

Mikrofluidik

3D-Druck zur Miniaturisierung von chromatographischen Anwendungen

CARLOTTA KORTMANN¹, TAIEB HABIB¹, DÖRTE SOLLE¹, JANINA BAHNEMANN²

¹INSTITUT FÜR TECHNISCHE CHEMIE, UNIVERSITÄT HANNOVER

²TECHNISCHE BIOLOGIE, INSTITUT FÜR PHYSIK, UNIVERSITÄT AUGSBURG

3D printing as a tool for prototyping is already well established in many areas of biotechnology. Whether for the production of individual laboratory devices, for the development of biocompatible devices for cell cultivation or even lab-on-a-chip systems for miniaturization and reduction of consumables – the technology is now used by many research areas within biotechnology. However, there is one area where 3D printing is still comparatively underutilized: chromatography. Here, we explain the potential and possible applications of 3D printing for the development of miniaturized chromatography systems.

DOI: 10.1007/s12268-023-1935-6

© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Chromatographie ist nach wie vor die Methode der Wahl zur Aufreinigung rekombinant hergestellter Proteine (*downstream processing*). Allerdings steigen die Anforderungen an die eingesetzten chromatographischen Systeme stetig – vor allem im Bereich der Prozessentwicklung. Die schnelle und

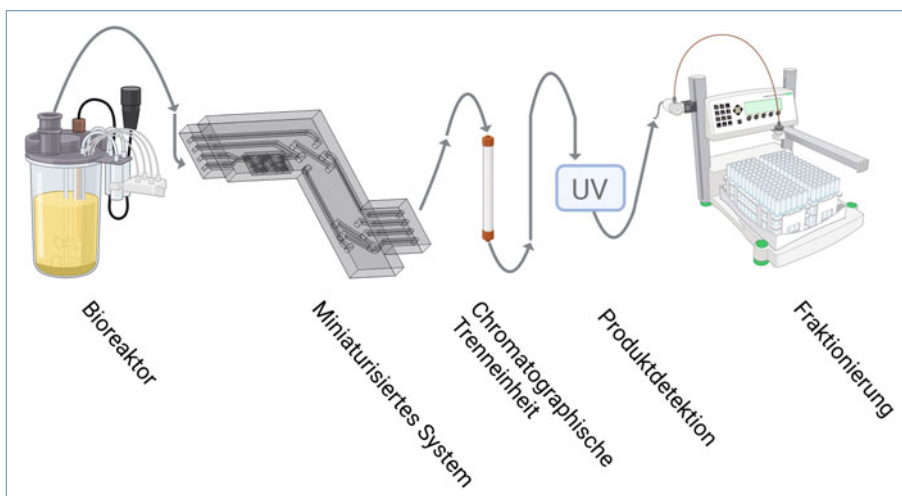
individuelle Anpassung an die jeweilige Nutzung, eine vereinfachte Systemintegration sowie die Verwendung modularer Systeme mit reduziertem Totvolumen können hierbei von großem Vorteil sein. Insbesondere für die schnelle und flexible Prototypenherstellung setzt sich zunehmend hochauflösen-

der 3D-Druck als Methode der Wahl durch. Das hier vorgestellte miniaturisierte 3D-gedruckte chromatographische System erfüllt diese Anforderungen und ermöglicht einen direkten Anschluss an einen Bioreaktor zur sofortigen Produktaufreinigung (Abb. 1).

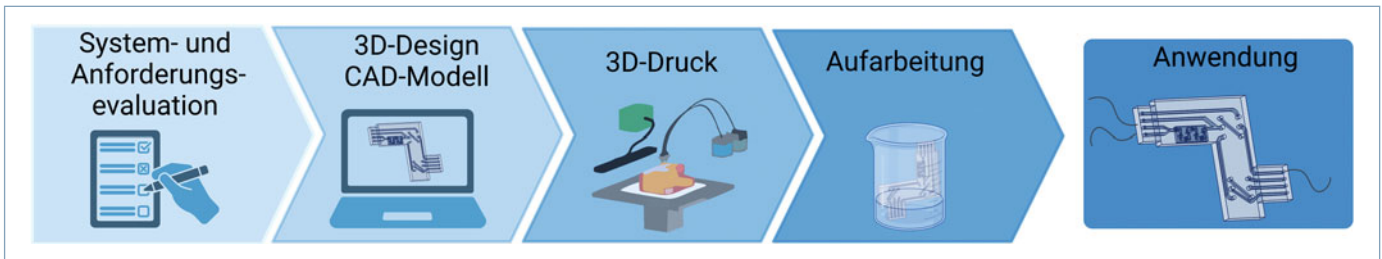
Rapid prototyping mittels 3D-Druck

Die Entwicklung neuer Bioprozesse beinhaltet oft langwierige Vorplanung – und je komplexer die Prozesse, desto aufwendiger und schwieriger kann die Etablierung neuer Systeme sein. Zudem müssen im Laufe der Entwicklung gegebenenfalls mehrere Prozessvarianten getestet werden oder entsprechende Systeme im Zuge einer Optimierung iterativ angepasst werden. Ebenso kann die Integration neuer Systeme in bestehende Laborinfrastruktur sowie eine gesamtheitliche Automatisierung herausfordernd sein. All dies benötigt Zeit und Material, was zu entsprechend steigenden Kosten führen kann [1, 2].

Eine schnelle und verhältnismäßig einfache Prototypenentwicklung kann durch additive Fertigung, sprich 3D-Druck, vorangetrieben werden. Solche Prototypen können unkompliziert auf die Anforderungen des Anwenders zugeschnitten und direkt aus CAD-Modellen (*computer-aided design*) realisiert werden. Aufgrund der hohen Designfreiheit, die der 3D-Druck bietet, können komplexe strukturelle Details geformt werden, bei denen herkömmliche Techniken oftmals an ihre Grenzen stoßen. Mittlerweile sind eine Vielzahl verschiedenster 3D-Drucktechniken und unterschiedlichste Materialien auf dem Markt verfügbar. Die Wahl des 3D-Druckers hängt von den individuellen Anforderungen (z. B. Druckauflösung oder Materialeigenschaft) an das gewünschte Bauteil ab. Der prinzipielle Ablauf zur Entwicklung eines Prototyps mittels 3D-Druck ist schematisch in **Abbildung 2** abgebildet. Da hochauflösende 3D-Drucker inzwischen komplexe Kanalsysteme mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern erzeugen können, lassen sich mittlerweile auch miniaturisierte Systeme

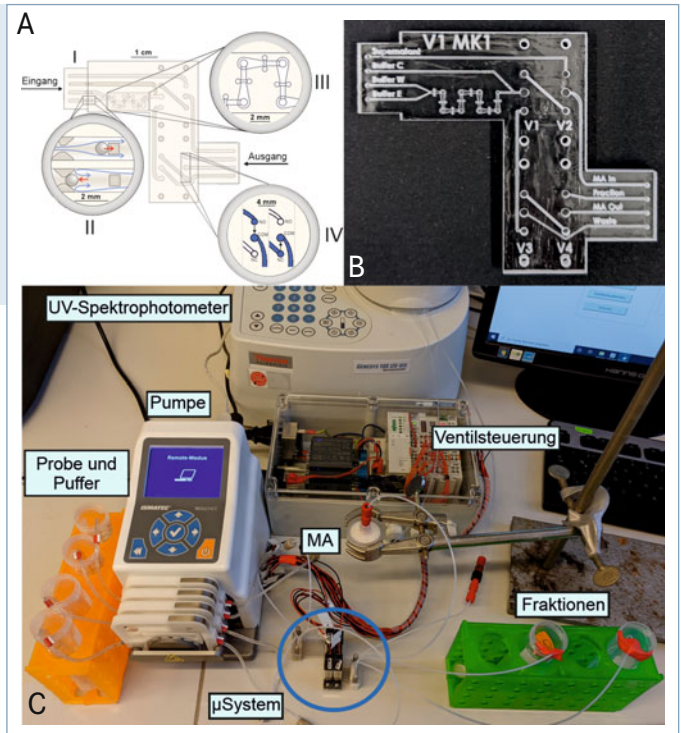


▲ **Abb 1:** Schematischer Prozessverlauf der chromatographischen Proteinaufreinigung mithilfe eines 3D-gedruckten miniaturisierten Systems, welches direkt an einen Bioreaktor angeschlossen werden kann. Der aus dem Bioreaktor entnommene produktthaltige Zellkulturüberstand wird über das 3D-gedruckte miniaturisierte System in eine chromatographische Trenneinheit gepumpt. Die Aufreinigung wird mittels UV-Messung überwacht und eluiertes Produkt kann anschließend in Fraktionen gesammelt werden. Abbildung erstellt mit BioRender.com.



▲ **Abb 2:** Workflow zur Entwicklung eines neuen Prototyps mittels 3D-Druck nach [3]. Zunächst wird ein 3D-Modell mit einer CAD-Software gemäß den benötigten Spezifikationen erstellt. Das Modell kann in die Software des 3D-Druckers geladen und direkt gedruckt werden. Anschließend wird das gedruckte Bauteil aufgearbeitet (um das Stützmaterial zu entfernen) und kann daraufhin für Experimente verwendet werden. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

► **Abb 3:** Übersicht eines mikrofluidischen Systems zur Batch-Aufreinigung von Proteinen mittels 3D-Druck. **A,** CAD-Zeichnung des mikrofluidischen Systems zur Anwendung in der Chromatographie. (I) Anschluss des Systems an Puffer- und Probereservoir, (II) Rückschlagventil, (III) integrierter Mikromischer, (IV) Aufbau der montierten 3/2-Ventile. **B,** Fotografische Aufnahme des 3D-gedruckten miniaturisierten Systems. **C,** Integration des 3D-gedruckten Systems in die für die Batch-Chromatographie benötigte Peripherie, bestehend aus Reservoirs, Pumpe, Ventilsteuerung, UV-Spektrophotometer, Membranadsorber (MA) als Trenneinheit und Fraktionssammlung.



– wie z. B. Lab-on-a-Chip-Systeme – mittels 3D-Druck herstellen [2, 3].

Einsatz von 3D-Druck in der Biotechnologie

Der Einsatz von 3D-Druck zur Prototypenentwicklung ist in der Biotechnologie bereits weit verbreitet, beispielsweise für die individuelle Herstellung von Laborgeräten [4, 5], Durchflusszellen [6], Zellseparationssystemen [7], neuartigen Reaktorsystemen [8] oder für Anwendungen im Bereich der Sensorik [9]. Im Vergleich dazu spielen Anwendungen im Chromatographie-basierten Downstream-Prozess noch eine eher untergeordnete Rolle.

Chromatographie und 3D-Druck

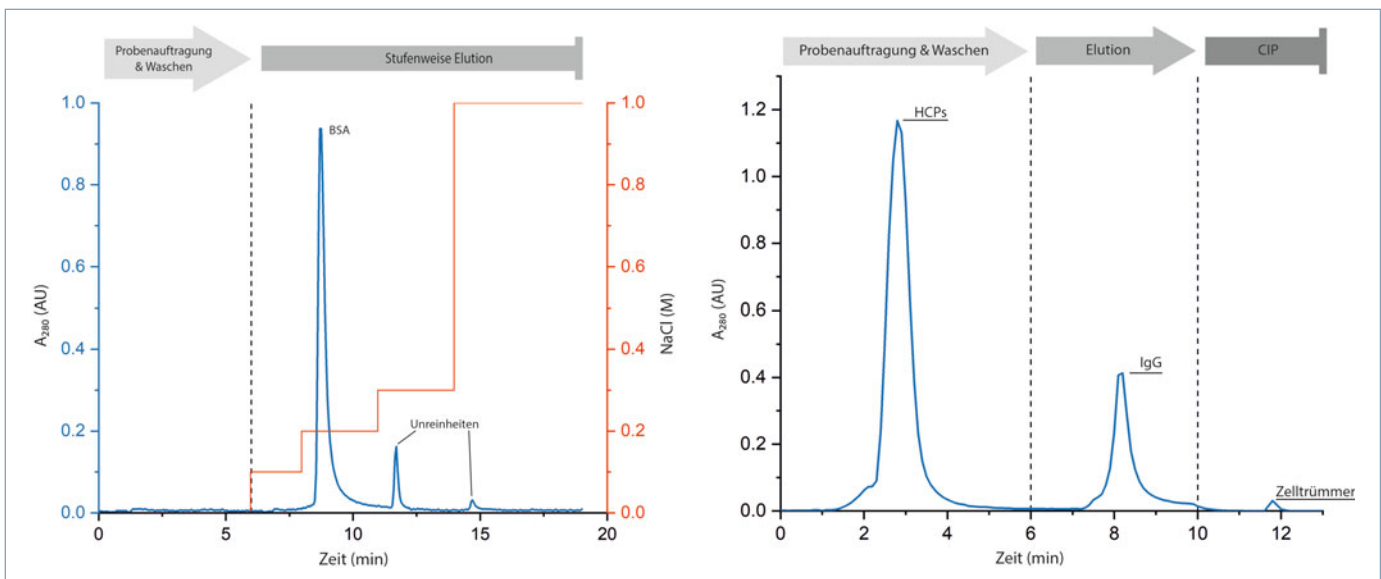
Ein Beispiel für den Einsatz von 3D-Druck im Bereich der Chromatographie stellen direkt gedruckte stationäre Phasen dar, die die Verwendung einer kommerziellen chromatographischen Einheit ersetzen können. Diese bieten gerade durch ihre geordnete Struktur mit definierter Geometrie die Möglichkeit spezifischerer Anwendung und eine Verbesserung der Trenneffizienz [5, 10].

Ein großes Potenzial für die Systemminiaturisierung und -automatisierung bietet der Einsatz 3D-gedruckter Mikrosysteme, wie z. B. Mikromischer [11] oder Rückschlagventile. Solche funktionellen Einheiten können flexibel miteinander kombiniert werden, sodass (in Anlehnung an klassische chroma-

tographische Anlagen) ein miniaturisiertes chromatographisches System aufgebaut werden kann. Ein Beispiel eines solchen 3D-gedruckten mikrofluidischen Systems, das mit Membranadsorbern (MA) betrieben und zur batchweisen Aufreinigung von Proteinen genutzt werden kann, wurde von Habib *et al.* detailliert beschrieben [2]. Das CAD-Design, das 3D-gedruckte System sowie das in einen Chromatographieprozess integrierte System sind in **Abbildung 3** dargestellt. Im Vergleich zur klassischen Chromatographie ersetzt dieses 3D-gedruckte System einen Großteil der Schläuche und ist aufgrund der Systemminiaturisierung transportabel. Wie in **Abbildung 3A** und **B** zu erkennen ist, besitzt das System vier Eingänge: einen für die aufzureinigende Probe und drei für Pufferlösungen (**Abb. 3A** (I)). 3D-gedruckte Rückschlagventile können durch integrierte Kugeln einen ungewünschten Rückfluss verhindern (**Abb. 3A** (II)). Vier direkt angeschlossene 3/2-Magnetventile leiten die entsprechenden Lösungen durch das Kanalsystem auf den MA, durch deren Aktivierung der Fluss zwischen zwei Positionen möglich wird (**Abb. 3A** (IV), [2]). Ein

integrierter Mikromischer sichert auch bei laminarem Fluss eine homogene Durchmischung und ermöglicht beispielsweise die Generierung von Stufengradienten während der Elution (**Abb. 3A** (III), [12]). Über zwei Ausgänge können die Produktfraktionen getrennt voneinander aufgefangen werden. Die Proteindetektion als Prozesskontrolle erfolgt mittels UV-Spektrophotometer (280 nm), welches dem MA nachgeschaltet ist (**Abb. 3C**).

Mit diesem Aufbau konnte Bovines Serumalbumin (BSA) mittels Anionenaustausch-MA sowie ein monoklonaler Antikörper über Protein-A-Affinitätschromatographie erfolgreich aufgereinigt werden. Dabei erfolgt nach jedem Schritt ein Umschalten der Ventile, um die nächste benötigte Lösung (Probe oder Puffer) auf die chromatographische Trenneinheit zu pumpen. Zunächst wird eine Probe auf die Einheit gegeben, welche gemäß ihren



▲ **Abb. 4:** Chromatogramme der Batch-Aufreinigung mittels des mikrofluidischen Systems. Absorption wurde bei 280 nm gemessen (blau). **A,** Chromatogramm der Aufreinigung des Modellproteins BSA; Elution erfolgte mittels schrittweisem NaCl-Gradienten (rot). **B,** Chromatogramm der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers (IgG) aus Tierzellkulturüberstand. Bei Probenauftrag bindet IgG affin an die Säulenmatrix, während Proteine der Wirtszelle (HCPs) ausgewaschen werden und direkt als Peak detektierbar sind. Auf die Produktelution bei saurem pH-Wert folgte ein „Cleaning-in-Place-Schritt (CIP)“, um die Trenneinheit u. a. von Zelltrümmern zu reinigen.

Charakteristika mit der Matrix der Einheit wechselwirkt. Diese Bindung wird durch Änderung der umgebenen mobilen Phase (Ionenstärke oder pH-Wert) wieder gelöst und das gereinigte Produkt erhalten. Die resultierenden Chromatogramme sind in **Abbildung 4** gezeigt.

Durch den modularen Aufbau des mikrofluidischen Chromatographiesystems kann es flexibel an individuelle Anwendungen angepasst werden. So lässt sich zum einen die chromatographische Einheit leicht durch Säulen oder durch MA austauschen, die andere Trennprinzipien nutzen. Zudem eignet sich das System aufgrund des geringen Totvolumens zum Durchführen vieler Versuche hintereinander (wie beispielsweise beim Pufferscreening) bei gleichzeitig geringem Proben- und Pufferverbrauch. Aufgrund der Herstellung mittels 3D-Druck lässt sich die vorhandene Peripherie (Mikrokanäle, Mikromischer, Rückschlagventile) unkompliziert verändern und erweitern. Somit könnte ein recht komplexes Mikrosystem entwickelt werden, das durch eine automatisierte Schaltung auch für kontinuierliche Prozesse genutzt werden könnte.

Ausblick

Die Entwicklung eines miniaturisierten Systems auf Basis einer 3D-gedruckten Plattform zur Umsetzung von Batch-Chromatographie konnte bereits erfolgreich demonstriert werden. Ein Trend ist die Entwicklung kon-

tinuierlicher chromatographischer Prozesse, welche aufgrund der verbesserten Nutzung der Kapazität der chromatographischen Einheit, der Möglichkeit der Automatisierung und der Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber Batch-Aufreinigungen von Vorteil sein können. Allerdings ist die Realisierung wegen der steigenden Komplexität kontinuierlicher Systeme oft herausfordernd. Hierbei könnten miniaturisierte Systeme zukünftig Abhilfe schaffen [2, 3]. Diese bieten zudem die Möglichkeit, geringe Probenvolumina (die beispielsweise bei Tierzellkultivierung im kleinen Maßstab entstehen [12]) kontinuierlich zu reinigen. Dies wäre dank miniaturisierter Systeme auf Basis von 3D-Druck kostengünstig, flexibel, automatisiert und individuell konfiguriert realisierbar. ■

Literatur

- [1] Silva TC, Eppink M, Ottens M (2022) Automation and miniaturization: enabling tools for fast, high throughput process development in integrated continuous biomanufacturing. *J Chem Tech Biotech* 97: 2365–2375
- [2] Habib T, Brämer C, Heuer C et al. (2022) 3D-Printed microfluidic device for protein purification in batch chromatography. *Lab on a chip* 22: 986–993
- [3] Heuer C, Preuß JA, Habib T et al. (2022) 3D printing in biotechnology-An insight into miniaturized and microfluidic systems for applications from cell culture to bioanalytics. *Eng Life Sci* 22: 744–759
- [4] Lücking TH, Sambale F, Schnaars B et al. (2015) 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Eng Life Sci* 15: 57–64
- [5] Heuer C, Preuss JA, Buttkeiwitz M et al. (2022) A 3D-printed microfluidic gradient generator with integrated photonic silicon sensors for rapid antimicrobial susceptibility testing. *Lab on a chip* 22: 4950–4961

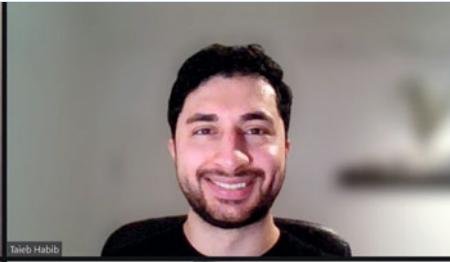
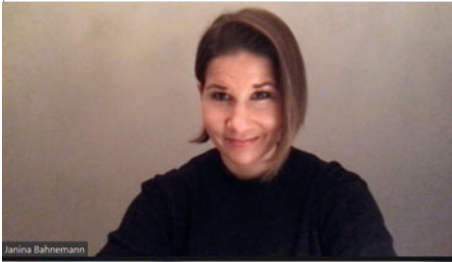
- [6] Siller IG, Preuss JA, Urmann K et al. (2020) 3D-Printed Flow Cells for Aptamer-Based Impedimetric Detection of *E. coli* Crooks Strain. *Sensors (Basel)* 20: 4421
- [7] Enders A, Preuss JA, Bahnemann J (2021) 3D Printed Microfluidic Spiral Separation Device for Continuous, Pulsation-Free and Controllable CHO Cell Retention. *Micromachines (Basel)* 12: 1060
- [8] Frey LJ, Vorländer D, Ostsieker H et al. (2021) 3D-printed micro bubble column reactor with integrated microsensors for biotechnological applications: From design to evaluation. *Sci Rep* 11: 7276
- [9] Arshavsky-Graham S, Enders A, Ackerman S et al. (2021) 3D-printed microfluidics integrated with optical nanostructured porous aptasensors for protein detection. *Mikrochimica Acta* 188: 67
- [10] Salmear C, Dimartino S (2019) 3D-Printed Stationary Phases with Ordered Morphology: State of the Art and Future Development in Liquid Chromatography. *Chromatographia* 82: 443–463
- [11] Enders A, Siller IG, Urmann K et al. (2019) 3D Printed Microfluidic Mixers-A Comparative Study on Mixing Unit Performances. *Small* 15: e1804326
- [12] Wohlenberg OJ, Kortmann C, Meyer KV et al. (2022) Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles. *Eng Life Sci* 22: 484–494

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Janina Bahnemann
 Lehrstuhl Technische Biologie
 Institut für Physik
 Universität Augsburg
 Universitätsstraße 1
 D-86159 Augsburg
 janina.bahnemann@uni-a.de

ARBEITSGRUPPEN



Janina Bahnmann, Taieb Habib (oben), Dörte Solle und Carlotta Kortmann (unten, v.l.n.r.)

Der Lehrstuhl „Technische Biologie“ am Institut für Physik der Universität Augsburg unter der Leitung von Prof. Dr. Janina Bahnmann beschäftigt sich mit der Herstellung und Integration von 3D-gedruckten mikrofluidischen Systemen und der Entwicklung innovativer Biosensoren, die für Anwendungen im Bereich der Zellkulturtechnik und Point-of-Care-Diagnostik zum Einsatz kommen.



Die Schwerpunkte der Arbeitsgruppe von Dr. Dörte Solle am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover liegen in der Entwicklung von *Process Analytical Tools* (PAT) und Sensoren zur Überwachung von Bioprozessen sowie der Produktcharakterisierung. Der Prozess umfasst die gesamte Kette zur Herstellung monoklonaler Antikörper aus tierischen Zellkultivierungen, aufgeteilt in Up- und Downstream-Prozesse.