

双柱周期性逆流色谱法纯化MAb的放大研究

James Angelo, John Pagano, Thomas Müller-Späth, Kathleen Mihlbachler, Srinivas Chollangi, Xuankuo Xu, Sanchayita Ghose, and Zheng Jian Li

周期性逆流(PCC)工艺越来越多地被评价为单柱批量捕获工艺的替代品。与单柱工艺相比，PCC工艺的一些优点包括通过提高生产率缩短处理时间和/或减少所需的树脂体积;通过提高树脂利用率，降低树脂成本;并通过增加列加载减少缓冲消耗。然而，这些优势伴随着设备复杂性和硬件成本的增加。提出了具有2至16列同类型的PCC工艺和系统。随着色谱柱数量的增加，过程变得更加复杂，可能会增加泵、检测器、阀门和管道。

本研究中研究的PCC工艺是CaptureSMB工艺:使用两柱和调制进料流量的PCC工艺。所有PCC流程都基于这样的概念，即加载超过其动态突破能力的第一个关联列，并捕获在相同类型的第二个关联列中突破的内容。因此，第一柱可以加载到50 - 80%的突破值，而在批量色谱中，通常加载到低于1%的突破值，以防止产品损失(1)。根据市售蛋白A树脂的吸附动力学和传质特性，在负载区连接两个以上的柱几乎没有改善性能(2,3)。

Baur等人基于数值优化比较了CaptureSMB、三列和四列PCC工艺的性能(4)。结果表明，所有格式都实现了较高的容量利用率(>95%)，这是意料之中的，因为所有格式都采用了上述两列串联加载。作者表明，在测试的三种格式中，CaptureSMB具有生产力优势，特别是低表达滴度和高表达滴度。。



Photo 1: Twin-column equipment Contichrom CUBE Combined (BENCHTOP SCALE, LEFT) and EcoPrime Twin (PILOT SCALE, RIGHT)

这是因为该过程的相互连接的加载阶段可以随着滴度的增加或减少而独立于其他过程步骤调整持续时间。图1概述了基于一个流程周期的CaptureSMB流程的原理。

在第一步中，两个关联列相互连接。第一柱加载超过其动态突破能力，其次是缓冲洗涤转移未结合的产品从第一柱到第二柱。

PRODUCT FOCUS: ANTIBODIES

PROCESS FOCUS: DOWNSTREAM PROCESSING

WHO SHOULD READ: PROCESS DEVELOPMENT AND MANUFACTURING

KEYWORDS: BATCH AND AFFINITY CHROMATOGRAPHY, CONTINUOUS CAPTURE, PROTEIN A, BUFFER CONSUMPTION

LEVEL: INTERMEDIATE

在第二步中，两个关联列作为单个列并行操作。当第一(超载)柱被洗涤、洗脱、清洗和重新平衡时，第二柱继续加载，直到达到1%的突破。第二柱的加载流速可以降低到与第一柱的恢复和再生同步。

在第三步中，第二列和第一列相互连接并按类似于第一步的顺序加载。

在第四步中，第二柱被洗涤、洗脱、清洗、重新平衡，同时继续在第一柱上装载。

在一个循环完成后，该过程可以在多个循环中继续进行。考虑到柱最初没有产品，具有附加负载的相互连接阶段(根据产品突

破曲线的知识计算)启动了周期性稳态过程。当过程关闭时，第一柱被洗涤、洗脱、清洁、重新平衡，而第二柱保持不活动(因为它在前一步中被清洁和重新平衡)。

先前进行的研究侧重于在实验室和台式规模上评估PCC工艺(5,6)。可扩展的多柱工艺主要用于制药应用，主要用于分离小的分子对映体(使用模拟移动床，SMB，色谱)(7,8)。

然而，生物制剂纯化要求的更大复杂性提出了SMB可扩展性的问题。生物制剂在活性药物成分(API)组成方面比小分子药物更具异质性，通常更容易降解和聚集，并且在起始原料中可能含有

复杂的产品和工艺相关杂质。

通常，需要几个正交的步骤，每个步骤由不同的分离机制组成，以纯化产品以达到目标规格。在这些步骤中，蛋白A捕获是去除单克隆抗体纯化中大多数过程相关杂质的主要工作。然而，由于蛋白A树脂的高成本以及在批量模式下操作的有限选择，亲和层析步骤已成为下游加工中最昂贵的步骤。CaptureSMB等PCC工艺通过在快速流速下实现高容量使用，克服了这一挑战。这里提供的数据证明了该工艺从台式到中试和生产规模的成功扩展。

材料与amp;方法

对于台式实验，使用 Contichrom CUBE Combined 30系统(ChromaCon, z<e:1> rich, Switzerland)。该系统可以运行单柱间歇工艺和双柱工艺，如CaptureSMB、双柱抛光(多柱溶剂梯度纯化，MCSGP)和集成的两步间歇色谱。中试运行使用了 ecprime Twin 100系统(LEWA-Nikkiso America, Inc.)。

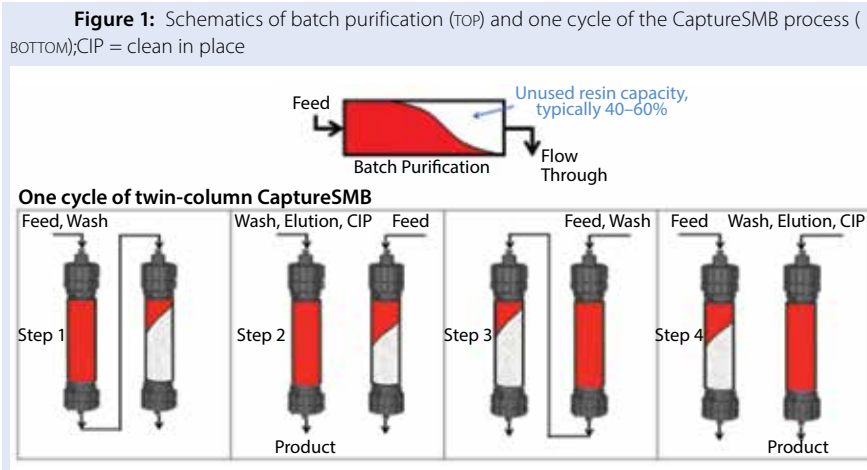


Figure 2: Protocol used for batch and CaptureSMB processes

Single-Column Operation			CaptureSMB Run 1				CaptureSMB Run 2			
Presanitization	3 CV	300 cm/h	Presanitization	3 CV	300 cm/h	3 CV	400 cm/h	Not cycled		
Equilibration	3 CV	300 cm/h	Equilibration	3 CV	300 cm/h	3 CV	400 cm/h			
Load	50 g/L	150 cm/h	Load	75 g/L	150 cm/h IC 30 cm/h parallel	75 g/L	150 cm/h IC 100 cm/h parallel	Cycled four times		
Wash 1	2 CV	300 cm/h	Wash 1	2 CV	300 cm/h	2 CV	400 cm/h			
Wash 2	5 CV	300 cm/h	Wash 2	5 CV	300 cm/h	4 CV	400 cm/h			
Wash 3	3 CV	300 cm/h	Wash 3	3 CV	300 cm/h	3 CV	400 cm/h			
Elution	0.5 OD-1.5 OD	300 cm/h	Elution	0.5 OD-1.5 OD 5 CV max	300 cm/h	0.5 OD-1.5 OD 3.5 CV max	400 cm/h	Not cycled		
CIP	3 CV	300 cm/h	CIP	3 CV	300 cm/h	3 CV	400 cm/h			
Neutralization 1	3 CV	300 cm/h	Reequilibration	5 CV	300 cm/h	4 CV	400 cm/h	Not cycled		
Sanitization	3 CV	300 cm/h	Sanitization	3 CV	300 cm/h	3 CV	400 cm/h			
Neutralization 2	3 CV	300 cm/h	Neutralization	3 CV	300 cm/h	3 CV	400 cm/h			
Storage	3 CV	300 cm/h	Storage	3 CV	300 cm/h	3 CV	400 cm/h			

Ecopprime Twin系统具有卫生设计，可以按照现行的良好生产规范(CGMP)标准进行生产。该系统还可以在单柱批处理模式和两柱互连续模式(例如AEX-CEX)下运行色谱。这两种系统都具有紫外线，电导率和pH值检测功能(图1，第一页)。

根据单独生成的突破曲线数据，CaptureSMB工艺设计使用Contichrom CUBE操作软件(ChromIQ)中包含的向导。根据输入的数据，向导生成CaptureSMB方法，包括所有阀门设置、加载、洗涤和再生流速，以及相应的启动和关闭方法。小规模实验用MabSelect SuRe LX树脂(GE Healthcare)填充两柱，尺寸为1.0 cm直径× 10.0 cm床高(每柱CV = 7.85 mL)。放大实验使用两根10.0 cm直径× 10.0 cm床高的柱(CV = 785 mL)，填充相同的树脂，柱体积放大系数为100倍。间歇式参比实验采用MabSelect SuRe LX树脂填充柱，柱高24.5 cm，柱高30 cm (CV = 17,300 mL)。每次运行的起始材料是含有IgG4的澄清细胞培养收获，滴度为5 g/L。图2显示了单列引用流程和CaptureSMB流程。

基于运行前生成的1%的突破数据，单柱间歇色谱的柱载量限制在50 g/L。负载流量和剩余步骤流量分别以最大负载能力和提高生产率为优化目标。进行了两次CaptureSMB运行，一次是“标准”运行，一次是“优化”运行(分别为run 1和run 2)。在标准运行中，除了负载能力和循环模式操作更高外，批处理模式色谱法和CaptureSMB色谱法之间的所有标度参数保持不变。在突破60%的基础上，负载能力优化到75 g/L，并

Figure 3: UV profiles (280 nm) at benchtop and pilot scale (Run 2), with arrows indicating the breakthrough of unbound monoclonal antibody

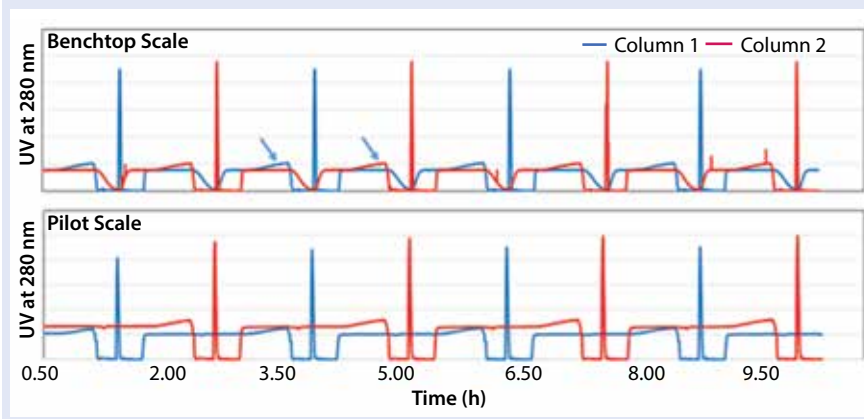
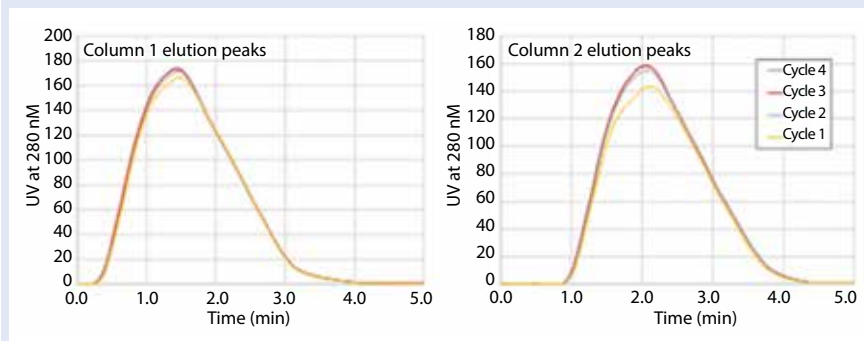


Figure 4: Elution peaks (see Table 1) overlaid: column 1 (LEFT) and column 2 (RIGHT)



增加了安全边际，以防止任何产品损失。

考虑到洗脱和再生柱所花费的时间长度，在优化运行中，并行模式(图1中的步骤2和4)的操作流速从300 cm/h增加到400 cm/h。因此，在标准操作中，加载流量增加到100 cm/h，而不是30 cm/h。在CaptureSMB中，由于层高较低，因此整个柱的背压较低，因此可以实现如此高的流速。结果，循环时间从230分钟减少到170分钟(总共4个循环)，使用的树脂总体积为1.57 l。两种运行都包括启动和关闭方法。相比之下，在17.3 l树脂总体积下，间歇色谱持续时间为260分钟。分别收集产品洗脱部分，分析滴度、宿主细胞蛋白(HCP)、DNA、浸出蛋白A配体(rProA)和聚集体含量。

结果

采用初始和优化后的工艺

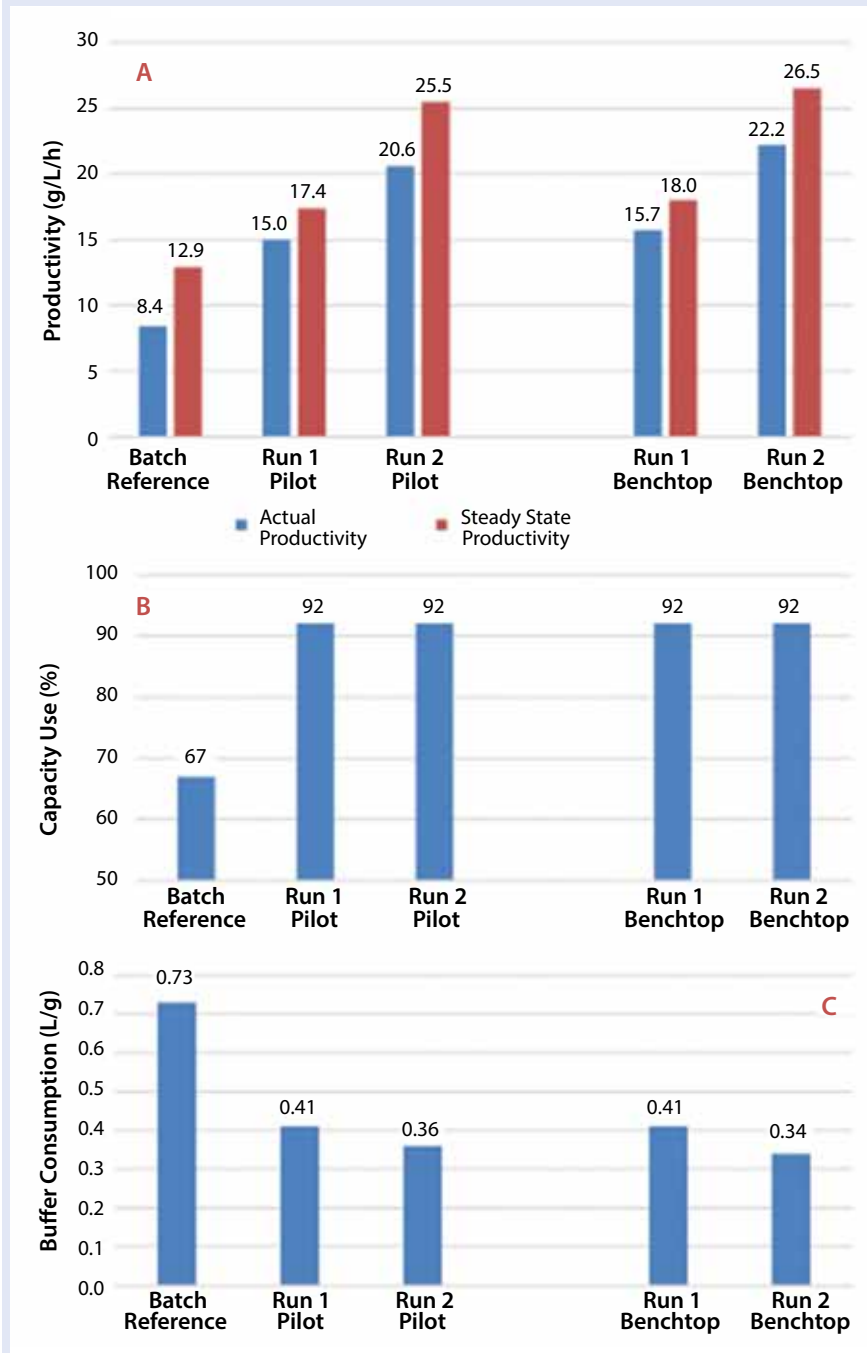
Table 1: Elution peak areas of column 1 and column 2 for Run 1 (pilot scale)

Peak Number	Column 1 Peak Area	Column 2 Peak Area
1	0.239	0.276
2	0.255	0.283
3	0.259	0.285
4	0.260	0.286
Average	0.258	0.285
Error %	1.1	0.6

* Does not include the first cycle

采用初始和优化后的工艺参数，在台式和中试工厂规模上进行了连续捕获色谱实验。两次运行的紫外谱图具有可比性(图3)。在两个尺度上，每根柱后面的紫外检测器记录了交替产物洗脱的重复模式(色谱图中的尖峰)。同样，紫外探测器记录了在相互连接的加载阶段的突破曲线。由于上游柱的高树脂利用率，在相互连接的加载阶段，不仅非结合杂质，而且MAb也从上游柱中突破。在突破曲线的最后部分(见箭头)可以

Figure 5: Productivity (A), capacity use (B), and buffer consumption (C) for pilot and benchtop scale CaptureSMB operation, along with batch reference performance calculations



通过上升的紫外信号来识别未结合的单克隆抗体，然后在下游柱上捕获。

图4显示了先导试验Run 1的洗脱峰，每个柱分别覆盖。轮廓几乎一模一样；由于启动加载阶段的预载荷近似，只有第一个峰值的面积略小。

表1列出了在每个柱上洗脱时收集的峰面积。紫外检测器校准中的一个小变化表明第1柱洗脱的面积值较小，但每个柱的值

可重复的，误差为1.1%或更小

在中试规模下，CaptureSMB的Run 1使用1.57 L蛋白A树脂在19小时内处理了澄清收获的约450 g产品。随着处理速度的提高，在第2次运行中，使用1.57 L蛋白a树脂在14小时内纯化了相同数量的产品(图2)。相比之下，间歇色谱使用17.3 L蛋白a树脂在3.5小时内捕获了相同数量的产品，但结合能力较低。这相当于在优化的CaptureSMB

运行中，与批量捕获色谱相比，生产率提高了约2.5倍(每升树脂每小时产生MAb克数)。对所有的台式和中试生产进行了生产率、产能使用(动态结合能力/静态结合能力)和缓冲液消耗(每克MAb生产使用的缓冲液升数)的评估(图5)。所有生产的收率均 94%。

在中试规模下，CaptureSMB的Run 1使用1.57 L蛋白A树脂在19小时内处理了澄清收获的约450 g产品。随着处理速度的提高，在第2次运行中，使用1.57 L蛋白a树脂在14小时内纯化了相同数量的产品(图2)。相比之下，间歇色谱使用17.3 L蛋白a树脂在3.5小时内捕获了相同数量的产品，但结合能力较低。这相当于在优化的CaptureSMB运行中，与批量捕获色谱相比，生产率提高了约2.5倍(每升树脂每小时产生MAb克数)。对所有的台式和中试生产进行了生产率、产能使用(动态结合能力/静态结合能力)和缓冲液消耗(每克MAb生产使用的缓冲液升数)的评估(图5)。所有生产的收率均 94%。

图5a显示了批量和连续运行的生产率。后者也显示了不同规模和工艺条件(运行1和2)。该图还显示了实际生产率(蓝色条)与稳态生产率(橙色条)的比较。报告的实际生产率值包括作业的启动和关闭，而不是运行的稳态阶段。在稳定状态下，产品的浓度和质量在每个循环中保持不变。

比较稳态值显示，在初始连续工艺(运行1)中，与传统批量工艺相比，生产率提高了1.8倍。进一步的工艺优化(运行2)将生产率提高了2.5倍。这些改进可以在两个尺度上看到。因此，在试验台上进行的初步可行性研究在中试规模上得到验证。我们在两个尺度上都

看到了类似的树脂使用效果，连续捕获的容量利用率从67%显著增加到92%(图5b)。与批量色谱法相比，缓冲液消耗(图5c)减少了50%。同样，在连续捕获期间，两种尺度获得了相似的结果。

在所有运行过程中，对收集的产物池进行产物浓度、HCP、DNA、rProA和高分子量(HMW)物种含量的分析。这些关键质量属性在批量和中试规模

CaptureSMB工艺中具有可比性(表2)。所有结果都在分析方法的分析可变性范围内。

在CaptureSMB Run 2中收集的洗脱峰样品的纯度使用ecprime Twin系统上的在线采样阀进行进一步分析。在CaptureSMB操作期间，不同洗脱之间的杂质值具有良好的一致性，在性能质量上没有显示出系统性偏差的迹象(表3)。该表显示了每个柱的结果(每个周期进行两次洗脱)，这解释了其他样品中值之间的一些振荡。对于该工艺，直到循环2才达到循环稳态，尽管运行开始时较低的产品浓度可归因于手动取样程序。通过引入自动采样和与之相关的Pats，可以降低采样的一致性。

讨论

双柱CaptureSMB工艺成功地从实验室规模扩大到中试规模100倍，用于捕获澄清细胞培养收获的单克隆抗体，具有相当的工艺性能和质量属性。

该工艺以5 g/L的滴度从收获材料中捕获MAb，表明该工艺可以与上游补料批一起使用，而不仅仅是与连续的细胞培养过程(例如灌注)一起使用。这是临床MAb生产的一个重要方面，其中连续上游步骤的快速实施可能取决于制造套件中的特定限制。

Table 2: Impurity results for batch and pilot scale CaptureSMB

Sample Name	Concentration (g/L)	HCP (ppm)	DNA (ppb)	rProA (ppm)	HMW %	CE-SDS Purity %
Batch Run (product pool)	31.3	447	56	16	3.0	99.8
Run 1 (product pool)	30.2	464	42	18	2.9	99.8
Run 2 (product pool)	28.0	500	55	7	2.9	99.8

Table 3: Impurity results from optimized pilot scale CaptureSMB operation (Run 2)

Sample Name	Concentration (g/L)	HCP (ppm)	DNA (ppb)	rProA (ppm)	HMW %	CE-SDS Purity %
Cycle 1-1	49.1	367	3	8	2.7%	96.3
Cycle 1-2	48.5	392	1	13	3.1%	96.4
Cycle 2-1	49.3	406	3	12	3.1%	96.5
Cycle 2-2	48.9	429	4	7	2.7%	96.1
Cycle 3-1	56.1	535	1	12	3.0%	96.4
Cycle 3-2	52.7	436	1	14	3.1%	97.3
Cycle 4-1	56.8	528	3	12	3.0%	97.3
Cycle 4-2	53.3	450	1	13	3.1%	97.9

如果处理细胞培养收获的节奏在间歇式工艺和CaptureSMB工艺之间保持相同，那么使用CaptureSMB工艺可以在36小时内处理一个20公斤(2000升生物反应器，滴度为10克/升)的理论临床批次，其中约25升树脂分布在两个40厘米直径和10厘米床高的预包装柱中。相反，使用单柱批处理将需要一个100l的柱，直径为80厘米(床高20厘米)，运行4个周期，耗时约36小时，消耗两倍的缓冲液。这个例子展示了CaptureSMB提高的生产效率如何支持使用更小的色谱柱，从而可能显著节省树脂。

此外，在临床生产环境中，蛋白A树脂通常在4或5批次(16 - 20个周期)后被闲置，直到重复生产发生-这通常不频繁。对于批量净化，这将导致整个树脂生命周期及其可用容量的严重不足。另外，CaptureSMB方法在每个临床生产活动中操作更小的色谱柱，周期更长(60 - 80个周期)。这再次转化为树脂的主要节省和树脂产能的有效利用。

一个有前景的方案

在这个扩大规模的研究中，使用PCC策略可以节省大约50%的缓冲。在20公斤单克隆抗体临床试验场景中，这将相当于节省约7400升。工艺验证的问题通常与PCC工艺一起提出。毫无疑问，流程验证工作随着列的数量成比例地增加。然而，初步的基于风险的验证概念设计表明，对于CaptureSMB操作(与使用更多列的列配置相比)，这项工作是可以管理的，因为批处理中使用的许多进程参数都可以直接扩展到CaptureSMB进程上。需要进一步的工作来证明该操作完全可以替代传统的批量处理，包括树脂寿命循环研究。基于uv的动态过程控制“AutomAb”已经在PD规模上运行，还需要在更大的规模上进行验证。CaptureSMB过程的病毒清除和携带研究已成功开展。

致谢

作者感谢Srujana Govindarajulu、Danielle Belluscio、Kevin Potter和Nicholas DiGioia对中试规模操作的帮助，并感谢Devens过程开发分析团队提供的分析支持。与苏黎世联邦理工学院(ETH z<e:l> rich)的Massimo Morbidelli教授和Daniel Baur博士的讨论也非常感谢。

参考文献

- 1 Mahajan V, George A, Wolk B. Improving Affinity Chromatography Resin Efficiency Using Semi-Continuous Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1227 (March 2012): 154–162; doi:10.1016/j.chroma.2011.12.106.
- 2 Baur D, et al. Optimal Model-Based Design of the Twin-Column Capture SMB Process Improves Capacity Utilization and Productivity in Protein A Affinity Capture. *Biotechnol. J.* 11(1) 2016: 135–145; doi:10.1002/biot.201500223.
- 3 Gjoka X, et al. A Straightforward Methodology for Designing Continuous Monoclonal Antibody Capture Multi-Column Chromatography Processes. *J. Chromatogr. A* 1416 (October 2015): 38–46; doi:10.1016/j.chroma.2015.09.005.
- 4 Baur D, et al. Comparison of Batch and Continuous Multi-Column Protein A Capture Processes By Optimal Design. *Biotechnol. J.* 11(7) 2016: 920–931; doi:10.1016/j.chroma.2015.09.005.
- 5 Godawat R, et al. Periodic Counter-Current Chromatography: Design and Operational Considerations for Integrated and Continuous Purification of Proteins. *Biotechnol. J.* 7(12) 2012: 1496–1508; doi:10.1002/biot.201200068.
- 6 Warikoo V, et al. Integrated Continuous Production of Recombinant Therapeutic Proteins. *Biotechnol Bioeng.* 109(12) 2012: 3018–3029.

7 Miller L, et al. Chromatographic Resolution of the Enantiomers of a Pharmaceutical Intermediate from the Milligram to the Kilogram Scale. *J. Chromatogr. A* 849(2) 1999: 309–317.

8 Juza M, Mazzotti M, Morbidelli M. Simulated Moving-Bed Chromatography and Its Application to Chirotechnology. *Trends Biotechnol.* 18(3) 2000: 108–116. 🌐

James Angelo and John Pagano are scientists, corresponding author **Srinivas Chollangi** is a senior scientist, **Xuankuo Xu** is a principal scientist, **Sanchayita Ghose** is a director, and **Zheng Jian Li** is the executive director at Bristol-Myers Squibb, Inc., 38 Jackson Rd, Devens, MA 01434, USA. **Thomas Müller-Späth** is COO at ChromaCon AG, Technoparkstr. 1, CH-8005 Zürich, Switzerland; and **Kathleen Mihlbachler** is global director of separations development at LEWA-Nikkiso America, Inc. Bioprocess Group, 8 Charlestown Street, Devens, MA 01434, USA.

To share this in PDF or professionally printed format, contact Jill Kaletha: jkaletha@mossbergco.com, 1-574-347-4211.