Development and Implementation of Control Strategies for Production of Biotherapeutic Products

NITIKA

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

NOVEMBER 2024

© Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2024

Development and Implementation of Control Strategies for Production of Biotherapeutic Products

by

NITIKA

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING

Submitted

in fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

NOVEMBER 2024

Dedicated to my family

Certificate

This is to certify that the thesis entitled "**Development and Implementation of Control Strategies for Production of Biotherapeutic Products**" being submitted by **Ms. NITIKA** (entry number 2018CHZ8086) to 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 our 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
New Delhi, 110016

Acknowledgements

This journey owes its existence to the steadfast support of a few key individuals. I want to express my sincere gratitude to these individuals whose contributions were essential for achieving this milestone.

First and foremost, I am profoundly grateful to my mentor, **Prof. Anurag S. Rathore**. His deep technical insights, stimulating discussions, constructive feedback, and genuine interest in my work were foundational to my research efforts. I deeply value his unwavering belief in me during challenging times and the independence he granted me during my time at IIT Delhi.

I am also thankful to my Ph.D. research committee members, **Prof. Anupam Shukla, Prof. Jayati Sarkar, and Prof. Atul Narang**, for their insightful contributions during my SRC presentations, which guided my research in the right direction.

Special acknowledgment goes to my fellow lab mates, including Dr. Nikhil Kateja, Dr. Nikita Saxena, Dr. Anamika Tiwari, Dr. Garima Thakur, Dr. Sharad Narnawre, Dr. Kantinandan Mihooliya, Dr. Keerthiveena, Dr. Vishwanath Hebbi, Naveen Jesublan, and Rashmi Sharma, for their collaboration, motivation, and for creating a supportive environment in the lab. An extended heartfelt thanks to my friends Himanshu Malani, Surbhi Gupta, Deepika Sarin, Shantanu Banerjee, and Priyank Rajput for their invaluable academic discussions and unwavering support during challenging periods.

Lastly, I am deeply indebted to my parents, Mr. Devender Singh and Mrs. Meena, my brother Mr. Ankur Singh, my husband Mr. Kushagra Pathak, and my in-laws, Mr. Surendra Sharma and Mrs. Shashibala, for their continuous support, blessings, and encouragement, which were indispensable for the successful completion of this work.

Nitika

(2018CHZ8086)

Abstract

Continuous biopharmaceutical manufacturing is gaining interest due to its ability to lower the cost of manufacturing. Process control is a critical contributor to successfully executing continuous processes. Control actions for continuous processes are considerably more complex than the traditional mode owing to the requirements of real time monitoring and control when operating continuous platforms. This thesis focuses on process optimization, equipment and sensors advancements, along with applications of artificial intelligence to offer better end-to-end control of downstream processing of biologics originating in microbial and mammalian platforms.

Chapter 3 explores optimization of refolding yield and stability of L-asparaginase, a micobial product produced as inclusion bodies (IBs), an essential enzyme in the food and biopharmaceutical industry. However, commercial manufacturing of any biopharmaceutical can incur several hold-ups during processing which can result in product loss if product stability is an issue, as is the case with L-asparaginase. The study focuses on the interplay of product intermediate stability and process design to increase the stability of refolded L-asparaginase and thereby maximizes the final yield. Using one variable at a time (OVAT) experiments, urea (6 M), solubilized inclusion bodies (15 mg/ml), refolding method (step dilution), and pH (8.6) were identified as significant process parameters. A design of experiment (DOE)-based optimization was then performed for the refolding step. The net outcome was more than a three-fold increase in enzyme recovery (i.e., 4.90 IU/ml) compared to unoptimized conditions (i.e., 1.26 IU/ml). Further, the optimized L-asparaginase process intermediate was found to be stable for more than a week at room temperature at 2–8°C, while the unoptimized sample was stable at 2–8°C but did not show any activity at room temperature after 72 h. The current study elucidates how process intermediate stability needs to be given due consideration during process optimization, particularly for products such as L-asparaginase which are labile.

Following process optimization in the batch mode, next we developed a continuous enabler for mixing reactions. To that end, a novel coiled flow inversion reactor (CFIR) has been utilized for carrying out downstream unit operations that require reaction and mixing like refolding, precipitation, viral inactivation, and PEGylation. Chapter 4 presents an application of CFIR for continuous PEGylation of therapeutic proteins like granulocyte colony-stimulating factor (GCSF). A batch PEGylation and purification process was initially developed followed by its conversion

to continuous format with GCSF as our model molecule. A rapid and highly productive PEGylation process attaining reaction completion in 1 hour of reaction time and a novel displacement mode cation exchange chromatography post PEGylation were the major highlights of the developed process. Enabling technologies like coiled flow inversion reactor, inline concentrator and concurrent chromatography, were utilized for the successful conversion of the batch process to the continuous process. Suitable process modifications were made to ensure efficient conversion and integration of different unit operations. The final integrated continuous PEGylation process consisted of continuous PEGylation in a CFIR followed by four column continuous counter-current chromatography. The established continuous PEGylation train was also integrated to a previously established GCSF manufacturing train, resulting in creation of an end-to-end continuous manufacturing process starting from inclusion bodies to unformulated PEG-GCSF drug substance. The continuous bioprocessing train was run uninterrupted for 12 h to demonstrate its capability and the resulting output was analyzed for various critical quality attributes. All attributes were found to be consistent over the period of operation with product purity > 99 % and high molecular weight impurities < 0.5 %. The developed assembly offers higher productivity, fewer hold steps, and significantly higher equipment and resin utilization. Further, we also demonstrate the utility of CFIR for continuous virus inactivation process for monoclonal antibody (mAb) biotherapeutics. Low pH virus inactivation for a mAb therapeutic was performed in continuous mode using this reactor and its performance was compared to a parallel batch setup. It was found that both batch and continuous processes yield about equal level of virus inactivation with comparable logarithmic reduction value (LRV) for XMuLV of 4.32 ± 0.26 in batch versus 4.12 ± 0.08 in continuous over a period of 55 minutes. The data clearly demonstrates that CFIR can be used in a continuous train for virus inactivation without any reduction in inactivation efficiency or inactivation kinetics. Integration of the reactor with the continuous downstream train has also been evaluated by highlighting different possible configurations. Two different case studies depicting the integration of the reactor to a continuous Protein-A capture chromatography under different sets of operational conditions have been discussed. In all cases, consistent process performance and product quality attributes were obtained. The proposed reactor offers a suitable configuration for continuous viral inactivation for mAb continuous processing platforms.

In chapter 5, we propose a strategy for automation and control of multi-step polishing

chromatography for integrated continuous manufacturing of mAbs. The strategy has been demonstrated for a multi-step polishing process consisting of cation exchange chromatography in bind-and-elute mode followed by mixed-mode chromatography in flowthrough mode. A BioSMB system with a customized Python control layer has been used for automation and scheduling of both the chromatography steps. Further, the BioSMB valve manifold has been leveraged for in-line conditioning between the two steps, as tight control of pH and conductivity is essential when operating with multimodal resins because even slight fluctuations in load conditions adversely affect the chromatography performance. The present study demonstrates that the pH and conductivity of the load to the multimodal chromatography columns is consistent, despite the elution gradient of the preceding cation exchange chromatography step. Inputs from the BioSMB pH and conductivity sensors have been used for real-time control of the 7 independent BioSMB pumps and 240 valves to achieve in-line conditioning inside the BioSMB manifold in a fully automated manner. This is confirmed by showcasing different elution strategies in cation exchange chromatography, including linear gradient, step gradient and process deviations like tubing leakage. In all the above cases, the model was able to maintain the pH and conductivity of multimodal chromatography load within the range of 6 ± 0.1 pH and 7 ± 0.3 mS/cm conductivity. The strategy eliminates the need for using multiple BioSMB units or integrating external pumps, valves, mixers, surge tanks, or sensors between the two steps as is currently the standard approach, thus offering a simple and robust structure for integrating multiple polishing chromatography steps in continuous downstream monoclonal antibody purification trains.

Having developed and optimized different continuous downstream unit operations, we have explained development of a Raman spectroscopy-based PAT tool for assessment of critical quality attributes (CQA) of biopharmaceutical products for better control of continuous processes (chapter 7). Chemometrics based analysis of Raman spectra has been utilized for quantitative prediction of protein aggregation in lyophilized biotherapeutic products. Two commercially available therapeutic proteins, erythropoietin (EPO) and human growth hormone (HGH), have been used to demonstrate the applicability of the proposed approach. Thermally induced protein aggregation was monitored by size exclusion chromatography as well as Raman spectroscopy with a 785nm wavelength laser. Partial least square (PLS) regression was used to analyse the Raman spectra and create a model for quantitative determination of aggregate. Satisfactory performance was observed with both EPO and HGH with R^2 of 0.91 and 0.94, cross-validation correlation coefficient of 0.85

and 0.89, and Root Mean Square Error computed from cross calibration (RMSEcv) of 5.25 and 1.92, respectively. The developed approach has been demonstrated to enable rapid and accurate assessment of aggregation in lyophilized samples of biotherapeutic products. The study also demonstrates novel use of Raman spectroscopy for protein quantification through a vial. Further, we have demonstrated monitoring of charge related heterogeneities of mAb therapeutics using Raman spectroscopy. Charge variants are typically estimated using analytical cation exchange chromatography (CEX), which is time consuming and not suitable for real time control. Raman spectroscopy coupled with artificial intelligence (AI) tools offers an opportunity for real time monitoring and control of charge variants. Raman spectra were collected from a reference library of samples with distribution of acidic, main, and basic species from 0-100% in a mAb concentration range of 0-20 g/L generated from process-scale CEX. The performance of different machine learning techniques for spectral processing was compared for predicting different charge variant species. A convolutional neural network (CNN) based model was successfully calibrated for quantification of acidic species, main species, basic species, and total protein concentration with R^2 values of 0.94, 0.99, 0.96 and 0.99, respectively, and the Root Mean Squared Error (RMSE) of 0.1846, 0.1627, and 0.1029 g/L, respectively, and 0.2483 g/L for the total protein concentration. Thus, Raman spectroscopy combined with AI-ML frameworks can deliver rapid and accurate determination of product related impurities. This approach can be used for real time CEX pooling decisions in mAb production processes, thus enabling consistent charge variant profiles to be achieved.

The case studies presented in this thesis offer insight into the development and implementation of integrated continuous downstream processing for manufacturing of biopharmaceutical products.

Abstract (Hindi)

बायोफार्मास्युटिकल विनिर्माण की सतत विधा का उद्देश्य नियंत्रित सतत विनिर्माण प्रक्रिया विकसित करके स्वास्थ्य सेवा को किफायती बनाना है। सतत प्रसंस्करण को सफलतापूर्वक निष्पादित करने में प्रक्रिया नियंत्रण एक महत्वपूर्ण योगदानकर्ता है। सतत प्रक्रियाओं के लिए नियंत्रण क्रियाएँ पारंपरिक विधा की तुलना में काफी अधिक जटिल हैं, क्योंकि सतत प्लेटफ़ॉर्म संचालित करते समय वास्तविक समय की निगरानी और नियंत्रण की आवश्यकता होती है। यह थीसिस प्रक्रिया अनुकूलन, उपकरण और सेंसर उन्नति, साथ ही कृत्रिम बुद्धिमत्ता के अनुप्रयोगों पर ध्यान केंद्रित करती है, ताकि माइक्रोबियल और स्तनधारी प्लेटफ़ॉर्म में उत्पन्न होने वाले बायोलॉजिक्स के डाउनस्ट्रीम प्रसंस्करण के बेहतर एंड-टू-एंड नियंत्रण की पेशकश की जा सके। पहला मामला एल-एस्पेरेगिनेज की रीफोल्डिंग उपज और स्थिरता के अनुकूलन के आसपास केंद्रित है, जो समावेशन निकायों (IBs) के रूप में उत्पादित एक माइक्रोबियल उत्पाद है। इन IBs को L-एस्पेरेगिनेज उत्पाद देने के लिए रीफोल्ड किया जाता है जो खाद्य और बायोफार्मास्युटिकल उद्योग में एक आवश्यक एंजाइम है। हालाँकि, किसी भी बायोफार्मास्युटिकल के वाणिज्यिक विनिर्माण में प्रसंस्करण के दौरान कई रुकावटें आ सकती हैं, जिसके परिणामस्वरूप स्थिरता एक मुद्दा होने पर उत्पाद की हानि हो सकती है, जैसा कि L-एस्पेरेगिनेज के मामले में है। अध्याय 3 उत्पाद मध्यवर्ती स्थिरता और प्रक्रिया डिजाइन के परस्पर क्रिया पर ध्यान केंद्रित करता है ताकि होल्ड-अप समय से निपटने और अंतिम उपज को बढ़ाने के लिए रीफोल्डेड एल-एस्पेरेजिनेज की स्थिरता को बढ़ाया जा सके। इस अध्ययन में, रीफोल्डिंग उपज और रीफोल्डेड एल-एस्पेरेजिनेज की स्थिरता को एक साथ बढ़ाने के लिए एक रणनीति प्रस्तावित की गई है ताकि समग्र प्रक्रिया उपज में सुधार हो सके। एक समय में एक चर (OVAT) प्रयोगों का उपयोग करते हुए, यूरिया (6 M), घुलनशील समावेशन निकाय (15 mg/ml), रीफोल्डिंग विधि (चरण कमजोर पड़ने), और pH (8.6) को महत्वपूर्ण प्रक्रिया मापदंडों के रूप में पहचाना गया। फिर रीफोल्डिंग चरण के लिए प्रयोग का डिज़ाइन (DOE)-आधारित अनुकूलन किया गया। शुद्ध परिणाम एंजाइम रिकवरी (यानी, 4.90 IU/ml) में अअनुकूलित स्थितियों (यानी, 1.26 IU/ml) की तुलना में तीन गुना से अधिक वृद्धि थी। इसके अलावा, अनुकूलित एल-एस्पेरगिनेज प्रक्रिया मध्यवर्ती कमरे के तापमान और 2-8 डिग्री सेल्सियस पर एक सप्ताह से अधिक समय तक स्थिर पाया गया, जबकि अनुकूलित न किया गया नमूना 2-8 डिग्री सेल्सियस पर स्थिर था, लेकिन 72 घंटे के बाद कमरे के तापमान पर कोई गतिविधि नहीं दिखाई दी। वर्तमान अध्ययन स्पष्ट करता है कि प्रक्रिया अनुकूलन के दौरान प्रक्रिया मध्यवर्ती स्थिरता पर उचित ध्यान देने की आवश्यकता है, विशेष रूप से एल-एस्पेरगिनेज जैसे उत्पादों के लिए जो अस्थिर हैं।

बायोफार्मास्युटिकल विनिर्माण के सतत मोड का उद्देश्य नियंत्रित सतत विनिर्माण प्रक्रिया विकसित करके स्वास्थ्य सेवा को किफायती बनाना है। सतत प्रसंस्करण को सफलतापूर्वक निष्पादित करने में प्रक्रिया नियंत्रण एक महत्वपूर्ण योगदानकर्ता है। सतत प्रक्रियाओं के लिए नियंत्रण क्रियाएँ पारंपरिक मोड की तुलना में काफी अधिक जटिल हैं, क्योंकि सतत प्लेटफ़ॉर्म संचालित करते समय वास्तविक समय की निगरानी और नियंत्रण की आवश्यकता होती है। यह थीसिस प्रक्रिया अनुकूलन, उपकरण और सेंसर की उन्नति, साथ ही माइक्रोबियल और स्तनधारी प्लेटफ़ॉर्म में उत्पन्न होने वाले बायोलॉजिक्स के डाउनस्ट्रीम प्रसंस्करण के बेहतर एंड-टू-एंड नियंत्रण की पेशकश करने के लिए कृत्रिम बुद्धिमत्ता के अनुप्रयोगों पर केंद्रित है। बैच मोड में प्रक्रिया अनुकूलन के बाद, अगला चरण मिश्रण प्रतिक्रियाओं के एक सतत प्रवर्तक को विकसित करने पर केंद्रित था। उस उद्देश्य के लिए, डाउनस्ट्रीम इकाई संचालन को पूरा करने के लिए एक नया कुंडलित प्रवाह व्युत्क्रम रिएक्टर (CFIR) का उपयोग किया गया है, जिसके लिए रिफ़ोल्डिंग, अवक्षेपण, वायरल निष्क्रियता और PEGylation जैसी प्रतिक्रिया और मिश्रण की आवश्यकता होती है। इस उद्देश्य को अध्याय 4 में दो भागों में प्रदर्शित किया गया था। पहले भाग में ग्रैनुलोसाइट कॉलोनी-उत्तेजक कारक (GCSF) जैसे चिकित्सीय प्रोटीन के सतत PEGylation के लिए CFIR का अनुप्रयोग शामिल है। चिकित्सीय प्रोटीन का PEGylation, प्रोटीन के औषधीय गुणों को बढ़ाने के लिए एक आशाजनक पद्धति के रूप में उभरा है, जैसे कि इन विवो हाफ-लाइफ में वृद्धि और बेहतर जैव उपलब्धता। PEGylation से जुड़े सभी लाभों के बावजूद, PEGylated उत्पादों की उच्च लागत ने रोगियों के लिए इन उत्पादों की पहुँच में बाधा उत्पन्न की है। निरंतर प्रसंस्करण इस समस्या का समाधान प्रदान करता है, जिसमें उत्पाद की गुणवत्ता का त्याग किए बिना उत्पादकता और अर्थशास्त्र में सुधार करने की सिद्ध क्षमता है। एक बैच PEGylation और शुद्धिकरण प्रक्रिया को शुरू में विकसित किया गया था, इसके बाद हमारे मॉडल अणु के रूप में GCSF के साथ निरंतर प्रारूप में इसका रूपांतरण किया गया। 1 घंटे के प्रतिक्रिया समय में प्रतिक्रिया पूर्णता प्राप्त करने वाली एक तेज़ और अत्यधिक उत्पादक PEGylation प्रक्रिया और PEGylation के बाद एक नया विस्थापन मोड कैशन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी विकसित प्रक्रिया की प्रमुख विशेषताएँ थीं। बैच को निरंतर प्रक्रिया में सफलतापूर्वक बदलने के लिए कॉइल्ड फ्लो इनवर्जन रिएक्टर, इनलाइन कंसंट्रेटर और समवर्ती क्रोमैटोग्राफी जैसी सक्षम तकनीकों का उपयोग किया गया। विभिन्न इकाई संचालन के कुशल रूपांतरण और एकीकरण को सुनिश्चित करने के लिए उपयुक्त प्रक्रिया संशोधन किए गए। अंतिम एकीकृत सतत PEGylation प्रक्रिया में एक कुंडलित प्रवाह इन्वर्टर रिएक्टर में सतत PEGylation शामिल था, जिसके बाद चार स्तंभों में सतत काउंटर-करंट क्रोमैटोग्राफी की गई। स्थापित सतत PEGylation ट्रेन को हमारे पहले से स्थापित GCSF विनिर्माण ट्रेन में

भी एकीकृत किया गया था, जिसके परिणामस्वरूप समावेशन निकायों से लेकर असंरूपित PEG-GCSF दवा पदार्थ तक एक अंत-से-अंत सतत विनिर्माण प्रक्रिया का निर्माण हुआ। सतत जैव प्रसंस्करण ट्रेन को इसकी क्षमता का प्रदर्शन करने के लिए 12 घंटे तक बिना रुके चलाया गया और परिणामी आउटपुट का विभिन्न महत्वपूर्ण गुणवत्ता विशेषताओं के लिए विश्लेषण किया गया। उत्पाद शुद्धता > 99% और उच्च आणविक भार अशुद्धियों < 0.5% के साथ संचालन की अवधि में सभी विशेषताएँ सुसंगत पाई गईं। विकसित असेंबली उच्च उत्पादकता, कम होल्ड चरण और उल्लेखनीय रूप से उच्च उपकरण और राल उपयोग प्रदान करती है। दूसरे भाग में हम मोनोक्लोनल एंटीबॉडी (mAb) बायोथेरेप्यूटिक्स के लिए सतत वायरस निष्क्रियता प्रक्रिया के लिए CFIR की उपयोगिता का प्रदर्शन करते हैं। इस रिएक्टर का उपयोग करके mAb उपचारात्मक के लिए कम pH वायरस निष्क्रियण निरंतर मोड में किया गया था और इसके प्रदर्शन की तुलना समानांतर बैच सेटअप से की गई थी। यह पाया गया कि बैच और निरंतर दोनों प्रक्रियाओं में वायरस निष्क्रियण का लगभग बराबर स्तर प्राप्त होता है, जिसमें 55 मिनट की अवधि में बैच में XMuLV के लिए तुलनीय लघुगणक कमी मूल्य (LRV) 4.32 ± 0.26 बनाम निरंतर में 4.12 ± 0.08 होता है। डेटा स्पष्ट रूप से दर्शाता है कि रिएक्टर कॉन्फ़िगरेशन का उपयोग वायरस निष्क्रियण के लिए निरंतर ट्रेन में निष्क्रियता दक्षता या निष्क्रियता गतिज में किसी भी कमी के बिना किया जा सकता है। विभिन्न संभावित कॉन्फ़िगरेशन को हाइलाइट करके निरंतर डाउनस्ट्रीम ट्रेन के साथ रिएक्टर के एकीकरण का भी मूल्यांकन किया गया है। विभिन्न परिचालन स्थितियों के तहत निरंतर प्रोटीन-ए कैप्चर क्रोमैटोग्राफी में रिएक्टर के एकीकरण को दर्शाने वाले दो अलग-अलग केस अध्ययनों पर चर्चा की गई है। सभी मामलों में, सुसंगत प्रक्रिया प्रदर्शन और उत्पाद गुणवत्ता विशेषताएँ प्राप्त की गईं। प्रस्तावित रिएक्टर mAb निरंतर प्रसंस्करण प्लेटफ़ॉर्म के लिए निरंतर वायरल निष्क्रियण के लिए उपयुक्त कॉन्फ़िगरेशन प्रदान करता है।

mAbs के एकीकृत सतत निर्माण के लिए पॉलिशिंग क्रोमैटोग्राफी। रणनीति को बहु-चरणीय पॉलिशिंग प्रक्रिया के लिए प्रदर्शित किया जाता है जिसमें बाइंड-एंड-एल्यूट मोड में कैटियन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी शामिल होती है, जिसके बाद फ्लोथ्रू मोड में मिश्रित-मोड क्रोमैटोग्राफी होती है। एक अनुकूलित पायथन नियंत्रण परत के साथ एक बायोएसएमबी प्रणाली का उपयोग दोनों क्रोमैटोग्राफी चरणों के स्वचालन और शेड्यूलिंग के लिए किया जाता है। इसके अलावा, बायोएसएमबी वाल्व मैनिफोल्ड को दो चरणों के बीच इन-लाइन कंडीशनिंग के लिए लीवरेज किया जाता है, क्योंकि मल्टीमॉडल रेजिन के साथ संचालन करते समय पीएच और चालकता का सख्त नियंत्रण आवश्यक होता है क्योंकि लोड की स्थिति में मामूली उतार-चढ़ाव भी क्रोमैटोग्राफी प्रदर्शन को प्रतिकूल रूप से प्रभावित करता है। वर्तमान अध्ययन दर्शाता है कि पिछले

कैटियन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी चरण के निक्षालन ढाल के बावजूद, मल्टीमॉडल क्रोमैटोग्राफी कॉलम में लोड का पीएच और चालकता सुसंगत है। BioSMB pH और चालकता सेंसर से इनपुट का उपयोग 7 स्वतंत्र BioSMB पंपों और 240 वाल्वों के वास्तविक समय नियंत्रण के लिए किया जाता है ताकि BioSMB मैनिफोल्ड के अंदर पूरी तरह से स्वचालित तरीके से इन-लाइन कंडीशनिंग प्राप्त की जा सके। इसकी पुष्टि कैटियन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी में विभिन्न एल्यूशन रणनीतियों को प्रदर्शित करके की जाती है, जिसमें रैखिक ग्रेडिएंट, स्टेप ग्रेडिएंट और ट्यूबिंग लीकेज जैसे प्रक्रिया विचलन शामिल हैं। उपरोक्त सभी मामलों में, मॉडल 6 ± 0.1 pH और 7 ± 0.3 mS/cm चालकता की सीमा के भीतर मल्टीमॉडल क्रोमैटोग्राफी लोड के pH और चालकता को बनाए रखने में सक्षम था। यह रणनीति कई BioSMB इकाइयों का उपयोग करने या बाहरी पंपों, वाल्वों, मिक्सर, सर्ज टैंकों या सेंसरों को दो चरणों के बीच एकीकृत करने की आवश्यकता को समाप्त करती है जैसा कि वर्तमान में मानक दृष्टिकोण है, इस प्रकार निरंतर डाउनस्ट्रीम मोनोक्लोनल एंटीबॉडी शुद्धिकरण ट्रेनों में कई पॉलिशिंग क्रोमैटोग्राफी चरणों को एकीकृत करने के लिए एक सरल और मजबूत संरचना प्रदान करता है।

विभिन्न निरंतर डाउनस्ट्रीम इकाई संचालन को विकसित और अनुकूलित करने के बाद, हम निरंतर प्रक्रियाओं के बेहतर नियंत्रण के लिए बायोफर्मासिटिकल उत्पादों की महत्वपूर्ण गुणवत्ता विशेषताओं (सीक्यूए) के आकलन के लिए रमन स्पेक्ट्रोस्कोपी-आधारित पीएटी उपकरण के विकास का प्रस्ताव करते हैं। अध्याय 7 के पहले भाग में, हम लाइओफिलाइज्ड बायोथेराप्यूटिक उत्पादों में प्रोटीन एकत्रीकरण की मात्रात्मक भविष्यवाणी के लिए रमन स्पेक्ट्रा के कीमोमेट्रिक्स आधारित विश्लेषण को लागू करते हैं। प्रस्तावित दृष्टिकोण की प्रयोज्यता को प्रदर्शित करने के लिए दो व्यावसायिक रूप से उपलब्ध चिकित्सीय प्रोटीन, एरिथ्रोपोइटिन (ईपीओ) और मानव विकास हार्मोन (एचजीएच) का उपयोग किया गया है। 785 एनएम तरंग दैर्ध्य लेजर के साथ आकार बहिष्करण क्रोमैटोग्राफी के साथ-साथ रमन स्पेक्ट्रोस्कोपी द्वारा थर्मली प्रेरित प्रोटीन एकत्रीकरण की निगरानी की गई ईपीओ और एचजीएच दोनों के साथ संतोषजनक प्रदर्शन देखा गया, जिसमें आर2 0.91 और 0.94, क्रॉस-वैलिडेशन सहसंबंध गुणांक 0.85 और 0.89, और क्रॉस कैलिब्रेशन (आरएमएसईसीवी) से गणना की गई रूट माध्य वर्ग त्रुटि क्रमशः 5.25 और 1.92 थी। विकसित दृष्टिकोण जैवचिकित्सीय उत्पादों के लाइओफिलाइज्ड नमूनों में एकत्रीकरण का तेज और सटीक आकलन करने में सक्षम हो सकता है। अध्ययन में एक शीशी के माध्यम से प्रोटीन परिमाणीकरण के लिए रमन स्पेक्ट्रोस्कोपी के नए उपयोग को भी प्रदर्शित किया गया है। अध्ययन के दूसरे भाग में, हम एमएबी चिकित्सा विज्ञान की आवेश संबंधी विषमताओं के मामले पर विचार करते हैं। आवेश वेरिएंट का अनुमान आमतौर पर विश्लेषणात्मक कैशन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी

(सीईएक्स) का उपयोग करके लगाया जाता है हम मशीन लर्निंग तकनीकों का उपयोग करते हुए रमन स्पेक्ट्रोस्कोपी पर आधारित प्रोसेस स्केल CEX के दौरान ऑन-लाइन और वास्तविक समय चार्ज वैरिएंट निर्धारण के लिए एक प्रोसेस एनालिटिकल टेक्नोलॉजी (PAT) टूल प्रस्तुत करते हैं। रमन स्पेक्ट्रा को प्रोसेस-स्केल CEX से उत्पन्न 0-20 g/L के mAb सांद्रता रेंज में 0-100% से अम्लीय, मुख्य और मूल प्रजातियों के वितरण वाले नमूनों के संदर्भ पुस्तकालय से एकत्र किया जाता है। विभिन्न चार्ज वैरिएंट प्रजातियों की भविष्यवाणी करने के लिए स्पेक्ट्रल प्रोसेसिंग के लिए विभिन्न मशीन लर्निंग तकनीकों के प्रदर्शन की तुलना की जाती है। एक कन्वोल्यूशनल न्यूरल नेटवर्क (CNN) आधारित मॉडल को क्रमशः R2 मान 0.94, 0.99, 0.96 और 0.99 के साथ अम्लीय प्रजातियों, मुख्य प्रजातियों, मूल प्रजातियों और कुल प्रोटीन सांद्रता के परिमाणीकरण के लिए सफलतापूर्वक कैलिब्रेट किया गया हम प्रदर्शित करते हैं कि AI-ML फ्रेमवर्क के साथ संयुक्त रमन स्पेक्ट्रोस्कोपी उत्पाद से संबंधित अशुद्धियों का तेजी से और सटीक निर्धारण कर सकती है। इस दृष्टिकोण का उपयोग mAb उत्पादन प्रक्रियाओं में वास्तविक समय CEX पूलिंग निर्णयों के लिए किया जा सकता है, जिससे सुसंगत चार्ज वैरिएंट प्रोफाइल प्राप्त करना संभव हो जाता है।

इस थीसिस में प्रस्तुत केस स्टडीज बायोफार्मास्युटिकल उत्पादों के एकीकृत निरंतर डाउनस्ट्रीम प्रसंस्करण के विकास और कार्यान्वयन में अंतर्दृष्टि प्रदान करते हैं।

Contents

Certificate i
Acknowledgements ... iii
Abstract ... v
List of Figures ... xxi
List of Tables ... xxv
Chapter 1. Introduction and Objective ... 1
1.1 Motivation and background ... 3
1.2 Problem definition, scope, and objectives of research ... 4
1.2.1 Establishing continuous mixing reaction control ... 4
1.2.2 Raman spectroscopy for online monitoring of critical quality attributes ... 4
1.2.3 Managing in-process stability of L-asparaginase ... 5
1.2.4 Control strategies for loading of process chromatography ... 5
Chapter 2. Literature Review ... 7
2.1 Process control in biomanufacturing ... 9
2.2 Challenges faced in designing process control strategies for continuous processes ... 10
2.3 Advancements in development of control strategies for continuous processing ... 12
2.4 Recent developments in control structures ... 13
2.4.1 Control of mixing reactions ... 14
2.4.2 Control of process chromatography ... 17
2.4.3 Control of membrane-based unit operations ... 21
Chapter 3. Managing in-process stability of L-asparaginase ... 27
3.1 Introduction ... 29
3.2 Materials and methods ... 30
3.2.1 Chemicals ... 30
3.2.2 Solubilization and refolding of IBs ... 30
3.2.3 Assay for L-asparaginase activity ... 30
3.2.4 One Variable at a Time (OVAT) optimization of L-asparaginase refolding ... 31
3.2.5 DOE-based L-asparaginase refolding optimization ... 31
3.2.6 Stability studies for refolded L-asparaginase ... 34
3.2.7 Statistical analysis of a response obtained in PB and RSM ... 34

3.3 Results and discussion 35
3.3.1 OVAT for optimization of solubilization conditions for L-asparaginase 35
3.3.2 OVAT for the optimization of refolding conditions for L-asparaginase 37
3.3.3 PB-based screening for L-asparaginase refolding 38
3.3.4 RSM-CCD for studying the interactions among significant variables 39
3.3.5 Validation of RSM model 41
3.3.6 Stability of refolded L-asparaginase under optimized and unoptimized conditions 42
3.4 Conclusions 43
Chapter 4. Establishing continuous mixing reaction control 45
4.1 Continuous GCSF PEGylation control 47
4.1.1 Introduction 47
4.1.2 Materials and methods 49
4.1.2.1 Samples 49
4.1.2.2 Chromatographic equipment 50
4.1.2.3 Chromatographic column and resins 50
4.1.2.4 Coiled Flow Inverter Reactor (CFIR) 50
4.1.2.5 Filtration 51
4.1.2.6 Chemicals 52
4.1.2.7 Methodology for development of integrated continuous train 52
4.1.2.8 GCSF purification 53
4.1.2.9 Batch PEGylation reaction 53
4.1.2.10 Cation exchange chromatography-based purification of PEGylation output in batch mode 53
4.1.2.11 Integrated continuous process 56
4.1.2.12 Analysis methods 57
4.1.3 Results and discussions 60
4.1.3.1 GCSF purification- material generation for PEGylation 60
4.1.3.2 Batch PEGylation reaction optimization 60
4.1.3.3 Batch chromatographic purification process development 66
4.1.3.4 Integrated continuous purification 69
4.1.4 Conclusion 74
4.2 Continuous virus inactivation control 77

4.2.1 Introduction 77
4.2.2 Materials and methods 79
4.2.2.1 Protein feed and reagents 79
4.2.2.2 Protocol for the viral inactivation assessment 79
4.2.2.3 Cell-based cytotoxicity evaluation 80
4.2.2.4 Cell-based interference evaluation 80
4.2.2.5 Quantification of virus titer by plaque assay 81
4.2.2.6 Viral inactivation study for the batch process 81
4.2.2.7 Continuous viral inactivation reactor 82
4.2.2.8 Viral inactivation study for the continuous process 83
4.2.2.9 Integration of the continuous virus inactivation reactor to the continuous downstream train 84
4.2.2.10 Analytical methods for qualitative and quantitative assessment of mAb 86
4.2.3 Results and discussion 88
4.2.3.1 Viral inactivation assessment 88
4.2.3.2 Cell-based cytotoxicity and interference evaluation 88
4.2.3.3 Batch low pH viral inactivation 88
4.2.3.4 Continuous low pH viral inactivation 89
4.2.3.5 Comparison between batch and continuous virus inactivation 89
4.2.3.6 Integration of continuous viral inactivation reactor with the continuous downstream train 92
4.2.4 Conclusions 96
Chapter 5. Control strategies for loading of process chromatography 97
5.1 Introduction 99
5.2 Materials and methods 102
5.2.1 Materials 102
5.2.2 Integrated continuous polishing chromatography: cation exchange (CEX) and multimodal (MMC) 102
5.2.3 Automation and control setup 103
5.2.4 In-line conditioning algorithm 104
5.3 Results and discussion 107
5.3.1 Need for in-line conditioning between CEX and MMC 107

5.3.2 Testing the in-line conditioning controller 109
5.4 Conclusions 112
Chapter 6. Raman spectroscopy for online monitoring of critical quality attributes 115
6.1 Monitoring and control of High Molecular Weight Impurities (HMWI) 116
6.1.1 Introduction 116
6.1.2 Materials and methods 117
6.1.2.1 Protein samples 117
6.1.2.2 Chemicals 117
6.1.2.3 Software 117
6.1.2.4 Aggregate production 118
6.1.2.5 Quantification of percent aggregate by Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC) 118
6.1.2.6 Raman spectroscopy 118
6.1.2.7 PLS analysis of spectra 118
6.1.3 Results and discussion 119
6.1.3.1 Quantification of aggregates using SEC 119
6.1.3.2 Quantification of aggregates with Raman spectroscopy 120
6.1.3.3 In situ protein aggregation determination 125
6.1.4 Conclusions 128
6.2 Monitoring and control of charge variants 129
6.2.1 Introduction 129
6.2.2 Materials and methods 133
6.2.2.1 Materials 133
6.2.2.2 Preparative scale CEX for Raman sample preparation 134
6.2.2.3 Analytical scale CEX 134
6.2.2.4 Selection of Raman spectral acquisition settings 135
6.2.2.5 Data preprocessing 135
6.2.2.6 Development of the Artificial Intelligence-Machine Learning (AI-ML) framework 137
6.2.2.7 Hyperparameter tuning 139
6.2.3 Results and discussion 140
6.2.3.1 Deploying Raman spectroscopy for real-time analysis of chromatography process

..... 140
6.2.3.2 Analytical and preparative scale cation exchange chromatography 141
6.2.3.3 Raman spectral acquisition and development of the AI-ML framework..... 142
6.2.3.4 Performance metrics..... 144
6.2.3.5 Ablation study on the machine learning framework 144
6.2.3.6 Model interpretability..... 148
6.2.3.7 Case studies for monitoring and control of charge variants in mAb purification ... 149
6.2.4 Conclusions 151
Chapter 7. Conclusion and Future Perspective 153
7.1 Conclusion 155
7.2 Future perspective..... 156
References 157

List of Figures

Figure 2.1: Automation pyramid - depicting levels of automation to demonstrate the integration of technology into industry..... 10

Figure 2.2: Basic architecture of closed loop control system using process models and process analytical tools. First step is to identify sensors, control hardware and software. Second step is to integrate sensors with process equipment for monitoring. Steps 3 and 4 are meant to setup a communication protocol with the control platform for data transfer from the equipment and to the equipment. 13

Figure 2.3: Architecture for control of mixing reactions including data acquisition, analysis, and control. 14

Figure 2.4: A pictorial representation of chromatography control showcasing process parameter controlled through model development of off-line and on-line analyzed data..... 17

Figure 3.1: Densitometry analysis for estimation of solubilization of L-asparaginase IBs: (A) Different concentrations of urea, (B) Different concentrations of IBs, and (C) Different incubation periods after addition of DTT during solubilization. 36

Figure 3.2: L-Asparaginase activity under different refolding conditions: (A) Different refolding methods, (B) Different pH, and (C) Different dilution factors. 37

Figure 3.3: The Pareto chart shows the effect of different variables for refolding L-asparaginase. 39

Figure 3.4: Response surface 3D plots showing interaction among most significant variables for refolding of L-asparaginase as a function of: (A) pH and dilution factor, (B) pH and glycine, (C) pH and sorbitol, (D) Dilution factor and glycine, (E) Dilution factor and sorbitol, and (F) Glycine and sorbitol. 40

Figure 3.5: L-Asparaginase stability studies under optimized and unoptimized conditions stored at 2-8°C and room temperature: (A) Optimized L-asparaginase activity stored at 2-8°C from 0 to 168 h, (B) RP-HPLC profiles of optimized L-asparaginase stored at 2-8°C, (C) Optimized L-asparaginase activity stored at room temperature from 0 to 168 h, (D) RP-HPLC profiles of optimized L-asparaginase stored at room temperature (E) Unoptimized L-asparaginase activity stored at 2-8°C from 0 to 168 h, (F) RP-HPLC profiles of unoptimized L-asparaginase stored at 2-8°C, (G) Unoptimized L-asparaginase activity stored at room temperature from 0 to 168 h, (H) RP-HPLC profiles of unoptimized L-asparaginase stored at room temperature. 42

Figure 4.1: Architecture of the integrated continuous end-to-end PEGylation and purification train showcasing production of purified PEG-GCSF from inclusion bodies. 51

Figure 4.2: Proposed methodology for the development of integrated continuous PEGylation and purification train. 52

Figure 4.3: (A) Details of the screening DoE study- list of input variables (along with their range

studies) and output variables, (B) actual vs. predicted plots, and (C) prediction profiles for output variables. 63

Figure 4.4: (A) Details of the optimization DoE study- list of input variables (along with their range studies) and output variables, (B) actual vs. predicted plots, (C) prediction profiles for output variables, and (D) design space for operation under defined set of constraints. 65

Figure 4.5: Analytical size exclusion (SEC-HPLC) and analytical cation exchange (CEX-HPLC) chromatograms for (A, C) PEGylation output and (B, D) purified cation exchange elute respectively. 66

Figure 4.6: Process chromatograms for cation exchange chromatography development (A) CM Sepharose FF linear gradient elution, (B) Fractogel COO^- linear gradient elution, and (C) Fractogel COO^- step elution. 68

Figure 4.7: Chromatographic profile for the (A) 4 column continuous CEX loading and, (B) overlays of all CEX elution profiles. 73

Figure 4.8: Illustration of the continuous virus inactivation reactor configuration depicting the flow schematic for the viral inactivation study. 82

Figure 4.9: RTD curve for the designed viral inactivation reactor. 83

Figure 4.10: Continuous downstream train showcasing integration of the continuous Protein A chromatography to continuous viral inactivation step using a surge vessel. 86

Figure 4.11: Continuous downstream train showcasing integration of the continuous Protein A chromatography to continuous viral inactivation step using an inline buffer dilution setup 87

Figure 4.12: Viral inactivation data (Log_{10} adjusted virus titer and the log_{10} reduction value) at different time points for A) Batch process and the B) Continuous process. A dotted line joining the average Log_{10} virus titer was plotted in both the curves (to represent inactivation kinetics). 89

Figure 4.13: Overlay of the A) Aggregate (SEC-HPLC) and the B) Charge variant profile (CEX-HPLC) for the mAb sample before (Protein A Elute) and after (Neutralized Protein A Elute) viral inactivation in the continuous viral inactivation reactor. 92

Figure 4.14: A) Elution chromatogram for continuous Protein A chromatography, B) pH change as a function of time for Protein A chromatography, C) pH titration curve depicting moles of acid required for acidification at different pH values, and D) pH of the Protein A elute entering the CFIR in integration strategy B. 94

Figure 5.1: BioSMB setup with in-line conditioning. 103

Figure 5.2: (A) Elution pH gradient from pH 6.0 to 9.0 between Buffers A and B, with amount of HCl required to be added at each point to adjust pH to 6.0; (B) Flow rates of conditioning solutions required to adjust the elution stream at different pH (6.0-9.0) and conductivities ((i) 11 mS/cm; (ii) 12 mS/cm; (iii) 13 mS/cm) with a total conditioning flow rate of 6.5 mL/min. 106

Figure 5.3: Control algorithm for automated real-time conditioning between CEX and MMC

using BioSMB live sensor data and valve manifold control. C_{target}, C_{CEX}, C_{acid}, C_{salt} are the conductivity values in mS/cm of the targeted MMC load material, CEX elution stream, HCl conditioning solution, and NaCl condition solutions, respectively. Also, 6.5 mL/min is the flow rate of the CEX elution stream, and 13 mL/min is the target flow rate for the MMC load stream. 107

Figure 5.4: Normalized UV profile of MMC elute in integrated CEX+MMC chromatography runs (A) without in-line conditioning control and (B) with in-line conditioning control; (C) yield and CQAs in load material, without conditioning, with conditioning, and with both conditioning and pooling for reduction of acidic, basic, and aggregate species. 108

Figure 5.5: Testing the real-time conditioning controller under different elution conditions: (A) linear gradient; (B) multi-step gradient; (C) sigmoidal gradient. Dashed lines show the required set-points of pH, conductivity and flow rate post-conditioning. 110

Figure 5.6: Testing the real-time conditioning controller with different process deviations: (A) wrong pH of Buffer B (~8.5 instead of 9) resulting in wrong pH gradient; (C) wrong conductivity of Buffer A (~11.5 instead of 13), causing unexpected conductivity gradient; (C) tubing blockage and leakage detected at t = 20 min followed by tubing replacement. 111

Figure 6.1: Chromatogram for SEC of a) EPO and b) HGH 119

Figure 6.2: Percent aggregate measured by SEC for a) EPO and b) HGH 120

Figure 6.3: Representative Raman spectra for a) EPO and b) HGH 121

Figure 6.4: Model calibration and testing graph showing actual v/s predicted percentage aggregate of a) EPO and b) HGH. The data points represent the mean value of predictions for each actual percentage aggregate, while vertical lines represent the standard deviation of data. The orange squares represent calibration data and blue circles represent testing data. 122

Figure 6.5: Raman spectra as taken from inside a vial of a) EPO and b) HGH. 127

Figure 6.6: Illustration of the generalized pipeline of the approach used in this study. 133

Figure 6.7: Visual analysis of spectra before and after preprocessing. 136

Figure 6.8: Representation of the one-dimensional Convolutional Neural Network architecture with Raman spectroscopy data input connected to the convolution, pooling, flatten, fully connected and the output layer. 138

Figure 6.9: Schematic design of integration of Raman spectroscopy in continuous downstream processing train (A) post protein A elution (B) post CEX elution. 140

Figure 6.10: (A) Analytical CEX of T-mAb prior to charge variant separation showcasing presence of acidic, main, and basic charge variants; (B) CEX elution profile of T-mAb in semipreparative CEX using YMC S10 resin; (C) CEX elution profile of T-mAb in preparative CEX using Eshmuno CPX resin. 142

Figure 6.11: Scatter plot of observed versus predicted for the proposed CNN architecture: (a)

Acidic charge variant, (b) Main charge variant, (c) Basic charge variant, and (d) Total Protein. 146

Figure 6.12: Taylor diagram of predicted charge variant concentration during the validation stage (a) Acidic charge variant, (b) Main charge variant, (c) Basic charge variant, and (d) Total Protein (full charge variant). 146

Figure 6.13: Comparison of the actual and predicted charge variant concentration with different machine learning models (a) Acidic charge variant, (b) Main charge variant, (c) Basic charge variant, and (d) Total Protein. 147

Figure 6.14: Bar plot of AI-ML and PLS regression-based model prediction of charge variant concentration with respect to Coefficient of determination. 148

Figure 6.15: Comparison of AI-ML and PLS regression-based model prediction of charge variant concentration with respect to RMSE values. 148

Figure 6.16: Validation of on-line and real time prediction of CEX chromatography fractions using CNN model as compared to HPLC. 150

List of Tables

Table 2.1: Potential issues faced while developing a robust control strategy 12

Table 2.2: Schemes for controlling mixing reactions in bioprocessing..... 16

Table 2.3: Different techniques for implementing control in chromatographic unit operations . 22

Table 2.4: Type of membranes used in membrane-based unit operations of bioprocesses..... 23

Table 2.5: Different techniques for implementing control in membrane-based unit operations . 26

Table 3.1: Variables and their range studied under OVAT 31

Table 3.2: PB design for L-asparaginase refolding with the actual and predicted activity 33

Table 3.3: Matrix design of CCD with the actual and predicted values for the optimization of refolding conditions by analyzing the interactions between the most significant factors 35

Table 3.4: ANOVA for PB design of L-asparaginase refolding..... 39

Table 3.5: ANOVA for CCD of RSM 40

Table 3.6: Validation matrix for CCD of RSM 41

Table 3.7: Optimized conditions for refolding of L-asparaginase from E. coli IBs 41

Table 4.1: Details of the continuous GCSF manufacturing process..... 54

Table 4.2: Details of cation exchange chromatography step in batch mode 55

Table 4.3: Details of Continuous PEGylation process 57

Table 4.4: Quality attributes for the integrated continuous downstream process for PEG-GCSF 73

Table 4.5: Comparison of Continuous and Batch PEGylation process 74

Table 4.6: Details of the continuous Protein A chromatography step for integration strategy A 85

Table 4.7: Details of the continuous Protein A chromatography step for integration strategy B 87

Table 4.8: Product quality attributes for the batch and CFIR in two integration strategies 95

Table 6.1: Summary of percentage aggregate prediction models..... 122

Table 6.2: Variation in principal components of EPO model..... 123

Table 6.3: Variation in principal components of HGH model..... 124

Table 6.4: Actual v/s predicted values of percent aggregate 125

Table 6.5: VIP scores of various peaks in EPO model..... 126

Table 6.6: VIP scores of various peaks in HGH model..... 126

Table 6.7: ML framework that has been proposed for predicting charge variants..... 139

Table 6.8: Purity levels of different charge variant pools after purification from YMC S10 resin 141

Table 6.9: Environment dependencies 143

Table 6.10: Statistical results of SVR, RF, DNN, and CNN models for prediction of acidic, main and basic charge variants. 145

Table 6.11: Raman fingerprinting of top 10 relevant features. 149