

治疗性 mAbs 生产中下游工艺的在线液相色谱监测

作者

Edgar Naegele 和
Daniel Kutscher
安捷伦科技有限公司

Lea Bonnington,
Michael Leiss,
Andrés Martínez
Roche Diagnostics
GmbH Penzberg, 德国

摘要

本应用简报介绍了 Agilent 1260 Infinity II Prime 在线液相色谱系统在生物药物产品下游工艺中的应用。将通过例子展示对 mAb 工艺纯化系统的在线 HPLC 监测。实时监测有助于深入了解工艺，并且能够通过优化工艺步骤的载料和混合标准来提高目标产物的收率和纯度。通过使用在线 SEC-UV-UHPLC 快速定量方法，可以获得更高的主要产物浓度并尽可能减少副产物（即聚集体）。实时在线监测纯化工艺有助于做出决策以提高产品质量，节省时间和成本，并避免手动样品处理的要求。此外，还可以通过自动化工艺反馈实时做出决策。整个监测过程由安捷伦在线液相色谱监测软件协调控制，该软件便于取样和样品分析，并能够通过趋势图实现在线实时监测。

前言

在现代生物制药行业中，活性药物成分 (API) 的生产分为上游和下游工艺。上游工艺 (USP) 包括与发酵过程相关的各个环节，例如，对哺乳动物细胞进行工程改造，以产生所需的生物分子。其中包括与受控条件下微生物生长和细胞培养相关的步骤。

下游工艺 (DSP) 从细胞与溶液分离开始，称为细胞分离和采集。可以直接从滤液中获得所需的 API 并进行进一步加工处理，或者在某些情况下，通过额外的加工步骤将 API 从细胞中释放到溶液中。所需的 API 通常会根据电荷、大小、疏水性或亲和力等特性，通过几个色谱步骤进行纯化。通过多个调整、精处理和活化步骤得到最终 API (图 1)。

正如必须监测生物反应器中细胞培养物中的目标产物一样，同样也必须监测副产物、细胞生长培养基的特性以及后续纯化和加工步骤中的产品质量。鉴于生物制剂是复杂的分子，需要使用灵敏的分析工具

(例如 (U)HPLC) 密切监测关键质量属性 (CQAs) 和关键工艺参数 (CPPs)。

本应用简报展示了使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 在线液相色谱系统近乎实时地监测生物药物 API 的色谱纯化。这使相关人员能够根据纯度快速做出决策以满足混合和进一步加工要求。

实验部分

仪器

- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器组件 (G3167AA)：Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器 (G3167A)，与 Agilent 1290 Infinity 阀驱动器 (G1170A) 上的外部阀 (货号 5067-6680) 以及安捷伦在线液相色谱监测软件组合
- 用于 1260 Infinity II 在线样品管理器的样品温控装置 (G7167-60005)

- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备标准热交换器 (G7116-60051) 和 2 位/10 通阀 (货号 5067-4283)
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)，配备标准最大光强卡套式流通池 (1 μ L, 10 mm; G4212-60008)

色谱柱

基于聚合物的 UHPLC SEC 色谱柱，4.6 \times 150 mm, 200 \AA , 1.7 μ m

软件

- Agilent OpenLab CDS 2.6 版
- 安捷伦在线液相色谱监测软件，1.0 版

纯化系统取样方法

- 使用内部开发的符合 GMP 要求的无菌 FPLC 解决方案从纯化洗脱液流中在线取样，该解决方案配备 NovaSeptum 传输装置 (Merck) 和分馏装置 (Äkta Go, Cytiva)^[1]
- **从工艺流程中取样并引导至在线 LC 的流速：**2.2 mL/min
- **取样间隔：**4.25 分钟
- **在线 LC 的取样速度：**设置 2 (抽吸速度：100 μ L/min)

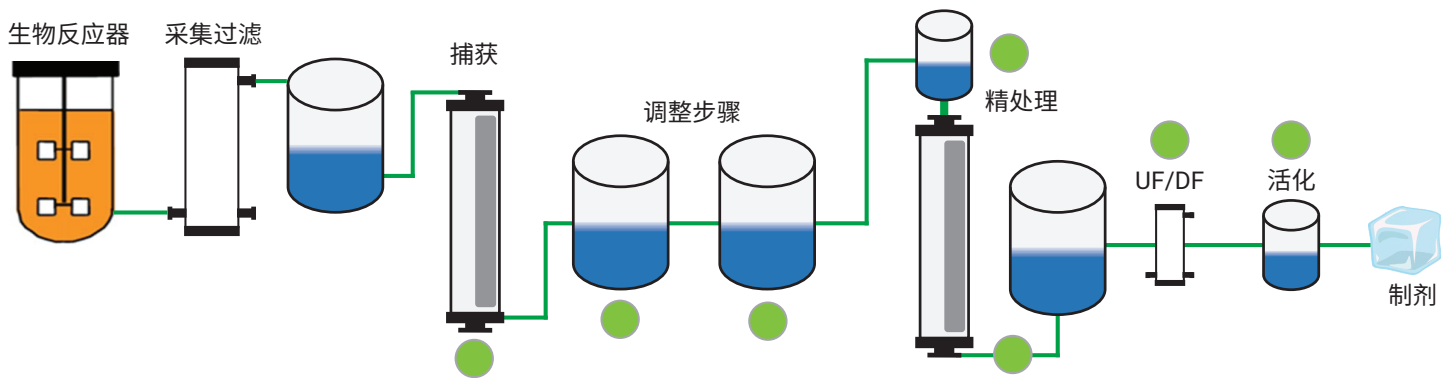


图 1. 生物药物 API 的下游工艺。绿点表示通过测定单克隆抗体 (纯化) 工艺中高分子量聚集体的百分比 (%HMWs mAb 聚集体) 对产品质量进行在线液相色谱监测的接入点

分析方法

参数	值
溶剂	100 mmol/L CH ₃ CO ₂ NH ₄ , pH 5.5
分析流速	0.6 mL/min
梯度模式	等度
停止时间	3 分钟
柱温	40 °C
进样模式	Feed 模式 注入速度: 自适应 (80% 泵流速) 冲洗模式: 自动 (12.44 μL)
进样量	4 μL
进样针清洗	外部清洗模式: 标准 — 5 s, S1 100% H ₂ O 内部清洗模式: 关闭 — 仅用 S2 (流动相) 再活化
取样	参见取样方法
二极管阵列 检测器	波长: 280 nm ± 4 nm 和 260 nm ± 4 nm, 参比 360 nm (100 nm) 数据采集速率: 10 Hz

注: 作为备份, 通过 2 位/10 通阀连接相同的第二根色谱柱, 并配置第二个高速泵进行再生。

数据处理

自动积分、原始数据导出和结果报告导出 (CSV 和 PDF 数据格式, 并通过基于方法的 OPC UA 接口)、软件 β 版。

样品

专有 mAb, 从纯化系统中洗脱。

溶剂和化学品

- 所有溶剂均购自德国 Merck 公司
- 化学品购自德国 VWR 公司
- 新制超纯水产自配置 0.22 μm Millipak 膜式终端过滤器的 Milli-Q Q-POD 系统

结果与讨论

在由哺乳动物细胞生产的 mAb 的下游工艺中, 通过在线 LC (SEC-UV) 验证来自 AEX 色谱精处理步骤的洗脱液的产品质量 (图 2)。采用配备 NovaSeptum 取样接头的符合 GMP 要求的无菌 FPLC 解决方案, 将 Agilent 1260 Infinity II Prime 在线液相色谱系统连接至来自所使用的纯化系统的流出物管线。利用在线液相色谱系统约每 4 分钟取样一次, 并直接进样至 SEC 色谱柱, 在三分钟运行时间内进行分析。整个配置中还包括第二台泵和 MCT 中的 2 位/10 通阀, 以实现色谱柱切换, 当色谱柱出现问题时可即时提供替

代解决方案。所获得的 SEC 色谱图提供了有关所需 mAb 的浓度和高分子量聚集体的百分比信息。

在协调取样和分析计划的在线液相色谱监测软件中, 可以近乎实时地查看数据 (当每次运行完成时)。快速定量 SEC-UV 方法每四分钟提供一次 mAb 和 HMW 聚集体成分的面积百分比信息 (图 3)。趋势图给出了 DSP 工艺中 HMW 聚集体的面积百分比。

观察到一种 HMW 聚集体 (SEC 保留时间: 1.67 min) 在 24 min 至 56 min 从 0.1% 增加至 1.68%, 随后在 76 min 时降低至 0.47%。

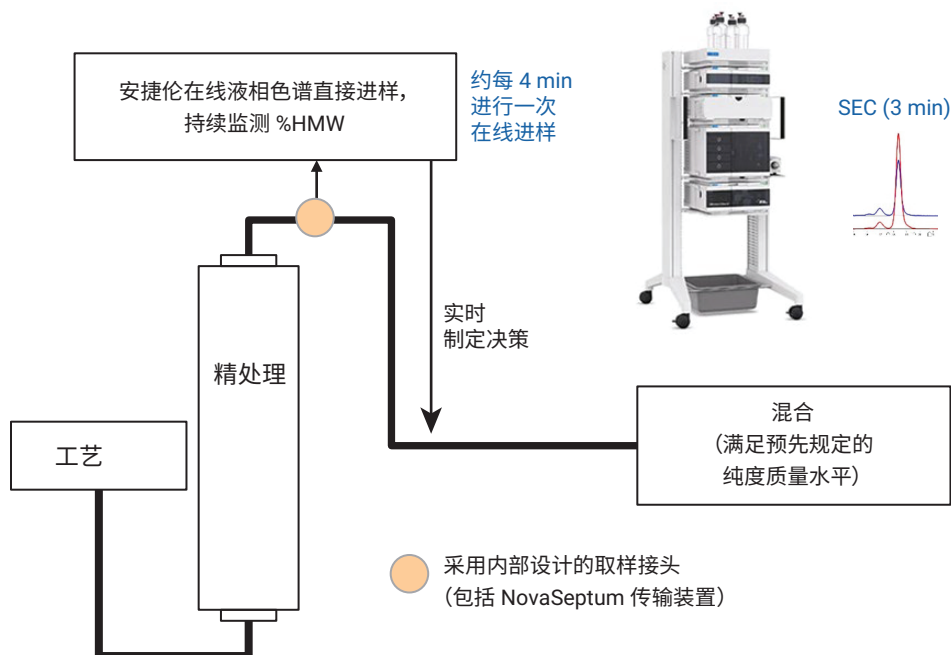


图 2. Agilent 1260 Infinity II 在线液相色谱系统在生物药物 mAb 下游工艺中的设置示意图

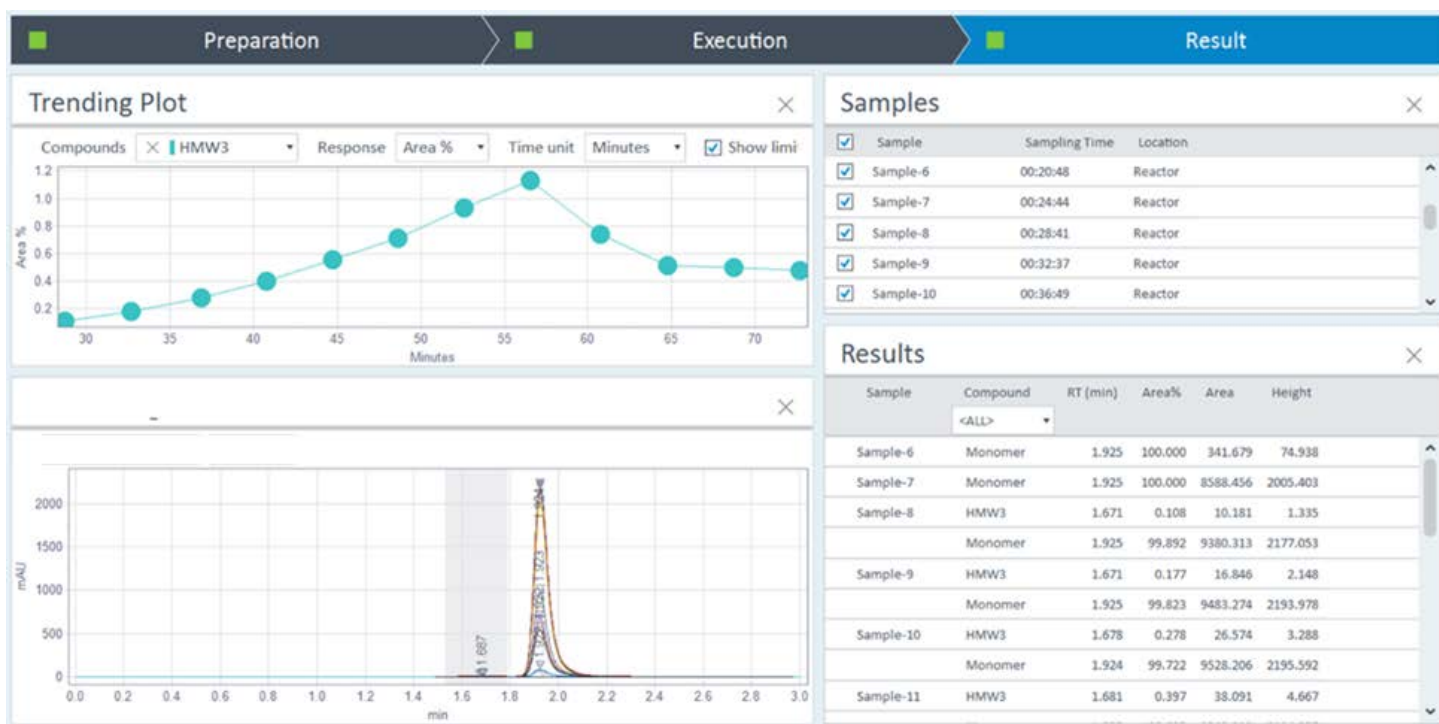


图 3. 安捷伦在线液相色谱监测软件中显示的结果概览。趋势图显示了 mAb 的高分子量 (HMW) 聚集体的面积百分比 (绿色)。在 Samples (样品) 选项卡中, 可以看到样品编号、取样时间和样品来源。Results (结果) 选项卡显示了检测到的化合物以及样品的分析结果。色谱图显示了选定 (校验) 样品的叠加图

主要产物 (所需 mAb) 的面积百分比显示在图 4A 的趋势图中。该图提供了样品中主要产物的含量信息, 与图 3 中的图 (显示了 HMW 聚集体的面积百分比) 相反。mAb 从 20.48 min 开始从纯化系统中洗脱 (样品 6), 在 28.41 min 后首次检

测到 HMW 聚集体 (样品 8), mAb 单体和 HMW 聚集体的比例分别为 99.892% 和 0.108%。实际峰面积的趋势图显示, 单体的主要洗脱时间为 24.44 min (样品 7) 至 72.40 min (样品 19) (图 4B)。

在线液相色谱监测软件支持两种模式: 控制器模式 (主动控制由用户设置的取样计划) 和接收器模式 (等待外部触发/启动信号)。在这两种模式中, 在线液相色谱系统所生成的数据都可用于反馈循环。

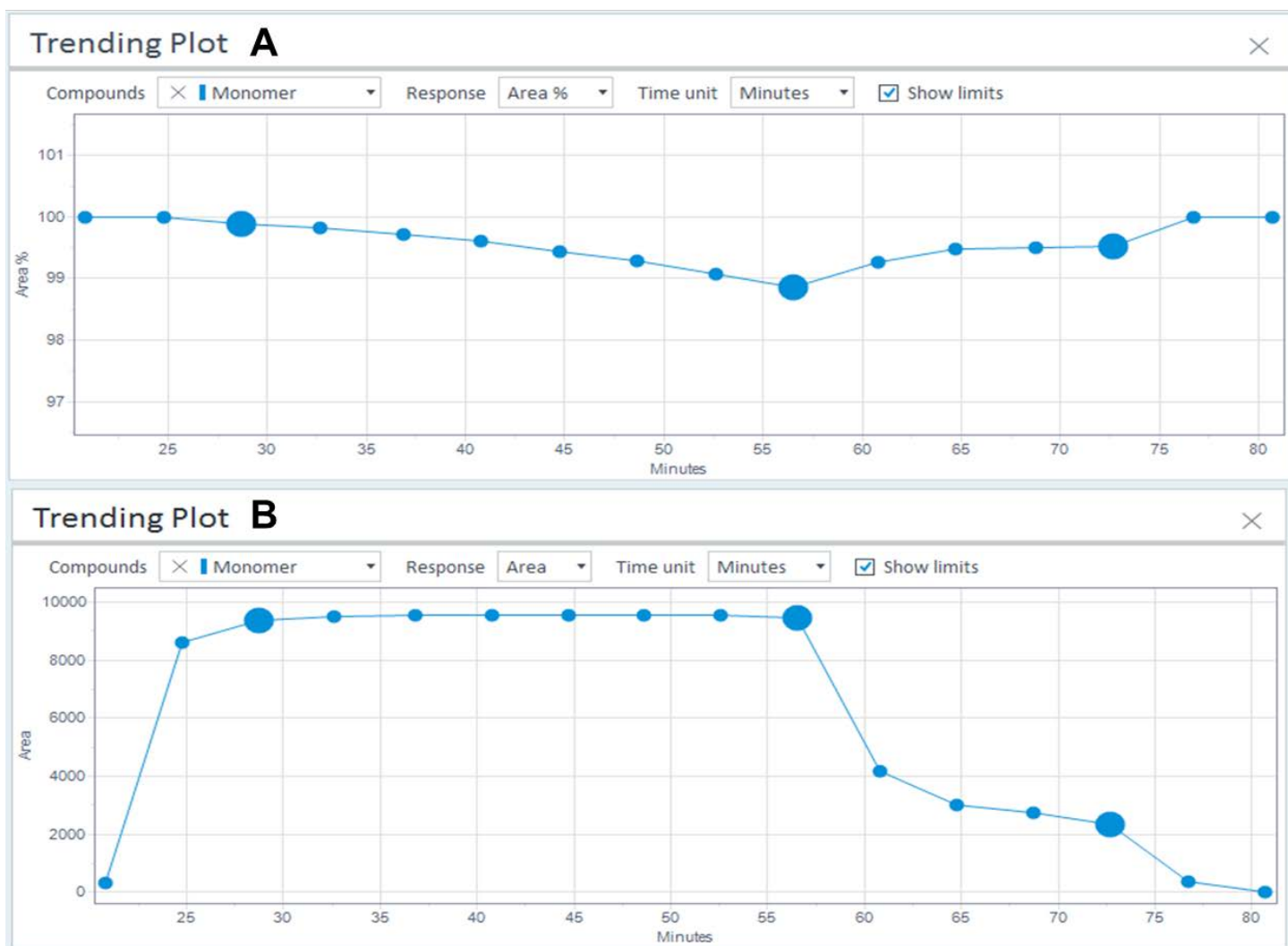


图 4. 趋势图 A 显示了所收集的馏分中 mAb 的面积百分比（蓝色）。趋势图 B 显示了所抽取的样品和所抽取的馏分中主峰的峰面积

结论

本应用简报展示了配备安捷伦在线液相色谱监测软件的 Agilent 1260 Infinity II 在线液相色谱系统在治疗性 mAb 下游工艺中的应用。可以近乎实时地获得相关数据，

帮助做出混合决策，确保产品杂质符合预先规定的可接受最大阈值要求，如本文中的 HMW 聚集体。与离线方法相比，这种在线监测方法可节省时间并降低成本，有助于提高产品质量和工艺可靠性。

参考文献

1. Scheidecker, B.; Braaz, R.; Vinnemeier, J. Fluid Dynamic Sampling Site Characterization Improves Process Correlation During Continuous Online Sampling. *J. Pharm. Innov.* **2020**. <https://doi.org/10.1007/s12247-020-09458-w>

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

DE25566314

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022
2022 年 10 月 27 日
5994-5186ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

