



Doctoral Thesis

## **Towards a better understanding of ion exchange materials for purification of proteins**

**Author(s):**

Franke, Agnes

**Publication Date:**

2009

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005949889> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

ETH Diss. Nr. 18474

# Towards a better understanding of ion exchange materials for the purification of proteins

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

Agnes Franke  
Dipl.-Ing. Universität Stuttgart, Germany  
born January 7<sup>th</sup>, 1980 in Reutlingen, Germany  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Massimo Morbidelli, examiner  
Prof. Dr. Marco Mazzotti, co-examiner

Zurich 2009

# Abstract

In search of new active ingredients for drugs, proteins, especially antibodies, have already proven a great potential. However, as they are sensitive to heat, the standard purification scheme includes several chromatographic steps, whereas one of those is usually an ion exchange step. In this work several examples are shown that enlighten some phenomena occurring during the downstream processing of proteins with ion exchange chromatography. Based on fundamental insights, procedures are established for the characterization of proteins on chromatographic materials. By this systematic analysis, the behavior of proteins on stationary phases is linked to material properties.

The adsorption and diffusion behavior of a polyclonal antibody is studied in Chapter 2 on a set of custom made cation exchange resins. The performance of functionalized materials, such as cation exchange resins, is not only dependent on the ligand type and ligand density, but also on the pore accessibility of the target molecule. In the case of large molecules such as antibodies this latter parameter becomes crucial, because the size of such molecules falls somewhere inside the pore size distribution of the resin. The influence of the ligand density and accessibility on the overall performance of the material is explored systematically. Five different materials, having the same chemistry as the strong cation exchange resin Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  (M), have been analyzed. These materials only differ in the ligand density. It is shown that the ligand density directly influences the porosity of the materials as well as the pore diffusivity and the dynamic binding capacity. For a given purification problem an optimal ligand density can be found. Based on the above results a new material is proposed, showing superior properties in terms of dynamic binding capacity. This is achieved by an optimization of the ligand density and by a decrease of the particle size of the stationary phase. The material properties are modeled with a general rate model. Further simulations were conducted to evaluate the performance of the new material in comparison with a conventional resin.

A new class of stationary phases is analyzed in Chapter 3. Mixed mode resins are ma-

materials that exhibit more than one functionality. This feature can be utilized to reduce the number of chromatographic steps in the downstream processing of proteins, while keeping the same purity constraints. This approach might lead to a significant cost reduction in the downstream processing. A promising mixed mode resin, Capto adhere, is therefore studied for the application in the polishing step of the downstream processing of monoclonal antibodies from cell culture supernatant. Capto adhere is a strong anion exchange resin with additional hydrophobic interaction functionalities. The Henry coefficient, which quantifies the adsorption strength, was measured for the full working range of the stationary phase as a function of the sodium chloride concentration and the pH. The results are compared to a conventional anion exchange resin and a hydrophobic interaction resin. Furthermore, Capto adhere is applied for the polishing step of an antibody from an industrial clarified cell culture supernatant. Finally, it is shown that this resin can be used for the separation of IgG subclasses.

In Chapter 4, experiments with human serum albumin on the strong cation exchange resin Fractogel EMD SE Hicap (M) are described. Even though human serum albumin at high purity is used, two peaks in gradient elution experiments occur. It is shown that human serum albumin binds to Fractogel EMD SE Hicap (M) in two different binding conformations: site 1 adsorbs instantaneously, while site 2 adsorbs with a kinetic limitation. The two peak behavior of human serum albumin is analyzed in detail, especially at various gradient lengths, concentrations and temperatures. Breakthrough curves are performed at four modifier concentrations and three velocities. The characteristic behavior, as described for gradient experiments, is confirmed for the breakthrough curves. The two peak elution pattern of human serum albumin is also found for other strong cation exchange resins, but not for weak cation exchange resins. It is concluded that the described behavior is peculiar for the interaction of human serum albumin with the strong cation exchange ligand of the resin.

The adsorption behavior of human serum albumin on Fractogel EMD SE Hicap (M) is modeled with a general rate model in Chapter 5, whereas the two elution peaks are modeled with two binding sites. As the adsorption process is not in equilibrium for this system, the model also includes an approach for the kinetics of adsorption. Isocratic experiments under nonadsorbing conditions were used to characterize the mass transfer of this system. The isotherm of both adsorption sites, as well as the kinetic of adsorption and desorption for the second site, that were modeled with a first order kinetic, are functions of the modifier. The kinetic ansatz is evaluated with linear gradient experiments and step experiments with various adsorption times. It is possible to simulate the characteristics of the experiments with the proposed modified general rate model. The behavior of the system at conditions, that are not considered for the regression, can be predicted with the proposed model.

# Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen für Medikamente haben Proteine, insbesondere Antikörper, bereits großes Potential gezeigt. Allerdings erfordert die Aufreinigung dieser hitzeempfindlichen Substanzen unter anderem mehrere chromatographische Schritte, wobei einer dieser Schritte oft mit Ionenaustauscherchromatographie durchgeführt wird. In dieser Arbeit werden mehrere Beispiele gezeigt, die zum Verständnis von Phänomenen beitragen, die bei der chromatographischen Aufreinigung von Proteinen auftreten. Es werden Vorgehensweisen für die Charakterisierung von Proteinen auf Materialien entwickelt. Durch den systematische Ansatz kann das Verhalten von Proteinen auf Stationärphasen mit Materialeigenschaften verknüpft werden.

Das Adsorptions- und Diffusionsverhalten eines polyklonalen Antikörpers wird in Kapitel 2 auf mehreren, speziell angefertigten Kationenaustauschern untersucht. Die Kapazität von funktionalisierten Materialien wie zum Beispiel Kationenaustauschern hängt nicht nur von der Art des Liganden und der Ligandendichte ab, sondern auch von der Porezugänglichkeit der Phase für das Zielmolekül. Im Falle großer Moleküle, wie zum Beispiel Antikörpern, sind diese Parameter äußerst wichtig, da die Größe solcher Moleküle im Bereich der Porengrößenverteilung der Stationärphase liegt. Der Einfluss der Ligandendichte und der Porezugänglichkeit auf die Leistungsfähigkeit des Materials wird daher systematisch untersucht. Fünf verschiedene Stationärphasen, alle chemisch identisch mit dem starken Kationenaustauscher Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  (M), werden analysiert. Daher unterscheiden sich die einzelnen Materialien nur in der Ligandendichte. Es wird gezeigt, daß eine Steigerung der Ligandendichte die Porosität des Materials verringert. Dies beeinflusst auch den Diffusionskoeffizienten und die dynamische Kapazität. Für ein gegebenes Aufreinigungsproblem gibt es eine optimale Ligandendichte. Basierend auf einem rationalen Entwurf wird eine neue Stationärphase mit überlegenen Eigenschaften synthetisiert. Dies wird durch eine Optimierung der Ligandendichte und durch eine Verringerung der Partikelgröße der Stationärphase erreicht. Die Eigenschaften des Materials werden mit einem Porendiffusionsmodell beschrieben. Weitere

Simulationen werden durchgeführt, um die Güte des neuen Materials mit konventionellen Stationärphasen zu vergleichen.

Eine neue Klasse von Stationärphasen wird in Kapitel 3 analysiert. Bei der Adsorption an „Mixed Mode“ Harzen treten gleichzeitig mehrere Adsorptionsmechanismen auf. Eine dieser neuen Stationärphasen, Capto adhere, wird für die Eignung für den zweiten Aufreinigungsschritt der Aufarbeitung von monoklonalen Antikörpern aus Zellüberstand untersucht. Capto adhere ist ein starker Anionenaustauscher, der außerdem hydrophobe Wechselwirkungen zeigt. Der Henrykoeffizient, der ein Maß für die Adsorptionsstärke darstellt, wird für den gesamten Betriebsbereich der Stationärphase als Funktion der Salzkonzentration und des pH-Werts gemessen. Die Ergebnisse werden mit Daten für einen konventionellen Anionenaustauscher und mit Daten für eine Phase nur mit hydrophoben Wechselwirkungen verglichen. Schließlich wird gezeigt, daß diese Stationärphase auch für die Trennung von Antikörpersubklassen erfolgreich eingesetzt werden kann.

In Kapitel 4 werden Experimente mit humanem Serumalbumin auf dem starken Kationenaustauscher Fractogel EMD SE Hicap (M) beschrieben. Obwohl Humanalbumin hoher Reinheit verwendet wird, eluiert das Protein im Salzgradienten mit zwei Peaks. Es wird gezeigt, daß Humanalbumin auf Fractogel EMD SE Hicap (M) in zwei verschiedenen Konformationen adsorbiert: während humanes Albumin in der ersten Konformation unmittelbar adsorbiert, tritt bei der zweiten Konformation eine kinetische Limitierung auf. Dieses Verhalten wird detailliert untersucht, insbesondere mit Gradienten verschiedener Länge, bei unterschiedlichen Konzentrationen und bei verschiedenen Temperaturen. Durchbruchkurven werden bei vier verschiedenen Salzkonzentrationen und drei verschiedenen Flußraten gemessen. Das beschriebene Verhalten von Humanalbumin auf Fractogel EMD SE Hicap (M) tritt auch bei anderen starken Kationenaustauschern auf, allerdings nicht bei schwachen Kationenaustauschern. Daher wird angenommen, daß das beschriebene Verhalten charakteristisch für die Wechselwirkung zwischen Humanalbumin mit dem Liganden des starken Kationenaustauschers ist.

Das Verhalten von Humanalbumin auf Fractogel EMD SE Hicap (M) wird mit einem Porendiffusionsmodell in Kapitel 5 beschrieben, wobei die zwei Humanalbumin-Peaks durch zwei verschiedene Adsorptionsstellen modelliert werden. Da der Adsorptionsprozess sich für das beschriebene System nicht im Gleichgewicht befindet, wird in das Modell ein Ansatz für die Adsorptionskinetik eingearbeitet. Isokratische Experimente unter nichtadsorbierenden Bedingungen wurden benutzt, um den Stofftransport des Systems zu charakterisieren. Die Kinetik für Adsorption und Desorption für die zweite Bindungsstelle wird mit einem Ansatz erster Ordnung beschrieben. Sowohl die Kinetik für Adsorption und Desorption, als auch die Isothermen beider Adsorptionsstellen sind Funktionen der Salzkonzentration. Die beschriebenen Experimente können mit dem mo-

difizierten Porendiffusionmodell erfolgreich simuliert werden. Darüber hinaus wird das Verhalten des Systems unter Bedingungen, die nicht für die Regression berücksichtigt wurden, vorhergesagt.