



Doctoral Thesis

Adsorption equilibria of proteins in ion-exchange chromatography

Author(s):

Guélat, Bertrand

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007262318> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 20228

Adsorption Equilibria of Proteins in Ion-Exchange Chromatography

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Bertrand Guélat

Master of Science, EPF Lausanne

Born June 17, 1984

citizen of Bure (JU)

accepted on the recommendation of
Prof. Massimo Morbidelli, examiner
Prof. Ive Hermans, co-examiner

Zurich 2012

Abstract

In the production of therapeutic proteins, in particular of monoclonal antibodies, an improvement of the traditional downstream processing is required to decrease the purification costs. In this context, ion-exchange chromatography can play a major role as a versatile technique applicable at each purification step, from the capture to the final polishing.

The aim of this thesis is to provide new tools to support model-based process design and characterization of ion-exchange chromatography for protein purifications. The methods developed are based on the study of the adsorption equilibria of proteins on ion-exchangers.

The interactions between the proteins and the ion-exchange material were described on a fundamental level based on colloidal theories. The adsorption process was considered as the accumulation of charged spherical proteins in the vicinity of the oppositely charged ion-exchanger surface. Several adsorption equilibrium models were developed in this framework for various applications. In each case, the focus was made on modeling the effect of the pH and the salt concentration on the adsorption equilibrium, as these are the main operating conditions controlling the binding strength in ion-exchange chromatography. It was an important feature in order to offer a versatile tool for the process development. In addition, a sound physical basis was kept throughout the models developments and the meaning of the corresponding parameters was retained, promoting a fundamental understanding of the ion-exchange processes.

First, the adsorption equilibrium was modeled as a Gibbs Surface Excess arising from the electrostatic interaction between the proteins and the ion-exchanger. A colloidal interaction model was adapted to compute this electrostatic interaction using a solution of the linearized Poisson-Boltzmann equation. It included a molecular property model for the protein and resin charges which was accounting for their change with the pH and the salt concentration. The Henry constant, i.e. the linear adsorption equilibrium constant, of several proteins (lysozyme, chymotrypsinogen A, monoclonal antibodies) on various stationary phases were modeled with an explicit pH and salt dependence. This model was then re-developed based on a statistical thermodynamic approach and on a colloidal model including the electrostatic (nonlinear Poisson-Boltzmann equation) and Van der Waals interactions. These changes were introduced to reflect the monolayer adsorption behavior of large protein molecules and with the high charge of the ion-exchange materials. The pH and salt dependent Henry constants of several monoclonal antibody charge variants were

modeled successfully. The physical value of this approach was thus confirmed, despite the necessary simplifications in the system geometry (plane-sphere) and in the level of details about the protein and resin structures.

An adaptation of the model aiming at a more predictive use was developed. For this, the protein charge model was extended to take into account all the ionizable amino acid groups of the protein. The predictions of the protein titration curve were obtained from the amino acid sequence of monoclonal antibodies and the corresponding Henry constants were computed with an explicit pH and salt concentration. The results were useful to show the relative behavior of monoclonal antibodies on various stationary phases. They also allowed predicting the selectivity between monoclonal antibody charge variants with a reasonable accuracy. The absolute values of the Henry constants, however, were less accurate for the predictions.

In order to design a preparative monoclonal antibody variants separation, a column simulation model was developed using a lumped kinetic model to describe the column dynamics. The nonlinear adsorption behavior of the variants was accounted for by the competitive Langmuir isotherm in which the pH and salt dependent Henry constant model was implemented. The inverse method was used to fit the saturation capacity of the variants, while the Henry constant was determined previously by the independent retention factor measurements. The calibrated model was then applied to predict the separation of the monoclonal antibody variants for pH and salt gradient elution experiments. The good accuracy of the simulations over the broad range of operating conditions studied demonstrated the versatility of the process design tool developed in this thesis.

Finally, the adsorption equilibrium model based on statistical thermodynamics was further developed into a nonlinear adsorption equilibrium model. For this purpose, the effect of the surface coverage and of the colloidal protein-protein repulsions at increasing adsorbed protein concentrations were studied. The model was able to reproduce the behavior of the adsorption equilibria at various pH values and salt concentrations. The protein-protein repulsions were negligible at the moderate adsorbed concentrations observed in all experiments. Thus, the adsorption equilibrium was a direct function of the Henry constant and of the protein coverage radius. The obtained model was successfully implemented in the lumped kinetic model for the simulation of isocratic elution and breakthrough experiments of monoclonal antibody variants. It behaved similarly to the classical competitive Langmuir isotherm model but it offered more degrees of freedom with respect to the pH and the salt concentration dependence, as well as a physically sound basis allowing a reasonable prediction of the parameters.

Résumé

Dans la production de protéines thérapeutiques, en particulier d'anticorps monoclonaux, une amélioration du procédé traditionnel de purification est nécessaire afin de diminuer les coûts de production. Dans ce contexte, la chromatographie d'échange d'ions peut jouer un rôle majeur, étant une technique polyvalente applicable à chaque étape de purification, de la capture jusqu'au polissage final.

Pour cette raison, les équilibres d'adsorption des protéines en chromatographie d'échange d'ions ont été étudiés dans cette thèse. L'approche suivie visait à fournir de nouveaux outils pour soutenir la conception et la validation "basées sur un modèle" de procédés de chromatographie d'échange d'ions pour la purification de protéines.

Les interactions entre les protéines et le matériel d'échange d'ions ont été décrites à un niveau fondamental se basant sur les théories colloïdales. Le procédé d'adsorption a été considéré comme l'accumulation de protéines sphériques chargées à proximité de la surface de l'échangeur d'ions de charge opposée. Plusieurs modèles d'équilibre d'adsorption ont été développés dans ce cadre. Dans chaque cas, l'accent a été mis sur la modélisation de l'effet du pH et de la concentration de sel sur l'équilibre d'adsorption, ceux-ci étant les principales conditions opérationnelles contrôlant la force de liaison en chromatographie d'échange d'ions. Ceci est une caractéristique importante afin d'offrir un outil polyvalent pour le développement de procédé. De plus, une base physique rationnelle a été maintenue tout au long des développements des modèles et le sens des paramètres correspondant a été conservé, promouvant une compréhension fondamentale des procédés d'échanges d'ions.

Tout d'abord, l'équilibre d'adsorption a été modélisé comme un Excès de Surface de Gibbs résultant de l'interaction électrostatique entre les protéines et l'échangeur d'ions. Un modèle d'interaction colloïdale a été adapté pour calculer cette interaction électrostatique en utilisant une solution de l'équation de Poisson-Boltzmann linéarisée. Il inclue un modèle de propriété moléculaire pour les charges de la protéine et de la résine qui prend en compte leurs variations avec le pH et la concentration de sel. La constante de Henry, c.-à-d. la constante d'équilibre d'adsorption linéaire, de plusieurs protéines (lysozyme, chymotrypsinogène A, anticorps monoclonaux) sur différentes phases stationnaires a été modélisée avec une dépendance explicite au pH et à la concentration de sel. Ce modèle a été ensuite redéveloppé sur la base d'une approche thermodynamique statistique et d'un modèle colloïdal incluant les interactions électrostatiques (équation de Poisson-Boltzmann non linéaire) et de Van der Waals. Ces modifications sont en meilleur accord avec la caractéristique d'adsorption monocouche des grandes molécules de protéines et avec la charge élevée des matériaux

d'échange d'ions. Les constantes de Henry, dépendantes du pH et de la concentration de sel, de plusieurs variantes de charge d'un anticorps monoclonal ont été modélisées avec succès. La valeur physique de cette approche a ainsi été confirmée, malgré les simplifications nécessaires dans la géométrie du système (plan-sphère) et dans le niveau de détails concernant les structures de la protéine et de la résine.

En outre, une adaptation du modèle visant à une utilisation plus prédictive a été présentée. Dans ce but, le modèle de la charge de la protéine a été étendu pour prendre en compte tous les groupes ionisables des acides aminés de la protéine. Ainsi, des prédictions de la courbe de titration de la protéine ont été obtenues à partir de la séquence d'acides aminés d'anticorps monoclonaux et les constantes de Henry correspondantes ont été calculées avec une dépendance explicite au pH et à la concentration de sel. Les résultats ont été utiles afin de montrer le comportement relatif d'anticorps monoclonaux sur différentes phases stationnaires. Ils ont également permis de prédire la sélectivité entre les variantes de charge d'un anticorps monoclonal avec une précision raisonnable.

Afin de concevoir une séparation préparative de variantes de charge d'un anticorps monoclonal, un modèle de simulation de colonne chromatographique a été développé en utilisant un "lumped kinetic model" pour décrire la dynamique de la colonne. Le comportement d'adsorption non linéaire des variantes a été pris en compte par l'isotherme de Langmuir compétitif dans lequel la constante de Henry dépendante du pH et de la concentration de sel a été implémentée. La méthode inverse a été utilisée pour ajuster la capacité de saturation des variantes, alors que la constante de Henry a été déterminée précédemment par les mesures indépendantes du facteur de rétention. Le modèle calibré a ensuite été appliqué pour prédire la séparation des variantes de l'anticorps monoclonal pour des éluions par gradient de pH ou de sel. La bonne précision des simulations sur la large série de conditions opérationnelles a démontré l'avantage d'un outil polyvalent de conception de procédé.

Finalement, le modèle d'équilibre d'adsorption basé sur la thermodynamique statistique a été complété pour décrire l'équilibre d'adsorption non linéaire. Dans ce but, l'effet de la couverture de la surface et des répulsions colloïdales entre protéines avec l'augmentation des concentrations de protéines adsorbées a été étudié. Le modèle est capable de reproduire le comportement des équilibres d'adsorption à différents pH et concentrations de sel. Les répulsions entre protéines sont négligeables pour les concentrations adsorbées modérées observées dans toutes les expériences. Ainsi, l'équilibre d'adsorption est une fonction directe de la constante de Henry et du rayon de couverture de la protéine. Le modèle obtenu a été implémenté avec succès dans le "lumped kinetic model" pour la simulation d'expériences d'éluion isocratique et de chromatographie frontale des variantes de l'anticorps monoclonal. Il a un comportement similaire au modèle d'isotherme de Langmuir classique, mais il offre plus de degrés de liberté par rapport à la dépendance au pH et à la concentration de sel, ainsi qu'une base physique rationnelle permettant de déterminer des bonnes estimations pour tous les paramètres.