

DISS. ETH No. 20857

**ONLINE CONTROL DEVELOPMENT AND PROCESS  
INTENSIFICATION IN CONTINUOUS  
CHROMATOGRAPHY (MCSGP)**

A dissertation submitted to  
ETH Zurich

For the degree of  
Doctor of Sciences

Presented by  
**MARTIN KRÄTTLI**

MSc ETH Chem Bio Eng  
ETH Zürich

Born the  
20<sup>th</sup> of April, 1985

Citizen of Untervaz, Graubünden, Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof Dr Massimo Morbidelli (ETH Zurich), examiner  
Prof Dr Marco Mazzotti (ETH Zurich), co-examiner

2012

## Zusammenfassung

Der Mehrkolonnen-Gegenstrom-Lösungsmittel Gradienten Reinigungsprozess (englische Abkürzung MCSGP) wird in dieser Arbeit weiter untersucht. Der Prozess wurde vor einigen Jahren von Aumann und Morbidelli [1] erstmals erwähnt, die Weiterentwicklung des Prozesses dauert noch an. In dieser Arbeit wurde der MCSGP Prozess für zwei schwierige Trennprobleme eingesetzt, namentlich eine Trennung von Ladungsvarianten von monoklonalen Antikörpern (englische Abkürzung: mAb) und die Aufreinigung von seltenen Erden (englische Abkürzung: REE). Die Ladungsvarianten der drei mAbs Avastin®, Herceptin® und Erbitux® wurden aufgetrennt. Der Fall Herceptin® muss hervorgehoben werden, da für diesen Antikörper die Bio Aktivität der einzelnen Varianten bekannt ist [2], weshalb die die spezifische Aktivität eines aufgereinigten Produktes bestimmt werden konnte. Bei allen drei mAbs wurde erfolgreich die Hauptvariante mit diskontinuierlicher Chromatographie und MCSGP angereichert, es wurde in beiden Fällen ein Kationen Tauscher als stationäre Phase verwendet. Die Produktivität konnte für die MCSGP im Gegensatz zur diskontinuierlichen Chromatographie vervierfacht werden. Die Bio Aktivität im Fall von Herceptin® konnte um 30% gesteigert werden. Zusätzlich wurde die Stabilität des MCSGP Prozessen mithilfe von modifiziertem Start-Material getestet, welches mehr Verunreinigungen enthielt. Das Produkt wurde dabei in seiner Qualität nicht signifikant beeinflusst.

Die Trennung von REE wird zu einem immer wichtigeren Problem, da der weltweite Bedarf an REE stetig wächst und gleichzeitig mehrere Produktionsstätten aufgrund von Umweltschäden und zu hohen Kosten geschlossen wurden [3]. Chromatographie war eine wichtige und oft verwendete Trennmethode für REEs, bis sie in den 70er Jahren durch Extraktion ersetzt wurde. Durch die Verwendung des MCSGP Prozesses könnte die Chromatographie wieder wirtschaftlich werden. Zusätzlich wären die umwelttechnischen Bedenken im Falle eines chromatographischen Reinigungsprozesses kleiner als bei Extraktion, was die Produktion von REEs in den westlichen Ländern wieder möglich machen könnte. In dieser Arbeit wurden drei Elemente der Lanthaniden Gruppe (Praesodymium, Cer und Lanthanum) in diskontinuierlicher Chromatographie und mit MCSGP getrennt. Die Trennung war in beiden Fällen erfolgreich, die Produktivität konnte durch den Einsatz von MCSGP um Faktor 5 bis 15 erhöht werden. Leider war die absolute Produktivität aufgrund der tiefen Löslichkeit der REEs in der mobilen Phase aber sehr klein. Um dieses Problem überwinden zu können, könnte eine andere mobile Phase verwendet werden, wie beispielsweise von Hansen und Koautoren vorgeschlagen wurde [4]. Dadurch könnte die Produktivität auf Werte um 1 Kilogramm pro Tag und Liter Kolonnenbett erhöht werden.

Das ursprüngliche Design des MCSGP Prozesses erlaubt eine Trennung in 3 Fraktionen, was für die meisten Prozesse ausreichend ist. In speziellen Fällen sind aber mehrere Substanzen im Gemisch wertvoll und sollten als reines Produkt gesammelt werden. In dieser Arbeit wird ein Aufbau der MCSGP diskutiert, der theoretisch  $n$  Fraktionen mit  $n$  Säulen auftrennen kann und das Prozess Design dieser Multifraktions MCSGP wird anhand zweier Beispiele erklärt. In den Experimenten wurde die Trennung auf 4 Fraktionen beschränkt, da sonst ein zu grosser Druckabfall über die Säulen entstand. Die

---

Validierung dieser MCGSP Variante wurde mit einem Protein Modell System und einer mAb Variantentrennung durchgeführt, in beiden Fällen konnte die Ausbeute mit dem MCGSP Prozess im Vergleich zu diskontinuierlicher Chromatographie bei gleicher Reinheit der Produkte gesteigert werden.

Der zyklisch verlaufende MCGSP Prozess kann problemlos für sehr lange Zeiträume in Betrieb gehalten werden. Dafür wird ein Kontroll Konzept benötigt um den Prozess stabil zu halten. Zwei verschiedene Kontroller basierend auf dem empirischen Proportional, Integral und Differential (PID) Konzept wurden in den MCGSP Prozess integriert und getestet. Der erste Kontroller verwendet als Prozess Information das online gemessene UV Signal der MCGSP Anlage und regelt direkt die Position des Maximums des Signals. Diese sehr schnelle und einfache Kontroll Möglichkeit garantiert dass der Prozess konstant bleibt, kann aber nicht direkt die Reinheit des Produktes regeln, da diese nicht aus dem online UV entnommen werden kann. Entsprechend muss das Design des Prozesses vor dem Einschalten des Kontrollers von Hand gemacht werden. Der Prozess wurde mit einem Proteinsystem (Lysozym) und einem Peptid (Fibrinopeptide A human) validiert. Der Prozess wurde mit dem Kontroll System eingeschalten gestartet und es wurden Störungen in den Flussraten simuliert. Der Kontroller reagierte schnell und zuverlässig und konnte sämtliche Störfälle innerhalb von 3 – 5 Zyklen meistern. Im zweiten Kontroll Konzept wurde das einfache online UV durch eine automatische HPLC Analyse des Produkts ersetzt, welche direkte Rückschlüsse auf die Reinheit zulässt. Das Konzept basiert auf zwei entkoppelten PID Kontrollern, welche die beiden Verunreinigungen (Früher eluierend als das Produkt und später eluierend als das Produkt) unabhängig kontrollieren und den gewünschte Reinheitswert einstellen. Dieses Konzept wurde mit zwei Protein Systemen getestet, zum einen ein Modell System und zum anderen der Zellüberstand einer mAb Fermentation. Für beide Systeme wurden Störungen in den Pumpen Flussraten sowie Veränderungen des Grundmaterials künstlich eingeführt, der Kontroller konnte sämtliche Störungen meistern und kehrte zur gewünschten Reinheit des Produktes zurück.

## Abstract

The multi-column countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process is studied in this work. The process was developed some years ago by Aumann and Morbidelli [1], some further process development is still going on. In this work, the process itself was applied for two challenging separation problems; a monoclonal antibody (mAb) charge variant separation and the purification of rare earth elements (REE). The charge variants of three mAbs were separated, namely Avastin®, Herceptin® and Erbitux®. Especially Herceptin® should be mentioned, as the bio activity of the charge variants was measured for this mAb in the past [2]. Therefore, the benefit of removing inactive variants could be quantified. All three mAb separations were performed successfully in cation exchange batch chromatography and MCSGP, with MCSGP having an up to 4 fold higher productivity. The activity of the mAb Herceptin® could be increased by 30% in comparison to the original mixture which is available as a therapeutic. Additionally, the stability of the MCSGP process was verified applying feed which was enriched in impurities. It was found that the feed composition was not influencing the product quality significantly.

The separation of REE is becoming an increasingly important challenge, as the demand of REE is increasing worldwide and several production sides have been closed due to environmental concerns and too high costs [3]. In the past, chromatography was an often applied tool for the purification of REE, but was replaced by extraction in the last 40 years. Implementing a continuous chromatographic process as the MCSGP providing higher productivity than batch chromatography the purification of REE based on chromatography could become economically interesting again. In addition, the chromatographic steps could significantly lower the environmental concerns due to milder conditions and thereby reinitiate the production of REE in western countries. In this work, three REE species were separated (Praseodymium, Cerium and Lanthanum) applying batch and MCSGP chromatography. The MCSGP process could outperform the batch significantly, improving the productivity by factor 5 to 15. However, the cation exchange chromatography only reached moderate absolute productivities, as the solubility of the REE in the mobile phase was very low. To overcome this problem, a different mobile phase would have to be applied as proposed recently by Hansen et al. [4]. The implementation of this mobile phase could increase the productivity of the MCSGP process to the order of kilograms per day and liter of resin.

MCSGP in its original setup is able to separate three fractions, which is sufficient for most encountered problems. In rare cases where multiple products in a mixture are valuable, the separation of more than three fractions would be beneficial. In this work, the theoretical design of a MCSGP capable of separating  $n$  fractions and its design starting from batch chromatography is discussed. In theory, applying a MCSGP process with  $n$  columns can separate  $n$  fractions as well, in experimental application; the maximum number of fractions was limited to 4 due to pressure drop issues. The four fraction separation was validated applying a model mixture of four proteins and a mAb charge variant separation. In both cases, the yield could be increased applying MCSGP keeping the purity at the same level.

The MCGP process, which is running on a cyclic base continuously for long time periods, requires an online control concept to stabilize the process. Two different control concepts based on empirical proportional, integral, differential (PID) control were introduced in the frame of this work. The first controller was based on the MCGP online UV as the feedback information. The goal of the controller is to keep the maximum of the online UV chromatogram, which his normally referring to the product, at a certain position of the process. This method guarantees that the product outlet quality is remaining constant. The drawback of this very simple control concept is the missing information on the actual purity of the product. Therefore, the tuning of the MCGP process has to be performed offline, the controller is just assisting in keeping the process stable. The controller was validated experimentally applying a protein system (Lysozyme) and a peptide (Fibrinopeptide A human). The process startup was guided to steady state and during steady state operation; various disturbances in the flow rates of system pumps were introduced. The controller was reacting reliable and fast, restoring the product quality within 3 - 5 cycles guaranteeing stable operation. In the second control concept, the feedback was replaced with an at-line HPLC analysis of the product stream, allowing to directly controlling the purity. The control concept relied on two decoupled PID controller, one controlling the early eluting, and one controlling the late eluting impurities. The controller was tested with two protein systems, a model separation and a mAb supernatant capture. In both cases, a purity requirement similar to the purity reached with batch chromatography was set. The controller was able to guide the process from different starting points to this desired purity constraints and was able to reject disturbances in flow rates and the feed composition.