CONTINUOUS PROCESSING FOR PURIFICATION OF BIOTECH THERAPEUTICS

NIKHIL KATEJA

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI
FEBRUARY 2020

CONTINUOUS PROCESSING FOR PURIFICATION OF BIOTECH THERAPEUTICS

by

NIKHIL KATEJA

Department of Chemical Engineering

Submitted

in fulfilment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

FEBRUARY 2020

Dedicated to my family

Certificate

This is to certify that the thesis entitled **"CONTINUOUS PROCESSING FOR PURIFICATION OF BIOTECH THERAPEUTICS"** being submitted by **NIKHIL KATEJA** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of **Doctor of Philosophy** is a record of the original bonafide research work carried out by him under my guidance and supervision. The results contained in this thesis have not been submitted in part or in full to any other University or Institute for the award of any degree or diploma.

I certify that he has pursued the prescribed course of research.

Prof. Anurag S. Rathore
Department of Chemical Engineering
Indian Institute of Technology Delhi

Acknowledgements

This thesis would not have been materialized without the immeasurable help from many people who gave their support in different ways. To them I would like to convey my heartfelt gratitude and sincere appreciation.

I owe my deepest gratitude to my Professor, Dr. Anurag S. Rathore for his encouragement and support in each phase of my research endeavor. As a supervisor, he has mentored my research work from the beginning of the doctoral program. Personally, as a well-wisher he helped me to overcome numerous obstacles. He supported me not only as a research guide but, also emotionally, giving ample moral support and freedom.

With his insightful discussions and constructive feedback, he channelized my research work in proper direction. Being my inspiration, he taught me how to execute research projects in a perfect manner. Without his guidance and continuous optimism this thesis would not have been possible. I owe my profound thanks to him for his constant support and his effort to shape my dissertation till the last moment. He is an unrivalled mentor who accompanied throughout the gestation of my work. I am very grateful to his trust in me and his positive stimulation.

I am pleased to acknowledge my PhD research committee members, Prof. Sudip Pattanayek, Prof. Anupam Shukla and Prof. Tapan K. Chaudhuri for their significant influence in formulating the ideas. Their insights helped me move forward.

I would like to specially thank the entire continuous downstream processing team- Anamika Tiwari, Vishwanath Hebbi, Garima Thakur, Anupa Pahuja and Sharad Narnawre for their scintillating cooperation during the time when I felt exhausted. I thank all other lab members of bioseparations lab for their kind support and co-operation during this work.

I am extremely grateful to Dr. Vijesh Kumar who taught me various lab instruments for my PhD work upon joining the bioseparations lab.

I specially thank my friend Sumit Kumar Singh who provided immense support for mass spectroscopic analysis. Special thanks is also due to Naresh Kumar for all their immense co-operation at times of need.

No words of gratitude can justify the support, help, care and love I have received from my dear friends Rupesh Tamgadge, Rohit Bansal, Saurabh Patil, Hitesh Chhabra, Nidhi Chhabra. I feel privileged and lucky to have you all in my life.

I would also like to gratefully acknowledge the support of all the bachelor's degree students- Harshit Agarwal, Abhishek Kumar Sharma, Devashish Kumar, Suruchi Sethi and Samit Dureja for helpful discussions and for their help rendered in carrying out experiments.

I would also like to thank Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) for providing me salary in the form of stipend till fourth years of my degree.

Special thanks to my parents and my wife Snehal who have put in their efforts and prayers for me to attain success in life. I am falling short of words to express my feelings towards them. Their blessings and encouragement were essential for my successful completion of this work.

NIKHIL KATEJA

Abstract

Despite the extraordinary success, the biopharma industry is presently facing multiple economic, political and regulatory challenges. As a result, there is a significant drive to boost the overall productivity of biotherapeutic manufacturing by utilization of continuous processing. However, the actual implementation of continuous manufacturing is highly contingent on development of novel continuous processing technologies and their efficient integration. In this thesis, we attempt to alleviate a number of challenges associated with continuous bioprocessing by following a two-fold approach: (a) development of novel continuous manufacturing technologies; (b) utilization of these technologies for development of cost effective alternatives to the current batch manufacturing .

While the technology for continuous upstream processing has been explored for more than a decade (perfusion), options available for continuous downstream processing are limited and subject to ongoing development. Such enabling technologies are especially lacking for processes which require reaction and mixing like refolding and precipitation. In our attempt to solve this problem, we report (chapter 3) on development of a novel coiled flow inversion reactor (CFIR). The CFIR has been proposed as a configuration consisting of helical coils bent at equidistant right angles to cause flow inversion for improved cross sectional mixing in the tube. The configuration can be appropriately utilized to provide a sharper residence time distribution along with good cross-sectional mixing and a better emulation of plug flow than a simple straight tube or a helix. The novel reactor has been explored for continuous protein refolding and continuous precipitation. The performance of the continuous protocol has been compared with an optimized batch protocol. It has been demonstrated that operation in CFIR allows for refolding at higher protein concentrations (2 folds) along with a decrease in the time required to reach equilibrium conversion (1.5 folds). In case of continuous precipitation, improved clearance of host cell proteins (HCP) and host cell deoxyribonucleic acid (DNA) was obtained compared to batch. In both the case studies, continuous configuration offered a 6-16X increase in productivity as non-productive steps like cleaning and filling steps were eliminated and buffer consumption was significantly reduced without any adverse effect on product quality. Effectively, the configuration can significantly contribute towards creation of an integrated continuous bioprocessing platform.

Actual implementation of continuous manufacturing is highly contingent on integration between different unit operations. Recent times has therefore seen an impetus towards development of solutions for efficient integration of continuous unit operations. Integrated

chromatographic platform processes have the potential to simplify the downstream processing train without sacrificing the product quality requirements. Thus, the primary motivation (chapter 5) was to develop an integrated chromatographic platform for purification of monoclonal antibody (mAb) therapeutics that can deliver the desired separation of both charge variants and aggregates, in addition to the process related impurities like HCP and host cell DNA. To achieve the same, an integrated two-stage chromatographic process platform consisting of cation exchange chromatography and multimodal chromatography has been proposed. The versatility of the proposed platform has been successfully demonstrated for three different mAbs. It has been shown that in each case charge variant separation was achieved with the required clearance of aggregates (< 1%), HCP (< 10 ppm), and DNA (< 5ppb). Moreover, the proposed platform is conducive to use for development of a continuous process and offers 50% reduction in process time, absence of any hold steps, lower buffer utilization, lower risk of external contamination and decreased operational costs when compared to the conventional purification platforms.

Based on the success of creation of technology enablers in the form of the CFIR and integrated chromatographic platforms, the later part of thesis focusses on utilization of these developed enablers for creation of end-to-end continuous platforms. Creation of two platforms was targeted- one for proteins expressed in bacterial hosts as inclusion bodies and the other for monoclonal antibody therapeutics expressed in mammalian hosts. In chapter 4, we propose an end-to-end integrated continuous downstream process (from inclusion bodies to unformulated drug substance) for a therapeutic protein expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies, with granulocyte colony stimulating factor (GCSF) as our model molecule. The final process for GCSF consisted of continuous refolding in a coiled flow inverter reactor directly coupled to a three-column periodic counter-current chromatography for capture of the product followed by a three-column con-current chromatography for polishing. The continuous bioprocessing train was run uninterrupted for 26 h to demonstrate its capability and the resulting output was analyzed for the various critical quality attributes, namely product purity (>99%), high molecular weight impurities (<0.5%), host cell proteins (<100 ppm), and host cell DNA (<10 ppb). All attributes were found to be consistent over the period of operation. The developed assembly offers smaller facility footprint, higher productivity, fewer hold steps, and significantly higher equipment and resin utilization. The complexities of process integration in the context of continuous processing have also been highlighted.

For the case of mAb therapeutics (chapter 6), Protein A capture chromatography, the core of a mAb purification platform, is known to account for more than 50% of downstream processing

costs along with other limitations including lack of complete stability to alkaline cleaning solutions, relatively lower binding capacity, and ligand leaching. Researchers have explored alternatives to protein A chromatography, both chromatographic and non-chromatographic, but with limited success. In this work, we have proposed a non-protein A purification platform for continuous processing of monoclonal antibodies (mAbs). The proposed platform consists of precipitation in coiled flow inverter reactor, cation exchange chromatography for capture, multimodal chromatography and a salt tolerant anion exchange membrane as polishing steps. The versatility of the proposed platform has been successfully demonstrated for three different mAbs. In all cases, acceptable process yield was obtained (70 to 80 %) and the product quality attributes of the final unformulated drug substance were consistent and well within accepted limits (HCP <100 ppm, DNA < 10 ppb, % aggregate content < 1%) along with desired charge variant composition.

We believe that the studies presented here as a part of this thesis will promote development of highly efficient, universal, end-to-end, fully continuous platforms for manufacturing of biotherapeutics.

सार

असाधारण सफलता के बावजूद, बायोफार्मा उद्योग वर्तमान में कई आर्थिक, राजनीतिक और नियामक चुनौतियों का सामना कर रहा है। नतीजतन, निरंतर प्रसंस्करण के उपयोग द्वारा जैव-चिकित्सीय विनिर्माण की समग्र उत्पादकता को बढ़ावा देने के लिए एक महत्वपूर्ण ड्राइव है। हालांकि, निरंतर निर्माण का वास्तविक कार्यान्वयन उपन्यास निरंतर प्रसंस्करण प्रौद्योगिकियों के विकास और उनके कुशल एकीकरण पर अत्यधिक आकस्मिक है। इस थीसिस में, हम एक दोहरी दृष्टिकोण का पालन करते हुए निरंतर बायोप्रोसेसिंग से जुड़ी कई चुनौतियों को दूर करने का प्रयास करते हैं: (ए) उपन्यास निरंतर निर्माण प्रौद्योगिकियों का विकास; (बी) वर्तमान बैच विनिर्माण के लिए लागत प्रभावी विकल्पों के विकास के लिए इन प्रौद्योगिकियों का उपयोग।

जबकि सतत अपस्ट्रीम प्रसंस्करण के लिए प्रौद्योगिकी को एक दशक से अधिक (छिड़काव) के लिए खोजा गया है, निरंतर बहाव प्रसंस्करण के लिए उपलब्ध विकल्प सीमित हैं और चल रहे विकास के अधीन हैं। ऐसी सक्षम प्रौद्योगिकियों में विशेष रूप से ऐसी प्रक्रियाओं की कमी होती है जिनके लिए प्रतिक्रिया और मिश्रण की आवश्यकता होती है जैसे कि रीफोल्डिंग और प्रेसिपीटशन। इस समस्या को हल करने के हमारे प्रयास में, हम एक उपन्यास कोइलेड फ्लो इन्वर्टर रिएक्टर (सीएफआईआर) के विकास पर रिपोर्ट (अध्याय 3) करते हैं। सीएफआईआर को एक विन्यास के रूप में प्रस्तावित किया गया है, जो नली में बेहतर पार अनुभागीय मिश्रण के लिए प्रवाह उलटा पैदा करने के लिए विषुवत समकोण पर सहायक कुंडली से बना है। विन्यास का उपयोग उचित क्रॉस-अनुभागीय मिश्रण और एक सरल स्ट्रेट ट्यूब या हेलिक्स की तुलना में प्लग प्रवाह के बेहतर अनुकरण के साथ एक तेज निवास समय वितरण प्रदान करने के लिए किया जा सकता है। उपन्यास रिएक्टर को निरंतर प्रोटीन रीफॉल्डिंग और निरंतर प्रेसिपीटशन के लिए खोजा गया है। निरंतर प्रोटोकॉल के प्रदर्शन की तुलना एक अनुकूलित बैच प्रोटोकॉल के साथ की गई है। यह प्रदर्शित किया गया है कि सीएफआईआर में ऑपरेशन उच्च प्रोटीन सांद्रता (दो गुना) के साथ-साथ संतुलन रूपांतरण (डेढ़ गुना) तक पहुंचने के लिए आवश्यक समय में कमी के लिए

अनुमति देता है। निरंतर प्रेसिपीटशन के मामले में, मेजबान सेल प्रोटीन (एचसीपी) और मेजबान सेल डीऑक्सीराइबोन्यूक्लिक एसिड (डीएनए) की बेहतर निकासी बैच की तुलना में प्राप्त की गई थी। दोनों मामले के अध्ययन में, निरंतर कॉन्फ़िगरेशन ने उत्पादकता में 6-16X वृद्धि की पेशकश की क्योंकि सफाई और भरने वाले कदम जैसे गैर-उत्पादक कदम समाप्त हो गए और उत्पाद की गुणवत्ता पर कोई प्रतिकूल प्रभाव डाले बिना बफर खपत को काफी कम कर दिया गया। प्रभावी रूप से, कॉन्फ़िगरेशन एक एकीकृत सतत बायोप्रोसेसिंग प्लेटफॉर्म के निर्माण में महत्वपूर्ण योगदान दे सकता है।

विभिन्न इकाइयों के संचालन के बीच एकीकरण पर निरंतर विनिर्माण का वास्तविक कार्यान्वयन अत्यधिक आकस्मिक है। इसलिए हाल के दिनों में निरंतर यूनिट संचालन के कुशल एकीकरण के लिए समाधानों के विकास की दिशा में गति देखी गई है। एकीकृत क्रोमैटोग्राफिक प्लेटफ़ॉर्म प्रक्रियाओं में उत्पाद की गुणवत्ता की आवश्यकताओं का त्याग किए बिना डाउनस्ट्रीम प्रसंस्करण ट्रेन को सरल बनाने की क्षमता है। इस प्रकार, प्राथमिक प्रेरणा (अध्याय 5) को मोनोक्लोनल एंटीबॉडी (मैब) चिकित्सीय की शुद्धि के लिए एक एकीकृत क्रोमैटोग्राफिक प्लेटफ़ॉर्म विकसित करना था जो एचसीपी और डीएनए के अलावा चार्ज वेरिएंट और एग्रीगेट दोनों के वांछित पृथक्करण को वितरित कर सकता है। । उसी को प्राप्त करने के लिए, एक एकीकृत दो-चरण क्रोमैटोग्राफिक प्रक्रिया मंच जिसमें कटियन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी और मल्टीमॉडल क्रोमैटोग्राफी शामिल है, प्रस्तावित किया गया है। प्रस्तावित मंच की बहुमुखी प्रतिभा को तीन अलग-अलग मैबस के लिए सफलतापूर्वक प्रदर्शित किया गया है। यह दिखाया गया है कि प्रत्येक मामले में चार्ज वेरिएंट पृथक्करण समुच्चय (<1%), एचसीपी (<10 पीपीएम), और डीएनए (<5 पीपीबी) की आवश्यक मंजूरी के साथ हासिल किया गया था। इसके अलावा, प्रस्तावित मंच एक सतत प्रक्रिया के विकास के लिए उपयोग करने के लिए अनुकूल है और पारंपरिक शुद्धि प्लेटफार्मों की तुलना में प्रक्रिया समय में 50% की कमी, किसी भी होल्ड स्टेप्स की अनुपस्थिति, कम बफर उपयोग, बाहरी संदूषण के कम जोखिम और परिचालन लागत में कमी की पेशकश करता है।

सीएफआईआर और एकीकृत क्रोमैटोग्राफिक प्लेटफॉर्म के रूप में प्रौद्योगिकी एनबलर्स के निर्माण की सफलता के आधार पर, एंड-टू-एंड निरंतर प्लेटफार्मों के निर्माण के लिए इन विकसित एन्बलर्स के

उपयोग पर थीसिस का बाद का हिस्सा फोकस्सड है। दो प्लेटफार्मों के निर्माण को लक्षित किया गया था - एक बैक्टीरिया होस्ट में शामिल किए गए प्रोटीन के लिए और दूसरा माममालियन होस्ट में मोनोक्लोनल एंटीबॉडी चिकित्सा विज्ञान के लिए व्यक्त किया गया। अध्याय 4 में, हम अपने मॉडल अणु के रूप में ग्रेनुलोसाइट कॉलोनी स्टिमुलेटिंग फैक्टर (जी सी एस ऍफ़) के साथ एस्चेरीचिअ कोली में शामिल चिकित्सीय प्रोटीन के लिए एक एंड-टू-एंड एकीकृत निरंतर बहाव प्रक्रिया (असंरचित दवा पदार्थ से) का प्रस्ताव करते हैं। जीसीएसएफ के लिए अंतिम प्रक्रिया में एक कुंडलित प्रवाह पलटनेवाला रिएक्टर में निरंतर रीफॉल्डिंग शामिल थी जो सीधे उत्पाद के कैप्चर और पॉलिशिंग के लिए एक आवधिक काउंटर- करंट क्रोमैटोग्राफी के लिए युग्मित था। निरंतर बायोप्रोसेसिंग ट्रेन को 26 घंटों के लिए अपनी क्षमता का प्रदर्शन करने के लिए निर्बाध रूप से चलाया गया था और परिणामी आउटपुट का विश्लेषण विभिन्न महत्वपूर्ण गुणवत्ता विशेषताओं, अर्थात् उत्पाद शुद्धता (> 99%), उच्च आणविक भार अशुद्धियों (<0.5%), मेजबान सेल प्रोटीन (<100 पीपीएम), और मेजबान सेल डीएनए (<10 पीपीबी) के लिए किया गया था। सभी विशेषताओं को ऑपरेशन की अवधि के अनुरूप पाया गया। विकसित असेंबली छोटी सुविधा के पदचिह्न, उच्च उत्पादकता, कम होल्ड स्टेप्स और काफी उच्च उपकरण और रेसिन उपयोग प्रदान करती है। निरंतर प्रसंस्करण के संदर्भ में प्रक्रिया एकीकरण की जटिलताओं को भी उजागर किया गया है।

मैब थैरेप्यूटिक्स (अध्याय 6) के मामले में, प्रोटीन ए कैप्चर क्रोमैटोग्राफी, मैब शुद्धि प्लेटफॉर्म का मुख्य भाग, 50% से अधिक डाउनस्ट्रीम प्रोसेसिंग लागत के साथ-साथ अन्य सीमाओं के साथ खाते में जाना जाता है, जिसमें सफाई समाधानों के लिए पूर्ण स्थिरता की कमी, अपेक्षाकृत कम बाध्यकारी क्षमता, और लिगेंड लीचिंग शामिल है। शोधकर्ताओं ने प्रोटीन ए क्रोमैटोग्राफी, क्रोमैटोग्राफिक और गैर-क्रोमैटोग्राफिक दोनों के विकल्पों का पता लगाया है, लेकिन सीमित सफलता के साथ। इस काम में, हमने मोनोक्लोनल एंटीबॉडी (मैबस) के निरंतर प्रसंस्करण के लिए एक गैर-प्रोटीन ए शुद्धि मंच का प्रस्ताव दिया है। प्रस्तावित मंच में कुंडलित प्रवाह इन्वर्टर रिएक्टर में प्रेसिपीटशन, कैप्चरिंग के लिए कटियन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी, पॉलिशिंग चरणों के रूप में मल्टीमॉडल क्रोमैटोग्राफी और एक नमक सहिष्णु

आयनों विनिमय झिल्ली है। प्रस्तावित मंच की बहुमुखी प्रतिभा को तीन अलग-अलग मैबस के लिए सफलतापूर्वक प्रदर्शित किया गया है। सभी मामलों में, स्वीकार्य प्रक्रिया उपज (70 से 80%) प्राप्त की गई थी और अंतिम असंबंधित दवा पदार्थ की उत्पाद गुणवत्ता विशेषताएँ सुसंगत और अच्छी तरह से स्वीकार्य सीमा के भीतर थीं (एचसीपी <100 पीपीएम, डीएनए <10 पीपीबी,% एग्रीगेट <1%) वांछित चार्ज संस्करण रचना के साथ।

हमारा मानना है कि इस थीसिस के एक हिस्से के रूप में यहां प्रस्तुत अध्ययन जैव-तंत्र के निर्माण के लिए अत्यधिक कुशल, सार्वभौमिक, एंड-टू-एंड, पूरी तरह से निरंतर प्लेटफार्मों के विकास को बढ़ावा देगा।

Contents

List of Figures

List of Tables