PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY IN CONTINUOUS DOWNSTREAM MANUFACTURING OF BIOTHERAPEUTICS

GARIMA THAKUR

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

August 2022

© Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2022

PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY IN CONTINUOUS DOWNSTREAM MANUFACTURING OF BIOTHERAPEUTICS

by

Garima Thakur
Department of Chemical Engineering

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

Indian Institute of Technology Delhi
August 2022

Dedicated to my family

Certificate

This is to certify that the thesis entitled “PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY IN CONTINUOUS DOWNSTREAM MANUFACTURING OF BIOTHERAPEUTICS” being submitted by GARIMA THAKUR 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 her 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 she 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 materialized without immense support from many people who shared their help, guidance and wisdom 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. He is an unrivalled mentor and this thesis would not have been possible without his guidance and continuous optimism. With his insightful discussions and constructive feedback, he helped me to channel my research efforts in a clear and productive direction. He taught me how to plan and execute research projects and inspired me to pursue ambitious goals. He also guided me in my personal life and helped me to overcome numerous obstacles, providing moral support and freedom. I owe him my profound thanks for his positive stimulation and trust in me.

I am very pleased to acknowledge my PhD research committee members, Prof. James Gomes, Prof. Anupam Shukla and Prof. Manoj Ramteke for their support in formulating the ideas in this thesis. Their insights helped me move forward.

I also extend sincere thanks to the Tata Consultancy Services Research Scholar Program for providing me with a research scholarship and excellent mentorship and support throughout the years of my doctoral studies.

I would like to specially thank my close colleagues in the lab - Anamika Tiwari, Anupa Pahuja, Jashwant Kumar, Kathiresan, Nikhil Kateja, Nikita Saxena, Nitika, Shantanu Banerjee, Somesh Mishra, and Vishwanath Hebbi, for their inspiring work ethic and unstinting support, due to which we were able to carry out many rich collaborations. I would also like to thank all the other members of the bioprocessing lab for their kind support and co-operation at all times.

Finally, my deepest thanks to my brother Gaurav Thakur and my parents Abhay and Surabhi Thakur, whose guidance, blessings, and love were of utmost importance for me while pursuing this degree. Without them, I would not be where I am today.

Garima Thakur

Abstract

Motivated by the rapid growth in the field of biotherapeutics due to the increase in the number of approved biological therapies in the market, including recombinant proteins and hormones, monoclonal antibodies (mAbs), cytokines, growth factors, gene therapy products, vaccines, and cell-based products, there is growing interest among some pharmaceutical companies and contract manufacturing organizations to shift from batch to continuous processing to improve productivity, reduce facility and consumables costs, cope with growing demands, and reduce manufacturing footprints. Development of process control strategies using fundamental and data driven approaches is critical for ensuring process stability over long continuous campaigns and consistently meeting quality targets. However, achieving robust continuous operation requires a high level of monitoring, control and automation to minimize human intervention and handle a wide range of product and process deviations. Process analytical technology (PAT) is a key area of interest in the biopharmaceutical industry, involving rapid monitoring of critical process parameters (CPPs) and critical quality attributes (CQAs) using different types of sensors and modelling approaches to facilitate real-time process monitoring and control. The aim of this thesis is to develop PAT solutions for monitoring and control of continuous downstream unit operations for mAb production using mechanistic, spectroscopic, empirical, rule-based and data-driven models for improved efficiency, robustness, and automation.

In this thesis, several PAT tools and control strategies were developed for downstream unit operations, including capture chromatography, viral inactivation, dead-end filtration, and ultrafiltration. Also, an end-to-end strategy for control of continuous processes using surge tanks for process stability and risk management was developed. The first operation in the downstream train is Protein A chromatography. Due to the valuable nature of the Protein A resin, loading up to the dynamic binding capacity is desired in each cycle to maximize resin utilization. Also, cycle times need to be fixed as the elution from the Protein A step must be continuously directed further downstream so that the following unit operations can run smoothly. A control system was designed to track the amount of mAb loaded onto the Protein A column using near infrared spectroscopy (NIRS) sensors, optimally utilize resin across multiple cycles and enable consistent and periodic elutions so that the downstream unit operations can run smoothly. The next operation in the continuous train is viral inactivation, where tight control of pH is essential, as pH fluctuations above 3.5 can result in incomplete viral inactivation, while fluctuations below 3.5 can lead to significant aggregate formation. Thus, a strategy was developed for in-line pH adjustment post-capture chromatography and

prior to viral inactivation. A model-based controller was developed to accurately predict the pH profile throughout the elution and automatically deliver the correct amount of acid required at each time point to maintain the pH consistently at 3.5 ± 0.2.

At many points in the continuous process, dead-end filtration is required to for primary and secondary clarification as well as in-process sterile filtration. Dead end filtration is conventionally done in batch mode and requires filter pre-sizing using extensive scouting studies, along with filter over-sizing before deployment to handle potential variability. However, continuous manufacturing processes require consistent use of dead-end filtration over weeks or months, with potential unpredictable variations in feed stream attributes. Thus, a dead-end filtration skid was designed for continuous depth filtration, incorporating multiple small-sized filters along with turbidity and pressure sensors with immediate switching to a fresh filter whenever turbidity or pressure breakthrough above a pre-determined cut-off is detected in real time. Finally, in the final stage of the process, ultrafiltration (UF) is used to concentrate the mAb up to the desired final concentration for administration to the patient. There are several challenges that must be overcome before a robust continuous UF operation can be integrated into a continuous mAb processing train, including flux decline due to concentration polarization and membrane fouling, and scheduling of UF steps with preceding chromatography elutions, A strategy was developed that utilizes NIRS sensors, and control pumps and valves to achieve stable continuous UF-DF operation.

Finally, an end-to-end process integration and control strategy was proposed for the continuous train using surge tanks. Surge tanks are critical but often overlooked enablers of continuous bioprocessing. They provide multiple benefits including dampening of concentration gradients and allowing process resumption efforts in case of equipment failure or unexpected deviations, which can occur during a continuous campaign of weeks or months. They are also useful in enabling steady-state operation across a continuous train by facilitating mass balance between unit operations such as chromatography which have periodic loading and elution cycles. However, many researches in the field of continuous bioprocessing are of the opinion that surge tanks should only be introduced when absolutely necessary. There are undeniably downsides of surge tanks, including capital costs, increased product residence time, decreased productivity due to added hold time, and operational complexities due to the introduction of level sensors, weighing balances or cooling jackets. Therefore, an ideal strategy should avoid the placement of unnecessary tanks but also encourage their placement where they can provide critical advantages such as dampening of concentration gradients prior to feed-sensitive unit operations, or flexibility of flow-rate or scheduling for improved CQA control. The present

work developed a general set of guidelines for surge tank placement and demonstrated surge tank-based control for a continuous mAb production train with several deviations in process parameters and feed attributes.

सार

बायोप्रोसेसिंग और बायोथेरेप्यूटिक्स के क्षेत्र में तकनीकी प्रगति से प्रेरित, फार्मास्युटिकल कंपनियां और अनुबंध निर्माण संगठन उत्पादकता में सुधार, सुविधा और उपभोग्य सामग्रियों की लागत को कम करने, बढ़ती मांगों का सामना करने और विनिर्माण पदचिह्न को कम करने के लिए बैच से निरंतर प्रसंस्करण में स्थानांतरित हो रहे हैं। निरंतर संचालन में अपस्ट्रीम टाइट्रे विविधताओं को संभालने, उत्पाद की गुणवत्ता विनिर्देशों को पूरा करने और स्थिर स्थिति में लगातार आवश्यक उत्पाद का उत्पादन करने की क्षमता है। लंबे निरंतर अभियानों में प्रक्रिया स्थिरता सुनिश्चित करने और गुणवत्ता लक्ष्यों को लगातार पूरा करने के लिए मौलिक और डेटा संचालित दृष्टिकोणों का उपयोग करते हुए प्रक्रिया नियंत्रण रणनीतियों का विकास महत्वपूर्ण है। हालांकि, मजबूत निरंतर संचालन को प्राप्त करने के लिए मानव हस्तक्षेप को कम करने और उत्पाद और प्रक्रिया विचलन की एक विस्तृत श्रृंखला को संभालने के लिए उच्च स्तर की निगरानी, नियंत्रण और स्वचालन की आवश्यकता होती है। प्रक्रिया विश्लेषणात्मक प्रौद्योगिकी (पीएटी) बायोफर्मासिटिकल उद्योग में रुचि का एक प्रमुख क्षेत्र है, जिसमें वास्तविक समय प्रक्रिया निगरानी और नियंत्रण की सुविधा के लिए उपन्यास सेंसर और मॉडलिंग दृष्टिकोण का उपयोग करके महत्वपूर्ण प्रक्रिया पैरामीटर (सीपीपी) और महत्वपूर्ण गुणवत्ता विशेषताओं (सीक्यूए) की तेजी से निगरानी शामिल है। इस थीसिस का उद्देश्य बेहतर दक्षता, मजबूती और स्वचालन के लिए मैकेनिस्टिक, स्पेक्ट्रोस्कोपिक, अनुभवजन्य, नियम-आधारित और डेटा-संचालित मॉडल का उपयोग करके एमएबी उत्पादन के लिए निरंतर डाउनस्ट्रीम यूनिट संचालन की निगरानी और नियंत्रण के लिए पीएटी समाधान विकसित करना है।

पहला काम प्रोटीन में कॉलम लोडिंग के नियंत्रण के लिए एक पीएटी रणनीति विकसित करना है निरंतर क्रोमैटोग्राफी के नियंत्रण के लिए एक क्रोमैटोग्राफी दृष्टिकोण में मुख्य रूप से कई क्रोमैटोग्राफी चरणों (लोडिंग, वॉश, रेफरेंस, क्लीनिंग और इक्विलिब्रेशन) का उचित शेड्यूलिंग शामिल है, जिसमें निरंतर सेटअप का लाभ उठाया जाता है। समानांतर में काम करने वाले कई कॉलम, इनलेट, आउटलेट और वाल्व। कई निरंतर क्रोमैटोग्राफी प्रणालियों का प्रदर्शन और व्यावसायीकरण किया गया है, जैसे कि ताल बायोएसएमबी (पाल लाइफ साइंसेज, यूएसए), एक्टा पीसीसी ७५(जीई लाइफ साइंसेज, स्वीडन), बायोएससी लैब (नोवासेप इंक, फ्रांस), और मल्टीकॉलम काउंटरकुरेंट सॉल्वेंट ग्रेडिएंट शुद्धिकरण (एमसीएसजीपी) कॉन्टीक्रोम प्रणाली (क्रोमाकॉन एजी, स्विट्ज़रलैंड)। निरंतर प्रोटीन ए क्रोमैटोग्राफी के लिए एक नियंत्रण प्रणाली स्थापित करने में दो प्रतिस्पर्धी चुनौतियां हैं। सबसे पहले, प्रोटीन ए राल की मूल्यवान प्रकृति के कारण, गतिशील बाध्यकारी क्षमता तक लोड करना प्रत्येक चक्र में राल उपयोग को अधिकतम करने के लिए वांछित है। लोड टाइट्रे पर गतिशील बाध्यकारी क्षमता की महत्वपूर्ण निर्भरता के कारण जटिलता उत्पन्न होती है, जो एक छिड़काव प्रक्रिया के दौरान, साथ ही कॉलम निवास समय और कॉलम चक्रों की संख्या में काफी भिन्न हो सकती है। दूसरे, चक्र के समय को प्रोटीन से रेफरेंस के रूप में तय करने की आवश्यकता है एक कदम को लगातार नीचे की ओर निर्देशित किया जाना चाहिए ताकि निम्नलिखित इकाई संचालन सुचारू रूप से चल सकें। एक नियंत्रण प्रणाली को कई चक्रों में राल का बेहतर उपयोग करने के लिए डिज़ाइन किया गया है, प्राथमिक लोड कॉलम सफलता के बहुत कम स्तर पर सेकेंड-पास लोडिंग शुरू करके उत्पाद को बचाएं, और लगातार और आवधिक क्षालन सक्षम करें ताकि डाउनस्ट्रीम इकाई संचालन सुचारू रूप से चल सके।

अगला काम इन-लाइन पीएच समायोजन पोस्ट-कैप्चर क्रोमैटोग्राफी के नियंत्रण के लिए और वायरल निष्क्रियता से पहले एक पीएटी रणनीति विकसित करना है। प्रक्रिया में इस बिंदु पर, पीएच का कड़ा नियंत्रण आवश्यक है, क्योंकि ३.५ से ऊपर पीएच के उतार-चढ़ाव के परिणामस्वरूप अपूर्ण वायरल निष्क्रियता हो सकती है, जबकि ३.५ से नीचे के उतार-चढ़ाव से महत्वपूर्ण समग्र गठन हो सकता है। चूंकि क्रोमैटोग्राफी इल्यूशन

प्रकृति में आवधिक होते हैं और लगातार बदलती एकाग्रता, नमक या पीएच ग्रेडिएंट्स के साथ चोटियों के रूप में आते हैं, सर्ज टैंक इन ग्रेडिएंट्स को कम करने और बाद के यूनिट ऑपरेशन द्वारा सामग्री के सुचारू चित्रण की अनुमति देने में उपयोगी होते हैं। हालांकि, निरंतर प्रसंस्करण में वायरल निष्क्रियता से पहले सर्ज टैंक सहित प्रक्रिया जटिलताओं की ओर जाता है क्योंकि एमएबी सामग्री की प्रत्येक इकाई मात्रा के लिए उचित वायरल निकासी सुनिश्चित करने के लिए कम पीएच होल्डिंग समय की समान मात्रा से गुजरना महत्वपूर्ण है। सर्ज टैंक पूंजीगत लागत में वृद्धि के साथ-साथ सफाई, तापमान नियंत्रण, नसबंदी, सत्यापन और स्केल-अप की जटिलताओं को भी पेश करते हैं। इस काम का उद्देश्य सर्ज टैंक को खत्म करने और इन-लाइन पीएच समायोजन पोस्ट-कैप्चर क्रोमैटोग्राफी और वायरल निष्क्रियता से पहले करने की संभावना का पता लगाना है। वास्तविक समय में पीएच नियंत्रण के लिए एक गतिशील नियंत्रण रणनीति की आवश्यकता होती है। इसके बिना, ऐसी स्थिति होने की संभावना है जहां प्रक्रिया सामग्री या तो वायरस निष्क्रियता के लिए आवश्यक कम पीएच प्राप्त नहीं करती है या पीएच लक्ष्य से कई पीएच बिंदुओं को बदलता है, जिससे समग्र गठन की प्रवृत्ति बढ़ जाती है। इन चुनौतियों को दूर करने के लिए वायरल निष्क्रियता से पहले इन-लाइन पीएच नियंत्रण के लिए एक गतिशील समाधान प्रस्तावित है। मॉडल सटीक रूप से पूरे रेफरेंस में पीएच प्रोफाइल की भविष्यवाणी करता है, साथ ही पीएच को लगातार ३.५ ± ०.२ पर बनाए रखने के लिए प्रत्येक समय बिंदु पर आवश्यक एसिड की प्रवाह दर की गणना करता है। नियंत्रण रणनीति को निरंतर प्रक्रिया में बफ़र्स, कॉलम, परिचालन स्थितियों और प्रक्रिया विचलन की एक श्रृंखला के लिए मान्य और परीक्षण किया जाता है।

अगला काम डेड-एंड फिल्ट्रेशन को बदलने का तरीका विकसित करना था, प्राथमिक और माध्यमिक स्पष्टीकरण के साथ-साथ इन-प्रोसेस स्टेराइल निस्पंदन के लिए इस्तेमाल किया जाने वाला एक महत्वपूर्ण यूनिट ऑपरेशन, निरंतर मोड में। डेड एंड फिल्ट्रेशन पारंपरिक रूप से बैच मोड में किया जाता है और संभावित परिवर्तनशीलता को संभालने के लिए तैनाती से पहले फिल्टर ओवर-साइज़िंग के साथ-साथ व्यापक स्काउटिंग अध्ययनों का उपयोग करके फ़िल्टर प्री-साइज़िंग की आवश्यकता होती है। हालांकि, निरंतर निर्माण प्रक्रियाओं के लिए हफ्तों या महीनों में डेड-एंड फिल्ट्रेशन के लगातार उपयोग की आवश्यकता होती है, जिसमें फीड स्ट्रीम विशेषताओं में संभावित अप्रत्याशित बदलाव होते हैं। यह एक अनसुलझी चुनौती है, विशेष रूप से यदि फ़िल्टरिंग को निरंतर तरीके से बिना किसी रुकावट के मैन्युअल हस्तक्षेप के लिए वांछित किया जाता है। एक डेड-एंड निस्पंदन स्किड को निरंतर गहराई निस्पंदन के लिए डिज़ाइन किया गया है, जिसमें टर्बिडिटी और प्रेशर सेंसर के साथ कई छोटे आकार के फिल्टर शामिल हैं, जब भी वास्तविक समय में पूर्व-निर्धारित कट-ऑफ के ऊपर मैलापन या दबाव की सफलता का पता चलता है, तो तुरंत एक नए फिल्टर पर स्विच किया जाता है। . प्रस्तावित स्किड को न्यूनतम पूर्व स्काउटिंग अध्ययन या स्केल-अप के लिए आकार की गणना के साथ किसी भी डेड-एंड निस्पंदन एप्लिकेशन के लिए सीधे लागू किया जा सकता है। यह निरंतर प्रसंस्करण ट्रेनों के लिए एक उपयोगी समाधान है जहां फ़ीड की प्रकृति, जैसे कि इसकी मैलापन या एचसीपी सामग्री, लंबे समय तक चलने वाले अभियानों में बदल सकती है, जो पिछले आकार की गणना को गलत बनाती है। स्किड १.५-२बार के साइज़िंग सुरक्षा कारक को समाप्त करके महत्वपूर्ण लागत बचत की भी अनुमति देता है। जिसे आम तौर पर विनिर्माण पैमाने पर फिल्टर परिनियोजन से पहले जोड़ा जाता है।

अगला काम इन्फ्रारेड स्पेक्ट्रोस्कोपी के पास इन-लाइन का उपयोग करके एसपीटीएफएफ में रिटेंटेट एकाग्रता के नियंत्रण के लिए एक पीएटी रणनीति विकसित करना है। एक सतत एमएबी प्रोसेसिंग ट्रेन में एक मजबूत निरंतर यूएफ-डीएफ ऑपरेशन को एकीकृत करने से पहले कई चुनौतियां हैं जिन्हें दूर किया जाना चाहिए। सबसे पहले, यूएफ झिल्ली के माध्यम से प्रवाह समय के साथ प्रतिवर्ती प्रक्रियाओं जैसे एकाग्रता ध्रुवीकरण और प्रोटीन जेल परत के गठन के साथ-साथ अपरिवर्तनीय झिल्ली दूषण के कारण कम हो जाता है। इस प्रकार, अनुमेय प्रवाह में कमी के कारण समय के साथ प्रतिशोधी धारा में मियाब की सांद्रता कम हो जाती है। दूसरी चुनौती में निरंतर ट्रेन में अन्य यूनिट संचालन के साथ संयोजन में एसपीटीएफएफ चरण

की प्रक्रिया समयबद्धन शामिल है। उदाहरण के लिए, पॉलिशिंग क्रोमैटोग्राफी आम तौर पर एमएबी प्रोसेसिंग प्लेटफॉर्म में यूएफ-डीएफ से पहले यूनिट ऑपरेशन होता है। इसलिए, यह सुनिश्चित करने के लिए कि एसपीटीएफएफ मॉड्यूल सूखा नहीं चलता है और एसपीटीएफएफ फ़ीड स्ट्रीम में कोई सांद्रता ग्रेडिएंट नहीं हैं, यह सुनिश्चित करने के लिए एक मध्यवर्ती सर्ज टैंक के माध्यम से एसपीटीएफएफ मॉड्यूल के लिए आवधिक क्षालन से मिलान करने के लिए शेड्यूलिंग आवश्यक है। तीसरी चुनौती हफ्तों या महीनों तक बिना रुके लगातार अभियान चलाने की संभावित जटिलताओं से उत्पन्न होती है। अप्रत्याशित विचलन को संभालने के लिए मजबूत तरीके होने चाहिए। एक रणनीति सफलतापूर्वक विकसित की गई थी जो स्थिर निरंतर यूएफ-डीएफ संचालन को प्राप्त करने के लिए प्रक्रिया समझ, उन्नत निगरानी सेंसर और एकीकृत नियंत्रण रणनीतियों का उपयोग करती है।

अंत में, सर्ज टैंकों का उपयोग करके निरंतर ट्रेन के लिए एक एंड-टू-एंड प्रक्रिया एकीकरण और नियंत्रण रणनीति का प्रस्ताव किया गया था। सर्ज टैंक महत्वपूर्ण हैं लेकिन निरंतर बायोप्रोसेसिंग के अक्सर अनदेखी की जाती हैं। वे कई लाभ प्रदान करते हैं जिसमें एकाग्रता ग्रेडिएंट्स को कम करना और उपकरण विफलता या अप्रत्याशित विचलन के मामले में प्रक्रिया को फिर से शुरू करने के प्रयासों की अनुमति देना शामिल है, जो हफ्तों या महीनों के निरंतर अभियान के दौरान हो सकता है। वे यूनिट संचालन जैसे क्रोमैटोग्राफी के बीच बड़े पैमाने पर संतुलन को सुविधाजनक बनाकर एक सतत ट्रेन में स्थिर-राज्य संचालन को सक्षम करने में भी उपयोगी होते हैं, जिसमें आवधिक लोडिंग और रेफरेंस चक्र होते हैं। हालांकि, निरंतर बायोप्रोसेसिंग के क्षेत्र में कई शोधों की राय है कि सर्ज टैंक केवल तभी शुरू किए जाने चाहिए जब बिल्कुल आवश्यक हो। पूंजीगत लागत, उत्पाद निवास समय में वृद्धि, अतिरिक्त होल्ड समय के कारण उत्पादकता में कमी, और स्तर सेंसर, वजन संतुलन या कूलिंग जैकेट की शुरूआत के कारण परिचालन जटिलताओं सहित उछाल टैंक के निर्विवाद रूप से डाउनसाइड्स हैं। इसलिए, एक आदर्श रणनीति को अनावश्यक टैंकों की नियुक्ति से बचना चाहिए, लेकिन उनके प्लेसमेंट को भी प्रोत्साहित करना चाहिए जहां वे महत्वपूर्ण लाभ प्रदान कर सकते हैं जैसे कि फ़ीड-संवेदनशील इकाई संचालन से पहले एकाग्रता ढालों को कम करना, या प्रवाह-दर की लचीलापन या बेहतर सीक्यूए नियंत्रण के लिए शेड्यूलिंग। वर्तमान कार्य ने सर्ज टैंक प्लेसमेंट के लिए दिशानिर्देशों का एक सामान्य सेट विकसित किया और प्रक्रिया मापदंडों और फ़ीड विशेषताओं में कई विचलन के साथ एक सतत एमएबी उत्पादन ट्रेन के लिए सर्ज टैंक-आधारित नियंत्रण का प्रदर्शन किया।

Contents

Certificate ..... **i**

Acknowledgements ..... **ii**

Abstract ..... **iii**

Contents ..... **ii**

List of Figures ..... **vi**

List of Tables ..... **x**

1 CHAPTER 1 INTRODUCTION **1**

1.1. Background 1

1.2. Problem definition, scope and objectives of research 4

1.2.1. Process analytical technology for control of loading in continuous capture chromatography 4

1.2.2. Process analytical technology for control of pH between continuous capture chromatography and viral inactivation 5

1.2.3. Automated dead-end filtration as an enabler for continuous processing of biotherapeutics 5

1.2.4. Process analytical technology for control of single-pass tangential flow ultrafiltration 6

1.2.5. Process integration and control of end-to-end continuous train using surge tanks 7

2 CHAPTER 2 LITERATURE SURVEY **7**

2.1. Introduction to PAT in biopharmaceutical manufacturing 8

2.2. Spectroscopy as a PAT tool in downstream bioprocessing 9

2.2.1. Advantages of spectroscopy in continuous processing 9

2.2.2. Near infrared spectroscopy for measuring CQAs 11

2.3. PAT control approaches in continuous downstream unit operations 12

2.3.1. PAT for control of continuous capture chromatography 12

2.3.2. PAT for control of continuous dead-end filtration 13

2.3.3. PAT for control of continuous single-pass tangential flow ultrafiltration (SPTFF) 14

2.4. Control and integration of end-to-end continuous train 15

2.5. Summary of literature survey 16

3 CHAPTER 3 AN NIR BASED PAT TOOL FOR REAL TIME CONTROL OF LOADING IN PROTEIN A CHROMATOGRAPHY **5**

3.1. Introduction 18

3.2. Materials And Methods 20
3.2.1. Materials and feedstock 20
3.2.2. Experiment setup and protocol 21
3.2.3. NIR instrumentation and method 21
3.2.4. Protein A chromatography method 24
3.2.5. NIR- BioSMB communication and control 28
3.2.6. Real time testing with variable harvest load 30
3.3. Results And Discussion 31
3.3.1. Case 1: Step changes in product concentration in load 33
3.3.2. Case 2: Linear variation in product concentration in load 35
3.3.3. Case 3: Handling extreme deviations outside the normal operating range, and nonlinear deviations 35
3.3.4. Testing elution reproducibility and quality attributes 37
3.4. Concluding Remarks 38
4 CHAPTER 4 MODEL BASED REAL TIME CONTROL OF pH IN VIRAL INACTIVATION FOR CONTINUOUS MANUFACTURING OF MONOCLONAL ANTIBODIES 39
4.1. Introduction 40
4.2. Materials And Methods 43
4.2.1. Materials 43
4.2.2. Protein A chromatography 44
4.2.3. Viral Inactivation 44
4.2.4. Modelling of pH transitions 44
4.2.5. Real-time control 48
4.3. Results And Discussion 48
4.4. Concluding Remarks 55
5 CHAPTER 5 AUTOMATED DEAD-END FILTRATION: AN ENABLER FOR CONTINUOUS PROCESSING OF BIOTHERAPEUTICS 42
5.1. Introduction 57
5.2. Materials And Methods 59
5.2.1. Materials 59
5.2.2. Feed materials 59
5.2.3. Method for pressure and turbidity excursion studies 60
5.2.4. Set-up and demonstration of the continuous skid 62

5.3. Results And Discussion 65
5.3.1. Turbidity and pressure excursion studies 65
5.3.2. Implementation of skid in continuous process 67
5.3.3. Economics of batch versus continuous dead-end filtration 68
5.4. Conclusions 70
6 CHAPTER 6 IMPLEMENTING PAT FOR CONTINUOUS ULTRAFILTRATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES 72
6.1. Introduction 72
6.2. Material and Methods 75
6.2.1. Materials 75
6.2.2. Ultrafiltration material preparation 76
6.2.3. Ultrafiltration equipment and methods 76
6.2.4. Near Infrared Spectroscopy (NIRS) 78
6.2.5. SPTFF control strategy and setup 80
6.3. Results and Discussion 81
6.3.1. Scouting the design space for the SPTFF module 81
6.3.2. Modelling the design space for the SPTFF module 87
6.3.3. Development of SPTFF control strategy 91
6.3.4. Implementation of PAT control strategy 96
6.4. CONCLUSIONS 99
7 CHAPTER 7 CONTROL OF SURGE TANKS FOR IMPROVED CONTINUOUS MANUFACTURING OF MONOCLONAL ANTIBODIES 101
7.1. Introduction 101
7.2. Material and Methods 104
7.2.1. Materials 104
7.2.2. Methods for unit operations 104
7.2.3. Setup of surge tanks 106
7.2.4. Development of the controller 108
7.3. Results and Discussion 111
7.3.1. Surge tank placement and sizing 111
7.3.2. Surge tank levels in normal operation, start-up and shut-down 114
7.3.3. Leveraging surge tanks for handling process deviations 117
7.3.4. Leveraging surge tanks for handling product variability using PAT 128
7.4. Conclusions 131

8 CHAPTER 8 CONCLUSIONS AND SCOPE OF FUTURE WORK 133

8.1. Conclusions 133

8.2. Scope of future work 135

9. REFERENCES 138

10. BIODATA 154

11. PUBLICATIONS 156

List of Figures

Figure 1.1 Batch vs. continuous processing in terms of setup (A, C) and scheduling (B, D)....2
Figure 3.1 Schematic of protein A chromatography control system for (a) Setup A with a single NIR flow cell at the inlet to the Protein A loading column; (b) Setup B with two NIR flow cells, one at the inlet to the Protein A loading column and one at the outlet 22
Figure 3.2 (a) NIR spectra of concentrated mAb pool and flow through (containing HCP but not mAb); insets show sample spectra collected during real time runs. 23
Figure 3.3 Overview of PCC method and dynamic time adjustment.....24
Figure 3.4 Dynamic binding capacity studies at 70% breakthrough of mAb harvest on MabSelectSureTM resin. The area shaded in red shows the normal operating range of the proposed control system. 26
Figure 3.5 (a) Schematic of hardware elements controlled on the BioSMB; and (b) Image of experimental setup for setup A.....29
Figure 3.6 Control system response to induced variations in harvest concentration in Setup A (a) case 1, (b) case 2 and (c) case 3 32
Figure 3.7 Control system response to induced variations in harvest concentration in Setup B (a) case 1, (b) case 2 and (c) case 3 34
Figure 4.1 Typical process flow diagram for continuous downstream purification train for mAbs. The red box highlights the focus area of the present work.....41
Figure 4.2 (A) Scheduling of chromatography sub-steps in each of three columns in periodic counter current (PCC) mode of operation; (B) Example of pH transition profile between wash and elution steps; (C) Conversion of conductivity profile from NaOH cleaning step 42
Figure 4.3 (A) Schematic of the experimental setup; (B) Illustration of pH and HCl addition profiles at key points (Points 1, 2, 3 from (A)) in the setup; (C) Flowchart of model-based pH control strategy 47
Figure 4.4 (A-C) Experimental and model-predicted pH curves for three runs with different concentrations of Tris in the wash buffer; (D) Overlaid conductivity profiles showing almost complete overlap; (E-F) Overlaid experimental and model-predicted profiles 50
Figure 4.5 Experimental and model-predicted pH curves for three runs with different buffer pairs (phosphate, tris, acetate) and elution flow rates (residence time of 2 minutes and 4 minutes).....51
Figure 4.6 Effect of mAb on the pH transition profiles 52

Figure 4.7 (A) Example of alternative type of pH control using stepwise adjustment of HCl addition rate from 0.3 mL/min to 0.1 mL/min; (B) Example of controlled addition of HCl based on model-predicted pH profile showing pH maintained at 3.5. The insert shows the flow rate profiles of HCl and water from the two control pumps. 53
Figure 4.8 Demonstration of model-based pH control in 10 cycles of 3-column PCC capture chromatography. Different column packing and process parameter deviations are highlighted in blue text, and the effect of air and channelling on the conductivity profile used as the input to the pH model is shown on the right. 54
Figure 5.1 (A) Schematic and (B) Image of the experimental set up showing the key elements including pump, solenoid valve, depth filters, in-line pressure sensor, programmable logic controller (PLC) for real time monitoring and control.....61
Figure 5.3 Depth filtration pressure and turbidity profiles for different cases: (A) B1HC centrate of mAb cell culture broth, (B) 90ZA Output of harvest filtered through 30S (harvest→30S→90ZA), (C) D0HC CHO cell culture harvest, (D) Acrodisc GCSF drug product, (E) HP PDD1 GCSF quenched refolding output, (F) HP PDH4 *Pichia pastoris* HSA broth with 5% solids, and (G) X0HC cell culture harvest centrate. The respective cut-offs are shown in dotted red lines and arrows. Pressure cut-off of 1.5 bar is used for secondary depth and sterile filters, while turbidity cut-off of 1000 NTU is used for primary depth filters turbidity sensors, and trigger the solenoid valve to switch the flow to a fresh filter when the current value exceeded the programmed cut-off.....64
Figure 5.4 Applications of dead end filtration skid in continuous mAb production train showing potential locations for implementation, including depth filtration of clarified harvest prior to capture chromatography, post-viral inactivation pH adjustment, and in final sterile filtration of the formulated drug product.....66
Figure 5.5 Profiles of continuous operation with (A) turbidity-based switching for HP PDH4 (Sample: HSA Pichia pastoris broth with 5% solids on wet weight basis), and (B) pressure-based switching for X0HC (Sample: mAb CHO cell culture centrate) 67
Figure 5.6 Process flow chart for implementation of continuous dead end filtration using the developed skid.....68
Figure 5.7 Example of filter area savings and cost analysis for selection of number of filters in the proposed skid.....69
Figure 6.1 (A) Example of NIRS spectra for different concentrations of mAb; (B) PLS model calibration results showing actual vs. calculated mAb concentrations from NIRS spectra.....77

Figure 6.2 Schematic of SPTFF setup with sensors and control elements (solid/dashed lines show fluid flow; dotted lines show information flow) 79
Figure 6.3 Example of scouting runs for 28 g/L feed concentration. It is seen that VCF 8x is unachievable for feed flowrate 30 mL/min, and this is the limit of the design space for this condition 82
Figure 6.4 Design space of SPTFF module: (A) Maximum feed flow rate, VCF and absolute retentate concentration achievable within pressure limits; (B) Maximum VCF possible for different feed flow rates and concentrations 84
Figure 6.5 Pressure data for (A) Feed pressure, (B) Delta P and (C) TMP in the design space scouting runs for different combinations of feed concentration, feed flowrate, and VCF 86
Figure 6.6 Pre- and post-cleaning fouling data for 10 runs of ~6 hours each: (A) Normalized water permeability measured at 100 mL/min water with unrestricted flow; (B) TMP at different feed flowrates under flux control with permeate pump 88
Figure 6.7 (A) Logarithmic best-fit curves y = A ln(x) + B for VCF-Max vs. feed flowrate at different feed concentrations; (B) Logarithmic best-fit curves for parameters A and B vs. feed concentration; (C) Examples of model-generated design spaces for some feed concentrations 89
Figure 6.8 Complete PAT approach for monitoring and control of SPTFF for ultrafiltration in the formulation step of a continuous mAb processing train to achieve target CQA of drug product concentration, regardless of process discontinuity or deviation 97
Figure 6.9 Implementation of end-to-end PAT approach in continuous train conditions with VCF control, process scheduling, and periodic monitoring of NBP during buffer flush for (A) Run A and (B) Run B from Table 6.3 98
Figure 7.1 Setup of the continuous mAb processing train, with surge tanks and their corresponding inflow and outflow pumps highlighted in red. The solenoid valves are shown as dark blue diamonds. 105
Figure 7.2 Scheduling chart for steady-state operation of the continuous train shown for 4 hours of operation, with input and output step flow rates (“u”, mL/min) and times (“t”, min) included in red for each unit operation and surge tank. 107
Figure 7.3 (A) Schematic of the four-layer Python-based controller of the surge tanks and unit operations; (B) illustration of start-up and shut-down procedures (dark red = OFF, light red = ON) 109
Figure 7.4 Volumetric level of the three surge tanks over 36 hours of continuous operation using the automated control strategy, including start-up and shut-down. Key points of controller

action are marked with dotted red diamonds and explained in Table 7.3. The data shown here is from 12 hours of operation with mAb fed-batch harvest material followed by 24 hours of operation with water. 115
Figure 7.5 Process-level data for steady state and deviated operation, showing (A) concentrations in the three surge tanks, (B-C) quality attributes of the final drug product including charge variant concnetrations, % high molecule weight species, pH, conductivity and concentration, (D) process chromatograms from the BioSMB. Deviation 4 is not shown as it was carried out with water. 116
Figure 7.6 Volumetric level of the three surge tanks for handling deviations using case-specific automated control strategies for (A) breakdown in AWS, (B) reduction in binding capacity of Protein A resin, (C) Protein A column failure, (D) CEX column failure, (E) change in CEX elution pool volume, (F) pressure-build up in ILC-ILD triggering an extended cleaning cycle, and (F) breakdown in ILC-ILD. Key points of controller action are marked with dotted red diamonds and explained in the figure inserts. 122
Figure 7.7 (A) Operating spaces within which the critical process parameters (CPP) of the major unit operations can changed, and their associated critical quality attributes (CQA) to be maintained; Volumetric level of the three surge tanks for handling variability in product quality attributes using different PAT control strategies: (B) handling upstream titer variations by controlling loading in Protein A chromatography monitored by in-line NIR flow cells, and (C) handling variations in charge variant or aggregate profile by controlling pooling in CEX chromatography monitored by at-line HPLC. Key points of controller action are marked with dotted red diamonds and explained in the figure inserts. 125
Figure 7.8 Flow chart summarizing the approach and key considerations for surge tank strategy design 129

List of Tables

Table 2.1 Summary of spectroscopy-based downstream PAT applications in the recent publications 10
Table 3.1 Specifications of the BioSMB PCC method operated by the control system 25
Table 3.2 Elution comparison for 24 cycles in terms of yield and critical quality attributes 36
Table 5.1 Properties of different feed streams used in this study 60
Table 5.2 Pressure or turbidity breakthroughs for different filters using different feeds 62
Table 6.1 Parameters of log best-fit curves y = A ln(x) + B for VCF-Max curves in Figure 6.7A 90
Table 6.2 Determining the operable space for different feed conditions, with results illustrated in Figure 6.7(C) 91
Table 6.3 Implementation of PAT monitoring and control strategy for SPTFF under continuous train conditions for two runs with different feed volume and concentrations 95
Table 7.1 Considerations for deciding surge tank placement before or after each unit operation 112
Table 7.2 Details and timings of key controller actions during normal operation of the continuous train at the keypoints in Figure 7.4. A more detailed version of the Table is given in Thakur et al 2021[101]. 117
Table 7.3 Failure modes and effects analyses for the process equipment and unit operations 119