

治療用 mAb 製造のダウンストリーム プロセスにおけるオンライン LC モニタリング

著者

Edgar Naegele and
Daniel Kutscher
Agilent Technologies, Inc.

Lea Bonnington,
Michael Leiss, and Andrés
Martinez
Roche Diagnostics GmbH
Penzberg, Germany

概要

このアプリケーションノートでは、バイオ医薬品のダウンストリームプロセスにおける Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC システムの使用について説明します。例として、mAb のプロセス精製システムのオンライン HPLC モニタリングを示します。リアルタイムモニタリングによりプロセスの詳細を把握することができ、製造プロセスステップでのロード量やプーリング基準を最適化することができます。目的の製品の回収率および純度を向上することができます。高速での定量が可能なオンライン SEC-UV-UHPLC メソッドを適用することにより、主製品の濃度の最適化が可能となり、一方で、凝集体などの副生成物生成を最小限に抑えることができます。精製プロセスをオンラインでリアルタイムモニタリングすることにより、製品品質の向上に対する意思決定を迅速化し、時間とコストを削減することができます。マニュアルでのサンプルハンドリングを行う必要がなくなります。さらに、自動プロセスフィードバックにより、リアルタイムでの意思決定を可能にします。モニタリングプロセス全体を Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアで制御することにより、サンプリングとサンプル分析を簡素化し、トレンドプロットによるリアルタイムモニタリングを可能にします。

はじめに

最近のバイオ医薬品業界では、医薬品有効成分 (API) の製造を、アップストリームプロセス、ダウンストリームプロセスに区分しています。アップストリームプロセス (USP) は、目的の生体分子を生成するための哺乳類細胞の開発などの発酵プロセスに関連する要素で構成されています。このプロセスには、制御された条件下での微生物および細胞培地などに関わる培養ステップが含まれます。

ダウンストリームプロセス (DSP) では、細胞ろ過と回収 (溶液からの細胞分離) が最初のステップとなります。目的の API をろ過溶液から直接採取してその先のプロセスに進む方法や、細胞から API を溶液に遊離させるプロセスを実施後に採取する方法などがあります。一般的に目的の API は、電荷、サイズ、疎水性、アフィニティなどのクロマトグラフィーを用いて精製します。いくつかの調整、脱水、およびコンディショニングステップを実施し、最終の API を生成します (図 1)。

目的の製品、副生成物、細胞増殖培地の特性について、バイオリアクタ内の細胞培地をモニタリングする必要があるのと同様に、その後の精製およびプロセス全体を通して製品品質もモニタリングする必要があります。生物製

剤が複雑な分子であることを考えれば、(U)HPLC のような高感度の分析ツールを使用して、重要品質特性 (CQA) および重要工程パラメータ (CPP) を詳細にモニタリングする必要があります。

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC システムによる、バイオ医薬品 API のクロマトグラフィー精製のリアルタイムモニタリングについて説明します。このシステムにより、目的の純度を得るためのプーリングやその他のプロセスが必要かどうかといった意思決定を迅速に行うことができます。

実験方法

装置構成

- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1260 Infinity II オンライン サンプルマネージャセット (G3167AA) : Agilent 1260 Infinity II オンライン サンプルマネージャ (G3167A)、外部バルブ (部品番号 5067-6680) とクラスタ化した Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A) および Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア
- Agilent 1260 Infinity II オンライン サンプルマネージャ用サーモスタット (G7167-60005)

- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、標準の熱交換器 (G7116-60051) および 2 ポジション/10 ポートバルブ (部品番号 5067-4283) 搭載
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)、標準の Max-Light カートリッジセル (1 μ L、10 mm、G4212-60008) 装備

カラム

ポリマーベース UHPLC SEC カラム、4.6 \times 150 mm、200 \AA 、1.7 μ m

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS、バージョン 2.6
- Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア、バージョン 1.0

精製システムからのサンプリングメソッド

- 社内開発の GMP に準拠した無菌 FPLC システム (NovaSeptum 移送ユニット (Merck) およびフラクショネーション (Äkta Go、Cytiva) を搭載) による、精製溶離液フローからのオンラインサンプリング¹
- **プロセスからのオンライン LC サンプリング流量** : 2.2 mL/min
- **サンプリング間隔** : 4.25 分
- **オンライン LC のサンプリングスピード** : 設定値 2 (吸引スピード : 100 μ L/min)

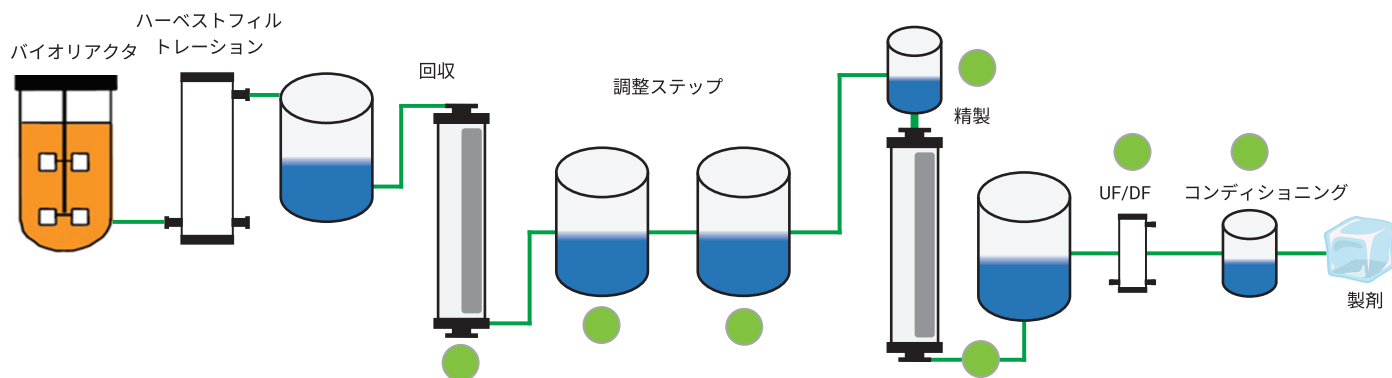


図 1. バイオ医薬品 API のダウンストリームプロセス。オンライン LC モニタリングによる製品品質確認を行ったアクセスポイントを緑色のドットで示しており、モノクローナル抗体 (精製) プロセスでの高分子量凝集体の割合 (%HMW mAb 凝集体) の測定を行っています。

分析メソッド

パラメータ	設定値
溶媒	100 mM CH ₃ CO ₂ NH ₄ , pH 5.5
分析流量	0.6 mL/min
グラジエントモード	イソクラテック
ストップタイム	3分
カラム温度	40 °C
注入モード	Feedモード Feed速度: 適応可能 (ポンプ流量の 80 %) フラッシュアウトモード: 自動 (12.44 μL)
サンプル注入量	4 μL
ニードル洗浄	外側洗浄モード: 標準:5 秒、 S1 100 % H ₂ O 内側洗浄モード: オフ:S2 (移動相) による再コンディショニングのみ
サンプリング	サンプリングメソッドを参照
ダイオードアレイ 検出器	波長: 280 ±4 nm および 260 ± 4 nm、リファレンス 360 (100 nm) データレート: 10 Hz

注: バックアップとして、同一の 2 本目のカラムを 2 ポジション/10 ポートバルブに接続し、ハイスピードポンプでカラム再生が行える構成としました。

データ処理

自動積分、生データのエキスポート、および結果レポートのエキスポート (CSV および PDF データ形式、メソッドベースの OPC UA インタフェースを使用)、ソフトウェアベータバージョン。

サンプル

精製システムから採取した固有の mAb

溶媒と試薬

- すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入しました。
- 試薬はドイツの VWR 社から購入しました。
- 超純水は、0.22 μm Millipak メンブレンユースポイントカートリッジ付きの Milli-Q Q-POD システムで精製しました。

結果と考察

哺乳類細胞から生成した mAb のダウンストリームプロセスでは、AEX クロマトグラフィー Polishing (高度精製) ステップで得られた溶出液の製品品質をオンライン LC (SEC-UV) で検証しました (図 2)。Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC システムを、NovaSeptum サンプリング搭載の接続の GMP に準拠した無菌 FPLC を用いた精製システムからの流出物ラインに接続しました。サンプルを約 4 分ごとにオンライン LC システムで吸引し、SEC カラムに直接注入して、分析時間 3 分で分析を行いました。MCT の第 2 のポンプと 2 ポジション/10 ポートバルブを組み込むことでカラム切り替えを有効にし、カラムに問題が発生した際には即座にカラム切替を行って分析を継続できるようにしました。得られた SEC クロマトグラムは、目的の mAb の濃度および高分子量凝集体の % に関する情報を示していました。

オンライン LC モニタリングソフトウェアで、サンプリングと分析のスケジュールを制御することにより、データを各分析の終了時に、リアルタイムで確認することが可能です。高速定量を可能にする SEC-UV メソッドにより、4 分ごとに mAb および面積 %HMW 凝集体組成を取得できます。(図 3)。DSP プロセスにわたる HMW 凝集体の面積 % をトレンドプロットで示しています。

HMW 凝集体 (SEC RT : 1.67 分) では、24 ~ 56 分にかけて 0.1 ~ 1.68 % に増大していますが、76 分には 0.47 % に低下しています。

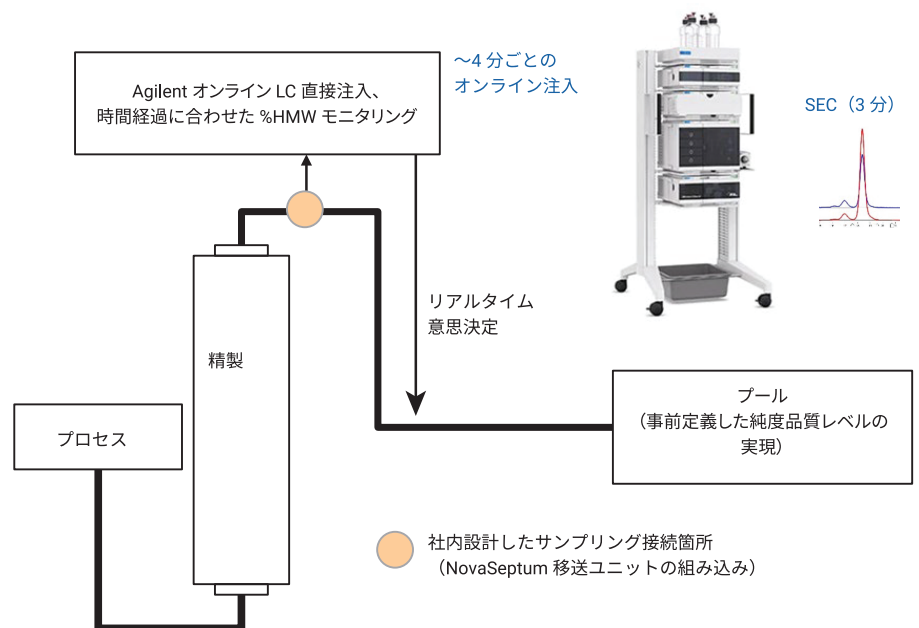


図 2. バイオ医薬品 mAb のダウンストリームプロセスにおける Agilent 1260 Infinity II オンライン LC システムの設定概略図

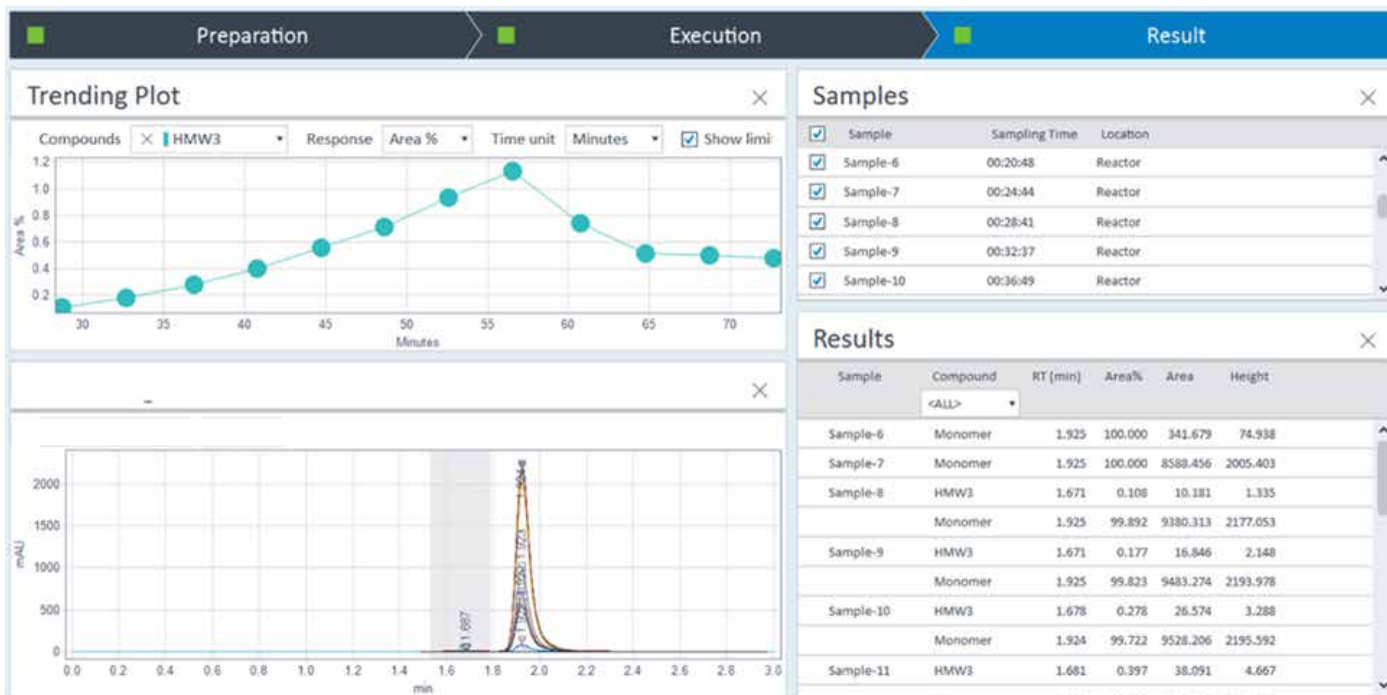


図 3. Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアに表示される結果の概要。トレンドプロットは、mAb で生成した高分子量 (HMW) 凝集体の面積 % を示しています (緑色)。「[サンプル]」タブでは、サンプル番号、サンプリング時間、およびサンプルソースを確認できます。「[結果]」タブには、検出された化合物およびサンプルの分析結果が表示されます。選択されたサンプル (チェックマーク付き) のクロマトグラム重ね書きが表示されます。

主製品である目的の mAb の面積 % を、図 4A のトレンドプロットに示します。このプロットは、サンプル中の主製品の含有量の概要を示していますが、図 3 のプロットは、HMW 凝集体の面積 % を示しています。分析開始から 20.48 分で精製システムから溶出した mAb を sample 6 として測定しました。HMW 凝集体は開始から 28.41 分後の sample 8 の分析時に初めて検出されました。この時の mAb 単量体と HMW 凝集体の面積 % はそれぞれ 99.892 % および 0.108 % でした。実際のピーク面積のトレンドプロットは、開始から 24.44 分の sample 7 ~ 開始から 72.40 分の sample 19 の分析で得られた単量体について示しています。(図 4B)。

オンライン LC モニタリングソフトウェアは 2 つのモードをサポートしています。1 つはコントローラモードであり、この場合はユーザーが設定したサンプリングスケジュールで分析を実行します。もう 1 つはレシーバモードとなり、外部トリガー / 開始信号を受けて分析を開始します。両方のモードにおいて、オンライン LC システムが生成したデータをフィードバックループに利用できます。

結論

このアプリケーションノートでは、治療用 mAb のダウンストリームプロセスにおける Agilent 1260 Infinity II オンライン LC システムと Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアの使用について示しました。リアルタイムで得られた結果データが、ここで示した HMW 凝集体の例のように、事前に定義してある製品不純物の許容最大閾値限界までどのくらいブリーディングできるかを決定する支援となります。このオンラインモニタリングのアプローチでは、オフラインのアプローチと比較して、時間とコストを削減すると同時に、製品品質とプロセスの信頼性を向上させることが可能となります。

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>

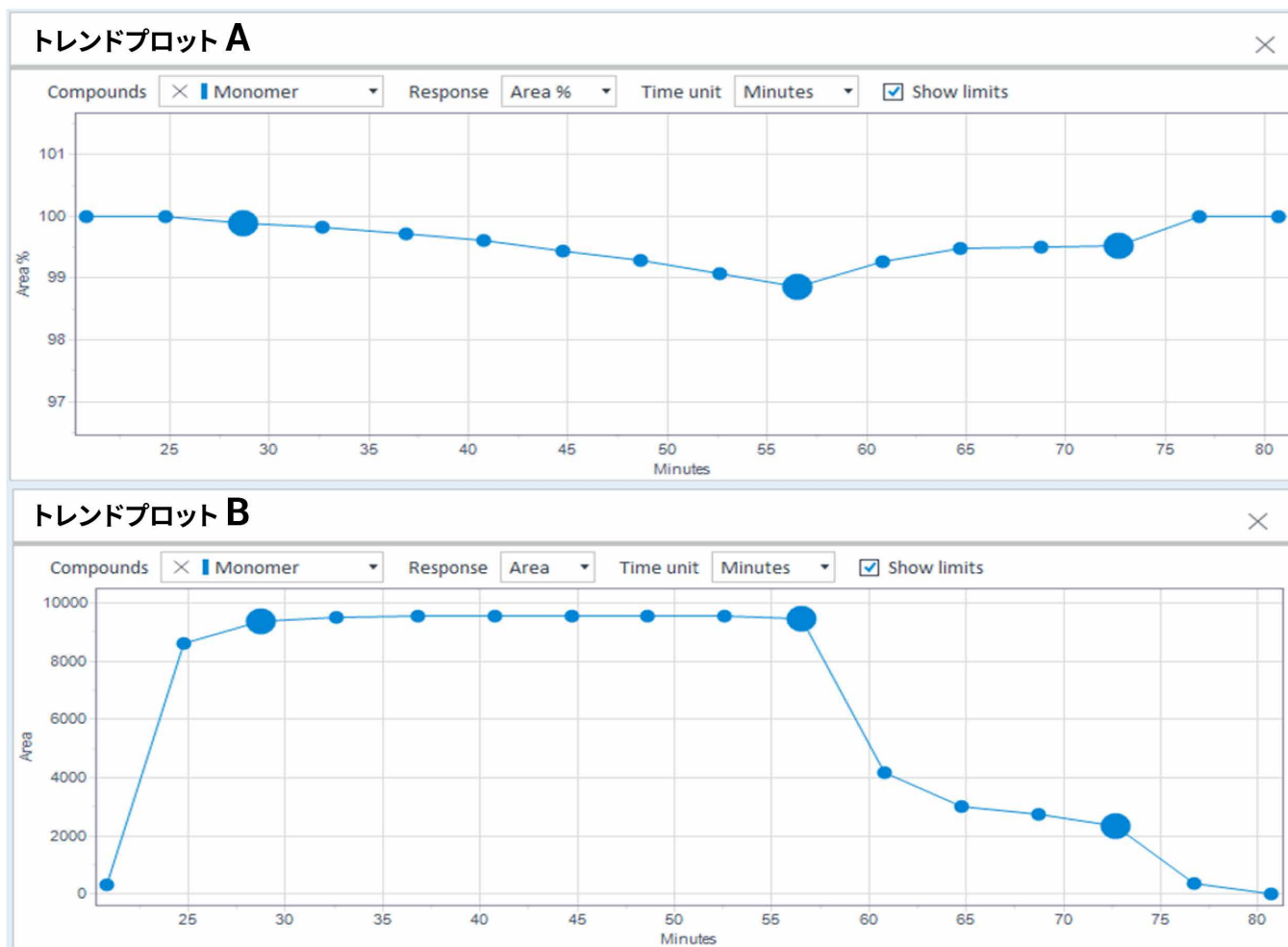


図 4.トレンドプロット A は、収集したフラクション中の mAb の面積 % を示しています（青色）。トレンドプロット B では、サンプリングされたサンプルやフラクションのメインピークのピーク面積を示しています。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE25566314

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, October 27, 2022

5994-5186JAJP