



POLITECHNIKA RZESZOWSKA

im. Ignacego Łukasiewicza

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Katedra Inżynierii Chemicznej i

Procesowej



ROZPRAWA DOKTORSKA

ZASTOSOWANIE STRĄCANIA DO
MASOWEGO OCZYSZCZANIA BIAŁEK

mgr inż. Tomasz Rumanek

Promotor:

dr hab. inż. Wojciech Piątkowski, prof. PRz.

Promotor pomocniczy:

dr inż. Michał Kołodziej

Rzeszów, 16.09.2024

Pragnę złożyć podziękowania:

mojemu promotorowi

dr hab. inż. Wojciechowi Piątkowskiemu, prof. PRz

za udzielone wsparcie merytoryczne, okazaną mi cierpliwość oraz za poświęcony czas.

Wszelkie wskazówki Pana Profesora stanowiły dla mnie nieocenioną pomoc,
podczas realizacji mojego doktoratu.

Zaszczytem dla mnie oraz ogromną lekcją, była praca z Panem.

prof. dr hab. inż. Dorocie Antos

za okazane zaufanie oraz daną mi szansę, na realizację tej pracy,
za przekazaną wiedzę, a także cenne rady w trakcie studiów doktoranckich.

dr inż. Michałowi Kołodziejowi

za wsparcie w realizacji badań eksperymentalnych, pomoc w rozwoju mojego doktoratu
oraz za przyjazną atmosferę w trakcie codziennej, wspólnej pracy.

moim Rodzicom i Siostrze

za wsparcie, wiarę i nieustanną motywację, które towarzyszyły
mi przez całe życie, aż do tego momentu.

Wasza miłość i poświęcenie były dla mnie nieocenione.

mojej Żonie

za wspólnie spędzony czas, za to że byłaś dla mnie motywacją i wsparciem.

Twoja wiara we mnie dawała mi siłę do działania.

Streszczenie

Tematyka niniejszej dysertacji obejmuje zagadnienia związane z masowym strącaniem białek, a w szczególności przeciwciał monoklonalnych (*mAbs*).

W części eksperymentalnej prowadzonej na podstawie postawionej hipotezy pracy opracowano i przedstawiono dwa procesy oczyszczania *mAbs* wykorzystujące strącanie jako proces rozdzielania. Oba procesy dedykowane są do różnych zastosowań, na różnych etapach technologii otrzymywania *mAbs*, a obecnie realizowanych w przemyśle z wykorzystaniem metod chromatograficznych.

W pierwszej części pracy opisano proces wychwytu *mAb* z mieszaniny pochodzącej z komórek jajnika chomika chińskiego. Proces został zrealizowany poprzez połączenie dwóch etapów, w których kolejno usuwane są zanieczyszczenia nisko- oraz wysokocząsteczkowe. Etap pierwszy polega na dwustopniowym strącaniu zanieczyszczeń niskocząsteczkowych w pH 8 z wykorzystaniem *PEG* jako precypitantu. Zanieczyszczenia wysokocząsteczkowe usuwane są w etapie drugim, w dwóch wariantach, czyli: strącaniu w pH 5 lub ekstrakcji ciecz – ciało stałe (*SLE*).

W drugiej części pracy rozwiązywany problem dotyczył dostosowania do wymogów składu wariantów ładunkowych *mAbs* poprzez redukcję tzw. wariantów kwasowych w produkcji *mAbs*. W tym przypadku opracowano proces selektywnego strącania prowadzony w pH 5 przy niskiej sile jonowej z zastosowaniem *PEG* jako środka strącającego. Przebieg procesu i optymalne warunki jego prowadzenia dobrano stosując początkowo strącanie jednostopniowe, następnie metodę rozwinięto do wielostopniowego strącania, pracującego w układzie krzyżowym oraz przeciwprądowym. W ostatniej części pracy opracowano proces rozdzielania wariantów ładunkowych, który składał się z połączonego, selektywnego strącania oraz jonowymiennej chromatografii AEX.

Prezentowane w pracy rozwiązania dotyczące zastosowania: *SLE* do wychwytu *mAbs* oraz selektywnego strącania wariantów ładunkowych *mAbs*, stanowią nowości w procesach oczyszczania białek na skalę masową. Rozwiązania takie nie były dotąd prezentowane w literaturze, zatem można wnioskować, że prezentowana praca jest pierwszą opisującą te zagadnienia. Podstawą do napisania dysertacji doktorskiej były cztery publikacje o zasięgu międzynarodowym oraz dwa zgłoszenia patentowe na terenie RP. Badania nad prezentowanymi zagadnieniami realizowano w ramach realizacji pracy magisterskiej oraz czterech lat doktoratu.

Summary

This work covers issues related to mass precipitation of proteins, in particular monoclonal antibodies.

In the experimental part of the research conducted on the basis of the stated dissertation hypothesis, two *mAbs* purification processes were developed and presented, using precipitation as a process for separating molecules. Both processes are dedicated to various applications, in various areas of technology, and currently implemented in industry using chromatographic methods.

The first of the described processes concerns the uptake of the antibody from the post-culture mixture of Chinese hamster ovary cells. This process is carried out by combining two stages in which low- and high-molecular contaminants are separately removed. The first stage involves two-stage precipitation of low molecular weight contaminants at pH 8 using *PEG* as a precipitant. However, high-molecular impurities are removed in the second stage, in the following variants: precipitation at pH 5 or solid-liquid extraction (*SLE*).

In the second process, the problem to be solved concerned adapting *mAbs* charge variants to the composition requirements. In this case, a selective precipitation process was used, carried out at pH 5 at low ionic strength, using *PEG* as the precipitating agent. The course of the process and the optimal conditions for its conduct were determined using initially single-stage precipitation, then the method was developed into multi-stage precipitation, working in a cross-current and counter-current system. To optimize the efficiency and throughput of the process, a hybrid process for separating charge variants was also developed, which consisted of selective precipitation and AEX ion exchange chromatography.

The solutions presented in this work regarding the use of: *SLE* to capture *mAbs*, and selective precipitation of *mAbs* charge variants, are new in the field of mass protein purification. Such solutions have not been presented in the literature so far, so it can be concluded that the presented work is the first to describe these issues. The basis for writing the doctoral dissertation were four international publications and two Polish patent applications. Research on the presented issues was carried out as part of a master's thesis and a four-year doctorate.

Wykaz publikacji będących podstawą przeprowadzenia przewodu doktorskiego:

[Rumanek i in., 2022]

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2022). Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Biotech. Bioeng.*, 120, 114–124.

Impact Factor = 3.5

<https://doi.org/10.1002/bit.28257>

[Zimoch, Rumanek i in., 2023]

Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2023). Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool. *J. Chromatogr. A*, 1701, 464070.

Impact Factor = 3.8

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464070>

[Rumanek i in., 2024a]

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024a). Countercurrent preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Chem. Eng. Res. Des. (CHERD)*, 202, 336–345,

Impact Factor = 3.7

<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2024.01.001>

[Rumanek i in., 2024b]

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024b). Isolation and purification of a monoclonal antibody from a cell culture supernatant by multistage precipitation and solid-liquid extraction. *Food Bioprod. Process.*, 147, 34-41.

Impact Factor = 3.5

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.05.016>

[Rumanek i in., P2022]

Rumanek T., Zimoch P., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (P2022). Sposób rozdzielania wariantów przeciwciał monoklonalnych. **P.441857** [WIPO ST 10/CPL441857] z dnia 2022-07-27

[Rumanek i in., P2024]

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (P2024). Sposób izolacji przeciwciał monoklonalnych z mieszaniny pochodowlanej. **P.448410** [WIPO ST 10/C PL448410] z dnia 2024-04-25

Spis treści

Streszczenie.....	5
Summary.....	6
1. Wprowadzenie, hipoteza oraz cele badawcze	11
1.1. Wprowadzenie	11
1.2. Hipoteza.....	13
1.3. Cel i zakres pracy.....	13
2. Podstawy teoretyczne	14
2.1. Przeciwciała monoklonalne - <i>mAbs</i>	14
2.1.1. Charakterystyka przeciwciał.....	14
2.1.2. Podział funkcji <i>Abs</i>	17
2.1.3. Zastosowanie <i>Abs</i> w medycynie	18
2.1.4. Mikroheterogeniczność <i>mAbs</i>	20
2.2. Produkcja oraz oczyszczanie <i>mAbs</i>	23
2.2.1. Wytwarzanie <i>mAbs</i> – USP	24
2.2.2. Oczyszczanie <i>mAbs</i> – DSP.....	26
2.3. Strącanie i krystalizacja białek.....	32
2.3.1. Podstawy procesu.....	33
2.3.2. Rodzaje precypitantów	35
2.3.3. Proces krystalizacji i strącania w przemyśle.....	37
3. Komentarz do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską	41
3.1. Elementy nowości w ramach pracy doktorskiej.....	41
3.2. Izolacja i oczyszczanie <i>mAb</i> z supernatantu hodowli komórkowej CHO metodą strącania wieloetapowego i ekstrakcji ciecz-ciało stałe.....	42
3.2.1. Równowaga oraz kinetyka procesu <i>PREC8</i>	43
3.2.2. Optymalizacja usuwania <i>LMWI</i> w <i>PREC8</i>	44
3.2.3. Usuwanie <i>HMWI</i> poprzez zastosowanie <i>SLE</i> lub <i>PREC5</i>	45

3.2.4. Oczyszczanie i izolacja mAb2 z mieszaniny pohodowlanej CHO – podsumowanie	46
3.3. Selektywne strącanie wariantów kwasowych z puli <i>mAbs</i>	48
3.3.1. Dobór parametrów operacyjnych	49
3.3.2. Zależność wydajności od stopnia redukcji <i>av</i>	52
3.3.3. Krzyżowe, wielostopniowe strącanie wariantów <i>mAb2 CsMP</i>	54
3.4. Przeciwna, wielostopniowe strącanie wariantów ładunkowych <i>mAb2 CnMP</i> wspomaganie modelowaniem komputerowym	56
3.4.1. Bilans masy, zależności termodynamiczne oraz połączenie strumieni procesowych	57
3.4.2. Optymalizacja procesu	60
3.4.3. Weryfikacja modelu	62
3.5. Połączenie procesów strącania i chromatografii w celu selektywnego rozdzielania wariantów ładunkowych <i>mAbs</i>	63
3.5.1. Wyniki symulacji procesu	65
3.5.2. Weryfikacja modelu	67
4. Podsumowanie i wnioski	68
5. Lista skrótów i oznaczeń	70
5.1. Skróty	70
5.2. Oznaczenia	71
6. Literatura	74
7. Wykaz pozostałych osiągnięć	90

1. Wprowadzenie, hipoteza oraz cele badawcze

1.1. Wprowadzenie

Przeciwciała to białka (polipeptydy) o złożonej strukturze IV-rzędowej, występujące naturalnie w organizmach kręgowców. Cząsteczki te wyspecjalizowane są do pełnienia funkcji obronnej, co realizowane jest poprzez szereg mechanizmów oraz aktywności biologicznych. Mechanizmy te wynikają z budowy przeciwciał i mogą zostać zakłócone wraz z zaburzeniem struktury białka [Gołąb i in., 2012, Forthal, 2014].

Szczególne właściwości tej grupy polipeptydów sprawiły, że znalazły one szerokie zastosowanie w przemyśle biofarmaceutycznym. Na przestrzeni ostatnich trzech dekad produkcja przeciwciał monoklonalnych (*mAbs*) stała się najprężniej rozwijającą się gałęzią przemysłu biofarmaceutycznego. *mAbs* stosowane są w leczeniu m. in. chorób nowotworowych, autoimmunologicznych, infekcji, chorób neurologicznych czy hematologicznych [Walsh i Walsh, 2022, Wang i in., 2022].

Farmaceutycznie czynne *mAbs* wytwarzane są w komórkach ssaczych lub mikroorganizmach bakteryjnych, przez co narażone są na kontakt z typowymi dla tych technologii zanieczyszczeniami (DNA, wirusy, endotoksyny, białka komórek gospodarza) oraz na występowanie niekontrolowanych modyfikacji struktury (mikroheterogeniczności). Wśród modyfikacji szczególne znaczenie ma mikroheterogeniczność ładunku, która wynika z wytwarzania wariantów o różnym punkcie izoelektrycznym. Warianty takie mogą wykazywać obniżoną aktywność biologiczną, co najczęściej stwierdzano wśród izoform o najniższym punkcie izoelektrycznym, nazywanych w literaturze oraz w niniejszej pracy wariantami kwasowymi [Bults i in., 2016, Beck i in., 2022, Dakshinamurthy i in. 2017, dos Santos i in., 2018].

Proces przemysłowego oczyszczania składa się z szeregu etapów odpowiadających m. in. za: wychwyt *mAbs* z mediów hodowlanych, usuwanie zanieczyszczeń oraz regulacje składu wariantów. Obecnie etapy te opierają się w głównej mierze na technikach chromatograficznych. Techniki te pomimo wielu zalet wykazują ograniczoną przepustowość oraz generują wysokie koszty mogące stanowić 70% lub więcej kosztów całej produkcji [dos Santos i in., 2017, Franzreb i in., 2014, Shukla i Thommes, 2010].

W ostatnich latach podjęto wzmożone wysiłki mające na celu rozwijanie nowych procesów mogących zastąpić drogie, a zatem nieefektywne ekonomicznie techniki

chromatograficzne oczyszczania *mAbs*. W ostatnich latach największym zainteresowaniem cieszą się procesy membranowe, krystalizacja, strącanie oraz ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych [Roque i in., 2020, Strube i in., 2018].

Pierwsze próby strącania *mAbs* na skalę masową podjęto w roku 2010, kiedy to wydzielono IgG4 z roztworu pochodowlanego CHO, z wykorzystaniem glikolu polietylenowego jako środka strącającego (precypitantu).

Proces strącania był początkowo mało efektywnym procesem rozdzielania, jednak udoskonalano go poprzez dobór i optymalizację parametrów operacyjnych. Realizacja procesu wieloetapowo umożliwiła poprawę wydajności przy zachowaniu czystości produktu. Kolejno podjęto próby przenoszenia skali procesu oraz opracowywania jego reżimu pracy w trybie ciągłym. Pomimo dużego zainteresowania metodą strącania oraz krystalizacji, ich zastosowanie do oczyszczania *mAbs* nadal pozostaje jedynie zagadnieniem naukowym na etapie badań laboratoryjnych [Hammersmidt i in., 2016, Pons Royo i in., 2023, Smejkal i in., 2013a, Sommer i in., 2014, Zang i in., 2011].

Jednym z powodów takiego stanu rzeczy jest fakt, że wszystkie ww. prace podejmowały jedynie tematykę oddzielania przeciwciał od innego rodzaju zanieczyszczeń. Nerozwiązanym pozostawał np. problem efektywnego rozdzielania wariantów ładunkowych *mAbs* za pomocą innych procesów niż chromatografia. Ponadto większość tych prac było realizowane jedynie w sposób eksperymentalny bez prób modelowania badanego procesu oraz przenoszenia jego skali metodami obliczeniowymi. Podejście takie powiększało koszty rozwoju metody i wydłużało czas wprowadzenia technologii do przemysłu.

W prezentowanej pracy po raz pierwszy wykorzystano strącanie zarówno jako metodę wychwytu *mAbs* z roztworu pochodowlanego jak też proces selektywnego rozdzielania puli wariantów ładunkowych *mAbs*. Niniejsza praca oraz powiązane z nią publikacje szczegółowo opisują obie techniki łącznie z wyznaczeniem zależności termodynamicznych oraz określeniem stabilności białka na poszczególnych ich etapach. W ramach badań nad selektywnym strącaniem wariantów ładunkowych opracowano model matematyczny umożliwiający projektowanie oraz optymalizowanie procesu. Rozwiązanie takie pozwala na ograniczenie ilości badań eksperymentalnych oraz zmniejszenie kosztów wprowadzania do przemysłu nowych metod oczyszczania biofarmaceutyków.

1.2. Hipoteza

Proces strącania może zostać wykorzystywany do efektywnego oczyszczania farmaceutycznych *mAbs* zarówno na etapie wychwytu z medium pohodowlanego jak i regulacji składu wariantów ładunkowych.

1.3. Cel i zakres pracy

Celem badań w ramach rozprawy doktorskiej było opracowanie metody oczyszczania farmaceutycznych przeciwciał monoklonalnych, opartego na procesie strącania z roztworu. Proces podzielono na dwie części odpowiadające poszczególnym etapom przemysłowego oczyszczania przeciwciał. Pierwsza z nich polegała na wychwycie przeciwciał z roztworu po hodowli w komórkach ssaczych i oddzieleniu ich od pozostałych zanieczyszczeń komórkowych za pomocą nowej techniki połączonego strącania i ekstrakcji ciecz-ciało stałe. W części drugiej zastosowano proces selektywnego strącania wariantów ładunkowych o różnym punkcie izoelektrycznym, będący podstawą nowości w niniejszej pracy.

Zakres pracy obejmował:

1. Przegląd literaturowy związany z teoretycznymi i praktycznymi aspektami dotyczącymi procesów masowego strącania i krystalizacji białek, a także obecnie stosowanych metod rozdzielania tej grupy związków ze szczególnym uwzględnieniem farmaceutycznych *mAbs*.
2. Badania eksperymentalne nad: rozpuszczalnością *mAbs* w wodnych roztworach buforowych, doбором parametrów procesowych, zależnościami termodynamicznymi oraz kinetyką procesu strącania z roztworu.
3. Opracowanie koncepcji wychwytu biofarmaceutyków z medium pohodowlanego w kaskadzie procesów strącania i ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe.
4. Opracowanie koncepcji selektywnego strącania wariantów ładunkowych *mAbs* w procesie jednostopniowym, a następnie rozszerzenie metody do procesu wielostopniowego o przepływie krzyżowym lub przeciwprądowym. Sformułowanie modelu matematycznego procesu selektywnego rozdzielania wariantów ładunkowych na podstawie zależności termodynamicznych.

2. Podstawy teoretyczne

Przeciwciała (immunoglobuliny, ang. *Antibodies - Abs*) to złożone struktury białkowe, występujące w płynach ustrojowych wszystkich kręgowców. Ze względu na swoją budowę oraz pełnione funkcje można je zaliczyć do białek globularnych (kłębuszkowych), odpowiadających za obronę organizmu. Wyróżnia się 5 podstawowych klas przeciwciał: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, które produkowane są przez komórki limfocyty B [Gołąb i in., 2012]. Ze względu na swoje właściwości biologiczne, prostotę działania i stabilność struktury przeciwciała znalazły szerokie zastosowanie w medycynie, diagnostyce i przemyśle biofarmaceutycznym.

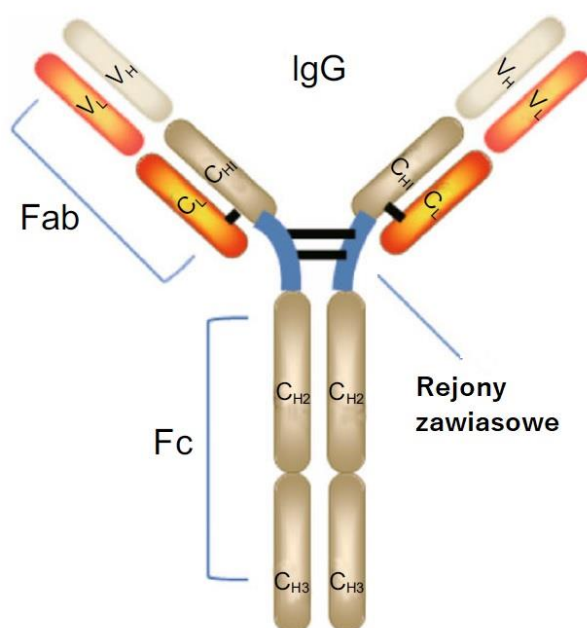
2.1. Przeciwciała monoklonalne - *mAbs*

2.1.1. Charakterystyka przeciwciał

Przeciwciała, jak wszystkie białka, zbudowane są z aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym. Aminokwasy białkowe to niskocząsteczkowe związki organiczne, wykazujące czynność optyczną o konfiguracji L (za wyjątkiem glicyny). Podstawnikami chiralnego atomu węgla są: atom wodoru, grupa karboksylowa, grupa aminowa oraz charakterystyczny dla każdego aminokwasu łańcuch boczny. Grupa karboksylowa oraz grupa aminowa biorą udział w tworzeniu wiązania peptydowego, tworząc I rzędową strukturę polipeptydową. W skład sekwencji białek wchodzi 20 rodzajów aminokwasów, różniących się między sobą budową łańcucha bocznego. Budowa łańcucha bocznego dzieli aminokwasy na grupy o określonych właściwościach. Jest to niezwykle istotne, ponieważ aminokwasy, których łańcuchy boczne są eksponowane na powierzchni białka, wpływają na jego właściwości fizykochemiczne takie jak: wypadkowy ładunek powierzchniowy, punkt izoelektryczny (pI), strefy hydrofobowości i hydrofilowości [Chiu i in., 2020, Pires and Asher, 2016].

Kolejność połączenia poszczególnych aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym zwana sekwencją aminokwasową, warunkuje powstawanie spontanicznych struktur II - rzędowych. W przypadku *Abs* najczęściej występującą strukturą II - rzędową jest β -harmonijka (stanowi ok. 50% długości sekwencji aminokwasowej) oraz α -helisa (4-11%). Dalsza organizacja w obrębie pojedynczej jednostki (łańcucha polipeptydowego) określa konformację przestrzenną białka zwaną strukturą III - rzędową. Natomiast w przypadku białek złożonych, takich jak *Abs*, ułożenie przestrzenne kilku podjednostek białkowych względem siebie określane jest mianem struktury IV - rzędowej [Qiao i in., 2021, Gołąb i in., 2012]. Struktura przestrzenna

decyduje o funkcjonalności danego białka. W przypadku *Abs* decyduje ona między innymi o rodzaju epitopu, czyli miejscu wiązania na antygenie, przeciwko któremu przeciwciało ma być skierowane. Wszystkie klasy *Abs* posiadają IV - rzędową strukturę przestrzenną, co oznacza, że zbudowane są z kilku podjednostek białkowych (łańcuchów polipeptydowych). W zależności od klasy pojedyncza cząsteczka może składać się z różnej liczby łańcuchów. Najczęściej występującą formą *Abs* jest monomer zbudowany z dwóch łańcuchów lekkich L (ang. *Light*) oraz dwóch łańcuchów ciężkich H (ang. *Heavy*), połączonych mostkami disiarczkowymi (rys. 1).

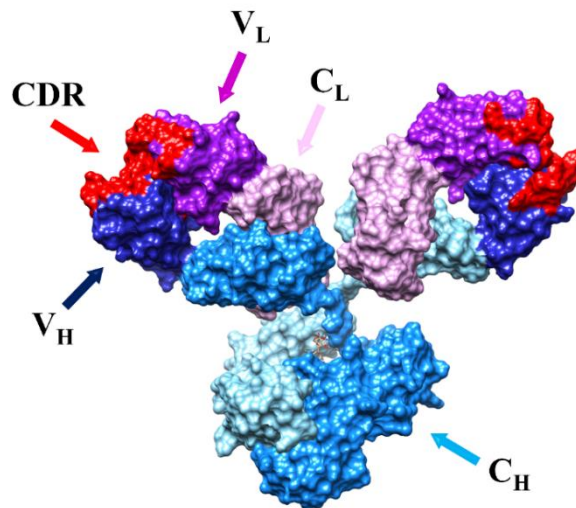


Rys. 1. Schemat struktury przeciwciała IgG, V_L-region zmienny łańcucha lekkiego, C_L-region stały łańcucha lekkiego, V_H-region zmienny łańcucha ciężkiego, C_{H1-3}-region stały łańcucha ciężkiego [Liu i in., 2018].

Budowa łańcucha ciężkiego warunkuje przynależność przeciwciała do danej klasy oraz podklasy. Przykładowo klasa IgG posiada 4 podklasy oznaczone kolejno IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Różnią się one między innymi liczbą wiązań disiarczkowych. Przeciwciała w formie monomerycznej występują we wszystkich rodzajach klas, wyjątkiem jest klasa IgM, której przeciwciała naturalnie tworzą pentamery oraz klasa IgA mogąca przyjmować zarówno formę monomeryczną, jak i formę dimerów. W budowie *Abs* wyróżnić można trzy wyraźne fragmenty. Fragment Fc odpowiada za stabilizację i wiązanie do receptorów Fc komórek efektorowych, natomiast dwa fragmenty Fab (ang. *antigen binding*) odpowiadają za przyłączanie się *Abs* do antygenów. Łańcuchy polipeptydowe wewnątrz określonego fragmentu połączone są ze sobą poprzez mostki disiarczkowe, natomiast oba Fab połączone są z Fc współdzieloną sekwencją łańcucha

ciężkiego. Niektóre klasy przeciwciał, w tym klasa IgG, posiadają szczególny rodzaj połączenia fragmentów Fab z fragmentem Fc. Takie połączenie nazywane jest regionem zawiasowym. Region ten odpowiada za zmienność segmentalną, czyli elastyczność zmiany kąta pomiędzy ramionami przeciwciała. Właściwość ta umożliwia łatwiejsze dopasowanie się *Abs* do epitopów na powierzchni antygeny i jest jednym z głównych powodów, dla których to właśnie przeciwciała klasy IgG znalazły najszersze zastosowanie w farmacji. W obrębie fragmentu Fc występują również cząsteczki cukrów. Glikozylacja *Abs* wpływa na ich wiązanie do receptorów FcγR i na funkcje związane z tą właściwością. Fragment wiążący antygen można podzielić na części zmienne V (ang. *Variable*) oraz części stałe C (ang. *Constans*), mieszczące się zarówno w obszarze łańcucha ciężkiego, jak i łańcucha lekkiego. Przeciwciała w obrębie tej samej klasy oraz podklasy posiadają jednakową sekwencję aminokwasową części stałej, mogą różnić się natomiast sekwencją części zmiennej. To właśnie sekwencja części zmiennych łańcucha ciężkiego (V_H) oraz łańcucha lekkiego (V_L) odpowiada za specyficzność *Abs* i jego zdolność wiązania antygenów [Cobb, 2020, Chiu i in., 2020, Gilliland i in., 2012, Irvine i Alter, 2020, Liu i in.,2012].

Przeciwciała o różnej swoistości różnią się głównie sekwencją aminokwasową w obszarze regionów determinujących komplementarność CDR (ang. *Complementarity-Determining Regions*). Regiony CDR odpowiadają za budowę przestrzenną miejsca wiążącego na powierzchni przeciwciała (rys. 2). Każda część zmienna posiada trzy takie regiony oddzielone od siebie regionami zrębowymi FR (ang. *Frame Regions*). Całkowita długość sekwencji monomeru przeciwciała waha się w granicach 1300 aminokwasów, długość pojedynczego regionu CDR wynosi od kilku do maksymalnie kilkunastu aminokwasów (wyjątek stanowi ludzki region CDRH3, którego długość może przekraczać 20 aminokwasów). Wytworzenie swoistości *Abs* limitowane jest zatem w głównej mierze długością i zmiennością sekwencji regionów CDR. Skutkiem tego jest fakt, że nawet niewielka modyfikacja w obrębie regionów CDR może znacząco obniżyć powinowactwo przeciwciała do antygeny lub całkowicie dezaktywować właściwości biologiczne białka [Chiu i in., 2020, Dondelinger i in., 2018, Gilliland i in., 2012, Novak i in., 2016, Teplyakov i in., 2016].



Rys. 2. Struktura przestrzenna przeciwciała klasy IgG (pdb: 1IGY), z zaznaczonymi domenami: zmiennymi łańcucha lekkiego VL oraz łańcucha ciężkiego VH, stałymi łańcucha lekkiego CL oraz łańcucha ciężkiego CH, a tak że regionami determinującymi komplementarność CDR.

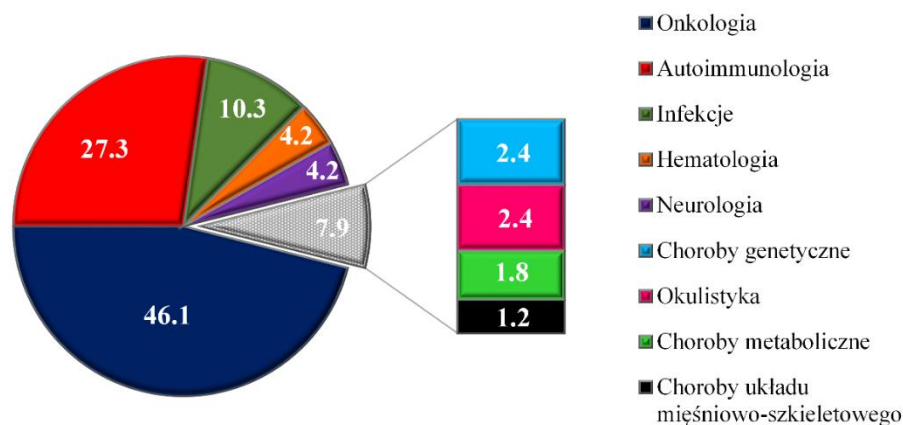
2.1.2. Podział funkcji Abs

Przeciwciała należą do białek obronnych, które w organizmie gospodarza odpowiadają za mechanizmy warunkujące odporność humoralną. Ich ogólna funkcja obronna składa się z szeregu aktywności biologicznych, które podzielić można na trzy główne grupy: funkcje Abs niezależne od komórek efektorowych, funkcje zależne od układu dopełniacza oraz funkcje Abs oparte na interakcji z receptorami Fc. Mechanizmy niezależne od komórek efektorowych polegają na przyłączeniu przeciwciała do antygeny i jego dezaktywacji bez ingerencji pomocniczych komórek czy cząsteczek. Zachodzić mogą zarówno przed jak i po związaniu patogenu ze swoistym receptorem, na drodze agregacji i aglutynacji przez Abs. W niektórych przypadkach Abs mogą blokować zakaźność patogenu, generując interferencję sferyczną w miejscu jego wiązania lub uniemożliwiając mu dalsze wniknięcie do komórki po związaniu [Forthal, 2014, Roche i in., 2014, Mathias i in., 2013]. Drugą grupą funkcji Abs są mechanizmy związane z aktywacją układu dopełniacza. Układ dopełniacza to zespół ponad 30 białek osocza oraz receptorów na powierzchni komórek, które synergicznie zwiększają lub uzupełniają zdolność przeciwciał i komórek układu odpornościowego do zwalczania patogenów m.in. poprzez: opsonizację patogenów (głównie wirusów), wywoływanie stanów zapalnych oraz uszkodzenie ściany komórkowej bakterii. Białka dopełniacza aktywowane przez Abs (poprzez interakcje z fragmentem Fc) wykazują zdolność do modulowania prezentacji antygeny limfocytom B oraz T, tym samym rozbudowują pamięć immunologiczną organizmu. Zdolność aktywacji układu dopełniacza posiadają głównie przeciwciała klasy IgM oraz IgG (za wyjątkiem IgG4) [Forthal, 2014, Goldberg i Ackerman, 2020, Sörman

2014]. Fragment Fc jest niezwykle istotny nie tylko ze względu na zdolność aktywacji układu dopełniacza, ale także ze względu na to, że znaczna część właściwości przeciwciał jest wynikiem interakcji pomiędzy nimi a receptorami Fc. Po połączeniu *Abs* z antygenem na powierzchni patogenu, jego miejsce wiążące jest zajęte, natomiast dostęp do fragmentu Fab utrudniony poprzez zawadę sferyczną. Fragment Fc jest jednak dość wyraźnie eksponowany dając łatwy dostęp komórkom efektorowym posiadającym odpowiednie receptory. Mechanizm lizy patogenu jest w takim przypadku zależny od tego, jaka komórka przyłączy się do Fc. Największym zainteresowaniem naukowców w ostatnim czasie cieszy się cytotoksyczność komórkowa zależna od ADCC (ang. *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*). ADCC wywoływana jest głównie przez komórki NK (ang. *Natural Killer*), a jej dużą zaletą jest umożliwienie destrukcyjnego oddziaływania zarówno na komórki patogenu, jak i na komórki zainfekowane przez patogen. Właściwość ta znalazła zastosowanie w terapiach nowotworowych w przypadku leków takich jak: Rituximab skierowanemu przeciwko antygenowi limfocytów-B-CD20 oraz Trastuzumab skierowanemu przeciwko receptorowi ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu-HER2 [Murphy, 2022, Gómez i in., 2014].

2.1.3. Zastosowanie *Abs* w medycynie

Rynek biofarmaceutyczny to część przemysłu farmaceutycznego zajmująca się rozwojem, opracowywaniem, produkcją oraz wprowadzaniem na rynek nowych bioleków, leków bionastępczych, a także terapii genowych i komórkowych. Największy udział w rynku zajmują terapeutyczne białka, wśród których najprężniej rozwijającą się grupą są przeciwciała monoklonalne (*mAbs*). Ich uniwersalny sposób działania umożliwia szeroki zakres zastosowań. Obecnie *mAbs* wykorzystywane są m.in. do leczenia chorób nowotworowych, autoimmunologicznych oraz infekcji (rys. 3) [Wang i in., 2022].



Rys. 3. Procentowy udział zastosowania terapii *mAbs*, stan na 2022 rok.

Do połowy 2022 roku zatwierdzonych zostało 165 preparatów, zawierających w swoim składzie *mAbs* lub ich pochodne, natomiast kolejne 145 preparatów znajdowało się w późnych fazach badań klinicznych. W tym samym roku przychód ze sprzedaży tychże środków wyniósł 217 miliardów dolarów [Walsh i Walsh, 2022, Wang i in., 2022]. Średnia wartość rocznej terapii *mAbs* wahała się w granicach od 15 tys. do 200 tys. dolarów na jednego pacjenta [Lim i in., 2023].

Drugą, o wiele mniejszą grupą zastosowań *Abs* w farmacji, są surowice poliklonalne (*pAbs*). *pAbs* stosuje się w celu zapobiegania odrzucania przeszczepów nerkowych, uzyskiwania biernej odporności, a także neutralizacji toksyn jadowych po ukąszeniu pewnych gatunków węży oraz pająków [Pelletier i Mukhtar, 2020]. Szczególnym zainteresowaniem w ostatnich latach cieszyła się terapia *pAbs*, skierowana przeciwko wirusowi SARS-CoV-2. Osocze pobierane od dawców po przebytej infekcji było jednym z pierwszych udanych sposobów leczenia choroby COVID-19 [Focosi i in., 2022, Ning i in., 2021]. Terapie *pAbs* przystosowane są do stosowania krótkotrwałego lub nawet jednorazowego m.in. ze względu na ograniczoną możliwość kontroli produkcji oraz składu preparatu, skutkującą istnieniem wysokiego prawdopodobieństwa indukowania odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko nim. Pod tym względem wielką zaletą stosowania *mAbs* jest ich bezpieczeństwo, warunkowane przez szereg instytucji oraz procesów kontroli na poszczególnych etapach życia bioleku.

Rynek biofarmaceutyczny jest ściśle regulowany i kontrolowany od etapu zaprojektowania cząsteczki leczniczej, poprzez fazy badań klinicznych, aż do wyprodukowania i dostarczenia substancji aktywnej pacjentom. Za proces ten odpowiadają organizacje, które swoim obszarem dzielą się na: USA – Agencja Żywności i Leków, FDA (ang. *Food and Drug Administration*), Europa – Europejska Agencja Leków,

EMA (ang. *European Medicines Agency*), Wielka Brytania – Agencja Regulacji Produktów Leczniczych i Produktów Opieki Zdrowotnej, MHRA (ang. *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency*). Instytucje te odpowiadają za tworzenie przepisów regulacyjnych, polityki rozwoju, wytycznych, a także mogą licencjonować oraz audytować zakłady produkcyjne. Regulacje na poszczególnych obszarach mogą różnić się między sobą, dlatego w celu ujednoczenia procesu wdrażania leków na rynek powołano Międzynarodową Radę Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi, ICH (ang. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*). Organ ten wydaje wytyczne podzielone na 4 kategorie dotyczące: jakości, bezpieczeństwa, skuteczności oraz multidyscyplinarne. Wytyczne wydawane przez ICH mogą stanowić bezpośrednie regulacje prawne (EMA) lub być wskazówkami do ich opracowania (FDA). ICH zajmuje się zarówno wymaganiami dotyczącymi nowo wprowadzanych leków, jak i leków bionastępczych. Określa między innymi regulacje dotyczące składu leku bionastępczego, bezpieczeństwa, limitów zanieczyszczeń oraz kluczowych cech produktu, jakie musi spełniać lek, aby mógł być dopuszczony do obrotu. Kluczowe cechy produktu biofarmaceutycznego zdefiniowane zostały przez ICH w dokumencie Q8(R2), jako czynniki fizyczne, chemiczne, biologiczne lub mikrobiologiczne, które to powinny znaleźć się w określonym limicie w celu zachowania cech jakościowych produktu.

Niestety, wysoka skuteczność *mAbs* jako biofarmaceutyków idzie w parze z wysokimi kosztami ich produkcji, a przez to również z wysokimi kosztami ich stosowania. Koszty terapii ww. lekami zwykle pokrywane są przez ubezpieczycieli oraz podmioty refundujące. Wydatki tego typu instytucji są jednak ograniczone, przez co wielu pacjentów zmuszona jest do korzystania z mniej skutecznych terapii konwencjonalnych lub całkowitego braku leczenia.

2.1.4. Mikroheterogeniczność *mAbs*

Każdy czynnik wpływający na modyfikację budowy, stabilność, konformację czy glikozylację przeciwciała może wpływać na jego efektywność farmakologiczną oraz aktywność biologiczną. Czynnikiem szczególnie wpływającym na właściwości *Abs* jest ich mikroheterogeniczność. Zjawisko to wywołane jest drobnymi zmianami w chemicznej strukturze białka, warunkując bezpośrednio zmiany w jego właściwościach fizycznych, a w sposób pośredni, na jego aktywność biologiczną. Dotyczy ono wszystkich klas *Abs* występujących w organizmach, jak i tych produkowanych w przemyśle farmaceutycznym.

Mikroheterogeniczność polega na występowaniu licznych, niemal nieskończonych ilości izoform (wariantów) w puli cząsteczek białka, ulegającego translacji z jednakowego fragmentu kodu genetycznego. Zjawisko to może dotyczyć: konformacji białka, masy cząsteczkowej, obszarów hydrofobowości oraz wypadkowego ładunku powierzchniowego [Haselberg i in., 2018, Leblanc i in., 2017, Tang i in., 2013]. Szczególne znaczenie w procesie walidacji farmaceutycznych *mAbs* ma kontrola zawartości izoform o zróżnicowanym wypadkowym ładunku powierzchniowym oraz modyfikacji z tym związanych [Beers i Bador, 2012]. Najważniejsze procesy odpowiadające za powstawanie izoform zebrano w tabeli 1. Procesy te wpływają na wartość oraz rozkład wypadkowego ładunku na powierzchni przeciwciała, a przez to zmieniają jego pI. Mogą one zachodzić na etapie USP (ang. *Upstream Processing*) w wyniku modyfikacji potranslacyjnych, jak również na etapach oczyszczania DSP (ang. *Downstream Processing*), formulacji oraz w trakcie późniejszego przechowywania gotowego produktu [Beck i in., 2022, Liu i in., 2008, Liu i in., 2018, Vlasak i Ionescu, 2008].

Tabela 1. Procesy będące najczęstszym źródłem mikroheterogeniczności ładunkowej

Modyfikacja	Ładunek wariantów
Deaminacja asparaginy	kwasowe
Sialilacja	kwasowe
Glikozylacja	kwasowe
Fragmentacja	kwasowe
Modyfikacje Cysteiny	kwasowe
Utlenianie	kwasowe/zasadowe
Usunięcie C-końcowej lizyny	zasadowe
C-końcowe amidowanie	zasadowe
Izomeryzacja asparaginy	zasadowe

W literaturze izoformy ładunkowe *mAbs* dzielone są na trzy kategorie o niskim, średnim oraz wysokim punkcie izoelektrycznym (pI). Ww. izoformy nazwano w pracy oraz w publikacjach odpowiednio wariantami kwasowymi *av* (ang. *acidic*), obojętnymi (piku głównego) *mv* (ang. *main*) i zasadowymi *bv* (ang. *basic*). Należy jednak podkreślić, że każda z ww. grup składa się z kilku lub nawet kilkunastu izoform, których zakres pI mieści się w pewnym przedziale wartości. Identyfikacja oraz oznaczenie ilościowe poszczególnych form zależy w głównej mierze od stosowanej metody analitycznej. Najczęściej stosowanymi metodami analitycznymi do określania składu wariantowego *mAbs* są: jonowymienna chromatografia cieczowa IEX HPLC, spektrometria mas MS, elektroforeza kapilarna CE lub kombinacja wspomnianych metod [Bults i in., 2016, Haselberg i in., 2018, Leblanc i in., 2017, Sun i in., 2021, Vlasak i Ionescu, 2008].

Badanie różnic w aktywności biologicznej wariantów ładunkowych *mAbs* często ogranicza się jedynie do badań *in vitro* lub *in vivo* na organizmach zwierzęcych. Wysokie koszty związane z badaniami klinicznymi oraz konieczność uzyskania szeregu pozwoleń sprawiają, że określenie dokładnego i długoterminowego wpływu składu wariantów na prowadzenie terapii w organizmie chorego nie jest jeszcze dokładnie poznane, a prace badaczy na ten temat często dają sprzeczne wyniki [Beck i in., 2022].

Wykazano, że deaminacja asparaginy w obrębie regionów CDR, odpowiadająca za występowanie wariantów kwasowych, prawie zawsze wpływa na pogorszenie wiązania *mAbs* do antygeny [Bults i in., 2016, Dakshinamurthy i in. 2017, Habegger i in., 2014, Harris i in., 2001, Vlasak i in., 2009]. Podobna sytuacja zachodzi w przypadku izomeryzacji tego aminokwasu [Harris i in., 2001, Yan i in., 2016]. Badania nad wpływem glikozylacji oraz sialilacji dały sprzeczne wyniki. Część z nich wykazuje, że te formy modyfikacji potranslacyjnej nie wpływają na żadne z głównych funkcji przeciwciała [Khawli i in., 2010, Miller i in. 2011], inne natomiast sugerują obniżone powinowactwo do antygeny oraz receptorów Fc [Scallon i in., 2007, Habegger i in. 2014]. Utlenianie metioniny może powodować powstawanie zarówno wariantów kwasowych jak i zasadowych. Pomimo, że większość badań wykazała brak korelacji pomiędzy występowaniem utlenienia metioniny, a obniżeniem właściwości biologicznych białka, to istnieją również sygnały mówiące o obniżeniu zdolności wiązania antygeny w takiej sytuacji [Teshima i in. 2011].

Podobnie jak w przypadku właściwości farmakodynamicznych, sprzeczne wyniki osiągane są również w trakcie określenia właściwości farmakokinetycznych wariantów ładunkowych *mAbs*. Przeciwciała naturalnie ulegają pinocytozie w komórkach śródbłonna. Receptory FcRn umożliwiają częściowy recykling przeciwciał i ich zwrot z wnętrza komórki do surowicy. Tym samym zdolność wiązania przeciwciał do FcRn wpływa na ich okres półtrwania w surowicy. Wielu autorów wskazywało na różne powinowactwo wariantów ładunkowych *mAbs* do receptorów FcRn [Hintersteiner i in., 2016a, Hintersteiner i in. 2016b, Miao i in., 2017, Zhang i in., 2014]. Badania *in vitro* nie uwzględniają jednak złożoności mechanizmów biologicznych występujących w żywym organizmie, a przez to często wstępne wyniki mogą nie mieć odwzorowania w ostatecznym działaniu bioleku. Badania przeprowadzone w warunkach *in-vivo* na organizmach mysich w warunkach sztucznego zaburzenia pI podstawowej formy przeciwciała wykazały, że zmiana jego punktu izoelektrycznego liniowo oddziałuje na okres półtrwania formy we krwi, skracając go wraz ze wzrostem pI [Igawa i in., 2010].

Boswell podając *mAbs* szczurom zauważył różnice pomiędzy wariantami ładunku zarówno w farmakokinetyce jak i w dystrybucji tkankowej [Boswell i in., 2010]. Khwali wykazał natomiast, że warianty ładunkowe pochodzące z rutynowej technologii otrzymywania *mAbs* i posiadające standardowy zakres pI, po podaniu do organizmów szczurów nie wykazują różnic w farmakokinetyce [Khawli i in., 2010].

Wpływ wariantów ładunkowych na właściwości biologiczne produktu to cecha indywidualna dla danego *mAb*. Nie ma ogólnej zasady decydującej o korzystnym czy jednoznacznie negatywnym wpływie danej grupy wariantów na właściwości biologiczne i proces leczniczy wszystkich opracowywanych przeciwciał. Faktem jednak jest, że w przypadku pewnych modyfikacji *Abs*, szczególnie niepożądane są izoformy kwasowe. Wykazują one mniejsze powinowactwo do antygeny przez co ograniczają skuteczność terapii. Na podstawie wytycznych opracowywanych przez ICH nadzór nad zawartością wariantów ładunkowych jest więc jednym z kluczowych aspektów kontroli produkcji farmaceutycznych *mAbs*. Ma to szczególne miejsce w przypadku leków bionastępczych, w których często, ze względu na redukcję kosztów, ogranicza się fazę badań klinicznych dostosowując skład produktu bionastępczego do leku referencyjnego. Z drugiej strony zawartość wariantów ładunkowych może być traktowana również jako narzędzie do kontroli powtarzalności procesu produkcji *mAbs*, które wskazuje na potencjalne obniżenie aktywności biologicznej substancji leczniczej.

2.2. Produkcja oraz oczyszczanie *mAbs*

Właściwości białek znacząco różnią się od właściwości związków małocząsteczkowych, przez co ich produkcja jest unikatową i stosunkowo nową gałęzią przemysłu farmaceutycznego.

Tradycyjne metody produkcji leków małocząsteczkowych w skrócie opierają się na syntezie chemicznej oraz/lub izolacji tych związków z surowców naturalnych. Zwykle w trakcie syntezy chemicznej substancja czynna API (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*) - powstaje jako główny (kluczowy) produkt technologii lub też API jest izolowana (wychwytywana) jest z surowców naturalnych. W obu przypadkach wychwyty oraz oczyszczanie API jest często możliwe z wykorzystaniem prostych procesów jednostkowych.

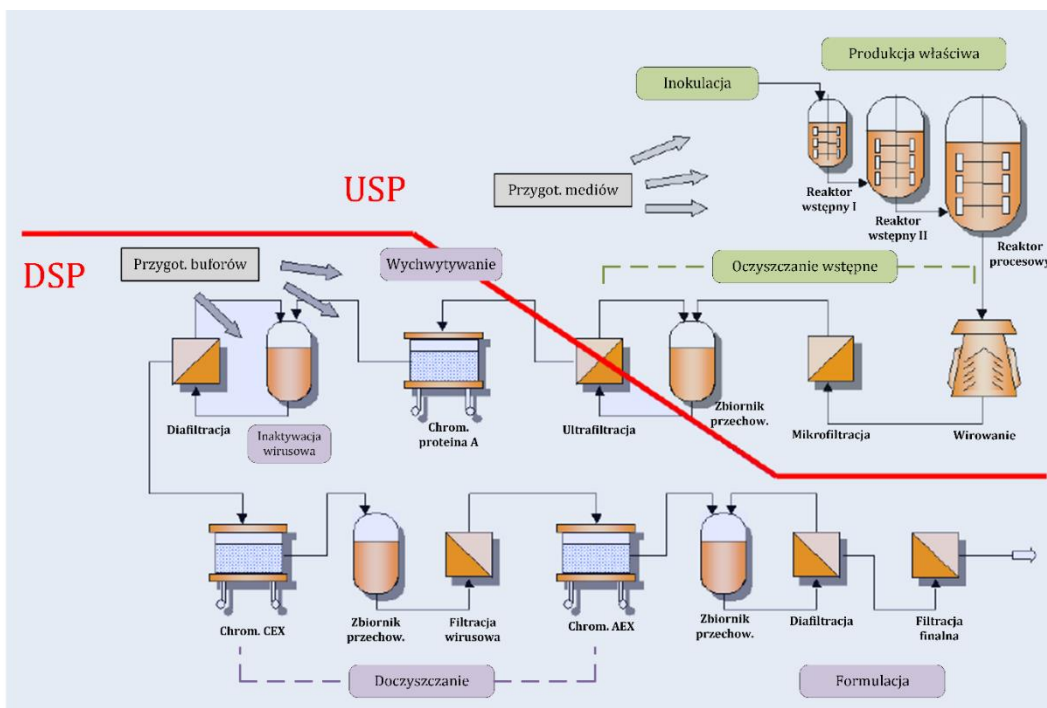
Proces produkcji bioleków, w tym *mAbs*, odbywa się poprzez biosyntezę w organizmach żywych lub ich komórkach. Biosynteza zachodzi z wykorzystaniem „maszyny” komórkowej mikroorganizmu, przez co oprócz produktu kluczowego wytwarzany jest również szereg zanieczyszczeń np. zanieczyszczenia wysokocząsteczkowe, *HMWI* (ang. *High Molecular Weight Impurities*), niskocząsteczkowe, *LMWI* (ang. *Low Molecular Weight Impurities*), białka komórek gospodarza HCP (ang. *Host Cell Protein*), DNA, agregaty białkowe, endotoksyny czy składniki pożywki. Nawet ich niewielka ilość w produkcie gotowym jest niedopuszczalna, ponieważ może negatywnie oddziaływać na organizm pacjenta, indukować odpowiedź immunologiczną, degradować białko właściwe lub substancje pomocnicze w produkcie gotowym, w trakcie przechowywania [Vanderlaan i in., 2018]. Aspekty te sprawiają, że skomplikowana technologia produkcji *mAbs* podzielona została na dwa szeregowy etapy. Etap USP odpowiada za wytworzenie *mAbs* w oparciu o metody biosyntezy - inżynierii komórkowej oraz etap DSP, którego celem jest wychwyt i oczyszczenie cząsteczek białek terapeutycznych do wartości czystości wymaganych farmakologicznie dla omawianych leków. Oba te etapy technologiczne są tak samo istotne w produkcji biofarmaceutyków, jednak na chwilę obecną większe oczekiwania oraz wyzwania w rozwoju stawiane są dla etapu DSP, który jest obecnie „wąskim gardłem” dla produktywności procesu. Jednocześnie szacuje się, że etap ten może stanowić ponad 70% kosztów produkcji, co w dużej mierze związane jest ze stosowaniem w tym etapie technologii otrzymywania *mAbs* kosztownych i mało przepustowych metod chromatograficznych [dos Santos i in., 2017, Costioli i in., 2010].

2.2.1. Wytwarzanie *mAbs* – USP

USP to grupa metod i procesów rozpoczynających technologię produkcji przeciwciał, mająca na celu wytworzenie cząsteczek terapeutycznego *mAbs* poprzez biofermentację w komórkach ssaczy lub rzadziej w bakteriach. Etapy USP produkcji *mAbs* zwykle składają się z inokulacji pożywki komórkami gospodarza, produkcji właściwej poprzez stopniowy wzrost objętości bioreaktorów oraz wstępnego oczyszczania (rys. 4). Liczba i rodzaj procesów (etapów USP) może być różna w zależności od skali procesu, rodzaju produkowanego *mAbs* oraz użytego systemu ekspresji [Gronemeyer i in., 2014, Shukla i Thommes, 2010]. Inokulacja polega na wprowadzeniu genetycznie zmodyfikowanych komórek zawierających geny ekspresji terapeutycznego *mAbs* do pożywki hodowlanej. Skala wstępnej inokulacji zawiera się w przedziale od kilku do kilkudziesięciu litrów. Najczęstszym typem systemów ekspresji *mAbs* są komórki ssacze linii CHO, (komórki

jajnika chomika chińskiego, ang. *Chinese Hamster Ovary*) oraz NS0 i Sp2/0, (mysie komórki szpiczaka, ang. *murine myeloma cells*). Około 5% *mAbs* produkowane jest natomiast w komórkach bakteryjnych *E. Coli* [dos Santos i in., 2018]. W Polsce na chwilę obecną produkowane są dwa preparaty *mAbs* posiadające akredytację FDA oraz EMEA: Natalizumab produkowany w komórkach CHO oraz Ranibizumab ulegający ekspresji w *E. Coli*. Produkcja właściwa odbywa się poprzez stopniowe zwiększanie objętości bioreaktorów celem optymalnego namnażania komórek, zużywania składników odżywczych oraz gromadzenia ubocznych metabolitów procesu. Wstępne bioreaktory na etapie rozwoju mogą mieć objętość od kilkuset do kilku tys. L, natomiast objętość głównego bioreaktora procesowego może wynosić nawet 25 tys. L. Przebieg procesu w bioreaktorze poprzez objętość oraz stężenie produktu kluczowego warunkują jego wydajność i produktywność. W ciągu ostatnich dwóch dekad dzięki rozwojowi inżynierii genetycznej podwyższono stężenie *mAbs* w zbiorze medium pohodowlanym z początkowych 0.2 mg mL^{-1} do 13 mg mL^{-1} , a nawet 27 mg mL^{-1} przy zastosowaniu modyfikowanej perfuzji. Zwiększenie skali procesu oraz wzrost stężenia *mAbs* sprawia, że obecnie stosowane bioreaktory osiągają produktywność od 15 do 100 kg produktu na szarżę [Kelley, 2009, Shukla i Thommes, 2010].

Metody wstępnego wydzielenia produktu kluczowego z pozostałości komórkowych zaliczane są do zakresu etapów USP (rys. 4). Mogą to być metody filtracji, wirowania, sedymentacji. W przypadku produkcji białek w komórkach bakteryjnych konieczny jest dodatkowy etap homogenizacji mający na celu chemiczne lub mechaniczne rozbicie ściany oraz błony komórkowej, a przez to uwolnienie produktu do roztworu pohodowlanego [Pekarsky i in., 2018, Tatli i in., 2023]. Prostota przenoszenia skali, rozwój technik inżynierii genetycznej oraz wzrost przepustowości sprawiło, że USP nie jest już etapem limitującym produkcję *mAbs*.



Rys. 4. Przykładowy schemat technologiczny procesu produkcji *mAbs* z podziałem na USP i DSP [Sommerfeld i Strube, 2005].

2.2.2. Oczyszczanie *mAbs* – DSP

Przemysłowe oczyszczanie terapeutycznych *mAbs* jest procesem wieloetapowym co przedstawiono na rys 4. Liczba poszczególnych etapów, ich kolejność w DSP, dobór odpowiednich metod oraz organizacja procesu nie są jednolite i zależą od wielu czynników, takich jak: rodzaj oczyszczanego *mAbs*, system ekspresji białka, rodzaje zanieczyszczeń, wielkość skali czy poziom wyszkolenia personelu. Podobnie jak w przypadku USP, w DSP również wymienić można kilka elementów, które są powtarzalne dla wszystkich *mAbs*. Są to: wychwytywanie *mAbs*, doczyszczanie, inaktywacja wirusowa (dotyczy produkcji w komórkach ssaczy) oraz filtracja finalna i formulacja. Pod względem technologicznym w procesie DSP *mAbs* stosowane są metody chromatograficzne jako główne oraz metody „niechromatograficzne” jako metody pomocnicze [Sommerfeld i Strube, 2005].

2.2.2.1. Techniki chromatograficzne oczyszczania terapeutycznych *mAbs*

Techniki chromatograficzne stanowią obecnie cykl podstawowych procesów DSP do wychwytywania i oczyszczania *mAbs*. Techniki te mają wiele zalet, odznaczają się wysoką selektywnością i powtarzalnością, a ich wykorzystywanie pozwala otrzymać produkt o wysokiej czystości [Doltade i in., 2023., Dutra i in., 2020]. W wielu przypadkach metody chromatograficzne umożliwiają uniwersalność stosowania dla różnego rodzaju rozdzielanych cząsteczek [Antonioni i in., 2017, Milne i in., 2016, Antos i in., 2016, Antos

i in., 2017]. Wieloletni okres rozwoju chromatografii, początkowo analitycznej a następnie preparatywnej, pozwolił na dobre poznanie procesu i jego matematyczny opis, dlatego też chromatografia jest obecnie procesem teoretycznie dobrze poznanym oraz opisanym, a przenoszenie skali procesu oparte jest na metodach obliczeniowych (modelach dynamiki chromatografii). Skutkiem tego jest obniżenie kosztów wprowadzania na rynek nowych bioleków, ale tylko do określonego poziomu wynikającego z wysokich kosztów tego procesu.

Na koszt procesu składają się: konieczność stosowania drogich zestawów chromatograficznych (aparatura), koszty wynikające z dużego zużycia buforów (faza ruchoma), a przede wszystkim koszty wynikające z ceny złóż wynoszących 5 000 - 15 000 € za 1L oraz ich wysokiego zużycia. Złóża chromatograficzne wykazują ograniczoną pojemność wiązania adsorbatów białkowych, a ich masa użyta w procesie warunkowana jest objętością aparatu (kolumny chromatograficznej). Często konieczne jest porcjowanie materiału otrzymanego w jednej szarży USP na kilka cykli chromatografii. Żywotność samego złoża jest również ograniczona, a jej wymiana podwyższa koszty eksploatacyjne produkcji [dos Santos i in., 2017, Franzreb i in., 2014].

Ponadto, w większości opisywanych technologii, chromatografia jest procesem prowadzonym w trybie okresowym, co w połączeniu z niewielką pojemnością kolumn ogranicza jej produktywność i wydłuża czas procesu [Antoniou i in., 2017, Chiu i in., 2017, Ghose i in., 2014]. Alternatywnym podejściem może być stosowanie chromatografii ciągłej, która dzięki swojej efektywności i zdolności do przetwarzania dużych ilości materiału, staje się coraz bardziej popularna w różnych gałęziach przemysłu. Rozwiązania tego typu są jednak jeszcze słabo poznane, przez co wprowadzenie ich na rynek farmaceutyczny będzie wymagało dużych nakładów finansowych oraz czasu niezbędnego do rozwoju oraz walidacji procesów [Girard i in., 2015, Lin i in., 2021].

Najczęściej stosowanymi technikami chromatograficznymi do oczyszczania *mAbs* są: chromatografia powinowactwa AC (ang. *Affinity Chromatography*), jonowymienna IEX (ang. *Ion Exchange Chromatography*) oraz oddziaływań hydrofobowych HIC (ang. *Hydrophobic Interaction Chromatography*).

Chromatografia powinowactwa AC

Chromatografia powinowactwa AC jest zazwyczaj pierwszym wyborem w trakcie opracowywania procesu DSP *mAbs*. Tą techniką realizowany jest etap wychwytu przeciwciał z roztworu pohodowlanego.

Zasada jej działania polega na interakcji pomiędzy oczyszczanym *mAbs* a selektywnym białkiem, które związane jest z żywicą chromatograficzną tworząc tzw. ligand. W warunkach natywnych dla obu białek *mAbs* pozostaje unieruchomione w kolumnie na ligandach natomiast większość zanieczyszczeń ulega wymyciu. Elucja *mAbs* z kolumny odbywa się najczęściej poprzez skokowe obniżenie pH fazy ruchomej. Znane są różne rodzaje białek wykazujące powinowactwo do specyficznych części przeciwciał np.: białko G, białko L. Jednak najszersze zastosowanie w przemyśle znalazło białko A. Wykazuje ono zdolność odwracalnego wiązania się z fragmentami Fc przeciwciał klasy IgG [Chahar i in., 2019, Ramos i in., 2018]. AC pozwala otrzymać materiał o czystości > 95% *mAbs* bezpośrednio z roztworu pohodowlanego już w jednym etapie [Doltade i in., 2023, Dutra i in., 2020, Shukla i Hinkekley, 2008]. Ograniczenia opisane powyżej dla ogółu technik chromatografii preparatywnej dotyczą również AC, warto jednak wspomnieć, że technika ta jest najbardziej kosztowną ze wszystkich stosowanych w procesie DSP *mAbs*. Ponadto część zanieczyszczeń tj.: białka komórek gospodarza HCP (ang. *Host Cell Proteins*), DNA czy endotoksyny nie są całkowicie usuwane w trakcie AC i mogą przechodzić do półproduktu. Wraz z eksploatacją kolumny również białko A może ulegać degradacji i uwalniać się z matrycy. Ww. substancje nie mogą znaleźć się w produkcie końcowym, przez co muszą być usuwane na dalszych etapach DSP [Franzreb i in., 2014, Pathak i Rathore, 2016].

Chromatografia jonowymienna IEX

Chromatografia jonowymienna IEX jest szeroko stosowaną metodą oczyszczania *mAbs*, białek fuzyjnych oraz innych rodzajów biofarmaceutyków na skalę masową. Zasada jej działania opiera się na oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy ładunkami na powierzchniach białek a naładowanymi grupami funkcyjnymi (ligandami) immobilizowanymi na żywicy chromatograficznej [Ghose i in. 2017]. Wyróżnia się chromatografię anionowymienną, AEX (ang. *Anion Exchange Chromatography*) z dodatnio naładowanymi grupami funkcyjnymi oraz chromatografię kationowymienną CEX (ang. *Cation Exchange Chromatography*) posiadającą ujemny ładunek grup funkcyjnych. Od rodzaju zastosowanych grup funkcyjnych żywice zaliczane są do silnych lub słabych

wymieniaczy jonowych, co z kolei przekłada się na ich selektywność w procesie chromatografii [Staby i in. 2005]. Dwa główne zastosowania IEX w przypadku DSP *mAbs* to doczyszczanie przeciwciał z zanieczyszczeń po etapie wychwytu oraz rozdzielanie wariantów w celu regulacji ich składu w puli *mAbs*.

Etap doczyszczania *mAbs* z zanieczyszczeń poprocesowych jest realizowany z wysoką selektywnością zarówno z zastosowaniem chromatografii AEX jak i CEX. Przeciwciała wykazują stosunkowo wysoką wartość pI, dzięki czemu posiadają niski ładunek w pH 7-8 w typowo stosowanych buforach [Shukla i Thommes, 2010]. W tych samych warunkach obecne w strumieniu zasilającym zanieczyszczenia, takie jak: DNA, HCP oraz endotoksyny posiadają silny ładunek ujemny. Umożliwia to łatwe oddzielenie zanieczyszczeń z roztworów *mAbs* poprzez zastosowanie AEX w trybie przepływowym [Curtis i in., 2003]. W tym trybie frakcja przepływowa zawiera *mAbs*, natomiast frakcja zatrzymana w kolumnie chromatograficznej zawiera DNA, HCP, endotoksyny oraz pewną ilość wirusów. Ilość zanieczyszczeń jakie zostały do usunięcia w dalszych etapach DSP oraz efektywność AEX umożliwiają zastosowanie mniej pojemnych, ale tańszych w eksploatacji membran adsorpcyjnych jednokrotnego użytku [Trnovec i in., 2020]. Zanieczyszczenia o wyższym pI, o właściwościach zbliżonych do przeciwciał takie jak: agregaty białkowe czy cząsteczki białka A, nie są efektywnie usuwane podczas AEX. Ich eliminacja z roztworu jest możliwa z wykorzystaniem chromatografii CEX [Stein i Kiesewetter, 2007]. W tym przypadku proces prowadzony jest w trybie wiązania w niskim pH i elucji poprzez jego skokowy lub liniowy wzrost. Frakcją zatrzymywaną na kolumnie jest *mAb*, natomiast pozostałe zanieczyszczenia ulegają wymyciu. Duże masy *mAbs* otrzymane w hodowlanych komórkowych wymuszają stosowanie kolumn CEX o dużych pojemnościach, co przekłada się na znaczący wzrost kosztów procesowych.

Drugim zastosowaniem chromatografii jonowymiennej jest rozdzielanie wariantów ładunkowych w celu regulacji ich składu w puli *mAbs*. Proces ten prowadzi się zazwyczaj w trybie wiązania i elucji, a więc standardowym wyborem do realizacji tego celu jest chromatografia CEX [Chung i in., 2018, Fekete i in., 2015, Ahmed i in., 2019]. W przypadku bardziej zasadowych *mAbs* możliwe jest wykorzystanie również chromatografii AEX [Teshima i in., 2011]. Elucja wariantów może być prowadzona w gradiencie liniowym soli lub pH [Lee i in., 2018, Teshima i in., 2011]. Zbliżone wartości ładunku powierzchniowego poszczególnych grup wariantów sprawiają, że niezależnie od stosowanego rodzaju gradientu ich rozdzielanie metodami IEX jest zazwyczaj mało efektywne. Nakładające się

profile stężenia poszczególnych wariantów wymuszają zawracanie frakcji do ponownego rozdzielania. Ponadto tak jak w przypadku AC ograniczona pojemność kolumn wymusza porcjowanie półproduktu jednej szarży na kilka przebiegów. Ustalanie składu wariantów z wykorzystaniem IEX jest obecnie najbardziej czasochłonnym etapem w DSP *mAbs*.

Chromatografia oddziaływań hydrofobowych HIC

Chromatografia HIC opiera się na interakcjach pomiędzy hydrofobowymi ligandami matrycy a hydrofobowymi resztami aminokwasowymi na powierzchni białka, z wykorzystaniem cząsteczek wody. Mechanizm adsorpcji oraz późniejszej elucji z fazy stacjonarnej opiera się na zmianie stężenia użytej w HIC soli kosmotropowej (patrz podrozdz. 2.3.2.) posiadającej zdolność rozpraszania otoczki hydratacyjnej z powierzchni polipeptydów w fazie ruchomej. Utrata otoczki hydratacyjnej zwiększa oddziaływania hydrofobowe pomiędzy cząsteczkami białka, co skutkuje ich aglomeracją oraz wypadaniem z roztworu [Burgess, 2009, Dumetz i in., 2008]. Adsorpcja białek wzrasta wraz ze zwiększającym się stężeniem soli kosmotropowych w fazie ruchomej, natomiast zmniejszenie stężenia powoduje zanik oddziaływań białka z matrycą oraz stopniową elucję [Eriksson, 2018].

HIC jest najrzadziej stosowaną metodą oczyszczania *mAbs* spośród wszystkich ww. technik chromatograficznych. Główne zastosowania HIC w DSP dla *mAbs* to usuwanie wysokocząsteczkowych agregatów (*HMWI*) oraz HCP. Głównym problemem stosowania tego rodzaju chromatografii jest obniżenie rozpuszczalności i stabilności białek w obecności wysokich wartości stężenia soli, co może prowadzić do dimeryzacji czy też strącania białek w kolumnie. Zbyt niska siła jonowa eluentu może prowadzić natomiast do obniżenia efektywności procesu. Dobór matrycy oraz warunków chromatograficznych musi być zwykle poprzedzony badaniami stabilności oraz rozpuszczalności *mAbs* w warunkach prowadzenia procesu [Ghose i in. 2017, Vajda i Müller, 2017].

Prace nad maksymalizacją produktywności, wydajności oraz opłacalności rozdzielania chromatograficznego wariantów ładunkowych *mAbs* zostały podjęte przez zespół Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej PRz. Zaproponowano między innymi modyfikację warunków chromatografii IEX, która pozwoliła na regulację składu wariantów przy dużym przeładowaniu masowym *mAbs* [Baran i in., 2021, Zimoch, Rumanek i in., 2023, Rumanek i in., P2022]. Temat optymalnego zastosowania chromatografii IEX do rozdzielania wariantów to temat innej pracy doktorskiej, której treść zająłaby się tematyką z niniejszą pracą.

2.2.2.2. *Inne sposoby przemysłowego oczyszczania terapeutycznych mAbs*

Inną grupą procesów wykorzystywanych w DSP *mAbs* oprócz chromatografii są metody „niechromatograficzne”. Szerokie zastosowanie w DSP biofarmaceutyków znalazły np. techniki filtracyjne oraz membranowe. Do grupy metod „niechromatograficznych” zalicza się również techniki tj. ekstrakcja ATPE, krystalizacja, a także strącanie, które było tematem niniejszej pracy. Ich obecne zastosowanie w przemyśle jest ograniczone, jednak w ostatnich latach cieszą się one dużym zainteresowaniem ze względu na swoje możliwości.

Metody filtracyjne

Ze względu na rodzaj rozdzielanych cząsteczek oraz rozmiar porów stosuje się filtrację wgłębną, mikrofiltrację, filtrację wirusową oraz ultrafiltrację i diafiltrację [Marichal-Gallardo i Alvarez, 2012]. Filtracja wgłębną oraz mikrofiltracja stanowią podstawowe techniki usuwania większych zanieczyszczeń z roztworów pochodowlanych, takich jak resztki komórkowe, agregaty białkowe, bakterie czy cząstki stałe. Filtry o porowatości 0.22 μm stosowane są wielokrotnie w DSP, po każdej operacji jednostkowej w celu ograniczenia możliwości kontaminacji krzyżowej półproduktu oraz ochrony zaawansowanych systemów aparaturowych przed cząstkami stałymi [Marichal-Gallardo i Alvarez, 2012, Nadar i in., 2021, Roush i Lu, 2009]. Filtracja wirusowa to technika mająca na celu redukcję wirusów w produkcie pochodowlanym do wartości akceptowalnych przez ICH. Przemysł farmaceutyczny klasyfikuje wirusy w dwóch kategoriach, 20 nm i większe (parwowirusy) oraz 50 nm i większe (retrowirusy), przez co punkt odcięcia membran wirusowych mieści się w zakresie 15-50 nm [Marichal-Gallardo i Alvarez, 2012, Matilla i in., 2016, Shukla i in., 2007].

Ultrafiltracja i diafiltracja UF/DF to szeroko stosowana w przemyśle produkcji *mAbs* technologia regulacji stężenia produktu, wymiany oraz odsalania buforów. Membrany UF/DF posiadają rozmiary porów w zakresach 30-50 kDa, przez co są nieprzepuszczalne dla *mAbs*, umożliwia to zateżnienie cząsteczek białka w roztworze oraz jego późniejsze rozcieńczanie buforem przechowalniczym [Marichal-Gallardo i Alvarez, 2012., Nadar i in., 2021, Rosenberg i in., 2009, Whitaker i in., 2022].

Ekstrakcja ATPE

Ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych, ATPE jest rodzajem operacji rozdzielania, w której stosuje się dwa niemieszające się ze sobą roztwory wodne, w których składniki znajdują się powyżej określonych wartości stężenia krytycznego

określającego ich wzajemną rozpuszczalność. Najczęściej wykorzystywane układy to hydrofilowe roztwory: polimer-polimer, polimer-sól lub alkohol-sól [Soares i in., 2015]. ATPE zapewnia łagodne i biokompatybilne środowisko dla biomolekuł, w tym *mAbs*, ze względu na wysoką zawartość wody w obu fazach. Biomolekuły ulegają podziałowi pomiędzy fazę górną a dolną w zależności od wybranego układu faz, ich stężenia, masy cząsteczkowej, siły jonowej oraz pH [Asenjo i Andrews, 2011].

Zaletą ATPE jest niski koszt w porównaniu z chromatografią. Proces jest również łatwy do przenoszenia skali, objętość procesowa ograniczana jest w zasadzie jedynie rozmiarem reaktora [Wessner i in., 2020]. Wśród przykładów zastosowania ATPE wyróżnić można oddzielanie *mAbs* od HCP. Proces ten został z powodzeniem opracowany przy 75% czystości materiału oraz wydajności 95% [Azevedo i in., 2009]. Prowadzone są również prace nad możliwością prowadzenia procesu w sposób ciągły. Problemem metody pozostaje niekontrolowana agregacja biomolekuł wywołana wysokimi stężeniami składników faz, to jest polimeru oraz soli [Wessner i in. 2020].

2.3. Strącanie i krystalizacja białek

Strącanie oraz krystalizacja białek to proces przejścia polipeptydu z roztworu do osadu pod wpływem obniżenia jego rozpuszczalności – stężenie białka jest wyższe niż stężenie wynikające z równowagi ciecz-ciało stałe w roztworze. Uzyskaną morfologię osadu warunkuje rodzaj prowadzonego procesu.

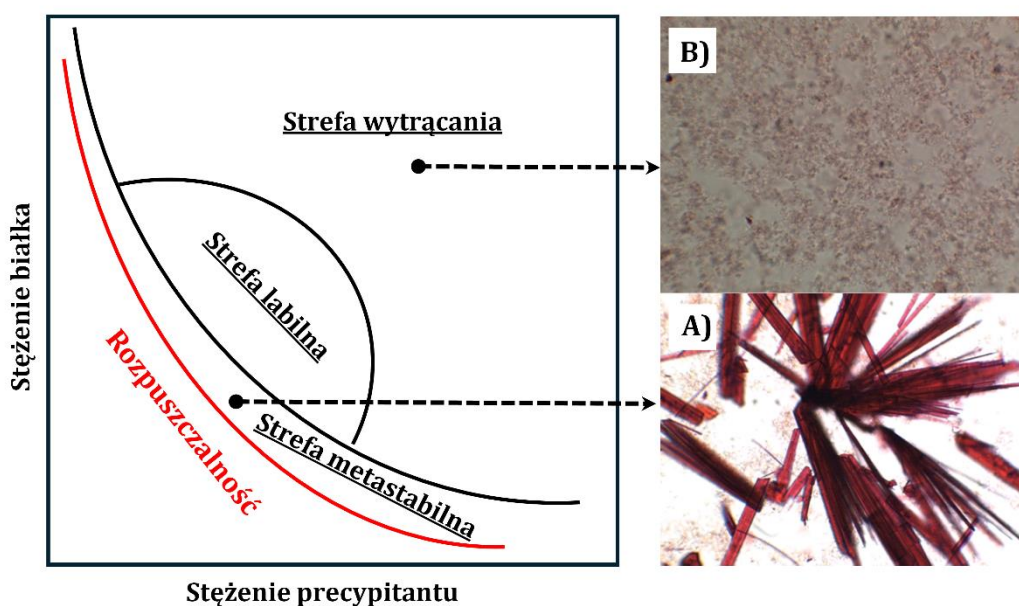
Strącanie jest procesem łatwym do przeprowadzenia, wykazującym szybką kinetykę, co ma duże znaczenie w procesach przemysłowych, gdzie czas jest jednym z kluczowych parametrów operacyjnych.

Krystalizacja białek w stosunku do strącania jest procesem znacznie trudniejszym do zaprojektowania i przeprowadzenia, ze względu na skomplikowaną termodynamikę procesu, konieczność kontroli wielu parametrów operacyjnych oraz wpływ zanieczyszczeń na przebieg procesu.

Produktem krystalizacji jest białko o uporządkowanej i stabilnej sieci krystalicznej, w przeciwieństwie do strącania, w którym otrzymuje się osad amorficzny. Uzyskiwana faza krystaliczna charakteryzuje się wyższą stabilnością niż bezpostaciowy osad, przez co białko może być przechowywane w tej postaci przez długi czas.

2.3.1. Podstawy procesu

Siłą napędową procesu strącania oraz krystalizacji jest przesylenie. Przesylenie to różnica stężenia pomiędzy stężeniem białka w przesyconym roztworze a jego rozpuszczalnością (stężeniem równowagowym). Równowaga fazowa, ciecz-ciało stałe przedstawiana jest najczęściej na dwuwymiarowym diagramie, którego współrzędne przypisane są stężeniu białka oraz precypitantu, rys. 5. Na diagramie wyróżnia się 4 strefy: roztwór nienasycony, strefę metastabilną, nukleacji (labilną) oraz strefę wytrącania [Asherie, 2004, Chen i in., 2021].



Rys.5. Schematyczny diagram fazowy w krystalizacji białek (lewa strona), ilustracje otrzymanych w pracach własnych osadów *mAb2*: a) kryształu oraz b) fazy amorficznej (prawa strona).

Proces krystalizacji białka zachodzi jedynie w przypadku, kiedy skład roztworu przesyconego znajdzie się w strefach: labilnej (nukleacji) lub metastabilnej. Strefa labilna charakteryzuje się spontanicznym zarodkowaniem (homogenicznym), które inicjuje wzrost kryształów. Czas, w którym układ krystalizacyjny znajduje się w strefie labilnej decyduje o liczbie powstałych kryształów, ich formie polimorficznej, wielkości oraz rozkładzie tych wielkości. W strefie metastabilnej przesylenie nie jest wystarczające, aby możliwe było wystąpienie zarodkowania spontanicznego. Kryształy w tej strefie mogą zarodkować na skutek szczepienia (nukleacja wtórna, heterogeniczna), czy też w obecności zarodków krystalizacyjnych dostarczonych z zewnątrz, np. ze strefy labilnej. Nowopowstałe kryształy mogą następnie rosnąć w strefie metastabilnej, aż do osiągnięcia równowagi krystalizacyjnej.

Wzrost kryształów w strefie metastabilnej jest procesem limitowanym przez dyfuzję, zależnym w dużej mierze od procesów transportu masy białka z roztworu do powierzchni kryształu. Wzrost kryształów może być zahamowany w obecności zanieczyszczeń procesowych, które mogą wbudowywać się w sieć krystaliczną oczyszczanego polipeptydu. W trakcie procesu do sieci krystalicznej białka wbudowywane są również cząsteczki wody mogące stanowić nawet 70% masy kryształu. Najczęściej faza kryształu jest fazą heterogeniczną co może wynikać z obecności różnych struktur krystalicznych lub form białka w fazie stałej i wody związanej z powierzchnią kryształu. Pobranie wody przez fazę stałą powoduje zagęszczenie białka oraz wzrost stężenia precypitantu w fazie ciekłej (roztworze). Powoduje to zmiany lokalnej rozpuszczalności białka. Podsumowując, wiązanie wody z roztworu na powierzchni kryształów białka przesuwają równowagę międzyfazową, a przez to utrudnia optymalizację procesu [Kołodziej i in., 2018].

Wartości przesylenia oraz zakres stężenia precypitantu, przy których uzyskiwana jest faza krystaliczna, wyznaczają tzw. okno operacyjne. W przypadku większości białek okno to ma bardzo wąski zakres. Ponadto krystalizacja białek charakteryzuje się powolną kinetyką, przez co bardzo często nie nadaje się do zastosowań przemysłowych [Asherie, 2004, Chen i in., 2021, Gutierrez-Quezada i in., 2010, Kołodziej i in., 2018, Simone i in., 2018].

Obszarem na diagramie fazowym, który był obszarem zainteresowania w niniejszej pracy jest strefa wytrącania. Rozpuszczone białko w stanie wysokiego przesylenia wytrąca się z roztworu w postaci amorficznego osadu. Granica strefy wytrącania nie jest ściśle określona, przez co zakres ich stosowania nie musi być precyzyjnie optymalizowany, jak ma to miejsce w przypadku krystalizacji. Strącanie jest również mało wrażliwe na parametry procesowe oraz środowiskowe i może zachodzić nawet przy znacznym zanieczyszczeniu roztworu, jak ma to miejsce w przypadku roztworów pochodowlanych *mAbs*. Strącanie charakteryzuje się szybką kinetyką, dzięki czemu równowaga fazowa osiągnięta jest po kilku do kilkunastu minutach [Asherie, 2004, Chen i in., 2021, Rumanek i in., 2022, Rumanek i in., 2024a, Rumanek i in., 2024b]. Powyższy opis mechanizmu procesu strącania wskazuje na fakt, że czystość otrzymywanego osadu nie jest zadowalająca, osad jest bezpostaciowy i niestabilny.

2.3.2. Rodzaje precypitantów

Przesycenie jako siła napędowa procesu strącania i krystalizacji jest osiągane najczęściej poprzez dodatek precypitantu, który dodany do układu obniża rozpuszczalność białka. Mechanizm jego działania zależy od rodzaju użytego związku. Precypitanty dzieli się zwykle na 3 kategorie: sole nieorganiczne, polimery oraz związki organiczne (Tabela 2).

Innym sposobem osiągnięcia przesycenia jest manipulacja parametrami układu, takimi jak pH czy temperatura. W przypadku temperatury stabilność białek ogranicza zakres zmian wartości tego parametru, przez co metoda ta nie nadaje się do oczyszczania białek na skalę masową [Krauss i in., 2013].

Tabela 2. Precypitanty stosowane w krystalizacji białek [Krauss i in., 2013].

Sole	Związki organiczne	Polimery
siarczan amonu	MPD	glikol polietylenowy -
siarczan litu	Izopropanol	200-35000
octan amonu	Etanol	glikol propylenowy 400
chlorek sodu	1,3-propanodiol	poli(winylopirolidon)
cytrynian amonu	dioksan	propoksylian pentaerytrytolu
mrówczan amonu	aceton	poliakrylan
cytrynian sodu	butanol	polikarboksylany
mrówczan sodu	acetonitryl	monometyloglikol -
fosforan amonu	dimetylosulfotlenek	polietylenowy 2000-5000
fosforan sodu	heksanodiol	
fosforan potasu	metanol	
azotan amonu	glikol etylenowy 200-400	
tiocyjanian potasu	kwasy malonowy	
octan sodu	kwasy hydroksybursztynowy	
octan magnezu	kwasy bursztynowy	
siarczan magnezu	glicerol	
azotan sodu	imidazol	

Wysalanie jest powszechnym określeniem procesu, polegającego na strącaniu białek pod wpływem dodatku soli. Białka wykazują słabą lub niemal wręcz zerową rozpuszczalność w czystej wodzie dejonizowanej, co jest spowodowane występowaniem na ich powierzchni ujemnych oraz dodatnich ładunków, co sprzyja aglomeracji ich cząsteczek. Białka przy braku obecności jonów w otoczeniu, łatwo aglomerują i ulegają wytrąceniu z roztworu. Dodatek już nawet niewielkiej ilości soli w roztworze neutralizuje ładunki powierzchniowe białek zdysocjowanymi jonami, przez co nie wchodzi one w interakcje międzycząsteczkowe i pozostają rozpuszczone w roztworze. Efekt ten określono mianem wsalania białek [Duong-Ly i Gabelli, 2014, Mc Pherson i Gavira, 2004].

Przy określonej wartości stężenia soli, białka uzyskują maksymalną rozpuszczalność, a dalszy wzrost obecności jonów w roztworze skutkuje ich wysalaniem. Wysalanie białek wiąże się ze wzrostem interakcji pomiędzy jonami a cząsteczkami rozpuszczalnika oraz automatycznym spadkiem podobnych oddziaływań po stronie rozpuszczonych polipeptydów. Sole posiadające zdolność rozpraszania otoczki hydratacyjnej z powierzchni polipeptydów nazwano solami kosmotropowymi (kosmotropami). Utrata otoczki hydratacyjnej zwiększa oddziaływania hydrofobowe pomiędzy cząsteczkami białka, co skutkuje ich aglomeracją oraz wypadaniem z roztworu [Burgess, 2009, Dumetz i in., 2008]. Proces ten określony jest ujemnymi wartościami energii swobodnej Gibbsa, co oznacza, że występuje samorzutnie w momencie przekroczenia granicznego iloczynu stężeń białka oraz soli. Efektywność wysalania białek z wykorzystaniem soli kosmotropowych, zależna jest od rodzaju użytego jonu, a zależność ta opisana została przez szereg Hofmaistera [Gregory i in., 2022, Hyde i in., 2017].

Mechanizm strącania białek wywołany obecnością polimerów tłumaczony jest obecnie przez teorię strefy wyczerpania oraz teorię wykluczonej objętości [Hammerling i in., 2017]. W przypadku teorii wykluczonej objętości zakłada się, że cząsteczki białka są sterycznie wykluczane z objętości roztworu zajmowanej przez *PEG*, jednocześnie zagęszczając się w pozostałej objętości roztworu. W wyniku tego stężenie białka stopniowo rośnie dochodząc do granicy rozpuszczalności, po przekroczeniu której zaczyna agregować [Iverius i Laurent, 1967, Poison, 1977]. Dodatek soli może w takim przypadku przesunąć równowagę procesu podobnie jak ma to miejsce w trakcie wysalania.

Teoria strefy wyczerpania zakłada, że polimery o małej masie takie jak np. *PEG* nie mogą znajdować się w bezpośrednim kontakcie z większymi cząsteczkami białek. Tworzy to strefę wyczerpania, bezpośrednio otaczającą polimer. Kiedy dwie cząsteczki białka zbliżają się do siebie wystarczająco blisko, ich strefy wyczerpania się nakładają, co powoduje, że cząsteczki polimerów są wyłączone z obszaru między nimi. Wynikające z tego niezrównoważone ciśnienie osmotyczne prowadzi do przyciągania pomiędzy cząsteczkami białek, a w dalszym ciągu do ich aglomeracji lub koagulacji [Asakura i Oosawa, 1958, Odijk, 2009, Virares i in., 2002]. Obie teorie zakładają, że białka w obecności polimerów dążą do obniżenia energii swobodnej, co skutkuje przejściem z roztworu do osadu. Strącanie białek w obecności polimerów zależne jest od siły jonowej roztworu, temperatury i pH [Knevelman i in., 2009]. Wykazano również, że znaczący

wpływ na przebieg procesu ma rozmiar cząsteczki białka oraz użytego precypitantu opisany promieniem hydrodynamicznym. Badania prowadzone z wykorzystaniem *PEG* o różnej liniowej długości łańcucha wykazały, że wraz ze wzrostem masy *PEG*, rozpuszczalność białek maleje [Polson i in., 1964]. W praktyce wykorzystywany jest zwykle *PEG* o liniowej strukturze łańcucha, o masie w zakresie 2-10 kDa, wykazujący optimum pomiędzy właściwościami strącającymi a lepkością roztworu. Polimer ten znalazł bardzo szerokie zastosowanie w strącaniu *mAbs* ze względu na swoje właściwości, jest stosunkowo tani, nietoksyczny, ma charakter obojętny, przez co nie wpływa na siłę jonową roztworów. Dane literaturowe mówią również, że w pewnym zakresie wartości stężenia *PEG* wywiera stabilizujący wpływ na strukturę *mAbs*.

Przejście fazowe białek może zostać również osiągnięte poprzez zmianę pH. Jest to jeden z najistotniejszych parametrów poddawanych kontroli w trakcie strącania białek. Białka wykazują właściwości amfoteryczne w zależności od pH, w którym się znajdują. Właściwości te wynikają z reszt aminokwasowych na powierzchni białek. Aminokwasy kwasowe zawierające grupy $-COOH$ są donorami H^+ , natomiast aminokwasy zasadowe o grupach $-NH_2$ są ich akceptorami. Poziom protonowania białka a tym samym jego wypadkowy ładunek jest zależny od pH środowiska. W pH równym punktowi izoelektrycznemu (pI) wypadkowy ładunek białka wynosi zero. Białka o zerowym ładunku powierzchniowym wykazują najmniejsze wartości oddziaływań elektrostatycznych. Zanik oddziaływań elektrostatycznych warunkuje agregację cząsteczek białka, przez co właśnie w pI większość białek wykazuje najmniejszą rozpuszczalność. Powyższy efekt może być wykorzystywany do strącania białek w zakresie niskich wartości stężenia precypitantu, zarówno w trakcie wysalania jak i strącania z wykorzystaniem *PEG* [Hekmat, 2015, Odijk, 2009].

2.3.3. *Proces krystalizacji i strącania w przemyśle*

Początki badań nad krystalizacją białek sięgają lat 30 XX wieku, kiedy to pojawiły się pierwsze wyniki prac nad otrzymywaniem stabilnych monokryształów przeznaczonych do celów rentgenowskich. Chęć poznania struktury polipeptydów oraz ich znaczenie w medycynie i farmacji były motorem napędowym, który pozwolił rozwijać oraz udoskonalać początkowo proste i nieefektywne procedury krystalizacji. Obecnie metody krystalizacji białek wykorzystywanej w krystalografii do określania ich struktury są wysoce efektywne i z powodzeniem stosowane do coraz to nowszych rodzajów cząsteczek.

Pomimo stosunkowo dobrego poznania procesu, wiele rozwiązań wykorzystywanych w krystalografii nie jest możliwych do zastosowania w przemysłowym oczyszczaniu białek. W procesach przemysłowych dąży się do oczyszczania dużych mas biopolimerów w możliwie jak najkrótszym czasie. Wartości przesylenia precypitantów stosowanych w krystalografii są niskie, przez co kinetyka tak prowadzonych procesów jest zbyt wolna do zastosowań przemysłowych. Problem stanowi również skład oczyszczanych roztworów, będący mieszaninami wieloskładnikowymi. Zanieczyszczenia mogą generować zmiany w termodynamice procesu, a także współstrącać się razem z białkiem właściwym. W związku z tym przez wiele lat strącanie oraz krystalizacja nie były brane pod uwagę jako metoda rozdzielania protein. Sytuacja ta zmieniła się m.in. poprzez wzrost zapotrzebowania na biofarmaceutyki. Moment osiągnięcia granicznej efektywności technik chromatograficznych był również momentem wzrostu zainteresowania przemysłu procesami strącania oraz krystalizacji białek.

Pierwszym i obecnie jedynym krystalizowanym na skalę przemysłową białkiem jest insulina. Niewielkie rozmiary i stosunkowa łatwość otrzymania fazy krystalicznej umożliwiły Petersonowi opatentowanie pierwszej metody na oczyszczanie tego polipeptydu w 1947. Peterson wykorzystał w tym celu bufor cytrynianowy wzbogacony jonami cynku. Przemysłowe oczyszczanie z materiału odzwierzęcego przeprowadzono dopiero 20 lat później [dos Santos i in., 2017, Petersen i Schlichtkrull, 1964]. Na przestrzeni lat proces udoskonalano i stopniowo powiększono jego skalę. W trakcie całego DSP proces ten wykorzystywany jest kilkakrotnie, do oczyszczania, zatężania oraz formulacji gotowego produktu. Insulina z powodzeniem ulega formulacji w rurowych krystalizatorach pracujących w reżimie ciągłym z wydajnością sięgającą 90% [Cheng i in., 2021, Parambil i in., 2011]. Krystalizacja ciągła jest procesem ekonomicznie korzystniejszym, co w przyszłości może znacząco obniżyć koszty produkcji białek np. przeciwciał, przy stale wzrastającym zapotrzebowaniu.

Problemem w opisywanym procesie krystalizacji na skalę przemysłową nadal pozostaje oczyszczanie białek o dużej masie oraz IV rzędowej strukturze jak *mAbs*. Elastyczność struktury *mAbs*, tworzenie agregatów oraz łatwość destabilizacji znacząco obniżają możliwość szybkiej i efektywnej krystalizacji. Jednocześnie stały wzrost zapotrzebowania na leki białkowe oraz ciągłe wprowadzanie na rynek nowych cząsteczek generuje wzmożone wysiłki w opracowywaniu nowych metod oczyszczania tej grupy leków.

Proces strącania białek znalazł szersze zastosowanie w obecnie stosowanym przemyśle farmaceutycznym. Powodem stosowania strącania może być nieporównywalnie większa prostota w prowadzeniu procesu w stosunku do krystalizacji. Wśród białek strącanie na etapie DSP wykorzystywane jest np. przy produkcji HSA (ang. *Human Serum Albumin*) oraz EPO (ang. *Erythropoietin*). HSA wykorzystywane jest w leczeniu: oparzeń, urazów czy hipowolemii. Ulega wysokowydajnemu strącaniu (< 96%) z wykorzystaniem mieszaniny PEG/Etanol [Schneider i in., 1979]. Proces strącania HSA z wykorzystaniem kwasu poliakrylowego został opatentowany w 2014 roku przez firmę GE Healthcare Bio-Sciences [Alstine i in., 2008]. W technologii tej strącanie wykorzystywane jest w pierwszym etapie DSP, który umożliwia usunięcie zanieczyszczeń komórkowych. Precypitacja etanolowa wykorzystywana jest również do odzysku EPO, przy wydajności sięgającej nawet 100% [Carcagno i in., 2001].

Yuguo Zang jako jedna z pierwszych podjęła temat zastosowania strącania oraz krystalizacji *mAbs* w DSP [Zang i in., 2011]. Wydzieliła ona IgG4 z roztworu pochodzącego CHO, wykorzystując w tym celu mieszaninę PEG 8000, imidazolu oraz octanu wapnia w pH 7.0. Zarówno czystość (90%) jak i wydajność procesu (31%) były niezadowalające, jednak badanie to pozwoliło określić przydatność ww. procesów w oczyszczaniu tej nowej i pręźnie rozwijającej się grupy leków [Zang i in., 2011]. Najpowszechniej stosowanym precypitantem w strącaniu *mAbs* jest liniowy PEG o masie do 8 kDa [Baker i in., 2015, Huettmann i in., 2014, Oelmeier i in., 2013, Kuczewski i in., 2011, Giese i in., 2013, Sommer i in., 2015, Hammerschmidt i in., 2014]. Kuczewski i Giese [Kuczewski i in., 2011] wykazali, że selektywność produktu może być poprawiona poprzez dobranie warunków wytrącania i wybór rodzaju PEG w procesie jedno- i dwuetapowym. Hammerschmidt oczyścił *mAbs* z roztworu pochodzącego CHO z wydajnością < 90% oraz czystością < 96% stosując dwuetapowe strącanie PEG [Hammerschmidt i in., 2016]. Smejkal pracując nad oczyszczaniem IgG1, oddzielił *mAbs* od roztworu pochodzącego wykorzystując 5 mM bufor octanowy z histydyną, 10 mM NaCl oraz bufor TRIS. Następnie powiększył skalę procesu do finalnej objętości 1L. Powiększenie skali nie zaburzyło parametrów procesowych i pozwoliło otrzymać produkt o czystości 96.7% oraz wydajności 90% [Smejkal i in., 2013a]. Powiększenie skali przeprowadzono również z użyciem PEG w procesie oczyszczania fragmentów Fab lub pojedynczych łańcuchów *mAbs* [Huettmann i in., 2014, Smejkal i in., 2013b]. Kolejnym etapem w nowych zastosowaniach oczyszczania *mAbs* z wykorzystaniem strącania było opracowanie procesów umożliwiających zastosowanie ciągłego reżimu pracy. Sommer

[Sommer i in., 2014] przeprowadzili selektywne wytrącanie *mAbs* z roztworów *PEG* w zautomatyzowanym zbiorniku reakcyjnym z mieszadłem, prowadzonym okresowo na małą skalę laboratoryjną. Pons Royo i in., [Pons Royo i in., 2023], Sommer [Sommer i in., 2015] i Ferreira-Faria [Ferreira-Faria i in., 2023] opracowali procesy wytrącania *mAbs* z użyciem *PEG* w reaktorach o przepływie tłokowym. Minervini [Minervini i in., 2013], Burgstaller [Burgstaller i in., 2019] i Li [Li i in., 2019] opisali zintegrowany proces, który łączył wytrącanie i mikrofiltrację tangencjalną.

Pomimo dużego zainteresowania procesami strącania oraz krystalizacji ich zastosowanie do oczyszczania *mAbs* nadal pozostaje jedynie zagadnieniem naukowym na etapie badań laboratoryjnych. Wprowadzenie metody do przemysłu biofarmaceutycznego będzie wiązało się dogłębnym poznaniem wpływu przejścia fazowego na właściwości biologiczne oczyszczanych cząsteczek. Ponadto wszystkie ww. prace dotyczyły głównie etapów wychwytu *mAbs* z roztworów pochodowlanych. Jak dotąd nie podejmowano zagadnienia selektywnego rozdzielania wariantów *mAbs* poprzez strącanie czy krystalizację.

W niniejszej pracy podjęto badania nad procesem strącania *mAbs* z wykorzystaniem glikolu polietylenowego *PEG* jako precypitantu w wyniku, którego opracowano dwie metody oczyszczania *mAbs* dedykowane do różnych etapów DSP *mAbs*. Metody omówiono w rozdz. 3, a także w czterech publikacjach o zasięgu międzynarodowym, będących podstawą niniejszej rozprawy [Rumanek i in., 2022, Rumanek i in., 2024a, Rumanek i in., 2024b Zimoch, Rumanek i in., 2023].

3. Komentarz do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską

3.1. Elementy nowości w ramach pracy doktorskiej

W ramach niniejszej pracy opracowano dwie nowe metody oczyszczania *mAbs* oparte na procesie strącania, które mogą być zastosowania na etapie DSP przy produkcji *mAbs*:

Pierwsza z metod polega na strącaniu *mAb2* z roztworu po hodowli komórek ssaczych połączonym z ekstrakcją ciało stałe-ciecz (ługowaniem), *SLE* (ang. *Solid-Liquid Extraction*). W procesie tym oddziela się *mAbs* od zanieczyszczeń powstających na etapie USP tj.: *HMWI*, *LMWI*, *Agg*, DNA czy HCP.

Druga metoda polega na selektywnym rozdzielaniu wariantów ładunkowych *mAbs* poprzez strącanie w niskich wartościach pH i przy niskiej sile jonowej, z wykorzystaniem *PEG* jako środka strącającego. W metodzie tej przeanalizowano różne sposoby prowadzenia strumieni procesowych, tj. przeciwprąd oraz współprąd, które zostały opisane za pomocą modelu matematycznego. Model umożliwia projektowanie i optymalizację strącania dla materiałów *mAb* o różnym składzie wariantów. Metodę można również wykorzystać w połączeniu z chromatografią co wykazano również w innej pracy realizowanej w tym samym zespole badawczym.

Zarówno połączenie strącania z *SLE* jak i wykorzystanie strącania do selektywnego rozdzielania wariantów ładunkowych stanowią nowe podejścia nieopisane dotąd w literaturze.

3.2. Izolacja i oczyszczanie *mAb* z supernatantu hodowli komórkowej CHO metodą strącania wieloetapowego i ekstrakcji ciecz-ciało stałe

[Rumanek i in., 2024b] Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024b). Isolation and purification of a monoclonal antibody from a cell culture supernatant by multistage precipitation and solid-liquid extraction. *Food Bioprod. Process.*, 147, 34-41. **Impact Factor = 3.5**

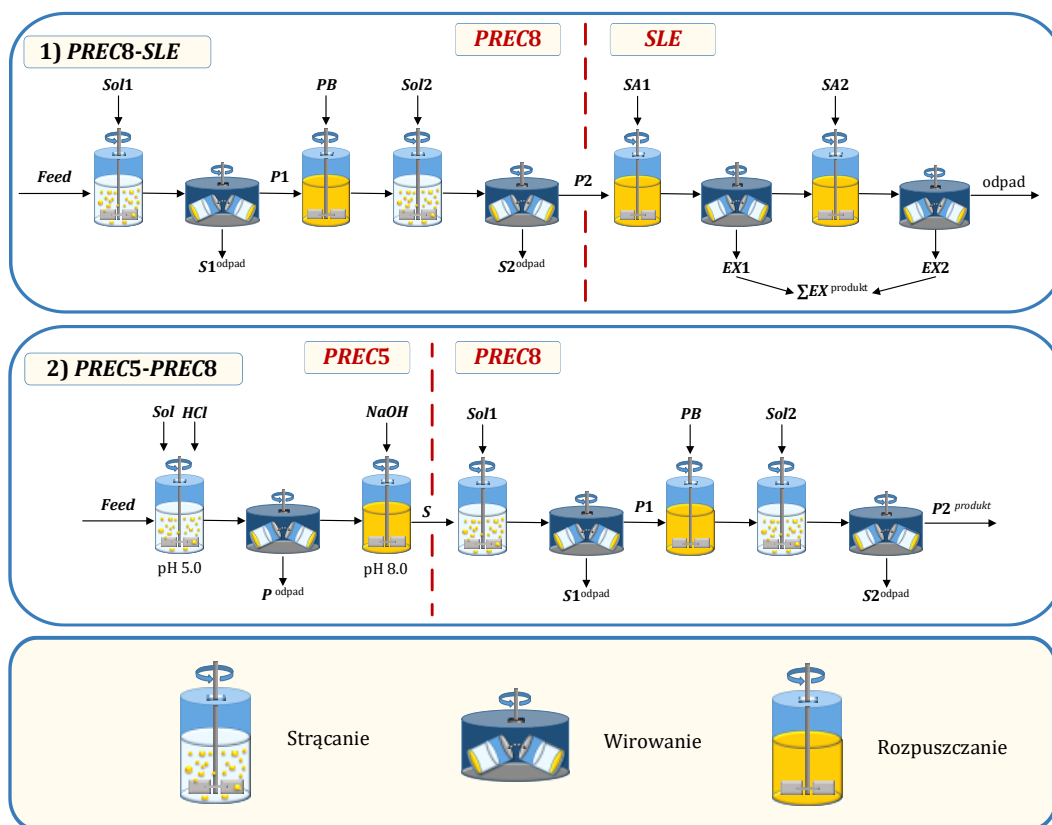
[Rumanek i in., P2024] Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (P2024). Sposób izolacji *mAbs* z mieszaniny pohodowlanej. **P.448410** [WIPO ST 10/C PL448410] z dnia 2024-04-25

W publikacji [Rumanek i in., 2024b] opisano opracowany proces wychwytu oraz oczyszczania przeciwciała monoklonalnego, *mAb2* (IgG1) z mieszaniny pohodowlanej CHO. *mAb2* oddzielono od zanieczyszczeń wysokocząsteczkowych *HMWI*, niskocząsteczkowych *LMWI*, DNA oraz komórek gospodarza HCP. Ograniczono również zawartość niskocząsteczkowych agregatów *mAb2 Agg* w produkcie. Zaprojektowano dwie alternatywne ścieżki procesu: 1) sekwencję strącania połączonego z *SLE* lub 2) dwuetapowego strącania glikolem polietylenowym *PEG*.

Opcja 1) (*PREC8-SLE*) rozpoczynała się od dwustopniowego strącania *LMWI* bezpośrednio z roztworu CHO w pH 8.0 (rys. 6). Następnie osad (*P*) zawierający *mAb2* oraz pewne ilości *HMWI* kierowany był do operacji *SLE*, którą prowadzono w sposób jedno lub dwustopniowy. W tym przypadku produktem procesu była faza ciekła (*EX*) zawierająca wyekstrahowane *mAb2*, natomiast *HMWI* pozostawały nierozpuszczone w osadzie.

W opcji 2) (*PREC5-PREC8*) *HMWI* usunięto bezpośrednio z roztworu CHO (*Feed*) poprzez strącanie w pH 5.0 (rys. 6), z zastosowaniem roztworu *PEG* 3.35 kDa, jako precypitantu (*Sol*). Po rozdzieleniu faz, osad (*P*) zawierający *HMWI* usunięto, natomiast supernatant (*S*) skierowano do etapu usuwania *LMWI*. W obu opcjach połączenia procesu *LMWI* usuwano na drodze dwustopniowego strącania w pH 8.0.

Przebadano wpływ parametrów operacyjnych na przebieg obydwu procesów tj. stężenia *PEG* oraz *mAbs* w strumieniu zasilającym, siły jonowej buforu procesowego, objętości buforu wykorzystanego do *SLE*. Wyznaczono równowagę oraz kinetykę strącania, a także określono czystość i aktywność produktu.

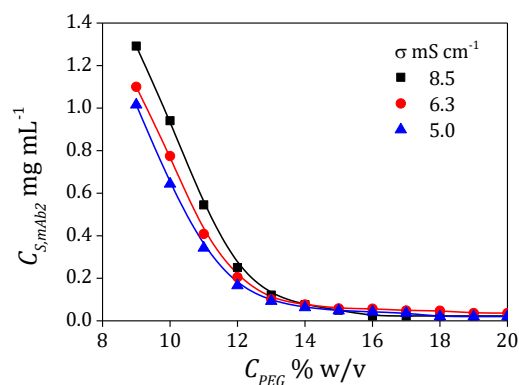


Rys. 6 Schemat procesu wychwyty i oczyszczania *mAb2*; 1) *PREC8-SLE*, 2) *PREC5-PREC8*.

3.2.1. Równowaga oraz kinetyka procesu *PREC8*

Badania nad oczyszczaniem materiału *mAb2* z *LMWI* (*PREC8*) rozpoczęto od wyznaczenia rozpuszczalności *mAb2*. Kluczowym parametrem operacyjnym w procesie strącania jest wartość stężenia precypitantu (C_{PEG}) oraz pH roztworu. Pomiary wykonano dla *PEG* w zakresie 9-20% w/v oraz dla pH 8.0, które odpowiadało pH materiału wsadowego (harvestu). Stężenie *PEG* wpływa na wartość stężenia równowagowego białka w roztworze ($C_{S,ovl}$) i selektywność oczyszczania. Wyznaczenie równowagi procesowej przeprowadzono przy różnych wartościach siły jonowej, obejmując cały zakres operacyjny wartości dla tego parametru, który zawierał się pomiędzy wartością odpowiadającą przewodnictwu materiału wsadowego, a wartości przewodnictwa 50 mM buforu fosforanowego *PB* o pH 8.0, wykorzystywanego jako roztwór procesowy.

Zależność rozpuszczalności *mAb2* od C_{PEG} , przedstawiono na rys. 7. Z wyników przedstawionych na rys. 7 wynika wyraźnie, że dla $C_{PEG} > 13\%$ w/v rozpuszczalność białka nie jest zależna od siły jonowej roztworu. Podobne wyniki uzyskano również dla różnego C_{ovl} [Rumanek i in., 2024b].

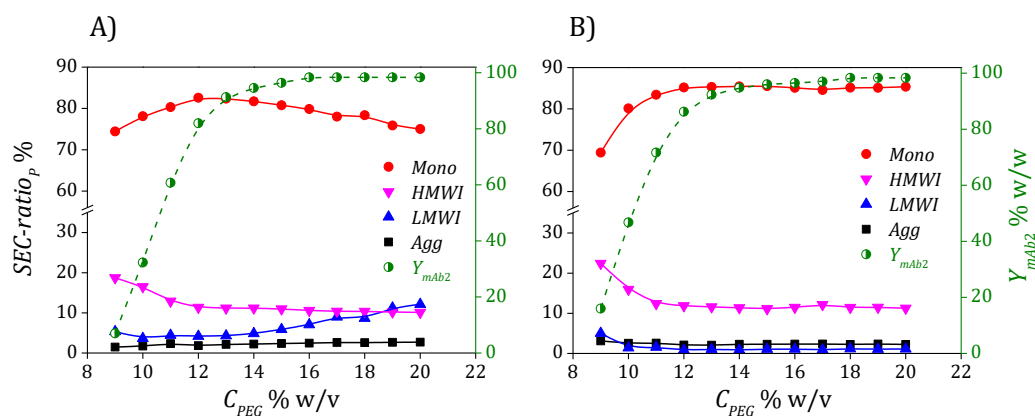


Rys. 7 Zależność rozpuszczalności *mAb2* w supernatancie ($C_{S,ovl}$) od początkowego stężenia *PEG* w roztworze (C_{PEG}) oraz siły jonowej (przewodnictwa roztworu, σ), stężenie początkowe *mAb2* w procesie $C_{ovl} = 1.4 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.2.2. Optymalizacja usuwania LMWI w PREC8

Efektywność usuwania zanieczyszczeń w *PREC8* przedstawiono na rys. 8. Podział składników mieszaniny pomiędzy frakcje wyznaczono na podstawie analizy SEC-HPLC i nazwano *SEC-ratio*. Parametr ten liczony był jako udział procentowy (stosunek powierzchni pod pikiem rozdzielanego składnika do sumy powierzchni wszystkich pików na chromatogramie). Wydajność procesu Y_{mAb2} określono jako procentowy stosunek masy *mAb2* uzyskanej w oczyszczonym produkcie do masy *mAb2* dostarczonej w strumieniu wsadowym. Produktem procesu *PREC8* był osad zawierający *mAb2*.

$$Y_{mAb2} = \frac{m_{P,mAb2}}{m_{Feed,mAb2}} \quad (1)$$



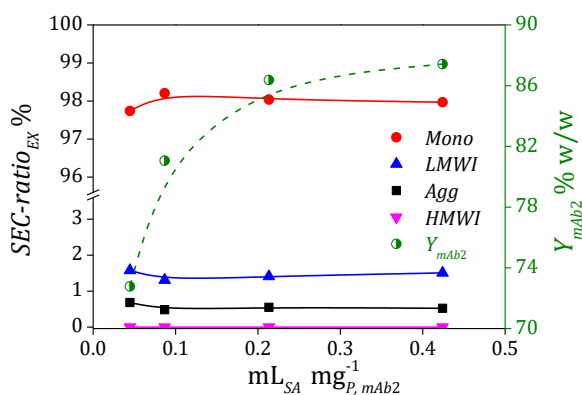
Rys. 8 Skład osadu po *PREC8*. A) Pierwszy stopień strącania z *Feed*, $\sigma = 8.5 \text{ mS cm}^{-1}$, początkowe stężenie *mAb2*, $C_{ovl} = 1.4 \text{ mg mL}^{-1}$, B) drugi stopień strącania, $\sigma = 5.04 \text{ mS cm}^{-1}$, $C_{ovl} = 1.2 \text{ mg mL}^{-1}$, *Mono* – monomery *mAb2*, *Agg* – agregaty *mAb2*.

Zawartość *mAb2* w osadzie uzyskanym po pierwszym etapie strącania (rys. 8A) osiągnęła maksimum przy $C_{PEG} = 13\% \text{ w/w}$, natomiast zawartość *LMWI* - minimum. Dalszy wzrost stężenia *PEG* powodował współstrącanie *LMWI* i wzrost ich udziału

w osadzie. Pewna część *LMWI* pochodziła z pozostałości supernatantu zawartego w mokrym osadzie *mAb2*. *HMWI* wykazywały wyższe wartości *SEC-ratio* przy zastosowaniu wartości stężenia $C_{PEG} < 13\%$ w/v, przy Y_{mAb2} w zakresie 5-60% w/w. Świadczy to o tym, że *HMWI* ulegały wytrącaniu w pierwszej kolejności. Zastosowanie drugiego stopnia strącania (rys. 8B) umożliwiło doczyszczanie materiału z *LMWI* do wartości *SEC-ratio* < 1%.

3.2.3. Usuwanie *HMWI* poprzez zastosowanie *SLE* lub *PREC5*

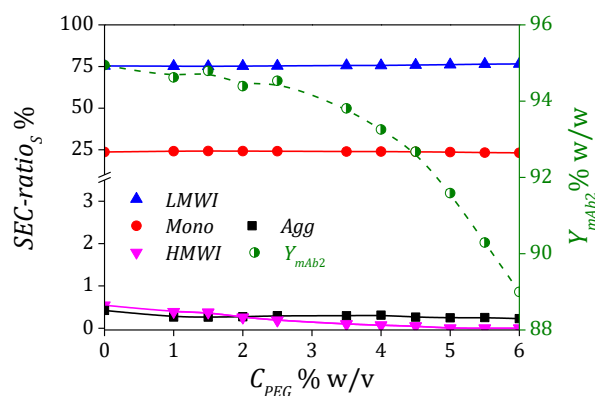
Operacja *PREC8*, pozwalała na wychwytywanie *mAb2* i usunięcie *LMWI*. Niestety produkt po procesie nadal zawierał spore ilości zanieczyszczeń w postaci *DNA*, *HCP* oraz przede wszystkim *HMWI*. W związku z tym zaproponowano dwie metody eliminacji *HMWI* z półproduktu *mAb2*. Obie metody opierały się na obniżeniu pH roztworu. Pierwszym podejściem była ekstrakcja *mAb2* z osadu po *PREC8* buforem octanowym (*SA*) o pH 5.0. Jak przedstawiono w poprzednich pracach [Rumanek i in., 2022, Rumanek i in., 2024a, Zimoch, Rumanek i in., 2023], *mAb2* wykazuje wysoką rozpuszczalność w niskich pH, gdzie *HMWI* pozostają prawie nierozpuszczalne. Efektywność oraz wydajność *SLE* w dużej mierze zależała od ilości użytego buforu co przedstawiono na rys. 9.



Rys. 9 Efektywność *SLE* (po pierwszym stopniu *PREC8*) w pH 5.0 w zależności od ilości użytego buforu wyrażonej w mL *SA* na mg *mAb2* w osadzie.

Jak wynika z danych przedstawionych na rys. 9 *HMWI* pozostają nierozpuszczone w osadzie niezależnie od ilości buforu użytego do ekstrakcji. Operacja *SLE* pozwoliła również na efektywne usunięcie *DNA* z oczyszczanego materiału nawet do wartości na poziomie 12 ng mL^{-1} oraz *HCP* do poziomu $0.08 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (tabela 3). Wydajność procesu osiągała optimum przy zastosowaniu 0.2 mL SA na mg *mAb2* w osadzie, na poziomie $Y_{mAb} = 87\%$ w/w. Wydajność *SLE* może być poprawiona poprzez zastosowanie kolejnego stopnia, co przedstawiono w tabeli 3.

W podejściu alternatywnym *HMWI* było strącanie w pH 5.0. W warunkach takich *HMWI* oraz *Agg* ulegały wytrąceniu, natomiast *mAb2* pozostawało rozpuszczone w supernatancie. Etap ten prowadzono bezpośrednio z roztworu pochodowlanego CHO poprzez obniżenie pH z użyciem 1 M HCl. Efektywność wytrącania *HMWI* ulegała poprawie przy zastosowaniu niewielkiego dodatku precypitantu, skuteczność redukcji zawartości *HMWI* w roztworze pochodowlanym oraz wydajności procesu w funkcji stężenia *PEG* zobrazowano na rys. 10.



Rys. 10 Zależność zawartości składu supernatantu ($SEC-ratio_s$) oraz wydajności procesu (Y_{mAb2}) w funkcji stężenia *PEG* (C_{PEG}).

W trakcie *PREC5* możliwe było zredukowanie zawartości *HMWI* w supernatancie do wartości ok. 0.05% przy $C_{PEG} = 5\%$ w/v. Wydajność procesu wynosiła 91.5% w/w. Niższe wartości stężenia precypitantu niż 5% nie pozwalały na skuteczne oddzielenie *HMWI* od materiału, natomiast przy $C_{PEG} > 5\%$ następował znaczący spadek Y_{mAb2} .

Obie ścieżki prowadzenia procesu pozwalają na wydajne oraz efektywne oczyszczanie materiału z *HMWI*, jednak opcja *PREC8-SLE* jest prostsza do wykonania ponieważ, zastosowanie *SLE*, nie wymaga zmiany pH buforu procesowego, natomiast w przypadku *PREC5* do zmiany takiej dochodzi dwukrotnie. Dodatek 1M HCl oraz 1M NaOH w celu regulacji pH generuje ponadto problemy związane z zachowaniem siły jonowej mieszaniny procesowej na stałym poziomie, która maleje wraz z rozcieńczaniem roztworu pomiędzy kolejnymi etapami strącania. Proces *PREC8-SLE* charakteryzuje się również większą skutecznością w usuwaniu DNA oraz HCP co przedstawiono w tabeli 3.

3.2.4. Oczyszczanie i izolacja *mAb2* z mieszaniny pochodowlanej CHO – podsumowanie

Opracowany proces izolacji oraz oczyszczanie *mAb2* z wykorzystaniem dwóch alternatywnych ścieżek: *PREC8-SLE* oraz *PREC5-PREC8* zweryfikowano doświadczalnie. Dodatkowo dla procesu *PREC8-SLE* wykonano eksperymenty w dwóch różnych

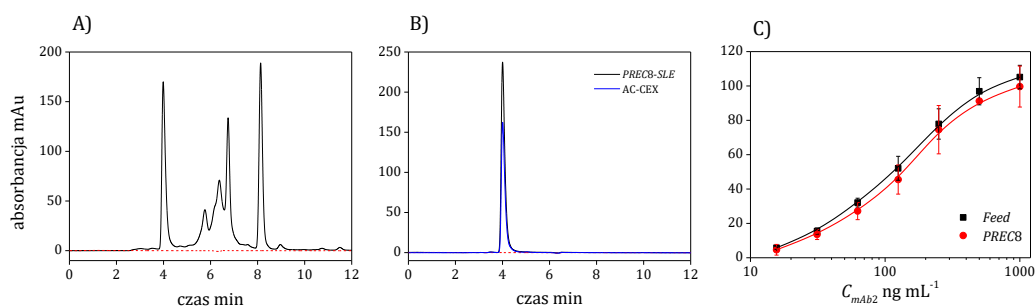
objętościach 4 mL (mała skala lab.) oraz 200 mL (duża skala lab.). Procesy przeanalizowano pod względem wydajności, czystości oraz stabilności *mAb2*. Wyniki zawarto w tabeli 3 oraz na rys. 11.

Tabela 3 Wyniki oczyszczania *mAb2* w procesach *PREC8-SLE* oraz *PREC5-PREC8*.

	<i>j</i>	<i>C_{j,ovl}</i> mg mL ⁻¹	<i>Y_{mAb2}</i> %w/w	<i>SEC-ratio, %</i>				<i>C_{i,DNA}</i> ng mL ⁻¹	<i>C_{j,HCP}</i> µg mL ⁻¹
				<i>mAb2</i>		<i>imp</i>			
				<i>Agg</i>	<i>Mono</i>	<i>LMWI</i>	<i>HMWI</i>		
<i>PREC5+PREC8</i> mała skala lab.	<i>P2</i>	6.5	77.0	1.95	96.83	0.51	0.71	1203±12	125±5
<i>PREC8+SLE</i> mała skala lab.	<i>EX1</i>	9.2	70.9	0.62	99.38	0.00	0.00	23 ± 3	0.15±0.02
	<i>EX1+EX2</i>	4.9	76.7	0.59	99.41	0.00	0.00	12± 1.7	0.08±0.01
<i>PREC8+SLE</i> duża skala lab.	<i>EX1</i>	23.4	66.1	0.37	99.12	0.51	0.00	15 ± 1.1	0.14±0.01
	<i>EX1+EX2</i>	19.5	73.5	0.35	99.09	0.56	0.00	12± 0.8	0.07±0.01

Analizując wyniki zamieszczone w tabeli 3 stwierdzono, że w obu ścieżkach osiągnięta wydajność była na zbliżonym poziomie. Czystość otrzymanego półproduktu była jednak wyższa w przypadku zastosowania *PREC8-SLE*. Zastosowanie *PREC5* nie pozwoliło na całkowite usunięcie *HMWI* i *Agg* z roztworu procesowego, przez co część ich masy przeniesiona została do *PREC8*, a następnie do półproduktu. W przypadku *PREC8-SLE* osiągnięto również wyższą efektywność w oczyszczaniu DNA oraz HCP. Regulacje prawne dopuszczają zawartość DNA w gotowym produkcie leczniczym na poziomie 10 ng mL⁻¹ oraz HCP na poziomie 100 µg mL⁻¹.

Efektywność opracowanego procesu porównano ze standardowo stosowaną chromatografią powinowactwa. Zwykle półprodukt po chromatografii AC charakteryzuje się czystością HCP na poziomie 900 µg mL⁻¹. Proces *PREC8-SLE* osiągnął czystość produktu leczniczego w przypadku HCP oraz zbliżył się do niej w przypadku DNA bez konieczności stosowania dodatkowych etapów doczyszczania. Zarówno proces strącania jak i *SLE* wykazują szybką kinetykę. Stężenie równowagowe osiągnięte było już po ok. 20 min, przez co cały proces trwał do 2h. W przypadku chromatografii cykle oczyszczania muszą być poprzedzane etapami równoważenia kolumny oraz zakończone etapami jej dezaktywacji, przez co często etap wychwytu *mAbs* z harvestu może trwać nawet do kilku dni. Kolejną zaletą przedstawionych procesów strącania jest łatwość w przenoszeniu skali. Zwiększenie skali z 4 mL na 200 mL nie wpłynęło na efektywność procesu i nie generowało trudności w jego prowadzeniu. Zarówno *PREC8-SLE* jak i *PREC5-PREC8* umożliwia oczyszczenie dużej masy materiału jednocześnie i w krótkim czasie. W przypadku chromatografii AC skalę procesu ogranicza objętość kolumny, dlatego pojedyncza szarża produkcyjna z USP dzielona jest na kilka szarż chromatograficznych.



Rys. 11 Ilustracja wyników badania czystości oraz stabilności *mAb2* po procesie *PREC8-SLE*. Chromatogramy SEC-HPLC uzyskane dla: A) roztworu pochodowlanego CHO (*Feed*), B) półproduktu po oczyszczaniu *mAb2* za pomocą *PREC8-SLE* oraz standardu *mAb2* dostarczonego przez producenta, C) porównanie stabilności *mAb2* przed i po procesie *PREC8* z wykorzystaniem standardowej metody ELISA.

Czystość chromatograficzna *mAb2* uzyskanego po *PREC8-SLE* była porównywalna do czystości materiału referencyjnego dostarczonego przez producenta (rys. 11B). Badania nad stabilnością *mAb2*, wykazały niewielki jej spadek, jednak jego wartości mieściły się w zakresie błędów pomiarowych (rys. 11C).

3.3. Selektywne strącanie wariantów kwasowych z puli *mAbs*

[Rumanek i in., 2022] Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2022).

Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Biotechnol Bioeng.*, 120, 114-124. **Impact Factor = 3.5**

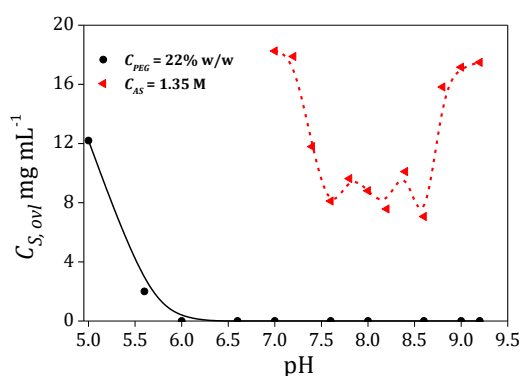
W publikacji przedstawiono wstępne wyniki badań dotyczące zastosowania strącania do usuwania wariantów kwasowych z materiału *mAb2* oraz *mAb3* (IgG4).

Jak wspomniano powyżej (rozdz. 2.1.4.), bardzo często nadmiar *av* w produkcji farmaceutycznym jest niepożądany.

Prace doświadczalne rozpoczęto od określenia wpływu na przebieg procesu parametrów operacyjnych takich jak: rodzaj i zakres stężenia precypitantu (*PEG*), wyjściowe stężenie białka oraz pH roztworu. Wyznaczono zależności uwzględniając wpływ tych parametrów na selektywność procesu. Dla optymalnych wartości parametrów operacyjnych zrealizowano proces selektywnego strącania wariantów kwasowych *mAb2* i *mAb3*. Opracowano proces krzyżowego strącania wielostopniowego (*CsMP*), który pozwolił na redukcję wariantów kwasowych w materiale wsadowym do założonego poziomu.

3.3.1. Dobór parametrów operacyjnych

Jak opisano w podrozdz. 2.3.2. silny wpływ na rozpuszczalność białek wywiera zależność wartości pI danego białka oraz pH roztworu procesowego. Punkt izoelektryczny wariantów ładunkowych badanego *mAb2* mieścił się w zakresie 8.7 – 9.1. Przeprowadzono badanie rozpuszczalności *mAb2* przy zmiennym pH w zakresie od pH 5.0 do pH 9.2. Jako precypitant wykorzystano PEG 3.35 o stężeniu 22% w/v oraz AS o stężeniu 1.35 M. Wyjściowe stężenie *mAb2* w procesie, C_{ovl} wynosiło 18 mg mL⁻¹. Zależność rozpuszczalności *mAb2* od pH i rodzaju precypitantu przedstawiono na rys. 12.



Rys. 12 Całkowita rozpuszczalność *mAb2* w roztworze PEG 3.35 oraz AS w funkcji pH. Linie na wykresie wskazują całkowite stężenie białka w supernatancie ($C_{S,ovl}$).

Jak wynika z danych przedstawionych na rys. 12 zarówno w przypadku PEG 3.35 jak i AS, rozpuszczalność *mAb2* była najmniej zależna od pH, a zarazem najniższa w zakresie pH zbliżonym do pI białka. Im bardziej wartości pH oddalały się od pI *mAb2* tym bardziej rosła wartość jego rozpuszczalności, osiągając w badanym zakresie maksymalne 18 mg mL⁻¹, gdzie poziom przesylenia *mAb2* w roztworze był zbyt niski do skutecznego strącania.

Podział wariantów *mAb2* pomiędzy supernatantem oraz osadem określono za pomocą analizy CEX-HPLC. Zawartość wariantu v ($v = av, mv, bv$) w badanym materiale wyrażono za pomocą zredukowanego ułamka masowego $U\%$ w/w (nie uwzględnia roztworu), zdefiniowanego równaniem (2):

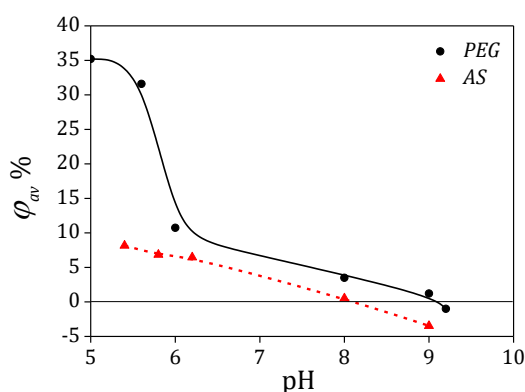
$$U_{Feed,v} = \frac{m_{Feed,v}}{m_{Feed,ovl}}, U_{S,v} = \frac{m_{S,v}}{m_{S,ovl}}, U_{P,v} = \frac{m_{P,v}}{m_{P,ovl}} \quad (2)$$

gdzie $m_{Feed,ovl}$, $m_{S,ovl}$, $m_{P,ovl}$, to całkowita masa *mAbs* (suma wszystkich wariantów) odpowiednio w roztworze wsadowym (*Feed*), supernatancie (*S*) oraz osadzie (*P*), $m_{Feed,v}$, $m_{S,v}$, $m_{P,v}$ to masa wariantu v w danej frakcji.

Stwierdzono, że strącanie przy pH zbliżonym do pI *mAb2* nie było selektywne, a składy *Feed* (materiału wsadowego), *S* (supernatantu) oraz *P* (osadu) wykazywały zbliżone wartości. Przy zastosowaniu pH poniżej dolnej granicy pI następowało preferencyjne wytrącanie wariantów kwasowych, przez co ich udział w *S* był niższy niż w materiale wsadowym *Feed*. Efekt odwrotny uzyskano stosując pH o wartościach wyższych niż pI (pH > 8.5-9.0), udział *av* w *S* był niższy niż w *Feed* oraz *P*. Zmianę tą wyrażono poprzez współczynnik względnej redukcji *av*, φ_{av} , zdefiniowany równaniem (3) oraz przedstawiono na rys. 13.

$$\varphi_{av} = \frac{U_{Feed,av} - U_{S,av}}{U_{Feed,av}} 100\% \quad (3)$$

gdzie φ_{av} to współczynnik względnej redukcji *av*, $U_{Feed,av}$, $U_{S,av}$ to zredukowany ułamek masowy % w/w wariantu kwasowego odpowiednio w materiale wsadowym oraz supernatancie.

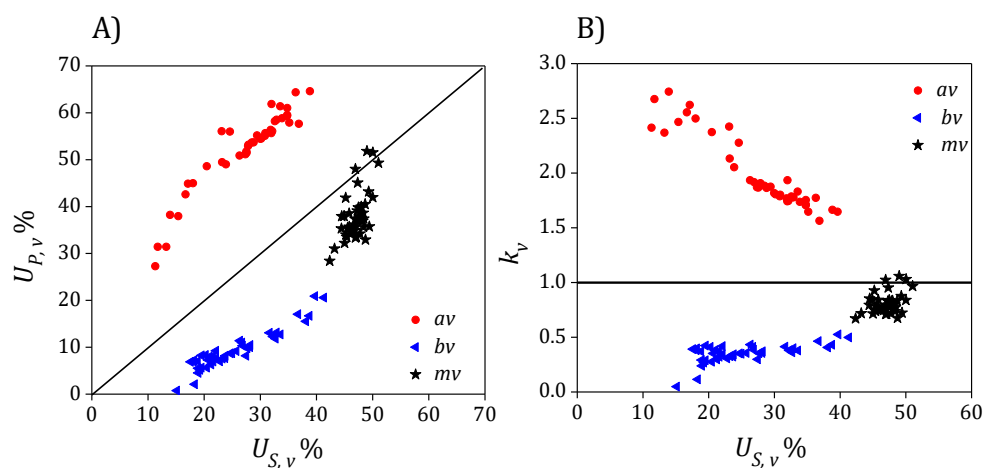


Rys. 13 Względna redukcja *av* w supernatancie, *S* po strącaniu, w funkcji pH. Strącanie prowadzono przy PEG 3.35 oraz AS, wydajność procesów utrzymywano na poziomie $Y \approx 50\%$ w/w, skład wariantów w roztworze wsadowym (*Feed*) wynosił: 42.0% *av*, 39.1% *mv*, 18.0% *bv* oraz 0.9% *Agg* w/w.

Dla niskiej wartości siły jonowej oraz niskiego pH roztworu, ładunek *mAbs* jest duży, co wywołuje silne oddziaływania elektrostatyczne między cząsteczkami. Warianty *mAbs* posiadają jednak różne ładunki przez co ich siły oddziaływań elektrostatycznych nie są jednakowe. Ponieważ w pH 5.0 warianty kwasowe posiadają najniższy wypadkowy ładunek, wykazują najmniejszą siłę odpychania międzycząsteczkowego, dlatego są bardziej podatne na hydrofobowe oddziaływania przyciągające, przez co ulegają strącaniu łatwiej niż warianty obojętne oraz zasadowe. Odwrócenie selektywności następuje, gdy pH roztworu jest wyższe niż pI wariantów. Wówczas to warianty zasadowe mają najniższy ładunek i są najbardziej podatne na wytrącanie.

PEG jest bardziej skuteczny w selektywnym wytrącaniu wariantów *mAbs*, ponieważ strącanie może być prowadzone przy niskich wartościach siły jonowej w roztworze. Stężone roztwory jonów soli ekranują ładunki wariantów, przez co zmniejszają różnicę wartości ładunku pomiędzy nimi, co zmniejsza selektywność rozdzielania.

Podział wariantów pomiędzy fazami określono również na podstawie szeregu eksperymentów, w których proces prowadzono przy zmiennych wartościach stężenia białka w *Feed* w zakresie od 7-35 mg mL⁻¹ i składu wariantów w materiale wsadowym. Dystrybucję wariantów pomiędzy fazami przedstawiono na rys. 14.



Rys. 14 Dystrybucja każdego *v*-tego wariantu pomiędzy supernatantem oraz osadem wyrażona jako A) jako zależność $U_{P,v}$ w funkcji $U_{S,v}$, B) jako zależność k_v w funkcji $U_{S,v}$.

Skład wariantów został przedstawiony jako zredukowany ułamek masowy wariantu *v* w osadzie ($U_{P,v}$) do zredukowanego ułamka masowego wariantu (*v*) w supernatancie ($U_{S,v}$, rys. 14A). Rys. 14B przedstawia zależność podziału dla każdego wariantu i wyrażony jest przez stosunek $U_{S,v}$ do współczynnika k_v :

$$k_v = \frac{U_{P,v}}{U_{S,v}} \quad (4)$$

Na podstawie wyników przedstawionych na rys.14A można stwierdzić, że podział *av* i *bv* pomiędzy fazy jest przeciwny, *av* jest wzbogacany w osadzie natomiast *bv* w supernatancie. Dystrybucja *mv* jest zlokalizowana blisko przekątnej kwadratu z bardzo niewielkim nadmiarem w jego zawartości w fazie stałej. Badania wykazały, że rozpuszczalność białka była niezależna od składu wariantów, przez co ubytek *av* w supernatancie był równoważony głównie przez jego wzbogacenie w *bv*. Obserwowana wymiana zawartości wariantów różniących się ładunkiem potwierdza, że oddziaływania elektrostatyczne znacząco determinują mechanizm podziału wariantów pomiędzy

fazami. Analizując rys. 14B można stwierdzić, że dla każdego wariantu współczynnik podziału dąży do 1 wraz ze wzrostem jego zawartości w supernatancie, oznacza to pogorszenie selektywności separacji i wydajności procesu.

3.3.2. Zależność wydajności od stopnia redukcji av

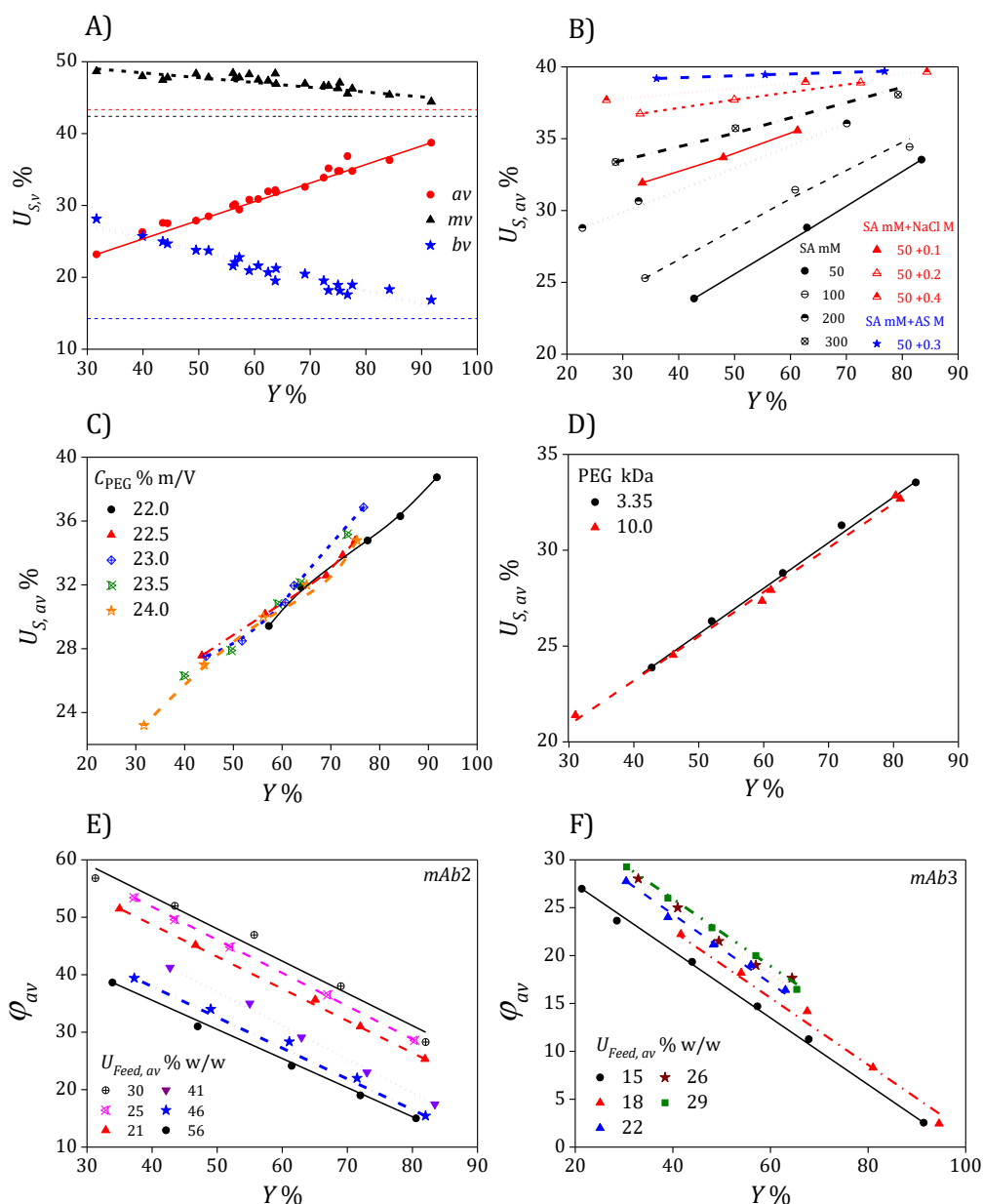
Analiza danych dotyczących równowagi oraz podziału międzyfazowego wariantów $mAbs$ potwierdziły możliwość zastosowania strącania z wykorzystaniem PEG do usuwania wariantów kwasowych z materiału mAb .

Kolejnym etapem badań było wyznaczenie wpływu parametrów operacyjnych na przebieg procesu i jego wydajność. Dane umieszczone na rys. 15A przedstawiają zależność pomiędzy względnym udziałem wariantów: av , mv oraz bv w supernatancie po procesie strącania a wydajnością procesu. Ponieważ av został uznany za jedyny wariant wymagający częściowego usunięcia (odpad technologii), wydajność operacji została określona jako stosunek masy wariantów mv i bv w produkcie do ich mas w roztworze wsadowym.

$$Y = \frac{m_{s,mv} + m_{s,bv}}{m_{Feed,mv} + m_{Feed,bv}} 100\% \quad (5)$$

Funkcja przedstawiona na rys. 15A jest rodzajem wykresu Pareto prezentującego wzajemną zależność dwóch sprzecznych wskaźników efektywności procesu, gdzie redukcja av w supernatancie osiągnana jest kosztem zmniejszenia wydajności i odwrotnie. Poziome linie przerywane na wykresie (rys. 15A) oznaczają wyjściowy skład wariantów w roztworze wsadowym $U_{Feed,v}$. Redukcja wariantu av w supernatancie odbywa się kosztem wzbogacenia go głównie w bv oraz w mniejszym stopniu w mv . Uzyskana zależność może być wykorzystywana do projektowania procesu, ponieważ pozwala znaleźć kompromis pomiędzy selektywnością, a wydajnością rozdzielania wariantów mAb . Selektywność procesu maleje wraz ze wzrostem siły jonowej buforu co przedstawia rys. 15B. Najwyższą redukcję zawartości av osiągnięto stosując 50 mM SA o przewodnictwie ok. $\sigma = 3.5 \text{ mS cm}^{-1}$, obniżanie siły jonowej poniżej tej wartości powodowało powstawanie żelu – fazy pośredniej pomiędzy roztworem a osadem.

Efektywność redukcji av była niezależna od stężenia i rodzaju stosowanego PEG ; badania prowadzone przy zmiennym stężeniu C_{PEG} (rys. 15C), przy zmiennej masie molowej oraz długości łańcucha (rys. 15D) PEG dały podobne wyniki. Parametry te mogą mieć znaczenie przy określaniu kosztów procesu, jednak nie wpływają na mechanizm rozdzielania wariantów.



Rys. 15 Zmiany składu wariantów w funkcji wydajności procesu; A) dla każdego rodzaju wariantu przy strącaniu PEG 3.35 kDa, C_{PEG} w zakresie 22-24% w/v oraz C_{ovl} w zakresie 36-7.5 mg mL⁻¹, wyjściowy skład wariantów w *Feed* wnosił 42% *av*, 39.1% *mv*, 18.0% *bv*, 0.9% *Agg* w/w; B) redukcja *av* przy różnej sile jonowej oraz $C_{PEG} = 23.5\%$ w/v, wartości stężenia oraz skład *mAb2* jak w (A); C) redukcja *av* w *mAb2* dla PEG 3.35 w zakresie wartości stężenia 22-24%; D) redukcja *av* przy zastosowaniu PEG 3.35 kDa o wartości stężenia 23.5% w/v oraz PEG 10 kDa o wartości stężenia 10.5% w/v; E) względna redukcja *av* *mAb2* w funkcji wydajności procesu dla różnego $U_{Feed,av}$; F) względna redukcja *av* *mAb3* w funkcji wydajności procesu dla różnego $U_{Feed,av}$.

Na przebieg zależności Pareto wpływał początkowy udział wariantów *mAb2* w materiale wsadowym. Badania prowadzone w szerokim zakresie wartości $U_{Feed,av}$ wykazały, że wraz ze zmniejszającym się $U_{Feed,av}$ wzrasta współczynnik względnej redukcji *av* w supernatancie. Po osiągnięciu wartości $U_{Feed,av} = 30\%$ w/w zależność ta się odwraca.

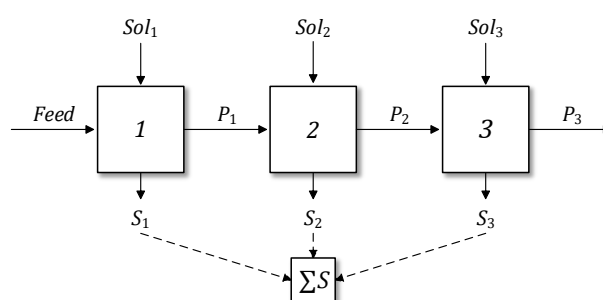
Analogiczne badania przeprowadzono dla innego przeciwciała *mAb3* i przedstawiono na rys. 15F. Dały one podobne wyniki, jednak materiał wsadowy *mAb3* w tym przypadku miał o wiele bardziej zbliżony skład, przez co linie na wykresie nakładają się.

Zaobserwowany trend może być wyjaśniony przez wspomnianą wcześniej zależność współczynnika podziału od zawartości *av* w przetwarzanych roztworach (rys. 14B). Powoduje to, że efektywność procesu wyrażona jako wydajność operacyjna, jest wyższa dla puli *mAbs* o niższej zawartości *av*.

3.3.3. Krzyżowe, wielostopniowe strącanie wariantów *mAb2 CsMP*

Jak pokazano na rys. 13 oraz 15 selektywne strącanie *av* jest najbardziej efektywne przy wykorzystaniu *PEG* jako precypitantu, przy niskich wartościach pH oraz przy niskiej sile jonowej roztworu. Wydajność procesu zależy od selektywności rozdzielania oraz składu wariantów w materiale wsadowym, *Feed*. Dla materiału o $U_{Feed,av} = 42\%$ w/w możliwe jest zredukowanie zawartości *av* w supernatancie do wartości $U_{S,av} = 32\%$ w/w przy wydajności $Y = 65\%$ w/w w jednym stopniu strącania.

Poprawa wydajności jest możliwa przy zastosowaniu strącania wielostopniowego. W tej pracy zaprojektowano trójstopniowe ($i = 3$) strącanie krzyżowe (*CsMP*), w którym do procesu zawracany jest osad wzbogacony w *av* natomiast produkt stanowi supernatant uzyskany na wszystkich stopniach procesu (ΣS). Schemat trójstopniowego strącania krzyżowego przedstawiono na rys. 16, natomiast wydajność oraz selektywność zebrano w tabeli 4.



Rys. 16 Schemat 3 – stopniowego, selektywnego, krzyżowego strącania wariantów ładunkowych *mAb2*, *CsMP*, Sol_i – roztwór precypitantu, ΣS – połączony supernatant stopnia 1-3.

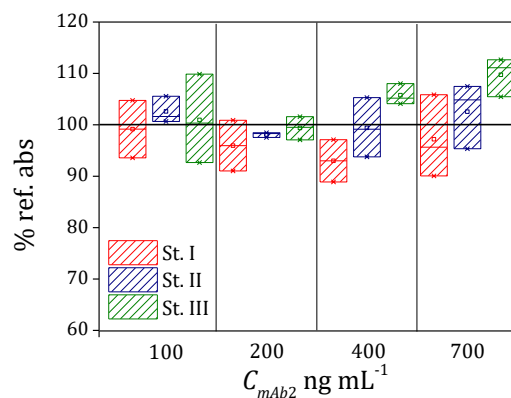
Tabela 4. Efektywność trójstopniowego *CsMP* dla $U_{Feed,v}$: 42.0 *av*, 39.1 *mv*, 18.0 *bv* % w/w oraz $U_{Feed,Agg}$ = 0.9% w/w.

Stopień	$U_{S,i,v}$ % w/w			$U_{P,i,v}$ % w/w			$U_{S,i,Agg}$	Y
	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	% w/w	% w/w
I	27.4	45.8	26.8	51.2	38.6	10.2	0.34	48.6
II	32.0	48.7	19.3	60.1	36.2	3.70	0.37	49.8
III	43.8	49.7	6.50	68.6	27.2	4.22	0.37	51.0
ΣS	31.9	47.4	20.7					87.2

Zaproponowany proces *CsMP* umożliwił redukcję wariantów z 42% w roztworze wsadowym do 32% w/w w połączonym supernatancie ΣS , przy wydajności $Y = 87.2\%$ w/w. Materiałem wsadowym stopnia *i*, był osad stopnia poprzedniego *i* - 1 wzbogacony w *av*, przez co udział *av* w kolejnych stopniach wzrastał, a efektywność procesu malała. Każdy kolejny stopień pozwalał jednak przenosić pewną część masy *mAb2* do supernatantu dzięki czemu z każdym kolejnym stopniem podwyższano całkowitą wydajność procesową. Optymalizacja procesu oparta o zależności opisane na rys. 15 umożliwia poprawę Y przy zachowaniu pożądanej zawartości $U_{S,av}$.

Dodatkową zaletą procesu jest obniżenie udziału agregatów w produkcie. $U_{Feed,Agg}$ wynosił 0.9% w/w i został zredukowany z do wartości 0.34 - 0.37%w/w w produkcie.

Aktywność rozdzielanego *mAb2* na poszczególnych stopniach strącania określono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA i przedstawiono na rys. 17. Wartość sygnału absorbancji supernatantu po strączeniu porównano do referencyjnej wartości sygnału roztworu wsadowego (*Feed*). Na każdym stopniu strącania aktywność *mAb2* była zbliżona do wartości materiału wsadowego i wahała się w granicach $100 \pm 10\%$. Oznacza to, że *mAb2* zachowuje swoją natywną strukturę oraz właściwości biologiczne w trakcie trwania całego procesu.



Rys. 17 Aktywność *mAb2* w produktach strącania dla stopni 1 – 3 gdzie 100% to aktywność materiału referencyjnego.

3.4. Przeciwprądowe, wielostopniowe strącanie wariantów ładunkowych *mAb2 CnMP* wspomagane modelowaniem komputerowym

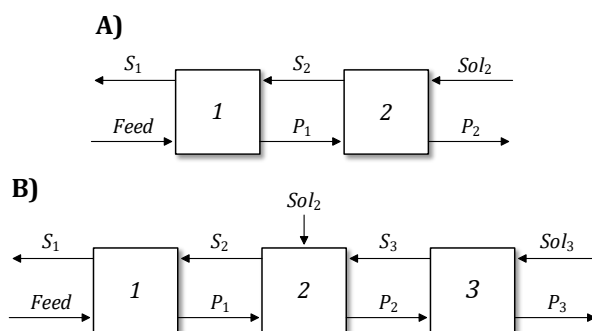
[Rumanek i in., 2024a] Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024a).

Countercurrent preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools, *Chem Eng Res Des*, 202, 336–345. **Impact Factor = 3.7**

Badania opisane w niniejszej publikacji stanowiły kontynuację badań przeprowadzonych i opisanych w rozdz. 3.3. oraz publikacji [Rumanek i in. 2022]. W tej części pracy opracowano proces przeciwprądowego wieloetapowego selektywnego strącania (*CnMP*) wariantów *av* z materiału *mAb2*. Aby zaprojektować proces opracowano model matematyczny, który składał się z równań bilansu masy w stanie ustalonym oraz podstawowych zależności termodynamicznych opisanych w rozdz. 3.3. Model ten został rozwiązany dla różnych kombinacji parametrów procesowych, w tym stężenia białka w materiale wsadowym oraz stężenia *PEG* w kolejnych stopniach strącania. Koncepcja procesu została zweryfikowana eksperymentalnie; procesy *CnMP* w układzie dwu oraz trójstopniowym zostały przeprowadzone przy użyciu zmiennych procesowych wyznaczonych przez rozwiązanie modelu. Wskaźniki wydajności obliczone przez model i zmierzone eksperymentalnie były podobne, co wskazywało zarówno na wykonalność jak i predykcyjność procesu *CnMP*.

3.4.1. Bilans masy, zależności termodynamiczne oraz połączenie strumieni procesowych

Na podstawie wyników przeprowadzonych cykli symulacji komputerowych oraz badań opisanych w poprzednim rozdz. zaprojektowano dwu- i trójstopniowy proces przeciwwądnego strącania wariantów ładunkowych (*CnMP*). Schemat procesu przedstawiono na rys. 18. W *CnMP* *Feed* oraz osady uzyskane w kolejnych stopniach podawane były przeciwwądnym w stosunku do roztworu zawierającego precypitant (*Sol*) oraz supernatantów (*S*). Jeżeli kaskada procesów składa się z większej ilości stopni niż 2, to stężenie *PEG* na stopniach pośrednich utrzymywane było poprzez dodatkowy strumień zasilający *Soli*. Układ taki pozwalał na ponowne zawrócenie do procesu zarówno *S* jak i *P*, przez co przenoszenie masy w procesie *CnMP* było bardziej efektywne niż w układzie krzyżowym. Produkt ubogi w *av* odbierany był w supernatancie stopnia pierwszego (*S*₁), natomiast odpad bogaty w *av* w osadzie stopnia ostatniego (*P*₂ lub *P*₃).



Rys. 18 Schemat procesu *CnMP*, A) dwustopniowy, B) trójstopniowy.

Proces *CnMP* opisano modelem matematycznym, który składał się z równań bilansu masy oraz odpowiednich zależności termodynamicznych białka. Zależności te wyznaczono w poprzednich badaniach dla procesu strącania jednostopniowego [Rumanek i in., 2022, Zimoch, Rumanek i in., 2023].

Poszczególne równania modelu przedstawiono poniżej:

Całkowity bilans masy:

$$m_{S,i+1} + m_{P,i-1} + m_{Sol,i} = m_{S,i} + m_{P,i} \quad (6)$$

gdzie *i*, *i*+1, *i*-1, oznaczają kolejno: *i*-ty stopień, stopień następny oraz stopień poprzedni, przy czym $m_{P,0} = m_{Feed}$, a $m_{Sol,1} = 0$.

Bilans masy białka dla wszystkich wariantów *mAb*2:

$$m_{S,i+1,ovl} + m_{P,i-1,ovl} = m_{S,i,ovl} + m_{P,i,ovl} \quad (7)$$

Bilans masy wariantu *av*:

$$m_{S,i+1,ovl} U_{S,i+1,av} + m_{P,i-1,ovl} U_{P,i-1,av} = m_{S,i,ovl} U_{S,i,av} + m_{P,i,ovl} U_{P,i,av} \quad (8)$$

W modelu bilansowano jedynie warianty kwasowe, uznając sumę zawartości pozostałych wariantów *mAb2* za produkt procesu.

Bilans masy *PEG* w strumieniach wlotowych oraz wylotowych:

$$m_{S,i+1,PEG} + m_{P,i-1,PEG} + m_{Sol,i,PEG} = m_{S,i,PEG} + m_{P,i,PEG} \quad (9)$$

Całkowita masa białka w *i*-tym stopniu jest obliczana według wzoru:

$$m_{j,i,ovl} = m_{j,i} \frac{C_{j,i,ovl}}{d_{j,i}} \quad j = S, P \quad (10)$$

Masa *PEG* w *i*-tym stopniu:

$$m_{j,i,PEG} = m_{j,i} \frac{C_{j,i,PEG}}{d_{j,i}} \quad j = S, P, Sol \quad (11)$$

Zredukowany udział wariantów kwasowych we frakcji *j*, w *i*-tym stopniu:

$$U_{j,i,av} = \frac{m_{j,i,av}}{m_{j,i,ovl}} \quad j = S, P \quad (12)$$

Zredukowany udział wariantów kwasowych w *i*-tym stopniu (dotyczy składu wariantów w mieszaninie procesowej powstałej po zmieszaniu strumieni przeciwpływających):

$$U_{i,av} = \frac{m_{S,i+1,ovl} U_{S,i+1,av} + m_{P,i-1,ovl} U_{P,i-1,av}}{m_{S,i+1,ovl} + m_{P,i-1,ovl}} \quad (13)$$

Zredukowany ułamek wariantu kwasowego w supernatancie $U_{S,av}$:

$$U_{S,i,av} = a_i \beta_{i,ovl} + b_i \quad (14)$$

$$\beta_{i,ovl} = \frac{C_{S,i,ovl}}{C_{i,ovl}} \quad (15)$$

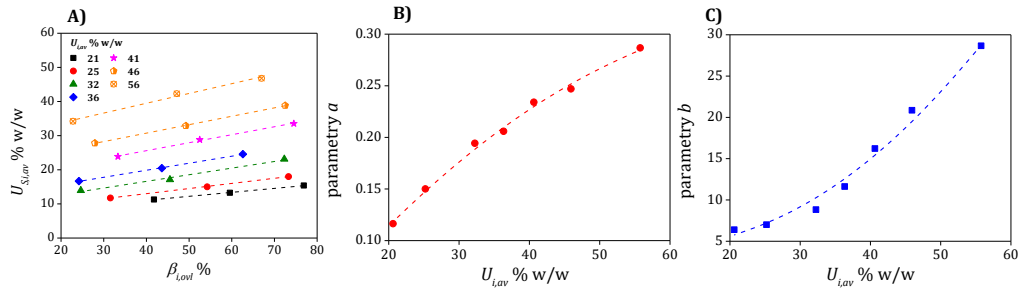
gdzie $C_{i,ovl}$ jest całkowitym stężeniem białka w *i*-tym stopniu, a_i oraz b_i są współczynnikami empirycznymi skorelowanymi z całkowitą zawartością *av* w *i*-tym stopniu ($U_{i,av}$) w następujący sposób:

$$a_i = -0.567 U_{i,av}^2 + 0.905 U_{i,av} - 0.044 \quad (16)$$

$$b_i = 1.167 U_{i,av}^2 - 0.236 U_{i,av} + 0.057 \quad (17)$$

Zredukowany ułamek wariantu kwasowego w supernatancie $U_{S,av}$ został skorelowany ze współczynnikiem redukcji całkowitego stężenia białka w *i*-tym stopniu, $\beta_{i,ovl}$ (rys. 19A).

Wartości parametrów równań (14-17) przedstawiono na rys. 19B-C. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie funkcji $U_{S,i,av} = f(\beta_{i,ovl})$ dla materiału o dowolnym udziale av w mieszaninie procesowej ($U_{i,av}$).



Rys. 19 Dane równowagowe wytrącania wykorzystywane do określania zależności termodynamicznych (14-17) w modelu; A) zależność zredukowanego ułamka masowego wariantu av w supernatancie od współczynnika redukcji całkowitego stężenia białka w roztworze, B) zależność parametru a w stosunku do zredukowanego ułamka masowego av w mieszaninie procesowej i -tego etapu $U_{i,av}$, C) parametr b w funkcji $U_{i,av}$.

Wartość $C_{S,i,ovl}$ równoważna rozpuszczalności $mAb2$ w supernatancie była zależna oraz skorelowana ze stężeniem PEG w następujący sposób:

$$C_{S,i,ovl} = 1.346 C_{S,i,PEG}^2 - 70.160 C_{S,i,PEG} + 911.409 \quad (18)$$

Gęstość roztworu była skorelowana ze stężeniem PEG przez empiryczną zależność określoną eksperymentalnie:

$$d_{j,i} = 1.659 C_{j,i,PEG} + 1.002 \quad j = S, P, Sol \quad (19)$$

Na podstawie zawartości supernatantu w mokrym osadzie $mAb2$ wyznaczono:

$$C_{P,i,PEG} = 0.91 C_{S,i,PEG} \quad (20)$$

$$C_{P,i,ovl} = 90.91 \text{ mg mL}^{-1} \quad (21)$$

gdzie: $C_{P,i,ovl}$ oraz $C_{P,i,PEG}$ to wartości stężeń odpowiednio $mAb2$ oraz PEG w wilgotnym osadzie $mAb2$ zawierającym pozostałości supernatantu po wirowaniu.

Model został rozwiązany za pomocą MATLAB R2022b, używając procedury f_{solve} .

Podobny model opracowano dla trójstopniowego procesu $CsMP$ opisanego w rozdz. 3.3. Równania bilansu masy zmodyfikowano dla przepływu krzyżowego i umieszczono w materiałach pomocniczych publikacji [Rumanek i in. 2024a].

3.4.2. Optymalizacja procesu

Model *CnMP* składał się z równań (6-21) spełnionych dla wszystkich stopni procesowych. Zawierał on parametry dotyczące masy i składu strumieni wejściowych oraz wyjściowych wraz z podstawowymi zależnościami termodynamicznymi.

Zbiór zmiennych decyzyjnych, które zostały użyte do optymalizacji procesu zawierał: stężenie *mAb2* w *Feed*, stężenia *PEG* w poszczególnych stopniach procesu oraz stężenie *PEG* w przeciwnieprądowym strumieniu zasilającym. Liczba parametrów optymalizacyjnych uzależniona była od liczby stopni w procesie i zestawiona w tabeli 5.

Wynik rozwiązania modelu opisano następnie wskaźnikami jakościowymi, którymi były $Y\%$ w/w oraz $\varphi_{av}\%$. Oba wskaźniki wyrażono za pomocą równań opisujących proces wielostopniowy:

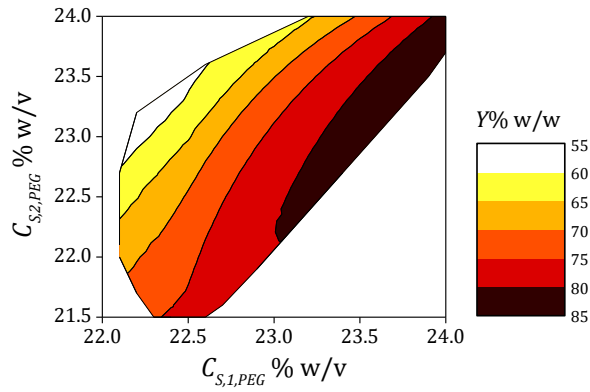
Tabela 5. Zmienne wprowadzane do modelu procesów *CsMP* oraz *CnMP*.

Zmienne procesowe dla trójstopniowego <i>CsMP</i>	
Arbitralne	$m_{Feed}, U_{Feed,av}, U_{S,1,av}$
Optymalizowane	$C_{Feed,ovl}$ od 20 do 80 z krokiem 2 mg mL ⁻¹
	$C_{S,1,PEG}, C_{S,2,PEG}, C_{S,3,PEG}$ od 20 do 24 z krokiem 0.2% w/v
	$C_{Sol,3,PEG}$ od 19 do 26 z krokiem 1% w/v
Zmienne procesowe dla dwustopniowego <i>CnMP</i>	
Arbitralne	$m_{Feed}, U_{Feed,av}, U_{S,1,av}$
Optymalizowane	$C_{Feed,ovl}$ od 30 do 70 z krokiem 2 mg mL ⁻¹
	$C_{S,1,PEG}, C_{S,2,PEG}$ od 20 do 24 z krokiem 0.1% w/v
Zmienne procesowe dla trójstopniowego <i>CnMP</i>	
Arbitralne	$m_{Feed}, U_{Feed,av}, U_{S,1,av}$
Optymalizowane	$C_{Feed,ovl}$ od 20 do 80 z krokiem 2 mg mL ⁻¹
	$C_{S,1,PEG}, C_{S,2,PEG}, C_{S,3,PEG}$ od 20 do 24 z krokiem 0.2% w/v
	$C_{Sol,3,PEG}$ od 19 do 26 z krokiem 1% w/v

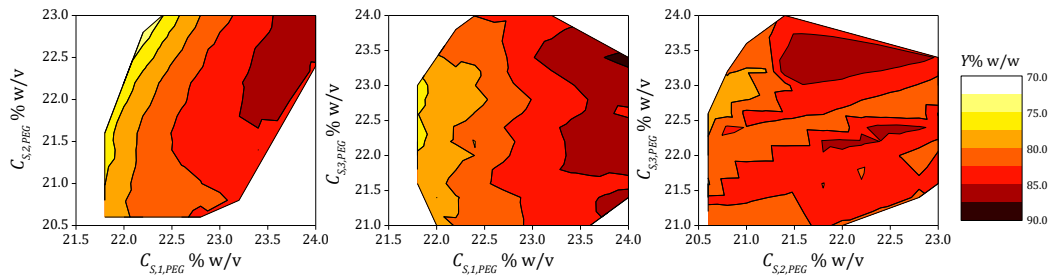
$$Y = \frac{m_{S,1,ovl} - m_{S,1,av}}{m_{Feed,ovl} - m_{Feed,av}} 100\% \quad (22)$$

$$\varphi_{av} = \frac{U_{Feed,av} - U_{S,1,av}}{U_{Feed,av}} 100\% \quad (23)$$

Model rozwiązano dla różnych kombinacji zmiennych decyzyjnych. Rys. 20 i 21 ilustrują przestrzeń operacyjną wygenerowaną dla dwustopniowego i trójstopniowego *CnMP* przy założonym poziomie względnej redukcji *av*, $\varphi_{av} = 37\%$ oraz założonej zawartości *av* w strumieniu wsadowym $U_{Feed,av} = 40\%$ w/w.



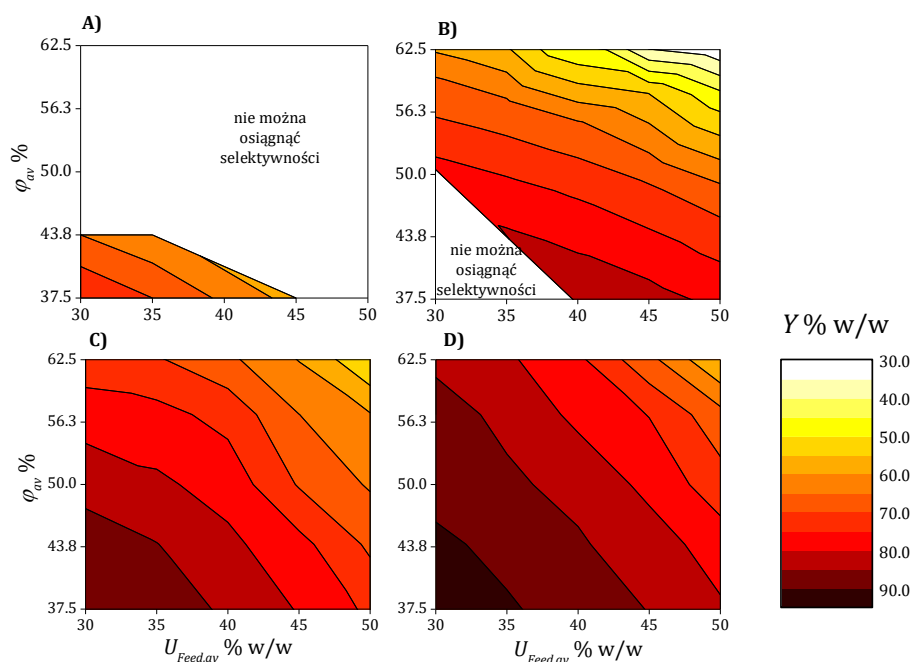
Rys. 20 Ilustracja rozwiązania modelu dla dwustopniowego *CnMP* przedstawiona na płaszczyźnie 2D dla $U_{Feed,av} = 40\% \text{ w/w}$, $\varphi_{av} = 37\%$. $C_{S,1,PEG}$ oraz $C_{S,2,PEG}$ to zmienne decyzyjne (tabela 5), Y to wydajność procesowa.



Rys. 21 Ilustracja rozwiązania modelu dla trójstopniowego *CnMP* przedstawiona na płaszczyźnie 2D dla $U_{Feed,av} = 40\% \text{ w/w}$, $\varphi_{av} = 37\%$. $C_{S,1,PEG}$, $C_{S,2,PEG}$ oraz $C_{S,3,PEG}$ to zmienne decyzyjne (tabela 5), Y to wydajność procesowa.

Wartości parametrów odczytywanych z wykresów pozwalają nie tylko określić zakres zmian parametrów decyzyjnych, przy których proces jest wykonalny, ale również ich optymalne wartości oraz maksymalną możliwą do uzyskania wydajność procesu Y .

Analogiczne serie symulacji przeprowadzono dla dwustopniowego *CnMP*, trójstopniowego *CnMP*, trójstopniowego *CsMP*, przy zmiennym $U_{Feed,av}$ oraz φ_{av} . Wyniki zestawiono na rys. 22, na którym dodatkowo porównano wyniki usuwania *av* z puli wariantów *mAb2* w chromatografii anionowymiennej *AEX* przy zastosowaniu modelu dynamicznego, opracowanego i opisanego w publikacji [Zimoch i in., 2023].



Rys. 22 Porównanie efektywności procesu separacji: A) trójstopniowe *CsMP*, B) *AEX*, C) dwustopniowe *CnMP*, D) trójstopniowe *CnMP*.

We wszystkich przedstawionych przypadkach wydajność maksymalna malała wraz ze wzrostem współczynnika względnej redukcji av (φ_{av}) oraz ze wzrostem zawartości av w strumieniu wsadowym ($U_{Feed,av}$). *CnMP* jest bardziej efektywne niż *CsMP* oraz *AEX* pod względem wydajności $Y\%$ w/w w procesie usuwania av . Okna operacyjne dla dwu i trójstopniowego *CsMP* są szersze niż w przypadku *CsMP* oraz *AEX*, co pozwala na realizację procesu w szerszym zakresie parametrów operacyjnych. W przypadku dwustopniowego *CnMP* maksymalna wydajność wynosiła 85%, a minimalna $Y = 37\%$ w/w, podczas gdy dla trójstopniowego *CnMP* wydajność wahała się między 50% a 90% w/w. Wybór między dwustopniowym a trójstopniowym *CnMP* powinien zależeć od zawartości av w strumieniu wsadowym, wymaganej wartości współczynnika względnej redukcji av oraz wydajności.

3.4.3. Weryfikacja modelu

Dokładność opracowanego modelu zweryfikowano poprzez eksperymentalną realizację dwu oraz trójstopniowego *CnMP*, a wyniki weryfikacji przedstawiono w tabeli 6 oraz 7. Procesy zaprojektowano tak, aby osiągnąć poziom zawartości av w produkcie określony przez producenta, czyli max. 25% w/w. Materiał wsadowy w procesie dwustopniowym zawierał $U_{Feed,av} = 37.5\%$ w/w oraz poziom redukcji $\varphi_{av} = 37\%$, natomiast w trójstopniowym *CnMP* użyto materiału o $U_{Feed,av} = 42\%$ w/w po czym w procesie osiągnięto $\varphi_{av} = 40\%$.

Tabela 6. Porównanie danych eksperymentalnych oraz rozwiązania modelu dla dwustopniowego *CnMP* przy $U_{Feed,av} = 37.5\%$ w/w oraz $\varphi_{av} = 37\%$.

	$U_{Feed,av}$	$U_{P,i,av}$ % w/w		$U_{S,i,av}$ % w/w		Y
	% w/w	1	2	1	2	% w/w
eksp.	37.5	46	62	24	38	78
sym.	37.5	49	69	24	42	84
błąd wzgl. %	0	5.2	9.9	0	8.9	8

Tabela 7. Porównanie danych eksperymentalnych oraz rozwiązania modelu dla trójstopniowego *CnMP* przy $U_{Feed,av} = 42\%$ w/w oraz $\varphi_{av} = 42\%$.

	$U_{Feed,av}$	$U_{P,i,av}$ % w/w			$U_{S,i,av}$ % w/w			Y
	% w/w	1	2	3	1	2	3	% w/w
eksp.	42	47	65	78	25	43	54	80
sym.	42	49	64	72	25	44	54	83
błąd wzgl. %	0	4.4	2.1	7.4	0	1.7	0	3.3

Wyniki symulacji oraz dane eksperymentalne mają zbliżone wartości co świadczy o poprawności opracowanego modelu. W pracy [Rumanek i in. 2024a] zestawiono również bilanse mas *mAb2* dla obu procesów. Zarówno bilanse masy na poszczególnych stopniach, jak i dla całego procesu były zachowane.

3.5. Połączenie procesów strącania i chromatografii w celu selektywnego rozdzielania wariantów ładunkowych *mAbs*

[Zimoch, Rumanek i in., 2023] Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2023). Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool. *J. Chromatogr. A*, 1701, 464070.

Impact Factor= 3.8

[Rumanek i in., P2022] Rumanek T., Zimoch P., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (P2022). Sposób rozdzielania wariantów przeciwciał monoklonalnych. **P.441857** [WIPO ST 10/C PL441857] z dnia 2022-07-27

W publikacji [Rumanek i in., P2022] opisano badania nad połączeniem procesu selektywnego strącania wariantów ładunkowych *mAbs* z chromatografią jonowymienną. Połączenie to opracowywano w ramach dwóch niezależnych prac doktorskich. W ramach niniejszej pracy wykonano część eksperymentalną dotyczącą strącania *mAbs*, obliczeń

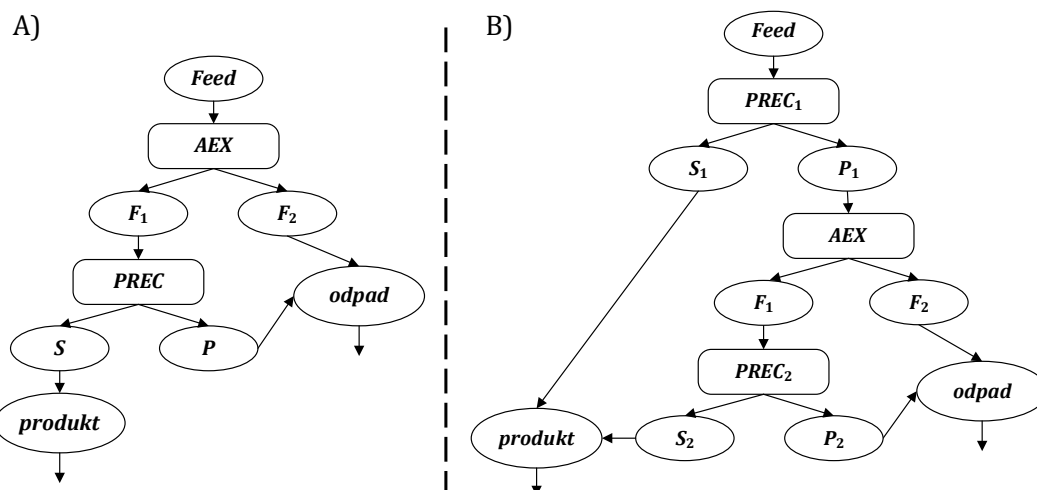
komputerowych dotyczących procesu strącania oraz końcowych obliczeń wydajności i efektywności połączonych procesów przedstawionych na rys. 24 i 25. W ramach drugiej, odrębnej pracy doktorskiej przeprowadzono część eksperymentalną obejmującą chromatograficzne rozdzielanie wariantów *mAbs*, opracowano dynamiczny model chromatografii *AEX* oraz określono i zoptymalizowano połączenie procesów (rys. 23).

Proces strącania (*PREC*) prowadzono w sposób jednostopniowy, tak jak opisano w rozdz. 3.2. oraz w publikacji [Rumanek i in. 2022].

W etapie chromatograficznym użyto *AEX*, która prowadzona była przy przeładowaniu masowym kolumny. Białko wprowadzano do kolumny w pH 9.3, a eluowano w pH 5.5. W warunkach takich rozdzielany materiał dzielił się na dwie frakcje. Frakcję przepływową stanowił materiał zubożony w warianty kwasowe (F_1), które kumulowały się we frakcji zatrzymywanej na kolumnie (F_2).

Sekwencje procesów dobrano na podstawie wyników symulacji komputerowych. W przypadku *PREC* zastosowano model zaprezentowany w rozdz. 3.2. i w publikacjach [Rumanek i in., 2022, Rumanek i in., 2024a], przystosowany do procesu jednostopniowego. Do opisu procesu chromatograficznego użyto ww. modelu dynamicznego. W wyniku przeprowadzonych symulacji ustalono, że najefektywniejszym połączeniem procesu są (rys. 23):

- Opcja 1) nazwana *AEX-PREC*
stosowana w przypadku założonych wysokich wartości współczynnika względnej redukcji av ($\varphi_{av} = 62\%$). Jako pierwszy prowadzony był proces *AEX*, po czym frakcja zubożona w warianty kwasowe (F_1) kierowana była do doczyszczania poprzez selektywne strącanie wariantów. Produkt procesu odbierany był w postaci supernatantu (S).
- Opcja 2) nazwana *PREC-AEX-PREC*
stosowana w przypadku niższych wartości współczynnika względnej redukcji av ($\varphi_{av} = 32\%$), pozwalała osiągać wysokie wartości wydajności procesowej Y . Proces rozpoczynał się od selektywnego strącania, w którym otrzymany supernatant (S_1) spełniał założone warunki jakościowe produktu (osiągnął $\varphi_{av} = 32\%$). Osad (P_1) o dużej zawartości av kierowany był do *AEX*. Następnie proces prowadzono jak w opcji 1. Produktem procesu był połączony supernatant $PREC_1+PREC_2$.

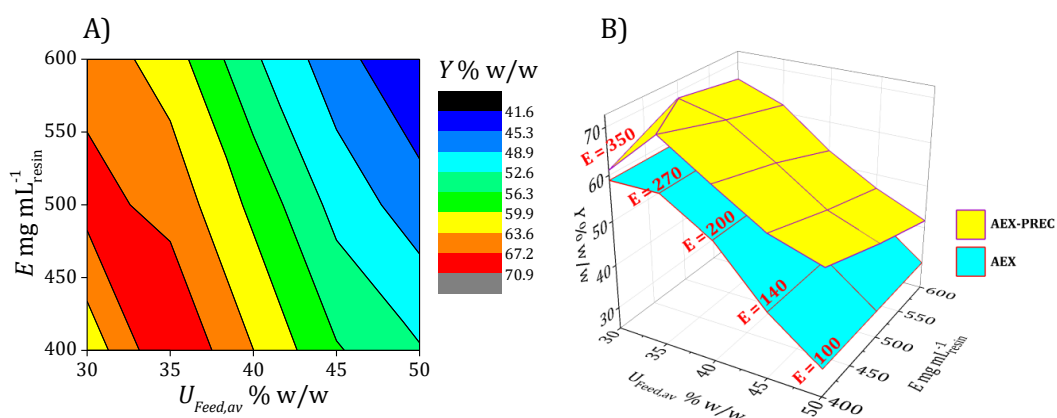


Rys. 23 Schemat hybrydowego procesu rozdzielania wariantów ładunkowych *mAbs*, A) opcja 1 AEX-PREC; B) opcja 2 PREC-AEX-PREC.

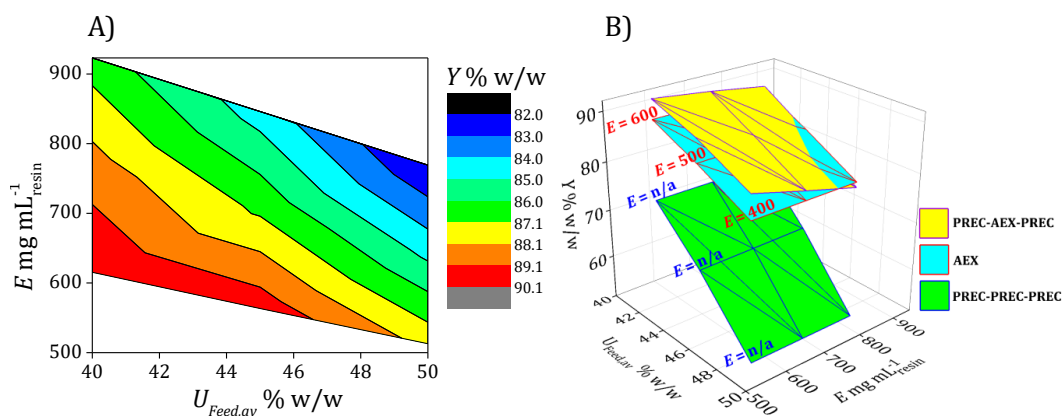
3.5.1. Wyniki symulacji procesu

Model został rozwiązany dla różnych składowych początkowych materiału wsadowego ($U_{Feed,v}$) dla obu opcji prowadzenia procesu. Parametrami zmiennymi były udział av w materiale wsadowym $U_{Feed,av}$ oraz stopień redukcji av wyrażone poprzez współczynnik redukcji φ_{av} . Parametrami jakościowymi była wydajność (Y) opisana poniżej równaniem 27 oraz efektywność E wyrażona jako masa przerabianego w procesie *mAb2* (mg) przypadająca na mL złoża. Parametr E ma szczególne znaczenie w procesach chromatograficznych, gdzie złoże bardzo często wykazuje niską pojemność chłonną, przez co wymagane jest stosowanie kolumn o dużych objętościach lub zwiększanie liczby cykli oczyszczania. Wyniki przeprowadzonych symulacji przedstawiono na rys. 24 i 25.

$$Y = \frac{m_{Prod,mv} + m_{Prod,bv}}{m_{Feed,mv} + m_{Feed,bv}} 100\% \quad (24)$$



Rys. 24 Ilustracja wyników symulacji dla połączenia AEX-PREC przy $\varphi_{av} = 62\%$ w/w, A) Zestawienie wyników wydajności $Y\%$ w/w oraz efektywności procesu E mg mL⁻¹_{złoża} na płaszczyźnie 2D; B) porównanie parametrów jakościowych pomiędzy procesem AEX-PREC a AEX na płaszczyźnie 3D.



Rys. 25 Ilustracja wyników symulacji dla *PREC-AEX-PREC* przy $\varphi_{av} = 32\%$ w/w, A) Zestawienie wyników wydajności Y % w/w oraz efektywności procesu E mg mL⁻¹złóża na płaszczyźnie 2D; B) porównanie parametrów jakościowych pomiędzy procesem *AEX-PREC* a *AEX* oraz trójstopniowym *CsMP* na płaszczyźnie 3D.

Analizując wyniki symulacji procesu *AEX-PREC* zauważyć można zależności znane z procesów *CsMP* oraz *CnMP*. Wraz ze wzrostem udziału av w materiale wsadowym wydajność procesu maleje.

Dzięki połączeniu *AEX* z *PREC* proces *AEX* mógł być realizowany przy niższej selektywności rozdzielania i wyższym obciążeniu kolumny masą białka. Frakcja F_1 , która nie spełniała kryterium jakościowego produktu kierowana była do etapu *PREC*, który umożliwił jej doczyszczanie do zadanego poziomu. W wyniku tego efektywność procesu *AEX-PREC* była do 6 razy wyższa niż w przypadku pojedynczego *AEX* (np.: przy $U_{Feed,av} = 50\%$ w/w, E dla *AEX* wynosi 100 mg mL⁻¹złóża, natomiast w procesie *AEX-PREC* E mieścił się w zakresie 400-600 mg mL⁻¹złóża). Podobne wyniki zaobserwowano dla wydajności, która dla procesu *AEX-PREC* była wyższa niż dla pojedynczego procesu *AEX* w całym badanym zakresie parametrów. Proces *AEX* zapewniał wysoką selektywność, niemożliwą do osiągnięcia z wykorzystaniem trójstopniowego *CsMP*.

Proces *PREC-AEX-PREC* opracowany dla niższej wartości współczynnika redukcji av umożliwił zarówno poprawę wydajności jak i efektywności w stosunku do pojedynczego *AEX* czy trójstopniowego *CsMP*. Korzyści otrzymane z zastosowania połączonego procesu były jednak niższe niż w przypadku opcji 1. Dla przykładu efektywność procesu *PREC-AEX-PREC* była wyższa niż pojedynczego procesu *AEX* od 50 do 100% w zależności od $U_{Feed,av}$. Wydajność *PREC-AEX-PREC* była znacząco wyższa niż trójstopniowego *CsMP*, jednak zbliżona do wydajności osiąganej w pojedynczym *AEX*.

3.5.2. Weryfikacja modelu

Do eksperymentalnego zweryfikowania opracowanych modeli wykorzystano proces *AEX-PREC*, w którym materiał wsadowy (*Feed*) posiadał 39% w/w *av*, natomiast pożądaną czystość produktu zadano na poziomie $U_{Prod,av} = 25\%$. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz symulacji zebrano w tabeli 8.

Tabela 8. Porównanie eksperymentalnych oraz modelowych wyników *AEX-PREC*.

<i>j</i>		$U_{j,v}$ % w/w			<i>Y</i> %
		<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	% w/w
<i>Feed</i>		38.9	45.0	15.6	-
eksp.	<i>Produkt</i>	26.0	52.3	21.7	82
sym.		25.2	53.6	21.2	82
eksp.	<i>Odpad</i>	63.6	32.3	4.2	15
sym.		62.9	31.4	5.7	18

Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 8 stwierdzono, że modele zaproponowane w pracy poprawnie opisują połączenie procesów *AEX* i *PREC* stosowanych do rozdzielania wariantów ładunkowych *mAb2*.

Podsumowując, w pracy z powodzeniem zastosowano proces rozdzielania wariantów ładunkowych *mAb2* składający się z połączonych procesów selektywnego strącania oraz chromatografii *AEX*. W zależności od założonej sprawności rozdzielania, sposób połączenia i liczba etapów mogą być odpowiednio dostosowywane.

4. Podsumowanie i wnioski

W ramach pracy doktorskiej zrealizowano dwa cele badawcze:

1. W pierwszej części pracy opracowano proces wychwytu przeciwciała monoklonalnego klasy IgG1 - *mAb2* z roztworu pochodzącego CHO poprzez strącanie. W trakcie procesu roztwór wsadowy zawierający *mAb2* oczyszczono z *Agg*, *HMWI*, *LMWI*, DNA oraz HCP. Opracowano dwie opcje prowadzenia procesu, które różniły się pomiędzy sobą kolejnością i sposobem usuwania zanieczyszczeń wielkocząsteczkowych. Opcją bardziej efektywną okazała się *PREC8-SLE*, w której zanieczyszczenia niskocząsteczkowe usuwane są jako pierwsze w dwustopniowym strącaniu z wykorzystaniem *PEG 3.35 kDa* w pH 8.0, następnie zanieczyszczenia wielkocząsteczkowe, w procesie ekstrakcji ciecz-ciało stałe w pH 5.0. W zaproponowanej opcji proces pozwolił na otrzymanie produktu o czystości HPLC > 99%, zawartości DNA na poziomie 12 ng mL⁻¹ oraz HCP na poziomie 0.08 µg mL⁻¹ przy wydajności $Y > 75\%$ w/w.

2. W drugiej części pracy opracowano nowy proces selektywnego strącania wariantów ładunkowych *mAbs* klasy IgG1 oraz IgG4. Przeanalizowano oraz eksperymentalnie przebadano wpływ różnych parametrów na przebieg procesu, wyznaczono zależności termodynamiczne oraz kinetykę procesu.

Na podstawie zebranych danych opracowano proces jednostopniowego selektywnego strącania wariantów, który prowadzony był przy niskich wartościach siły jonowej, w pH 5.0 wykorzystując *PEG 3.35 kDa* jako precypitant. Proces opisano pod względem wydajności oraz selektywności w funkcji zmian zakresu parametrów procesowych, a także potwierdzono stabilność oraz aktywność biologiczną produktu.

Następnie wydajność procesu selektywnego rozdzielania wariantów ładunkowych zwiększono poprzez zastosowanie strącania wielostopniowego. Przebadano możliwość połączenia poszczególnych stopni procesu w układzie krzyżowym (*CsMP*), przeciwprądowym (*CnMP*) oraz połączenia selektywnego strącania (*CsMP*) i chromatografii *AEX* (*PREC-AEX*).

Na podstawie zebranych danych eksperymentalnych opracowano matematyczny model procesu składający się z bilansów masy, empirycznymi zależnościami termodynamicznymi. Model zweryfikowano eksperymentalnie i na jego podstawie wyznaczono okno operacyjne zmiennych decyzyjnych, w którym proces był wykonalny.

Na zakończenie badań w tym zakresie przeprowadzono serię symulacji celem porównania efektywności *CnMP* oraz *CsMP*. W ramach przeprowadzonych symulacji stwierdzono, że proces jest bardziej efektywny w przypadku zastosowania przepływu przeciwnoobrotowego, gdzie w trójstopniowym procesie maksymalna wydajność, osiągnęła $Y = 90\%$ w/w.

Proces selektywnego strącania wariantów kwasowych przeciwciał monoklonalnych jest elementem nowości niniejszej pracy.

Wyniki badań opisanych w dysertacji doktorskiej udowadniają prawdziwość postawionej hipotezy dla niniejszej pracy: proces strącania może zostać wykorzystywany do efektywnego oczyszczania farmaceutycznych *mAbs* zarówno na etapie wychwytu z medium pohodowlanego jak i redukcji *av* w czystym produkcie. Połączenie opracowanych w ramach pracy doktorskiej procesów strącania może stanowić alternatywny ciąg technologiczny na etapie DSP.

5. Lista skrótów i oznaczeń

5.1. Skróty

- Abs* – ang. *Antibodies*, przeciwciała,
- AC* – ang. *Affinity Chromatography*, chromatografia powinowactwa,
- ADCC* – ang. *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał,
- AEX* – ang. *Anion Exchange Chromatography*, chromatografia anionowymienna,
- API* – ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*, substancja czynna,
- ATPE* – ang. *Aqueous two-phase extraction*, ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych,
- av* – ang. *Acidic Variants*, warianty kwasowe przeciwciał monoklonalnych,
- bv* – ang. *Basic Variants*, warianty zasadowe przeciwciał monoklonalnych,
- C* – ang. *Constants*, części stałe przeciwciał,
- CD20* – ang. *B-Lymphocyte Antigen*, antygen limfocytów-B,
- CDR* – ang. *Complementarity-Determining Regions*, regiony determinujące komplementarność,
- CEX* – ang. *Cation Exchange Chromatography*, chromatografia kationowymienna,
- CHO* – ang. *Chinese Hamster Ovary*, linia komórkowa pochodząca z jajnika chomika chińskiego,
- DNA* – ang. *Deoxyribonucleic Acid*, kwas deoksyrybonukleinowy,
- DSP* – ang. *Downstream Processing*, grupa procesów mająca na celu oczyszczenie, cząsteczek aktywnych biologicznie (np. *mAbs*) produkowanych w trakcie USP,
- EMA* – ang. *European Medicines Agency*, Europejska Agencja Leków – Europa,
- EPO* – ang. *Erythropoietin*, erytropoetyna,
- Fab* – ang. *Fragment Antigen Binding*, fragment wiążący antygen, region na powierzchni przeciwciała odpowiadający za powinowactwo,
- Fc* – ang. *Fragment Crystallizable*, fragment krystalizujący, region na powierzchni przeciwciała odpowiadający za funkcje efektorowe,
- FcRn* – ang. *Neonatal Fragment Crystallizable Receptor*, receptor Fc na powierzchni komórek śródbłonna,
- FcγR* – ang. *Fc-Gamma Receptors*, grupa receptorów gamma na powierzchni komórek efektorowych,
- FDA* – ang. *Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków – USA,
- FR* – ang. *Frame Regions*, regiony zrębowe,

- H – ang. *Heavy*, łańcuch ciężki przeciwciał,
- HCP – ang. *Host Cell Protein*, białka komórek gospodarza,
- HER2 – ang. *Receptor Tyrosine-Protein Kinase*, receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu,
- HIC – ang. *Hydrophobic Interaction Chromatography*, chromatografia oddziaływań hydrofobowych,
- HSA – ang. *Human Serum Albumin*, ludzka albumina osocza,
- ICH – ang. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi,
- IEX – ang. *Ion Exchange Chromatography*, chromatografia jonowymienna,
- L – ang. *Light*, łańcuch lekki przeciwciał,
- mAb2* – przeciwciało monoklonalne klasy IgG1,
- mAb3* – przeciwciało monoklonalne klasy IgG4,
- mAbs* – ang. *Monoclonal Antibodies*, przeciwciała monoklonalne,
- mv* – ang. *Main Variants*, warianty obojętne (piku głównego) przeciwciał monoklonalnych,
- NK – ang. *Natural Killers*, rodzaj komórek efektorowych w organizmach kręgowców,
- NS0 – ang. *Murine Myeloma Cells*, linia komórkowa mysiego szpiczaka,
- pAbs* – ang. *Polyclonal Antibodies*, przeciwciała poliklonalne,
- PEG – ang. *Polyethylene glycol*, glikol polietylenowy,
- pI – ang. *Isoelectric Point*, punkt izoelektryczny,
- UF/DF – ang. *Ultrafiltration/Diafiltration*, ultrafiltracja/diafiltracja,
- USP – ang. *Upstream Processing*, grupa procesów mająca na celu przemysłowe wytworzenie cząsteczki aktywnej biologicznie (np. *mAbs*),
- V – ang. *Variable*, części zmienne przeciwciał,

5.2. Oznaczenia

- a* – parametr „a” empirycznej funkcji liniowej $U_{i,av} = f(\beta_{i,ovl})$,
- Agg* – agregaty przeciwciał,
- AS* – siarczan amonu,
- b* – parametr „b” empirycznej funkcji liniowej $U_{i,av} = f(\beta_{i,ovl})$,
- C* – stężenie, [mg mL⁻¹ dla *mAbs*], [% w/v dla *PEG*], [M dla *AS*], [ng mL⁻¹ dla DNA], [μg mL⁻¹ dla HCP],

- CnMP* - proces wielostopniowego selektywnego strącania wariantów ładunkowych *mAbs* o przeciwpądowym przepływie strumieni procesowych,
- CsMP* - proces wielostopniowego selektywnego strącania wariantów ładunkowych *mAbs* o krzyżowym przepływie strumieni procesowych,
- d* - średnia gęstość roztworu procesowego [g mL^{-1}],
- E* - efektywność - parametr jakościowy stosowany dla hybrydowego procesu rozdzielania wariantów, określający masę *mAb2* rozdzielanego w procesie w przeliczeniu na masę złoża w kolumnie chromatograficznej [$\text{mg mL}^{-1}_{\text{resin}}$],
- EX* - ekstrakt uzyskany po *SLE*,
- F* - frakcja uzyskiwana w procesie AEX, *F*₁ - frakcja przepływowa, *F*₂ - frakcja zatrzymywana na kolumnie,
- Feed* - roztwór pochodzący z CHO, roztwór wsadowy, [Rumanek i in., 2022]: *Feed* oznaczono jako *F*,
- HMWI* - zanieczyszczenia wysokocząsteczkowe,
- i* - numer stopnia procesu,
- j* - frakcja/strumień procesowy; *Feed*, *S*, *P*, *Sol*, *EX*,
- k_v* - współczynnik podziału wariantu *v*,
- LMWI* - zanieczyszczenia niskocząsteczkowe,
- m* - masa [mg],
- Mono* - forma monomeryczna przeciwciała *mAb2*,
- ovl* - suma wszystkich wariantów ładunkowych *mAbs*, [Rumanek i in., 2024a]: *ovl* oznaczono jako *mAb2*
- P* - osad *mAbs*,
- PB* - 50 mM bufor fosforanowy o pH 8.0,
- PEG* - glikol polietylenowy,
- PREC5* - strącanie w pH 5.0 - jeden z etapów wychwytu *mAb2* z roztworu pochodzącego,
- PREC8* - strącanie w pH 8.0 - jeden z etapów wychwytu *mAb2* z roztworu pochodzącego,
- σ - konduktywność - przewodnictwo, siła jonowa roztworu [mS cm^{-1}],
- S* - supernatant,
- SA* - 50 mM bufor octanowy o pH 5.0,

- SEC-ratio* – stosunek powierzchni rozdzielanego składnika do sumy powierzchni wszystkich pików uzyskanych na chromatogramie *SEC-HPLC* - dotyczy wychwytu *mAb2* z roztworu pohodowlanego,
- SLE* – ekstrakcja ciecz-ciało stałe - jeden z etapów wychwytu *mAb2* z roztworu pohodowlanego,
- Sol* – strumień roztworu precypitantu,
- U* – zredukowany ułamek masowy [% w/w],
- v* – rodzaj wariantu; *av*, *mv*, *bv*, [Rumanek i in., 2022]: *v* oznaczono jako *i*,
- Y* – wydajność procesu selektywnego rozdzielania wariantów ładunkowych,
- Y_{mAb2}* – wydajność procesu strącania *mAb2* z roztworu pohodowlanego CHO,
- β_{ovl}* – współczynnik redukcji całkowitego stężenia *mAb2* [%], [Rumanek i in., 2022]: *β_{ovl}* oznaczono jako *Y%*, [Zimoch, Rumanek i in., 2023]: *β_{ovl}* oznaczono jako *Rec_{ovl}*,
- φ_{av}* – współczynnik względnej redukcji *av* [%], [Rumanek i in., 2022]: *φ_{av}* oznaczono jako $\Delta U_{S,av}/U_{F,av}$.

6. Literatura

- Antoniou C., McCue J., Natarajan V., Thömmes J., Yuan Q. S., (2017). Scaling Up Industrial Protein Chromatography. *Preparative Chromatography for Separation of Proteins*, Hoboken, <https://doi.org/10.1002/9781119031116.ch8>.
- Antos D., Kaczmarek K., Piątkowski W., (2017). Chromatografia preparatywna jako proces rozdzielania mieszanin. *Wydawnictwo naukowe PWN*, Warszawa.
- Antos D., Piątkowski W., (2016). Band Deformation in Non-Isocratic Liquid Chromatography. *Trends Anal. Chem.*, 81, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.005>.
- Ahmed S., Atia N. N., Rageh A. H., (2019). Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variants. *Talanta*, 199, 347 – 354. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.082>.
- Alstine J. V., Berg M., Kjorning J., Shanagar J., (2008). Plasma protein fractionation by sequential polyacid precipitation. GE Healthcare BioSciences. **US Patent 2014/0343253 A1**.
- Asakura, S., Oosawa, F., (1958). Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *J. Polym. Sci.*, 33, 183-192. <https://doi.org/10.1002/pol.1958.1203312618>.
- Asherie N., (2004). Protein Crystallization and Phase Diagrams. *Methods*, 34 (3), 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.028>.
- Asenjo J. A., Andrews B. A., (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *J. Chromatogr. A.*, 1218, 8826–8835. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.051>.
- Azevedo A. M., Gomes A. G., Rosa P. A. J., Ferreira I. F., Pisco A. M. O., Aires-Barros M. R., (2007). Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.*, 65(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.010>.
- Baker E.G., Bartlett G.J., Crump M.P., Sessions R.B., Linden N., Faul C. F. J., Woolfson D.N., (2015). Local and macroscopic electrostatic interactions in single α -helices. *Nat. Chem. Biol.*, 11, 221–228. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1739>.

Baran K., Zimoch P., Stanczak A., Piatkowski W., Antos D., (2021). Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1658. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462607>.

Beck A., Nowak C., Meshulam D., Reynolds K., Chen D., Pacardo D. B., Nicholls S. B., Carven G. J., Gu Zu., Fang J., Wang D., Katiyar A., Xiang T., Liu H., (2022), Risk-Based Control Strategies of Recombinant Monoclonal Antibody Charge Variants. *Antibodies*, 11(73). <https://doi.org/10.3390/antib11040073>.

Boswell C. A., Tesar D. B., Mukhyala K., Theil F. P., Fielder P. J., Khawli L. A., (2010). Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjug. Chem.*, 21, 2153–2163. <https://doi.org/10.1021/bc100261d>.

Bults P., Bischoff R., Bakker H., Gietema J.A., van de Merbel N.C., (2016). LC-MS/MS-Based Monitoring of In Vivo Protein Biotransformation: Quantitative Determination of Trastuzumab and Its Deamidation Products in Human Plasma. *Anal. Chem.*, 88, 1871–1877. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04276>.

Burgess R. R., (2009). Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol.*, 463, 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63020-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63020-2).

Burgstaller D., Jungbauer A., Satzer P., (2019). Continuous integrated antibody precipitation with two-stage tangential flow microfiltration enables constant mass flow. *Biotechnol Bioeng.*, 116(5), 1053–1065. <https://doi.org/10.1002/bit.26922>.

Carcagno C.M., Criscuolo M., Melo C., Vidal J.A., (2001). Methods of purifying recombinant human erythropoietin from cell culture supernatants. *EP 1127063B1*.

Chahar D. S., Ravindran S., Pisala S. S., (2019). Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale. *Biologicals*, 63, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.007>.

Chen R., Weng J., Fung Chow S., Lakerveld R., (2021). Integrated Continuous Crystallization and Spray Drying of Insulin for Pulmonary Drug Delivery. *Cryst. Growth Des.*, 2021, 21, 1, 501–511. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c01312>.

Chen W., Li X., Guo M., Link F. J., Ramli S. S., Ouyang J., Rosbottom I., Heng J. Y. Y., (2021). Biopurification of monoclonal antibody (mAb) through crystallisation. *Sep. Purif. Technol.*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118358>.

- Chiu, J., Valente, K. N., Levy, N. E., Min, L., Lenhoff, A. M., Lee, K. H., (2017). Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations. *Biotechnol Bioeng.*, 114(5), 1006–1015. <https://doi.org/10.1002/bit.26237>.
- Chiu M. L., Goulet D. R., Teplyakov A., Gilliland G. L., (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*, 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>.
- Chen W., Li X., Guo M., Link F. J., Ramli S. S., Ouyang J., Rosbottom I., Heng J. H. H., (2021). Biopurification of monoclonal antibody (mAb) through crystallisation. *Sep. Purif. Technol.*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118358>.
- Chung S., Tian J., Tan Z., Chen J., Lee J., Borys M., Li Z. J., (2018). Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles. *Biotechnol. Bioeng.*, 115, 1646 – 1665. <https://doi.org/10.1002/bit.26587>.
- Cobb B. A., (2020). The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiol.*, 30(4), 202-213. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz065>.
- Costioli M. D., Guillemot-Potelle C., Mitchell-Logean C., Broly H., (2010). Cost of goods modeling and quality by design for developing cost-effective processes. *BioPharm Int.*, 23, 26–35.
- Curtis S., Lee K., Blan, G. S., Brorson K., Xu Y., (2003). Generic/matrix evaluation of SV40 clearance by anion exchange chromatography in flow-through mode. *Biotechnol. Bioeng.*, 84, 179–186. <https://doi.org/10.1002/bit.10746>.
- Dakshinamurthy P., Mukunda P., Kodaganti B., Shenoy B. R., Natarajan B., Maliwalave A., Halan V., Murugesan S., Maity S., (2017). Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab. *Biologicals*, 46, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.006>.
- Doltade S., Saldanha M., Patil V., Dandekar P., Jain R., (2023). Statistically aided development of protein A affinity chromatography for enhancing recovery and controlling quality of a monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B.*, 1227, 123829. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123829>.
- Dondelinger M., Filée P., Sauvage E., Quinting B., Muyldermans S., Galleni M., and Vandevenne M. S., (2018). Understanding the Significance and Implications of Antibody

- Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition. *Front. Immunol.*, 9(2278). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02278>.
- dos Santos R., Carvalho A. L., Roque A. C. A., (2017). Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification. *Biotechnol. Adv.*, 35(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.005>.
- dos Santos M. L., Quintilio W., Manieri T. M., L Tsuruta L. R., Moro A. M., (2018). Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 54. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001007>.
- Dumetz, A. C., Chockla, A. M., Kaler, E. W., Lenhoff, A. M. (2008). Protein Phase Behavior in Aqueous Solutions. Crystallization, Liquid-Liquid Phase Separation, Gels, and Aggregates. *Biophys. J.*, 94(2), 570–583. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.116152>.
- Dutra, G., Komuczki, D., Jungbauer, A., Satzer, P. (2020). Continuous capture of recombinant antibodies by ZnCl₂ precipitation without polyethylene glycol. *Eng. Life Sci.*, 20(7), 265–274. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900160>.
- Duong-Ly K. C., Gabelli S. B., (2014). Chapter Seven - Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods Enzymol.*, 541, 85-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>.
- Eriksson K. O., (2018). Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biopharmaceutical Processing*, 401-408. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00019-0>.
- Fekete S., Beck A., Fekete J., Guillarme D., (2015). Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: Salt gradient approach, *J. Pharm. Biomed*, 102. 33 – 44. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>.
- Ferreira-Faria, D., Domingos-Moreira, F., Aires-Barros, M. R., Ferreira, A., Azevedo, A. M., (2023). Continuous precipitation of antibodies using oscillatory flow reactor: A proof of concept. *Sep. Purif.*, 317, 123924. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123924>.
- Franzreb, M., Müller, E., Vajda, J., (2014). Cost estimation for protein a chromatography: An in-silico approach to mab purification strategy. *BioProcess International*, 12.
- Focosi D., Franchini M., Tuccori M., Cruciani M., (2022). Efficacy of High-Dose Polyclonal Intravenous Immunoglobulin in COVID-19: A Systematic Review. *Vaccines*, 10(94). <https://doi.org/10.3390/vaccines10010094>.

- Forthal D. N., (2014). Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.*, 2(4), 1-17.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.aid-0019-2014>.
- Giese G., Myrold A., Gorrell J., Persson J., (2013). Purification of antibodies by precipitating impurities using Polyethylene Glycol to enable a two-chromatography step process. *J. Chromatogr. B*, 938, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.029>.
- Girard V., Hilbold N. J., Ng C. K. S., Pegon L., Chahim W., Rousset F., Monchois V., (2015). Large-scale monoclonal antibody purification by continuous chromatography, from process design to scale-up. *J. Biotech.*, 213 (10), 65-73.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.026>.
- Ghose S., Jin M., Liu J., Hickey J., Lee S., (2017). Integrated Polishing Steps for Monoclonal Antibody Purification. *Process Scale Purification of Antibodies*, 303-323.
<https://doi.org/10.1002/9781119126942.ch14>.
- Ghose S., Zhang J., Conley L., Caple R., Williams K. P., Cecchini D., (2014). Maximizing binding capacity for protein A chromatography. *Biotechnol. Prog.*, 30(6), 1335 – 1340.
<https://doi.org/10.1002/btpr.1980>.
- Goldberg B. S., Ackerman M. E., (2020). Antibody-mediated complement activation in pathology and protection, *Immunol. Cell Biol.*, 98, 305–317.
<https://doi.org/10.1111/imcb.12324>.
- Gómez R. V. R., Murray J. C., Weiner, L. M., (2014). Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). *Antibody Fc*, 1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394802-1.00001-7>.
- Gregory K. P., Elliott G. R., Robertson H., Kumar A., Wanless E. J., Webber G. B., Craig V. S. J., Andersson G. G., Page A. J., (2022). Understanding specific ion effects and the Hofmeister series. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 24, 12682-12718.
<https://doi.org/10.1039/D2CP00847E>.
- Gronemeyer P., Ditz R., Strube J., (2014). Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering*, 1, 188-212.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering1040188>.
- Gutierrez-Quezada A. E., Arreguin-Espinosa R., Moreno A., (2010). Protein Crystal Growth Methods, *Springer Handbook of Crystal Growth*, New York, 1583-1605.

- Haberger M., Bomans K., Diepold K., Hook M., Gassner, J., Schlothauer T., Zwick A., Spick C., Felix Kepert J., Hienz B., (2014). Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies: Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes. *mAbs*, 6, 327–339. <https://doi.org/10.4161/mabs.27876>.
- Hämmerling F., Effio C. L., Andris S., Kittelmann J., Hubbuch J., (2017). Investigation and prediction of protein precipitation by polyethylene glycol using quantitative structure–activity relationship models. *J. Biotech.*, 241, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.014>.
- Hammerschmidt N., Hobiger S., Jungbauer A., (2016). Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: Sequential precipitation and resolubilization. *Proc. Biochem.*, 51(2), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.032>.
- Hammerschmidt N., Tscheliessnig A., Sommer R., Helk B., Jungbauer A., (2014). Economics of recombinant antibody production processes at various scales: Industry-standard compared to continuous precipitation. *Biotechnol. J.*, 9, 766–775. <https://doi.org/10.1002/biot.201300480>.
- Harris R.J., Kabakoff B., Macchini F.D., Shen F.J., Kwong M., Andya J.D., Shire S.J., Bjork N., Totpal K., Chen A.B., (2001). Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 752, 233–245. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00548-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00548-X).
- Haselberg R., Vijlder T.D., Heukers R., Smit M.J., Romijn E. P., Somsen G. W., Domínguez-Vega E., (2018). Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 1044, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.024>.
- Hekmat, D., (2015). Large-Scale Crystallization of Proteins for Purification and Formulation. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 38 (7), 1209–1231. <https://doi.org/10.1007/s00449-49015-1374-y>.
- Hintersteiner B., Lingg N., Janzek E., Mutschlechner O., Loibner H., Jungbauer A., (2016a). Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein. *Biotechnol. J.*, 11(12), 1617–1627. <https://doi.org/10.1002/biot.201600504>.

Hintersteiner B., Lingg N., Zhang P., Woen S., Hoi K. M., Stranner S., Wiederkum S., Mutschlechner O., Schuster M., Loibner H., Jungbauer, A., (2016b). Charge heterogeneity: basic antibody charge variants with increased binding to fc receptors. *mAbs*, 8(8), 1548–1560. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1225642>.

Huettmann H., Berkemeyer M., Buchinger W., Jungbauer A., (2014). Preparative crystallization of a single chain antibody using an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.*, 111, 2192–2199. <https://doi.org/10.1002/bit.25287>.

Hyde A. M., Zultanski S. J., Wladman J. H., Zhong Y-L., Shavelin M., Peng F., (2017)., General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Org. Process Res. Dev.*, 21(9), 1355-1370. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>.

Igawa T., Tsunoda H., Tachibana T., Maeda A., Mimoto F., Moriyama C., Nanami M., Sekimori Y., Nabuchi Y., Aso Y., Hattori K., (2010). Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Eng. Des.*, 23(5), 385–392. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq009>.

Irvine E. B., Alter G., (2020). Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases, *Glycobiol.*, 30(4), 241-253. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa018>.

Iverius P. H., Laurent T. C., (1967). Precipitation of some plasma proteins by the addition of dextran or polyethylene glycol. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Protein Struct.*, 133(2), 371-373. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(67\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(67)90079-7).

Kelley B., (2009). Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*, 1(5), 443-452. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9448>.

Khawli L. A., Goswami S., Hutchinson R., Kwong Z. W., Yang J., Wang X., Yao Z., Sreedhara A., Cano T., Tesar D. B., Nijem I., Allison D. E., Wong P. Y., Kao Y.-H., Quan C., Joshi A., Harris R. J., Motchnik P., (2010). Charge variants in IgG1. Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *mAbs*, 2(6), 613–624. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13333>.

Knevelman, C., Davies, J., Allen, L., Titchener-Hooker, N.J., (2009). High-throughput screening techniques for rapid PEG-based precipitation of IgG4 mAb from clarified cell culture supernatant. *Biotechnol. Prog.*, 26, 697-705. <https://doi.org/10.1002/btpr.357>.

- Kołodziej M., Poplewska I., Piątkowski W., Antos D., (2018). Design of Bulk Protein Crystallization Based on Phase Diagrams Accounting for the Presence of Interfacial Water. *Cryst. Growth Des.*, 18 (1), 393–401. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01398>.
- Krauss I., Merlino A., Vergara A., Sica, F., (2013). An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(6), 11643–11691. <https://doi.org/10.3390/ijms140611643>.
- Kuczewski M., Schirmer E., Lain B., Zarbis-Papastoitsis G., (2011). A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. *Biotechnol. J.*, 6(1), 56–65. <https://doi.org/10.1002/biot.201000292>.
- Li Z., Gu Q., Coffman J. L., Przybycien T., Zydney A. L. (2019). Continuous precipitation for monoclonal antibody capture using countercurrent washing by microfiltration. *Biotechnol. Prog.*, 35(6), 2886. <https://doi.org/10.1002/btpr.2886>.
- Lim K. K., Ng K., Balachandran S., Russell M. D., Boalch A., Sinclair A., Coker B., Vinnakota K., Mansoor R., Douiri A., Marks L. V., Sacks S., (2023). Measuring the impact of monoclonal antibody therapies. *Front. Med.*, 10, 1256712. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1256712>.
- Lin D. Q., Zhang Q. L., Yao S. J., (2021). Model-assisted approaches for continuous chromatography: Current situation and challenges. *J. Chromatogr. A*, 1637, 461855. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461855>.
- Liu H., Gaza-Bulseco, G., Faldu, D., Chumsae, C., Sun, J., (2008). Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J. Pharm. Sci.*, 97(7), 2426–2447. <https://doi.org/10.1002/jps.21180>.
- Liu H., Ma J., Winter C., Bayer R., (2010). Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5), 480-499. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12645>.
- Liu H., May K., (2012). Disulfide bond structures of IgG molecules Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *mAbs*, 4(1), 17-23. <https://doi.org/10.4161/mabs.4.1.18347>.
- Liu L., (2018). Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell*, 9(1), 15–32. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0408-4>.

Leblanc C., Ramon C., Bihoreau N., Chevreux G., (2017), Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ionexchange chromatography coupled on-line to native massspectrometry: Case study after a long-term storage at +5 ° C, *J. Chromatogr. B.*, 1048, 130–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>.

Lee Y. F., Johnck M., Frech C., (2018). Evaluation of Differences Between Dual Salt-pH Gradient Elution and Mono Gradient Elution Using a Thermodynamic Model: Simultaneous Separation of Six Monoclonal Antibody Charge and Size Variants on Preparative-Scale Ion Exchange Chromatographic Resin. *Biotechnol. Prog.*, 34, 973 – 985. <https://doi.org/10.1002/btpr.2626>.

Marichal-Gallardo P. A., Alvarez M. M., (2012). State-of-the-Art in Downstream Processing of Monoclonal Antibodies: Process Trends in Design and Validation. *Biotechnol Prog.*, 28(4), 899 – 916. <https://doi.org/10.1002/btpr.1567>.

Mathias A., Longet S., Corthesy B., (2013). Agglutinating secretory IgA preserves intestinal epithelial cell integrity during apical infection by Shigella flexneri. *Infect. Immun.*, 81, 3027–3034. <https://doi.org/10.1128/iai.00303-13>.

Miao S., Xie P., Zou M., Fan L., Liu X., Zhou Y., Zhao L., Ding D., Wang H., Tan W.-S., (2017). Identification of multiple sources of the acidic charge variants in an IgG1 monoclonal antibody. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 5627–5638. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8301-x>.

Miller A.K., Hambly D.M., Kerwin B.A., Treuheit M.J., Gadgil H.S., (2011). Characterization of Site-Specific Glycation During Process Development of a Human Therapeutic Monoclonal Antibody. *J. Pharm. Sci.*, 100, 2543–2550. <https://doi.org/10.1002/jps.22504>.

Milne J.J., (2016). Scale-Up of Protein Purification: Downstream Processing Issues. *Methods Mol Biol.*, 1485, 71-84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_5.

Minervini M., Mergy M., Zhu Y., Gutierrez Diaz M. A., Pointer C., Shinkazh O., Oppenheim S. F., Cramer S. M., Przybycien T. M., Zydney A. L. (2013). Continuous precipitation-filtration process for initial capture of a monoclonal antibody product using a four-stage countercurrent hollow fiber membrane washing step. *Biotechnol. Bioeng.*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/bit.28525>.

Muller-Spath T., Aumann L., Melter L., Strohle G., Morbidelli M., (2008). Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn

countercurrent solvent gradient purification (MCSGP). *Biotechnol. Bioeng.*, 100, 1166 – 1177. <https://doi.org/10.1002/bit.21843>.

Murphy K., Travers P., Walport M., (2022). Janeway's Immunobiology. 10th. *Norton & Company*, Columbia, 61-80.

Nadar S., Shooter G., Somasundaram B., Shave E., Baker K., Lua L. H. L., (2021). Intensified Downstream Processing of Monoclonal Antibodies Using Membrane Technology. *Biotechnol. J*, 16, 2000309. <https://doi.org/10.1002/biot.202000309>.

Ning L., Abagna H. B., Jiang Q., Liu S., Huang J., (2021). Development and application of therapeutic antibodies against COVID-19. *Int J Biol Sci*, 17(6), 1486-1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59149>.

Novak J., Baker T., Georges G., Kelm S., Klostermann S., Shi J., Sridharan S., Deane C. M., (2016). Length-independent structural similarities enrich the antibody CDR canonical class model. *mAbs*, 8(4), 751–760. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1158370>.

Odijk, T., (2009). Depletion Theory and the Precipitation of Protein by Polymer. *J. Phys. Chem. B*, 113, 3941-3946. <https://doi.org/10.1021/jp806722j>.

Oelmeier, S.A., Ladd-Effio, C., Hubbuch, J., (2013). Alternative separation steps for monoclonal antibody purification: Combination of centrifugal partitioning chromatography and precipitation. *J. Chromatogr. A*, 1319, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.043>.

Pathak M., Rathore A. S., (2016). Mechanistic understanding of fouling of protein A chromatography resin. *J. Chromatogr. A*, 1459(2016) 78-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.084>.

Parambil J. V., Schaepertoens M., Williams D. R., Heng Y. J. J., (2011). Effects of Oscillatory Flow on the Nucleation and Crystallization of Insulin. *Cryst. Growth Des.*, 2011, 11(10), 4353–4359. <https://doi.org/10.1021/cg200158z>.

Pekarsky A., Spadiut O., Rajamanickam V., Wurm D. J., (2018). A fast and simple approach to optimize the unit operation high pressure homogenization - a case study for a soluble therapeutic protein in E. Coli. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 49(1), 74-81. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536988>.

- Pelletier J. P. R., Mukhtar F., (2020). Passive Monoclonal and Polyclonal Antibody Therapies. *Immunologic Concepts in Transfusion Medicine.*, Cleveland, 251–348. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-67509-3.00016-0>.
- Persson O., Andersson N., Nilsson B., (2017). Design of two-column batch-to-batch recirculation to enhance performance in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1531, 112 – 121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.035>.
- Petersen K., Schlichtkrull J., (1964). Insulin crystals and preparations and processes for producing them. Novo Terapeutisk Laboratorium A/S. *US Patent 692612*.
- Pires D. E. V., Ascher D. B., (2016), mCSM-AB: a web server for predicting antibody–antigen affinity changes upon mutation with graph-based signatures, *Nucleic Acids Res.*, 44, 469-473. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw458>.
- Poison A., (1977). A Theory for the Displacement of Proteins and Viruses with Polyethylene Glycol. *Prep. Biochem.*, 7, 129-154. <https://doi.org/10.1080/00327487708061631>.
- Polson, A., Potgieter, G., Largier, J., Mears, G., Joubert, F., (1964). The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Sub.*, 82, 463-475. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(64\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(64)90438-6).
- Pons Royo M. del C., De Santis T., Komuczki D., Satzer P., Jungbauer, A., (2023). Continuous precipitation of antibodies by feeding of solid polyethylene glycol. *Sep. Purif.*, 304. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122373>.
- Qiao X., Qu L., Guo Y., Hoshino T., (2021). Secondary Structure and Conformational Stability of the Antigen Residues Making Contact with Antibodies. *J. Phys. Chem. B*, 125, 11374–11385. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c05997>.
- Ramos-de-la-Peña A. M., González-Valdez J., Aguilar O., (2018). Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *J Sep Sci.*, 42(9), 1816-1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>.
- Roche A. M., Richard A. L., Rahkola J. T., Janoff E. N., Weiser J. N., (2014). Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination. *Mucosal Immunol*, 8(1), 176–185. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.55>.
- Roque A. C. A., Pina A. S., Azevedo A. M., Aires-Barros R., Jungbauer A., Profio G., Heng J. Y., Haigh J., Ottens M., (2020). Anything but Conventional Chromatography Approaches

in Bioseparation. *Biotechnol. Bioeng.*, 1900274.

<https://doi.org/10.1002/biot.201900274>.

Rosenberg E., Hepbildikler S., Kuhne W., Winter G., (2009). Ultrafiltration concentration of monoclonal antibody solutions: Development of an optimized method minimizing aggregation. *J. Membr. Sci.*, 342, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.06.028>.

Roush D. J., Lu Y., (2009). Advances in Primary Recovery: Centrifugation and Membrane Technology. *Biotechnol. Prog.*, 24, 488-495. <https://doi.org/10.1021/bp070414x>.

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2022). Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Biotechnol Bioeng.*, 120, 114-124. <https://doi.org/10.1002/bit.28257>.

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024a). Countercurrent preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Chem Eng Res Des*, 202, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2024.01.001>.

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024b). Isolation and purification of a monoclonal antibody from a cell culture supernatant by multistage precipitation and solid-liquid extraction. *Food Bioprod. Process.*, 147, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.05.016>

Rumanek T., Zimoch P., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (P2022). Sposób rozdzielania wariantów przeciwciał monoklonalnych. **P.441857** [WIPO ST 10/C PL441857] z dnia 2022-07-27

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (P2024). Sposób izolacji przeciwciał monoklonalnych z mieszaniny pohodowlanej. **P.448410** [WIPO ST 10/C PL448410] z dnia 2024-04-25

Scallon B.J., Tam S.H., McCarthy S.G., Cai A.N., Raju T.S., (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol.*, 44, 1524–1534. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.005>.

Schneider W., Friihlich C., Fiedler H., Lefevre H., (1979). Process for isolating albumin from blood. Plasmesco. *US Patent 4156681*.

Shukla A. A., Hinckley P., (2008). Host Cell Protein Clearance During Protein A Chromatography: Development of an Improved Column Wash Step. *Biotechnol. Prog.*, 24, 1115-1121. <https://doi.org/10.1002/btpr.50>.

Shukla A. A., Hubbard B., Tressel T., Guhan S., Low D., (2007). Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches. *J. Chromatogr. B*, 848, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.026>.

Shukla A. A., Thommes J., (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.*, 28(5), 253-61. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.02.001>.

Simone E., Othman R., Vladislavljević G. T., Nagy Z. K., (2018). Preventing Crystal Agglomeration of Pharmaceutical Crystals Using Temperature Cycling and a Novel Membrane Crystallization Procedure for Seed Crystal Generation. *Pharmaceutics*, 10(1), 17, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010017>.

Sörman A., Zhang Lu., Ding Z., Heyman B., (2014), How antibodies use complement to regulate antibody responses, *Mol. Immunol.*, 61, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.010>.

Smejkal B., Agrawal N.J, Helk B., Schulz H., Giffard M., Mechelke M., Ortner F., Heckmeier P., Trout B. L., Hekmat D., (2013a). Fast and scalable purification of a therapeutic full-length antibody based on process crystallization, *Biotechnol. Bioeng.*, 110, 2452–2461. <https://doi.org/10.1002/bit.24908>.

Smejkal B., Helk B., Rondeau J. M., Anton S., Wilke A., Scheyerer P., Fries J., Hekmat D., Weuster-Botz D., (2013b). Protein crystallization in stirred systems-scale-up via the maximum local energy dissipation, *Biotechnol. Bioeng.*, 110, 1956–1963. <https://doi.org/10.1002/bit.24845>.

Sommer R., Satzer P., Tscheliessnig A., Schulz H., Helk B., Jungbauer A., (2014). Combined polyethylene glycol and CaCl₂ precipitation for the capture and purification of recombinant antibodies. *Proc. Biochem.*, 49(11), 2001–2009. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.012>.

Sommer R., Tscheliessnig, A., Satzer P., Schulz H., Helk B., Jungbauer A., (2015). Capture and intermediate purification of recombinant antibodies with combined precipitation methods. *Biochem. Eng. J.*, 93, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.008>.

Sommerfeld S., Strube J., (2005). Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. *Chem. Eng. Process.*, 44, 1123–1137. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2005.03.006>.

- Staby A., Sand M. B., Hansen R. G., Jacobsen J. H., Andersen L. A., Gerstenberg M., Bruus U. K., Jensen I. H., (2005). Comparison of chromatographic ion-exchange resins. *J. Chromatogr. A.*, 1069, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.094>.
- Stein A., Kiesewetter A., (2007). Cation exchange chromatography in antibody purification: pH screening for optimised binding and HCP removal. *J. Chromatogr. B.*, 848, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.010>.
- Strube J., Ditz R., Kornecki M., Huter M., Schmidt A., Thiess H., Zobel-Roos S., (2018). Process intensification in biologics manufacturing. *Chem. Eng. Process.: Process Intensif.*, 133, 278-293. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.09.022>.
- Sun Q., Wang L., Li N., Shi L., (2021). Characterization and monitoring of charge variants of a recombinant monoclonal antibody using microfluidic capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 625. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114214>.
- Tang L., Sundaram S., Zhang J., Carlson P., Matathia A., Parekh B., Zhou Q., Hsieh M., (2013). Conformational characterization of the charge variants of a human IgG1 monoclonal antibody using H/D exchange mass spectrometry, *mAbs*, 5(1), 114–125. <https://doi.org/10.4161/mabs.22695>.
- Tatli O., Oz Y., Dingiloglu B., Yalcinkaya D., Basturk E., Korkmaz M., Akbulut L., Hatipoglu D., Kirmacoglu C., Akgun B., Turk K., Pinar O., Akbulut B. S., Atabay Z., Turanli E. T., Kazan D., Doganay G. D., (2023). A two-step purification platform for efficient removal of Fab-related impurities: A case study for Ranibizumab. *Heliyon*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21001>.
- Teplyakov A., Obmolova G., Malia T. J., Luo J., Muzammil S., Sweet R., Almagro J. C., Gilliland G. L., (2016). Structural diversity in a human antibody germline library. *mAbs*, 8(6), 1045–1063. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1190060>.
- Teshima G., Li M.X., Danishmand R., Obi C., To R., Huang C. Kung, J., Lahidji V., Freeberg J., Thorner L., (2011). Separation of oxidized variants of a monoclonal anti-body by anion-exchange. *J. Chromatogr. A.*, 1218, 2091–2097. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.107>.
- Trnovec H., Doles T., Hribar G., Furlan N., Podgornik A., (2020). Characterization of membrane adsorbers used for impurity removal during the continuous purification of monoclonal antibodies. *J. Chromatogr A*, 1609. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460518>.

- Vajda J., Müller E., (2017), Hydrophobic interaction chromatography for the purification of antibodies. *Process Scale Purification of Antibodies*, <https://doi.org/10.1002/9781119126942.ch7>.
- van Beers, M. M. C., & Bardor, M., (2012), Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnol. J.*, 7, 1473–1484. <https://doi.org/10.1002/biot.201200065>.
- Vanderlaan M., Zhu-Shimoni J., Lin S., Gunawan F., Waerner T., Van Cott K. E., (2018). Experience with Host Cell Protein Impurities in Biopharmaceuticals. *Biotechnol. Prog.*, 34, 828–837. <https://doi.org/10.1002/btpr.2640>.
- Vlasak, J., Ionescu, R., (2008). Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 9(6), 468–481. <https://doi.org/10.2174/138920108786786402>.
- Vivaraes D., Belloni L., Tardieu A., Bonnete F., (2002). Catching the PEG-induced attractive interaction between proteins. *Eur. Phys. J.*, 9, 15–25. <https://doi.org/10.1140/epje/i2002-10047-7>.
- Vlasak J., Bussat M.C., Wang S., Wagner-Rousset E., Schaefer M., Klinguer-Hamour C., Kirchmeier M., Corvaia N., Ionescu R., Beck A., (2009). Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody. *Anal. Biochem.*, 392, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.043>.
- Walsh, G., Walsh, E., (2022). Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nat. Biotechnol.*, 40(12), 1722–1760. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>.
- Wang Z., Wang G., Lu H., Li H., Tang M., Tong A., (2022). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Mol. Biomed.*, 3(35). <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00100-4>.
- Wessner M., Nowaczyk M., Brandenbusch C., (2020). Rapid identification of tailor-made aqueous two-phase systems for the extractive purification of high-value biomolecules. *J. Mol. Liq.*, 314. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113655>.
- Whitaker N., Pace S. E., Merritt K., Tadros M., Khossravi M., Deshmukh S., Cheng Y., Joshi S. B., Volkin D. B., Dhar P., (2022). Developability Assessments of Monoclonal Antibody Candidates to Minimize Aggregation During Large-Scale Ultrafiltration and Diafiltration

(UF-DF) Processing. *J Pharm Sci*, 111(11), 2998-3008.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.08.001>.

Yan Y., Wei H., Fu Y., Jusuf S., Zeng M., Ludwig R., Krystek S.R., Chen G. Tao L., Das T.K., (2016). Isomerization and Oxidation in the Complementarity-Determining Regions of a Monoclonal Antibody: A Study of the Modification-Structure-Function Correlations by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 88, 2041–2050.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02800>.

Zang Y., Kammerer B., Eisenkolb M., Lohr K., Kiefer H., (2011). Towards protein crystallization as a process step in downstream processing of therapeutic antibodies: Screening and optimization at microbatch scale. *PLoS One*, 6, 3– 10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025282>.

Zhang Y.T., Hu J., Pace A.L., Wong R., Wang Y.J., Kao Y.-H., (2014) Characterization of asparagine 330 deamidation in an Fc-fragment of IgG1 using cation exchange chromatography and peptide mapping. *J. Chromatogr. B*, 965, 65–71.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.06.018>.

Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piatkowski W., Antos D., (2023). Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool. *J. Chromatogr. A*, 1701.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464070>.

7. Wykaz pozostałych osiągnięć

Konferencje:

- 1) Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., “*Coupling preferential precipitation and IEX for reducing acidic variant content in monoclonal antibody pools*”. PREP 2022 (35th), Baltimore, USA, (wystąpienie **L-305**), <http://www.prepsymposium.org/>
- 2) Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., “*Coupling preferential precipitation and IEX for reducing acidic variant content in monoclonal antibody pools*”. SPICA 2022 (18th), Lisbon, Portugal, (wystąpienie **OC04 | P45**), <http://www.spica2022.org/>
- 3) Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., “*Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants by PEG-aided Precipitation and IEX Chromatography*”, OKIChiP 2023 (24th) Szczecin (poster, **PS/108**), <https://okichip24.zut.edu.pl>
- 4) Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., “*PEG-aided precipitation for adjusting acidic variant content in monoclonal antibody pools*”, ISPPP 2023 (42nd) Wiedeń OP17 (L), <https://www.isppp.net/programme/>
- 5) Rumanek T., „*Rozdzielanie wariantów ładunkowych przeciwciał monoklonalnych poprzez proces selektywnego strącania*”, **Dokonania Naukowe Doktorantów** – edycja X – 2022 – Wielka Sesja Posterowa, zdalnie – poster, <https://www.doktorant.com.pl/index.php/2022-dnd-10>

Udział w projektach i grantach:

- 1) Uczestnictwo w projekcie grantowym PCI N3_076 w ramach III Naboru Grantowego dla projektów B+R z Podkarpackiego Centrum Innowacji pt.: „Rozdzielanie wariantów przeciwciała IgG1 w hybrydowym procesie strącania i chromatografii”.

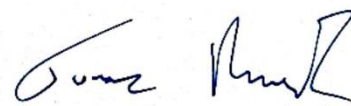
Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej

Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024b). Isolation and purification of a monoclonal antibody from a cell culture supernatant by multistage precipitation and solid-liquid extraction. *Food Bioprod. Process.*, 147, 34-41.

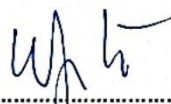
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.05.016>

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na przeprowadzeniu części badań eksperymentalnych dotyczących strącania przeciwciał monoklonalnych oraz ich ekstrakcji w układzie ciało stałe-ciecz. Mój udział w powstaniu publikacji składał się również z: interpretacji uzyskanych wyników, pomocy przy opracowaniu konceptualizacji pracy, opracowaniu metodologii badawczej, a także pisaniu oraz recenzji publikacji.

Udział w publikacji szacuję na 45%.



(podpis doktoranta)



(podpis współautora)



(podpis współautora)



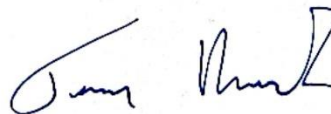
(podpis współautora)

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej

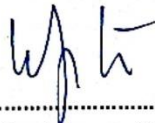
Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2022). Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Biotech. Bioeng.*, 120, 114–124.
<https://doi.org/10.1002/bit.28257>

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na przeprowadzeniu całości badań eksperymentalnych dotyczących selektywnego strącania przeciwciał monoklonalnych, interpretacji uzyskanych wyników, pomocy przy opracowaniu konceptualizacji pracy, opracowaniu metodologii badawczej, a także pisaniu oraz recenzji publikacji.

Udział w publikacji szacuję na 50%



.....
(podpis doktoranta)



.....
(podpis współautora)



.....
(podpis współautora)




.....
(podpis współautora)

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej

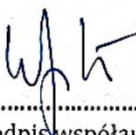
Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2024a). Countercurrent preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Chem. Eng. Res. Des. (CHERD)*, 202, 336–345, <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2024.01.001>

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na przeprowadzeniu całości badań eksperymentalnych, dotyczących selektywnego strącania przeciwciał monoklonalnych w wielostopniowym procesie przeciwprądowym. Mój udział w powstaniu publikacji składał się również z: interpretacji uzyskanych wyników, wykonywaniu symulacji obliczeniowych, pomocy przy opracowaniu oprogramowania, konceptualizacji pracy, opracowaniu metodologii badawczej, a także pisaniu oraz recenzji publikacji.

Udział w publikacji szacuję na 50%



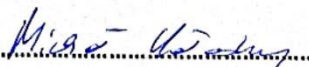
(podpis doktoranta)



(podpis współautora)



(podpis współautora)



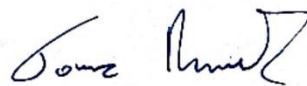
(podpis współautora)

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej

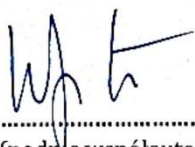
Zimoch P., **Rumanek T.**, Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., (2023). Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool. *J. Chromatogr. A*, 1701, 464070.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464070>

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na wykonaniu części pracy doświadczalnej w zakresie selektywnego strącania przeciwciał monoklonalnych. Ponadto na udziale w zakresie: konceptualizacji pracy, wykonaniu części symulacji obliczeniowych, interpretacji uzyskanych wyników, pisania i redagowania publikacji. Brałem również udział w realizacji projektu grantowego będącego podstawą finansowania badań zawartych w niniejszej publikacji.

Udział w publikacji szacuję na 20%



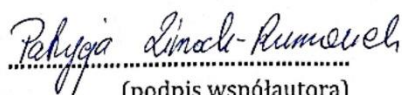
(podpis doktoranta)



(podpis współautora)



(podpis współautora)



(podpis współautora)



(podpis współautora)



Isolation and purification of a monoclonal antibody from a cell culture supernatant by multistage precipitation and solid-liquid extraction

Tomasz Rumanek^a, Michał Kołodziej^{b,*}, Wojciech Piątkowski^b, Dorota Antos^{b,2}

^a Doctoral School of the Rzeszów University of Technology, Poland

^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
 Monoclonal antibodies
 Purification
 Precipitation
 Solid-liquid extraction

ABSTRACT

A process of multistage pH mediated precipitation was developed for capture and purification of a monoclonal antibody (*mAb*) from a Chinese hamster ovary cell culture (CHO) harvest. The *mAb* was separated from low molecular mass impurities (*LMWI*) and high molecular weight impurities (*HMWI*) by a sequence of two precipitation steps or by a sequence of precipitation and solid-liquid extraction (*SLE*). In the former approach, *HMWI* were precipitated from the harvest at pH 5 in the presence of polyethylene glycol (*PEG*), whereas the obtained supernatant was subsequently subjected to precipitation at pH 8 to obtain the *mAb* of 96 % chromatographic purity in a precipitate form. In the latter approach, the *mAb* was precipitated from the harvest at pH 8 in the presence of *PEG* to isolate the *mAb* from *LMWI*, then the precipitate obtained was subjected to *SLE* to extract the *mAb* of 99 % purity in a form of liquid solution. The coupling of precipitation at pH 8 and *SLE* allowed effective removal of DNA from 9260 ng/mL in the feed to 1.4 ng/mL in the product of two-stage *SLE*, and host cell proteins (*HCP*) from 300 µg/mL to 0.07 µg/mL, which was not possible by the coupling of two precipitation stages at pH 5 and 8. Therefore, the combination of precipitation and *SLE* can be a promising technique for capture of *mAbs* from CHO cell harvests.

1. Introduction

The production of therapeutic proteins, in particular monoclonal antibodies (*mAbs*), is a dynamically developing branch of the biopharmaceutical industry (K. Li et al., 2022). The total cost of sales for *mAbs*-based drugs was \$217 billion in 2022 (Walsh & Walsh, 2022). Despite high demand for bioactive *mAbs*, the cost of their manufacturing remains still high and limits the access to new life-saving therapies (Ecker et al., 2015; Gagnon, 2012; Grobhans et al., 2018; Hernandez et al., 2018; Minervini et al., 2013; Shukla et al., 2017; Walsh & Walsh, 2022). Recent advancements in upstream processing of *mAbs* enabled improving their harvest titers from 0.2 mg/mL up to even 27 mg/mL (dos Santos et al., 2017). As a consequence, downstream processing (*DSP*) has become the manufacturing bottleneck making up to 70 % of the total production costs (Costioli et al., 2010; dos Santos et al., 2017).

The main technique used for the isolation and purification of *mAbs* in *DSP* is chromatography that allows achievement of high selectivity, efficiency and recovery rate of the separation process (Dutra et al., 2020).

Despite those advantages, chromatographic operation is a cost-driver of the whole production. This stems from a high price of chromatographic resins, which is on average 5000–14 000 € per L, and a high consumption of buffers, which is on average 300 000 – 2 000 000 L per batch (dos Santos et al., 2017; Franzreb et al., 2014). Diffusion and capacity limitations are causes of low productivity of chromatography. Furthermore, host cell proteins (*HCP*) often contaminate *mAbs* pools during capture or polishing steps, which deteriorate the product purity (Barroso et al., 2014; Chiu et al., 2017; Dhadge et al., 2014; Franzreb et al., 2014). Therefore, in last decades alternative non-chromatographic techniques for *mAbs* purification have emerged (dos Santos et al., 2017; Oelmeier et al., 2013). Among them, *PEG*-aided precipitation gained particular interest (dos Santos et al., 2017; Pons Royo et al., 2022, 2023). Addition of *PEG* to the solution of *mAbs* triggers its selective precipitation, even in the presence of impurities. The obtained precipitate is not particularly sensitive to shear forces (Satzler et al., 2020). Moreover, the precipitation process is fast and easy to scale up and does not require sophisticated equipment. Economic analyzes provided in the literature showed that

* Correspondence to: Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland.

E-mail address: m.kolodziej@prz.edu.pl (M. Kołodziej).

¹ orcid.org/0000-0003-1742-3133

² orcid.org/0000-0001-8246-5052

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.05.016>

Received 7 February 2024; Received in revised form 23 May 2024; Accepted 28 May 2024

Available online 6 June 2024

0960-3085/© 2024 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

precipitation generates lower costs compared to chromatography which requires high material consumption in terms of buffer and resin usages (Cataldo et al., 2020; Großhans et al., 2019; Pons Royo et al., 2023). The reduction in buffer consumption allows reduction in volume of industrial equipment required for the process realization (Cataldo et al., 2020; Großhans et al., 2019; Pons Royo et al., 2023). Those advantages make precipitation competitive with chromatography, which particularly holds true for expensive protein A chromatography. Thus, precipitation can potentially replace chromatographic operations in DSP, or it can be integrated with chromatography to improve productivity and reduce operational costs (Chollangi et al., 2015; Großhans et al., 2018).

Recent studies described several examples of efficient capture of mAbs from Chinese hamster ovary (CHO) harvests; Pons Royo et al. (Pons Royo et al., 2023), Sommer et al. (Sommer et al., 2015) and Ferreira-Faria et al. (Ferreira-Faria et al., 2023) developed processes of PEG-aided mAb precipitation in plug-flow reactors. Sommer et al. (Sommer et al., 2014) performed selective precipitation of mAbs from PEG solutions in an automated stirred tank reactor operated batchwise in a lab scale. Mineveini et al. (Minervini et al., 2013), Burgstaller et al. (Burgstaller et al., 2019) and Li et al. (Z. Li et al., 2019) described an integrated process, which coupled precipitation and tangential flow microfiltration. In previous studies, we used PEG-aided precipitation for adjusting the variant composition in mAbs pools. In that approach, precipitation was performed as a stand-alone operation (Rumanek et al., 2023) or it was combined with ion exchange chromatography (Zimoch et al., 2023).

In this study, we have developed a multistage process for efficient capture of a mAb from a CHO harvest. The process is accomplished in two pH mediated steps, in which the mAb is isolated from low molecular weight impurities (LMWI) and high molecular weight impurities (HMWI). Different sequences of the purification steps were examined. In the most efficient option, the mAb was isolated from LMWI by two-stage precipitation in the first step, and from HMWI, DNA and host cell proteins (HCP) by solid-liquid extraction (SLE) in the second step.

2. Background

As mentioned above, two alternative options have been considered for the mAb capture and purification:

- in the first option termed as PREC5-PREC8, HMWI present in the CHO harvest (Feed) are at first precipitated in the presence of PEG solutions (Sol) at pH 5 (PREC5, Fig. 1A). After the phase separation, the precipitate containing HMWI is rejected, whereas the supernatant is subjected to two-stage precipitation at pH 8 (PREC8, Fig. 1B) to remove LMWI. The product of the process is the purified mAb in the precipitate form.
- in the second option termed as PREC8-SLE, PREC8 is performed in the first step to remove LMWI (Fig. 1B). The precipitate containing the mAb and HMWI is subjected to two-stage SLE at pH 5 (Fig. 1C). The product of the process is the pool of the extracts (EX1, EX2) containing the purified mAb.

3. Experimental

3.1. Materials

All chemicals were of analytical grade, unless stated otherwise. Disodium phosphate, hydrochloric acid and sodium acetate were purchased from (Chempur Piekary Śląskie, Poland), acetic acid, orthophosphoric acid and sodium chloride were purchased from Avantor (Gliwice, Poland), polyethylene glycol 3.350 kDa (PEG) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Elisa reagents, OPD tablets and stable peroxide substrate buffer 10x were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Tween-20, PBS tablets pH 7.4 and bovine serum albumin heat shock

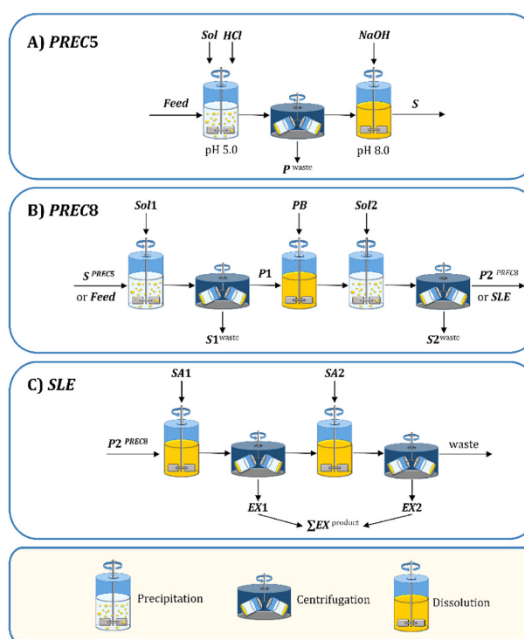


Fig. 1. Flowsheet scheme of the purification process. A) Precipitation of HMWI at pH 5 (PREC5), B) two-stage crosscurrent precipitation at pH 8 (PREC8), C) two-stage solid-liquid extraction of the precipitate at pH 5 (SLE).

fraction with purity, $P_u \geq 98\%$ were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), sulfuric acid $P_u = 95\%$ were purchased from Avantor (Gliwice, Poland). Recombinant Human IL-23 – lyophilisate $\geq 98\%$ was purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse anti-human IgG monoclonal antibody solutions of 1.1 mg/mL were purchased from Abcam (Cambridge, UK).

The CHO harvest of pH 8.0 was provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Polska). It contained a monoclonal antibody, mAb2 (MW = 148 kDa, the isoelectric point $pI = 8.2$) of the concentration about 3.0 mg/mL. The CHO harvest composition was determined by size exclusion chromatography HPLC (SEC-HPLC, Section 3.2.1) and expressed as a percentage peak area fraction (SEC-ratio) as follows: 1.9 % HMWI, 73.5 % LMWI, 0.6 % Agg (mAb2 dimeric forms), 23.9 % Mono (mAb2 monomeric forms). The DNA concentration in the harvest was determined using a dsDNA assay kit and amounted to 9260 ± 75 ng/mL, whereas the HCP concentration determined using a CHO HCP ELISA kit amounted to 300 $\mu\text{g/mL} \pm 5$.

3.2. Methods

3.2.1. SEC-HPLC analysis

The SEC-HPLC analysis was performed using the Dionex Ultimate 3000 BioRS system (Thermo Scientific Inc., Waltham, USA) equipped with the ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column (Waters) with I.D. 0.46 cm and length 30 cm, packed with a resin with particle size of 1.7 μm and pore size of 200 \AA . The mobile phase was 100 mM phosphate buffer with pH 6.8, with the flowrate 0.3 mL/min. The UV signal of the protein was monitored at 280 nm and corrected by subtraction of a blank run of the same solution, but without the protein sample.

3.2.2. Determination of the DNA concentration

Quant-iT Picogreen dsDNA assay kit (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) was used for the determination of the double-

stranded DNA (dsDNA) concentration according to the manufacturer's instruction. Samples of the processed *mAb2* solutions and the DNA standard were diluted with 1xTE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.5). The obtained solutions were transferred into 96-well black bottom plates and mixed in a ratio 1:1 with diluted color reagent solutions. Fluorescence intensity was measured in a microplate reader (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific); the extinction and emission wavelength were 480 and 520 nm, respectively. The concentration of dsDNA was calculated based on the calibration curve determined for solutions of the DNA standard of different concentrations.

3.2.3. Determination of the HCP concentration

CHO HCP ELISA kit (abcam, AB240996) was used to determine the residual CHO HCP concentration according to manufacturer's instruction. The processed *mAb2* solutions and standards were transferred into 96-well plates contained in the kit and incubated for 90 min at room temperature. Next, the solutions were discarded and the plate was washed two times with a wash buffer. Then, the Reporting Antibody was added into each well, the plate was covered with sealing film and incubated for 45 min at room temperature. In the next step, the solutions were discarded, the plate was washed and the solution of the Streptavidin-HRP conjugate was added into each well. The plate was again incubated for 30 min at room temperature. Next, the TMB Substrate was added and the plate was incubated for 10 min at room temperature. In the last step, the Stop Solution was added, and absorbance was measured by a microplate reader (Tecan 145 Group Ltd, Männedorf, Switzerland). The HCP concentration was calculated using the UV calibration curve.

3.2.4. Preparation of stock solutions

Prior to the use, the CHO harvest was centrifuged for 20 min at 5000 rpm, at 20°C. The supernatant was withdrawn using an automatic pipette and filtered using syringe filters (0.22 µm PES membrane from Alchem, Rzeszow, Poland). To mimic different titers of the biological material, the harvest was diluted in 50 mM phosphate buffer pH 8 (PB) or spiked with the purified *mAb2*.

The PEG stock solutions were prepared by dissolving PEG (50 % w/v) in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0 (SA) or (40 % w/v) in PB. The PEG stocks were diluted to the concentrations within the range 26–50 % w/v in SA or 26–40 % w/v in PB, and used for precipitation.

3.2.5. Separation of *mAb2* from LMWI by two-stage precipitation at pH 8 (PREC8)

The CHO stock solution was mixed with an adequate portion of PEG in PB to obtain the desired concentration of PEG in each precipitation stage. In the small-sample experiments, the solution (up to 4 mL) was incubated at 20°C for 25 min while stirring in a rotating mixer (Benchmark Scientific Inc, Sayreville, USA) at 35 rpm in 5-mL Eppendorf tubes. In the large-sample experiments, the incubated solution (up to 200 mL) was stirred with a magnetic stirrer in a 250 mL flask at 300 rpm. After the incubation, the precipitate and the supernatant were separated by centrifugation for 5 min at 5000 rpm. Next, the supernatant and the precipitate obtained were dissolved in PB and subjected to the SEC-HPLC analysis. To determine the *mAb2* concentration, the protein standard delivered by the manufacturer was used (Figure S1, Supplementary materials).

PREC8 was performed in crosscurrent flow regime, as is shown in Fig. 1B. The volume ratios of individual streams to the CHO stock solution (*Feed*) are provided in Table 1. *Feed* was mixed with the PEG solution (*Sol1*) in the first stage and subjected to precipitation. Then, the precipitate (*P1*) was directed to the second stage, whereas the supernatant (*S1*) was rejected as a waste. In the stage 2, the precipitate *P1* was dissolved in PB, and subjected again to precipitation by contacting with a portion of a fresh PEG solution (*Sol2*). The *S2* stream outcoming the stage 2 was rejected, whereas the precipitate *P2* was the precipitation

Table 1

Volume ratios of the streams delivered to the purification unit related to the *Feed* volume (v/v).

sample volume	PREC5-PREC8 small sample	PREC8-SLE lab	large sample
HCl	0.045	-	-
*			
<i>Sol</i>	0.120	-	-
*			
NaOH	0.028	-	-
*			
<i>Sol1</i>	0.41	1	1
PB	0.24	0.25	0.2
<i>Sol2</i>	0.36	0.25	0.093
SA1*,*	-	0.2	0.075
SA2*,*	-	0.2	0.025

* used only in PREC5, ** used only in SLE

product.

3.2.6. Separation of *mAb2* from HMWI by precipitation at pH 5 (PREC5)

1 M HCl was dropwise added to *Feed* while stirring in an Eppendorf tube until pH was reduced to 5.0 (Fig. 1A). Then, an adequate portion of the PEG stock solution of pH 5 was added (*Sol*), and the mixture obtained was stirred at 20°C for 10 min in the rotating mixer at 35 rpm. The supernatant and the precipitate were separated by centrifugation for 5 min at 5000 rpm. The supernatant was withdrawn using an automatic pipette and analyzed by SEC-HPLC. A 1 M NaOH solution was added to the supernatant to adjust pH to 8. The volume composition of the solutions is provided in Table 1.

3.2.7. Separation of *mAb2* from HMWI by SLE

The precipitate obtained after PREC8 was placed in an Eppendorf tube and covered with a portion of SA (pH 5.0) (SA1, Table 1, Fig. 1C). The solution was stirred at 20°C for 15 min with a magnetic stirrer at 300 rpm. The obtained slurry was centrifuged for 5 min at 5000 rpm, then the extract, EX1 (Fig. 1C), was withdrawn using an automatic pipette and analyzed by SEC-HPLC. The precipitate obtained after the phase separation was covered with a fresh portion of the buffer (SA2, Table 1, Fig. 1C), stirred, and then the extract EX2 was separated under the same conditions. The extracts of both stages (EX1 and EX2) were pooled together as the product of the whole process.

4. Results and discussion

4.1. Separation of *mAb2* from LMWI by PREC8

4.1.1. Assessment of kinetics and equilibrium of precipitation

pH of the solution used for the process realization was selected on the basis of preliminary screening experiments. At pH 8 *mAb2* showed the lowest solubility. Therefore, precipitation at pH 8 allowed reduction in the consumption of the buffer and PEG, and improvement in the selectivity toward the LMWI removal.

The solution of PEG in PB was used to precipitate *mAb2* from *Feed*, which enabled the removal of LMWI (Fig. 1B). The kinetics of precipitation depended on the PEG concentration that determined the driving force for precipitation. In any case, quasi-equilibrium of the *mAb2* precipitation established quickly, i.e., within about 20 min and remained undisturbed for 5 h (Figure S2, Supplementary materials). After that time interval, the protein aggregation was observed. Similar results were obtained for the precipitation of the purified *mAb2* in the previous study (Rumanek et al., 2023). The protein concentration in the supernatant at quasi-equilibrium, is further termed as “solubility” and the quasi-equilibrium as “precipitation equilibrium”.

The yield of *mAb2* depended on its solubility, which was determined by the concentration of PEG and ionic strength of the solution used for precipitation. As can be observed from Table 2, ionic strength of the

Table 2
Ionic strength of the solutions used for precipitation at pH 8.

	without PEG		$C_{PEG} = 13\% \text{ w/v}$		
Feed: PB v/v	1:0	0:1	1:1	0.1:1	0:1
cond. mS/cm	17.61	8.46	8.50	5.04	5.01

solution depended on the volumetric ratio of Feed to PB and the PEG concentration. Feed had higher ionic strength than PB, hence dilution of Feed in PB yielded solutions with lower ionic strengths. This means that ionic strength of the processed solutions decreased from stage to stage approaching the ionic strength of PB.

The dependencies of the mAb2 solubility on the PEG concentration, the initial concentration of mAb2 and the ionic strength of the solution are presented in Figs. 2A and 2B.

It is evident that for the PEG concentrations higher than about 13 % w/v, the protein solubility was not affected by ionic strength of the solution (Fig. 2A) and by the initial concentration of mAb2 (Fig. 2B). The latter implies that water uptake from the solution by the precipitate compared with the solution volume was negligible.

4.1.2. Optimization of the LMWI removal in PREC8

The effectiveness of the LMWI removal by PREC8 (Fig. 1B) was examined for different PEG concentrations in the solution. The content of mAb2, LMWI and HMWI in the precipitate, which was the product of the process in PREC8 was determined by the SEC-HPLC analysis in the form of the peak area ratio (Figures S3 and S4 in Supplementary materials). The mAb2 yield was calculated for each stage as the percentage ratio of the mass of mAb2 obtained in the precipitate to the mass of mAb2 delivered in the incoming stream. The effectiveness of the mAb2 capture versus the PEG concentration in the solution is demonstrated in Figs. 3A and 3B.

The content of mAb2 (SEC-ratio) in the precipitate obtained after the first PREC8 stage reached a maximum at 13 % w/v PEG, at which LMWI content reached a minimum (Fig. 3A). The content of HMWI decreased with increasing PEG concentration; up to $C_{PEG} = 13\% \text{ w/v}$ the reduction in the HMWI content was substantial, whereas above that value it stabilized at the level of about 12 %. For C_{PEG} higher than about 13 % w/v, the concentration of LMWI exceeded their solubility limit, which caused their transfer to the solid phase and contamination of the precipitate. The repetition of the precipitation of mAb2 in the second stage (Fig. 3B) allowed the removal of LMWI to the level of 1 %. Nevertheless, it is evident that PREC8 did not allow complete removal of HMWI and the mAb2 aggregates as both co-precipitated with the monomeric mAb2.

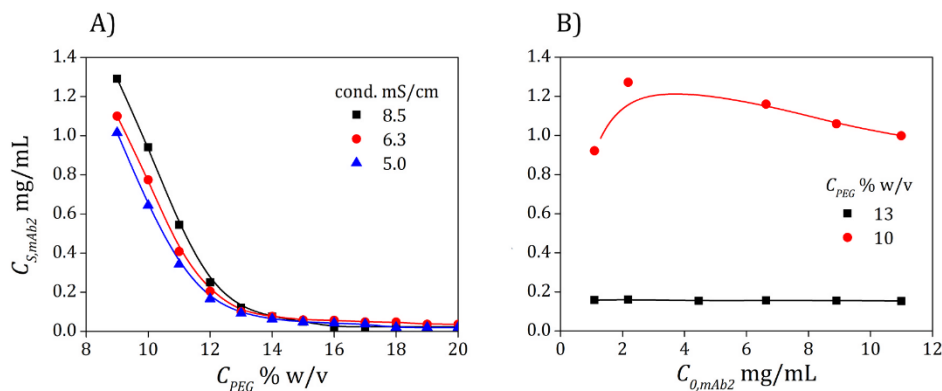


Fig. 2. Illustration of the precipitation equilibrium for mAb2 at pH 8. A) Dependence of the mAb2 solubility in the supernatant ($C_{s,mAb2}$) on the initial PEG concentration, C_{PEG} , and ionic strength of the solution, B) dependence of $C_{s,mAb2}$ on the initial concentration of mAb2 in the solution, $C_{0,mAb2}$, at ionic strength corresponding to 8.5 mS/cm (conditions of the first stage of PREC8).

4.2. Solid-liquid extraction of mAb2 from the precipitate

To recover mAb2 from the precipitate obtained from PREC8, SLE was performed by contacting the precipitate with SA. SLE at pH 5 allowed the elimination of HMWI, as they were insoluble at pH 5 or below pH 5. Reduction in pH below pH 5 did not improve selectivity. For buffers with pH > 5, HMWI were transferred with different extents to the extract phase contaminating the mAb2 solution, which was the final purification product. Therefore, SA of pH 5 was selected for the realization of SLE. Fig. 4 demonstrates the effectiveness of SLE, in terms of the purity and yield of mAb2, as a function of the buffer consumption (mL SA) per mass of the processed mAb2 in precipitate ($mg_{P,mAb2}$). A significant increase in the yield can be observed for increasing buffer consumption up to 0.2 mL per $mg_{P,mAb2}$. Above that value, the gain in the yield was insignificant. This may indicate that a small amount of mAb2 was irreversibly adhered to HMWI in the precipitate.

4.3. Separation of mAb2 from HMWI by PREC5

In PREC5, pH of Feed was adjusted to pH 5 and subjected to precipitation in the PEG solution in SA at pH 5.0. Under those conditions HMWI and a certain part of the aggregates precipitated from the solution, whereas mAb2 remained in the supernatant. Kinetics of the precipitation were fast, similarly to that measured for PREC8. The effectiveness of the separation in terms of the HMWI reduction and the mAb2 yield versus the PEG concentration is illustrated in Fig. 5.

The content of HMWI in the supernatant could be reduced to about 0.005 % at $C_{PEG} = 5.0\% \text{ w/v}$. For C_{PEG} higher than 5.0 % w/v, the mAb2 solubility in the solution dropped, which caused reduction in the mAb2 yield. Therefore, $C_{PEG} = 5.0\%$ was selected for the effective removal of HMWI from Feed. In the following precipitation step, PREC8, mAb2 was isolated from LMWI. To induce precipitation of mAb2, pH of the supernatant provided by PREC5 was adjusted from pH 5 to pH 8. That twofold pH adjustment of pH from pH 8 to pH 5 and back to pH 8 caused almost twofold dilution of the mAb2 solution. Therefore, to achieve the supersaturation level necessary for precipitation of mAb2, the obtained solution had to be concentrated. This required participation of an additional membrane process. Furthermore, though PREC8-SLE was only slightly more efficient in the HMWI removal compared with PREC5-PREC8, but the efficient DNA and HCP removal could be achieved only by PREC8-SLE (Tables 3–5). The coupling of PREC8 with SLE allowed for reduction in the DNA concentration from 9260 ng/mL in the feed to 1.4–2 ng/mL in the extract after the second stage of SLE and HCP from 300 $\mu\text{g/mL}$ to 0.07–0.08 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, PREC8-SLE was accepted as the most

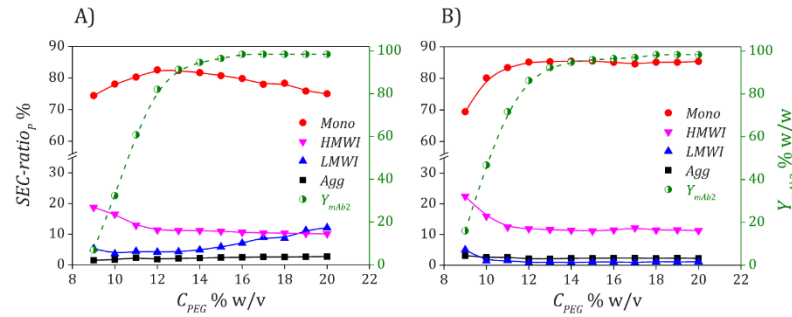


Fig. 3. Composition of the precipitate after PREC8. A) First stage of the precipitation from *Feed*, the initial solution conductivity was 8.5 mS/cm, the initial *mAb2* concentration $C_{0,mAb2} = 1.4$ mg/mL, B) second precipitation stage, the solution conductivity was 5.04 mS/cm, $C_{0,mAb2} = 1.2$ mg/mL.

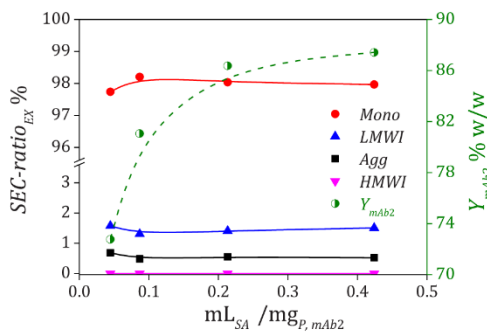


Fig. 4. Efficiency of *SLE* (after the first stage of *PREC8*) at pH 5 versus the buffer consumption in mL of SA per mg of the *mAb2* in precipitate.

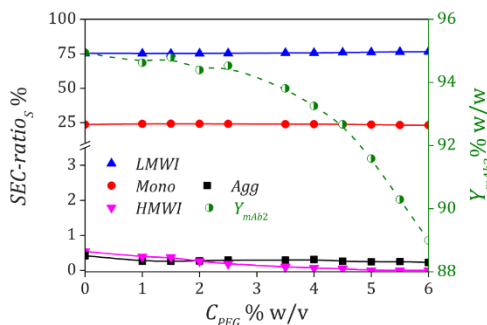


Fig. 5. Content of HMWI, LMWI and *mAb2* in the supernatant (*SEC-ratio_S*) and the *mAb2* yield in *PREC5* versus the PEG concentration in the solution.

promising concept for the *mAb2* capture. That concept was successfully verified in a large-sample experiment, in which approximately 200 mL of the *mAb2* solution was processed. This is demonstrated in Tables 4 and 5, which provide process variables and the purities of the processed solutions, and in Fig. 6, which illustrates the results of the SEC-HPLC analysis of *Feed* (Fig. 6A), the product of *PREC8-SLE* and a *mAb2* standard (Fig. 6B). Additionally, SDS-PAGE analysis was performed, which is illustrated in Figure S5 in Supplementary materials. Both SEC-HPLC and SDS-PAGE analysis indicate a high purity of the product obtained. The performance indicators obtained were similar for both small- and large-sample experiments.

In each step, a part of the protein solution was withdrawn and subjected to the concentration analysis. However, the yield reported in Table 5 was calculated based on the whole *mAb2* mass obtained, including the mass taken for the concentration analysis.

The final antibody concentration in the product depended on the volume of SA used in *SLE*. In the small-sample experiments, a relatively large portion of the solution was used for the concentration analysis and filtration. For that reason, the solution was diluted with an extra-portion of SA, which caused reduction in the protein concentration.

The overall yield was about 75 % for both small and large sample *PREC8-SLE* experiments. The CHO harvest delivered by the manufacturer was characterized by a relatively low *mAb2* titer of about 3 mg/mL. Consequently, the initial *mAb2* concentration in the first *PREC8* step was approximately 1.4 mg/mL. As can be seen from Fig. 2, the equilibrium *mAb2* concentration established in that stage at $C_{PEG} = 13$ % w/v was about 0.15 mg/mL. The residues of the protein in the supernatant made 10–15 % of the protein mass, which was wasted. The process yield could be markedly improved by increase in the initial *mAb2* concentration while maintaining the same PEG content. For example, if the initial concentration of *mAb2* was 10 mg/mL, yield would make 96 % for *PREC8* and 85 % for *PREC8-SLE*.

The buffer consumption was 760 mL in the small-sample experiments and 560 mL per 1 g of *mAb2* in the large-sample experiment (Table S1, Supplementary materials). The higher buffer consumption in the large-sample experiment resulted from a high volume ratio of the solution taken for the concentration analysis and lost in the filtration units to the total solution volume processed. The *mAb* activity in the obtained products was preserved (Figure S5, Supplementary materials). The results obtained indicate that *PREC8-SLE* has a potential to replace protein A chromatography-based capture steps in *DSP*.

4.4. Comparison of the separation efficiency by protein A chromatography and *PREC8-SLE*

The product yield that can be achieved in the developed process was lower than that in protein A chromatography. Nevertheless, its main advantage is possibility of reduction in costs of the *mAb* production. As shown in this study, the precipitation process is characterized by lower buffer consumption, and it does not require using the expensive protein A resin. Protein A-based chromatographic separation consists of a few stages including: column equilibration, protein capture, column washing, protein elution, and the column sanitization. Typical binding capacity of the protein A resins ranges from 20 to 50 g *mAb* per L resin, but it is often lower due mass transport limitations. Therefore, the protein mass loaded into the column often exceeds the binding capacity of the resin, thus the capture step has to be repeated in subsequent cycles. According to the manufacturer of *mAb2*, the total buffer consumption ranges from 1500 to 2000 mL per 1 g of *mAb2*. In the large-

Table 3

Process variables and the purity in the lab-scale *PREC5-PREC8*. Feed: 1.9 % HMWI, 73.5 % LMWI, 0.6 % Agg, 23.9 % Mono and the DNA concentration 9260 ± 75 ng/mL.

	C_{PEG}	C_{mAb2}	m_{mAb2}	phase	C_{mAb2}	m_{mAb2}	SEC-ratio % <i>mAb2</i>		<i>imp</i>		C_{DNA}
	% v/w	mg/mL	mg		mg/mL	mg	Agg	Mono	LMWI	HMWI	ng/mL
small sample											
<i>PREC5</i>	5	2.28	26.51	S	1.96	23.26	0.27	20.4	79.2	0.13	3349±45
St. I	14	1.45	9.82	S1	0.08	0.54	0.00	1.19	98.8	0.00	2108±29
<i>PREC8</i>				P1	8.85	9.14	1.90	92.2	4.74	1.12	2450±32
St. II	14	5.78	7.08	S2	0.05	0.05	0.00	14.0	86.0	0.00	697±11
<i>PREC8</i>				P2	6.47	6.68	1.95	96.8	0.51	0.71	1203±12

Table 4

Process variables and the purity obtained in stage I and stage II of *PREC8* and in stage I and stage II of *SLE* (Figs. 1B, 1C) in the small- and large-sample experiments and, the Feed composition as in Table 3.

	C_{PEG}	C_{mAb2}	m_{mAb2}	phase	C_{mAb2}	m_{mAb2}	SEC-ratio % <i>mAb2</i>		<i>imp</i>		C_{DNA}
	% v/w	mg/mL	mg		mg/mL	mg	Agg	Mono	LMWI	HMWI	ng/mL
small sample											
St. I <i>PREC8</i>	13	1.34	5.34	S1	0.18	0.72	0.3	2.8	96.8	0.1	3910± 50
				P1	8.94	4.58	1.9	87.5	4.4	6.2	1686± 21
St. II <i>PREC8</i>	13	4.47	1.79	S2	0.12	0.05	4.8	30.0	63.7	1.5	410±9.5
St. I <i>SLE</i>		SA1 = 0.09 mL/mg _{P,mAb2}		EX1	9.17	1.48	0.6	99.4	0.0	0.0	23±3
St. II <i>SLE</i>		SA2 = 0.74 mL/mg _{P,mAb2}		EX2	0.72	0.12	0.2	99.8	0.0	0.0	2±0.5
large sample											
St. I <i>PREC8</i>	13	1.44	286.6	S1	0.19	36.9	0.1	2.2	97.7	0.0	2725±31
				P1	11.9	249.3	2.1	88.1	5.8	4.1	1611±17
St. II <i>PREC8</i>	13	8.13	240.2	S2	0.13	3.7	4.5	20.4	70.3	4.8	784 ±9
St. I <i>SLE</i>		SA1=0.03 mL/mg _{P,mAb2}		EX1	23.4	182.6	0.4	99.1	0.5	0.0	15±1.1
St. II <i>SLE</i>		SA2=0.05 mL/mg _{P,mAb2}		EX2	7.74	20.3	0.2	98.8	1.0	0.0	1.4±0.1

Table 5

Comparison of the performance indicators (the product purity, its concentration and yield, Y) for *PREC5-PREC8* and *PREC8-SLE* processes.

	collected phases	C_{mAb2}	Y_{mAb2}	SEC-ratio % <i>mAb2</i>		<i>imp</i>		C_{DNA}	C_{HCP}
		mg/mL	% w/w	Agg	Mono	LMWI	HMWI	ng/mL	µg/mL
<i>PREC5-PREC8</i> small sample	P2	6.5	77.0	1.9	96.8	0.5	0.7	1203±12	125±5
<i>PREC8-SLE</i> small sample	EX1	9.2	72.5	0.6	99.4	0	0	23 ± 3	0.15±0.02
	EX1+EX2	4.9	78.3	0.6	99.4	0	0	12± 1.7	0.08±0.01
<i>PREC8-SLE</i> large sample	EX1	23.4	66.1	0.4	99.1	0.5	0	15 ± 1.1	0.14±0.01
	EX1+EX2	19.5	73.5	0.4	99.1	0.6	0	12± 0.8	0.07±0.01

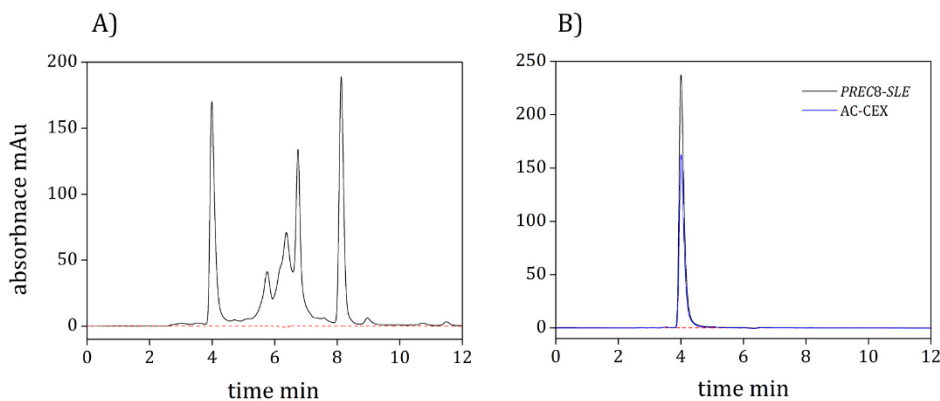


Fig. 6. SEC-HPLC chromatograms obtained for: A) the Feed solution, B) the product after the *mAb2* purification by *PREC8-SLE* and a *mAb2* standard delivered by the manufacturer, which was purified by the sequence of protein A chromatography (AC) and cation exchange chromatography (CEX).

sample precipitation experiments, fourfold less buffers was used (Table S1, Supplementary materials). As mentioned above, the buffer consumption in the small-sample experiments was higher due to the

high volume of the solution taken for the concentration analysis and lost in the filtration units in relation to the total volume of the processed solution. The protein A-based resin allows for the HCP reduction in

range of log removal value (*LRV*) 2.5–3.0 (Reese et al., 2020). The *LRV* value in the product *PREC8-SLE* was about 3.5. High efficiency in the *HCP* removal may reduce the number of operations to be used in the polishing step.

In the elution phase in protein A chromatography, buffers with pH 4 are typically used. The *mAb2* solution after *PREC8+SLE* had pH 5. In both the methods, it is necessary to perform a complete protocol of low pH viral inactivation at pH below 3.6 for 30 – 60 min (ICH Q5A (R2) "Guideline on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin"). However, *PREC8-SLE* provides possibility of fast adjustment pH directly in the reactor.

Precipitation is characterized by fast kinetics, which is not significantly affected by the harvest concentration. The processing time is short, which is a factor of major importance for the *mAb* production.

Both precipitation and *SLE* are relatively easy to scale up by an increase in the reactor volume. Since they are characterized by fast kinetic rates, they can be realized in a continuous mode, i.e., in continuous stirred tank reactors coupled with continuous filtration units.

5. Conclusions

A concept for purification of a monoclonal antibody (*mAb2*) was developed, which was based on a sequence of PEG-aided and pH mediated precipitation (*PREC5-PREC8*) or combination of PEG-aided precipitation and solid phase extraction (*PREC8-SLE*). The first step of *PREC5-PREC8*, was performed at pH 5, which was below isoelectric point of *mAb2* ($pI = 8.2$). Under those conditions the solubility of *mAb2* was much higher compared with *HMWI*, which allowed selective transfer *HMWI* to the precipitate and *mAb2* to the supernatant. Next, *mAb2* was precipitated from the obtained supernatant at pH 8, for which solubility of *mAb2* was low, which allowed its isolation from *LMWI* that remained in the liquid phase. The method allowed the effective removal of *HMWI* and *LMWI*; the chromatographic purity of *mAb2* in the product was about 96 %. The drawback of *PREC5-PREC8* was the necessity of double pH adjustments which caused dilution of the protein solution. Moreover, that method did not allow effective removal of DNA and *HCP*, which partially contaminated the product.

In *PREC8-SLE*, *LMWI* were removed in the first step at pH 8 which was pH of the biological material to be processed. In the second step, the precipitate containing *mAb2* was subjected to *SLE* at pH 5 to extract *mAb2* from the solid phase. In that approach, the extract contained *mAb2* with 99 % chromatographic purity, with the content of *HCP* 0.07 µg/mL, and DNA 1.4 ng/mL, at the *mAb2* yield 78 % in the small-sample experiment, and 74 % in the large-sample experiment. *PREC8-SLE* preserved all benefits of the precipitation process: low costs, high throughput, ease in realization. The main advantages of *PREC8-SLE* are: avoiding expensive resins, low buffer consumption, fast process kinetics and high product purity. Hence, *PREC8-SLE* has a potential to be applied for the capture of monoclonal antibodies from CHO harvests as a replacement of protein A chromatography. The obtained product might be directly subjected to polishing steps of *DSP* for final purification.

CRedit authorship contribution statement

Wojciech Piątkowski: Conceptualization, Data curation, Writing – review & editing. **Tomasz Rumanek:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Dorota Antos:** Conceptualization, Data curation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Michał Kołodziej:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments

Financial support of this study by Narodowe Centrum Nauki (UMO-2018/31/N/ST8/02538) is gratefully acknowledged. We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland for the supplement of biological material.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.fbp.2024.05.016](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.05.016).

References

- Barroso, T., Casimiro, T., Ferraria, A., Mattioli, F., Aguiar-Ricardo, A., Roque, A., 2014. Hybrid Monoliths for Magnetically-Driven Protein Separations. *Adv. Funct. Mater.* 24 <https://doi.org/10.1002/adfm.201400022>.
- Burgstaller, D., Jungbauer, A., Satzer, P., 2019. Continuous integrated antibody precipitation with two-stage tangential flow microfiltration enables constant mass flow. *Biotechnol. Bioeng.* 116 (5), 1053–1065. <https://doi.org/10.1002/bit.26922>.
- Cataldo, A.L., Burgstaller, D., Hribar, G., Jungbauer, A., Satzer, P., 2020. Economics and ecology: Modelling of continuous primary recovery and capture scenarios for recombinant antibody production. *J. Biotechnol.* 308, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.12.001>.
- Chiu, J., Valente, K.N., Levy, N.E., Min, L., Lenhoff, A.M., Lee, K.H., 2017. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations. *Biotechnol. Bioeng.* 114 (5), 1006–1015. <https://doi.org/10.1002/bit.26237>.
- Chollangi, S., Parker, R., Singh, N., Li, Y., Borys, M., Li, Z., 2015. Development of robust antibody purification by optimizing protein-A chromatography in combination with precipitation methodologies. *Biotechnol. Bioeng.* 112 (11), 2292–2304. <https://doi.org/10.1002/bit.25639>.
- Costioli, M.D., Guillemot-Potelle, C., Mitchell-Logean, C., Broly, H., 2010. Cost of goods modeling and quality by design for developing cost-effective processes. *BioPharm. Int.* 23, 26–35.
- Dhadge, V., Rosa, S., Azevedo, A., Aires-Barros, M., Roque, A., 2014. Magnetic aqueous two phase fishing: A hybrid process technology for antibody purification. *J. Chromatogr. A* 1339. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.069>.
- dos Santos, R., Carvalho, A.L., Roque, A.C.A., 2017. Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification. *Biotechnol. Adv.* 35 (1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.005>.
- Dutra, G., Komuczki, D., Jungbauer, A., Satzer, P., 2020. Continuous capture of recombinant antibodies by ZnCl₂ precipitation without polyethylene glycol. *Eng. Life Sci.* 20 (7), 265–274. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900160>.
- Ecker, D.M., Jones, S.D., Levine, H.L., 2015. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* 7 (1), 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>.
- Ferreira-Faria, D., Domingos-Moreira, F., Aires-Barros, M.R., Ferreira, A., Azevedo, A.M., 2023. Continuous precipitation of antibodies using oscillatory flow reactor: A proof of concept. *Sep. Purif. Technol.* 317, 123924. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123924>.
- Franzreb, M., Muller, E., Vajda, J., 2014. Cost estimation for protein A chromatography: An in silico approach to mAb purification strategy. *BioProcess Int.* 12.
- Gagnon, P., 2012. Technology trends in antibody purification. *J. Chromatogr. A* 1221, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.034>.
- Großhans, S., Suhm, S., Hubbuch, J., 2019. Precipitation of complex antibody solutions: Influence of contaminant composition and cell culture medium on the precipitation behavior. *Bioprocess Biosyst. Eng.* <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02103-y>.
- Großhans, S., Wang, G., Fischer, C., Hubbuch, J., 2018. An integrated precipitation and ion-exchange chromatography process for antibody manufacturing: Process development strategy and continuous chromatography exploration. *J. Chromatogr. A* 1533, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.013>.
- Hernandez, I., Bott, S.W., Patel, A.S., Wolf, C.G., Hospodar, A.R., Sampathkumar, S., Shrank, W.H., 2018. Pricing of monoclonal antibody therapies: Higher if used for cancer? *Am. J. Manag. Care* 24 (2), 109–112.
- Li, K., Bermudez, O., Forciniti, D., 2022. Poly (ethylene) glycol (PEG) precipitation of glycosylated and non-glycosylated monoclonal antibodies. *Process Biochem.* 121, 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.07.030>.
- Li, Z., Gu, Q., Coffman, J.L., Przybycien, T., Zydney, A.L., 2019. Continuous precipitation for monoclonal antibody capture using countercurrent washing by microfiltration. *Biotechnol. Prog.* 35 (6), e2886. <https://doi.org/10.1002/btpr.2886>.
- Minervini, M., Mergy, M., Zhu, Y., Gutierrez Diaz, M.A., Pointer, C., Shinkazh, O., Oppenheim, S.F., Cramer, S.M., Przybycien, T.M., Zydney, A.L., 2013. Continuous precipitation-filtration process for initial capture of a monoclonal antibody product

- using a four-stage countercurrent hollow fiber membrane washing step. *n/a(n/a)*, 1–11 *Biotechnol. Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.28525>.
- Oelmeier, S.A., Ladd-Effio, C., Hubbuch, J., 2013. Alternative separation steps for monoclonal antibody purification: Combination of centrifugal partitioning chromatography and precipitation. *J. Chromatogr. A* 1319, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.043>.
- Pons Royo, M. del C., Beulay, J.L., Valery, E., Jungbauer, A., Satzer, P., 2022. Mode and dosage time in polyethylene glycol precipitation process influences protein precipitate size and filterability. *Process Biochem.* 114, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.017>.
- Pons Royo, M. del C., De Santis, T., Komuczki, D., Satzer, P., Jungbauer, A., 2023. Continuous precipitation of antibodies by feeding of solid polyethylene glycol. *Sep. Purif. Technol.* 304 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122373>.
- Reese, H.R., Xiao, X., Shanahan, C.C., Chu, W., Van Den Driessche, G.A., Fourches, D., Carbonell, R.G., Hall, C.K., Menegatti, S., 2020. Novel peptide ligands for antibody purification provide superior clearance of host cell protein impurities. *J. Chromatogr. A* 1625, 461237. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461237>.
- Rumanek, T., Kołodziej, M., Piątkowski, W., Antos, D., 2023. Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Biotechnol. Bioeng.* 120 (1), 114–124. <https://doi.org/10.1002/bit.28257>.
- Satzer, P., Burgstaller, D., Krepper, W., Jungbauer, A., 2020. Fractal dimension of antibody-PEG precipitate: Light microscopy for the reconstruction of 3D precipitate structures. *Eng. Life Sci.* 20 (3–4), 67–78. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900110>.
- Shukla, A.A., Wolfe, L.S., Mostafa, S.S., Norman, C., 2017. Evolving trends in mAb production processes. *Bioeng. Transl. Med.* 2 (1), 58–69. <https://doi.org/10.1002/btm2.10061>.
- Sommer, R., Satzer, P., Tscheliessnig, A., Schulz, H., Helk, B., Jungbauer, A., 2014. Combined polyethylene glycol and CaCl₂ precipitation for the capture and purification of recombinant antibodies. *Process Biochem.* 49 (11), 2001–2009. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.012>.
- Sommer, R., Tscheliessnig, A., Satzer, P., Schulz, H., Helk, B., Jungbauer, A., 2015. Capture and intermediate purification of recombinant antibodies with combined precipitation methods. *Biochem. Eng. J.* 93, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.008>.
- Walsh, G., Walsh, E., 2022. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nat. Biotechnol.* 40 (12), 1722–1760. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>.
- Zimoch, P., Rumanek, T., Kołodziej, M., Piątkowski, W., Antos, D., 2023. Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool. *J. Chromatogr. A* 1701, 464070. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464070>.

Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools

Tomasz Rumanek¹ | Michał Kołodziej² | Wojciech Piątkowski² | Dorota Antos² 

¹Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

²Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

Correspondence

Dorota Antos, Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland.
Email: dorota.antos@prz.edu.pl

Funding information

Narodowe Centrum Nauki

Abstract

Microheterogeneity of monoclonal antibodies (mAbs) can impact their activity and stability. Formation of charge variants is considered as the most important source of the microheterogeneity. In particular, controlling the content of the acidic species is often of major importance for the production process and regulatory approval of therapeutic proteins. In this study, the preferential precipitation process was developed for reducing the content of acidic variants in mAb downstream pools. The process design was preceded by the determination of phase behavior of mAb variants in the presence of different precipitants. It was shown that the presence of polyethylene glycol (PEG) in protein solutions favored precipitation of acidic variants of mAbs. Precipitation yield was influenced by the variant composition in the mAb feed solutions, the concentration of the precipitant and the protein, and the ionic strength of the solutions. To improve yield, multistage precipitation was employed, where the precipitate was recycled to the precipitation process. The final product was a mixture of supernatants pooled together from the recycling steps. Such an approach can be potentially used either instead or in a combination with chromatography for adjusting the acidic variant content of mAbs, which can benefit in improvement in throughput and reduction in manufacturing costs.

KEYWORDS

charge variants, monoclonal antibodies, polyethylene glycol, precipitation

1 | INTRODUCTION

Heterogeneity of formulated monoclonal antibodies (mAbs) is of considerable importance in the field of biotechnology. This particularly holds true for the IgG class, which comprises most mAb therapeutics currently marketed or in development (Khawli et al., 2010).

The structural complexity and large size of the IgG molecule is a cause of its susceptibility to modifications. This results in microheterogeneity, which influences the biological activity, stability, and biophysical properties of the product as well as its potential side-effects (Brorson & Jia, 2014; van Beers & Bardor, 2012).

The most important source of microheterogeneity is formation of charge variants, which can occur via different mechanisms, including deamidation, oxidation, and fragmentation modifying the isoelectric

point (pI) values (Harris et al., 2004; He et al., 2009; Vlasak & Ionescu, 2008; Wang et al., 2007). The charge variants can be formed during upstream processing because of posttranslational modifications, in downstream processing during product purification, in the product formulation or storage (Liu et al., 2008). Charge variants can be divided into low-pI, mid-pI, and high-pI isoforms, which are termed as "acidic" (av), "main" (mv), and "basic" (bv) variants. Acidic and basic variants may exhibit different pharmacokinetics from the main species. Some studies have shown lack of interplay between the value of pI and pharmacokinetics (Hötzel et al., 2012; Li et al., 2014), yet a number of literature reports have shown decreased therapeutic potency of acidic variants and increased potency of basic variants compared with the main species (Boswell et al., 2010; Bumbaca Yadav et al., 2015; Dakshinamurthy et al., 2017; Hintersteiner, Lingg,

Janek, et al., 2016a; Hintersteiner, Lingg, Zhang, et al., 2016b; Igawa et al., 2010; Khawli et al., 2010). Hence, the contents of the av species of therapeutic proteins frequently falls to category of product quality attributes and its control is of major importance for the production process and the regulatory approval (Jiang et al., 2016; Khawli et al., 2010). Therefore, in processing protocols emphasis is often placed on reduction in the content of acidic charge variants rather than reduction in basic charge variants. Nevertheless, it has been indicated that the effect of acidic variant content on the properties of the overall mAb pool is often insignificant at values of $\sim 25 \pm 5\%$ acidic variant level (Alt et al., 2016; Chung et al., 2018, 2019; Habberger et al., 2014; Jiang et al., 2016; Khawli et al., 2010; Liu et al., 2014).

The charge variant content can be adjusted by modification of upstream processing, however downstream processing is typically employed for that purpose. Ion exchange chromatography (IEX) is regarded as standard downstream technique for separation of mAb charge variants (Ahmed et al., 2019; Chung et al., 2018; Fekete et al., 2015; Jing et al., 2020; Teshima et al., 2011). As the surface charge properties of mAb charge variants are very similar, their separation selectivity in IEX is usually low, which results in strong overlapping of chromatographic band profiles. To improve the separation yield, multiple recycling of chromatographic fractions is typically performed, but at the expense of reduction in the operation throughput.

The separation task becomes less challenging when reduction in the av content is prioritized over reduction in the bv content. In such a case, the separation problem reduces to partial removal of av from the mAb downstream pool. In a previous study, an IEX-based separation process has been developed, which allowed relatively fast reduction of the av content in the mAb pool under strong overloading conditions (Baran et al., 2021). Nevertheless, the yield of a single chromatographic run was still unsatisfactory. Therefore, to avoid product losses, unresolved fractions needed to be recycled, which had to be preceded by ultrafiltration for buffer exchange and concentration. It extended the processing time and impaired the operation throughput. Therefore, in this study, we have developed an alternative approach for partial removal of av from a mAb pool, which was based on preferential precipitation in the presence of polyethylene glycol (PEG).

Precipitation by PEG is frequently used for protein concentration and pre-separation in early purification stages in downstream processing. The advantages of PEG are relatively low cost, it is non-toxic, noncorrosive, nonflammable, and has low-vapor pressure (Sim, He, Tscheliessnig, Mueller, Tan, Jungbauer 2012a). The presence of PEG has also been reported to exert stabilization effect on protein structures (Bell et al., 1983; Polson et al., 1964; Scopes, 1994). PEG-aided precipitation is a simple method exhibiting fast precipitation kinetics. It can be realized in continuous mode, which is being implemented progressively into the biopharmaceutical industry (Hammerschmidt et al., 2016; Rathore et al., 2015).

The mechanism underlying precipitation with PEG is interpreted through the theories of attractive depletion and excluded volume. According to the theory, protein molecules are sterically excluded

from the volume of solution occupied by the polymer, and the resulting displacement effect causes concentration of the protein and its precipitation (Asakura & Oosawa, 1958; Edmond & Ogston, 1970; Iverius & Laurent, 1967; Polson, 1977).

PEG-aided precipitation has received also interest in the field of monoclonal antibody (mAb) purification (Giese et al., 2013; Hammerschmidt et al., 2014, 2015; Knevelman et al., 2010; Kuczewski et al., 2011; Sommer et al., 2015). Kuczewski and Giese (Kuczewski et al., 2011) reported that product selectivity can be improved by tuning the precipitant conditions and selection of the PEG type in single and two-step precipitation. Hammerschmidt et al. (2016) used two-step PEG precipitation to isolate a mAb form CHO supernatant with yield above 90% and above 96% purity.

In this study, we present a possibility for another application area of PEG-aided precipitation, which has not been explored yet. We demonstrate that the process can be potentially used for adjusting the content of av in mAb pools to a manufacturer-defined level. The technique is based on preferential precipitation of av in the presence of PEG at pH below the average pI of the mAb, which induces depletion of the supernatant with av. To improve the operation yield, multistage precipitation can be used. The supernatants obtained in each stage are not further processed, but pooled together as the process product. That way, additional operations of concentration and exchange of viscous PEG solutions are partly avoided. This is an important issue, as high viscosity of PEG is a typical concern for using PEG as precipitation agent (Sim, He, Tscheliessnig, Mueller, Tan, Jungbauer 2012a, 2012b).

The description of the process development is preceded by an analysis of the phase behavior of mAb variants and quantifying the effects of the variant composition, the PEG type and its concentration, and ionic strength of the protein solutions on the precipitation selectivity.

2 | EXPERIMENTAL

2.1 | Materials

All chemicals were of analytical grade, unless stated otherwise. Sodium chloride, ammonium sulfate (AS), ortho-phosphoric acid and acetic acid were purchased from Avantor (Gliwice, Poland), sodium dihydrogen phosphate anhydrous, sodium hydrogen phosphate, and sodium acetate were purchased from Chempur (Piekary Śląskie, Poland), 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (TRIS), poly (ethylene glycol) 3.350 kDa (PEG 3.35) and 10 kDa (PEG 10) was purchased from Sigma-Aldrich, hydrochloric acid 35-38% was purchased from Merck).

The monoclonal immunoglobulins: mAb2 (IgG1, the average isoelectric point pI = 8.2, MW = 148 kDa) (purity > 99%) and mAb3 (IgG4, the average isoelectric point pI = 7.9, MW = 149 kDa) (purity > 96%) were provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Poland). The mAb post-processing material contained 22 mg/ml of mAb2 dissolved in sodium acetate buffer (SA) 40 mM, pH 5, with the variant

composition: 42.0% av, 39.1% mv, 18.0% bv, and 0.9% aggregates (agg) w/w, and 25 mg/ml mAb3 dissolved in a solution of 10 mM histidine and 150 mM NaCl, pH 5.8, with the variant composition: 15.0% av, 73.7% mv, 10.5% bv, 0.8% agg w/w.

2.2 | Methods

2.2.1 | Preparation of stock solutions of mAbs and precipitants

The mAb material was subjected to buffer exchange using Amicon Ultra Centrifugal Filter Units, with molecular weight cut-off of 30 kDa (Merck Millipore). For this purpose, a 0.6 ml of the mAb material was transferred into the Amicon filter, covered with a portion of 3.4 ml of adequate buffer, that is, 0.05 M SA with pH varied within the range 5.0–5.6, 0.05 M sodium phosphate with pH 5.8–7.0 or 0.05 M Tris-HCl with pH 7.2–9.2, and centrifuged for 15 min (at 20°C and 13,000 g). The operation was repeated with a fresh portion of the buffer several times until the desired pH was obtained and the solution conductivity was adjusted to the buffer conductivity. The overall protein concentration in the obtained mAb stocks was determined using an Infinite 200 Pro multimode microplate reader (Tecan Group Ltd).

The stocks of the precipitants were prepared by dissolving PEG in the adequate buffers complying with the prepared mAb stocks, to obtain 50 w/v % PEG 3.35, 30 w/v % PEG 10, or 3 M AS.

2.2.2 | Precipitation of mAbs and determination of solid-liquid quasi-equilibrium

Samples of the mAb stock were mixed with proper volumes of the precipitant stock and appropriate buffer to obtain the desired concentrations of the protein and the precipitant. The obtained feed solution was shaken using a TS-100C Thermo-Shaker (BioSan, Józefów, Poland) for 15 min at 20°C and 950 rpm. To separate precipitate and supernatant, the solution was centrifugated for 10 min at 20°C and 12,000 g.

The water uptake by the precipitate was found to be negligible, therefore the precipitate was assumed to be solely composed of the protein. To calculate the operation yield, the following mass balance equations were used:

$$m_F = m_{F,ovl} + m_{sol}, \quad (1)$$

$$m_{F,ovl} = m_{S,ovl} + m_{P,ovl}, \quad (2)$$

$$m_{F,ovl} U_{F,i} = m_{P,ovl} U_{P,i} + m_{S,ovl} U_{S,i} \quad i = av, mv, bv, \quad (3)$$

$$m_{F,ovl} = m_F \frac{C_{F,ovl}}{d}, \quad (4)$$

$$m_{S,ovl} = m_{sol} \frac{C_{S,ovl}}{d}, \quad (5)$$

where m_F , m_{sol} (mg) are the masses of the feed solution, F (obtained by mixing the stock solutions of the mAbs and the precipitants), and the solvent, sol, respectively, $m_{F,ovl}$, $m_{S,ovl}$, $m_{P,ovl}$ (mg) are the overall masses of the protein in the feed solution, the supernatant, S, and precipitate, P, respectively, $U_{P,i} = \frac{m_{P,i}}{m_{P,ovl}} = U_{F,i} = \frac{m_{F,i}}{m_{F,ovl}}$, $U_{S,i} = \frac{m_{S,i}}{m_{S,ovl}}$ are the reduced (without solvent) individual mass fractions of i -th variant in the precipitate, in the feed solutions and in the supernatant, $C_{F,ovl}$, $C_{S,ovl}$ (mg/ml) are the overall protein concentrations in the feed and the supernatant, d is the solution density that was set the same as for the solvent (water and PEG).

The mass of the feed, m_F , the overall mass of the protein in the feed, $m_{F,ovl}$, and the individual variant content, $U_{F,i}$, are known a priori, the reduced individual mass fractions in the supernatant, $U_{S,i}$, are measured using CEX-HPLC (Section 2.2.3), the overall protein concentrations $C_{F,ovl}$, $C_{S,ovl}$ are determined using the microplate reader. The unknown mass and composition of the precipitate are determined from Equations (2) and (3).

Since av was considered as the only undesired variant, the operation yield was determined as a ratio of the mass of mv and bv variants in the product to their masses in the feed:

$$Y = \frac{m_{S,mv} + m_{S,bv}}{m_{F,mv} + m_{F,bv}} 100\%. \quad (6)$$

In the multistage operation, the precipitant obtained after the phase separation was redissolved in the appropriate volume of buffer and the PEG stock, to obtain the desired protein concentration in the supersaturated solution and subjected again to precipitation. The whole procedure of the phase separation and the analysis of the protein concentration and the variant composition was repeated two more times to mimic a three-stage precipitation process.

All experiments were performed in triplicate.

2.2.3 | Determination of the variant content by CEX-HPLC

A Dionex UltiMate 3000 BioRS System (Thermo Scientific) was used for CEX-HPLC. The individual variant content in the mAbs samples was determined using an analytical CEX-HPLC column ProPac™ WCX-10 BioLC (Thermo Fisher Scientific) with I.D. 0.4 cm and length 25 cm, packed with a resin of particle size 10 μm. The composition of buffers used for the analyses and the procedure for the sample preparation are presented in Supporting Information: Section S1.

2.2.4 | Measurements of the protein activity

The mAb activity was measured in the products obtained after single and multistage precipitation. The procedure and materials used, and the results obtained are described in Supporting Information: Section S2.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Process development

The realization of the precipitation process was preceded by preliminary experiments aimed at determining: (1) the overall mAb solubility in different solvent environments with respect to the precipitant type and its concentration, pH, and ionic strength of the solutions, (2) the precipitation kinetics, (3) the distribution of variants between supernatant and precipitate for the solvent environments selected, (4) the relationship between the precipitation yield and the degree of av reduction.

3.2 | Measurements of solid-liquid quasi-equilibrium

3.2.1 | Solubility measurements

The protein solubility determines the supersaturation level of the solution; hence it influences the precipitation yield. Therefore, efficient design of the process requires precise information on the protein solubility and its dependences on the underlying process variables, that is, the precipitant concentration, pH of the solution and its ionic strength. To acquire that information, mAbs were precipitated under different conditions, by contacting the protein solutions with the precipitant solutions, in which PEG was present or it was replaced with the kosmotropic salt, that is, AS. The total concentration of the protein was measured in the supernatant at the state of quasi-equilibrium, that is, when the protein concentration in the solution remained invariant for at least 1 h. The quasi-equilibrium was established within about 20 min and remained undisturbed for 5 h (Supporting Information: Section S3). Then, the structure of precipitate started changing; it converted partly to a crystalline form and partly to insoluble aggregates. For the sake of brevity, the protein concentration in the supernatant at quasi-equilibrium, $C_{S,ovl}$, is further termed as "solubility."

Figure 1 illustrates the solubility diagram of mAb2 in the solutions of PEG 3.35 or AS, in which the dependence of the overall protein solubility is plotted versus pH of the solution within the operating window used for the precipitation process. For both precipitants, the protein solubility was the smallest and the least sensitive to pH over the range neighboring pI of the protein. It increased with increasing distance between pH of the solution and pI of the variants, and attained values above 18 mg/ml, for which the supersaturation level of the feed solutions was not sufficient for effective precipitation. For the PEG solutions, the pH dependency of the solubility was stronger compared to the AS solutions, and it was strongly sensitive to the ionic strength of the buffer. It can be observed for the solubility curve generated at 8% w/v PEG, whose course raised at about pH 7 when acetate buffer (3.5 mS/cm) was replaced with phosphate buffer of slightly higher conductivity (7.2 mS/cm).

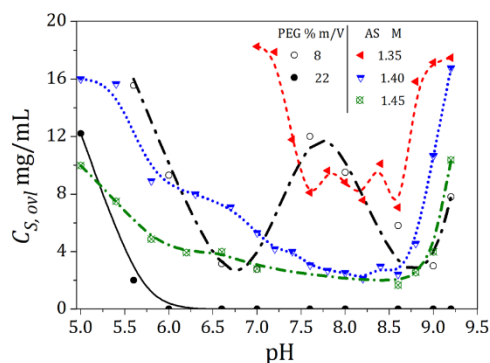


FIGURE 1 Overall solubility of mAb2 in the solutions of polyethylene glycol (PEG) 3.35 and ammonium sulfate (AS) versus pH. Lines guide the eye, $C_{S,ovl}$ is the overall protein concentration in the supernatant at quasi-equilibrium.

The protein solubility was found to be independent of the protein concentration in the feed solutions over the concentration range investigated, that is, up to about 35 mg/ml. This implies that the effect of water uptake by the protein in the precipitate phase was of minor importance, which resulted from a small ratio of the volumes of the precipitate and the solution. Moreover, that effect is expected to be more pronounced when the crystalline phase is formed (Kołodziej et al., 2018), which did not occur over the time interval of the precipitation process. The solubility of the protein in the given solvent environment was also found to be independent of the composition of the variants in the feed solutions.

3.2.2 | Phase distribution of the mAb2 variants

To determine the distribution of the mAb2 variants between supernatant and precipitate, the composition of phases was analyzed by CEX-HPLC. We found that for pH neighboring the pI range of the protein, precipitation was not selective in terms of the variant composition, that is, the concentrations of all variants in both phases changed in the same proportions. Below the lower bound of the pI range, that is, at pH < ~7.0, preferential precipitation of av occurred, that is, the av content in the supernatant reduced due to its preferable transfer to the precipitate.

Figure 2 illustrates typical pattern of changes in the av content, expressed as the difference in the reduced mass fraction of av (i.e., mass fraction of the av variant in the overall mass of the protein in the solution, excluding the solvent) in the feed solution and the supernatant ($\Delta U_{S,av} = U_{F,av} - U_{S,av}$) versus pH of the feed solution. As it can be observed, at pH below pI, precipitation of av is favored, yet the selectivity of precipitation deteriorates with increasing pH in the direction of the pI range. At pH above the pI range, the selectivity reversal occurs, that is, bv is preferably precipitated. The effect of preferential precipitation of av is pronounced for the PEG solutions,

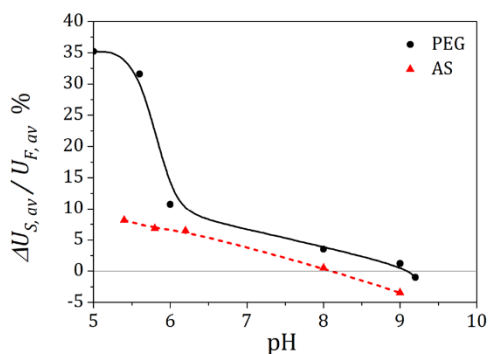


FIGURE 2 Relative *av* reduction in the supernatants of mAb2 versus pH for solutions of polyethylene glycol (PEG) 3.35 or ammonium sulfate (AS), precipitation yield $Y \approx 50\%$. The variant composition in the feed solution: 42.0% *av*, 39.1% *mv*, 18.0% *bv*, 0.9% *agg w/w*. $C_{F,PEG} = 6.4\% - 22.0\%$ m/V. Lines guide the eye.

whereas it is very weak in the presence of AS. This indicates a difference between the mechanisms of protein–protein interactions triggered by both precipitants.

According to the DLVO theory (Verwey & Overbeek, 1948), the force between interacting charged surfaces of the solutes results from a combination of the effects associated with the electrostatic force of repulsion due to the double layer of counterions and with the van der Waals dispersion-force of attraction (Hamaker, 1937). For large surface charges and low ionic strength of the solution, the contribution of the repulsion force to the interaction mechanism is dominating. It diminishes at increasing ionic strength, when ions present with a high concentration screen the solute–solute electrostatic interactions (Curtis & Lue, 2006; Curtis et al., 2002).

For low ionic strength and low pH of the solution, the net charge of mAbs is large, which induces electrostatic interactions between their molecules. However, the mAb variants carry different charges, therefore they also differ in the interaction strength. As the acidic variants have the lowest net charge at pH 5, they exhibit the weakest strength of protein–protein repulsion. Therefore, they are more prone to attractive interactions, thus to precipitation, compared to the main and basic variants. The selectivity reversal occurs when pH of the solution is higher than *pI* of the variants. Then, the basic variants carry the lowest charge and it is the most prone to precipitate.

Therefore, PEG is more effective for selective precipitation of mAb variants than highly concentrated solutions of salt ions, as they screen the charges of the variants and damp the differences between them.

Further precipitation experiments were performed using PEG solutions at pH 5 with concentrations varied from 22% to 25.4% w/V of PEG. In that range, which determined the boundaries of the operating window, the overall protein solubility was highly sensitive to the precipitant concentration; it correspondingly changed from 18 to 3 mg/ml. Figure 3 presents a semi-logarithmic dependence of the

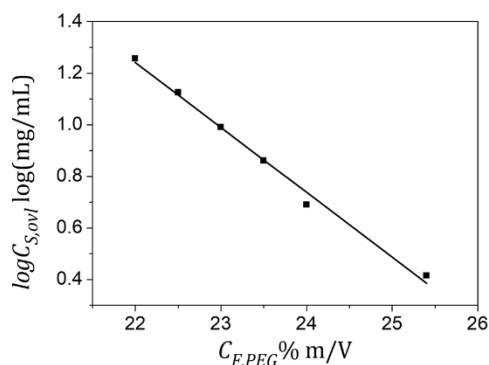


FIGURE 3 Solubility of mAb2 versus the concentration of polyethylene glycol (PEG) 3.35 in the solution, pH 5. Symbols – experimental data, line – regression analysis.

overall protein solubility on the PEG concentration within the operating window. The course of the plot can be quantified by a linear dependence, as follows (Juckes, 1971):

$$\log C_{S,ovl} = -\beta \varphi + \log C_{S,ovl}^0 \quad (7)$$

where $C_{S,ovl}$ corresponds to the overall protein solubility in the presence of PEG (φ %w/v). The value of β ($[\log(\text{mg/ml})]/[\%w/v]$) is correlated with the overall precipitation efficiency, $C_{S,ovl}^0$ (mg/ml) represents the intrinsic protein solubility in the absence of PEG.

The value of β can be correlated with the sizes of the molecules of PEG and the protein molecules, as follows (Odijk, 2009):

$$\beta = m \left(\frac{r_{g,PEG}^2}{M_{PEG}} \right) r_{h,prot} \quad (8)$$

where $r_{g,PEG}$ is the PEG gyration radius, $r_{h,prot}$ is the protein hydrodynamic radius, and m is an empirical coefficient which, according to Odijk, takes the value $24/\ln 10$ (Odijk, 2009). Sim et al. proposed the following expression to determine the β value (Sim, He, Tscheliessnig, Mueller, Tan, Jungbauer 2012a, 2012b):

$$\beta = \left(\gamma r_{h,PEG}^{0.211} + \delta \right) r_{h,prot} \quad (9)$$

where $r_{h,PEG}$ is the PEG hydrodynamic radius γ and δ are empirical parameters. The first term is interpreted as the depletion of protein by PEG, the second term is attributed to the depletion of PEG by protein. Sim et al. determined the parameters of Equation (9) as: $\gamma = 0.076$, $\delta = -0.045$ ($r_{h,PEG}$, $r_{h,prot}$, nm), (Sim, He, Tscheliessnig, Mueller, Tan, Jungbauer 2012a, 2012b). The value of $r_{h,PEG}$ was evaluated for the system mAb and PEG 3.35 according to the formulas used by (Sim, He, Tscheliessnig, Mueller, Tan, Jungbauer 2012b) and (Dohmen et al., 2008), and it is equal: $r_{h,PEG} = 1.9$ nm, the value of $r_{h,prot}$ for the mAb2 (IgG1) was experimentally measured and described in literature (Gagnon et al., 2015; Zhao et al., 2009), and it

is equal: $r_{h,prot} = 6.0$, which provides the value of $\beta = 0.25$ from Equation (9). From the regression analysis of the data depicted in Figure 3, the same value of β was obtained; $\beta = 0.25$. Though the value $\log C_{S,ov}^0$ in Equation (7) has to be determined experimentally for the given pH, that equation markedly facilitate the adjustment of the PEG concentration according to the concentration of the protein in the feed solution.

The protein concentration in the feed solutions was selected above the solubility limits accordingly to the PEG content; it was changed from 35 to 7 mg/ml. As a result, a set of quasi-equilibrium data was obtained covering a relatively wide range of the variant compositions in both phases. The obtained phase distribution diagram is presented in Figure 4. The variant composition at quasi-equilibrium was expressed as the reduced mass fraction of i -th variant in the precipitate ($U_{p,i}$), and the reduced mass fraction of i -th variant in the overall mass of the protein in the supernatant ($U_{s,i}$).

It can be observed that av and bv exhibit the opposite distribution between the phases; av is enriched in the precipitate, whereas bv in the supernatant. The distribution of mv is localized close to the square diagonal with a very small excess in the supernatant. As the protein solubility was independent of the variant composition, the depletion of the supernatant in av was mostly counterbalanced by its enrichment in bv . Such an exchange between av and bv , which exhibit the greatest difference in charge, confirms that electrostatic interactions considerably contribute to the mechanism of their partition between the phases.

Figure 4b shows the dependence of the partition coefficients of each i -th variant, k_i , on the equilibrium concentration for each variant. The coefficient k_i is defined as a ratio of the reduced mass fraction of i -th variant in the precipitate to its reduced mass fraction in the supernatant, $k_i = \frac{U_{p,i}}{U_{s,i}}$. It is evident that for each variant the partition coefficient tends to 1 with increasing its content in the supernatant;

this means deterioration of the separation selectivity, which has a negative impact on the operation yield.

3.2.3 | Interplay between yield and degree of av reduction

Figure 5a illustrates the relationship between the av content in the supernatant and the operation yield, Y , defined as the percent ratio of the mass of mv and bv in the supernatant, which is the operation product, to the mass of mv and bv contained in the feed solutions (Equation 6). The horizontal lines indicate the concentrations of the variants in the feed solution. The data were acquired for different PEG 3.35 concentrations, different overall protein concentrations, but at the same variant composition in the feed solutions. The plot is a Pareto-type chart, which presents an interplay of the two contradictory performance indicators, where enhancement in the av reduction is achieved at the cost of decrease in yield and vice versa. The course of the plot is instructive for the process design, as it allows selecting a tradeoff between these conflicting indicators. It can be furthermore observed that the selectivity of precipitation deteriorates with increasing ionic strength of the solution, which is shown in Figure 5b. This agrees with the results obtained for the precipitation of $mAb2$ in AS (Figure 2). As discussed above, the excessive presence of salt ions triggers unfavorable changes in the selectivity of the interactions between variants.

The pattern of the Pareto plots does not evidently depend on the overall protein concentration and the concentration of PEG 3.35. This is illustrated in Figure 5c for the PEG solutions with the concentration varied over the range 22%–24% w/v, for which the values of the overall protein solubility were significantly different (Figure 3). The degree of the av reduction does not also depend on

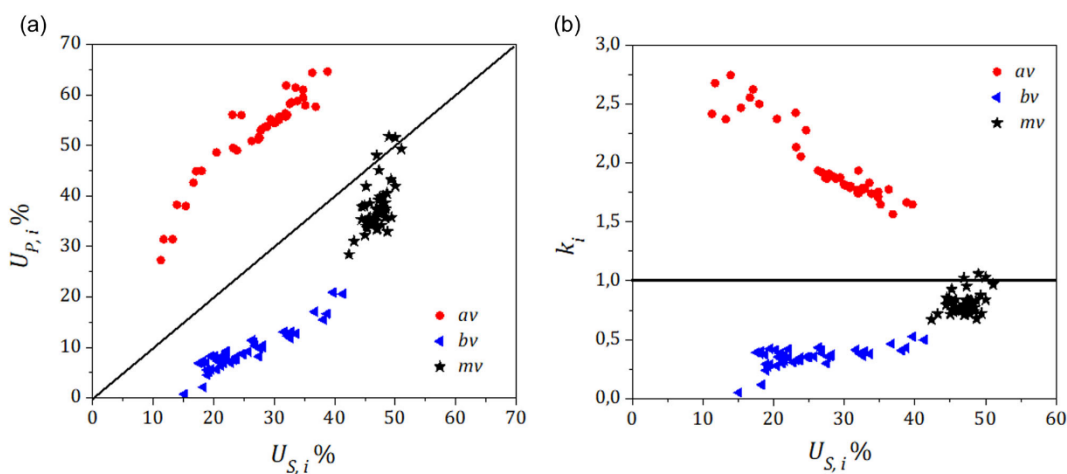


FIGURE 4 Distribution of each i -th variant of $mAb2$ between the supernatant and the precipitate. (a) Unit square distribution, $U_{p,i}$ versus $U_{s,i}$. (b) Variations of the partition coefficient k_i versus $U_{s,i}$. $C_{F,PEG} = 22.0\%–24.0\% m/V$.

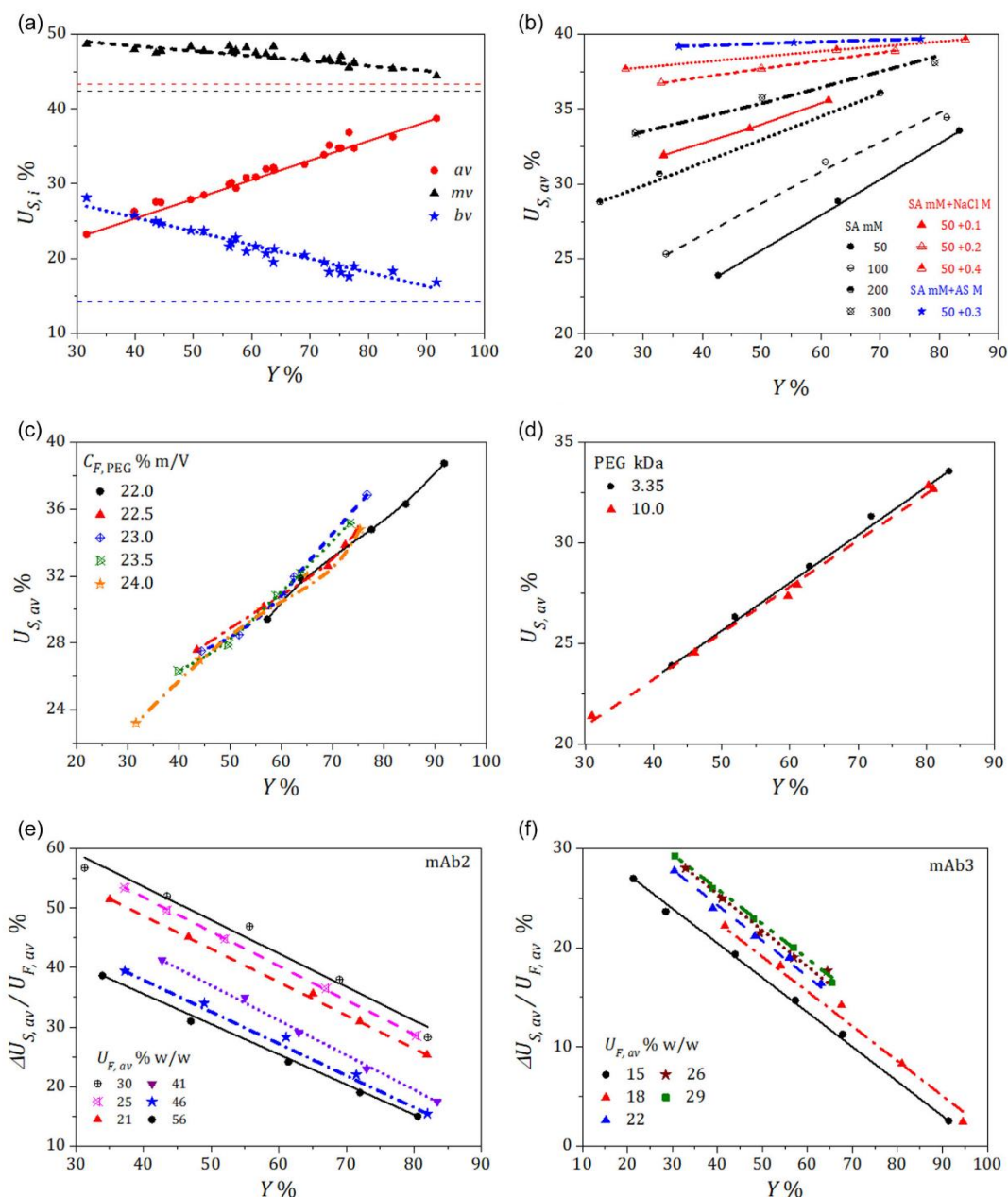


FIGURE 5 Changes in the variant composition versus yield. (a) For each of mAb2 variants in the polyethylene glycol (PEG) 3.35 solutions within the concentration range 22%–24% w/v, for the overall concentration of mAb2 in the feed solutions varied from 36 to 7.5 mg/ml, respectively, at the variant percentage fractions in the feed solutions: 42.0% *av*, 39.1% *mv*, 18.0% *bv*, 0.9% *agg* w/w, (b) *av* reduction in mAb2 in 23.5% w/v PEG 3.35 for different ionic strengths, the feed solutions as in (a), (c) *av* reduction in mAb2 at different PEG 3.35 concentrations (22%–24% w/v), (d) *av* reduction in mAb2 in 23.5% w/v PEG 3.35 and in 10.5% w/v PEG 10, the feed solutions as in (a), (e) relative *av* reduction in mAb2 in 23.5% w/v PEG 3.35, for different variant compositions in the feed solutions, (f) relative *av* reduction in mAb3 in 10.5% w/v PEG 3.35, the mAb3 concentration 10–25 mg/ml, for different variant compositions in the feed solutions. Lines guide the eye.

the molecular weight of PEG. It is illustrated in Supporting Information: Figure 4d, where the Pareto plots generated for the solutions of PEG 3.35 and PEG 10 are superimposed.

Nevertheless, the pattern of Pareto plot was influenced by the variant content in the feed solutions. The latter is shown in Figure 5e, in which the relative av reduction in the supernatant is shown for different variant compositions in the feed solutions. It is evident that increasing av content above about 25% w/w impairs the operation yield, which stems from decrease in the value of the partition coefficient (Figure 4b). The trend seems to be reversed for the av content below 25% w/w, however, the differences between plots are small and almost fall within the range of experimental errors. The observed trend can be explained by the above-mentioned dependency of the partition coefficient on the content of av in the processed solutions. It causes that the process efficiency quantified in terms of the operation yield, thus the process profitability, is higher for mAb pools with lower content of av. Another form of the illustration of that trend is presented in Supporting Information: Figure 4f.

Similar analysis was performed for mAb3 that represents another class of mAbs (IgG4), which is characterized by different structure and lower pI value compared with mAb2. As the content of the av variant of mAb3 in the post-processing material was much lower compared to mAb2, the quasi-equilibrium data were acquired over the range of lower av contents, that is, 15%–29% w/w of av in the feed solutions. In general, all the trends in the phase behavior of mAb3 were similar to those reported for mAb2, but the selectivity of precipitation was lower compared to mAb2. However, reduction in av content by precipitation was also possible, which can be observed in Supporting Information: Figure 4f. Moreover, the process conditions might be optimized, for example, by a decrease in pH of the solution

As discussed above, the operation yield depended on the demand for the av reduction. When the av content needs only a small adjustment, the single-stage process can be realized at a high yield. When demand for av reduction is high, a multistage precipitation can be employed (Section 3.2.4).

In general, yield of chromatographic separation is expected to be higher compared with precipitation, since the latter is less selective. For the same mAb2 pool, in the previous study (Baran et al., 2021) we achieved a relative av reduction of about 35% at a yield of 65% in a

single IEX run under optimized operating conditions. The maximum mass that could be processed in that run was about 300 mg per 1 ml of the column volume over the run time of about 50 min (excluding the column cleaning). In this study, the same av reduction was achieved in 15 min at a yield of about 50%, whereas the mass which could be processed depended only on the reactor volume. To precipitate 300 mg of the product protein, we needed 4.5 g of PEG 3.35. Since the final pure product can be precipitated from the PEG solution, there is a possibility to reuse the PEG solutions after the phase separation. It can be realized by increasing pH of the solution towards the pI range, which causes the protein to precipitate, whereas PEG remains in the solution.

3.2.4 | Multistage precipitation

To verify the possibility for improvement of operation yield, the precipitate was re-dissolved and subjected to precipitation two times more. The process conditions and the performance indicators (yield and the av content) are shown in Table 1.

As it can be observed, threefold recycling of the precipitate phase allowed reducing mAb2 av content from 42% to 31% at the overall yield of 87%. The yield of individual steps subsequently decreased, accordingly with increasing content of av in the solutions obtained by re-dissolution of the precipitates withdrawn from previous steps. Hence, for lower contents of av in the feed solutions, higher efficiency of the process in terms of yield and degree of av reduction could be achieved, which has been discussed earlier for single-step precipitation.

Additional advantage of the approach developed was that the mAb aggregates present in post-processing solutions could be accumulated in precipitate (Table 1). The partition coefficient of the aggregate between phases was found to vary between 3.6 and 4.6. The number of aggregates in the feed solutions was small, therefore accurate determination of that value and its dependence on the aggregate content in the feed solution was not possible. The aggregation of mAbs is a potential safety concern in their processing and formulation in pharmaceutical industry. Thus, reducing the aggregate content in the bioproduct is of major importance (Rosenberg, 2006; Shukla et al., 2007). Furthermore, the activity

TABLE 1 Conditions for multiple precipitate recycling in 25.4% w/v PEG 3.35 and the performance indicators

Recycling	$C_{F,ovl}$ mg/mL av+mv+bv	$U_{S,i}$ % w/w			$U_{P,i}$ % w/w			$U_{S,agg}$ % w/w	Y %
		av	mv	bv	av	mv	bv		
I	11.0	27.4	45.8	26.8	51.2	38.6	10.2	0.34	48.6
II	9.0	32.0	48.7	19.3	60.1	36.2	3.70	0.37	49.8
III	7.5	43.8	49.7	6.50	68.6	27.2	4.22	0.37	51.0
Pooled supernatants		31.9	47.4	20.7					87.2

Note: The variant composition of the feed solution: 42.0 av, 39.1 mv, 18.0 bv w/w, 0.9% agg w/w, $C_{F,ovl}$, $U_{S,i}$, $U_{P,i}$ are the overall concentration of variants in the feed solution, the reduced mass fraction in supernatants and precipitates at quasi-equilibrium, respectively.

analysis of the products obtained after each stage of precipitation indicated that multiple precipitation in the PEG solutions did not affect the protein activity (Supplementary Material, Section S2).

4 | CONCLUSIONS

Preferential precipitation of mAb variants in different solvent environments with respect to the precipitating agent (PEG or AS) its concentration, and pH of the solutions is demonstrated. The phenomenon manifests as opposite tendency of partitioning *av* and *bv* variants between the supernatant and precipitate phases, in which the reduction in *av* content in the supernatant is compensated by its enrichment with *bv*. The effect is pronounced in the presence of PEG and diminishes with increasing ionic strength of the solution. The selectivity of PEG-aided precipitation mainly results from effects induced by electrostatic interactions between molecules of differently charged variants.

The phenomenon was exploited to reduce *av* in downstream pools of mAb2 and mAb3 differing in molecular structure and isoelectric point, which were precipitated with PEGs of different types and concentrations. The selectivity of the phase partition of variants was found to be independent of the overall protein concentration and the PEG concentration, was also the same for PEGs differing in molecular weight, that is, PEG 3.35 and PEG 10 kDa. Nevertheless, the individual partition coefficient of the variant decreased with increasing its mass fraction in the mAb pools. Therefore, the highest efficiency in *av* reduction could be achieved for its relatively low content in the stock solution. The enhancement in the degree of *av* reduction was counterbalanced by decrease in yield of the operation, which could be quantified using the Pareto chart. Therefore, a tradeoff has to be found between both performance indicators.

To improve the operation yield, multistage precipitation was employed, that is, the precipitate after re-dissolution was subjected to precipitation two times more. Finally, precipitate highly enriched with *av* and aggregates was discarded, while the supernatants were pooled together as a product with the reduced *av* content.

Though the precipitation selectivity for mAb3 was lower than for mAb2, all trends in the phase behavior were common for both the mAbs. This may indicate that the phenomenon of preferential precipitation of *av* variants of mAb in PEG has a general character and it may occur also in case of other mAbs. Therefore, it can be potentially applied in downstream processing for *av* reduction in mAb pools instead of chromatography or in combination with chromatography, to reduce the operation costs and accelerate the process.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Tomasz Rumanek designed, conceived the experiments, and acquired the data, Michał Kołodziej, Wojciech Piątkowski, Dorota Antos analyzed or interpreted the data, Tomasz Rumanek, Wojciech Piątkowski, Dorota Antos drafted or revised the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support of this study by Narodowe Centrum Nauki (UMO-2018/31/N/ST/02538) is gratefully acknowledged. We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland for the supplement of biological material.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Dorota Antos  <http://orcid.org/0000-0001-8246-5052>

REFERENCES

- Ahmed, S., Atia, N. N., & Rageh, A. H. (2019). Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variants. *Talanta*, 199, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.082>
- Alt, N., Zhang, T. Y., Motchnik, P., Taticek, R., Quarmby, V., Schlothauer, T., Beck, H., Emrich, T., & Harris, R. J. (2016). Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals*, 44(5), 291–305. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.06.005>
- Asakura, S., & Oosawa, F. (1958). Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33(126), 183–192. <https://doi.org/10.1002/pol.1958.1203312618>
- Baran, K., Zimoch, P., Stańczyk, A., Piątkowski, W., & Antos, D. (2021). Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1658, 462607. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462607>
- van Beers, M. M. C., & Bardor, M. (2012). Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnology Journal*, 7, 1473–1484. <https://doi.org/10.1002/biot.201200065>
- Bell, D. J., Hoare, M., & Dunhill, P. (1983). The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. In A. Fitcher (Ed.), *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (p. 26). Springer-Verlag.
- Boswell, C. A., Tesar, D. B., Mukhyala, K., Theil, F. P., Fielder, P. J., & Khawli, L. A. (2010). Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjugate Chemistry*, 21, 2153–2163. <https://doi.org/10.1021/bc100261d>
- Brorson, K., & Jia, A. Y. (2014). Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: Terminal heterogeneity, detection, and impact on quality. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.012>
- Bumbaca Yadav, D., Sharma, V. K., Boswell, C. A., Hotzel, I., Tesar, D., Shang, Y., Ying, Y., Fischer, S. K., Grogan, J. L., Chiang, E. Y., Urban, K., Ulufatu, S., Khawli, L. A., Prabhu, S., Joseph, S., & Kelley, R. F. (2015). Evaluating the use of antibody variable region (fv) charge as a risk assessment tool for predicting typical cynomolgus monkey pharmacokinetics. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 29732–29741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692434>
- Chung, S., Tian, J., Tan, Z., Chen, J., Lee, J., Borys, M., & Li, Z. J. (2018). Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(7), 1646–1665. <https://doi.org/10.1002/bit.26587>
- Chung, S., Tian, J., Tan, Z., Chen, J., Zhang, N., Huang, Y., Vandermark, E., Lee, J., Borys, M., & Li, Z. J. (2019). Modulating cell culture oxidative stress reduces protein glycation and acidic charge variant formation.

- mAbs, 11(1), 205–216. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1537533>
- Curtis, R. A., & Lue, L. (2006). A molecular approach to bioseparations: Protein–protein and protein–salt interactions. *Chemical Engineering Science*, 61, 907–923.
- Curtis, R. A., Ulrich, J., Montaser, A., Prausnitz, J. M., & Blanch, H. W. (2002). Protein–protein interactions in concentrated electrolyte solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 79, 367–380. <https://doi.org/10.1002/bit.10342>
- Dakshinamurthy, P., Mukunda, P., Prasad Kodaganti, B., Shenoy, B. R., Natarajan, B., Mailwalave, A., Halan, V., Murugesan, S., & Maity, S. (2017). Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab. *Biologicals*, 46, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.006>
- Dohmen, M. P. J., Pereira, A. M., Timmer, J. M. K., Benes, N. E., & Keurentjes, J. T. F. (2008). Hydrodynamic radii of polyethylene glycols in different solvents determined from viscosity measurements. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 53, 63–65. <https://doi.org/10.1021/jc700355n>
- Edmond, E., & Ogston, A. G. (1970). Phase separation in an aqueous quaternary system. *Biochemical Journal*, 117(1), 85–89. <https://doi.org/10.1042/bj1170085>
- Fekete, S., Beck, A., Fekete, J., & Guillaume, D. (2015). Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography. part I: Salt gradient approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>
- Gagnon, P., Nian, R., Leong, D., & Hoi, A. (2015). Transient conformational modification of immunoglobulin G during purification by protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1395, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.080>
- Giese, G., Myrold, A., Gorrell, J., & Persson, J. (2013). Purification of antibodies by precipitating impurities using Polyethylene Glycol to enable a two chromatography step process. *Journal of Chromatography B*, 938, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.029>
- Haberger, M., Bomans, K., Diepold, K., Hook, M., Gassner, J., Schlothauer, T., Zwick, A., Spick, C., Kepert, J. F., Hienz, B., Wiedmann, M., Beck, H., Metzger, P., Mølhøj, M., Knoblich, C., Grauschopf, U., Reusch, D., & Bulau, P. (2014). Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies. Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes. *mAbs*, 6(2), 327–339. <https://doi.org/10.4161/mabs.27876>
- Hamaker, H. C. (1937). The London van-der-Waals attraction between spherical particles. *Physica (Amsterdam)*, 4, 1058–1072.
- Hammerschmidt, N., Hintersteiner, B., Lingg, N., & Jungbauer, A. (2015). Continuous precipitation of IgG from CHO cell culture supernatant in a tubular reactor. *Biotechnology Journal*, 10(8), 1196–1205. <https://doi.org/10.1002/biot.201400608>
- Hammerschmidt, N., Hobiger, S., & Jungbauer, A. (2016). Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: Sequential precipitation and resolubilization. *Process Biochemistry*, 51(2), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.032>
- Hammerschmidt, N., Tscheliessnig, A., Sommer, R., Helk, B., & Jungbauer, A. (2014). Economics of recombinant antibody production processes at various scales: Industry-standard compared to continuous precipitation. *Biotechnology Journal*, 9(6), 766–775. <https://doi.org/10.1002/biot.201300480>
- Harris, R. J., Shire, S. J., & Winter, C. (2004). Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies. *Drug Development Research*, 61, 137–154. <https://doi.org/10.1002/ddr.10344>
- He, X. Z., Que, A. H., & Mo, J. J. (2009). Analysis of charge heterogeneities in mAbs using imaged CE. *Electrophoresis*, 30, 714–722. <https://doi.org/10.1002/elps.200800636>
- Hintersteiner, B., Lingg, N., Janzek, E., Mutschlechner, O., Loibner, H., & Jungbauer, A. (2016a). Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein. *Biotechnology Journal*, 11(12), 1617–1627. <https://doi.org/10.1002/biot.201600504>
- Hintersteiner, B., Lingg, N., Zhang, P., Woen, S., Hoi, K. M., Stranner, S., Wiederkum, S., Mutschlechner, O., Schuster, M., Loibner, H., & Jungbauer, A. (2016b). Charge heterogeneity: basic antibody charge variants with increased binding to fc receptors. *mAbs*, 8(8), 1548–1560. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1225642>
- Hötzel, I., Theil, F.-P., Bernstein, L. J., Prabhu, S., Deng, R., Quintana, L., Lutman, J., Sibia, R., Chan, P., Bumbaca, D., Fielder, P., Carter, P. J., & Kelley, R. F. (2012). A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance. *mAbs*, 4(6), 753–760. <https://doi.org/10.4161/mabs.22189>
- Igawa, T., Tsunoda, H., Tachibana, T., Maeda, A., Mimoto, F., Moriyama, C., Nanami, M., Sekimori, Y., Nabuchi, Y., Aso, Y., & Hattori, K. (2010). Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Engineering, Design and Selection*, 23(5), 385–392. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq009>
- Iverius, P. H., & Laurent, T. C. (1967). Precipitation of some plasma proteins by the addition of dextran or polyethylene glycol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 133(2), 371–373. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(67\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(67)90079-7)
- Jiang, G., Yu, C., Yadav, D. B., Hu, Z., Amurao, A., Duenas, E., Wong, M., Iverson, M., Zheng, K., Lam, X., Chen, J., Vega, R., Ulfatu, S., Leddy, C., Davis, H., Shen, A., Wong, P. Y., Harris, R., Wang, Y. J., & Li, D. (2016). Evaluation of heavy-chain c-terminal deletion on product quality and pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(7), 2066–2072. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.027>
- Jing, S. Y., Gou, J.-X., Gao, D., Wang, H.-B., Yao, S. J., & Lin, D.-Q. (2020). Separation of monoclonal antibody charge variants using cation exchange chromatography: Resins and separation conditions optimization. *Separation and Purification Technology*, 235, 116136. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116136>
- Juckles, I. R. M. (1971). Fractionation of proteins and viruses with polyethylene glycol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 229(3), 535–546.
- Khawli, L. A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z. W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D. B., Nijem, I., Allison, D. E., Wong, P. Y., Kao, Y.-H., Quan, C., Joshi, A., Harris, R. J., & Motchnik, P. (2010). Charge variants in IgG1. Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *mAbs*, 2(6), 613–624. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13333>
- Knevelman, C., Davies, J., Allen, L., & Titchener-Hooker, N. J. (2010). High-throughput screening techniques for rapid PEG-based precipitation of IgG₄ mAb from clarified cell culture supernatant. *Biotechnology Progress*, 26(3), 697–705. <https://doi.org/10.1002/btpr.357>
- Kołodziej, M., Poplewska, I., Piątkowski, W., & Antos, D. (2018). Design of bulk protein crystallization based on phase diagrams accounting for the presence of interfacial water. *Crystal Growth & Design*, 18(1), 393–401. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01398>
- Kuczewski, M., Schirmer, E., Lain, B., & Zarbis-Papastois, G. (2011). A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. *Biotechnology Journal*, 6(1), 56–65. <https://doi.org/10.1002/biot.201000292>
- Li, B., Tesar, D., Boswell, C. A., Cahaya, H. S., Wong, A., Zhang, J., Meng, Y. G., Eigenbrot, C., Pantua, H., Diao, J., Kapadia, S. B., Deng, R., & Kelley, R. F. (2014). Framework selection can influence pharmacokinetics of a humanized therapeutic antibody through differences in molecule charge. *mAbs*, 6(5), 1255–1264. <https://doi.org/10.4161/mabs.29809>
- Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Faldu, D., Chumsae, C., & Sun, J. (2008). Heterogeneity of monoclonal antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(7), 2426–2447. <https://doi.org/10.1002/jps.21180>

- Liu, H., Ponniah, G., Zhang, H.-M., Nowak, C., Neill, A., Gonzalez-Lopez, N., Patel, R., Cheng, G., Kita, A. Z., & Andrien, B. (2014). In vitro and in vivo modifications of recombinant and human IgG antibodies. *mAbs*, 6(5), 1145–1154. <https://doi.org/10.4161/mabs.29883>
- Odijk, T. (2009). Depletion theory and the precipitation of protein by polymer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(12), 3941–3946.
- Poison, A. (1977). A theory for the displacement of proteins and viruses with polyethylene glycol. *Preparative Biochemistry*, 7(2), 129–154. <https://doi.org/10.1080/00327487708061631>
- Polson, A., Potgieter, G. M., Largier, J. F., Mears, G. E. F., & Joubert, F. J. (1964). The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 82, 463–475. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(64\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(64)90438-6)
- Rathore, A. S., Agarwal, H., Sharma, A. K., Pathak, M., & Muthukumar, S. (2015). Continuous processing for production of biopharmaceuticals. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(8), 836–849. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.985834>
- Rosenberg, A. S. (2006). Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *The AAPS Journal*, 8(3), E501–E507. <https://doi.org/10.1208/aapsj080359>
- Scopes, R. K. (1994). *Protein purification: Principles and practice*. Springer.
- Shukla, A. A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S., & Low, D. (2007). Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches. *Journal of Chromatography B*, 848(1), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.026>
- Sim, S. L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, R. B. H., & Jungbauer, A. (2012a). Branched polyethylene glycol for protein precipitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(3), 736–746. <https://doi.org/10.1002/bit.24343>
- Sim, S. L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, R. B. H., & Jungbauer, A. (2012b). Protein precipitation by polyethylene glycol: A generalized model based on hydrodynamic radius. *Journal of Biotechnology*, 157(2), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2011.09.028>
- Sommer, R., Tscheliessnig, A., Satzer, P., Schulz, H., Helk, B., & Jungbauer, A. (2015). Capture and intermediate purification of recombinant antibodies with combined precipitation methods. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.008>
- Teshima, G., Li, M. X., Danishmand, R., Obi, C., To, R., Huang, C., Kung, J., Lahidji, V., Freeberg, J., Thorne, L., & Tomic, M. (2011). Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange. *Journal of Chromatography A*, 1218(15), 2091–2097. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.107>
- Verwey, E. J. W., & Overbeek, J. T. K. (1948). *Theory of stability of lyophobic colloids*. Elsevier.
- Vlasak, J., & Ionescu, R. (2008). Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(6), 468–481. <https://doi.org/10.2174/138920108786786402>
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., & Nema, S. (2007). Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(1), 1–26. <https://doi.org/10.1002/jps.20727>
- Zhao, H., Graf, O., Milovic, N., Luan, X., Bluemel, M., Smolny, M., & Forrer, K. (2010). Formulation development of antibodies using robotic system and high-throughput laboratory (HTL). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(5), 2279–2294. <https://doi.org/10.1002/jps.22008>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Rumanek, T., Kołodziej, M., Piątkowski, W., & Antos, D. (2022). Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Biotechnology and Bioengineering*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/bit.28257>



Countercurrent preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools

Tomasz Rumanek^a, Michał Kołodziej^b, Wojciech Piątkowski^b, Dorota Antos^{b,*}

^a Doctoral School of the Rzeszów University of Technology, Poland

^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Monoclonal antibody
Variant separation
Precipitation
Continuous operation

ABSTRACT

The process of countercurrent multistage precipitation (CnMP) was developed for reduction of the acidic variant (*av*) content in monoclonal antibody (mAb) pools. The process was performed in polyethylene glycol (PEG) solutions of low ionic strength, at which *av* was the most prone to precipitate. To design the process, a mathematical model was formulated, which consisted of steady-state mass balance equations and underlying thermodynamic dependencies. The model was solved for different combinations of the process variables, including the protein concentration in the feed material and the PEG concentration in subsequent precipitation stages. The model solution was projected onto two-dimensional planes, where the performance indicators, such as the separation yield and the *av* reduction level, were correlated with the process variables. CnMP overperformed crosscurrent multistage precipitation (CsMP) and ion exchange chromatography (IEX) used in previous studies; in the comparison with CsMP, the 3-stage CnMP process allowed up to 28% increase in yield and up to 25% increase in the *av* reduction level, and in the comparison with IEX, up to 37% increase in yield and up to 12.5% increase in the *av* reduction level. The yield benefit of CnMP depended on the composition of the feed material and the demand for the *av* reduction. The concept was experimentally verified; the 2- and 3-stage CnMP processes were performed using the input process variables provided by the model solution. The performance indicators calculated by the model and experimentally measured were in a good agreement, which indicated both feasibility and predictability of CnMP.

1. Introduction

Structure of intact monoclonal antibodies mAbs, or their fragments can be perturbed during post translation modification, product purification in downstream processing, product formulation or storage (Harris, et al., 2004; He, et al., 2009; Khawli, et al., 2010; Liu, et al., 2008, 2014; Santora et al. 1999; Vlasak & Ionescu, 2008; Wang, et al., 2007). This can lead to formation of mixtures of charge variants along with the target product and to deterioration of functionality of mAbs, including reduced activity, immunogenicity, stability, and efficacy (Boswell, et al., 2010; Brorson & Jia, 2014; Hintersteiner, et al. 2016A; Hötzel, et al., 2012; Huang, et al. 2005; Khawli, et al., 2010; Li, et al., 2014; Pantua, et al., 2014; Müller-Spáth, et al. 2010; Rehder, et al. 2008; van Beers & Bardor, 2012).

Charge variants are classified according to their isoelectric point (pI) as “acidic” (*av*), “main” (*mv*), and “basic” (*bv*) variants, which corresponds to low-pI, mid-pI, and high-pI isoforms, respectively. The content

of *av* and *bv* species in the final product has to be maintained within a pre-defined range determined based on their impact on final drug product activity (Rathore, 2010; Singh, et al. 2016).

A number of case studies indicated decreased therapeutic potency of the *av* species compared with the *mv* and *bv* species. The *av* species have been shown to have lower affinity for FcγRIIIA receptors than *mv* and *bv*. FcγRIIIA is responsible for effector functions and induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. For that reason, *mv* and *bv* can have a lower value of the antibody concentration necessary to achieve 50% cell lysis (Hintersteiner, et al., 2016A; Hintersteiner, et al., 2016B, Dakshinamurthy, et al., 2017, Beyer, et al., 2018). It has also been reported that in some cases *av* exhibit lower antigen-binding affinity than other variant species (Hintersteiner, et al., 2016B, Dakshinamurthy, et al., 2017, Miao, et al., 2017). There are studies that have shown that *av* had also lower affinity for the neonatal Fc receptor (FcRn) (Liu et al., 2021, Hintersteiner, et al., 2016B). Moreover, the presence of *av* may result in decreased tissue retention and increased whole body clearance

* Correspondence to: Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland.
E-mail address: dorota.antos@prz.edu.pl (D. Antos).

<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2024.01.001>

Received 25 October 2023; Received in revised form 22 December 2023; Accepted 1 January 2024
Available online 4 January 2024

0263-8762/© 2024 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Boswell, et al., 2010). Hence, the control of the *av* content in mAb pools is of major importance for the regulatory approval (Jiang, et al., 2016; Khawli, et al., 2010), and its reduction is often prioritized over reduction in basic charge variants (Alt, et al., 2016; Chung, et al., 2018; Chung, et al., 2019; Habberger, et al., 2014; Jiang, et al., 2016; Khawli, et al., 2010; Liu, et al., 2014).

The separation of the charge variants is typically accomplished in polishing steps of downstream protein processing by use of ion-exchange chromatography (IEX) (Ahmed, et al., 2019; Chung, et al., 2018; Guilmarme, et al., 2015; Fekete, et al., 2015; Jing, et al., 2020; Lee, et al., 2018; Rosa, et al., 2023; Teshima, et al., 2011; Thorner and Tomic, 2011). Yet, similarity of the surface charge properties of mAb charge variants causes chromatographic band profiles to overlap, therefore their separation by IEX remains a big challenge in downstream processing. To improve the separation yield, multiple recycling of chromatographic fractions is typically performed, but at the expense of reduction in the operation throughput, or by exploiting multicolumn chromatography, which however requires sophisticated equipment systems (Jian, et al., 2021; Jing, et al., 2020; Jing et al., 2023; Khanal et al., 2019; Müller-Spáth, et al., 2008; Zhang, et al., 2011).

In previous studies, to reduce the *av* content in mAbs pools, we developed alternative approaches, in which IEX was replaced with PEG-aided precipitation (Rumanek, et al., 2023) or combined with IEX (Zimoch, et al., 2023). The precipitation process was performed at low ionic strength and at pH distinctly lower than isoelectric point of all mAb variants, at which their net charge was large. For large surface charges and low ionic strength of the solution, the contribution of the electrostatic force of repulsion is dominant over the van der Waals dispersion-force of attraction. That tendency diminishes at increasing ionic strength, as ions present with a high concentration screen the solute–solute electrostatic interactions (Curtis & Lue, 2006; Curtis et al., 2002). Since the *av* species have the lowest net charge at pH 5 compared with *mv* and *bv* species, they exhibit the weakest strength of protein–protein repulsion; therefore, they are more prone to attractive interactions, thus to precipitation.

The standalone single-step precipitation process provided high throughput limited only by the volume of the precipitation reactor, but at a relatively low operation yield, which resulted from low separation selectivity (Rumanek, et al., 2023). To improve the yield, crosscurrent multistage precipitation (CsMP) was employed, in which precipitate was repeatedly re-dissolved and processed in subsequent stages, whereas the supernatants depleted with *av* were pooled together as the operation product. Nevertheless, the improvement in yield was still unsatisfactory, particularly for the mAb pools with a high *av* content (Rumanek, et al., 2023). The combination of PEG-aided precipitation and anion exchange chromatography (AEX) allowed a significant improvement in yield, compared with standalone precipitation (Rumanek, et al. 2023; Zimoch, et al. 2023), and in throughput, compared with standalone AEX (Baran, et al., 2021; Zimoch, et al., 2023).

In this study, to adjust the *av* content in mAb pools, we have developed countercurrent multistage precipitation (CnMP), in which liquid phase and precipitate were transported in countercurrent flow. The method preserved all benefits of the precipitation process; low costs, high throughput, ease in realization, but at a marked enhancement in yield compared with CsMP. This made CnMP competitive with chromatography in polishing steps of protein purification.

In general, PEG-aided precipitation is frequently used for capture and pre-purification of mAb from host cell proteins (Burgstaller, et al., 2019; Ferreira-Faria, et al. 2023; Giese, et al., 2013; Gu, et al., 2020; Hammerschmidt, et al., 2015; Hammerschmidt, et al., 2014; Hammerschmidt, et al., 2016; Knevelman, et al., 2010; Kuczewski, et al., 2011; Li, et al., 2019; Sim, et al., 2012A; Sim, et al., 2012B; Sommer, et al., 2014; Sommer, et al., 2015), therefore CnMP can be combined with precipitation-based pre-purification steps using very similar solvent environment. Moreover, as CnMP is designed as a continuous process, it can be integrated with preceding continuous pre-purification

processes.

2. Background and theory

2.1 Flowsheet schemes of multistage precipitation

In general, mass transfer in the countercurrent flow regime is more effective than in the cocurrent or crosscurrent regimes, therefore countercurrent devices are preferred in industrial applications. Thus, in this study we implemented that regime to protein precipitation. The concept of CnMP, and the difference between CnMP and CsMP developed in the previous study (Rumanek et al., 2023) are illustrated in Figs. 1 and 2. In CsMP (Fig. 1), the feed solution is processed in the first stage, the precipitate obtained is transported to the next stage, re-dissolved with a fresh portion of the PEG solution (*Sol*) and again subjected to precipitation. The operation is repeated in each subsequent stage. The supernatants (*S*) acquired from all stages are pooled together and withdrawn as the product of the process. In CnMP (Fig. 2A, B), the feed and the supernatants are transported countercurrently along the unit and re-used in each stage. If the number of stages is higher than 2, the PEG content in intermediate stages is adjusted by adding a fresh PEG solution with proper concentration.

2.2 Mathematical model

To design the CnMP process and determine its performance, a set of the steady state mass balance equations was used, as follows.

For the total mass balance of the inlet and outlet streams of *i*-th precipitation stage it holds:

$$m_{S,i+1} + m_{P,i-1} + m_{Sol,i} = m_{S,i} + m_{P,i} \quad (1)$$

For the overall mass balance of the protein (including all variants) it holds:

$$m_{S,i+1,ovl} + m_{P,i-1,ovl} = m_{S,i,ovl} + m_{P,i,ovl} \quad (2)$$

For the mass balance of the *av* species it holds:

$$m_{S,i+1,avl} U_{S,i+1,avl} + m_{P,i-1,avl} U_{P,i-1,avl} = m_{S,i,avl} U_{S,i,avl} + m_{P,i,avl} U_{P,i,avl} \quad (3)$$

For the mass balance of PEG it holds:

$$m_{S,i+1,PEG} + m_{P,i-1,PEG} + m_{Sol,i,PEG} = m_{S,i,PEG} + m_{P,i,PEG} \quad (4)$$

where subscripts *S*, *P*, *Sol*, *PEG* denote the supernatant (liquid phase), the precipitate, the buffered PEG solution (*Sol*), and PEG as the precipitation agent, respectively, *m* is the mass of the streams *P*, *S* or *Sol*, *U* denotes the reduced mass fraction (without the solvent), *i*, *i* – 1, *i* + 1, denote the *i*-th, previous and subsequent stage, respectively, where $m_{P,0} = m_{Feed}$, $m_{Sol,1} = 0$, *ovl* denotes the overall protein content.

The overall mass of the protein in the *i*-th stage is calculated from:

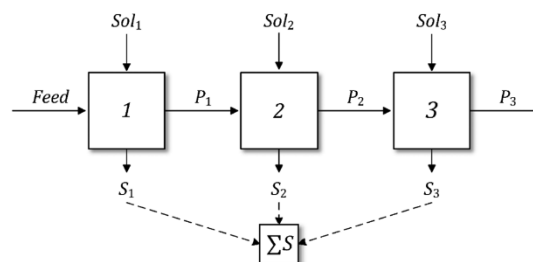


Fig. 1. Flowsheet scheme of CsMP. *S* – supernatant, *P* – precipitate, *Sol* – buffered PEG solution free of the protein.

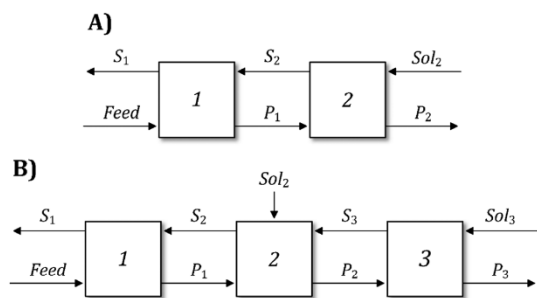


Fig. 2. Flowsheet scheme of CnMP. A) 2-stage precipitation, B) 3-stage precipitation.

$$m_{j,i,ovl} = m_{j,i} \frac{C_{j,i,ovl}}{d_{j,i}} \quad j = S, P \quad (5)$$

The mass of PEG in the i -th stage is calculated from:

$$m_{j,i,PEG} = m_{j,i} \frac{C_{j,i,PEG}}{d_{j,i}} \quad j = S, P, Sol \quad (6)$$

where $C_{j,i,ovl}$ is the overall protein concentration in the i -th stage, $C_{j,i,PEG}$ is the concentration of PEG in the i -th stage, $d_{j,i}$ is the density of the PEG solution.

The reduced mass fraction of the av species in i -th stage is expressed as:

$$U_{j,i,av} = \frac{m_{j,i,av}}{m_{j,i,ovl}} \quad j = S, P \quad (7)$$

The set of the mass balance equations Eqs. (1)–(7) was combined with the empirical thermodynamic dependencies, which correlated the composition of the precipitate and the supernatant in each stage (Section 4.1).

The design of the CsMP process was described in the previous studies (Rumanek, et al. 2023; Zimoch, et al. 2023). The model equations and the definitions of the performance indicators specific for CsMP are given in Appendixes A1 and A2.

3. Materials and methods

3.1. Materials

All chemicals were of analytical grade, unless stated otherwise. Disodium phosphate and sodium acetate were purchased from (Chem-pur Piekary Śląskie, Poland), acetic acid, sodium dihydrogen phosphate and sodium chloride were purchased from Avantor (Gliwice, Poland), poly (ethylene glycol) 3.350 kDa (PEG 3.35) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The monoclonal antibody, mAb2 (mAb2 material), which was a candidate for a biotherapeutic drug, MW = 148 kDa, purity > 99%, was provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Polska). The mean isoelectric points of the variants were: $pI_{av} = 8.7$, $pI_{mv} = 8.9$, $pI_{bv} = 9.1$. The mAb2 material contained 15 mg mL⁻¹ mAb2 dissolved in solutions of 90 mM sodium acetate buffer and 50 mM TRIS.

The variant composition in the feed materials: 37.5% av , 43% mv , 18% bv , 1.5% aggregates (Agg) w/w (used in 2-stage CnMP) or 42% av , 39% mv , 17.5% bv , 1.5% Agg w/w (used in 3-stage CnMP).

3.2. Equipment

The Dionex UltiMate 3000 BioRS System (Thermo Scientific) was used for the determination of the content of av and Agg in the samples of mAb2 solutions. The av content was determined using the analytical

cation exchange HPLC (CEX-HPLC) column ProPac™ WCX-10 BioLC (Thermo Fisher Scientific) with I.D. 0.4 cm and length 25 cm, packed with a resin with particle size of 10 μm. The analytical size exclusion chromatography (SEC-HPLC) column MAbPac SEC-1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) with I.D. 0.4 cm and length 30 cm, packed with a resin with particle size of 5 μm and pore size of 300Å, was used for the determination of the Agg content in the mAb2 solutions.

3.3. Preparation of stock solutions

To prepare the stock solution of mAb2, the solvent of the mAb2 material was exchanged for 50 mM acetate buffer pH 5.0 (SA) using centrifuge tubes Amicon Ultra 50 kDa. The overall mAb2 concentration in the stock was determined spectrophotometrically using the Infinite 200 Pro multimode microplate reader (Tecan Group Ltd).

The PEG stock solution was prepared by dissolving PEG 3.35 (50% w/v) in SA.

3.4. CEX-HPLC analysis

Prior to the CEX-HPLC analysis, the mAb2 solutions were exchanged for the binding buffer (buffer A, Table 1) using the Amicon filters. Then, the samples obtained were injected into the CEX-HPLC column equilibrated with buffer A. After 5 min of the column washing, buffer A was exchanged for 100% v/v buffer B in the 55-min linear gradient. After each run, the column was regenerated with 100% v/v buffer C. The mobile phase flowrate was 0.5 mL min⁻¹. The UV signal of protein was monitored at 280 nm and corrected by subtraction of the blank run of the same gradient program, but without the protein.

3.5. SEC-HPLC analysis

The SEC-HPLC analysis was performed using solutions of 300 mM NaCl in 50 mM phosphate buffer with pH 6.8 as the mobile phase, at the flowrate of 0.2 mL min⁻¹. The UV signal of the protein was monitored at 280 nm and corrected by subtraction of the blank run.

3.6. Countercurrent precipitation

To mimic continuous realization of CnMP, the composition of all streams and their masses were selected based on the model solution (Eqs. (1)–(16)). The experimental realization of 2- and 3-stage CnMP started with stage 2. In 2-stage CnMP, the streams P_1 and Sol_2 of proper composition and quantity were combined to obtain the stream P_2 , which was the process waste, and the supernatant S_1 , which was delivered into the first stage (Fig. 2A). In 3-stage CnMP, the precipitate P_2 was directed to the stage 3 and mixed with Sol_3 . The output streams from the stages 1 and 3 (P_1 , S_3) were mixed with stream Sol_2 to restore the experimental stage 2.

All protein solutions were prepared according to the procedure developed in the previous study (Rumanek, et al., 2023); suitable volumes of adequate streams were mixed together in 5-mL centrifuge tubes. The solutions were weighed and incubated for 20 min at 20 °C while stirring in a rotating mixer at 35 rpm. Then, they were centrifuged for 20 min at 20 °C and 5000 rpm for the phase separation. The supernatants were withdrawn using an automatic pipette. The supernatant and

Table 1
Composition of buffers used for the CEX-HPLC analysis of the mAb2 variant composition.

Buffer % v/v	NaH ₂ PO ₄ 0.025 M	Na ₂ HPO ₄ 0.025 mM	NaCl 0.125 mM
A	35.6	44.4	20
B	8.8	71.2	20
C	5.0	5.0	90

the precipitate slurry obtained were weighed, and then transferred into the adequate stage, in which the precipitate was dissolved in proper volumes of the PEG solutions (Sol).

The overall mAb2 concentration in the supernatants and the precipitates obtained in each stage was measured using the microplate reader, whereas the individual variant content was determined by CEX-HPLC. The protein concentrations, the variant composition and the masses of all streams obtained were compared with the model solution.

The aggregate content in the mAb2 samples was determined by SEC-HPLC. The mAb2 activity was confirmed using the procedure used in the previous work (Rumanek, et al., 2023), with the standard sandwich ELISA protocol, using $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ human IL-23 PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) and 1:3000 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse anti-human IgG monoclonal antibody - solutions 1.1 mg mL^{-1} Abcam (Cambridge, UK).

3.7. Model solution

The model was solved with MATLAB R2022b using the *fsolve* procedure for solving non-linear algebraic equations. The value *fval*, which determine the acceptance level of the solution was set as $|fval| < 0.0001$.

4. Results and discussion

4.1. Thermodynamic dependences

As mentioned above, the mass balance equations (Eqs. (1)–(4)) have to be supplemented with thermodynamic dependences correlating the phase compositions at precipitation equilibrium. For that purpose, we adopted the empirical dependences determined in the previous study based on the measurements of precipitation equilibrium in single-stage precipitation (Rumanek, et al., 2023; Zimoch, et al., 2023). The fraction of the *av* species in the supernatant was correlated with the reduction factor of the overall protein concentration in *i*-th stage, $\beta_{i,ovb}$, as follows:

$$U_{S,i,av} = a_i \beta_{i,ovb} + b_i \quad (8)$$

$$\beta_{i,ovb} = \frac{C_{S,i,ovl}}{C_{i,ovl}} \quad (9)$$

where $C_{i,ovl}$ is the overall concentration of the protein in *i*-th stage, a_i and b_i are empirical coefficients correlated with the overall *av* content in *i*-th stage, $U_{i,av}$, as follows:

$$a_i = -0.567U_{i,av}^2 + 0.905U_{i,av} - 0.044 \quad (10)$$

$$b_i = 1.167U_{i,av}^2 - 0.236U_{i,av} + 0.057 \quad (11)$$

$$U_{i,av} = \frac{m_{S,i+1,ovl}U_{S,i+1,av} + m_{P,i-1,ovl}U_{P,i-1,av}}{m_{S,i+1,ovl} + m_{P,i-1,ovl}} \quad (12)$$

The value of $C_{S,i,ovb}$, which is equivalent to the mAb2 solubility in the supernatant, was correlated with the PEG concentration, as follows:

$$C_{S,i,ovl} = 1.346C_{S,i,PEG}^2 - 70.16C_{S,i,PEG} + 911.4 \quad (13)$$

The corresponding experimental data which were acquired in the previous studies (Rumanek, et al., 2023; Zimoch, et al., 2023) are provided in Appendix A3 in Figs. A1 and A2.

The solution density was correlated with the PEG concentration by the empirical dependence determined experimentally (Appendix 3, Fig. A3):

$$d_{j,i} = 1.659C_{j,i,PEG} + 1.002 \quad j = S, P, Sol \quad (14)$$

Since the precipitate after the phase separation contained only 9.1% w/w of solid mAb2 and 90.9% of the liquid solution, for each stage the density of the precipitate phase was set equal to the supernatant density. Thus, the concentration of PEG in the precipitate was calculated as

follows:

$$C_{P,i,PEG} = 0.91C_{S,i,PEG} \quad (15)$$

The mAb2 concentration in precipitate that contained a residue of the supernatant after the phase separation, $C_{P,i,ovl}$, was expressed as:

$$C_{P,i,ovl} = 90.91 \quad (\text{mg mL}^{-1}) \quad (16)$$

4.2. Model solution

The complete model of CnMP (Eqs. (1)–(16)) contains several parameters, which are: the masses and the compositions of the incoming and outgoing streams of each stage along with the underlying thermodynamic dependencies. The mass of the feed, m_{Feed} , and the content of *av* in the feed stream, $U_{Feed,av}$, are determined by the conditions of the upstream process. The value $U_{S,1,av}$, which determines the *av* content in the product, is defined by the manufacturer acceptance level. Therefore, those three variables: m_{Feed} , $U_{Feed,av}$, $U_{S,1,av}$ have to be set arbitrarily. The set of the decision variables that was used for the optimization of the process performance included: the PEG concentrations and the masses of the PEG solutions which determined the mAb2 solubility and the separation yield for each stage. The remaining model parameters along with the thermodynamic parameters *a* and *b* (Eqs. (10) and (11)) were provided by the model solution.

To optimize the process performance, the model equations were solved for different combinations of the decision variables, which were changed incrementally within the range limited by the process feasibility. The list of all variables along the increments and the ranges of their changes is presented in Table 2. The remaining parameters of Eqs. (1)–(16) are provided by the model solution.

For each combination of the variables, the performance indicators were calculated, which were the separation yield, *Y*, and the relative reduction of the *av* species in the product, φ_{av} . The former was defined as the ratio of the mass of the *mv* and *bv* species in the product to their mass in the feed stream:

$$Y = \frac{m_{S,1,ovl} - m_{S,1,av}}{m_{Feed,ovl} - m_{Feed,av}} 100\% \quad (17)$$

The coefficient φ_{av} was defined as the relative difference between the *av* content in the feed, $U_{Feed,av}$, and in the product, $U_{S,1,av}$:

$$\varphi_{av} = \frac{U_{Feed,av} - U_{S,1,av}}{U_{Feed,av}} 100\% \quad (18)$$

Table 2
Process variables and the model parameters.

Process variables for 3-stage CsMP		
Set	m_{Feed} , $U_{Feed,av}$, $U_{S,1,av}$	arbitrarily
Optimized	$C_{Feed,ovl}$	range 40 - 100 mg mL ⁻¹ with increment 5
	$C_{S,1,PEG}$, $C_{S,2,PEG}$, $C_{S,3,PEG}$	range 20 - 24% w/v with increment 0.2
	$m_{Sol,1}$	range 100 - 140 g with increment 10
Process variables for 2-stage CnMP		
Set	m_{Feed} , $U_{Feed,av}$, $U_{S,1,av}$	arbitrarily
Optimized	$C_{Feed,ovb}$	range 30 - 70 mg mL ⁻¹ with increment 2
	$C_{S,1,PEG}$, $C_{S,2,PEG}$	range 20 - 24% w/v with increment 0.2
Process variables for 3-stage CnMP		
Set	m_{Feed} , $U_{Feed,av}$, $U_{S,1,av}$	arbitrarily
Optimized	$C_{Feed,ovl}$	range 20 - 80 mg mL ⁻¹ with increment 2
	$C_{S,1,PEG}$, $C_{S,2,PEG}$, $C_{S,3,PEG}$	range 20 - 24% w/v with increment 0.2
	$C_{Sol,3,PEG}$	range 19 - 26% w/v with increment 1

The outcome of the model solutions in the form of the values of all variables and the corresponding performance indicators, Y and φ_{av} , was subjected to the segregation according to several criteria, which ensured the process feasibility, i.e.:

- 1) negative values of the process variables were excluded,
- 2) the maximum protein concentration was $C_{i,ovl} < 130 \text{ mg mL}^{-1}$, which corresponded to the protein solubility limit in SA buffer free of PEG,
- 3) the maximum PEG concentration was $C_{S,i,PEG} < 50\% \text{ w/v}$, which was the solubility limit of PEG 3.35 in SA. Both those constraints were accounted for by the following equations:

$$\frac{130 - C_{Feed,ovl}}{130} 50\% - C_{Feed,PEG} > 0 \quad (19)$$

$$\frac{m_{PA,i} - m_{P,i}}{m_{PA,i}} 50\% - C_{PA,2,PEG} > 0 \quad (20)$$

Additionally, the thermodynamic dependencies were limited to the range of the thermodynamic data acquired experimentally, i.e.:

- 4) $\beta_{i,ovl}$ (Eq. (9)) was limited to: $0.25 < \beta_{i,ovl} < 0.8$.

As mentioned above, the separation selectivity diminishes with increasing ionic strength of the solution. That effect is illustrated in Fig. A4 in Appendix 4. Therefore, the precipitation process was performed within the solutions of PEG in SA without addition of salts.

4.3. Optimization results

The model solution obtained for different combinations of the decision variables, was presented in 2D plane, in the form of the operating space, where the coordinate axes corresponded to the PEG concentrations in the supernatants, $C_{S,i,PEG}$, and the separation yield, Y . For each set of the obtained variables and thermodynamic parameters, the process was feasible and could be realized in the continuous manner.

Figs. 3 and 4 illustrate the operating space generated for 2-stage and 3-stage CnMP at the defined level of the relative av reduction $\varphi_{av} = 37\%$ (Eq. (17)) and the defined content of av in the feed $U_{Feed,av} = 40\% \text{ w/w}$, which corresponded to the composition of the stock material and the demand for the av level specified by the manufacturer; maximum 25% av in the product. As can be observed, for 2-stage CnMP, the highest yield values of about 85% are located at the upper boundaries for the PEG concentrations: $C_{1,PEG} = 23\text{--}24\% \text{ w/v}$, $C_{2,PEG} = 22\text{--}24\% \text{ w/v}$. For 3-stage CnMP, the highest values of the yield correspond to $C_{S,1,PEG} = 24\% \text{ w/v}$, $C_{S,2,PEG} = 22.5\% \text{ w/v}$, $C_{S,3,PEG} = 23.5\% \text{ w/v}$.

Fig. 5 presents the comparison between the performance of CsMP (Fig. 5A), AEX (Fig. 5B), 2- and 3-stage CnMP (Fig. 5C,D) in 2D plane, whose coordinate axes correspond to the demand for the av reduction, φ_{av} , and to the specified av content in the feed. To calculate the

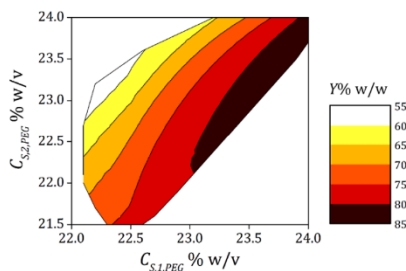


Fig. 3. Model solution for 2-stage CnMP projected onto 2D plane for $U_{Feed,av} = 40\% \text{ w/w}$ and $\varphi_{av} = 37\%$. $C_{S,1,PEG}$, $C_{S,2,PEG}$ are the decision variables (Table 2). Y is the operation yield.

performance of the separation by AEX, the dynamic model developed in the previous study was used (Zimoch, et al., 2023). The protein processing by AEX was preceded by other purification steps, in which low and high molecular weight impurities were removed. Such an approach is typically applied in downstream processing of mAbs, where the variant separation is performed in one of polishing steps. Therefore, Fig. 5 provides the comparison of the efficiency of the av reduction by different methods applicable in final stages of the mAb purification.

It can be observed that CnMP outperforms CsMP and AEX with respect to the operation yield, Y , and the level of the av reduction.

In all presented cases, the maximum yield that can be achieved decreased with increasing demand for the av reduction (φ_{av}) and with increasing the av content in the feed ($U_{Feed,av}$). In the 3-stage CsMP arrangement, the driving force for precipitation decreased from stage to stage. This stemmed from increasing av concentration in the processed supernatants, which deteriorated the separation selectivity (Rumanek et al., 2023). Therefore, extension of the precipitation cascade with additional steps did not deliver any substantial improvement. As the separation selectivity was not sufficient to achieve proper purification level for the feeds with a high av content, the operating window was narrow. The yield that could be achieved varied between maximum about 70% and minimum 50%. In AEX, the operating window was wider, the attainable yield varied from maximum about 80% and minimum 30%. The selectivity of the AEX separation was a complex function of the av content in the feed and the loading conditions, therefore for certain ranges of the av content in the feed, the required levels of the av reduction were unachievable (Zimoch, et al. 2023).

In the case of 2-stage and 3-stage CnMP, the operating window was the widest at the highest yield compared with AEX and CsMP. For 2-stage CnMP, the maximum yield was 85% and minimum $Y = 37\% \text{ w/w}$, whereas for 3-stage CnMP, the yield varied between maximum over 90% and minimum 50% w/w .

The choice between 2-stage and 3-stage CnMP should depend on the av content in the feed, the demand for its reduction and the yield requirement. For instance, the reduction of av from the feed of $U_{Feed,av} = 35\%$ by $\varphi_{av} = 37\%$ at $Y = 90\%$ can be provided by 2-stage CnMP, but to reach the reduction level of $\varphi_{av} = 50\%$ for the same feed composition and the same yield demand, 3-stage CnMP needs to be used. Further extension of the 3-stage cascade with additional steps makes the synchronization of the stream between the stages very difficult, or for some process variables impossible. Therefore, a 3-stage CnMP cascade is of maximum size.

4.4. Model verification

To verify the model predictability and the process feasibility, 2- and 3-stage CnMP were performed experimentally. Table 3 shows the comparison of the operation yield achieved experimentally and provided by the model solution for $U_{Feed,av} = 37.5\% \text{ w/w}$, $\varphi_{av} = 37\%$. As mentioned above, it corresponds to the feed material delivered and the manufacture-defined acceptance level for the av content. Additionally, the coefficient $\beta_{i,ovl}$ was monitored, as it determined the thermodynamic dependencies (Eq. (8)).

Table 4 presents the mass balance closure for the performed experiment. As it can be seen, the mass balance is conserved for both stages and for the whole unit, therefore the process can be performed in the continuous manner.

Similar quality of the comparison between the model predictions and the experimental data was achieved for 3-stage CnMP, which is demonstrated in Table 5. Also in this case, the mass balance was conserved (Table 6).

For both 2- and 3-stage CnMP, the mass of the protein processed in each stage was different, which also concerned the processed solution volumes. This stems from the synchronization of the supernatant and precipitate streams between the subsequent stages. In CsMP only precipitate streams are subsequently processed, therefore the process

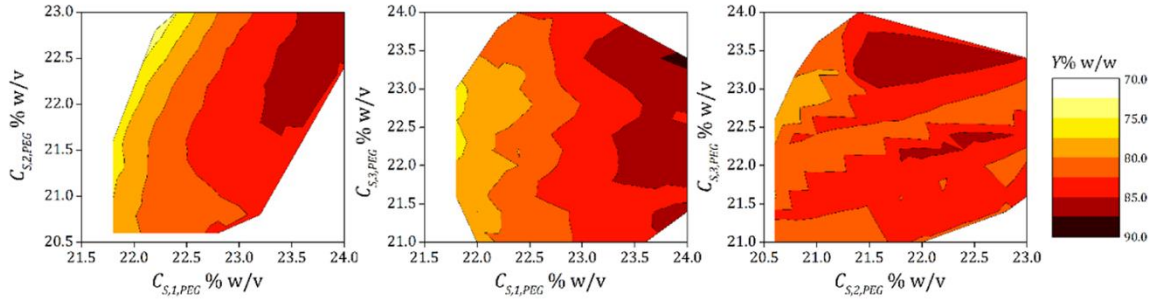


Fig. 4. Model solution for 3-stage CnMP projected onto 2D plane for $U_{Feed,av} = 40\% \text{ w/w}$, $\varphi_{av} = 37\%$. $C_{S,1,PEG}$, $C_{S,2,PEG}$, $C_{S,3,PEG}$ are the decision variables (Table 2).

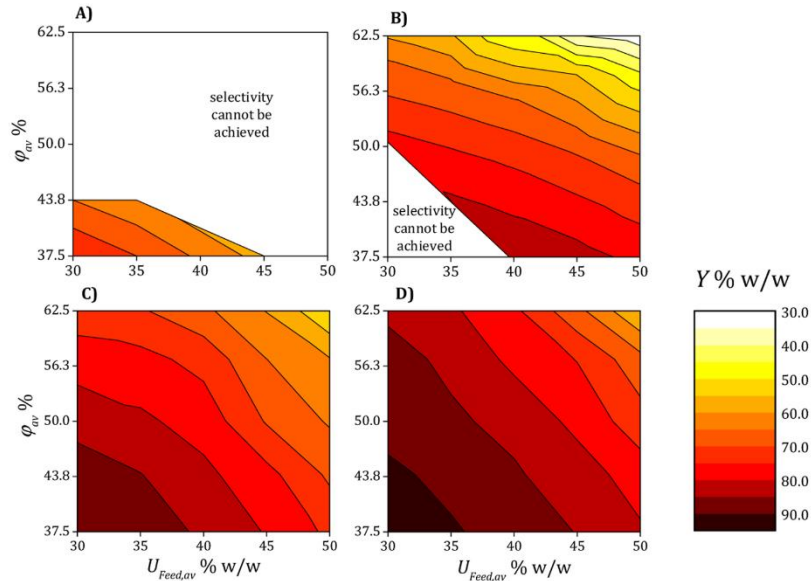


Fig. 5. Comparison of the efficiency of the separation process: A) 3-stage CsMP, B) AEX, C) 2-stage CnMP, D) 3-stage CnMP.

Table 3
Comparison of the experimental data and the model solution for 2-stage CnMP at $U_{Feed,av} = 37.5\% \text{ w/w}$, $\varphi_{av} = 37\%$, i denotes the stage number (1, 2).

	$U_{Feed,av}$	$U_{P,i,av} \text{ \% w/w}$		$U_{S,i,av} \text{ \% w/w}$		$\beta_{i,out}$		Y
	$\% \text{ w/w}$	1	2	1	2	1	2	$\% \text{ w/w}$
exp.	37.5	46	62	24	38	0.40	0.72	78
sym.	37.5	49	69	24	42	0.40	0.78	84
rel. error %	0	5.2	9.9	0.0	8.9	0.90	8.9	8.0

Table 4
Mass balance closure for 2-stage CnMP at $U_{Feed,av} = 37.5\% \text{ w/w}$, $\varphi_{av} = 37\%$, in_i , out_i denote the sum of the inlet and outlet streams, respectively, m_{ovt} is the overall mass of the protein delivered in the feed stream, $m_{i,ovt}$ is the overall mass of the protein processed in i -th stage.

		m_{ovt}		
		mg	mg	
exp.	in	17.3	31.2	19.9
	out	17.6	30.9	20.4

design has more degrees of freedom compared with CnMP. This allowed keeping the masses and the volumes of all streams, thus the volumes of the reactors, the same in all stages without deteriorating the performance indicators.

Additionally, the aggregate distribution between the product and the waste of the process was determined. Table 7 shows the results achieved for 3-stage CnMP, which indicate that the product contained a smaller amount of the mAb2 aggregates compared with the feed material. As can be observed, the efficiency of the aggregate removal was comparable to that achieved in AEX in the previous study (Zimoch, et al., 2023). This is an additional benefit of the CnMP process. The mAb2 aggregates accumulated in the process waste, i.e., the precipitate withdrawn from the last stage 3. They were in a small excess compared with the feed material, which implies that they could be formed during the process, but in very small quantity, which did not affect the yield of the operation.

The activity test performed for the final product confirmed that the activity of mAb2 was preserved during its processing by CnMP.

5. Conclusions

The process of countercurrent multistage precipitation, CnMP, was

Table 5
Comparison of the experimental data and the model solution for 3-stage CnMP at $U_{Feed,av} = 42\%$ w/w, $\varphi_{av} = 40\%$.

	$U_{Feed,av}$	$U_{P,i,av}$ % w/w			$U_{S,i,av}$ % w/w			$\beta_{i,out}$			Y
	% w/w	1	2	3	1	2	3	1	2	3	w/w
exp.	42	47	65	78	25	43	54	0.34	0.77	0.56	80
mod.	42	49	64	72	25	44	54	0.33	0.78	0.52	83
rel. error.%	0.0	4.4	2.1	7.4	0.0	1.7	0.0	2.5	2.2	9.4	3.3

Table 6
Mass balance closure for 3-stage CnMP at $U_{Feed,av} = 42\%$ w/w, $\varphi_{av} = 40\%$, in, out denote the sum of the inlet and outlet streams, respectively.

		m_{out}			
		mg	1	2	3
exp.	in	33.7	74.9	67.9	28.0
	out	33.7	74.6	67.3	27.5

Table 7
Aggregate distribution between the product and waste of the process achieved in this study for 3-stage CnMP for $U_{Feed,av} = 42\%$ w/w, $\varphi_{av} = 40\%$, and in AEX for $U_{Feed,av} = 49\%$ w/w, $\varphi_{av} = 47\%$ (Zimoch, et al., 2023).

	3-stage CnMP			AEX		
	m_{out}	m_{Agg}	$U_{i,Agg}$	m_{out}	m_{Agg}	$U_{i,Agg}$
	mg	mg	% w/w	mg	mg	% w/w
Feed	33.74	0.51	1.5	145.78	2.45	1.7
Product	21.13	0.06	0.3	48.33	0.23	0.5
Waste	12.62	1.11	8.8	94.46	2.52	2.7

employed for the adjustment of the av content in a mAb pool. In this process, the precipitate and the liquid phase were transported counter-currently. This allowed the enhancement of the separation efficiency compared with multistage crosscurrent precipitation (CsMP) and anion exchange chromatography (AEX) developed in the previous studies. The process was performed for the mAb2 material as a model mAb pool, in the presence of PEG 3.35 kDa at pH 5, which was markedly lower than the isoelectric points of all variants. Those conditions allowed preferential precipitation of av . The precipitate enriched with av was the process waste, whereas the supernatant withdrawn from the last stage was the separation product with the desired level of the av reduction.

Appendix

A1. CsMP mass balance equations

For the total mass balance of the inlet and outlet streams of i -th precipitation stage it holds:

$$m_{P,i-1} + m_{Sol,i} = m_{P,i} + m_{S,i} \quad (A1)$$

where $m_{P,0} = m_{Feed}$.

For the overall mass balance of the protein (including all variants) it holds:

$$m_{P,i-1,out} = m_{P,i,out} + m_{S,i,out} \quad (A2)$$

For the mass balance of the av species it holds:

$$m_{P,i-1,out} U_{P,i-1,av} = m_{P,i,out} U_{P,i,av} + m_{S,i,out} U_{S,i,av} \quad (A3)$$

For the total mass balance of PEG it holds:

$$m_{P,i-1,PEG} + m_{Sol,i,PEG} = m_{P,i,PEG} + m_{S,i,PEG} \quad (A4)$$

The mass of PEG in the i -th stage is calculated from:

$$m_{j,i,PEG} = m_{j,i} \frac{C_{j,i,PEG}}{d_{j,i}} \quad j = S, P, Sol \quad (A5)$$

A2. CsMP performance indicators

The CsMP yield was defined as the ratio of the mass of the mv and bv species in the product (supernatants pooled together) to their mass in the feed

Additionally, the mAb2 aggregates present in the feed material were accumulated in the precipitate, thus their amount was reduced in the final product. The process was designed and optimized based on a mathematical model, which consisted of the set of steady state mass balance equations coupled with the thermodynamic dependencies.

The maximum yield achieved in CnMP depended on the number of stages and the specified values of the av content in the feed solutions, $U_{Feed,av}$, and the desired level of the av reduction in the product, φ_{av} . For 2-stage CnMP, the maximum yield was $Y = 90\%$ and minimum $Y = 50\%$ w/w, which corresponded to the range of $U_{Feed,av} = 30 - 50\%$ w/w and $\varphi_{av} = 37.5 - 62\%$. 3-stage CnMP enabled up to 12% increase in yield compared with 2-stage CnMP.

3-stage CnMP enabled up to 28% increase in yield and up to 25% increase in φ_{av} compared with CsMP. The yield achieved in 3-stage CnMP was up to 37% higher, and φ_{av} was up to 12% higher than that in AEX. Moreover, the throughput of the chromatographic process was limited by the time periods of the product elution and the column regeneration, whereas the throughput of the precipitation was limited only by the size of the reactor.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Financial support of this work by Narodowe Centrum Nauki (UMO-2018/31/N/ST8/02538) is gratefully acknowledged. We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland for the supplement of biological material.

stream:

$$Y = \frac{m_S \sum_{ovl} - m_S \sum_{av}}{m_{Feed,ovl} - m_{Feed,av}} 100\% \tag{A6}$$

The coefficient φ_{av} was defined as the relative difference between the *av* content in the feed, $U_{Feed,av}$, and in the product, $U_{S,\sum av}$:

$$\varphi_{av} = \frac{U_{Feed,av} - U_{S,\sum av}}{U_{Feed,av}} 100\% \tag{A7}$$

The constraint for the constant solution volume, V , was used for each stage of the process, $V_{i-1} = V_i = V_{i+1}$ where:

$$V_i = \frac{m_{P,i-1} + m_{Sol,i}}{d_i} \tag{A8}$$

A3. Equilibrium dependencies

Figs A1 and A2 presents the equilibrium data acquired in the previous studies. Fig. A3 shows the dependence of the solution density vs the PEG concentration, determined experimentally in this study.

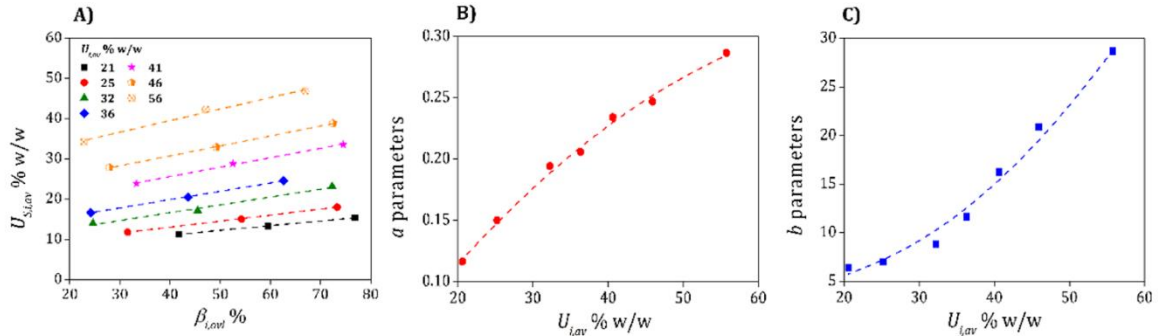


Fig. A1. Precipitation equilibrium data used for the determination of thermodynamic dependencies (Eqs. (8–(12)). A) Reduced *av* fraction in supernatant vs the reduction factor of the protein concentration in *i*-th stage, $\beta_{i,ovl}$, which is easily available from spectroscopic measurements, B) dependence of the *a* parameter vs the total fraction of *av* in *i*-th stage, C) dependence of the *b* parameter vs the total fraction of *av* in *i*-th stage (Rumanek, et al., 2023; Zimoch, et al., 2023).

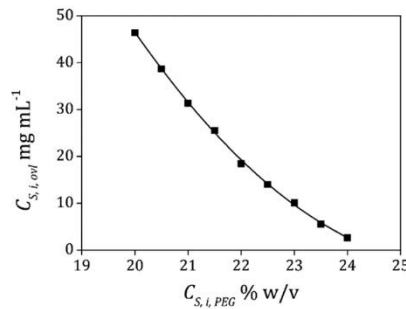


Fig. A2. Solubility of *mab2* vs the PEG 3.35 concentration (Rumanek, et al., 2023).

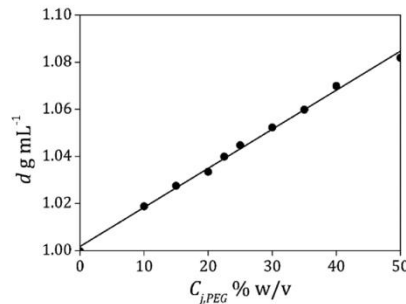
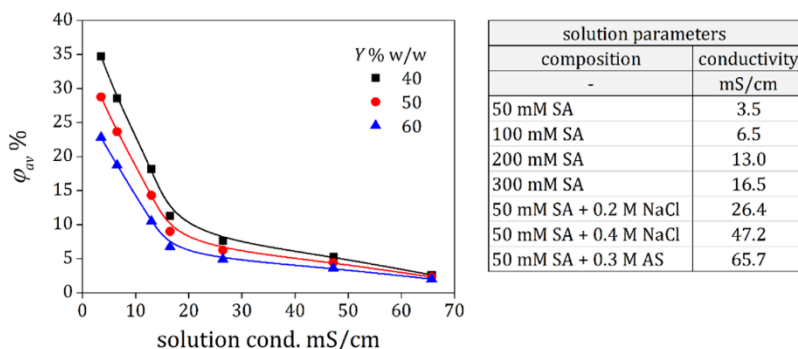


Fig. A3. Density of the solution of SA vs the PEG 3.35 concentration.

A4. Effect of ionic strength on the *av* reduction

Fig. A4 exemplifies the detrimental effect of the presence of salt ions on the separation efficiency.

Fig. A4. Level of the ϕ_{av} reduction vs the solution conductivity for $U_{Feed,av} = 40\%$ w/w, $C_{Feed,mAb2} = 20\text{ mg mL}^{-1}$, $C_{Feed,PEG} = 7\text{--}24\%$ w/w (depending on the the salt concentration).

References

- Ahmed, S., Atia, N.N., Rageh, A.H., 2019. Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variants. *Talanta* 199, 347–354 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.082>.
- Alt, N., Zhang, T.Y., Motchnik, P., Taticek, R., Quarmby, V., Schlothauer, T., Beck, H., Emrich, T., Harris, R.J., 2016. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals* 44 (5), 291–305 <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2016.06.005>.
- Baran, K., Zimoch, P., Stańczak, A., Piątkowski, W., Antos, D., 2021. Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.46260.7>.
- Beyer, B., Walch, N., Jungbauer, A., Lingg, N., 2018. How similar is biosimilar? A comparison of infliximab therapeutics in regard to charge variant profile and antigen binding affinity. *Biotechnol. J.* 14, 1800340 <https://doi.org/10.1002/biot.201800340>.
- Boswell, C.A., Tesar, D.B., Mukhyala, K., Theil, F.P., Fielder, P.J., Khawli, L.A., 2010. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjugate Chem.* 21, 2153–2163 <https://doi.org/10.1021/bc100261d>.
- Bronson, K., Jia, A.Y., 2014. Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 30, 140–146 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.012>.
- Burgstaller, D., Jungbauer, A., Satzer, P., 2019. Continuous integrated antibody precipitation with two-stage tangential flow microfiltration enables constant mass flow. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 1053–1065 <https://doi.org/10.1002/bit.26922>.
- Chung, S., Tian, J., Tan, Z., Chen, J., Lee, J., Borys, M., Li, Z.J., 2018. Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles. *Biotechnol. Bioeng.* 115 (7), 1646–1665 <https://doi.org/10.1002/bit.26587>.
- Chung, S., Tian, J., Tan, Z., Chen, J., Zhang, N., Huang, Y., Vandermark, E., Lee, J., Borys, M., Li, Z.J., 2019. Modulating cell culture oxidative stress reduces protein glycation and acidic charge variant formation. *mAbs* 1 (1), 205–216. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1537533>.
- Curtis, R.A., Lue, L., 2006. A molecular approach to bioseparations: protein–protein and protein–salt interactions. *Chem. Eng. Sci.* 61, 907–923.
- Curtis, R.A., Ulrich, J., Montaser, A., Prusnitz, J.M., Blanch, H.W., 2002. Protein–protein interactions in concentrated electrolyte solutions. Hofmeister-series effects. *Biotechnol. Bioeng.* 79, 367–380. <https://doi.org/10.1002/bit.10342>.
- Dakshinamurthy, P., Mukunda, P., Kodaganti, B.P., Shenoy, B.R., Natarajan, B., Maliwalave, A., Halan, V., Murugesan, S., Maity, S., 2017. Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab. *Biologicals* 46, 4656 <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2016.12.006>.
- Fekete, S., Beck, A., Fekete, J., Guillaume, D., 2015. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography. Part I: salt gradient approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102, 33–44 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>.
- Ferreira-Faria, D., Domingos-Moreira, F., Aires-Barros, M.R., Ferreira, A., Azevedo, A.M., 2023. Continuous precipitation of antibodies using oscillatory flow reactor: a proof of concept. *Sep. Purif. Technol.* 317, 123924 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123924>.
- Giese, G., Myrold, A., Gorrell, J., Persson, J., 2013. Purification of antibodies by precipitating impurities using Polyethylene glycol to enable a two chromatography step process. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 938, 14–21 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.029>.
- Gu, Q., Li, Z., Coffman, J.L., Przybycien, T.M., Zydny, A.L., 2020. High throughput solubility and redissolution screening for antibody purification via combined PEG and zinc chloride precipitation. *Biotechnol. Prog.* 36 <https://doi.org/10.1002/btpr.3041>, 3041.
- Guillarme, D., Fekete, S., Beck, A., 2015. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102, 33–44 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>.
- Haberger, M., Bomans, K., Diepold, K., Hook, M., Gassner, J., Schlothauer, T., Zwick, A., Spick, C., Kepert, J.F., Hienz, B., Wiedmann, M., Beck, H., Molhøj, M., Knoblich, C., Grauschopf, U., Reusch, D., Bulau, P., 2014. Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies. Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes. *mAbs* 6 (2), 327–329. <https://doi.org/10.4161/mabs.27876>.
- Hammerschmidt, N., Tscheliessnig, A., Sommer, R., Helk, B., Jungbauer, A., 2014. Economics of recombinant antibody production processes at various scales: Industry-standard compared to continuous precipitation. *Biotechnol. J.* 9 (6), 766–775 <https://doi.org/10.1002/biot.201300480>.
- Hammerschmidt, N., Hintersteiner, B., Lingg, N., Jungbauer, A., 2015. Continuous precipitation of IgG from CHO cell culture supernatant in a tubular reactor. *Biotechnol. J.* 10 (8), 1196–1205 <https://doi.org/10.1002/biot.201400608>.
- Hammerschmidt, N., Hobiger, S., Jungbauer, A., 2016. Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: sequential precipitation and resolubilization. *Proc. Biochem.* 51 (2), 325–332 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.032>.
- Harris, R.J., Shire, S.J., Winter, C., 2004. Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies. *Drug Dev. Res.* 61, 137–154 <https://doi.org/10.1002/ddr.10344>.
- He, X.Z., Que, A.H., Mo, J.J., 2009. Analysis of charge heterogeneities in mAbs using imaged CE. *Electrophoresis* 30, 714–722 <https://doi.org/10.1002/elps.200800636>.
- Hintersteiner, B., Lingg, N., Janzek, E.E., Mutschlechner, O., Loibner, H., Jungbauer, A., 2016a. Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein. *Biotechnol. J.* 11 (12), 1617–1627 <https://doi.org/10.1002/biot.201600504>.
- Hintersteiner, B., Lingg, N., Zhang, P., Woen, S., Hoi, K.M., Stranner, St., Wiederkum, S., Mutschlechner, O., Schuster, M., Loibner, H., Jungbauer, A., 2016b. Charge heterogeneity: Basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors. *mAbs* 8 (8), 1548–1560 <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1225642>.
- Hötzel, I., Theil, F.-P., Bernstein, L.J., Prabhu, S., Deng, R., Quintana, L., Lutman, J., Sibia, R., Chan, P., Bumbaca, D., Fielder, P., Carter, P.J., Kelley, R.F., 2012. A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance. *mAbs* 4 (6), 753–760 <https://doi.org/10.4161/mabs.22189>.
- Huang, L., Lu, J., Wroblewski, V.J., Beals, J.M., Riggan, R.M., 2005. In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. *Anal. Chem.* 77 (5), 1432–1439. <https://doi.org/10.1021/ac0494174>.
- Jian, S.Y., Shi, C., Leong, H.Y., Yuan, J.J., Gao, D., Wang, H.B., Yao, S.J., Lin, D.Q., 2021. A novel twin-column continuous chromatography approach for separation and enrichment of monoclonal antibody charge variants. *Eng. Life Sci.* 21, 382–391 <https://doi.org/10.1002/elsc.202000094>.
- Jiang, G., Yu, Ch, Yadav, Hu, D.B., Amurao, Z., Duenas, A., Wong, E., Iverson, M., Zheng, M., Lam, K., Chen, X., Vega, J., Ulufatu Sh, R., Leddy, C., Davis, H., Shen, A., Wong, P.Y., Harris, R., Wang, Y.J., Li, D., 2016. Evaluation of heavy-chain c-terminal deletion on product quality and pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *J. Pharm. Sci.* 105 (7), 2066–2072 <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.027>.
- Jing, S.-Y., Gou, J.X., Gao, D., Wang, H.B., Yao, S.J., Lin, D.Q., 2020. Separation of monoclonal antibody charge variants using cation exchange chromatography: resins and separation conditions optimization. *Sep. Purif. Technol.* 235, 116136 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116136>.
- Jing, S.-Y., Shi, C., Gao, D., Wang, H.-B., Yao, S.-J., Lin, D.-Q., 2023. Improved process design for monoclonal antibody charge variants separation with multicolour counter-current solvent gradient purification. *J. Chromatogr. A* 1707 (27), 464292 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464292>.
- Khanal, O., Kumar, V., Westerberg, K., Schlegel, F., Lenhoff, A.M., 2019. Multi-column displacement chromatography for separation of charge variants of monoclonal

- antibodies. *J. Chromatogr. A* 1586, 40–51 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.074>.
- Khawli, L.A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z.W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., Nijem, I., Allison, D.E., Wong, P.Y., Kao, Y.-H., Quan, C., Joshi, A., Harris, R.J., Motchnik, P., 2010. Charge variants in IgG1. Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *mAbs* 2, 613–624 <https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13333>.
- Knevelman, C., Davies, J., Allen, L., Titchener-Hooker, N.J., 2010. High-throughput screening techniques for rapid PEG-based precipitation of IgG₄ mAb from clarified cell culture supernatant. *Biotechnol. Prog.* 26 (3), 697–705 <https://doi.org/10.1002/btpr.357>.
- Kuczewski, M., Schirmer, E., Lain, B., Zarbis-Papastoitis, G., 2011. A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER C6 human cell line. *Biotechnol. J.* 6, 56–65 <https://doi.org/10.1002/biot.201000292>.
- Lee, H.J., Lee, C.M., Kim, K., Yoo, J.M., Kang, S.-M., Ha, G.-S., Park, M.K., Choi, M.-A., Seong, B.L., Lee, D.E., 2018. Purification of antibody fragments for the reduction of charge variants using cation exchange chromatography. *J. Chromatogr. B* 1080, 20–26 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.030>.
- Li, B., Tesar, D., Boswell, C.A., Cahaya, H.S., Wong, A., Zhang, J., Meng, Y.G., Eigenbrot, Ch, Pantua, H., Diao, J., Kapadia, Sh.B., Deng, R., Kelley, R.F., 2014. Framework selection can influence pharmacokinetics of a humanized therapeutic antibody through differences in molecule charge. *mAbs* 6, 1255–1264 <https://doi.org/10.4161/mabs.29809>.
- Li, Z., Gu, Q., Coffman, J.L., Przybycien, T., Zydny, A.L., 2019. Continuous precipitation for monoclonal antibody capture using countercurrent washing by microfiltration. *Biotechnol. Prog.* 35 e2886. <https://doi.org/10.1002/btpr.2886>.
- Liu, H., Gaza-Bulsecu, G., Faldut, D., Chumsae, C., Sun, J., 2008. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J. Pharm. Sci.* 97, 2426–2447 <https://doi.org/10.1002/jps.21180>.
- Liu, H., Ponniah, G., Zhang, H.-M., Nowak, Ch, Neill, A., Gonzalez-Lopez, N., Patel, R., Cheng, G., Kita, A.Z., Andrien, B., 2014. In vitro and in vivo modifications of recombinant and human IgG antibodies. *mAbs* 6, 1145–1154 <https://doi.org/10.4161/mabs.29883>.
- Liu, S., Verma, A., Kettenberger, H., Richter, W.F., Shah, D.K., 2021. Effect of variable domain charge on in vitro and in vivo disposition of monoclonal antibodies. *mAbs* 13 (1), 1993769. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1993769>.
- Miao, S., Xie, P., Zou, M., Fan, L., Liu, X., Zhou, Y., Zhao, L., Ding, D., Wang, H., Tan, W., 2017. Identification of multiple sources of the acidic charge variants in an IgG1 monoclonal antibody. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 101 (14), 5627–5638. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8301-x>.
- Müller-Späh, T., Aumann, L., Melter, L., Ströhlein, G., Morbidelli, M., 2008. Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolonn counter-current solvent gradient purification (MCSGP). *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1166–1177 <https://doi.org/10.1002/bit.21843>.
- Müller-Späh, T., Krättli, M., Aumann, L., Ströhlein, G., Morbidelli, M., 2010. Increasing the activity of monoclonal antibody therapeutics by continuous chromatography (MCSGP). *Biotechnol. Bioeng.* 107, 652–662 <https://doi.org/10.1016/j.bi.22843>.
- Rathore, A.S., 2010. Setting specifications for a biotech therapeutic product in the quality by design paradigm. *BioPharm. Int.* 23 (1), 46–53.
- Rehder, D.S., Chelius, D., McAuley, A., Dillon, T.M., Xiao, G., Crouse-Zeineddini, J., Vardanyan, L., Perico, N., Mukku, V., Brems, D.N., Matsumura, M., Bondarenko, P. V., 2008. Isomerization of a single aspartyl residue of anti-epidermal growth factor receptor immunoglobulin gamma2 antibody highlights the role avidity plays in antibody activity. *Biochemistry* 47, 2518–2530 <https://doi.org/10.1021/bi7018223>.
- Rosa, Ricardo M.S., Cunha, S.S., da Silva, R., L. C., Azevedo, A.M., Fernandes-Platzgummer, A., 2023. Anion exchange chromatography-based platform for the scalable purification of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells. *Sep. Purif. Technol.* 310, 123238 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123238>.
- Rumanek, T., Kołodziej, M., Piątkowski, W., Antos, D., 2023. Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools. *Biotechnol. Bioeng.* 120, 114–124 <https://doi.org/10.1002/bit.28257>.
- Santora, L.C., Krull, L.S., Grant, K., 1999. Characterization of recombinant human monoclonal tissue necrosis factor- α antibody using cation-exchange HPLC and capillary isoelectric focusing. *Anal. Biochem.* 275, 98–108 <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4275>.
- Sim, S.L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, R.B.H., Jungbauer, A., 2012a. Branched polyethylene glycol for protein precipitation. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 736–746 <https://doi.org/10.1002/bit.24343>.
- Sim, S.L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, B.H., Jungbauer, A., 2012b. Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius. *J. Biotechnol.* 157 (2), 315–319 <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2011.09.028>.
- Singh, S.K., Narula, G., Rathore, A.S., 2016. Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes? *Electrophoresis* 37 (17–18), 2338–2346 <https://doi.org/10.1002/elps.201600078>.
- Sommer, R., Satzer, P., Tscheliessnig, A., Schulz, H., Helk, B., Jungbauer, A., 2014. Combined polyethylene glycol and CaCl₂ precipitation for the capture and purification of recombinant antibodies. *Process Biochem.* 49, 2001–2009 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.012>.
- Sommer, R., Tscheliessnig, A., Satzer, P., Schulz, H., Helk, B., Jungbauer, A., 2015. Capture and intermediate purification of recombinant antibodies with combined precipitation methods. *Biochem. Eng. J.* 93, 200–211 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.008>.
- Teshima, G., Li, M.X., Danishmand, R., Obi, C., To, R., Huang, C., Kung, J., Lahidji, V., Freeberg, J., 2011. Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange. *J. Chromatogr. A* 1218 (15), 2091–2097 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.107>.
- Thorner, L., Tomic, M., 2011. Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange. *J. Chromatogr. A* 1218 (15), 2091–2097 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.107>.
- van Beers, M.M.C., Bardor, M., 2012. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnol. J.* 7, 1473–1484 <https://doi.org/10.1002/biot.201200065>.
- Vlasak, J., Ionescu, R., 2008. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (6), 468–481 <https://doi.org/10.2174/138920108786786402>.
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D.L., King, K., Nema, S., 2007. Antibody structure, instability, and formulation. *J. Pharm. Sci.* 96 (1), 1–26 <https://doi.org/10.1002/jps.20727>.
- Zhang, T., Bourret, J., Cano, T., 2011. Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography. *J. Chromatogr. A* 1218, 5079–5086 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.061>.
- Zimoch, P., Rumanek, T., Kołodziej, M., Piątkowski, W., Antos, D., 2023. Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool. *J. Chromatogr. A* 1701. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464070>, 464070.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool

Patrycja Zimoch^a, Tomasz Rumanek^a, Michał Kołodziej^b, Wojciech Piątkowski^b, Dorota Antos^{b,*}

^a Doctoral School of the Rzeszow University of Technology, Poland

^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2023

Revised 4 May 2023

Accepted 13 May 2023

Available online 14 May 2023

Keywords:

Ion exchange chromatography

Mathematical modeling

Monoclonal antibody

Precipitation

Variant separation

ABSTRACT

The acidic charge variants (*av*) of monoclonal antibodies (mAb) are often reported to have reduced therapeutic potency compared with the main (*mv*) and basic variants (*bv*), therefore reduction in the *av* content in mAb pools is often prioritized over reduction in the *bv* content.

In previous studies we described two different methods for reducing the *av* content, which were based on either ion exchange chromatography or selective precipitation in polyethylene glycol (PEG) solutions. In this study, we have developed a coupled process, in which advantages of simplicity and ease in realization of PEG-aided precipitation and high separation selectivity of anion exchange chromatography (AEX) were exploited. The design of AEX was supported by the kinetic-dispersive model, which was supplemented with the colloidal particle adsorption isotherm, whereas the precipitation process and its coupling with AEX was quantified by simple mass balance equations and underlying thermodynamic dependencies. The model was used to assess the performance of the coupling of AEX and precipitation under different operating conditions. The advantage of the coupled process over the stand-alone AEX depended on the demand for the *av* reduction as well as the initial variant composition of the mAb pool, e.g., the improvement in the throughput provided by the optimized sequence of AEX and PREC varied from 70 to 600% for the initial *av* content changed from 35 to 50% w/w, and the reduction demand changed from 30 to 60%.

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The structural complexity of molecules of monoclonal antibodies (mAbs) is a cause of their propensity for modifications. Hence, the formulation of mAbs often results in different types of micro-heterogeneity, which influences the biological activity, stability, and biophysical properties of the product as well as its potential side-effects [1,2]. Charge variants are the most common species of mAb heterogeneities. They are classified according to their pI values as acidic variants (*av*) with a lower pI, main variants (*mv*) with an intermediate pI, and basic variants (*bv*) with a higher pI [3].

Several literature reports indicated decreased therapeutic potency of *av* compared with *mv* and *bv* species [4–9]. Therefore, the level of the *av* content in the mAb pool has to meet a regulatory acceptance criterion [10,11]. Usually, complete removal of *av* from the mAb pool is not required, and the *av* content below $25 \pm 5\%$ w/w of the total mAb pool is often at the acceptable level [11–16].

To separate mAb variants, ion exchange chromatography (IEX) is used as the gold standard [15,17–21]. Nevertheless, a drawback of the process is peak overlap of variants that results from similarity of their structures and charges. This renders complete separation of charge variants very difficult. The separation efficiency can be improved by reduction in the particle size of the resin [22,23], but at the expense of reduction in the operation throughput, or by exploiting multicolumn chromatography [24–27], which however requires sophisticated equipment systems.

In a previous study, an IEX-based method for fast adjusting the *av* content in mAb pools to a manufacturer defined level was developed [28]. In that method, the column is overloaded with the feed solution up to its loading capacity. The interplay between thermodynamic and kinetic effects is utilized for improving the separation selectivity compared with standard process realizations, i.e., using linear pH or salt gradients. In this approach, a part of the protein that is unbound is eluted in flow-through during the loading and washing steps, whereas the remaining part is recovered in pH step gradient. The flow-through fraction is enriched with the least retained variant and depleted with the most retained one, whereas in the bound fraction the enrichment tendency is re-

* Corresponding author.

E-mail address: dorota.antos@prz.edu.pl (D. Antos).

versed. In cation exchange chromatography (CEX), which is operated below pI of the variants, the av species are the weakest bound and therefore they prevail in the flow-through fraction, whereas the opposite holds for anion exchange chromatography (AEX). For the mAb pool used as a case study in the previous work, the separation of variants by AEX was more selective compared with CEX, regardless of the operating conditions and resins used [28].

In a subsequent study, to reduce the av content in mAb pools, PEG-aided precipitation was employed [29]. The technique is based on preferential precipitation of av in the presence of PEG at pH below pI of the variants. This induces depletion of the supernatant and enrichment of the precipitate with av . The precipitation throughput is determined only by the reactor volume; therefore, it can easily be adjusted to the upstream processing capacity. The disadvantage of the process is a relatively low separation selectivity.

Neither IEX nor precipitation, when used as the stand-alone process, did not provide satisfactory separation efficiency; the chromatographic throughput was limited by binding capacity of the resin, whereas the yield of precipitation was limited by its relatively low separation selectivity. Therefore, in this study both AEX and PEG-aided precipitation were coupled to take advantage of the selectivity of the chromatographic process and high throughput of precipitation.

To describe chromatographic process, a dynamic model was used, similar to that reported in previous work [28]. Yet, in this study, to quantify adsorption thermodynamics, we adopted the colloidal particle adsorption model (CPA) and developed a procedure for determining the underlying parameters. This allowed us to improve the accuracy of predictions of chromatographic band profiles compared with that achieved in the previous study. Moreover, the influence of PEG residues in the post-precipitation products on the selectivity of subsequent chromatographic separation was quantified.

2. Theory

2.1. Design of chromatographic process

To simulate the band profiles of variants and design AEX, a kinetic-dispersive model was employed [28,30]:

$$\varepsilon_{t,p} \frac{\partial C_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial x} + (1 - \varepsilon_t) \frac{\partial q_i}{\partial t} = D_{L,a} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad (1)$$

where C_i is the concentration of i th variant in the mobile phase in mmol mL^{-1} , q_i is the total adsorbed phase concentration of i th variant expressed in $\text{mmol per mL of the solid matrix}$ ($\text{mmol mL}_{\text{matrix}}^{-1}$) u is the superficial velocity in m s^{-1} , t is time in s , x is the axial coordinate in m , $D_{L,a}$ is the effective axial dispersion coefficient in $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, $\varepsilon_{t,p}$ is the bed porosity accessible by the protein molecules, which was set the same for all variants, ε_t is the total bed porosity.

Eq. (1) was coupled with the kinetic equation:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_i (q_i^* - q_i) \quad (2)$$

where k_i in s^{-1} is the lumped overall mass transport coefficient, q_i^* is the equilibrium concentration, which was given by the CPA isotherm developed by Kumar et al. [31]:

$$q_i^* = K_{eq} C_i \exp \left\{ - \sum_{j=1}^n \left[\frac{c q_j}{4 \sum_{k=1}^n q_k} \frac{B_{ij} a_{ij}}{R} \exp [-\kappa (R - 2a_{ij})] (3 + \kappa R) \right] \right\} \quad (3)$$

where K_{eq} is the equilibrium constant, a_{ij} is the radius of the protein, which is the same for all variants $a_{ij} = a$, ($a = 5.5 \times 10^{-9} \text{ m}$ for mAb [32]), c is the coordination number of the configuration (that is 6 for the hexagonal arrangement), B_{ij} is the protein-protein long-range interaction, primarily electrostatic, R , is the protein spacing in m , which is defined by a hexagonal monolayer arrangement [33]:

$$R = \left(\frac{2}{\frac{\sqrt{3}}{\varphi} q_i N_A} \right)^{0.5} \quad (4)$$

where φ is the phase ratio estimated based on the assumption that at the maximum surface coverage (q^m), the protein spacing, R , has a minimum at $2a$ for monolayer adsorption [33]:

$$\varphi = 2 \sqrt{3} a^2 q^m N_A \quad (5)$$

The symbol κ in Eq. (3) denotes the inverse Debye length:

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 e^2 I N_A}{k_b T \varepsilon_0 \varepsilon}} \quad (6)$$

where e is the elementary charge, I is the ionic strength of the solution, k_b is the Boltzmann constant, T is temperature, ε_0 is the vacuum permittivity, ε is the dielectric constant.

The CPA model above is grounded on the concept similar to that developed by Briskot et al. [34], however some individual interactions are described in a different way. Nevertheless, both models assume idealized systems containing molecules of spherical shape with single-layer hexagonal arrangement in the adsorbed phase. Those assumptions do not apply to real adsorption behavior of structurally complex molecules such as mAbs. Yet, the mathematical form of the models often allows reproducing experimentally observed adsorption behavior [31,33,34]. The expression of the CPA isotherm given by Eq. (3) is relatively simple with respect to the determination of the model parameters (Section 4.3.1). Therefore, that model was used in this study for simulating band profiles and calculating the separation yield.

Since av was considered as the only undesired variant, the operation yield was determined as the ratio of the mass (m) of mv and bv variants in the flow-through fraction containing the product ($Prod$) with the desired av content, to their masses in the feed ($Feed$):

$$Y = \frac{m_{Prod,mv} + m_{Prod,bv}}{m_{Feed,mv} + m_{Feed,bv}} 100\% \quad (7)$$

The model was coupled with proper initial and boundary conditions, i.e., at the column inlet:

$$C_F(t, x = 0) = \begin{cases} C_F & \text{for } t \in [0, t_{inj}] \\ 0 & \text{for } t > t_{inj} \end{cases} \quad (8)$$

and at the outlet of the L -length column:

$$\frac{\partial C(t, x = L)}{\partial x} = 0 \quad (9)$$

and solved using a finite difference scheme [35,36].

2.2. Design of precipitation process

To determine the performance of precipitation, the set of mass balance equations was used, as follows [29]:

$$m_{Feed,ov1} = m_{S,ov1} + m_{p,ov1} \quad (10)$$

$$m_{Feed,ov1} U_{Feed,i} = m_{p,ov1} U_{p,i} + m_{S,ov1} U_{S,i} \quad i = av, mv, bv \quad (11)$$

$$m_{sol} = m_{S,ov1} \frac{d}{C_{S,ov1}} \quad (12)$$

$$\sum_i U_{S,i} = 1, \quad \sum_i U_{P,i} = 1 \quad (13)$$

where $m_{Feed,ovl}$, $m_{S,ovl}$, $m_{P,ovl}$ are the overall masses of the protein in the feed in g, $Feed$, the supernatant, S , and the precipitate, P , respectively, m_{sol} is the mass of the solvent in g, $U_{P,i} = \frac{m_{P,i}}{m_{P,ovl}}$, $U_{Feed,i} = \frac{m_{Feed,i}}{m_{Feed,ovl}}$, $U_{S,i} = \frac{m_{S,i}}{m_{S,ovl}}$ are the reduced (without solvent) individual mass fractions of i th variant in the precipitate, in the feed solutions and in the supernatant, respectively, $C_{S,ovl}$ in mg mL^{-1} is the overall protein concentration in the supernatant, determined by the solubility of the protein, d in mg mL^{-1} is the solution density that was set the same as for the solvent (water and PEG), m_{sol} is the mass of the solvent.

The water uptake by the precipitate was found to be negligible due to small mass ratio of the precipitate and the supernatant, therefore it was not accounted for in the mass balance equations (Eqs. (10)–(12)).

As av was characterized by the lowest pI of all variants, it exhibited the lowest solubility at pH used for precipitation (pH = 5), thus the highest propensity to precipitate. Therefore, the precipitation process provided the supernatant depleted with av , which was the product of the operation. The operation yield was expressed by Eq. (7), where the mass of the supernatant was assigned to the mass of the product.

3. Experimental

3.1. Instruments

An Äkta purifier with UV, pH and conductometric detectors (Cytiva, Uppsala, Sweden) and a data station was used for the IEX separations. The separations were performed using the glass Tricorn columns (Cytiva), I.D. 0.5 cm equipped with stop-plugs and connectors. The sample injector was an injection valve with a loop capillary of 2 mL volume or 10 mL Superloop™ (Cytiva).

The Dionex UltiMate 3000 System (Thermo Scientific, Waltham, USA) was used for the CEX- HPLC analysis of the charge variant content.

The Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units, with volume of 4 and 15 mL and molecular cut-off of 30 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were used for buffer exchange and concentration of protein solutions. The Infinite 200 PRO multimode microplate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) was used to determine the overall protein concentration.

The rotating mixer 115 V (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, New Jersey, USA) was used for stirring solutions in the precipitation process.

3.2. Materials

All chemicals were of analytical grade, unless stated otherwise. Sodium chloride, ortho-phosphoric acid, L-histidine and acetic acid were purchased from Avantor (Gliwice, Poland), sodium acetate, sodium dihydrogen phosphate and sodium hydrogen phosphate were purchased from Chempur (Piekary Śląskie, Poland), 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (TRIS) was purchased from Carl Roth GmbH & Co. KG (Mannheim, Germany), poly(ethylene glycol) 3.350 kDa (PEG) and hydrochloric acid 35–38% were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The monoclonal antibody mAb2 (mAb2 material), MW = 148 kDa, purity >99% was provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Polska). The mean isoelectric points of the variants were: acidic variant (av) pI = 8.7, main variant (mv) pI = 8.9, basic variant (bv) pI = 9.1. The mAb2 material (M- av) contained variants with the composition: 39% av , 45% mv , 16% bv w/w.

To separate the variants, POROS™ XQ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) was used, which is a strong AEX resin. For fast removal of PEG residues from post-precipitation solutions, POROS™ XS, was used, which is a strong CEX resin (Thermo Fisher). The properties of the resins are presented in Table 1.

The individual variant content in the mAb2 samples was determined using the analytical ProPac WCX-10 CEX-HPLC column (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) with I.D. 0.4 cm and length 25 cm, packed with the resin of particle size 10 μm .

An analytical size exclusion SEC-HPLC column MAbPac SEC-1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) with I.D. 0.4 cm and length 30 cm, packed with a resin with particle size of 5 μm and pore size of 300 Å, was used for the determination of the aggregate content in the mAb2 material and in the post-processing mAb2 pools.

3.3. Procedures

3.3.1. Preparation of mAb2 samples

The mAb stock solutions were prepared from the mAb2 material by buffer exchange using the Amicon filters. For this purpose, a 5 mL of the initial mAb solution at a concentration of approximately 15 mg mL^{-1} was added into the Amicon filter, covered with a portion of 10 mL of appropriate buffer, and centrifuged for 15 min (at 20 °C and 5000 rpm). The operation was repeated several times with a fresh portion of the buffer until the desired pH was obtained, and the solution conductivity was adjusted to the buffer conductivity. The overall protein concentration in the obtained mAb2 stocks was determined using the microplate reader.

3.3.2. Measurements of the individual isotherms

The individual adsorption isotherms of the variants on the AEX resin were determined in 0.05 M TRIS-HCl buffer at pH 9.3 (AEX binding buffer) with and without presence of 4% w/v PEG in the protein solution. A portion of the resin suspension was transferred into the spin-x Eppendorf tubes and washed once with water, and next three times with the AEX binding buffer and centrifuged after each step. The last centrifugation was carried out for 30 min to remove liquid adhered to the resin surface. Next, samples of about 10 mg of the resin were taken and placed into the Eppendorf tubes. A 0.7 mL sample of the protein solution in the adequate buffer with the concentration ranging from 3 to 10 mg mL^{-1} was added and incubated using the rotating mixer at 15 rpm until no noticeable change in the supernatant concentration was observed, i.e., for 2 h. The supernatants were separated from the resin using 0.2 μm PES syringe filters and subjected to the concentration analysis. The overall concentration of the protein was determined using the microplate reader. The variant content in the supernatants was measured by CEX-HPLC.

The individual equilibrium concentration of each variant, q_i^* , in the adsorbed phase was calculated using the following equations:

$$q_i^* = \frac{V(C_{0,i} - C_i)}{m_a} \quad (14)$$

where V is the solution volume in mL, m_a is the mass of the resin in g, $C_{0,i}$ is the initial individual concentration of each variant in the stock solution ($i = av, mv, bv$) and C_i is the corresponding individual equilibrium concentration in the supernatant in mg mL^{-1} .

3.3.3. Column packing

The manner of the column packing followed the manufacturer's guidelines (Thermo Fisher Scientific Inc.). The resin was packed into the Tricorn column. The bed height in the columns after compression was about 5 cm.

Table 1
Properties of the resins.

Resin name	POROS™ XQ	POROS™ XS
Resin type	AEX	CEX
Functional group	Quaternary amine	Sulfopropyl
Matrix	Cross-linked poly(styrene-divinylbenzene)	
Resin mean size μm	50	50
Ionic capacity mmol mL packed bed	0.088–0.130*	0.081**

* from [37].

** from [38].

3.3.4. Measurements of packed bed porosity

The porosity of the packed bed in the AEX column was determined from the retention time of a dilute pulse of TRIS-HCl eluted in the mobile phase. The specific packed bed porosity for mAb2 was determined from the elution time of a pulse of the mAb2 solution eluted under non-binding conditions, i.e., at 1 M NaCl in the mobile phase. The elution time measured was corrected by subtracting the contribution of the extra-column volumes. The total porosity of the bed in the AEX column was $\varepsilon_t = 0.69$, the specific porosity for mAb2, whose molecules only partially penetrated the pore volume of the adsorbent, was $\varepsilon_{t,p} = 0.44$.

3.3.5. Anion exchange chromatography

The column packed with the AEX resins was equilibrated with the binding buffer, i.e., 0.05 M TRIS-HCl, pH 9.3. The protein solution was exchanged for the binding buffer up to the concentration of 20 mg mL⁻¹ with or without the presence of 4% w/v PEG, injected into the column using the 10 mL superloop, and washed with the binding buffer at the flowrate of 0.5 mL min⁻¹. Next, the binding buffer was exchanged for the desorption buffer, i.e., 0.02 M histidine buffer pH 5.5 (HIS), in a step gradient (0 – 100% v/v). Finally, the column was stripped with 1 M NaCl solution in the desorption buffer.

To determine the individual concentration of variants during the whole process (including loading, washing and desorption), the column effluent was collected in 1 mL fractions. The variant content was determined by the CEX-HPLC analysis.

3.3.6. CEX-HPLC analysis

The mobile phase consisted of 25 mM NaH₂PO₄ (X), 25 mM Na₂HPO₄ (Y), 125 mM NaCl (Z) with different volume ratios. The samples were injected into the CEX-HPLC column, which was firstly equilibrated with the buffer A (X/Y/Z: 35.6/44.4/20 v/v) and washed for 5 min with the same buffer. Next, the buffer A was exchanged for 100% v/v of the buffer B (8.8/71.2/20 v/v) in a 55-min linear gradient. After elution, the column was regenerated using 100% v/v of the buffer C (5.0/5.0/90). The mobile phase flowrate was 0.5 mL min⁻¹.

3.3.7. Precipitation of mAb

Precipitation from the stock solutions. The stock solution of mAb was exchanged for 0.05 M sodium acetate buffer (SA) pH 5.0, as described in the Section 3.3.1. The PEG stock (precipitant) was prepared by dissolving PEG in SA buffer to obtain the PEG content of 50 w/v%.

The stock solutions of mAb2, the precipitant, and SA buffer were mixed in proper volumes to generate a specified supersaturation of the solution, which was determined by the solubility of mAb2 (e.g., 20 mg mL⁻¹ mAb2 at 22.6 w/v% of the PEG solution pH 5 [29]). The precipitation process was accomplished in 20 min at 20 °C while stirring in a rotating mixer at 35 rpm. To separate precipitate and supernatant, the solution was centrifuged for 20 min at 20 °C and 5000 rpm. The overall mAb2 concentration in the supernatant was measured using the microplate reader,

whereas the individual variant content was determined by CEX-HPLC. The precipitate was re-dissolved in SA buffer and subjected to CEX (Section 3.3.8) to remove PEG residues.

Precipitation from the AEX effluent. pH of the AEX effluent that contained the desorbed mAb2 was adjusted to pH 5.5 using HCl. Then, the PEG stock was added to obtain the specified supersaturation level of mAb2 in the solution. The solubility of mAb2 in the solution depended very weakly on the buffer type; it was mainly determined by pH and the PEG concentration. Therefore, the mAb2 solubility in a mixture of buffers TRIS-HCl and HIS, which were present in the desorption effluent, was similar to that measured in SA buffer in the previous work [29]; for both solvent environments the precipitation yield was also very similar (Fig. S1, Supplementary materials).

3.3.8. PEG removal from post-precipitation solutions

The column packed with the CEX resin was equilibrated with the CEX binding buffer, i.e., SA pH 5.5. The protein precipitate was dissolved in SA and injected into the column. The column load by mAb2 was about 66 mg per mL of the packed bed. To remove the PEG residues from the protein solution, the column was washed with SA at the flowrate of 0.5 mL min⁻¹ for 8 CV. Then, the binding buffer was exchanged for the desorption buffer (0.025 M phosphate buffer, pH 9.0) in a step gradient (0 – 100% v/v). The effluent was collected and subjected to the concentration analysis. The column was stripped with 1 M NaCl solution in the desorption buffer.

3.3.9. Coupling the precipitation process and AEX

The precipitation and AEX operations were coupled in different sequences; when precipitation preceded AEX (sequence PREC-AEX), the precipitate obtained in the first step was dissolved and subjected to CEX to remove the PEG residues in the liquid adhered to the precipitate surface, as described in Section 3.3.8. In the sequence AEX-PREC, the effluent of the AEX column was directly subjected to precipitation, as described in Section 3.3.7.2.

3.3.10. Determination of the aggregate content

Distribution of aggregates between the liquid and solid phases was measured using SEC-HPLC. The mobile phase was 0.05 M phosphate buffer (pH 6.8) with 0.3 M NaCl, the flowrate was 0.2 mL min⁻¹. The signal of the protein was recorded by the UV detector at 280 nm, then corrected by subtraction of the blank run. An example chromatogram is shown in the Fig. 1.

4. Results and discussion

4.1. Design of the precipitation process

As mentioned above, the *av* species having the lowest pI exhibited at pH 5 the lowest solubility of all variants, thus the highest tendency to precipitate. Therefore, the precipitation process provided the supernatant (S) depleted with *av* and the precipitate (P) enriched with *av*.

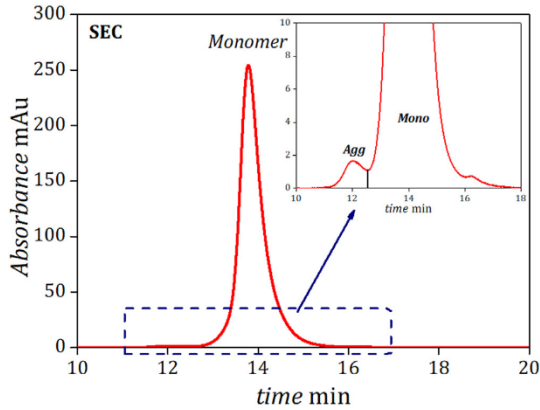


Fig. 1. SEC-HPLC analysis of the mAb2 material; *Agg* - aggregates, *Mono* - monomers of mAb2.

The experimental quasi-equilibrium data provided in the previous study [29] (Fig. S2, supplementary materials) were quantified in the form of empirical dependences, i.e., the dependence of $U_{S,av}$ (%) and the ratio $m = \frac{U_{S,mv}}{U_{S,bv}}$ versus the overall protein recovery, $Rec_{ovl} = \frac{U_{S,ovl}}{U_{Feed,ovl}}$, were expressed by the formulas:

$$U_{S,av} = (a_a^{av} U_{Feed,av}^2 + b_a^{av} U_{Feed,av} + c_a^{av}) Rec_{ovl} + (a_b^{av} U_{Feed,av}^2 + b_b^{av} U_{Feed,av} + c_b^{av}) \quad (15)$$

$$m = \frac{(a_a^m U_{Feed,bv}^2 + b_a^m U_{Feed,bv} + c_a^m) Rec_{ovl} + (a_b^m U_{Feed,bv}^2 + b_b^m U_{Feed,bv} + c_b^m)}{(a_a^{av} U_{Feed,av}^2 + b_a^{av} U_{Feed,av} + c_a^{av}) Rec_{ovl} + (a_b^{av} U_{Feed,av}^2 + b_b^{av} U_{Feed,av} + c_b^{av})} \quad (16)$$

$$U_{S,bv} = \frac{100 - U_{S,av}}{m + 1} \quad (17)$$

$$U_{S,mv} = 100 - U_{S,av} - U_{S,bv} \quad (18)$$

where a_i^j , b_i^j , c_i^j ($i = a, b$, $j = av, m$) are empirical parameters; their values are reported in Table S1 (Supplementary materials).

The acceptable content of *av* in the supernatant, which was the product of the process, was set at a defined level ($U_{S,av}$). When $U_{S,av}$ was set, Rec_{ovl} could be calculated from Eq. (15), and the concentration of the remaining variants in the supernatant from Eqs. (16)–(18). The composition of the precipitate was calculated by solving the mass balance equations (Eqs. (10)–(13)) at the defined feed composition.

When precipitation proceeded AEX (PREC-AEX), the precipitate was dissolved in the AEX binding buffer and the obtained sample was further processed in AEX. The PEG residue in the obtained samples was about 4% w/v. Therefore, prior their processing in AEX, the influence of the presence of PEG on the adsorption pattern of variants was evaluated.

4.2. Effect of PEG on the adsorption of the variants

The individual isotherms of the variants in the AEX binding buffer with and without the addition of 4% w/v PEG was measured according to the procedure described in Section 3.3.2. The result obtained for the post-precipitation material with a high content of *av* (H-*av*) is depicted in Fig. 2. It is evident that the presence of PEG causes reduction in the adsorption strength of *av*, weakly

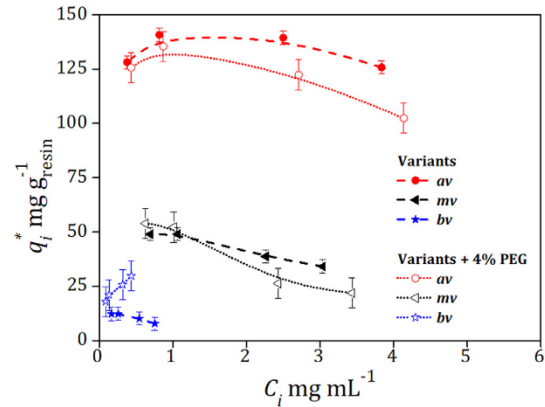


Fig. 2. Individual isotherms of the mAb2 variants on the AEX resin at pH 9.3 in a post-precipitation solution (H-*av*): 56% *av*, 35% *mv*, 9% *bv*) without PEG (solid symbols) and with 4% w/v PEG (open symbols) in the binding buffer. Lines guide to the eye.

influences the adsorption of *mv*, and enhances the adsorption of *bv*, which reduces differences between the adsorption affinities of the variants, thus also in the separation selectivity. This can be explained by the reversal in the solubility pattern of the variants at pH 9.3, which was used for the protein binding in AEX, and that at pH 5, which was used for the precipitation. Since *av* was characterized by the lowest pI, it was the best soluble at pH 9.3, whereas *bv* whose pI was the highest, hence the closest to pH 9.3, exhibited the worst solubility, therefore the highest affinity to the adsorbed phase.

4.3. Design of the AEX process

4.3.1. Formulation and verification of the dynamic model

The accuracy of the predictions of the mAb2 band profiles based on the modified SMA isotherm model, which was implemented in the previous work, was only fair [28]. Therefore, there was a room for its improvement, especially that design of the coupled processes required a robust mathematical tool. Increase in the number of adjustable coefficients in the SMA model did not noticeably improve the prediction quality. The Langmuir model was found to be oversimplified and failed to reproduce the band profiles. Therefore, in this work we adopted the CPA isotherm (Eqs. (3)–(6)), which turned out to be more accurate in predictions of shapes and yields of the AEX separation of the mAb2 variants.

The isotherm model contains a few coefficients to be determined. Those are: the interaction coefficients between the molecules of the same compound, B_{ii} , and between unlike molecules B_{ij} . The latter values can be approximated by the following formula [31]:

$$B_{ij} = \sqrt{B_{ii} B_{jj}} \quad i, j = av, mv, bv \quad (19)$$

The molecular interactions are assumed to be symmetrical, i.e., $B_{ij} = B_{ji}$.

As the first trial of the parameter estimation did not provide good fit to the experimental data, the number of the parameters was increased by one, including each of the individual parameters: $B_{av,mv}$, $B_{av,bv}$, $B_{mv,bv}$. The estimation results revealed that the binary coefficient determining the *av*-*mv* interactions, $B_{av,mv}$, markedly departed from the value provided by Eq. (19), therefore it had to be independently estimated. This may stem from complex behavior of

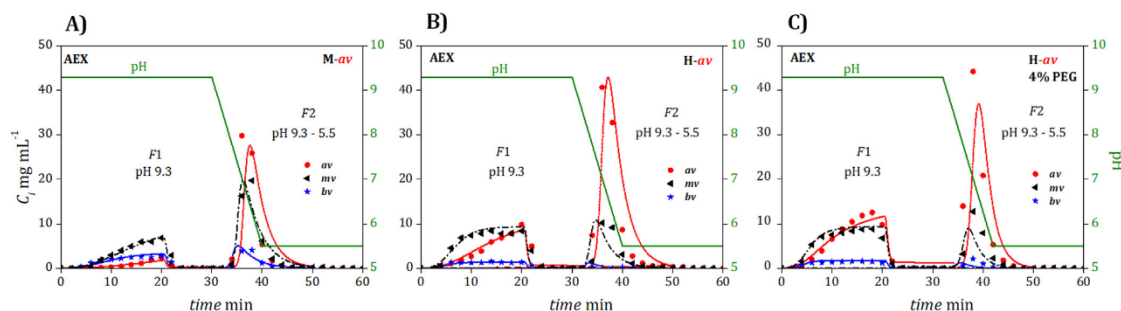


Fig. 3. Individual band profiles of the mAb2 variants eluted from the AEX column for: A) mAb2 material (M-av), $C_{inj} = 19.3 \text{ mg mL}^{-1}$, B) post-precipitate mAb2 material (H-av), $C_{inj} = 25.8 \text{ mg mL}^{-1}$, C) H-av material with the presence of 4% w/v of PEG in the AEX binding buffer, $C_{inj} = 26.3 \text{ mg mL}^{-1}$. The mobile phase flowrate $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{inj} = 10 \text{ mL}$. Symbols – experimental data, lines – simulations.

the concentrated solutions of the variants in the adsorbed phase, which was not accounted for in the CPA isotherm.

The value of q_i^m was taken from literature (Table 1, $q_i^m = 0.088 \text{ mmol mL}^{-1} = \frac{0.088}{(1 - \epsilon_t)} \text{ mmol mL}^{-1}_{\text{matrix}}$). The uncertainty of that value was lumped into the remaining model coefficients.

The coefficient k_i in the kinetic equation (Eq. (2)) lumps the effects of mass transfer resistances, therefore it is correlated with the retention factor, thus with the Henry constant $H_i = K_c q_i^m$ [28,30,36]. The value of k_{av} was selected as the estimated parameter. The coefficients k_{mv} and k_{bv} are correlated with k_{av} through their Henry constants:

$$\frac{k_{av}}{k_i} = \frac{H_i}{H_{av}} \quad i = mv, bv \quad (20)$$

As K_c and q_i^m were set the same for all variants ($q_i^m = q^m$), therefore $k_i = k_{av}$.

The effective axial dispersion coefficient, $D_{L,a}$, was determined in the previous study [28] by fitting to the mAb2 profiles recorded under non-binding conditions (for the flowrate used $D_{L,a} = 6.6 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

Altogether, six coefficients had to be determined K_{eq} , $B_{av,av}$, $B_{mv,mv}$, $B_{bv,bv}$, $B_{av,mv}$, k_{av} . For that purpose, the peak fitting method was used. The experimental basis for the estimation were the flow-through band profiles of all three variants measured for two feed materials differing in the variant composition. For the estimation an optimization procedure was used, in which the objective function to be minimized was the sum of the squared differences between the simulated and experimentally measured concentration profiles. The results of the simulation and the corresponding experimental data are depicted in Fig. 3A, and B, which illustrate the profiles of the flow-through fraction (F1) eluted in the loading and washing step, and the bound fraction (F2) eluted with the pH gradient step. The operation yields obtained from the experiments and the simulations are compared in Table 3. As it can be observed, the model reproduced the shapes of band profiles (Fig. 3) and the operation yields (Table 3) with good accuracy; the difference between the predicted and experimentally determined operation yield and did not exceed 4%. To predict the elution profile of the bound fraction, the relative changes in the k_i parameter in pH step change vs the Henry constants were assessed analogously to Eq. (20) [28]. In fact, a high precision in the reproduction of the peak shapes in the bound fraction was not necessary, since it contained the remaining amount of each variant, which might be calculated from the mass balance conservation. All the model parameters estimated are presented in Table 2. Considering the simplifications made in the formulation of the CPA model, the obtained

parameters should be regarded as mathematical coefficients rather than real values of the molecular interaction parameters.

To verify the effect of the presence of PEG on the separation selectivity, the AEX feed was supplemented with 4% w/v PEG to mimic the composition of the dissolved precipitate to be processed in AEX. The model parameters obtained for the PEG-free feed solutions were tuned to fit the model simulations to the experimental band profiles recorded for the PEG-enriched feed, which are depicted in Fig. 3C.

The results of the simulations are overlaid on the experimental data in Fig. 3.

As the model of the AEX dynamics was successfully verified for all tested conditions, it could be further used for designing the coupling of AEX and precipitation.

4.4. Integration of AEX and PREC

4.4.1. Design concept

To determine the optimal sequence of the partial processes, the model of the AEX dynamics Eqs. (1)–(8) and the equilibrium model of precipitation Eqs. (10)–(13), ((15)–(18)) were integrated. Prior to its use, the integrated model was verified by the experimental realization of the sequences PREC-AEX and AEX-PREC for the M-av material. The acceptance level *av* in the product was set at 25% *av* w/w, which corresponded to 34% of the relative reduction with respect to the M-av material. In the sequence PREC-AEX, the PREC process was performed in the first step, according to the procedure described in Section 3.3.7.1. As mentioned above, the post-precipitation material contained residue of PEG. Since the lab-scale filtration process was time consuming due to clogging membranes with PEG, we used CEX for fast removal of the PEG residue from the post-precipitation protein solutions. PEG was unretained in the CEX column, thus the whole amount of its residue was eluted in flow-through. The bound protein was desorbed with the desorption buffer (Section 3.3.8). The choice of the intermediate operation for the PEG removal was not optimized; it is possible that CEX could be omitted by optimizing parameters of the filtration membrane or conditions for precipitate washing. Since the realization of AEX was the throughput-limiting step, we focused the study on the reduction of the AEX contribution to the whole coupled process.

The mAb2 pool free of the PEG residue was concentrated and subjected to AEX, as described in Section 3.3.5. The *av* content and yield of each partial process and the coupling PREC-AEX were determined based on the concentration analysis of the precipitation product and the AEX effluent. The results obtained for the sequence PREC-AEX were compared with the numerical predictions of the integrated model and presented in Table 4. Similar accu-

Table 2
Coefficients of the CPA isotherm with and without presence of PEG.

PEG% w/v	K_c (-)	$B_{av,av}$ (-)	$B_{mv,mv} \times 10^3$ (-)	$B_{bv,bv} \times 10^3$ (-)	$B_{av,mv}$ (-)	k_i (pH 9.3) (s^{-1})
0	722	0.67	1.11	3.05	71.4	1.71×10^{-4}
4	938	1.05			52.4	

Table 3
Variant compositions in the flow-through and bound fractions in AEX. Exp. – experimental data, Sim. – simulations.

Material	M-av				H-av				H-av 4% w/v PEG			
	$U_{Feed,i}$ % w/w			Y%	$U_{Feed,i}$ % w/w			Y%	$U_{Feed,i}$ % w/w			Y%
	av	mv	bv	% w/w	av	mv	bv	% w/w	av	mv	bv	% w/w
Feed	38	45	17	–	59	36	5	–	59	35	6	–
F1 Exp.	13	57	30	46	38	53	9	72	47	44	9	70
Sim.	13	56	31	46	36	55	9	73	48	43	9	72
F2 Exp.	53	38	9	52	78	21	1	26	73	23	4	29
Sim.	51	39	10	53	80	18	2	25	73	24	3	28

Table 4
Verification of the model for the integrated process PREC-AEX; the comparison of the variant composition in the supernatant S, and the precipitate P, and the yields obtained experimentally and numerically using the dynamic model for AEX (Eqs. (1)–(6)) integrated with the mass balance equations at equilibrium for PREC (Eqs. (8)–(11), (13)–(16)).

Fraction	after PREC				Frac	after AEX				Fraction	after PREC-AEX			
	$U_{Feed,i}$ % w/w			Y%		$U_{Feed,i}$ % w/w			Y%		$U_{Feed,i}$ % w/w			Y%
	av	mv	bv	% w/w		av	mv	bv	% w/w		av	mv	bv	% w/w
Feed	39	45	16	–	P	49	41	10	–	Feed	39	45	16	–
Exp. S	26	51	23	63	F1	26	56	18	48	Product	26	52	22	82
Sim.	26	52	22	63		24	57	19	48		25	54	21	82
Exp. P	49	41	10	37	F2	64	32	4	48	Waste	64	32	4	15
Sim.	51	39	10	37		63	32	5	52		63	31	6	18

racy was achieved for the sequence AEX-PREC (data not shown). Since the experimental data and the model predictions were in good agreement, the model was subsequently used for determining the performance of different configurations of partial processes in the coupled process.

4.4.2. Case study systems for the optimization of the coupled process

The optimal configuration and the sequence of the partial processes depended on the required level of the *av* reduction and the *av* content in the mAb2 material (feed). We considered two options for the case study; in the option I, the *av* content in the mAb2 material was reduced by 62%, and in the option II by 34% (e.g., for the M-av material from 39% to 15% *av* w/w in the option I, or from 39% to 25% *av* w/w in the option II). The optimized configurations of the partial processes in the coupled process are illustrated in Fig. 4. For both options, the model was solved for different compositions of the mAb2 materials, which influenced the separation selectivity, and for different supersaturation levels, which defined the operation yield. The increase in the *av* content caused drop in yield of AEX, due to enhancement of peak overlap between the *av* and other variants, which was reproduced well by the dynamic model with the implemented CPA isotherm. Similar changes in the yield values were also observed in the precipitation process. It resulted from the selectivity decline with increasing the *av* content in the solution [29], which was accounted for in the model by the empirical equilibrium dependencies (Eqs. (15)–(18)). Therefore, the changes in the feed composition involved changes in the overall process efficiency, in terms of the throughput of the AEX process and the overall operation yield (Eq. (7)). For the precipitation process, the throughput of precipitation was assumed to be unlimited, since it was determined only by the size of the reactor.

4.4.3. Performance of the coupled process for the option I

The realization of the option I was more challenging than the option II due to the higher demand for the *av* reduction. The interplay between the variant composition in the feed solution, $U_{Feed,av}$, throughput (E , mg mL $^{-1}$ resin $^{-1}$) and yield (Y) is illustrated in Figs. 5A and 5B. The precipitation process used as the stand-alone operation was not sufficiently selective to achieve the desired reduction level. The stand-alone AEX provided that level, but at the expense of reduction in E (Fig. 5B). The sequence AEX-PREC allowed significant improvement in E , i.e., up to 600% for the highest *av* content in the mAb2 material (i.e., about 50% *av* w/w), and up to 70% for the lowest *av* content (i.e., about 30% *av* w/w). As the demand for the *av* reduction in the AEX process was relieved due to its coupling with PREC, higher column loads could be used. The improvement in yield was less prominent: up to 20% for the highest *av* content, which went down to the value provided by AEX while decreasing the *av* content. For the *av* content in the mAb2 material less than 30% w/w, AEX-PREC outperformed AEX only with respect to E .

4.4.4. Performance of the coupled process for the option II

The efficient reduction in *av* in the option II was achieved for the configuration: PREC-AEX-PREC. It overperformed the stand-alone AEX with respect to E (up to 100% for the highest *av* content and up to 50% for lowest *av* content in the mAb2 material), and the stand-alone three-stage precipitation PREC-PREC-PREC with respect to yield (up to 35% for the highest *av*, and up to 20% for the lowest *av* content (Fig. 6).

For the mAb2 materials with the *av* content lower than 40% w/w, the efficiency of the stand-alone AEX or the stand-alone PREC-PREC-PREC was comparable with the coupled process. The

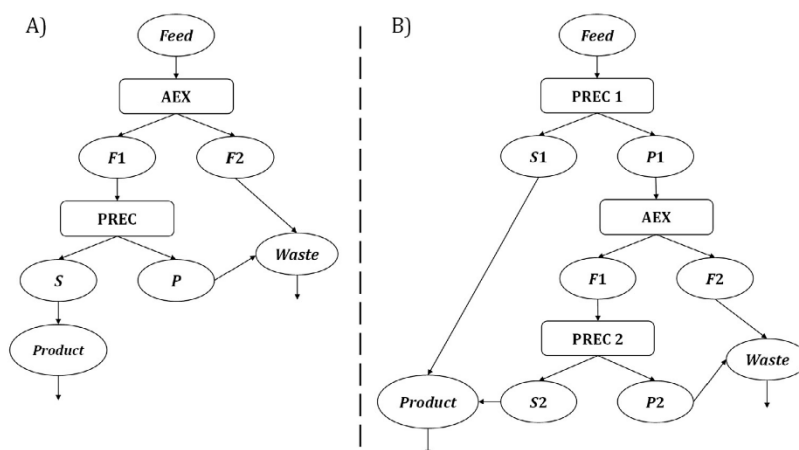


Fig. 4. Scheme of the optimized configuration of the coupled process of PREC and AEX. A) Option I, B) option II. Feed is the mAb2 material, F1 is the AEX flow-through fraction depleted with *av*, F2 is the bound fraction enriched with *av*, S is the supernatant, P is the precipitate.

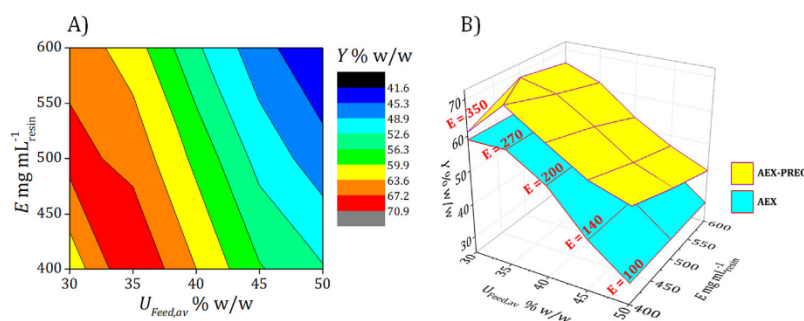


Fig. 5. Performance of the coupled process of AEX-PREC for the option I. A) *E* vs the *av* content in the feed solution $U_{Feed,av}$. B) 3D illustration of the interplay between $U_{Feed,av}$, *E* and *Y*.

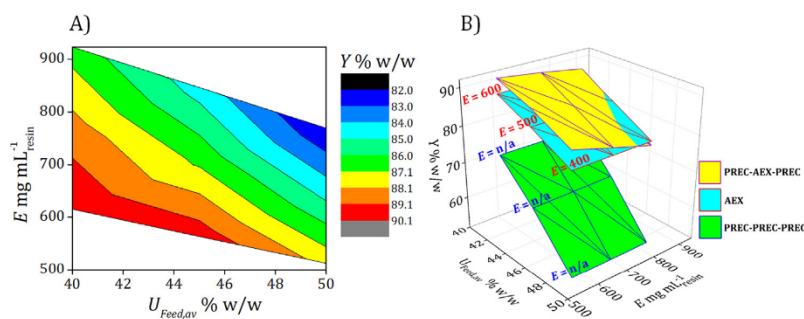


Fig. 6. Performance of the coupled process of PREC-AEX-PREC (for the option II). A) *E* vs the *av* content in the feed solution $U_{Feed,av}$. B) 3D illustration of the interplay between $U_{Feed,av}$, *E* and *Y*.

stand-alone AEX in the option II provided yields up to 90% at $E = 700\text{--}900 \text{ mg mL}^{-1}$ for the mAb2 materials with the *av* content $U_{Feed,av} = 30\text{--}35\%$ w/w. Under the same conditions, the stand-alone PREC-PREC-PREC provided yields of about 80% while its throughput was limited only by the reactor volume. The benefit provided by the coupling of both operations was negligible.

4.5. Aggregate distribution in the products

Finally, the aggregate distribution in the products of the partial processes and the coupled process was determined. The aggregates present in the mAb2 material were accumulated in precipitate, which is illustrated in Table 5. This indicated additional

Table 5
Aggregate content in the stand-alone processes PREC and AEX and the coupled process AEX-PREC.

	PREC		<i>P'</i>	AEX		<i>Feed</i>	AEX-PREC	
	<i>U</i> _{Feed,Agg} % w/w	%Agg w/w		<i>U</i> _{Feed,Agg} % w/w	%Agg w/w		<i>U</i> _{Feed,Agg} % w/w	%Agg w/w
<i>Feed</i>	0.80	–		1.68	–	<i>Feed</i>	0.80	–
<i>S</i>	0.14	0.10	<i>F1</i>	0.48	0.08	<i>Product</i>	0.21	0.17
<i>P</i>	1.47	0.90	<i>F2</i>	2.67	0.92	<i>Waste</i>	2.67	0.83

P'- precipitate fraction after removal of PEG residues by CEX.

advantage of the configuration of the coupled process, in which precipitation was realized downstream AEX.

5. Conclusions

The coupled process of AEX and preferential PEG-aided precipitation has been developed to reduce the acidic variant content in the mAb2 pool. The coupled process outperformed the stand-alone operations with respect to both yield and throughput. To predict the process performance, the dynamic model of AEX was integrated with the model of precipitation equilibrium. The former was based on the kinetic-dispersive model that was supplemented with the CPA isotherm model. The CPA isotherm coefficients were determined by the peak fitting method. The implementation of the CPA isotherm improved the predictability of the dynamic model compared with the previous study [28]. The model of the precipitation equilibrium consisted of simple mass balance equations and empirical equilibrium dependencies. The optimal sequence of the partial operations in the coupled process depended on the requirement for the reduction level in the *av* content in the mAb2 material. When demand for the *av* reduction level was high, i.e., about 60% with respect to the initial *av* content, the optimized sequence AEX-PREC provided higher throughput and yield compared with the stand-alone AEX (*E* up to 600% higher and *Y* up to 20% higher at the highest *av* content in the mAb2 material), while the stand-alone precipitation failed to achieve that reduction level. When the restriction on the *av* reduction level was relieved i.e., to about 30%, the sequence of PREC-AEX-PREC provided up to 100% improvement in the throughput compared with the stand-alone AEX and up to 35% in yield compared with the stand-alone precipitation. This indicates that the optimal configuration depends on the manufacturer specified demand for the *av* reduction in the specific mAb pool.

The protein aggregates present in a small quantity in the mAb2 material were accumulated in precipitate. Therefore, the configuration of the coupled process, in which precipitation was used in the last stage provided additional benefit in terms of the reduction in the aggregate content.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRedit authorship contribution statement

Patrycja Zimoch: Investigation, Methodology, Conceptualization. **Tomasz Rumanek:** Investigation, Methodology, Conceptualization. **Michał Kołodziej:** Methodology, Conceptualization. **Wojciech Piątkowski:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Dorota Antos:** Conceptualization, Software, Writing – review & editing.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgment

Financial support of this study by Podkarpackie Centrum Innowacji (N3_076) is gratefully acknowledged. We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland for the supplement of biological material.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2023.464070.

References

- [1] M.M.C. van Beers, M. Bardor, Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins, *Biotechnol. J.* 7 (2012) 1473–1484, doi:10.1002/biot.201200065.
- [2] K. Brorson, A.Y. Jia, Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality, *Curr. Opin. Biotechnol.* 30 (2014) 140–146, doi:10.1016/j.copbio.2014.06.012.
- [3] Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, et al., Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies, *MABs* 4 (2012) 578585, doi:10.4161/mabs.21328.
- [4] A.J. Chirino, A. Mire-Sluis, Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1383–1391, doi:10.1038/nbt1030.
- [5] C.A. Boswell, D.B. Tesar, K. Mukhyala, F.P. Theil, P.J. Fielder, L.A. Khawli, Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics, *Bioconjugate Chem.* 21 (2010) 2153–2163, doi:10.1021/bc100261d.
- [6] T. Igawa, H. Tsunoda, T. Tachibana, A. Maeda, F. Mimoto, C. Moriyama, M. Nanami, Y. Sekimori, Y. Nabuchi, Y. Aso, K. Hattori, Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region, *Protein Eng. Des. Sel.* 23 (2010) 385–392, doi:10.1093/protein/gzq009.
- [7] P. Dakshinamurthy, P. Mukunda, B.P. Kodaganti, B.R. Shenoy, B. Natarajan, A. Maliwalave, V. Halan, S. Murugesan, S. Maity, Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab, *Biologicals* 46 (2017) 46–56, doi:10.1016/j.biologics.2016.12.006.
- [8] B. Hintersteiner, N. Lingg, E.E. Janzek, O. Mutschlechner, H. Loibner, A. Jungbauer, Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein, *Biotechnol. J.* 11 (2016) 1617–1627, doi:10.1002/biot.201600504.
- [9] B. Hintersteiner, N. Lingg, P. Zhang, S. Woen, K.M. Hoi, S. Stranner, S. Wiederkum, O. Mutschlechner, M. Schuster, H. Loibner, A. Jungbauer, Charge heterogeneity: basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors, *MABs* 8 (2016) 1548–1560, doi:10.1080/19420862.2016.1225642.
- [10] G. Jiang, C. Yu, D.B. Yadav, Z. Hu, A. Amurao, E. Duenas, M. Wong, M. Iversen, K. Zheng, X. Lam, J. Chen, R. Vega, S. Ulufatu, C. Leddy, H. Davis, A. Shen, P.Y. Wong, R. Harris, Y.J. Wang, D. Li, Evaluation of heavy-chain C-terminal deletion on product quality and pharmacokinetics of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 2066–2072, doi:10.1016/j.xphs.2016.04.027.
- [11] L.A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z.W. Kwong, J. Yang, X. Wang, Z. Yao, A. Sreedhara, T. Cano, D. Tesar, I. Nijem, D.E. Allison, P.Y. Wong, Y.H. Kao, C. Quan, A. Joshi, R.J. Harris, P. Motchnik, Charge variants in IgG1: isolation, characterization, *in vitro* binding properties and pharmacokinetics in rats, *MABs* 2 (2010) 613–624, doi:10.4161/mabs.2.6.13333.
- [12] M. Habberger, K. Bomans, K. Diepold, M. Hook, J. Gassner, T. Schlothauer, A. Zwick, C. Spick, J.F. Kepert, B. Hienz, M. Wiedmann, H. Beck, M. Mølhøj, C. Knoblich, U. Gauschopf, D. Reusch, P. Bulau, Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies. Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes, *MABs* 6 (2014) 327–329, doi:10.4161/mabs.27876.

- [13] H. Liu, G. Ponniah, H.M. Zhang, Ch. Nowak, A. Neill, N. Gonzalez-Lopez, R. Patel, G. Cheng, A.Z. Kita, B. Andrien, *In vitro* and *in vivo* modifications of recombinant and human IgG antibodies, *MAbs* 6 (5) (2014) 1145–1154, doi:10.4161/mabs.29883.
- [14] N. Alt, T.Y. Zhang, P. Motchnik, R. Taticek, V. Quarumby, T. Schlothauer, H. Beck, T. Emrich, R.J. Harris, Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles, *Biologicals* 44 (2016) 291–305, doi:10.1016/j.biologicals.2016.06.005.
- [15] S. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, J. Lee, M. Borys, Z.J. Li, Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 1646–1665, doi:10.1002/bit.26587.
- [16] S. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, N. Zhang, Y. Huang, E. Vandermark, J. Lee, M. Borys, Z.J. Li, Modulating cell culture oxidative stress reduces protein glycation and acidic charge variant formation, *MAbs* 11 (2019) 205–216, doi:10.1080/19420862.2018.1537533.
- [17] G. Teshima, M.X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, J. Kung, V. Lahidji, J. Freeberg, Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2091–2097, doi:10.1016/j.chroma.2010.10.107.
- [18] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillaume, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 33–44, doi:10.1016/j.jpba.2014.08.035.
- [19] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillaume, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 282–289, doi:10.1016/j.jpba.2014.09.032.
- [20] S. Ahmed, N.N. Atia, A.H. Rageh, Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variants, *Talanta* 199 (2019) 347–354, doi:10.1016/j.talanta.2019.02.082.
- [21] S.Y. Jing, J.X. Gou, D. Gao, H.B. Wang, S.J. Yao, D.Q. Lin, Separation of monoclonal antibody charge variants using cation exchange chromatography: resins and separation conditions optimization, *Sep. Purif. Technol.* 235 (2020) 116136, doi:10.1016/j.seppur.2019.116136.
- [22] H.J. Lee, C.M. Lee, K. Kim, J.M. Yoo, et al., Purification of antibody fragments for the reduction of charge variants using cation exchange chromatography, *J. Chromatogr. B* 1080 (2018) 20–26, doi:10.1016/j.jchromb.2018.01.030.
- [23] T. Zhang, J. Bourret, T. Cano, Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5079–5086, doi:10.1016/j.chroma.2011.05.061.
- [24] T. Müller-Späh, L. Aumann, L. Melter, G. Ströhlein, M. Morbidelli, Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP), *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 1166–1177, doi:10.1002/bit.21843.
- [25] O. Persson, N. Andersson, B. Nilsson, Design of two-column batch-to-batch recirculation to enhance performance in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1531 (2018) 112–121, doi:10.1016/j.chroma.2017.11.035.
- [26] O. Khanal, V. Kumar, K. Westerberg, F. Schlegel, A.M. Lenhoff, Multi-column displacement chromatography for separation of charge variants of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A* 1586 (2019) 40–51, doi:10.1016/j.chroma.2018.11.074.
- [27] S.Y. Jian, C. Shi, H.Y. Leong, J.J. Yuan, D. Gao, H.B. Wang, S.J. Yao, D.Q. Lin, A novel twin-column continuous chromatography approach for separation and enrichment of monoclonal antibody charge variants, *Eng. Life Sci.*, 21 (2021) 382–391, doi:10.1002%2Felsc.202000094.
- [28] K. Baran, P. Zimoch, A. Stańczak, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1658 (2021) 462607, doi:10.1016/j.chroma.2021.462607.
- [29] T. Rumanek, M. Kołodziej, W. Piątkowski, D. Antos, Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools, *Biotechnol. Bioeng.* 120 (2023) 114–124, doi:10.1002/bit.28257.
- [30] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Non-linear Chromatography*, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 2006. Hardback ISBN: 9780123705372; eBook ISBN: 9780080457222.
- [31] X. Xu, A.M. Lenhoff, Binary adsorption of globular proteins on ion-exchange media, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6177–6195, doi:10.1016/j.chroma.2009.06.082.
- [32] A. Lavoisier, J.M. Schlaeppli, Early developability screen of therapeutic antibody candidates using Taylor dispersion analysis and UV area imaging detection, *MAbs* 7 (2015) 77–83, doi:10.4161/19420862.2014.985544.
- [33] V. Kumar, S. Lewke, W. Heymann, E. von Lieres, F. Schlegel, K. Westerberg, A.M. Lenhoff, Robust mechanistic modeling of protein ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1660 (2021) 462669, doi:10.1016/j.chroma.2021.462669.
- [34] T. Briskot, T. Hahn, T. Huuk, J. Hubbuch, Protein adsorption on ion exchange adsorbents: a comparison of a stoichiometric and non-stoichiometric modeling approach, *J. Chromatogr. A* 1653 (2021) 462397, doi:10.1016/j.chroma.2021.462397.
- [35] W.K. Marek, R. Muca, S. Woś, W. Piątkowski, D. Antos, Isolation of monoclonal antibody from a CHO supernatant. II. Dynamics of the integrated separation on IEC and HIC column, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 64–75, doi:10.1016/j.chroma.2013.06.076.
- [36] W.K. Marek, D. Sauer, A. Dürauer, A. Jungbauer, W. Piątkowski, D. Antos, Prediction tool for loading, isocratic elution, gradient elution and scaling up of ion exchange chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A* 1566 (2018) 89–101, doi:10.1016/j.chroma.2018.06.057.
- [37] M.S. Ricardo, S.S. Rosa, R. Cunha, C.L. da Silva, A.M. Azevedo, A. Fernandes-Platzgummer, Anion exchange chromatography-based platform for the scalable purification of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells, *Sep. Purif. Technol.* 310 (2023) 123238, doi:10.1016/j.seppur.2023.123238.
- [38] M.T. Stone, K.A. Cotoni, J.L. Stoner, Cation exchange frontal chromatography for the removal of monoclonal antibody aggregates, *J. Chromatogr. A* 1599 (2019) 152–160, doi:10.1016/j.chroma.2019.04.020.