

曲妥珠单抗阳离子交换色谱过程机理模型建立及其应用

李乐仪¹, 阎续^{1,2}, 焦静雨², 高丹², 高栋², 瞿海斌^{1*}

(1. 浙江大学药学院, 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058; 2. 海正生物制药有限公司, 浙江 杭州 311404)

摘要: 阳离子交换色谱作为一种常用的生物制药分离和纯化技术, 常用于单抗的下游生产过程以分离电荷异质体。对于电荷异质体种类复杂、分离度低的样品, 基于紫外数据的收集方式无法明确各异质体的组成, 因此无法直接确定合并范围, 仍需进行繁琐的馏分分析来指导产品收集。本文对目标单抗关键组分的阳离子交换色谱过程建立机理模型, 并辅助于产品收集。该模型可以准确预测电荷异质体的洗脱峰形状, 且真实值与预测值的均方根误差小于0.009。与基于在线紫外的收集方式相比, 模型辅助收集方式不仅能够可视化洗脱过程, 并且在保证产品合格率的情况下可提高相对产率4倍。

关键词: 单克隆抗体; 曲妥珠单抗; 电荷异质体; 纯化; 机理模型

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1391-08

Mechanistic modeling for cation exchange chromatography process of trastuzumab and its application

LI Le-yi¹, YAN Xu^{1,2}, JIAO Jing-yu², GAO Dan², GAO Dong², QU Hai-bin^{1*}

(1. Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Hisun Biopharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311404, China)

Abstract: Cation exchange chromatography, as a commonly used separation and purification technique in biopharmaceutical manufacturing, is often employed for downstream processes to separate target monoclonal antibodies from their charge variants. For samples with complex and poorly resolved charge variant profiles, the collection solely based on ultraviolet detection does not provide specific compositional information for individual charge variants, making it challenging to determine the range of pooled fractions directly. Subsequent laborious fractionation analysis is then required to guide collection according to production requirements. A mechanistic model for the cation exchange chromatography process of the target monoclonal antibody's critical components was established, and it was employed to assist in product collection. The model accurately predicted the elution peak shapes of the modeled variants, with a root mean square error between predicted and actual values below 0.009. In comparison to the online ultraviolet-based collection method, the model-assisted collection method not only visualized the chromatographic process but also increased the relative productivity by fourfold while ensuring compliance rate.

Key words: monoclonal antibody; trastuzumab; charge variant; purification; mechanistic modeling

曲妥珠单抗 (trastuzumab) 作为第一个用于治疗实体瘤的人源化单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb)

通过抑制 PI3K/AKT 信号通路诱导机体产生免疫反应, 广泛用于乳腺癌等 HER2 阳性恶性肿瘤的治疗^[1-3]。在细胞表达、生产、储存、运输等环节中, 单抗分子会发生聚集、降解以及各类翻译后修饰, 从而导致产品表面电荷分布发生变化生成电荷异质体, 根据等电点 (pI) 的不同可分为酸性电荷异质体和碱性电荷异质体^[4-6]。

收稿日期: 2023-09-12; 修回日期: 2023-11-22.

基金项目: 浙江省重点研发计划 (2023C03116).

*通讯作者 Tel: 86-571-88208428, E-mail: quhb@zju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1042

对于曲妥珠单抗而言,不同电荷异质体组成的产品与HER2基因的结合能力不同,从而影响抗增殖作用^[7]。由于专利时限以及经济效益,曲妥珠单抗生物类似药快速发展,因此为保证产品实际疗效,需严格控制产品中电荷异质体的比例^[8]。

在生物制药下游纯化工艺的环节中,色谱过程是提升生产效率的首选优化对象^[9],其中阳离子交换色谱(cation exchange chromatography, CEX)常用于分离单抗的电荷异质体。已有研究表明有多种方法可用于优化CEX工艺。早期通过实验设计方法(design of experiment, DoE)建立操作参数、缓冲液条件等工艺条件与纯度、产率等目标之间的统计模型,这种方法不需要深入的理论理解,但需进行多次试验,易造成时间和资源浪费^[10-12]。随着计算机计算能力的迅速提升,基于物理化学原理的机理模型方法得到了极大发展。由传质方程和吸附等温线方程组成的偏微分方程组能够在较短的时间内获得数值解,从而加速过程优化,推动生产工艺开发^[13-16]。已有研究表明,机理模型在辅助单抗分离过程中具有应用潜力,可用于树脂结合能力预测^[17-19]、聚体与异质体分离^[20-26]以及过程优化^[27-30]。针对电荷异质体分离过程建模,通常选用标准蛋白^[25,26]或经过预纯化处理以便人为控制比例的样品^[22-24]。但受到原料量、样品保存时间等因素制约,预纯化步骤可能难以进行,使用原始物料进行建模的研究尚未见报道。

通用速率模型(general rate model, GRM)考虑色谱柱内轴向和颗粒内径向的质量传递,涵盖对流传质、轴向扩散、膜扩散、孔扩散等影响因素最全面,而经常用于复杂色谱过程建模^[31-33]。空间质量作用等温线(steric mass action, SMA)由化学计量学方法推导而来,常用于描述单抗色谱分离过程中流动相、树脂吸附剂和溶质间的吸附作用^[34-36]。

本研究针对未进行预纯化处理的曲妥珠单抗生物类似药HS022生产中间体,使用GRM和SMA建立阳离子交换色谱过程的机理模型,实现关键组分洗脱行为的模型表征。并根据模型预测值有效指导馏分合并范围,辅助产品收集,在保证产品合格率的情况下提高相对产率4倍。

材料与方法

原料与试剂 HS022经阴离子交换色谱处理后得到的洗脱液(批号22002,由海正生物制药有限公司提供,样品不进行单独的纯化处理)。醋酸盐(批号RH408179,上海易恩化学技术有限公司罗恩试剂)、磷酸盐(批号J2123631,上海阿拉丁生化科技股份有限

公司)、氯化钠(批号C14845080,上海麦克林生化科技有限公司)配置相应离子强度缓冲液作洗脱液。蓝色葡聚糖2000(批号528E054,北京索莱宝科技有限公司)、丙酮(批号20200128,国药集团化学试剂有限公司)配置相应浓度作示踪剂。氢氧化钠(批号20210730,国药集团化学试剂有限公司)配置相应浓度作再生与清洗用途。

仪器设备 AKTA pureTM 25 L蛋白纯化仪(Cytiva,美国)配有20 μ L的进样环、电导率监测器、紫外检测器(波长280 nm,光程0.2 cm)、圆形组分收集器F9-R以及UNICORN 7.0控制系统;10 mm \times 400 mm的Generik FPLC空柱(苏州赛分科技有限公司)填有25.5 cm高Poros HS50树脂(Thermo Fisher Scientific,美国);150 mL Highloop超级定量环(苏州采石仪器有限公司);Spark多功能酶标仪(TECAN,瑞士);Centrifuge 5424型高速离心机(Eppendorf,德国);ProPac WCX-10 4 mm \times 250 mm柱(Thermo Fisher Scientific,美国);Agilent 1260高效液相色谱仪(Agilent,美国);Milli-Q Synthesis水纯化系统(Merck,德国)。

阳离子交换色谱实验 首先,使用流动相A(醋酸盐缓冲液,pH 5.5)和流动相B(醋酸盐缓冲液,pH 5.5)平衡色谱柱至电导稳定后,上样载量为15.4 mg \cdot mL⁻¹的样品。进行平衡与预洗后,采用线性梯度洗脱。当紫外检测器记录的数值达到40 mAU时,组分收集器开始接样,每个馏分收集1 mL,直到紫外数据低于40 mAU时停止接样。最后,使用0.5、1 mol \cdot L⁻¹氢氧化钠溶液进行色谱柱的再生与保存。

具体实验条件通过DoE确定,固定pH为5.5,研究流速和洗脱体积对主成分纯度大于65%时的相对产率和产品合格率的影响。控制流速在2.12 \times 10⁻⁴~4.25 \times 10⁻⁴ m \cdot s⁻¹之间,洗脱体积在4个柱体积(column volume, CV)到6个柱体积之间变化,进行2因子2水平3个中心点的全因实验设计,共7次实验。此外,为了避免吸附参数多解问题还额外进行了上样量为3.85 mg \cdot mL⁻¹的阶梯式梯度洗脱实验^[23,37],详细的实验条件见表1。

分析实验 馏分经12 000 r \cdot min⁻¹转速离心10 min后,取上清液,采用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA),根据酶标仪562 nm波长的紫外吸光度测定各个馏分的总蛋白浓度。并据此稀释每个样品至1 mg \cdot mL⁻¹后进行高效液相色谱分析(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。使用流动相A(磷酸盐缓冲液,pH 7.5)和流动相D(磷酸盐缓冲液,pH 7.5)进行线性梯度洗脱,紫外检测波长214 nm,每针进样50 μ L,体积流速0.8 mL \cdot min⁻¹,柱温25 $^{\circ}$ C。对色谱图

Table 1 Experimental condition of the cation exchange chromatography. CV: Column volume

Elution mode	Number	Velocity / $\times 10^{-4} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	Volume /CV	Loading / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
Linear gradient	1	4.25	4	15.4
	2	4.25	6	15.4
	3	2.12	4	15.4
	4	2.12	6	15.4
	5	3.18	5	15.4
	6	3.18	5	15.4
	7	3.18	5	15.4
Step	8	4.25	5	3.85

进行手动积分, 结合参比品建立的标准曲线计算每个馏分中各电荷异质体的浓度, 浓度数据将用于吸附参数的确定^[23,38]。

评价标准^[37,39,40]

纯度 纯度 P 为各种类电荷异质体峰面积 A_i ($i = \text{Acid, M, Basic}$) 占总峰面积 A_{All} 的比例 (式 1)。生产要求酸性电荷异质体应小于 25%, 碱性电荷异质体应小于 15%, 主成分应大于 65%。

$$P = \frac{A_i}{A_{\text{All}}} \quad (i = \text{Acid, M, Basic}) \quad (1)$$

相对产率 相对产率 (relative productivity, RP) 为单位收集时间 t 单位柱体积 CV 内满足生产要求的主成分的质量 (式 2)。

$$\text{RP} = \frac{m_{\text{M}}}{\text{CV} \cdot t} \quad (2)$$

产品合格率 产品合格率 (compliance rate, CR) 为满足生产要求的主成分的质量 m_{M} 占收集到的主成分的质量 $m_{\text{M_POOL}}$ 的比例 (式 3)。

$$\text{CR} = \frac{m_{\text{M}}}{m_{\text{M_POOL}}} \quad (3)$$

建模方法

色谱柱模型 利用 GRM 描述溶质分子在色谱柱中流动相和填料颗粒孔隙间的质量平衡。考虑一个孔隙率为 ε_c , 长度为 L , 充满了半径为 r_p 的球形填料颗粒的色谱柱。沿着柱子的轴向距离 x , 溶质分子在液相中经历对流传质和轴向扩散进行质量传递, 与此同时填料颗粒周围的停滞膜造成的相间传质不可忽视, 见式 4、5。

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + u_{\text{int}} \frac{\partial c_i}{\partial x} + \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} k_{\text{film}} \frac{3}{r_p} \left[(c_i - c_{p,i}) \left(r = r_p \right) \right] = D_{\text{ax}} \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} \quad (4)$$

式中, c_i 是组分 i 在液体相中的间隙浓度, $c_{p,i}$ ($r = r_p$) 是组分 i 在填料颗粒表面液体相中的浓度, 其中 $i \geq 0$, 当 $i = 0$ 时, 代表盐组分, 下同。 u_{int} 、 k_{film} 和 D_{ax} 分别代

表间隙流速、膜传质系数和轴向扩散系数。

考虑一个颗粒孔隙率为 ε_p 的球形填料颗粒, 沿着颗粒内的径向距离 r , 考虑溶质分子在颗粒内仅发生孔扩散, 见式 5。

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p) \frac{\partial q_i}{\partial t} = \varepsilon_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 D_p \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} \right) \quad (5)$$

式中, $c_{p,i}$ 代表组分 i 在颗粒间隙液体相中的浓度, 而 q_i 代表组分 i 与填料颗粒的结合浓度。 D_p 代表填料颗粒孔隙中的孔扩散系数。

最后确定边界条件便于后续求解, 如式 6~9 所示。

$$c_i(t, x = 0) = c_{\text{in},i}(t) - \frac{D_{\text{ax}}}{u_{\text{int}}} \frac{\partial c_i(t, x = 0)}{\partial x}, t \geq 0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial x}(t, x = L) = 0, t \geq 0 \quad (7)$$

$$\frac{\partial c_{p,i}}{\partial r}(t, x, r = 0) = 0, t \geq 0 \ \& \ x \in [0, L] \quad (8)$$

$$\frac{\partial c_{p,i}}{\partial r}(t, x, r = r_p) = \frac{k_{\text{film}}}{\varepsilon_p D_p} (c_i(x, t) - c_{p,i}(x, r_p, t)), t \geq 0 \ \& \ x \in [0, L] \quad (9)$$

吸附等温线模型 利用 SMA 描述溶质分子在流动相与填料颗粒间的吸附作用, 组分 i 在填料颗粒表面的浓度随时间的变化 $\frac{\partial q_i}{\partial t}$ 由式 10、11 给出。

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{\text{a},i} \left(\Lambda - \sum_{j=1}^n (v_j + \sigma_j) q_j \right) c_{p,i} - k_{\text{d},i} q_i c_{p,0}^v \quad (10)$$

$$q_0 = \Lambda - \sum_{i=1}^n v_i q_i \quad (11)$$

式中, 指 q_i 组分 i 与填料颗粒的结合浓度, $c_{p,i}$ 指组分 i 在颗粒间隙液体相中的浓度。填料离子容量 Λ 、蛋白质的特征电荷数 v_i 和屏蔽因子数 σ_i , 以及吸附速率常数 $k_{\text{a},i}$ 和解吸速率常数 $k_{\text{d},i}$ 均是影响平衡的因素。

数值解法 由 GRM 和 SMA 构成的偏微分方程通过开源软件包色谱分析和设计工具包 (chromatography analysis and design toolkit, CADET) 进行求解^[13]。CADET 采用有限体积法及具有可变步长和阶数的向后微分公式对方程进行离散化求解^[41]。软件包集成了多种计算技术, 以实现最大的求解器性能, 并已在离子交换色谱建模中得到广泛应用^[23,38,42,43]。

参数确定 建模所需参数可大致分为两类, 一类可通过实验、关联公式换算得到, 例如柱参数和传质参数, 一类则可通过逆方法拟合得到, 例如吸附参数。

对于柱参数, 柱长 L 、柱径 D 以及填料颗粒直径 d_p 通过产品说明书获得, 柱孔隙率 ε_c 、颗粒孔隙率 ε_p 使用不同的示踪剂由体积排阻层析法 (size exclusion chromatography, SEC) 实验测定^[31,33,44], 离子容量 Λ 通过酸碱滴定实验测定^[35,45,46], 具体实验条件见表 2。

对于传质参数, 轴向扩散系数 D_{ax} 通过等板高度

(height equivalent of theoretical plate, HETP) 获得^[35,36,47], 膜扩散系数 k_{film} 与孔扩散系数 D_p 使用关联方程换算得到^[48,49], 具体方程见表 2。

对于吸附参数, 特征电荷值 v_i 、屏蔽因子 σ_i 和吸附速率常数 $k_{a,i}$ 利用逆方法通过最小化实验数据和模拟数据之间的误差确定。为了减少计算难度, 属于同一样品的不同电荷异质体的屏蔽因子被设定为相同的值, 且 $k_{a,i}$ 值设定为 1^[33,37,38]。拟合时, 首先设定初始值并调用 CADET 求解器进行一次正向模拟, 其次利用 CADET-MATCH 中的非支配排序遗传算法, 在给定的搜寻范围内对实验数据与模拟数据进行多目标优化。使用标量值峰形 (shape) 作为得分指标 (scores) 逐步缩小搜寻范围, 并根据残差平方和 (sum of squares due to error, SSE) 筛选参数^[50], 具体流程见图 1。

结果与讨论

1 CEX 实验结果

1.1 上样样品及建模组分选择 上样液经 HPLC 分析后得到的电荷异质体分布情况如图 2 所示。手动积分表明, 上样液中含有 24.62% 的酸性电荷异质体, 53.07% 的主成分, 以及 22.31% 的碱性电荷异质体。从图 2 中可知, 样品电荷异质体种类多且分离度低。选择与主成分洗脱时间最接近的组分进行建模, 可对后续产品收集提供数据支持^[23,38,51]。在选择建模组分时, 由 HPLC 积分结果组成的浓度峰轮廓应近似呈高斯对称, 若不同电荷异质体合并浓度峰轮廓近似呈高斯对称则合并为同一组分^[20,23,38,50,51]。最终确定 A、M 和 B 三组分用于建模, 分别是酸性电荷异质体中第四个酸性电荷异

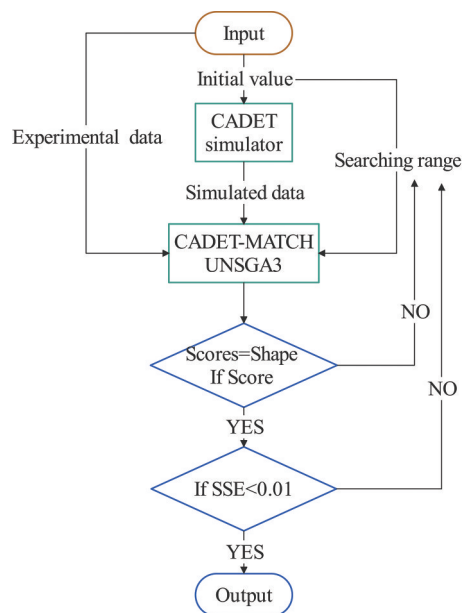


Figure 1 Flow of the inverse method to fit the adsorption parameters. CADET: Chromatography analysis and design toolkit; CADET-MATCH: Chromatography analysis and design toolkit - parameters matching; UNSGA3: Undefined and non-dominated sorting genetic algorithm-III; SSE: Sum of squares due to error

质体 A4 作为 A, 主成分作为 M, 碱性电荷异质体中前两个碱性电荷异质体 B1 和 B2 合并为 B。

1.2 洗脱实验 实验 1 洗脱时段所接馏分中建模组分的浓度及紫外吸收数据如图 3 所示。从图 3 中可见, 紫外吸收曲线呈现一个大的吸收峰, 表明各个电荷异质体未实现基线分离且具体组成无法确定^[37]。在 210 min 左右处的小峰则表明碱性电荷异质体实现了部分分离,

Table 2 Measured and calculated parameters

Parameter	Proceeding	Equation
D	From manufacturer	-
L	From manufacturer	-
d_p	From manufacturer	-
ε	1% Acetone as tracer performed pulse injection without and with column to get system dead volume V_d and acetone retention volume and V_{Re_Ace}	$\varepsilon = \frac{(V_{Re_Ace} - V_d)}{V_{col}}$ ($V_{col} = \frac{\pi D^2}{4} \cdot L$)
ε_c	1 mol·L ⁻¹ Dextran as tracer performed pulse injection with column to get dextran retention volume V_{Re_Dex}	$\varepsilon_c = \frac{(V_{Re_Dex} - V_d)}{V_{col}}$
ε_p	Formula conversion	$\varepsilon = \varepsilon_c + (1 - \varepsilon_c)\varepsilon_p$
A	The column was first stabilized through HCl and water flushing, then titrated with 0.1 mol·L ⁻¹ NaOH until a conductivity increase was observed, denoted as V_{NaOH}	$A = \frac{1000 \cdot c_{NaOH} \cdot (V_{NaOH} - V_d - V_e)}{V_c}$ ($V_e = V_{col}(1 - \varepsilon)$)
D_{ax}	Peak integration in dextran pulse injection	$D_{ax} = \frac{u_{int} \cdot \text{HETP}}{2}$ HETP: Height equivalent of theoretical plate
k_{film}	Wilke Chang equation correlation & penetration correlation	$D_m = 2.74 \times 10^{-9} M^{-\frac{1}{3}}$ $k_{\text{film}} = \sqrt{\frac{4D_m u}{\pi d_p}}$ ($M = 148 \text{ kDa}$)
D_p	Mackie and Meares correlation	$D_p = \left(\frac{\varepsilon_p}{2 - \varepsilon_p} \right) D_m$

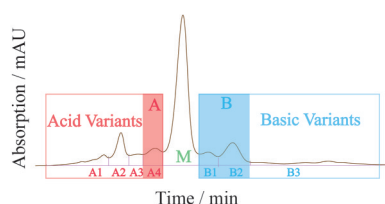


Figure 2 Results of HPLC analysis of the loading samples. Axes scale hidden for confidentiality reasons

这与组分 B 浓度峰轮廓与组分 M 相比有向右偏移的趋势一致^[23]。在 DoE 设定范围内改变流速与洗脱梯度, 均不能实现电荷异质体的基线分离, 仅凭紫外数据无法确定各个电荷异质体的具体组成。

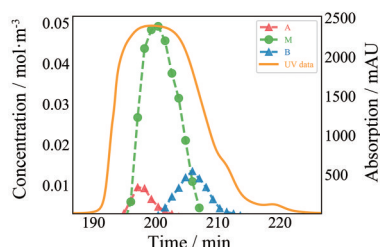


Figure 3 Reconstructed concentration profile using fractionated elution pool and UV trace from Experiment 1 at the elution times

2 机理模型

2.1 参数确定 表3所示为建模所需的参数及其数值符号。对于吸附参数, 选择实验1、4、5、8的浓度数据进行逆拟合, 因其涵盖流速与洗脱体积范围可有效保证模型的适用性, 并且选择不同的洗脱模式可以有效

避免多解问题^[23,37,38]。根据结果可知, 特征电荷数随着保留时间的增加而逐渐变大, 即数值排序 $A < M < B$, 符合规律, 这也验证了之前合并 B1 和 B2 作为同一组分是合理的^[33,38]。同时, A 与 M 的特征电荷数值差距较小, 难以获得基线分辨率^[38], M 与 B 的特征电荷数值之差大于 0.5, 这与图3中 B 的浓度峰轮廓分离较明显一致。

Table 3 Parameters for the modeling

Parameter	Symbol	Value	Unit	
Column parameter	D	0.01	m	
	L	0.255	m	
	d_p	$1.0e^{-4}$	m	
	ε	0.72		
	ε_c	0.41		
Mass transfer coefficient	A	276.06	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$	
	D_{ax}	$9.08e^{-8}$	$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$	
	k_{film}	$2.37e^{-5}$	$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$	
	D_p	$1.50e^{-11}$	$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$	
Adsorption parameter		A	M	B
	ν	8.90	9.29	10.46
	k_a	2.03	3.03	5.97
	σ	32.02		

2.2 模型预测 利用模型对实验集中未进行参数拟合的实验进行预测, 实验2、3、6、7洗脱时段所接馏分中建模组分的浓度值与模型预测值对比如图4所示。从图4中可见, 流速在 $2.12 \times 10^{-4} \sim 4.25 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ 之间, 洗脱体积在 4~6 CV 之间, 模型很好地预测了建模组分洗脱峰的形状, 预测值与真实值的均方根误差 (root mean square error, RMSE) 小于 0.009。部分数据之间

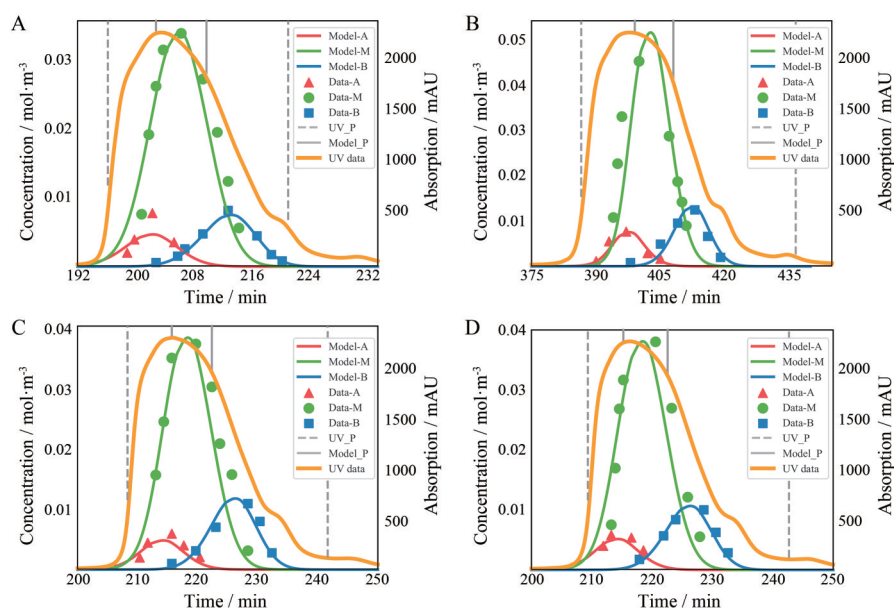


Figure 4 Concentration of modelled components in the fractions received during the elution periods of experiments 2 (A), 3 (B), 6 (C) and 7 (D) versus predicted values and collection time points based on different judgement criteria. UV_P: Pool range based on UV data (gray dashed line); Model_P: Pool range with model assistance (gray solid line)

的差异可能由两个原因引起。一是分析过程中采用手动积分造成的计算误差。其次,系统死体积与柱参数基于示踪试剂的滞留量确定,受样品量限制未进行实验考察管道内的实际扩散所带来的影响^[44]。对于目标样品生产优化目的是控制不同电荷异质体的比例在一定范围内,并不深究各个电荷异质体的确切浓度,因此该模型在一定程度上可以起到预测作用。

3 收集方式

3.1 基于紫外的收集方式 在实际生产中,产品的收集节点完全依据紫外数据进行判断。具体而言,当实时记录的UV数值超过500 mAU时开始收集,每个馏分收集1 mL,当洗脱液体积达到2.8 CV时停止收集,如图4中的灰色虚线所示。由于紫外数据无法准确反映各个电荷异质体的具体组成,直接合并馏分得到的产品可能无法完全符合生产要求。因此,为了选择符合纯度要求的产品,需要进行繁琐的浓度测定和HPLC分析。基于紫外数据收集产品,模型预测集实验的相对产率与产品合格率如图5所示。这种收集方式无法直接指导馏分合并的范围,而且收集范围广,需分析的馏分数量多,易造成人力和物力损失。

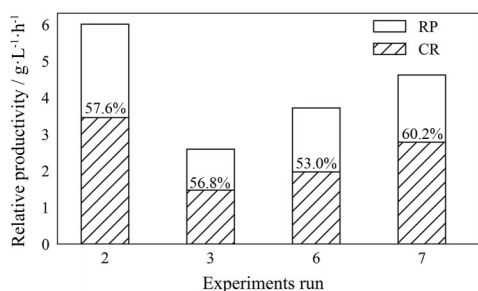


Figure 5 RP and CR of each experiment based on UV data collection. RP: Relative productivity; CR: Compliance rate

3.2 基于模型的收集方式 为了提高产品收集的效率,可借助机理模型,在合并馏分前预测各组分的浓度比例,从而有选择地收集符合生产要求的馏分。模型辅助产品收集的流程如图6所示,首先,可调用求解器进行正向模拟得到各组分浓度随时间变化的曲线,并以0.1 s为间隔计算各建模组分的纯度;其次,利用filtered函数选择符合纯度要求的时间点后将其作为合并馏分的起始点,并通过matpilot实现可视化,如图4中的灰色实线所示。实际应用时,预测时间段内馏分可直接合并,起始点处可选取2个馏分进行HPLC分析,以防造成产品损失。这种收集方式可直接指导馏分收集范围,减少了馏分HPLC分析的数量,从而有效降低实验成本。基于模型收集产品,模型预测集实验的相对产率与产品合格率如图7所示。因样品分离度

低,并非所有电荷异质体都被建模,因此需要根据参比品中A、M、B所占比例确定筛选要求,在本实验中选择了A < 16%、M > 74%和B < 25%的纯度要求。以实验2为例,不同收集方式下,相对产率由6.0039 g·L⁻¹·h⁻¹增长至24.4643 g·L⁻¹·h⁻¹。对比发现,模型辅助产品收集在保证产品合格率的同时,可提高相对产率,并且减少了HPLC分析的工作量。

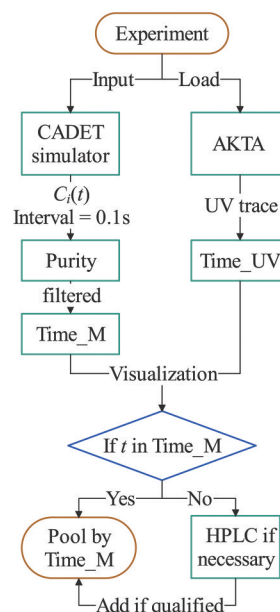


Figure 6 Flow of model-assisted product collection. AKTA: Protein purification apparatus; Time_M: Time point for the merged fractions determined based on model prediction; Time_UV: Time point for the merged fractions determined based on UV data

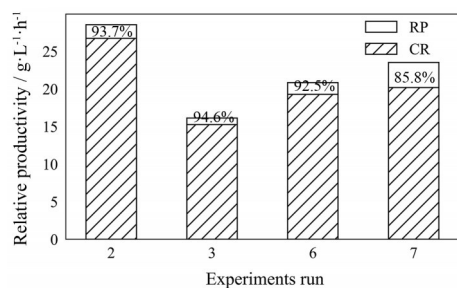


Figure 7 RP and CR of each experiment based on model-assisted collection

结论

本研究对曲妥珠单抗的阳离子交换色谱分离电荷异质体过程建立了机理模型。结果表明,由GRM与SMA构成的模型可预测色谱柱中关键组分的洗脱行为,预测值与真实值间的均方根误差小于0.009。同时,提出了一种模型辅助的产品收集方式,该方式可直接指导馏分合并,有效地降低了实验成本,成功提高相对产率4倍。研究为单抗电荷异质体洗脱行为数字化

表征提供了基础,可望用于单抗电荷异质体分离工艺条件优化及馏分收集策略制定。后续研究中,可考虑考察管道内的实际扩散的影响,从而提高模型预测性能,以期优化阳离子交换层析实际生产工艺提供可行方法。

作者贡献: 李乐仪负责实验工作、数据处理及文章撰写、修改; 阎续负责数据处理指导、写作指导及文章修改; 焦静雨负责提供原料、参比品等样品; 高丹、高栋负责工艺技术支持, 瞿海斌负责选题指导与文章修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Hassing CMS, Nielsen DL, Knoop AS, et al. Adjuvant treatment with trastuzumab of patients with HER2-positive, T1a-bN0M0 breast tumors: a systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2023, 184: 103952.
- [2] Pernas S, Barroso-Sousa R, Tolancy SM. Optimal treatment of early stage HER2-positive breast cancer [J]. *Cancer*, 2018, 124: 4455-4466.
- [3] Rugo HS. Chapter 14 - Biosimilars for HER2-positive breast cancer [M]//*Her2-Positive Breast Cancer*. Missouri: Elsevier, Inc., 2019: 231-237.
- [4] Liu H, Gaza-Bulsecu G, Faldu D, et al. Heterogeneity of monoclonal antibodies [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97: 2426-2447.
- [5] Brorson K, Jia AY. Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30: 140-146.
- [6] Vlasak J, Ionescu R. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9: 468-481.
- [7] Dakshinamurthy P, Mukunda P, Prasad Kodaganti B, et al. Charge variant analysis of proposed biosimilar to trastuzumab [J]. *Biologicals*, 2017, 46: 46-56.
- [8] Blackwell K, Gligorov J, Jacobs I, et al. The global need for a trastuzumab biosimilar for patients with HER2-positive breast cancer [J]. *Clin Breast Cancer*, 2018, 18: 95-113.
- [9] Matte A. Recent advances and future directions in downstream processing of therapeutic antibodies [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 8663.
- [10] Mandenius CF, Brundin A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology [J]. *Biotechnol Prog*, 2008, 24: 1191-1203.
- [11] Kumar V, Bhalla A, Rathore AS. Design of experiments applications in bioprocessing: concepts and approach [J]. *Biotechnol Prog*, 2014, 30: 86-99.
- [12] Shekhawat L K, Godara A, Kumar V, et al. Design of experiments applications in bioprocessing: chromatography process development using split design of experiments [J]. *Biotechnol Prog*, 2019, 35: e2730.
- [13] Leweke S, Lieres EV. Chromatography analysis and design toolkit (CADET) [J]. *Comput Chem Eng*, 2018, 113: 274-294.
- [14] Jäpel RC, Buyel JF. Bayesian optimization using multiple directional objective functions allows the rapid inverse fitting of parameters for chromatography simulations [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1679: 463408.
- [15] Hahn T, Huuk T, Heuveline V, et al. Simulating and optimizing preparative protein chromatography with chromX [J]. *J Chem Educ*, 2015, 92: 1497-1502.
- [16] de Sousa PLR, Tavares PAS, Teixeira EMTS, et al. Experimental designs for optimizing the purification of immunoglobulin G by mixed-mode chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1125: 121719.
- [17] Pfister D, David L, Holzer M, et al. Designing affinity chromatographic processes for the capture of antibodies. Part I: a simplified approach [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1494: 27-39.
- [18] Pabst TM, Thai J, Hunter AK. Evaluation of recent protein A stationary phase innovations for capture of biotherapeutics [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1554: 45-60.
- [19] Ghose S, Nagrath D, Hubbard B, et al. Use and optimization of a dual-flowrate loading strategy to maximize throughput in protein - a affinity chromatography [J]. *Biotechnol Prog*, 2004, 20: 830-840.
- [20] Guélat B, Khalaf R, Lattuada M, et al. Protein adsorption on ion exchange resins and monoclonal antibody charge variant modulation [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1447: 82-91.
- [21] Kluters S, Wittkopp F, Jöhnck M, et al. Application of linear pH gradients for the modeling of ion exchange chromatography: separation of monoclonal antibody monomer from aggregates [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39: 663-675.
- [22] Khanal O, Kumar V, Westerberg K, et al. Multi-column displacement chromatography for separation of charge variants of monoclonal antibodies [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1586: 40-51.
- [23] Kumar V, Rathore AS. Mechanistic modeling based pat implementation for ion-exchange process chromatography of charge variants of monoclonal antibody products [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12: 1700286.
- [24] Tao Y, Chen N, Carta G, et al. Modeling multicomponent adsorption of monoclonal antibody charge variants in cation exchange columns [J]. *AIChE J*, 2012, 58: 2503-2511.
- [25] Huuk TC, Hahn T, Osberghaus A, et al. Model-based integrated optimization and evaluation of a multi-step ion exchange chromatography [J]. *Sep Purif Technol*, 2014, 136: 207-222.
- [26] Nagrath D, Messac A, Bequette BW, et al. A hybrid model framework for the optimization of preparative chromatographic processes [J]. *Biotechnol Prog*, 2008, 20: 162-178.
- [27] Mollerup JM, Hansen TB, Kidal S, et al. Development, modeling, optimisation and scale-up of chromatographic purification of a therapeutic protein [J]. *Fluid Phase Equilib*, 2007, 261:

- 133-139.
- [28] Steinebach F, Angarita M, Karst DJ, et al. Model based adaptive control of a continuous capture process for monoclonal antibodies production [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1444: 50-56.
- [29] Ng CKS, Osuna-Sanchez H, Valéry E, et al. Design of high productivity antibody capture by protein A chromatography using an integrated experimental and modeling approach [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 899: 116-126.
- [30] Kaltenbrunner O, Diaz L, Hu X, et al. Continuous bind-and-elute protein A capture chromatography: optimization under process scale column constraints and comparison to batch operation [J]. *Biotechnol Prog*, 2016, 32: 938-948.
- [31] Michel M, Epping A, Jupke A. Modeling and determination of model parameters [M]//*Preparative Chromatography*. Weinheim: John Wiley & Sons, Inc., 2005: 215-312.
- [32] Guiochon G, Shirazi DG, Felinger A, et al. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography* [M]. 2nd Ed. San Diego: Academic Press, 2006.
- [33] Hunt S, Larsen T, Todd RJ. Modeling preparative cation exchange chromatography of monoclonal antibodies [M]//*Preparative Chromatography for Separation of Proteins*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2017: 399-427.
- [34] Staby A, Rathore AS, Ahuja S. *Preparative Chromatography for Separation of Proteins* [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2017.
- [35] Brooks CA, Cramer SM. Steric mass-action ion exchange: displacement profiles and induced salt gradients [J]. *AIChE J*, 1992, 38: 1969-1978.
- [36] Osberghaus A, Hepbildikler S, Nath S, et al. Determination of parameters for the steric mass action model – a comparison between two approaches [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1233: 54-65.
- [37] Hahn T, Huuk T, Osberghaus A, et al. Calibration-free inverse modeling of ion-exchange chromatography in industrial antibody purification [J]. *Eng Life Sci*, 2016, 16: 107-113.
- [38] Kumar V, Leweke S, von Lieres E, et al. Mechanistic modeling of ion-exchange process chromatography of charge variants of monoclonal antibody products [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1426: 140-153.
- [39] Schmölder J, Kaspereit M. A modular framework for the modeling and optimization of advanced chromatographic processes [J]. *Processes*, 2020, 8: 65.
- [40] Rathore AS, Hebhi V. *Ion exchange chromatographic methods for purification of therapeutic antibodies* [M]//*Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2022: 179-186.
- [41] von Lieres E, Andersson J. A fast and accurate solver for the general rate model of column liquid chromatography [J]. *Comput Chem Eng*, 2010, 34: 1180-1191.
- [42] Kumar V, Leweke S, Heymann W, et al. Robust mechanistic modeling of protein ion-exchange chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1660: 462669.
- [43] Rischawy F, Briskot T, Hopf N, et al. Connected mechanistic process modeling to predict a commercial biopharmaceutical downstream process [J]. *Comput Chem Eng*, 2023, 176: 108292.
- [44] Kumar V, Khanal O, Jin M. Modeling the impact of holdup volume from chromatographic workstations on ion-exchange chromatography [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2022, 61: 10195-10204.
- [45] Briskot T, Hahn T, Huuk T, et al. Protein adsorption on ion exchange adsorbers: a comparison of a stoichiometric and non-stoichiometric modeling approach [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1653: 462397.
- [46] Chen YC, Yao SJ, Lin DQ. Parameter-by-parameter method for steric mass action model of ion exchange chromatography: theoretical considerations and experimental verification [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1680: 463418.
- [47] Shekhawat LK, Tiwari A, Yamamoto S, et al. An accelerated approach for mechanistic model based prediction of linear gradient elution ion-exchange chromatography of proteins [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1680: 463423.
- [48] Wilke CR, Chang P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions [J]. *AIChE J*, 1955, 1: 264-270.
- [49] Mackie JS, Meares P. The diffusion of electrolytes in a cation-exchange resin membrane I. Theoretical [J]. *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci*, 1955, 232: 498-509.
- [50] Heymann W, Glaser J, Schlegel F, et al. Advanced score system and automated search strategies for parameter estimation in mechanistic chromatography modeling [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1661: 462693.
- [51] Joshi VS, Kumar V, Rathore AS. Optimization of ion exchange sigmoidal gradients using hybrid models: implementation of quality by design in analytical method development [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1491: 145-152.