

## 离子交换层析分离单抗电荷异质体的模型辅助过程优化

许茹枫<sup>1</sup>, 陈煜成<sup>1</sup>, 高丹<sup>2</sup>, 焦静雨<sup>2</sup>, 高栋<sup>2</sup>, 王海彬<sup>2</sup>, 姚善泾<sup>1</sup>, 林东强<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学化学工程与生物工程学院, 生物质化工教育部重点实验室, 浙江 杭州 310058;

<sup>2</sup> 海正生物制药有限公司, 浙江 杭州 311404)

**摘要:** 针对单抗电荷异质体分离, 采用离子交换层析机理模型, 预测洗脱分离行为, 辅助工艺条件优化。设计了校准实验, 拟合得到模型参数, 模型计算与实验吻合良好, 具有良好的预测能力。利用模型分析比较了不同洗脱方式, 得到最优的两步阶跃洗脱方案, 具有较高的收率, 但发现该分离过程对盐浓度极为敏感。进一步针对第一步洗脱盐浓度进行过程稳健性约束的过程优化, 发现盐浓度为 108.5 mmol/L 时过程稳健性增强。经实验验证, 两步阶跃洗脱收率最高可达到 85.3%, 稳健约束优化后第一步等度洗脱盐浓度操作区间增大为 98.9~117.5 mmol/L。结果表明, 模型辅助的工艺优化可以进行复杂条件分析, 促进难分离体系的分离过程优化, 并能够针对过程稳健性给出合理解决方案。

**关键词:** 单克隆抗体; 电荷异质体; 分离; 离子交换层析; 层析模型; 过程优化

中图分类号: TQ 028.8

文献标志码: A

文章编号: 0438-1157 (2024) 05-1903-09

## Model-assisted process optimization of ion-exchange chromatography for monoclonal antibody charge variant separation

XU Rufeng<sup>1</sup>, CHEN Yucheng<sup>1</sup>, GAO Dan<sup>2</sup>, JIAO Jingyu<sup>2</sup>, GAO Dong<sup>2</sup>, WANG Haibin<sup>2</sup>,  
YAO Shanjing<sup>1</sup>, LIN Dongqiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; <sup>2</sup> Hisun Biopharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311404, Zhejiang, China)

**Abstract:** For the separation of monoclonal antibody charge heterogeneous species, an ion-exchange chromatography mechanism model is used to predict the elution and separation behavior and assist in the optimization of process conditions. The calibration experiments were designed to estimate the model parameters and the model simulation matched well with the experiments, demonstrating the model has good predictive ability. The model was used to compare and evaluate the influences of different elution modes and conditions. The optimal two-step elution was obtained to achieve high yield. However, it was found that the separation efficiency was highly sensitive to the salt concentration of first-step elution solution. Therefore, the process robustness was considered further to optimize the salt concentration, and it was found the salt concentration of 108.5 mmol/L could greatly

收稿日期: 2023-12-01 修回日期: 2024-02-20

通信作者: 林东强 (1971—), 男, 博士, 教授, lindq@zju.edu.cn

第一作者: 许茹枫 (1999—), 女, 硕士研究生, 528869431@qq.com

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2023C03116 和 2021C03089); 国家自然科学基金项目 (22078286); 国家重点研发计划项目 (2021YFE0113300)

引用本文: 许茹枫, 陈煜成, 高丹, 焦静雨, 高栋, 王海彬, 姚善泾, 林东强. 离子交换层析分离单抗电荷异质体的模型辅助过程优化[J]. 化工学报, 2024, 75(5): 1903-1911

**Citation:** XU Rufeng, CHEN Yucheng, GAO Dan, JIAO Jingyu, GAO Dong, WANG Haibin, YAO Shanjing, LIN Dongqiang. Model-assisted process optimization of ion-exchange chromatography for monoclonal antibody charge variant separation[J]. CIESC Journal, 2024, 75(5): 1903-1911

enhance the process robustness. The results of validation experiments showed that the highest yield of two-step elution process reached 85.3%, and the operating range of the salt concentration of first-step elution was widened to 98.9—117.5 mmol/L. The results demonstrated that model-assisted process optimization could facilitate the complex condition analysis, promote the optimization and provide reasonable solutions for process robustness.

**Key words:** monoclonal antibody; charge variant; separation; ion-exchange chromatography; chromatography model; process optimization

## 引言

全球最畅销的10种药物大多数来自生物制剂<sup>[1-2]</sup>,其中单克隆抗体(简称单抗,mAb)是最重要的生物技术药物<sup>[3]</sup>。为了提高产品质量和过程可控性,遵循质量源于设计(quality by design, QbD)理念,工艺过程开发一般通过实验设计(design of experiment, DOE)进行优化设计<sup>[4]</sup>。不过,由于下游分离纯化过程可调参数多,导致实验工作量大,工艺开发效率较低<sup>[5]</sup>。

单抗药物由于翻译后修饰或在分离纯化和储存过程中发生氧化或脱氨等化学修饰,容易引起单抗表面电荷的改变而形成电荷异质体,通常采用离子交换层析(ion-exchange chromatography, IEC)进行分离或富集<sup>[6]</sup>。由于许多治疗性抗体具有较高等电点<sup>[7-8]</sup>,因此阳离子交换层析(cation-exchange chromatography, CEX)最为常用<sup>[9]</sup>。由于单抗主成分及其电荷异质体在结构和性质上非常相似,导致洗脱峰存在严重的交叠,难以分离。如果用传统的DOE方法进行过程开发,对所有相关参数进行考察,时间和实验成本将耗费巨大。美国食品药品监督管理局(FDA)明确指出,应用计算机建模和虚拟仿真技术,可以全面深入理解层析过程,系统评价关键参数对分离性能的影响,可以在较短时间内实现预测分析,得到最优条件<sup>[10]</sup>。Jakobsson等<sup>[11]</sup>利用IEC建模并考虑模型不确定性,设计了稳健的洗脱收集策略。Close等<sup>[12]</sup>利用机理建模确定了疏水相互作用层析的稳健工艺条件。Andris等<sup>[13]</sup>开发了一种表征抗体-药物偶联物分离的机理模型,对操作空间进行优化。

IEC建模关键在于描述蛋白在不同溶液条件下的吸附-解吸行为,需要对柱内的传质和吸附过程有精确表征。平衡分散模型(equilibrium dispersive model, EDM)描述了柱内的对流和扩散过程,适用于传质较快和容易进入介质孔道的层析过程<sup>[14]</sup>。空间质量作用模型(steric mass action model, SMA)是IEC

最常用的吸附模型<sup>[15-16]</sup>,考虑了盐离子浓度对多组分平衡中蛋白结合的影响。由于SMA模型中每个组分有4个参数,包括特征电荷数、平衡常数、空间因子和动力学常数,多个分离组分造成参数众多,且参数之间互相关联,因此参数拟合难度较大。Yamamoto法<sup>[17-19]</sup>是校准SMA模型参数的常用方法,通过线性梯度洗脱实验(LGEs)保留时间对应的盐浓度与归一化梯度斜率之间的线性关系,拟合出特征电荷数和平衡常数。然而,Creasy等<sup>[20]</sup>发现Yamamoto方法只能适用上样量小于最大载量5%~10%的情况。Saleh等<sup>[21]</sup>采用Yamamoto方法估算了低上样量下SMA参数值。工业生产通常采用大上样量来确保过程产率,因此Yamamoto方法存在一定局限性。Chen等<sup>[22-23]</sup>提出了parameter-by-parameter (PbP)的模型参数拟合方法,分步拟合SMA模型的相关参数,提高了参数拟合效率。该方法适用于较大上样量,突破了Yamamoto方法的局限性。

针对CEX分离单抗电荷异质体,本文采用PbP参数拟合方法,根据工艺条件设计校准实验,拟合得到SMA模型参数,并验证模型预测能力。然后,通过模型计算对不同洗脱方式的层析洗脱曲线进行预测分析,得到合适的洗脱方式和最优操作点。最后,基于分离过程对盐浓度极为敏感的情况,进行过程稳健性约束的优化,得到更稳健的操作条件和更宽的洗脱液盐浓度操作区间,改善实际分离的工艺控制。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要材料与仪器

单抗料液(IgG1,等电点8.03,平均分子量150 kDa)、蛋白A亲和层析分离后的样品,海正生物制药有限公司;强阳离子交换介质 Monomix HC45-S和层析柱 Generik FPLC(内径10 mm,柱长30 cm),苏州赛分科技股份有限公司;弱阳离子交换分析柱 ProPac WCX-10,美国 ThermoFisher 公司;其他试剂

均为市售分析纯。

层析系统 ÄKTA pure, 美国 Cytiva 公司; 高效液相色谱仪 200/1260, 美国 Agilent 公司; 分光光度仪 DropSense 16, 比利时 Trinean 公司。

### 1.2 模型校准实验

采用 ÄKTA pure 层析系统进行 CEX 分离单抗电荷异质体, Monomix HC45-S 介质装填层析柱, 装填高度为 196 mm。在上样前, 对单抗料液进行预处理, 用 NaCl 溶液调节电导率值至 5.0 mS/cm, 用柠檬酸缓冲液调节 pH 至 5.0±0.1, 用平衡缓冲液 (10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 5.0) 调整单抗浓度为 3.16 mg/ml。进行 6 组校准实验, 得到上样量为 5 mg/ml, 洗脱长度分别为 10、15、20 倍柱体积 (CV) 的 3 条 LGEs 洗脱曲线; 上样量分别为 15 和 30 mg/ml、洗脱长度为 10 CV 的两条 LGEs 洗脱曲线; 上样量为 5 mg/ml 的等度洗脱曲线。

层析具体步骤: 4 CV 平衡缓冲液平衡层析柱后上样, 4 CV 平衡缓冲液冲洗, 4 CV 预洗缓冲液 (10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0) 调节 pH 至 6.0, 然后进行洗脱。洗脱缓冲液为含有 0.2 mol/L 醋酸钠的 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0), 线性梯度范围为 0~100%, 等度洗脱为 55%。清洗及再生步骤包括 2 CV 的 100% 洗脱缓冲液、4 CV 清洗液 (0.5 mol/L NaOH)、4 CV 再生缓冲液 (1 mol/L NaCl)。全程流速为 2.0 ml/min, 室温操作。收集器分管收集洗脱组分, 分析各组分含量, 得到各组分的洗脱曲线。

### 1.3 分析方法

单抗浓度由 UV280 进行测定。单抗纯度和电荷异质体含量由高效液相色谱仪分析得到, 采用弱阳离子交换分析柱 ProPac WCX-10。对样品进行酶切处理, 调节样品浓度至 1 mg/ml, 羧肽酶 B (cpb) 在 37°C 下进行酶切 30 min。流动相 A (25 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0) 和流动相 B (25 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 添加 250 mmol/L NaCl, pH 6.0), 进行 10%~37% B 相的线性梯度洗脱, 然后 100% B 高盐洗脱, 最后 10% B 平衡再生。紫外检测波长 220 nm, 上样 50 μl, 流速 1.0 ml/min, 柱温 25°C。采用峰面积归一法计算样品中单抗主峰和各个电荷异质体的含量。纯度为洗脱收集样品中单抗主峰和碱性异质体的峰面积与总峰面积之比, 收率为洗脱收集得到的单抗蛋白量与上样的单抗蛋白量之比。

### 1.4 离子交换层析模型

采用 EDM 作为柱模型, 具体方程如式 (1), 等号

右侧分别为对流项、分散项和吸附项。

$$\frac{\partial c_i}{\partial t}(z, t) = -\frac{u}{\varepsilon_i} \frac{\partial c_i}{\partial z}(z, t) + D_{app} \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2}(z, t) - \frac{1 - \varepsilon_i}{\varepsilon_i} \frac{\partial q_i}{\partial t}(z, t) \quad (1)$$

式中,  $c_i$  和  $q_i$  是不同组分在流动相和固定相中的浓度, mol/L;  $z$  是轴向位置, m;  $t$  是时间, s;  $u$  为线性流速, m/s;  $\varepsilon_i$  是总空隙率;  $D_{app}$  是表观轴向分散系数。

吸附等温线 SMA 模型方程如下。

$$k_{kin,i} \frac{\partial q_i}{\partial t}(z, t) = k_{eq,i} \left[ \Lambda - \sum_{j=1}^n (v_j + \sigma_j) q_j(z, t) \right]^{v_i} c_i(z, t) - q_i(z, t) c_s^v(z, t) \quad (2)$$

$$q_s(z, t) = \Lambda - \sum_{j=1}^n v_j q_j(z, t) \quad (3)$$

式中,  $k_{eq,i}$ 、 $v_i$ 、 $\sigma_i$  和  $k_{kin,i}$  分别是平衡常数、特征电荷数、空间因子和动力学常数;  $\Lambda$  表示用于结合蛋白的总离子交换容量, mol/L;  $c_s$  和  $q_s$  分别是流动相和固定相中的盐浓度, mol/L。

对于层析柱参数,  $L$  直接测量得到,  $\varepsilon_i$  通过丙酮脉冲实验得到,  $\Lambda$  通过层析柱动态酸碱滴定实验测得<sup>[24-25]</sup>; 对于操作条件参数, 单抗上样浓度  $c_{inj}$  和线性流速  $u$  来自实验,  $D_{app}$  则通过层析柱等板高度 HETP 以下式计算得到。

$$D_{app} = 0.5 \text{HETP} u_{int} \quad (4)$$

式中,  $u_{int}$  为间隙流速, mm/s。  $u_{int}$  通过体积流速  $Q$  (ml/min) 计算, 公式如下:

$$u_{int} = \frac{4000Q}{60\varepsilon_i \pi d_{col}^2} \quad (5)$$

SMA 参数拟合采用 PbP 方法, 具体参见文献 [22-23]。步骤如下: (1) 相同上样量、不同洗脱长度的校准实验洗脱曲线, 通过第一线性回归拟合得到  $v$  初值<sup>[26]</sup>; (2) 相同洗脱长度、不同上样量的校准实验洗脱曲线, 通过第二线性回归拟合得到  $k_{eq}$  初值; (3) 通过简化线性逼近结合反演法得到  $\sigma$ ; (4) 利用校准实验的所有洗脱曲线, 通过反演法得到  $k_{kin}$ <sup>[27]</sup>。

### 1.5 模型辅助洗脱过程优化

采用校准好的 IEC 模型, 预测不同洗脱方式下的洗脱曲线, 包括单步洗脱、两步洗脱和三步洗脱, 比较分析单抗电荷异质体的分离效果, 实现过程优化。根据工艺要求, 设定洗脱长度为 15 CV, 纯度大于 89%。过程优化以保证纯度和提高收率为目标, 定义最大化目标函数  $F1$  为纯度为 89% 时收率的最大值。

对不同洗脱方式进行比较分析, 基于最大过程收率确定适合的洗脱方式和最优操作点。求解采用遗传算法, 具有较强的全局搜索能力、鲁棒性和自适应性, 特别适用于多维参数优化和复杂问题的

求解。使用 scikit-optimize 软件包中的遗传算法 (scikit-optimize 是一个开源的 Python 库, 提供了多种优化算法)。编程采用 Python 3.10。

### 1.6 考虑过程稳健性的洗脱条件优化

考虑洗脱过程对盐浓度比较敏感, 为了扩大洗脱盐浓度的操作区间, 对 1.5 节优化得到的洗脱方式进行过程稳健约束下的进一步优化, 保证过程洗脱盐浓度不确定时的收率稳健。定义优化目标函数  $F2$  为:

$$F2: \max w_{\text{avg}} \frac{\sum_{i=1}^3 Y_i}{3} - w_s \sqrt{\frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \left( Y_i - \frac{\sum_{i=1}^3 Y_i}{3} \right)^2} \quad (6)$$

式中,  $w_{\text{avg}}$  和  $w_s$  分别为收率的平均值和标准差的权重, 本文  $w_{\text{avg}}=0.7$ ,  $w_s=0.3$ ;  $Y_1, Y_2, Y_3$  为其余洗脱条件不变时, 两步阶跃洗脱过程中的第一步洗脱盐浓度变化  $-5\%$ 、 $0\%$ 、 $+5\%$  时, 纯度为 89% 时对应的收率。该稳健约束将确保即使在第一步洗脱过程中盐浓度不确定的情况下, 收率仍能保持在可接受的范围内, 并且提供过程对盐浓度变化的适应能力。利用模型预测不同第一步洗脱盐浓度下的洗脱曲线, 估算其纯度和收率, 可确定对应操作区间。

## 2 结果与讨论

### 2.1 模型参数确定

层析系统和层析柱参数测定和计算结果汇总于表 1 中。

表 1 层析系统和层析柱参数

Table 1 Chromatographic system and column parameters

参数类别	参数名称	参数符号	数值	单位
层析柱参数	柱径	$d_{\text{col}}$	10	mm
	床高	$L$	196	mm
	总空隙率	$\epsilon_t$	0.91	—
	离子交换容量	$A$	0.58	mol/L
操作条件参数	单抗上样浓度	$c_{\text{inj}}$	3.16	mg/ml
	线性流速	$u$	0.467	mm/s
	表观轴向分散系数	$D_{\text{app}}$	0.0989	mm <sup>2</sup> /s

对单抗料液进行 HPLC 分析, 酸性异质体、单抗主峰及碱性异质体按保留时间由小到大排列。单抗主峰记为 M, 含量为 69.53%; 酸性异质体有两个峰, 记为 A1 和 A2, 含量分别为 9.14% 和 13.02%, 分开建模; 碱性异质体 B 因含量较低且不影响产品质量, 故不进行建模。进行 6 个 CEX 校准实验, 收集样

品分别进行浓度检测和 HPLC 分析, 获得单抗浓度和不同组分含量, 得到 6 条洗脱曲线, 结果见图 1。其中, 图 1(a)~(f) 分别对应实验 a~f。可以发现, 酸性异质体和单抗主峰的洗脱峰重叠严重, 其中 A2 和 M 的洗脱峰区间几乎完全重合。从相同上样量、不同洗脱长度的实验 (a、b、c) 可以看出, 洗脱长度越大, 不同组分的保留时间相差越大, 分离效果越好; 从不同上样量、相同洗脱长度的实验 (a、d、e) 可以看出, 上样量越大, 洗脱峰峰宽越大, 重叠越严重。

在进行模型参数拟合前, 先确认模型预测的盐浓度和实验盐浓度得到了较好匹配。选取前 5 个实验的洗脱曲线, 按照 PbP 法进行模型参数的分步拟合: (1) 实验 a、b、c 得到  $v$  初值; (2) 实验 a、d、e 得到  $k_{\text{eq}}$  初值; (3) 5 个实验共同得到  $\sigma$  初值; (4) 将前面 3 个参数初值代入, 用反演法拟合全部 5 条洗脱曲线, 得到 4 个 SMA 参数的终值。拟合得到的模型参数见表 2。A1、A2、M 的特征电荷数  $v$  和平衡常数  $k_{\text{eq}}$  依次增大, 与实验中逐渐增大的保留时间相对应<sup>[28]</sup>。同时, 3 个组分的空间因子  $\sigma$  之差小于 0.5, 与电荷异质体和单抗分子大小相近的事实相符<sup>[29]</sup>。A1、A2、M 的洗脱过程峰宽逐渐减小, 拟合得到的动力学常数  $k_{\text{kin}}$  逐渐降低, 符合  $k_{\text{kin}}$  与峰宽呈正相关的规律<sup>[30]</sup>。从图 1 可见 5 个实验的模型计算与实验拟合良好。采用得到的模型参数, 对实验 f 进行预测分析, 发现等度洗脱曲线的预测结果和实验吻合良好, 说明模型具有较好的预测准确性。

### 2.2 模型辅助洗脱过程优化

单抗电荷异质体分离的原工艺为 14 CV 的 4 步洗脱过程, 纯度为 89%, 收率为 49.8%。为了与原工艺作对比, 本文优化目标设定为: 洗脱长度为 15 CV, 保持纯度为 89%, 使收率尽可能提高。利用前文建立的模型, 预测不同洗脱方案的洗脱曲线, 得到纯度为 89% 时对应的收率, 直至收敛得到最大过程收率的最优操作点。为了探究洗脱步骤复杂程度对最大收率的影响, 对单步洗脱、两步洗脱、三步洗脱的不同洗脱方式均进行了优化, 三步洗脱仅考虑了较有代表性的 3 种方式。表 3 汇总了不同洗脱方式及最大过程收率。可以发现, 最大收率随着洗脱方式的复杂程度增大而递增: 三步洗脱 (65.2%) > 两步洗脱 (64.85%) > 单步洗脱 (60.57%)。洗脱方式越复杂, 工艺越难控制, 两步洗脱的最大收率仅比三步洗脱小 0.35%, 因此确定两步洗脱为最合适工艺。

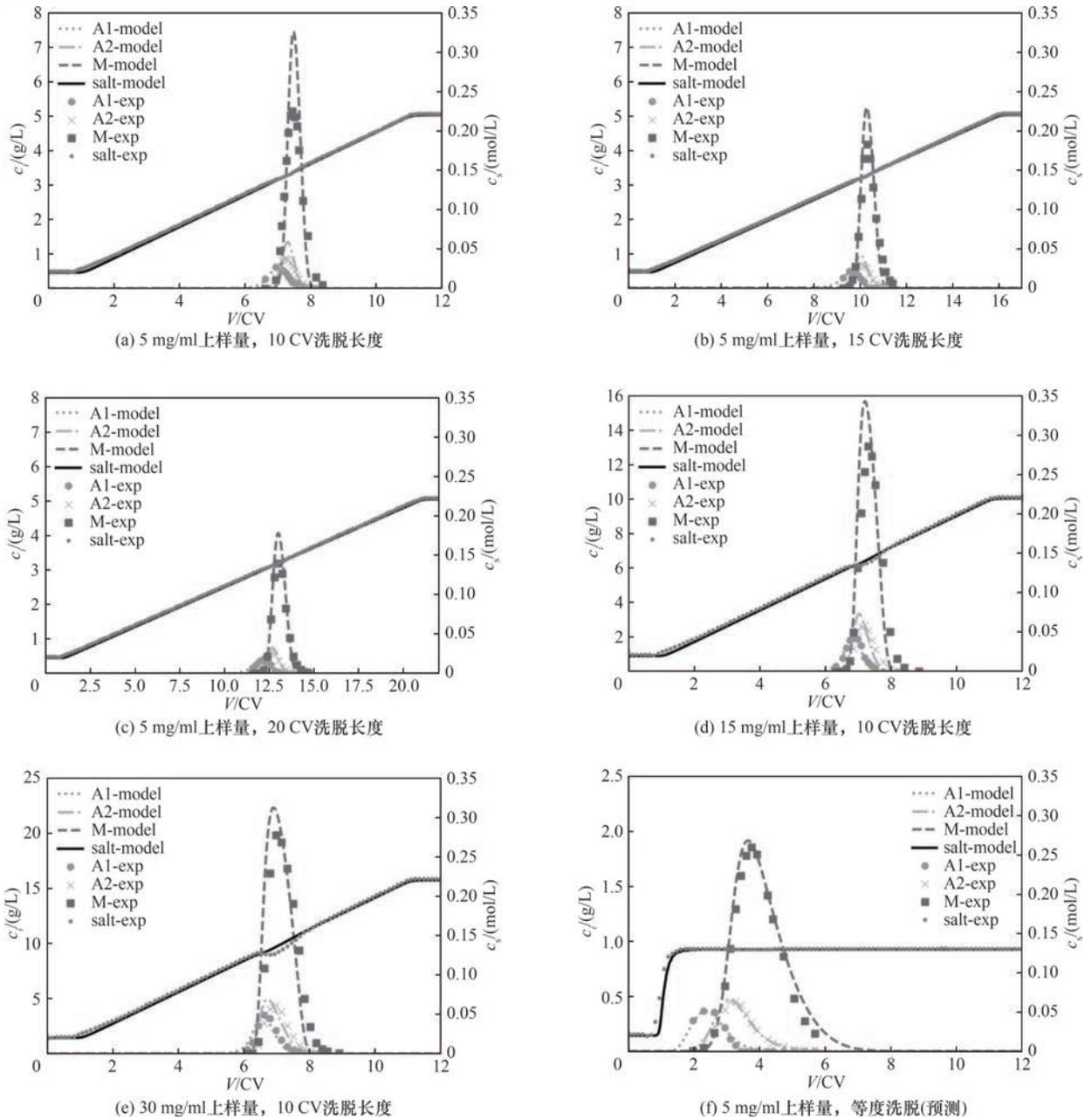


图1 实验洗脱曲线和模型计算结果比较

Fig.1 Comparison of experimental elution curve and model calculation

表2 SMA模型参数

Table 2 SMA model parameters

参数名称	参数符号	A1	A2	M
特征电荷数	$\nu$	11.58	11.75	11.89
平衡常数	$k_{eq}$	$4.23 \times 10^{-7}$	$6.20 \times 10^{-7}$	$7.34 \times 10^{-7}$
空间因子	$\sigma$	10.47	10.97	11.70
动力学常数	$k_{kin}$	$0.35 \times 10^{-8}$	$0.20 \times 10^{-8}$	$0.10 \times 10^{-8}$

在两步洗脱的4种洗脱方式中,两步阶跃和梯度-等度洗脱的最大收率较为突出,其中后者略大于前者,洗脱曲线见图2(阴影部分为产品的收集区间)。实际应用中,梯度洗脱较难控制,因此选择两

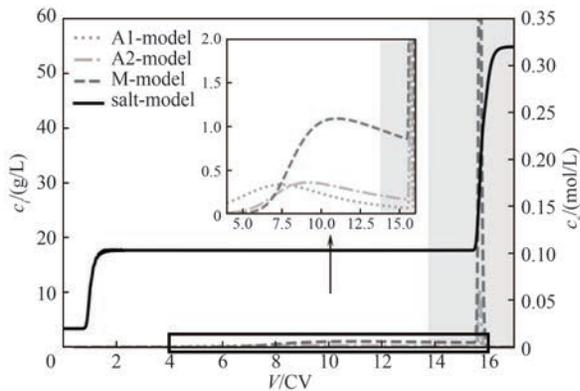
步阶跃洗脱作为优化方案:第一步等度洗脱的盐浓度为103.4 mmol/L,洗脱长度为14.42 CV;第二步等度洗脱的盐浓度为320.0 mmol/L,洗脱长度为0.58 CV,最大收率达到65.5%。该方案中,第一步洗脱先以较低的盐浓度洗出大部分酸性异质体,再用第二步高盐洗出剩余产物。因此第一步洗脱的盐浓度控制极为重要,决定了产物的纯度和收率。

根据前文优化结果,针对两步阶跃洗脱方案,进一步考察第一步洗脱盐浓度对洗脱曲线的影响,结果见图3。可以发现,仅仅3 mmol/L的盐浓度变

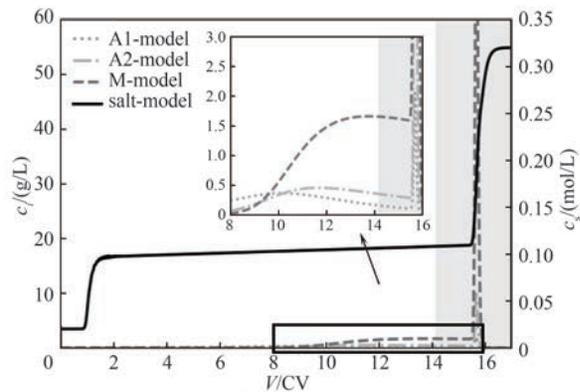
表3 不同洗脱方式的优化结果

Table 3 Process optimization of different elution methods

洗脱方式		最大收率/(纯度为89%)
单步洗脱	等度洗脱	59.2
	梯度洗脱	61.9
两步洗脱	两步阶跃	65.5
	等度-梯度	64.2
	梯度-等度	65.6
	两步梯度	64.1
三步洗脱	三步阶跃	65.5
	等度-梯度-等度	65.1
	梯度-等度-梯度	65.0



(a) 两步阶跃洗脱



(b) 梯度-等度洗脱

图2 优化后不同洗脱方式的洗脱曲线  
(阴影部分为收集区间)

Fig.2 Elution curves of different optimized elution modes  
(the shaded parts are the collection ranges)

化就会导致洗脱曲线形状发生改变,说明洗脱过程对盐浓度极度敏感。保持收集区间不变,图4给出了第一步洗脱盐浓度在103.4 mmol/L附近变化幅度为6%时,单抗纯度和收率的变化情况(图中虚线表示操作点位置)。可以发现,盐浓度变化仅6.0 mmol/L,单抗纯度波动大于5%,收率波动大于30%。因此,前文得到的优化方案的稳健性不佳。

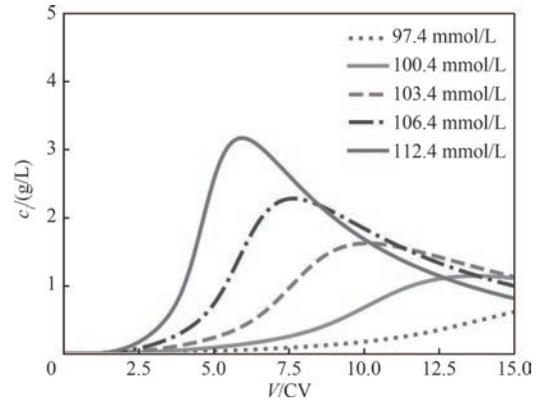


图3 不同盐浓度的第一步阶跃洗脱曲线

Fig.3 First-step elution curves of different salt concentrations

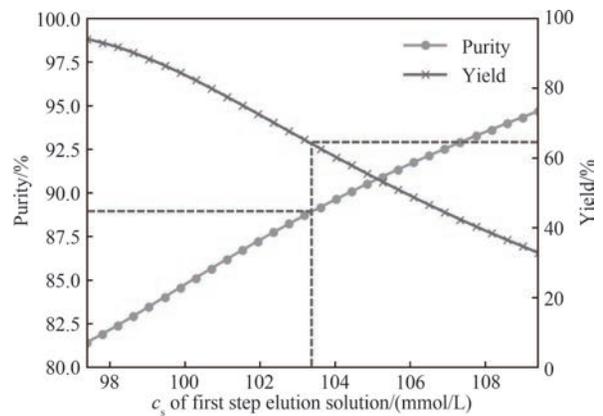


图4 第一步洗脱盐浓度对两步阶跃洗脱的纯度和收率的影响

Fig.4 Effects of first-step elution salt concentration on purity and yield of two-step stepwise elution

### 2.3 考虑过程稳健性的洗脱条件优化

为了增大过程稳健性,扩大洗脱盐浓度的操作区间,进一步对前文得到的两步阶跃中第一步洗脱的盐浓度进行稳健约束优化,包括第一步洗脱的长度、第一步洗脱盐浓度、第二步洗脱盐浓度,同时对第一步洗脱盐浓度的不确定性导致的收率变化进行约束。比较分析不同洗脱条件的洗脱曲线,直至收敛得到稳健且较高过程收率的洗脱条件。

在收集区间不变的条件下,优化得到过程相对稳健的两步阶跃洗脱方案如下:第一步洗脱盐浓度为99.2 mmol/L,洗脱长度为11.70 CV;第二步洗脱盐浓度为280.0 mmol/L,洗脱长度为3.30 CV。洗脱曲线见图5。图6展示了第一步洗脱盐浓度在99.2 mmol/L附近变化幅度为6%时对应的纯度和收率变化曲线(虚线表示操作点位置)。若保持收集区间不变,当第一步等度洗脱盐浓度变化6.0 mmol/L时,收率波

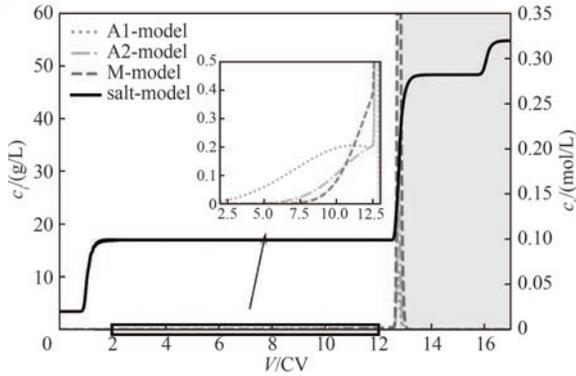


图5 收集区间恒定的稳健优化两步阶跃洗脱曲线  
Fig.5 Elution curve of optimized two-step stepwise elution under the robust constraints and fixed collection range

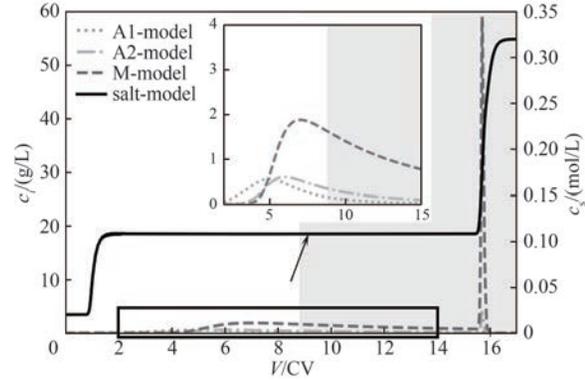


图7 收集区间变化的稳健优化两步阶跃洗脱曲线  
Fig.7 Elution curve of optimized two-step stepwise elution under the robust constraints and changed collection range

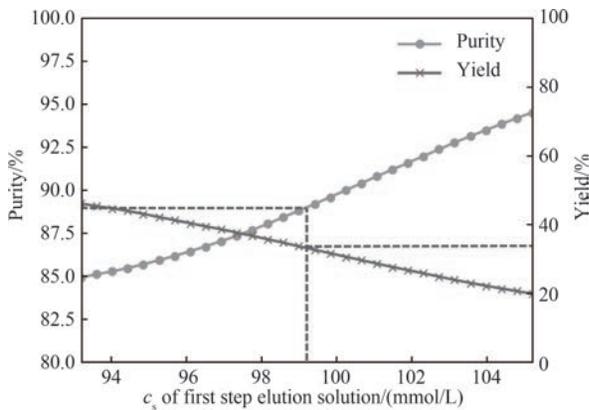


图6 第一步洗脱盐浓度对稳健优化及收集区间恒定的两步阶跃洗脱纯度和收率的影响  
Fig.6 Effects of first-step elution salt concentration on purity and yield of optimized two-step stepwise elution under the robust constraints and fixed collection range

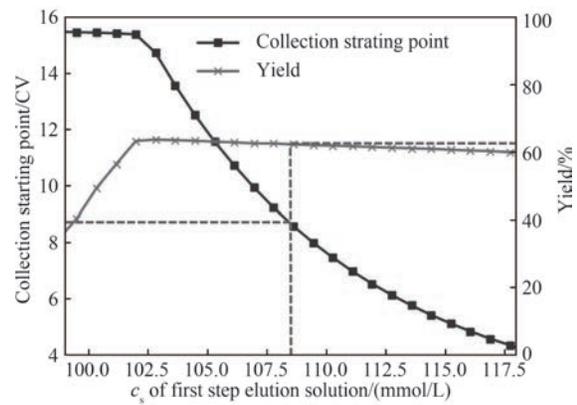


图8 第一步洗脱盐浓度对稳健优化及收集区间变化的两步阶跃洗脱收集起点和收率的影响  
Fig.8 Effects of first-step elution salt concentration on purity and yield of optimized two-step stepwise elution under the robust constraints and changed collection range

动小于10%，过程稳健性大大提高。但是，此方案的收率较低。由此可见，提高过程稳健性的代价是收率大幅度降低，这主要是因为收集区间恒定的限制导致收率不能最大化。

为了提高过程的稳健性同时提高收率，进一步提出收集区间和盐浓度同时变化的方案。把收集区间设为可变的工艺条件之一，用前文同样的方法进行稳健约束的过程优化，得到洗脱条件为：第一步洗脱盐浓度为108.5 mmol/L，洗脱长度为14.38 CV；第二步洗脱盐浓度为320.0 mmol/L，洗脱长度为0.62 CV。洗脱曲线见图7。图8展示了第一步洗脱盐浓度变化幅度为6%时对应的收集起点和收率变化曲线(虚线表示操作点位置)。可以发现，洗脱盐浓度从103.4 mmol/L变化到117.5 mmol/L，收率变化控制在5%内，过程较为稳健，最大收率为63.45%。此方案能同时满足较高收率和过程稳健性要求。

这是因为第一步洗脱盐浓度变化时，收集区间可同步进行调整，使单抗始终满足纯度要求( $\geq 89\%$ )，同时达到收率最大化。

#### 2.4 层析分离实验验证

为了确认上述模型优化结果，进行了4个条件的实验验证。其中，实验I是未考虑稳健性得到的最优操作点，可达到最大过程收率；实验II是稳健约束优化后确定的洗脱条件。为了进一步确认实验II的第一步洗脱盐浓度的操作区间，进行了操作区间上限和下限考察，分别为实验III和实验IV。具体实验条件见表4，第二步等度洗脱盐浓度均为320 mmol/L，结果见图9。

从图9可以看出，层析分离验证实验的洗脱曲线与模型预测吻合良好。表4中实验值是按照模型预测的收集区间收集时对应的纯度和收率，偏差均小于7%。整体而言，验证实验的分离效果优于模

表4 层析分离验证实验与模型预测结果比较

序号	洗脱总长度/CV	收集 起点/CV	第一步等度洗脱		纯度			收率		
			洗脱长度/CV	盐浓度/(mmol/L)	预测值/%	实验值/%	偏差/%	预测值/%	实验值/%	偏差/%
I	15.0	13.80	14.42	103.4	89.0	92.2	3.47	65.5	64.2	2.02
II	15.0	11.00	14.38	108.5	89.0	91.1	2.31	63.4	59.8	6.02
III	15.0	16.06	14.38	98.9	89.0	91.7	2.94	43.8	43.5	0.69
IV	15.0	4.40	14.38	117.5	89.0	89.0	0	60.0	57.5	4.35

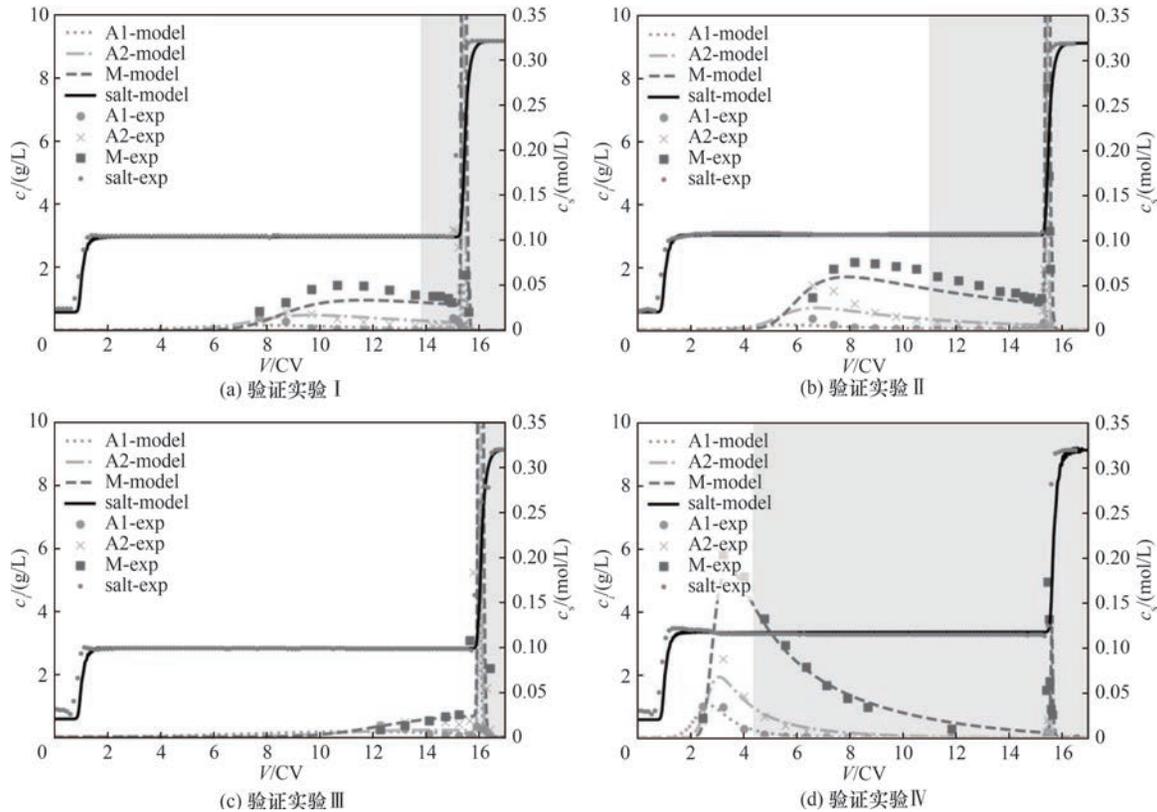


图9 层析分离验证实验与模型预测结果比较

Fig.9 Comparison of chromatographic separation verification experiments and model predicted results

型预测,纯度比预测的89%稍高,分析原因主要是A2酸性异质体在模型校准时匹配程度不够高,导致模型预测存在一定偏差<sup>[31]</sup>。结果表明,经过稳健性约束优化,在保证单抗纯度大于或等于89%条件下,第一步洗脱盐浓度在103.4~117.5 mmol/L时,过程收率波动小于7%,过程具有较好的稳健性,与模型预测基本一致。基于表4的验证实验,若调整收集区间控制纯度为89%,4个实验的收率均高于表中数值,分别为85.3%、71.1%、83.7%、57.5%,最大收率可达到85.3%,实验III的收率同样满足工艺要求。因此第一步洗脱盐浓度的操作区间可扩大至98.9~117.5 mmol/L,此区间内纯度和收率均满足要求,过程稳健性显著提高,有利于实际应用。

### 3 结 论

针对CEX分离单抗电荷异质体,建立层析机理模型,辅助洗脱条件优化。设计了校准实验,根据PbP法进行参数分步拟合,模型计算与实验吻合良好。利用模型,对不同洗脱方式进行了过程优化,模型预测洗脱曲线并估算纯度和收率,优化得出两步阶跃洗脱方法,但分析发现该洗脱条件对第一步洗脱的盐浓度极为敏感。进一步考虑过程稳健性,对第一步等度洗脱盐浓度进行稳健约束优化,并进行了实验验证,两步阶跃洗脱收率达到85.3%,第一步等度洗脱盐浓度控制在98.9~117.5 mmol/L内均能得到较高收率。结果表明,层析模型辅助方法有助于确定最优操作点,评价过程稳定性,促进难分

离体系的分离工艺优化。

### 参考文献

- [1] Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, **20**: 491–495.
- [2] Fisher A C, Kamga M H, Agarabi C, et al. The current scientific and regulatory landscape in advancing integrated continuous biopharmaceutical manufacturing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, **37**(3): 253–267.
- [3] Kaplon H, Chenoweth A, Crescioli S, et al. Antibodies to watch in 2022[J]. *MAbs*, 2022, **14**(1): 2014296.
- [4] Rathore A S, Winkle H. Quality by design for biopharmaceuticals [J]. *Nature Biotechnology*, 2009, **27**: 26–34.
- [5] Saleh D, Wang G, Rischawy F, et al. In silico process characterization for biopharmaceutical development following the quality by design concept[J]. *Biotechnology Progress*, 2021, **37**(6): e3196.
- [6] Hong G, Bazin-Redureau M I, Scherrmann J M. Pharmacokinetics and organ distribution of cationized colchicine-specific IgG and Fab fragments in rat[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999, **88**(1): 147–153.
- [7] Chung S, Tian J, Tan Z J, et al. Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, **115**(7): 1646–1665.
- [8] Ahmed S, Atia N N, Rageh A H. Selectivity enhanced cation exchange chromatography for simultaneous determination of peptide variants[J]. *Talanta*, 2019, **199**: 347–354.
- [9] Fekete S, Beck A, Veuthey J L, et al. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, **113**: 43–55.
- [10] Benner S W, Welsh J P, Rauscher M A, et al. Prediction of lab and manufacturing scale chromatography performance using mini-columns and mechanistic modeling[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2019, **1593**: 54–62.
- [11] Jakobsson N, Degerman M, Stenborg E, et al. Model based robustness analysis of an ion-exchange chromatography step[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2007, **1138**(1/2): 109–119.
- [12] Close E J, Salm J R, Iskra T, et al. Fouling of an anion exchange chromatography operation in a monoclonal antibody process: visualization and kinetic studies[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, **110**(9): 2425–2435.
- [13] Andris S, Hubbuch J. Modeling of hydrophobic interaction chromatography for the separation of antibody–drug conjugates and its application towards quality by design[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, **317**: 48–58.
- [14] Lin D Q, Zhang Q L, Yao S J. Model-assisted approaches for continuous chromatography: current situation and challenges[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2021, **1637**: 461855.
- [15] Forrer N, Butté A, Morbidelli M. Chromatographic behavior of a polyclonal antibody mixture on a strong cation exchanger column (part I): Adsorption characterization[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2008, **1214**(1/2): 59–70.
- [16] Brooks C A, Cramer S M, Rosano T G. Preparative chromatographic purification of cyclosporine metabolites[J]. *Clinical Chemistry*, 1993, **39**(3): 457–466.
- [17] Yamamoto S. Plate height determination for gradient elution chromatography of proteins[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **48**(5): 444–451.
- [18] Keller W R, Evans S T, Ferreira G, et al. Use of MiniColumns for linear isotherm parameter estimation and prediction of benchtop column performance[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2015, **1418**: 94–102.
- [19] Saleh D, Wang G, Mueller B, et al. Cross-scale quality assessment of a mechanistic cation exchange chromatography model[J]. *Biotechnology Progress*, 2021, **37**(1): e3081.
- [20] Creasy A, Reck J, Pabst T, et al. Systematic interpolation method predicts antibody monomer–dimer separation by gradient elution chromatography at high protein loads[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, **14**(3): e1800132.
- [21] Saleh D, Wang G, Müller B, et al. Straightforward method for calibration of mechanistic cation exchange chromatography models for industrial applications[J]. *Biotechnology Progress*, 2020, **36**(4): e2984.
- [22] Chen Y C, Yao S J, Lin D Q. Parameter-by-parameter method for steric mass action model of ion exchange chromatography: theoretical considerations and experimental verification[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2022, **1680**: 463418.
- [23] Chen Y C, Yao S J, Lin D Q. Parameter-by-parameter method for steric mass action model of ion exchange chromatography: simplified estimation for steric shielding factor[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2023, **1687**: 463655.
- [24] Huuk T C, Briskot T, Hahn T, et al. A versatile noninvasive method for adsorber quantification in batch and column chromatography based on the ionic capacity[J]. *Biotechnology Progress*, 2016, **32**(3): 666–677.
- [25] Hahn T, Huuk T, Osberghaus A, et al. Calibration-free inverse modeling of ion-exchange chromatography in industrial antibody purification[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2016, **16**(2): 107–113.
- [26] Rüdert M, Gillet F, Heege S, et al. Combined Yamamoto approach for simultaneous estimation of adsorption isotherm and kinetic parameters in ion-exchange chromatography[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2015, **1413**: 68–76.
- [27] Heymann W, Glaser J, Schlegel F, et al. Advanced score system and automated search strategies for parameter estimation in mechanistic chromatography modeling[J]. *Journal of Chromatography A*, 2022, **1661**: 462693.
- [28] Saleh D, Hess R, Ahlers-Hesse M, et al. Modeling the impact of amino acid substitution in a monoclonal antibody on cation exchange chromatography[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, **118**(8): 2923–2933.
- [29] Natarajan V, Ghose S, Cramer S M. Comparison of linear gradient and displacement separations in ion-exchange systems[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **78**(4): 365–375.
- [30] Hahn T, Baumann P, Huuk T, et al. UV absorption-based inverse modeling of protein chromatography[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2016, **16**(2): 99–106.
- [31] Cherra D E, Khattabi S, Guiochon G. Adsorption behavior and prediction of the band profiles of the enantiomers of 3-chloro-1-phenyl-1-propanol. Influence of the mass transfer kinetics[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2000, **877**(1/2): 109–122.