



PRACA DOKTORSKA

w formie spójnego tematycznie
cyklu publikacji

Chromatografia przeciwciał monoklonalnych

mgr inż. Krystian Baran

Promotor pracy:

prof. dr hab. inż. Dorota Antos

Promotor pomocniczy:

dr inż. Wojciech Marek

RZESZÓW 2022

Pragnę serdecznie podziękować **Pani prof. dr hab. inż. Dorocie Antos, Panu dr inż. Wojciechowi Markowi** za nieocenioną pomoc podczas prowadzenia badań i redakcji pracy, poświęcony czas, wsparcie merytoryczne oraz życzliwą atmosferę.

Składam podziękowania **Panu dr hab. inż. Wojciechowi Piątkowskiemu, Panu mgr. Arturowi Stańczakowi** oraz całemu **Zespołowi Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej** za wspólną pracę, poświęcony czas i cenne wskazówki.

Dziękuję firmie **Polpharma Biologics** za możliwość wykonania części badań oraz dostarczenie niezbędnych materiałów.

Dziękuję również mojej **żonie Agacie** za cierpliwość, wyrozumiałość, pomoc oraz motywację.

Streszczenie

Niniejsza praca doktorska dotyczy procesu oczyszczania i regulacji składu rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych (tzw. mAbs – *ang. monoclonal antibodies*) stosowanych jako leki biologiczne. Ze względu na wysoki koszt oraz rygorystyczne wymagania dotyczące czystości leków procesy te nadal wymagają udoskonalenia.

Istotnym problemem technologicznym w produkcji przeciwciał jest mikro-heterogeniczność otrzymywanego produktu, czyli niejednorodność strukturalna białka, która może wpływać na jego aktywność biologiczną, stabilność oraz własności biofizyczne. Mikro-heterogeniczność przejawia się w powstawaniu wariantów mAbs, które różnią się masą cząsteczkową, ładunkiem lub hydrofobowością cząsteczki. Głównym źródłem mikro-heterogeniczności mAbs są tzw. warianty ładunkowe, które różnią się od siebie punktem izoelektrycznym (pI). Doniesienia literaturowe wskazują, że warianty ładunkowe o niższej wartości pI, tj. tzw. warianty kwasowe, zazwyczaj wykazują niższą aktywność biologiczną niż pozostałe warianty przeciwciała. Podobieństwo struktury chemicznej i ładunku wariantów powoduje, że są one bardzo trudne do rozdzielenia.

W cyklu przeprowadzonych badań opracowano metodę regulacji zawartości wariantów kwasowych przeciwciał monoklonalnych z udziałem chromatografii jonowymiennej, która jest jedną z najczęściej stosowanych technik izolacji i oczyszczania przeciwciał. Pracę zrealizowano w kilku etapach.

W pierwszym etapie pracy zbadano zjawisko agregacji przeciwciał na złożach do chromatografii jonowymiennej. Opracowano metodę przesiewowej oceny stabilności przeciwciał na złożach chromatograficznych przy użyciu różnicowej fluorymetrii skaningowej oraz aparatury do PCR (*ang. polymerase chain reaction*). Pomiary wartości temperatury przejścia fazowego (tzw. temperatury topnienia) umożliwiły ocenę stabilności przeciwciał na złożach. Wykonano je dla dwóch przeciwciał w różnych warunkach adsorpcyjnych, a poziom destabilizacji ich struktury zależał od rodzaju złoża i warunków wiązania. Ponadto ustalono, że spadek wartości temperatury topnienia poniżej wartości krytycznej (ok. 30°C) świadczy o niekorzystnych zmianach w strukturze białek zaadsorbowanych na złożu. Metoda ta może służyć zarówno do badań stabilności zaadsorbowanych przeciwciał, jak i do szybkich badań przesiewowych złożów oraz dostosowywania warunków operacyjnych procesu.

W kolejnym etapie badań zbadano wpływ przestrzeni pozakolumnowych (ECV – *Extra Column Volume*) na elucję białek w układzie chromatograficznym. Badania wstępne nad opracowaniem rozdzielania chromatograficznego prowadzi się przy zastosowaniu min-kolumn o bardzo małych wymiarach. Powoduje to wzrost udziału ECV w stosunku do zasadniczej objętości złoża w chromatograficznym układzie aparaturowym. Powyższe pociąga za sobą deformację kształtu profili stężenia przeciwciał w układzie chromatograficznym w postaci „ogonowania” pików i asymetrii krzywych wyjścia. Utrudnia to prawidłową interpretację otrzymanych danych eksperymentalnych i przenoszenie skali procesu.

W niniejszej pracy przeanalizowano wpływ występowania ECV na retencję kilku mało-i wielkocząsteczkowych związków modelowych oraz ich mieszanin. Zjawisko deformacji profili stężenia wynikało z nierównomiernego rozkładu prędkości w ECV i zależało od masy cząsteczkowej badanego związku. Ponadto typ układu iniekcyjnego wpływał na kształt otrzymanych chromatogramów. Do opisu tego zjawiska zastosowano model matematyczny, który odtwarzał profile stężenia w zakresie stosunkowo niskich prędkości fazy ruchomej charakterystycznych dla chromatografii białek.

W końcowym etapie badań opracowano metodę optymalizacji zawartości wariantów ładunku przeciwciał monoklonalnych na złożach do chromatografii jonowymiennej. Badania prowadzono w warunkach silnego przeładowania kolumny chromatograficznej masą białka w gradiencie pH. W wyniku tego procesu otrzymano dwie frakcje, w których jedna, w zależności od ładunku wypadkowego złoża, wzbogacona była o warianty kwasowe (frakcja odpadowa), natomiast druga zubożona w te warianty (frakcja produktu). Zastosowanie chromatografii jonowymiennej pozwoliło na regulację zawartości wariantów kwasowych we frakcji produktu, a zastosowanie recyklu frakcji odpadowej pozwoliło na zwiększenie wydajności prowadzonego procesu. Do ilościowego opisu procesu wykorzystano model dynamiki kolumny chromatograficznej, w którym uwzględniono wpływ ECV na przebieg rozdzielania.

Praca doktorska opiera się na cyklu trzech spójnych tematycznie artykułów, które zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie „*Journal of Chromatography A*”. Wyniki przeprowadzonych badań uzupełniają obecny stan wiedzy na temat oczyszczania przeciwciał monoklonalnych, a zaprezentowane metody mogą być wykorzystane w przemyśle biofarmaceutycznym.

Summary

This dissertation concerns the process of purification and regulation of the composition of recombinant monoclonal antibodies (mAbs) used as biological drugs. Due to high cost and stringent requirements for drug purity, purification processes still need to be improved.

A significant technological problem in antibody production is micro-heterogeneity of the obtained product, i.e., the structural heterogeneity of the protein, which can affect its biological activity, stability, and biophysical properties. Micro-heterogeneity is manifested in the formation of variants of mAbs that differ in molecular weight, charge, or hydrophobicity of the molecule. The main source of micro-heterogeneity of mAbs is formation of the charge variants, which differ in their isoelectric point. The similarity of the chemical structure and charge of the variants makes them very difficult to separate. Literature reports indicate that variants with a lower isoelectric point, i.e., the so-called acid variants, usually show lower biological activity than the other antibody variants.

In this work, a method for regulation of the content of acid variants of monoclonal antibodies with the use of ion-exchange chromatography was developed. Ion exchange chromatography is one of the most widely used techniques for the isolation and purification of antibodies. The research was performed in a few stages.

In the first stage of the work, the phenomenon of mAb aggregation in ion-exchange chromatography media was investigated. A method for high-throughput screening of the mAb stability on the chromatographic resins using differential scanning fluorimetry and PCR (*ang. polymerase chain reaction*) equipment has been developed. Measurements of the phase transition temperature, known as the melting point, enabled the evaluation of mAb stability adsorbed on the resins. The method was verified for two mAbs adsorbed under different conditions, and the level of destabilization of their structure depended on the type of the resin and the bonding conditions. Moreover, it was found that the drop in the melting point, below the critical value (approx. 30°C), indicated unfavorable changes in the structure of adsorbed proteins. This method can be used both for research on the stability of adsorbed mAbs, as well as for fast screening of the resins and adjusting the operating conditions of the process.

In the next stage of the work, the effect of extra column volumes (ECV) on the elution of proteins in the chromatographic system was investigated. Preliminary development of chromatographic separation is performed using mini-columns of very small dimensions. It results in increase in the ratio of ECV to the bed volume in the column and

is a cause of deformations of mAb profiles in the chromatographic system in the form of peak tailing and asymmetry of breakthrough curves. This makes difficult to interpret the obtained experimental data and transfer the scale of the process.

Therefore, in this stage, the influence of the presence of ECV on the retention of several low- and high-molecular model compounds and their mixtures were analyzed. The phenomenon of deformation of the concentration profiles resulted from the uneven velocity distribution in the ECV and depended on the molecular weight of the tested compound. Moreover, the type of the injection system influenced the shape of the obtained chromatograms. A mathematical model was used to describe that phenomenon. The model reproduced the concentration profiles in the range of relatively low mobile phase velocities, characteristic for the protein chromatography.

Finally, a method for optimization of the content of mAb charge variants has been developed using ion-exchange chromatography. The experiments were carried out under strong mass-overloading conditions using pH gradient. As a result, two fractions of column effluent were obtained, one of which was enriched with acidic variants (the wasted fraction), and another one depleted with these variants (the product fraction). The use of ion exchange chromatography made possible to adjust the content of acidic variants in the product fraction, whereas recycling of the wasted fraction allowed increase in the efficiency of the process.

The doctoral thesis is based on a cycle of three thematically coherent articles published in a renowned journal „Journal of Chromatography A”. The results of the performed research supplement the state of the art in the purification of mAbs and the methods presented have the potential to be applied in biopharmaceutical industry.

Spis treści

Wstęp	9
Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej.....	12
Część teoretyczna.....	13
1. Białka rekombinowane	13
2. Przeciwciała monoklonalne	15
3. Chromatografia w oczyszczaniu białek	17
3.1 Chromatografia powinowactwa	17
3.2 Chromatografia oddziaływań hydrofobowych	17
3.3 Chromatografia wykluczania	18
3.4 Chromatografia jonowymienna	18
4. Denaturacja i agregacja białek	21
5. Niejednorodność przeciwciał monoklonalnych	23
6. Przestrzenie martwe w układach chromatograficznych	26
7. Modelowanie procesów separacji w układach chromatograficznych	27
Część doświadczalna.....	29
8. Koncepcja badań.....	29
9. Badanie stabilności IgG ₁ na złożach IEX	30
9.1 Badania adsorpcji IgG ₁ na złożach	30
9.2 Analiza zawartości agregatów	33
9.3 Badanie temperatury topnienia przeciwciał	34
9.4 Podsumowanie	36
10. Wpływ obecności przestrzeni martwych w układach chromatograficznych na przebieg elucji	37
10.1 Uproszczona geometria układu	37
10.2 Model przepływu w przestrzeniach martwych	38
10.3 Deformacje profili stężenia przy małych objętościach iniekcji	38
10.4 Deformacje profili stężenia przy dużych objętościach iniekcji.....	40
10.5 Modelowanie CFD.....	42
10.6 Podsumowanie	42
11. Rozdzielanie wariantów ładunku przeciwciał monoklonalnych	43
11.1 Koncepcja przebiegu procesu chromatografii.....	43
11.2 Równowaga adsorpcyjna.....	44
11.3 Rozdzielanie preparatywne.....	45

11.4 Podsumowanie.....	48
Wnioski ogólne z pracy	49
Spis rysunków.....	50
Spis tabel.....	52
Literatura.....	53
Załącznik 1	63
Załącznik 2	74
Załącznik 3	83
Oświadczenia autora.....	93

Wstęp

Sektor biofarmaceutyczny w przemyśle ma najwyższą szacowaną stopę wzrostu i stoi w obliczu dużego zapotrzebowania na swoje produkty w najbliższej przyszłości. Technologia produkcji przeciwciał monoklonalnych (mAbs) jest bardzo ważnym procesem w tym sektorze, a jednocześnie bardzo skomplikowanym. Dotyczy to w szczególności technologii otrzymywania przeciwciał klasy IgG, która obejmuje większość leków opartych na mAbs obecnie sprzedawanych lub opracowywanych. Szacuje się, że w do 2028 roku ich udział w rynku światowym wzrośnie o 93.45 mld dolarów [1-3].

W wielu przypadkach, pierwszy etap technologii produkcji przeciwciał - etap wytwarzania i wydzielenia wstępnego mAbs (*ang. USP, Upstream Processing*), polegający na doborze systemów ekspresji oraz prowadzeniu hodowli komórkowych w wielkoskalowych bioreaktorach został już opracowany. Etap ten jest stale udoskonalany poprzez wprowadzanie ulepszeń technologicznych.

Otrzymane w USP mieszaniny pofermentacyjne poddawane są procesom izolacji białek oraz ich oczyszczania w następnym etapie technologicznym (*ang. DSP, Downstream Processing*). Zanieczyszczenia zawarte w mieszaninach pofermentacyjnych mogą generować w organizmie ludzkim niepożądane skutki uboczne, dlatego ich usuwanie to kluczowy element produkcji przeciwciał monoklonalnych. Zastosowane procesy oczyszczania ze względu na wysokie koszty oraz rygorystyczne wymagania dotyczące czystości leków nadal wymagają udoskonalenia i/lub optymalizacji [3,4].

Istotnym problemem produkcyjnym jest mikro-heterogeniczność wytwarzanego mAbs, czyli niewielka niejednorodność strukturalna białka, która może wpływać na jego aktywność biologiczną, stabilność oraz własności biofizyczne. Wynikiem mikro-heterogeniczności jest powstawanie różnych wariantów mAbs, które polega na: zmianie masy, ładunku lub hydrofobowości cząsteczki. Głównym źródłem mikro-heterogeniczności mAbs jest powstawanie tzw. wariantów ładunkowych, które różnią się punktem izoelektrycznym pI. Ich zawartość w produkcie należy do atrybutów regulacyjnych produkcji. Jednocześnie podobieństwo struktury chemicznej i ładunku wariantów powoduje, że są one bardzo trudne do rozdzielenia [5-7].

W wielu badaniach klinicznych stwierdzono zmniejszoną aktywność biologiczną wariantu kwasowego przeciwciał *av* i zwiększoną aktywność wariantu zasadowego *bv* względem celu molekularnego [8-10]. Zawartość *av* w produkcie często musi mieścić się

w kategorii cech jakościowych produktu i musi spełniać określone przez producenta kryterium akceptacji. W literaturze [9,11-13] podaje się jednocześnie, że wpływ obecności *av* na właściwości całej puli mAb jest często nieistotny w zakresie jego zawartości wynoszącej około $25 \pm 5\%$ wag. lub niższych.

W rozdzielaniu wariantów ładunkowych w etapie DSP w skali przemysłowej stosuje się chromatografię jonowymienną (IEX), którą najczęściej wykorzystuje się do regulacji składu wariantów ładunku. Adsorpcja przeciwciał na żywicach jonowymiennych może jednak powodować destabilizację struktury cząsteczki białka oraz ich agregację tj. łączenie się pojedynczych cząsteczek w dimery i oligomery, czyli agregaty wyższego rzędu. Agregaty zwykle są nieaktywne biologicznie, a ich obecność w leku może wywołać niepożądane skutki uboczne. Dlatego też rodzaj żywicy jonowymiennej oraz parametry procesu IEX muszą być odpowiednio dobrane, tak aby zapewnić dobrą selektywność rozdzielania przy uniknięciu niekorzystnych zmian konformacji białka [4-7].

Dobór żywic do IEX i warunków prowadzenia procesu (układu chromatograficznego) wykonuje się w skali laboratoryjnej w pierwszym etapie projektowania procesu przy zastosowaniu mini-kolumn, czyli kolumn o bardzo małych rozmiarach. Pozwala to na minimalizację zużycia materiału biologicznego podczas badań. Jest to na tym etapie bardzo istotne, ponieważ dobór optymalnych warunków procesu wymaga wykonania ogromnej liczby cykli doświadczalnych [14].

Z drugiej strony, minimalizacja rozmiarów kolumny chromatograficznej wywołuje kolejny problem, którym jest wpływ tzw. przestrzeni martwych (ECV - *Extra Column Volume*) chromatograficznego układu aparaturowego na kształt wylotowych profili stężenia (chromatogramów), a co za tym idzie interpretację danych doświadczalnych uzyskanych w eksperymentach. Obecność ECV wywołuje zjawisko dyspersji wzłużnej chromatografowanych związków i rozmycie ich profili stężenia. Ponieważ objętość przestrzeni martwych jest zwykle porównywalna, a często większa od objętości mini-kolumny, obecność i wpływ ECV musi być uwzględniony w opisie dynamiki procesu chromatografii. Pozwala to na uniknięcie błędów w przenoszeniu skali procesu z układów chromatograficznych z mini-kolumną na układy z kolumną preparatywną lub przemysłową [14-16].

W ramach niniejszej pracy realizowano trzy cele badawcze;

1. Opracowanie kryteriów doboru żywic do IEX (układu chromatograficznego) oraz warunków prowadzenia procesu oczyszczania przeciwciał monoklonalnych.

Na tym etapie pracy podjęto badania nad zjawiskiem rozwijania i agregacji przeciwciał monoklonalnych na żywicach jonowymiennych, w efekcie których opracowano metodę badania stabilności białka. W badaniach nad stabilnością zaadsorbowanych białek wykorzystano różne techniki analizy, w tym różnicową fluorymetrię skaningową (DSF, *Differential Scanning Fluorimetry*), co jest nowością tej pracy.

2. Określenie wpływu ECV na interpretację danych doświadczalnych.

W tej części pracy zbadano wpływ ECV na przebieg elucji mikro i makro-cząsteczek w mini-kolumnach chromatograficznych i opracowano uproszczony model opisujący hydrodynamikę ECV.

3. Opracowanie chromatograficznej regulacji składu wariantów przeciwciała monoklonalnego.

W ramach realizacji tego celu, który był najważniejszy w pracy, opracowano metodę redukcji zawartości wariantów kwasowych av , w której rozdzielanie odbywa się w kolumnie IEX, w warunkach silnego przeładowania masowego surowcem do poziomu stanu nasycenia pojemności chłonnej złoża. W trakcie elucji realizowanej w jednostopniowym gradiencie pH, odbierane są tylko dwie frakcje: frakcja zubożona w av do zadanej zawartości, oraz frakcja wzbogacona w av , która może być zawracana do ponownej chromatografii w celu poprawy wydajności procesu. Przebieg procesu jest krótki i prosty do wykonania.

Proces rozdzielania wariantów w chromatografii IEX białek opisano matematycznie za pomocą modelu dynamiki kolumny chromatograficznej, w którym dodatkowo uwzględniono wpływ przestrzeni martwych na retencję białek.

Całość wyników badań zrealizowanych w ramach pracy została opublikowana w artykułach [17,18,20] oraz częściowo w [19], a ich charakter umożliwia wykorzystanie w przemyśle biofarmaceutycznym. Wyniki pracy mogą mieć zastosowanie przy oczyszczaniu innych niż przeciwciała monoklonalne białek terapeutycznych.

Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej.

- Stańczak A., **Baran K.**, Antos D., A high-throughput method for fast detecting unfolding of monoclonal antibodies on cation exchange resins. *J. Chromatogr. A* 1643 (2020) 461688. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461688. **(Załącznik 1)**
- **Baran K.**, Marek W.K., Piątkowski W., Antos D., Effect of flow behavior in extra-column volumes on the retention pattern of proteins in a small column. *J. Chromatogr. A* 1598 (2019) 154-162. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.03.060. **(Załącznik 2)**
- **Baran K.**, Zimoch P., Stańczak A., Piątkowski W., Antos D., 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. **(Załącznik 3)**

Część teoretyczna

1. Białka rekombinowane

Rekombinowane białka są wykorzystywane zarówno w badaniach biomedycznych jak i wleczeniu wielu wcześniej nieuleczalnych ciężkich chorób. W 1982 roku zatwierdzono jako lek pierwsze rekombinowane białko, którym była ludzka insulina, a do tej pory na całym świecie produkuje się nawet kilkaset różnych biofarmaceutyków [6,21,22].

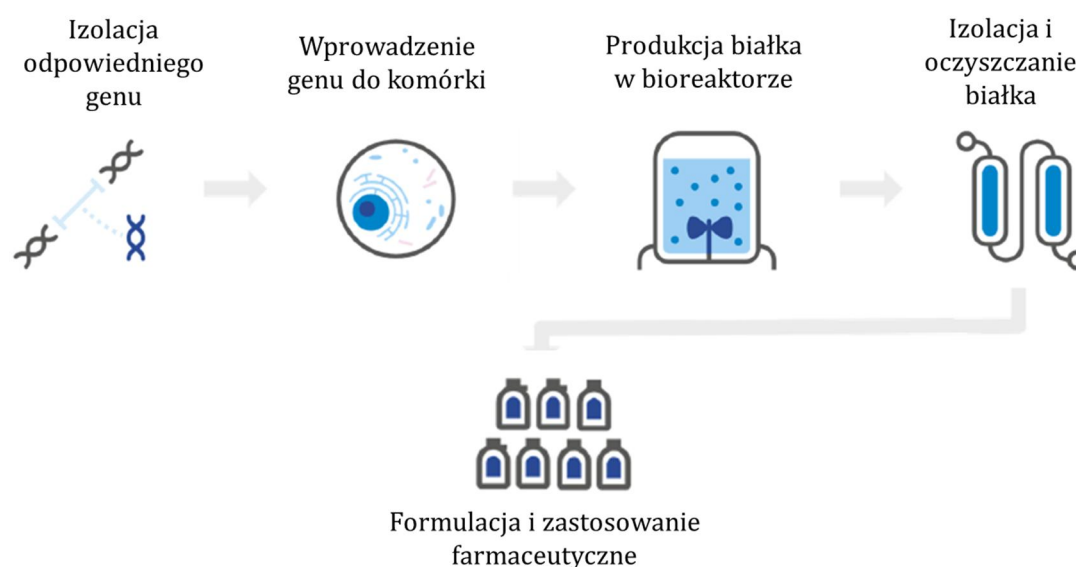
Pierwsza generacja białek rekombinowanych opierała się wyłącznie o natywną strukturę otrzymanych produktów, podczas gdy druga obejmowała białka o ulepszonych właściwościach i wyższym odwzorowaniu cząsteczek obecnych w organizmach żywych. Ulepszone właściwości, tj. specyficzność, biodystrybucja, skuteczność i minimalizacja skutków ubocznych są jednak niewystarczające biorąc pod uwagę rozwój omawianej dziedziny. Najnowsza, trzecia generacja rekombinowanych białek, oprócz rozwoju nowych produktów, ma na celu opracowanie innych dróg podawania leku, wyższą efektywność oraz większe bezpieczeństwo tego typu terapii [22].

We wszystkich komórkach żywych, w zależności od potrzeb funkcjonalnych syntezowane są odpowiednie białka. Informacje o białkach zakodowane w materiale genetycznym są kontrolowane i regulowane przez systemy transkrypcyjne, dzięki czemu z DNA syntezowany jest matrycowy kwas rybonukleinowy (mRNA), który w procesie translacji pozwala na uzyskanie odpowiedniego białka. Po procesie translacji, ze względu na konieczność uzupełniania struktury, białka podlegają tzw. modyfikacjom potranslacyjnym [23].

Białka syntezowane są zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych. U organizmów bezjądrowych procesy w komórce są szybkie, mało skomplikowane, a co za tym idzie wysoce ekonomiczne, jednak z powodu występujących modyfikacji potranslacyjnych, w przemyśle biofarmaceutycznym często stosuje się komórki eukariotyczne. Komórki ssacze z uwagi na zbliżoną strukturę i aktywność w porównaniu do komórek ludzkich są najlepszym wyborem do produkcji leków biopodobnych (*ang. biosimilars*) – leków produkowanych na bazie już istniejących na rynku. Przeciwciała monoklonalne ze względu na szerokie zastosowanie stanowią największą grupę rekombinowanych leków białkowych. W przypadku ich produkcji jako

system ekspresyjny często wykorzystuje się komórki z jajnika chomika chińskiego (CHO – *ang. Chinese Hamster Ovary*). Zastosowanie znalazły również komórki ludzkie typu PerC6, które podobnie jak komórki CHO pozwalają na otrzymanie wysokiego stężenia białka docelowego w roztworze (nawet 15 mg mL^{-1}) [1,24-26].

Gen kodujący docelowe białko wprowadzany jest do komórki ekspresyjnej za pomocą odpowiedniego wektora, a następnie w bioreaktorze dochodzi do produkcji pożądanego biofarmaceutyku (rys.1). Białka rekombinowane mogą być wytwarzane wewnątrz lub zewnątrz-komórkowo. Produkcja białek wewnątrz komórek wymaga zastosowania dodatkowego etapu jakim jest liza komórki, co dodatkowo generuje zanieczyszczenia w postaci jej składników. Niezależnie od sposobu wytwarzania mieszanina poreakcyjna poddawana jest szeregom procesów oczyszczania i zateżenia [4].



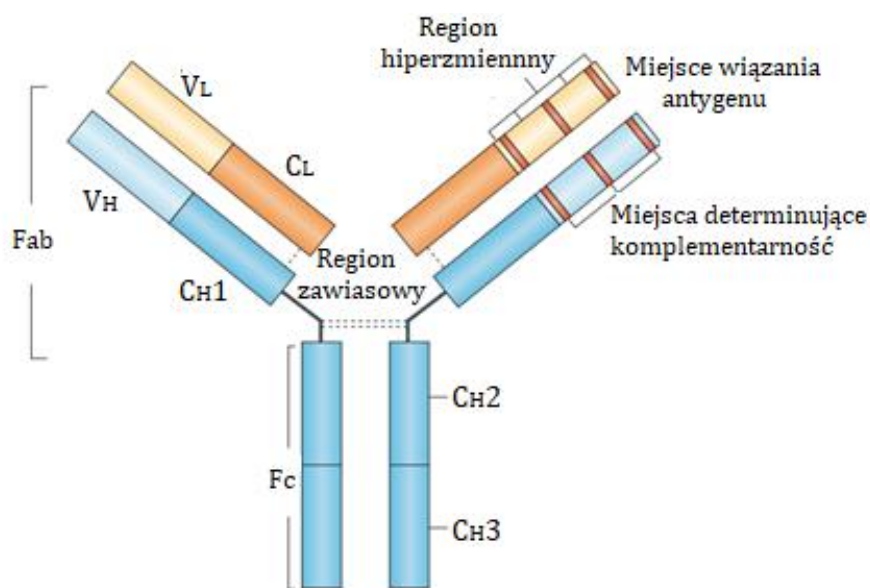
Rys.1. Uproszczony schemat produkcji biofarmaceutyków (na podstawie [26])

Każdy kolejny etap produkcji i oczyszczania jest wybierany i optymalizowany w oparciu o wymagania docelowego produktu dotyczące czystości, tożsamości a także ilości zanieczyszczeń.

2. Przeciwciała monoklonalne

Przeciwciała są glikoproteinami wytwarzanymi w organizmach żywych przez komórki plazmatyczne w odpowiedzi na wystąpienie różnego rodzaju antygenów. Przeciwciała można podzielić na poliklonalne i monoklonalne. Przeciwciała poliklonalne wywołują swoistą, uniwersalną odpowiedź organizmu, gdyż rozpoznają wiele epitopów (specyficznych regionów) tego samego antygeny. Przeciwciała monoklonalne wiążą się bardzo specyficznym z jednym, konkretnym epitopem danego antygeny. Właściwości przeciwciał monoklonalnych wykorzystywane są zarówno w analityce jak i diagnostyce laboratoryjnej oraz jako leki biologiczne [23,27].

Cząsteczka przeciwciała (jako immunoglobuliny G – IgG) składa się z czterech łańcuchów: dwóch lekkich i dwóch ciężkich połączonych ze sobą mostkami dwusiarczkowymi. Każdy z łańcuchów zbudowany jest z domen stałych: C_H i C_L oraz zmiennych: V_H i V_L . Struktura IgG przypomina literę Y, gdzie trzon stanowi fragment F_c , natomiast ramiona, w których zawarte są miejsca wiązania antygeny, nazywane są fragmentami F_{ab} (rys.2).

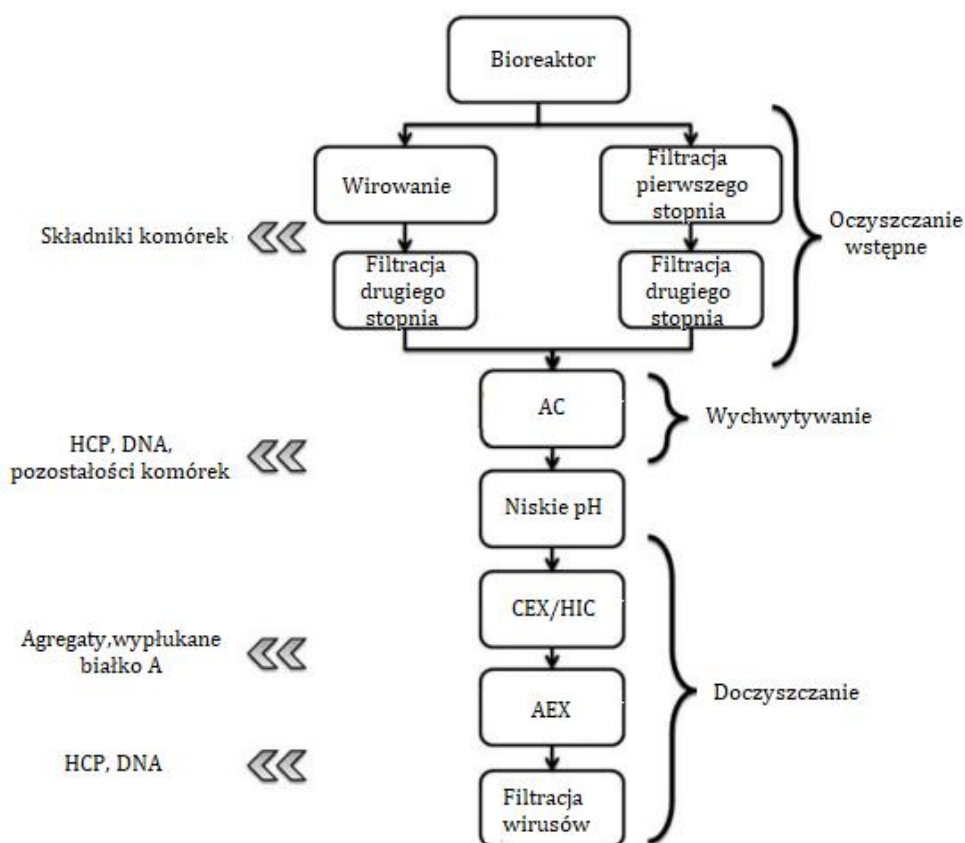


Rys.2. Budowa przeciwciała klasy IgG (na podstawie [28]).

Ze względu na budowę przeciwciał, podzielić je można na 5 klas: IgA, IgD, IgE, IgG oraz IgM. Z wymienionych klas, immunoglobuliny G występują w surowicy krwi w największym stężeniu i pełnią kluczową rolę w działaniu systemu immunologicznego. W surowicy ludzkiej krwi wyróżnia się 4 podklasy IgG: IgG₁, IgG₂, IgG₃ oraz IgG₄, które różnią się między sobą budową domen stałych C_H oraz strukturą wiązania fragmentów F_c z F_{ab} (regionem zawiasowym). To właśnie różnice strukturalne odpowiadają za

dobór odpowiedniej podklasy do celów terapeutycznych, np. długi region zawiasowy, krótki okres półtrwania oraz trudności w oczyszczaniu powodują, że IgG₃ jest najrzadszą podklasą wykorzystywaną jako lek biologiczny [5,27].

Na rys.3 zilustrowano poszczególne etapy produkcji przeciwciał monoklonalnych. Mieszanina pochodząca po etapie USP poddawana jest procesom wirowania i filtracji, w których usuwane są duże zanieczyszczenia (np. składniki komórki). Następnie docelowy produkt jest wychwytywany w procesie chromatograficznym przy użyciu komplementarnego liganda, przy jednoczesnej dezaktywacji wirusów (poprzez desorpcję w niskim pH). Ostatnim etapem przed formulacją jest doczyszczanie produktu białkowego z występujących w mniejszych ilościach zanieczyszczeń (np. DNA), białek komórek gospodarza (HCP) czy agregatów [29,30].



Rys.3 Przykładowy schemat technologiczny procesu produkcji przeciwciał monoklonalnych (na podstawie [29]).

3. Chromatografia w oczyszczaniu białek

Procesy oczyszczania przeciwciał monoklonalnych rozwijają się w kierunku opracowania uniwersalnych platform (schematów), w których stosuje się te same operacje jednostkowe. Jednak ze względu na różnice we właściwościach i zachowywaniu oczyszczanych związków jest to bardzo trudne.

Niezależnie od typu produkowanego przeciwciała pierwszym chromatograficznym etapem oczyszczania w DSP jest chromatografia powinowactwa, AC (rys.3), która charakteryzuje się wysoką specyficznością i wydajnością oraz pozwala na skuteczny wychwyty białka z mieszanin pofermentacyjnych. Po etapie wychwyty konieczne jest zastosowanie kolejnych etapów doczyszczania chromatograficznego - głównie chromatografii hydrofobowej i jonowymiennej. W celach analitycznych, rzadziej preparatywnych, wykorzystuje się również chromatografię wykluczania SEC [30].

3.1 Chromatografia powinowactwa

AC jest jedną z ważniejszych technik oczyszczania białek, szczególnie przeciwciał monoklonalnych. Wiązanie białka z odpowiednim ligandem jest wysoko specyficzne. Białko wprowadzone jest do kolumny i wiązane izokratycznie w neutralnym pH, a jego elucja z kolumny odbywa się najczęściej poprzez zastosowanie eluentu o niskim pH. Białko eluowane w takich warunkach charakteryzuje się skłonnością do tworzenia agregatów, dlatego też konieczny jest dobór odpowiedniego składu i gradientu fazy ruchomej [31]. Eluenty stosowane do wymywania białek zawierają w swoim składzie aminokwasy, których zawartość wpływa zarówno na odzysk produktu, jak i na agregację. Stosuje się m.in. glicynę, prolinę, lizynę, histydynę i argininę, jednak jak dowodzą badania, wykorzystanie tej ostatniej zapewnia największą wydajność procesu przy stosunkowo niskiej agregacji białek [32-42].

3.2 Chromatografia oddziaływań hydrofobowych

W procesach rozdzielania i oczyszczania biofarmaceutyków popularną i znaczącą metodą jest chromatografia oddziaływań hydrofobowych HIC. Technika wykorzystuje właściwości hydrofobowe rekombinowanych przeciwciał poprzez interakcję między niepolarnymi regionami na ich powierzchni a hydrofobowymi ligandami unieruchomionymi na złożu. Każde białko posiada specyficzną liczbę oraz różne wyeksponowanie grup hydrofobowych, co w obecności soli kosmotropowej o odpowiednim zakresie stężenia pozwala na ich rozdzielenie [4,43-45].

Fragmenty hydrofobowe białek ulokowane są najczęściej w wewnętrznej części struktury białka, dlatego podczas oczyszczania techniką chromatografii hydrofobowej często dochodzi do zmian konformacyjnych cząsteczek. Efekt ten zależy również od rodzaju liganda oraz stężenia soli kosmotropowej, której obecność wpływa najmocniej na omawiane zmiany. Rozwijanie białka na złożu jest w dużej mierze zjawiskiem odwracalnym, mimo to powstawanie agregatów jest jednym z głównych ograniczeń chromatografii HIC [44-49].

W zależności od rozdzielanych substancji można zastosować różne tryby elucji. Najczęściej stosuje się gradient liniowy i stopniowy (przy malejącym stężeniu soli kosmotropowej) lecz możliwa jest także elucja izokratyczna lub zmiana typu soli na chaotropową. Ponadto stosuje się gradient temperatury lub modyfikacje powyższych [50-52].

3.3 Chromatografia wykluczania

Mechanizm rozdzielania w chromatografii wykluczania SEC opiera się wyłącznie na różnicy w kształtach i rozmiarach badanych związków. Cząsteczki nie wiążą się specyficznym ze złożem, ponieważ jest ono adsorpcyjnie inertne, nie posiada ono na swojej powierzchni unieruchomionych ligandów i grup funkcyjnych, które mogłyby wywołać adsorpcję rozdzielanych substancji. W SEC matryca oraz rozkład średnic porów są dostosowane do wielkości średnic hydrodynamicznych rozdzielanych cząsteczek. Eluent (bufor) wykorzystany w tej technice nie ma znaczącego wpływu na rozdzielanie, co umożliwia zastosowanie tej metody bezpośrednio po innej technice rozdzielania (np. IEC, HIC) [44,53]. Technika znajduje również zastosowanie jako metoda odsalania (wymiany) buforów pomiędzy poszczególnymi etapami chromatograficznymi [53].

Proces chromatografii wykluczania jest prowadzony w trybie elucji izokratycznej. Zakres stosowanego pH jest zależny wyłącznie od ograniczeń związanych ze stabilnością białka i wymagań procesowych [44].

3.4 Chromatografia jonowymienna

Chromatografia jonowymienna IEC jest jedną z najczęściej stosowanych technik do oczyszczania i separacji peptydów, białek (w tym mAb), kwasów nukleinowych oraz innych naładowanych cząsteczek. Mechanizm procesu pozwala na separację cząsteczek ulegających jonizacji poprzez oddziaływanie z przeciwnie naładowaną powierzchnią złoża [44,54-56].

Cząsteczki białka charakteryzują się różnicami w ładunku powierzchniowym, jego gęstością i rozkładem. Wartość sumarycznego ładunku powierzchniowego cząsteczki jest zależna od pH roztworu buforowego, w którym się znajduje. W pI białka osiągają zerowy wypadkowy ładunek elektryczny, w roztworach o niższym pH występują w formie kationów, natomiast w pH wyższym w postaci anionów [54]. Niezależnie od ładunku wypadkowego, w dużych cząsteczkach, takich jak białka, nie wszystkie grupy funkcyjne są równomiernie eksponowane. Mimo, iż białko ma sumarycznie ładunek zerowy, zależnie od jego struktury kationy lub aniony mogą występować na powierzchni. W celu zachowania odpowiedniej stabilności białka, wartość pH powinna być dobrana w taki sposób, aby białko pozostawało w formie natywnej, a jego aktywność nie ulegała zmianie [56].

Zdolność rozdzielcza w tej technice jest na tyle wysoka, iż pozwala m.in. na rozdzielanie białek różniących się nawet jednym aminokwasem [54]. Wszechstronność, szerokie zastosowanie i stosunkowo niskie koszty doprowadziły do tego, że chromatografia jonowymienna stała się jedną z najpopularniejszych technik chromatografii białek [56].

Matrycą ciała stałego w chromatografii jonowymiennej jest najczęściej usieciowana agaroz (sepharoz), modyfikowany styren czy polimetakrylan metylu. Dzięki reakcji chemicznej do matrycy za pomocą odpowiedniego linkera (np. propylowego) przyłączana jest odpowiednia grupa funkcyjna. W przypadku, gdy przyłączona grupa występuje w formie anionu (np. grupa sulfonowa, karboksylowa) złoże jest kationitem, natomiast w wyniku reakcji np. z czwartorzędową aminą wytwarza się wymiennicz anionowy [4,44,57].

Proces rozdzielania można prowadzić za pomocą gradientu soli lub pH. Przy najczęściej stosowanym gradiencie soli, białko adsorbuje się przy jej niskiej zawartości w fazie ruchomej, a wymycie następuje przy wzroście zawartości soli w strumieniu wlotowym. Zwykle w celu wymycia białka stosuje się gradient liniowy, natomiast aby wymyć silnie zaadsorbowane zanieczyszczenia konieczny jest gradient skokowy realizowany przy dużym stężeniu soli. Niektóre mieszaniny białek różniące się pI mogą być wymywane przy użyciu gradientu pH [44,56]. W skali przemysłowej, gdzie dąży się do minimalizacji przeprowadzonych etapów stosuje się również gradient soli lub pH generowany wewnątrz kolumny [44]. Po przeprowadzonej pracy kolumna musi zostać poddana regeneracji fazą ruchomą użytą do adsorpcji, a w niektórych przypadkach musi zostać zastosowana sanityzacja (np. roztworem NaOH) [44]. IEC można prowadzić

również w trybie rugowania, co ma miejsce m.in. przy oczyszczaniu wariantów przeciwciał monoklonalnych. Rugowanie przeprowadza się przy użyciu odpowiedniego środka wymywającego [58] lub wykorzystując wyłącznie różnice w adsorpcji substancji rozdzielanych [59].

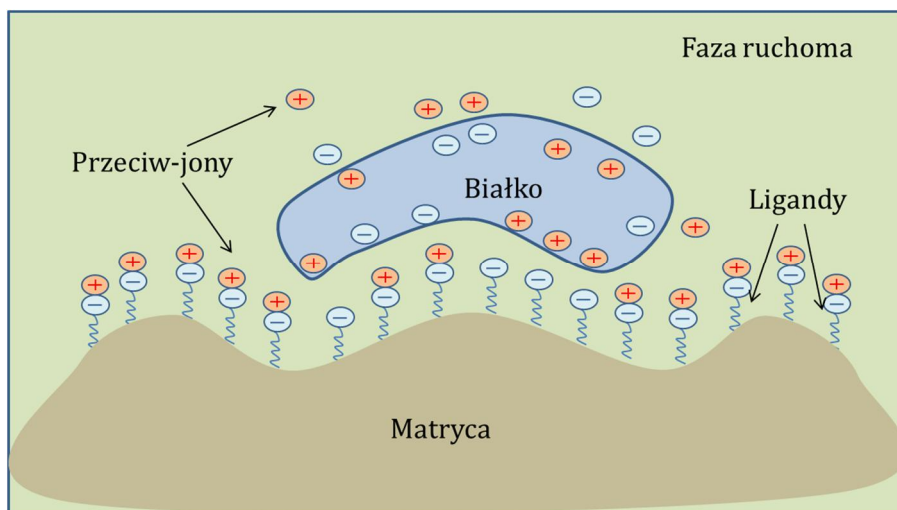
W IEC zjawisko rozwijania i agregacji cząsteczek białka jest obserwowane stosunkowo rzadko. Fragmenty białek zawierające ładunek, które odpowiedzialne są za wiązania elektrostatyczne z ligandami unieruchomionymi na złożu, eksponowane są na zewnątrz cząsteczki, dzięki czemu proces adsorpcji nie wymusza zmian konformacyjnych w obrębie białek. Zmiana struktury może być jednak wywołana przez inne właściwości złożeń do chromatografii jonowymiennej. Dobór odpowiednich parametrów złożeń, tj. rodzaju matrycy i liganda, porowatości czy gęstości usypowej oraz składu fazy ruchomej jest niezbędny przy projektowaniu tego typu chromatografii [60-67].

W IEC szybkość procesu powierzchniowego adsorpcja-desorpcja jest znacząco wyższa w stosunku do szybkości dyfuzji w porach adsorbentu. Przy modelowaniu procesu zwykle zakłada się równowagę termodynamiczną pomiędzy stężeniem białka w fazie ruchomej i na powierzchni adsorbentu. Równowagę termodynamiczną opisuje się przy użyciu izotermi stechiometrycznej (równania (1) i (2)) po uprzednim uwzględnieniu zjawiska osłaniania (ekranowania) ładunku na powierzchni adsorbentu przez makrocząsteczkę (rys.4) [68-69].



$$q_P^* = \frac{K_e[q^{\infty} - (z + \sigma)q_P^*]^z}{[Na^+]^z} C_P \quad (2)$$

gdzie: z – ładunek białka, R – miejsce aktywne na wymienniczu jonowym, P – cząsteczka białka, Na^+ – przeciwjony, C_P – stężenie białka w fazie ruchomej, q_P^* – stężenie zaadsorbowanego białka, σ – współczynnik ekranowania ładunku, $q^{*\infty}$ – pojemność chłonna złożeń, K_e – stała równowagi [4].



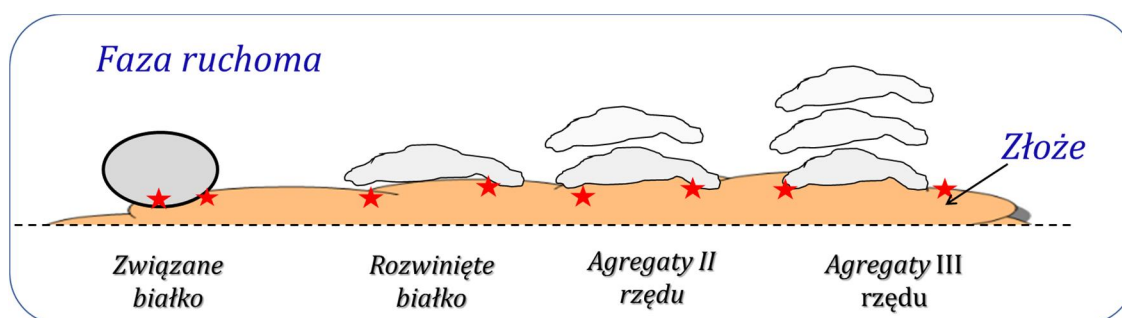
Rys.4. Schemat przedstawiający adsorpcję i efekt ekranowania na złożach do chromatografii jonowymiennej (na podstawie [4]).

4. Denaturacja i agregacja białek

Jak wspomniano powyżej, procesy adsorpcji i desorpcji na złożach chromatograficznych prowadzą często do zmiany struktury białek, a w konsekwencji do zmian ich aktywności. Np. rozwijanie się białek może być procesem nieodwracalnym, a wytworzone agregaty charakteryzują się zazwyczaj odmienną aktywnością biologiczną w porównaniu z cząsteczkami w formie natywnej. W przypadku biofarmaceutyków obecność agregatów jest niewskazana ze względu na możliwość wystąpienia reakcji immunogennych lub inne działania niepożądane po podaniu leku. Zatem zmiany struktury białek wpływają na wydajność i selektywność oczyszczania produktów białkowych i wymagają w zastosowanych technikach izolacji i oczyszczania odpowiedniego przeciwdziałania [4,31].

Denaturacja, jako odwracalna lub nieodwracalna zmiana struktury białka jest niewątpliwie prekursorem tworzenia agregatów białkowych. Podczas tego procesu dochodzi do ekspozycji hydrofobowych domen, które w znacznej mierze odpowiadają za agregację. Na proces agregacji może wpływać wiele czynników, m.in. temperatura, stężenie białka, pH oraz jonowość roztworu. Ponadto obecność niektórych ligandów, w tym specyficznych jonów może stymulować zmiany struktury białka. Podczas produkcji i oczyszczania biofarmaceutyków występują również naprężenia mechaniczne mogące wpływać na agregację produktów [31,70]. W zależności od warunków procesu białko wiąże się w formie natywnej lub rozwija się podczas adsorpcji na złożu chromatograficznym, co w konsekwencji może prowadzić do powstania agregatów drugiego lub wyższych rzędów. Hipotetyczny mechanizm rozwijania i agregacji

przedstawiono na rys.5. Przypuszcza się, że zaadsorbowane białko po zakotwiczeniu na powierzchni adsorbentu rozwija się poprzez interakcje z kilkoma sąsiadującymi miejscami aktywnymi. Rozwinięte w ten sposób białko podatne jest na agregację.



Rys.5. Uproszczony schemat agregacji białek.

Agregacja może zachodzić już na etapie USP. Wybór odpowiedniego systemu ekspresji i warunków, w których prowadzona będzie hodowla to główne czynniki mogące limitować agregację na tym etapie. Akumulacja dużej ilości białka powstałego podczas ekspresji w komórkach może prowadzić do agregacji wewnątrzkomórkowej z powodu oddziaływań między fragmentami rozwiniętej molekuly lub nieprawidłowej identyfikacji łańcucha peptydowego przez chaperony odpowiedzialne za odpowiednie fałdowanie [31]. W wyniku nagromadzenia się białek i pozostałych składników mieszaniny hodowlanej oraz ich interakcji (oddziaływań jonowych lub hydrofobowych) powstają ciała inkluzyjne, zawierające w sobie dużą ilość rekombinowanego białka (50 - 90%), jednak bez późniejszej obróbki nie nadają się one do zastosowania jako leki [71]. Dostosowanie warunków ekspresji m.in: temperatury, czasu prowadzenia procesu, dodatek środków powierzchniowo czynnych oraz wybór systemu komórkowego zapewniającego wysoką zgodność na poziomie potranslacyjnym to główne czynniki pozwalające ograniczać niekorzystne zjawisko agregacji [31,72,73]. Zmiany konformacyjne białek są problemem limitującym proces produkcji biofarmaceutyków, dlatego też istnieje wiele metod analitycznych pozwalających na detekcję tego zjawiska. Wykorzystuje się tu metody fluoroscencyjne, spektrofotometryczne, czy też kalorymetryczne, lecz główną ich wadą jest długi czas wykonania analiz oraz trudności ze zbadaniem zmian konformacyjnych na złożach chromatograficznych w czasie rzeczywistym [74-77].

Różnicowa fluorymetria skaningowa DSF jest praktyczną, opłacalną i dostępną techniką biofizyczną szeroko stosowaną do oceny fałdowania białek oraz ich stabilności termicznej. Technika pozwala na badanie rozwijania białek poprzez podgrzewanie ich

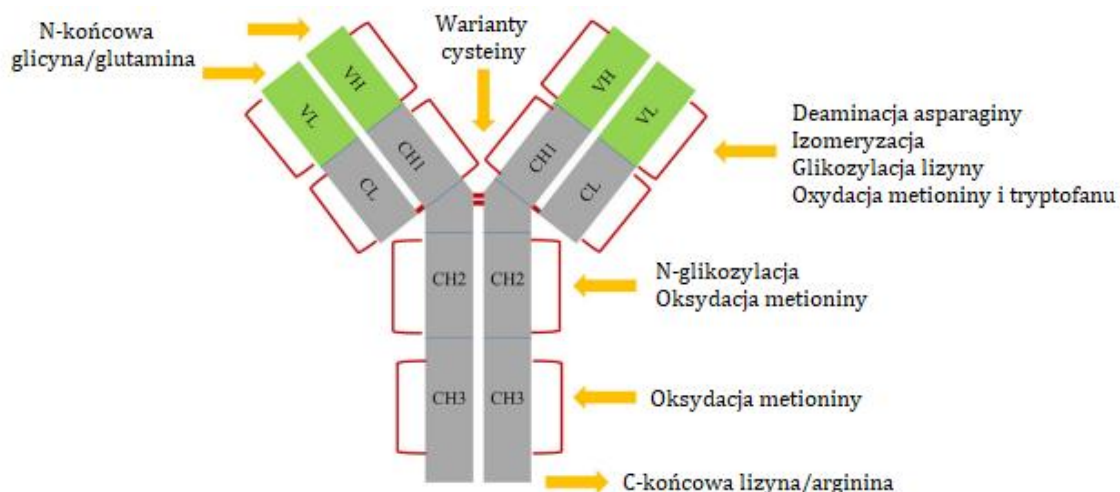
w kontrolowanym środowisku i pomiarze zmiany emisji fluorescencji. Z otrzymanej w ten sposób krzywej fluorescencji, można odczytać temperaturę przejścia fazowego (topnienia), często więcej niż jedną, charakteryzującą odchylenie konformacji od formy natywnej. W przypadku przeciwciał monoklonalnych, ze względu na wielkość cząstek i strukturę domenową, można zaobserwować dwie lub trzy temperatury topnienia [78-79].

Omawiana technika nie wymaga specjalistycznego sprzętu, do wysokopręślowych eksperymentów wykorzystać można zestaw do RT-PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym) będący na wyposażeniu większości laboratoriów biotechnologicznych [80-81]. W artykule [17], w ramach niniejszej pracy, opisano metodę szybkiej identyfikacji zmian strukturalnych białek zaadsorbowanych na złożu przy wykorzystaniu zestawu do RT-PCR.

5. Niejednorodność przeciwciał monoklonalnych

Przeciwciała, w tym przeciwciała rekombinowane, ze względu na swoją złożoną budowę i duże rozmiary są cząsteczkami niejednorodnymi. Mikro-heterogeniczność przeciwciał może być powodowana procesami zachodzącymi w etapie USP, zarówno na poziomie wewnątrz jak i zewnątrzkomórkowym [7]. Dodatkowo, jak wspomniano powyżej, zmiany strukturalne białek zachodzą w etapie DSP i wynikają przeważnie tylko z procesu agregacji białek.

W przemyśle biofarmaceutycznym wymaga się wysokiej zgodności produkowanych substancji z ich naturalnie występującymi w organizmach odpowiednikami. Białka często różnią się sumarycznym ładunkiem (zależnym od jonizacji reszt aminokwasowych), co ma znaczący wpływ kliniczny i może wyeliminować dany produkt z zastosowań farmaceutycznych. Dodatni ładunek wypadkowy (gdy pH białka jest mniejsze od pI) pochodzi głównie od argininy, lizyny, histydyny i aminy na N-końcu, natomiast ujemny (gdy pH > pI) generowany jest zazwyczaj przez kwas asparaginowy i glutaminowy oraz wolną grupę karboksylową. W zależności od sumarycznego ładunku wyróżnia się trzy typy izoform białek (zwanymi dalej wariantami): kwasowe (*av*), obojętne (*mv*) i zasadowe (*bv*), wykazujące różnice w wartości pI. Tworzenie się odpowiednich wariantów ma miejsce na poziomie obróbki potranslacyjnej, gdzie dochodzi między innymi do glikozylacji, utleniania reszt metioninowych, izomeryzacji kwasu asparaginowego czy obróbki N-końcowej lizyny (rys.6)[7,82,83].



Rys.6. Przykładowe modyfikacje cząsteczki IgG (na podstawie [7]).

Warianty kwasowe i zasadowe wykazują często odmienne właściwości od wariantów obojętnych. Wartość punktu izoelektrycznego może mieć wpływ m.in. na farmakokinetkę poprzez zmniejszoną retencję tkankową dla wariantów kwasowych i zwiększoną dla zasadowych [10,84]. Przykładem może być lek Trastuzumab, który jest rekombinowanym przeciwciałem monoklonalnym łączącym się z receptorem ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2). Lek ten hamuje proliferację komórek nowotworowych, które wykazują nadekspresję receptora HER2 [85,86]. Badania wykazały, że warianty o ładunku kwasowym *av* wiążą się słabiej z receptorami HER2, przez co działanie zmniejszające proliferację ulega pogorszeniu [87].

Zawartość poszczególnych wariantów powinna zależeć od ich zawartości w białku wyjściowym oraz ich wpływu na zastosowanie kliniczne. W procesach produkcji i oczyszczania często dąży się do redukcji zawartości wariantów kwasowych *av* i zasadowych *bv*, jednak te pierwsze wykazują najczęściej zmniejszoną aktywność biologiczną. Optymalne warunki dla leku biopodobnego uzyskuje się wówczas, gdy udział wariantów *av* stanowi nie więcej niż 25% zawartości wszystkich izoform [12,13].

Zmiany wypadkowego ładunku białek wykrywa się analitycznie głównie metodami chromatograficznymi i elektroforetycznymi. W zależności od wartości pI izoform stosuje się chromatografię kationowymienną (CEX) (dla większości przeciwciał terapeutycznych) lub anionowymienną (AEX). Chromatografia CEX stosowana jest szeroko w przemyśle i pozwala na efektywne określenie ilościowego udziału poszczególnych izoform w badanym materiale. W przypadku ogniskowania izoelektrycznego (IEF) cząsteczki rozdzielają się na podstawie wypadkowego ładunku

oraz wartości pI, a do detekcji wykorzystywana jest absorpcja promieniowania przy długości fali 280 nm. Ogniskowanie izoelektryczne często prowadzi się w kapilarach co znacząco zwiększa wydajność procesu [7,88]. Do pozostałych metod analitycznych wykorzystywanych w celu badania zgodności pod względem zawartości wariantów należą: dichroizm kołowy (CD), spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) lub spektrometria mas (MS) [89].

Chromatografię IEX wykorzystuje się nie tylko do analizy ilościowego określenia zawartości wariantów ładunkowych. Do oddzielenia niekorzystnych izoform stosuje się najczęściej jako technikę rozdzielania CEX oraz rzadziej AEX [20,90-92]. Wybór odpowiedniej techniki rozdzielania i warunków prowadzenia procesu, tj. wypełnienia kolumny, pH fazy ruchomej i stężenia soli zależy od indywidualnych właściwości oczyszczanego przeciwciała [80]. Rozdzielanie opiera się zwykle na odpowiednim gradiencie pH lub stężenia soli w fazie ruchomej. Wykorzystanie gradientu soli wymaga wysokiego jej stężenia w celu elucji białka z kolumny, a w konsekwencji generuje dodatkowe procesy odsalania przed kolejnymi etapami oczyszczania czy formulacji. Alternatywą jest elucja w gradiencie pH pozwalająca na proste i efektywne rozdzielenie wariantów na podstawie wartości ich pI, jednak w tym przypadku konieczna jest optymalizacja stosowanych buforów, tak aby pojemność buforowa była stała w danym zakresie pH i aby bufony nie oddziaływały z fazą stacjonarną [93-96]. Dodatkowo w celu poprawienia wydajności procesu stosuje się układy wielokolumnowe oraz przepływ przeciwny [95], jednak tak zaawansowane techniki mimo wysokiej wydajności są trudne do optymalizacji i kontroli warunków prowadzenia procesu.

6. Przestrzenie martwe w układach chromatograficznych

Badania w skali laboratoryjnej są koniecznym elementem projektowania procesu chromatograficznego. Ze względu na dużą ilość potrzebnych cykli doświadczalnych, a zarazem wysokie koszty procesu i materiałów, wstępny dobór warunków procesowych odbywa się w skali laboratoryjnej, gdzie stosowane są kolumny o bardzo małych objętościach (wymiarach) - mini-kolumny. Z takich badań przy małym zużyciu materiału można uzyskać ogromną liczbę informacji, które następnie służą jako dane wyjściowe do doboru i budowy modeli dynamiki umożliwiających projektowanie i optymalizację procesu, a w konsekwencji do powiększenia jego skali [14].

Z drugiej strony zastosowanie mini-kolumn powoduje wzrost udziału objętości przestrzeni pozakolumnowych (ECV) w stosunku do zasadniczej objętości samej kolumny w chromatograficznym układzie aparaturowym. W ECV rozkład prędkości przepływającej fazy ruchomej jest nierównomierny, co powoduje zmianę kształtu i rozmycie profili stężenia badanych substancji. Efekty hydrodynamiczne wpływające na deformację profilu są często w uproszczeniu określane jako tzw. dyspersja w kierunku osiowym [97]. Efekt ECV najczęściej opisywany jest poprzez wyznaczenie wariancji pików w całym układzie aparaturowym lub w jego częściach [15,16], co jest metodą szybką, jednak uproszczoną, a co za tym idzie często za mało dokładną ze względu na złożoność zjawiska. W przypadku związków wielkocząsteczkowych, takich jak białka, ze względu na ich niską dyfuzyjność ruch w kierunku promieniowym w kapilarach łączących elementy ECV jest utrudniony, a opis hydrodynamiki układu wymaga uwzględnienia rozkładu prędkości radialnej oraz dyfuzji promieniowej [18].

Długość elementów ECV składających się z przewodów w układzie chromatograficznym jak i udział objętości martwych w pozostałych elementach układu, które wypełnia faza ruchoma (zawory, pętle iniekcyjne, łączenia kapilar, celki detektorów) powinny być minimalizowane. Niestety, konstrukcja układu chromatograficznego ma swoje granice minimalizacyjne, tak więc efektów pochodzących z ECV nie można całkowicie wyeliminować. ECV ma zatem znaczący wpływ na kształt rejestrowanych profili stężenia w układach chromatograficznych. W wyniku efektu ECV impuls iniekcyjny badanej próbki ulega deformacji i rozcieńczeniu przemieszczając się w układzie, co ma negatywny wpływ na efektywność rozdzielania chromatograficznego [97-99]. Zaniedbanie tego efektu może prowadzić do błędnej interpretacji mechanizmów retencji

cząstek w kolumnie chromatograficznej, a w konsekwencji do nieefektywnego i nieekonomicznego przeniesienia skali procesu.

7. Modelowanie procesów separacji w układach chromatograficznych

Ze względu na złożoność procesu projektowanie chromatografii jest kosztowne i czasochłonne, a modelowanie matematyczne jest często jedynym rozwiązaniem umożliwiającym przeniesienie skali oraz optymalizację jej przebiegu [44].

Modelowanie matematyczne chromatografii z powodu towarzyszących sorpcji znikomych efektów cieplnych jest uproszczone, ponieważ w przeciwieństwie do procesu adsorpcji, w modelu eliminuje się równania bilansów i kinetyki transportu ciepła [99-102].

Do opisu dynamiki chromatografii białek stosuje się modele: heterogeniczne i pseudohomogeniczne. W modelu heterogenicznym uwzględnia się bilanse transportu masy zarówno w fazie ruchomej jak i w porach adsorbentu. W modelach pseudohomogenicznych będących uproszczeniami modeli heterogenicznych, ale o podobnej dokładności opisu, transport masy w fazie stacjonarnej jest opisywany zastępczymi współczynnikami kinetycznymi [44,100-103]. Niezależnie od wyboru modelu, konieczne jest uzupełnienie modelu odpowiednimi równaniami izoterm adsorpcji, a w niektórych przypadkach także równaniami kinetyki adsorpcji [44].

Jednym z modeli pseudohomogenicznych jest model kinetyczno-dyspersyjny, wyrażany poprzez różniczkowy bilans masy w płynie [44,100]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\partial q}{\partial t} + \frac{u_0}{\varepsilon_{tot}} \frac{\partial C}{\partial x} = D_a \frac{\varepsilon_e}{\varepsilon_{tot}} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (3)$$

gdzie: C – lokalne stężenie substancji w fazie ruchomej mg mL^{-1} , q – lokalne stężenie substancji w fazie stałej $\text{mg mL}_{\text{złoża}}^{-1}$, x , t – odpowiednio współrzędna osiowa i czas, u_0 – średnia prędkość liniowa w osi kapilary m s^{-1} , D_a – zastępczy współczynnik dyspersji wzdłużnej w kolumnie $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, $F = \frac{1 - \varepsilon_{tot}}{\varepsilon_{tot}}$ – stosunek faz, ε_{tot} , ε_e – porowatości: całkowita i zewnętrzna układu chromatograficznego.

Powyższy model musi być uzupełniony równaniami kinetycznymi transportu masy pomiędzy fazą ciekłą i stałą. Modyfikacje modelu posłużyły do opracowania modelu przepływu w przestrzeniach martwych układu chromatograficznego oraz opracowania modelu retencji wariantów ładunku przeciwciał monoklonalnych w kolumnie chromatograficznej.

Część doświadczalna

8. Koncepcja badań

Badania zrealizowane w ramach pracy składały się z następujących etapów:

1. Badań stabilności struktury przeciwciał monoklonalnych zaadsorbowanych na wybranych złożach do chromatografii jonowymiennej oraz opracowania kryteriów szybkiego doboru złoża do procesu ich oczyszczania. Opracowano metodę szybkiej i wysokoprzesiewowej oceny żywic pod kątem zmian konformacyjnych w obrębie struktury oczyszczanych przeciwciał [17].
2. Opracowania adekwatnego modelu dynamiki procesu opisującego retencję przeciwciał w kolumnie chromatograficznej z uwzględnieniem efektu ECV. Przebadano wpływ przestrzeni pozakolumnowych ECV w układzie chromatograficznym, a do badań wykorzystano związki o różnych masach cząsteczkowych oraz ich mieszaniny. Przeanalizowano również wpływ rodzaju urządzenia iniekcyjnego na kształt profili stężenia w przestrzeniach pozakolumnowych [18,19].
3. Opracowania metody rozdzielania wariantów przeciwciała monoklonalnego IgG₁ na złożach do chromatografii jonowymiennej. W tym celu wykorzystano zjawisko przeładowania kolumny oraz jednostopniowy gradient pH i otrzymano frakcję przepływową wzbogaconą o warianty kwaśne w przypadku zastosowania kationitu oraz warianty zasadowe przy zastosowaniu anionitu. Druga frakcja, związana na złożu, a następnie zdesorbowana, wzbogacona była w warianty o przeciwnym ładunku w stosunku do frakcji przepływowej [20].

9. Badanie stabilności IgG₁ na złożach IEX [17]

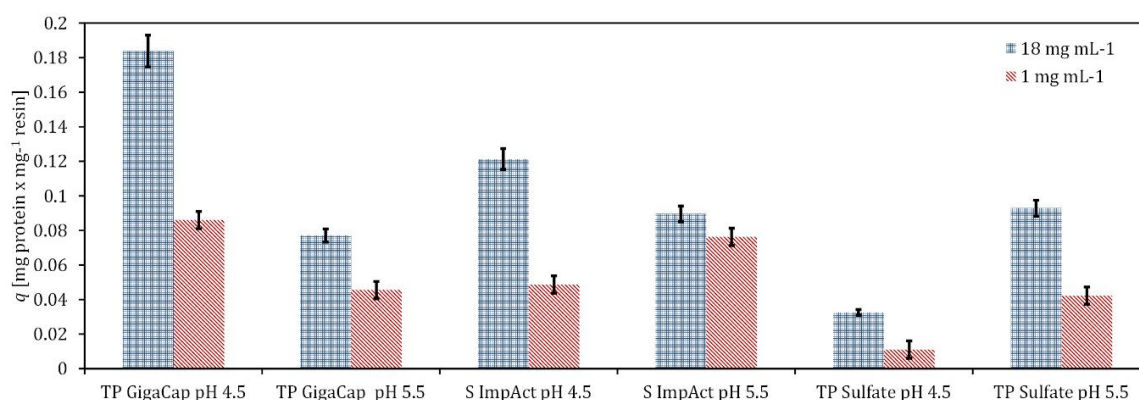
Przeprowadzono badania przesiewowe nad własnościami adsorpcyjnymi na kilku złożach IEX. Do szczegółowych badań agregacji i rozwijania białek wybrano trzy złoża wykazujące wysoką pojemność adsorpcyjną w stosunku do IgG₁, a ich parametry przedstawiono poniżej [tab.1].

Tab. 1. Parametry złoż CEX wykorzystanych do badań (na podstawie danych producenta lub * na podstawie [105]).

Nazwa złoża	TOYOPEARL GigaCap S-650M	Capto S ImpAct	TOYOPEARL Sulfate-650F
Skrót	TP GigaCap	S ImpAct	TP Sulfate
Grupa funkcyjna	Siarczanowa	Sulfonowa	Sulfonowa
Ligand	propyl	pirolidon	butyl
Matryca	PMMA	agarozą	PMMA
Rozmiar ziaren [μm]	50 - 100	50	30-60
Pojemność jonowa złoża [$\mu\text{eq mL}^{-1}$]	185*	64*	530

9.1 Badania adsorpcji IgG₁ na złożach

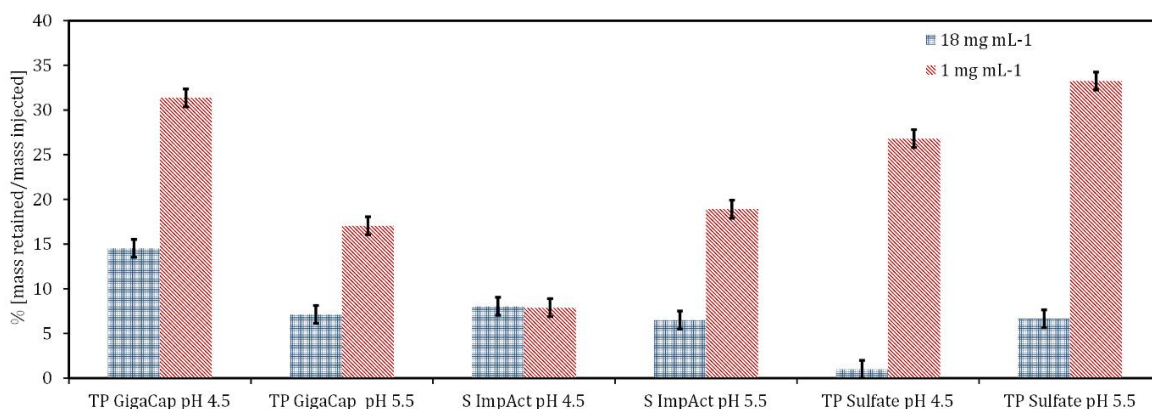
Na rys.7 przedstawiono zależność ilości zaadsorbowanego białka dla wybranych złoż przy dwóch różnych wartościach pH, 4.5 i 5.5.



Rys.7. Stężenie IgG₁ w fazie zaadsorbowanej ($q \text{ mg}_{\text{białka}} \text{ mg}_{\text{złoża}}^{-1}$) na wybranych złożach chromatograficznych

Najsilniejszą adsorpcję zaobserwować można na złożu TP GigaCap w pH 4,5, ponadto niezależnie od stężenia, wraz ze wzrostem wartości pH ilość zaadsorbowanego białka maleje. Odwrotny efekt zaobserwowano na złożu TP Sulfate. W przypadku złoża S ImpAct ilość związanego białka zależy w większym stopniu od jego początkowego stężenia niż od wartości pH.

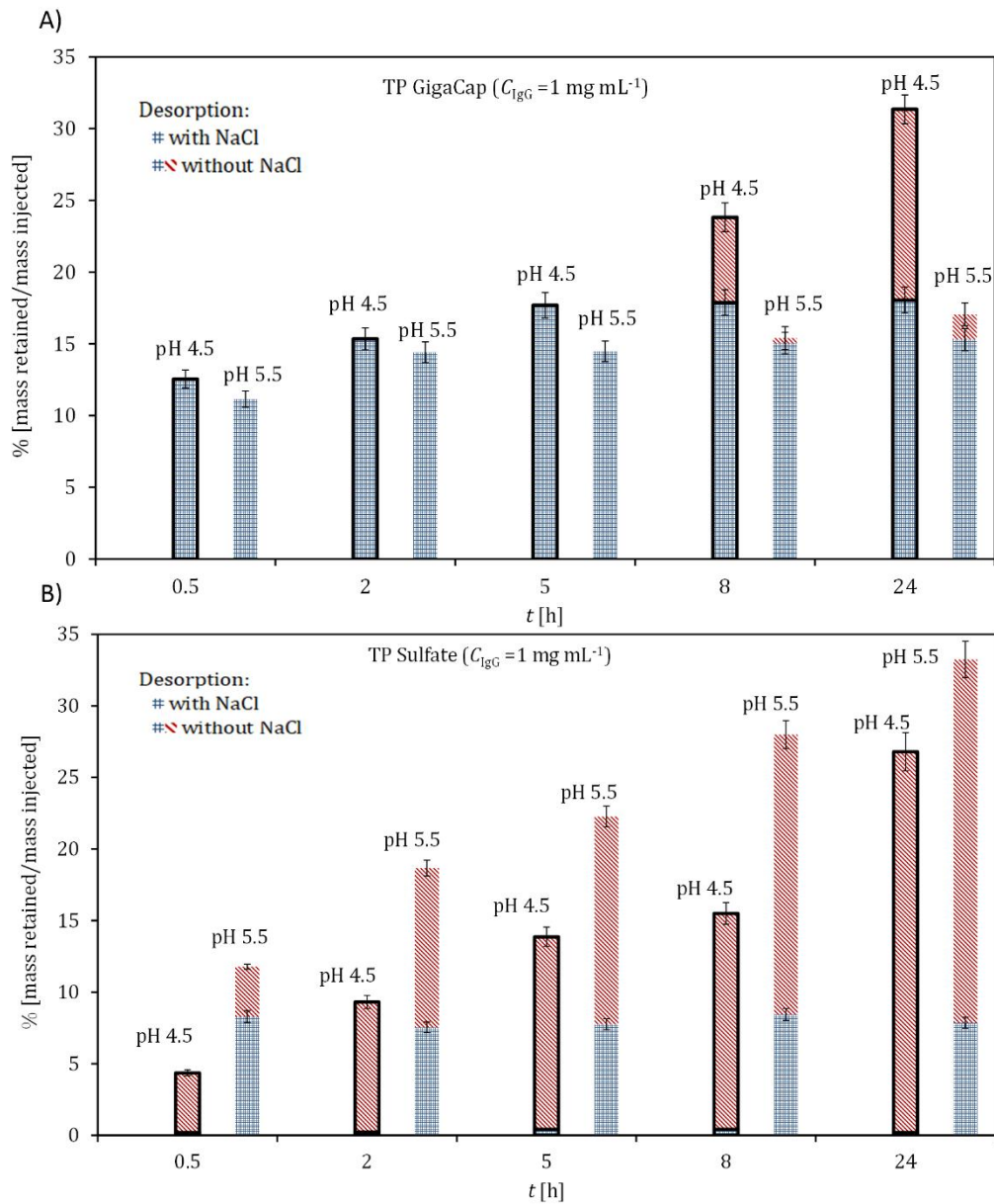
W celu określenia odzysku masy białka wprowadzonego w strumieniu zasilającym przeprowadzono desorpcję buforem o pH 9, a następnie wykonano bilans masy i obliczono straty białka, które nie uległo desorpcji (rys.8). Prawie we wszystkich przypadkach (z wyjątkiem S ImpAct w pH 4,5) straty masy zależały od stężenia białka w roztworze wyjściowym, tj. im mniej masy białka zaadsorbowało się na złożu tym odzysk masy białka był mniejszy. Efekt ten może wynikać z procesu rozwijania się białek na złożach. Im mniej białka zaadsorbowanego na złożu tym więcej miejsc aktywnych, na których mogło się ono rozwinąć i zmienić swoją strukturę, co opisano w rozdz. 4. Ponadto w przypadku TP GigaCap i TP Sulfate straty masy są większe w przypadku takiego zakresu warunków, w których białko silniej wiązało się na złożu.



Rys.8. Straty masy białka na złożach (masa białka niezdesorbowanego ze złoża w stosunku do masy wprowadzonej)

Dla złożów, w których efekt niepełnej desorpcji był najbardziej widoczny, zbadano wpływ czasu inkubacji na etapie adsorpcji oraz sposobu desorpcji na ilość białka trwale związanego ze złożem. Desorpcję wykonano dwustopniowo, tj. buforem fosforanowym pH 9,0 oraz tym samym buforem z dodatkiem 1M NaCl. Czas inkubacji wynosił od 0,5 do 24 godzin. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów przedstawiono na rys.9. W przypadku złoża TP GigaCap metoda desorpcji nie miała wpływu przy czasach inkubacji nie dłuższych niż 5 godzin, natomiast przy dłuższym kontakcie białka ze złożem, szczególnie przy pH 4,5, desorpcja buforem z solą powiększała odzysk białka. Na złożu TP Sulfate straty masy związane z silną adsorpcją wykryto już po upływie

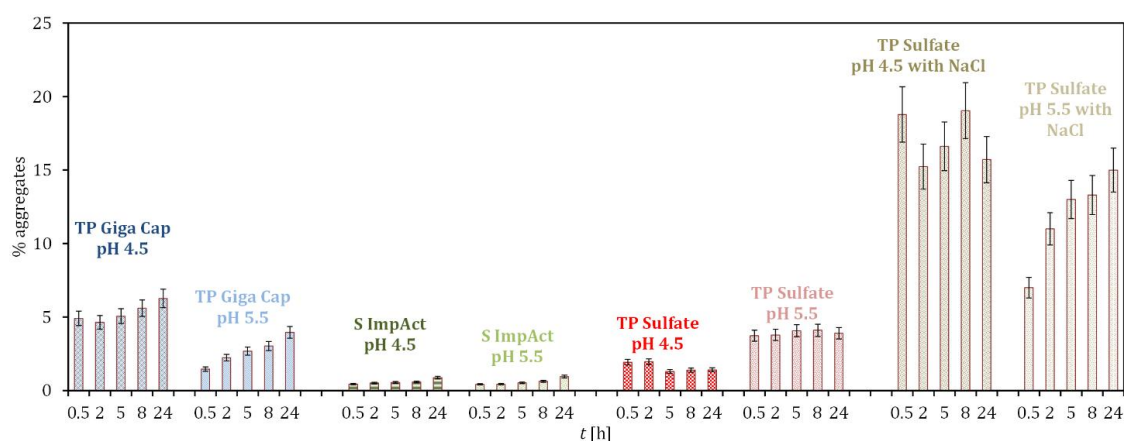
0,5 godziny i pomimo zastosowania desorpcji z udziałem soli część białka trwale wiązała się na złożu.



Rys.9. Wpływ czasu inkubacji oraz typu desorbentu na straty masy.

9.2 Analiza zawartości agregatów

W celu zbadania zmiany struktury białek w procesie adsorpcji-desorpcji wykonano analizę SEC roztworów białek otrzymanych po desorpcji, która pozwoliła na wykrycie obecności agregatów drugiego (dimerów) i wyższych rzędów. Eksperymenty przeprowadzono dla próbek otrzymanych po różnych czasach inkubacji i stężeniu wyjściowym białka równym 18 mg mL^{-1} (rys.10). Na złożach TP GigaCap i S ImpAct ilość agregatów wzrastała wraz ze wzrostem czasu inkubacji, jednak dla drugiej z wymienionych żywic poziom agregatów był bardzo niski (ok 1 %). Dla wymienionych żywic zawartość agregatów nie zmieniała się znacząco przy zastosowaniu buforu desorpcyjnego z dodatkiem soli, co świadczy o wystarczającej sile elucyjnej zastosowanego buforu bez soli w stosunku do białka jak i agregatów. Ze złoża TP Sulfate agregaty zostały wymyte już przy najkrótszym czasie inkubacji. W pH 5,5 zawartość agregatów nie zależała od czasu inkubacji, a w pH 4.5 nieznacznie spadała z czasem, co może wynikać ze słabej adsorpcji w tych warunkach (rys.7). Wymycie IgG₁ z TP Sulfate buforem z dodatkiem soli spowodowało duży wzrost zawartości agregatów świadczący o znacznej destabilizacji białka na tym złożu. Prawdopodobnie tworzenie się dużej ilości agregatów utrudniało dostęp białka do miejsc aktywnych i spowodowało nieoczekiwaną redukcję siły adsorpcji.



Rys.10. Procentowa zawartość agregatów w desorbencji w funkcji czasu inkubacji.

Jak można było zaobserwować, zjawiska agregacji i rozwijania białek na złożach chromatograficznych są zależne od zmiennych operacyjnych procesu (stężenie białka, warunki adsorpcji i desorpcji, czas wiązania), dlatego też jej badanie jest procesem niezwykle czasochłonnym. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie metody opartej na pomiarze temperatur przejścia fazowego, czyli tzw. temperatur

topnienia białek zaadsorbowanych na złożu przy użyciu technik bazujących na fluorymetrii DSF, którą wykorzystano w niniejszej pracy.

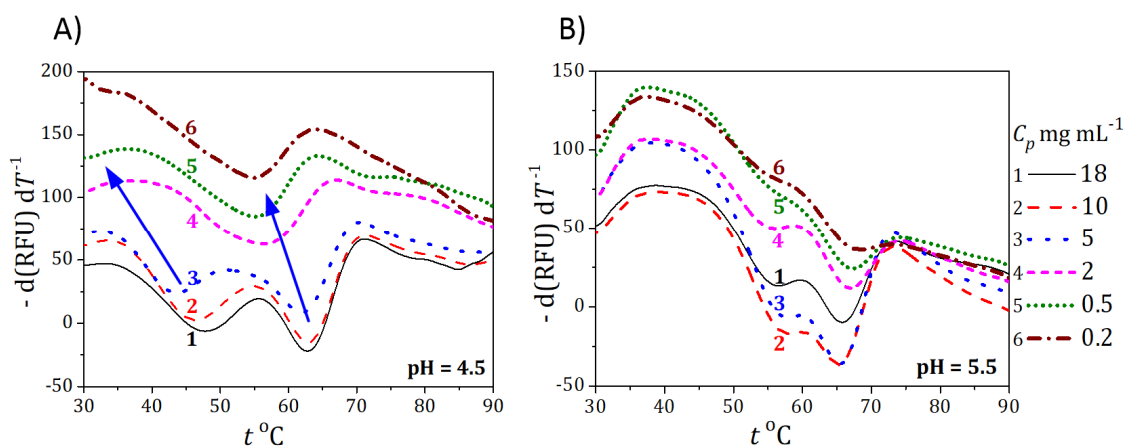
9.3 Badanie temperatury topnienia przeciwciał

Wykonano badania temperatury topnienia przeciwciał zaadsorbowanych na wybranych złożach. Zaadsorbowaną na odpowiednim złożu IgG₁ znakowano barwnikiem fluorescencyjnym, a następnie podgrzewano w aparacie do RT-PCR. Z otrzymanej w ten sposób zależności fluorescencji od temperatury wyznaczono ww. temperatury topnienia (*tt*).

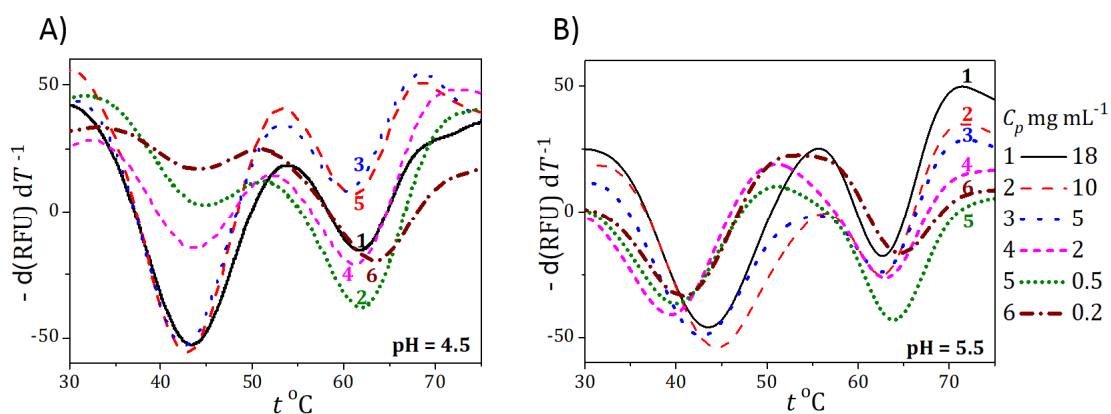
Niższa *tt* natywnej IgG₁ w roztworze, w zależności od warunków, mieściła się między 59 a 62°C, natomiast wyższa między 69 a 73°C. Wartości *tt* zaadsorbowanego przeciwciała były znacznie niższe od wyżej wymienionych niezależnie od zastosowanego złoża (rys.11- 13), w szczególności dla niższej wartości *tt*, co świadczy o różnicy w stabilności między poszczególnymi domenami IgG₁.

Białko związane na złożu TP GigaCap w pH 4.5 (Rys.11a) charakteryzuje się niższymi wartościami *tt* w porównaniu z wiązaniem przy pH 5.5 (rys.11b). Ponadto przy pH 4.5 zaobserwować można zależność wpływu stężenia na stabilność badanego przeciwciała. Wartości *tt* maleją przy zastosowaniu niższych wartości stężenia, a przy wartościach stężenia mniejszych od 5 mg mL⁻¹ widoczna jest tylko jedna jej wartość (niższa znajduje się poniżej badanego zakresu tj. 30°C), co wynika z silnej adsorpcji i agregacji białka w tych warunkach opisanych w rozdziałach 9.1 i 9.2. Jak wykazano poniżej, przy wyższych wartościach stężenia struktura białka jest stabilniejsza prawdopodobnie ze względu na silne pokrycie powierzchni adsorbentu, co zapobiega rozwijaniu i agregacji. Dla pH 5,5 stężenie IgG₁ nie miało znaczącego wpływu na wartość *tt*, co może świadczyć o tym, że zjawisko rozwijania w tych warunkach zostało zahamowane.

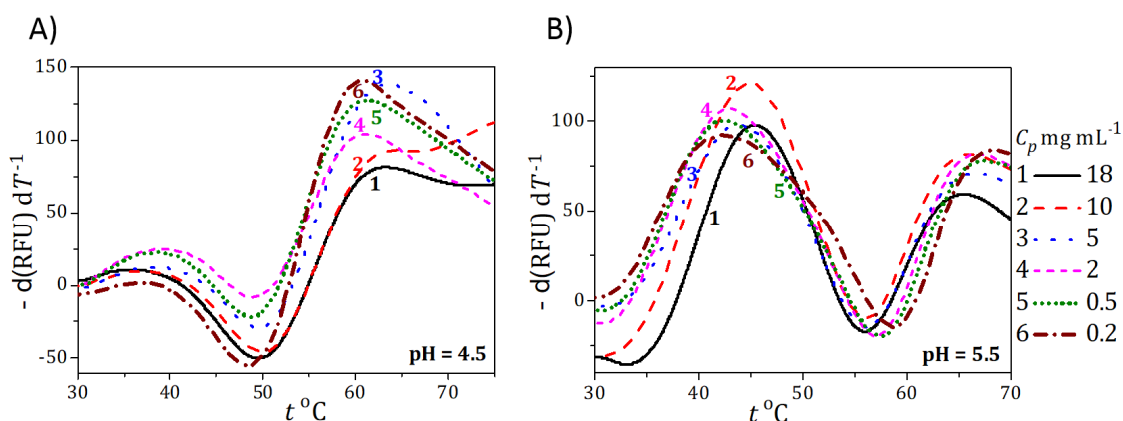
Na złożu S ImpAct (rys.12) niezależnie od warunków zaobserwować można dwie wartości *tt*, świadczące o wyższej stabilności IgG₁ w porównaniu do złoża TP GigaCap. Przy zastosowaniu pH 5,5, gdzie adsorpcja jest silna dla niskiego zakresu stężenia białka (rys.7), a straty masy są wyższe niż w pH 4.5 (rys.8) obserwuje się efekt destabilizacji białka, przejawiający się obniżeniem wartości *tt*.



Rys.11. Zależność tt dla różnych stężeń zaadsorbowanego białka na złożu TP GigaCap w pH 4,5 (A) oraz pH 5,5(B); C_p – stężenie białka w roztworze wyjściowym, $-d(\text{RFU})dT^{-1}$ – parametr charakteryzujący zmiany we fluorescencji próbki.



Rys.12. Zależność tt dla różnych stężeń zaadsorbowanego białka na złożu S ImpAct w pH 4.5 (A) oraz pH 5,5 (B); C_p – stężenie białka w roztworze wyjściowym, $-d(\text{RFU})dT^{-1}$ – parametr charakteryzujący zmiany we fluorescencji próbki.



Rys.13. Zależność tt dla różnych stężeń zaadsorbowanego białka na złożu TP Sulfate w pH 4.5 (A) oraz pH 5.5 (B); C_p – stężenie białka w roztworze wyjściowym, $-d(\text{RFU})dT^{-1}$ – parametr charakteryzujący zmiany we fluorescencji próbki.

W przypadku złoża TP Sulfate (rys.13) występuje tylko jedna wartość t_t , co świadczy o wysokiej destabilizacji białka i koreluje z silną adsorpcją oraz wysokimi stratami masy na złożu.

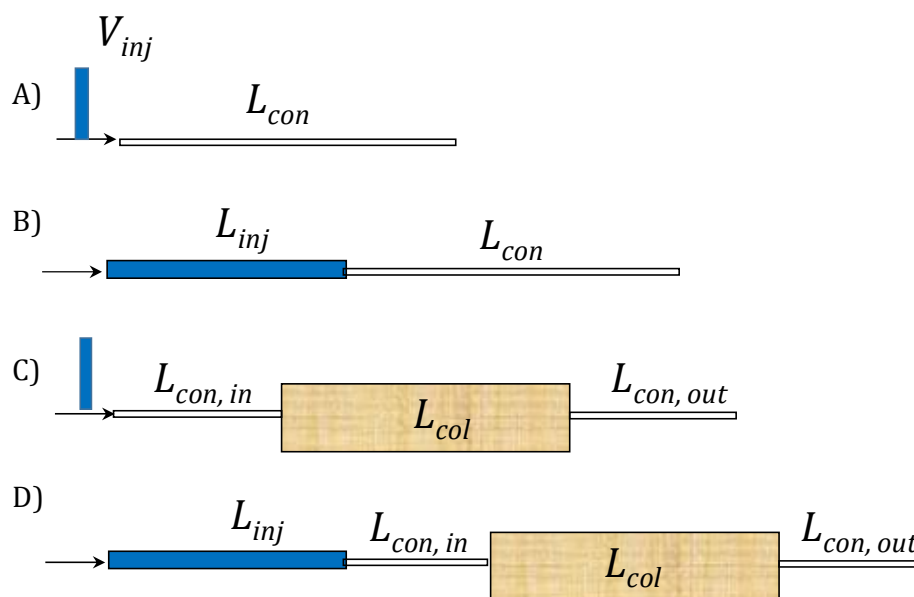
9.4 Podsumowanie

Wybór odpowiedniego złoża, które jest integralną częścią układu chromatograficznego podczas oczyszczania leków biologicznych, jest jednym z trudniejszych etapów procesu. Zaproponowana metoda pozwala na szybkie badania przesiewowe dużej ilości złożów, przy ich małym zużyciu oraz przy niskim zapotrzebowaniu na badane białko, wykorzystana może być do szybkiej charakteryzacji nawet kilkudziesięciu próbek białka zaadsorbowanego na złożu w czasie jednej godziny. Ponadto metodę można wykorzystać do szybkiej analizy kandydatów na leki biologiczne, ze względu na możliwość oceny ich stabilności na złożach do chromatografii jonowymiennej. Stwierdzono, że spadek temperatury topnienia przeciwciężła poniżej wartości krytycznej (ok. 30°C) jest kryterium określającym niską stabilność jego struktury na wybranej żywicy.

10. Wpływ obecności przestrzeni martwych w układach chromatograficznych na przebieg elucji [18,19]

10.1 Uproszczona geometria układu

W celu określenia wpływu ECV na elucję w układzie chromatograficznym wykonano szereg doświadczeń dla różnych konfiguracji układu zaprezentowanych na rys.14. W konfiguracji A i B kolumnę zastąpiono łącznikiem o „zerowej” długości, a eksperymenty przeprowadzono przy różnych prędkościach fazy ruchomej stosując dwa układy dozujące: pętlę kapilarną o różnych objętościach oraz pętlę superloop. Geometrię układu z podłączoną kolumną przedstawiono w konfiguracji C i D. Drogi przepływu próbki wprowadzanej do układu chromatograficznego, gdzie $L_{con,in}$ i $L_{con,out}$ oznaczają odpowiednio długość kapilar przed i za kolumną ($L_{con,in} + L_{con,out} = L_{con}$) przedstawiono na rys.14. Analizowano retencję białek: lizozymu z białka jaja kurzego, albuminy surowicy bydlęcej BSA oraz przeciwciała monoklonalnego IgG₁ w przestrzeniach pozakolumnowych i porównano ww. profile z profilami: związku małocząsteczkowego (acetonu) oraz wielocząsteczkowego (dekstranu).



Rys.14. Ilustracja drogi przepływu dla różnych konfiguracji układu chromatograficznego.
A) Układ bez kolumny z prostokątnym impulsem wlotowym (mała pętla kapilarna i superloop);
B) układ bez kolumny z dużą pętlą kapilarną, która jest początkowo wypełniona próbka, pozostałe części układu są wolne od substancji rozpuszczonej; C) układ jak w A), ale z kolumną
D) układ jak w B), ale z kolumną.

10.2 Model przepływu w przestrzeniach martwych

W celu opisu retencji białek w ECV zastosowano uproszczony model matematyczny, w którym przyjęto rozkład prędkości odpowiadający przepływowi laminarnemu w układzie kapilarnym [104,106,107]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + u(r) \frac{\partial C}{\partial x} = D \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial C}{\partial r} r \right) + D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (4)$$

$$u(r) = 2u_0 \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (5)$$

gdzie: C – lokalne stężenie substancji w fazie ruchomej mg mL^{-1} , u , u_0 – prędkość liniowa i średnia prędkość liniowa w osi kapilary m s^{-1} , r , x , t – odpowiednio współrzędna promieniowa, osiowa i czas, R – promień kapilary, D – współczynnik dyfuzji molekularnej substancji rozpuszczonej $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Powyższe równania poprawnie opisywały profile stężenia, gdy suma długości kapilar (L) była mniejsza od tzw. długości krytycznej (L_{crit}) wyrażonej zależnością [108]:

$$L_{crit} = \frac{u_0 r^2}{4D} \quad (6)$$

Jeżeli wartości długości kapilar były na tyle duże, że przekraczały wartość krytyczną, do opisu procesu niezbędne było uwzględnienie zjawiska dyspersji poprzez zastosowanie równania Ficka, w którym substancja rozpuszczona w fazie ruchomej jest transportowana ze średnią prędkością przepływu, u_0 :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + u_0 \frac{\partial C}{\partial x} = D_{app} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (7)$$

gdzie pozorny współczynnik dyspersji (D_{app}) można obliczyć w następujący sposób [108,109]:

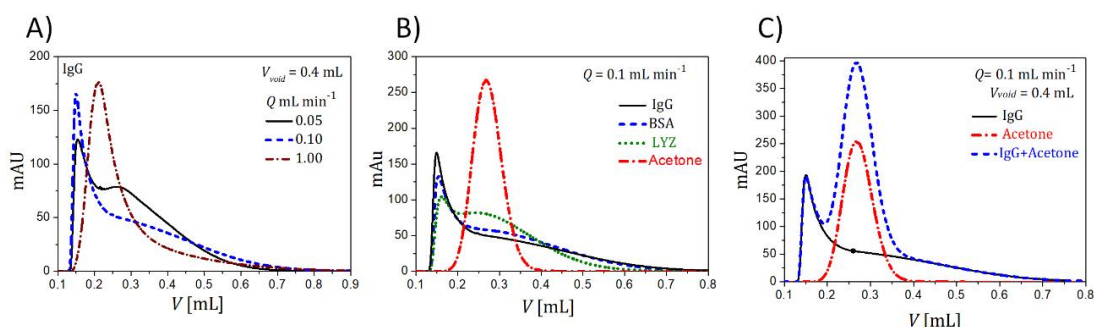
$$D_{app} = D + \frac{u_0^2 r^2}{\kappa D} \quad (8)$$

W równaniu (8) κ jest parametrem uwzględniającym geometrię kapilary i przepływu, a w przypadku przepływu laminarnego w rurze prostej κ wynosi 48 [108,109].

10.3 Deformacje profili stężenia przy małych objętościach iniekcji

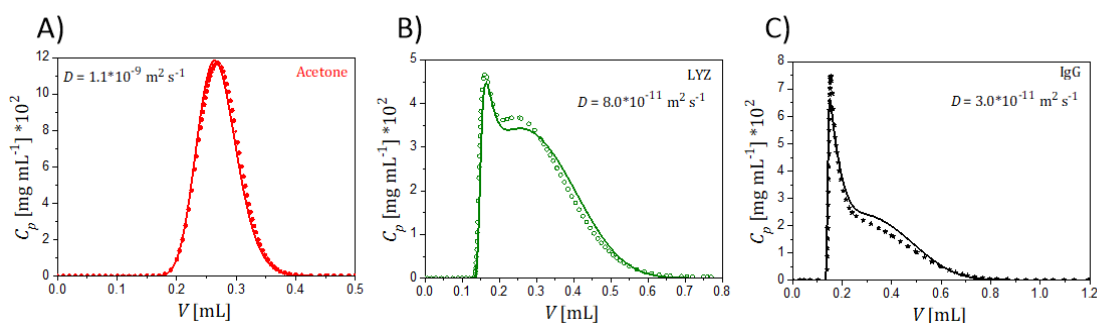
Roztwory pojedynczych związków modelowych lub ich mieszanin w fazie ruchomej wprowadzono do układu bez podpiętej kolumny, co przedstawiono schematycznie na rys.14.A. Zaobserwowano silne odkształcenie i ogonowanie pików IgG₁, które zwiększa się wraz ze spadkiem natężenia przepływu fazy ruchomej (rys.15A). Podobny trend zaobserwowano w przypadku pozostałych białek modelowych (rys.15B). W przypadku

acetonu pik zachował kształt Gaussa, co świadczy o tym, że dla związku o małej masie cząsteczkowej występuje równomierny rozkład stężenia w kierunku promieniowym. Duże różnice w przebiegu elucji występują również w przypadku roztworów wieloskładnikowych (rys.15C). Podczas iniekcji mieszaniny IgG₁ i acetonu zaobserwowano dwa profile stężenia: jako pierwszy eluowany był front stężenia IgG₁, natomiast drugi pochodził od acetonu. Ponadto można było zaobserwować ogonowanie charakterystyczne dla pików IgG₁. Opisane eksperymenty pozwalają na stwierdzenie, że związki małowagowe nie są odpowiednie do badania efektu ECV w chromatografii białek.



Rys.15. Ilustracja deformacji profili stężenia w ECV. A) Profile IgG₁ zarejestrowane dla różnych szybkości przepływu fazy ruchomej; B) porównanie profili IgG₁, BSA, LYZ i acetonu przy tym samym natężeniu przepływu; C) elucja mieszaniny dwuskładnikowej.

Do matematycznego opisu przebiegu elucji w ECV zaproponowano model matematyczny (rozd.10.2), w którym estymowano wartość współczynnika dyfuzji D m² s⁻¹. Otrzymana w ten sposób wartość współczynnika dyfuzji dla danego związku była zbliżona do wartości literaturowych [4]. Wyniki otrzymanych symulacji i eksperymentów porównano na rys.16.

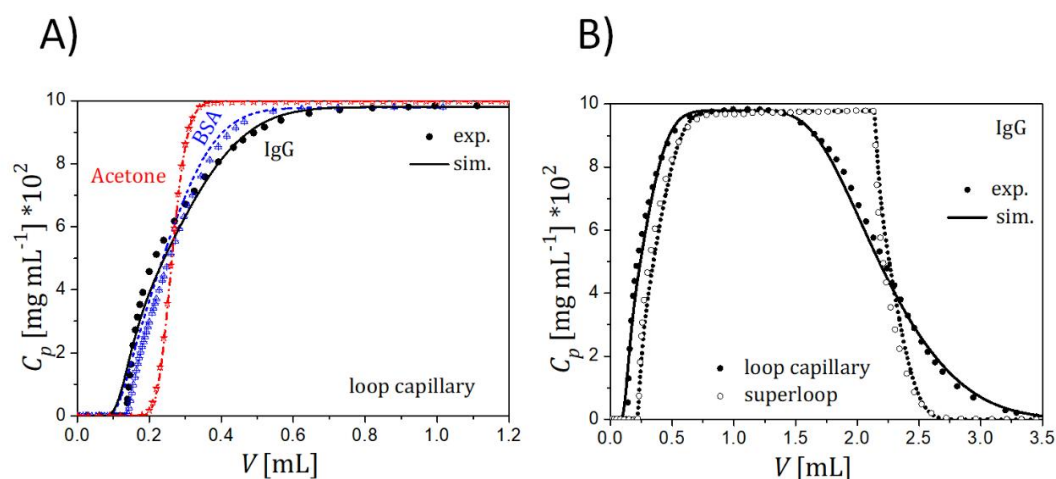


Rys.16. Porównanie doświadczalnych profili stężeń i symulacji modelu dla różnych związków. We wszystkich przypadkach natężenie przepływu było równe 0.1 mL min⁻¹ (symbole- wyniki eksperymentalne, linie-symulacje)

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że deformacja i ogonowanie piku intensyfikuje się wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej chromatografowanego związku i zmniejszaniem się wartości współczynnika dyfuzji.

10.4 Deformacje profili stężenia przy dużych objętościach iniekcji

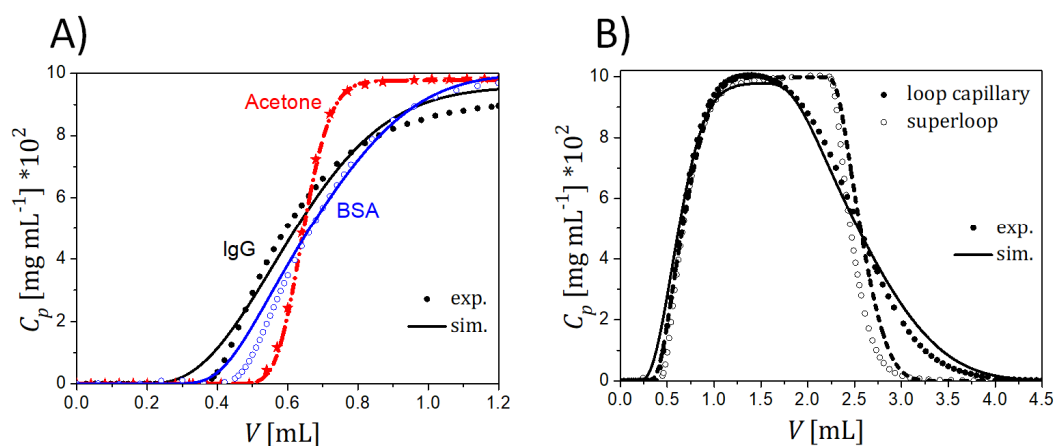
Iniekcje próbek o dużej objętości wykonano za pomocą pętli kapilarnych (rys.14.B) oraz przy pomocy kolumny typu superloop (rys.14.A). W przypadku modelowania przepływu w kapilarach łączących oraz superloop, gdzie $L < L_{crit}$ korzystano z równań (4) i (5), natomiast w przypadku modelowania w pętlach kapilarnych o dużej długości, gdzie $L > L_{crit}$, korzystano z równania (7) i (8). Porównanie danych eksperymentalnych i symulacji przedstawiono na rys.17. Części wstępujące profile związków modelowych charakteryzowały się silną asymetrią (rys.17a) wynikającą, podobnie jak w przypadku iniekcji o małych objętościach, z nierównomiernego rozkładu prędkości w kierunku promieniowym i powolnej dyfuzji makrocząsteczek. Porównując profile stężenia dla próbki wprowadzonej do układu za pomocą pętli kapilarnej oraz superloop (rys.17b) nie widać znaczących różnic, ponieważ droga jaką pokonały próbki była taka sama. Ze względu na znaczącą długość pętli kapilarnych zbocze dyfuzyjne piku charakteryzuje się silnym ogonowaniem, powstającym w wyniku dyspersji próbki w tylnej części wypełnionej kapilary, gdzie cząsteczki zawarte w próbce przebyły znacznie dłuższą drogę niż w przypadku pętli superloop.



Rys.17. Profile stężeń w ECV dla iniekcji o dużej objętości (2 mL). A) Fronty krzywych wyjścia dla białek i acetonu – iniekcje przez pętlę kapilarną; B) porównanie profili IgG₁ przy iniekcji przez pętlę kapilarną i superloop, (symbole- wyniki eksperymentalne, linie-symulacje)

Analogiczne eksperymenty (rys.18) wykonano również w obecności kolumny w układzie chromatograficznym (rys.14.C,D), która była wypełniona inertnym złożem (niewykazującym adsorpcji badanych związków).

W celu symulacji przepływu próbki układ podzielono na 3 części: objętości (ECV1) przed kolumną, samą kolumnę oraz objętości za kolumną (ECV2) (suma objętości pozakolumnowych $ECV = ECV1 + ECV2$). Zastosowano równania (7) i (8), w których estymowano współczynnik dyspersji w kolumnie. Gdy suma długości kapilar (L_{con}) nie przekraczała wartości krytycznej, uzyskane efekty były addytywne.



Rys.18. Profile stężeń na wylocie kolumny dla iniekcji próbki o dużej objętości (2 mL). A) Krzywe wyjścia IgG₁, BSA i acetonu dla iniekcji przez pętlę kapilarną; B) porównanie kształtów profili stężenia IgG₁ dla iniekcji przez pętlę kapilarną i superloop, (symbole- wyniki eksperymentalne, linie-symulacje).

Kształty krzywych wyjścia (rys.18A) charakteryzują się silną asymetrią, co mogłoby sugerować, że na złożu zachodzi adsorpcja, mimo iż było ono inertne. Jednak efekt ten wynikał wyłącznie z wpływu ECV, co zostało potwierdzone symulacjami. Podobnie jak w przypadku układu bez kolumny, kształt frontu stężenia nie zależał od zastosowanej metody iniekcji (rys.18B). W przypadku zastosowania pętli superloop ogonowanie piku było znacząco ograniczone w porównaniu do pętli kapilarnej, co potwierdza predykcje numeryczne.

Wyżej przedstawione model właściwie opisywał retencję w układzie chromatograficznym dla niskich natężeń przepływu fazy ruchomej, natomiast do modelowania elucji przy wyższych wartościach natężeń przepływu symulacje odbiegały od danych eksperymentalnych, dlatego konieczne było wykorzystanie metody numerycznej mechaniki płynów CFD (rozd.10.5).

10.5 Modelowanie CFD

W celu uwzględnienia wpływu geometrii ECV na retencję i kształt profili stężenia związków o różnych masach cząsteczkowych zastosowano metodę CFD [19]. Oprócz uwzględnienia zmian w długościach i średnicach kapilar łączących elementy układu, uwzględniono krzywiznę drogi przepływu. Dodatkowe zaburzenia trajektorii przepływu zaobserwowano w elementach składowych układu chromatograficznego (np. połączeniach kapilar i celce detektora). W przypadku acetonu, skrócenie czasu przebywania w kapilarze przyczyniło się do poszerzenia piku, a zwiększenie prędkości przepływu pogorszyło jego symetrię. W przypadku makromolekuł, zaburzenia na drodze przepływu przyspieszały transport masy, co poprawiało symetrię piku, niezależnie od wielkości wprowadzonej próbki. Ponadto zwiększenie krętości drogi przepływu wpływa na tworzenie się tzw. wirów Deana, które łagodzą efekty wynikające z powolnej dyfuzji. Szczegółowy opis badań przedstawiono w publikacji [19].

10.6 Podsumowanie

W tej części pracy eksperymentalnie i teoretycznie przeanalizowano zjawisko zmiany kształtu pików chromatograficznych w przestrzeniach pozakolumnowych (ECV). Obserwowany efekt deformacji profili stężenia wynikał z nierównomiernego rozkładu prędkości promieniowej w kapilarach układu i powolnej dyfuzji makrocząsteczek. W przypadku związków małych cząsteczkowych mechanizm retencji zależał głównie od dyspersji osiowej, dlatego też nie zaobserwowano deformacji pików.

W przypadku makrocząsteczek efekt ECV jest na tyle istotny, iż może wpływać na błędną interpretację otrzymanych wyników przy projektowaniu procesu chromatografii. Zastosowany model matematyczny efektywnie odwzorował kształt profili stężenia w stosunkowo szerokim zakresie parametrów operacyjnych, dzięki czemu może on posłużyć do określania efektu ECV. Uwzględnienie tego efektu może być niezbędne w procesach projektowania chromatografii białek i przeniesienia skali procesu z laboratoryjnej na przemysłową.

11. Rozdzielanie wariantów ładunku przeciwciał monoklonalnych [20]

11.1 Koncepcja przebiegu procesu chromatografii

Przeprowadzono przesiewowe badania rozdzielania wariantów przeciwciał monoklonalnych, w których badano różne gradienty pH i stężenia soli. We wszystkich przypadkach selektywność rozdzielania była bardzo niska, dlatego opracowano technikę, w której wykorzystano dodatkowo efekty kinetyczne. Technika polegała na wprowadzeniu dużej, porównywalnej z pojemnością chłonną masy białka. Część białka eluowała w czasie martwym kolumny jako frakcja przepływowa, a jej zawartość była wzbogacona w białko wiążące się najsłabiej. Frakcję związaną, zawierającą białko zaadsorbowane za złożu, eluowano przy użyciu skokowego gradientu pH, który w przeciwieństwie do gradientu soli nie generuje dodatkowych etapów usuwania jej jonów z roztworu.

Do badań użyto dwa silne wymiennicze jonowe wykorzystywane wcześniej do badania agregacji: kationit - TP GigaCap (tab.1) i anionit - Poros XQ (tab.2). Całkowite rozdzielanie wariantów było niemożliwe ze względu na zbliżone właściwości retencyjne, udało się jedynie zebrać frakcje wzbogacone o daną izoformę IgG₁.

Tab. 2. Parametry złoża AEX wykorzystanego w eksperymentach (na podstawie danych producenta)

Nazwa złoża	POROS™ XQ
Skrót	POROS
Typ	AEX
Grupa funkcyjna	Czwartorzędowa amina
Matryca	Usieciowany polistyrenodivinylobenzen
Rozmiar ziaren [μm]	50

Do badań skorzystano z materiałów zawierających IgG₁ o różnej zawartości wariantów *av* (tab.3). Zastosowano materiał o niskiej (L-*av*), średniej (M-*av*) i wysokiej (H-*av*) zawartości kwasowych wariantów *av* przeciwciała monoklonalnego IgG₁.

Tab. 3. Zawartość poszczególnych izoform w badanych materiałach

Materiał	Warianty kwasowe (<i>av</i>)	Warianty obojętne (<i>mv</i>)	Warianty zasadowe (<i>bv</i>)
	%		
L- <i>av</i>	24	52	24
M- <i>av</i>	45	40	15
H- <i>av</i>	61	35	4

11.2 Równowaga adsorpcyjna

Zaprojektowanie procesu chromatografii wymagało określenia własności adsorpcyjnych materiałów białkowych. W tym celu wyznaczono izotermy adsorpcji, a do ich opisu wykorzystano równanie kinetyczno-reakcyjne (dla trzech adsorbujących się składników) oparte na modelu izotermy stechiometrycznej (rozdz. 7):

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{d,i} \left[K_{app,i} C_i (q_i^\infty - \sigma_{app,ii} q_i - \sum_{j \neq i}^2 \sigma_{app,ij} q_j) - q_i \right] \quad (9)$$

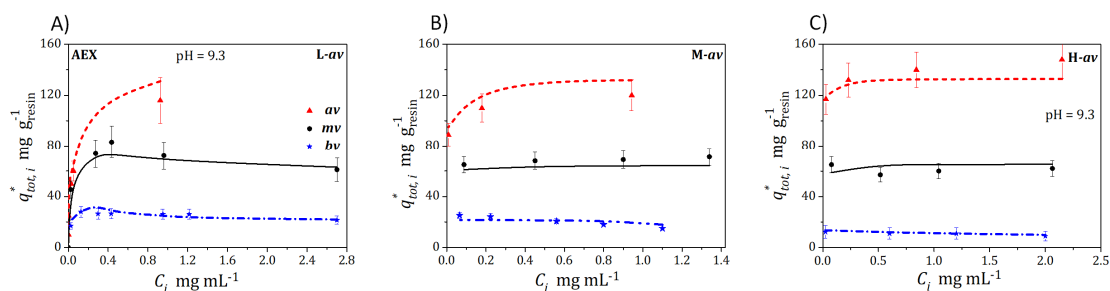
gdzie: C_i – stężenie odpowiedniego wariantu w fazie ruchomej mg mL^{-1} , q_i – indywidualna pojemność chłonna wariantu po adsorpcji $\text{mg mL}_{\text{złóża}}^{-1}$, q_i^∞ – całkowita pojemność chłonna złoża $\text{mg mL}_{\text{złóża}}^{-1}$, $\sigma_{app,ij}$ – znormalizowany współczynnik ekranowania, k_d – współczynnik przenikania masy, $K_{app,i}$ – znormalizowana stała równowagi danego wariantu.

Parametry modelu wyznaczono dla stanu ustalonego w równaniu kinetyczno – reakcyjnym (9). W przypadku, gdy wartości wszystkich współczynników ekranowania dla wariantów wynoszą 1, równanie (9) w stanie ustalonym przekształca się w konkurencyjną izotermę Langmuira. Gdy znormalizowany współczynnik ekranowania jest wartością większą od jedności, zaobserwować można ujemne odchylenia do izotermy Langmuira, odpowiadające za redukcję miejsc wiązania w wyniku konkurencji poszczególnych wariantów, gdzie warianty o silniejszym powinowactwie wypierają te, które charakteryzują się niższą zdolnością wiązania. W przeciwnym razie (gdy $\sigma_{app,ij} < 1$) występuje dodatnie odchylenie od izotermy Langmuira, zwane dodatnią adsorpcją kooperatywną, która wynika z przyciągania cząsteczek białek i skutkuje wzmocnieniem adsorpcji [100,110,111].

W przypadku CEX, pomimo różnic w zawartościach poszczególnych wariantów ładunkowych w materiałach wyjściowych (L-*av*, M-*av* i H-*av*), przebieg izoterm dla poszczególnych wariantów był bardzo zbliżony (tj. w granicach błędów eksperymentalnych). Ze względu na brak wystarczającej selektywności w adsorpcji

wariantów, współczynniki izoterm w równaniu (9) uśredniono i stosowano dla wszystkich izoform.

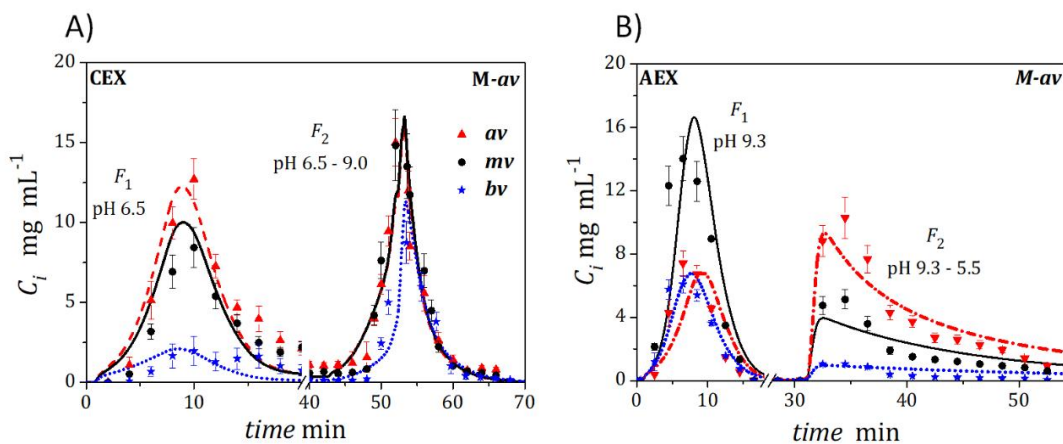
Izotermie adsorpcji dla różnych materiałów wyjściowych uzyskane przy użyciu AEX dla poszczególnych wariantów charakteryzowały się większymi różnicami (rys.19). Najsilniejszą adsorpcję zaobserwowano w przypadku materiału o dużej zawartości frakcji kwasowej (H-*av*) co jest zbieżne z wartością punktu izoelektrycznego i kolejnością elucji wariantów na złożach anionowymiennych. W tym przypadku w równaniu (9) zastosowano współczynniki izoterm charakterystyczne dla danej izoformy IgG₁.



Rys.19. Izotermie adsorpcji poszczególnych materiałów IgG₁ na AEX , A) L-*av*, B) M-*av*, C) H-*av*.

11.3 Rozdzielanie preparatywne

Po przeanalizowaniu przebiegu izoterm adsorpcji dobrano poziom wyjściowy stężenia białka i przeprowadzono jego elucję z kolumny, w wyniku czego otrzymano dwie główne frakcje. Skład każdej z frakcji zbadano przy użyciu analitycznej chromatografii jonowymiennej i określono zawartość poszczególnych wariantów. Frakcja pierwsza wzbogacona była o warianty kwasowe (*av*) w przypadku CEX, natomiast w przypadku AEX o warianty zasadowe (*bv*), z kolei druga frakcja wzbogacona była o warianty o przeciwnym ładunku (rys.20).



Rys.20. Profile stężeń frakcji *M-av* przeciwciała przy przepływie fazy ruchomej 0.5 mL min^{-1} , objętość iniekcji 5 mL , a) złożo CEX, stężenie wlotowe białka 44 mg mL^{-1} , b) złożo AEX, stężenie wlotowe białka 40 mg mL^{-1} (symbole- wyniki eksperymentalne, linie-symulacje)

Do symulacji przebiegu elucji zastosowano model matematyczny uwzględniający równanie (9), a parametry modelu wyznaczono na podstawie równań przebiegu izoterm adsorpcji oraz z estymacji eksperymentalnych profili stężenia (tab.4).

Tab. 4. Parametry modelu wyznaczone w warunkach adsorpcji (* - uśrednione wartości uzyskane z izoterm, ** - wartości wyznaczone na podstawie eksperymentów na kolumnie)

Złożo	q_{av}^{∞}	q_{mv}^{∞}	q_{bv}^{∞}	K_{av}	K_{mv}	K_{bv}	σ_{app}	k_{av} $\times 10^5$	k_{mv} $\times 10^5$	k_{bv} $\times 10^5$
CEX										
Izoterma	122*	122*	122*	5.1*	5.1*	5.1*				
Estymacja do profilu stężenia	156**	161**	170**	5.1*	5.1*	5.1*	0.30**	11.1**	10.1**	8.54**
AEX										
Izoterma	146*	90.0*	57.5*	312*	78.9*	34.8*	0.17*			
Estymacja do profilu stężenia	175**	108**	46**	312*	78.9*	34.8*	0.17*	0.148**	1.33**	4.04**

Zastosowany model dynamiki zweryfikowano poprzez porównanie symulacji z danymi eksperymentalnymi przy zmiennych warunkach ładowania (zakres stężenia białka, natężenie przepływu fazy ruchomej). Symulacje modelu nie były idealnie zgodne z danymi doświadczalnymi, jednak w sposób zadowalający odzwierciedlały tendencje w badanym procesie. Skład otrzymanych frakcji i wydajność (masa białka we frakcji badanej do masy wprowadzonej do układu) przedstawiają tab. 5 i 6.

W przypadku CEX (tab.5), gdy zastosowano materiał *M-av* we frakcji pierwszej F_1 , materiał wzbogacił się nieznacznie o warianty kwasowe, natomiast materiał pochodzący

z frakcji F_2 zawierał mniej av przy ponad dwukrotnym zwiększeniu zawartości bv . Lepszy rozdział uzyskano w materiale H- av , gdzie zawartość av w materiale wyjściowym była większa. Frakcja F_2 otrzymana z materiału H- av może zostać zawrócona i poddana kolejnemu procesowi doczyszczania.

Tab. 5. Skład poszczególnych frakcji przy zastosowaniu CEX

		M- av				H- av			
		av	mv	bv	Y [%]	av	mv	bv	Y [%]
Skład materiału		42	46	11		60	37	3.0	
F_1	Eksperyment	49	40	11	58	69	29	2.0	51
	Symulacja	52	40	8.0	41	74	25	1.0	45
F_2	Eksperyment	36	40	23	42	48	46	5.0	49
	Symulacja	36	40	24	59	47	47	6.0	55

Znacznie lepszą selektywność rozdzielania uzyskano przy zastosowaniu złoża do chromatografii anionowymiennej (tab.6). Po zebraniu frakcji F_1 z materiału M- av otrzymuje się zawartość av mniejszą niż 25 %, co pozwala na użycie materiału jako leku biologicznego. Frakcja F_2 oraz frakcje powstałe z materiału o wyższym zakresie stężenia av w materiale wyjściowym mogą być zawrócone zarówno na kolumnę CEX jak i AEX w celu optymalizacji zawartości poszczególnych izoform.

Tab. 6. Skład poszczególnych frakcji przy zastosowaniu AEX

		M- av				H- av			
		av	mv	bv	Y [%]	av	mv	bv	Y [%]
Skład materiału		43.44	39.56	17.00		60.01	36.48	3.51	
F_1	Eksperyment	24	52	23	64	47	48	5.0	51
	Symulacja	24	56	20	56	49	47	4.0	50
F_2	Eksperyment	62	30	8.0	36	70	27	3.0	49
	Symulacja	60	30	10	44	70	26	4.0	50

Ze względu na fakt, iż w każdym etapie zbierane były wyłącznie dwie frakcje, proces rozdzielania i zawracania frakcji znacznie się upraszczał. Zastosowanie wyłącznie gradientu pH fazy ruchomej oraz prostota i szybkość rozdzielania powodują, że przedstawiona metoda posiada potencjał wdrożeniowy w przemyśle biofarmaceutycznym.

11.4 Podsumowanie

W pracy zaproponowano metodę regulacji zawartości poszczególnych wariantów przeciwciał monoklonalnych na złożach do chromatografii kationo- i anionowymiennej. Kolumny chromatograficzne pracowały w warunkach przeładowania masowego, a dzięki zastosowaniu gradientu pH otrzymano dwie główne frakcje, które różniły się znacząco zawartością poszczególnych izoform. Metoda może znaleźć zastosowanie przy regulacji zawartości wariantów leków biologicznych nawet po jednoetapowym rozdziale (w przypadku AEX), a poprzez zawrócenie materiału o niezadawalającym składzie na kolumnę można znacząco zwiększyć wydajność procesu nawet do 70-80 %. Badania eksperymentalne porównano z symulacjami wykonanymi przy użyciu odpowiedniego modelu matematycznego. Zastosowana metoda szybkiej i wydajnej zmiany składu wariantów ładunku przeciwciał monoklonalnych może zostać wykorzystana w przemyśle biofarmaceutycznym, również do białek o innych właściwościach kinetycznych i termodynamicznych.

Wnioski ogólne z pracy

W ramach pracy zaproponowano metodę regulacji zawartości wariantów przeciwciał monoklonalnych do wymaganego poziomu. Badania przeprowadzono w kilku etapach, w ramach których opracowano metodę przesiewowego badania stabilności przeciwciał na złożach IEX oraz określono wpływ przestrzeni pozakolumnowych na kształty pików w układzie chromatograficznym. Sformułowano następujące wnioski:

- Stabilność przeciwciał monoklonalnych w procesie ich oczyszczania jest zależna od zastosowanego złoża chromatograficznego, a spadek temperatury topnienia zaadsorbowanego białka poniżej 30°C świadczy o jego niskiej stabilności na danym złożu. Metoda różnicowej fluorymetrii skaningowej (DSF) z wykorzystaniem sprzętu do RT-PCR pozwala na szybką i wysokowydajną ocenę stabilności przeciwciał monoklonalnych w trakcie adsorpcji na złożach chromatograficznych.
- Zastosowanie mini-kolumn chromatograficznych generuje deformację profili stężenia z powodu dużej objętości przestrzeni pozakolumnowych w stosunku do objętości samych kolumn. Może to powodować błędną interpretację otrzymanych wyników w postaci zdeformowanych profili stężenia. Powyższy efekt wynika z nierównomiernego rozkładu prędkości promieniowej w kapilarach i niskiej dyfuzyjności makrocząsteczek białka. Opracowano uproszczony model matematyczny, jednak dla niektórych warunków operacyjnych opis hydrodynamiki wymagał zastosowania CFD.
- Metoda regulacji zawartości wariantów przeciwciał monoklonalnych w warunkach przeładowania kolumny i przy zastosowaniu jednostopniowego gradientu pH, pozwala na zwiększenie wydajności i produktywności rozdzielania w porównaniu z tradycyjną metodą liniowego gradientu pH przy niskim przeładowaniu kolumny. Metoda umożliwia regulację zawartości wariantów kwasowych av w materiałach zawierających przeciwciała monoklonalne, co pozwala na wykorzystanie ich jako leki.

Opublikowane w ramach rozprawy wyniki w postaci publikacji [17-20] pozwalają na optymalizację i redukcję kosztów procesu oczyszczania przeciwciał monoklonalnych, a zaproponowane metody mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle biofarmaceutycznym.

Spis rysunków

Rys.1. Uproszczony schemat produkcji biofarmaceutyków (na podstawie [26]).....	14
Rys.2. Budowa przeciwciała (na podstawie [28]).....	15
Rys.3 Przykładowy schemat technologiczny procesu produkcji przeciwciał monoklonalnych (na podstawie [29]).	16
Rys.4. Schemat przedstawiający adsorpcję i efekt ekranowania na złożach do chromatografii jonowymiennej (na podstawie [4]).	21
Rys.5. Uproszczony schemat agregacji białek.	22
Rys.6. Przykładowe modyfikacje cząsteczki IgG (na podstawie [7]).....	24
Rys.7. Stężenie IgG ₁ w fazie zaadsorbowanej (q mg białka mg złoża – 1) na wybranych złożach chromatograficznych.....	30
Rys.8. Straty masy białek na złożach (masa białka niezdesorbowanego ze złoża w stosunku do masy wprowadzonej).	31
Rys.9. Wpływ czasu inkubacji oraz typu desorbentu na straty masy.	32
Rys.11. Zależność temperatur topnienia dla różnych stężeń zaadsorbowanego białka na złożu TP GigaCap w pH 4,5 (A) oraz pH 5,5(B); C_p – stężenie białka w roztworze wyjściowym.....	35
Rys.12. Zależność temperatur topnienia dla różnych stężeń zaadsorbowanego białka na złożu S ImpAct w pH 4.5 (A) oraz pH 5,5(B); C_p – stężenie białka w roztworze wyjściowym.....	35
Rys.13. Zależność temperatur topnienia dla różnych stężeń zaadsorbowanego białka na złożu TP Sulfate w pH 4.5 (A) oraz pH 5.5(B); C_p – stężenie białka w roztworze wyjściowym.....	35
Rys.14. Ilustracja drogi przepływu dla różnych konfiguracji układu chromatograficznego. A) Układ bez kolumny z prostokątnym impulsem wlotowym (mała pętla kapilarna i superloop); B) układ bez kolumny z dużą pętlą kapilarną, która jest początkowo wypełniona próbką, pozostałe części układu są wolne od substancji rozpuszczonej; C) układ jak w A), ale z kolumną D) układ jak w B), ale z kolumną.	37
Rys.15. Ilustracja deformacji profili stężenia w ECV. A) Profile IgG ₁ zarejestrowane dla różnych szybkości przepływu fazy ruchomej; B) porównanie profili IgG ₁ , BSA, LYZ i acetonu przy tym samym natężeniu przepływu; C) elucja mieszaniny dwuskładnikowej.	39
Rys.16. Porównanie doświadczalnych profili stężeń i symulacji modelu dla różnych związków. We wszystkich przypadkach natężenie przepływu było równe 0.1 mL min ⁻¹ ; punkty - dane eksperymentalne, linie – symulacje.....	39
Rys.17. Profile stężeń w ECV dla iniekcji o dużej objętości (2 mL). A) Fronty krzywych wyjścia dla białek i acetonu – iniekcje przez pętlę kapilarną; B) porównanie profili IgG ₁ przy iniekcji przez pętlę kapilarną i superloop.....	40

Rys.18. Profile stężeń na wylocie kolumny dla iniekcji próbki o dużej objętości (2 mL). A) Krzywe wyjścia IgG ₁ dla iniekcji przez pętlę kapilarną; B) porównanie kształtów profili stężenia IgG ₁ dla iniekcji przez pętlę kapilarną i superloop.....	41
Rys.19. Izotermy adsorpcji poszczególnych materiałów IgG ₁ na AEX, A) L-av, B) M-av, C) H-av.....	45
Rys.20. Profile stężeń frakcji M-av przeciwciała przy przepływie fazy ruchomej 0.5 mL min ⁻¹ , objętość iniekcji 5 mL, a) złożo CEX, stężenie wlotowe białka 44 mg mL ⁻¹ b) złożo AEX, stężenie wlotowe białka 40 mg mL ⁻¹ (symbole- wyniki eksperymentalne, linie-symulacje).....	46

Spis tabel

Tab. 1. Parametry źróz CEX wykorzystanych do badań (na podstawie danych producenta lub * na podstawie [105]).....	30
Tab. 2. Parametry złoża AEX wykorzystanego w eksperymentach (na podstawie danych producenta).....	43
Tab. 3. Zawartość poszczególnych izoform w badanych materiałach.....	44
Tab. 4. Parametry modelu wyznaczone w warunkach adsorpcji (* - uśrednione wartości uzyskane z izoterm, ** - wartości wyznaczone na podstawie eksperymentów na kolumnie).....	46
Tab. 5. Skład poszczególnych frakcji przy zastosowaniu CEX.....	47
Tab. 6. Skład poszczególnych frakcji przy zastosowaniu AEX.....	47

Literatura

- [1] Gangon P., Technology trends in antibody purification. *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 57-70. DOI:10.1016/j.chroma.2011.10.034.
- [2] Global Monoclonal Antibodies Market 2018-2022, <https://www.technavio.com/report/global-monoclonal-antibodies-market-analysis-share> (dostęp dnia 15.03.2022).
- [3] Gronemeyer, P.; Ditz, R.; Strube, J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* 1 (4) (2014) 188–212. DOI: 10.3390/bioengineering1040188.
- [4] Carta G., Jungbauer A. Protein Chromatography. Process Development and Scale Up, Wiley, Weinheim, 2010.
- [5] Sadeghalvad M., Rezaei N., Introduction on Monoclonal Antibodies, *In book: Monclonal Antibodies Publisher: IntechOpen* (2021). DOI:10.5772/intechopen.98378
- [6] Tripathi N. K., Shrivastava A., Recent developments in recombinant protein production, *Front Bioeng. Biotechnol* 7 (2019) 420. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00420.
- [7] Chung S., Tian J., Tan Z., Chen J., Lee J., Borys M., Li Z. J., Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles. *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 1646-1665. DOI: 10.1002/bit.26587.
- [8] Hintersteiner B., Lingg N., Janzek E., Mutschlechner O., Loibner H., Jungbauer A., 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] Hintersteiner B., Lingg N., Zhang P., Woen S., Hoi K. M., Stranner S., Wiederkum S., Mutschlechner O., Schuster M., Loibner H., Jungbauer A., Charge heterogeneity: Basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors, *mAbs* 8 (2016) 1548 – 1560. DOI: 10.1080/19420862.2016.1225642
- [10] Boswell C. A., Tesar D. B., Mukhyala K., Theil F. P., Fielder P. J., Khawli L. A., Effects of Charge on Antibody Tissue Distribution and Pharmacokinetics, *Bioconjugate Chem.* 21 (2010) 2153 – 2163. DOI: 10.1021/bc100261d
- [11] Harris R. J., Shire S. J., Winter C., Commercial Manufacturing Scale Formulation and Analytical Characterization of Therapeutic Recombinant Antibodies, *Drug Dev. Res.* 61 (2004) 137 – 154. DOI: 10.1002/ddr.10344
- [12] Jiang G., Yu Ch., Yadav D. B., Hu Z., Amurao A., Duenas E., Wong M., Iverson M., Zheng K., Lam X., Chen J., Vega R., Ulufatu S., Leddy C., Davis H., Shen A., Wong P. Y., Harris R.,

Wang Y. J., Li D., Evaluation of Heavy-Chain C-Terminal Deletion on Product Quality and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* 105 (7) (2016) 2066-2072. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.04.027.

[13] Zhao Y. Y., Wang N., Liu W. H., Tao W. J., Liu L. L. Shen Z. D., Charge Variants of an Avastin Biosimilar Isolation, Characterization, In Vitro Properties and Pharmacokinetics in Rat. *PLoS. One* 11 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0151874.

[14] Chhatre S., Titchener-Hooker N., Review: Microscale methods for high-throughput chromatography development in the pharmaceutical industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84 (2009) 927-940. DOI: 10.1002/jctb.2125.

[15] Dose E.V., Guiochon G., Effects of extra column convolution on preparative chromatographic peak shapes. *Anal. Chem. Div.* 62 (1990) 1723–1730.

[16] Grinias J. P., Bunner B., Gilar M., Jorgenson J. W., Measurement and modeling of extra-column effects due to injection and connections in capillary liquid chromatography. *Chromatography*, 2 (2015) 669–690. DOI: 10.3390/chromatography2040669.

[17] Stańczak A., Baran K., Antos D., A high-throughput method for fast detecting unfolding of monoclonal antibodies on cation exchange resins. *J. Chromatogr. A* 1643 (2020) 461688. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461688.

[18] Baran K., Marek W.K., Piątkowski W., Antos D., Effect of flow behavior in extra-column volumes on the retention pattern of proteins in a small column. *J. Chromatogr. A* 1598 (2019) 154-162. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.03.060.

[19] Filip B., Bochenek R., Baran K., Strzałka D., Antos D., Influence of the geometry of extra column volumes on band broadening in a chromatographic system. Predictions by computational fluid dynamics. *J. Chromatogr. A* 1653 (2021) 154-162. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462410.

[20] Baran K., Zimoch P., Stańczak A., Piątkowski W., Antos D., 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.

[21] Murray R. K., Granner D. K., Rodwel V. W., *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2012.

[22] Pham P.V., Medical Biotechnology: Techniques and Applications, *In: Omics Technologies and Bio-Engineering* (2018) 449-469. DOI: 10.1016/b978-0-12-804659-3.00019-1.

[23] Whitford D., *Proteins. Structure and Function*, Wiley, Weinheim, 2005.

- [24] Lai T., Yang Y., Kong Ng S., Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals* 6 (5) (2013) 579-603. DOI: 10.3390/ph6050579.
- [25] M. J. B. Burnett, A.C. Burnett, Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants People Planet* 2 (2020) 121-132. DOI: 10.1002/ppp3.10073.
- [26] Puetz J., Wurm F.M., Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes* 7 (8) (2019) 476. DOI: 10.3390/pr7080476.
- [27] Hames B.D., Hooper. N. M. Biochemia. Krótkie wykłady, PWN, Warszawa, 2007.
- [28] Hansel T. , Kropshofer H., Singer T., Mitchell J., George A., The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug. Discov.* 9 (4) (2010) 325-338. DOI: 10.1038/nrd3003.
- [29] Gillespie Ch.M., Kozlov M., Phillips M., Potty A., Integrating Continuous and Single-Use Methods to Establish a New Downstream Processing Platform for Monoclonal Antibodies, *In book: Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing* (2015) 71-96. DOI:10.1002/9783527673681.ch04
- [30] Shukla A.A., Thommes J., Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* 28 (5) (2010) 253-261. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.02.001
- [31] Cromwell M.E.M., Hilario E., Jacobson F., Protein Aggregation and Bioprocessing. *The AAPS Journal* 8 (2006) 572-579. DOI: 10.1208/aapsj080366.
- [32] Arakawa T., Philo J.S., Tsumoto K., Yumioka R., Ejima D., Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions. *Protein Expr. Purif.* 36 (2004) 244-248. DOI: 10.1016/j.pep.2004.04.009.
- [33] Ejima D., Yumioka R., Tsumoto K., Arakawa T., Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography. *Anal. Biochem.* 345 (2005) 250-257. DOI: 10.1016/j.ab.2005.07.004.
- [34] Mazzer A.R., Perraudb X., Halley J., O'Hara J., Bracewell D.G., Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold. *J. Chromatogr. A* 1414 (2015) 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.068>.
- [35] Aroraa S., Saxena V., B. V. Ayyarc, Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods* 116 (2017) 84-94. DOI: 10.1016/j.jymeth.2016.12.010.

- [36] Rodriguez E. L., Poddar S., Iftekhar S., Suh K., Woolfork A. G., Ovbude S., Pekarek A., Walters M., Lott S., Hage D. S., Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1157 (2020) 122332. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122332.
- [37] Baran K., Badania nad oczyszczaniem białek za pomocą chromatografii powinowactwa. Praca dyplomowa magisterska, Rzeszów, 2018.
- [38] Roque A. C. A., Silva C. S. O. , Taipa M. A., Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 44–55. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.05.109.
- [39] Choe W., Durgannavar T. A., Chung S. J., Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides. *Materials (Basel)*. 9 (12) (2016) 994. DOI: 10.3390/ma9120994.
- [40] Hober S., Nord K., Linhult M., Protein A chromatography for antibody purification. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 848 (2007) 40-47. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.09.030.
- [41] Shi Q., Sun Y., Protein A-based ligands for affinity chromatography of antibodies. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 30 (2021) 194-203. DOI: 10.1016/j.cjche.2020.12.001
- [42] Mouratou B., Behar G., Pecorari F., Artificial Affinity Proteins as Ligands of Immunoglobulins *Biomolecules* 5 (1) (2015) 60-75. DOI: 10.3390/biom5010060.
- [43] Jones T. T., Fernandez E. J., Alpha-Lactalbumin tertiary structure changes on hydrophobic interaction chromatography surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 259 (1) (2003) 27–35. DOI: 10.1016/s0021-9797(02)00180-7.
- [44] Antos D., Kaczmarek K., Piątkowski W., Chromatografia preparatywna jako proces rozdzielania mieszanin, *Wydawnictwo Naukowo-Techniczne*, Warszawa, 2011
- [45] Pierra Bresolin I.R.A., Lingg N., Lazzarotto Bresolin I.T., Jungbauer A., Hydrophobic interaction chromatography as polishing step enables obtaining ultra-pure recombinant antibodies. *J. Biotechnol.* 324 (2020) 1000020. DOI: 10.1016/j.btecx.2020.100020.
- [46] Jungbauer A., Machold R., Hahn R., Hydrophobic interaction chromatography of proteins III. Unfolding of proteins upon adsorption. *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 221-228. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.04.002.
- [47] Haimer E., Tschelissing A., Hahn R., Jungbauer A., Hydrophobic interaction chromatography of proteins IV Kinetics of protein spreading. *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 84-94. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.11.003.

- [48] McCue J.T., Engel F., Ng A., Macniven R., Thommes J., Modeling of protein monomer/aggregate purification and separation using hydrophobic interaction chromatography. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31 (2008) 261. DOI: 10.1007/s00449-008-0200-1.
- [49] B. Beyera, A. Jungbauer, Conformational changes of antibodies upon adsorption onto hydrophobic interaction chromatography surfaces. *J. Chromatogr. A* 1552 (2018) 60–66. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.04.009.
- [50] Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography, Principles and Methods – Handbook, GE Healthcare, 2015.
- [51] Muca R., Piątkowski W., Antos D Altering efficiency of hydrophobic interaction chromatography by combined salt and temperature effects. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8712-8721. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.04.046.
- [52] Muca R., Piątkowski W., Antos D., Effects of thermal heterogeneity in hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6716-6727. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.08.007.
- [53] Size Exclusion Chromatography Principles and Methods- Handbook, Cytiva, 2020.
- [54] Ion Exchange Chromatography Principles and Methods – Handbook, GE Healthcare, 2016.
- [55] Marek W.K , Muca R., Woś S., Piątkowski W., Antos D., Isolation of monoclonal antibody from a Chinese hamster ovary supernatant. I: Assessment of different separation concepts. *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 55-63. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.06.077.
- [56] Cummins Ph. M., Rochfort K. D., O'Connor B. F., Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods Mol. Biol.* 1485 (2017) 209-223. DOI: 10.1007/978-1-4939-6412-3_11.
- [57] Fritz J. S., Factors affecting selectivity in ion chromatography. *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 8-17. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.087.
- [58] Zhang T., Bourret J., Cano T., 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.
- [59] Khanal O., Kumar V., Westerberg K., Schlegel F., Lenhoff A. M., 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.

- [60] Staby A., Sand M. B., Hansen R. G., Jacobsen J. H., Andersen L. A., Gerstenberg M., Bruus U. K. Jensen I. H., Comparison of chromatographic ion- exchange resins IV. Strong and weak cation- exchange resins and heparin resins. *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 65-77. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.11.094.
- [61] Luo H., Macapagal N., Newell K., Man A., Parupudi A., Li Y., Li Y., Effects of salt-induced reversible self-association on the elution behavior of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 186–193. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.08.048.
- [62] Guo J., Zhang S., Carta G., Unfolding and Aggregation of a Glycosylated Monoclonal Antibody on a Cation Exchange Column. Part I. Chromatographic Elution and Batch Adsorption Behavior. *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 117–128. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.06.037.
- [63] Guo J., Carta G., Unfolding and Aggregation of a Glycosylated Monoclonal Antibody on a Cation Exchange Column. Part II. Protein structure effects by hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 129–137. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.06.038.
- [64] Guo J., Carta G., Unfolding and Aggregation of Monoclonal Antibodies on Cation Exchange Columns: effects of resin type, load buffer, and protein stability. *J. Chromatogr. A* 1388 (2015) 184–194. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.047.
- [65] Barlow D.J., Thornton J.M., The distribution of charged groups in proteins. *Biopolymers* 25 (1986) 1717–1733. DOI: 10.1002/bip.360250913.
- [66] Guo J., Carta G., Unfolding and Aggregation of Monoclonal Antibodies on Cation Exchange Columns: Effects of Resin Type, load buffer, and protein stability. *J. Chromatogr. A* 1388 (2015) 184-194. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.047.
- [67] Poplewska I., Piątkowski W., Antos D., A case study of the mechanism of unfolding and aggregation of a monoclonal antibody in ion exchange chromatograph. *J. Chromatogr. A* 1636 (2021) 461687. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461687.
- [68] Kopaciewicz W., Rounds M.A., Fausnaugh J., Regnier F.E., Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 266 (1983) 3-21. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)90875-1.
- [69] Brooks CA, Cramer SM. *Steric mass-action ion exchange – displacement profiles and induced salt gradients, AIChE J.* 38 (1992) 1969-1978.
- [70] Wang W., Nema S., Teagarden D., Protein aggregation- Pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* 390 (2) (2010) 89-99, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.025.

- [71] Singh S.M., Panda A.K., Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99 (2005) 303-310. DOI: 10.1263/jbb.99.303.
- [72] Alam P., Siddiqi K., Chturvedi S.K., Khan R.H., Protein aggregation: From background to inhibition strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* 103 (2017) 208-219. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048.
- [73] Roberts Ch. J., Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol.* 32 (7) (2014) 372-380. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.05.005.
- [74] Engel M.F.M., Van Mierlo C.P.M., Visser A.J.W.G., Kinetic and structural characterization of adsorption-induced unfolding of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10922–10930. DOI: 10.1074/jbc.M106005200.
- [75] Ueberbacher R., Haimer E., Hahn R., Jungbauer A., Hydrophobic interaction chromatography of proteins V. Quantitative assessment of conformational changes. *J. Chromatogr. A* 1198-1199 (2008) 154–163. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.05.062.
- [76] Ueberbacher R., Rodler A., Hahn R., Jungbauer A., Hydrophobic interaction chromatography of proteins: thermodynamic analysis of conformational changes. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 184–190. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.05.033.
- [77] Capito F., Skudas R., Kolmar H., Hunzinger Ch., Mid-infrared spectroscopy-based antibody aggregate quantification in cell culture fluids. *Biotechnol. J.* 8 (8) (2013) 912-7. DOI: 10.1002/biot.201300164.
- [78] Khanal O., Kumar V., Westerberg K., Schlegel F., Lenhoff A. M., 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.
- [79] Vermeer A.W.P., Norde W., The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys. J.* 78 (2000) 394–404. DOI: 10.1016/s0006-3495(00)76602-1.
- [80] Gao K., Oerlemans R., Groves M.R., Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophysical Reviews* 12 (2020) 85-104. DOI: 10.1007/s12551-020-00619-2.
- [81] Nieden F.H., Berglund H., Vedadi M., The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2 (2007) 2212-2221. DOI: 10.1038/nprot.2007.321.
- [82] Liu H., Gaza-Bulsecu G., Faldu D., Chumsae Ch., Sun J., Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426-4247. DOI: 10.1002/jps.21180.

- [83] Nicolaidis N. C., Sass P. M., Grasso L., Monoclonal Antibodies: A Morphing Landscape for Therapeutics. *Drug Dev. Res.* 67 (2007) 781-789 DOI:10.1002/ddr.20149.
- [84] Schoch A., Kettenberger H., Mundigl O., Winter G., Engert J., Heinrich J., Emrich, T., Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (19) (2015) 5997–6002. DOI: 10.1073/pnas.1408766112.
- [85] E. Tagliabue, M. Campiglio, S.M. Pupa, S. Ménard, A. Balsari, Activity and resistance of trastuzumab according to different clinical settings. *Cancer Treat. Rev.* 38 (3) (2012) 212-217. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.06.002.
- [86] Pogoda K., Niwińska A., Subcutaneous trastuzumab — recent evidence on efficacy and safety in HER2-positive breast cancer patients, *Oncology in Clinical Practice*, 2015, 11, 93-99.
- [87] Dakshinamurthy, P., Mukunda, P., Kodaganti, P. B., Shenoy B. R., Natarajan, B., Maliwalave, A., Halan, V., Murugesan S., Maity S., Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab. *Biologicals* 46 (2017) 46–56. DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.12.006.
- [88] Yüce M., Sert F., Torabfam M., Parlar A., Gürel B., Çakır N., Dağlıkoca D. E., Khan M. A., Çapan Y., Fractionated charge variants of biosimilars: A review of separation methods, structural and functional analysis. *Anal. Chim. Acta.* 1152 (2021) 238189,. DOI: 10.1016/j.aca.2020.12.064.
- [89] Fekete S., Beck A. Fekete J., Guillarme D., 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.
- [90] Jing S. Y., Gou J. X., Gao D., Wang H. B., Yao S. J., Lin D. Q., Separation of monoclonal antibody charge variants using cation exchange chromatography: Resins and separation conditions optimization, *Separation and Purification Technology* 235 (2020) 116136. DOI:10.1016/j.seppur.2019.116136.
- [91] Teshima G., Li M. X., Danishmand R., Rbi Ch., To R. Huang C., Kung J., Lahidji V., Freeberg J., Thorner L., Tomic M., Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange. *J. Chromatogr. A* 1218 (15) (2011) 2091-7. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.10.107.
- [92] Fekete S., Beck A., Fekete J., Guillarme D., 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.
- [93] Pabst T. M., Carta G., Ramasubramanian N., Hunter A. K., Mensah P., Gustafson M. E., Separation of Protein Charge Variants with Induced pH Gradients Using Anion Exchange Chromatographic Columns Timothy. *Biotechnology Prog.* 24 (5) (2008) 1096-1106. DOI: 10.1002/btpr.53.
- [94] Lingg N., Tan E., Hintersteiner B., Bardor M., Jungbauer A., Highly linear pH gradients for analyzing monoclonal antibody charge heterogeneity in the alkaline range. *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 65-71. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.028.
- [95] Müller-Späth T., Aumann L., Melter L., Ströhlein G., Morbidelli M., Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP). *Biotechnol. Bioeng.* 100 (6) (2008) 1166–1177. DOI: 10.1002/bit.21843.
- [96] Witkiewicz Z., Kałużna-Czaplińska J., Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych, *PWN*, Warszawa, 2017.
- [97] Shmidt-Traub H., Schulte M., Morgenstern S.A., Preparative chromatography, *Wiley*, Weinheim, 2012.
- [98] Guiochon G., The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 6-49. DOI:10.1016/j.chroma.2016.02.083.
- [99] Schultze-Jena A., Boon M. A., Bussmann P. J. Th., Janssen A. E. M., van der Padt A., The counterintuitive role of extra-column volume in the determination of column efficiency and scaling of chromatographic processes. *J. Chromatogr. A* 1493 (2017) 49-56. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.02.068.
- [100] Guiochon G., Felinger A., Shirazi D. G., Katti A. M., Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, *Academic Press*, USA, 2006.
- [101] Fornstedt T., Forssen P., Samuelsson J., Modeling of preparative liquid chromatography. *In book: Liquid Chromatography* (2017) 573-592. DOI:10.1016/B978-0-12-805393-5.00024-5.
- [102] Ankar N., Qmar S., Seidel Morgenstern A., Nonlinear model of liquid chromatography considering finite rates of adsorption-desorption kinetics and core-shell adsorbents. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 41 (2018) 17-18. DOI: 10.1080/10826076.2018.1519832.

- [103] Guiochon G., Lin B., Modeling preparative chromatography. *Academic PR INC.* San Diego, 2003.
- [104] Shankar A., Lenhoff A.M., Dispersion in round tubes and its implications for extracolumn dispersion. *J. Chromatogr. A* 556 (1991) 235-248. DOI: 10.1016/S0021-967(01)96224-7.
- [105] Stone T.M., Cotoni K.A., Stoner J.L., 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.
- [106] Vrentas J.S., Vrentas C.M., Dispersion in Laminar Tube Flow at Low Peclet Numbers or Short Times. *Chemical Engineering* 34 (1988) 1423-1430. DOI: doi.org/10.1002/aic.690340904.
- [107] Atwood J., Golay M., Dispersion of peaks by short straight open tubes in liquid chromatography systems. *J. Chromatogr. A* 218 (1981) 97-122. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)82050-6.
- [108] Taylor G., Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly Through a Tube. *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci.* 1137 (1953) 186-203. DOI: 10.1098/rspa.1953.0139.
- [109] Aris R., On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube. *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci.* 235 (1956) 67-77. DOI: 10.1098/rspa.1956.0065.
- [110] Marek W.K , Muca R., Woś S., Piątkowski W., Antos D., 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.
- [111] Marek W.K , Sauer D., Dürauer A., Jungbauer A., Piątkowski W., Antos D., 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.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

A high-throughput method for fast detecting unfolding of monoclonal antibodies on cation exchange resins

Artur Stańczak^{a,c}, Krystian Baran^b, Dorota Antos^{b,*}^a Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland^c Department of Biopharmacy and Pharmacokinetics, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2020

Revised 22 October 2020

Accepted 5 November 2020

Available online 11 November 2020

Keywords:

Differential scanning fluorimetry

High-throughput measurement

Protein stability

Ion-exchange chromatography

ABSTRACT

A fast method for assessing the stability of monoclonal antibodies (mAbs) adsorbed on ion exchange resins has been developed. The method exploited a real time polymerase chain reaction equipment to determine the temperature of protein phase transition, i.e., the so called melting temperature, based on differential scanning fluorimetry.

Changes to the melting temperature were screened under various adsorption conditions and correlated with the protein stability upon adsorption.

The method was tested for two different mAbs bound to various types of strong cation exchangers at different pH and loading concentrations. The mAbs destabilized upon adsorption due to strong binding, which manifested itself in aggregate formation and recovery reduction. The phenomenon depended on the resin type and binding conditions. However, regardless of the process conditions and resins used, drop in the melting temperatures to a critical value of about 30° could serve as an indicator of destructive changes in the protein structure in the adsorbed phase. The measurements were simultaneously accomplished for a number of samples with very small material consumption. Therefore, the method may be applied for screening resins and operating variables for a given mAb to exclude conditions that induce structure destabilization and aggregation.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Conformational changes of proteins upon adsorption often result in unexpected reduction in the separation selectivity and yield losses in preparative and industrial protein chromatography. Protein unfolding often induces formation of irreversible aggregates, whose presence affects adversely biological activity of the product. Moreover, it disturbs the retention behavior of proteins, which manifest itself in incomplete or multi-peak elution.

That phenomenon has been reported to occur mainly in hydrophobic interaction chromatography (HIC) [1–5]. Since hydrophobic residues are typically located in the inner part of the protein molecule, their interactions with hydrophobic surfaces of HIC media are often accompanied with conformational changes. In protein processing by ion exchange chromatography (IEX), unfolding and aggregation are not usually observed since most of the protein charged residues, which are responsible for electro-

static interactions with the charged adsorbent surface, are located on the outer protein surface [6]. This prevents proteins from conformational change or unfolding upon binding [7]. However, it has been shown by several research groups that adsorption on IEX surfaces can also induce unfolding and aggregation of proteins [8–16]. Multi-peak elution of proteins on IEX media was observed by e.g.: Voitl et al., Gillespie et al. and Luo et al. [8,10–12], who attributed that phenomena to conformational changes of proteins on the adsorbent surface. Gospodarek et al. [9] provided evidences of protein unfolding on both ion exchange and mixed mode chromatographic media. Carta and co-workers also demonstrated evidences for unfolding and aggregation of monoclonal antibodies (mAbs) on ion exchange columns [13–16].

To detect changes in the structure of proteins upon adsorption, various spectroscopic methods have been used, including: circular dichroism [17], fluorescence [18,19], infrared spectroscopy [20] and isothermal titration calorimetry [21,22]. Moreover, hydrogen exchange has proven to be a useful tool for evidencing changes in protein conformation at solid interfaces (e.g. [5,15,23–26]). All those methods provided some insight into the mechanism of struc-

* Corresponding author.

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

tural changes of proteins upon adsorption. Nevertheless, they are too sophisticated to be applied for fast identification of that phenomenon. As the tendency to destabilization is specific for the protein, its interaction with the resin surface, and the solvent environment, the elimination of undesirable process conditions requires tedious experimental efforts, i.e., conducting dozens of adsorption-desorption runs and subsequent chromatographic analysis of the effluents.

In our previous study, we used nano-Differential Scanning Fluorimetry (nanoDSF) measurements to identify the stability of proteins adsorbed on hydrophobic surface of a HIC medium [27]. The nanoDSF technology uses temperature gradient to monitor protein conformational changes over time. The thermal stability of protein is determined by the so called melting temperature, corresponding to the midpoint of the transition from folded to unfolded form of the protein or its specific domains. In order to determine the unfolding transition points, the shifts of intrinsic tryptophan fluorescence at the emission wavelengths of 330 nm and 350 nm are recorded [28]. That approach allows fast and simultaneous detection of melting temperatures for a large number of small samples and does not require a dye for protein staining. However, to record the shift in wavelength, a very sophisticated equipment is needed.

Hence, the goal of our study was to develop a high-throughput method that enables fast assessment of the stability of the protein in the adsorbed phase by using a standard laboratory equipment, and to establish a destabilization criterion.

We employed a conventional DSF method, in which a standard real time polymerase chain reaction thermocycler (RT-PCR) could be applied to determine the melting temperature of proteins. This method has the advantages of nanoDSF regarding a high speed of the measurements and small protein consumption, but it exploits a much simpler and readily available RT-PCR setup.

This technique requires using a dye, i.e., typically SYPRO Orange, which becomes strongly fluorescent when bound to hydrophobic protein residues. In the presence of dye, the thermal unfolding transition can easily be monitored spectrophotometrically. The method is widely used for screening applications in drug discovery and formulation development [29–32].

We extended the applicability of that technique for assessment of the protein stability in the adsorbed phase. The analysis was focused on IEX resins that are characterized by much weaker hydrophobicity compared to HIC media, hence they are less prone for undesirable interactions with dye.

The model proteins were two different monoclonal antibodies (mAbs), whose stability and propensity to aggregation was analyzed on IEX resins that differed in the density of the active group on the adsorbent surface and the hydrophobicity of the matrix. The aggregation of mAbs is a potential safety concern in their processing and formulation in pharmaceutical industry [33,34]. Thus, detection of that phenomena and elimination of its causes is of major importance.

The analysis was performed under different conditions in terms of pH, the concentration of the mAbs and the incubation time of the protein solution with the resins. The melting temperature of the bound proteins was correlated with their stability in the adsorbed phase. The lowest critical melting temperature (LCMT) of the adsorbed mAbs was determined, which could be used as an indicator of detrimental effects accompanying protein adsorption.

2. Experimental

2.1. Instruments

RT-PCR Detection Systems CFX96 (Bio Rad) equipped with a hard-shell 96-well plate was used for the measurements of the protein melting temperature. Multi-Well Plates (96 well), volume 1

and 2 mL with 0.45 μ m cellulose membrane (Pall Corporation, Ann Arbor, USA) were used for binding (adsorption), incubation, and release (desorption) of the protein. An ÅKTA Avant with a UV detector and a data station (Cytiva Life Sciences, Uppsala, Sweden) and a SoloVPE UV-VIS spectrophotometer (C Technologies Inc., Bridgewater, USA) were used for the concentration analysis. An ACQUITY UPLC System (Waters Corporation, Milford, USA) was used for the SEC analysis.

2.2. Materials

The monoclonal immunoglobulins mAb2 (isoelectric point = 8.8, MW = 148 kDa (purity > 96%) and mAb3 (isoelectric point = 7.9, MW = 149 kDa (purity > 96%)) were provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Poland). The adsorption tests were performed on strong IEX resins: Eshuno CPX (Merc Millipore), Fractogel EMD COO⁻ 650 (M)(Merc Millipore), TOYOPEARL (TP) GigaCap S-650M (Tosh Bioscience), Capto S ImpAct (Cytiva), POROSTM XS (Life Technologies), TOYOPEARL Sulfate-650 (Tosh Bioscience).

For protein binding 0.04M sodium acetate buffers with pH 4.5 or 5.5 (adsorption buffers) were used, whereas for the protein release two different solutions were used (desorption buffers): a 0.05M sodium phosphate buffer with pH 9.0 (PB) or a 1 M NaCl solution in PB (PBS).

SYPROTM Orange Protein Gel Stain (5000x Concentrate in DMSO) (Thermo Fisher Scientific) was used for staining the protein before the DSF analysis.

An analytical column Waters BEH200 (Waters Corporation, Milford, USA) with I.D. 0.46 cm and length 15 cm, packed with a resin of particle size 1.7 μ m was used for the SEC analysis.

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of chromatographic resins

Prior to the adsorption-desorption tests, all resins were washed several times and conditioned with the adsorption buffers of pH 4.5 or pH 5.5 in Eppendorf tubes, and then centrifuged. Next, the resins were filtered out on a paper filter and left in air for 1 hour to remove the excess of moisture.

2.3.2. Adsorption and desorption experiments

Batches of 10 mg of the prepared resins were weighed out and transferred into Eppendorf tubes. Next, solutions of various concentrations of the mAbs within the range of 0.2 - 18 mg mL⁻¹ at pH 4.5 or 5.5 were prepared and added into the tubes. To determine the adsorbed phase concentration at equilibrium, the batches were shaken in a rocking shaker for 24 h. Next, samples of supernatants were acquired and subjected to the concentration analysis using the SoloVPE spectrophotometer and the UV detector of the ÅKTA system. The calibration factor of the UV detector signal was determined for standard solutions of the mAbs.

To detect the formation of the protein aggregates and mass losses due to strong adsorption, several batches were incubated for different time intervals within 0.5 - 24 h, and then transferred into a 96-well plate connected to a vacuum pump. The unbound mAb was collected in a receiving plate. Then, the resins were flushed using the adsorption buffer. Afterwards, the desorption buffer PB or PBS was added to the resin samples. The slurry obtained was incubated for approx. 30 min. on the orbital shaker. Next, liquid was sucked out and collected using the vacuum pump. The concentration of each collected effluent was determined using the UV detector, as described above. All experiments were performed at room temperature (av. 22°C). The measurements were performed in triplicate.

2.3.3. Measurement of melting temperature

The proteins were stained using SYPRO Orange of 20x concentration. For that purpose, 996 μL of appropriate adsorption buffer and 4 μL of 5000x SYPRO Orange were mixed.

27 μL samples of the resins obtained (Section 2.3.2), were transferred into the RT-PCR plate, and 3 μL of 20x SYPRO Orange was added into each of wells. A protective foil was placed onto the upper 96-well plate and aluminum foil on the entire plate. The whole was mixed on the orbital shaker for 1 minute and then centrifuged for a minute with a 1000 \times G. The plate was placed into the detection system and the temperature program was started (1°C every 1 minute, from 25 to 95°C). Additionally, the procedure was repeated for blank samples of each resins, i.e., without contacting them with the protein solution.

All the measurements were performed in triplicate.

2.3.4. Size exclusion chromatography

In the SEC experiments, the mobile phase was a 200 mM sodium chloride solution in a 100 mM phosphate buffer with pH 6.8. The flowrate of 0.3 mL min^{-1} was used. The analyzed fractions were injected into the SEC column that was previously equilibrated with the mobile phase. A blank pulse was also injected to determine the difference in the UV signals between the mobile phase and the sample-solvent. The UV signal of the protein was then corrected by subtraction of the blank pulse from the peak of the protein sample.

3. Results and discussion

3.1. Binding of 20x SYPRO Orange into IEX resins

To reduce binding of the dye to protein residues participating in the interactions with the adsorbent surface, SYPRO Orange was added after mAb was adsorbed on the resins (Section 2.3.3). The adsorption properties of both mAbs were found to be not affected by the presence of dye, which was verified by several adsorption-desorption trials for the stained and unstained proteins. The molecules of the protein stained in adsorbed phase interacted to a higher degree with the dye than those stained in the liquid solution, which manifested itself in their enhanced fluorescence intensity. This improved sensitivity of the protein fluorescence detection in the presence of the resin. On the other hand, hydrophobic groups on the resin matrix were also stained along with the adsorbed mAb. This caused the resins themselves to be fluorescent depending on the number of hydrophobic group present on their surfaces. Therefore, prior to the adsorption tests, the fluorescence intensity of blank samples of the resins stained with 20x SYPRO Orange was measured. The results of the measurements performed in the environment of adsorption buffers of pH 4.5 and 5.5, at which the protein binding occurred are presented in Fig. 1. The lowest fluorescence intensity is exhibited by S ImpAct based on the hydrophilic agarose matrix, whereas the highest intensity is showed by Poros XS, which was composed of the most hydrophobic styrene-divinylbenzene matrix with the highest binding affinity to SYPRO Orange (Table 1). Only in the latter case, the fluorescence signal from the resin matrix interfered with that of the mAbs, which made the result of the DSF measurements difficult to interpret. For all remaining resins, the melting temperature of the adsorbed protein could be detected without disturbing interference of the background signal. In all cases, the results of measurements did not distinctly depend on pH of the adsorption (pH 4.5 and 5.5) and desorption buffers (pH 9).

We selected three resins for further analysis, i.e., TP GigaCap, TP Sulfate, and S ImpAct (Table 1). The first two resins are based on the same matrix, with however different ligand densities. S ImpAct

Table 1
Characteristics of the resins used in the tests, the ligand density were given by the manufacturer or taken from literature [35].

Resin name	Eshmuo CPX	Fractogel COO- 650	TOYOPEARL GigaCap S-650M	Capto S ImpAct	Poros XS	TOYOPEARL Sulfate-650F
Acronym	Eshmuo	Fractogel	TP GigaCap	S ImpAct	Poros XS	TP Sulfate
Functional group	Sulfonate	Carboxy	Sulfonate	Sulfonate	Sulfonate	Sulfonate
Spacer	isobutyl	ethyl	propyl	pyrrolidone	propyl	butyl
Matrix	polyvinylether polymer	methacrylic polymer	methacrylic polymer	agarose	styrene divinylbenzene	methacrylic polymer
Resin mean size [μm]	50	40-80	50 - 100	50	50	30-60
Ionic density ($\mu\text{eq/mL}$)	70*	95 - 145	185*	64*	81*	530

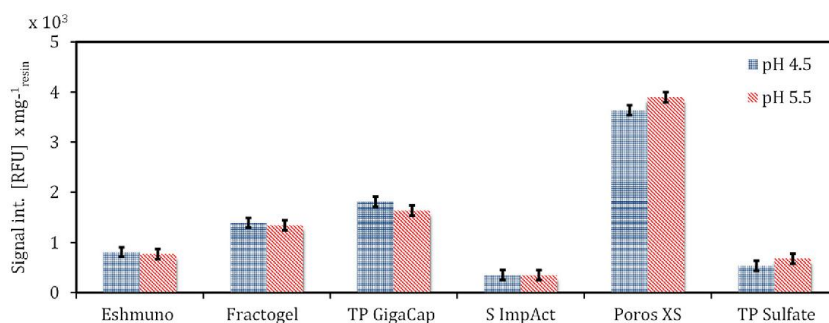


Fig. 1. Fluorescence intensity of the resins stained by SYPRO Orange at 25°C. The error bars indicate the accuracy of the measurements.

Table 2
Protein-loading capacities for mAb2 adsorbed on different resins.

resin	TP GigaCap		S ImpAct		TP Sulfate	
pH	4.5	5.5	4.5	5.5	4.5	5.5
loading capacity $\text{mg}_{\text{mAb2}} \text{mg}_{\text{resin}}^{-1}$	0.431	0.197	0.233	0.231	0.0211	0.247

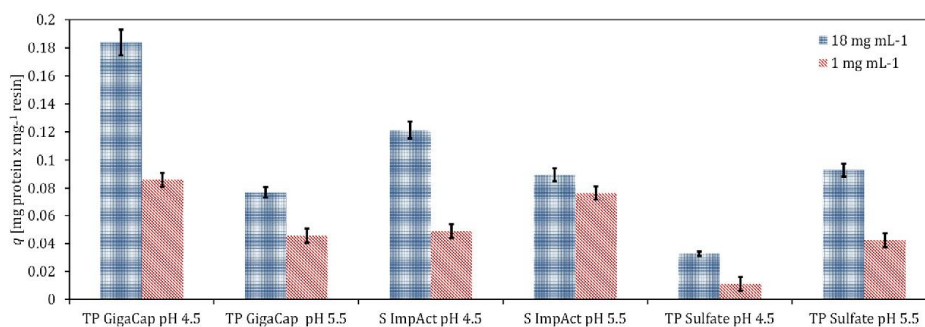


Fig. 2. Adsorption behavior of mAb2 on the selected resins for two different loading concentrations: 18 mg mL^{-1} and 1 mg mL^{-1} (resin loadings 1.8 and 0.1 $\text{mg}_{\text{mAb2}} \text{mg}_{\text{resin}}^{-1}$). The incubation time 24 h.

contains agarose matrix in contrast to all remaining resins composed of synthetic-polymer backbone.

3.2. Adsorption behavior of mAb2 on different IEX resins

The adsorption behavior of mAb2 was determined by contacting the selected resins with the protein solutions of pH 4.5 and 5.5 and different loading concentrations. The sets of the equilibrium data, i.e., the concentrations in the supernatant and in the adsorbed phase expressed in mg of the adsorbed protein per mg of the prepared resin were used to determine the isotherm courses and to estimate the protein-loading capacities. The results obtained are summarized in Table 2. Typical comparison of the adsorption properties of mAb2 recorded for different resins is shown in Fig. 2, where the amount of the protein bound to the resin at the adsorption equilibrium, q , is depicted for two different loading concentrations.

It can be observed that the highest protein adsorption was obtained for TP GigaCap at pH 4.5, regardless of the loading concentrations, however it weakened significantly with increase in pH to 5.5, i.e., towards the isoelectric point of mAb2. The opposite trend was observed for TP Sulfate, for which mAb2 was adsorbed much weaker at pH 4.5 than at pH 5.5. In case of S ImpAct, the

changes in the adsorption strength versus pH depended on the protein concentration: for higher loading concentrations typical adsorption pattern was observed, i.e., the amount adsorbed decreased with increasing pH, whereas for low loading conditions a reversed pattern was observed (Fig. 2). As discussed in Section 3.3, those effects may be explained by differences in the protein structural stability.

The protein binding was followed by its desorption at elevated pH (pH 9) with PB or PBS (Section 2.3.2). The former was used to mimic the desorption step in pH gradient applied in the downstream separation of the mAb2 charge variants by CEX, whereas the latter was intended to mimic the resin stripping step.

To determine the protein recovery from the resins, the effluent collected during the desorption step was subjected to the concentration analysis. The mass deficiency of mAb2 recorded during desorption with PB are presented in Fig. 3 as the ratio of the mass retained on the resin to the total mass of the protein introduced into each of the systems. The mass losses depended on the loading conditions, i.e., for all resins apart from S ImpAct equilibrated at pH 4.5, the effect of incomplete desorption was enhanced for the lower loading concentration, i.e., 1 mg mL^{-1} (the resin loading by the protein: 0.1 $\text{mg}_{\text{mAb2}} \text{mg}_{\text{resin}}^{-1}$). The influence of pH on the recovery reduction correlated with the adsorption behavior, i.e., for

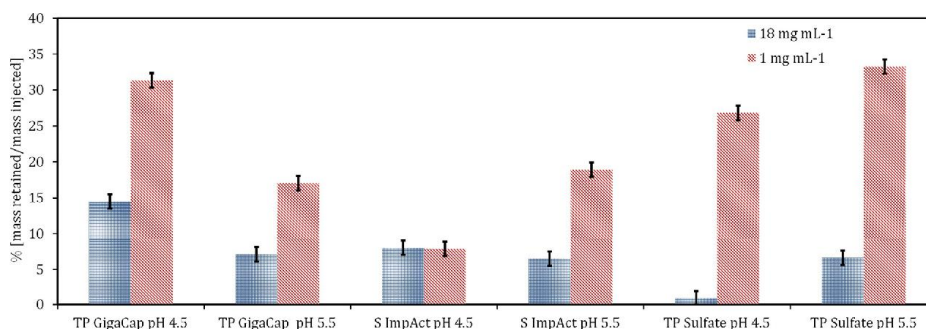


Fig. 3. Illustration of the mass losses of mAb2 loaded onto the resins at pH 4.5 and 5.5 expressed as the ratio of the mass of the protein retained on the resin to the mass loaded for two different loading concentrations (as in Fig. 2). The incubation time 24 h.

TP GigaCap that effect was stronger at pH 4.5, at which the protein was stronger bound compared to pH 5.5, whereas for TP Sulfate and S ImpAct, the effect was more pronounced at pH 5.5, which corresponded to the changes in the adsorption strength versus pH reported for the same loading concentration in Fig. 2.

Fig. 4A and B show the dependence of the mass losses on the composition of the desorption buffer and the resin incubation time during the adsorption step for the TP GigaCap and TP Sulfate resins, for which the effect of incomplete desorption was the most pronounced. In case of TP GigaCap, the amount desorbed with PB and PBS was practically the same up to 5h of incubation at pH 4.5, and up to 8h at pH 5.5. In case of TP Sulfate, a greater part of the protein could be recovered using PBS. Nevertheless, in all cases the protein mass desorbed was in deficiency with respect to that introduced into the system, which indicated that certain amount of the protein was too strongly bound to the resins. It was attributed to spreading of the unfolded mAb2 in the adsorbed phase. A part of the unfolded protein that spread on the surface interacted strongly with adsorption sites, therefore it could not be desorbed neither with PB nor with PBS. As it can also be seen, the mass losses due to strong adsorption were detected already after 0.5 h of the incubation time.

To analyze the homogeneity of the mAb in the desorption effluent, the SEC analysis was used. The analysis revealed the presence of dimeric aggregates, which start partially decomposing to monomers just after desorption, however the equilibrium of the decomposition process was reached after 2-3 days. This was an additional proof of the protein destabilization upon adsorption. In case of TP GigaCap, the amount of the dimeric aggregates increased with increasing the incubation time in the adsorption step (Fig. 5). The smallest amount of those aggregates appeared after desorption from S ImpAct. It increased slightly with the increasing incubation time. However, the amount of the dimeric aggregates detected in the effluent from TP GigaCap and S ImpAct did not distinctly depend on the desorption buffer used, i.e., for both PB and PBS the difference in the aggregate content was within the experimental error. This reveals that the elution strength of PB was sufficient to desorb both monomer and aggregate from those resins.

The results obtained also indicated that the protein destabilized the fastest on TP Sulfate, for which the dimeric aggregates appeared in the desorption effluent after a short incubation time and their content did not clearly changed over time. Also, the effluent of desorption with PBS contained a large amount of aggregates, which were strongly bound to that resin and could not be desorbed with PB possessing a weaker elution strength. The adsorption capacity for mAb2 on TP Sulphate at pH 4.5 was low, but

accompanied with significant destabilization of the protein structure, which resulted in formation of a large amount of aggregates. A small reduction in the amount of aggregates at pH 4.5 with increasing the incubation time may be explained by a slow progress in the aggregate adsorption.

The protein destabilization observed is specific for the protein and resins studied, therefore very difficult to predict. Hence, to reduce experimental efforts, we developed the DSF-based method for fast assessing the protein stability under different process conditions.

3.3. Measurement of melting temperature of mAb2

The melting temperatures were measured according to the procedure reported in Section 2.3.3. The fluorescence curves obtained were differentiated, as illustrated in Fig. 6A, in which a phase transition for the native mAb2 in the adsorption buffer of pH 4.5 was shown. The differential curve exhibits peaks, whose minimum is assigned to the melting temperature. Two melting temperatures, i.e., 60 and 69°C, correspond to the phase transition of different domains of the mAb structure.

Since mAb can be described as a multi-domain protein, the presence of different transition peaks indicates unfolding events of the different domains of the molecule. Usually, 2-3 different transition peaks are observed for different antibodies, these peaks may however overlap to various degrees [36-38]. A typical fluorescence intensity curve for the mAb2 adsorbed on TP GigaCap at pH 4.5 resin along with its first derivative is shown in Fig. 6B. The fluorescence intensity signal of the blank sample of the resin is also depicted in the same figure. The melting temperatures obtained for different conditions are summarized in Tables 3 and 4, and illustrated in Figs. 7-9.

The melting events of the native mAb2 dissolved in the adsorption buffers depended in some extent on pH and the protein concentration in the solutions (Table 3). The melting temperatures were higher for higher pH and for lower protein concentrations in the solution. This indicated slightly higher stability of the protein at milder solution pH and lower concentrations, at which the protein was less prone to intermolecular interactions (e.g. aggregation). The desorbed protein exhibited the same pattern of the melting event as the native one (Table 4). The melting temperatures measured for the native protein (free protein in the initial solution) and the protein desorbed from the resin with PB were the same, whereas for that desorbed with PBS was slightly lower (Table 3).

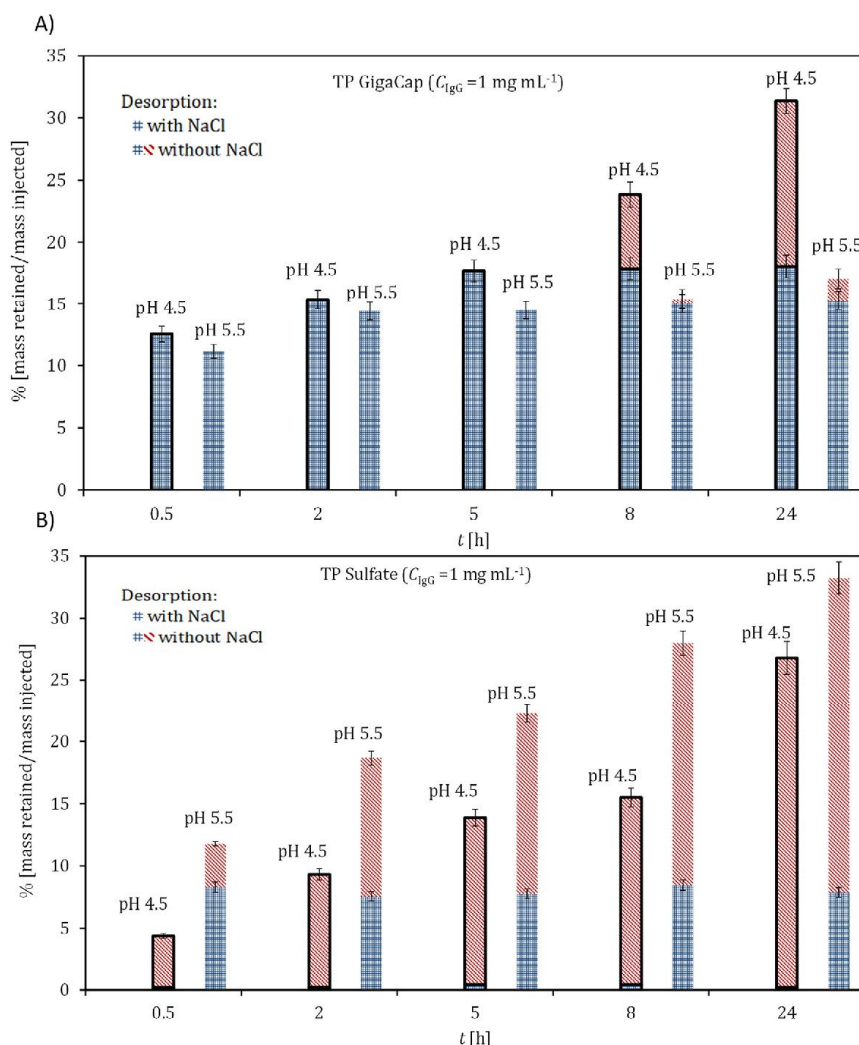


Fig. 4. Influence of the incubation time in the adsorption step on the efficiency of mAb2 desorption (i.e., on the mass losses) at pH = 4.5 and pH = 5.5. A) TP GigaCap, B) TP Sulphate.

The protein activity in the effluent of desorption with PB was measured by an ELISA test according to the internal procedure of Polpharma Biologics. The measurement indicated that the activity of the desorbed protein was preserved.

The melting temperatures of the protein adsorbed on the resins were markedly lower than in liquid solutions for all resin tested. This applies in particular to the lower-melting temperature, which reveals a difference in the stability between lower- and higher-melting temperature domains of mAb2.

The shift in the melting temperature depended significantly on the resin type and adsorption conditions. In case of TP GigaCap, the melting temperature of mAb2 adsorbed on the resin at pH 4.5 changed significantly with the loading concentrations

(Table 3, Fig. 7A). At higher loadings, i.e.: $0.5 - 1.8 \text{ mg}_{mAb2} \text{ mg}_{resin}^{-1}$, which exceed markedly the loading capacity of the resins (Table 2), two peaks corresponding to two melting temperatures are distinctly visible, however with decrease in the resin loading the low-temperature peak shifted towards lower temperatures. Further decrease in the loadings from 0.1 to $0.02 \text{ mg}_{mAb2} \text{ mg}_{resin}^{-1}$, which are below the protein-loading capacity, causes the low-temperature peak to shift below 30°C and "disappear" from the plot, and the high-temperature peak to shift below 60°C . That effect can be correlated with the adsorption behavior of the protein described in Section 3.2. The mAb was strongly adsorbed on TP GigaCap at pH 4.5, which was accompanied with aggregation and strong adsorption. It enhanced for low resin loadings, in accordance to the

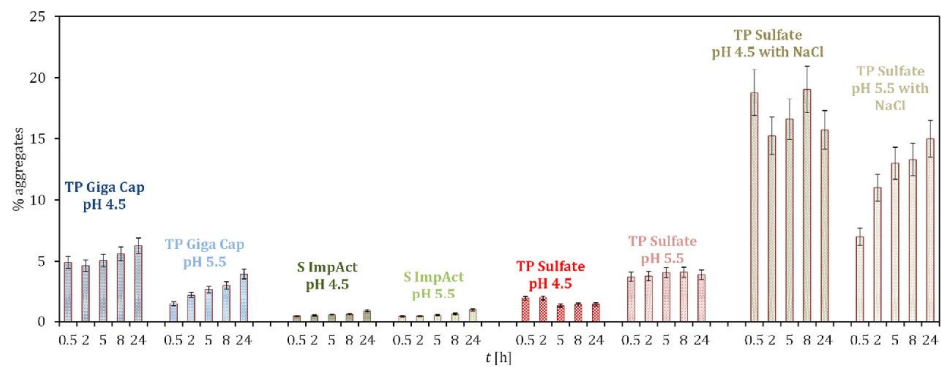


Fig. 5. Influence of the incubation time on the formation of the dimeric aggregates. The loading concentration 18 mg mL^{-1} (resin loading $1.8 \text{ mg}_{\text{mAb2}} \text{ mg}_{\text{resin}}^{-1}$).

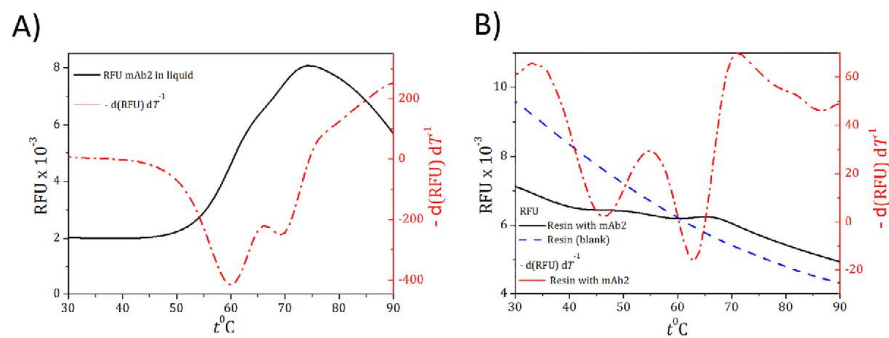


Fig. 6. Fluorescence intensity curves for mAb2. A) native mAb2 in liquid solution (in adsorption buffer pH 4.5, the protein concentration 18 mg mL^{-1}), B) the protein adsorbed on TP GigaCap from the same solution. Solid line - fluorescence curve, dash-dotted line - differential curve, dotted line - fluorescence curve for a blank sample of the resin stained with SYPRO Orange.

Table 3

Melting temperatures of mAb2 in the initial liquid solutions (free protein) and adsorbed on resins, T1,T2 ($^{\circ}\text{C} \pm 1$).

mAb2	load $\text{mg}_{\text{mAb2}} \text{ mg}_{\text{resin}}^{-1}$	pH	1.8		1.0		0.5		0.2		0.05		0.02	
			T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
free		4.5	59	69	60	69	61	70	62	70	61	73	62	73
free		5.5	64	71	65	72	68*	68*	70*	70*				
TP GigaCap		4.5	48	63	47	63	44	62	<30	56	<30	55	<30	55
TP GigaCap		5.5	57	66	58	65	58	66	56	67	67*	68*		
S ImpAct		4.5	43	62	43	61	43	60	44	61	45	62	44	63
S ImpAct		5.5	44	63	44	63	43	63	39	63	40	64	41	65
TP Sulfate		4.5	<30	50	<30	50	<30	49	<30	49	<30	49	<30	48
TP Sulfate		4.5 + 0.5 NaCl	54	65	54	65	54	65	55	69	55	69	Na ⁺ *	
TP Sulfate		5.5	<30	56	<30	56	<30	56	<30	57	<30	58	<30	59

* T1 and T2 peaks overlapped

** signal too low due to weak adsorption

Table 4

Comparison of melting temperatures in the initial solutions (free protein) and in the desorption effluent. The concentration in the initial solution about 1 mg mL^{-1} , T1,T2 ($^{\circ}\text{C} \pm 1$).

	pH	T1	T2
free	4.5	61	73
free	9	68	77
desorbed	9	68	77
desorbed	9 + NaCl	68	75

reduction in the melting temperature. We have already observed similar pattern for proteins adsorbed on a HIC resin in the previous study [27]. The phenomenon can be explained by the so called crowding effect that occurs at a high surface coverage, when compact layer of the adsorbed molecules prevents the protein from unfolding and spreading. The existence of that effect was indicated e.g. by Fogle et al. [39], who evidenced stabilization of the protein with increasing surface coverage.

The protein adsorbed on TP GigaCap at pH 5.5 showed two melting temperature peaks, whose localization was independent of the loading concentration (Table 3, Fig. 7B). This indicated much

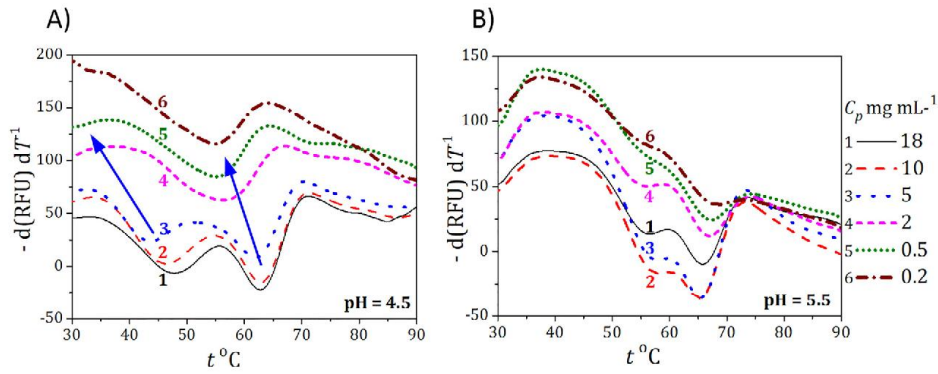


Fig. 7. Changes in the melting temperature of mAb2 adsorbed on TP GigaCap for different loading concentrations (the corresponding resin loadings in $\text{mg}_{\text{mAb2}} \text{mg}_{\text{resin}}^{-1}$ are 10 times lower, i.e., 0.02 - 1.8). A) Protein adsorbed at pH 4.5, B) protein adsorbed at pH 5.5. The incubation time 24 h.

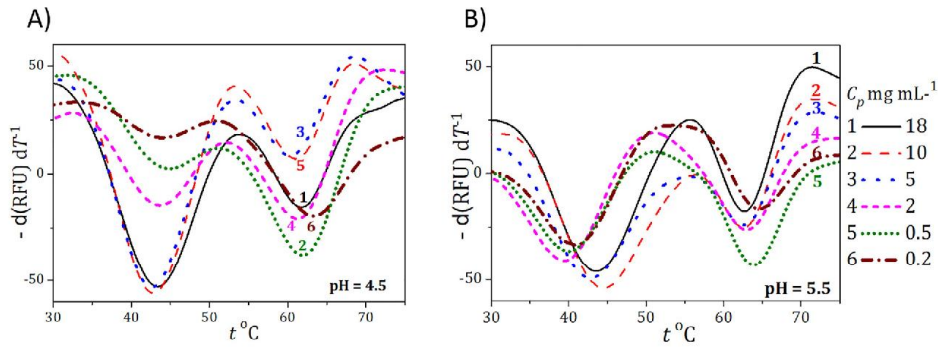


Fig. 8. Changes in the melting temperature of mAb2 adsorbed on S for different loading concentrations, as in Fig. 7. A) Protein adsorbed at pH 4.5, B) protein adsorbed at pH 5.5.

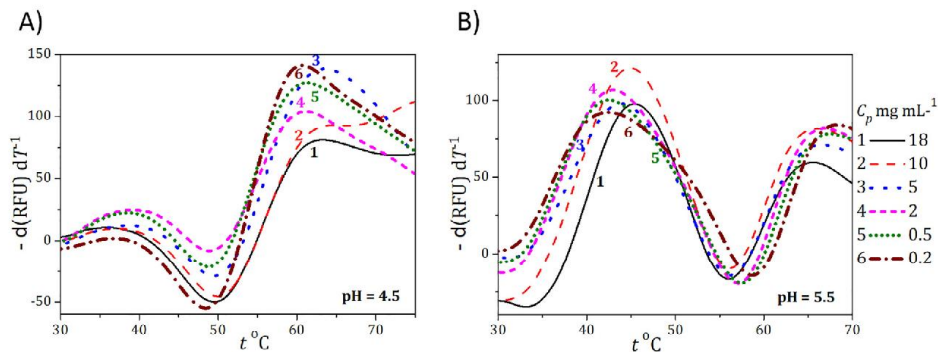


Fig. 9. Changes in the melting temperature of mAb2 adsorbed on TP Sulfate for different loading concentrations, as in Fig. 7. A) Protein adsorbed at pH 4.5, B) protein adsorbed at pH 5.5.

higher stability of the adsorbed protein, which was less prone to aggregation at pH 5.5 than at pH 4.5. This is in agreement with the data presented in Figs. 2–5, i.e., decrease in adsorption at pH 5.5 resulted in lower amount of aggregates and lower mass losses in the desorption effluent.

The melting temperature data of the protein adsorbed on S ImpAct presented in Table 3 and Fig. 8 confirm the correlation between the reduction in the melting temperature and the protein destabilization. For mAb2 adsorbed at pH 4.5, the values of the melting temperature determined by the localization of both peaks, indicate relatively good stability of the protein. The position of

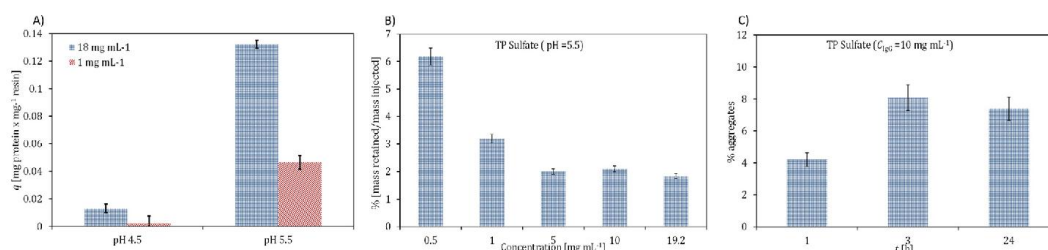


Fig. 10. Adsorption behavior of mAb3. A) Amount adsorbed on TP Sulfate for two different loading concentrations 10 mg mL⁻¹ and 1 mg mL⁻¹ (resin loadings 1.0 and 0.1 mg_{mAb3} mg_{resin}⁻¹). B) mass losses on TP Sulfate for adsorption at pH 5.5. C) aggregate content in the effluent after desorption with PBS. The incubation time 24 h.

Table 5

Melting temperatures of mAb3 in the initial solutions (native) and adsorbed on the resin T1,T2,T3 (°C ± 1).

load mg _{mAb3} mg _{resin} ⁻¹	pH	1			0.5			0.1			0.05		
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
native	5.5	-	66	81	-	66	81	-	68	82	-	68	82
TP GigaCap	5.5	-	67	78	60	68	78	60*	81	60*	81		
TP Sulfate	5.5	37	67.5	77	36	68	77	35	50	76	35	50	76

* T1 and T2 peaks overlapped

peaks does not change with the loading concentration. However, at pH 5.5, the low-temperature peak shifts towards lower temperatures with decrease in the loading concentration. This suggest the possibility of destabilization of the protein upon adsorption, which is again in correlation with the enhancement of the adsorption strength and the mass losses demonstrated in Figs 2 and 3.

The protein was found to be the least stable when adsorbed on TP Sulfate, which is illustrated in Fig. 9A, B and Table 3. At pH 4.5 a significant destabilization of the protein occurred regardless of the loading conditions. The low-temperature peak shifted towards very low values, i.e., below 30°C, therefore it was not visible in the thermogram. This was accompanied with very low adsorption capacity, which was apparently against the suggested relationship between the adsorption strength and the tendency of protein for unfolding. However, there is still a close relationship between the reduction in the melting temperature to very low values (i.e., about 30°C and lower) and the enhancement of mass losses. We hypothesize that the spreading of unfolded protein on the adsorbent surface induced steric hindrances, which limited the access to active sites. At pH 5.5, the low-temperature peak is partly visible on the thermogram, however it is still located at very low temperature, which indicates instability of the adsorbed protein similarly as it was illustrated in Fig. 7A, in which the melting events of the mAb2 adsorbed on TP GigaCap at 4.5 were shown. This coincides with the pattern of the mass losses on both resins under the mentioned conditions.

Obviously, it is possible to screen the melting temperatures to find adsorption conditions under which unfavorable effects are avoided. For instance, an addition of NaCl to the adsorption buffer reduced adsorption strength of the protein, which improved its stability (Table 3).

The data presented in Figs. 6–9 were acquired after 24 h of the protein incubation in the adsorption step. To verify whether the melting temperature of mAb2 is time dependent, a series of measurements were performed using different incubation times (0.5 – 8h). The results obtained were practically the same. This indicated that the protein destabilized immediately when contacted with the resin. The progress in spreading of the unfolded protein, which we suggested as a reason of its strong adsorption, did not influenced on the melting temperature.

3.4. Adsorption behavior and melting events of mAb3

Finally, we analyzed the adsorption behavior of mAb3 so as to verify whether similar correlation between the protein stability and the melting temperature could be observed for other mAbs. The mAb3 protein was more stable than mAb2 on the resins used, and an evidence of destabilization, i.e., a distinct increase in the amount of aggregates, mass losses, and appearance of the melting temperature of about 30°C, was observed only for TP Sulfate. A brief report from the acquired data is shown in Fig. 10A–C and Table 5. Adsorption capacity for mAb3 on TP Sulfate at pH 4.5 was very low (Fig. 10 A), almost negligible, probably for the same reason as reported for mAb2. Therefore, the melting temperatures are reported only for pH 5.5. For the comparison, Table 5 also presents the melting temperature data of mAb3 adsorbed on TP GigaCap, for which despite strong adsorption mass losses were not observed.

Free mAb3 dissolved in the adsorption buffer, exhibited two melting temperatures (about 60°C and 80°C) which weakly increased with reduction in the protein loading, similarly as observed for mAb2. The protein adsorbed on TP Sulfate exhibited three melting temperatures, with the lowest within the range of 30 – 40°C. The appearance of that additional temperature was attributed to partial destabilization of some of protein domains, which enhanced with reduction in the protein loading (Table 5).

The changes in the recovery reduction of mAb3 adsorbed on TP Sulfate followed similar pattern of the concentration dependence to that observed for mAb2, i.e., it enhanced at low loadings (Fig. 10B). The effluent obtained after protein desorption contained dimeric aggregates (Fig. 10C).

Again, the reduction in the lowest melting temperature to about 30°C indicated destabilization of the protein, which was confirmed by the presence of aggregates and mass losses.

4. Conclusions

We developed a high-throughput procedure for detecting destabilization of mAbs upon adsorption on ion exchange resins. The procedure was based on the measurements of melting temperatures of the adsorbed protein using differential scanning fluorimetry in RT-PCR equipment. For the tests, two different mAbs were

used, whose adsorption properties and stability on different strong cation exchange resins were analyzed. The fluorescence intensity signal coming from the resins tested did not interfere with that of the proteins. The exception was the resin based on the most hydrophobic styrene-divinylbenzene matrix, to which SYPRO Orange was strongly bound.

We detected structure destabilization of the model mAb2 upon adsorption on all three resins selected for the adsorption-desorption tests: TOYOPEARL GigaCap S-650M (TP GigaCap), Capto S ImpAct (S ImpAct), TOYOPEARL Sulfate-650 (TP Sulfate), which manifested itself in formation of aggregates and in the recovery reduction. The phenomenon enhanced with increase in adsorption strength and decrease in the loading concentration. The latter was explained by the crowding effect of the protein on the adsorbent surface at its high coverage, which prevented the protein from unfolding, and in consequence - from aggregation and recovery reduction. The destabilization effect was specific for the resin type, the matrix and the ligand density. The protein was the most stable while adsorbed on ImpAct having the lowest ligand density and the least hydrophobic matrix. Similar trends were detected for mAb3, which however was much more stable compared to mAb2 and destabilized only on TP-Sulfate.

Those observations cannot be generalized to any extent, since the resin which induces destabilization of certain protein can be suitable for another one. The correlation between the protein stability and the resin type is complex and difficult for prediction, therefore its quantification requires a number of chromatographic measurements. However, the relationship between the melting temperature and the protein stability on the resin can be determined much faster and with very small material consumption.

The performed study reveals that there is the lowest critical melting temperature (LCMT), which may serve as an indicator of structure destabilization of the adsorbed protein. In case of both mAb2 and mAb3, the shift in the melting temperature of the least stable protein domain towards 30°C signalized detrimental changes in the protein structure. Nevertheless, LCMT has to be identified for a given protein. Then, the DSF thermograms of the adsorbed protein can be screened to exclude conditions, for which the melting temperature drops to LCMT. The realization of the DSF measurements in the RT-PCR equipment allows fast determination of LCMT for a high number of resins samples. Hence, the method can potentially be used in the development stage of the mAb processing by ion exchange chromatography for screening the resins and binding conditions to eliminate those for which undesirable phenomena occur. Moreover, the method may be used for screening of drug product candidates to select more stable molecules, which are not prone to aggregate on CEX resins, hence, to increase downstream process productivity and robustness.

Funding

This work was supported by the by National Science Center Poland (NCN.Cl.18.00, OPUS 14 UMO-2017/27/B/ST8/00385).

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

Artur Stańczak: Investigation, Methodology, Conceptualization, Writing - review & editing. **Krzysztof Baran:** Investigation, Methodology, Conceptualization, Writing - review & editing. **Dorota Antos:** Conceptualization, Writing - review & editing.

Acknowledgment

We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland for supplement of biological material.

References

- [1] K. Benedek, S. Dong, B.L. Karger, Kinetics of unfolding of proteins on hydrophobic surfaces in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 317 (1984) 227–243.
- [2] T.T. Jones, E.J. Fernandez, α -Lactalbumin tertiary structure changes on hydrophobic interaction chromatography surfaces, *J. Colloid Interface Sci* 259 (2003) 27–35.
- [3] A. Jungbauer, C. Machold, R. Hahn, Hydrophobic interaction chromatography of proteins: III. Unfolding of proteins upon adsorption, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 221–228.
- [4] E. Haimer, A. Tscheliessnig, R. Hahn, A. Jungbauer, Hydrophobic interaction chromatography of proteins IV. Kinetics of protein spreading, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 84–94.
- [5] Y. Xiao, T. Tibbs-Jones, A.H. Laurent, J.P. O'Connell, T.M. Przybycien, E.J. Fernandez, Protein instability during HIC: hydrogen exchange labeling analysis and a framework for describing mobile and stationary phase effects, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 80–93.
- [6] D.J. Barlow, J.M. Thornton, The distribution of charged groups in proteins, *Biopolymers* 25 (1986) 1717–1733.
- [7] A.M.-B. Staby, R.G.R.G. Hansen, J.H. Jacobsen, L.A. Andersen, M. Gerstenberg, I.H. Jensen, Comparison of chromatographic ion-exchange resins - IV. Strong and weak cation-exchange resins and heparin resins, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 65–77.
- [8] A. Voitl, A. Butté, M. Morbidelli, Behavior of human serum albumin on strong cation exchange resins: II model analysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5492–5500.
- [9] M. Gospodarek, D.E. Hiser, J.P. O'Connell, E.J. Fernandez, Unfolding of a model protein on ion exchange and mixed mode chromatography surfaces, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 238–252.
- [10] R. Gillespie, T. Nguyen, S. Macneil, L. Jones, S. Crampton, S. Vunnum, Cation exchange surface mediated denaturation of an aglycosylated immunoglobulin (IgG1), *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 101–110.
- [11] H. Luo, N. Macapagal, K. Newell, A. Man, A. Parupudi, Y. Li, Y. Li, Effects of salt-induced reversible self-association on the elution behavior of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 186–193.
- [12] H. Luo, M. Cao, K. Newell, C. Afdahl, J. Wang, W.K. Wang, Y. Li, Double-peak elution profile of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography is caused by histidine-protonation-based charge variants, *J. Chromatogr. A* 1424 (2015) 92–101.
- [13] J. Guo, S. Zhang, G. Carta, Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column - part I. Chromatographic elution and batch adsorption behavior, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 117–128.
- [14] J. Guo, G. Carta, Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column - part II. Protein structure effects by hydrogen deuterium exchange mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 129–137.
- [15] J. Guo, G. Carta, Unfolding and aggregation of monoclonal antibodies on cation exchange columns: effects of resin type, load buffer, and protein stability, *J. Chromatogr. A* 1388 (2015) 184–194.
- [16] J. Guo, A.D. Creasy, G. Barker, G. Carta, Surface induced three-peak elution behavior of a monoclonal antibody during cation exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1474 (2016) 85–94.
- [17] N.J. Greenfield, Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2527–2535.
- [18] M.F.M. Engel, C.P.M. van Mierlo, A.J.W.G. Visser, Kinetic and structural characterization of adsorption-induced unfolding of bovine α -lactalbumin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10922–10930.
- [19] P. Oroszlan, R. Blanco, X.M. Lu, D. Yarmush, B.L. Karger, Intrinsic fluorescence studies of the kinetic mechanism of unfolding of α -lactalbumin on weakly hydrophobic chromatographic surfaces, *J. Chromatogr. A* 500 (1990) 481–502.
- [20] R. Ueberbacher, E. Haimer, R. Hahn, A. Jungbauer, Hydrophobic interaction chromatography of proteins V. Quantitative assessment of conformational changes, *J. Chromatogr. A* 1198–1199 (2008) 154–163.
- [21] R. Ueberbacher, A. Rodler, R. Hahn, A. Jungbauer, Hydrophobic interaction chromatography of proteins: thermodynamic analysis of conformational changes, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 184–190.
- [22] W.Y. Chen, H.M. Huang, C.C. Lin, F.Y. Lin, Y.C. Chan, Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation, *Langmuir* 19 (2003) 9395–9403.
- [23] Y.W. Bai, T.R. Sosnick, L. Mayne, S.W. Englander, Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange, *Science* 5221 (1995) 192–197.
- [24] Z.Q. Zhang, D.L. Smith, Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, *Protein Sci* 2 (1993) 522–531.

- [25] J. Buijs, C.C. Vera, E. Ayala, E. Steensma, P. Hakansson, S. Oscarsson, Conformational stability of adsorbed insulin studied with mass spectrometry and hydrogen exchange, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3219–3225.
- [26] J.L. McNay, E.J. Fernandez, How does a protein unfold on a reversed-phase liquid chromatography surface? *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 135–148.
- [27] R. Muca, W. Marek, M. Żurawski, W. Piątkowski, D. Antos, Effect of mass overloading on binding and elution of unstable proteins in hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1492 (2017) 79–88.
- [28] G. Senisterra, I. Chau, M. Vedadi, Thermal denaturation assays in chemical biology, *Assay Drug Dev. Technol.* 10 (2012) 128–136.
- [29] M.W. Pantoliano, E.C. Petrella, J.D. Kwasnoski, V.S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B.A. Springer, P. Lane, F.R. Salemme, High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery, *J. Biomol. Screen* 6 (2001) 429–440.
- [30] K. Mahendrarajah, P.A. Dalby, B. Wilkinson, S.E. Jackson, E.R. Main, A high-throughput fluorescence chemical denaturation assay as a general screen for protein-ligand binding, *Anal. Biochem.* 411 (2011) 155–157.
- [31] A. Niedziela-Majka, E. Kan, P. Weissburg, U. Mehra, S. Sellers, R. Sakowicz, High-throughput screening of formulations to optimize the thermal stability of a therapeutic monoclonal antibody, *J. Biomol. Screen* 20 (2015) 552–559.
- [32] S.A. Seabrook, J. Newman, High-throughput thermal scanning for protein stability: making a good technique more robust, *ACS Comb. Sci.* 15 (2013) 387–392.
- [33] A.S. Rosenberg, Effects of protein aggregates: an immunologic perspective, *AAPS J* 8 (2006) E501–E507.
- [34] A. Shukla, B.B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, D. Low, Downstream processing of monoclonal antibodies - application of platform approaches, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 28–39.
- [35] 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.
- [36] A.W.P. Vermeer, W. Norde, The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein, *Biophys. J.* 78 (2000) 394–404.
- [37] A.W.P. Vermeer, W. Norde, A. Amerongen, The unfolding/denaturation of immunoglobulin of isotype 2b and its F_{ab} and F_c fragments, *Biophys. J.* 79 (2000) 2150–2154.
- [38] B. Beyera, A. Jungbauer, Conformational changes of antibodies upon adsorption onto hydrophobic interaction chromatography surfaces, *J. Chromatogr. A* 1552 (2018) 60–66.
- [39] J.L. Fogle, J.P. O'Connell, E.J. Fernandez, Loading, stationary phase, and salt effects during hydrophobic interaction chromatography: α -Lactalbumin is stabilized at high loadings, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 209–218.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

Effect of flow behavior in extra-column volumes on the retention pattern of proteins in a small column



Krystian Baran, Wojciech Kazimierz Marek, Wojciech Piątkowski, Dorota Antos*

Department of Chemical and Process Engineering, Powstańców Warszawy Ave. 6, 35-959, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2019
Received in revised form 26 March 2019
Accepted 28 March 2019
Available online 2 April 2019

Keywords:

Protein chromatography
Extra-column volume effect
Mathematical modelling

ABSTRACT

Experimental and theoretical analysis of deformation of band profiles in extra-column volumes (ECV) was performed, and its influence on the retention pattern of proteins in a small chromatographic column was quantified. Several macromolecule and small-molecule compounds, and their mixtures were eluted from a chromatographic system in the absence and presence of the column. The peak deformation in ECV was attributed to non-uniform velocity distribution in the radial direction in connecting capillaries. The phenomenon enhanced with increasing molecular weight of the model compound, when radial diffusion dominated the mechanism of band spreading. The band shape was also affected by the geometry of the injection system used, i.e., an injection loop capillary or a superloop. The phenomenon vanished for a small molecule compound, for which plug flow conditions could be established. The difference in flow behaviour of the macromolecule and small-molecule compounds caused them to migrate with different velocities in ECV, which resulted in partial separation of their bands. The ECV effect influenced the retention behaviour of macromolecules in a small column; it caused tailing of peaks and asymmetry of breakthrough curves. To describe the elution profiles in ECV and in the column, a mathematical model was used which accounted for non-ideality of the flow pattern. The model reproduced accurately band profiles of macromolecules within a range of relatively low velocities, typical however for protein chromatography.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Columns with very small volumes, i.e., maximum 1 mL, are often used in the development stage of protein chromatography to estimate operating parameters for large scale operations at minimal material consumption. Small columns are exploited in high throughput experiments to acquire a huge number of chromatographic elution data that are subjected to statistical analysis to determine the bounds for the process operating window [1–3]. The elution profiles obtained can also be used as an input for mechanistic models to characterize the process dynamics and provide optimum of operating conditions with respect to the process performance [4–10]. However, reduction in the column size causes an increase in the ratio of the extra-column volume (ECV) in the workstation (i.e., connecting capillaries, injection valves, sample loops, detector flow cells, and connectors) to the column volume. Therefore, band broadening in ECV can significantly affect the separation efficiency. The phenomenon of band broadening in ECV

has already been reported in literature for many years [11–14], however, it became critical after small highly efficient column systems were launched [15–24]. These additional ECV effects were reported to depend on different process variables and physico-chemical parameters, such as: the mobile phase linear velocity, injection volume, diffusion coefficient of the solute, as well as the geometry of experimental set-up [14–19]. Moreover, adsorption on the internal surfaces in ECV was also indicated as a possible cause of band deformation and drop in efficiency of chromatographic systems [25].

In most of approaches reported in literature, the ECV effect is quantified by the determination of peak variances in the total system or in its individual parts [11,13,20,22,26]. In the latter case, peak variances in each of parts are calculated using a Gaussian function or an exponential decay function, and added to quantify the total band broadening effect. In that approach, the effect of the location of each part on the band broadening is also distinguished [16]. Band broadening in ECV can be quantified based on several methods, such as: theoretical analysis, using zero dead volume connectors or zero-length columns, extrapolation from columns of different lengths or different retention times of solutes [15–17,22,26].

* Corresponding author.

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

In the articles referred, small-molecule compounds were used to determine the contribution of ECV effect to the total system efficiency. However, the elution pattern of macromolecules in ECV can be different than that observed for small-molecule compounds. This stems from very low values of the diffusion coefficient of proteins attributed to their large molecular weights. Slow diffusivity accompanied with non-uniform velocity distribution in connecting capillaries of the chromatographic system may cause deformation of band profiles of proteins in ECV. The phenomenon of deformation of protein peaks in ECV has already been reported in a previous work [10], where we determined peak variances to account for band broadening.

That approach is simple and efficient in fast characterization of the ECV effects; however, it is accurate only for laminar flow at the Taylor-Aris regime, for which the residence time in ECV is sufficient for lateral equilibration, i.e., to enable the solute to diffuse over the tube cross-section. In a pre-asymptotic flow regime, for which that condition is not met, the heterogeneity of the velocity profile in the radial direction causes the solute to segregate into the faster-moving region near the capillary center and the slow-moving region at the column wall [27–33]. The phenomenon is expected to be enhanced for macromolecules, whose movement in the radial direction is hindered by low diffusivity, which can adversely affect the performance of the whole chromatographic system. Therefore, neglecting that issue can result in misinterpretation of the retention data for proteins, particularly for small columns, in which band broadening in ECV dominates the elution pattern. To describe accurately the ECV effects, radial distribution of velocity in laminar flow in a tube as well as diffusion in the radial direction have to be accounted, as indicated in several studies [27–33].

However, chromatographic literature lacks in providing a systematic analysis of the ECV effect for proteins and its influence on the retention behavior in a small chromatographic column. Therefore, in this study we examined band broadening in ECV with a focus on the specificity of the protein flow behavior in comparison to a small-molecule compound. For that purpose, band profiles of different macro and small-molecule compounds, and their mixtures were recorded in ECV by replacing the column with a zero-length connector, as well as in the whole system including a small chromatographic column. The experiments were performed at different mobile phase velocity in an Äkta workstation using two different injection systems: injection loop capillary of different volumes and a superloop. The former is a thin loop with diameter usually smaller than 0.1 cm, whereas the latter is a glass tube in a few cm in the diameter. A strong deformation of protein profiles in ECV was observed, which enhanced with increasing molecular weight of the eluted compound. To reproduce the shape of band profiles, a mathematical model was formulated, which accommodated non-ideality of flow distribution in ECV as well as in the column. The accuracy of the model predictions was verified based on experimental data acquired for different mobile phase velocities. The velocity range for the model applicability has also been determined.

2. Theory

2.1. Formulation of the model

To determine the flow behavior of proteins in ECV, a mathematical model was used which accounted for laminar flow velocity profile in the capillary system [27–31]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + u(r) \frac{\partial C}{\partial x} = D \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial C}{\partial r} r \right) + D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1)$$

$$u(r) = 2u_0 \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (2)$$

where C is the local concentration of the solute in the mobile phase; u , u_0 are the linear velocity and the mean linear velocity over the capillary radius; r , x and t are the radial, axial coordinates and time, respectively; R is the capillary radius; D is the solute diffusivity.

If the capillary length, L , exceeds certain critical value, L_{crit} , defined as [34]:

$$L > L_{crit} = \frac{u_0 r^2}{4D} \quad (3)$$

then the process can be described by a Fickian mechanism, where the solute is moved with the mean flow velocity, u_0 :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + u_0 \frac{\partial C}{\partial x} = D_{app} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (4)$$

The apparent dispersion coefficient can be calculated as follows [34,35]:

$$D_{app} = D + \frac{u_0^2 r^2}{\kappa D} \quad (5)$$

In Eq. (5) κ accounts for the geometry of the capillary and flow. In case of laminar flow in a straight tube $\kappa = 48$ [34,35].

The protein elution inside the column was described by the Transport Dispersive model as follows [36]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\partial q}{\partial t} + \frac{u_0}{\varepsilon_{tot}} \frac{\partial C}{\partial x} = D_{a,TD} \frac{\varepsilon_e}{\varepsilon_{tot}} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (6)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_m (q^* - q) \quad (7)$$

where q is the local concentration in the solid phase; q^* is the equilibrium concentration in the solid phase that is correlated with the mobile phase concentration, C , by the isotherm equation; k_m is the overall mass transport coefficient; $D_{a,TD}$ is the apparent dispersion coefficient in the column; $F = (1 - \varepsilon_{tot})/\varepsilon_{tot}$ is the phase ratio; ε_{tot} and ε_e are the total and external bed porosities.

2.2. Boundary and initial conditions

The model presented in Section 2.1 has to be supplemented with adequate initial and boundary conditions. In case of sample pulses injected through a small loop capillary or a superloop (Fig. 1A), the system was assumed to be free of the solute prior to the injection, i.e., for the initial conditions it hold:

$$C(x, t = 0) = 0 \quad (8)$$

Moreover, a rectangular injection profile was assumed for the inlet boundary condition:

$$C(x = 0, t) = \begin{cases} C_{inj} & \text{for } t \leq t_{inj} \\ 0 & \text{for } t > t_{inj} \end{cases} \quad (9)$$

where C_{inj} and t_{inj} denote the injection concentration of the solute and the injection time, respectively.

The outlet boundary condition was expressed as follows:

$$\frac{\partial C(x = L_{con}, t)}{\partial x} = 0 \quad (10)$$

In case of injections through a large-volume loop capillary (Fig. 1B), the initial condition was expressed as follows:

$$C(x, t = 0) = \begin{cases} C_{inj} & \text{for } x \leq L_{inj} \\ 0 & \text{for } x > L_{inj} \end{cases} \quad (11)$$

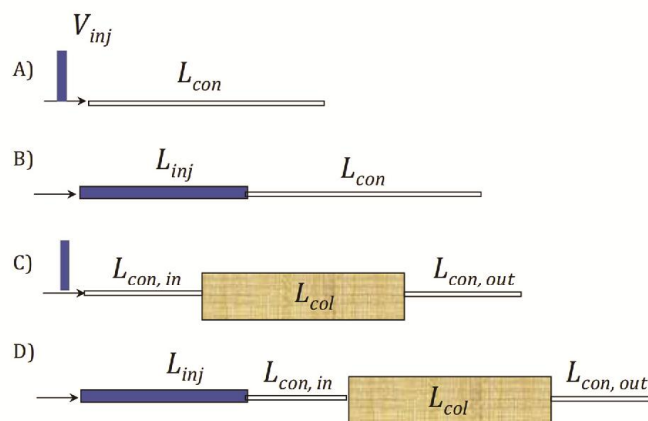


Fig. 1. Illustration of the flow path for the sample injections. A) System without the column with a rectangular pulse injection (small loop capillary and superloop); the system initially free of the solute; B) system without the column with a large loop capillary, which is initially filled with the sample, whereas remaining parts of the system are free of the solute; C) system as in A) but with the column; D) system as in B) but with the column. $L_{con,in}$, $L_{con,out}$ denote the length of the pre- and post-column connection capillaries ($L_{con,in} + L_{con,out} = L_{con}$), respectively.

where L_{inj} is the length of the injection loop capillary. The inlet boundary condition for the injection loop capillary and the connection capillary was assumed as follows (Fig. 1B):

$$C(x, t) = \begin{cases} 0 & \text{for } x = 0 \\ C_{ave} & \text{for } x = L_{inj} \end{cases} \quad (12)$$

where C_{ave} is the area-average concentration of the solute at the outlet of the injection loop capillary. The outlet boundary condition was the same as described by Eq. (10), at $x = L_{inj} + L_{con}$.

In the presence of the column, the boundary concentration at the column inlet was calculated as the area-average concentration of the solute at the outlet of the pre-column connection capillary, whereas the concentration of the solute at the outlet of the column was used as the boundary condition for the post-column connection capillary (Fig. 1C and D). The conditions for injections through the loop capillary or the superloop were included in the initial and boundary conditions in the same way as described by Eqs (8)–(12).

The models given by Eqs. (1) and (2) or Eqs. (4) and (5), which describe the elution in capillaries, and by Eqs. (6) and (7), which describe the column dynamics, were coupled with adequate initial and boundary conditions and solved numerically using a finite difference method (details of the method are described elsewhere (e.g. [37])).

3. Experimental

3.1. Instruments

Äkta purifier with a UV detector and a data station (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) was used for chromatographic experiments. The injector was an injection valve with loop capillaries: 0.01 mL volume with I.D. 0.5 mm, 1 and 2 mL volume with I.D. 0.75 mm, and a superloop with maximum volume of 10 mL, I.D. 30 mm.

The volume of the connecting capillaries was of 0.25 mL, which corresponded to the length 127.0 cm, including: $L_{con,in} = 64.5$ cm for the pre-column capillary (or before the zero-length connector), and $L_{con,out} = 62.5$ cm for the post-column capillary (Fig. 1C and D). In case of the superloop, the total length of additional connecting capillaries was 43 cm.

The column elution experiments were performed using a Tricorn column, I.D. 5 mm (GE Healthcare) equipped with two stop-plugs and two connectors, the length of bed packed into the column was 1.4 cm, the bulk bed volume (V_{bed}) was 0.27 mL.

3.2. Materials and process conditions

A few model proteins were used for the elution experiments: lysozyme from chicken egg white, LYZ (MW = 14.4 kDa, purity $\geq 90\%$), bovine serum albumin, BSA (MW = 66.5 kDa purity $\geq 96\%$), which were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland), monoclonal immunoglobulin IgG4 (MW = 145.4 kDa purity $\geq 99\%$) was provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Poland). A few band profiles of fibroblast growth factor 2 FGF (MW = 18 kDa) acquired in a previous study [10] were also used as a reference for the model simulations (Section 4.1.1). Additionally, blue dextran was used (MW = 2000 kDa), as a representative of large macromolecules, and acetone (MW = 58.8 Da), as a representative of small-molecule compounds. All experiments were performed at room temperature (av. 22 °C). The column was packed with a cation exchange resin UNOsphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, particle diameter 80 μm). The mobile phase was phosphate buffer (PB) with pH = 7 free of salt or with 1 M NaCl in the solution.

3.3. Procedures

3.3.1. Determination of void volumes

The void volume of chromatographic system consists of the internal column volume that includes: the void volume of the column hardware (column fittings, stop-plugs) and the void volume of the packed bed, as well as ECV that includes: connection capillaries, connectors, valves, and a detector cell.

The void value of the column hardware was determined by a pycnometric method, i.e., the empty column of a defined volume and the same column filled with water and closed with stop-plugs were weighed. The difference in the weights was used to calculate the void volume of the column hardware. The value of 0.047 mL was obtained, which was lumped with the bulk bed volume by extend-

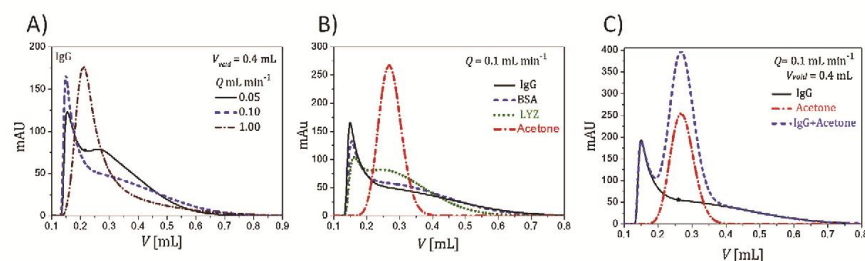


Fig. 2. Illustration of band profiles deformation in ECV. A) IgG profiles recorded for different mobile phase flow rates; B) comparison of profiles of IgG, BSA, LYZ and acetone at the same flow rate; C) band splitting of binary mixture IgG and acetone. Q is the flow rate: 0.1 mL min^{-1} corresponds to 30 cm h^{-1} in the column and $30 \times 100 \text{ cm h}^{-1}$ in the connecting capillary.

ing its length. The lumped bed length was used for the simulations of the solute elution in the column (Section 4.2).

To determine ECV, a pulse of acetone was injected into the system, in which the column was replaced with a zero-length connector. A flow restrictor was mounted into the system to mimic the presence of the column. The first absolute moment of the recorded “connector” peak was used to calculate the total ECV, which was equal to 0.29 mL . The difference between the total value of ECV and the volume of the connecting capillaries (0.25 mL) determined the contribution of the connectors, valves and the detector cell. That value was lumped with the length of the connecting capillaries, which made the apparent capillary length 23 cm longer, i.e. 150 cm in total.

To determine the void volume of the packed bed, thus the bed porosity, a pulse of acetone was injected into the system equipped with the column packed with the resin, eluted with the mobile phase at a defined flowrate (Q), and recorded as a “column” peak. The first absolute moment of the connector peak was subtracted from that calculated for the column peak to determine the retention time in the column (t_r). The value obtained was used to determine the apparent bed porosity $\varepsilon_{\text{tot}} = Q t_r / V_{\text{bed}}$, which was equal to 0.95 . That value included the contribution of the column hardware.

Additionally, the protein pulses were eluted and recorded under non-binding conditions, i.e., in PB pH = 7 with 1 M NaCl for IgG, LYZ, or PB free of salt for the remaining solutes that were unretained by the stationary phase. The connector and column peaks obtained were used for estimating the apparent bed porosity available for each of macromolecules (Section 4.2).

3.3.2. Pulse experiments

The solutions of proteins, blue dextran or acetone were injected into the system, in which the zero-length connector or the column were interchangeably assembled. The injections were performed using the injection loop capillaries or the superloop (Section 3.1). In case of the loop capillaries, the injection volume was 0.01 mL , 1 , or 2 mL , whereas in case of the superloop - 1 or 2 mL . The sample concentrations for all solutes were: 1 mg mL^{-1} for 0.01 mL -injections, and 0.1 mg mL^{-1} for 1 and 2 mL -injections. The solutes were eluted at different mobile phase flow rates changed over the range 0.05 – 1 mL min^{-1} , which corresponded to the linear velocity 15×10^2 – $300 \times 10^2 \text{ cm h}^{-1}$ in the capillaries with I.D. 0.5 mm , and 15 – 300 cm h^{-1} in the column with I.D. 5 mm .

The peaks were recorded at 280 nm wavelength and converted into the concentration units using a calibration factor. Standard solutions of macromolecules and acetone were used to correlate the detector signal with the protein concentration. The experiments were performed in duplicate or triplicate. The results were found to be reproducible, which confirmed the flow rate stability in ECV and in the whole system.

4. Results and discussion

4.1. Band broadening in ECV

4.1.1. Small-volume injections

To analyze band broadening in ECV, several pulse experiments were performed, i.e., solutions of different macro and small-molecule compounds were injected into the chromatographic system, in which the column was replaced with the zero-length connector (Section 3.3.2). Typical band profiles of IgG corresponding to small-volume injections (0.01 mL) recorded using the UV detector at different flow rates are illustrated in Fig. 2A.

A strong band deformation can be observed, which is pronounced at low values of the mobile phase velocity. The same trend is valid for all model macromolecules, though their profiles differ from each other, which is illustrated in Fig. 2B. The band profile of acetone, which is superimposed in the same figure, follows a Gaussian shape. This indicates that for small-molecule compounds the capillary length was sufficient to reach radial equilibrium, i.e., uniform distribution of the solute concentration in the radial direction, whereas proteins eluted at pre-asymptotic flow regime. Therefore, small-molecule compounds should not be used for analyzing and quantifying the ECV effect for macromolecules. That effect has to be individually determined for each type of macromolecule. The difference in diffusivity of species in multicomponent solutions can cause mixture components to migrate through capillaries with different velocities, which can result in unexpected band splitting. An illustration of that effect is presented in Fig. 2C, where the ECV profiles of single elution of IgG and acetone and their mixture is superimposed. A pre-separation of the mixture occurs in ECV, where a part of IgG elutes first, then the mixture of both components appears, and finally the tail of the protein, which is free of acetone, is eluted.

To reproduce the band profiles of macromolecules and elucidate the observed phenomena, the mathematical model expressed by Eqs. (1) and (2) was used. The diffusion coefficient was an adjustable model parameter, whose value was estimated by fitting the model prediction to the experimental band profiles. The experimental data, model predictions and the estimated values of the diffusion coefficients are reported in Fig. 3A–F. For all cases, the value of the diffusion coefficient obtained was very close to that conveyed by literature, particularly for IgG [38]. It can also be observed that peak tailing and peak deformation enhance with increasing molecular weight and decreasing the diffusion coefficient. The strongest peak tailing occurred for blue dextran with the highest molecular weight, for which more than 1 mL of the mobile phase had to be used to elute a small 0.01 mL -sample.

In case of all macromolecules, the length of the capillaries did not exceed the critical value L_{crit} (Eq. (3)) regardless of the flow rate

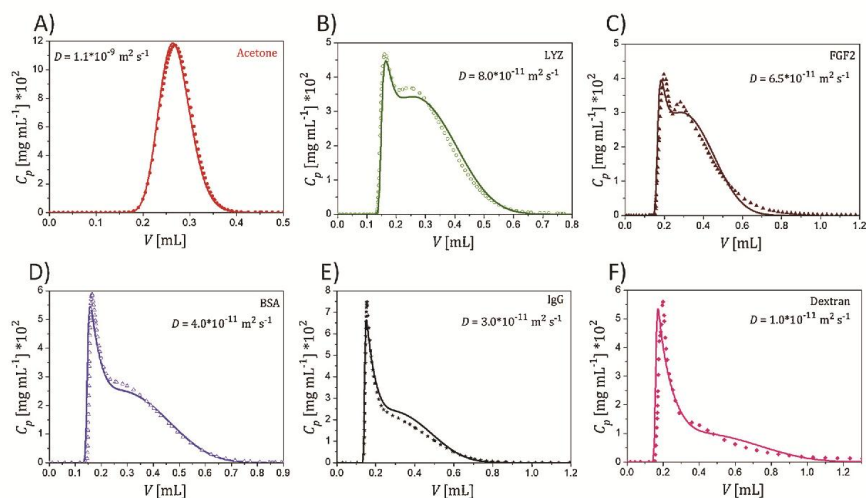


Fig. 3. Experimental band profiles and the corresponding model simulations for different compounds. In all cases the flow rate was equal to $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$; points – experiment data, lines – simulations.

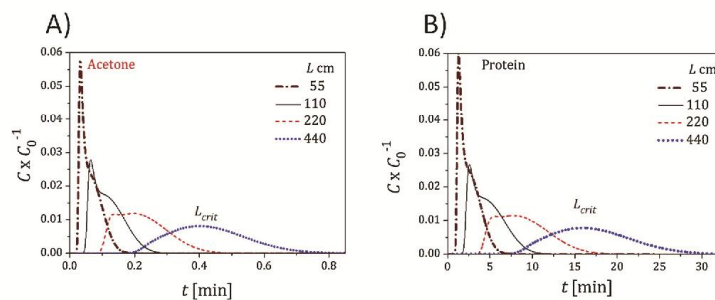


Fig. 4. Evolution of the band profile for A) IgG and B) acetone in a long capillary at different distances from the inlet.

used. The critical length for the smallest protein LYZ was minimum about $L_{crit} = 160 \text{ cm}$ (at flow rate of 0.1 mL min^{-1}), for the largest molecule of blue dextran it was minimum $L_{crit} = 1330 \text{ cm}$, whereas the total length of the connection capillaries was 150 cm (Section 3.3.1). Therefore, the flow behavior of all the macromolecules was dominated by non-uniform velocity distribution and slow diffusion in the radial direction. The results of simulations also revealed that the contribution of diffusion in axial direction (the last term in Eq. (1)) was of minor importance.

In case of acetone, whose molecules are characterized by very fast diffusivity with the diffusion coefficient $D = 1.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (according to the GSC chemical database), the critical length was only $L_{crit} = 0.12 \text{ cm}$ (at 0.1 mL min^{-1}). Therefore, radial relaxation could be reached at a very short residence time in ECV.

To explain the differences between the flow behavior of a protein and a small-molecule compound, a visualization of the evolution of band profiles in a long capillary is presented in Fig. 4A and B. The bands evolved from a rectangular injection pulse via band deformation at pre-asymptotic flow regime towards formation a Gaussian profile. The simulations were performed for the same critical length for both solutes. The changes in band shapes presented

in Fig. 4A and B are identical, but correspond to significantly different time scales. The Gaussian profile for acetone is formed about 40 times faster compared to the protein.

Therefore, to reproduce experimental band profiles of acetone Eq. (6) was used, in which the second term including the adsorbed phase concentration was canceled. The axial dispersion coefficient was calculated from Eq. (4) with $\kappa = 48$, as it is recommended for laminar flow in a straight tube [34,35], and used in simulations without any further adjustments. The quality of predictions is illustrated in Fig. 3A.

The accuracy of the model predictions was verified versus the experimental band profiles recorded at different mobile phase velocities, i.e., at different residence times in ECV. In case of acetone the model predictions reproduced experimental profiles over the whole range of the mobile flow rates investigated. In case of the macromolecules, the model accuracy was very good or good for the flow rates $Q < 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, i.e., $u < 150 \times 10^2 \text{ cm h}^{-1}$ in the capillaries with I.D. 0.05 cm , which corresponded to $u < 150 \text{ cm h}^{-1}$ in the column with I.D. 0.5 cm . Above that value the model failed in the predictions, despite the criterion for the critical length $L_{conn} < L_{crit}$ was met. For all the model macromolecules the pro-

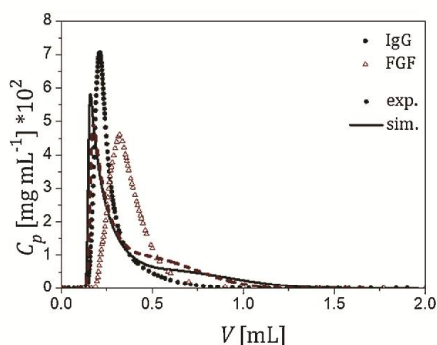


Fig. 5. Discrepancy between the model predictions and the experimental band profiles for the mobile phase velocity $u = 300 \times 10^2 \text{ cm h}^{-1}$ (flow rate $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$) in the connecting capillaries; points – experiment, lines – simulation.

file shape became more symmetrical with increasing the mobile phase velocity, which was against to the trends reported for small molecules [20,31], and to the model predictions. The discrepancy between the simulations and experimental bands depended on the protein type. The problem is illustrated in Fig. 5, where a comparison between band profiles of IgG and FGF2 calculated and recorded experimentally at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$ is shown.

In case of the FGF2 profiles (recorded in the previous study [10]), the discrepancy between the model predictions and experimental data was particularly pronounced. It is evident that the elution pattern of proteins and its dependency on flow turbulence is different than that for small-molecule compounds. Because of very low protein concentration in chromatographic pulses, viscosity effects could be excluded as a possible reason for the reported phenomenon. Probably, an explanation of that phenomenon requires a more advanced approach, which may account for the space orientation of the macromolecules and possibility of their interactions. Anyway, the range of mobile phase velocity in the column $w < 150 \text{ cm h}^{-1}$ corresponds to that typically used for small columns in protein chromatography.

4.1.2. Large-volume injections

The large-volume injections, i.e., with samples of 1 or 2 mL, were performed using the injection loop capillaries or the superloop (Section 3.3.2., Fig. 1B). For all the model macromolecules the length

of the loop capillary exceeded the critical value, whereas the length of the connecting capillary was below that value at any flowrates used. In such a case, the distance, L , that had to be made by the front of the sample plug to reach the outlet of the connecting capillary was smaller than L_{crit} , whereas the distance to be covered by the rear part in the injection loop capillary was above the critical value. Therefore, two different model equations were used to simulate the band migration in both parts, i.e., for a part of the sample plug, for which $L < L_{crit}$, the set of Eqs (1) and (2) was used, whereas for a part for which $L > L_{crit}$ Eq. (4) was employed with the dispersion coefficient given by Eq. (5). The boundary conditions were adjusted accordingly, as described in Section 2.2. The value κ was adjusted by fitting the model simulations to the experimental profiles, it and was equal to $\kappa = 470$ for all macromolecules. That empirical parameter lumps hydrodynamic conditions for macromolecules in the injection capillary coil.

For acetone, the condition $L > L_{crit}$ was always met, therefore, Eqs (4) and (5) were used for the prediction of band profiles at $\kappa = 48$, in the same way as in case of small-volume injections, without further adjustments. This again indicates differences in flow behavior of small- and macromolecule compounds ($\kappa = 48$ versus $\kappa = 470$), which cannot be explained by the model used.

In case of the injections through the superloop, the length of the loop occupied by the sample solution was very small (max $L_{inj} = 0.28 \text{ cm}$), therefore, the effect arising from the flow behavior of the solutes in the superloop was negligible, and the rectangular injection profile was assumed at the inlet of the connection capillary. This corresponded to the flow path shown in Fig. 1A and the boundary conditions given by Eq. (9).

Typical experimental data and the model simulations of band profiles obtained for both injection systems are depicted in Fig. 6A and B. The protein band profiles are characterized by strong asymmetry of their fronts; i.e., a fast rise in the concentration in the lower part of the breakthrough curve and a slow concentration transition in its upper part.

The asymmetry is pronounced with increasing molecular weight of the solute and decreasing the value of the diffusion coefficient. This stems from the same effect, which caused peak deformations for the small-volume injections, i.e., from non-uniform velocity distribution and slow diffusivity of macromolecules. In case of both, the injection loop capillary and the superloop, the front of the breakthrough curves migrates through (almost) the same distance to reach the end of the connection capillary; therefore, the asymmetry of the front did not depend on the injection method. However, the band profiles of the samples injected through the large loop capillaries are characterized by

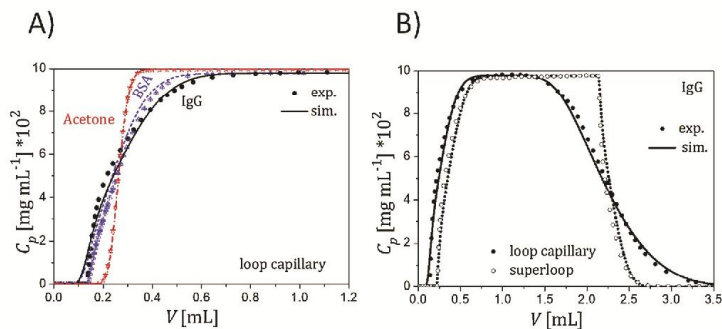


Fig. 6. Band profiles in ECV for the large-volume (2 mL) injections. A) Fronts of breakthrough curves for the proteins and acetone – injections through the loop capillary; B) comparison of the IgG bands for the injections through the loop capillary and the superloop.

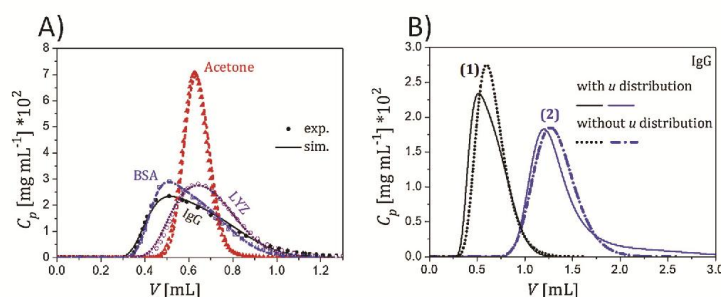


Fig. 7. Typical band profiles of different proteins eluted from the column. A) Comparison of the experimental data and the model simulations under non-adsorbing conditions; B) comparison of the model solutions with the radial velocity distribution, or with the lumped apparent dispersion coefficient in ECV, peaks (1) – non-adsorbing conditions; peaks (2) – adsorbing conditions with the retention factor $k = 1.3$, the mass transfer coefficient (Eq. (5)) $k_m = 0.03$, and the column dispersion coefficient $D = 5.0 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

long tailing (Fig. 6B) that arose from dispersion of the rear part of the sample plug, which had to pass much longer distance compared to that injected through the superloop. The model simulations reproduced correctly the reported trends regardless of the sample volume injected.

4.2. Band broadening in the presence of the column

The pulse experiments were repeated in the presence of the column. The deformation of peaks in ECV contributed to band broadening of the column peaks. In case of small injections, the flow path of the solutes was divided into three parts: the pre-column connection capillary (before the column), the column, and the post-column connecting capillary (after the column), which is illustrated in Fig. 1C and D. To simulate the band profiles in the capillaries, the same algorithm was used as that described for the elution in ECV. The band migration in the column was simulated using Eqs. (4) and (5), in which an adjustable parameter was the apparent dispersion coefficient in the column. It can be expected that in a short column the velocity distribution in radial direction is heterogenous; however, because of the presence of stationary phase that effect is much less pronounced than in an empty capillary. This was confirmed by the model predictions, which revealed that the contribution of dispersion in the column to band broadening was of minor importance. The simulations were performed for non-adsorbing conditions, for which the adsorbed phase concentration in Eq. (4) was set equal to zero, and Eq. (5) was dropped, or for adsorbing conditions in a linear range of the isotherm. The column length was equal to the length of the bed (1.4 cm) extended with the length of the column hardware, i.e. 0.24 cm in the inert part of the column length (without adsorption). For the simulation of the acetone peaks, the apparent bed porosity $\varepsilon_{tot} = 0.95$ was used (Section 3.3.1). The apparent bed porosity with respect to the protein was found by adjusting the peak retention simulated to the experimental one. In case of IgG, the apparent bed porosity was $\varepsilon_{tot} = 0.78$, for BSA 0.75, and for LYZ, which could easier accommodate in large pores (ca 130 nm [38]) of the resin particles, it was 0.95. Moreover, since neither the lengths of both connection capillaries $L_{con,in}$ and $L_{con,out}$ nor the total length ($L_{tot} = L_{con,in} + L_{con,out}$) did not exceed the critical value (L_{crit}), the band broadening in the pre- and post-column capillaries was additive. This means that the same band shapes could be obtained when two connecting capillaries were replaced either with a single capillary with the length L_{tot} at the column inlet or at the column outlet since the total residence time in the capillary system in both cases was the same. This is valid for non-adsorbing conditions or adsorption within the linear range of the isotherm. In case of non-linearity in the process thermodynamics or hydrodynamics, which were not

accounted for in this study, the band broadening effect may be not additive.

Typical chromatograms obtained for the macromolecules and acetone under non-adsorbing conditions and corresponding simulations are shown in Fig. 7A. As mentioned above, the peak asymmetry was determined by flow behavior in ECV, whereas the contribution of dispersion in the column to the band broadening was of minor importance.

To illustrate the effect of heterogeneity of the radial concentration profiles in ECV on the band shape, the model was additionally solved using the apparent dispersion coefficient determined from the peak variances for both ECV and the column. Exemplary solutions of the model in which the radial concentration heterogeneity was accounted for, or lumped into the apparent dispersion coefficient are compared in Fig. 7B. A typical comparison of the results is presented for both non-adsorbing and adsorbing conditions. The extent of discrepancy between the results of the simulations depends on the length of the column, its efficiency, mass transfer kinetics and the adsorption strength. The shorter residence time of the protein in the column, the more important the ECV effect is. Furthermore, the ECV effect enhances with increasing column efficiency. Peak variance and its skewness could be used as a criterion for quantification of the ECV effect and correlating its value with the residence time and the mass transport kinetics, which however would require an additional detailed analysis. In general, in case of small columns with volume of 1 mL and less, the ECV effect has to be always taken into account while determining parameters of the process.

The model was also used to predict the band profiles obtained from the column for the large-volume injections. All model coefficients were set the same as those determined for the small-injections. Typical experimental data and the results of simulations are depicted in Fig. 8.

The band shapes for the proteins are characterized by asymmetrical front with the dispersed upper part, which may suggest that the solutes are adsorbed on the resin, though their elution was performed under non-adsorbing conditions. The calculation of the adsorbed phase concentration from the breakthrough curves by use of the so-called frontal analysis method (see e.g. [34]) provides nonzero values. However, that stems only from the ECV effect, which was confirmed by the model predictions. The shape of the breakthrough front does not depend on the injection method, whereas the courses of the concentration decay in the desorption parts of the band profiles obtained by injection using the loop capillary and the superloop differ markedly. In case of the superloop injection, peak tailing is markedly reduced compared to that for the loop capillary. This reflects the elution pattern in ECV presented

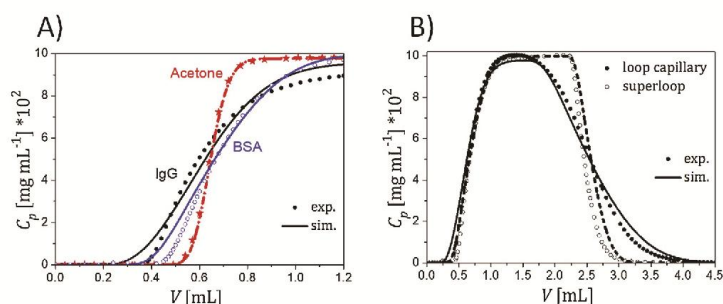


Fig. 8. Typical band profiles at the column outlet for the large-volume (2 mL) injections. A) Fronts of IgG bands for the injections through the loop capillary; B) comparison of the IgG band shapes for the injections through the loop capillary and the superloop.

above. Therefore, misleading conclusion concerning the adsorption behavior of proteins may be drawn, if the presence of the ECV effect is not taken into account. The contribution of that effect to the chromatographic system efficiency depends on the column performance and its length, as well as the adsorption strength, similarly as reported above for the small-injection case.

5. Conclusions

The band deformation and broadening of macromolecules in extra-column volume (ECV) was analyzed experimentally and theoretically. The effect stemmed from the radial velocity distribution in connecting capillaries and slow diffusivity of macromolecules, which caused non-uniform distribution of the concentration profiles in the radial direction. In case of a small molecule compound (acetone), the length of the connecting capillaries was sufficient so that axial dispersion governed the retention mechanism; therefore, the peak deformation was not observed. The difference in the flow behavior between the macro and small molecules caused them to migrate through the connection capillaries with different velocities. Therefore, they were partly separated at the outlet of the system. The ECV effect depended on the geometry of the injection system used, i.e., an injection loop capillary or a superloop. In the former case, a strong tailing of band profiles was indicated that stemmed from hydrodynamic conditions in long injection loop capillaries.

To quantify the band deformation of macromolecules, a mathematical model was used which accounted for the radial velocity distribution and slow diffusivity of macromolecules. The model reproduced well the band profiles for the mobile velocity less than $150 \times 10^2 \text{ cm h}^{-1}$ in the capillary (that is 150 cm h^{-1} in the small column). The diffusion coefficients estimated were in close agreement to those reported in literature, therefore, the elution of protein through the capillary system could potentially be exploited to evaluate their diffusivity in different solutions.

The ECV effect contributed strongly to the elution behavior of macromolecules in the small column. Peak tailing was observed for small-volume injections and asymmetry of breakthrough curve fronts for large-volume injections. Neglecting the ECV effect may result in a wrong interpretation of the protein retention mechanism.

Acknowledgment

Financial support of this work by National Science Center Poland (project DEC-2016/22/M/ST8/00193) is gratefully acknowledged.

Professor Abraham Lenhoff is gratefully acknowledged for fruitful discussion.

References

- R. Bhambure, K. Kumar, A.S. Rathore, High-throughput process development for biopharmaceutical drug substances, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 127–135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tbttech.2010.12.001>.
- R. Bhambure, A.S. Rathore, Chromatography process development in the quality by design paradigm i: establishing a high-throughput process development platform as a tool for estimating characterization space for anion exchange chromatography step, *Biotechnol. Progr.* 29 (2013) 403–414, <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.1705>.
- S. Chhatre, N.J. Titchener-Hooker, Review: microscale methods for high-throughput chromatography development in the pharmaceutical industry, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 927–940, <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2125>.
- A. Wiesel, H. Schmidt-Traub, J. Lenz, J. Strube, Modelling gradient elution of bioactive multicomponent systems in non-linear ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1006 (2003) 101–120, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00554-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00554-5).
- A. Osberghaus, S. Hepbildikler, S. Nath, M. Haindl, E. von Lieres, J. Hubbuch, Optimizing a chromatographic three component separation: a comparison of mechanistic and empiric modeling approaches, *J. Chromatogr. A* 1237 (2012) 86–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.029>.
- T.C. Huuk, T. Hahn, A. Osberghaus, J. Hubbuch, Model-based integrated optimization and evaluation of a multi-step ion exchange chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 136 (2014) 207–222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.012>.
- E.J. Close, J.R. Salm, D.G. Bracewell, E. Sorensen, A model based approach for identifying robust operating conditions for industrial chromatography with process variability, *Chem. Eng. Sci.* 116 (2014) 284–295, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.03.010>.
- W.R. Keller, Steven T. Evans, Gisela Ferreira, David Robbins, Steven M. Cramer, Use of minicolumns for linear isotherm parameter estimation and prediction of benchtop column performance, *J. Chromatogr. A* 1418 (2015) 94–102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.038>.
- R. Khalaf, J. Heymann, X. LeSaout, F. Monard, M. Costioli, M. Morbidelli, Model-based high-throughput design of ion exchange protein chromatography, *J. Chromatogr. A* 1459 (2016) 67–77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.076>.
- W. Marek, D. Sauer, A. Dürauer, A. Jungbauer, W. Piatkowski, 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.057>.
- O. Nilsson, On the estimation of extra-column contributions to band broadening through measurements on an authentic chromatogram, *J. HRCCC* 2 (1979) 605–608.
- K.-P. Hupe, R.J. Jonker, G. Rozing, Determination of band-spreading effects in high-performance liquid chromatographic instruments, *J. Chromatogr.* 285 (1984) 253–265.
- E.V. Dose, G. Guiochon, Effects of extra column convolution on preparative chromatographic peak shapes, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1723–1730.
- O. Kaltenbrunner, A. Jungbauer, S. Yamamoto, Prediction of the preparative chromatography performance with a very small column, *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 41–53.
- F. Gritti, G. Guiochon, Accurate measurements of peak variances: importance of this accuracy in the determination of the true corrected plate heights of chromatographic columns, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4452–4461, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.035>.

- [16] K. Vanderlinden, K. Broeckhoven, Y. Vanderheyden, G. Desmet, Effect of pre- and post-column band broadening on the performance of high-speed chromatography columns under isocratic and gradient conditions, *J. Chromatogr. A* 1442 (2016) 73–82, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.016>.
- [17] A. Prüss, C. Kempter, J. Gysler, T. Jira, Extracolumn band broadening in capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 129–141, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01290-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01290-1).
- [18] D.V. McCalley, Instrumental considerations for the effective operation of short, highly efficient fused-core columns. Investigation of performance at high flow rates and elevated temperatures, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4561–4567, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.070>.
- [19] P. Aggarwal, K. Liu, S. Sharma, J.S. Lawson, H. Dennis Tolley, M.L. Lee, Flow rate dependent extra-column variance from injection in capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1380 (2015) 38–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.017>.
- [20] K.J. Fountain, U.D. Neue, E.S. Grumbach, D.M. Diehl, Effects of extra column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2- μm porous particles, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5979–5988, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.044>.
- [21] F. Gritti, G. Guiochon, On the minimization of the band-broadening contributions of a modern, very high pressure liquid chromatograph, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4632–4648, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.024>.
- [22] J.P. Grinias, B. Bunner, M. Gilar, J.W. Jorgenson, Measurement and modeling of extra-column effects due to injection and connections in capillary liquid chromatography, *Chromatography* 2 (2015) 669–690, <http://dx.doi.org/10.3390/chromatography2040669>.
- [23] Sz. Fekete, J. Fekete, The impact of extra-column band broadening on the chromatographic efficiency of 5 cm long narrow-bore very efficient columns, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5286–5291, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.045>.
- [24] N. Wu, A.C. Bradley, Ch.J. Welch, L. Zhang, Effect of extra-column volume on practical chromatographic parameters of sub-2- μm particle-packed columns in ultra-high pressure liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 35 (16) (2012) 2018–2202, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201200074>.
- [25] D. Hlushkou, F. Gritti, G. Guiochon, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, Effect of adsorption on solute dispersion: a microscopic stochastic approach, *Anal. Chem.* 86 (9) (2014) 4463–4470, <http://dx.doi.org/10.1021/ac500309p>.
- [26] S. Schweiger, A. Jungbauer, Scalability of pre-packed preparative chromatography columns with different diameters and lengths taking into account extra column effects, *J. Chromatogr. A* 1537 (2018) 66–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.022>.
- [27] J.G. Atwood, M.J.E. Golay, Early phases of the low dispersion of a sample injected in poiseuille flow, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 353–370.
- [28] J.G. Atwood, M.J.E. Golay, Dispersion of peaks by short straight open tubes in liquid chromatography systems, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 97–122.
- [29] J.S. Vrentas, C.M. Vrentas, Dispersion in laminar tube flow at low Peclet numbers or short times, *AIChE J.* 34 (1988) 1423–1430.
- [30] A. Shankar, A.M. Lenhoff, Dispersion in round tubes and its implications for extracolumn dispersion, *J. Chromatogr. A* 556 (1991) 235–248.
- [31] A. Shankar, A.M. Lenhoff, Dispersion in laminar flow in short tubes, *AIChE J.* 35 (1989) 2048–2052.
- [32] K. Broeckhoven, G. Desmet, Numerical and analytical solutions for the column length-dependent band broadening originating from axisymmetrical trans-column velocity gradients, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1325–1337, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.065>.
- [33] U. Tallarek, E. Rapp, T. Scheenen, E. Bayer, H. Van As, Electroosmotic and pressure-driven flow in open and packed capillaries: velocity distributions and fluid dispersion, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2292–2301, <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2125>.
- [34] G. Taylor, Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube, *Proc. Roy. Soc. A* 186 (1953) 317.
- [35] R. Aris, On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube, *Proc. Royal Soc. Lond. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 235 (1200) (1956) 67–77.
- [36] G. Guiochon, A. Felinger, D. Shirazi, A. Katti, *Fundamentals of Preparative and Non-Linear Chromatography*, sec. ed., Academic Press, 2006, pp. 281–345.
- [37] R. Muca, W. Piątkowski, D. Antos, Effects of thermal heterogeneity in hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6716–6727, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.007>.
- [38] G. Carta, A. Jungbauer, *Protein Chromatography: Process Development and Scale-up*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, Weinheim, 2010.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography

Krystian Baran^a, Patrycja Zimoch^b, Artur Stańczak^c, Wojciech Piątkowski^a, Dorota Antos^{a,*}^a Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, PL^b Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, PL^c Polpharma Biologics, Gdańsk, PL

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2021

Revised 24 September 2021

Accepted 1 October 2021

Available online 8 October 2021

Keywords:

pH gradient

Mathematical modelling

Monoclonal antibody

Variant separation

ABSTRACT

A procedure for adjusting the content of charge variants of monoclonal antibody by ion exchange chromatography has been developed. The band splitting phenomenon was utilized to split the protein load into two parts, i.e., the flowthrough and bound fractions, which were either enriched or depleted with some of variants. The phenomenon was triggered by thermodynamic effects resulting from oversaturation of the resin binding sites at high column loadings as well as from kinetic effects arising from limited rates of mass transport. Cation exchange chromatography (CEX) and anion exchange chromatography (AEX) separations were examined, with the reverse order of the variant elution: acidic, main, basic in CEX, and basic, main, acidic in AEX, and the corresponding reverse enrichment tendency in the collected fractions. The separations were performed by pH gradient, whose course was simplified to two stages: isocratic loading and washing at mild pH to load and partly elute the protein, followed by a rapid pH change towards non-binding conditions to desorb the remains of the protein load. To improve yield of the operation, possibility of recycling of waste fractions was considered. To predict the process performance, a dynamic model was developed, which accounted for both adsorption kinetics and thermodynamics.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are a fast growing class of therapeutic proteins that have a potential to cure a number of previously "incurable" diseases, contributing to improvements in health care [1–4]. mAbs are often characterized by high specificity and efficacy and limited side effects [5,6]. Large size and complexity of the structure of intact mAb makes its molecules prone to modifications that may occur during expression or due to enzymatic and chemical reactions. Therefore, the formulation of therapeutic mAbs often results in different types of microheterogeneity. Formation of charge variants is one of the most important sources of microheterogeneity. It mainly arises from sialylation of the glycan, oxidation of methionine residues, N-terminal lysine processing, and isomerization of aspartic acid [7–10]. Charge variants can be divided into low-pI, mid-pI, and high-pI isoforms, which are termed as "acidic", "main" and "basic" variants. Several researches reported decreased therapeutic potency of acidic variant and increased potency of basic variants compared to the main species [11–16]. Hence, reduction in the content of the acidic charge vari-

ants in the downstream pools is often prioritized over reduction in basic charge variants. Furthermore, the content of the acidic species often falls to category of product quality attributes and has to meet a manufacturer defined acceptance criterion [17,18]. Nevertheless, it has been indicated that the effect of the presence of acidic variants on the properties of the overall mAb pool is often insignificant at reported literature values of $\sim 25 \pm 5\%$ acidic variant level [17,18].

Though modification of upstream processing can be used to alter charge variant content, downstream processing is typically used for that purpose. Since most of mAbs have a basic property with a relatively high isoelectric point ($pI > 7$), cation exchange chromatography (CEX) is regarded as standard technique for separation of mAb charge variants [19–24]. For the separation of the more basic oxidized variants of intact mAbs, anion-exchange chromatography (AEX) can also be applied [25].

The separation is typically performed with salt or pH gradients. In several separation cases, dual pH-salt gradients were also found to be efficient [21,26]. However, use of salt or dual gradients for the protein elution, requires optimization of the pH and the NaCl concentration in the loading and elution buffers for each individual mAb [27]. Separations using pH gradients is simpler in that respect. That technique was successfully used in several studies for separation of the mAb charge variants [28–32]. pH gradient may

* Corresponding author.

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

be generated on strong ion exchangers by mixing two buffer solutions with predefined pH values at the column inlet (external gradient), or on either strong ion exchangers using adsorbing buffer components or weak ion exchangers using non-adsorbing buffers (internal gradients) [29,33–39].

Nevertheless, pH gradients for separations of mAb variants are typically realized within a wide pH range that covers binding and elution conditions. Capacity limits of buffers used ion exchange chromatography result in non-linearity of pH gradients; deviation from pH gradient linearity is a cause of lowered resolution [31]. Therefore, complex multicomponent buffering mixtures are required [31,40], which can be acceptable for analytical purposes but problematic in preparative protein separations.

In general, regardless of the gradient mode, the similarity of surface charge properties between mAb charge variants makes their separations by IEX very difficult. Low separation selectivity causes profiles of variants to overlap. Displacement chromatography has shown some potential to improve the separation effectiveness, since it provides better resolution than other elution modes [41,42]. However, the separation mechanism is based on use of strongly adsorbing displacer that is difficult for removing, which hinders implementation of that technique.

To improve the separation performance and mitigate the overlapping of variants profiles, multicolumn chromatography was exploited based on countercurrent solvent gradient [43], multicolumn recycling method [44], or multicolumn self-displacement [45], which allowed the enrichment of the desired variants to a high yield. However, the realization of multicolumn processes requires special equipment systems, whose performance is difficult to optimize and control.

Furthermore, large-scale chromatography is realized at high throughput. Therefore, mAbs are loaded into IEX columns at pH far different from their pI, at which they are highly charged, thus their binding capacity is high. Yet, strong binding to the resin may be a cause of destabilization of mAb structure on the adsorbent surface, its unfolding and aggregation, which reduces yield and recovery of the protein [46–48].

In this study, an alternative approach is developed based on utilization of an IEX batch column, in which the separation is performed by pH changes within a relatively narrow range; at mild pH below and above pI of the mAb variants, under conditions of oversaturation of adsorption sites by the protein load. In the procedure developed, pH gradient is reduced to two steps, i.e., isocratic loading and washing, in which the feed containing the mixture of the mAb variants is loaded and partly eluted in the flowthrough fraction, and desorption, in which the bound fraction is pooled. The flowthrough fraction is enriched with the least retained variant and depleted with the most retained one, whereas in the bound fraction the enrichment tendency is reversed. To describe the process quantitatively, a model of the process dynamics is formulated and used for predicting the separation course of the mAb stock materials differing in the variant content.

Summarizing, the goal of the study is to develop a procedure for fast adjustment of the content of mAb variants, i.e., to reduce or enrich the mAb pool with certain variants at required level, along with a simple mathematical tool for the process design. The operation can be performed at mild pH, at which the protein structure stability is preserved. Also, it does not require neither special equipment nor sophisticated gradient shape.

2. Theory - dynamic model

To simulate the band profiles of variants in a chromatographic column, a kinetic-dispersive model was employed [49–51]:

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

where C_i is concentration of i -th variant in the mobile phase in mg mL^{-1} , q_i is the adsorbed concentration of i -th variant in $\text{mg mL}_{\text{matrix}}^{-1}$ (matrix denotes the solid backbone of the resin), 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, which lumps dispersion and diffusional mass transfer effects, 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.

The adsorption kinetics was quantified as follows:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{d,i} \left[K_{app,i} C_i \left(q_i^\infty - \sigma_{app,ii} q_i - \sum_{j \neq i} \sigma_{app,ij} q_j \right) - q_i \right] \quad (2)$$

where $k_{d,i}$ is the lumped mass transfer coefficient, q_i^∞ is the individual binding capacity of i -th variant, which can be obtained by normalization of the total resin binding capacity, q^∞ , with respect to the individual exclusion factor σ_i , i.e., $q_i^\infty = \frac{q^\infty}{\sigma_i}$, $\sigma_{app,ij}$ is the normalized apparent exclusion factor, $\sigma_{app,ij \neq i} = \frac{\sigma_j}{\sigma_i}$, which accounts for the contributions of steric hindrances and molecular interactions in the adsorbed phase, for $j = i$: $\sigma_{app,ii} = 1$. Since the variants are similar in their structures, $\sigma_{app,ij}$ was assumed to be the same for all of them, $\sigma_{app,ij \neq i} = \sigma_{app}$. The coefficient $K_{app,i}$ is the apparent equilibrium constant.

When all exclusion factors are equal to 1, $\sigma_{app,ij} = \sigma_{app,ii} = 1$, Eq (2) at steady state (i.e., at the adsorption equilibrium) converts to the competitive Langmuir isotherm. The values $\sigma_{app,ij} > 1$ indicate negative deviations from the Langmuir isotherm, i.e., negative cooperative adsorption that is attributed to the occurrence of repulsive interactions or steric exclusion of adsorbed molecules of different species, which reduces their concentration in the adsorbed phase. The values $\sigma_{app,ij} < 1$ indicate contribution of positive deviation from the Langmuir isotherm, i.e. positive cooperative adsorption, termed also as synergistic adsorption, which stems from attractive interactions of protein molecules in the adsorbed phase and results in enhancement of adsorption [52–55].

Initial and boundary conditions were specified according to refs. [46–48]. In case of large protein loads, the extra-column volume profile of the protein was used to formulate the boundary condition at the column outlet. A numerical solution of the combined Eqs. (1) and (2) was obtained using a finite difference method (details of that method are given in e.g., [56]).

3. Experimental

3.1. Instruments

Äkta purifier with UV, pH and conductometric detectors with a data station (Cytivia, Uppsala, Sweden) was used for the semi-preparative IEX separations. The sample injector was an injection valve with a loop capillary of 5 mL volume. The semi-preparative separations were performed using Tricorn columns, I.D. 0.5 cm (Cytivia) equipped with stop-plugs and connectors.

A Dionex UltiMate 3000 System (Thermo Scientific, Waltham, USA) was used for the CEX HPLC analysis of the variant content. An Infinite 200 PRO multimode microplate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) was used to determine the overall protein concentration.

Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units, with volume of 4 and 15 mL and molecular weight cut-off of 10 kDa (Merc Millipore, Darmstadt, Germany) were used for buffer exchange and concentration of protein solutions.

3.2. Materials

The monoclonal antibody mAb2 (IgG1, MW = 148 kDa, purity > 96%), was provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Poland).

Table 1
Average content of the stock materials.

Stock	av %	mv	bv
L-av	24	52	24
M-av	45	40	15
H-av	61	35	4.0

Table 2
Properties of the resins used for the semi-preparative separation of mAb2 variants.

Resin name	TOYOPEARL GigaCap S-650M	POROS™ XQ
Acronym	TP GigaCap	POROS
Resin type	CEX	AEX
Functional group	Sulfonate	Quaternary amine
Matrix	Methacrylic polymer	Crosslinked poly (styrene-divinylbenzene)
Resin mean size μm	50-100	50

Table 3
Compositions of buffers used in the analytical CEX HPLC separation of the variants.

Buffer % v/v	25 mM NaH_2PO_4	25 mM Na_2HPO_4	125 mM NaCl
A	35.6	44.4	20
B	8.8	71.2	20
C	5.0	5.0	90

The mean isoelectric points of variants were: acidic variant (av) $\text{pI} = 8.7$, main variant (mv) $\text{pI} = 8.9$, basic variant (bv) $\text{pI} = 9.1$. The stocks of the mAb2 post-processing material were provided with different variant content: a medium acidic variant content (M-av) and a high acidic variant content (H-av). Stock materials with a low acidic variant content (L-av) were composed of fractions of IEX effluents obtained in the semi-preparative separations. The average variant content of different batches obtained from the same processing procedures (both by Polpharma Biologics and acquired in the semi-preparative separations) are given in Table 1.

Two IEX resins were used for the semi-preparative separations: a strong CEX resin - TOYOPEARL GigaCap S-650M (Tosoh Bioscience), and a strong AEX resin - POROS™ XQ (Thermo Fisher Scientific). The properties of the resins are presented in Table 2.

The binding and washing of the protein on the CEX resin was performed using 0.025 M disodium phosphate buffer (PB) pH 6.5, whereas for desorption PB with pH 9.0 was used. For binding and washing of the protein in the AEX column, a 0.05M TRIS-HCl buffer pH 9.3 was used, and for desorption a 0.04M sodium acetate buffer with pH 5.5 was used. The columns were regenerated with a 1 M NaCl solution in adequate desorption buffer.

The individual variant content in the mAb2 samples was determined using an analytical CEX HPLC column ProPac™ WCX-10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 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 is presented in Table 3.

3.3. Procedures

3.3.1. Preparation of mAb2 samples for semi-preparative chromatography and for the isotherm measurements

The Amicon filters were used for buffer exchange and the sample concentration.

A 5 mL of the mAb2 solution was added to the Amicon filter, covered with a portion of 10 mL of the binding buffer, and centrifuged for 30 min. The operation was repeated with a fresh portion of the binding buffer several times until the desired pH was obtained and the sample conductivity complied with the buffer conductivity.

3.3.2. Measurements of isotherms

The adsorption isotherms were determined at different pH using appropriate buffers; for the CEX resin - 0.05 M acetate buffer with pH 5.5, or 0.025 M PB with pH: 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and for AEX resin - 0.05 M TRIS-HCl buffer with pH: 9.3, 9.2, 9.15, 9.0, 8.8.

A portion of the resin suspension was transferred to a spin-x Eppendorf with a cellulose membrane and washed three times with the binding buffer and centrifuged after each step. The last centrifugation was carried out for 30 minutes to remove liquid adhered to the resin surface.

Next, samples of about 10 mg of the resin were taken and placed into Eppendorf tubes. A 0.7 mL sample of the protein solution in the adequate buffer with the concentration ranging from 0.1 to 8 mg mL^{-1} was added and incubated on a circular rotator at 15 rpm until no noticeable change in the supernatant concentration was observed, i.e. for 2h. 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 (i.e., the whole content of mAb2) was performed using the microplate reader, the content of variants was determined using CEX HPLC (section 3.3.6).

The overall equilibrium concentration of all variants, q_{ov}^* , and the individual equilibrium concentration of each variant, q_i^* , in the adsorbed phase was calculated from the following equations:

$$q_{ov}^* = \frac{V(C_{0,ov} - C_{ov})}{m_a} \quad (3)$$

$$q_i^* = \frac{V(C_{0,i} - C_i)}{m_a} \quad (4)$$

where V is the solution volume, m_a is the mass of the resin, $C_{0,ov}$, $C_{0,i}$ are the initial overall concentration and the initial individual concentration of each variant in the stock materials ($i = av, mv, bv$), respectively, C_{ov} , C_i are the corresponding overall and individual equilibrium concentrations in the liquid phase (supernatant).

3.3.3. Column packing

A 50% slurry of the appropriate resin was transferred into the Tricorn column. The resin was left for sedimentation, rinsed several times to prevent drying out. After that, the bed was consolidated by pumping a 1 M NaCl solution in phosphate buffer through the column under controlled maximum flow rate. The position of the flow adapter was adjusted according to the bed height until there was no further bed compression. The bed height after compression was about 5 cm for both CEX and AEX resins.

3.3.4. Measurements of packed bed porosity

To determine the packed bed porosity, the elution times were measured for dilute pulses of NaCl using PB in the CEX column or TRIS-HCl in the AEX column as the mobile phase. The specific packed bed porosity for mAb2 was determined from the retention time of a pulse of mAb2 solution eluted under non-binding conditions, i.e., at 1 M NaCl in the mobile phase. The elution times measured were corrected by subtracting the contribution of the extra column volumes. For the CEX column the total porosity was $\varepsilon_t = 0.73$, the specific porosity for mAb2 was $\varepsilon_{t,p} = 0.41$, for the AEX column those values were 0.69 and 0.44, respectively.

Table 4
Conditions for semi-preparative chromatography experiments.

Run no	Resin	Feed comp.	pH load	V_{inj} mL	C_{inj} mg mL ⁻¹	Column load mg mL ⁻¹	Q mL min ⁻¹	pH gradient
1*	CEX	M-av	6.5	5	44	220	0.5	6.5-9.0
	CEX	M-av	6.5	5	44	220	0.2	6.5-9.0
2	CEX	H-av	6.5	5	38.5	192.5	0.5	6.5-9.0
	CEX	M-av	6.5	5	18.3	91.5	0.5	5.5-9.0
4	CEX	M-av	6.5	5	5	25	0.5	5.5-9 (linear, 5 CV)
	AEX	M-av	9.3	5	40	200	0.5	9.3-5.5
6	AEX	M-av	9.3	5	40	200	0.2	9.3-5.5
	AEX	H-av	9.3	5	40	200	0.5	9.3-5.5

*) reference runs used for the model calibration

3.3.5. Semi-preparative chromatography experiments

The column packed with the CEX or AEX resins was equilibrated with the appropriate binding buffer (section 3.2). The protein dissolved in the binding buffer was injected into the column and partially eluted using the same buffer at the flowrate of 0.5 or 0.2 mL min⁻¹. Next, the binding buffer was exchanged with the desorption buffer in a step gradient (0–100% v/v) or in a 5CV linear gradient. During the whole process, including loading, washing and desorption, the column effluent was collected in 1 mL fractions. To calibrate and verify the model, several chromatographic runs were performed, in which the mAb2 load and the mobile phase flowrate was changed (Table 4).

To quantify the band broadening in extra-column volumes, each mAb2 sample was injected into the Äkta system bypassing the column. The recorded profile was used to define the inlet boundary condition for the dynamic model.

3.3.6. Determination of the variant content by CEX HPLC

The samples acquired from the supernatants obtained in the isotherm measurements and in the IEX separations were analyzed by CEX HPLC. Prior to the analysis, the samples were subjected to buffer exchange with the binding buffer (buffer A, Table 3). Then, the samples were injected into the CEX HPLC column equilibrated with buffer A and washed for 5 min with the same buffer. Next, buffer A was exchanged with 100% v/v of buffer B in a 55-min linear gradient. After elution, the column was regenerated using 100% v/v buffer C. The mobile phase flowrate was 0.5 mL min⁻¹. The UV signal of the protein was corrected by subtraction of the blank run of the same gradient program but without the protein. To normalize the results of all analyses, the total mass of the protein injected to the column was kept the same, i.e., 0.05 mg of the protein. For that purpose, the Amicon-filtration of the samples was combined with the concentration analysis using the microplate reader, and then the injection volume was adjusted to load the defined mass of the protein. A typical band profiles recorded are illustrated in Fig. 1. The fraction F_1 was assigned to the acidic variant, F_2 to the main variant, and F_3 to the basic variant, according to the procedure used by Polpharma Biologics. The area under the profiles corresponding to each of fractions was determined and used to calculate the individual variant content.

4. Results and discussion

4.1. Separation concept

As mentioned above, the goal of the separation technique developed was to accelerate the whole process and to simplify the course of pH gradient to two stages:

- isocratic loading and washing at mild pH, for the resin oversaturated by a high protein load, which was accompanied by partial elution of the protein in the flowthrough fraction,
- fast change in pH towards non-binding conditions to desorb the bound fraction of the protein.

The realization of the process was preceded by:

- screening of CEX and AEX resins for the possibility of variant separation at a high binding capacity,
- measurements of adsorption isotherm of the protein,
- determination of the retention behavior of the variants in CEX and AEX columns,
- formulation of the dynamic model to predict the separation efficiency,
- assessment of the possibility of fraction recycling to improve the operation yield.

4.2. Screening of the separation conditions

4.2.1. Selection of the resins for CEX and AEX

The CEX and AEX experiments were preceded by screening different strong cation and anion exchange resins packed in small 1 mL columns to find the best candidates in terms of the capability of separating the mAb2 variants by pH or salt gradients or their combination. In general, the mAb2 variants exhibited very similar retention properties, and therefore they were very difficult to separate. Addition of salt was found to be destructive for the separation selectivity, regardless of the resin used. Therefore, pH gradient was eventually used for the separation. Preliminary separation experiments were performed under low loading conditions with pH linear gradients within pH range 5.5–9.0 for the CEX resins, and 9.3–5.5 for the AEX resins. Finally, the pair of TP GigaCap (CEX) and POROS (AEX) was selected, for which the separation of the variants was feasible though still difficult. In CEX the acidic variant eluted slightly ahead of the main one, however strong overlap was observed between their profiles regardless of the gradient slope and flowrate used. In AEX the elution order was reversed; the overlap was observed for the bands of the basic and main variants, whereas the acidic variant was the strongest retained.

4.2.2. Selection of pH for loading and washing - assessment of the overall binding capacity

To assess the overall binding capacity of mAb2 and its pH dependency, the overall adsorption equilibrium was measured for the stock mixture with a medium content of the acid variant (M-av stock, Table 1). The measurements were performed at different pH of the mAb2 solutions, within the range of pH 5.5–7.5 for the CEX resin, and pH 9.3–8.8 for the AEX resin, according to the procedures reported in sections 3.3.1 and 3.3.2. The results shown in Fig. 2A and 2B represent pseudo-single isotherms of the protein that include the overall contribution of all variants. The overall binding capacity in the M-av stock was estimated based on the isotherm course; it varied from 210 to 63 mg g⁻¹ for the CEX resin (i.e., per g of the centrifugated resin), and from 290 to 23 mg g⁻¹ for the AEX resin. The estimated parameters of the overall (pseudo-single) isotherms (Eq. (2) at $\sigma_{app} = 0$) of the M-av stock are reported in Table S1 and S2 in Supplementary materials.

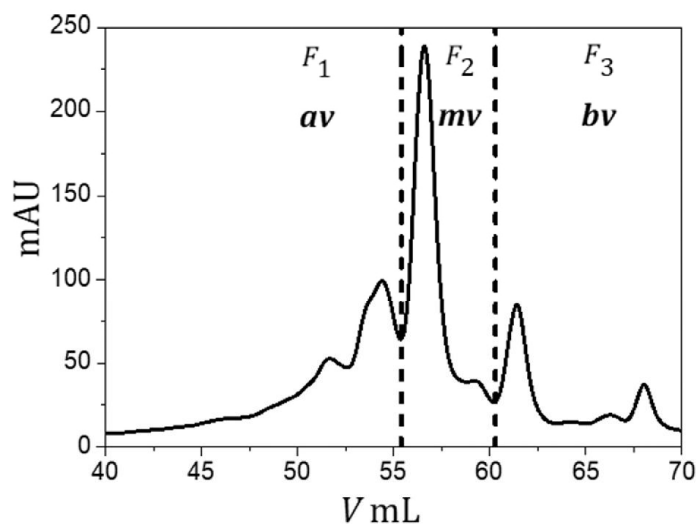


Fig. 1. Typical band profiles in CEX HPLC. F_1 , F_2 , F_3 are the fractions assigned to the variants: *av*, *mv*, *bv*.

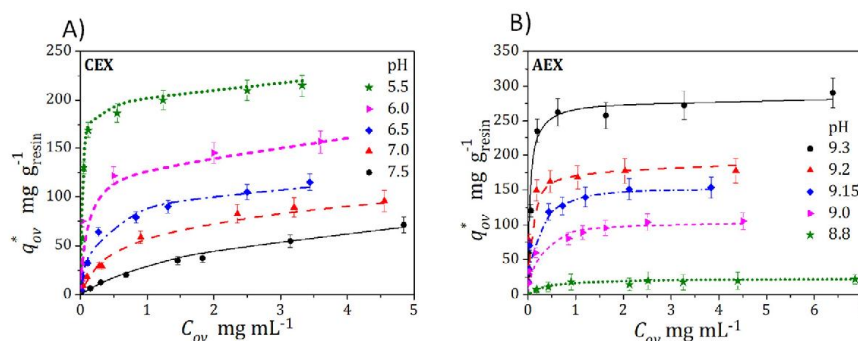


Fig. 2. Overall isotherm courses of mAb2 for the M-*av* stock at different pH of the solutions. A) CEX column, B) AEX column. Symbols – experimental data, lines – simulations.

4.2.3. Preliminary chromatographic experiments

A few chromatographic experiments in the IEX columns were performed, in which the mAb2 solution was loaded under binding conditions, i.e., at pH for which the binding capacity was higher than $100 \text{ mg g}_{\text{resin}}^{-1}$. The column loading was about $200 \text{ mg mL}_{\text{column}}^{-1}$ (mg mAb2 per mL of the column volume), which corresponded to oversaturation of the resin by the protein. The protein peak split into two parts, which occurred due to a combination of thermodynamic effects arising from the oversaturation of the adsorption sites on the adsorbent surface as well as kinetic effects triggered by slow rates of mass transport. In the CEX separations, the first fraction of the protein load was eluted in flowthrough during the loading and washing period at pH 5.5, 6.0 or 6.5, whereas the second one was recovered without mass losses by pH changes in the step gradient or in the 5CV linear gradient towards pH 9.0. In AEX, the protein was loaded and partially eluted at pH 9.3 or 9.2 and desorbed by a pH drop to 5.5. The effluent was fractionated and subjected to the concentration analysis in the microplate reader and to the CEX HPLC analysis to determine the variant content. The collected data were converted into the individual concentra-

tion profiles of the variants. Next, the loading pH was selected for further experiments i.e., pH 6.5 for CEX and 9.3 for AEX., which ensured mild binding conditions for the protein and allowed avoiding the problems with structural instability of mAb2 reported in previous studies [57,58]. The protein load was selected in such a way that the protein band was split approximately in half. Each fraction, which was acquired with about 50% yield, was enriched, or depleted with some of the variants. For both CEX and AEX resins, pH conditions were mild for the protein; no aggregation of the protein, irreversible adsorption, or other symptoms of structural changes upon adsorption were observed. Typical chromatograms are illustrated in Fig. 3A for CEX, and in Fig. 3B for AEX.

4.3. Determination of the individual isotherm coefficients

The overall adsorption equilibrium was measured for all three stock materials at the reference pH selected for the column loading and washing (pH 6.5 for the CEX resin, and pH 9.3 for the AEX resin, section 4.2.3), according to the procedure described in section 3.3.1. The results of the measurements for CEX and AEX are

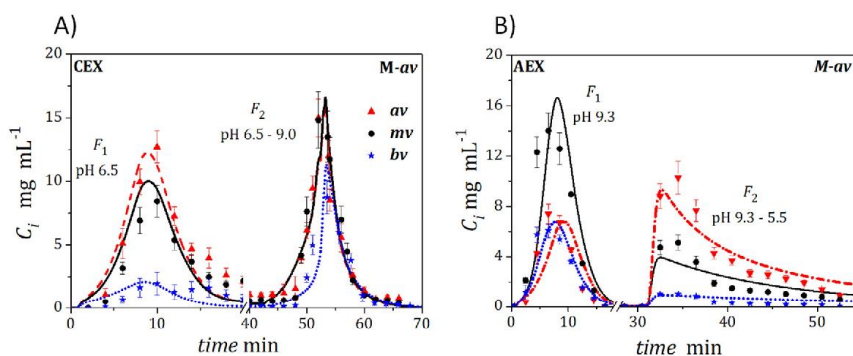


Fig. 3. Individual band profiles of the M-ab2 variants for the M-av stock recorded at the mobile phase flowrate $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{inj} = 5 \text{ mL}$ (Table 4). A) CEX, run 1 ($C_{inj} = 44 \text{ mg mL}^{-1}$), F_1 - fraction enriched with av, F_2 - fraction depleted with av, B) AEX, run 5 ($C_{inj} = 40 \text{ mg mL}^{-1}$), F_1 - fraction depleted with av, F_2 - fraction enriched with av. Symbols - experimental data, lines - model simulations (section 4.5).

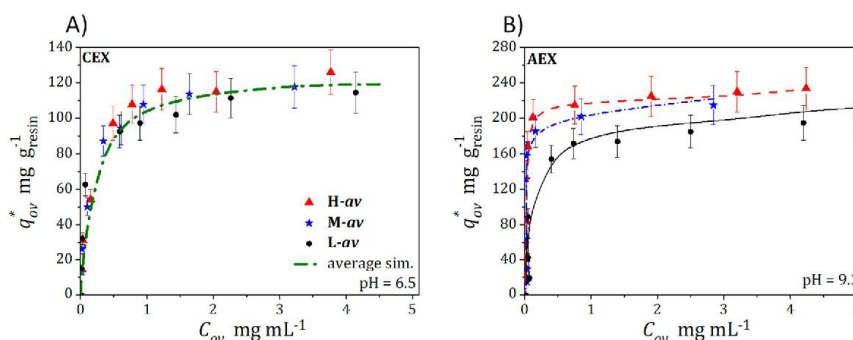


Fig. 4. Overall isotherms of MAb2 for three stock materials: H-av, M-Av, L-av. A) CEX and B) AEX.

Table 5

Model parameters determined under binding conditions (pH 6.5 in CEX, pH 9.3 in AEX), q^{∞} in mg g^{-1} in the isotherm measurements (batch), q^{∞} in mg mL^{-1} in the dynamic measurements, K and σ_{app} - dimensionless, k in s^{-1} , $D_L a$.

Resin	q_{av}^{∞}	q_{mv}^{∞}	q_{bv}^{∞}	K_{av}	K_{mv}	K_{bv}	σ_{app}	$k_{av} \times 10^5$	$k_{mv} \times 10^5$	$k_{bv} \times 10^5$	$D_L \times 10^6$
CEX											
Batch dynamic	122*	122*	122* 170**	5.1* 5.1	5.1* 5.1	5.1* 5.1	0.30	11.1	10.1	8.54	6.79
	156**	161**									
AEX											
Batch dynamic	146	90.0	57.5 46**	312 312	78.9 78.9	34.8 34.8	0.17 0.17	0.148	1.33	4.04	6.01
	175**	108**									

*) mean values for the pseudo-single isotherms (q_{av}^{∞}), **) adjusted based on the column experiments

presented in Figs 4A and 4B in the form of the overall equilibrium concentration of the protein in the adsorbed phase vs its overall equilibrium concentration in the liquid phase, $q_{ov}^* = f(C_{ov})$.

As it can be observed in Fig. 4A, despite the differences in the variant content, the courses of the overall isotherms measured for all three stock materials on the CEX resin are very similar, i.e., within the margin of experimental errors. This indicates that the adsorption selectivity of the variants was very low, which rendered the determination of the individual isotherm coefficients for each variant impossible. Therefore, in this case only the overall isotherm coefficients were determined and averaged for all stock materials (Table 5).

In case of AEX, the difference in the overall isotherm courses obtained for different stock materials was more distinct, therefore the individual isotherms of variants could be assessed. The corre-

sponding data are shown in Fig. 5A-5C. In that case, the strongest adsorption was observed for the H-av stock, with the agreement to pl of the variants, and to the elution order in the AEX column.

The individual adsorption data acquired on the AEX resin were used to determine the isotherm coefficients in terms of the individual equilibrium constant, K_i , the individual binding capacity, q_i^{∞} , and the apparent exclusion factor, σ_{app} . For that purpose, the kinetic model consisting of Eq. (2) was solved for all three variants in their ternary mixtures, and the obtained steady state solutions were fitted to all isotherm data, i.e., obtained for all three stock materials, using an optimization procedure. The values of the individual isotherm coefficients are presented in Table 5. The simulated and experimental isotherms are not perfectly matched (Fig. 5), which can be attributed to both experimental errors arising from inaccuracies of the CEX HPLC analysis of the variant

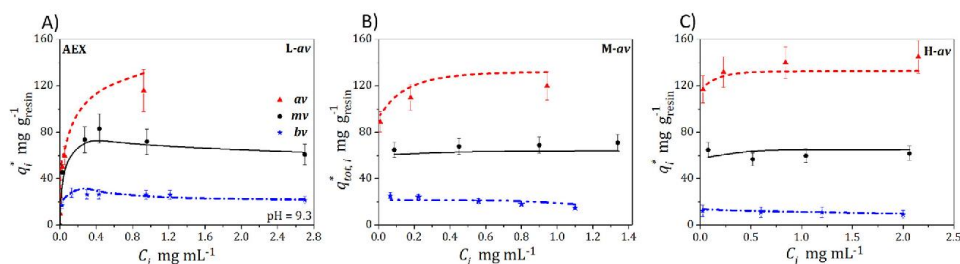


Fig. 5. Individual isotherms of the mAb2 variants: $q_{i,\alpha,i}^* = f(C_i)$ ($i = av, mv, bv$) on the AEX resin at pH 9.3 for different stock materials: A) L-av, B) M-av, C) H-av. Symbols - experimental data, lines - simulations.

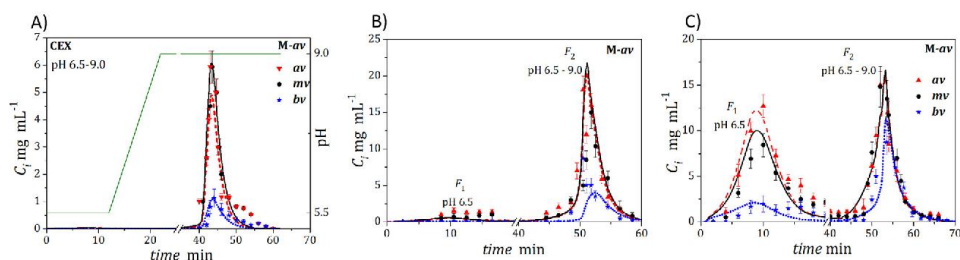


Fig. 6. Individual band profiles of the mAb2 variants eluted from the CEX column under different loading conditions, the mobile phase flowrate $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{inj} = 5 \text{ mL}$ (Table 4). A) run 4 (M-av stock, $C_{ij} = 5 \text{ mg mL}^{-1}$), B) run 3 (M-av stock, $C_{ij} = 18.3 \text{ mg mL}^{-1}$), C) run 2 (H-av stock, $C_{ij} = 38.5 \text{ mg mL}^{-1}$).

content as well as the model simplifications. Nevertheless, the isotherm data obtained revealed distinct trend of a very weak competition between the variants for adsorption sites. This was reflected by the value of the apparent exclusion factor, which was markedly lower than 1 ($\sigma_{app} = 0.17$, Table 5). This implies that the adsorption mechanism was a combination of positive and negative cooperative adsorption, in which adsorption of one variant induced enhancement of adsorption of another one rather than its reduction. The negative cooperative adsorption causes reduction of available adsorption sites for molecules of each variant due to the competition with other variants, and induces the effect termed as self-displacement, in which more retained molecules displace less retained ones. Positive cooperative adsorption can occur as a result of attractive intermolecular interactions that lead to the formation of molecular clusters on the adsorbent surface [50–53].

4.5. Formulation of dynamic model

To simulate the band profiles, the dynamic model expressed by Eqs. (1) and (2) was solved. The model parameters were thermodynamic coefficients: K_i , q_i^∞ , σ_{app} , and the kinetic coefficients: lumped desorption rate coefficient, k_d , and the effective axial dispersion coefficient $D_{L,a}$.

In case of CEX, K_i was set equal to the average overall equilibrium constant, $K_i = K$, determined from the averaged overall isotherm course, while q_i^∞ , σ_{app} and $k_{d,i}$ were estimated to reproduce the individual flowthrough profiles (i.e., in the loading and washing step) of the variants recorded under high overloaded conditions. For that purpose, the reverse method (peak fitting) was employed. The model parameters obtained for the loading and washing steps are reported in Table 5. The differences in the loading capacities obtained from the isotherm data and peak fitting can be attributed to the differences in bulk densities of the packed bed and the centrifugated resin, as well as to model and experimental inaccuracies. To simulate the course of the protein desorption

with the pH gradient, i.e., pH 6.5–9.0, the empirical exponential or polynomial dependencies of K and q_i^∞ versus pH were formulated based on the data reported in Table S1 (Supplementary materials) and adjusted to the ratios between individual q_i^∞ of the variants. The coefficient $k_{d,i}$ in the kinetic equation (Eq. 2) lumps the effect of mass transfer resistances, therefore it was correlated with the retention factor, thus with the Henry constant $H_i = K_i q_i^\infty$ (see e.g. [47,48]). To account for the pH dependence, $k_{d,i}$ was set to vary along with the Henry constant in relation to the loading and washing pH 6.5:

$$\frac{k_{d,i}(\text{pH})}{k_{d,i}(\text{pH}6.5)} = \frac{H_i(\text{pH}6.5)}{H_i(\text{pH})} \quad (5)$$

Obviously, that approach oversimplified the real desorption mechanism, however it reproduced the desorption course with a reasonable accuracy.

The value of $D_{L,a}$ was determined by fitting the model simulations to the protein profiles recorded under non-binding conditions, at which $k_{d,i} = 0$ [47,48]. It was found that both values of $D_{L,a}$ and $k_{d,i}$ did not noticeably depend on the mobile phase flowrate used, i.e., 0.5 mL min^{-1} or 0.2 mL min^{-1} . This probably stems from the influence of flow behavior in the external void volumes on band broadening in short columns, which for each flowrate was independently accounted for in the boundary conditions of the dynamic model (section 2).

In case of AEX, to reproduce the flowthrough band profile, the individual isotherm coefficient, K_i , and the apparent exclusion factor, σ_{app} , determined based on the isotherm courses (Fig. 5) were adopted in the dynamic model, whereas the loading capacities, q_i^∞ , and the kinetic coefficients, $k_{d,i}$, were adjusted by fitting the model simulations to the experimental bands. All parameters obtained are collected in Table 5. To evaluate the model parameters for the desorption step, similar approach was taken as that reported for CEX.

The model simulations confirmed the trend observed in the isotherm data, i.e., weak competitive adsorption, which manifested

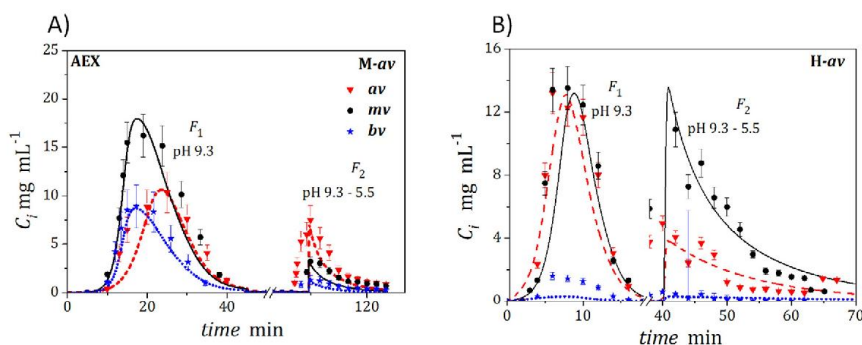


Fig. 7. Individual band profiles of the variants eluted from the AEX column under different flowrates, $C_{inj} = 40 \text{ mg mL}^{-1}$, $V_{inj} = 5 \text{ mL}$ (runs in Table 4). A) run 6 (M-av stock, $Q = 0.2 \text{ mL min}^{-1}$), B) run 7 (H-av stock, $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$).

Table 6
Variant compositions in the flowthrough and bound fractions in CEX.

	M-cv				H-cv			
	av	mv	bv	Y [%]	av	mv	bv	Y [%]
Stock material	42	46	11		60	37	3.0	
F_1 Experiment	49	40	11	58	69	29	2.0	51
F_1 Simulation	52	40	8.0	41	74	25	1.0	45
F_2 Experiment	36	40	23	42	48	46	5.0	49
F_2 Simulation	36	40	24	59	47	47	6.0	55

Table 7
Variant compositions in the flowthrough and bound fractions in AEX.

	M-cv				H-cv			
	av	mv	bv	Y [%]	av	mv	bv	Y [%]
Stock material	43	40	17		60	36	4.0	
F_1 Experiment	24	52	23	64	47	48	5.0	51
F_1 Simulation	24	56	20	56	49	47	4.0	50
F_2 Experiment	62	30	8.0	36	70	27	3.0	49
F_2 Simulation	60	30	10	44	70	26	4.0	50

itself by a weak displacement effect, regardless of the variant content in the stock material used as the feed solution. The model reproduced band splitting that occurred, as mentioned above, due to a combination of thermodynamic and kinetic effects. Both effects caused formation of the flowthrough concentration front in the column oversaturated by high protein load. When the amount of the protein present in the column decreased, a slow front was formed, in which the protein was stronger bound and therefore retained longer. Simultaneously, the extension of the residence time enhanced the protein binding due to the kinetic effects, hence the protein desorption was inhibited until the pH gradient was initiated.

The model was verified by comparing the simulated and experimental band profiles recorded at different protein loads, variant content in the feed solutions and the mobile phase flowrate. Typical band profiles recorded in CEX are shown in Fig. 3A and Figs. 6A-C, and in AEX in Fig. 3B and Figs. 7A, 7B. The compositions of fraction and the fraction yields are reported in Tables 6 and 7. The fraction yield was calculated as the mass of mAb2 in the fraction collected to the mass loaded into the column. Again, the model simulations did not perfectly match the experimental data but followed well the observed trends.

It can be observed that reduction in the protein load caused band splitting to diminish, which was well reproduced by the model (compare Fig. 5A and Figs. 7A-C). The fraction F_1 obtained in

the flowthrough of the M-av stock in the CEX column was slightly enriched with the acidic variant (av), whereas F_2 was depleted with that variant (M-av, Table 6). The change in the content of the bv variant was more pronounced; its concentration in the fraction F_2 was much higher than in the feed solutions. If isolation or enrichment of bv were the goal of the process, the waste fraction F_1 that was av-enriched might be recycled to CEX to recover the remaining part of the target bv variant. Recycling of the waste av-enriched fraction F_1 from the M-av stock was mimicked by processing of the H-av stock. The av content in the fractions collected from the H-av stock was again only slightly different (F_1 , F_2 in H-av, Table 6). Therefore, if reducing the av content in the M-av stock were the goal of the process, the AEX separation would be much more effective, as it provides the flowthrough fraction with less than 25% av (F_1 in M-av, Table 7). As mentioned above, the presence of acidic variants has often negligible effect on the properties of the overall mAb pool at level about 25%. Therefore, the whole flowthrough fraction may meet the product composition criterion.

To increase the process yield, the waste av-enriched fraction F_2 eluted from AEX might be recycled, which would allow restoring the initial M-av composition (F_1 in H-av, Table 7). The obtained flowthrough fraction can be processed once again to provide the desired product with the overall yield of about 70-80%. Since only two fractions are collected, whose variant content does not need to be analyzed in intermediate steps, the recycling procedure is fast and simple.

It was found that decrease in flowrate from 0.5 to 0.2 mL min^{-1} did not change noticeably the selectivity of the separation in both AEX and CEX, therefore the obtained data were not reported in Tables 6 and 7.

5. Conclusions

A procedure for adjusting the variant content of a mAb have been developed, which was based on batch IEX separations. The retention order of the variants was changed from acidic, main, and basic on CEX column to basic, main acidic in AEX column. Both columns operated under highly overloaded conditions, with the maximum of the protein load about $200 \text{ mg mL}^{-1}_{\text{column}}$. The variants were eluted with pH gradient, which was simplified to two main steps: loading and partial elution under binding conditions at mild pH, and desorption of the protein remains by pH gradient. This provided two fractions of the effluents: the flowthrough and bound fractions, either enriched or depleted with some of variants. The CEX process provided enrichment of the basic variant in the bound fraction, at very poor selectivity of the separation of the

acidic and main variants. AEX allowed reduction in the content of the acidic variant in flowthrough fractions, at a low selectivity of the separation of the main and basic variants. When complete separation of variants is not necessary, which is often the case, the composition of the mAb pools obtained may meet regulatory demands. For instance, AEX may be particularly effective when the maximum content of acidic variant is restricted. Then, after proper selection of the process conditions, the product with required composition can be acquired from the whole flowthrough fraction. The yield of the separations may be improved by recycling the waste fractions.

To design the process, a mathematical tool was provided; the model of the column dynamics was formulated and calibrated based on the equilibrium isotherm data and shapes of band profiles. The variant adsorption was suggested to be governed by positive cooperative adsorption, with a weak effect of the competition for adsorption sites. Therefore, the displacement between the eluting band profiles was almost not active on both CEX and AEX resins. This indicated that the intermolecular interactions of variants in the adsorbed phase did not depend on the type of the resin; they were characteristic for the mAb molecule.

Though the kinetic and thermodynamic properties were specific for the mAb used for the case study, the idea of exploiting the band splitting phenomena for fast enrichment or depletion effluents in certain component may apply to other proteins and chromatographic modes.

Funding

This work was supported by the by National Science Center Poland (NCN.CI.18.00, OPUS 14 UMO-2017/27/B/ST8/00385).

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

Krystian Baran: Investigation, Methodology, Conceptualization, Writing – review & editing. **Patrycja Zimoch:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Artur Stańczak:** Methodology, Writing – review & editing. **Wojciech Piątekowski:** Methodology, Writing – review & editing. **Dorota Antos:** Conceptualization, Software, Writing – review & editing.

Acknowledgment

We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland for 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.2021.462607.

References

- [1] A.A. Shukla, J. Thömmes, Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins, *Trends Biotech* 28 (2010) 253–261.
- [2] S. Aggarwal, What's fueling the biotech engine - 2010 to 2011, *Nat. Biotech* 29 (2011) 1083–1089.
- [3] H. Modjtahedi, S. Ali, S. Essapen, Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges, *Br. Med. Bull.* 104 (2012) 41–59.
- [4] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2014, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 992–1000.
- [5] A. Beck, S. Sanglier-Cianfèrani, A. Van Dorsselaer, Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (11) (2012) 4637–4646.
- [6] N.C. Nicolaidis, P.M. Sass, L. Grasso, Monoclonal antibodies: a morphing landscape for therapeutics, *Drug Dev. Res.* 67 (2006) 781–789.
- [7] N. Lingg, P. Zhang, Z. Song, M. Bardor, The sweet tooth of biopharmaceuticals: importance of recombinant protein glycosylation analysis, *Biotechnol. J.* 7 (2012) 1462–1472.
- [8] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426–2447.
- [9] C. Hakemeyer, U. Strauss, S. Werz, F. Folque, J.C. Menezes, Near-infrared and two-dimensional fluorescence spectroscopy monitoring of monoclonal antibody fermentation media quality: aged media decreases cell growth, *Biotechnol. J.* 8 (2013) 835–846.
- [10] F. Capito, R. Skudas, H. Kolmar, C. Hunzinger, Mid-infrared spectroscopy-based antibody aggregate quantification in cell culture fluids, *Biotechnol. J.* 898 (2013) 912–917.
- [11] A.J. Chirino, A. Mire-Sluis, Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1383–1391.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] P. Dakshinamurthy, P. Mukunda, B.P. Kodaganti, B.R. Shenoy, B. Natarajan, A. Maliwalave, Halan V. S. Murugesan, S. Maity, Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab, *Biologicals* 46 (2017) 46–56.
- [15] 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.
- [16] B. Hintersteiner, N. Lingg, P. Zhang, S. Woen, K.M. Hoi, St. Stranner, S. Wiederikum, 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.
- [17] G. Jiang, Ch. Yu, D.B. Yadav, Z. Hu, A. Amurao, E. Duenas, M. Wong, M. Iverson, K. Zheng, X. Lam, J. Chen, R. Vega, Sh. 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.
- [18] 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, Amita 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.
- [19] S. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, J. Lee, M. Boryz, Z.J. Li, Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 1646–1665.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] S. Ahmed, N.N. Atia, A.H. Rageh, Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variations, *Talanta* 199 (2019) 347–354.
- [23] St. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, J. Lee, M. Boryz, Z.J. Li, Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 1646–1665.
- [24] Sh-Y. Jing, J.-X. Gou, D. Gao, H.-B. Wang, Sh-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.
- [25] C. Teshima, M.X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, J. Kung, V. Lahidji, J. Freeberg, L. Thorner, M. Tomic, Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2091–2097.
- [26] Y.F. Lee, M. Johnck, C. Frech, 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 (2018) 973–986.
- [27] D. Farnan, G.T. Moreno, Multiproduct high-resolution monoclonal antibody charge variant separations by pH gradient ion-exchange chromatography, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8846–8857.
- [28] M. Weitzhandler, D. Faman, J. Horvath, J.S. Rohrer, R.W. Slingsby, N. Avdalovic, C. Pohl, Protein variant separations by cation exchange chromatography on tentacle-type polymeric stationary phases, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 365–372.
- [29] T.M. Pabst, G. Carta, N. Ramasubramanian, A.K. Hunter, P. Mensah, M.E. Gustafson, Separation of protein charge variants with induced pH gradients using anion exchange chromatographic columns, *Biotechnol. Prog.* 24 (2008) 1096–1106.

- [30] A. Rozhkova, Quantitative analysis of monoclonal antibodies by cation-exchange chromatofocusing, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5989–5994.
- [31] N. Lingg, E. Tan, B. Hintersteiner, M. Bardor, A. Jungbauer, Highly linear pH gradients for analyzing monoclonal antibody charge heterogeneity in the alkaline range, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 65–71.
- [32] L. Zhang, T. Patajoff, D. Farnan, B. Zhang, Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength, *J. Chromatogr. A* 1272 (2013) 56–64.
- [33] M. Schmidt, M. Hafner, C. Frech, Modeling of salt and pH gradient elution in ion-exchange chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 5–13.
- [34] T.M. Pabst, G. Carta, pH transitions in cation exchange chromatographic columns containing weak acid groups, *J. Chromatogr. A* 1142 (2007) 19–31.
- [35] T.M. Pabst, D. Antos, G. Carta, N. Ramasubramanian, A.K. Hunter, Protein separations with induced pH gradients using cation-exchange chromatographic columns containing weak acid groups, *J. Chromatogr. A* 1181 (2008) 83–94.
- [36] K.A. Logan, I. Lagerlund, S.M. Chamow, A simple, two-component buffer enhances use of chromatofocusing for processing of therapeutic proteins, *Biotechnol. Bioeng.* 62 (1999) 208–215.
- [37] R.C. Bates, X. Kang, D.D. Frey, High-performance chromatofocusing using linear and concave pH gradients formed with simple buffer mixtures. I. Effect of buffer composition on the gradient shape, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 25–36.
- [38] X. Kang, R.C. Bates, D.D. Frey, High-performance chromatofocusing using linear and concave pH gradients formed with simple buffer mixtures. II. Separation of proteins, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 37–43.
- [39] X. Kang, D.D. Frey, High-performance cation-exchange chromatofocusing of proteins, *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 117–128.
- [40] F. Kröner, J. Hubbuch, Systematic generation of buffer systems for pH gradient ion exchange chromatography and their application, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 78.
- [41] K.A. Barnthouse, W. Trompeter, R. Jones, P. Inampudi, R. Rupp, S.M. Cramer, Cation-exchange displacement chromatography for the purification of recombinant protein therapeutics from variants, *J. Biotechnol.* 66 (1998) 125–136.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] M. Gospodarek, D.E. Hiser, J.P. O'Connell, E.J. Fernandez, Unfolding of a model protein on ion exchange and mixed mode chromatography surfaces, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 238–252.
- [47] R. Gillespie, T. Nguyen, S. Macneil, L. Jones, S. Crampton, S. Vunnum, Cation exchange surface mediated denaturation of an aglycosylated immunoglobulin (IgG1), *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 101–110.
- [48] J. Guo, G. Carta, Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column - Part II. Protein structure effects by hydrogen deuterium exchange mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 129–137.
- [49] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Non-linear Chromatography*, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 2006.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] R.C. Chatelier, A.P. Minton, Adsorption of globular proteins on locally planar surfaces: Models for the effect of excluded surface area and aggregation of adsorbed protein on adsorption equilibria, *Biophys. J.* 71 (1996) 2367–2374.
- [53] A.P. Minton, Effects of excluded surface area and adsorbate clustering on surface adsorption of proteins. II. Kinetic models, *Biophys. J.* 80 (2001) 1641–1648.
- [54] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106.
- [55] R. Muca, M. Kołodziej, W. Piątkowski, G. Carta, Dorota Antos, Effects of negative and positive cooperative adsorption of proteins on hydrophobic interaction chromatography media, *J. Chromatogr. A* 16 (2020) 1461309.
- [56] R. Muca, W. Piątkowski, D. Antos, Effects of thermal heterogeneity in hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6716.
- [57] A. Stańczak, K. Baran, D. Antos, A high-throughput method for fast detecting unfolding of monoclonal antibodies on cation exchange resins, *J. Chromatogr. A* 1634 (2020) 461688.
- [58] I. Poplewska, W. Piątkowski, D. Antos, A case study of the mechanism of unfolding and aggregation of a monoclonal antibody in ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1636 (2021) 461687.

Oświadczenia autora

Oświadczam, że praca pt. *A high-throughput method for fast detecting unfolding of monoclonal antibodies on cation exchange resins* będąca podstawą rozprawy doktorskiej została opracowana i opublikowana w czasopiśmie *Journal of Chromatography A* przy udziale mgr. Artura Stańczaka oraz prof. dr hab. inż. Doroty Antos.

.....

Oświadczam, że praca pt. *Effect of flow behavior in extra-column volumes on the retention pattern of proteins in a small column.* będąca podstawą rozprawy doktorskiej została opracowana i opublikowana w czasopiśmie *Journal of Chromatography A* przy udziale dr. inż. Wojciecha Marka, dr. hab. inż. Wojciecha Piątkowskiego oraz prof. dr hab. inż. Doroty Antos.

.....

Oświadczam, że praca pt. *Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography* będąca podstawą rozprawy doktorskiej została opracowana i opublikowana w czasopiśmie *Journal of Chromatography A* przy udziale mgr inż. Patrycji Zimoch, mgr. Artura Stańczaka, dr. hab. inż. Wojciecha Piątkowskiego oraz prof. dr hab. inż. Doroty Antos.

.....