



POLITECHNIKA RZESZOWSKA

im. Ignacego Łukasiewicza

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Katedra Inżynierii Chemicznej
i Procesowej



PRACA DOKTORSKA

**OCZYSZCZANIE WARIANTÓW
PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH
Z WYKORZYSTANIEM
CHROMATOGRAFII**

mgr inż. Patrycja Zimoch-Rumanek

Opiekun:

prof. dr hab. inż. Dorota Antos

Rzeszów, 2024

Pragnę serdecznie podziękować wszystkim osobom, które w różnorodny sposób przyczyniły się do powstania niniejszej pracy doktorskiej.

Szczególne podziękowania kieruję w stronę mojej promotor,

Pani Profesor dr hab. inż. Doroty Antos,

która z niezwykłym profesjonalizmem, wiedzą i życzliwością kierowała moimi badaniami. Jej cenne wskazówki, motywacja oraz naukowe podejście stanowiły nieocenioną pomoc na każdym etapie realizacji tej pracy.

*Dziękuję także **Panu dr hab. inż. Wojciechowi Piątkowskiemu, prof. PRz** za wsparcie merytoryczne oraz wszelkie sugestie, które znacząco wzbogaciły moje badania oraz przyczyniły się do ostatecznego ukształtowania niniejszej pracy doktorskiej.*

*Jestem niezmiernie wdzięczna zespołowi naukowemu z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej za nieocenioną pomoc w trakcie realizacji badań laboratoryjnych oraz za stworzenie inspirującego środowiska pracy. Szczególnie chciałabym tutaj podziękować **Pani dr inż. Izabeli Poplewskiej** oraz **Pani dr inż. Renacie Mucy**, za wprowadzenie mnie w wykonywanie badań naukowych oraz wszelką pomoc okazaną podczas ich przeprowadzania. Jednocześnie swoje podziękowania kieruję również w stronę **Pana dr inż. Wojciecha Marka** za wszelkie wskazówki i ciekawostki związane z obsługą chromatografów.*

*Dziękuję **Kolegom i Koleżankom**, których miałam okazję poznać podczas tych 4 lat doktoratu. Wspaniała atmosfera na Uczelni przyczyniła się do ukończenia tej pracy.*

*Szczególne podziękowania kieruję również do mojej **Mamy, Męża** oraz **przyjaciół**. Dziękuję za Wasze wsparcie, zrozumienie i cierpliwość, które towarzyszyły mi przez cały czas trwania tego projektu.*

Streszczenie

Przeciwciała monoklonalne (mAb) to złożone cząsteczki białka, które w trakcie ekspresji i procesów przetwarzania ulegają modyfikacji prowadzących do mikroheterogeniczności powstałego produktu biofarmaceutycznego. Głównym źródłem mikroheterogeniczności jest powstawanie różnych wariantów tej samej cząsteczki, spośród których największy udział mają warianty ładunkowe. Ze względu na niewielkie różnice w budowie, warianty ładunkowe nieznacznie różnią się pomiędzy sobą punktem izoelektrycznym (pI) i są klasyfikowane jako warianty kwasowe (*av*) o najniższym pI, główne (*mv*) o pośrednim pI i zasadowe (*bv*) o najwyższym pI. Obecność wariantów ładunkowych mAb wpływa na aktywność biologiczną, właściwości biofizyczne oraz stabilność biofarmaceutyku. Dlatego skład wariantów w konkretnym produkcie musi być kontrolowany i dostosowany do ściśle określonego poziomu.

W ramach badań realizowanych w niniejszej pracy doktorskiej opracowano dwie metody szybkiego dostosowywania składu wariantów ładunkowych mAb. Pierwsza z nich polegała na połączeniu chromatografii anionowymiennej (AEX) oraz strącania w obecności glikolu polietylenowego (PEG) w celu zredukowania zawartości *av* w puli wariantów mAb. Druga metoda polegała na połączeniu dwóch procesów chromatograficznych: AEX oraz chromatografii kationowymiennej (CEX) w celu rozdzielania wariantów *av*, *mv* i *bv* na osobne frakcje.

Realizację projektu badawczego poprzedzono pomiarami izoterm adsorpcji wariantów ładunkowych mAb i doбором optymalnych warunków ich rozdzielania na złożach AEX oraz CEX. Następnie przeprowadzono cykle eksperymentów prowadzące do sformułowania modelu dynamiki kolumny AEX w warunkach przeładowania masowego mAb, który oparto na równaniach modelu dyspersyjno-kinetycznego oraz modelu izoterm adsorpcji cząsteczek koloidalnych (CPA). Wyznaczono parametry modelu bez obecności i w obecności PEG w fazie ruchomej.

Model dynamiki kolumny AEX połączono z modelem procesu strącania. Był to niezbędny etap pracy prowadzący do opracowania połączonego procesu AEX oraz strącania wariantów mAb. Otrzymany model użyto do optymalizacji połączonego procesu dla materiałów mAb o różnych składach wariantów, tj. dla materiału o różnej zawartości *av*, *mv* i *bv*.

W kolejnej części pracy na podstawie wyników odpowiednich cykli doświadczalnych sformułowano model dynamiki połączonych technik CEX i AEX, a następnie zweryfikowano go eksperymentalnie. Analogicznie jak w pierwszej części pracy, opracowane modele dynamiki oparto na równaniach modelu dyspersyjno-kinetycznego oraz modelu izoterm CPA. Następnie zoptymalizowano połączenia obu chromatografii dla materiałów mAb o różnych składach wyjściowych wariantów.

Summary

Monoclonal antibodies (mAb) are complex protein molecules that undergo modifications during expression and processing which, leads to microheterogeneity in the resulting biopharmaceutical product. The main source of microheterogeneity arises from the formation of different variants of the same molecule, with charge variants constituting the majority. Due to minor structural differences, charge variants differ slightly in their isoelectric point (pI) and are classified as acidic variants (*av*) with the lowest pI, main variants (*mv*) with intermediate pI, and basic variants (*bv*) with the highest pI. The presence of charge variants in mAb affects biological activity, biophysical properties, and the stability of the biopharmaceutical. Therefore, the composition of variants in a specific product must be controlled and adjusted to a precisely defined level.

In the research conducted as part of this doctoral dissertation, two methods for rapid adjustment of the charge variant composition in the mAb were developed. The first method involved combining anion exchange chromatography (AEX) and precipitation in the presence of polyethylene glycol (PEG) to reduce the content of *av* in the charge variant mAb pool. The second method involved combining two chromatographic processes: AEX and cation exchange chromatography (CEX), to separate *av*, *mv*, and *bv* variants into individual fractions.

The research project was preceded by measurements of adsorption isotherm measurements of the charge variants of mAb, and selection of the optimal conditions for their separation on AEX and CEX columns were determined. Subsequently, a series of experiments was conducted to formulate a dynamic model of the AEX column under mass overload conditions of mAb, based on the transport-dispersive model (TD) and the colloidal particle adsorption (CPA) isotherm model. Model parameters were determined in the absence and presence of PEG in the mobile phase.

The dynamic model of the AEX column was integrated with the precipitation process model. This was a crucial step in the development of the combined process of the AEX and mAb variant precipitation. The resulting model was used to optimize the combined process for mAb materials with different charge variant compositions, i.e., materials with varying levels of *av*, *mv*, and *bv*.

In the next part of the study, on the basis of the results of relevant experimental cycles, a dynamic model of the coupled process of the CEX and AEX techniques was formulated and experimentally validated. Similarly to the first part of the study, the developed dynamic models were based on the TD model and the CPA isotherm model. Subsequently, the combination of

both chromatography processes was optimized for mAb materials with different initial charge variant compositions.

Spis treści

Streszczenie	5
Summary.....	7
Wstęp	13
Hipoteza badawcza	15
Cel i zakres pracy	15
1 Przegląd literaturowy.....	17
1.1 Przeciwciała monoklonalne	17
1.1.1 Biofarmaceutyki i leki biopodobne	17
1.1.2 Budowa przeciwciał	18
1.1.3 Produkcja przeciwciał.....	19
1.1.4 Procesy DSP w produkcji przeciwciał	22
1.2 Mikroheterogeniczność przeciwciał	23
1.2.1 Powstawanie wariantów ładunkowych przeciwciał monoklonalnych	23
1.2.2 Regulacje prawne	26
1.2.3 Separacja wariantów przeciwciał monoklonalnych	27
1.3 Podstawy procesu chromatograficznego.....	28
1.3.1 Chromatografia kolumnowa	28
1.3.2 Chromatografia analityczna a preparatywna	29
1.3.3 Techniki stosowane w chromatografii białek.....	30
1.3.4 Chromatografia IEX w oczyszczaniu wariantów ładunkowych mAb.....	33
1.4 Modele dynamiki procesu chromatograficznego.....	37
1.5 Termodynamika procesu adsorpcji	39
1.5.1 Izoterma SMA	39
1.5.2 Izoterma adsorpcji kooperatywnej.....	40
1.5.3 Izoterma CPA	41
1.5.4 Metody wyznaczania izoterm.....	42
2 Część badawcza	44
2.1 Materiały.....	44

2.2	Roztwory buforowe.....	45
2.3	Aparatura oraz sprzęt badawczy.....	45
2.4	Procedury badawcze.....	46
2.4.1	Przygotowanie próbek białka.....	46
2.4.2	Pomiar izoterm adsorpcji metodą statyczną.....	46
2.4.3	Pakowanie kolumn chromatograficznych.....	48
2.4.4	Określanie porowatości złoża chromatograficznego	48
2.4.5	Analiza zawartości wariantów ładunkowych mAb za pomocą CEX-HPLC	48
2.4.6	Rozdzielenie wariantów mAb za pomocą chromatografii IEX	49
2.4.7	Usuwanie PEG z roztworu białka	50
2.4.8	Proces strącania mAb za pomocą PEG	50
2.4.9	Połączenie procesu strącania i AEX	51
2.4.10	Wyznaczanie wydajności i składu otrzymanych frakcji	51
3	Dyskusja otrzymanych wyników	52
3.1	Koncepcja badań	52
3.2	Dobór warunków rozdzielania na złożu AEX.....	54
3.3	Dobór złoża oraz optymalnych warunków rozdzielania dla CEX	56
3.4	Wpływ PEG na adsorpcję wariantów mAb na wybranych złożach IEX	58
3.5	Redukcja av w połączonym procesie chromatografii i strącania	60
3.5.1	Projektowanie procesu AEX – formułowanie i weryfikacja modelu dynamicznego	61
3.5.2	Weryfikacja modelu dla połączenia AEX oraz strącania.....	63
3.5.3	Optymalizacja połączonego procesu oczyszczania mAb.....	65
3.6	Wydzielanie poszczególnych wariantów mAb	68
3.6.1	Koncepcja procesu	68
3.6.2	Dobór warunków prowadzenia procesu CEX.....	68
3.6.3	Formułowanie modelu dynamiki CEX	69
3.6.4	Weryfikacja modelu dynamiki CEX.....	70
3.6.5	Dobór warunków prowadzenia procesu AEX	71

3.6.6	Formułowanie modelu dynamiki AEX.....	72
3.6.7	Określenie warunków operacyjnych za pomocą predykcji numerycznych.....	74
3.6.8	Separacja wariantów w sekcji CEX.....	76
3.6.9	Separacja wariantów w sekcji AEX	78
4	Podsumowanie i wnioski	81
5	BIBLIOGRAFIA	83
6	Spis skrótów	92
7	Dorobek naukowy	99
8	Udział w badaniach naukowych.....	100

Wstęp

Przeciwciała monoklonalne (mAb) stanowią obecnie jedną z największych grup biofarmaceutyków dostępnych na rynku. Są to duże, złożone białka o skomplikowanej budowie strukturalnej, których wytwarzanie odbywa się głównie w komórkach ssaczych. Wykorzystywane są w celach diagnostycznych oraz w terapii chorób m. in.: wirusowych, autoimmunologicznych, nowotworowych czy neurodegeneracyjnych.

Mikroheterogeniczność, obejmująca ładunek cząsteczek mAb, spowodowana jest np. glikozylacją, fosforylacją lub acetylacją białka w procesie modyfikacji potranslacyjnych w komórkach gospodarza. Powstałe w ten sposób warianty ładunkowe mAb wpływają na aktywność biologiczną, właściwości biofizyczne oraz stabilność końcowego produktu biofarmaceutycznego. Warianty te dzieli się na trzy główne grupy zgodnie z wartością punktu izoelektrycznego (pI) mAb. Warianty o najniższym pI nazwano w pracy wariantami kwasowymi (*av*), warianty o średniej wartości pI wariantami głównymi (*mv*), zaś o najwyższym pI wariantami zasadowymi (*bv*). Konieczna jest regulacja zawartości wariantów ładunkowych mAb w produkcie farmaceutycznym, ponieważ skład wariantów wpływa na skuteczność terapeutyczną gotowego leku biologicznego. Skład wariantów w leku określa się poprzez zbadanie ich potencjału terapeutycznego, przez co wymagane jest ich wydzielenie z jak najwyższą czystością oraz wydajnością.

Redukcja zawartości powstających wariantów ładunkowych możliwa jest już na etapie tworzenia sekwencji nukleotydowej kodowanej cząsteczki mAb oraz poprzez odpowiednie prowadzenie procesów wytwarzania rekombinowanych cząsteczek mAb. Niestety, ze względu na występowanie modyfikacji potranslacyjnych nie jest możliwe całkowite uniknięcie powstawania wariantów, których konieczne jest usunięcie na etapie oczyszczania.

Do rozdzielania wariantów ładunkowych mAb jako złoty standard wykorzystywana jest obecnie chromatografia kationowymienna (CEX). Podobieństwo struktury i ładunków wariantów jest powodem nakładania się profili stężenia wariantów wymywanych z kolumny chromatograficznej, co utrudnia ich rozdzielanie. Wydajność procesu dodatkowo jest mocno ograniczona przez ilość białka, którą można wprowadzić do kolumny chromatograficznej. Ponadto proces jest czasochłonny, ponieważ warianty wymywa się w liniowym gradiencie pH lub soli. Analiza dostępnej literatury wykazała, że brak jest szybkiej i efektywnej metody chromatograficznej, za pomocą której możliwe byłoby wydzielenie wariantów ładunkowych mAb z materiału o różnej zawartości tych wariantów.

W niniejszej pracy opracowano dwie metody oczyszczania wariantów ładunkowych mAb: połączenie procesu chromatografii anionowymiennej (AEX) oraz procesu strącania w celu redukcji zawartości av w produkcie oraz połączenie AEX i CEX w celu rozdzielania av , mv i bv na poszczególne frakcje. Etapy chromatograficzne realizowano przy przeładowywaniu kolumn dużą masą białka, którą następnie wymywano w dwóch frakcjach za pomocą gradientu skokowego pH. Ten sposób prowadzenia procesu pozwolił na wzrost efektywności procesu chromatograficznego w porównaniu z klasyczną metodą rozdzielania w liniowym gradiencie soli lub pH, która jest czasochłonna ponieważ wymaga żmudnego frakcjonowania przy niskiej wydajności rozdzielania.

Projekt badawczy realizowano w kilku etapach. W pierwszym z nich (rozdz. 3.2, 3.3 i 3.4) wykonano cykle badań eksperymentalnych konieczne do pomiarów izoterm adsorpcji, które dostarczyły niezbędnych danych dotyczących pojemności chłonnych złoż chromatograficznych, jakościowo i ilościowo wykazały różnice w adsorpcji pomiędzy wariantami mAb na złożach chromatograficznych oraz pokazały jaki jest wpływ obecności glikolu polietylowego na przebieg procesu chromatografii. Na podstawie otrzymanych wyników określono optymalne warunki prowadzenia procesu rozdzielania wariantów ładunkowych mAb, tj. wybrano złoża chromatograficzne oraz pH buforów.

Następnie przeprowadzono cykl badań prowadzących do opracowania połączonych procesów AEX oraz strącania (rozdz. 3.5) w celu redukcji av z materiału wyjściowego do poziomu akceptacji określonego przez producenta, tj. $\pm 25\%$. W procesie połączonym wykorzystano wysoką efektywność procesu strącania oraz selektywność procesu chromatograficznego w celu uzyskania produktu o dużej wydajności oraz czystości. Sformułowano oraz zweryfikowano model dynamiki kolumny AEX. Kolejno połączono otrzymany model wraz z równaniami bilansu masy procesu strącania, który opracowany został w pracy doktorskiej mgr inż. Tomasza Rumanka i wykonano cykl badań numerycznych, otrzymując dane dotyczące efektywności połączonego procesu oraz jego optymalnej konfiguracji.

W ostatniej części niniejszej pracy (rozdz. 3.6) wykonano cykle badań połączonego procesu AEX i CEX oraz sformułowano i zweryfikowano model dynamiki tego procesu. Określono optymalne konfiguracje połączenia obu chromatografii w chromatografię wielokolumnową.

Dysertację zakończono posumowaniem i wnioskami z pracy (rozdz. 4).

Hipoteza badawcza

1. Metoda polegająca na przeładowaniu jonowymiennych kolumn chromatograficznych masą mAb i jej frakcjonowaniu w skokowym gradiencie pH może zostać wykorzystana jako sposób szybkiego wydzielenia wariantów ładunkowych mAb.
2. Połączenie procesów AEX i strącania w obecności PEG pozwala na znaczne zwiększenie wydajności procesu usuwania *av* w porównaniu z klasycznym sposobem rozdzielania wariantów w liniowym gradiencie soli lub pH.
3. Połączenie technik AEX i CEX pozwala na znaczne zwiększenie wydajności procesu rozdzielania *av*, *bv* i *mv* w porównaniu z klasycznym sposobem rozdzielania wariantów w liniowym gradiencie soli lub pH.

Cel i zakres pracy

Celem badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie dwóch metod separacji przeznaczonych do:

- szybkiej redukcji wariantów *av* do pożądanego poziomu, poprzez połączenie AEX i strącania w obecności PEG,
- szybkiego wydzielenia wariantów *av*, *bv* i *mv* przy zastosowaniu połączenia procesu AEX and CEX.

Zakres pracy obejmował:

1) przegląd literaturowy związany z:

- produkcją mAb i ich zastosowaniem w przemyśle, budową mAb, występowaniem mikroheterogeniczności oraz regulacjami prawnymi dotyczącymi ich zawartości w materiale biologicznym,
- metod przemysłowego oczyszczania białek ze szczególnym uwzględnieniem oczyszczania mAb,
- aspektów teoretycznych i praktycznych procesów chromatograficznego oczyszczania mAb,

2) cykle badań doświadczalnych dotyczące:

- pomiaru izoterm adsorpcyjnych mAb i wariantów mAb na złożach chromatograficznych wraz z uwzględnieniem wpływu glikolu polietylenowego na przebieg izoterm adsorpcji, w celu doboru optymalnych parametrów prowadzenia procesu chromatograficznego rozdzielania wariantów ładunkowych mAb,

- rozdzielenia wariantów ładunkowych mAb technikami AEX oraz CEX wraz ze sformułowaniem oraz zweryfikowaniem modeli dynamiki tych procesów,
- połączenia procesów AEX oraz strącania w celu redukcji av mAb z materiałów o różnym składzie wyjściowym do zadanego poziomu z uzyskaniem jak najwyższej wydajności produktu,
- zaprojektowanie procesu chromatografii wielokolumnowej, łączącej rozdzielanie technikami AEX i CEX, w celu wydzielenia poszczególnych wariantów ładunkowych mAb z uzyskaniem jak najwyższej czystości oraz wydajności produktów.

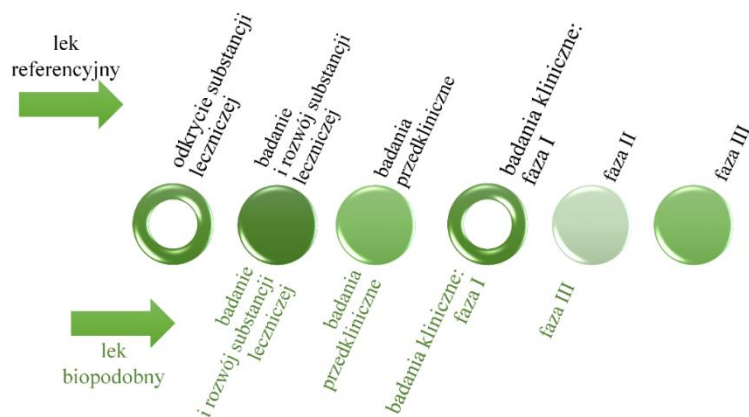
1 Przegląd literaturowy

1.1 Przeciwciała monoklonalne

1.1.1 Biofarmaceutyki i leki biopodobne

Leki biologiczne (ang. *biological medical products*) nazywane również biofarmaceutykami (ang. *biopharmaceutical drugs*), są to wielkocząsteczkowe substancje lecznicze, najczęściej wytworzone metodami biotechnologicznymi w żywych komórkach organizmów prokariotycznych oraz eukariotycznych [1-2]. Pierwszym lekiem biologicznym była biosyntetyczna insulina uzyskana przy użyciu plazmidów bakterii *Escherichia coli*, wyprodukowana w latach 80. ubiegłego wieku [3]. Obecnie leki biologiczne to głównie białka, peptydy oraz kwasy nukleinowe [4].

Wygasanie patentów leków biologicznych I generacji (referencyjnych leków biologicznych), doprowadziło do pojawienia się leków biologicznych II generacji – leków biopodobnych. Pierwszym lekiem biopodobnym dopuszczonym do obrotu w Europie w 2006 r. był lek o nazwie handlowej Omnitrope[®] (somatropina) [5-6]. W porównaniu do referencyjnych biofarmaceutyków, nie są to leki identyczne, co odpowiada specyfice ich wytwarzania (ang. *Upstream Process*, USP) oraz możliwym modyfikacjom, występującym podczas ich syntezy w komórkach organizmów żywych, a także podczas ich oczyszczania (ang. *Downstream Process*, DSP), formulacji, czy też przechowywania [4-5]. Z tego też powodu otrzymanie zgody przez firmy biofarmaceutyczne na wytwarzanie leków biopodobnych, zarówno od Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA), jak i Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (ang. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA), jest dużo trudniejsze niż w przypadku leków niskocząsteczkowych II generacji, czyli leków generycznych (tzw. generyków) [5-6]. W pierwszym kwartale 2024 r. FDA zatwierdziła 13 leków biologicznych, z których aż 5 preparatów to leki biopodobne [7-9]. Uproszczony schemat procedury dopuszczania do obrotu leków bionaśladowczych, w porównaniu do leków biologicznych, przedstawiono na rys. 1. Można zauważyć pominięcie w rozwoju leku biopodobnego dwóch etapów: odkrycia danej substancji leczniczej oraz III fazy badań klinicznych. Pozwala to na skrócenie badań prowadzących do wprowadzenia leku biopodobnego do obrotu o 3 – 4 lata, niż ma to miejsce w przypadku biologicznego leku referencyjnego [2, 5].



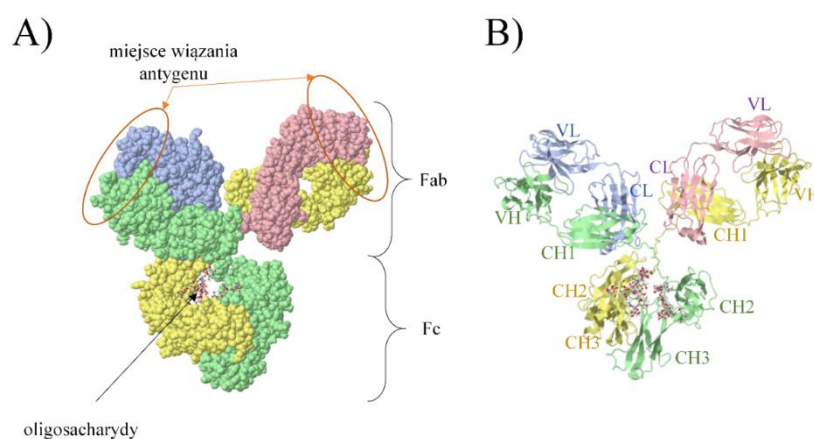
Rys. 1. Rozwój referencyjnego leku biologicznego oraz leku biopodobnego [5].

Leki biologiczne, referencyjne i biopodobne, stanowią obecnie dużą część rynku leków. Ich wysoka specyficzność pozwala na ograniczenie wielu działań niepożądanych, które stanowią nieodłączną część leczenia terapeutykami niskocząsteczkowymi [5]. Biofarmaceutyki są dla pacjentów z przewlekłymi chorobami szansą na względnie „normalne” życie lub całkowite wyleczenie chorób, na które bezskutecznie próbowano znaleźć lekarstwo wśród leków tradycyjnych (syntetycznych). Substancje zawarte w lekach biologicznych pozwalają na terapię chorób autoimmunologicznych [10], nowotworowych [11-12], wirusowych (np. szczepionka przeciwko wirusowi Ebola) [13], czy też neurodegeneracyjnych (np. choroba Alzheimera, rdzeniowy zanik mięśni, stwardnienie rozsiane) [13-14]. Rynek leków biologicznych stale się rozwija, co w ostatnich latach niewątpliwie przyspieszyła pandemia wirusa SARS-COV-2. Szczepionka mRNA przeciwko Covid-19 (Comirnaty), w 2022 r. stała się najlepiej sprzedającym się lekiem biologicznym (36.8 mld \$), wyprzedzając tym samym lek o nazwie Humira (21.2 mld \$) [13].

1.1.2 Budowa przeciwciał

Przeciwciała wykorzystywane terapeutycznie to najczęściej przeciwciała klasy G, (Immunoglobuliny G, IgG), które zbudowane są z dwóch łańcuchów ciężkich oraz dwóch łańcuchów lekkich, posiadających w swojej strukturze domeny stałe (ang. *Constant Domain of Heavy/Light Chain*, CH/CL) i zmienne (ang. *Variable Domain of Heavy/Light Chain*, VH/VL) [15]. Domeny VH, VL, CH1 oraz CL tworzą wspólnie fragment wiążący antygen (ang. *antigen-binding fragment*, Fab), natomiast domeny CH2 i CH3 fragment zdolny do krystalizacji, pełniący funkcje efektorowe (ang. *crystallizable fragment*, Fc). Na rys. 2 przedstawiono domenową budowę IgG myszy (kod w bazie pdb: 1IGY) [16], jako modelowego przeciwciała z klasy G. Domeny CH3 oraz CL zbudowane są z C-końcowych części odpowiednio łańcucha

ciężkiego oraz lekkiego. W rejonie Fab N-końcowe części domeny VL oraz VH tworzą rejon hiperzmienny (ang. *Complementarity-Determining Region*, CDR). Rejon CDR determinuje specyficzne dopasowanie się przeciwciała z antygenem i charakteryzuje się największą zmiennością w swojej budowie [15]. Na rys. 2 rejon ten oznaczony został kolorem pomarańczowym i opisany jako „miejsce wiązania antygenu”. Pomiędzy domenami CH2 i CH1 obu łańcuchów ciężkich znajduje się rejon zawiasowy, wewnątrz którego łańcuchy i ich domeny są dodatkowo wiązane za pomocą mostków disiarczkowych. Różnice w wiązaniach pomiędzy poszczególnymi domenami oraz w liczbie mostków disulfidowych wpływają na podział IgG na podklasy, w których wyróżniamy: IgG1, IgG2, IgG3 oraz IgG4 [15, 17-18].



Rys. 2. Struktura IgG myszy (baza pdb kod: 1IGY). A) Ilustracja łańcuchów ciężkich (kolor zielony i żółty) oraz lekkich (kolor niebieski i różowy), B) ilustracja budowy IgG z określeniem budujących ją domen obu łańcuchów [15-17].

1.1.3 Produkcja przeciwciał

W latach 2020 – 2022 aż 54% wszystkich zatwierdzonych jako leki biofarmaceutyków stanowiły przeciwciała monoklonalne (ang. *monoclonal antibodies*, mAb). Ich wartość na rynku leków biologicznych wyniosła 217 mld \$, czyli blisko 80.2% całkowitej wartości rynku bioleków [13, 19]. Na cenę gotowego produktu zawierającego w swoim składzie rekombinowane mAb ma wpływ m.in. konieczność przestrzegania wielu obostrzeń, co spowodowane jest złożonością struktury tych białek oraz ich późniejszym zastosowaniem, jako leków o wysokiej specyficzności [20].

Po raz pierwszy mAb wyprodukowano w 1975 r. za pomocą techniki hybrydomy, która polega na immunizacji zwierzęcia (myszy), za pomocą odpowiedniego antygeny i następnie wyizolowaniu z jego śledziony namnożonych limfocytów B. Limfocyty te kolejno łączy się z mysimi komórkami szpiczaka mnogiego (komórki mieloma) w celu uzyskania komórek hybrydowych (hybrydoma), które będą posiadały cechy nieśmiertelności oraz produkowały pożądaną przeciwciała. Wszystkie przeciwciała otrzymane za pomocą komórek hybrydoma są

przeciwciałami poliklonalnymi (skierowanymi przeciwko różnym epitopom antygeny). W celu otrzymania czystych mAb, skierowanych przeciwko jednemu epitopowi antygeny, komórki te namnaża się w oddzielnych studzienkach płytek wielodołkowych i po kilku dniach izoluje się wytworzone w nich mAb [20-23]. Jedną z głównych wad tej metody jest immunizowanie żywych zwierząt, co wyklucza możliwość wytwarzania mAb skierowanych przeciwko toksycznym substancjom. Do wytwarzania takich przeciwciał stosuje się tzw. technikę *phage display*, która wykorzystuje inżynierię genetyczną bakteriofagów i ich zdolność do prezentacji białek lub ich fragmentów na swojej powierzchni. Dzięki temu uzyskać można skomplikowane struktury przeciwciał, które są trudne do uzyskania metodą hybrydomy. Za pomocą techniki *phage display* uzyskiwane są biblioteki przeciwciał, które następnie są sekwencjonowane, a uzyskana w ten sposób informacja genetyczna może być powtórnie wykorzystana w przyszłości [21, 24-25]. Dwie inne metody wytwarzania przeciwciał polegają na pozyskiwaniu limfocytów B z: a) zwierząt transgenicznych, które dzięki zmodyfikowaniu ich genomu wytwarzają w pełni ludzkie przeciwciała lub b) wcześniej zaszczepionych lub naturalnie zainfekowanych dawców ludzkich (technika pojedynczej komórki B) przy użyciu np. cytometrii przepływowej, a następnie, podobnie jak w przypadku techniki *phage display*, uzyskanie mAb i ich sekwencjonowanie w celu dalszej produkcji w większych objętościach [23].

Jedną z kluczowych kwestii podczas projektowania procesów USP jest dobór linii komórkowej, za pomocą której wytwarzane będą mAb. Najczęściej wybierane są komórki ssacze, które pozwalają na produkcję aktywnych form przeciwciał. Komórki te odpowiednio fałdują strukturę białka, czyli wpływają na jego konformację przestrzenną, modyfikują cząsteczkę potranslacyjnie zgodnie z system ekspresji ssaczej oraz zapewniają brak jej agregacji [20, 26]. Obecnie do produkcji terapeutycznych mAb wykorzystuje się głównie komórki jajnika chomika chińskiego (ang. *Chinese Hamster Ovary*, CHO) i mysie linie komórkowe (NS0 oraz Sp2/0) [20, 26-27]. Jako jedne z pierwszych komórek do produkcji rekombinowanych białek wykorzystywano komórki szpiczaka mysiego (NS0), jednak ze względu na jednoczesną produkcję przez komórki gospodarza aktywnego wirusa białaczki mysiej, który wymaga inaktywacji, częściej w celach ekspresji mAb wybierane są komórki CHO. Aktualnie niektóre z mAb produkowane są również przy zastosowaniu linii komórek ludzkich takich jak HEK, PER.C6 [26], komórek roślinnych [28], drożdży (na etapie badań) [29-30] i komórek bakteryjnych [13].

Po doborze linii komórkowej następuje ich hodowla w bioreaktorach w zoptymalizowanych warunkach [20]. Do hodowli przemysłowych wykorzystywane są

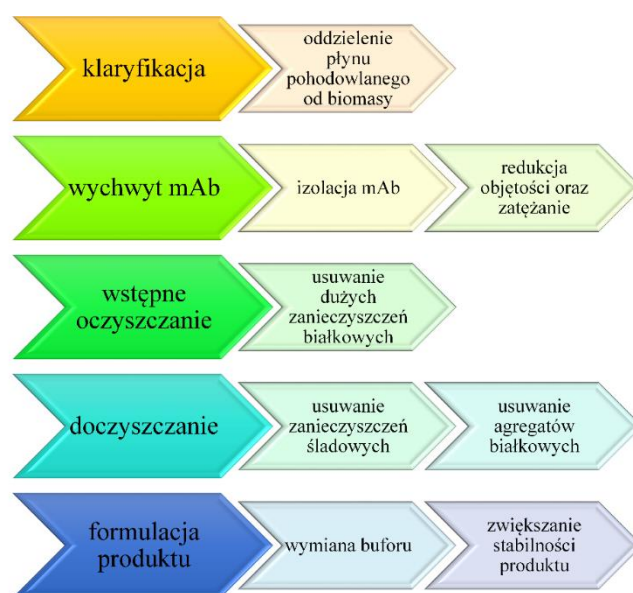
obecnie bioreaktory jednorazowego użytku, co zmniejsza prawdopodobieństwo kontaminacji krzyżowej kolejnych serii produktu oraz pozwala na większą elastyczność procesu i ewentualne zmiany podczas kolejnych serii produktu. Zastosowanie bioreaktorów jednorazowego użytku przyczynia się również do redukcji kosztów produkcji nawet do 22% w porównaniu do tradycyjnych bioreaktorów wykonanych ze stali nierdzewnej [30-33]. Optymalizacja warunków wytwarzania obejmuje następujące parametry: temperatura, przepływ gazu (napowietrznie hodowli), prędkość mieszania, pH środowiska, stężenie O₂ i CO₂, poziom wydzielanych przez komórkę metabolitów, stężenie komórek a także ich żywotność i cykl komórkowy [20, 26]. Nawet drobne zmiany w temperaturze, pH czy poziomie CO₂ w hodowli mogą drastycznie zmienić produktywność procesów USP [20]. Dość ważnym czynnikiem wpływającym na stężenie wydzielanych przez komórki mAb ma metoda dostarczania składników odżywczych. Wyróżnia się metodę okresową (ang. *batch*), okresową z zasilaniem (ang. *fed-batch*) oraz przepływową (ang. *perfusion*) [26, 34]. Metoda okresowa jest najprostszym typem produkcji. Zakłada ona zamknięty system, w którym wszystkie składniki odżywcze, niezbędne do wzrostu komórek, są zawarte w początkowym medium hodowlanym. Ze względu na brak możliwości odbierania ze środowiska zbędnych metabolitów, metoda ta nie jest odpowiednia dla komórek ssaczych, ponieważ w dużych stężeniach są one dla komórek toksyczne. Metoda okresowa z zasilaniem, jest najchętniej stosowana w przemyśle. Pozwala ona na dostosowanie składników odżywczych, do różnych faz wzrostu komórek oraz dodawanie ich w określonych odstępach czasu. Odpowiedni dobór stężenia i zawartości pożywki wpływa też na produkcję zbędnych metabolitów, co znacząco wpływa na produktywność kolonii komórkowej. Metoda przepływowa jest optymalna dla samej hodowli, jednak generuje duże koszty i trudności w przenoszeniu skali procesu. Głównymi zaletami tej metody jest ciągły przepływ medium hodowlanego, ciągła filtracja i usuwanie toksycznych produktów przemiany materii oraz ciągłe dostarczanie świeżych składników odżywczych, na zasadzie podobnej do metody okresowej z zasilaniem [20, 32, 34]. Obecnie mAb wytwarzane są w produkcji okresowej z zasilaniem w stężeniu powyżej 5 mg ml⁻¹ komórek w okresie 2 tygodni, w bioreaktorach jednorazowego użytku o objętości nawet do 2000 l [30, 35].

Każdy ze składników odżywczych dodawanych do medium hodowlanego posiada określone właściwości mające wpływ zarówno na końcowy produkt, jak i jego wydajność. W celu poprawy jakości produktu, w tym zmniejszenie stężenia agregatów, stosuje się dodatki takie jak glicerol, L-cysteina, jony żelaza, siarczan miedzi, czy glutation. Składniki te wpływają również na modyfikacje potranslacyjne mAb. Dodatki w postaci insuliny, albuminy oraz czynników i hormonów wzrostu mają na celu pobudzić komórki do wzrostu oraz wpłynąć na

końcowe stężenie wytwarzanych przez nie przeciwciał [20, 32, 34]. Istotną zmianą w przygotowywaniu mediów hodowlanych było zastąpienie hydrolizatów białkowych pochodzących z surowic zwierzęcych, białkami soi, pszenicy lub drożdży. Głównym niebezpieczeństwem podczas stosowania białek pochodzenia zwierzęcego, np. z surowicy bydłej, jest możliwość zanieczyszczenia końcowego produktu prionami, powodującymi m.in. encefalopatię gąbczastą [20, 26, 36].

1.1.4 Procesy DSP w produkcji przeciwciał

Po etapach wytwarzania mAb (USP) następuje ich oczyszczanie (DSP). Kolejne operacje stosowane w DSP mAb przedstawiono na rys. 3. Oczyszczanie gotowego produktu rozpoczyna się klaryfikacją, czyli oddzieleniem biomasy od płynu pohodowlanego (ang. *harvest*). Klaryfikacja tradycyjnie opiera się na metodach fizycznego oddzielania produktu od pozostałych składników w bioreaktorze. Wykorzystuje się tutaj wirowanie, metody filtracyjne lub połączenie obu technik [35, 37-39].



Rys. 3. Główne operacje stosowane w DSP w produkcji mAb [30, 38].

W zależności od tego, czy produkt jest wydzielany przez komórki na zewnątrz (komórki ssące), czy też magazynowany w ich organellach komórkowych (komórki roślinne), etapy oczyszczania różnią się. Jeżeli produkt białkowy nie jest wydzielany z komórki do płynu pohodowlanego, przed klaryfikacją dodatkowym etapem DSP jest homogenizacja komórek, w celu wyodrębnienia z ich wnętrza docelowego białka [28].

Następnym etapem DSP jest filtracja wglębna, po której następuje wychwyt mAb z płynu pohodowlanego. Etap ten ma na celu wstępne wyeliminowanie zanieczyszczeń białkowych i niebiałkowych, a także zateżnienie produktu. Najczęściej stosowaną w tym etapie techniką

separacji, jest chromatografia powinowactwa (ang. *Affinity Chromatography*, AC) przy zastosowaniu proteiny A [38, 40]. Elucję mAb z kolumn AC prowadzi się przy niskich wartościach pH, co jednocześnie pozwala na inaktywację wirusów [41]. AC zostanie szerzej omówiona w rozdz. 1.3.3, poświęconym chromatografii białek.

Niskie pH eluatu po AC neutralizuje się roztworem alkalicznym i poddaje się go dalszym etapom oczyszczania. Białko po etapie wychwytu ma czystość ok. 90%, jednak ze względu na niektóre niespecyficzne wiązania, jakie występują na złożu AC lub pomiędzy wydzielanym produktem, niezbędne jest jego doczyszczenie do pożądanego poziomu czystości, co prowadzi się przy zastosowaniu uzupełniających technik chromatograficznych. Na tym etapie mAb oczyszczane jest z białek komórek gospodarza (ang. *Host Cell Proteins*, HCP), agregatów, wirusów i DNA [38, 41]. Dostosowuje się również zawartość wariantów mAb, wynikających z mikroheterogeniczności przeciwciał (rozdz. 1.2). Obecnie nowym kierunkiem badań jest izolacja mAb za pomocą strącania lub krystalizacji, co potencjalnie pozwoliłoby na znaczną redukcję kosztów związanych z koniecznością wykorzystania drogich żywic chromatograficznych, zaś krystalizacja dodatkowo poprawia wydajność oraz czystość otrzymanego produktu [42]. W przypadku, gdy do usuwania cząsteczek wirusów nie są używane techniki chromatograficzne, niezbędna jest dodatkowo nanofiltracja mAb. Nanofiltracja wykorzystywana na skalę przemysłową posiadają membrany utworzone ze zmodyfikowanej celulozy, poliaryloeterosulfonu (PES) lub polifluorku winylydenu (PVDF) o średnicy porów w zakresie 15 – 20 nm [30, 35, 41].

Ostatnim etapem DSP jest formulacja produktu. Stosowane są tutaj techniki membranowe takie jak ultrafiltracja/diafiltracja (ang. *Ultrafiltration/Diafiltration*, UF/DF) i filtracja z przepływem stycznym (ang. *Tangential Flow Filtration*, TFF). Oczyszczone białko jest rozpuszczane w stabilnym buforze, przeznaczonym do jego przechowywania i jednocześnie zatężane do stężeń powyżej 150 mg ml⁻¹, które są odpowiednie do podskórnego podawania pacjentom [20, 43]. Filtracja pozwala również na usunięcie zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Kolejno do produktu dodawane są stabilizatory, m.in. polisorbat 80 [38].

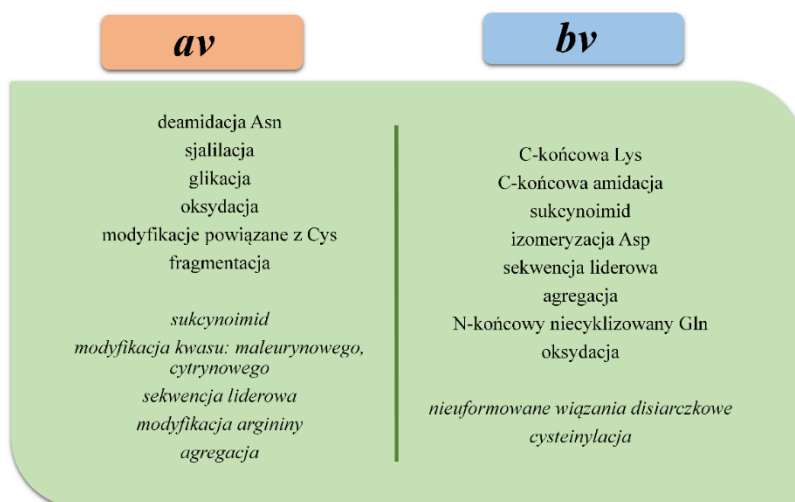
1.2 Mikroheterogeniczność przeciwciał

1.2.1 Powstawanie wariantów ładunkowych przeciwciał monoklonalnych

Mikroheterogeniczność strukturalna przeciwciał to zjawisko występujące zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [21, 44]. Cząsteczki takie nazywa się izoformami lub wariantami przeciwciał i zgodnie z wytycznymi EMA oraz FDA klasyfikuje się je jako „zanieczyszczenia związane

z produktem” [18]. Warianty przeciwciał podzielić można na masowe, hydrofobowe oraz ładunkowe. Warianty ładunkowe powstają najczęściej i dzieli się je na trzy podgrupy: warianty kwasowe (ang. *acidic variants*, *av*), warianty główne (ang. *main variant*, *mv*) oraz warianty zasadowe (ang. *basic variant*, *bv*) [18, 20, 45]. *Av*, *mv*, *bv* to nazwy własne wprowadzone w publikacjach oraz niniejszej dysertacji. Wszystkie warianty ładunkowe, posiadające punkt izoelektryczny (pI) niższy niż *mv* to warianty kwasowe, zaś warianty o pI wyższym od *mv* określa się wariantami zasadowymi [45].

W produkcji mAb warianty ładunkowe mogą tworzyć się na etapie modyfikacji potranslacyjnych, podczas procesów oczyszczania, formulacji oraz przechowywania produktu leczniczego [45]. Najczęściej występujące modyfikacje usystematyzowano na rys. 4; kursywą zapisano rzadziej pojawiające się zmiany strukturalne, prowadzące do powstawania określonych wariantów.



Rys. 4. Modyfikacje występujące w *av* i *bv*. Kursywa – rzadko występujące modyfikacje [45]. Asn – asparagina, Asp – kwas asparaginowy, Cys – cysteina, Gln – glutamina, Lys – lizyna.

Modyfikacje wpływające na powstawanie *av* przedstawiono z lewej strony rys. 4. Deamidacja asparaginy (Asn) jest najważniejszą degradacją Asn, która prowadzi do powstania kwasu asparaginowego (Asp) oraz jego izomeryzacji. Izomeryzacja Asp oraz deamidacja Asn przebiegają z produktem pośrednim – sukcy노imidem (imid kwasu bursztynowego). W zależności od ładunku wypadkowego, modyfikacje te odpowiadają za powstawanie *av* lub *bv*, przy czym powstawanie sukcy노imidu w *av* należy do rzadkich modyfikacji [21]. Jeżeli reakcje te przebiegają w rejonie hiperzmiennym (CDR) to wpływają one na stabilność przeciwciała oraz jego wiązanie z antygenem, co skutkuje spadkiem potencjału leczniczego produktu końcowego. Gdy modyfikacje te występują w rejonach stałych (CH i CL) to nie

wpływają na selektywność wiązania antygeny. Obserwuje się je zarówno w przeciwciałach rekombinowanych, jak i endogenicznych IgG ludzkich. [21, 45].

Modyfikacje powiązane z cysteiną, prowadzące do powstawania *av*, obejmują formowanie się wiązań disiarczkowych, wspierających strukturę III- i IV-rzędową proteiny. Najczęściej występujące modyfikacje to alternatywne wiązania disiarczkowe, tworzenie wiązań trójsiarczkowych, brak wiązań disulfidowych, cysteinylacja oraz glutationylacja [18, 45].

Kwasy sjałowe są cukrami występującymi na końcu łańcucha oligosacharydów w cząsteczkach IgG. Sjałilacja mAb następuje w wyniku glikozylacji w regionach Fab oraz Fc i najczęściej następuje w sposób naturalny w obecności kwasu N-acetylneuraminowego. W warunkach produkcyjnych zdarza się, że sjałilacja przebiega z wykorzystaniem innego kwasu, np. kwasu N-glikoliloneuraminowego, który naturalnie nie występuje w organizmie ludzkim [15]. Sjałilacja regionu Fc wpływa niekorzystnie na jego zdolności efektorowe, np. na zdolność opsonizacji (opłaszczania) antygeny, prowadzącą do fagocytozy takiego antygeny przez komórki żerne układu odpornościowego [45].

Glikacja to nieenzymatyczna reakcja pomiędzy grupą aminową aminokwasu (najczęściej w lizynie, Lys) oraz zredukowanym cukrem (pochodzącym np. z pożywki). Modyfikacja ta nie wpływa na wiązanie się przeciwciała z antygenem lub proteiną A w chromatografii AC, ale zwiększa skłonność mAb do tworzenia agregatów, co znacząco obniża jakość i wydajność końcowego produktu [15, 18, 21].

Modyfikacje N-końcowe oraz C-końcowe prowadzą najczęściej do powstawania *bv*. Wyjątek stanowi niekompletne usunięcie sekwencji liderowej (sekwencja nukleotydów zlokalizowana przed sekwencją kodującą określony gen, tutaj budowę mAb), które najczęściej prowadzi do powstawania *bv*, jednak znane są przypadki, w których pozostała sekwencja tworzy *av* [45]. Najczęstszą modyfikacją prowadzącą do utworzenia się *bv* jest amidacja C-końcowej lizyny. Ponieważ aminokwas ten znajduje się w regionie Fc i nie wpływa na funkcjonalność mAb, najczęściej na etapie tworzenia sekwencji genowej usuwa się kodon C-końcowej Lys z CH₃ [45]. Dość ważną i niebezpieczną dla jakości bioleku (nie tylko mAb) jest obecność N-końcowej glutaminy (Gln), która może przekształcać się w kwas piroglutaminowy (pGlu), co prowadzi do powstawania wariantów *bv* i tworzenia się nierozpuszczalnych włókien białkowych. Obecność tych włókien powiązana jest z demencją oraz chorobą Alzheimera [17].

Kluczowym problemem w przechowywaniu mAb jest utlenianie się aminokwasów zawierających w swojej strukturze siarkę oraz pierścienie aromatyczne. Modyfikacje te są również możliwe na etapie produkcji białka. Najczęściej utlenieniu ulega metionina. Znane są również przypadki utlenienia tryptofanu w rejonie CDR, co skutkuje znacznym obniżeniem zdolności wiązania się mAb z antygenem [15, 17, 21, 45].

1.2.2 Regulacje prawne

Warianty ładunkowe przeciwciał występują powszechnie w organizmach żywych. Zasadniczy problem pojawia się w momencie produkcji rekombinowanych mAb. Wysoka zawartość *av* w produkcie, wynosząca powyżej 25% całej puli wariantów jest szczególnie niepożądana [47, 57], podczas gdy obecność *bv* może poprawiać właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne danego przeciwciała [62]. Zbyt duże stężenie *av* w końcowym produkcie wpływa również na stabilność oraz immunogenność leku [15, 17-18, 20, 41, 45-47]. Dodatkowe komplikacje pojawiają się, gdy na rynek bioleków wprowadzane są leki biopodobne. Ze względu na uproszczoną procedurę wprowadzenia ich do obrotu, konieczne jest aby lek biopodobny miał porównywalną zawartość wariantów ładunkowych do leku referencyjnego [5, 46]. Z tych powodów EMA, FDA oraz Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) wprowadziły regulacje prawne dotyczące kontroli dostosowywania zawartości wariantów ładunkowych mAb w produktach leczniczych. Dostosowywanie zawartości *av* i *bv* w gotowym produkcie leczniczym zależy ostatecznie od rodzaju wprowadzanego leku biologicznego oraz jego właściwości terapeutycznych [48-54].

Agencje regulacyjne oraz zasady Dobrej Praktyki Wytwarzania (ang. *Good Manufacturing Practice*, GMP) rekomendują prowadzenie rozwoju i wprowadzania nowych produktów na rynek zgodnie z koncepcją *Quality by Design* (QbD). Koncepcja ta opiera się na 4 głównych zasadach, przedstawionych na rys. 5, a ich cele zostały opisane w wytycznych Międzynarodowej Rady ds. Harmonizacji (ang. *International Conference on Harmonization*, ICH), w dokumencie ICH-Q8, który opisuje Wymagania Techniczne dla Produktów Farmaceutycznych Stosowanych u Ludzi [55-56].

Jednym z głównych zadań zawartych w podpunkcie 1. zaprezentowanym na rys. 5, jest sprecyzowanie cech leku, które mają krytyczne znaczenie dla jego jakości, czyli krytycznych atrybutów jakości (ang. *Critical Quality Attributes*, CQA). Do CQA zalicza się obecnie mikroheterogeniczność, w tym obecność wariantów ładunkowych [47, 57-58]. Konieczne jest zatem, aby kolejne serie danego produktu i leki biopodobne posiadały takie same składy wariantów ładunkowych jak lek referencyjny [58]. Zastosowanie koncepcji QbD pozwala na

redukcję niektórych z wariantów już na etapie projektowania procesów USP, m.in. poprzez niekodowanie C-końcowej Lys, czy też zapewnienie odpowiednich warunków w bioreaktorze, które zapobiegają stresowi oksydacyjnemu komórki [15, 18, 20, 45, 59-60]. Wprowadzenie zasad GMP redukuje możliwość wprowadzenia na rynek produktu (nowego lub kolejnej serii) zawierającego w swoim składzie niepożądane warianty ładunkowe, co zapewnione jest przez kontrolowanie oraz dokumentowanie wszelkich nieprawidłowości. Wszystkie obostrzenia przedstawione powyżej mają na celu eliminację ryzyka związanego z podaniem pacjentowi leku potencjalnie zagrażającego jego życiu lub też mającego gorsze właściwości terapeutyczne. W praktyce nie jest możliwe całkowite uniknięcie powstawania wariantów ładunkowych mAb w USP. Dlatego też konieczne jest zastosowanie operacji ich separacji w etapie DSP [20, 49-56, 58].



Rys. 5. Koncepcja *QbD* adaptowana przez ICH dla produktów farmaceutycznych stosowanych u ludzi [20].

1.2.3 Separacja wariantów przeciwciał monoklonalnych

Metody separacji wariantów ładunkowych mAb podzielić można na analityczne oraz preparatywne. Metody analityczne służą do określenia budowy oraz dokładnego składu wariantów ładunkowych (np. określenie glikozylacji poszczególnych izoform) i nie mają zastosowania podczas procesów DSP w wielkoskalowej produkcji mAb, pełnią jednak ważną rolę w kontroli jakości produktu biologicznego. Głównymi metodami wykorzystywanymi przy analizie składu wariantów mAb są metody oparte na ogniskowaniu elektrycznym, strefowej elektroforezie kapilarnej, membranowej oraz wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej [46, 61-65]. Eluowane frakcje kierowane są najczęściej do analizy za pomocą spektrometrii mas, która pozwala na określenie budowy poszczególnych polipeptydów oraz określenie przyczyn powstawania wyizolowanych wariantów ładunkowych mAb [61-63].

Metody preparatywne służą do dostosowywania składu końcowego wariantów ładunkowych mAb powstałych w etapie USP, w celu wprowadzenia produktu terapeutycznego na rynek [46, 61]. Obecnie w przemyśle biofarmaceutycznym doczyszczanie produktu i dostosowywanie wariantów ładunkowych mAb przeprowadza się za pomocą chromatografii kationowymiennej (ang. *Cation Exchange Chromatography*, CEX), która zostanie szerzej opisana w rozdz.1.3, poświęconym chromatografii.

Preparatywne rozdzielanie wariantów ładunkowych możliwe jest również poprzez strącanie, co opisano w pracach prowadzonych w zespole badawczym [66-67]. W pracach tych wykazano możliwość selektywnego strącania *av* stosując glikol polietylenowy (ang. *Polyethylene Glycol*, PEG) jako precypitant, prowadząc proces w pH 5.0 oraz przy niskiej sile jonowej. Polimery takie jak PEG obniżają rozpuszczalność białek poprzez mechanizmy związane z wykluczaniem sterycznym, jednocześnie nie wpływając na ich wypadkowy ładunek. Ponieważ warianty różnią się pI to wykazują one różny ładunek w zależności od pH roztworu, w którym się znajdują. W pH 5.0 najniższy ładunek wykazują *av* przez co działają na nie najsłabsze siły odpychania elektrostatycznego. Po przekroczeniu granicy rozpuszczalności wywołanej dodatkiem środka strącającego *av* wytrącają się z roztworu, przez co ich udział w nim maleje. Technika ta pozwala znacznie zredukować zawartość *av* w mieszaninie wariantów ładunkowych mAb. Jest to również metoda tańsza oraz szybsza od metod chromatograficznych. Niestety nie pozwala ona na wydzielanie *mv* i *bv*. Jednocześnie w przypadku zastosowania PEG, jako środka strącającego, pozostaje on w produkcie, co wymaga zastosowania dodatkowego etapu oczyszczania [68].

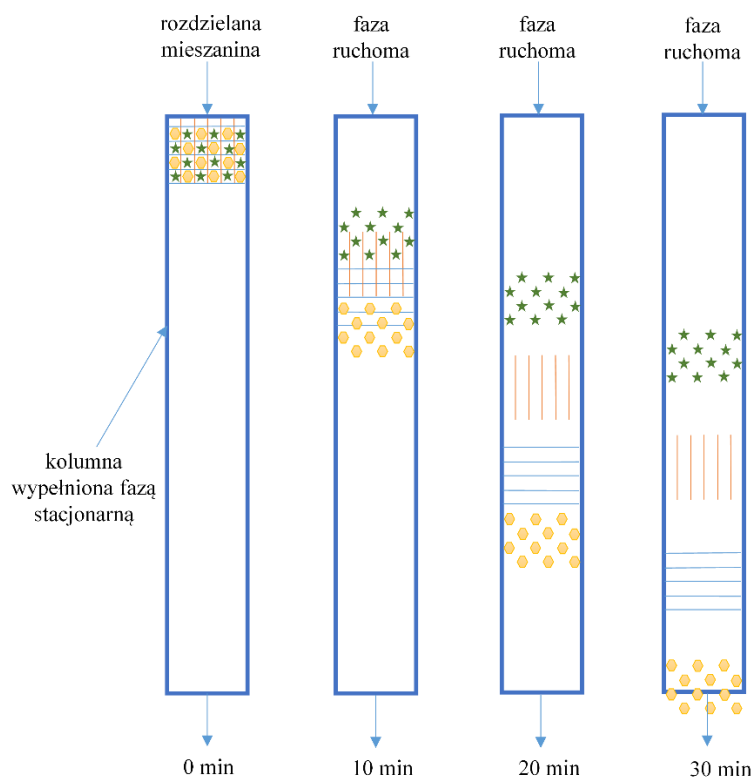
1.3 Podstawy procesu chromatograficznego

1.3.1 Chromatografia kolumnowa

Rozdzielanie mieszanin za pomocą chromatografii polega na podziale masy składników mieszaniny pomiędzy fazą ruchomą a fazą stacjonarną (złoże chromatograficzne). Cząsteczki oddziałujące ze słabszą siłą ze złożem chromatograficznym eluowane są wcześniej z powierzchni matrycy złoża, przez co szybciej migrują wzdłuż kolumny chromatograficznej [69].

Rozdzielaną mieszaninę wprowadza się do kolumny jako roztwór nazywany strumieniem zasilającym w skali preparatywnej i przemysłowej lub próbką w skali analitycznej. Następnie wymywa się z niej zatrzymane adsorpcyjnie składniki za pomocą eluentu (fazy ruchomej) zgodnie z teorią adsorpcji opisaną powyżej. W trakcie elucji fronty stężenia rozdzielanych

substancji ulegają poszerzeniu ze względu na opory transportu masy, co przedstawiono na rys. 6. Jest to szczególnie istotne w chromatografii białek, których cząsteczki charakteryzują się niską dyfuzyjnością, co jest powodem bardzo wolnej kinetyki transportu masy [70-72].



Rys. 6. Schematyczne przedstawienie przebiegu chromatografii kolumnowej [71-72].

W celu rozdzielania biofarmaceutyków stosuje się chromatografię niskociśnieniową (ang. *Low-Pressure Liquid Chromatography*, LPLC). Kolumny w niej stosowane mają od kilku milimetrów (skala analityczna) do kilku metrów średnicy wewnętrznej (skala przemysłowa) i są dostępne w handlu w formie gotowych, upakowanych kartridży. Możliwe jest także samodzielne pakowanie kolumn złożem chromatograficznym, co jest typowe w skali preparatywnej. Powiększanie skali procesu oraz powtarzalność przebiegu rozdzielania chromatograficznego w kolejnych szarżach produkcyjnych są niezwykle ważne dla jakości końcowego produktu biofarmaceutycznego [70, 72].

1.3.2 Chromatografia analityczna a preparatywna

Rozdzielanie mieszanin w skali przemysłowej w większości przypadków odbywa się w nieliniowym zakresie izotermi adsorpcyjnej. Oznacza to, że zależność między stężeniem składnika zaadsorbowanego w fazie stacjonarnej oraz stężeniem tego składnika w fazie ruchomej, będących w stanie równowagi termodynamicznej, jest opisane zależnością nieliniową (modelem izotermi nieliniowej). Ten rodzaj chromatografii preparatywnej nosi z tego powodu nazwę chromatografii nieliniowej [69].

W skali przemysłowej celem chromatografii jest prowadzenie procesu z jak najwyższą produktywnością, definiowaną jako masa wydzielonego składnika na jednostkę objętości złoża chromatograficznego w przeliczeniu na jednostkę czasu. W chromatografii nieliniowej profile stężenia (piki chromatograficzne) często nakładają się na siebie. Dlatego uzyskane chromatogramy nie pozwalają na dokładne wyznaczenie masy produktu [69, 71-73].

W chromatografii preparatywnej białek najczęściej wykorzystywane są ziarna złoż chromatograficznych o średnicach cząstek (d_p) od 20 – 100 μm . Ciśnienia, które uzyskiwane są podczas przepływu fazy ruchomej przez kolumny chromatograficzne nie przekraczają 2 – 3 barów. Przekroczenie tych wartości wiązać się może ze zniszczeniem struktury złoż chromatograficznych dedykowanych do chromatografii preparatywnej, które nie są odporne mechanicznie na ciśnienia powyżej ok. 10 barów lub nawet niższych [72-73].

W chromatografii analitycznej warunki procesu są tak dobrane, że przebiega on w liniowym zakresie izotermi adsorpcyjnej. Pozwala to na dokładną analizę składników badanej próbki pod względem jakościowym i ilościowym. Otrzymywane piki chromatograficzne mają zazwyczaj postać krzywej gaussowskiej, co pozwala na dokładne wyznaczenie czasu retencji danego składnika a także wyznaczenie jego masy wprowadzonej na kolumnę, m.in. za pomocą tzw. krzywych kalibracji [69, 72].

Analizy chromatograficzne wykonywane są przy zastosowaniu kolumn analitycznych do wysokosprawnej chromatografii ciekowej (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) lub ultrasprawnej chromatografii ciekowej (ang. *Ultra-Performance Liquid Chromatography*, UPLC) [71, 74]. Wykorzystuje się tu złoża chromatograficzne o małej średnicy ziaren, co zapewnia wysoką rozdzielczość uzyskiwanych chromatogramów. Wraz ze zmniejszaniem rozmiarów ziaren fazy stacjonarnej wzrasta ciśnienie w układzie chromatograficznym. Standardowe układy do HPLC są odporne na ciśnienia od 300 do 400 barów. W technice UPLC można zastosować ciśnienia nawet do 1000 barów [71, 74].

1.3.3 Techniki stosowane w chromatografii białek

Technikami chromatograficznymi wykorzystywanymi najczęściej w wychwycie, oczyszczaniu i analizie białek są:

- chromatografia powinowactwa (AC),
- chromatografia oddziaływań hydrofobowych (ang. *Hydrophobic Interaction Chromatography*, HIC),
- chromatografia wykluczania (ang. *Size-Exclusion Chromatography*, SEC) oraz

- chromatografia jonowymienna (ang. *Ion Exchange Chromatography*, IEX).

Powyższe techniki zaliczają się do grupy kolumnowej chromatografii cieczerwowej. Różnią się pomiędzy sobą rodzajami użytych matryc ciała stałego oraz ligandów immobilizowanych na ich powierzchni w celu wytworzenia odpowiedniego złoża chromatograficznego. Mechanizm rozdzielania zależy od własności tych ligandów.

Mechanizm rozdzielania w **chromatografii powinowactwa (AC)** opiera się na interakcjach o wysokiej selektywności pomiędzy cząsteczką białka a immobilizowanym na powierzchni matrycy złoża ligandem. Ligandy takie jak: proteina A, proteina G, proteina L, przeciwciała i ich fragmenty, wiążą się z wychwytywaną cząsteczką za pomocą wiązań wodorowych, hydrofobowych, jonowych oraz oddziaływań van der Waalsa. Jako matryca w złożach AC dość popularna jest agaroz, która wykazuje bardzo dobrą odporność chemiczną w szerokim zakresie pH. Charakteryzuje się również niską zdolnością do niespecyficznego wiązania wielu czynników biologicznych i jest jednocześnie tanim materiałem. Ze względu na fakt, że posiada ona bardzo ograniczoną stabilność mechaniczną nie może być wykorzystywana w HPLC. W tym celu wykorzystuje się jako matryce modyfikowaną krzemionkę, modyfikowane szkło, polistyren czy polimetakrylan. Polimery organiczne, w przeciwieństwie do krzemionki oraz szkła mogą być stosowane w równie szerokim zakresie pH, jak agaroz i posiadają dobrą biokompatybilność [71, 75-76].

W oczyszczaniu mAb najczęściej stosuje się AC z ligandem w postaci proteiny A. Jest to białko będące składnikiem ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, które wiąże się specyficznie z fragmentem Fc IgG [72, 75, 77]. Chromatografia z zastosowaniem proteiny A wykorzystywana jest na etapie wychwytu białka z roztworu pochodowlanego, pozwalając na zatężenie i wstępne oczyszczenie produktu z HCP. Popularnym złożem wykorzystywanym na skalę przemysłową jest MabSelect SuRe firmy Cytiva, które posiada dynamiczną pojemność złoża (ang. *Dynamic Binding Capacity*, DBC) na poziomie $\sim 35 \text{ mg IgG ml}_{\text{złoża}}^{-1}$. Supernatant pochodowlany (*harvest*) wprowadzany jest do kolumny przy neutralnym pH. Po związaniu IgG z proteiną A przepłukuje się kolumnę w celu usunięcia niespecyficznie związanych ze złożem zanieczyszczeń. Następnie przeciwciała eluuje się przy pomocy buforów o niskim pH, w zakresie pH 2.5 – 4.0. Niskie pH utrzymywane jest przez krótki okres w celu wstępnej inaktywacji wirusowej, a następnie bufor jest szybko wymieniany ze względu na słabą stabilność struktury mAb i ich skłonność do agregacji w tak niskim pH [38, 40-41, 71, 76-77].

Złoża do chromatografii AC są niezwykle drogie, co wynika z konieczności wytworzenia ligandów w odpowiednich komórkach (np. bakteryjnych). Obecnie za 1 l złoża z proteiną A

należy zapłacić blisko 24 tysiące dolarów. Z tego też powodu kolumny w AC upakowane są najczęściej małą objętością złożeń, w porównaniu do kolumn zawierających inne złożeń chromatograficzne i stosuje się je wielokrotnie (nawet do 200 razy). Generuje to konieczność czyszczenia kolumny pomiędzy kolejnymi cyklami chromatograficznymi. Do czyszczenia muszą być używane słabe roztwory NaOH o wysokim pH, które powodują denaturację białek, w tym częściowo proteiny A. Za pomocą inżynierii białek projektuje się obecnie ligandy, które wykazują odporność na ten czynnik, niemniej jednak problem ten pozostaje niecałkowicie rozwiązany [72, 75-77].

Matrycami w **chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC)** są podobnie jak w AC agarozą lub celulozą. Jako ligandy stosowane są w tej technice np. krótkie łańcuchy alkilowe lub aryłowe. Za oddziaływania w HIC odpowiadają m.in. siły van der Waalsa pomiędzy niepolarnymi aminokwasami łańcucha białkowego (fenyloalaniny, tryptofanu, metioniny). Jednak mechanizm wiązania oraz towarzyszące mu efekty nie są w pełni zrozumiałe [72, 77-80]. Adsorpcja białek odbywa się przy wysokich wartościach stężenia soli kosmotropowych (np. siarczanu amonu), dlatego HIC używana jest często po etapie strącania lub chromatografii jonowymiennej, gdzie stosowane są wysokie stężenia soli [78-80]. HIC wykorzystuje się w usuwaniu agregatów mAb, które najczęściej są bardziej hydrofobowe od białek prawidłowo pofalowanych [80]. Ponadto HIC umożliwia usuwanie endotoksyn, plazmidów bakteryjnych, enzymów komórkowych czy też kwasów nukleinowych [77-78, 80]. Desorpcja substancji zaadsorbowanych na złożu HIC następuje poprzez zmniejszenie siły jonowej fazy ruchomej. DBC żywic w HIC jest dość niska i mieści się w przedziale 10 – 50 mg białka $\text{ml}^{-1}_{\text{złoża}}$ [78]. Zastosowanie HIC stwarza określone trudności, m.in. pojemność chłonna złoża ogranicza możliwość wprowadzania do kolumny dużych mas białka, a wysoka siła jonowa i silne oddziaływania hydrofobowe mogą wpływać na konformację białka, a nawet powodować jego strącanie się w kolumnie chromatograficznej [72, 78-79].

W **chromatografii wykluczania (SEC)** cząsteczki rozdzielane są w zależności od ich rozmiaru, co wynika z ich masy molekularnej oraz kształtu struktury cząsteczki [72, 81]. Separacja następuje tutaj dzięki różnej prędkości migracji substancji o odmiennych rozmiarach w kolumnie chromatograficznej. Cząsteczki posiadające większe rozmiary są eluowane z kolumny jako pierwsze ponieważ nie mogą wnikać do wszystkich porów w ziarnach złoża chromatograficznego. W głąb porów dyfundują natomiast cząsteczki o mniejszych rozmiarach, przez co ich czas migracji wzdłuż kolumny jest dłuższy. Dlatego możliwe jest rozdzielenie substancji o różnych rozmiarach, np. agregatów białka od jego monomerów [72, 81].

Złoża chromatograficzne w SEC wykonane są z prostych substancji np. dekstranu, agarozy, poliakrylamidu, mieszanin dekstranu i poliakrylamidu lub dekstranu i agarozy [77]. Pomiędzy złożem SEC a separowanymi cząsteczkami nie powinno być żadnych interakcji, dlatego fazy stacjonarne pozbawione są tutaj dodatkowych ligandów na swojej powierzchni. Konieczne jest natomiast, aby budowa strukturalna złoża była jak najbardziej regularna [81].

Produktywność kolumn SEC jest dość niska, co wynika z konieczności wprowadzania do kolumny małych objętości próbki w celu uzyskania efektywnego rozdzielania. Dodatkowo, aby zapewnić wyższą sprawność kolumny stosowane są niskie wartości przepływu fazy ruchomej, co znacząco wydłuża czas separacji [72, 81]. Z tych powodów chromatografia SEC jest rzadko wykorzystywana w etapach DSP, w których oczyszczane są duże ilości białka. W skali laboratoryjnej oraz małej skali produkcyjnej chromatografię tą stosuje się w celu wymiany buforów, odsalania oraz usuwania cząsteczek o dużych różnicach w rozmiarach. W skali analitycznej SEC wykorzystywana jest np. do określania zawartości agregatów w końcowym produkcie [72, 77, 81].

1.3.4 Chromatografia IEX w oczyszczaniu wariantów ładunkowych mAb

Podstawą **chromatografii jonowymiennej (IEX)** są odwracalne oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy ładunkami na powierzchni chromatografowanych cząsteczek, a przeciwnie naładowanymi grupami funkcyjnymi ligandów fazy stacjonarnej. Cząsteczki białka są związkami amfoterycznymi posiadającymi ładunki ujemne oraz dodatnie, które pochodzą od grup bocznych aminokwasów oraz ich końca aminowego i karboksylowego, znajdującego się w każdym łańcuchu polipeptydowym. Wartość pH przez to wpływa na ogólny ładunek cząsteczki białka. W pI białko posiada wypadkowy zerowy ładunek i jest jonem obojnym, jednak nadal pewne grupy funkcyjne wykazują zdolność do wiązania się z ligandami [72].

Na siłę wiązania białka wpływa zarówno pH roztworu, jak i wartość siły jonowej. Adsorpcję na złożach IEX prowadzi się przy niskich wartościach siły jonowej. Desorpcję prowadzi się wprowadzając fazę ruchomą zawierającą wyższe stężenie soli (np. NaCl), zmieniając pH eluentu lub łącząc obie metody [46, 72, 82-83]. Mechanizm elucji przy zastosowaniu wysokiej siły jonowej tłumaczy nazwę chromatografii, w której to cząsteczki białka konkurują z jonami soli o naładowane grupy funkcyjne na ligandach złoża. Zmiana pH fazy ruchomej w kierunku pI cząsteczki powoduje zmianę wypadkowego ładunku białka, przez co jego siła wiązania z ligandami maleje i ulega ono elucji z kolumny chromatograficznej [71-72, 82].

Tabela 1. Przykłady ligandów stosowanych w żywicach chromatograficznych IEX [72, 82].

rodzaj chromatografii IEX	nazwa ligandu	skrót	struktura
słaby wymiennicz anionowy	dietylaminoetyl	DEAE	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
silny wymiennicz anionowy	czwartorzędowa amina	Q	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
	czwartorzędowy aminoetyl	QAE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
słaby wymiennicz kationowy	karboksymetyl	CM	$-\text{CH}_2\text{COOH}$
silny wymiennicz kationowy	sulfopropyl	SP	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$
	siarczan metylu	S	$-\text{OCH}_2\text{SO}_3\text{H}$

W zależności od ładunku wymienianych jonów chromatografię IEX dzieli się na dwie techniki: kationowymienną (CEX) oraz anionowymienną (ang. *Anion Exchange Chromatography*, AEX). W CEX ujemnie naładowane ligandy wiążą dodatnio naładowane cząsteczki, natomiast w AEX faza stacjonarna jest naładowana dodatnio, dzięki czemu zatrzymywane są na niej aniony [71-72, 77, 82-83]. Wymieniacze jonowe klasyfikuje się jako silne oraz słabe względem ich zdolności do wymiany jonów w szerokim lub wąskim zakresie pH. Silne wymieniacze jonowe, zarówno w CEX jak i AEX są mniej zależne od pH roztworu i posiadają dobrą zdolność do wymiany jonów nawet przy dużych zmianach pH. W przypadku CEX ligandy zawierają grupy funkcyjne silnych kwasów, np. sulfonowe, a w przypadku AEX są to czwartorzędowe aminy. W przeciwieństwie do nich słabe wymieniacze jonowe posiadają ligandy zawierające słabe grupy kwasowe, np. karboksylowe (CEX) lub aminowe o niższej rzędowości (AEX). Siła wiązania białka z tym złożem jest bardziej zależna od pH roztworu, ale w wielu przypadkach pozwalają one na selektywny rozdział białek [72, 82]. Ligandy używane najczęściej w CEX oraz AEX przedstawiono w tabeli 1.

W procesach DSP mAb IEX wykorzystywana jest przynajmniej w jednym z etapów. CEX jest najczęściej używana po AC. Roztwór białka otrzymany po AC ma niskie pH (poniżej pI białka), przez co bezpośrednio może być kierowany do kolumny kationowymiennej. Na tym etapie oczyszcza się produkt z HCP, kwasów nukleinowych czy też endotoksyn. Chromatografia ta prowadzona jest w tzw. trybie *bind-and-elute*, czyli „zaadsorbuj i eluuj”. Produkt wiąże się ze złożem, natomiast zanieczyszczenia wymywane są wraz z buforem wiążącym. Następnie mAb wymywa się buforem desorbującym i kieruje do kolejnych etapów

oczyszczania [82]. Zwykle pI wariantów białka mieści się w przedziale 7 – 8.5, co oznacza, że w $\text{pH} < 7$ posiada ono ładunek dodatni. Kolejno AEX stosowana jest w trybie przepływowym (ang. *flow-through*). Na złożu wiązane są wirusy, DNA, ligandy proteiny A obecne w eluacie AC oraz kwasowe HCP, natomiast mAb przepływa przez złożo chromatograficzne nie wiążąc się z nim [82].

Warianty ładunkowe mAb posiadają zbliżone względem siebie pI, jednak wraz z oddalaniem się wartości pH od ich pI, różnice w ładunku całkowitym cząsteczek wzrastają. Tym samym *bv* w buforze o niskim pH najsilniej wiążą się ze złożami CEX, zaś w wysokim pH najsłabiej ze złożami AEX. Odwrotnie sytuacja wygląda dla *av*, które najsilniej adsorbują się na złożach AEX, w wysokim pH (powyżej swojego pI) oraz najsłabiej na złożach CEX w niskim pH [46, 82]. Z tego też powodu w oczyszczaniu wariantów ładunkowych mAb CEX uważana jest za standardową metodę zarówno w separacji, jak i analizie zawartości wariantów w produkcji. W przemyśle do rozdzielania wariantów mAb wykorzystywane są złoża takie jak: Fractogel COO-(M), SP Sepharose FF, czy POROS XS. Warianty są eluowane na tych złożach w liniowym gradiencie soli lub pH [46-47].

Podobne wartości pI wariantów ładunkowych mAb są powodem wzajemnego nakładania się ich profili stężenia, co znacząco utrudnia separację tych cząsteczek. Występuje to szczególnie na złożach o dużych rozmiarach ziaren (pomiędzy 30 a 90 μm), stosowanych w skali preparatywnej i przemysłowej [68, 84-86]. Zmniejszenie rozmiarów ziaren złoża poprawia efektywność rozdzielania wariantów, jednak nie rozwiązuje całkowicie problemu, ponieważ wraz ze zmniejszaniem średnicy ziaren złoża, wzrasta ciśnienie w układzie chromatograficznym. Wymusza to stosowanie krótszych kolumn lub niższych prędkości przepływu, co obniża możliwość znaczącego obciążenia kolumny masą białka, a tym samym produktywność takiej metody [84-85]. Lee i in. wykorzystując złożo SP ImpRes, o d_p w zakresie 36 – 44 μm , wprowadzali na kolumnę 2.55 mg mAb $\text{ml}_{\text{złoża}}^{-1}$ i otrzymali *mv* o czystości 100%, wmywając je z kolumny za pomocą liniowego gradientu pH, przy wydajności 76.6% [84]. Podobne wartości uzyskał Jing i in. ładując na złożo Nano SP-15L ($d_p = 15 \mu\text{m}$) 2.8 mg mAb $\text{ml}_{\text{złoża}}^{-1}$. Jednocześnie zauważyli oni znaczny wzrost ciśnienia w kolumnie, co wykluczyło możliwość stosowania takiej chromatografii przy wysokich prędkościach przepływu fazy ruchomej [85]. Porównanie wprowadzanych na kolumnę mas mAb, złoż chromatograficznych oraz ilości kolumn w wymienionych wyżej artykułach przedstawiono w tabeli 2. We wszystkich metodach zestawionych w tabeli 2 używano gradientu liniowego pH lub soli, co powodowało wydłużenie czasu elucji, rozcieńczenie frakcji oraz konieczność żmudnego frakcjonowania, o czym wspomniano powyżej.

Tabela 2. Porównanie warunków prowadzenia separacji wariantów ładunkowych mAb.

	V_{col}	obciążenie kolumny	ilość kolumn	nazwa złoża CEX	d_p
artykuł	[ml złoża]	[mg mAb ml ⁻¹ złoża]	[-]	[-]	[μ m]
[84]	20	2.55*	1	Capto S	90
				CM Sepharose	90
				SP ImpRes	36-44
[85]	1.96	2.8	1	SP Sepharose Fast Flow	90
	1.96			Monomix MC30 SP	30
	1.70			Nano SP-15L	15
[87]	0.35	15-22.5	2 lub 3	POROS HS	50
[88]	1.66	0.73	2	Fractogel EMD COO-(S)	30
[89]	0.98	5	2	BioPro SmartSep S10	10
		15			
[90]	3.93	0.1	2	Proteomix SCX-NP10	10
	4.15	0.1-0.4			
	19.63				
	88.20				

V_{col} objętość jednej kolumny chromatograficznej wyrażona w ml złoża chromatograficznego;
*oszacowano na podstawie danych eksperymentalnych podanych w publikacji

Kolejne badania doprowadziły do opracowania metod, w których warianty rozdziela się za pomocą chromatografii wielokolumnowej, przy wymywaniu gradientem liniowym pH lub metodą rugowania [87]. Khanal i in. w metodzie rugowania do pierwszej z układu dwóch lub trzech kolumn chromatograficznych wprowadzali duże masy białka (15 – 22.5 mg mAb ml⁻¹złoża). Zaobserwowali, że następuje wtedy konkurencyjna adsorpcja pomiędzy poszczególnymi wariantami ładunkowymi, przez co *bv* mocniej adsorbujące się ze złożem CEX, wypierają (rugują) *mv* oraz *av*. Związane białko desorbowano za pomocą gradientu liniowego pH oraz soli. Wydzielono *mv* o czystości i wydajności ok. 90%, zaś *av* oraz *bv* wydzielono z wydajnością < 30% [87].

Müller-Späth i in. [88], Vogg i in. [89] oraz Jing i in. [90] do separacji wariantów ładunkowych zastosowali dwie bliźniacze kolumny. Uzyskali czystość *mv* > 80% w produkcji, przy 90% wydajności [88] lub 71% [89]. Jing i in. wydzielili *av* z wydajnością 86% [90].

1.4 Modele dynamiki procesu chromatograficznego

Jak wspomniano powyżej, projektowanie procesu chromatograficznego uwzględnia koncepcję QbD i stanowi niezbędny element rozwoju leków biologicznych. Definiowanie parametrów procesu opierać się może na wysokoprzepustowych metodach eksperymentalnych, realizowanych w mikroskali. Uzyskane dane wprowadzane są jako dane wejściowe do algorytmów uczenia maszynowego lub poddawane są analizie statystycznej [91]. Otrzymuje się modele statystyczne oparte na danych, które nie pozwalają na zrozumienie mechanizmu procesu i często zawodzą w projektowaniu procesu w większej skali, preparatywnej lub przemysłowej [91-92]. Dużo efektywniejsze modele uzyskuje się stosując podejście *knowledge-based design*, którego przykładem jest zastosowanie modeli dynamicznych [93-94].

Wykorzystanie modeli dynamicznych kolumny chromatograficznej pozwala na zrozumienie mechanizmu procesu chromatograficznego i tym samym na jego optymalizację i przenoszenie skali [95]. Składają się one z równań bilansu masy i uwzględniają efekty kinetyczne i termodynamiczne, które towarzyszą adsorpcji i elucji wszystkich składników znajdujących się w rozdzielanej mieszaninie. Ilościowy opis efektów kinetycznych i termodynamicznych jest niezbędny do prawidłowej predykcji adsorpcji cząsteczek na złożu chromatograficznym [69, 92].

IgG1 to cząsteczki o dużych rozmiarach i masie (~ 150 kDa), przez co ich transport masy w procesie chromatograficznym jest utrudniony. Najczęściej w opisie chromatografii białek stosuje się modele matematyczne, które uwzględniają efekty wywołane dyspersją osiową, oporami transportu masy wraz z kinetyką adsorpcji-desorpcji [72, 92].

Model ogólny (ang. *General Rate*, GR) należy do modeli heterogenicznych, które zawierają równania bilansu masy w fazie ciekłej i stacjonarnej oraz uwzględniają matematyczny opis prawie wszystkich niezbędnych procesów cząstkowych zachodzących w kolumnie chromatograficznej. Niestety, wraz ze skomplikowaniem modelu rosną wymagania dotyczące narzędzi obliczeniowych oraz nakładu czasu obliczeniowego, w którym otrzymuje się wyniki [69, 92-93].

Modele pseudo-homogeniczne wyprowadzone jako uproszczenia modelu GR mogą być rozwiązane przez prostsze i szybsze algorytmy numeryczne. Składają się one z równania bilansu masy w fazie ruchomej, zaś udział efektów kinetycznych jest uwzględniany pośrednio przez zastępcze parametry modelu. Wśród ww. modeli często używany jest model kinetyczno-dyspersyjny (ang. *Transport-Dispersive Model*, TD), stanowiący kompromis pomiędzy

prostotą modelu, a jego dokładnością predykcijną [92, 95]. Model ten został użyty w niniejszej pracy.

Model TD składa się z różniczkowego równania bilansu masy w fazie ruchomej (równanie 1), które łączy się z kinetycznym równaniem opisującym transport masy (równanie 2):

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

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{mq,i}(q_i^* - q_i) = k_{mc,i}(C_i - C_i^*) \quad (2)$$

gdzie ε_t to porowatość złoza chromatograficznego, $\varepsilon_{t,p}$ to specyficzna porowatość złoza chromatograficznego, wyznaczona dla białka, C_i w mg ml^{-1} i q_i w $\text{mg ml}_{\text{zloza}}^{-1}$, to stężenia i -tych składników odpowiednio w fazie ruchomej oraz w fazie zaadsorbowanej, C_i^* i q_i^* to równowagowe stężenia i -tych składników mieszaniny odpowiednio w eluencie i fazie zaadsorbowanej, określane równaniem izotermy adsorpcji, u to prędkość powierzchniowa wyrażona w m s^{-1} , x to współrzędna osiowa w m, t to czas w s, $D_{L,a}$ jest efektywnym współczynnikiem dyspersji w $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, zaś $k_{mq,i}$ i $k_{mc,i}$ w s^{-1} , to zastępcze współczynniki szybkości procesu przenikania masy [86, 92].

Równanie 2 oparte jest na liniowej sile napędowej procesu przenikania masy, rozumianej jako różnica pomiędzy równowagowym a rzeczywistym stężeniem i -tego składnika w fazie zaadsorbowanej ($q_i^* - q_i$) lub w fazie ruchomej ($C_i - C_i^*$). Równania bilansu masy oraz transportu masy łączy się z warunkami początkowymi, opisującymi początkowy profil stężenia wewnątrz kolumny:

$$C_{inj}(t = 0, x) = 0 \quad (3)$$

Równanie 3 odpowiada kolumnie niezawierającej białka w chwili początkowej procesu chromatograficznego.

Równanie 3 łączy się z równaniami 4A – C. Równania 4A i 4B określają warunki brzegowe na wlocie kolumny:

$$u \left(C_{inj}(t, x = 0) - C_i(t, x = 0) \right) = -\varepsilon_t D_{L,a} \frac{\partial C(t,x)}{\partial x} \quad (4A)$$

$$C_{inj,i}(t, x = 0) = \begin{cases} C_{inj,i} & \text{dla } t \in [0, t_{inj}] \\ 0 & \text{dla } t > t_{inj} \end{cases} \quad (4B)$$

oraz równanie 4C określa warunki na wylocie kolumny o długości L ($x = L$):

$$\frac{\partial c_i(t, x=L)}{\partial x} = 0 \quad (4C)$$

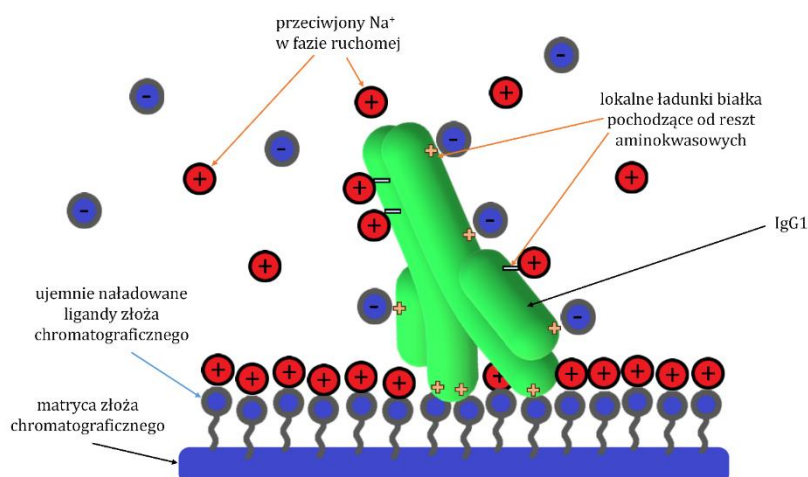
gdzie $C_{inj,i}$ oraz t_{inj} to odpowiednio stężenie wlotowe i -tego składnika wprowadzanego w strumieniu zasilającym (próbce) i czas wprowadzania strumienia zasilającego (próbki) [69, 86, 92].

W chromatografii białek zwykle proces adsorpcji-desorpcji jest dużo szybszy w porównaniu do szybkości transportu masy. Dlatego w modelowaniu procesów IEX najczęściej zakłada się natychmiastowe ustalenie się stanu równowagi adsorpcyjnej na granicy fazy stałej oraz eluentu [69, 92].

1.5 Termodynamika procesu adsorpcji

1.5.1 Izoterma SMA

Równowaga termodynamiczna procesów chromatograficznych IEX jest często opisywana za pomocą izotermy stechiometrycznej, która zakłada stechiometryczny mechanizm wymiany jonowej na powierzchni adsorbentu. Przeciwnon wiążący się z określoną liczbą miejsc aktywnych fazy stacjonarnej wypiera odpowiadającą mu (stechiometryczną) liczbę jonów podlegających elucji. Dla białek, które są cząsteczkami o dużych rozmiarach, izoterma jest modyfikowana w sposób uwzględniający efekt osłaniania ładunku na powierzchni adsorbentu przez taką makrocząsteczkę, co przedstawiono na rys. 7 [69, 72, 92].



Rys. 7. Schemat uwzględniający efekt osłaniania ładunków na powierzchni adsorbentu [72].

Przedstawiony efekt osłaniania ładunków ligandów przez cząsteczki białka (lub innej makromolekuły) opisuje model izotermy SMA (ang. *Steric Mass Action*, SMA):

$$q_i^* = \frac{K_{e,i} [q^m - \sum_j^N ((z_j + \sigma_j) q_j^*)]^{z_i}}{C_s^{z_i}} C_i \quad (5)$$

gdzie q_i^* oraz C_i to równowagowe stężenie i -tego adsorptywu w fazie zaadsorbowanej oraz ruchomej, C_s to stężenie soli, z_i to ładunek białka, q^m to pojemność chłonna złoża, $K_{e,i}$ to stała równowagi adsorpcji, zaś σ_j to współczynnik ekranowania ładunku [72, 86, 92]. Parametrami modelu, które muszą być wyznaczone doświadczalnie są: z_i , q^m , $K_{e,i}$ oraz σ_j . Parametry te są funkcją pH. Do wyznaczenia ich wartości konieczne jest przeprowadzenie cyklu odpowiednich badań doświadczalnych, a otrzymane wyniki stają się bazą do estymacji oraz weryfikacji parametrów za pomocą wybranego modelu izotermy. Wartości parametrów modelu są estymowane lub obliczane osobno dla każdego składnika zarówno na etapie adsorpcji na złożu chromatograficznym oraz na etapie elucji z kolumny [69, 86, 92].

1.5.2 Izoterma adsorpcji kooperatywnej

Izoterma adsorpcji kooperatywnej (ang. *cooperative adsorption isotherm*) stanowi model uproszczony w porównaniu do modelu SMA:

$$q_i^* = K_{e,i} C_i (q_i^m - \sum_j^N \sigma_{i,j} q_j^*) \quad (6)$$

gdzie $K_{e,i}$ to stała równowagi adsorpcji, q_i^m to pojemność złoża chromatograficznego, dostępna dla i -tego składnika mieszaniny, $\sigma_{i,j}$ to współczynnik ekranowania.

Jeżeli współczynnik ekranowania wynosi 1, to równanie sprowadza się do równania izotermy typu Langmuira. Odchylenie od tej wartości, $\sigma_i \neq 1$, wskazuje na mechanizm adsorpcji kooperatywnej, gdzie wartości współczynnika ekranowania większe od 1 opisuje negatywne odchylenia od izotermy Langmuira, które wynikają z odpychających oddziaływań i efektów sterycznych, zaś $\sigma_i < 1$ oznacza dodatnią adsorpcję kooperatywną, wynikającą z oddziaływań przyciągających pomiędzy składnikami w fazie zaadsorbowanej [86, 92].

W opisie termodynamiki procesu adsorpcji wariantów ładunkowych mAb na złożach IEX możliwe jest zredukowanie liczby parametrów izotermy niezbędnych do wyznaczenia. Warianty ładunkowe mAb posiadają bardzo podobne rozmiary, dlatego też można założyć, że współczynniki ekranowania są takie same: $\sigma_{i,j} = \sigma_{i,i} = \sigma_{j,j}$, gdzie i, j to odpowiednio poszczególne warianty w mieszaninie [86, 92].

W celu zdefiniowania modelu izotermy adsorpcji kooperatywnej niezbędne jest wyznaczenie: stałej równowagi adsorpcji $K_{e,i}$, pojemności złoża q_i^m i współczynnika ekranowania σ_i . Wartości tych parametrów są funkcją pH oraz stężenia soli [69, 86, 92].

1.5.3 Izoterma CPA

Modele SMA oraz adsorpcji kooperatywnej pozwalają na względnie prosty opis mechanizmu adsorpcji białek na złożach jonowymiennych. Ich równania nie uwzględniają oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy naładowanymi cząsteczkami mAb oraz ligandami złoża. Z tego powodu mogą prowadzić do błędów w opisie matematycznym mechanizmu adsorpcji oraz profili elucji chromatograficznej [92-94]. Bardziej precyzyjny opis zapewnia model izotermy adsorpcji cząsteczek koloidalnych (ang. *Colloidal Particle Adsorption*, CPA), który przedstawia równanie 7:

$$q_i^* = K_{e,i} C_i \exp \left\{ - \sum_{j=1}^n \left[\frac{c q_j}{4 \sum_{k=1}^n q_k} \frac{B_{ij} a_{ij}}{R} \exp[-\kappa (R - 2a_{ij})] (3 + \kappa R) \right] \right\} \quad (7)$$

gdzie B_{ij} to parametr opisujący oddziaływania pomiędzy białkiem i oraz białkiem j , a_{ij} to promień białka, R stanowi odległość pomiędzy cząsteczkami białka, zaś κ to współczynnik ekranowania.

R zdefiniowane jest przez heksagonalny układ cząsteczek tworzących monowarstwę w fazie zaadsorbowanej:

$$R = \left(\frac{2}{\sqrt{3} q_i N_A} \right)^{0.5} \quad (8)$$

gdzie N_A to liczba Avogadro, zaś φ to współczynnik faz, wyznaczany przy założeniu, że dla adsorpcji jednowarstwowej i maksymalnym pokryciu złoża chromatograficznego (q^m) odległość pomiędzy cząsteczkami (R) wynosi $2a$ ($a_{ij} = a$, dla mAb wartość ta wynosi $5.5 \cdot 10^{-9}$ m) [92-94, 96]:

$$\varphi = 2\sqrt{3} a^2 q^m N_A \quad (9)$$

Współczynnik κ , występujący w równaniu 7, to odwrócona długość Debeye'a w elektrolicie i zdefiniowany jest następująco:

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 e^2 I N_A}{k_b T \varepsilon_0 \varepsilon}} \quad (10)$$

gdzie e to ładunek elementarny, I to siła jonowa roztworu, k_b to stała Boltzmann, T to temperatura, ε_0 to przenikalność elektryczna próżni, zaś ε jest względną przenikalnością elektryczną [68, 92-94].

Przebieg izotermi jest liniowy w przypadku, gdy pomiędzy poszczególnymi składnikami mieszaniny (białkami) nie występują oddziaływania boczne białko-białko [93]. Przy wyższych stężeniach białka oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy jego cząsteczkami zaadsorbowanymi na powierzchni ziaren złoża chromatograficznego ulegają wzmocnieniu. W modelu CPA uwzględniane są one przez parametr B_{ij} , opisujący interakcję pomiędzy białkiem i oraz białkiem j [92-95].

Model CPA, podobnie jak pozostałe, oparto o pewne uproszczenia. Jednym z nich jest założenie, że adsorbowane cząsteczki mają kształt kuli, co dla przeciwciał nie jest prawdą. Dodatkowo cząsteczki białka mogą zmieniać swój ładunek w obecności innej substancji (np. innego białka w roztworze), zaś model izotermi CPA zakłada ich stały ładunek [92]. Zastosowanie tego modelu w niniejszych badaniach pozwoliło jednak na dobre dopasowanie profili stężeń wariantów ładunkowych mAb w warunkach silnego przeładowania masowego kolumny chromatograficznej.

1.5.4 Metody wyznaczania izoterm

Równowagę adsorpcyjną w układach ciecz – ciało stałe wyznacza się w warunkach izotermicznych oraz izokratycznych. Pomiar równowagi opiera się na wygenerowaniu danych eksperymentalnych, zakładających mechanizm odwracalnego procesu adsorpcja-desorpcja składnika mieszaniny na złożu chromatograficznym. W chromatografii preparatywnej wyznacza się ją od wartości stężenia składników mieszaniny bliskich zeru aż do maksymalnych stężeń, które wykorzystywane będą w projektowanym procesie chromatograficznym [69].

Jedną z najprostszych metod pomiaru izoterm jest metoda statyczna. W metodzie tej określoną objętość adsorbentu, V_a , miesza się z określoną objętością próbki, V , o znanym stężeniu początkowym adsorbowanej substancji, $C_{0,i}$. Otrzymaną zawiesinę inkubuje się przez określony czas, potrzebny do ustalenia się równowagi pomiędzy stężeniem substancji w roztworze, C_i , i w fazie zaadsorbowanej, q_i^* . Stężenia równowagowe w fazie ruchomej oraz stacjonarnej wyznacza się za pomocą równania 11:

$$q_i^* = \frac{V(C_{0,i} - C_i)}{V_a} \quad (11)$$

Pomiary wykonuje się dla zadanego zakresu stężeń badanej substancji, a na podstawie otrzymanych wyników określa się, który z modeli izoterm najdokładniej opisuje otrzymane dane eksperymentalne [69, 86].

Metoda statyczna jest metodą dokładną, jednak dość czasochłonną. Dla adsorpcji białek dominują efekty kinetyczne związane z transportem masy i układ nie osiąga równowagi w trakcie elucji chromatograficznej. Dlatego dla celów praktycznych stosuje się jedną z metod dynamicznych: metodę dopasowania do piku, nazywaną również metodą inwersji (ang. *Inverse Fit Method*, IM). Parametry izoterm wyznacza się w tym przypadku poprzez dopasowanie symulacji do profili stężenia badanych substancji uzyskanych w eksperymentach z użyciem kolumny chromatograficznej w warunkach izokratycznych. Metoda IM stosowana jest również do wyznaczania wartości parametrów izoterm dla układów wieloskładnikowych. W celu jak najdokładniejszego wyznaczenia wartości parametrów i zwiększenia dokładności prowadzonych obliczeń estymację parametrów należy przeprowadzić dla kilku profili doświadczalnych, otrzymanych w różnych warunkach operacyjnych [69, 93].

2 Część badawcza

2.1 Materiały

Przeciwciała monoklonalne wykorzystane w badaniach eksperymentalnych to IgG1, pochodzące z firmy *Polpharma Biologics* (Gdańsk, Polska), o masie cząsteczkowej 148 kDa i czystości $\geq 96\%$. Punkty izoelektryczne wariantów mAb wynosiły odpowiednio: $pI_{av} = 8.7$, $pI_{mv} = 8.9$, $pI_{bv} = 9.1$.

W badaniach wykorzystano złoża chromatograficzne, których charakterystykę przedstawiono w tabeli 3. Złoża upakowano do szklanych kolumn chromatograficznych typu TRICORN (Cytiva, Szwecja), wyposażonych w adaptory oraz fryty ceramiczne. Złoża te użyto również do pomiarów izoterm adsorpcyjnych.

Tabela 3. Złoża chromatograficzne wykorzystane w badaniach eksperymentalnych.

nazwa złoża	TOYOPEARL GigaCap S-650M	TOYOPEARL Sulfate-650F	POROS™ XS	POROS™ XQ
skrót	TP GigaCap	TP Sulfate	POROS XS	POROS XQ
producent	Tosoh Bioscience		Thermo Fisher Scientific	
rodzaj złoża	silny kationit CEX			silny anionit AEX
grupa funkcyjna	sulfonian	siarczan	sulfopropyl	czwartorzędowa amina
matryca złoża	polimer metakrylowy		sieciowany poli(styren-diwinylbenzen)	
łącznik	propyl	butyl	-	
średni rozmiar ziaren złoża μm	50 – 100	45	50	

Zawartość wariantów mAb analizowano za pomocą chromatografii analitycznej CEX, stosując kationowymienną kolumnę HPLC ProPac™ WCX-10 (Thermo Fisher Scientific, USA), I.D. 0.4 cm i długości (L) 25 cm, upakowaną złożem o średnicy ziarna 10 μm . Kolumnę wyposażono w pre-kolumnę ProPac™ WCX-10G (Thermo Fisher Scientific) I.D 0.4 cm i $L = 5$ cm, upakowaną takim samym złożem.

Wszystkie roztwory wykorzystywane zarówno do pomiaru izoterm, rozdzielania chromatograficznego, jak i technik analitycznych przygotowywane były z wody dejonizowanej oraz odczynników o czystości do analizy lub wyższej i odważane na wadze OHAUS PX224

(OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) z dokładnością do 4 miejsc po przecinku. pH roztworów ustalano z wykorzystaniem pH-metru METTLER TOLEDO FiveEasy (Mettler Toledo, USA). Roztwory buforowe oraz roztwory zawierające mAb poddawano filtracji z wykorzystaniem sączków strzykawkowych z membraną PES o średnicy porów 0.22 μm oraz zestawu do filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem, wykorzystując sączki membranowe z mieszanych estrów celulozy (MCE) o średnicy porów 0.22 μm .

Probówki filtracyjne Amicon® Ultra (Merck Millipore, Niemcy) o punkcie odcięcia masy cząsteczkowej (ang. *molecular weight cut-off*, MWCO) 30 kDa i objętości 4 i 15 ml, z membraną z regenerowanej celulozy wykorzystano w celu zatężania białka oraz wymiany buforów. Probówki Corning® Costar® Spin-X® (Sigma-Aldrich, Niemcy) z membraną z octanu celulozy o średnicy porów 0.22 μm użyto do podmiany buforu w obecności złoża chromatograficznego.

2.2 Roztwory buforowe

W chromatografii kationowymiennej (CEX) buforami wiążącymi był 50 mM bufor octanowy, doprowadzany do określonego pH za pomocą kwasu octowego lub 25 mM bufor fosforanowy (wodorofosforan (V) disodu, Na_2HPO_4), który doprowadzano do określonego pH za pomocą kwasu ortofosforowego (V). Jako bufor desorbujący stosowano 25 mM bufor fosforanowy o pH wyższym niż pH wiążące.

W chromatografii anionowymiennej (AEX) jako bufor wiążący wykorzystano 50 mM 2- amino-2-hydroksymetylo-propan-1,3-diol (TRIS), który doprowadzano do określonego pH za pomocą HCl. Jako bufor desorbujący zastosowano 20 mM L-histydynę, którą doprowadzano do określonego pH za pomocą HCl, lub TRIS-HCl o pH wyższym niż pH wiążące.

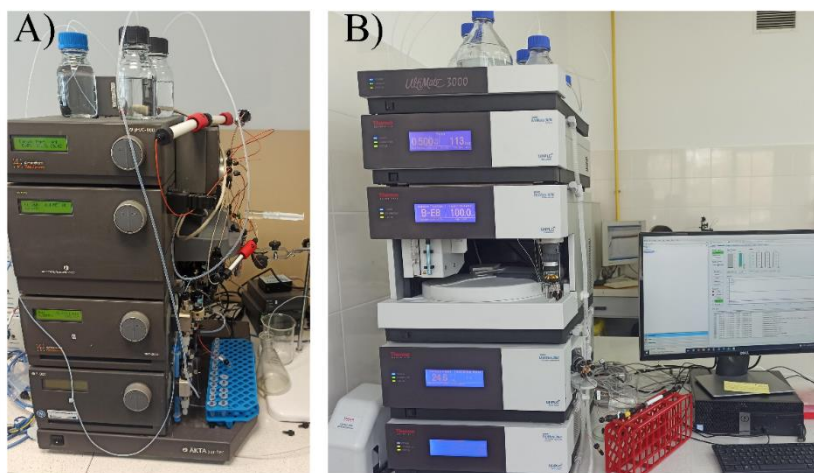
Pomiar izoterm adsorpcji na złożach CEX przeprowadzono w 50 mM buforze octanowym o pH 5.5 lub 25 mM buforze fosforanowym o pH 6 – 7.5. Na złożu AEX pomiar izoterm adsorpcji przeprowadzono z zastosowaniem 50 mM buforu TRIS-HCl, w zakresie pH 8.8 – 9.3.

Kolumny chromatograficzne regenerowano 1 M NaCl w buforze desorbującym oraz 0.5 M NaOH i przechowywano je w 20% roztworze wodnym etanolu.

2.3 Aparatura oraz sprzęt badawczy

Rozdzielanie wariantów ładunkowych mAb prowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego Äkta purifier, który wyposażony był w detektory: UV, konduktometryczny oraz

pH (rys. 8.A). Jako oprogramowanie sterujące wykorzystano software UNICORN™ 5.11 firmy Cytiva. Analizę zawartości wariantów ładunkowych w otrzymanych frakcjach białka prowadzono przy użyciu chromatografu UHPLC Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 BioRS System z detektorami: UV, konduktometrycznym oraz pH i oprogramowaniem sterującym Chromeleon 7 firmy Thermo Fisher Scientific (rys. 8.B). Analizę stężenia białka (tj. całkowitej puli wariantów mAb) mierzono przy użyciu czytnika mikroplitek Infinite® M Nano z oprogramowaniem sterującym i-control™ 2.0 (TECAN, Szwajcaria), z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych przepuszczalnych dla UV (Thermo Fisher Scientific).



Rys. 8. Chromatografy ciekowe wykorzystane podczas przeprowadzania badań eksperymentalnych: A) chromatograf ciekowy Äkta purifier (Cytiva), B) chromatograf UHPLC Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 BioRS (Thermo Fisher Scientific).

2.4 Procedury badawcze

2.4.1 Przygotowanie próbek białka

Dostarczone przez *Polpharmę Biologics* mAb rozpuszczone było w 40 mM buforze octanowym, pH 5. Białko przygotowywano do eksperymentów poprzez wymianę buforu przy użyciu probówek filtracyjnych typu Amicon. W tym celu próbkę rozcieńczano odpowiednim buforem w stosunku objętościowym od 1:3 do 1:9, a następnie zatężano poprzez wirowanie przez 15 min (w 20°C, 5000 rpm). Przesącz wylewano, natomiast retentat zawierający mAb rozcieńczano świeżą porcją buforu. Operację powtarzano od 3 do 5 razy, aż do uzyskania niezbędnego pH oraz stężenia mAb. Całkowite stężenie białka określano przy użycia czytnika mikroplitek przy długości fali $\lambda = 280$ nm.

2.4.2 Pomiar izoterm adsorpcji metodą statyczną

Pomiar izoterm adsorpcji prowadzono dla każdego ze złożeń przedstawionych w tabeli 3. Wyniki cyklu doświadczalnego posłużyły do doboru złożeń oraz pH fazy ruchomej, dla których

selektywność separacji była najlepsza. Badania adsorpcji mAb prowadzono przy różnym pH, stosując odpowiednie buforę wiążące dla złożeń CEX oraz AEX.

Porcję złożeń przenoszono do probówki wirówkowej Corning® Costar® Spin-X® i przemywano trzykrotnie buforem wiążącym, odwirowując przez 5 minut (20°C, 12 000 rpm) po każdym dodaniu buforu. Ostatnie wirowanie wykonywano przez 30 minut, aby usunąć nadmiar buforu z powierzchni złożeń. Następnie przenoszono odwirowane złożeń chromatograficzne o $m_a = 10$ mg do probówek typu Eppendorf, dodawano $V = 0.7$ ml roztworu mAb w określonym buforze wiążącym w stężeniu początkowym w przedziale $C_0 = 0.1 - 10$ mg ml⁻¹ (maksymalne stężenie różniło się w zależności od badanego złożeń i jego pojemności chłonnej). Tak przygotowaną próbkę inkubowano przy pomocy rotatora obrotowego (20°C, 15 rpm) do momentu, aż stężenie białka w supernatancie ustabilizowało się na stałym poziomie (2 godziny). Supernatant oddzielano od złożeń chromatograficznego za pomocą filtrów strzykawkowych PES i poddawano analizie. Całkowite stężenie białka określano za pomocą czytnika mikropłytek, natomiast zawartość wariantów ładunkowych mAb określano za pomocą analizy CEX-HPLC.

Podczas pomiarów izoterm adsorpcji (rozdz. 3.2 – 3.4) całkowite stężenie równowagowe całej puli wariantów, q_{ov}^* oraz stężenie równowagowe poszczególnych wariantów, q_i^* , w mg g_{złóża}⁻¹, określano za pomocą równań:

$$q_{ov}^* = \frac{V(C_{0,ov} - C_{ov})}{m_a} \quad (12)$$

$$q_i^* = \frac{V(C_{0,i} - C_i)}{m_a} \quad (13)$$

gdzie V to objętość roztworu w ml, m_a to masa złożeń chromatograficznego w g, $C_{0,ov}$ i $C_{0,i}$ to odpowiednio całkowite stężenie białka i indywidualne stężenie każdego z wariantów ładunkowych mAb w materiale początkowym w mg ml⁻¹ ($i = av, mv, bv$), C_{ov} i C_i to odpowiednio całkowite i indywidualne równowagowe stężenia w fazie ruchomej w mg ml⁻¹ (supernatancie).

Pomiar izoterm prowadzono w temperaturze pokojowej. W przypadku złożeń AEX pomiar izoterm dla pH 9.3 prowadzono z dodatkiem oraz bez dodatku 4% m/v PEG w próbce białka, w celu określenia wpływu jego obecności na adsorpcję każdego z wariantów ładunkowych mAb.

2.4.3 Pakowanie kolumn chromatograficznych

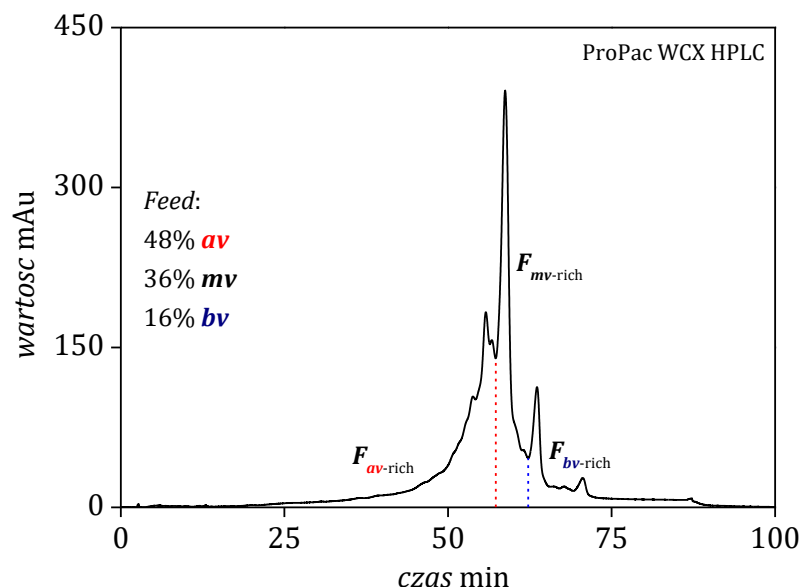
50% zawiesinę złoża chromatograficznego w 0.1 M NaCl, przenoszono do kolumny szklanej typu TRICORN. Złoże pozostawiono do sedimentacji. Następnie złoże skompresowano w układzie chromatograficznym Äkta purifier przy natężeniach przepływu odpowiadającym ciśnieniu ok. 3 barów. Procedurę pakowania dostosowywano do wskazówek producenta, dla określonego złoża chromatograficznego. Po upakowaniu złoża mierzono jego wysokość.

2.4.4 Określanie porowatości złoża chromatograficznego

W celu określenia całkowitej porowatości upakowanego złoża chromatograficznego, ε_t , mierzono czas retencji, t_r , dla impulsów roztworu NaCl stosując jako fazę ruchomą odpowiednio bufor fosforanowy w kolumnach CEX oraz TRIS-HCl w kolumnie AEX. Specyficzną porowatość upakowanego złoża, $\varepsilon_{t,p}$, dla mAb określano na podstawie t_r impulsu roztworu mAb w warunkach niewiążących, tj. w 1 M NaCl w fazie ruchomej. Zmierzone czasy retencji korygowano o udział retencji w objętościach martwych kolumny.

2.4.5 Analiza zawartości wariantów ładunkowych mAb za pomocą CEX-HPLC

W chromatografii analitycznej CEX-HPLC, wykorzystywano bufory, które sporządzano poprzez mieszanie w odpowiednich proporcjach trzech roztworów: 25 mM NaH₂PO₄ (X), 25 mM Na₂HPO₄ (Y) oraz 125 mM NaCl (Z). Próbkę białka ($m_{IgG1} = 50 \mu\text{g}$) rozpuszczone w buforze A (X/Y/Z: 35.6/44.4/20 v/v), wprowadzano na kolumnę ProPac™ WCX-10, równoważoną wcześniej tym samym buforem i przemywano przez 5 minut. Następnie bufor A wymieniało na bufor B (8.8/71.2/20 v/v) w 55-minutowym gradiencie liniowym, aż do osiągnięcia 100% v/v buforu B. Po zakończonej elucji kolumnę regenerowano za pomocą 100% v/v buforu C (5.0/5.0/90). Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej (Q) podczas trwania analizy wynosiło $Q = 0.5 \text{ ml min}^{-1}$. Typowy chromatogram uzyskiwany podczas analizy zawartości wariantów mAb przedstawiono na rys. 9, gdzie $F_{mv-rich}$ oznacza frakcję bogatą w warianty główne, $F_{av-rich}$ to frakcja bogata w warianty kwasowe, natomiast $F_{bv-rich}$ oznacza frakcję bogatą w warianty zasadowe.



Rys. 9 Chromatogram uzyskany za pomocą CEX-HPLC, dla materiału zawierającego 48% *av*, 36% *mv*, 16% *bv*. $F_{mv-rich}$ oznacza frakcję bogatą w *mv*, $F_{av-rich}$ to frakcja bogata w *av*, natomiast $F_{bv-rich}$ oznacza frakcję bogatą w *bv*.

2.4.6 Rozdzielenie wariantów mAb za pomocą chromatografii IEX

2.4.6.1 Rozdzielenie wariantów mAb za pomocą chromatografii AEX

Kolumnę upakowaną złożem AEX (POROSTTM XQ, I.D. 0.5 cm, $L = 5$ cm) równoważono buforem wiążącym, tj. 50 mM TRIS-HCl, pH 9.3. Roztwór białka w buforze wiążącym o pożądanym stężeniu początkowym, wprowadzano do kolumny chromatograficznej za pomocą pętli SuperloopTM (Cytiva, Szwecja), o objętości 10 ml. Białko niezwiązane na złożu wymywano buforem wiążącym, zbierając frakcję przepływową. Kolejno bufor wiążący wymieniono na bufor desorbujący, czyli 20 mM L-histydynę, pH 5.5 (HIS) lub TRIS-HCl o pH 8.9, 8.8, 8.3 lub 7.5 w gradiencie liniowym lub skokowym (0 – 100% v/v). Zastosowano natężenie przepływu $Q = 0.3$ lub 0.5 ml min^{-1} . W celu wyznaczenia profili stężenia dla każdego z wariantów ładunkowych mAb podczas całego procesu chromatograficznego (ładowanie, mycie, desorpcja) eluat zbierano we frakcjach o objętości 1 ml, określano ich stężenie i analizowano zawartość wariantów za pomocą chromatografii CEX-HPLC (procedura 2.4.5). W celu określenia wpływu PEG na separację wariantów ładunkowych mAb, eksperymenty prowadzono z dodatkiem oraz bez dodatku PEG w roztworze wiążącym oraz w próbce wprowadzanej do kolumny chromatograficznej.

2.4.6.2 Rozdzielenie wariantów mAb za pomocą chromatografii CEX

Kolumnę wypełnioną złożem chromatograficznym CEX (POROSTTM XS, I.D. 0.5 cm, $L = 5.45$, 8.8 lub 10.4 cm) równoważono buforem wiążącym, czyli 25 mM buforem fosforanowym, pH 6.0. Wymieniono bufor w roztworze białka na bufor wiążący, zatężano do

pożądanego stężenia (procedura **2.4.1**) i następnie wprowadzano do kolumny za pomocą pętli Superloop™ w objętości 10 ml. Kolumnę przemywano buforem wiążącym, który następnie wymieniano na bufor desorbujący, czyli 25 mM bufor fosforanowy o pH 6.8, 8.0 lub 9.0, w gradiencie liniowym lub skokowym przy $Q = 0.5 \text{ ml min}^{-1}$. W celu wyznaczenia profili stężenia wariantów ładunkowych mAb podczas całego procesu (ładowanie próbki, przemywanie kolumny oraz desorpcja mAb) zbierano eluat w 1 ml frakcjach. Stężenie całkowite mAb mierzono za pomocą czytnika mikroplątek oraz poddawano analizie zawartości wariantów za pomocą chromatografii CEX-HPLC (procedura **2.4.5**).

2.4.7 Usuwanie PEG z roztworu białka

Kolumnę wypełnioną złożem CEX (POROS™ XS, I.D. 0.5 cm, $L = 5 \text{ cm}$) równoważono buforem wiążącym, tj. 50 mM buforem octanowym o pH 5.5. Roztwór białka w buforze wiążącym zawierającym PEG wprowadzano do kolumny za pomocą pętli Superloop™, w objętości 10 ml. Całkowita masa mAb wprowadzona na kolumnę wynosiła $66 \text{ mg ml}_{\text{złoża}}^{-1}$. W celu usunięcia pozostałości PEG kolumnę przemyto buforem octanowym jako buforem myjącym przy $Q = 0.5 \text{ ml min}^{-1}$ przez 16 minut. Następnie bufor wiążący wymieniono na bufor desorbujący (25 mM bufor fosforanowy, pH 9.0), w gradiencie skokowym (0 – 100% v/v). Eluat zbierano do falkonu i mierzono stężenie białka za pomocą czytnika mikroplątek.

2.4.8 Proces strącania mAb za pomocą PEG

Bufor w roztworze mAb wymieniono na 50 mM bufor octanowy pH 5.0 zgodnie z procedurą **2.4.1**. Roztwór PEG (precypitant) przygotowano poprzez rozpuszczenie PEG w 50 mM buforze octanowym, w celu uzyskania PEG o stężeniu 50% m/v.

Roztwór mAb, precypitant oraz bufor octanowy mieszano w odpowiednich objętościach, aby uzyskać odpowiednie przesycenie roztworu, które określano na podstawie rozpuszczalności mAb, zgodnie z danymi uzyskanymi we wcześniejszych badaniach [66]. Proces wytrącania przeprowadzono w ciągu 20 min, w temperaturze 20°C, mieszając roztwór w rotatorze obrotowym przy 35 rpm. Całkowite stężenie mAb w supernatancie mierzono za pomocą czytnika mikroplątek. Zawartość wariantów określano za pomocą CEX-HPLC (procedura **2.4.5**). Osad ponownie rozpuszczono w buforze octanowym i oczyszczono z pozostałości PEG za pomocą chromatografii CEX (procedura **2.4.7**).

W przypadku strącania mAb po wcześniejszym rozdzieleniu za pomocą AEX (procedura **2.4.6.1**) pH roztworu zawierającego desorbowane mAb dostosowano do pH 5.0 za pomocą

HCl. Kolejno dodano roztwór PEG, aby uzyskać określony poziom przesylenia mAb w roztworze.

Procedura strącania mAb opracowana i przeprowadzona została przez mgr inż. Tomasza Rumanka.

2.4.9 Połączenie procesu strącania i AEX

Procesy strącania oraz chromatografii AEX połączono na dwa różne sposoby. W pierwszym z nich proces strącania mAb (PREC) stanowiło początkowy etap zgodnie z procedurą 2.4.8. Następnie uzyskany w tym procesie osad białka rozpuszczano i oczyszczano z PEG, zgodnie z procedurą 2.4.7. Kolejno wymieniano bufor w roztworze białka na TRIS-HCl, pH 9.3 (procedura 2.4.1) i prowadzono proces rozdzielania wariantów ładunkowych mAb przy zastosowaniu kolumny AEX (procedura 2.4.6.1).

Drugi sposób polegał na zastosowaniu AEX w pierwszym etapie, a następnie otrzymany eluat bezpośrednio przekazywano do procesu PREC.

2.4.10 Wyznaczanie wydajności i składu otrzymanych frakcji

Udział masowy wariantów mAb w materiale początkowym ($U_{0,i}$) obliczano równaniami:

$$U_{0,i} = \frac{m_{0,i}}{m_{0,ov}} 100\% \quad (14)$$

gdzie $i = av, mv, bv, ov$ to cała pula wariantów, m to masa mAb, a cyfra 0 odnosi się do warunków początkowych.

W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach wykorzystano dwa sposoby obliczania wartości wydajności operacyjnej oraz czystości produktu. W pierwszym przypadku (rozdz. 3.5) mv oraz bv traktowano jako produkt, natomiast av stanowiły odpad. Z tego też powodu av pomijano w obliczeniach uzyskanych wydajności oraz czystości frakcji. Wydajność operacyjną w rozdz. 3.5 obliczano jako udział masy mv oraz bv w analizowanej frakcji (F) lub końcowym produkcie ($Prod$), wyrażonej w mg mAb, względem ich masy w wyjściowym materiale biologicznym ($Feed$):

$$Y = \frac{m_{Prod,mv} + m_{Prod,bv}}{m_{Feed,mv} + m_{Feed,bv}} 100\% \quad (15)$$

Udział poszczególnych wariantów w określonej frakcji, produkcie lub $Feed$ obliczano analogicznie do równania 14:

$$U_{Feed,i} = \frac{m_{Feed,i}}{m_{Feed,ovl}} 100\% \quad i = av, mv, bv \quad (16)$$

$$U_{F,i} = \frac{m_{F,i}}{m_{F,ovl}} 100\% \quad i = av, mv, bv \quad (17)$$

W drugim przypadku (rozd. 3.6) każdy z wariantów stanowił odrębny produkt rozdzielania i nie występował w takim przypadku odpad. Wydajność frakcji w badaniach przedstawionych w rozdz. 3.6 obliczano następująco:

$$Y = \frac{m_{Frakcji}}{m_{Feed}} 100\% \quad (18)$$

Ponieważ każdy z wariantów uważano w badaniach z rozdz. 3.6 za produkt rozdzielania, wydajność separacji (Y_i) określano jako stosunek masy i -tego wariantu mAb we frakcji zawierającej produkt ($Prod_i$) do jego masy w strumieniu zasilającym ($Feed_i$) zgodnie z równaniem 19:

$$Y_i = \frac{m_{Prod_i}}{m_{Feed_i}} 100\%, \text{ gdzie } i = av, mv, bv \quad (19)$$

3 Dyskusja otrzymanych wyników

3.1 Koncepcja badań

W celu doboru warunków rozdzielania wariantów ładunkowych mAb przeprowadzono cykle pomiarów do wyznaczenia izoterm adsorpcji mAb na złożu AEX (rozd. 3.2) oraz na złożach CEX (rozd. 3.3). Otrzymane wyniki dostarczyły niezbędnych danych dotyczących termodynamiki adsorpcji badanego mAb i jego wariantów ładunkowych na złożach IEX oraz pozwoliły na wybranie najkorzystniejszych warunków, pod względem selektywności rozdzielania do dalszych badań, w tym badań procesu rozdzielania wariantów mAb z zastosowaniem chromatografii kolumnowej.

Następnie określono jaki wpływ na adsorpcję poszczególnych wariantów mAb na wybranych złożach IEX ma obecność PEG. W tym celu przeprowadzono pomiary izoterm adsorpcji wariantów mAb na wyselekcjonowanych złożach chromatograficznych oraz warunkach, które wybrano w rozdz. 3.2 oraz 3.3 do prowadzenia procesu rozdzielania wariantów dla chromatografii AEX oraz CEX. Otrzymane wyniki zaprezentowano oraz omówiono w rozdz. 3.4.

W rozdziale 3.5 połączono proces chromatografii AEX oraz strącania za pomocą PEG w celu zredukowania zawartości av w wyjściowym materiale biologicznym. Wykorzystano

wysoką produktywność (tj. wartość masy produktu otrzymanego w jednostce czasu) procesu strącania, którą ogranicza jedynie objętość reaktora oraz wysoką selektywność rozdzielania wariantów w chromatografii anionowymiennej. Wykonano badania eksperymentalne połączonego procesu, a następnie sformułowano oraz zweryfikowano model dynamiki kolumny, w którym wykorzystano model izotermi CPA oraz model TD. Następnie połączono zweryfikowany model z modelem procesu strącania, który został opracowany w pracy doktorskiej mgr inż. Tomasza Rumanka i przeprowadzono cykl obliczeń numerycznych, przy zmiennych operacyjnych modelu, takich jak: ilość ładowanej masy białka, zawartość av w materiale wyjściowym mAb oraz założony stopień redukcji av . Obliczenia wykorzystano do optymalizacji połączonego procesu strącania i chromatografii. W badaniach rozdzielano materiał biologiczny o różnym składzie początkowym wariantów ładunkowych mAb, różnych warunkach gradientu pH oraz różnym przeładowaniu kolumn chromatograficznych.

W żadnym z badanych procesów, tj.: niezależnej AEX, niezależnym strącaniu i połączonym procesie AEX i strącania nie udało się wydzielić mv od bv . Procesy te pozwalały jedynie na redukcję av z materiału wyjściowego.

Prezentowane w rozdziałach 3.2 – 3.5 wyniki badań wykazały, że przy pH powyżej pI wariantów mAb, chromatografia AEX mogła zostać zastosowana w celu izolowania av , który w tych warunkach posiadał największy ładunek ujemny. Przy pH poniżej pI badanych rozdzielanych wariantów, bv posiadał największy ładunek dodatni, dzięki czemu chromatografia CEX stanowiła dobrą metodę ich izolacji od pozostałych wariantów mAb.

Dlatego też w celu uzyskania frakcji mocno wzbogaconych w poszczególne warianty mAb użyto połączenia CEX i AEX. Przeprowadzono serię badań eksperymentalnych, w których rozdzielono warianty mAb za pomocą układu kolumn AEX oraz CEX. W badaniach rozdzielano materiał o różnym składzie początkowym wariantów ładunkowych mAb, różnych warunkach gradientu pH oraz różnym przeładowaniu kolumn chromatograficznych. Uzyskane dane wykorzystano do kalibracji modeli dynamiki kolumn chromatograficznych (AEX i CEX) oraz ich weryfikacji. W kolejnym etapie modele te zostały użyte do zdefiniowania najkorzystniejszej sekwencji operacji chromatograficznych i konfiguracji kolumn, które pozwoliły na efektywne rozdzielenie wszystkich wariantów mAb pod względem ich czystości oraz wydajności. Uzyskane wyniki zaprezentowano w rozdz. 3.6.

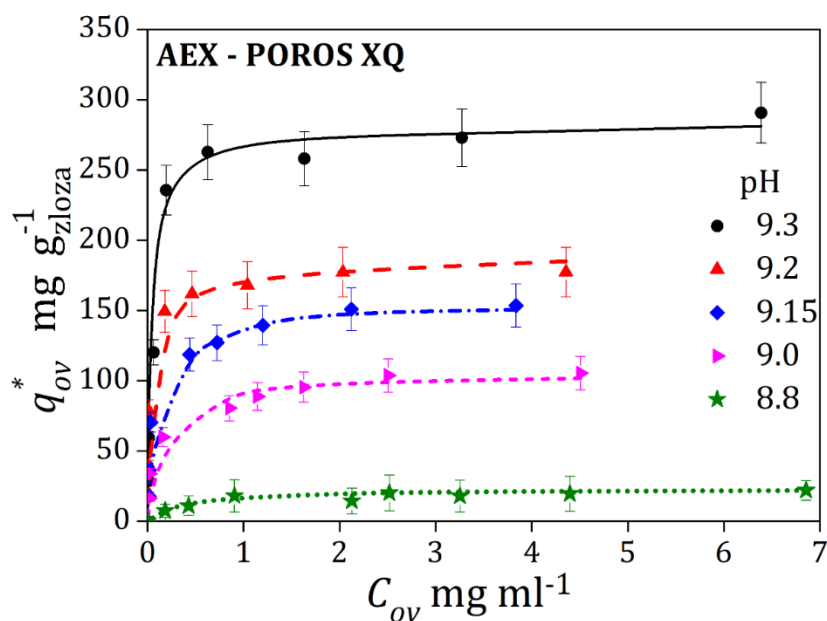
Pomiary izoterm, które przeprowadzono w niniejszej pracy i których wyniki przedstawiono w rozdziałach 3.2 – 3.4 wykorzystane zostały w czterech publikacjach naukowych [68, 86, 99, 100] i jednym patencie [101]. Połączenie procesu strącania oraz AEX

w celu redukcji av przedstawiono w publikacji naukowej [68] oraz patencie [101]. Badania nad chromatografią wielokolumnową i połączeniem CEX z AEX stanowią podstawę publikacji [100].

3.2 Dobór warunków rozdzielania na złożu AEX

Złoże anionowymienne (POROS XQ) zostało wybrane do rozdzielania wariantów mAb na podstawie wcześniejszych badań eksperymentalnych przeprowadzonych w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej [86]. W ramach niniejszej pracy przeprowadzono na nim badania wpływu pH na selektywność rozdzielania wariantów mAb, w celu wybrania optymalnego pH buforu wiążącego.

W celu określenia całkowitej pojemności chłonnej ziół jonowymiennych dla mAb i zależności tej wielkości od pH, wyznaczono pseudojednoskładnikowe izotermy adsorpcji (tzn. dla całej puli wariantów mAb), dla materiału biologicznego o następującej zawartości wariantów: 45% av , 40% mv , 15% bv .

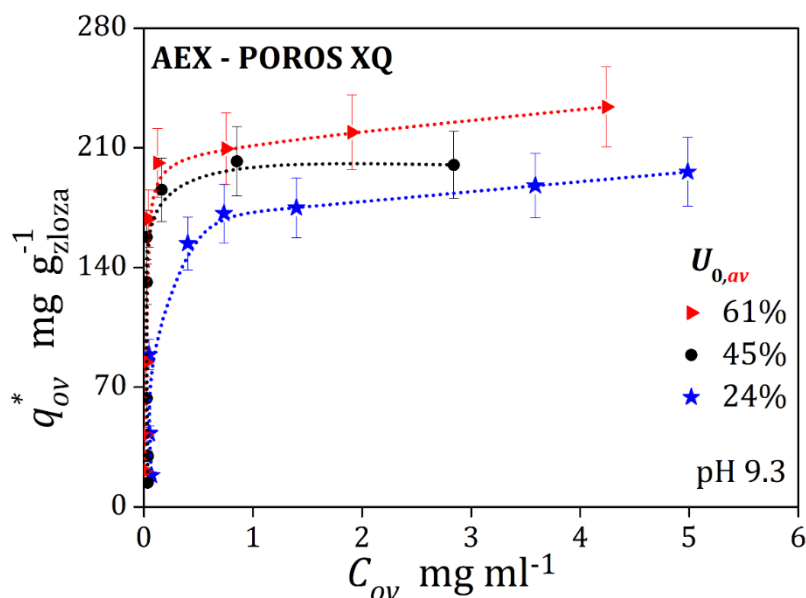


Rys. 10 Pseudojednoskładnikowe izotermy adsorpcji dla materiału o zawartości wariantów kwasowych: $U_{0,av}$ 45% av , w różnym pH roztworów białka, zmierzone na złożu AEX (POROS XQ). C_{ov} – całkowite stężenie równowagowe mAb w supernatancie; q_{ov}^* – całkowite stężenie równowagowe mAb w fazie zaadsorbowanej.

Pomiary wykonano w zakresie pH 8.8 – 9.3 dla złoża AEX, zgodnie z procedurami opisanymi w sekcji 2.4.1 (przygotowanie białka) oraz 2.4.2 (pomiar izoterm adsorpcji). Poniżej pH 8.8 białko miało ładunek dodatni i mogło wiązać się na złożu CEX. Nie badano własności białka dla pH powyżej 9.3 ze względu na możliwość destabilizacji jego struktury. Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 10 w postaci pseudojednoskładnikowych izoterm. Wyniki

pomiarów przedstawiono na wykresach w postaci całkowitego stężenia równowagowego białka w fazie zaadsorbowanej w funkcji jego całkowitego stężenia równowagowego w fazie ciekłej, $q_{ov}^* = f(C_{ov})$. Na podstawie otrzymanych izoterm określono całkowitą pojemność chłonną złoza POROS XQ, która w zależności od pH wahała się w zakresie od 15 do 280 mg g_{złoz}⁻¹.

Do dalszych badań wybrano pH 9.3 ze względu na dużą pojemność sorpcji. Następnie wyznaczono izotermie pseudojednoskładnikowe dla materiałów o różnych składach początkowych wariantów mAb. Materiał o niskiej zawartości *av* zawierał 24% *av*, 52% *mv* oraz 24% *bv*, materiał o średniej zawartości *av* miał skład 45% *av*, 40% *mv*, 15% *bv*, natomiast materiał o wysokiej zawartości *av* zawierał: 61% *av*, 35% *mv* i 4% *bv*. Wyniki pomiarów przedstawiono na rys. 11 w postaci całkowitego stężenia równowagowego białka w fazie zaadsorbowanej w funkcji jego całkowitego stężenia równowagowego w fazie ciekłej, $q_{ov}^* = f(C_{ov})$.

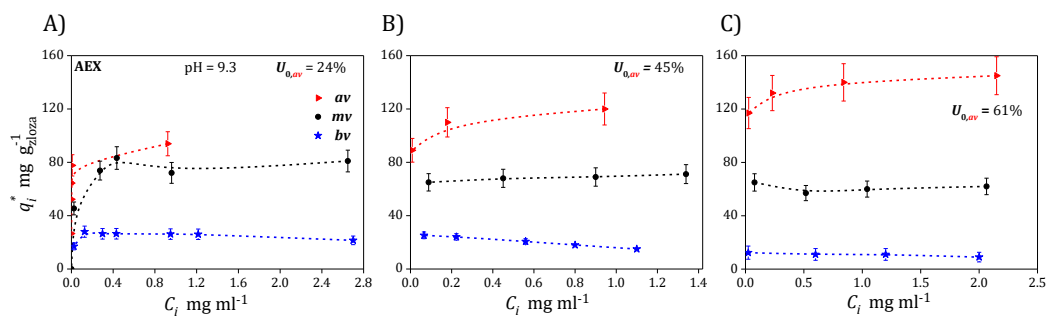


Rys. 11 Pseudojednoskładnikowe izotermie adsorpcji mAb dla materiałów wyjściowych o różnej początkowej zawartości wariantów kwasowych ($U_{0,av}$) na złożu AEX – POROS XQ. C_{ov} – całkowite stężenie równowagowe mAb w supernatancie; q_{ov}^* – całkowite stężenie równowagowe mAb w fazie zaadsorbowanej, $U_{0,av}$ – zawartość *av* w materiale wyjściowym.

Stwierdzono, że różnice w przebiegach izoterm adsorpcji uzyskanych dla materiałów o różnych składach początkowych są wyraźne. Najsilniejszą adsorpcję zaobserwowano dla materiału zawierającego początkowo $U_{0,av} = 61\%$. Jest to zgodne z wartością pI dla *av*, która jest najniższa spośród wszystkich wariantów. Dlatego w użytym roztworze o pH = 9.3, materiał zawierający dużą ilość *av* będzie wykazywać silniejszą adsorpcję w porównaniu z pozostałymi materiałami.

Znaczne różnice w adsorpcji pomiędzy materiałami o różnych składach wariantów mAb wskazywały na możliwość rozdzielania wariantów na złożu POROS XQ przy pH 9.3.

W następnym etapie wyznaczono przebieg indywidualnych izoterm dla poszczególnych wariantów zgodnie z procedurami: 2.4.1, 2.4.2 i 2.4.5. Wyniki pomiarów przedstawiono na rys. 12.A – 12.C.

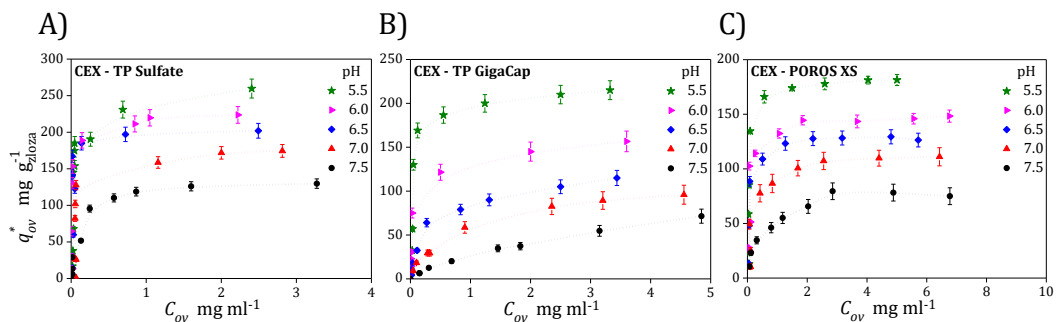


Rys.12 Indywidualne izotermy adsorpcji wyznaczone dla wariantów mAb, $q_i^* = f(C_i)$, gdzie $i = av, mv, bv$, na złożu POROS XQ przy pH 9.3, dla trzech różnych materiałów początkowych, w których zawartość av wynosiła $U_{0,av}$: A) 24%, B) 45%, C) 61%. C_i – stężenie równowagowe i -tego wariantu mAb w supernatancie; q_i^* – stężenie równowagowe i -tego wariantu mAb w fazie zaadsorbowanej.

Najsłabszą siłą wiązania w każdym z trzech zbadanych materiałów wykazywały bv , które tym samym powinny w pierwszej kolejności wymywać się z kolumny chromatograficznej. Analizując wyniki przedstawione na rys. 12.B oraz 12.C zauważono dużą różnicę w adsorpcji pomiędzy av a mv , która umożliwiła ich rozdzielanie z zastosowaniem kolumn AEX.

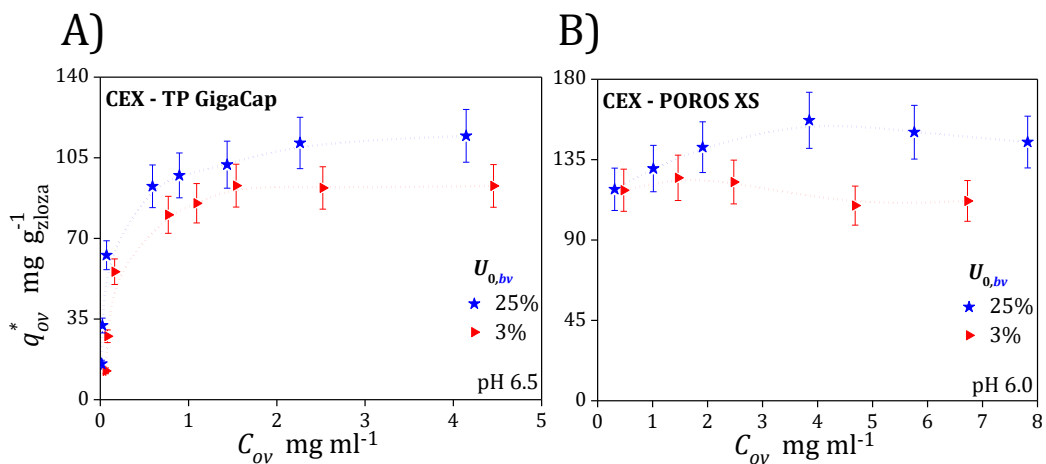
3.3 Dobór złoża oraz optymalnych warunków rozdzielania dla CEX

Do badań CEX wyselekcjonowano wstępnie trzy różne złoże chromatograficzne używane w przemyśle do oczyszczania przeciwciał: TP GigaCap, TP Sulfate, POROS XS (tab.3, sekcja 2.1). W tym celu przeprowadzono dla każdego ze złożeń pomiar pseudojednoskładnikowych izoterm adsorpcji. Adsorbowano materiał biologiczny, który zawierał w swoim składzie: 45% av , 40% mv oraz 15% bv . Pomiar całkowitej pojemności chłonnej złożeń CEX oraz zależności tej wielkości od pH wykonano w zakresie pH 5.5 – 7.5 zgodnie z procedurami opisanymi w sekcji 2.4.1 (przygotowanie białka) oraz 2.4.2 (pomiar izoterm). W pH < 7.5 białko było naładowane dodatnio i mogło być adsorbowane na złożu CEX. Nie prowadzono badań dla pH < 5.5 ze względu na destabilizację struktury białka w niskich wartościach pH. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 13.A – C. Pojemność chłonną złożeń CEX oszacowano na podstawie przebiegu izoterm. W zależności od pH dla złożeń TP Sulfate wynosiła ona od 130 do 260 mg mAb $g_{złoża}^{-1}$, TP GigaCap wahała się od 63 do 210 mg mAb $g_{złoża}^{-1}$, zaś dla POROS XS zakres ten wynosił od 78 do 181 mg mAb $g_{złoża}^{-1}$.



Rys.13 Pseudojednoskładnikowe izotermy adsorpcji w różnym pH roztworów białka, zmierzone na złożu: A) TP Sulfate, B) TP GigaCap, C) POROS XS. C_{ov} – całkowite stężenie równowagowe mAb w supernatancie; q_{ov}^* – całkowite stężenie równowagowe mAb w fazie zaadsorbowanej.

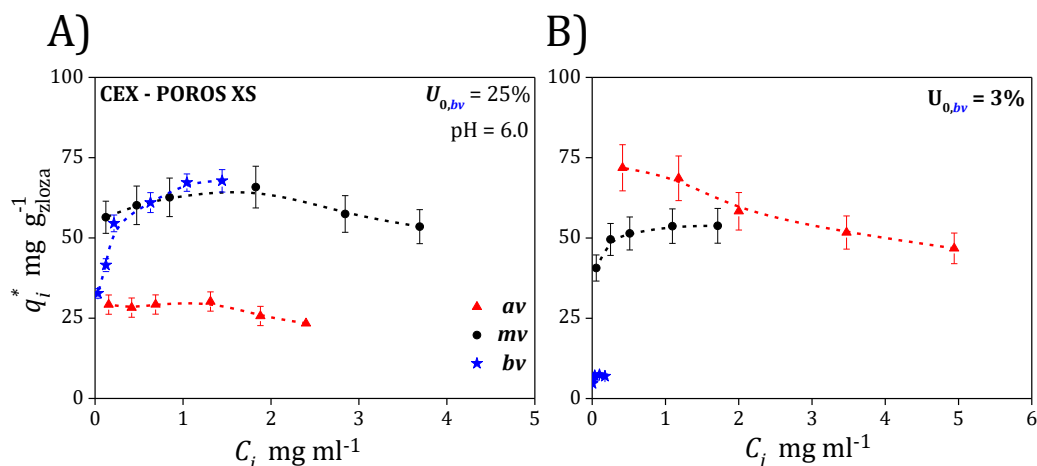
Pojemność chłonna złoża TP Sulfate była najwyższa. Badania wykazały jednak, że adsorpcji na tym złożu towarzyszyły zmiany konformacji przeciwciała [99]. Z tego powodu złoże TP Sulfate nie było brane pod uwagę w dalszych badaniach eksperymentalnych, pomimo jego wysokiej pojemności chłonnej.



Rys. 14 Pseudojednoskładnikowe izotermy adsorpcji mAb dla dwóch materiałów wyjściowych, $U_{0,bv} = 25\%$ oraz 3% , na złożach CEX: A) TP GigaCap, w pH 6.5, B) POROS XS, w pH 6.0. C_{ov} – całkowite stężenie równowagowe mAb w supernatancie; q_{ov}^* – całkowite stężenie równowagowe mAb w fazie zaadsorbowanej.

Wiązanie mAb na złożu CEX – TP GigaCap przeprowadzono w pH 6.5, dla którego pojemność chłonna była wysoka oraz białko zachowywało w tych warunkach stabilną strukturę. Wiązanie mAb na złożu POROS XS prowadzono w pH 6.0. W celu określenia możliwości wydzielania bv na obu złożach CEX (TP GigaCap oraz POROS XS) wyznaczono izotermy adsorpcji wariantów mAb dla materiałów o różnym początkowym udziale bv , $U_{0,bv}$, 3% bv oraz 25% bv . W zastosowanym pH bv o najwyższej wartości pI, spośród wszystkich wariantów mAb, miało najwyższy ładunek dodatni. W pierwszym etapie wyznaczono pseudojednoskładnikowe izotermy adsorpcji obu materiałów na tych złożach, zgodnie z procedurami 2.4.1 i 2.4.2. Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 14.

Analizując wyniki przedstawione na rys. 14. dla złoża POROS XS stwierdzono, że różnice w adsorpcji badanych materiałów były większe niż dla złoża TP GigaCap przy jednocześnie wyższej pojemności chłonnej. Dlatego też złoże POROS XS zostało wybrane do dalszych badań. Wyznaczono następnie indywidualne izotermy adsorpcji wariantów mAb na tym złożu dla obu badanych materiałów ($U_{0,bv}$, 3% *bv* oraz 25% *bv*). Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 15.



Rys. 15 Indywidualne izotermy adsorpcji wyznaczone dla wariantów mAb, gdzie $i = av, mv, bv$, na złożu POROS XS przy pH 6.0. Materiał wyjściowy o różnej zawartości *bv*, zawierał odpowiednio: A) $U_{0,bv} = 25\%$, B) $U_{0,bv} = 3\%$. C_i – stężenie równowagowe i -tego wariantu mAb w supernatancji; q_i^* – stężenie równowagowe i -tego wariantu mAb w fazie zaadsorbowanej.

Adsorpcja materiału o zawartości *bv* $U_{0,bv} = 25\%$ (rys. 15.A) jest wyższa, niż dla materiału zawierającego $U_{0,bv} = 3\%$. Jednocześnie w materiale o niższej zawartości tych wariantów (rys. 15.B), występuje spadek adsorpcji *av* wraz ze wzrostem stężenia białka. Jest to wynikiem konkurencji pomiędzy wariantami o miejsce aktywne na powierzchni złoża chromatograficznego. Otrzymane wyniki wskazują, że możliwe jest oddzielenie *bv* na złożu POROS XS od *av* w badanych warunkach. W przypadku dużego udziału *bv* w materiale wyjściowym ($U_{0,bv} = 25\%$) podobna siła adsorpcji *mv* oraz *bv* wyklucza możliwość ich wzajemnego rozdzielania.

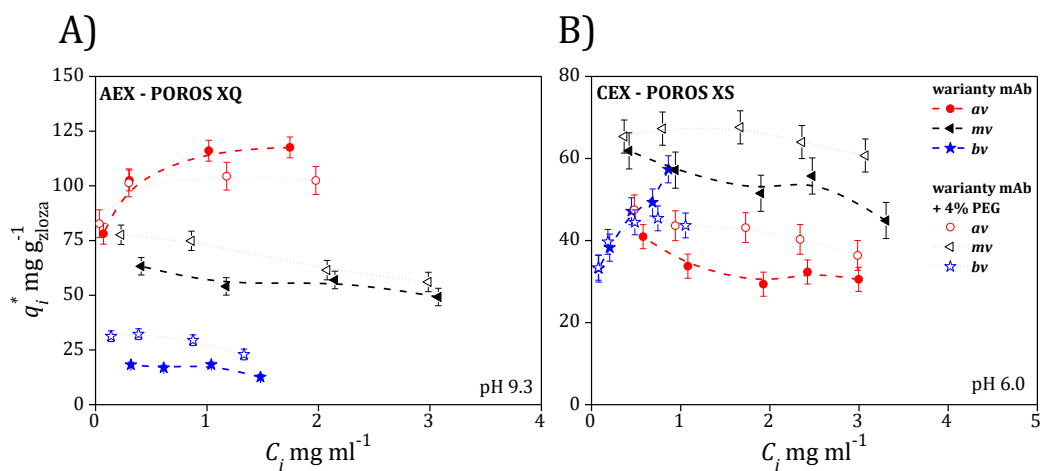
Po analizie powyższych wyników zdecydowano się prowadzić kolejne badania rozdzielania wariantów mAb na złożu POROS XS przy pH 6.

3.4 Wpływ PEG na adsorpcję wariantów mAb na wybranych złożach IEX

W niniejszej pracy proces chromatograficznego rozdzielania wariantów ładunkowych mAb (procedura 2.4.6.1) połączono z procesem strącania (procedura 2.4.8). W etapie strącania środkiem strącającym był PEG, który wpływa na siłę adsorpcji białka w kolumnach

chromatograficznych. Dlatego przeprowadzono badania nad wpływem obecności PEG na adsorpcję poszczególnych wariantów mAb na wybranych złożach chromatograficznych.

W tym celu przeprowadzono pomiary indywidualnych izoterm adsorpcji dla każdego z wariantów ładunkowych. Badania prowadzono w wybranych dla złożeń buforach wiążących. Dla POROS XQ (AEX) był to TRIS-HCl pH 9.3, natomiast dla POROS XS (CEX) – 25 mM bufor fosforanowy pH 6.0. Badania prowadzono z dodatkiem i bez dodatku 4% m/v PEG w roztworze, dla materiału wyjściowego zawierającego: 37% *av*, 42% *mv* oraz 21% *bv* i wykonano je zgodnie z procedurami 2.4.1, 2.4.2 oraz 2.4.5. Na rys. 16, który przedstawia otrzymane w badaniach wyniki, stwierdzono po ich analizie, że w przypadku złoża AEX (rys. 16.A) obecność PEG powoduje obniżenie siły adsorpcji *av*, nieznacznie wpływa na adsorpcję wariantów *mv* oraz znacząco wzmacnia siłę adsorpcji *bv*. Odwrotną zależność zaobserwowano dla złoża CEX (rys. 16.B), na którym siła adsorpcji *bv* znacząco zmalała, natomiast wzrosła siła adsorpcji *mv* oraz *av*. Wyniki otrzymane dla obu złożeń wskazują na zmniejszenie różnic pomiędzy powinowactwem adsorpcyjnym poszczególnych wariantów, a tym samym na zredukowanie selektywności separacji.



Rys. 16 Indywidualne izotermy adsorpcji wyznaczone dla wariantów mAb z dodatkiem oraz bez dodatku 4% m/v PEG, gdzie $i = av, mv, bv$. A) POROS XQ, pH 9.3, B) POROS XS, pH 6.0. Materiał wyjściowy zawierał: 37% *av*, 42% *mv* oraz 21% *bv*. C_i – stężenie równowagowe i -tego wariantu mAb w supernatancie; q_i^* – stężenie równowagowe i -tego wariantu mAb w fazie zaadsorbowanej.

Zaobserwowany efekt można tłumaczyć różnicami rozpuszczalności wariantów w pH 9.3 oraz pH 6.0. W roztworze pozbawionym środka strącającego rozpuszczalność wariantów ładunkowych mAb jest wysoka, przez co różnice w rozpuszczalności pomiędzy poszczególnymi wariantami IgG1 nie wpływają na mechanizm wiązania się ich na złożu chromatograficznym. Przy dodatku środka strącającego (PEG) do buforu rozpuszczalność wariantów maleje. W pH powyżej pI wariantów mAb najwyższą rozpuszczalność wykazują *av*,

ponieważ w warunkach tych posiadają one największy ładunek ujemny. Jednocześnie *bv* w tym samym pH wykazują najniższy ładunek wypadkowy cząsteczki, czego następstwem jest osłabienie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy cząsteczkami białka i obniżenie ich rozpuszczalności. Przy obniżeniu rozpuszczalności *bv* wykazują najwyższe powinowactwo do fazy stacjonarnej i adsorbują się silniej. Warianty kwasowe będąc najlepiej rozpuszczalnymi w tych warunkach mają większe powinowactwo do fazy ruchomej, jednocześnie mają najniższą siłę adsorpcji z wariantów mAb na AEX, co zobrazowano na rys. 16.A. Po dodaniu PEG do roztworu o pH poniżej pI wariantów mAb sytuacja jest odwrotna. Najlepszą rozpuszczalność wykazują wtedy *bv*, które mają w takim pH najwyższy ładunek dodatni. Obniżoną rozpuszczalność wykazują jednocześnie *av* oraz *mv*. Szczególnie duże obniżenie rozpuszczalności dla *av* sprawia, że wykazują one wyższe powinowactwo do fazy stacjonarnej, co przedstawiono na rys. 16.B.

3.5 Redukcja *av* w połączonym procesie chromatografii i strącania

Badania nad selektywnym procesem strącania wariantów ładunkowych mAb, prowadzone przez mgr. inż. Tomasza Rumanka, będące podstawą publikacji [66] oraz jego rozprawy doktorskiej wykazały, że pomimo wysokiej efektywności tej metody, posiada ona ograniczoną selektywność rozdzielania wariantów. Natomiast główną wadą metod chromatograficznych rozdzielania wariantów jest ich ograniczona produktywność, limitowana pojemnością chłonną złoża chromatograficznego. W celu wykorzystania zalet obu metod w tej pracy połączono proces selektywnego strącania z metodą rozdzielania wariantów za pomocą chromatografii AEX. Badania opisane w tym rozdziale stanowią podstawę publikacji [68], patentu [101], niniejszej rozprawy doktorskiej oraz rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Rumanka.

W przedstawionych w tym rozdziale badaniach analizowano możliwość redukcji zawartości *av* w materiale wyjściowym mAb do $\pm 25\%$ m/m w gotowym produkcie. Wartość ta została założona zgodnie z protokołem otrzymanym od producenta materiału biologicznego. Wyniki badań [47, 57] wykazały, że *av* poniżej 25% w materiale biologicznym nie wpływa na pogorszenie właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych leku biologicznego.

W ramach badań dotyczących niniejszej pracy doktorskiej sformułowano model dynamiki kolumny oraz zaprojektowano proces AEX w warunkach przeładowania masowego, mający na celu redukcję *av* z materiału wyjściowego mAb. Określono i zoptymalizowano połączenie procesu chromatograficznego oraz procesu strącania (rys. 18). Badania eksperymentalne dotyczące procesu strącania wariantów ładunkowych mAb, sformułowanie

modelu matematycznego dla tego procesu oraz ich weryfikację przeprowadził mgr inż. Tomasz Rumanek [66]. W ramach pracy doktorskiej mgr inż. Tomasza Rumanka przeprowadzono również końcowe obliczenia numeryczne dotyczące wydajności i efektywności połączonego procesu redukcji *av* z materiału wyjściowego, a otrzymane wyniki zaprezentowano na rys. 19 – 20. Pozostałe badania i obliczenia zostały wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

3.5.1 Projektowanie procesu AEX – formułowanie i weryfikacja modelu dynamicznego

W celu zaprojektowania połączonego procesu chromatografii i strącania przyjęto model izotermi CPA, równania 7 – 10 (sekcja 1.5.3). W porównaniu z izotermą SMA, którą zastosowano w publikacji [86] model ten jest dużo dokładniejszy w przewidywaniu kształtów pików chromatograficznych oraz wydajności rozdzielania wariantów mAb na złożu AEX. Model izotermi CPA połączono z modelem kinetyczno-dyspersyjnym dynamiki kolumny (równania 1, 2) oraz warunkami początkowymi i brzegowymi (równania 3, 4A – 4C).

W modelu izotermi CPA należy wyznaczyć następujące współczynniki: stałą równowagi K_e oraz współczynniki interakcji pomiędzy cząsteczkami białka. Są to współczynniki określające interakcje pomiędzy cząsteczkami tego samego białka, B_{ii} lub pomiędzy cząsteczkami różnych białek (np. różnymi wariantami mAb) – B_{ij} . Wartości B_{ij} oszacować można za pomocą równania 20:

$$B_{ij} = \sqrt{B_{ii}B_{jj}}, \text{ gdzie } i, j = av, mv, bv \quad (20)$$

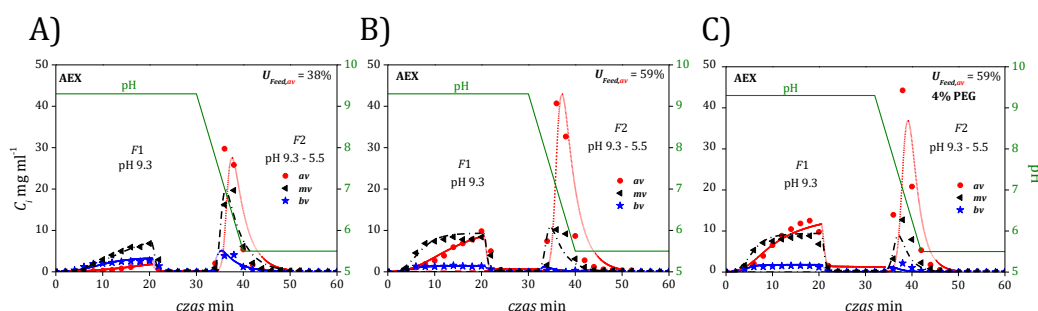
Zakłada się, że interakcje międzycząsteczkowe są symetryczne, czyli $B_{ij} = B_{ji}$. Przy pierwszej próbie estymacji liczba parametrów modelu okazała się niewystarczająca do dokładnego opisu profilu stężenia wariantów. Z tego powodu zwiększono liczbę parametrów o jeden, włączając w to każdy z indywidualnych parametrów, określających oddziaływanie pomiędzy różnymi cząsteczkami: $B_{av,mv}$, $B_{av,bv}$, $B_{mv,bv}$. Po oszacowaniu wartości tych parametrów za pomocą równania 20, współczynnik określający interakcje międzycząsteczkowe pomiędzy wariantami ładunkowymi *av* i *mv*, $B_{av,mv}$, odbiegał znacznie od wartości określonej równaniem 20 i należało go estymować niezależnie.

W celu określenia parametrów: K_e , $B_{av,av}$, $B_{mv,mv}$, $B_{bv,bv}$, $B_{av,mv}$ oraz k_{av} zastosowano metodę dopasowania do pików (IM, sekcja 1.5.4). Jako dane eksperymentalne, wykorzystano do oszacowania powyższych parametrów profile stężenia wariantów ładunkowych mAb, uzyskane dla dwóch materiałów wyjściowych o różnej zawartości *av* (tabela 4), zgodnie z procedurą rozdzielania wariantów mAb za pomocą AEX (procedura 2.4.6.1).

Tabela 4. Wyestymowane wartości parametrów izoterm adsorpcji mAb w obecności oraz bez obecności PEG.

PEG % m/v	K_e (-)	$B_{av,av}$ (-)	$B_{mv,mv}$ 10^3 (-)	$B_{bv,bv}$ 10^3 (-)	$B_{av,mv}$ (-)	k_i (pH 9.3) (s^{-1})
0	722	0.67	1.11	3.05	71.4	$1.71 \cdot 10^{-4}$
4	938	1.05			52.4	

Otrzymane wartości parametrów modelu przedstawiono w tabeli 4. Ze względu na uproszczenia, które zostały wprowadzone w modelu izoterm CPA, przedstawione parametry należy traktować jako współczynniki matematyczne, nie zaś jako rzeczywiste wartości parametrów oddziaływań międzycząsteczkowych.



Rys. 17 Profile stężenia wariantów ładunkowych mAb po elucji z kolumny AEX dla A) materiału wyjściowego $U_{Feed,av} = 38\%$, $C_{inj} = 19.3 \text{ mg ml}^{-1}$; B) materiału wyjściowego $U_{Feed,av} = 59\%$, $C_{inj} = 25.8 \text{ mg ml}^{-1}$; C) materiału wyjściowego $U_{Feed,av} = 59\%$, z dodatkiem 4% m/v PEG w buforze wiążącym, $C_{inj} = 26.3 \text{ mg ml}^{-1}$. $Q = 0.5 \text{ ml min}^{-1}$, $V_{inj} = 10 \text{ ml}$. Symbole – dane eksperymentalne; linie – dane pochodzące z symulacji.

Wyniki otrzymane z symulacji oraz odpowiadające im badania eksperymentalne przedstawiono na rys. 17. Zaprezentowano profile stężeń wariantów mAb we frakcji przepływowej ($F1$), która eluowana jest wraz z buforem wiążącym pH 9.3 na etapie ładowania próbki oraz frakcji związanej ($F2$) eluowanej gradientem liniowym pH od pH 9.3 do 5.5. Wydajności poszczególnych frakcji oraz składy wariantów w rozdzielonych frakcjach oraz materiale początkowym przedstawiono w tabeli 5. Materiał wyjściowy $U_{Feed,av} = 38\%$ o masie 193 mg mAb rozdzielono na dwie frakcje, w której $F1$ stanowiła frakcję zubożoną w av i ich zawartość wyniosła $U_{F1,av} = 13\%$ natomiast $F2$ stanowiła frakcję wzbogaconą w te warianty, o zawartości $U_{F2,av} = 53\%$.

Wyniki przedstawione na rys. 17 świadczą o dobrym dopasowaniu modelu do danych doświadczalnych. Symulacje z dużą dokładnością odtwarzają kształty profili stężenia poszczególnych wariantów. Wydajności eksperymentalne oraz wydajności obliczone z wyników symulacji również są zbliżone, co przedstawia tabela 5. Różnice pomiędzy przewidywanymi a eksperymentalnie określonymi wydajnościami nie przekroczyły 4%.

Tabela 5. Skład wariantów mAb we frakcji przepływowej ($F1$) oraz związanej ($F2$) dla różnych materiałów wyjściowych ($Feed$) po rozdzielaniu na złożu AEX. Eksp. – dane eksperymentalne, Sym. – symulacje, $U_{F,i}$ – udział i -tego wariantu we frakcji, Y – wydajność frakcji obliczona dla wszystkich wariantów.

Materiał $U_{Feed,av}$		38%				59%				59% z dodatkiem 4% PEG			
Frakcja		$U_{F,i}$ % m/m			Y%	$U_{F,i}$ % m/m			Y%	$U_{F,i}$ % m/m			Y%
		av	mv	bv	% m/m	av	mv	bv	% m/m	av	mv	bv	% m/m
$Feed$		38	45	17	-	59	36	5	-	59	35	6	-
$F1$	Eksp.	13	57	30	46	38	53	9	72	47	44	9	70
	Sym.	13	56	31	46	36	55	9	73	48	43	9	72
$F2$	Eksp.	53	38	9	52	78	21	1	26	73	23	4	29
	Sym.	51	39	10	53	80	18	2	25	73	24	3	28

Aby określić wpływ PEG na selektywność chromatograficznego rozdzielania wariantów mAb, $Feed$ został wzbogacony o 4% m/v PEG (rys. 17.C). W ten sposób odwzorowywano skład rozpuszczonego osadu po procesie strącania, który był później doczyszczany za pomocą AEX. Następnie wyestymowano parametry modelu, które zostały uzyskane dla roztworów bez PEG, tak aby dopasować symulacje do danych eksperymentalnych, które otrzymano rozdzielając chromatograficznie $Feed$ z dodatkiem PEG. Otrzymane profile stężeń zostały przedstawione na rys. 17.C oraz w tabeli 4. W przedstawionych powyżej oraz w rozdz. 3.4 badaniach określono, że dodatek środka strącającego, którym był PEG ma negatywny wpływ na proces adsorpcji wariantów na złożu AEX oraz ich elucję z kolumny chromatograficznej w warunkach dużego obciążenia masowego złoża chromatograficznego, co potwierdzają wyniki przedstawione w tabeli 5. Dlatego też konieczne jest usunięcie PEG z roztworu przed wprowadzeniem roztworu białka po procesie strącania do kolumny chromatograficznej. PEG usuwano przy użyciu chromatografii CEX w trybie *bind-and-elute* zgodnie z procedurą 2.4.7.

Wyniki obliczeń matematycznych uznano za wystarczająco dokładne dla wszystkich testowanych warunków (rys. 17, tabela 5), przez co model mógł być wykorzystany do zaprojektowania połączenia AEX z procesem strącania.

3.5.2 Weryfikacja modelu dla połączenia AEX oraz strącania

W celu określenia optymalnej konfiguracji połączenia AEX i strącania, model dynamiki AEX opracowany w niniejszej pracy rozwiązywano jednocześnie z modelem równowagowym procesu strącania opracowanym w pracy [66]. Przed jego wykorzystaniem model połączonych procesów zweryfikowano poprzez eksperymentalną realizację rozdzielania wariantów mAb w sekwencji PREC-AEX i AEX-PREC dla materiału zawierającego $U_{Feed,av} = 38\%$. W tym przypadku przyjęto, że maksymalna akceptowalna zawartość av w produkcie może wynosić 25%. Odpowiada to 34% redukcji wariantów av w odniesieniu do materiału wyjściowego. AEX

była limitującym etapem w połączeniu obu procesów, co wiązało się z ograniczoną produktywnością tego procesu. Tym samym integrując AEX z PREC minimalizowano udział AEX w całym procesie.

W układzie PREC-AEX najpierw przeprowadzono proces strącania materiału biologicznego w 50 mM buforze octanowym, pH 5, z wykorzystaniem buforu strącającego, tj. 50 mM buforu octanowego, pH 5, z dodatkiem 50% PEG m/v, zgodnie z procedurą 2.4.8. Supernatant traktowano jak gotowy produkt, natomiast osad kierowano do dalszego oczyszczenia za pomocą AEX. Ponieważ po procesie strącania materiał ten zawierał znaczne ilości PEG, co, jak wspomniano powyżej, zakłócało przebieg procesu chromatografii AEX, należało go wcześniej usunąć z roztworu. Próba usunięcia PEG za pomocą filtracji nie powiodła się, ponieważ polimer ten blokował pory membrany filtracyjnej. W związku z tym, w celu efektywnego usunięcia pozostałości PEG z roztworu białek po ich strąceniu, wykorzystano chromatografię CEX (procedura 2.4.7 i 2.4.6.1). Operacji usuwania PEG z roztworu po strącaniu nie optymalizowano. Możliwe, że można pominąć ten etap dzięki zoptymalizowaniu parametrów membrany filtracyjnej lub warunków płukania osadu.

Udział wariantów ładunkowych mAb, wydajność każdego z procesów jednostkowych oraz połączonego procesu PREC-AEX zostały wyznaczone na podstawie analizy stężenia produktu strącania i rozdzielania za pomocą AEX. Wyniki, które otrzymano eksperymentalnie porównano z danymi uzyskanymi z modelu numerycznego połączonego procesu i przedstawiono je w tabeli 6.

Tabela 6. Porównanie składu wariantów ładunkowych mAb w supernatancie (*S*) i osadzie (*P*) oraz wydajności otrzymanych eksperymentalnie i numerycznie po połączeniu modelu dynamicznego AEX z równaniami bilansu masy dla PREC. *Pro* – produkt, *Waste* – odpad.

PREC					AEX					Połączenie (PREC-AEX)							
Frakcja		$U_{F,i}$ % m/m			Y%	Frakcja		$U_{F,i}$ % m/m			Y%	Frakcja		$U_{F,i}$ % m/m			Y%
		<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	% m/m			<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	% m/m			<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	% m/m
<i>Feed</i>		39	45	16	-	<i>P</i>		49	41	10	-	<i>Feed</i>		39	45	16	-
Eksp.	<i>S</i>	26	51	23	63	<i>F1</i>	26	56	18	48	<i>Pro</i>	26	52	22	82		
Sym.		26	52	22	63		24	57	19	48		25	54	21	82		
Eksp.	<i>P</i>	49	41	10	37	<i>F2</i>	64	32	4	48	<i>Waste</i>	64	32	4	15		
Sym.		51	39	10	37		63	32	5	52		63	31	6	18		

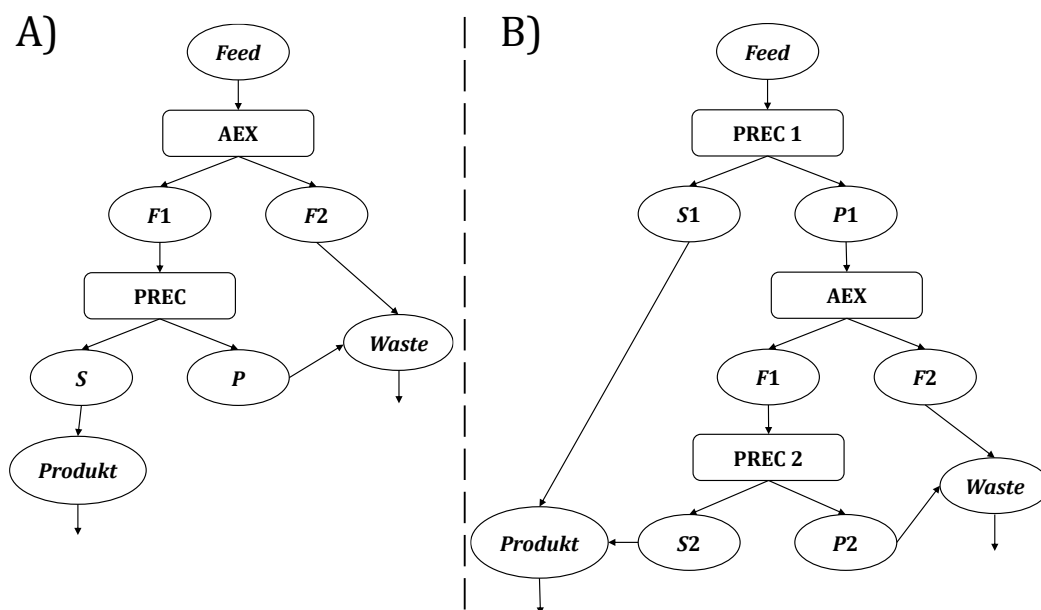
Ponieważ predykcje modelu i dane eksperymentalne były zbliżone, model wykorzystano do obliczenia wydajności różnych konfiguracji procesów jednostkowych w połączonym procesie oczyszczania wariantów ładunkowych.

Rozważone zostały dwie opcje: w opcji I zawartość *av* w materiale mAb zredukowano o 62%, zaś w opcji II o 34% (np. w przypadku opcji I dla materiału wyjściowego zawierającego

39% *av*, w produkcji otrzymano 15% *av*; w opcji II: z 39% *av* oczyszczono materiał do 25% *av*). Realizacja opcji I (rys.18.A), w której założono większe wymagania dotyczące stopnia redukcji *av* stanowiła bardziej wymagający przypadek, w porównaniu z opcją II (rys.18.B).

3.5.3 Optymalizacja połączonego procesu oczyszczania mAb

Optymalna konfiguracja i kolejność procesów jednostkowych zależała od założonego poziomu redukcji *av* oraz początkowej zawartości tych wariantów w materiale wyjściowym mAb (*Feed*).

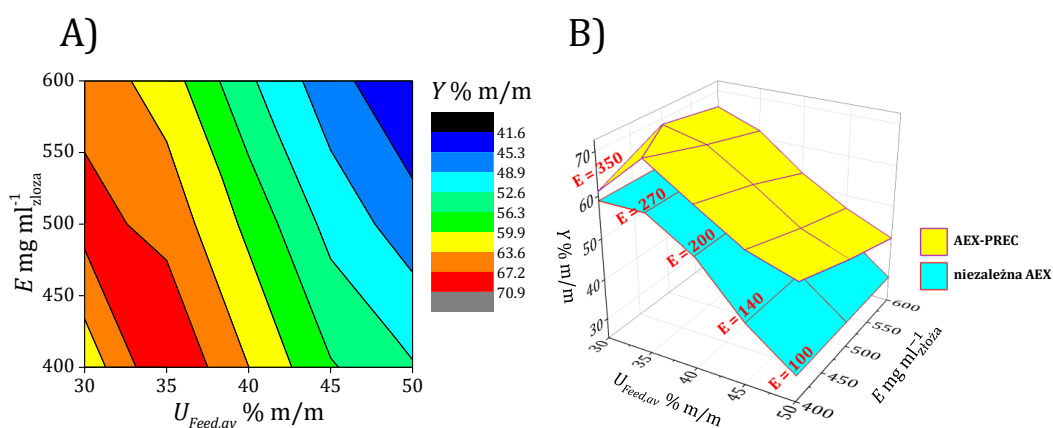


Rys. 18 Zoptymalizowana konfiguracja połączonych procesów PREC i AEX. A) opcja I; B) opcja II. *Feed* – materiał wyjściowy mAb; *F1* frakcja przepływowa AEX zubożona w *av*; *F2* frakcja związana AEX wzbogacona w *av*; *S* supernatant po procesie strącania; *P* osad po procesie strącania, *Waste* – odpad.

Wykonano symulacje dla różnych sekwencji procesów dwuetapowych i trój etapowych i porównano otrzymane wydajności, tj. AEX – PREC, PREC – AEX, PREC – AEX – PREC, AEX – PREC – PREC, PREC – PREC – AEX. Analizowano ww. połączenia obu procesów wraz z próbą oczyszczania różnych frakcji zarówno chromatograficznych, jak i otrzymanych w procesie strącania. Optymalne pod względem wydajności konfiguracje procesów jednostkowych w połączonym procesie oczyszczania wariantów mAb przedstawiono na rys. 18.

Symulacje matematyczne prowadzono przy założeniu różnych składów materiału wyjściowego mAb (*Feed*). Zmiana składu i wartości przeładunku kolumny AEX wpływała na selektywność i efektywność procesu. Wzrost zawartości *av* powodował obniżenie wydajności AEX, co wynikało z nakładania się pików pomiędzy *av* z pikiem pozostałych

wariantów ładunkowych mAb (*mv* i *bv*). Podobne zmiany w wartościach wydajności zaobserwowano również w procesie strącania [66]. W obliczeniach założono, że proces strącania ma nieograniczoną produktywność, ponieważ była ona determinowana tylko wielkością reaktora. Ponieważ zawartość *av* w supernatancie po procesie strącania mieściła się w wymaganym przedziale akceptacji $\pm 25\%$ (tab. 6), w celu zwiększenia wydajności połączonego procesu zdecydowano się doczyszczać otrzymywany osad, który pomimo wzbogacenia w *av* do $U_{P,av} = 49\%$ (tab. 6), zawierał również duże ilości *mv*, $U_{P,mv} = 41\%$ i *bv*, $U_{P,bv} = 10\%$, więc nie mógł być traktowany jako odpad (*Waste*). Jednocześnie w procesie AEX możliwe było wzbogacenie *F2* w *av* do zawartości $U_{av} \sim 80\%$ (tab. 5), co zapewniało wymagane zwiększenie wydajności i efektywności połączonego procesu, dlatego zdecydowano się traktować otrzymaną frakcję jako *Waste*, zaś *F1* kierować do dalszego doczyszczenia za pomocą procesu strącania.

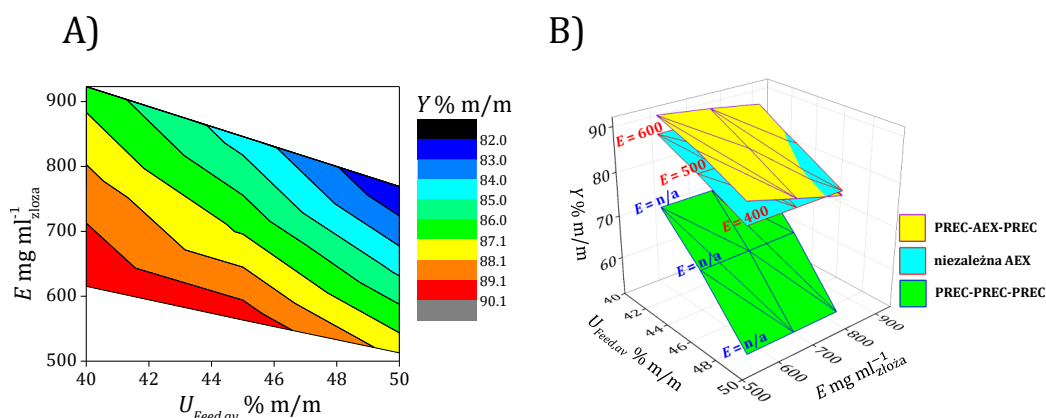


Rys. 19 Ilustracja efektywności oczyszczania wariantów ładunkowych mAb w połączonym procesie AEX-PREC, dla opcji I. A) Zależność E (efektywność) względem zawartości *av* w roztworze *Feed*, $U_{Feed,av}$, B) wykres 3D, przedstawiający zależność $U_{Feed,av}$, E oraz Y pomiędzy połączonym procesem AEX-PREC i niezależną AEX.

Na rys. 19 przedstawiono wyniki otrzymane dla opcji I w formie zależności pomiędzy zawartością *av* w roztworze początkowym, $U_{Feed,av}$, efektywnością procesu, E , wyrażoną w mg produktu na ml złoza w procesie chromatograficznym i wydajnością operacyjną, Y , liczoną za pomocą równania 15 i wyrażoną w %. Parametr E , który wyraża efektywność procesu jest szczególnie ważny dla procesów chromatograficznych, ponieważ często pojemność chłonna złożeń chromatograficznych jest niska. Z tego powodu w celu zwiększenia efektywności procesu stosuje się w technikach chromatograficznych kolumny o dużych objętościach lub zwiększa się ich liczbę w realizowanym procesie oczyszczania.

Na wykresie ilustrującym zależność efektywności procesu względem udziału *av* i wydajności operacyjnej (rys. 19.B), można stwierdzić, że redukcja *av* o pożądany stopień oczyszczenia (ok. 60%) przy udziale niezależnej AEX jest możliwa, ale jedynie w niskich

zakresach $E = 100 - 350 \text{ mg ml}_{\text{złóża}}^{-1}$. Połączenie AEX ze strącaniem, w konfiguracji przedstawionej na rys. 18.A, umożliwiło poprawę E do $600 \text{ mg ml}_{\text{złóża}}^{-1}$ dla najwyższej zawartości av w materiale mAb, tj. $U_{Feed,av} = 50\%$. Zastosowanie wyższego przeładowania kolumny AEX białkiem było możliwe dzięki zredukowaniu av w materiale biologicznym przy wykorzystaniu procesu strącania. Wydajność połączonego procesu względem niezależnej AEX była 20% wyższa, przy redukcji av z materiału o wysokiej zawartości tych wariantów, $U_{Feed,av} = 50\%$. Dla niskich zawartości av w $Feed$, ok. 30% av , efektywność procesu połączonego w sekwencji AEX-PREC była wyższa niż dla niezależnej AEX, od 50 do 250 $\text{mg ml}_{\text{złóża}}^{-1}$. Dla obu opcji wydajność redukcji av była na podobnym poziomie, wynoszącym ok. 60%.



Rys. 20 Ilustracja efektywności oczyszczania wariantów ładunkowych mAb w połączonym procesie PREC-AEX-PREC, dla opcji II. A) Zależność E względem zawartości av w roztworze $Feed$, $U_{Feed,av}$, B) wykres 3D, przedstawiający zależność pomiędzy $U_{Feed,av}$, E oraz Y połączonego procesu PREC-AEX-PREC, w porównaniu z niezależną operacją AEX i trójstopniowym strącaniem. $E = n/a$ – nie dotyczy, efektywność PREC nie jest niczym limitowana.

Redukcję av w opcji II, czyli o ok. 30% względem ich początkowej zawartości, osiągnięto dla konfiguracji procesów jednostkowych: PREC-AEX-PREC (rys. 18.B). Takie połączenie procesów przewyższa niezależną operację AEX pod względem efektywności procesu o 100% dla $Feed$ o najwyższej zadanej zawartości av , $U_{Feed,av} = 50\%$. Dla materiału o najniższym zadanym udziale tych wariantów, $U_{Feed,av} = 40\%$, E była o 50% wyższa niż dla niezależnej AEX. Konfiguracja ta okazała się również lepsza pod względem wydajności, którą można uzyskać za pomocą trójstopniowego procesu selektywnego strącania av (PREC-PREC-PREC). Wyniki otrzymane dla połączonego modelu w opcji II przedstawiono na rys. 20.

Dla materiałów mAb, w których zawartość początkowa av wynosiła: $U_{Feed,av} = 30 - 35\%$, efektywność niezależnej AEX lub trójstopniowego strącania była porównywalna do połączonego procesu PREC-AEX-PREC. Redukcja av w opcji II dla takich materiałów przy wykorzystaniu AEX, zapewniała wydajność do 90%, przy efektywności $700 - 900 \text{ mg ml}_{\text{złóża}}^{-1}$.

Połączenie procesów chromatografii i strącania dla materiałów o niskiej zawartości *av* i redukcji *av* o niższe wartości (ok. 30%) nie dawało znaczących korzyści.

3.6 Wydzielanie poszczególnych wariantów mAb

3.6.1 Koncepcja procesu

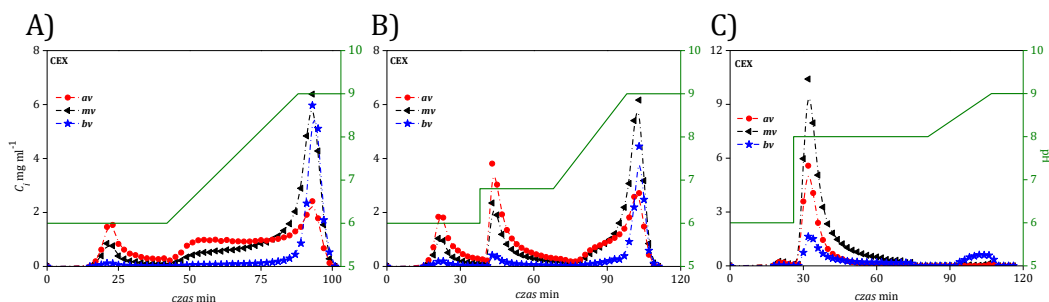
W żadnym z analizowanych przypadków, czyli niezależnym procesie AEX, niezależnym procesie strącania oraz w procesie połączonym nie udało się rozdzielić wszystkich wariantów mAb na pojedyncze frakcje. W tym celu opracowano procedurę rozdzielania wariantów mAb, która opierała się na połączeniu kolumn CEX oraz AEX w warunkach ich wysokiego przeładowania masowego.

W badaniach udowodniono [97-98], że zastosowanie gradientu pH jest dużo skuteczniejsze, gdy wykorzystuje się go do oddzielania wariantu najsilniej wiążącego się z fazą stacjonarną. W badaniach przedstawionych w tym rozdziale gradient pH dostosowano tak aby warianty mAb najsilniej związane ze złożem chromatograficznym nie wymywały się wraz z wariantami słabiej związanymi ze złożem. Desorbowano je kolejno w zależności od stosowanej chromatografii IEX buforem o niższym lub wyższym pH od buforu wymywającego.

W przyjętym schemacie separacji nie występuje odpad (*Waste*). Wszystkie eluaty są produktami. Udziały (czystość, *U*) każdego z wariantów w określonej frakcji/produkcji obliczano zgodnie z równaniami 16-17.

3.6.2 Dobór warunków prowadzenia procesu CEX

Rozdzielanie wariantów mAb za pomocą chromatografii CEX prowadzono z wykorzystaniem złoża POROS XS, które w badaniach opisanych w sekcji 3.3 wykazywało dobrą efektywność separacji *bv* od pozostałych wariantów mAb. We wstępnych eksperymentach zastosowano różne gradienty pH, aby podzielić związaną masę białka na frakcje zubożone lub wzbogacone w *bv*. Rys. 21 przedstawia różne testowane gradienty wraz z profilami stężenia każdego z wariantów mAb. Po przeanalizowaniu profili stężeń wariantów mAb wybrano bufor desorbujący pH 6.8 dla pierwszego z etapów gradientu w celu uzyskania słabo związanej frakcji zubożonej w *bv*, zaś bufor o pH 9.0 stanowił drugi bufor desorbujący, którym desorbowano frakcję wzbogaconą w *bv*.



Rys. 21 Eksperymentalne profile stężenia wariantów mAb dla różnych testowanych gradientów pH, $V_{inj} = 10$ ml, wiązanie mAb oraz mycie kolumny wykonywano przy pH = 6.0. A) $C_{inj} = 9.7$ mg ml⁻¹, gradient liniowy od pH 6.0 do 9.0, B) $C_{inj} = 9.6$ mg ml⁻¹, gradient skokowy od pH 6.0 do 6.8, kolejno gradient liniowy od pH 6.8 do 9.0, C) $C_{inj} = 8$ mg ml⁻¹, gradient skokowy od pH 6.0 do 8.0, kolejno gradient liniowy od pH 8.0 do 9.0. Skład wariantów w *Feed* wyrażony jako *av/mv/bv* w % m/m: A) 42/42/16; B) 38/46/16, C) 26/58/16. Zielona linia oznacza zadany gradient pH.

3.6.3 Formułowanie modelu dynamiki CEX

W celu kalibracji modelu, tzn. wyznaczenia jego parametrów dla wybranych etapów gradientu pH, czyli wprowadzania próbki oraz mycia kolumny w pH 6.0, desorpcji przy pH 6.8 oraz desorpcji przy pH 9.0 wykorzystano zmienne stężenia wariantów dla różnych materiałów wyjściowych mAb. Warunki separacji użyte do kalibracji modelu przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Zawartość wariantów mAb we frakcjach uzyskanych w CEX, wykorzystanych do kalibracji modelu. Próbkę (*Feed*) wprowadzono w objętości $V_{inj} = 10$ ml przy pH 6.0, desorpcja *F1* przy pH 6.8, desorpcja *F2* przy pH 9.0.

C_{inj} mg ml ⁻¹		4.5				5.3				7.8			
Ładowanie mg _{mAb} ml _{col} ⁻¹		26				50				73			
U_i % m m ⁻¹		<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	<i>Y</i> %	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	<i>Y</i> %	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	<i>Y</i> %
<i>Feed</i>		10	48	42	-	5	43	52	-	25	62	13	-
<i>F1</i>	Eksp.	15	57	28	74	9	48	43	84	26	65	9	45
	Sym.	15	64	21	68	6	50	44	85	27	65	8	46
<i>F2</i>	Eksp.	2	21	77	26	0	2	98	16	2	39	59	55
	Sym.	0	13	87	32	0	6	94	15	2	37	61	54

W tabeli 7 przedstawiono również eksperymentalne i symulowane składy oraz wydajności frakcji eluowanych przy pH 6.8 (*F1*) oraz 9.0 (*F2*). Masę wprowadzanej próbki przeliczano na 1 ml upakowanego w kolumnie złoża chromatograficznego i wyrażono w mg_{mAb} ml_{col}⁻¹.

Współczynniki modelu, którym był model TD połączony z modelem izotermi CPA, wyznaczono dopasowując symulacje do danych eksperymentalnych za pomocą procedury optymalizacyjnej, identycznej jak opisana w sekcji 3.5.1. Wartości otrzymanych parametrów przedstawiono w tabeli 8. Podobnie jak w modelu opisanym w rozdz. 3.5.1 uzyskane wartości

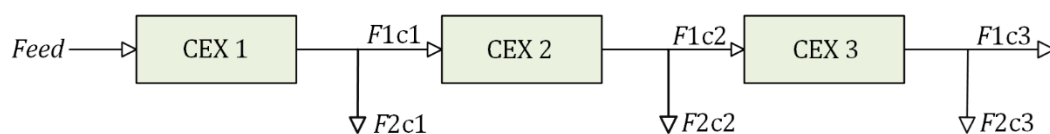
traktować należy jako dane empiryczne, pozwalające na odtworzenie efektywności rozdzielania. Nie mogą one odzwierciedlać rzeczywistego mechanizmu adsorpcji, co spowodowane jest złożonością mechanizmu retencji wariantów w kolumnie jonowymiennej.

Tabela 8. Wyestymowane wartości parametrów modelu dla CEX.

Wyestymowane parametry	Ładowanie pH 6	Elucja pH 6.8	Desorpcja pH 9
Ke_{av} (-)	2990	257	13.7
Ke_{mv} (-)		184	6.85
Ke_{bv} (-)		264	2.74
$B_{av,av}$ (-)	1.94		
$B_{mv,mv}$ (-)	1.95		
$B_{bv,bv}$ (-)	1.39		
$B_{av,mv}$ (-)	2.21	2.51	
$B_{av,bv}$ (-)	2.54		
$B_{mv,av}$ (-)	1.9	1.86	
$B_{mv,bv} = B_{bv,mv}$ (-)	1.65		
$B_{bv,av}$ (-)	1.64		
k_{av} (s^{-1})	0.000227	0.931	2.26
k_{mv} (s^{-1})			6.78
k_{bv} (s^{-1})		1.86	

3.6.4 Weryfikacja modelu dynamiki CEX

W celu weryfikacji modelu przeprowadzono rozdzielanie materiału mAb w układzie wielokolumnowym. Wykorzystano sekwencję trzech kolumn CEX w układzie szeregowym, który zaprezentowano na rys. 22.



Rys. 22 Konfiguracja CEX wykorzystana do weryfikacji modelu i testu rozdzielania mAb. F – frakcja; c – kolumna.

$Feed$ wprowadzono do pierwszej kolumny (CEX 1) i przemywano przy pH 6.0. Następnie częściowo eluowano warianty mAb, za pomocą pH 6.8 i zbierano frakcję słabo związaną ze złożem kolumny ($F1$). Kolejno pozostałe na kolumnie białko desorbowano za pomocą pH 9.0 i zbierano frakcję $F2$. Skład frakcji określano za pomocą analizy CEX-HPLC, a ich masę wyznaczono poprzez pomiary stężenia mAb za pomocą czytnika mikroplitek, uwzględniając

ilość pobraną do analizy zawartości wariantów oraz straty na probówkach filtracyjnych. Frakcję wymywaną pH 6.8 doprowadzano do pH 6.0, zateżano do objętości 10 ml i wprowadzano do kolejnej kolumny (CEX 2). Sekwencję powtórzono w celu rozdzielania białka w trzeciej z kolumn – CEX 3. Otrzymane wyniki, w których określono zawartości wariantów mAb w każdej z eluowanych frakcji oraz ich wydajności w odniesieniu do materiału wyjściowego (*Feed*) porównano z wynikami symulacji w tabeli 9.

Tabela 9. Skład wariantów mAb oraz wydajność frakcji uzyskanych w wielokolumnowym układzie CEX zastosowanym do weryfikacji modelu dynamicznego

C_{inj} mg ml ⁻¹		7.3				4.4				2.6			
Ładowanie mg _{mAb} ml _{col} ⁻¹		36				22				13			
		CEX 1				CEX 2				CEX 3			
U_i % m m ⁻¹		<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	<i>Y</i> %	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	<i>Y</i> %	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	<i>Y</i> %
<i>Feed</i>		7	42	51	-	11	53	36	-	21	63	16	-
<i>F1</i>	Eksp.	11	53	36	73	21	63	16	60	30	67	3	45
	Sym.	10	54	36	73	23	65	12	60	30	68	2	46
<i>F2</i>	Eksp.	0	10	90	27	2	19	78	40	5	57	38	55
	Sym.	0	9	91	27	1	18	81	40	14	56	30	54

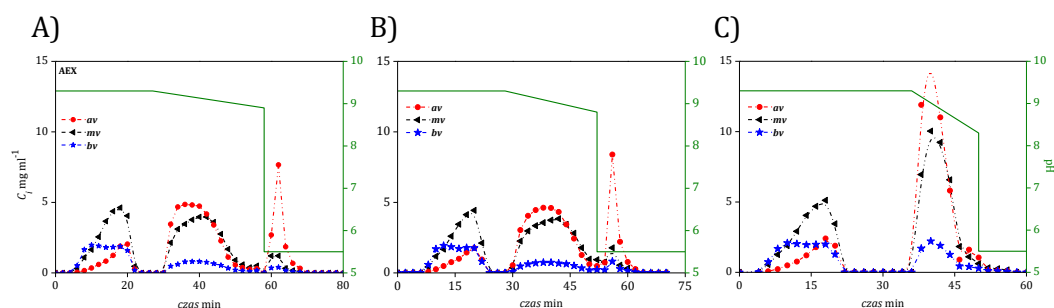
Frakcje mocniej związane ze złożem (*F2*) uzyskane z kolumn CEX 1 (*F2c1*) i CEX 2 (*F2c2*) były mocno wzbogacone w *bv*. Całkowita wydajność wydzielenia *bv* była obniżona o warianty, które pozostały we frakcji *F2c3*. Frakcja ta (*F2c3*) posiadała ok. 40% *bv*, jednak było to niewystarczające by połączyć ją z gotowym produktem bogatym w *bv*. Przedstawione wyniki uzyskane w tym eksperymencie potwierdziły jednak możliwość wydzielenia *bv* w układzie wielokolumnowym CEX. Zgodność pomiędzy danymi doświadczalnymi a wynikami symulacji była zadowalająca, co oznaczało, że model mógł być użyty do predykcji rozdzielania wariantów mAb w układzie wielokolumnowym CEX, w różnych warunkach pod względem wprowadzanej do kolumny masy oraz zawartości wariantów.

3.6.5 Dobór warunków prowadzenia procesu AEX

Warunki rozdzielania wariantów mAb na złożu AEX (POROS XQ), pozostały takie same jak w poprzednich badaniach przedstawionych w rozdziale 2.4.6.1. Białko wprowadzano do kolumny chromatograficznej przy pH 9.3 i częściowo eluowano tym samym buforem wiążącym, jako frakcję przepływową (*F1*). Pozostałe mAb, związane ze złożem chromatograficznym (*F2*) eluowano poprzez zmniejszenie pH fazy ruchomej.

W badaniach przedstawionych w tej części pracy bufor desorbujący oraz jego pH dostosowano tak, aby cała masa białka została zdesorbowana z kolumny. Warunki wiązania białka w AEX dobrano w poprzedniej części pracy (rozdz. 3.2). Na rys. 23 przedstawiono

testowe gradienty, które użyto do optymalizacji warunków desorpcji. Wystarczająco silną elucję uzyskano dla 50 mM buforu TRIS-HCl, pH 7.5. Pozwoliło to na wyeliminowanie buforu HIS, którego pozostałości były trudne do usunięcia z roztworu gotowego produktu za pomocą próbek filtracyjnych.



Rys. 23 Eksperymentalne profile stężenia wariantów mAb dla różnych testowych gradientów pH. $V_{inj} = 10$ ml, $C_{inj} = 13$ mg ml⁻¹, bufor wiążący i myjący pH 9.3. A) Gradient liniowy od pH 9.3 do pH 8.9, kolejno gradient skokowy do pH 5.5, B) gradient liniowy od pH 9.3 do pH 8.8, kolejno gradient skokowy do pH 5.5, C) gradient liniowy od pH 9.3 do pH 8.3, kolejno gradient skokowy do pH 5.5. Zielona linia oznacza zadany gradient pH.

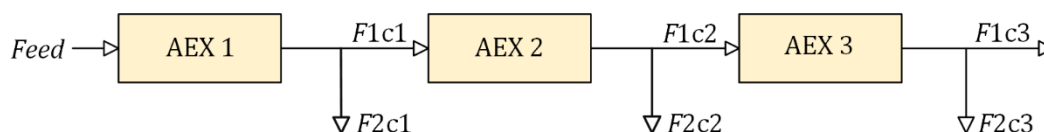
3.6.6 Formułowanie modelu dynamiki AEX

Wartości parametrów modelu dla AEX uzyskane zostały podczas obliczeń oraz eksperymentów przedstawionych w rozdz. 3.5. W przedstawionych w niniejszym rozdziale badaniach wartości parametrów skorygowano pod względem wykorzystywanego gradientu pH (desorpcja przy pH 7.5) oraz upakowanych świeżym złożem kolumn AEX. Do estymacji wartości parametrów modelu zastosowano profile stężenia wariantów, uzyskane w etapach ładowania i mycia przy pH 9.3 oraz w etapie desorpcji przy pH 7.5. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Wyestymowane wartości parametrów modelu dla AEX.

Wyestymowane parametry	Ładowanie pH 9.3	Desorpcja pH 7.5
$K_{eq,av} = K_{eq,mv} = K_{eq,bv}$ (-)	722	65.5
$B_{av,av}$ (-)	0.675	3.5
$B_{mv,mv} \times 10^3$ (-)	1.11	
$B_{bv,bv} \times 10^3$ (-)	3.1	
$B_{av,mv} \times 10^2$ (-)	2.74	6.24
$B_{av,bv}$ (-)	0.0453	0.103
$B_{mv,av}$ (-)	1.95	4.45
$B_{mv,bv} = B_{bv,mv} \times 10^3$ (-)	1.84	
$B_{bv,av}$ (-)	4.85	11.06
k_{av} (s ⁻¹)	0.000169	0.00451
k_{mv} (s ⁻¹)		
k_{bv} (s ⁻¹)		0.00225

Rys. 24 przedstawia schemat rozdzielania materiału mAb w układzie wielokolumnowym, który użyto w celu weryfikacji modelu AEX.



Rys. 24 Konfiguracja AEX wykorzystana do weryfikacji modelu i testu rozdzielania mAb. F – frakcja; c – kolumna.

Tabela 11. Skład wariantów mAb oraz wydajność frakcji uzyskanych w wielokolumnowym układzie AEX zastosowanym w weryfikacji modelu dynamicznego

C_{inj} mg ml ⁻¹	58				34				19				
Ładowanie mg _{mAb} ml ⁻¹ _{col}	580				340				190				
	AEX 1				AEX 2				AEX 3				
U_i %	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	Y %	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	Y %	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>	Y %	
<i>Feed</i>	48	36	16	-	37	44	19	-	17	56	27	-	
F_1	Eksp.	37	44	19	75	17	56	27	60	7	48	45	28
	Sym.	35	45	20	71	17	55	28	55	6	52	42	23
F_2	Eksp.	82	13	5	25	65	27	8	40	23	59	18	72
	Sym.	80	15	5	29	60	31	9	45	21	57	22	77

Roztwór mAb wprowadzany był do kolumny AEX 1 (*Feed*) oraz częściowo eluowany przy pH 9.3. Uzyskano frakcję przepływową (F_1) i frakcję związaną (F_2), którą desorbowano buforem o pH 7.5. Frakcje przepływowe zatężano do stałej objętości $V_{inj} = 10$ ml (procedura 2.4.6.1) i wprowadzano do kolejnej z kolumn. Udział wariantów we frakcjach oraz rozdzielanym materiale, wydajności porównano z wynikami symulacji w tabeli 11. Po analizie

otrzymanych wyników stwierdzono, że frakcje $F2c1$ i $F2c2$ są wzbogacone w av . Frakcja $F1c3$ jest prawie pozbawiona av ($U_{F1c3} = 7\%$), jednocześnie zawiera mv i bv o zbliżonym udziale. AEX umożliwia wydzielenie av z mieszaniny wariantów, przy bardzo dużych przeładowaniach kolumny, nawet do 600 mg na 1 ml kolumny. Nie można za jej pomocą jednak rozdzielić mv i bv .

Zgodność pomiędzy danymi eksperymentalnymi a symulacjami była zadowalająca w związku z czym model ten mógł być użyty do przewidywania procesów AEX.

3.6.7 Określenie warunków operacyjnych za pomocą predykcji numerycznych

Model został użyty do wyznaczenia efektywności rozdzielania wariantów. Obliczenia wykonano dla gradientów pH wybranych w przedstawionych powyżej badaniach eksperymentalnych oraz materiałów wyjściowych mAb o różnym składzie wariantów, które przedstawiono w tabeli 12. Materiał $H-av$ oznacza materiał referencyjny o najwyższej zawartości av , $H-mv$ to materiał o najwyższej zawartości mv , a $H-bv$ to materiał o najwyższej zawartości bv .

Tabela 12. Skład materiałów wyjściowych mAb wybranych do badania separacji za pomocą połączenia CEX i AEX.

	$U_{Feed,i}$ % i -tego wariantu mAb		
	av	mv	bv
$H-av$*	48	36	16
$H-mv$	24	60	16
$H-bv$	24	36	40

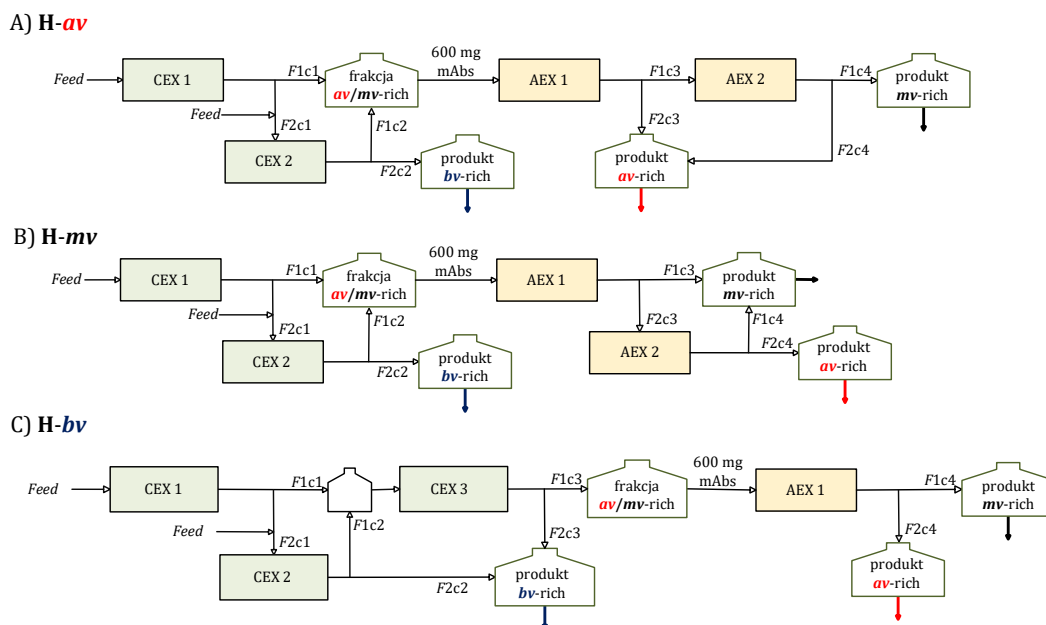
*materiał dostarczony przez firmę *Polpharma Biologics*

Dla każdego z materiałów przedstawionych w tabeli 12 przeprowadzono symulacje rozdzielania wariantów mAb dla różnych konfiguracji kolumn. Podczas obliczeń oraz badań eksperymentalnych przyjęto zasadę, w której każdy z wariantów ładunkowych mAb stanowił osobny produkt. Należało go wydzielić z możliwie najwyższą wydajnością oraz czystością. Jednocześnie niepożądane było otrzymanie odpadu (*Waste*), na którymkolwiek z etapów. Wykonując obliczenia przebadano materiały o różnym składzie początkowym. Kolejno sprawdzano następujące konfiguracje: AEX-AEX-CEX, CEX-AEX-AEX, CEX-CEX-AEX, CEX-CEX-AEX-AEX, CEX-CEX-AEX-AEX-AEX, kierując różne strumienie do kolejnej kolumny IEX (frakcje wzbogacone w określony wariant pozostawiano jako część gotowego produktu, zaś pozostałe kierowano do dalszego oczyszczenia). Konfiguracje AEX-CEX-AEX lub CEX-AEX-CEX odrzucono na wstępnym etapie badań, ze względu na

konieczność wielokrotnej wymiany buforów i doprowadzania białka do odpowiedniego pH, co powoduje znaczne wydłużenie czasu trwania procesu oraz duże straty mAb.

Zarówno dla modelu CEX, jak i AEX sprawdzano wydajność procesu przy wprowadzaniu objętości białka odpowiadającej strumieniowi frakcji zbieranej bezpośrednio z wylotu kolumny chromatograficznej. Otrzymano w ten sposób produkt o niższej selektywności oraz wydajności, przez co zdecydowano się zatężyć próbkę mAb wprowadzaną do kolumny AEX do objętości 10 ml. W przypadku CEX nie stwierdzono różnic w zależności selektywności rozdzielania od objętości próbki, dla której uzyskano najlepszą selektywność rozdzielania wariantów, co spowodowane jest całkowitym wiązaniem mAb na złożu chromatograficznym w trakcie ładowania. Jednak ładowanie próbek o dużych objętościach jest czasochłonne, dlatego i w tym przypadku zastosowano objętość ładowania 10 ml.

Rys. 25 przedstawia schemat dla połączeń CEX i AEX, które wybrano jako najbardziej efektywne pod względem czystości i wydajności produktu. Na rysunku przedstawiono najbardziej skrajne przypadki, dla każdego z wydzielanych wariantów. Konfiguracje przedstawione na rys. 25 analizowano w zakresie wprowadzanej masy mAb do każdej z kolumn CEX od 20 do 100 mg oraz dla każdej z kolumn AEX od 150 do 800 mg. W tych zakresach optymalna konfiguracja nie zależała od mas mAb wprowadzanych do kolumny IEX.



Rys. 25 Schemat blokowy rozdzielania wariantów mAb za pomocą połączenia CEX i AEX dla materiałów: A) H-av, B) H-mv, C) H-bv.

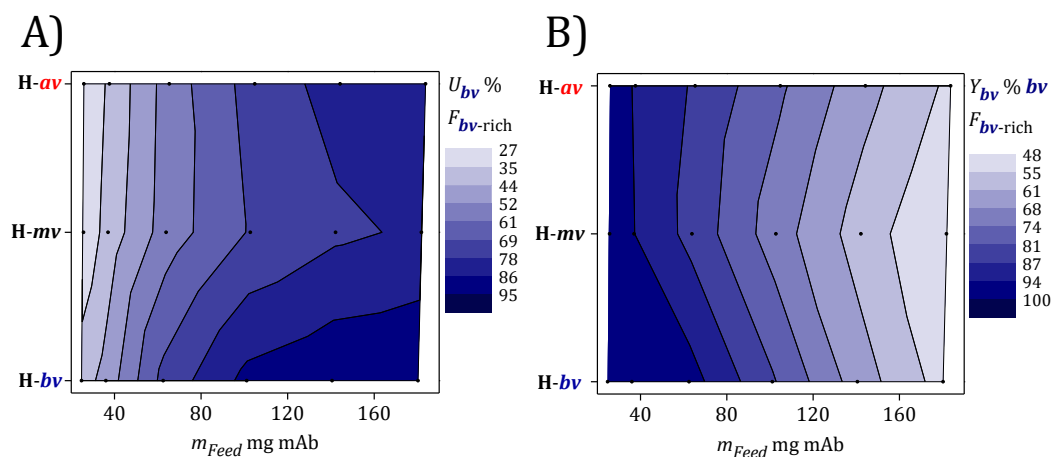
Wyniki obliczeń wykazały, że dla każdego z trzech materiałów w pierwszym etapie należy zastosować CEX, w którym izolowany jest produkt bogaty w *bv*. Dopiero po tym etapie można frakcje zubożone w *bv* kierować do sekcji AEX i wydelać produkty bogate w *mv* oraz

av. Materiały H-av oraz H-mv oczyszczano początkowo w dwóch kolumnach CEX, w celu izolacji bv we frakcjach mocniej związanych ze złożem chromatograficznym (F2). Kolejno, przy użyciu dwóch kolumn AEX izolowano produkt bogaty w av we frakcji związanej (F2) oraz bogaty w mv, we frakcji przepływowej (F1). Z materiału H-bv, w którym bv było w dużym nadmiarze, należało najpierw wyizolować bv w trzech kolumnach CEX. Następnie frakcję zubożoną w te warianty (av/mv-rich) kierowano do kolumny AEX.

3.6.8 Separacja wariantów w sekcji CEX

Symulacje rozdzielania wariantów w sekcji CEX przeprowadzono dla dwóch lub trzech kolumn, połączonych szeregowo, zgodnie z rys. 25. Materiał wyjściowy (Feed) wprowadzono do kolumny CEX 1 i rozdzielano na słabo związaną frakcję F1c1 oraz mocno związaną frakcję F2c1. Następnie do frakcji F2c1 dodawano świeży Feed, tak, aby uzyskać odpowiednie masowe obciążenie kolumny i wprowadzono na kolumnę CEX 2, której eluaty ponownie dzielono na dwie frakcje. Frakcja mocno związana, F2c2, była produktem bogatym w bv (produkt bv-rich). Frakcje F1c1 i F2c2, które zawierały głównie warianty av i mv były łączone w jedną frakcję nazywaną dalej av/mv-rich. Dla materiałów H-av oraz H-mv frakcja ta przekazywana była bezpośrednio do kolejnej sekcji AEX. W przypadku materiału H-bv frakcja ta wprowadzana była do kolumny CEX 3, aby uzyskać frakcję av/mv-rich oraz produkt bogaty w bv.

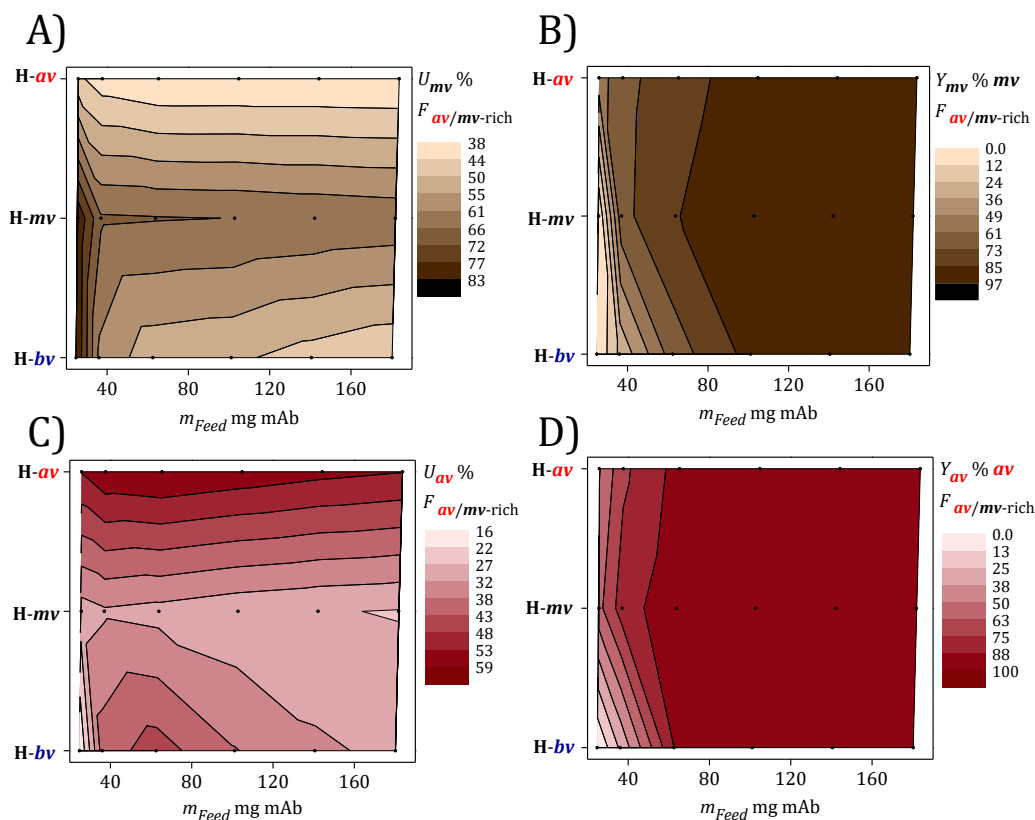
Wydajność produktu bv-rich (Y_{bv}) oraz efektywność wydzielania bv w sekcji CEX określano poprzez U_{bv} , który odpowiada czystości produktu zostały obliczone dla różnych obciążeń masowych mAb (m_{Feed}) całej sekcji CEX. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 26.



Rys. 26 Efektywność wydzielania bv w sekcji CEX. A) Udział bv we frakcji bv-rich, U_{bv} , B) wydajność bv we frakcji bv-rich, Y_{bv} . Oznaczenie m_{Feed} określa całkowitą masę mAb wprowadzoną do sekcji CEX.

Dla wszystkich materiałów wyjściowych zwiększenie masy mAb w strumieniu zasilającym (m_{Feed}) poprawiało czystość produktu do ok. 70% bv lub większej. Szczególnie dobrą wydajność uzyskano dla materiału H- bv : dla całkowitej m_{Feed} wynoszącej 80 mg, można uzyskać czystość U_{bv} ponad 85% przy $Y_{bv} \sim 80\% bv$. Z rys. 26 wynika, że poprzez właściwy dobór m_{Feed} możliwe jest osiągnięcie kompromisu pomiędzy wydajnością a czystością produktu bogatego w bv .

Efektywność izolacji frakcji av/mv -rich przedstawiono na rys. 27. Dla wszystkich zbadanych materiałów mv mogą być odzyskane z materiału wyjściowego ($Feed$) z wysoką wydajnością przy całkowitym obciążeniu masowym CEX $m_{Feed} > 80$ mg mAb (rys. 27.B), ale kosztem niskiej czystości (U_{mv} we frakcji av/mv -rich, rys. 27.A). Spowodowane jest to wysokim udziałem av (rys. 27.C). We frakcji av/mv -rich dla materiału H- mv możliwe jest odzyskanie mv z nieco wyższą efektywnością, np. przy całkowitym obciążeniu masowym CEX $m_{Feed} = 180$ mg mAb, uzyskano czystość mv $U_{mv} \sim 66\%$, przy wydajności $Y_{mv} \sim 85\%$. Warianty kwasowe można wydzielić z wysoką wydajnością, $Y_{av} > 80\% av$ (rys. 27.D), ale niską czystością, $U_{av} < 59\%$ (rys. 27.C). Z powodu niskiej efektywności rozdzielania mv i av w sekcji CEX konieczne było zastosowanie dodatkowo sekwencji kolumn w sekcji AEX, do której kierowano frakcję av/mv -rich.



Rys. 27 Charakterystyka frakcji av/mv -rich w sekcji CEX. A) U_{mv} , %, B) Y_{mv} , % mv , C) U_{av} , %, D) Y_{av} , % av .

Na podstawie symulacji matematycznych rozdzielania w sekcji CEX, wybrano skład frakcji *av/mv-rich* kierowanej do sekcji AEX. Przyjętym kryterium wyboru była mała zawartość *bv* we frakcji *av/mv-rich*, $U_{bv} < 5\%$, przy $Y_{av} > 95\%$ *av* i $Y_{mv} > 85\%$ *mv*. Wybrany skład frakcji *av/mv-rich*, otrzymany z sekcji CEX przedstawiono w tabeli 13.

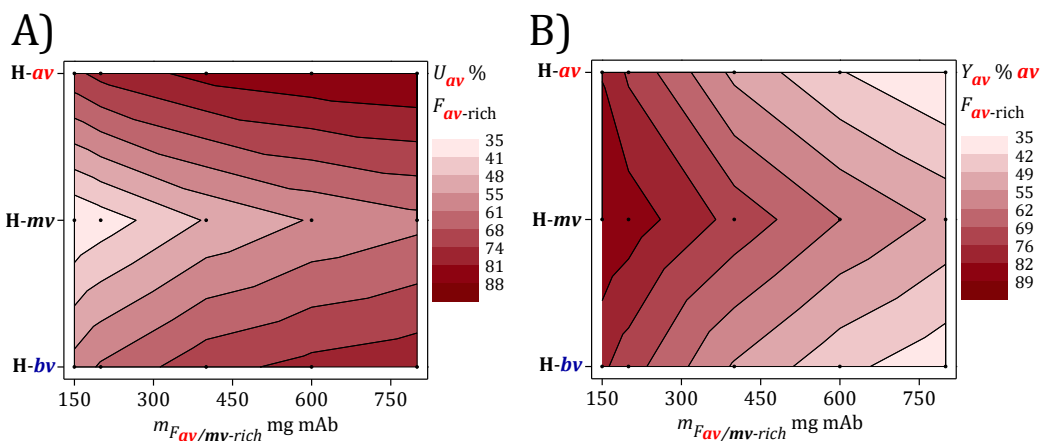
Tabela 13. Zawartość wariantów we frakcji *av/mv-rich*, uzyskanej w sekcji CEX i kierowanej do sekcji AEX. m_{Feed} oznacza masę mAb w mg wprowadzaną na objętość sekcji CEX.

	$U_{F,av/mv}$ %			m_{Feed} mg _{mAb} ml _{CEX} ⁻¹	CEX* ml _{col}
	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>		
H- <i>av</i>	57	39	4	26	14
H- <i>mv</i>	30	66	4	16	23
H- <i>bv</i>	45	52	3	10	42

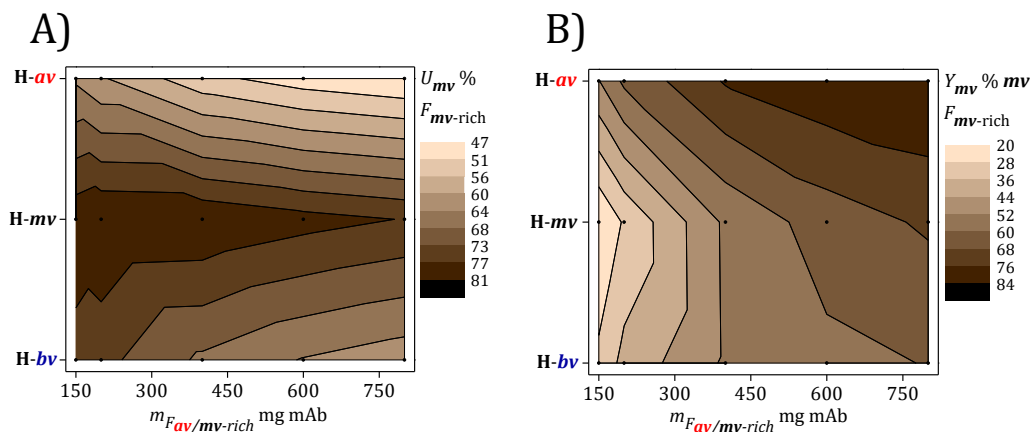
*objętość pojedynczej kolumny CEX w całej sekcji, w celu połączenia z sekcją AEX

3.6.9 Separacja wariantów w sekcji AEX

Efektywność rozdzielania frakcji *av/mv-rich* po pierwszej kolumnie AEX przedstawiono na rys. 28 dla produktu *av-rich* oraz rys. 29 dla produktu *mv-rich* (schemat na rys. 25).



Rys. 28 Efektywność izolacji *av* po pierwszej kolumnie AEX 1. A) U_{av} , %, B) Y_{av} , % *av*.



Rys. 29 Efektywność izolacji *mv* po pierwszej kolumnie AEX 1. A) U_{mv} , %, B) Y_{mv} , % *mv*.

Z wyników przedstawionych na rys. 28 można wyciągnąć wniosek, że dla materiałów H-*av* i H-*bv* możliwe jest uzyskanie produktu *av*-rich o wysokiej lub stosunkowo wysokiej czystości, $U_{av} > 70\%$. Najwyższą wydajność tego produktu można uzyskać wydzielając *av* z materiału H-*av*, podczas gdy najniższą wydajność uzyskuje się dla materiału H-*bv*. W tym przypadku duże przeładowanie kolumny AEX 1 masą wariantów *mv* spowodowało nakładanie się profili *av* i *mv*. Z tego też powodu frakcja *av*-rich (*F2c3*) wymagała dalszego doczyszczania na kolejnej kolumnie AEX (rys. 25).

Z rys. 29 wynika, że skuteczność wydzielania *mv* była najwyższa dla materiału H-*mv*. Otrzymano dla niego czystość $U_{mv} > 75\%$, przy wydajności $Y_{mv} > 60\%$ *mv*. Najgorszą skuteczność izolacji tych wariantów uzyskano dla materiału H-*av*. W tym przypadku profil *mv* był silnie zanieczyszczony przez *av*. Z tego też powodu frakcję *mv*-rich (*F1c3*) skierowano do oczyszczenia na kolejnej kolumnie AEX (rys. 25). Dla materiału H-*bv* wydajności frakcji *av*-rich jak i *bv*-rich były wystarczająco wysokie i oczyszczanie wariantów można było zakończyć po kolumnie AEX 1.

Dla każdego z badanych materiałów wyjściowych, izolacja *av* i *mv* w kolumnie AEX była prowadzona przy bardzo wysokim obciążeniu masą kolumny. Masa mAb wynosząca 600 mg na 1 ml kolumny została wybrana do ładowania pierwszej kolumny AEX. Dla całej sekcji AEX m_{Feed} wyniosła 300 lub 600 mg na 1 ml objętości całej sekcji, w zależności od składu materiału wyjściowego.

Wartości wydajności dla produktów uzyskanych po całym połączonym oczyszczaniu za pomocą sekcji CEX i AEX podsumowano w tabeli 14. Dla wszystkich materiałów wyjściowych uzyskane produkty zostały znacznie wzbogacone o określone warianty w porównaniu do ich udziałów w materiale wyjściowym. Jednocześnie wydzielanie to przeprowadzono bez utraty mAb.

Tabela 14. Udział wariantów w produktach uzyskanych dla każdego z badanych materiałów wyjściowych. $m_{av/mv}$ określa masę mAb, którą wprowadzono w przeliczeniu na objętość całej sekcji AEX.

	<i>av</i>-rich				<i>mv</i>-rich				<i>bv</i>-rich				$m_{av/mv}$ mg _{mAb} ml _{AEX} ⁻¹
	U_{av}	Y_{av}	U_{mv}	U_{bv}	U_{av}	U_{mv}	Y_{mv}	U_{bv}	U_{av}	U_{mv}	U_{bv}	Y_{bv}	
H- <i>av</i>	80	76	19	1	29	63	66	8	4	23	73	75	300
H- <i>mv</i>	75	46	25	0	19	76	78	5	4	40	56	85	300
H- <i>bv</i>	76	44	23	1	32	64	58	4	6	22	72	96	600

Wartości wydajności każdego z produktów można dostosować do wymogów konkretnego procesu poprzez zmianę obciążenia masowego dla sekcji CEX i AEX, przy pomocy wykresów przedstawionych na rys. 26 – 29. Dla każdego produktu możliwe jest

poprawienie jego czystości, kosztem otrzymanej wydajności lub odwrotnie. Wybór określonego wskaźnika (czystości lub wydajności), zależy będzie od specyficznych potrzeb procesu.

Wyniki symulacji, które zostały przedstawione w rozdziale **3.6.7** wskazują, że obciążenia masowe kolumn CEX i AEX białkiem znajdują się w różnych zakresach (tabela 13 i 14). Wydzielanie wariantów w AEX mogło być prowadzone przy znacznie wyższym obciążeniu masowym kolumny, tj. 300 lub 600 mg mAb na 1 ml kolumny. W przypadku CEX masa ta mieściła się w zakresie 10 – 26 mg mAb na 1 ml kolumny. Z tego też powodu połączenie CEX z AEX wymaga dostosowania objętości kolumn w sekcji CEX, tak aby uzyskać wystarczającą ilość materiału do dalszej separacji w sekcji AEX. Objętość każdej kolumny CEX niezbędna do uzyskania 600 mg mAb, do sekcji AEX, przedstawiona została w tabeli 13. Zaletą procesu jest możliwość zastosowania znacznie wyższego przeładowania masowego kolumn, w krótszym czasie, w porównaniu z metodami stosowanymi do tej pory.

4 Podsumowanie i wnioski

W ramach zrealizowanej pracy doktorskiej osiągnięto założone cele badawcze i udowodniono hipotezy badawcze. Określono optymalne warunki prowadzenia procesu chromatograficznego oczyszczania wariantów ładunkowych mAb. Zaprojektowano proces chromatografii jonowymiennej w połączonym procesie chromatografii i strącania, którego głównym celem była redukcja av z materiałów o różnej zawartości wariantów ładunkowych mAb. Sformułowano oraz zweryfikowano model dynamiki kolumny chromatograficznej i połączono go z modelem procesu strącania, który został sformułowany przez mgr inż. Tomasza Rumanka. Na podstawie otrzymanego modelu określono dwie optymalne konfiguracje połączenia obu procesów, których efektywność zależała od zawartości av w materiale wyjściowym mAb. Udowodniono tym samym, słuszność hipotezy 1, tj.: „Metoda polegająca na przeładowaniu jonowymiennych kolumn chromatograficznych masą mAb i jej frakcjonowaniu w skokowym gradiencie pH może zostać wykorzystana jako sposób szybkiego wydzielenia wariantów ładunkowych mAb”. Na podstawie otrzymanych wyników dotyczących połączonego procesu chromatografii AEX i strącania potwierdzono również słuszność hipotezy 2: „Połączenie procesów AEX i strącania w obecności PEG pozwala na znaczne zwiększenie wydajności procesu usuwania av w porównaniu z klasycznym sposobem rozdzielania wariantów w liniowym gradiencie soli lub pH”.

W kolejnej części pracy opracowano proces jonowymiennej chromatografii wielokolumnowej, która miała na celu wydzielenie wariantów ładunkowych mAb z materiałów wyjściowych o różnej ich zawartości. Przeprowadzono cykle doświadczalne, na podstawie których sformułowano modele dynamiki kolumn CEX oraz AEX. Oba modele zweryfikowano i przeprowadzono cykle obliczeń numerycznych. Na podstawie otrzymanych wyników określono optymalne konfiguracje połączenia chromatografii CEX i AEX, w celu otrzymywania produktów o jak najwyższej czystości oraz wydajności. Proces CEX wykorzystano do wydzielenia bv z materiału wyjściowego, natomiast za pomocą AEX rozdzielano mv i av . W opracowanych schematach procesowych nie występuje odpad, co dodatkowo zwiększa wydajność całkowitą każdego z otrzymanych produktów, czyli każdego z wariantów ładunkowych mAb. Otrzymane w tej części pracy wyniki udowodniły słuszność hipotezy 3 „Połączenie technik AEX i CEX pozwala na znaczne zwiększenie wydajności procesu rozdzielania av , bv i mv w porównaniu z klasycznym sposobem rozdzielania wariantów w liniowym gradiencie soli lub pH”.

Wszystkie procesy chromatograficzne prowadzono w warunkach wiążących, w przeładowaniu masowym kolumn chromatograficznych, wprowadzając do kolumny nawet do 600 mg białka na 1 ml złoża chromatograficznego, co przekracza wielokrotnie przeładowania w stosowanych do tej pory technikach. Związane ze złożem chromatograficznym białko wmywano gradientem skokowym pH, co skracало czas trwania procesu chromatograficznego. Wszystkie zaprojektowane metody oczyszczania wariantów są efektywne oraz szybkie w wykonaniu, w porównaniu z oczyszczaniem wariantów ładunkowych mAb metodami stosowanymi obecnie w przemyśle, tj. za pomocą trybu *bind-and-elute* i frakcjonowaniu wmywanego w gradiencie liniowym pH piku mAb.

Nowością w niniejszej pracy jest:

- połączenie procesu chromatografii z procesem strącania w celu redukcji zawartości *av* w materiale wyjściowym,
- wydzielenie każdego z wariantów ładunkowych mAb za pomocą wielokolumnowej chromatografii jonowymiennej w warunkach przeładowania masowego kolumny chromatograficznej dużych mas mAb, na poziomie 600 mg mAb na 1 ml złoża chromatograficznego,

co nie zostało do tej pory opisane w literaturze naukowej.

5 BIBLIOGRAFIA

- [1] Declerck P. J., Biologicals and biosimilars: a review of the science and its implications, *GaBI Journal*, **2012**; 1(1): 13-6
- [2] White J., Goldman J., Biosimilar and follow-on insulin: the ins, outs, and interchangeability, *J Pharm Technol*, **2019**, 35(1): 25-35
- [3] Krzymień J., Wójcicki J. M., Bogiel M., Karnafel W., Randomizowane badanie porównujące skuteczność i bezpieczeństwo leczenia insuliną Gensulin z insulinami ludzkimi znanego producenta u chorych na cukrzycę typu 1 poddanych intensywnej insulinoterapii podczas krótkotrwałej hospitalizacji, *Diabetologia Praktyczna*, **2003**, 4(4): 279-285
- [4] Nowicki M., Zimmer-Nowicka J., Biofarmaceutyki oryginalne i leki biopodobne – co należy o nich wiedzieć, aby zapewnić bezpieczeństwo leczenia?, *Onkologia w praktyce klinicznej*, **2017**, 3(3): 120-127
- [5] Kesik-Brodacka M., Progress in biopharmaceutical development, *Biotechnol Appl Biochem*, **2018**, 65(3): 306-322
- [6] Klein K., Gencoglu M., Helsterberg J., Acha V., Stolk P., The global landscape of manufacturers of follow-on biologics: an overview of five major biosimilar markets and 15 countries, *BioDrugs*, **2023**, 37: 235-245
- [7] Food and Drug Administration, purplebook-search-january-data-download [plik Microsoft Excel], **2024**, pobrane z: <https://purplebooksearch.fda.gov/downloads>, dostęp online dnia 27.04.2024 r.
- [8] Food and Drug Administration, purplebook-search-february-data-download [plik Microsoft Excel], **2024**, pobrane z: <https://purplebooksearch.fda.gov/downloads>, dostęp online dnia 27.04.2024 r.
- [9] Food and Drug Administration, purplebook-search-march-data-download [plik Microsoft Excel], **2024**, pobrane z: <https://purplebooksearch.fda.gov/downloads>, dostęp online dnia 27.04.2024 r.
- [10] Kucharz E. J., Stajszczyk M., Batko B., Brzosko M., Jeka S., Kotulska A., Majdan M., Samborski W., Świerkot J., Wiland P., Żuber Z., Biopodobne leki biologiczne w reumatologii, *Varia Medica*, **2018**, 2(1): 98-109

- [11] Hübel K., Kron F., Lux M. P., Biosimilars in oncology: Effects on economy and therapeutic innovations, *Eur J Cancer*, **2020**, 139: 10-19
- [12] Malakar S., Gontor E. N., Dugbaye M. Y., Shah K., Sinha S., Sutaoney P., Chauhan N. S., Cancer treatment with biosimilar drugs: a review, *Cancer Innov*, **2024**, 3(2): 115
- [13] Walsh G., Walsh E., Biopharmaceutical benchmarks 2022, *Nat Biotechnol*, **2022**, 40: 1722-1760
- [14] Song Y., Racette B. A., Camacho-Soto A., Nielsen S. S., Biologic targets of prescription medications and risk of neurodegenerative disease in United States Medicare beneficiaries, *PLoS ONE*, **2023**, 18(5)
- [15] Hmiel L. K., Brorson K. A., Boyne II M. T., Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity, *Anal Bioanal Chem*, **2015**, 407: 79-94
- [16] Harris L. J., McPherson A., Structure of immunoglobulin, kod w bazie pdb: 1IGY, 1998, pobrane z: <https://www.rcsb.org/structure/1IGY>, dostęp online dnia: 10.05.2024 r.
- [17] Jefferis R., Antibody posttranslational modifications, [w:] *Biosimilars of monoclonal antibodies: a practical guide to manufacturing, preclinical, and clinical development*, Ch. Liu, K. J. Morrow Jr, **2016**, 155-199
- [18] Beck A., Liu H., Macro- and micro-heterogeneity of natural and recombinant IgG antibodies, *Antibodies*, **2019**, 8(1), 18
- [19] Wang Z., Wang G., Lu H., Li H., Tang M., Tong A., Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases, *Mol Biomed*, **2022**, 3: 35
- [20] Carrara S. C., Ulitzka M., Grzeschik J., Kornmann H., Hock B., Kolmar H., From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies, *Int J Pharm*, **2021**, 594: 120164
- [21] Liu J. K. H., The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations, *Ann Med Surg*, **2014**, 3: 113-116
- [22] Zieliński M., Płucienniczak A., Przeciwciała monoklonalne – zastosowanie w medycynie, *biotechnologia*, **2009**, 2(85): 113-122

- [23] Lu R.-M., Hwang Y.-Ch., Liu I.-J., Lee C.-C., Tsai H.-Z., Li H.-J., Wu H.-Ch., Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases, *J Biomed Sci*, **2020**, 27:1
- [24] Hammers Ch. M., Stanley J. R., Antibody phage display: technique and applications, *J Invest Dermatol*, **2014**, 134(2): e17
- [25] Ledsgaard L., Ljungars A., Rimbault Ch., Sørensen Ch. V., Tulika T., Wade J., Wouters Y., McCafferty J., Laustsen A. H., Advances in antibody phage display technology, *Drug Discovery Today*, **2022**, 27(8)
- [26] Kunert R., Reinhart D., Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2016**, 100: 3451-3461
- [27] Walsh G., Biopharmaceutical benchmarks 2018, *Nat Biotechnol*, **2018**, 36(12): 1136-1147
- [28] Eldenberger L., Kogelmann B., Steinkellner H., Plant-based biopharmaceutical engineering, *Nat Rev Bioeng*, **2023**, 1: 426-439
- [29] Wang Y., Li X., Nielsen J., Petranovic D., Siewers V., Expression of antibody fragments in *Saccharomyces cerevisiae* strains evolved for enhanced protein secretion, *Microb Cell Fact*, **2021**, 20: 134
- [30] Shukla A. A., Wolfe L. S., Mostafa S. S., Norman C., Evolving trends in mAb production processes, *Bioeng Transl Med*, **2017**, 2: 58-69
- [31] Yang O., Qadan M., Ierapetritou M., Economic analysis of batch and continuous biopharmaceutical antibody production: a review, *J Pharm Innov*, **2020**, 15: 182-200
- [32] Matanguihan C., Wu P., Upstream continuous processing: recent advances in production of biopharmaceuticals and challenges in manufacturing, *Curr Opin Biotechnol*, **2022**, 78: 102828
- [33] Mahal H., Branton H., Farid S. S., End-to-end continuous bioprocessing: Impact on facility design, cost of goods, and cost of development for monoclonal antibodies, *Biotechnol Bioeng*, **2021**, 118: 3468-3485
- [34] Carvalho L. S., da Silva O. B., de Almeida G. C., de Oliveira J. D., Parachin N. S., Carmo T. S., Production processes for monoclonal antibodies, [w:] *Fermentation Processes*, Jozala A., **2017**, 181-198

- [35] Samaras J. J., Micheletti M., Ding W., Biopharmaceutical manufacturing through single-use technologies: current state, remaining challenges, and future development, *Ann Rev Chem Biomol Eng*, **2022**, 13: 73-97
- [36] Duarte A. C., Costa E. C., Filipe H. A. L., Saraiva S. M., Jacinto T., Miguel S. P., Ribeiro M. P., Coutinho P., Animal-derived products in science and current alternatives, *Biomater Adv*, **2023**, 151: 213428
- [37] Ledakowicz S., Rola inżynierii biochemicznej w rozwoju biotechnologii, *Inż Ap Chem*, **2015**, 54(3): 062-064
- [38] Tang S., Tao J., Li Y., Challenges and solutions for the downstream purification of therapeutic proteins, *Antibody Ther*, **2024**, 7(1): 1-12
- [39] Gupta A., Amara J. P., Gousseinov E., Cacace B., Recent advances in harvest clarification for antibodies and related products, [w:] *Approaches to the purification, analysis and characterization of antibody-based therapeutics*, Matte A., **2020**, 117-136
- [40] Chen S. W., Zhang W., Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies, *Antibody Ther*, **2021**, 4(2): 73-88
- [41] Chahar D. S., Ravindran S., Pisal S. S., Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale, *Biologicals*, **2020**, 63: 1-13
- [42] Pu S., Hadinoto K., Continuous crystallization as a downstream processing step of pharmaceutical proteins: A review, *Chem Eng Res Des*, **2020**, 160, 89-104
- [43] Nadar S., Shooter G., Somasundaram B., Shave E., Baker K., Lua L. H. L., Intensified downstream processing of monoclonal antibodies using membrane technology, *Biotechnol J*, **2021**, 16: 2000309
- [44] Liu H., Nowak Ch., Patel R., Modifications of recombinant monoclonal antibodies in vivo, *Biologicals*, **2019**, 59: 1-5
- [45] Beck A., Nowak Ch., Meshulam D., Reynolds K., Chen D., Pacardo D. B., Nicholls S. B., Carven G. J., Gu Z., Fang J., Wang D., Katiyar A., Xiang T., Liu H., Risk-based control strategies of recombinant monoclonal antibody charge variants, *Antibodies*, **2022**, 11(4): 73-26
- [46] Gupta T., Kumar A., Seshadri S., Bioprocess challenges in purification of therapeutic protein charge variants, *Biotechnol Bioprocess Eng*, **2023**, 28: 493-506

- [47] Chung S., Tian J., Chen J., Lee J., Borys M., Li Z. J., Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles, *Biotechnol Bioeng*, **2018**, 115: 1646-1665
- [48] Kang H.-N., Wadhwa M., Knezevic I., Ondari C., Simao M., WHO guidelines on biosimilars: Toward improved access to safe and effective products, *Ann NY Acad Sci*, **2023**, 1521: 96-103
- [49] World Health Organization, Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies as similar biotherapeutic products (SBPs). [w:] *WHO Expert Committee on Biological Standardization: Report of the Sixty-Seventh Meeting*, Geneva: World Health Organization, **2017**, 28–29
- [50] World Health Organization, WHO Questions and Answers: Similar biotherapeutic products. [w:] *WHO Expert Committee on Biological Standardization: Report of the Sixty-Ninth Meeting*, Geneva: World Health Organization, **2019**, 33-34
- [51] World Health Organization, WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixtieth report, *WHO Technical Report Series no. 977*, **2013**
- [52] European Medicines Agency, Statement on the scientific rationale supporting interchangeability of biosimilar medicines in the EU, *European Medicines Agency*, **2022**, plik pdf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/statement-scientific-rationale-supporting-interchangeabilitybiosimilar-medicines-eu_en.pdf
- [53] European Medicines Agency, Reflection paper on criteria to be considered for the evaluation of new active substance (NAS) status of biological substances, *European Medicines Agency, Committee for Advanced Therapies (CAT), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*, **2022**, plik pdf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-criteria-be-considered-evaluation-new-active-substance-nas-status-biological-substances_en.pdf
- [54] European Medicines Agency, Concept paper for the development of a Reflection Paper on a tailored clinical approach in Biosimilar development, *European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*, **2024**, plik pdf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/concept-paper-development-reflection-paper-tailored-clinical-approach-biosimilar-development_en.pdf

- [55] Food and Drug Administration, Guidance document Q8(R2) Pharmaceutical Development, **2009**, pobrane z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q8r2-pharmaceutical-development>, dostęp dnia: 12.05.2024
- [56] European Medicines Agency, ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development, *European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products*, **2009**, plik pdf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-considerations-ich-guideline-q8-r2-pharmaceutical-development-step-5_en.pdf
- [57] Singh S. K., Narula G., Rathore A. S., Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes?, *Electrophoresis*, **2016**, 37(17-18): 2338-2346
- [58] World Health Organization, Guidelines on evaluation of biosimilars. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 977, [w:] *WHO Expert Committee on Biological Standardization: Seventy-Fifth Report*, Geneva: World Health Organization, **2022**
- [59] Miao S., Xie P., Zou M., Fan L., Liu X., Zhou Y., Zhao L., Ding D., Wang H., Tan W.-S., Identification of multiple sources of the acidic charge variants in an IgG1 monoclonal antibody, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2017**, 101: 5627-5638
- [60] Sissolak B., Lingg N., Sommeregger W., Striedner G., Vorauer-Uhl K., Impact of mammalian cell culture conditions on monoclonal antibody charge heterogeneity: an accessory monitoring tool for process development, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2019**, 46: 1167-1178
- [61] Yüce M., Sert F., Torbfam 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*, **2021**, 1152: 238189
- [62] 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*, **2016**, 8(8): 1548-1560
- [63] Goyon A., Francois Y. N., Colas O., Beck A., Veuthey J. L., Guillarme D., High-resolution separation of monoclonal antibodies mixtures and their charge variants by an alternative and generic CZE method, *Electrophoresis*, **2018**, 39: 2083-2090

- [64] Nadar S., Somasundaram B., Charry M., Billakanti J., Shave E., Baker K., Lua L. H., Design and optimization of membrane chromatography for monoclonal antibody charge variant separation, *Biotechnol Prog*, **2022**, 38: e3288
- [65] Divase A., Pisal S., Dake M. S., Dakshinamurthy P. K., Reddy P. S., Dhere R., Kamat Ch., Chahar D. S., Pal J., Nawani N., Isolation and characterization of rabies monoclonal antibody charge variants, *Electrophoresis*, **2024**, 1-17
- [66] Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools, *Biotechnol Bioeng*, **2023**, 120: 114-124
- [67] Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., Countercurrent preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools, *Chem Eng Res Des*, **2024**, 202: 336-345
- [68] Zimoch P., Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool, *J Chromatogr A*, **2023**, 1701: 464070
- [69] Antos D., Kaczmarek K., Piątkowski W., Chromatografia preparatywna jako proces rozdzielania mieszanin, *Wyd. WNT*, **2013**
- [70] Gebauer K., Tschöp J., Chromatography columns, [w:] *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., *Elsevier*, **2018**, 493-511
- [71] Rushikesh B., Mayur B., Sandip C., Piyush B., Jayesh G., Vijayraj S., Ganesh S., A brief review on different chromatographic techniques, *J Pharm Res*, **2024**, 8(1): 000294
- [72] Carta G., Jungbauer A., Protein Chromatography. Process development and scale-up, *Wiley-VCH*, **2010**
- [73] Łacki K. M., Introduction to preparative protein chromatography, [w:] *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., *Elsevier*, **2018**, 319-366
- [74] Gupta M. K., Ghuge A., Parab M., Al-Refei Y., Khandare A., Dand N., Waghmare N., A comparative review on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) & High-Performance Thin Layer

- Chromatography (HPTLC) with current updates, *Curr Issues Pharm Med Sci*, **2022**, 35(4): 224-228
- [75] Rodriguez E. L., Poddar S., Iftexhar 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*, **2020**, 1157: 122332
- [76] Danielsson Å., Affinity chromatography, [w:] *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., *Elsevier*, **2018**, 367-378
- [77] Du M., Hou Z., Liu L., Xuan Y., Chen X., Fan L., Li Z., Xu B., Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology, *Front Bioeng Biotechnol*, **2022**, 10
- [78] Eriksson K. O., Hydrophobic interaction chromatography, [w:] *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., *Elsevier*, **2018**, 401-408
- [79] Eriksson K. O., Belew M., Hydrophobic interaction chromatography, [w:] *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications, Third edition*, Janson J.-Ch., *Wiley & Sons, Inc.*, **2011**, rozdz. 6
- [80] Muca R., Kołodziej M., Piątkowski W., Carta G., Antos D., Effects of negative and positive cooperative adsorption of proteins on hydrophobic interaction chromatography media, *J Chromatogr A*, **2020**, 1625: 461309
- [81] Hall M., Size Exclusion Chromatography (SEC), [w:] *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., *Elsevier*, **2018**, 421-432
- [82] Grönberg A., Ion exchange chromatography, [w:] *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., *Elsevier*, **2018**, 379-399
- [83] Gilardoni E., Regazzoni L., Liquid phase separation techniques for the characterization of monoclonal antibodies and bioconjugates, *J Chromatogr Open*, **2022**, 2: 100034
- [84] Lee H. J., Lee Ch. M., Kim K., Yoo J. M., Kang S.-m., Ha G.-s., Park M. K., Choi M.-A., Lee D. E., Seong B. L., Purification of antibody fragments for the reduction of charge variants using cation exchange chromatography, *J Chromatogr B*, **2018**, 1080: 20-26

- [85] 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, *Sep Purif Technol*, **2020**, 235: 116136
- [86] 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*, **2021**, 1658: 462607
- [87] 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*, **2019**, 1586: 40-51
- [88] 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*, **2008**, 100(6): 1166-1177
- [89] Vogg S., Ulmer N., Souquet J., Broly H., Morbidelli M., Experimental evaluation of the impact of intrinsic process parameters on the performance of a continuous chromatographic polishing unit (MCSGP), *Biotechnol J*, **2019**, 14: 1800732
- [90] Jing S.-Y., Shi C., Leong H. Y., Yuan J.-J., Gao D., Wang H.-B., Yao S.-J., Lin D.-Q., A novel twin-column continuous chromatography approach for separation and enrichment of monoclonal antibody charge variants, *Eng Life Sci*, **2021**, 21: 382-391
- [91] Khalaf R., Heymann J., LeSaout X., Monard F., Costioli M., Morbidelli M., Model-based high-throughput design of ion exchange protein chromatography, *J Chromatogr A*, **2016**, 1459: 67-77
- [92] Antos D., Piątkowski W., Equilibria and kinetics of ion-exchange of biopolymers. Handbooks of Separation Science: Ion-Exchange Chromatography and Related Techniques, [w:] *Ion-exchange chromatography and related techniques*, Nesterenko P., Poole C., Sun Y., Elsevier, **2024**, 25-49
- [93] Kumar V., Leweke S., Heymann W., von Lieres E., Schlegel F., Westerberg K., Lenhoff A. M., Robust mechanistic modeling of protein ion-exchange chromatography, *J Chromatogr A*, **2021**, 1660: 462669
- [94] Briskot T., Hahn T., Huuk T., Hubbuch J., Protein adsorption on ion exchange adsorbers: A comparison of a stoichiometric and non-stoichiometric modeling approach, *J Chromatogr A*, **2021**, 1653: 462397

- [95] Briskot T., Hahn T., Huuk T., Wang G., Kluters S., Studts J., Wittkopp F., Winderl J., Schwan P., Hagemann I., Kaiser K., Trapp A., Stamm S. M., Koehn J., Malmquist G., Hubbuch J., Analysis of complex protein elution behavior in preparative ion exchange processes using a colloidal particle adsorption model, *J Chromatogr A*, **2021**, 1654: 462439
- [96] Xu X., Lenhoff A. M., Binary adsorption of globular proteins on ion-exchange media, *J Chromatogr A*, **2009**, 1216: 6177-6195
- [97] Fekete Sz., 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*, **2015**, 102: 33-44
- [98] Fekete Sz., 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*, **2015**, 102: 282-289
- [99] Poplewska I., Zimoch P., Antos D., Dissociation events during processing of monoclonal antibodies on strong cation exchange resins, *J Chromatogr A*, **2022**, 1670: 462969
- [100] Zimoch-Rumanek P., Antos D., Coupling cation and anion exchange chromatography for fast separation of monoclonal antibody charge variants, *J Chromatogr A*, **2024**, 1733: 465256
- [101] Antos D., Piątkowski W., Kołodziej M., Rumanek T., Zimoch P., Rozdzielanie wariantów przeciwciał monoklonalnych w hybrydowym procesie strącania i chromatografii, patent polski, PL441857, zarejestrowany 27.07.2023 – w trakcie rozpatrywania

6 Spis skrótów

Skróty i oznaczenia użyte w niniejszej pracy:

a – promień cząsteczki białka

AC ang. *Affinity Chromatography* – chromatografia powinowactwa

AEX ang. *Anion Exchange Chromatography* – chromatografia anionowymienna

Asn – asparagine

Asp – kwas asparaginowy

av ang. *acidic variants* – warianty kwasowe mAb

av/mv-rich – frakcja zawierająca przewagę wariantów kwasowych lub wariantów głównych mAb, kierowana do dalszego oczyszczenia w sekcji AEX

av-rich – frakcja/produkt bogaty w warianty kwasowe mAb

B_{ij} – parametr opisujący interakcję pomiędzy białkiem i oraz białkiem j

bv ang. *basic variants* – warianty zasadowe mAb

bv-rich – frakcja/produkt bogaty w warianty zasadowe mAb

$C_{0,ov}$ – stężenie początkowe białka w roztworze całej puli wariantów mAb, i – odnosi się do indywidualnych wariantów ładunkowych mAb ($i = av, mv, bv$)

$C_{0,i}$ – stężenie początkowe indywidualnych wariantów ładunkowych mAb ($i = av, mv, bv$)

C_i – indywidualne równowagowe stężenia wariantów ładunkowych mAb w supernatancie ($i = av, mv, bv$)

$C_{inj,i}$ – stężenie i -tego składnika w strumieniu zasilającym (próbce) wprowadzanej na kolumnę chromatograficzną

C_{ov} – całkowite równowagowe stężenie mAb w supernatancie (fazie ruchomej)

C_s – stężenie soli

CEX ang. *Cation Exchange Chromatography* – chromatografia kationowymienna

CDR ang. *Complementarity-Determining Region* – rejon determinujący dopasowanie antygeny; rejon hiperzmienny przeciwciała

CL ang. *Constant Domain of Light Chain* – stała domena łańcucha lekkiego przeciwciała

CH ang. *Constant Domain of Heavy Chain* – stała domena łańcucha ciężkiego przeciwciała

CHO ang. *Chinese Hamster Ovary* – komórki jajnika chomika chińskiego

CPA ang. *Colloidal Particle Adsorption* – model izotermi adsorpcji cząsteczek koloidalnych

CQA ang. *Critical Quality Attributes* – krytyczne atrybuty jakości leku

Cys – cysteina

DBC ang. *Dynamic Binding Capacity* – dynamiczna pojemność złoża

$D_{L,a}$ – efektywny współczynnik dyspersji

d_p – średnica ziaren złoża chromatograficznego

DSP ang. *Downstream Process* – procesy obejmujące oczyszczanie produktów biotechnologicznych

e – ładunek elementarny

E – efektywność procesu

Eksp. – dane eksperymentalne

EMA ang. *European Medicines Agency* – Europejska Agencja Leków

F – frakcja

Fab ang. *antigen-binding fragment* – fragment wiążący antygen

Fc ang. *crystallizable fragment* – fragment krystalizowalny, fragment o funkcji efektorowej

FDA ang. *U.S. Food and Drug Administration* – Amerykańska Agencja Leków i Żywności

Feed – materiał wyjściowy mAb

Gln – glutamina

GMP ang. *Good Manufacturing Practice* – Dobra Praktyka Wytwarzania

GR ang. *General Rate Model* – model ogólny dynamiki kolumny

H-av – materiał biologiczny o wysokiej zawartości wariantów kwasowych

H-bv – materiał biologiczny o wysokiej zawartości wariantów zasadowych

H-mv – materiał biologiczny o wysokiej zawartości wariantów głównych

HCP ang. *Host Cell Proteins* – białka komórek gospodarza

HIC ang. *Hydrophobic Interaction Chromatography* – chromatografia oddziaływań hydrofobowych

HIS – 20 mM bufor L-histydyny, pH 5.5

HPLC ang. *High-Performance Liquid Chromatography* – wysokosprawna chromatografia cieczowa

I – siła jonowa roztworu

ICH ang. *International Conference on Harmonization* – Międzynarodowa Rada ds. Harmonizacji

I.D. – średnica wewnętrzna kolumny chromatograficznej

IEX ang. *Ion Exchange Chromatography* – chromatografia jonowymienna

IgG – Immunoglobulina G, przeciwciała klasy G

IM ang. *Inverse Fit Method* – metoda dopasowania do piku pomiaru izotermi

k_b – stała Boltzmanna

$K_{e,i}$ – indywidualna stała równowagi adsorpcji, gdzie $i = av, mv, bv$

$k_{mC,i}$ – zastępczy współczynnik szybkości procesu przenikania masy, odpowiadający sile napędowej w fazie ruchomej (eluencie)

$k_{mq,i}$ – zastępczy współczynnik szybkości procesu przenikania masy, odpowiadający sile napędowej w fazie stacjonarnej (złożu chromatograficznym)

L – długość kolumny chromatograficznej

Lys – lizyna

m_a – masa złoża chromatograficznego

$m_{IgG1} = m_{mAb}$ – masa białka

m_{Feed} – masa białka wyjściowego wprowadzana do kolumny chromatograficznej

mAb(s) ang. *monoclonal antibody(ies)* – przeciwciało(a) monoklonalne

MCE – mieszane estry celulozy

Met – metionina

mv ang. *main variants* – warianty główne

mv -rich – frakcja/produkt bogaty w warianty główne mAb

MWCO ang. *Molecular Weight Cut-Off* – punkt odcięcia masy cząsteczkowej membrany filtracyjnej

N_A – liczba Avogadro

P – osad otrzymany w procesie strącania

PEG ang. *Polyethylene Glycol* – glikol polietylenowy

PES – poliaryloeterosulfon

pI – punkt izoelektryczny; pI_i – indywidualny punkt izoelektryczny, gdzie $i = av, mv, bv$

POROS XS – złoże chromatograficzne POROS™ XS

POROS XQ – złoże chromatograficzne POROS™ XQ

PREC – proces strącania białka

Pro – produkt

PVDF – polifluorek winylidenu

q_i^* – indywidualne stężenie równowagowe dla poszczególnych wariantów ($i = av, mv, bv$)

q_{ov}^* – całkowite stężenie równowagowe puli wariantów mAb

q_i^∞ – indywidualna pojemność wiązania złoża chromatograficznego, gdzie $i = av, mv, bv$

q^m – pojemność chłonna złoża

Q – objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej

QbD ang. *Quality by Design*

R – odległość pomiędzy cząsteczkami

rpm – ang. *round per minute* – liczba obrotów rotora wirówki w 1 minucie wirowania

S – supernatant otrzymany w procesie strącania

SEC ang. *Size-Exclusion Chromatography* – chromatografia wykluczania

SMA ang. *Steric Mass Action* – model izotermy SMA

Sym. – dane otrzymane w symulacji

t – czas

T – temperatura

t_{inj} – czas wprowadzania strumienia zasilającego (próbki) na kolumnę chromatograficzną

TD ang. *Transport-Dispersive Model* – model kinetyczno-dystrybucyjny dynamiki kolumny

t_r – czas retencji

TRIS – 2-amino-2-hydroksymetylo-propan-1,3-diol

TP GigaCap – złożo chromatograficzne TOYOPEARL GigaCap S-650M

TP Sulfate – złożo chromatograficzne TOYOPEARL Sulfate-650F

u – prędkość powierzchniowa

U_i – udział określonego składnika w danej frakcji, gdzie $i = av, mv, bv$

UPLC ang. *Ultra-Performance Liquid Chromatography* – ultraszybka chromatografia ciekłowa

USP ang. *Upstream Process* – procesy obejmujące wytwarzanie produktów biotechnologicznych

V – objętość roztworu

V_a – objętość złoża chromatograficznego

V_{col} – objętość kolumny w ml złoża chromatograficznego

VL ang. *Variable Domain of Light Chain* – zmienna domena łańcucha lekkiego przeciwciała

VH ang. *Variable Domain of Heavy Chain* – zmienna domena łańcucha ciężkiego przeciwciała

WHO ang. *World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

x – współrzędna osiowa

Y – wydajność

z_i – ładunek białka

 ϵ_0 – przenikalność elektryczna próżni

ε – względna przenikalność elektryczna

ε_t – porowatość złoża chromatograficznego

$\varepsilon_{t,p}$ – specyficzna porowatość złoża chromatograficznego, wyznaczona dla mAb

κ – odwrócona długość Debey'a (odwrócony promień Debey'a); określa zasięg interakcji białko-białko, opisywanych parametrem B_{ij}

λ – długość fali światła

$\sigma_{i,j}$ – współczynnik ekranowania ładunku

σ_{app} – pozorny współczynnik ekranowania ładunku

φ – współczynnik faz

7 Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

- 1) 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*, **2021**, 1658: 462607, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462607>
- 2) Poplewska I., **Zimoch P.**, Antos D., Dissociation events during processing of monoclonal antibodies on strong cation exchange resins, *J Chromatogr A*, **2022**, 1670: 462969, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462969>
- 3) **Zimoch P.**, Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool, *J Chromatogr A*, **2023**, 1701: 464070, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464070>
- 4) **Zimoch-Rumanek P.**, Antos D., Coupling cation and anion exchange chromatography for fast separation of monoclonal antibody charge variants, *J Chromatogr A*, **2024**, 1733: 465256, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465256>

Patenty

Antos D., Piątkowski W., Kołodziej M., Rumanek T., **Zimoch P.**, Rozdzielanie wariantów przeciwciał monoklonalnych w hybrydowym procesie strącania i chromatografii, patent polski, PL441857, zarejestrowany 27.07.2023 – w trakcie rozpatrywania

Wystąpienia konferencyjne

- 1) **Zimoch P.**, Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., Coupling Preferential Precipitation and IEX for Reducing Acidic Variant Content in Monoclonal Antibody Pools, PREP 2022 (35th), Baltimore USA, wystąpienie **L-305**, <http://www.prepsymposium.org/>
- 2) Poplewska I., **Zimoch P.**, Antos D., pH Excursion during Processing of Monoclonal Antibodies on Strong Cation Exchange Resins, 35th International Symposium on Preparative and Process Chromatography, PREP 2022 (35th), Baltimore USA, poster **P-M-104**, <http://www.prepsymposium.org/>

- 3) **Zimoch P.**, Chromatograficzne rozdzielanie wariantów przeciwciała monoklonalnego poprzez przeładowanie masowe kolumn jonowymiennych, Dokonania Naukowe Doktorantów – edycja X – 2022 – Wielka Sesja Posterowa, online, poster, <https://www.doktorant.com.pl/index.php/2022-dnd-10>
- 4) **Zimoch P.**, Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., Coupling preferential precipitation and IEX for reducing acidic variant content in monoclonal antibody pools, SPICA 2022 (18th), Lisbon, Portugal, wystąpienie **OC04 | P45**, <http://www.spica2022.org/>
- 5) Rumanek T., **Zimoch P.**, Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants by PEG-aided Precipitation and IEX Chromatography, OKIChiP (24th), Szczecin 2023, poster **PS/108**, <https://okichip24.zut.edu.pl>
- 6) **Zimoch P.**, Rumanek T., Kołodziej M., Piątkowski W., Antos D., PEG-aided precipitation for adjusting acidic variant content in monoclonal antibody pools, ISPPP 2023 (42nd), Wiedeń, wystąpienie **OP17 (L)**, <https://www.isppp.net/programme/>

8 Udział w badaniach naukowych

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



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, multicolour chromatography was exploited based on countercurrent solvent gradient [43], multicolour recycling method [44], or multicolour self-displacement [45], which allowed the enrichment of the desired variants to a high yield. However, the realization of multicolour 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 mg mL⁻¹_{matrix} (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 m² 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, $\sigma_{app,ij \neq i} = \frac{\sigma_{ij}}{\sigma_i}$, 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 (Cytyvia, 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 (Cytyvia) 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 Bio-science), 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
3	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)
5*	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
7	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.

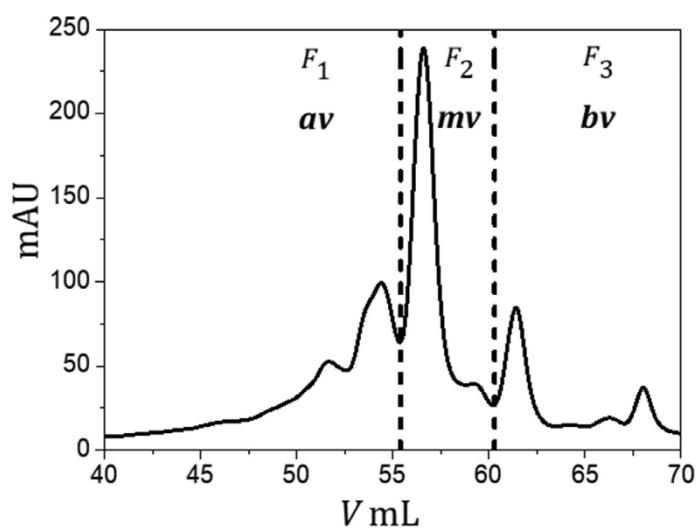


Fig. 1. Typical band profiles in CEX HPLC. F_1 , F_2 , F_3 are the fractions assigned to the variants: *av*, *mv*, *bv*.

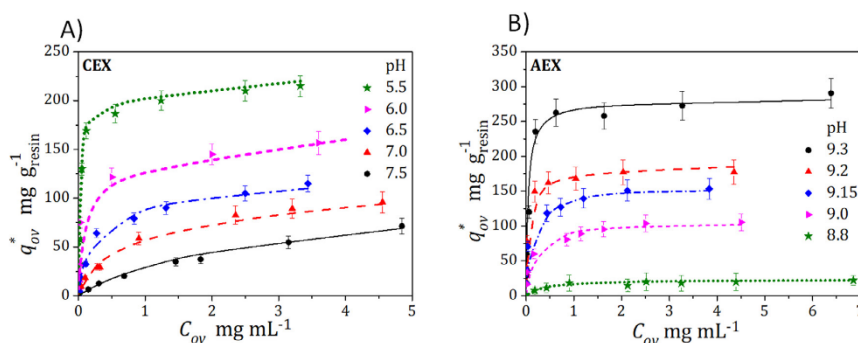


Fig. 2. Overall isotherm courses of mAb2 for the M-av stock at different pH of the solutions. A) CEX column, B) AEX column. Symbols - experimental data, lines - simulations.

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

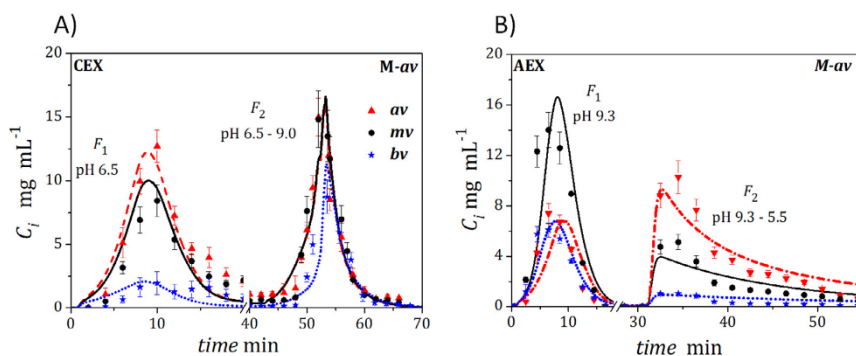


Fig. 3. Individual band profiles of the mAb2 variants for the M-av stock recorded at the mobile phase flowrate $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{inj} = 5 \text{ mL}$ (Table 4). A) CEX, run 1 ($C_{inj} = 44 \text{ mg mL}^{-1}$), F_1 - fraction enriched with av, F_2 - fraction depleted with av, B) AEX, 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).

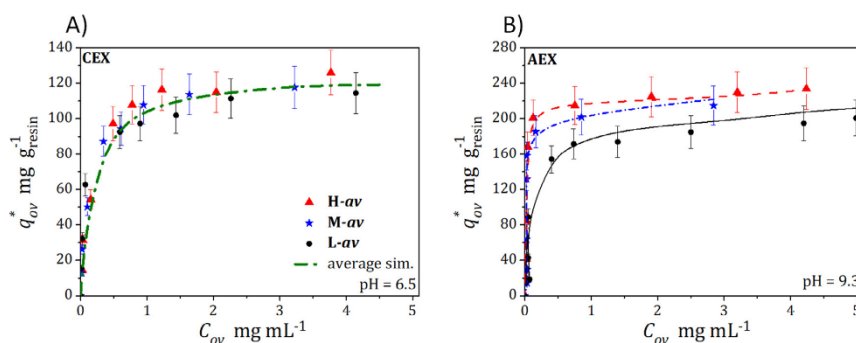


Fig. 4. Overall isotherms of mAb2 for three stock materials: H-av, M-av, L-av. A) CEX and B) AEX.

Table 5

Model parameters determined under binding conditions (pH 6.5 in CEX, pH 9.3 in AEX), q^∞ in $\text{mg g}_{\text{resin}}^{-1}$ in the isotherm measurements (batch), q^∞ in $\text{mg mL}_{\text{column}}^{-1}$ 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 pI 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

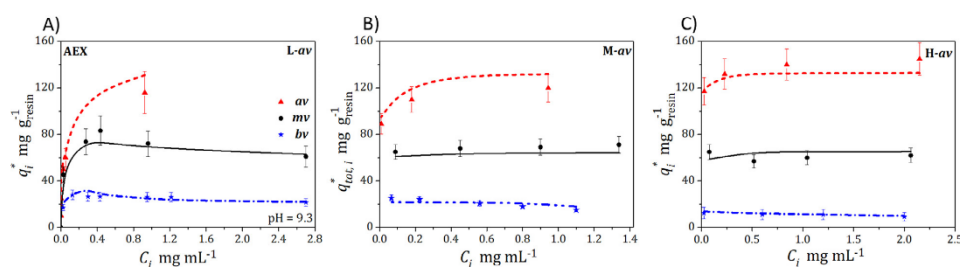


Fig. 5. Individual isotherms of the mAb2 variants: $q_{i,loc,i}^{\infty} = f(C_i)$ ($i = av, mv, bv$) on the AEX resin at pH 9.3 for different stock materials: A) L-av, B) M-av, C) H-av. Symbols - experimental data, lines - simulations.

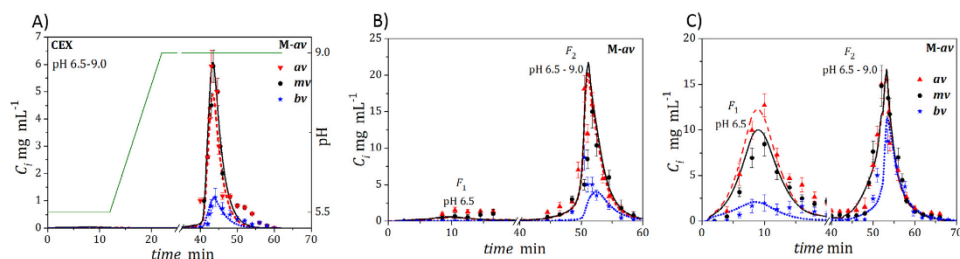


Fig. 6. Individual band profiles of the mAb2 variants eluted from the CEX column under different loading conditions, the mobile phase flowrate $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{inj} = 5 \text{ mL}$ (Table 4). A) run 4 (M-av stock, $C_{mj} = 5 \text{ mg mL}^{-1}$), B) run 3 (M-av stock, $C_{mj} = 18.3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

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, $k_{d,i}$, 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 experiential 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

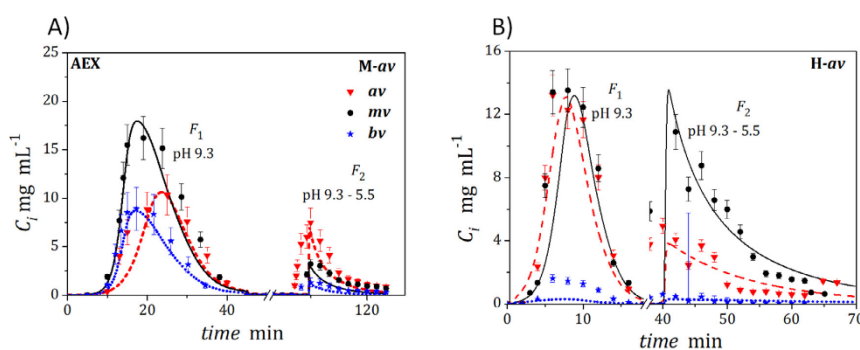


Fig. 7. Individual band profiles of the variants eluted from the AEX column under different flowrates, $C_{inj} = 40 \text{ mg mL}^{-1}$, $V_{inj} = 5 \text{ mL}$ (runs in Table 4). A) run 6 (M-av stock, $Q = 0.2 \text{ mL min}^{-1}$), B) run 7 (H-av stock, $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$).

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
	Simulation	52	40	8.0	41	74	25	1.0	45
F_2	Experiment	36	40	23	42	48	46	5.0	49
	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
	Simulation	24	56	20	56	49	47	4.0	50
F_2	Experiment	62	30	8.0	36	70	27	3.0	49
	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.CL18.00, 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

Krzysztof Baran: Investigation, Methodology, Conceptualization, Writing – review & editing. **Patrycja Zimoch:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Artur Stańczak:** Methodology, Writing – review & editing. **Wojciech Piątkowski:** 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-Gianférami, 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-Bulsecu, 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. Guilleme, 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. Guilleme, 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 variants, *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] G. 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. Farnan, 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. Patapoff, 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. Ramasubramanyan, 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. Barnhouse, 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 glycosylated 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. Kolodziej, 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.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

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

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

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

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



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2023

Revised 4 May 2023

Accepted 13 May 2023

Available online 14 May 2023

Keywords:

Ion exchange chromatography

Mathematical modeling

Monoclonal antibody

Precipitation

Variant separation

ABSTRACT

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

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

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

* Corresponding author.

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

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

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

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

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

2. Theory

2.1. Design of chromatographic process

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

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

where C_i is the concentration of i th variant in the mobile phase in mmol mL⁻¹, q_i is the total adsorbed phase concentration of i th variant expressed in mmol per mL of the solid matrix (mmol mL⁻¹ matrix) u is the superficial velocity in m s⁻¹, t is time in s, x is the axial coordinate in m, $D_{L,a}$ is the effective axial dispersion coefficient in m² s⁻¹, $\varepsilon_{t,p}$ is the bed porosity accessible by the protein molecules, which was set the same for all variants, ε_t is the total bed porosity.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

and at the outlet of the L -length column:

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

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

2.2. Design of precipitation process

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Experimental

3.1. Instruments

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

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

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

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

3.2. Materials

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

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

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

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

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

3.3. Procedures

3.3.1. Preparation of mAb2 samples

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

3.3.2. Measurements of the individual isotherms

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

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

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

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

3.3.3. Column packing

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

Table 1
Properties of the resins.

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

* from [37].

** from [38].

3.3.4. Measurements of packed bed porosity

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

3.3.5. Anion exchange chromatography

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

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

3.3.6. CEX-HPLC analysis

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

3.3.7. Precipitation of mAb

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

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

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

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

3.3.8. PEG removal from post-precipitation solutions

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

3.3.9. Coupling the precipitation process and AEX

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

3.3.10. Determination of the aggregate content

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

4. Results and discussion

4.1. Design of the precipitation process

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

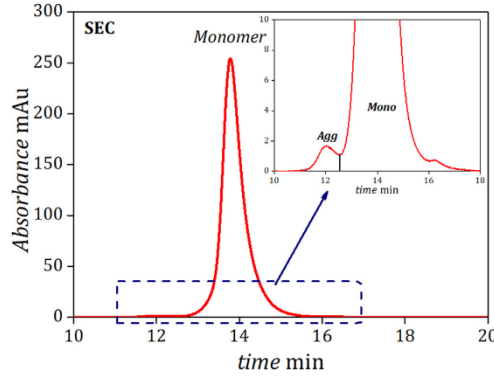


Fig. 1. SEC-HPLC analysis of the mAb2 material: Agg - aggregates, Mono - monomers of mAb2.

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2. Effect of PEG on the adsorption of the variants

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

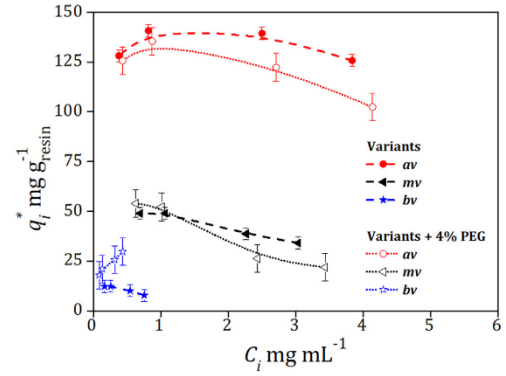


Fig. 2. Individual isotherms of the mAb2 variants on the AEX resin at pH 9.3 in a post-precipitation solution (H- av): 56% av , 35% mv , 9% bv) without PEG (solid symbols) and with 4% w/v PEG (open symbols) in the binding buffer. Lines guide to the eye.

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

4.3. Design of the AEX process

4.3.1. Formulation and verification of the dynamic model

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

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

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

The molecular iterations are assumed to be symmetrical, i.e., $B_{ij} = B_{ji}$.

As the first trial of the parameter estimation did not provide good fit to the experimental data, the number of the parameters was increased by one, including each of the individual parameters: $B_{av,mv}$, $B_{av,bv}$, $B_{mv,bv}$. The estimation results revealed that the binary coefficient determining the av - mv interactions, $B_{av,mv}$, markedly departed from the value provided by Eq. (19), therefore it had to be independently estimated. This may stem from complex behavior of

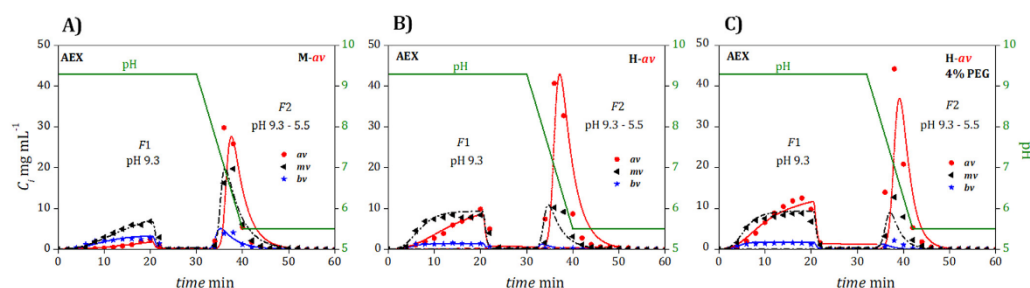


Fig. 3. Individual band profiles of the mAb2 variants eluted from the AEX column for: A) mAb2 material (M-av), $C_{inj} = 19.3 \text{ mg mL}^{-1}$, B) post-precipitate mAb2 material (H-av), $C_{inj} = 25.8 \text{ mg mL}^{-1}$, C) H-av material with the presence of 4% w/v of PEG in the AEX binding buffer, $C_{inj} = 26.3 \text{ mg mL}^{-1}$. The mobile phase flowrate $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{inj} = 10 \text{ mL}$. Symbols – experimental data, lines – simulations.

the concentrated solutions of the variants in the adsorbed phase, which was not accounted for in the CPA isotherm.

The value of q^m was taken from literature (Table 1, $q^m = 0.088 \text{ mmol mL}_{bed}^{-1} = \frac{0.088}{(1 - \epsilon_p)} \text{ mmol mL}_{matrix}^{-1}$). The uncertainty of that value was lumped into the remaining model coefficients.

The coefficient k_i in the kinetic equation (Eq. (2)) lumps the effects of mass transfer resistances, therefore it is correlated with the retention factor, thus with the Henry constant $H_i = K_e q_i^m$ [28,30,36]. The value of k_{av} was selected as the estimated parameter. The coefficients k_{mv} and k_{bv} are correlated with k_{av} through their Henry constants:

$$\frac{k_{av}}{k_i} = \frac{H_i}{H_{av}} \quad i = mv, bv \quad (20)$$

As K_e and q_i^m were set the same for all variants ($q_i^m = q^m$), therefore $k_i = k_{av}$.

The effective axial dispersion coefficient, $D_{L,a}$, was determined in the previous study [28] by fitting to the mAb2 profiles recorded under non-binding conditions (for the flowrate used $D_{L,a} = 6.6 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

Altogether, six coefficients had to be determined K_{eq} , $B_{av,av}$, $B_{mv,mv}$, $B_{bv,bv}$, $B_{av,mv}$, k_{av} . For that purpose, the peak fitting method was used. The experimental basis for the estimation were the flow-through band profiles of all three variants measured for two feed materials differing in the variant composition. For the estimation an optimization procedure was used, in which the objective function to be minimized was the sum of the squared differences between the simulated and experimentally measured concentration profiles. The results of the simulation and the corresponding experimental data are depicted in Fig. 3A, and B, which illustrate the profiles of the flow-through fraction (F1) eluted in the loading and washing step, and the bound fraction (F2) eluted with the pH gradient step. The operation yields obtained from the experiments and the simulations are compared in Table 3. As it can be observed, the model reproduced the shapes of band profiles (Fig. 3) and the operation yields (Table 3) with good accuracy; the difference between the predicted and experimentally determined operation yield and did not exceed 4%. To predict the elution profile of the bound fraction, the relative changes in the k_i parameter in pH step change vs the Henry constants were assessed analogously to Eq. (20) [28]. In fact, a high precision in the reproduction of the peak shapes in the bound fraction was not necessary, since it contained the remaining amount of each variant, which might be calculated from the mass balance conservation. All the model parameters estimated are presented in Table 2. Considering the simplifications made in the formulation of the CPA model, the obtained

parameters should be regarded as mathematical coefficients rather than real values of the molecular interaction parameters.

To verify the effect of the presence of PEG on the separation selectivity, the AEX feed was supplemented with 4% w/v PEG to mimic the composition of the dissolved precipitate to be processed in AEX. The model parameters obtained for the PEG-free feed solutions were tuned to fit the model simulations to the experimental band profiles recorded for the PEG-enriched feed, which are depicted in Fig. 3C.

The results of the simulations are overlaid on the experimental data in Fig. 3.

As the model of the AEX dynamics was successfully verified for all tested conditions, it could be further used for designing the coupling of AEX and precipitation.

4.4. Integration of AEX and PREC

4.4.1. Design concept

To determine the optimal sequence of the partial processes, the model of the AEX dynamics Eqs. (1)–(8) and the equilibrium model of precipitation Eqs. (10)–(13), ((15)–(18)) were integrated. Prior to its use, the integrated model was verified by the experimental realization of the sequences PREC-AEX and AEX-PREC for the M-av material. The acceptance level *av* in the product was set at 25% *av* w/w, which corresponded to 34% of the relative reduction with respect to the M-av material. In the sequence PREC-AEX, the PREC process was performed in the first step, according to the procedure described in Section 3.3.7.1. As mentioned above, the post-precipitation material contained residue of PEG. Since the lab-scale filtration process was time consuming due to clogging membranes with PEG, we used CEX for fast removal of the PEG residue from the post-precipitation protein solutions. PEG was unretained in the CEX column, thus the whole amount of its residue was eluted in flow-through. The bound protein was desorbed with the desorption buffer (Section 3.3.8). The choice of the intermediate operation for the PEG removal was not optimized; it is possible that CEX could be omitted by optimizing parameters of the filtration membrane or conditions for precipitate washing. Since the realization of AEX was the throughput-limiting step, we focused the study on the reduction of the AEX contribution to the whole coupled process.

The mAb2 pool free of the PEG residue was concentrated and subjected to AEX, as described in Section 3.3.5. The *av* content and yield of each partial process and the coupling PREC-AEX were determined based on the concentration analysis of the precipitation product and the AEX effluent. The results obtained for the sequence PREC-AEX were compared with the numerical predictions of the integrated model and presented in Table 4. Similar accu-

Table 2
Coefficients of the CPA isotherm with and without presence of PEG.

PEG% w/v	K_c (-)	$B_{av,av}$ (-)	$B_{mv,mv} \times 10^3$ (-)	$B_{bv,bv} \times 10^3$ (-)	$B_{av,mv}$ (-)	k_i (pH 9.3) (s^{-1})
0	722	0.67	1.11	3.05	71.4	1.71×10^{-4}
4	938	1.05			52.4	

Table 3
Variant compositions in the flow-through and bound fractions in AEX. Exp. – experimental data, Sim. – simulations.

Material	M-av				H-av				H-av 4% w/v PEG			
	$U_{feed,i}$ % w/w			Y%	$U_{feed,i}$ % w/w			Y%	$U_{feed,i}$ % w/w			Y%
	av	mv	bv	% w/w	av	mv	bv	% w/w	av	mv	bv	% w/w
Feed	38	45	17	–	59	36	5	–	59	35	6	–
F1 Exp.	13	57	30	46	38	53	9	72	47	44	9	70
Sim.	13	56	31	46	36	55	9	73	48	43	9	72
F2 Exp.	53	38	9	52	78	21	1	26	73	23	4	29
Sim.	51	39	10	53	80	18	2	25	73	24	3	28

Table 4
Verification of the model for the integrated process PREC-AEX; the comparison of the variant composition in the supernatant S, and the precipitate P, and the yields obtained experimentally and numerically using the dynamic model for AEX (Eqs. (1)–(6)) integrated with the mass balance equations at equilibrium for PREC (Eqs. (8)–(11), (13)–(16)).

Fraction	after PREC				Frac	after AEX				Fraction	after PREC-AEX			
	$U_{feed,i}$ % w/w			Y%		$U_{feed,i}$ % w/w			Y%		$U_{feed,i}$ % w/w			Y%
	av	mv	bv	% w/w		av	mv	bv	% w/w		av	mv	bv	% w/w
Feed	39	45	16	–	P	49	41	10	–	Feed	39	45	16	–
Exp. S	26	51	23	63	F1	26	56	18	48	Product	26	52	22	82
Sim.	26	52	22	63		24	57	19	48		25	54	21	82
Exp. P	49	41	10	37	F2	64	32	4	48	Waste	64	32	4	15
Sim.	51	39	10	37		63	32	5	52		63	31	6	18

racy was achieved for the sequence AEX-PREC (data not shown). Since the experimental data and the model predictions were in good agreement, the model was subsequently used for determining the performance of different configurations of partial processes in the coupled process.

4.4.2. Case study systems for the optimization of the coupled process

The optimal configuration and the sequence of the partial processes depended on the required level of the *av* reduction and the *av* content in the mAb2 material (feed). We considered two options for the case study; in the option I, the *av* content in the mAb2 material was reduced by 62%, and in the option II by 34% (e.g., for the M-av material from 39% to 15% *av* w/w in the option I, or from 39% to 25% *av* w/w in the option II). The optimized configurations of the partial processes in the coupled process are illustrated in Fig. 4. For both options, the model was solved for different compositions of the mAb2 materials, which influenced the separation selectivity, and for different supersaturation levels, which defined the operation yield. The increase in the *av* content caused drop in yield of AEX, due to enhancement of peak overlap between the *av* and other variants, which was reproduced well by the dynamic model with the implemented CPA isotherm. Similar changes in the yield values were also observed in the precipitation process. It resulted from the selectivity decline with increasing the *av* content in the solution [29], which was accounted for in the model by the empirical equilibrium dependencies (Eqs. (15)–(18)). Therefore, the changes in the feed composition involved changes in the overall process efficiency, in terms of the throughput of the AEX process and the overall operation yield (Eq. (7)). For the precipitation process, the throughput of precipitation was assumed to be unlimited, since it was determined only by the size of the reactor.

4.4.3. Performance of the coupled process for the option I

The realization of the option I was more challenging than the option II due to the higher demand for the *av* reduction. The interplay between the variant composition in the feed solution, $U_{feed,av}$, throughput (E , mg mL_{resin}^{-1}) and yield (Y) is illustrated in Figs. 5A and 5B. The precipitation process used as the stand-alone operation was not sufficiently selective to achieve the desired reduction level. The stand-alone AEX provided that level, but at the expense of reduction in E (Fig. 5B). The sequence AEX-PREC allowed significant improvement in E , i.e., up to 600% for the highest *av* content in the mAb2 material (i.e., about 50% *av* w/w), and up to 70% for the lowest *av* content (i.e., about 30% *av* w/w). As the demand for the *av* reduction in the AEX process was relieved due to its coupling with PREC, higher column loads could be used. The improvement in yield was less prominent: up to 20% for the highest *av* content, which went down to the value provided by AEX while decreasing the *av* content. For the *av* content in the mAb2 material less than 30% w/w, AEX-PREC outperformed AEX only with respect to E .

4.4.4. Performance of the coupled process for the option II

The efficient reduction in *av* in the option II was achieved for the configuration: PREC-AEX-PREC. It overperformed the stand-alone AEX with respect to E (up to 100% for the highest *av* content and up to 50% for lowest *av* content in the mAb2 material), and the stand-alone three-stage precipitation PREC-PREC-PREC with respect to yield (up to 35% for the highest *av*, and up to 20% for the lowest *av* content (Fig. 6).

For the mAb2 materials with the *av* content lower than 40% w/w, the efficiency of the stand-alone AEX or the stand-alone PREC-PREC-PREC was comparable with the coupled process. The

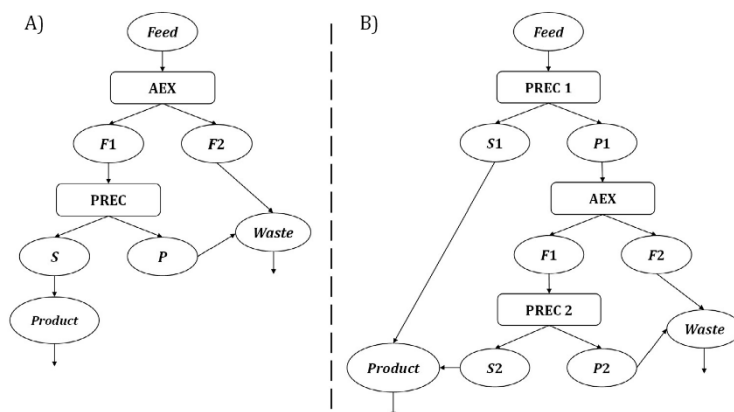


Fig. 4. Scheme of the optimized configuration of the coupled process of PREC and AEX. A) Option I, B) option II. Feed is the mAb2 material, F1 is the AEX flow-through fraction depleted with av , F2 is the bound fraction enriched with av , S is the supernatant, P is the precipitate.

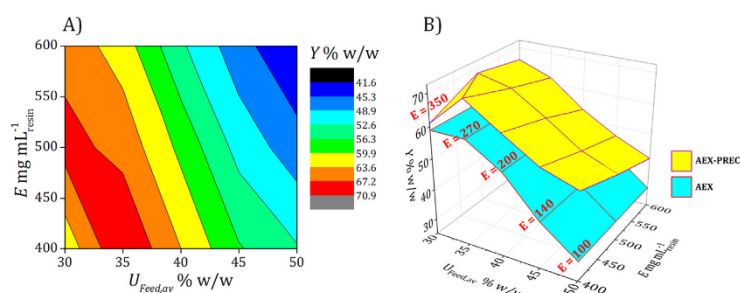


Fig. 5. Performance of the coupled process of AEX-PREC for the option I. A) E vs the av content in the feed solution $U_{Feed,av}$. B) 3D illustration of the interplay between $U_{Feed,av}$, E and Y .

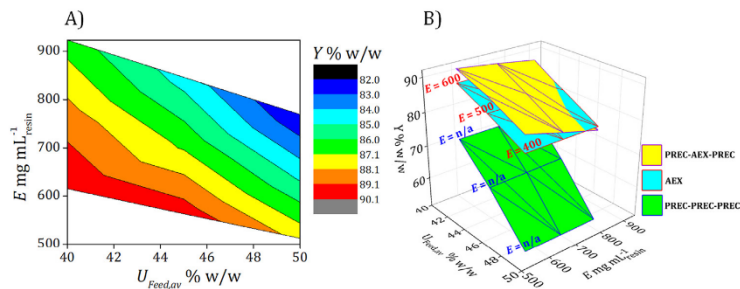


Fig. 6. Performance of the coupled process of PREC-AEX-PREC (for the option II). A) E vs the av content in the feed solution $U_{Feed,av}$. B) 3D illustration of the interplay between $U_{Feed,av}$, E and Y .

stand-alone AEX in the option II provided yields up to 90% at $E = 700\text{--}900 \text{ mg mL}^{-1}$ for the mAb2 materials with the av content $U_{Feed,av} = 30\text{--}35\%$ w/w. Under the same conditions, the stand-alone PREC-PREC-PREC provided yields of about 80% while its throughput was limited only by the reactor volume. The benefit provided by the coupling of both operations was negligible.

4.5. Aggregate distribution in the products

Finally, the aggregate distribution in the products of the partial processes and the coupled process was determined. The aggregates present in the mAb2 material were accumulated in precipitate, which is illustrated in Table 5. This indicated additional

Table 5
Aggregate content in the stand-alone processes PREC and AEX and the coupled process AEX-PREC.

	PREC			AEX			AEX-PREC	
	$U_{FeedAgg}$ % w/w	%Agg w/w		$U_{FeedAgg}$ % w/w	%Agg w/w		$U_{FeedAgg}$ % w/w	%Agg w/w
Feed	0.80	–	P'	1.68	–	Feed	0.80	–
S	0.14	0.10	F1	0.48	0.08	Product	0.21	0.17
P	1.47	0.90	F2	2.67	0.92	Waste	2.67	0.83

P' - precipitate fraction after removal of PEG residues by CEX.

advantage of the configuration of the coupled process, in which precipitation was realized downstream AEX.

5. Conclusions

The coupled process of AEX and preferential PEG-aided precipitation has been developed to reduce the acidic variant content in the mAb2 pool. The coupled process outperformed the stand-alone operations with respect to both yield and throughput. To predict the process performance, the dynamic model of AEX was integrated with the model of precipitation equilibrium. The former was based on the kinetic-dispersive model that was supplemented with the CPA isotherm model. The CPA isotherm coefficients were determined by the peak fitting method. The implementation of the CPA isotherm improved the predictability of the dynamic model compared with the previous study [28]. The model of the precipitation equilibrium consisted of simple mass balance equations and empirical equilibrium dependencies. The optimal sequence of the partial operations in the coupled process depended on the requirement for the reduction level in the *av* content in the mAb2 material. When demand for the *av* reduction level was high, i.e., about 60% with respect to the initial *av* content, the optimized sequence AEX-PREC provided higher throughput and yield compared with the stand-alone AEX (*E* up to 600% higher and *Y* up to 20% higher at the highest *av* content in the mAb2 material), while the stand-alone precipitation failed to achieve that reduction level. When the restriction on the *av* reduction level was relieved, i.e., to about 30%, the sequence of PREC-AEX-PREC provided up to 100% improvement in the throughput compared with the stand-alone AEX and up to 35% in yield compared with the stand-alone precipitation. This indicates that the optimal configuration depends on the manufacturer specified demand for the *av* reduction in the specific mAb pool.

The protein aggregates present in a small quantity in the mAb2 material were accumulated in precipitate. Therefore, the configuration of the coupled process, in which precipitation was used in the last stage provided additional benefit in terms of the reduction in the aggregate content.

Declaration of Competing Interest

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

CRediT authorship contribution statement

Patrycja Zimoch: Investigation, Methodology, Conceptualization. **Tomasz Rumanek:** Investigation, Methodology, Conceptualization. **Michał Kołodziej:** Methodology, Conceptualization. **Wojciech Piątkowski:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Dorota Antos:** Conceptualization, Software, Writing – review & editing.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgment

Financial support of this study by Podkarpackie Centrum Innowacji (N3_076) is gratefully acknowledged. We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland for the supplement of biological material.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2023.464070.

References

- M.M.C. van Beers, M. Bardor, Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins, *Biotechnol. J.* 7 (2012) 1473–1484, doi:10.1002/biot.201200065.
- K. Brorson, A.Y. Jia, Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality, *Curr. Opin. Biotechnol.* 30 (2014) 140–146, doi:10.1016/j.copbio.2014.06.012.
- Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, et al., Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies, *MAbs* 4 (2012) 578585, doi:10.4161/mabs.21328.
- A.J. Chirino, A. Mire-Sluis, Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1383–1391, doi:10.1038/nbt1030.
- C.A. Boswell, D.B. Tesar, K. Mukhyala, F.P. Theil, P.J. Fielder, L.A. Khawli, Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics, *Bioconjugate Chem.* 21 (2010) 2153–2163, doi:10.1021/bc100261d.
- T. Igawa, H. Tsunoda, T. Tachibana, A. Maeda, F. Mimoto, C. Moriyama, M. Nanami, Y. Sekimori, Y. Nabuchi, Y. Aso, K. Hattori, Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region, *Protein Eng. Des. Sel.* 23 (2010) 385–392, doi:10.1093/protein/gzq009.
- P. Dakshinamurthy, P. Mukunda, B.P. Kodaganti, B.R. Shenoy, B. Natarajan, A. Maliwalave, V. Hatan, S. Murugesan, S. Maity, Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab, *Biologicals* 46 (2017) 46–56, doi:10.1016/j.biologics.2016.12.006.
- B. Hintersteiner, N. Lingg, E.E. Janzek, O. Mutschlechner, H. Loibner, A. Jungbauer, Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein, *Biotechnol. J.* 11 (2016) 1617–1627, doi:10.1002/biot.201600504.
- B. Hintersteiner, N. Lingg, P. Zhang, S. Woen, K.M. Hoi, S. Stranner, S. Wiederkum, O. Mutschlechner, M. Schuster, H. Loibner, A. Jungbauer, Charge heterogeneity: basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors, *MAbs* 8 (2016) 1548–1560, doi:10.1080/19420862.2016.1225642.
- G. Jiang, C. Yu, D.B. Yadav, Z. Hu, A. Amurao, E. Duenas, M. Wong, M. Iversen, K. Zheng, X. Lam, J. Chen, R. Vega, S. Ulufatu, C. Leddy, H. Davis, A. Shen, P.Y. Wong, R. Harris, Y.J. Wang, D. Li, Evaluation of heavy-chain C-terminal deletion on product quality and pharmacokinetics of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 2066–2072, doi:10.1016/j.xphs.2016.04.027.
- L.A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z.W. Kwong, J. Yang, X. Wang, Z. Yao, A. Sreedhara, T. Cano, D. Tesar, I. Nijem, D.E. Allison, P.Y. Wong, Y.H. Kao, C. Quan, A. Joshi, R.J. Harris, P. Motchnik, Charge variants in IgG1: isolation, characterization, *in vitro* binding properties and pharmacokinetics in rats, *MAbs* 2 (2010) 613–624, doi:10.4161/mabs.2.6.13333.
- M. Habberger, K. Bomans, K. Diepold, M. Hook, J. Gassner, T. Schlothauer, A. Zwick, C. Spick, J.F. Kepert, B. Hienz, M. Wiedmann, H. Beck, M. Mølhoj, C. Knoblich, U. Grauschopf, D. Reusch, P. Bulau, Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies. Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes, *MAbs* 6 (2014) 327–329, doi:10.4161/mabs.27876.

- [13] H. Liu, G. Ponniah, H.M. Zhang, Ch. Nowak, A. Neill, N. Gonzalez-Lopez, R. Patel, G. Cheng, A.Z. Kita, B. Andrien, *In vitro* and *in vivo* modifications of recombinant and human IgG antibodies, *MAbs* 6 (5) (2014) 1145–1154, doi:10.4161/mabs.29883.
- [14] N. Alt, T.Y. Zhang, P. Motchnik, R. Taticek, V. Quarumby, T. Schlothauer, H. Beck, T. Emrich, R.J. Harris, Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles, *Biologicals* 44 (2016) 291–305, doi:10.1016/j.biologics.2016.06.005.
- [15] S. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, J. Lee, M. Borys, Z.J. Li, Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 1646–1665, doi:10.1002/bit.26587.
- [16] S. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, N. Zhang, Y. Huang, E. Vandermark, J. Lee, M. Borys, Z.J. Li, Modulating cell culture oxidative stress reduces protein glycation and acidic charge variant formation, *MAbs* 11 (2019) 205–216, doi:10.1080/19420862.2018.1537533.
- [17] G. Teshima, M.X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, J. Kung, V. Lahidji, J. Freeberg, Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2091–2097, doi:10.1016/j.chroma.2010.10.107.
- [18] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillaume, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 33–44, doi:10.1016/j.jpba.2014.08.035.
- [19] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillaume, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 282–289, doi:10.1016/j.jpba.2014.09.032.
- [20] S. Ahmed, N.N. Atia, A.H. Rageh, Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variants, *Talanta* 199 (2019) 347–354, doi:10.1016/j.talanta.2019.02.082.
- [21] S.Y. Jing, J.X. Gou, D. Gao, H.B. Wang, S.J. Yao, D.Q. Lin, Separation of monoclonal antibody charge variants using cation exchange chromatography: resins and separation conditions optimization, *Sep. Purif. Technol.* 235 (2020) 116136, doi:10.1016/j.seppur.2019.116136.
- [22] H.J. Lee, C.M. Lee, K. Kim, J.M. Yoo, et al., Purification of antibody fragments for the reduction of charge variants using cation exchange chromatography, *J. Chromatogr. B* 1080 (2018) 20–26, doi:10.1016/j.jchromb.2018.01.030.
- [23] T. Zhang, J. Bourret, T. Cano, Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5079–5086, doi:10.1016/j.chroma.2011.05.061.
- [24] T. Müller-Späh, L. Aumann, L. Melter, G. Ströhlein, M. Morbidelli, Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP), *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 1166–1177, doi:10.1002/bit.21843.
- [25] O. Persson, N. Andersson, B. Nilsson, Design of two-column batch-to-batch recirculation to enhance performance in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1531 (2018) 112–121, doi:10.1016/j.chroma.2017.11.035.
- [26] O. Khanal, V. Kumar, K. Westerberg, F. Schlegel, A.M. Lenhoff, Multi-column displacement chromatography for separation of charge variants of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A* 1586 (2019) 40–51, doi:10.1016/j.chroma.2018.11.074.
- [27] S.Y. Jian, C. Shi, H.Y. Leong, J.J. Yuan, D. Gao, H.B. Wang, S.J. Yao, D.Q. Lin, A novel twin-column continuous chromatography approach for separation and enrichment of monoclonal antibody charge variants, *Eng. Life Sci.*, 21 (2021) 382–391, doi:10.1002%2Felsc.202000094.
- [28] K. Baran, P. Zimoch, A. Stańczak, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1658 (2021) 462607–2021, doi:10.1016/j.chroma.2021.462607.
- [29] T. Rumanek, M. Kołodziej, W. Piątkowski, D. Antos, Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools, *Biotechnol. Bioeng.* 120 (2023) 114–124, doi:10.1002/bit.28257.
- [30] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Non-linear Chromatography*, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 2006 Hardback ISBN: 9780123705372; eBook ISBN: 9780080457222.
- [31] X. Xu, A.M. Lenhoff, Binary adsorption of globular proteins on ion-exchange media, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6177–6195, doi:10.1016/j.chroma.2009.06.082.
- [32] A. Lavoisier, J.M. Schlaeppli, Early developability screen of therapeutic antibody candidates using Taylor dispersion analysis and UV area imaging detection, *MAbs* 7 (2015) 77–83, doi:10.4161/19420862.2014.985544.
- [33] V. Kumar, S. Lewke, W. Heymann, E. von Lieres, F. Schlegel, K. Westerberg, A.M. Lenhoff, Robust mechanistic modeling of protein ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1660 (2021) 462669, doi:10.1016/j.chroma.2021.462669.
- [34] T. Briskot, T. Hahn, T. Huuk, J. Hubbuch, Protein adsorption on ion exchange adsorbents: a comparison of a stoichiometric and non-stoichiometric modeling approach, *J. Chromatogr. A* 1653 (2021) 462397, doi:10.1016/j.chroma.2021.462397.
- [35] W.K. Marek, R. Muca, S. Woś, W. Piątkowski, D. Antos, Isolation of monoclonal antibody from a CHO supernatant. II. Dynamics of the integrated separation on IEC and HIC column, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 64–75, doi:10.1016/j.chroma.2013.06.076.
- [36] W.K. Marek, D. Sauer, A. Dürauer, A. Jungbauer, W. Piątkowski, D. Antos, Prediction tool for loading, isocratic elution, gradient elution and scaling up of ion exchange chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A* 1566 (2018) 89–101, doi:10.1016/j.chroma.2018.06.057.
- [37] M.S. Ricardo, S.S. Rosa, R. Cunha, C.L. da Silva, A.M. Azevedo, A. Fernandes-Platzgummer, Anion exchange chromatography-based platform for the scalable purification of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells, *Sep. Purif. Technol.* 310 (2023) 123238, doi:10.1016/j.seppur.2023.123238.
- [38] M.T. Stone, K.A. Cotoni, J.L. Stoner, Cation exchange frontal chromatography for the removal of monoclonal antibody aggregates, *J. Chromatogr. A* 1599 (2019) 152–160, doi:10.1016/j.chroma.2019.04.020.



Coupling cation and anion exchange chromatography for fast separation of monoclonal antibody charge variants

Patrycja Zimoch-Rumanek^a, Dorota Antos^{b,*}

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Mathematical modelling
Monoclonal antibody
Variant separation
Ion exchange chromatography
Multicolumn chromatography

ABSTRACT

A design procedure for the separation of charge variants of a monoclonal antibody (mAb) was developed, which was based on the coupling of cation-exchange chromatography (CEX) and anion-exchange chromatography (AEX) under high loading conditions. The design of the coupled process was supported by a dynamic model. The model was calibrated on the basis of band profiles of variants determined experimentally for the mAb materials of different variant compositions. The numerical simulations were used to select the coupling configuration and the loading conditions that allowed for efficient separation of the mAb materials into three products enriched with each individual variant: the acidic (*av*), main (*mv*) and basic (*bv*) one. In the CEX section, a two-step pH gradient was used to split the loaded mass of mAb into a weakly bound fraction enriched with *av* and *mv*, and a strongly bound fraction containing the *bv*-rich product. The weakly bound fraction was further processed in the AEX section, where the *mv*-rich product was eluted in flowthrough, while the *av*-rich product was collected by a step change in pH. The choice of flow distribution and the number of columns in the CEX and AEX sections depended on the variant composition of the mAb material. For the selected configurations, the optimized mAb loading density in the CEX columns ranged from 10 to 26 mg mL⁻¹, while in the AEX columns it was as high as 300 or 600 mg mL⁻¹, depending on the variant composition of the mAb material. By proper selection of the loading condition, a trade-off between yield and purity of the products could be reached.

1. Introduction

The production of monoclonal antibodies (mAbs) is a rapidly expanding branch of the biopharmaceutical industry. Most therapeutic mAbs belong to the IgG subclass, which finds a multitude of clinical applications for the treatment of cancer, immune diseases, and infections of various types. Full-length IgG mAbs are large molecule proteins that are prone to multiple post-translational modifications, which can occur during biosynthesis, purification, formulation, or storage [1-7]. This is a cause of microheterogeneity, which can induce a reduction in activity, immunogenicity, stability, and efficacy of the product, as well as undesirable side effects [7-14]. The most common source of microheterogeneity is the formation of charge variants, which are classified according to their pI values as acid variants (*av*) with a lower pI, main variants (*mv*) with an intermediate pI, and basic variants (*bv*) with a higher pI [15]. Variants can differ in therapeutic potency; therefore, the variant composition falls into the category of product quality attributes and must be maintained at a defined target [16-23].

Some studies have shown a lack of interplay between variant pI and pharmacokinetics [6,10,11]; however, the results of several case studies indicated a decrease in the therapeutic potency of *av* species compared to *mv* and *bv* species and an increase in the potency of *bv* species compared to *mv* species [9,13,24-29]. In general, the influence of the charge variant composition on the functionality of the mAb-based drug is the individual characteristic of the mAb type. There is no bright line rule to define positive or negative impacts of variant type on the mAb-assisted treatment process [23]. Therefore, determining the therapeutic potency of individual mAb variants is of great importance for regulatory approval. To perform adequate tests, a substantial amount of mAb material enriched with each of the modifications has to be available. The results of the tests determine the variant composition of the product, which must be adjusted by the use of proper separation methods.

To separate protein variants, ion exchange chromatography (IEX) is generally used [30-40]. Nevertheless, structural similarity of charge variants is a cause of the overlapping of their band profiles, which

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465256>

Received 6 June 2024; Received in revised form 4 August 2024; Accepted 9 August 2024

Available online 10 August 2024

0021-9673/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

renders their separation difficult and leads to low product recovery. To improve separation performance, operating conditions can be optimized by adjustment of the shape of the elution gradient [30-32,35,36,38], the type of resin [39,40], or by exploiting multicolumn countercurrent chromatography, which, however, requires sophisticated equipment [41-48].

The separation of variants in single and multicolumn arrangements is typically performed using a linear gradient of salt or pH [30-36], or a combination of both [37,38]. Although this approach can be effective with respect to resolution of variants, the creation of linear gradients in a wide pH range, which cover binding and elution conditions, is problematic. Limits of buffer capacity result in deviation of pH gradients from linearity, which can be a cause of reduced resolution [49]. Moreover, to improve resolution, shallow gradients are often utilized, resulting in an extension of the separation time, a dilution of band profiles, and high buffer consumption. Linear gradients require peak fractionation, which hampers their application in continuous-operation modes. An alternative approach was demonstrated by Anupa et al., who used a combination of displacement mode and step salt gradient mode in a continuous cation exchange chromatography (CEX) setup to adjust variant composition in a mAb material [48].

In previous studies, we have developed various techniques for fast reducing the content of *av* in mAb pools to a manufacturer-defined level. The techniques were based on IEX [50], preferential precipitation [51], or a combination of both methods [52]. In the IEX-based approach, the linear gradient was eliminated and replaced with a pH step gradient. The column was loaded with the protein to the loading capacity. A part of the loading was eluted in the flowthrough fraction enriched with the least retained variant. In the subsequent desorption step, the bound fraction enriched with the most retained variant was eluted by a step change in pH. In anion exchange chromatography (AEX), the flowthrough fraction depleted of *av* species was the product of the process with the desired *av* level [50,52]. The advantage of that technique is the possibility of processing a very large amount of protein in a very short time, which is not achievable in ordinary linear salt or pH gradients. However, the yield of the operation is low, as the *av*-enriched fraction, which is the waste of the process, also contains other variants. To improve the yield, multiple recycling of the waste fraction is required, where in each subsequent recycling step the *av* content in the recycled fractions increases, leading to a reduction in the selectivity of separation [50].

To improve separation efficiency, a combination of AEX with preferential precipitation was developed, in which the advantages of low cost and ease of realization of precipitation and the high selectivity of AEX were used [52]. This approach was found to be more effective than both standalone AEX and standalone precipitation [52].

However, both precipitation and its combination with AEX could only be used to reduce the *av* content in mAb pools, while the separation of the remaining variants was not possible [51,52]. In the latter case, only the chromatographic method could provide sufficient selectivity to isolate individual variants from their mixture.

Therefore, in this study, we modified the IEX-based method to make it applicable to the separation of all variant types: *av*, *mv*, and *bv*. For this purpose, CEX and AEX were used orthogonally. In the CEX step, the fraction highly enriched with *bv* species was isolated from the variant mixture, whereas in the AEX step, *av* species were isolated from *mv* species. To mimic the heterogeneity of the mAb material, different variant compositions were considered, for which different flow diagrams were evaluated with respect to the yield and purity of the products.

The main goal of this study was to develop a procedure for the fast fractionation of the mAb material into products highly enriched with each of the variant species. The method could be used in the drug development stage to provide a sufficient amount of material for the analysis of the activity and therapeutic potency of mAb variants or in downstream processing to adjust the variant composition of the product.

2. Theory – dynamic model

To simulate the band profiles of the variants and design AEX and CEX, the kinetic dispersive model was employed [53]:

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

where C_i is the concentration of i -th variant in the mobile phase in mmol mL^{-1} , q_i is the total adsorbed phase concentration of i -th variant expressed in mmol $\text{mL}_{\text{matrix}}^{-1}$, u is the superficial velocity in m s^{-1} , t is time in s , x is the axial coordinate in m , $D_{L,a}$ is the effective axial dispersion coefficient in $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, ε_{LP} is the total bed porosity accessible by the mAb molecules, ε_i is the total bed porosity.

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

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

where k_i in s^{-1} is the lumped overall mass transport coefficient, q_i^* is the equilibrium concentration correlated with the liquid phase concentration by the isotherm model.

To describe the adsorption equilibrium of the mAb variants, the colloidal particle adsorption (CPA) isotherm was used, which was expressed as follows [54]:

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

where K_{eqi} is the equilibrium constant, a_{ij} is the radius of the protein, which is the same for all mAb variants, i.e., $a_{ij} = 5.5 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ [55], $c = 6$ is the coordination number of the configuration for the hexagonal arrangement, κ is the inverse Debye length m^{-1} , B_{ij} describes protein-protein long-range interactions, R is the protein spacing in m , which is defined by a hexagonal monolayer arrangement [56]:

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

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

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

Because of the complexity of the adsorption behavior of variants under strongly overloading conditions, the expression of the CPA isotherm given by Eq. (3) should be viewed as a mathematical formula that allows reproducing band profiles rather than a theoretically grounded model [52]. It contains a relatively low number of adjustable coefficients (K_{eqi} , B_{ij}), which facilitates the model definition.

The dynamic model was coupled with the initial conditions corresponding to the column free of the protein at time $t = 0$, and the Danckwerts-type boundary conditions:

- at the column inlet:

$$u(c_{inj}(t, x=0) - c_i(t, x=0)) = -\varepsilon_e D_{L,a} \frac{\partial c_i(t, x)}{\partial x} \quad (6)$$

where the injection profile was defined as follows:

$$c_{inj}(t, x=0) = \begin{cases} C_F & \text{for } t \in [0, t_{inj}] \\ 0 & \text{for } t > t_{inj} \end{cases} \quad (7)$$

where C_F is the feed (sample) concentration, t_{inj} is the injection time,

- at the outlet of the l -length column:

$$\frac{\partial C(t, x=L)}{\partial x} = 0 \quad (8)$$

The model was solved using a fast finite difference scheme [57,58].

3. Experimental

3.1. Instruments

The Äkta purifier with UV, pH, and conductometric detectors (Cytiva, Uppsala, Sweden) and a data station were used for variant separation. Separation was performed using glass Tricorn columns (Cytiva), ID 0.5 cm, equipped with stop plugs and connectors. The sample injector was the 10 mL Superloop™ (Cytiva).

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

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

3.2. Materials

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

The monoclonal antibody mAb2 material (IgG1), MW = 148 kDa, purity > 99 %, was provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Polska). The mean isoelectric points of the variants were: av with $pI = 8.7$, mv $pI = 8.9$, bv $pI = 9.1$. The mAb2 material contained variants with the composition: 48 % av , 36 % mv , and 16 % bv w/w.

To separate the variants, POROS™ XS, which is a strong CEX resin, and POROS™ XQ, which is a strong AEX resin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) were used. Both resins are based on a cross-linking poly(styrene-divinylbenzene) matrix with a mean particle size of 50 μ m. The AEX resin is functionalized with a quaternary amine group with ionic capacity of 0.081 mmol per mL of packed bed [59]. The CEX resin is functionalized with the sulfopropyl group with ionic capacity of 0.088–0.130 mmol per mL of packed bed [60].

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

3.3. Procedures

3.3.1. Preparation of mAb2 samples

To prepare mAb2 stock solutions, the mAb2 material was subjected to buffer exchange using Amicon filters. For this purpose, a 5 mL of the mAb2 material with a concentration of approximately 15 mg mL⁻¹ was added into the Amicon filter, covered with a portion of 10 mL of appropriate buffer, and centrifuged for 15 min at 20 °C, at 5000 rpm. The operation was repeated several times with a fresh portion of the

buffer until the desired pH was obtained and the solution conductivity adjusted to the buffer conductivity. The total protein concentration in the obtained mAb2 stocks was determined using the microplate reader.

3.3.2. Column packing and porosity determination

The resin was packed in the Tricorn column according to the manufacturer's guidelines (Thermo Fisher Scientific Inc.). The bed height in the columns after compression was about 5.4, 8.8 or 10.4 cm for the CEX resin and 5 cm for the AEX resin.

The specific porosity of the packed bed for mAb2 was determined from the elution time of a small pulse of the mAb2 solution eluted under nonbinding conditions, i.e. at 1 M NaCl in the mobile phase. The measured elution time was corrected by subtracting the contribution of the extra-column volumes. The total porosity of the bed in the AEX columns was $\epsilon_t = 0.74$, for the CEX columns $\epsilon_t = 0.73$. The specific porosity for mAb2, whose molecules only partially penetrated the pore volume of the adsorbent, for all columns was $\epsilon_{tp} = 0.45$.

3.3.3. CEX-HPLC analysis – determination of variant content

The mobile phase consisted of 0.025 M NaH₂PO₄ (X), 0.025 M Na₂HPO₄ (Y) and 0.125 M NaCl (Z) with different volume ratios. Buffer A was made up of 35.6 % X, 44.4 % Y, 20 % Z v/v, buffer B: 8.8 % X, 71.2 % Y, 20 % Z v/v, buffer C: 5 % X, 5 % Y, 90 % Z v/v. The samples were exchanged for the binding buffer (A) and injected into the CEX-HPLC column, which was firstly equilibrated with the buffer A. The column was washed for 5 min with the same buffer. Next, buffer A was exchanged for 100 % v/v of desorption buffer B in a linear gradient of 55 min. The column was regenerated using buffer C in the step gradient (0–100 % v/v). The mobile phase flowrate was 0.5 mL min⁻¹. A typical chromatogram is shown in Fig. 1.

3.3.4. Separation of the mAb2 variants by CEX

The column packed with the CEX resin was equilibrated with the binding buffer, that is, 0.025 M phosphate buffer (PB), pH 6.0. The protein solution was exchanged for the binding buffer up to the desired concentration and injected into the column using a 10 mL superloop, then washed with the binding buffer. The binding buffer was then exchanged for the elution buffer, i.e., PB with pH 6.8 or 8, or for the desorption buffer pH 9 in linear or step gradients. Finally, the column was stripped with a 1 M NaCl solution in PB pH 9. The mobile phase flowrate was 0.5 mL min⁻¹.

To perform the step change in the mobile phase composition, the pump was stopped, the buffers were quickly exchanged in the line between the adequate pump and the injection valve, and then the pump was restarted with the new buffer. The duration of the step change of buffers (0 to 100 % v/v) at the flowrate used was approximately 6 min.

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

3.3.5. Separation of the variants by AEX

The column packed with the AEX resin was equilibrated with the binding buffer, that is, 0.05 M TRIS-HCl, pH 9.3. The protein solution was exchanged for the binding buffer up to the desired concentration and injected into the AEX column using a 10 mL superloop, then washed with the binding buffer. Next, the binding buffer was exchanged for the elution buffer, i.e. TRIS-HCl with pH 8.8, 8.3, or 7.5, in step or linear gradients. In the case when the protein elution was incomplete, the elution buffer was exchanged for the desorption buffer, i.e. 0.02 M histidine buffer pH 5.5 (HIS) in a step gradient (0–100 % v/v).

Finally, the column was stripped with 1 M NaCl solution in HIS. The mobile phase flowrate was 0.3 mL min⁻¹. The variant content in the column effluent was determined by the CEX-HPLC analysis, as described in Section 3.3.3.

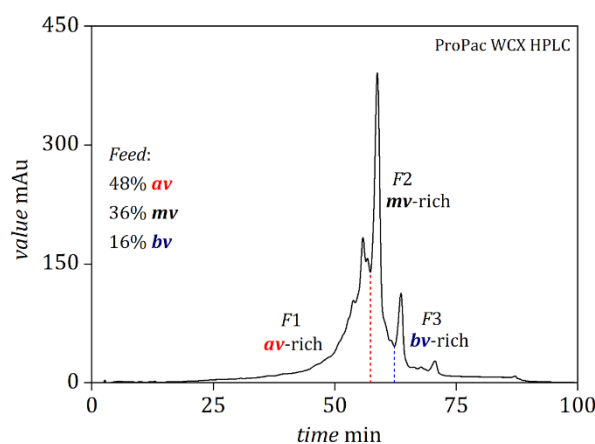


Fig. 1. Illustration of a CEX-HPLC chromatogram.

4. Results and discussion

4.1. Separation concept

Preliminary analysis of the separation selectivity of mAb2 variants in IEX resins was performed in previous studies [50,52]. The results revealed that regardless of the type of IEX resin examined, the separation of all mAb2 variants by ordinary pH or salt gradients was inefficient due to strong peak overlap. The baseline resolution of the variants was not achieved even in the high resolution CEX-HPLC column (Fig. 1). However, it was found that the pH gradient was much more effective when used to isolate the variant that was the most retained. At pH above pI of all variants, AEX could be used to isolate the *av* species, which possessed the highest charge, thus being the strongest bound to the resin. At pH below pI of all of variants, the *bv* species had the highest charge, thus CEX could be used for their isolation. Therefore, in this study, to separate the mAb material into fractions highly enriched in the individual variants, CEX and AEX were orthogonally used. A series of experimental separations were performed using both CEX and AEX columns, in which the mAb2 materials with different variant compositions were processed at different pH levels of the mobile phase and under different loading conditions. The data set obtained was used for the calibration of the dynamic model and its verification. Then, the

model was used to select the sequence of the chromatographic operations and the configuration of the columns (flow diagram) that allowed efficient separation of the variants with respect to yield and purity.

4.2. Formulation and verification of the dynamic models

4.2.1. Formulation of dynamic model of CEX

A series of chromatographic separations of the mAb2 variants were performed using the POROS XS resin, which showed a relatively good separation selectivity toward the *bv* species. Protein loading was carried out at a mild pH of the binding buffer (pH = 6) that ensured the structural stability of mAb2 in that resin, as well as a sufficient binding capacity for the variants, which were positively charged under that condition (the lowest pI_{av} was 8.7).

In preliminary separation experiments, several pH gradients of different shapes were used to split the loaded mass of the protein into fractions either depleted or enriched with the *bv* species. Fig. 2 shows an illustration of different scouting gradients along with the distribution of individual variants. After the analysis of the band profiles determined for different gradients, elution buffer pH 6.8 was selected for the first gradient step to acquire the fraction depleted in *bv*, which carried the highest charge and was the strongest bound of all variants ($pI_{bv} = 9.1$). The elution buffer of pH 9, which was close to the pI of all variants, was

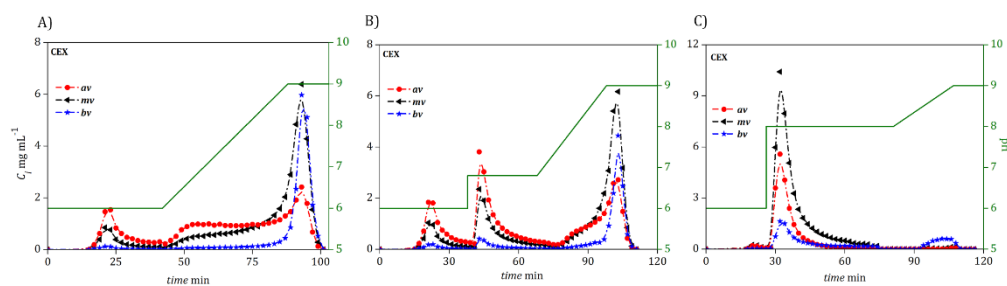


Fig. 2. Illustration of the experimental band profiles of the individual variants for different pH scouting gradients, the injection volume $V_{inj} = 10$ mL (9.4 CV), binding and washing at pH 6. A) $C_{inj} = 9.7$ mg mL⁻¹, washing (8.4 CV), linear gradient from pH 6 to 9 (23.4 CV), B) $C_{inj} = 9.6$ mg mL⁻¹, washing (8.4 CV), step gradient from pH 6 to pH 6.8 (14.0 CV), followed by the linear gradient 6.8 to 9.0 (14.0 CV), C) $C_{inj} = 8$ mg mL⁻¹, washing (2.8 CV), step gradient from 6.0 to pH 8.0 (25.7 CV), linear gradient pH 8.0 to 9.0 (12.1 CV). The variant composition: A) *av* = 42 %, *mv* = 42 %, *bv* = 16 %, B) *av* = 38 %, *mv* = 46 %, *bv* = 16 %, C) *av* = 26 %, *mv* = 58 %, *bv* = 16 % w/w. Dash-dotted lines are a guide for the eye. Solid line – programmed pH gradient.

Table 1

Variant composition of the fractions of the mAb2 effluents acquired in CEX. Sample (Feed) loading $V_{inj} = 10$ mL (9.4 CV), washing (2.3 CV) at pH 6.0, elution of the fraction F1 (12.6 CV) at pH 6.8, elution of the fraction F2 with pH 9.0 (5 CV).

C_{inj} mg mL ⁻¹		4.5				5.3				7.8			
Load mg _{mAb2} mL _{col} ⁻¹		26				50				73			
U_j % w w ⁻¹		av	mv	bv	Y%	av	mv	bv	Y%	av	mv	bv	Y%
Feed		10	48	42	-	5	43	52	-	25	62	13	-
F1	exp.	15	57	28	74	9	48	43	84	26	65	9	45
	sim.	15	64	21	68	6	50	44	85	27	65	8	46
F2	exp.	2	21	77	26	0	2	98	16	2	39	59	55
	sim.	0	13	87	32	0	6	94	15	2	37	61	54

Frac – fraction, col – column, exp. – experimental data, sim. – Simulations.

used to desorb the *bv*-enriched fraction. To determine the model parameters for the selected pH gradient steps, that is, loading and washing at pH 6, elution at pH 6.8, and desorption at pH 9, the individual band profiles of the variants were determined by fractionation and the CEX-HPLC analysis. The procedure was carried out for the mAb2 samples of different variant compositions, which were obtained by IEX pre-separations of the mAb2 material supplied by the manufacturer. The model coefficients were determined by fitting the model simulations (Eqs. (1-9)) to the experimental band profiles using an optimization procedure [50,52]. The separation conditions used for the calibration of the model are reported in Table 1, which also contains the experimental and simulated compositions and the yields of the fractions eluted at pH 6.8 (F1) and pH 9 (F2). The fraction yield was calculated as the ratio of the protein mass in the collected fraction, m_{frac} , to the total protein mass loaded to the column, m_{feed} :

$$Y_{frac} = \frac{m_{frac}}{m_{feed}} \cdot 100\% \quad (9)$$

The values of the model parameters obtained are reported in Table S1 in the Supplementary materials. As mentioned above, due to the complexity of the retention behavior of the variants in the overloaded column, the values obtained cannot reflect the real adsorption mechanism. They should be viewed as empirical parameters that allow reproducing the separation efficiency.

The effective axial dispersion coefficient, $D_{L,a}$, was determined in the previous study [50] by fitting to the mAb2 profiles recorded under nonbinding conditions (at flowrate 0.5 mL min⁻¹ it was $D_{L,a} = 6.5 \cdot 10^{-6}$ m² s⁻¹).

4.2.2. Verification of the dynamic model of CEX

To verify the predictability of the model, the multicolumn separation of the mAb2 material was performed. For this purpose, a sequence of three columns in series was used (Fig. 3). The feed sample was loaded to the first column (CEX 1) and washed at pH 6, then partially eluted at pH 6.8 to collect the weakly bound fraction F1, and then desorbed at pH 9 to collect F2, as previously described. The composition of the fractions was measured by the CEX-HPLC analysis, and their mass was determined, including the amount withdrawn for the composition analysis and lost on the filters. The weakly bound fractions (F1) were subjected to buffer exchange to adjust pH from pH 6.8 to pH 6 and concentrate to the injection volume, which was always 10 mL, and loaded to the next column. The results obtained in terms of the composition of the variants and fraction yields are summarized in Table 2. It can be observed that the fractions F2 acquired from the columns CEX 1 and CEX 2 (F2c1 and F2c2) are enriched in *bv*, yet the overall yield of the separation is reduced by a considerable amount of *bv* lost in the fraction F2c3. However, the results obtained in that experimental run confirmed the possibility of *bv* separation in multicolumn CEX arrangements. The composition of the fractions and their yields determined experimentally were compared with the simulations of the model. The agreement between the experimental data and the simulations was satisfactory, which proved that the model can be used for the prediction of the variant separation in multicolumn CEX under different conditions with respect to the mass loading and the variant composition.

4.2.3. Verification of dynamic model of AEX

The operating conditions for the separation of the mAb2 variants on the AEX resin have been selected in previous studies [50,52]. The mAb2 sample was loaded to the column at pH 9.3, where the protein was

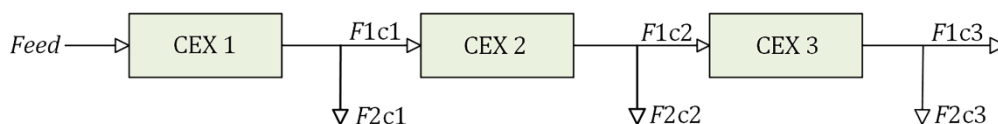


Fig. 3. CEX configuration used for the separation test and for the verification of the model.

Table 2

Variant composition and yield of the fractions obtained from the multicolumn CEX arrangement used in the separation test.

C_{inj} mg mL ⁻¹		7.3				4.4				2.6			
Load mg _{mAb2} mL _{col} ⁻¹		36				22				13			
U_j % w w ⁻¹		CEX 1				CEX 2				CEX 3			
		av	mv	bv	Y%	av	mv	bv	Y%	av	mv	bv	Y%
Feed		7	42	51	-	11	53	36	-	21	63	16	-
F1	exp.	11	53	36	73	21	63	16	60	30	67	3	45
	sim.	10	54	36	73	23	65	12	60	30	68	2	46
F2	exp.	0	10	90	27	2	19	78	40	5	57	38	55
	sim.	0	9	91	27	1	18	81	40	14	56	30	54

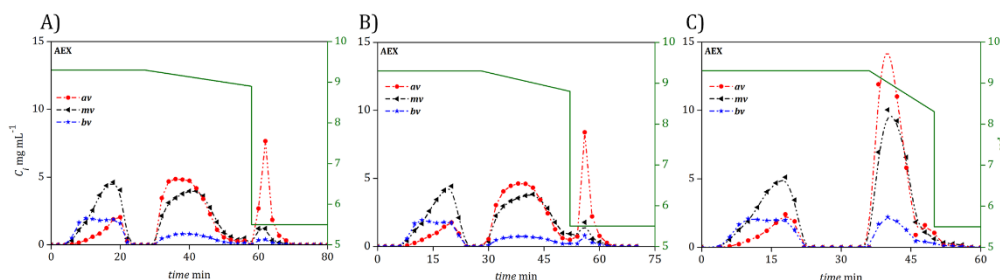


Fig. 4. Illustration of the experimental band profiles of the individual variants for different scouting pH gradients, the injection volume $V_{inj} = 10$ mL, $C_{inj} = 13$ mg mL⁻¹, the binding buffer pH 9.3. A) Linear gradient from pH 9.3 to pH 8.9 (15.5 CV), followed by the step gradient to pH 5.5, B) linear gradient from pH 9.3 to pH 8.8 (12 CV), the step gradient to pH 5.5, C) linear gradient from pH 9.3 to pH 8.3 (7 CV), the step gradient to pH 5.5. Dash-dotted lines are a guide for the eye. Solid line – programmed pH gradient.

partially eluted in flowthrough. The remaining part of the protein was received by a reduction in pH.

In this study, the type of desorption buffer and its pH were adjusted to ensure that the entire protein mass was desorbed from the column. An illustration of the scouting gradients used for experimental optimization of the desorption conditions is shown in Fig. 4. The elution strength of TRIS pH 7.5 was found to be sufficient to elute the whole mass of the protein bound to the resin. This allowed elimination of the HIS buffer, whose residues were rather difficult to remove from the product solutions. Profiles obtained in the loading and washing steps at pH 9.3, and in the desorption step at pH 7.5 were used to estimate the model parameters; the values obtained are summarized in Table S2 in the Supplementary Materials.

4.2.4. Verification of dynamic model of AEX

To verify the predictability of the AEX model, the multicolumn separation of the mAb2 material was performed in the manner similar to that reported for CEX (Fig. 5).

The mAb2 feed solution was loaded and partially eluted at pH 9.3 to acquire the flowthrough fraction $F1$, while the bound fraction $F2$ was collected with the desorption buffer pH 7.5. The flowthrough fractions were concentrated up to the injection volume (10 mL). The variant compositions in the fractions acquired in each step, the fraction yield and the column loadings are presented in Table 3. As can be observed, the fractions $F2c1$ and $F2c2$ are enriched with av , the fraction $F1c3$ is almost free of av , but contains both mv and bv . It is evident that AEX allows the isolation of av from the variant mixture at very high loading

density (even about 600 mg per mL of column), but it cannot be used to separate mv from bv . The agreement between the experimental data and the simulations was again satisfactory. Thus, after verification, both the CEX and the AEX models could be used for the predictions of the standalone CEX and the standalone AEX, as well as their coupling.

4.3. Determination of the operation conditions by model predictions

4.3.1. Determination of the coupling configuration

The performance of variant separation was evaluated for the pH step gradients selected in the experimental study. To mimic the variability of the composition in the mAb materials, different compositions of the variants were examined, as presented in Table 4; H- av denotes the reference material with the highest av content, which was delivered by the manufacturer, H- mv is the material with the highest mv content, H- bv is the material with the highest bv content.

The model was used to predict the separation efficiency for different configurations of the coupling. In the first step, the overall number of columns in the setup was set to 3, and the simulations were performed for four combinations (data not shown): CEX-AEX-AEX, CEX-CEX-AEX, AEX-CEX-CEX, and AEX-AEX-CEX. The combinations CEX-AEX-CEX and AEX-CEX-AEX were excluded, as they required the use of buffer exchange for each fraction after each stage. The fractions highly enriched with the defined variant were the products, while the remaining fractions were directed to a next column for further separation. The variant composition and protein content in the processed fractions was determined by numerical integrating the variant concentration profiles,

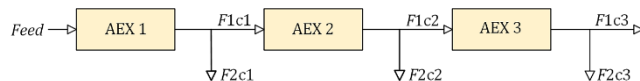


Fig. 5. AEX configuration used for the separation test and for the verification of the model.

Table 3

Variant composition and yield of the fractions obtained from the multicolumn AEX arrangement used in the separation test.

C_{inj} mg mL ⁻¹		58				34				19			
Load mg _{mAb2} mL _{col} ⁻¹		580				340				190			
		AEX 1				AEX 2				AEX 3			
U_i % w w ⁻¹		av	mv	bv	Y%	av	mv	bv	Y%	av	mv	bv	Y%
Feed		48	36	16	-	37	44	19	-	17	56	27	-
F1	exp.	37	44	19	75	17	56	27	60	7	48	45	28
	sim.	35	45	20	71	17	55	28	55	6	52	42	23
F2	exp.	82	13	5	25	65	27	8	40	23	59	18	72
	sim.	80	15	5	29	60	31	9	45	21	57	22	77

Table 4
Variant composition in the mAb2 materials selected for the separation study.

	$U_{feed,i}$ % <i>i</i> -th variants of mAb		
	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>
H- <i>av</i> ^a	48	36	16
H- <i>mv</i>	24	60	16
H- <i>bv</i>	24	36	40

^a reference material provided by the manufacturer.

averaging their concentrations according to the injection volume, and used to specify the inlet condition for the subsequent column. Fresh feed was optionally added to the boundary conditions to maintain the same loading level for each of the columns in the CEX or AEX sections. Column loadings were changed incrementally by the numerical procedure from 20 to 100 mg mAb (with increment 20) for the CEX section and 150 to 750 mg (with increment 150) for the AEX section. For each of the materials, the set of model predictions was used to benchmark different configurations with respect to yield and product purity, and to determine how the variant composition influences the separation efficiency, the choice of the column configuration, and the column loading conditions.

In the three-column couplings, the purity of the products was relatively low, regardless of the composition of the material and the loading condition. Thus, the total number of columns was increased to 4, and again the performance of different possible combinations of columns in the coupling was analyzed. In all cases, the isolation of *bv* in the CEX column was less selective than the isolation of *av* in the AEX column. In the former case, an increase in the content of *bv* in the variant mixture caused the front of its band profile to accelerate and strongly overlap the *mv* band profile. This is a characteristic for adsorption under nonlinear isotherm conditions, which occurs at high column overload. Furthermore, the elution pattern of the variants indicated a very weak displacement effect. This implied that variant adsorption was rather synergistic than competitive, making their separation very difficult [50].

When the AEX section was used in the first step, *av* was efficiently isolated from the flowthrough fraction, but it was accompanied by an increased mass ratio of *bv* in the variant mixture to be directed to the

subsequent CEX column. This caused contamination of the *mv*-rich product by the *bv* front. Therefore, for all three materials, CEX had to be used in the first step, where the *bv*-rich product could be isolated and followed by AEX, where the products rich in *av* and *mv* could be received.

Fig. 6 presents the flow diagrams for the coupling of CEX and AEX, which were selected as the best candidates with respect to the yield and purity of the products for the separation of the materials listed in Table 4.

The H-*av* and H-*mv* materials had to be processed in two CEX columns to enrich the F2 fractions in *bv* and then in two AEX columns to enrich the F2 fractions in *av* and the F1 fractions in *mv*. The H-*bv* material had to be processed in three CEX columns to isolate the *bv* species that were in a high excess and subsequently in one AEX column.

Since each of the separated variants was considered as the separation product, the separation yield (Y_i) was determined as the ratio of the mass of the desired *i*-th variant in the fraction containing the product ($Prod,i$) to its mass in the feed ($Feed,i$):

$$Y_i = \frac{m_{Prod,i}}{m_{Feed,i}} 100\%, \quad i = av, mv, bv \quad (10)$$

The adopted separation scheme is free of waste; all effluents of the units are products. If only one product is required, then the flow diagram has to be adapted to that requirement.

4.3.2. Variant separation in the CEX section

The simulations of the variant separation in the CEX section were performed for two or three columns assembled in series as shown in the flow diagram in Fig. 6. The feed is loaded to the CEX 1 column and then split into the weakly bound fraction F1c1 and the strongly bound fraction F2c1. The latter is supplemented with fresh feed to obtain the proper column load, and transferred to the CEX 2 column, whose effluent is again divided into two fractions. The strongly bound fraction F2c2 represents the *bv*-rich product. The fractions F1c1 and F1c2, which mainly contain the *av* and *mv* species, are pooled together in the *av/mv*-rich fraction. For the H-*av* and H-*mv* materials, that fraction is directly transferred to the AEX section, whereas for the H-*bv* material, it is processed again in the CEX 3 column. As mentioned above, the high content

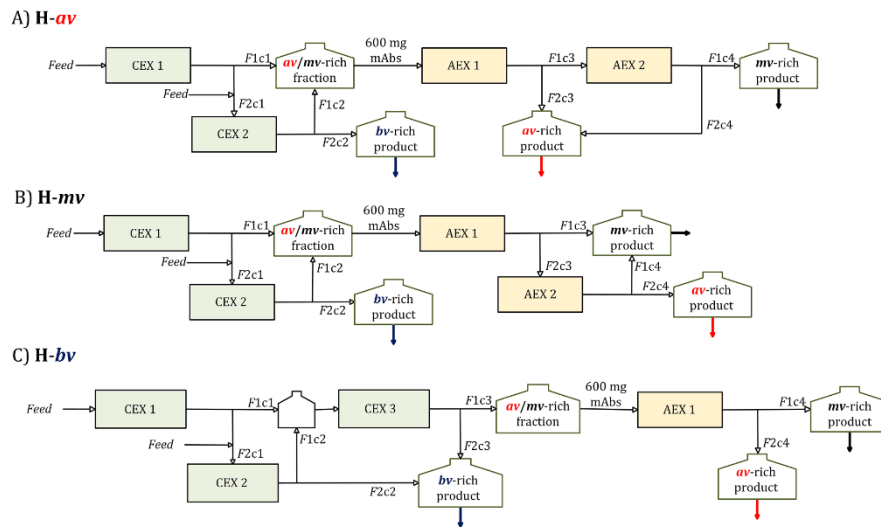


Fig. 6. Flow diagrams for the mAb2 variant separation by the coupling of CEX and AEX, for the materials: A) H-*av*, B) H-*mv*, C) H-*bv*.

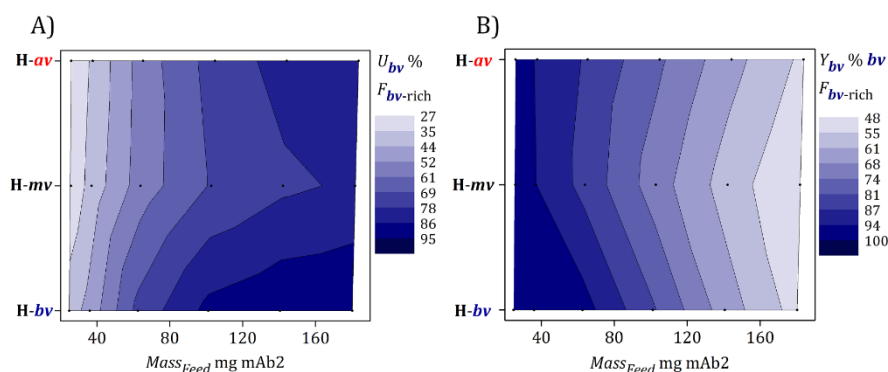


Fig. 7. Efficacy of the *bv* isolation in the CEX section: left-hand side - the *bv* content, U_{bv} % (purity), right-hand side - the corresponding *bv* yield, Y_{bv} %, $Mass_{feed}$ denotes the total mAb2 mass loaded to the CEX section.

of *bv* in the mixture caused contamination of the *av*/*mv*-rich fraction. Therefore, to improve the purity of the final product, an additional third column was needed.

The efficiency of the *bv* separation in the CEX section with respect to the *bv* content, U_{bv} , which corresponds to the purity of the product, and the yield of the *bv*-rich product, Y_{bv} , was calculated for different masses of mAb2 loaded in the entire section. The results obtained are demonstrated in Figs. 7A and 7B. For all processed materials, an increase in the mAb2 loading improved the purity of the product up to ca. 70 % or more. The efficiency was particularly good for the H-*bv* material, for example: for the total mAb2 loading of 80 mg, over 85 % purity of *bv* could be obtained at a yield of about 80 %. It is evident from Fig. 7 that a trade-off between yield and purity can be reached by proper selection of the loading condition, which is specific for the processed material.

The efficacy of the isolation of the *av*/*mv* fraction in CEX is shown in Fig. 8. For all materials, the *mv* species could be recovered with a high yield at the total mAb2 loading greater than 80 mg (Fig. 8B), but with a low purity (Fig. 8A) due to contamination by the *av* species (Fig. 8C). For the H-*mv* material alone, *mv* species could be recovered with somewhat higher efficiency, for example, with purity $U_{mv} \sim 66\%$ at $Y_{mv} \sim 85\%$ for the total loading of 180 mg of mAb2. The *av* species could be recovered with high yield, $Y_{av} > 80\%$ (Fig. 8D), but also with low purity ($U_{av} < 59\%$, Fig. 8C). Therefore, CEX was inefficient in obtaining the resolution of the *av* and *mv* species. For that, a sequence of the AEX columns was used.

For each of the materials, the condition for the loading of the CEX section was arbitrarily selected; the criterion adopted was a high level of reduction of *bv* in the *av*/*mv*-rich fraction, that is, $U_{bv} < 5\%$ at yields $Y_{av} > 95\%$ and $Y_{mv} > 85\%$ for *av* and *mv*, respectively. The composition of the *av*/*mv*-rich fraction that was directed to the AEX section is presented in Table 5.

4.3.3. Variant separation in the AEX section

The effectiveness of the separation of the *av*/*mv* fraction after the first AEX column is shown in Fig. 9 for the *av*-rich product and in Fig. 10 for the *mv*-rich product (Fig. 6).

As can be seen in Fig. 9, it is possible to obtain the *av*-rich product with a high or relatively high purity, $U_{av} > 70\%$, for the H-*av* and H-*bv* materials. The highest yield of that product can be obtained for the H-*av* material, whereas the lowest yield can be obtained for the H-*mv* material. In the latter case, the high loading of the *mv* species in the AEX column caused acceleration of the *mv* concentration front and contamination of the *av*-rich product. Therefore, the *av*-rich fraction (F2c3) needed further purification in the subsequent AEX column (Fig. 6).

The efficiency of the *mv* isolation was the highest for the H-*mv* material, for which $U_{mv} > 75\%$ with yield $Y_{mv} > 60\%$ could be achieved.

The worst separation efficiency toward the *mv* species was obtained for the H-*av* material, for which the *mv* profile was strongly contaminated by *av*. Therefore, the *mv*-rich fraction (F1c3) had to be further processed in the subsequent AEX column (Fig. 6). In the case of the H-*bv* material, the performance indicators for both the *av*-rich and *mv*-rich fractions were relatively high and, therefore, the purification could be terminated after the first AEX column.

For each of the materials, the efficient separation of *av* and *mv* in the AEX column was carried out at a very high mAb2 mass loading; the mAb2 mass of 600 mg per mL of column was selected for the loading of the first AEX column, and 300 or 600 mg per mL of volume of the whole AEX section.

The performance indicators for the products collected from the entire unit are summarized in Table 6. For all materials, the products obtained were considerably enriched with individual variants compared to the composition of the initial materials, without loss of mAb2. The final performance indicators can be adjusted by choosing the loading conditions for both CEX and AEX sections, which can be aided by the performance graphs depicted in Figs. 7-10. For all products, it is possible to improve purity, but at costs of yield, and vice versa. The choice between those conflicting indicators depends on the particular process need.

The results of the simulations presented above indicate that the protein loadings in the CEX and AEX columns are in different ranges (Tables 5 and 6). Separation in AEX could be performed with much higher loading density, that is, 300 or 600 mAb2 mg mL⁻¹, compared to CEX, that is, 10–26 mAb2 mg mL⁻¹. Therefore, the coupling of CEX with AEX requires an adjustment of the column volume of the CEX section, to obtain enough material for further separation in the AEX section. The volume of each CEX column required to load 600 mg of mAb2 into the AEX section is given in Table 5.

4.4. Advantages and limitations of the approach developed

The coupling of CEX and AEX can improve selectivity in mAb variant separation, which is usually very low in standalone operations. The manner of process realization remains frontal chromatography, in which the mixture components are separated between the flowthrough and bound fractions. The pH gradient is simplified to two steps; the loading/washing step, in which the flowthrough or weakly bound fraction is collected, and the desorption step, in which the remaining fraction is received in a short time interval. This accelerates the separation process compared to linear gradients, which are commonly used for this purpose. The process is performed for high column loadings that exceed the resin binding capacity, which could not be achieved using linear

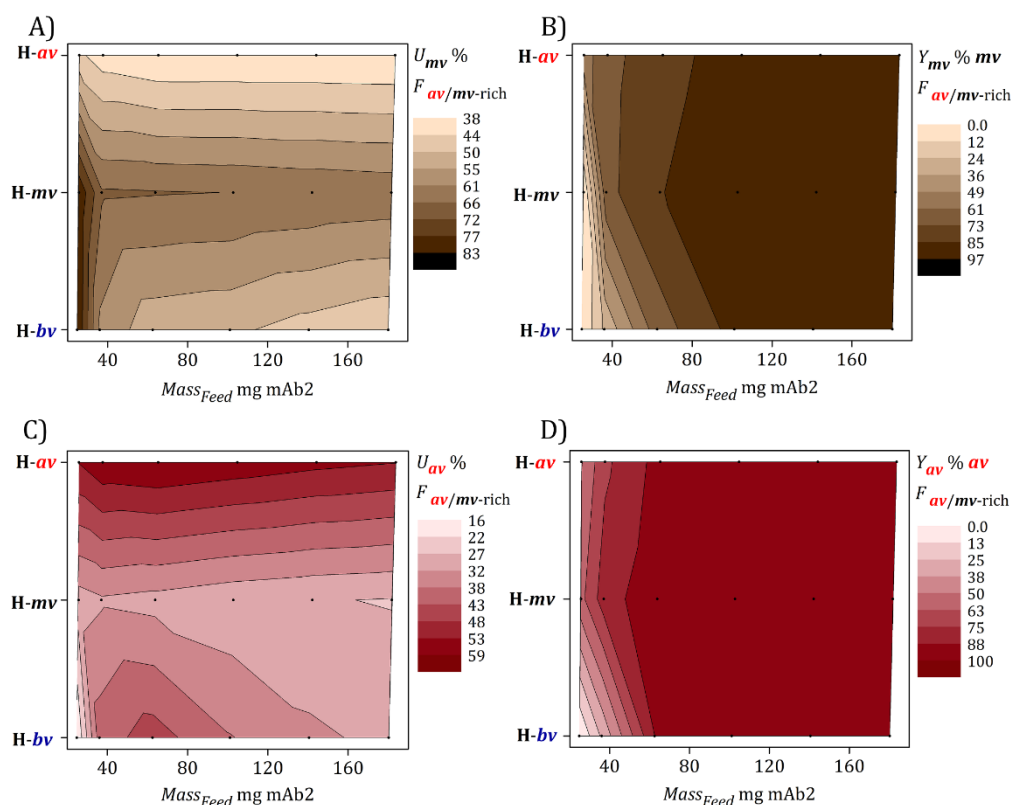


Fig. 8. Characterization of the *av/mv*-rich fraction. A) U_{mv} %, and B) Y_{mv} %, C) U_{av} % and D) Y_{av} %.

Table 5

Composition of the *av/mv* fraction acquired from the CEX section and directed to the AEX section. $Mass_{Feed}$ denotes the mAb2 loading per the volume of the whole CEX section.

	$U_{F,av/mv}$ Variants of mAb2			$Mass_{Feed}$ mg _{mAb2} ·mL ⁻¹ _{CEX}	CEX ^a mL _{col}
	<i>av</i>	<i>mv</i>	<i>bv</i>		
H- <i>av</i>	57	39	4	26	14
H- <i>mv</i>	30	66	4	16	23
H- <i>bv</i>	45	52	3	10	42

^a CEX single column volume required for the coupling with AEX.

gradients. As demonstrated above, the mAb2 loading density selected for the CEX section was within the range of 10–26 mg mL⁻¹ (Table 5) and for the AEX section it was as high as 300–600 mg mL⁻¹ (Table 6), thus the average mAb2 loading density for the entire unit was minimum about 80 mg mL⁻¹ and maximum about 300 mg mL⁻¹, which exceeded the loading densities reported in the literature cited above.

The process is easy to perform as it is based on a sequence of batch columns, in which the operation can be interrupted between subsequent steps and restarted at any time. Therefore, after each section, the composition of the products can be monitored and the process conditions adjusted to eliminate the influence of deviations in the material composition and the mass loading on the purity of the product.

The process design and the adjustment of the operating conditions require an efficient dynamic model which has to be calibrated in a wide range of loading conditions and variant composition for both CEX and AEX columns. Optimization of the column configuration and product purity without model predictions can be very difficult. The pH of the protein loading needs to be strictly controlled as it determines the mass of the protein in flowthrough and bound fractions and their compositions. Furthermore, careful buffer exchange is needed between CEX and AEX sections.

5. Conclusions

The study provided a design procedure for the separation of the mAb2 variants by coupling CEX and AEX under high loading conditions. Neither the standalone CEX nor the standalone AEX was able to separate the mAb2 materials into fractions enriched with the individual variants. In CEX, the most retained basic variant (*bv*) could be efficiently isolated from the mixture at a pH below the isoelectric point of all variants, whereas the acidic (*av*) and main variants (*mv*) eluted at the same time. The opposite was true for AEX; the most retained *av* could be effectively separated from the mixture at a pH greater than pI of all the variants. Therefore, CEX was used to separate *bv* from *av-mv* mixtures, and AEX was used to separate *av* from *mv*. For both operations, the mass of mAb2 loaded to the column was divided into two fractions enriched with a variant less or more retained. The design of the process was based on the

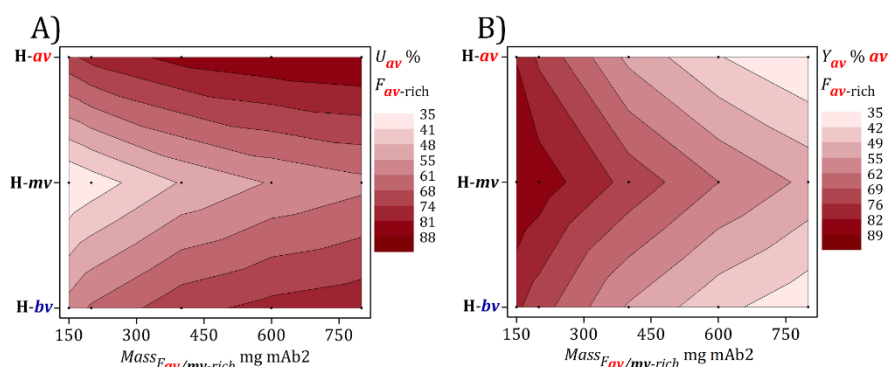


Fig. 9. Efficacy of the isolation of av after the first AEX column. A) $U_{av}\%$, B) $Y_{av}\%$.

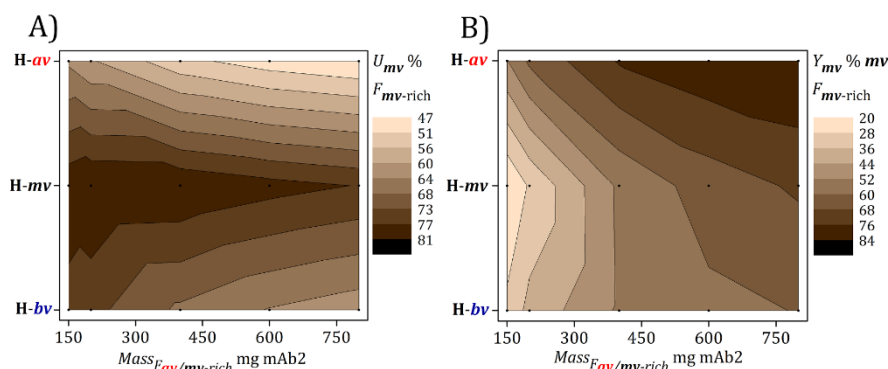


Fig. 10. Efficacy of the isolation of mv after the first AEX column. A) $U_{mv}\%$, B) $Y_{mv}\%$.

Table 6

Product composition obtained for all the materials examined, $Mass_{av/mv}$ denotes the mAb2 loading per the volume of the whole AEX section.

	av-rich				mv-rich				bv-rich				$Mass_{av/mv}$ mg _{mAb2} mL ⁻¹ _{AEX}
	U_{av}	Y_{av}	U_{mv}	U_{bv}	U_{av}	U_{mv}	Y_{mv}	U_{bv}	U_{av}	U_{mv}	U_{bv}	Y_{bv}	
H-av	80	76	19	1	29	63	66	8	4	23	73	75	300
H-mv	75	46	25	0	19	76	78	5	4	40	56	85	300
H-bv	76	44	23	1	32	64	58	4	6	22	72	96	600

predictions of the mathematical model calibrated on the basis of the individual variant profiles acquired experimentally. The separation efficiency was analyzed under different column loading conditions for three mAb2 materials of different variant compositions. The latter was aimed at mimicking the variability of the composition in mAb materials. In all the cases examined, the four-column CEX-AEX coupling allowed efficient separation of the variants into three products, each enriched with the individual variant. The mAb2 mass loading in the CEX section was found to be much lower than that of the AEX column. Therefore, to provide adequate protein mass for the separation in the AEX section, the CEX section has to be of larger volume.

The results received indicated that the choice of the loading conditions and column configuration strongly depends on the variant composition of the material to be processed and has to be optimized for each individual mAb material and for specific yield and purity

requirements. For this purpose, a dynamic model has to be formulated and verified.

CRedit authorship contribution statement

Patrycja Zimoch-Rumanek: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Dorota Antos:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Software, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

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

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

Financed by the Minister of Science and Higher Education, Republic of Poland, within the "Regional Excellence Initiative", agreement no. RID/SP/0032/2024/01.

We also acknowledge Polpharma Biologics, Gdańsk, Poland, for supplementing the biological material.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.chroma.2024.465256](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465256).

References

- R.J. Harris, S.J. Shire, C. Winter, Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies, *Drug Dev. Res.* 61 (2004) 137–154, <https://doi.org/10.1002/ddr.10344>.
- W. Wang, S. Singh, D.L. Zeng, K. King, S. Nema, Antibody structure, instability, and formulation, *J. Pharm. Sci.* 96 (1) (2007) 1–26, <https://doi.org/10.1002/jps.20727>.
- J. Vlasak, R. Ionescu, Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (6) (2008) 468–481, <https://doi.org/10.2174/138920108786786402>.
- H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldut, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426–2447, <https://doi.org/10.1002/jps.21180>.
- X.Z. He, A.H. Que, J.J. Mo, Analysis of charge heterogeneities in mAbs using imaged CE, *Electrophoresis* 30 (2009) 714–722, <https://doi.org/10.1002/clps.200800636>.
- L.A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z.W. Kwong, J. Yang, X. Wang, Z. Yao, A. Sreedhara, T. Cano, D. Tesar, I. Nijem, D.E. Allison, P.Y. Wong, Y.-H. Kao, C. Quan, A. Joshi, R.J. Harris, P. Motchnik, Charge variants in IgG1: isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats, *mAbs* 2 (2010) 613–624, <https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13333>.
- H. Liu, G. Ponniah, H.-M. Zhang, Ch. Nowak, A. Neill, N. Gonzalez-Lopez, R. Patel, G. Cheng, A.Z. Kita, B. Andrien, In vitro and in vivo modifications of recombinant and human IgG antibodies, *mAbs* 6 (5) (2014) 1145–1154, <https://doi.org/10.4161/mabs.29883>.
- D.S. Rehder, D. Chelius, A. McAuley, T.M. Dillon, G. Xiao, J. Crouse-Zeineddini, L. Vardanyan, N. Perico, V. Mukku, D.N. Brems, M. Matsumura, P.V. Bondarenko, Isomerization of a single aspartyl residue of anti-epidermal growth factor receptor immunoglobulin gamma2 antibody highlights the role avidity plays in antibody activity, *Biochemistry* 47 (2008) 2518–2530, <https://doi.org/10.1021/bi7018223>.
- 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, <https://doi.org/10.1021/bc100261d>.
- I. Hötzel, F.-P. Theil, Bernstein L.J., S. Prabhu, Deng R., L. Quintana, J. Lutman, R. Sibia, P. Chan, D. Bumbaca, P. Fielder, P.J. Carter, R.F. Kelley, A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance, *mAbs* 4 (6) (2012) 753–760, <https://doi.org/10.4161/mabs.22189>.
- B. Li, D. Tesar, C.A. Boswell, H.S. Cahaya, A. Wong, J. Zhang, Y.G. Meng, Ch. Eigenbrot, H. Pantua, J. Diao, Sh.B. Kapadia, R. Deng, R.F. Kelley, Framework selection can influence pharmacokinetics of a humanized therapeutic antibody through differences in molecule charge, *mAbs* 6 (2014) 1255–1264, <https://doi.org/10.4161/mabs.29809>.
- K. Brorson, A.Y. Jia, Therapeutic monoclonal antibodies, and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality, *Curr. Opin. Biotechnol.* 30 (2014) 140–146, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.012>.
- 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, <https://doi.org/10.1002/biot.201600504>.
- Y. Mimura, R. Saldova, Y. Mimura-Kimura, P.M. Rudd, R. Jefferis, Microheterogeneity of antibody molecules, in: M. Pezer (Ed.), *Antibody glycosylation*. *Experientia Supplementum* 112, Springer, Cham, 2021, https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3_1.
- Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, et al., Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies, *mAbs* 4 (2012) 578585, <https://doi.org/10.4161/mabs.21328>.
- A.J. Chirino, A. Mire-Sluis, Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1383–1391, <https://doi.org/10.1038/nbt1030>.
- A.S. Rathore, Setting specifications for a biotech therapeutic product in the quality by design paradigm, *BioPharm. Int.* 23 (1) (2010) 46–53.
- M.M.C. van Beers, M. Bardor, Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins, *Biotechnol. J.* 7 (2012) 1473–1484, <https://doi.org/10.1002/biot.201200065>.
- S.K. Singh, Narula G, A.S. Rathore, Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes? *Electrophoresis* 37 (17–18) (2016) 2338–2346, <https://doi.org/10.1002/elps.201600078>.
- N. Alt, T.Y. Zhang, P. Motchnik, R. Taticek, V. Quarmby, T. Schlothauer, H. Beck, T. Emrich, R.J. Harris, Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles, *Biologicals* 44 (5) (2016) 291–305, <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2016.06.005>.
- 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, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.027>.
- M. Habberger, K. Bomans, K. Diepold, M. Hook, J. Gassner, T. Schlothauer, A. Zwick, C. Spick, J.F. Kepert, B. Hienz, M. Wiedmann, H. Beck, M. Melhoj, C. Knoblich, U. Grauschopf, D. Reusch, P. Bulau, Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies. Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes, *mAbs* 6 (2014) 327–329, <https://doi.org/10.4161/mabs.27876>.
- A. Beck, C. Nowak, D. Meshulam, K. Reynolds, David Chen, D.B. Pacardo, S. B. Nicholls, G.J. Carven, Z. Gu, J. Fang, D. Wang, Risk-based control strategies of recombinant monoclonal antibody charge variants, *Antibodies* 11 (2022) 73, <https://doi.org/10.3390/antib11040073>.
- B. Hintersteiner, N. Lingg, P. Zhang, S. Woen, K.M. Hoi, St. Stranner, S. Wiederkum, O. Mutschlechner, M. Schuster, H. Loibner, A. Jungbauer, Charge heterogeneity: basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors, *mAbs* 8 (2016) 1548–1560, <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1225642>.
- S. Miao, P. Xie, M. Zou, L. Fan, X. Liu, Y. Zhou, L. Zhao, D. Ding, H. Wang, W. Tan, Identification of multiple sources of the acidic charge variants in an IgG1 monoclonal antibody, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 101 (2017) 5627–5638, <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8301-x>.
- P. Dakshinamurthy, P. Mukunda, B.P. Kodaganti, B.R. Shenoy, B. Natarajan, A. Maliwalave, V. Halan, S. Murugesan, S. Maity, Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab, *Biologicals* 46 (2017) 46–56, <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2016.12.006>.
- B. Beyer, N. Walch, A. Jungbauer, N. Lingg, How similar is biosimilar? A comparison of Infliximab therapeutics in regard to charge variant profile and antigen binding affinity, *Biotechnol. J.* 14 (2018) 1800340, <https://doi.org/10.1002/biot.201800340>.
- S. Liu, A. Verma, H. Kettenberger, W.F. Richter, D.K. Shah, Effect of variable domain charge on in vitro and in vivo disposition of monoclonal antibodies, *mAbs* 13 (2021) 1993769, <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1993769>.
- S. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, J. Lee, M. Borys, Z.J. Li, Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 1646–1665, <https://doi.org/10.1002/bit.26587>.
- T.M. Fabst, 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.
- D. Farman, G.T. Moreno, Multiproduct high-resolution monoclonal antibody charge variant separations by pH gradient ion-exchange chromatography, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8846–8857.
- L. Zhang, T. Patapoff, D. Farman, B. Zhang, Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength, *J. Chromatogr. A* 1272 (2013) 56–64.
- 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, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.061>.
- G. Teshima, M.X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, J. Kung, V. Lahidji, J. Freeberg, Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2091–2097, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.107>.
- 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, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>.
- 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, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.032>.
- H.J. Lee, Ch.M. Lee, K. Kim, J.M. Yoo, S.-M. Kang, G.-S. Ha, M. Park, M.-A. Choi, B. L. Seong, D.E. Lee, Purification of antibody fragments for the reduction of charge variants using cation exchange chromatography, *J. Chromatogr. B* 1080 (2018) 20–26, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.030>.
- 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.
- S. Ahmed, N.N. Atia, A.H. Rageh, Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variants, *Talanta* 199 (2019) 347–354, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.082>.

- [40] 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, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116136>.
- [41] 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, <https://doi.org/10.1002/bit.21843>.
- [42] S. Vogg, N. Ulmer, J. Souquet, H. Broly, M. Morbidelli, Experimental evaluation of the impact of intrinsic process parameters on the performance of a continuous chromatographic polishing unit (MCSGP), *Biotechnol. J.* 14 (2019) 1800732, <https://doi.org/10.1002/biot.201800732>.
- [43] 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, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.035>.
- [44] 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, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.074>.
- [45] S.-Y. Jing, C. Shi, H.-Y. Leong, J.-J. Yuan, D. Gao, H.-B. Wang, S.-J. Yao, D.-Q. Lin, A novel twin-column continuous chromatography approach for separation and enrichment of monoclonal antibody charge variants, *Eng. Life Sci.* 21 (2021) 382–391, <https://doi.org/10.1002%2Felsc.202000094>.
- [46] Jing S.-Y., C. Shi, D. Gao, H.-B. Wang, S.-J. Yao, D.-Q. Lin, Improved process design for monoclonal antibody charge variants separation with multicolumn countercurrent solvent gradient purification, *J. Chromatogr. A* 1707 (2023) 464292, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464292>, 27.
- [47] C. Shi, X.-J. Chen, X.-Z. Zhong, Y. Yang, D.-Q. Lin, R. Chen, Realization of digital twin for dynamic control toward sample variation of ion exchange chromatography in antibody separation, *Biotechnol. Bioeng.* 121 (2024) 1702–1715, <https://doi.org/10.1002/bit.28660>.
- [48] A. Anupa, V. Bansode, N. Kateja, A.S. Rathore, A novel method for continuous chromatographic separation of monoclonal antibody charge variants by combining displacement mode chromatography and step elution, *Biotechnol. Prog.* 40 (2024) e3395, <https://doi.org/10.1002/btpr.3395>.
- [49] 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.
- [50] K. Baran, P. Zimoch, A. Stańczak, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1658 (2021) 462607, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462607>.
- [51] T. Rumanek, M. Kołodziej, W. Piątkowski, D. Antos, Preferential precipitation of acidic variants from monoclonal antibody pools, *Biotechnol. Bioeng.* 120 (2023) 114–124, <https://doi.org/10.1002/bit.28257>.
- [52] P. Zimoch, T. Rumanek, M. Kołodziej, W. Piątkowski, D. Antos, Coupling of chromatography and precipitation for adjusting acidic variant content in a monoclonal antibody pool, *J. Chromatogr. A* 1701 (2023) 464070, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464070>.
- [53] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Amsterdam The Netherlands, 2006. Hardback ISBN: 9780123705372; eBook ISBN: 9780080457222.
- [54] X. Xu, A.M. Lenhoff, Binary adsorption of globular proteins on ion-exchange media, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6177–6195, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.082>.
- [55] A. Lavoisier, J.M. Schlaeppli, Early developability screen of therapeutic antibody candidates using Taylor dispersion analysis and UV area imaging detection, *mAbs* 7 (2015) 77–83, <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.985544>.
- [56] V. Kumar, S. Leweke, W. Heymann, E. von Lieres, F. Schlegel, K. Westerberg, A. M. Lenhoff, Robust mechanistic modeling of protein ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1660 (2021) 462669, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462669>.
- [57] 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, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.076>.
- [58] 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, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.057>.
- [59] M.S. Ricardo, S.S. Rosa, R. Cunha, C.L. da Silva, A.M. Azevedo, A. Fernandes-Platzgummer, Anion exchange chromatography-based platform for the scalable purification of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells, *Sep. Purif. Technol.* 310 (2023) 123238, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123238>.
- [60] 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, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.020>.