

Den Ort bestimmen Sie!

- Wie wählen Sie den Ort aus?
- Wie wählen Sie den Ort aus?
- Wie wählen Sie den Ort aus?

Selbstverständlich kommen wir für das Seminar auch gerne zu Ihnen!

Ihre Vorteile:

- Maßgeschneiderte Schulung und flexible Seminarformate
- Flexible Seminarzeiten
- Flexible Seminarorte

Für mehr Informationen kontaktieren Sie bitte:
Dr. Michael Hehn
Head of Sales
Tel. +49 2064 427-0
Fax +49 2064 427-222
E-Mail: info@ymc.eu

www.ymc.eu

Wir können auch Schulungen an Ihrem Standort organisieren:

- Dauer und Themen nach Vereinbarung
- Flexible Teilnehmerzahlen
- Fixe Kosten

Zielgruppe

Alle an der präparativen Chromatographie beteiligten Mitarbeiter (Laboranten, Techniker, Ingenieure, Chemiker)

Aktuelle Termine für Seminare finden Sie in unserem Seminar-Flyer unter www.ymc.eu oder Sie können sich direkt an uns wenden:

Tel: +49 2064 427-0

Fax: +49 2064 427-222

E-Mail: info@ymc.eu

Labor-Dienstleistungen

Sparen Sie Zeit mit einer vorgepackten Säule

Wenn Sie mit einem engen Zeitplan arbeiten oder keine Erfahrung mit dem Packen von Säulen haben, gibt es eine Lösung! Vertrauen Sie auf die Erfahrung von YMC und fragen Sie nach einer gepackten Säule. Unser Wissen über das Packen ist Ihr Vorteil!

Unsere Dienstleistungen umfassen:

- Packen von Säulen im analytischen Maßstab mit präparativem Bulkmaterial zur bequemen Methodenentwicklung, Phasenscreening und zuverlässiges, müheloses Scale-up (ID bis zu 20 mm)
- Packen von semi-präparativen YMC-Actus-Säulen mit axialer Kompressionstechnologie für hervorragende Stabilität und Effizienz der Säule (ID von 20, 30 oder 50 mm)
- Packen von präparativen Säulen in kleinem Maßstab (ID von 50 bis 200 mm)
- Maßgeschneiderte Aufreinigungen nach Ihren individuellen Anforderungen

Und so geht's:



Mehr über YMC – Ionentauscher-Resins von YMC

Spezifikationen

BioPro IEX Series	BioPro IEX Q75	BioPro IEX SmartSep Q30	BioPro IEX SmartSep Q20	BioPro IEX SmartSep Q10	BioPro IEX S75	BioPro IEX SmartSep S30	BioPro IEX SmartSep S20	BioPro IEX SmartSep S10
Ionentauscher-Typ	Starker Anionentauscher				Starker Kationentauscher			
Geladene Gruppe	-R-N ⁺ (CH ₃) ₃				-R-SO ₃ ⁻			
Matrix	Hydrophile Polymer-Partikel							
Porengröße	porös							
pH-Bereich	2–12							
Partikelgröße	75 µm	30 µm	20 µm	10 µm	75 µm	30 µm	20 µm	10 µm
Drucklimit	0,3 MPa	2 MPa Max. 3 MPa		3 MPa Max. 4 MPa	0,3 MPa	2 MPa Max. 3 MPa		3 MPa Max. 4 MPa
Typische Flussrate	200–1000 cm/hr Max. 2000 cm/hr							
Ionenaustausch-Kapazität	0,10 meq/mL Resin	0,08 meq/mL Resin			0,10 meq/mL Resin	0,08 meq/mL Resin		
Dynamische Bindekapazität	Min. 160 mg/mL Resin (BSA)	Min. 100 mg/mL Resin (BSA)			Min. 160 mg/mL Resin (BSA)	Min. 100 mg/mL Resin (BSA)		

Bestellinformationen

Starker Anionentauscher: BioPro IEX S

Produkt	Partikelgröße	Code	Verpackungseinheit*					
			50 mL	250 mL	1 L	5 L	10 L	20 L
BioPro IEX SmartSep Q10	10 µm	QSA0S10	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BioPro IEX SmartSep Q20	20 µm	QSA0S20	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BioPro IEX SmartSep Q30	30 µm	QSA0S30	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BioPro IEX Q75	75 µm	QAA0S75	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* Weitere Verpackungsgrößen auf Anfrage möglich.

Starker Kationentauscher: BioPro IEX S

Produkt	Partikelgröße	Code	Verpackungseinheit*					
			50 mL	250 mL	1 L	5 L	10 L	20 L
BioPro IEX SmartSep S10	10 µm	SSA0S10	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BioPro IEX SmartSep S20	20 µm	SSA0S20	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BioPro IEX SmartSep S30	30 µm	SSA0S30	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BioPro IEX S75	75 µm	SPA0S75	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* Weitere Verpackungsgrößen auf Anfrage möglich.

Regulatorische Support-Datei unter Geheimhaltungsvereinbarung. Wird in validierten cGMP-Herstellungsprozessen verwendet. Kundenspezifisches Material auf Anfrage erhältlich. DMF bei der FDA registriert.

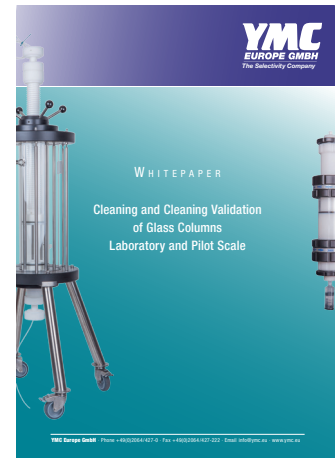
Weitere Informationen



Whitepaper
Methodenentwicklungsstrategien

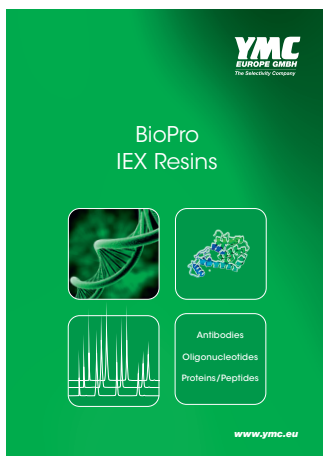


Whitepaper Strategien
bei der Peptidaufreinigung

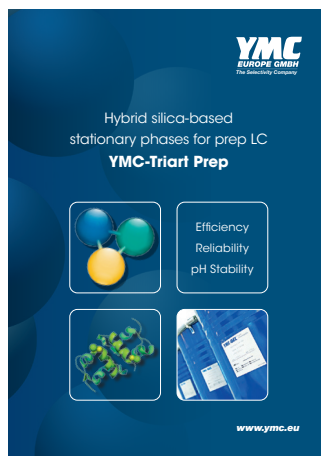


Whitepaper
Reinigen von Glassäulen

Ebenfalls von Interesse:



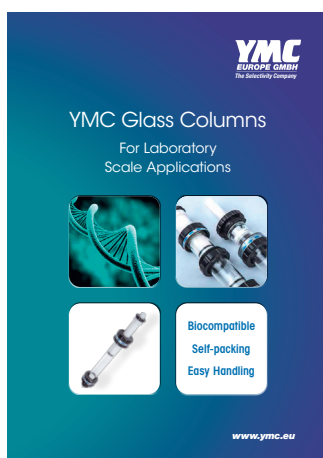
Broschüre
BioPro IEX Resins



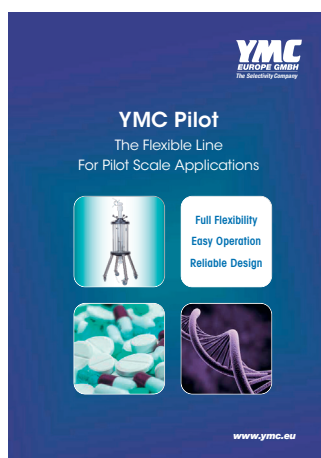
Broschüre
YMC-Triart Prep



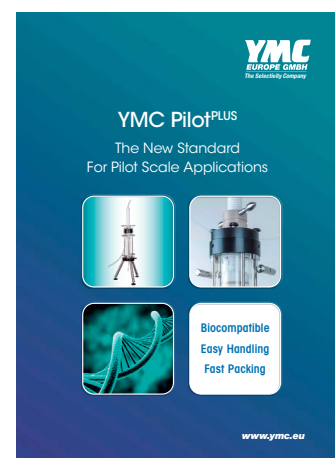
Broschüre
YMC*Gel HG-Series



Broschüre
YMC Glass Columns

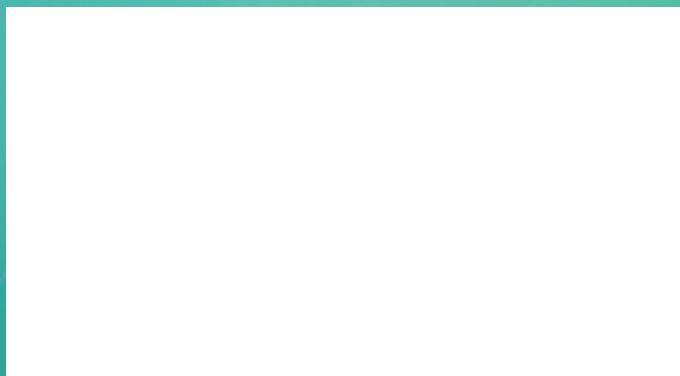


Broschüre
YMC Pilot



Broschüre
YMC Pilot^{PLUS}

Your local distributor:



YMC Europe GmbH

Schöttmannshof 19
D-46539 Dinslaken
Germany
Tel +49 2064 427-0, FAX +49 2064 427-222
www.ymc.eu

YMC Schweiz GmbH

Im Wasenboden 8
4056 Basel
Switzerland
Tel + 41 61561 80-50, Fax + 41 61561 80-59
www.ymc-schweiz.ch

YMC CO., LTD.

YMC Karasuma-Gojo Bld. 284 Daigo-cho,
Karasuma Nishiiru Gojo-dori Shimogyo-ku,
Kyoto 600-8106 Japan
Tel +81 75342 45-15, FAX +81 75342 45-50
www.ymc.co.jp