

QbD ソフトウェアを用いた HPLC メソッドの 迅速な開発とバリデーション

著者

Lisa Patterson and
Michael Watling
Agilent Technologies, Inc.
Carpinteria, CA, USA

George Cooney
S-Matrix
Eureka, CA, USA

概要

このホワイトペーパーは、Agilent OpenLab ChemStation ソフトウェアを用いたメソッド開発またはバリデーションを実施する液体クロマトグラフィー (LC) ユーザーを対象としています。ただし、S-Matrix 社とアジレントのソフトウェアを適切に使用し運用する責任は使用者とその所属組織にあることを前提とさせていただきます。このホワイトペーパーは一般的なガイドラインとして使用することが目的であり、S-Matrix 社の Fusion QbD ソフトウェア (バージョン 9.7.1) と Agilent LC ソフトウェアを組み合わせる際の代表的な例を示しています。

はじめに

FDA の要件に合わせてタンパク質の分析や抗体の品質管理を実施するために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) メソッドを開発してバリデーションすることが絶えず求められています。Quality by Design (QbD) 実験手法を体系的に用いることにより、メソッド開発と承認の効率が向上し、プロセスがより頑健性が高くなります。ただし、QbD の設定には時間がかかる場合があります。Fusion QbD は S-Matrix 社の高度なソフトウェアであり、Agilent OpenLab ChemStation ソフトウェアとシームレスに組み合わせることにより、QbD メソッドの実行と HPLC メソッドの分析を自動化します。QbD ソフトウェアは、実験計画法 (DoE) の設定を自動化して、メソッドパラメータ間の関係を定量化し、さらに USP 推奨のクロマトグラフィー情報に基づいて HPLC メソッドを最適化することにより、メソッドの開発および頑健性からバリデーションに至るまでの全プロセスを加速します。このホワイトペーパーでは、Fusion QbD ソフトウェアと OpenLab ChemStation ソフトウェアを組み合わせることで、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) HPLC メソッドの開発からバリデーションまでのすべてを行いました。SEC メソッドの分析目標プロファイル (ATP) は、重要品質特性 (CQA) に基づいて情報ごとの性能仕様を用いて作成しました。メソッドを最適化して定量に一貫性をもたせ、分解度、ピーク対称性、およびピークキャパシティを向上させました。QbD ソフトウェアを用いて OpenLab ChemStation ソフトウェア分析を補助することにより、従来の開発およびバリデーション手法と比較して 3 倍の高速化を達成しました。

メソッド開発の概要

サイズ分布間で抗体の純度を定量する SEC メソッドを開発しました。メソッド開発では、最も分離能が高く頑健で効率的な SEC メソッドを開発するために、クロマトグラフィー情報に基づいてメソッドパラメータを最適化しました。メソッドパラメータは、注入量、移動相の pH、移動相の濃度、流量、およびカラム温度です。クロマトグラフィー情報は、ピーク/谷比、ピーク対称性、ピーク数、および理論段数です。

メソッドパラメータを最終決定した後、各メソッドパラメータをわずかに変動させて頑健性をテストし、得られたクロマトグラフィー情報が頑健性の枠内に適切に収まっていることを確認しました。最後に、真度、中間再現精度、再現性、特異性、定量下限 (LLOQ)、直線性、範囲、および安定性を確認することにより、メソッドをバリデーションしました。

従来のメソッド開発戦略

SEC メソッドの初期の開発は、従来のメソッド開発戦略である一時一事法 (one factor at a time : OFAT) を用いて移動相の pH から始めました。pH 範囲テスト専用の 1 セットの分析を実施した結果、pH 範囲を 6.8 ~ 7.2 にするとピーク分離と対称性が向上することがわかりました。そこで、移動相の pH のメソッドパラメータを 7.0 に設定しました。1 つのパラメータを決定するだけでも、1 装置を占有して分析を実施しなくてはならず、時間のかかる作業でもあり、他のパラメータに対する交互作用までには対応できませんでした。OFAT メソッドで pH を決定してから、より適切な開発戦略の策定に取り組み、メソッド開発の残りの部分については QbD 戦略を使用しました。

QbD メソッド開発戦略

QbD メソッド開発は、QbD 環境内での流量、塩濃度、およびカラム温度を調査することから始めました。

パラメータを互いに関連付けてより適切に最適化するために DoE を実施し、各パラメータの両端点と中心点の組み合わせについてテストしました。DoE は、アジレントのパートナーである S-Matrix 社の QbD ソフトウェアにより自動的に設計し、単一セットの分析から最大限の情報を得るための計画行列を自動的に算出して作成しました。DoE のタイプは A- および G-最適プロセスであり、実行数 32 の立方モデルタイプ、中心点での 2 回反復、非中心点での 2 回反復、および不適合自由度 6 点を適用しました。計画行列は、実行準備が完了したシーケンスおよびメソッドプログラムとして、OpenLab ChemStation にエクスポートしました。

OpenLab ChemStation ソフトウェアを用いてシーケンスを実行し、クロマトグラムを積分しました。積分されたクロマトグラムは、高分子量種 (HMWS) またはメインピークとしてラベル付けしました。

分析後のデータを OpenLab ChemStation ソフトウェアからエクスポートして、QbD ソフトウェアにインポートし、最終的な分析を実施しました。再現性のある正確な定量に必要なピーク純度を達成するための ATP 分離目標の裏付けとなるため、これらの情報をモニタリングすることが重要になりました。USP <621> の推奨事項に従い、クロマトグラフィー情報 (図 2) を用いて分解度と効率を最適化しました。ここで使用したクロマトグラフィー情報は、ピーク/谷比、ピーク対称性、ピーク数、および理論段数です。

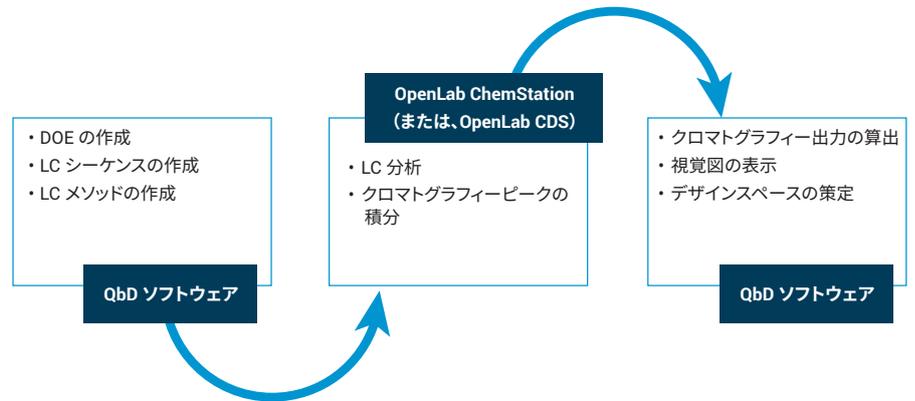


図 1. メソッドの設定、開発、および分析において、QbD ソフトウェアが使用されるステップ、およびアジレントのソフトウェアが使用されるタイミングを示すフローチャート

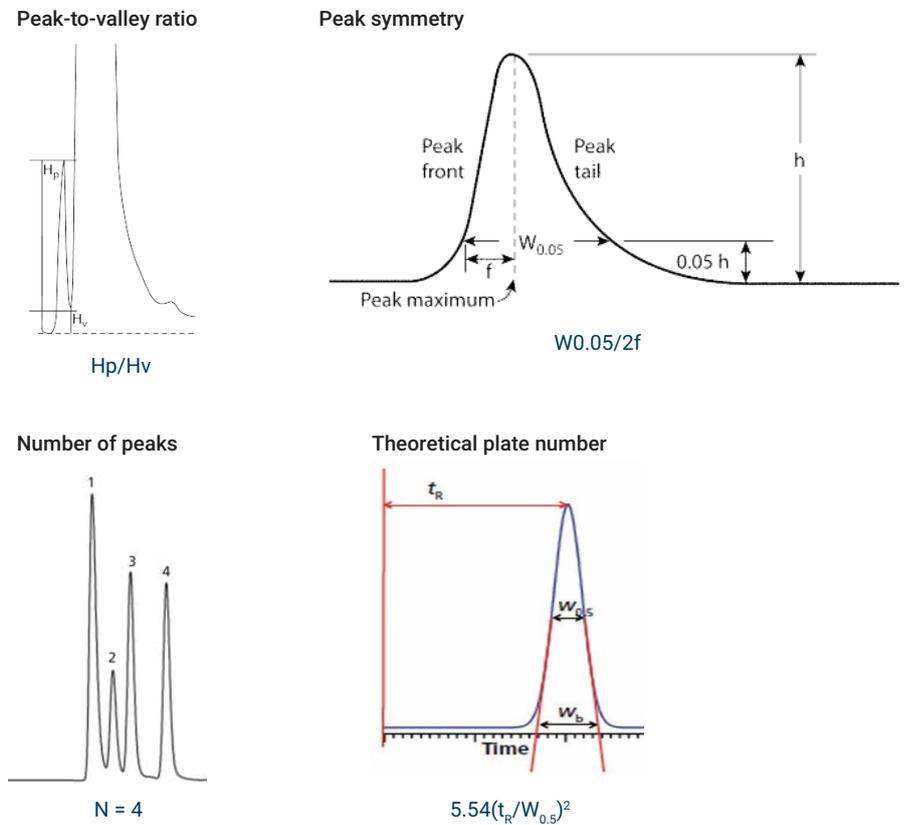


図 2. SEC メソッドの最適化に使用したクロマトグラフィー情報

QbD による結果

パレート図と効果プロットは QbD ソフトウェアで生成される多数の視覚化ツールのうちの 2 つであり、メソッド開発を進めるうえで非常に有用です。

パレート図には、クロマトグラフィーに最も大きな影響を与えているメソッドパラメータが表示されています。今回のメソッド開発で使用したパレート図の例を図 3 に示します。この図から、HPLC SEC メソッドのピーク対称性に最も大きな影響を与えたのは温度で、その次が濃度であることがわかります。さらに、パレート図から、温度と濃度の直線的、曲線的、および 2 要因の交互作用が、ピーク対称性結果の全変動の約 85 % を占めていることもわかります。QbD ソフトウェアを用いてあらゆるクロマトグラフィー情報に対してパレート図を表示することにより、分解度および効率に対してメソッドパラメータが与える影響を即座に視覚化できます。そして、メソッドに最も影響を与えているパラメータに重点を置いて、開発を続けることができます。今回の場合、将来の開発でピーク対称性を向上させるには、温度と緩衝液濃度に注目すればよいことがわかりました。

効果プロットは、さまざまな濃度でのメソッドパラメータの交互作用を視覚的に表示しています (図 4)。線の傾きが急になるほど、パラメータがクロマトグラフィー情報に与える影響が大きくなります。線が傾いておらず水平の場合、そのパラメータによる影響はありません。例えば、図 4 の左上の図によると、水平の赤色の線が示しているように、オープン温度は 200 mM 緩衝液を用いた場合のピーク数には影響を与えていませんでした。一方、100 mM 緩衝液の場合、傾きが右上がりになり

昇している青色の線が示しているように、カラム温度が上がるにつれて、ピーク数に影響を与えていました。QbD ソフトウェアではこのような効果プロットが自動的に表示されるため、一目見ただけでメソッドへの理解が大幅に深まります。

メソッド開発の最終ステップで、デザインスペースを作成しました。デザインスペースとは、メソッドにおいて許容できるクロマトグラフィーピーク分離度と効率が達成される特定の範囲のことです。クロマトグラフィー情報の

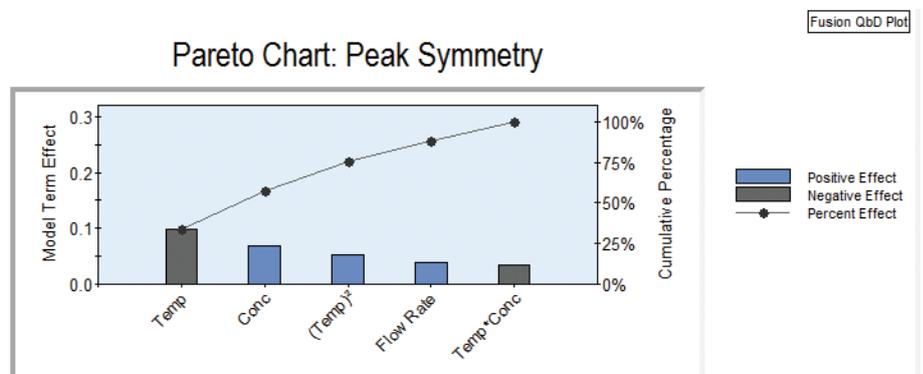


図 3. SEC 研究のパレート図。ピーク対称性に対するいくつかのメソッドパラメータの相対的な影響を図示

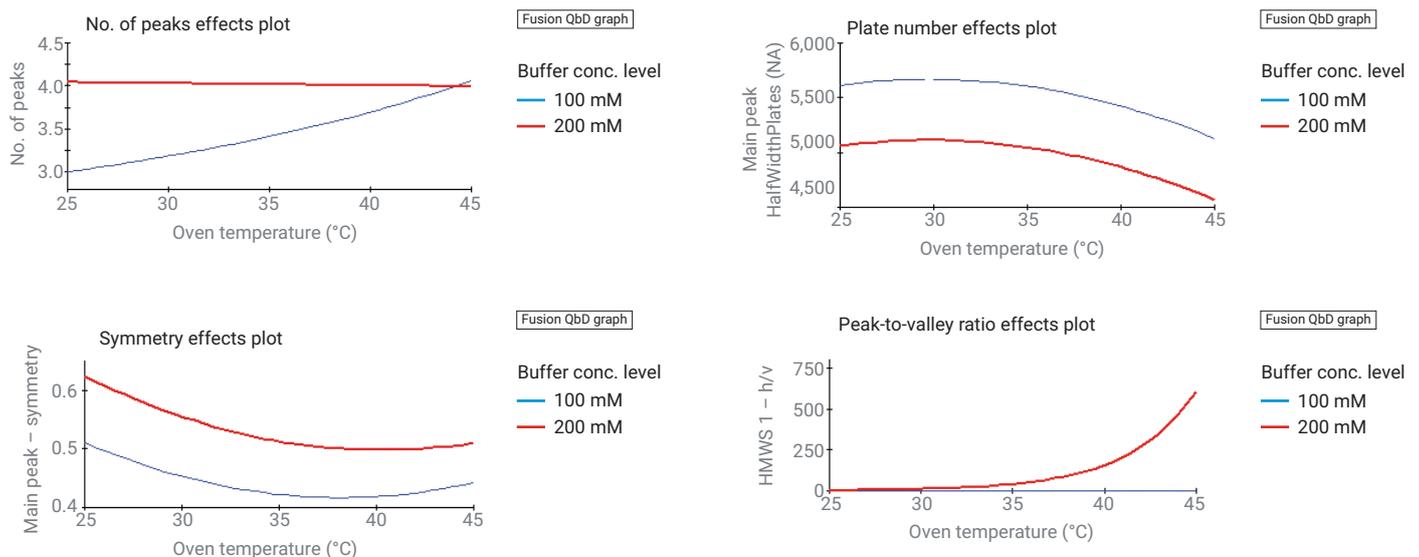


図 4. クロマトグラフィー情報を組み合わせた効果を理解するために使用した SEC 研究の効果プロット

品質を保証するために、各パラメータに対して制限値を設定しました。メソッドの頑健性を保証するためには、デザインスペース領域の中心点でメソッドを設定するのが理想的です。ただし、開発結果とは別にメソッドを変更できる、メーカーの推奨事項、圧力の制限、消費期限など、いくつかの制限事項が存在する場合があります。

図 5 は、デザインスペースを策定するために QbD ソフトウェアが SEC 開発の結果を用いて生成した図です。図の白色の領域はデザインスペースです。影の付いた領域は、クロマトグ

ラフィー情報によって測定された分離度と効率に基づいて評価した場合に、SEC クロマトグラムの品質が許容できるものではないことを示しています。

影の付いた緑色の領域は、ピーク高/谷比に基づいて評価した場合に、ピーク間の分離度が不十分であったことを示しています。青色の領域は、理論段数に基づいて評価した場合に、カラム効率が低かったことを示しています。オレンジ色の領域は、ピーク数が目標範囲を外れていたことを示しています。ピンク色の領域は、ピーク対称性に基づいて評価した場合

に、ピーク形状が不十分であったことを示しています。灰色の領域は、メインピークの幅に基づいて評価した場合に、分離度が不十分であったことを示しています。白色の領域はデザインスペースです。図 5 の黒色の四角の枠は、メソッドのいかなる性能要件も損なわずにパラメータを個別に変更可能なデザインスペースを視覚化して、実証済みの許容範囲 (PAR) 内に配置したものです。次に、この PAR を使用して、メソッドの頑健性を判別できます。

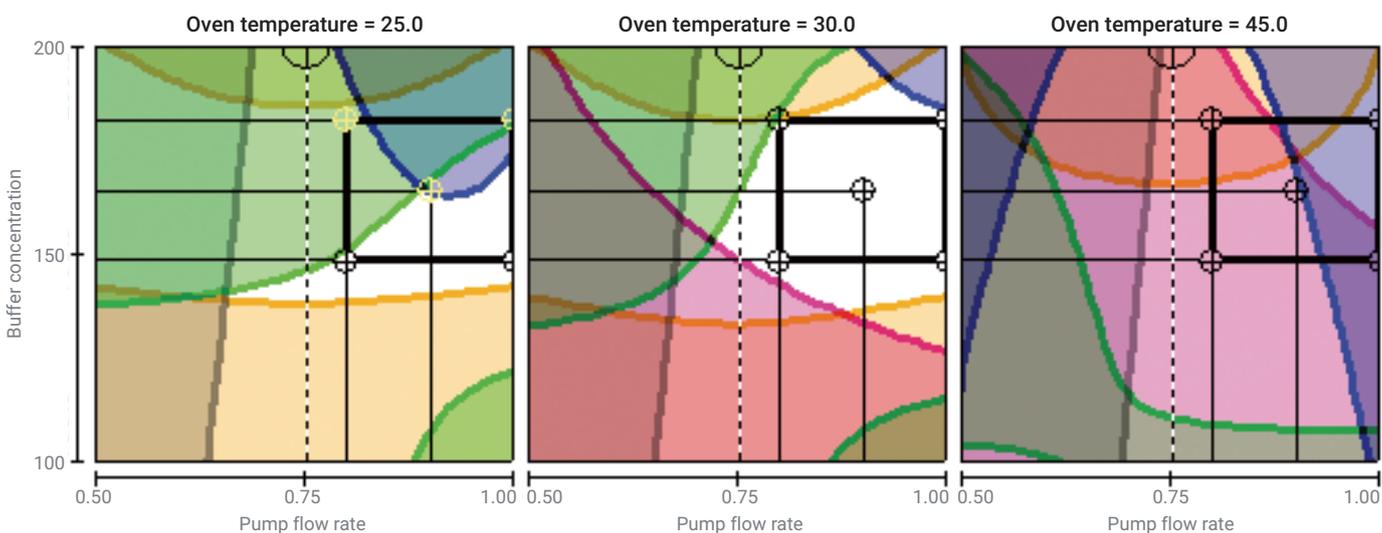


図 5. カラム温度 25 °C (左)、30 °C (中央)、45 °C (右) でのさまざまな緩衝液濃度と流量におけるデザインスペースを視覚的に示した 3 つの図

メソッド開発の最終条件

分離度、カラム効率、ピーク形状、および定量の一貫性を基にして決定した、流量、塩濃度、カラム温度の SEC メソッドの最終条件はそれぞれ 1.0 mL/min、165 mM リン酸ナトリウム、30 °C でした。最適化後の最終的な SEC クロマトグラムを図 6 に示します。拡大した表示では、HMWS はタンパク質のピーク面積のそれぞれ 0.5 % であり、適切に分離され、簡単に積分されています。パラメータはすでに、メソッド開発を基にした実証済みの許容範囲内に収まっていることがわかっていたため、頑健性テストの次のステップは、確実に評価できました。

結果

頑健性テストでは、メソッド開発の PAR を制限値として使用しました。各情報に割り当てられた合格基準は、CQA を維持するメソッド開発に基づいて設定しています。今回の SEC メソッドでは、CQA は HMWS のパーセントピーク面積であり、それに応じて各情報の許容範囲を割り当てました。報告された CQA に変動がほぼなかったことを示すうえで、頑健性の点で HMWS のパーセント相対標準偏差 (% RSD) を取り込むことが重要になりました。さらに重要なことは、合格基準はメソッドごとに固有のものであり、新規メソッドの場合、開発時に CQA を基にしてその固有のメソッドの合格基準を再評価する必要があるということです。

頑健性を即座に実証するためには、QbD ソフトウェアによりクロマトグラフィー情報を算出することが不可欠でした。HMWS はサンプルの 0.5 % を占めていましたが、このようなわずかな量においても、HMWS の % RSD は小さく、非常に頑健な SEC メソッドであることが立証されました (表 1)。さらに、ピーク/谷比は 1 を超えており、これは HMWS のショルダーピークが通常どおりに取り去られて、高い信頼性で定量されていることを示していました。

Fusion QbD を用いて SEC メソッドの真度、精度、特異性、および直線性をバリデーションしたところ、すべて許容基準に対して十分に合格していました。複数のオペレータが異なる日に新しく調製した緩衝液を用いましたが、SEC メソッドの定量は 0.1 % RSD 未満でした。以上の結果は、メソッド開発が十分なレベルで最適化されていたことを示しています。

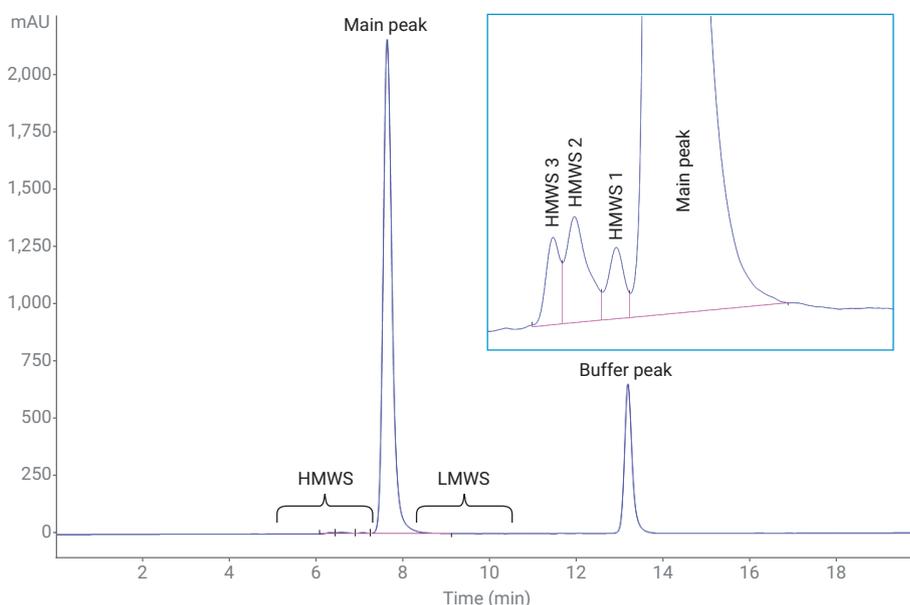


図 6. 公称条件を用いて最適化した後の最終的なメソッドの SEC クロマトグラム。6~9 分の間に溶出したタンパク質のピークおよび 13 分に溶出した緩衝液のピークとともに、クロマトグラム全体を表示。右上隅に、タンパク質のピークを拡大した図を表示

表 1. 頑健性テストで使用したパラメータ

頑健性パラメータ	テストした範囲	ピーク数 (= 4)	ピーク/谷比 (> 1)	ピーク面積の % RSD (< 15 %)	頑健性の判定結果
pH	7.0 ± 0.2	4	> 2	1.9 %	頑健
塩濃度	165 ± 17 mM	4	> 5	2.4 %	頑健
カラムのロット数	3 ロット	4	> 1	6.6 %	頑健
温度	30 ± 3 °C	4	> 2	2.8 %	頑健
流量	1.0 ± 0.1 mL/min	4	> 2	2.2 %	頑健

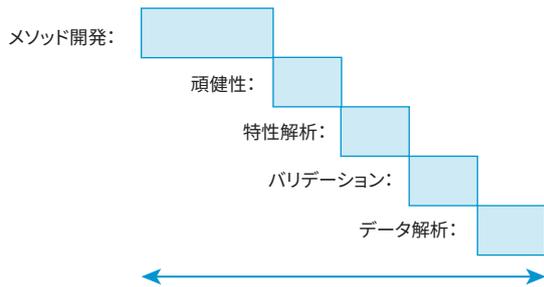
結論

Fusion QbD ソフトウェアは使いやすく、Agilent HPLC システム上で OpenLab ChemStation と簡単に組み合わせることができました。DoE メソッドおよびシーケンスを自動設定すると同時に、積分されたクロマトグラムを自動分析することにより、開発、頑健性、

特性解析、バリデーション、およびデータ解析が3倍以上高速化されました(図7)。さらに重要なのは、パラメータの多数の変動を比較して、開発をさまざまな組み合わせに対応させたことにより、結果的に、メソッドの頑健性が向上したことです。

OpenLab ChemStation ソフトウェアは、柔軟に利用できる積分パラメータと、自動積分オプションを備えているため、Fusion QbD とシームレスに組み合わせて HPLC メソッド開発を実施し、高品質かつ頑健なメソッドをごく短期間で開発できます。

自動化(Fusion QbD)



従来手法

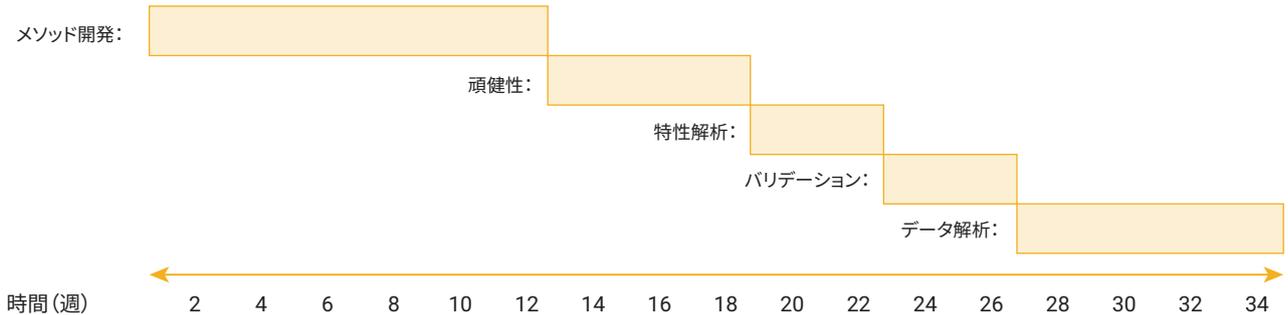


図7. 自動化 Fusion QbD ソフトウェアおよび従来手法を用いた HPLC メソッドの作成時間の比較

参考文献

1. Size Exclusion Chromatography for Biomolecule Analysis. *Agilent Technologies primer*, publication number 5991-3651EN, **2015**.
2. U.S Pharmacopeial Convention. U.S Pharmacopeia National Formulary - USP40-NF35 through first supplement, **2018**.
3. Politis, N. *et al.* Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Development. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, 43(6), 889-901. Epub 2017 Feb 23.
4. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Food and Drug Administration (FDA). Biopharmaceutics, **2018** May.
5. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. U.S. Department of Food and Drug Administration (FDA). Biopharmaceutics, **2015** July.
6. Guidance for Industry Q2(R1) Pharmaceutical Development. U.S. Department of Food and Drug Administration (FDA). ICH, **2005** November.
7. Guidance for Industry Q8(R2) Pharmaceutical Development. U.S. Department of Food and Drug Administration (FDA). ICH, **2009** August.
8. Guidance for Industry Q9 Pharmaceutical Development. U.S. Department of Food and Drug Administration (FDA). ICH, **2005** November.
9. Guidance for Industry Q9 Pharmaceutical Development. U.S. Department of Food and Drug Administration (FDA). ICH, **2008** June.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, April 6, 2020
5994-1880JAJP
DE.6119328704