

プロセス管理におけるモノクローナル抗体の 重要品質特性評価

自動ハートカット 2D-LC によるAgilent InfinityLab オンライン LC ソリューション

著者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、ハートカット 2D-LC を活用した Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアの機能について説明します。これらの分析では、プロセス管理のためのオンライン LC として Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システムを用い、ハートカットを行っています。例として、一次元目 (¹D) で抗体価測定のためのモノクローナル抗体 (mAb) の分離を行います。続いて二次元目で (²D)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による凝集、およびイオン交換クロマトグラフィー (IEC) による電荷変異体の分離を実施します。得られた結果は Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアで、表示、解析を行います。

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、最も重要なバイオ医薬品の 1 つです。モノクローナル抗体は抗体分子種が均一ですが、製造、精製、製剤において変化することがあり、それによって効能と安全性が損なわれる可能性があります。変化の例として、ダイマーや三量体などの分子量の大きい凝集体の形成、電荷変異体を生成する修飾 (例えば、脱アミド化によるもの) があります。これらが、最も重要な品質特性 (CQA) のうちの 2 つに挙げられます。したがって、培養工程 (アップストリーム)、および精製工程や製剤の途中 (ダウンストリーム) において、mAb の CQA を管理することが重要となります。

Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションは、mAb の製品品質の自動管理のための汎用性の高いツールであり、製造や精製プロセス中に CQA の分析が可能となります。¹ mAb CQA の分析に対し、オンライン分析に二次元ハートカット LC 分析を適用しました。一次元目でプロテイン A アフィニティクロマトグラフィー、二次元目で品質特性測定のためのメソッドを組み合わせることにより、分断されたワークフローと比較して、効率を向上させることができます。特にアップストリームやダウンストリームの製品品質評価に Process Analytical Technology (PAT) を採用している場合は、この統合型の自動化ワークフローにより、分析時間とコストを大幅に削減することができます。²

一次元目のプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーで、抗体価の測定と、その後の分析のために精製を行います。プロテイン A カラムからの流出物をループに収集し、サイズ排除またはイオン交換カラムなどの二次元目カラムに移送し mAb を分離します。この構成によ

り、1 つのメソッドで、抗体価と凝集体、または抗体価と電荷変異体を一度に測定することが可能です。二次元目 LC にカラムスイッチングバルブを使用することで、一次元目のプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーに異なる分離メカニズムのカラムを組み合わせることができ、さまざまな CQA 分析に活用することができます。この手法は、既に、二次元目で 3 本の異なるカラムを使用して 3 つの CQA 解析を行う方法として紹介されています。³

このアプリケーションノートでは、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアを用いて、二次元ハートカット機能を搭載した Agilent オンライン LC による mAb の 2 つの CQA 解析を行ったオンラインプロセス管理について説明します。この構成により、mAb 製造でのアップストリームおよびダウンストリームにおけるオンラインプロセスモニタリングを完全自動化でき、経済的な CQA を短時間で行うことができます。また、プロセスにおける intact multi attribute method (MAM) の自動化も可能となります。

実験方法

機器

- 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 (G3167A)、外部バルブ (5067-6680) とクラスタ化した Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)
- 1260 Infinity II オンライン サンプルマネージャ (G7167-60005) 用 サーモスタット
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラム サーモスタット (MCT、G7116B)、Agilent InfinityLab クイックチェンジ 4 ポジション/10 ポートバルブ、80 MPa (G4237A) 装備

- 一次元目ダイオードアレイ検出器 (DAD): Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)、Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル、3.7 mm (G4212-60032) 装備
- 二次元目ダイオードアレイ検出器: Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)、Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル、10 mm (G4212-60008) 装備
- Agilent InfinityLab 2D-LC バルブ (G4236A) 搭載 Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS、バージョン 2.6
- OpenLab CDS 用 Agilent 2D-LC ソフトウェア、バージョン 1.0
- 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

カラム

- Bio-Monolith Protein A カラム、5.2 × 5 mm (部品番号 5069-3639)
- Agilent AdvanceBio SEC 300Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm (部品番号 PL1180-5301)
- Bio MAb NP5、2.1 × 250 mm、5 μm、PEEK (部品番号 5190-2411)

Agilent InfinityLab 2D-LC ProtA-SEC キット⁴

InfinityLab 2D-LC ProtA-SEC キット (G4245A) には、両次元用の LC カラム (プロテイン A および SEC)、最適化されたサンプルループ、メソッド保存されているメモリスティック、ドキュメント、このワークフローの実習方法およびテスト用の NISTmAb 標準液が含まれています。

機器の設定

2D-LC バルブに 1 本の 180 μL ループ (5004-0036) を搭載したハートカット分析用の標準構成の 2D-LC 機器を使用しました。Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアによるオンライン LC 分析用 2D-LC 機器を使用するために、Agilent 1260 Infinity II オンライン サンプルマネージャを採用しました。

二次元目で 2 本の異なるカラムを使用するために、MCT に 4 カラム選択バルブを装備しました。オンライン LC サンプルマネージャをサンプル供給ポンプに接続しました。バイオリアクタが接続されている場合、サンプル供給装置において、リアクタ溶液がオンラインサンプルマネージャに送られる前に、無菌状態でサンプルを吸引し、細胞を除去する必要があります。

メソッド

- 一次元目のプロテイン A クロマトグラフィーと二次元目のサイズ排除クロマトグラフィーとを組み合わせたメソッドの詳細は、Agilent InfinityLab 2D-LC ProtA-SEC キットに含まれています。⁴
- 一次元目のプロテイン A クロマトグラフィーと二次元目のイオン交換クロマトグラフィーとを組み合わせたメソッドは、以前に発行されたアプリケーションノートに詳細が記載されています。¹
- 分析開始条件でシステムとカラムを洗浄するために、各 2D-LC 分析の前にブラン克蘭を実行しました。

サンプリング

サンプルは、オンライン LC モニタリングソフトウェアにより制御された、リアクティンタフェースバルブに接続されたリツキシマブ溶液 (7 g/L) から、直接注入モードによって吸引しました。注入量 10 µL を、100 µL/min の吸引スピードで吸引しました。

スケジューリング

プロテイン A/SEC およびプロテイン A/IEC の組み合わせによる分析の前に、適切なブラン克蘭を実行しました。3 時間間隔で、ブラン克蘭と 2D-LC 分析のセットを 12 回繰り返しました。分析完了には 1 日と 10 時間を要しました (表 1)。

サンプル

- リツキシマブ原液 (10 g/L)
- リツキシマブサンプル溶液、7 g/L、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液で希釈
- キャリブレーション : 0.2、1.0、2.0、10.0 g/L リツキシマブ、PBS 溶液で希釈

溶媒と試薬

- 二塩基性および一塩基性リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、酢酸を使用
- 下記に従い PBS を調製しました。200 mL の脱イオン水に 1 錠を溶解し、25 °C で 0.01 M リン酸緩衝液、0.0027 M 塩化カリウム、0.137 M 塩化ナトリウムを用いて pH 7.4 に調整
- すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入。
- 試薬はドイツの VWR 社から購入。
- 超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak 社) を備えた Milli-Q Integral 純水装置で精製。

結果と考察

オンライン 2D-LC ハートカットを用いた mAb の CQA 評価のために、2 つのメソッド開発を行いました。両方のメソッドで、プロテイン A カラムを使用し、一次元目では mAb の濃縮と、抗体価の測定を行いました。Binding Buffer により mAb はプロテイン A カラムに保持されます。すべての不純物をフラッシュアウトした後に mAb を完全に溶出させ、DAD で検出します。流出物は 180 µL ループで収集し、その後、二次元目の分離へ移送します。MCT のカラム選択バルブによって、SEC と IEC クロマトグラフィーの切換えを行いました。各分析のサンプリングとスケジューリングは、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアにより実行されます。取得データを分析中にリアルタイムでモニタリングすることができます。アップストリームのバイオリアクタでの反応を再現するために、mAb リツキシマブの純粋溶液を入れたフラスコを、リアクティンタフェースバルブに直接接続しました。サンプルは直接注入モードで吸引しました。直接モード以外に、希釈または無希釈サンプリングも可能です。実際は、無菌状態でのサンプルの吸引、ろ過、移送が可能な専用のサンプリング装置によってバイオリアクタをオンライン LC に接続する必要があります。

表 1. Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアでのブラン克蘭および分析のスケジューリング (Direct Injection Setting 01 : プロテイン A/SEC、Direct Injection Setting 02 : プロテイン A/IEC)

Type	Setting	Start time	Interval	Count	Start last action
Blank Sample	BlankSampleSetting 01	00 d 00 h 00 m	00 d 03 h 00 m	12	01 d 09 h 00 m
Direct injection	DirectInjectionSetting 01	00 d 00 h 20 m	00 d 03 h 00 m	12	01 d 09 h 20 m
Blank Sample	BlankSampleSetting 02	00 d 00 h 40 m	00 d 03 h 00 m	12	01 d 09 h 40 m
Direct injection	DirectInjectionSetting 02	00 d 01 h 15 m	00 d 03 h 00 m	12	01 d 10 h 15 m

一次元目のフラスコのリツキシマブ溶液の抗体価を測定するために、プロテイン A カラムを 0.2 ~ 10.0 g/L の範囲でキャリブレーションを行いました。キャリブレーションは、一次元目のメソッドと、一次元目の DAD で取得したデータによって実施しました。接続されたリツキシマブのテスト溶液の濃度は 7 g/L でした。プロテイン A カラムで精製された mAb リツキシマブは 0.821 分で溶出したため、0.75 分から 0.95 分間の 1 回のタイムベースハートカットを行い二次元目に移送しました (図 1)。

一次元目の分析の測定濃度をモニタリングするために、両方の各メソッドに対し、オンライン LC モニタリングソフトウェアのトレンドプロットを用いて、結果をモニタリングしました (図 2)。測定された mAb 抗体価から、抗体濃度は二次元目に SEC 分離を使用したメソッドでは 7.13 g/L (1.15% RSD)、二次元目に IEC を使用したメソッドでは 7.17 g/L (0.94% RSD) という結果が得られました。

SEC 分離と IEC 分離結果が統合された結果テーブルで、一次元目のプロテイン A 精製物に対して、どちらの分離モードで取得された値かを選択して表示できます (表 2)。この表では、一次元目のプロテイン A カラムを二次元目では SEC カラムに接続して分析した奇数のサンプル番号が示されています。表から確認できるように、精製された mAb は純度が高く、約 96 面積 % でした。

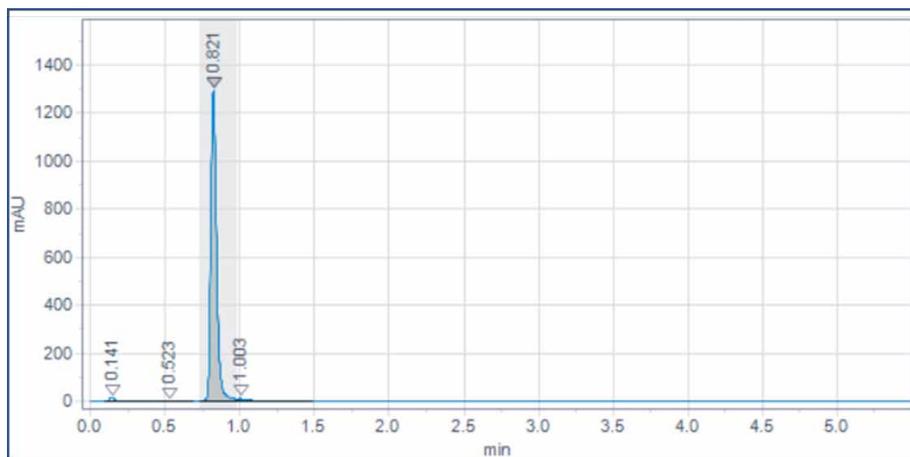


図 1. プロテイン A カラムによる mAb のクロマトグラム。0.821 分に溶出。0.75 分から 0.95 分間でタイムベースハートカットを実行し、二次元目へ移送しました。

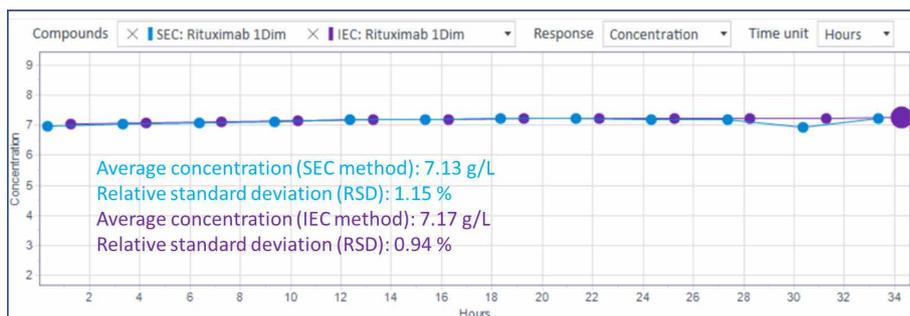


図 2. 両方の適用メソッドセットに紐づけられたプロテイン A カラムによる抗体価を Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアでトレンドプロットしました。SEC: リツキシマブ 1Dim: 一次元目のプロテイン A 分離の後に二次元目で SEC を実行 (青)。IEC: リツキシマブ 1Dim: 一次元目のプロテイン A 分離の後に二次元目で IEC を実行 (紫)

表 2. 一次元目のプロテイン A 精製で取得した値の選択表示

Sample	Compound	RT (min)	Area%	Area	Height	Concentration
	SEC: Rituximab 1Dim					
Sample-1	SEC: Rituximab 1Dim	0.821	96.433	3540.456	1292.056	6.967 g/L
Sample-3	SEC: Rituximab 1Dim	0.830	96.248	3577.720	1309.917	7.041 g/L
Sample-5	SEC: Rituximab 1Dim	0.825	96.459	3599.814	1312.146	7.084 g/L
Sample-7	SEC: Rituximab 1Dim	0.829	96.420	3623.753	1322.340	7.131 g/L
Sample-9	SEC: Rituximab 1Dim	0.827	96.534	3650.420	1326.742	7.183 g/L
Sample-11	SEC: Rituximab 1Dim	0.821	96.760	3650.717	1331.793	7.184 g/L

二次元目のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、早期に溶出する高分子量 (HMW) の mAb 凝集体の含有量、モノマー mAb、および遅く溶出する低分子量のバッファ関連の化合物を測定します (図 3)。二次元目の SEC 分離の詳細結果も、結果表 (表 3) で確認することができます。この表では、サンプル 1 に対し取得された結果を示しています。主要化合物は 7.930 分で溶出しており、含有量は 97.714 面積 % です。高分子量の凝集体は 7.063 分で溶出しており、含有量は 0.160 面積 % で、低分子量のバッファ関連の化合物は 11.011 分で溶出しており、含有量は 2.127 面積 % です。

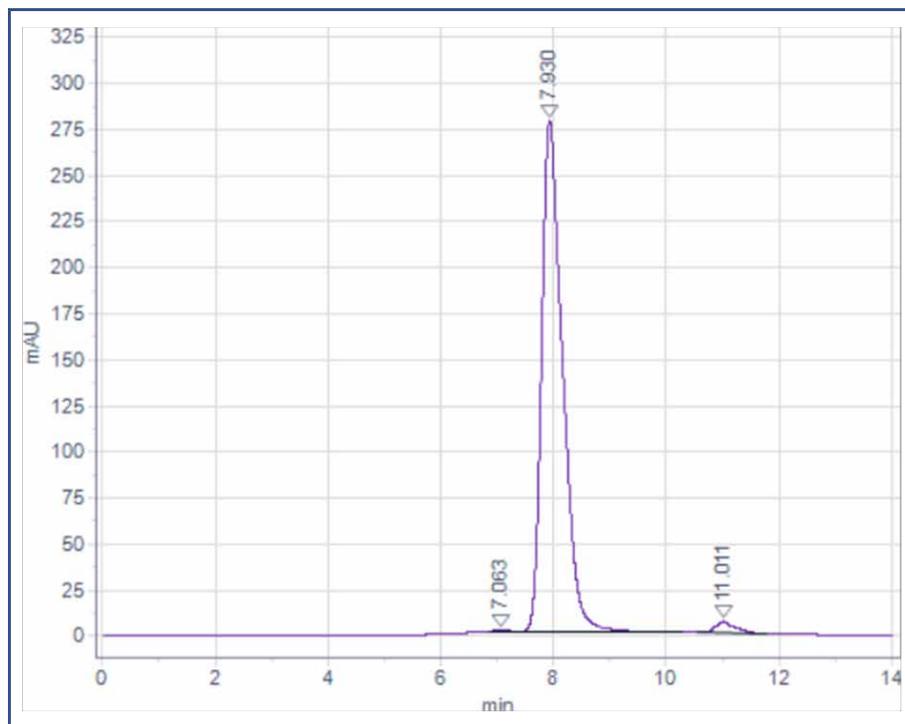


図 3. 一次元目でプロテイン A カラムで精製した mAb を二次元目で SEC 分析

表 3. プロテイン A 溶出のハートカットを二次元目で SEC 分離し、二次元目 DAD で検出した結果

Sample	Signal	RT (min)	Area%	Area	Height
	DAD2A Cut 1				
Sample-1	DAD2A Cut 1	7.063	0.160	11.674	0.541
	DAD2A Cut 1	7.930	97.714	7146.342	277.839
	DAD2A Cut 1	11.011	2.127	155.548	6.247

偶数のサンプル番号に対しては、一次元目にプロテイン A 精製後に MCT 内のカラム選択バルブにより、二次元目のイオン交換クロマトグラフィーに接続を切り替えて分離を行いました。イオン交換カラム分離では、mAb は 24.889 分に溶出し、mAb の電荷変異体としては酸性変異体が早期に溶出し、塩基性変異体が後に溶出しています (図 4)。メインピークの面積パーセント率は 83.945 です。残りの面積パーセント率は、早期および後に溶出する変異体に割り当てられます (表 4)。

二次元目の SEC と IEC 概要は、SEC からの mAb モノマーと、IEC からの主要な電荷変異体に対して取得された面積率のトレンドプロットによって表すことができます (図 5)。これらの結果表示により、分析したすべての CQA に対して取得された製品品質を、一目で把握することができます。分析された mAb のモノマー純度は約 98 %、電荷変異体の純度は約 84 % です。

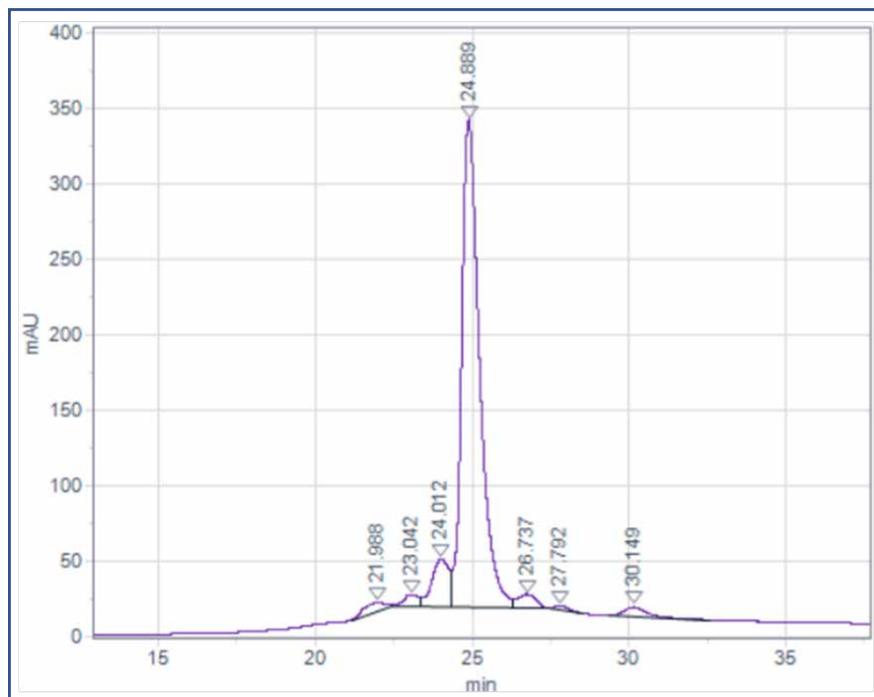


図 4. 一次元目のプロテイン A カラムで精製された mAb の二次元目 IEC 分析

表 4. プロテイン A 溶出のハートカットを二次元目で IEC 分離し、二次元目 DAD で検出した結果

Sample	Signal	RT (min)	Area%	Area	Height
	DAD2A Cut 1				
Sample-2	DAD2A Cut 1	21.988	1.659	253.556	5.269
	DAD2A Cut 1	23.042	1.564	239.065	7.400
	DAD2A Cut 1	24.012	7.682	1174.180	31.442
	DAD2A Cut 1	24.889	83.945	12830.116	322.719
	DAD2A Cut 1	26.737	2.523	385.579	9.093
	DAD2A Cut 1	27.792	0.620	94.708	3.075
	DAD2A Cut 1	30.149	2.007	306.694	6.253

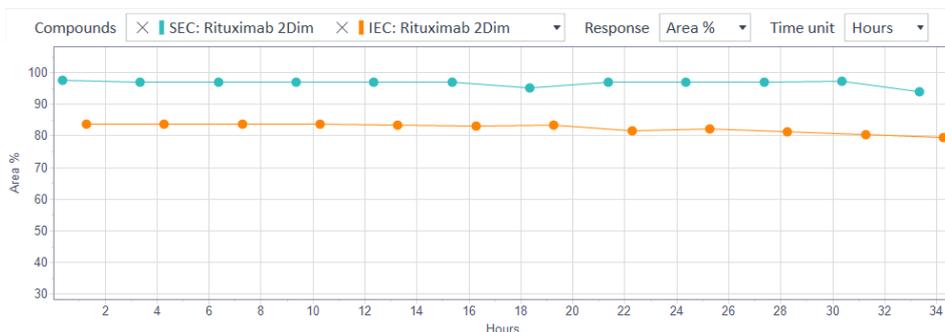


図 5. 二次元目の SEC (水色) で得られた mAb モノマーと、二次元目の IEC で得られた主要な電荷変異体の面積パーセント率を、全サンプルに対してプロットしたトレンドプロット

結論

このアプリケーションノートでは、mAb の製造や精製におけるオンラインプロセス管理を実現する Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションにより、自動ハートカット 2D-LC 分析を可能にする Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアについて説明しています。一次元目のプロテイン A 分離により mAb の抗体価を定量しました。二次元目では、カラムスイッチングバルブを用いて SEC と IEC カラムを切り替え、mAb の HMW 凝集体と電荷変異体の分布を分析しました。一次元目と二次元目のすべての結果は、ほぼリアルタイムで、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア上で一目で確認することが可能です。このシステム構成により、mAb 製造にかかる時間とコストを削減し、アップストリームまたはダウンストリームのバイオプロセスにおける CQA のインタクト MAM 分析を直接的に実施することが可能となります。

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おりません。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。

DE96890345

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, October 11, 2022

5994-5318JAJP

参考文献

1. Bonnington, L.; Naegele, E.; Kutscher, D. Online LC Monitoring of Downstream Processing in the Production of Therapeutic mAbs. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5186EN, **2022**.
2. Chemmalil, L.; Naegele, E.; Kutscher, D. An automated Sampling System for Online Monitoring as a Process Analytical Technology (PAT) Tool, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3716EN, **2021**.
3. Sandra, K.; et. al. Determination of Multiple Attributes of Monoclonal Antibodies, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3521EN, **2021**.
4. Agilent InfinityLab 2D-LC ProtA-SEC キットおよびサービス. *Agilent Technologies data sheet*, publication number 5994-3630JAJP, **2021**.