

Diss ETH NO. 20991

**Modeling and experimental characterization of protein mass transfer and adsorption
in preparative chromatography**

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Bertrand Coquebert de Neuville

Dipl. Ingénieur, Ecole Polytechnique, France

Master of Science, Imperial College London, United kingdom

Born January 27, 1984

Citizen of France

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Morbidelli (ETH Zurich), examiner

Prof. Dr. Mazzotti (ETH Zurich), co-examiner

Zurich, 2013

Abstract

Preparative chromatography is the most commonly used purification process for therapeutic proteins. This technique is already implemented and well understood since long for small molecules. On contrary, for proteins, the chromatographic process is still developed in an empirical way. A better understanding of protein chromatography is necessary to reduce the time and the cost of the process development and also to implement the concept of Quality by Design (QbD) developed by the FDA.

The specificity of protein chromatography is that the protein size (i.e. 1nm to 20nm) is in the range of the pore size distribution of the stationary phases. Consequently, it can happen that the smallest pores are not accessible to proteins, that in the largest pores several proteins compete for adsorption and finally that in the intermediate pore sizes only the smallest protein can enter. Moreover, the adsorbed proteins occupy a volume on the pore surface which in preparative chromatography conditions (i.e. high protein loading) reduces significantly the particle porosity. In this work, a pore model called the distributed pore model has been developed by considering the protein mass transfer and adsorption at the pore scale and by implementing a discretized pore size distribution of the chromatographic media. The pore shrinkage due to protein adsorption has been modeled considering a uniform layer of adsorbed proteins on the pore surface. The model has been applied to determine at different flow rates the dynamic binding capacity of the cation-exchange resin SP sepharose Big Beads from its static binding capacity. The distributed pore model has then been developed for multi components system and applied to study the decrease of the accessible porosity to non interacting dextrans due to polyclonal antibody adsorption in the cation-exchange resins Fractogel EMD SO₃ (M) and (S).

Other improvements in protein chromatography are coming from new chromatographic stationary phases. In order to increase the performance of the columns, perfusive columns are developed with an enhanced mass transfer due to the convection of part of the flow through the particles. On the other hand, particles functionalized with tentacles on the pore surface have been introduced to increase the adsorption saturation capacity and consequently the column productivity. New stationary phases combining perfusive properties and tentacle functionalization have been characterized. It has been shown that they have much higher performances compared to commercial materials such as the perfusive resin Poros 50 HS and the diffusive tentacle media Fractogel EMD SO₃ (M). In this work, the perfusion and the diffusion through the particles have been modeled with tanks in series and applied to simulate overloaded and breakthrough experiments in perfusive columns.

Résumé

La chromatographie préparative est le procédé de purification de choix pour les protéines thérapeutiques dans l'industrie pharmaceutique. Cette technique est déjà bien comprise et utilisée depuis longtemps pour la purification de petites molécules. Au contraire, pour les protéines, le procédé chromatographique est encore développé de manière très empirique. Une meilleure compréhension de la chromatographie pour la séparation de protéines est donc nécessaire pour réduire le temps et le coût du développement de procédés et également pour mettre en place le concept de « Quality by Design » initié par la FDA.

La spécificité de la chromatographie pour les protéines vient de la similitude entre la taille des protéines (entre 1nm et 20nm) et la taille moyenne de la distribution de pores dans la particule. Il peut alors arriver dans certaines situations que les plus petits pores soient inaccessibles aux protéines, que dans les plus gros pores, plusieurs protéines soient en compétition pour adsorber à la surface du pore et enfin qu'uniquement la plus petite protéine puisse entrer dans les tailles intermédiaires de pore. En outre, la protéine, une fois adsorbée, occupe un espace défini à la surface du pore, ce qui en chromatographie préparative (i.e. pour de grandes charges de protéines) réduit considérablement la porosité de la particule. Dans cette thèse, un modèle au niveau du pore, appelé « distributed pore model », a été développé en considérant le transfert de masse et l'adsorption de la protéine à l'échelle du pore et en implémentant une distribution discrète de pores pour le média chromatographique. Le rétrécissement du diamètre du pore dû à l'adsorption de la protéine a été modélisé en considérant une couche uniforme de protéines adsorbées à la surface du pore. Le modèle a été mis en application pour déterminer la capacité dynamique d'adsorption à différents flux de la résine échangeuse de cation SP Sepharose Big Beads à partir de sa capacité statique d'adsorption. Le modèle a ensuite été développé pour un système de plusieurs composants et utilisé pour étudier la réduction de la porosité accessible à des dextrans à cause de l'adsorption d'anticorps polyclonaux dans les résines échangeuses de cation Fractogel EMD SO₃ (M) et (S).

D'autres améliorations en chromatographie de la protéine viennent de nouvelles phases adsorbantes. Pour augmenter la performance des colonnes, des résines avec perfusion ont été développées avec un meilleur transfert de masse grâce à la convection d'une part du flux à travers les particules. Parallèlement, des particules fonctionnalisées avec des tentacules à la surface des pores ont été introduites pour augmenter la capacité d'adsorption et ainsi la productivité de la colonne. De nouvelles phases adsorbantes qui associent les propriétés de perfusion à une fonctionnalisation avec des tentacules, ont été caractérisées. Il est démontré que ces phases ont de bien meilleures performances que les colonnes commerciales telles que la résine avec perfusion Poros 50HS ou que la résine avec tentacules Fractogel EMD SO₃ (M). Dans cette thèse, la perfusion et la diffusion à travers la particule ont été modélisées avec des réservoirs en série. Le modèle a été utilisé pour simuler les expériences de percée et d'élution avec saturation dans des colonnes avec perfusion.