

モノクローナル抗体分解の オンラインモニタリング

1290 Infinity III LCで
同等の結果を得られます

Agilent 1290 Infinity II Bio オンライン LC システムによる
プロセス分析



著者

Adem Cakar and
Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、バイオリアクタで製造中モノクローナル抗体 (mAb) の分解をモニタリングについて説明します。プロセス中に、Agilent 1290 Infinity II Bio 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を使用しました。

mAb の分解は、製品の品質、安全性、効能に悪影響を与える可能性があるため、発生時に認識して制御する必要があります。この実験では 3 日間にわたり、電荷変異体の分析を用いて、強制的な脱アミド化を分析し、その結果おこる分解をモニタリングします。

概要

mAb の特性は、特定の化学的分解プロセス（酸化、脱アミド化、異性化、フラグメンテーションなど）で変わる可能性があり、これが電荷の変異体、不均一性、および結果的に等電点に影響します。¹ これは製品の品質、安全性、効能に悪影響を与える可能性があるため、発生時に検出する必要があります。² このため、相応の高速かつ自動的な品質チェックが不可欠です。

脱アミド化などの修飾により、mAb の負電荷が増加して等電 pH (pI) 値が低下することで、酸性変異体が発生することがあります。¹ また酸化などの修飾により、mAb の正電荷が増加して pI 値が上昇することで、塩基性変異体が発生することもあります。¹ このような修飾は、過酷な条件によって誘起される場合があります。例えば pH 値や温度の上昇による脱アミド化の発生や、過酸化水素の添加による酸化修飾の発生などです。¹ このメソッドは強制分解とも呼ばれており、メソッドの開発、適格性評価と移行、重要品質特性 (CQA) の評価、製品のばらつきの特定などによく使用されます。²

このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio オンライン LC を用いた、製造プロセス中の mAb の製品品質のモニタリングについて説明します。このため、pH 値と温度を上げて、バイオリアクタの代わりとなるバイアル内で強制的な脱アミド化を実行しました。この分解を、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアで開発した電荷変異体分析メソッドで測定しました。

実験手法

機器

1290 Infinity II Bio オンライン LC は、次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプ (G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio オンラインサンプルマネージャ (G3167B)、Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A) でクラスタリング、リアクタバルブポッド (部品番号 5067-6680) とオンライン LC モニタリングソフトウェアを搭載
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Agilent クイックコネク標準フロー Bio 熱交換器 (G7116-60071) 付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) (G7114B)、バイオマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID 搭載

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS バージョン 2.6 以降
- Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアバージョン 1.2 以降のバージョン
- Agilent Buffer Advisor バージョン 1.01.01 以降

カラム

Agilent Bio MAb、NP5、2.1 \times 250 mm、5 μ m、PEEK (部品番号 5190-2411)

化学物質

アンモニア溶液と塩化ナトリウムは、Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。リン酸二水素ナトリウムと二塩基性リン酸ナトリウムは、Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。

サンプル

MabThera (リツキシマブ) は Roche (ペンツベルク、ドイツ) から購入しました。

サンプル前処理法

リツキシマブの最終濃度を 5 mg/L、pH 値 9 ~ 10 にするために、100 μ L のリツキシマブ (10 mg/L) を 100 μ L のアンモニア溶液 (600 μ M) で希釈しました。サンプルを 37 $^{\circ}$ C まで加熱し、実験中はこの温度を維持しました。脱アミド化を誘起するには、高い pH と温度が必要でした。

メソッド

表 1. クロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値																																																												
カラム	Agilent Bio MAb、NP5、2.1 × 250 mm、5 μm、PEEK																																																												
溶媒	A) 水 B) 1.7 M NaCl C) 3.9 mM NaH ₂ PO ₄ D) 21.5 mM Na ₂ HPO ₄																																																												
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">時間 (分)</th> <th rowspan="2">緩衝液 (mM)</th> <th rowspan="2">NaCl (mM)</th> <th rowspan="2">pH</th> <th colspan="4">ソフトウェアで算出した移動相の組成</th> </tr> <tr> <th>A %</th> <th>B %</th> <th>C %</th> <th>D %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>7.65</td> <td>16.7</td> <td>0.6</td> <td>44.2</td> <td>38.5</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>10</td> <td>90</td> <td>7.65</td> <td>22.1</td> <td>5.3</td> <td>31.9</td> <td>40.7</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>10</td> <td>500</td> <td>7.65</td> <td>11.2</td> <td>29.4</td> <td>15.7</td> <td>43.7</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>10</td> <td>500</td> <td>7.65</td> <td>11.2</td> <td>29.4</td> <td>15.7</td> <td>43.7</td> </tr> <tr> <td>30.01</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>7.65</td> <td>16.7</td> <td>0.6</td> <td>44.2</td> <td>38.5</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>7.65</td> <td>16.7</td> <td>0.6</td> <td>44.2</td> <td>38.5</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	緩衝液 (mM)	NaCl (mM)	pH	ソフトウェアで算出した移動相の組成				A %	B %	C %	D %	0	10	10	7.65	16.7	0.6	44.2	38.5	20	10	90	7.65	22.1	5.3	31.9	40.7	20.01	10	500	7.65	11.2	29.4	15.7	43.7	30	10	500	7.65	11.2	29.4	15.7	43.7	30.01	10	10	7.65	16.7	0.6	44.2	38.5	40	10	10	7.65	16.7	0.6	44.2	38.5
	時間 (分)					緩衝液 (mM)	NaCl (mM)	pH	ソフトウェアで算出した移動相の組成																																																				
		A %	B %	C %	D %																																																								
	0	10	10	7.65	16.7	0.6	44.2	38.5																																																					
	20	10	90	7.65	22.1	5.3	31.9	40.7																																																					
	20.01	10	500	7.65	11.2	29.4	15.7	43.7																																																					
	30	10	500	7.65	11.2	29.4	15.7	43.7																																																					
	30.01	10	10	7.65	16.7	0.6	44.2	38.5																																																					
40	10	10	7.65	16.7	0.6	44.2	38.5																																																						
ストップタイム：40分 ポストタイム：0分																																																													
流量	0.200 mL/min																																																												
温度	30 °C																																																												
検出	VWD：280 nm、10 Hz																																																												
注入	注入量：4 μL サンプル温度：37 °C 洗浄：水で3秒間（フラッシュポート）																																																												

表 2. オンライン LC モニタリングソフトウェア分析条件

パラメータ	設定値																		
サンプリング	直接注入																		
サンプリング ソース	バイアル																		
サンプリング 速度	設定値 1 吸引スピード：130 μL/min																		
スケジュール	<table border="1"> <thead> <tr> <th>タイプ</th> <th>設定</th> <th>開始時間</th> <th>インターバル</th> <th>カウント</th> <th>最後の アクションの 開始</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ブランク サンプル</td> <td>ブランク 注入なし</td> <td>00日00時 00分</td> <td>00日00時 00分</td> <td>1</td> <td>00日00時 00分</td> </tr> <tr> <td>直接注入</td> <td>リツキシマブ</td> <td>00日01時 00分</td> <td>00日02時 00分</td> <td>36</td> <td>02日23時 00分</td> </tr> </tbody> </table>	タイプ	設定	開始時間	インターバル	カウント	最後の アクションの 開始	ブランク サンプル	ブランク 注入なし	00日00時 00分	00日00時 00分	1	00日00時 00分	直接注入	リツキシマブ	00日01時 00分	00日02時 00分	36	02日23時 00分
	タイプ	設定	開始時間	インターバル	カウント	最後の アクションの 開始													
	ブランク サンプル	ブランク 注入なし	00日00時 00分	00日00時 00分	1	00日00時 00分													
直接注入	リツキシマブ	00日01時 00分	00日02時 00分	36	02日23時 00分														

結果と考察

Bio オンライン LC で mAb の分解プロセスをモニタリングするには、脱アミド化を誘起することが必要でした。mAb をアンモニア溶液で処理して pH を上げ、温度を上げて脱アミド化修飾を強制することで、酸性変異体が増加し、メインピークが減少しました。この実験では、バイオリアクタの代わりにサンプルバイアルを使用しました。このため、mAb の電荷変異体を分離するメソッドが必要でした。このためにカチオン交換メソッドを使用しました。このメソッドには生体適合仕様の標準フロー熱交換器と Bio MAb、NP5、2.1 × 250 mm、5 μm、30 °C の PEEK カラムが含まれます。

1290 Infinity II Bio オンライン LC が脱アミド化プロセス全体をモニタリングする機能を証明するには、mAb の強制的な脱アミド化が必要でした。3 日間にわたり、2 時間おきにサンプルを注入して分析し、脱アミド化プロセスが長期にわたりトレース可能であることを確認しました。データ解析を簡素化して視覚化を容易にするため、複数の酸性ピークを 1 つの酸性変異体に結合し、塩基性ピークも同じ方法で処理しました（図 1 を参照）。

サンプルは最初に、高い酸性変異体濃度を示しました。これは治療用 mAb では一般的なことです。サンプルを開封して複数回再密封した後、冷蔵庫に 2 ~ 8 °C で長期保管するのはこのためです。

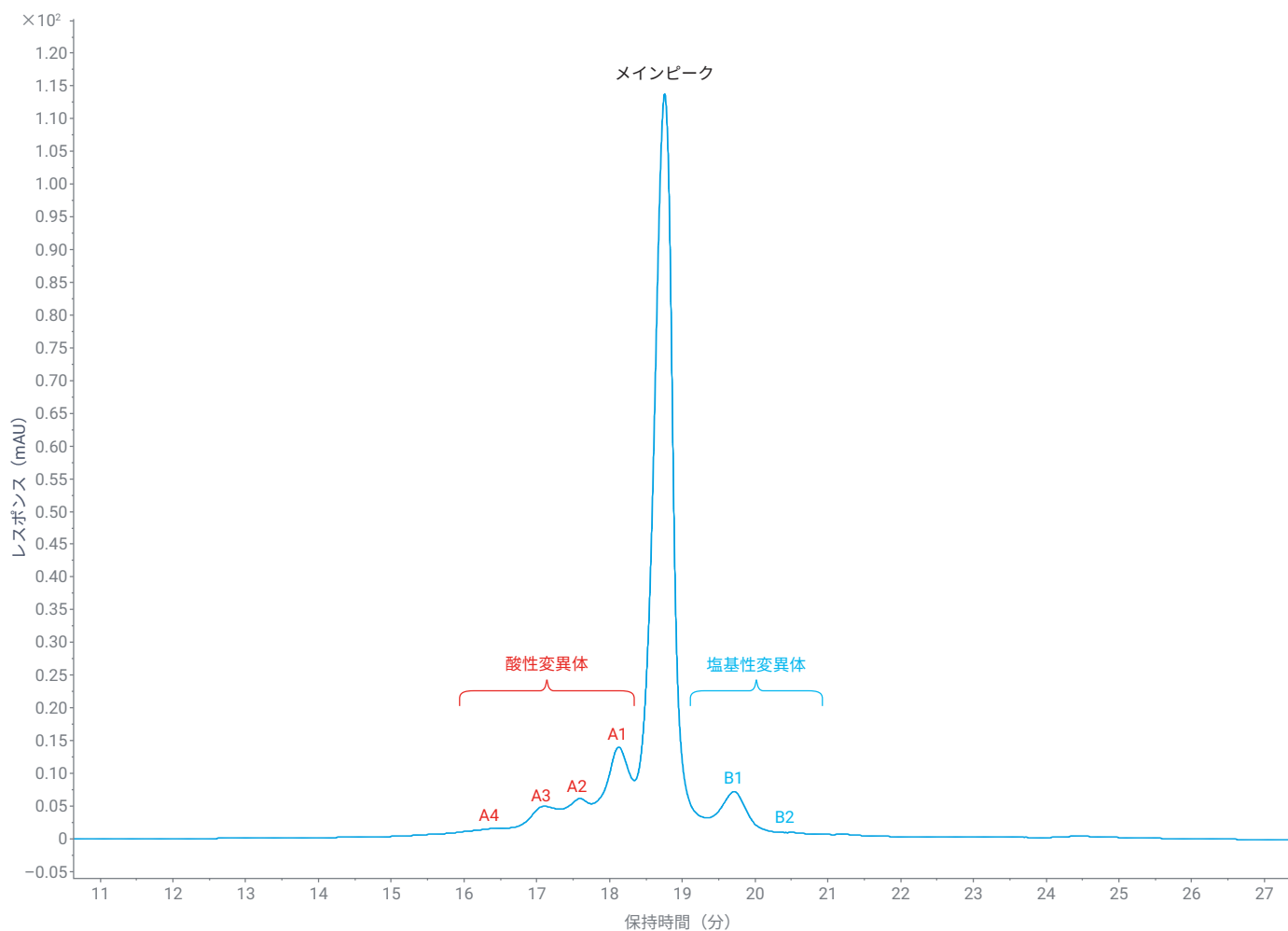


図 1. Agilent 1290 Infinity II Bio オンライン LC と Agilent Bio MAb、NP5、2.1 × 250 mm、5 μm、PEEK カラムで分離したリツキシマブのカチオン交換クロマトグラム。ピークは酸性変異体、メインピーク、塩基性変異体にまとめて、比較しやすいように視覚化しています。

実験の準備には、オンラインモニタリングソフトウェアを使用しました。このソフトウェアでは時間ベースのサンプル分析をスケジューリングできるため、反応（この場合は mAb の分解）をモニタリングできます。オンライン LC モニタリングソフトウェアは汎用性が高く、実験におけるサンプルの処理や定量をカスタマイズするためのさまざまなオプションがあります。オンライン LC モニタリングソフトウェアの特定の機能については、参考文献をご覧ください。³

図 2 に、サンプルにアンモニア溶液を添加した後の、さまざまなタイムポイントにおけるリツキシマブの電荷変異体分析の重ね表示を示します。メインピークは経時的に急速に減少し、塩基性変異体は微減しています。この結果、酸性変異体が急速に増加しています。概要を把握しやすくするため、図 2 では 4 つのデータポイントのみを示しています。

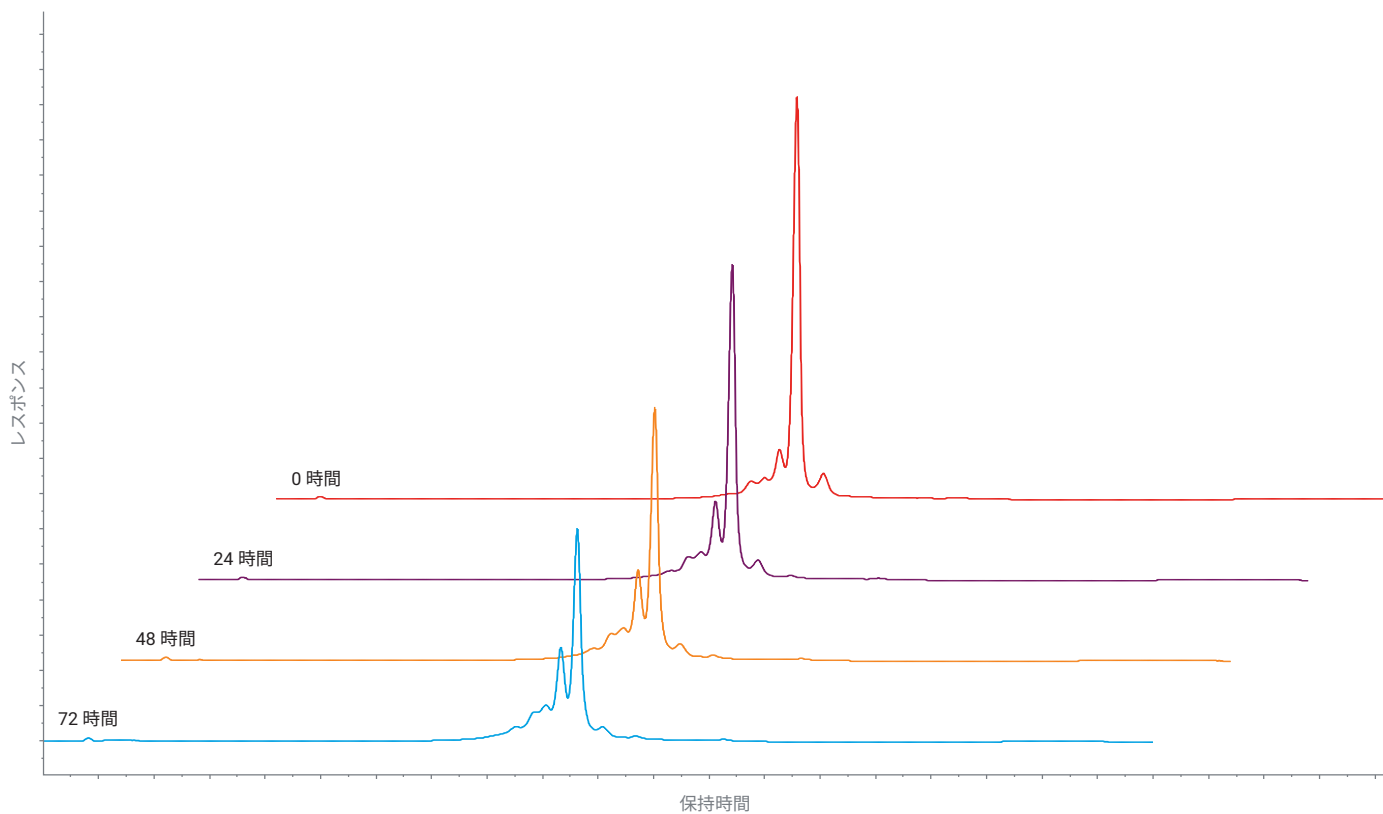


図 2. 高い pH および 37 °C での、さまざまなタイムポイントでのリツキシマブの電荷変異体分析の比較

オンライン LC モニタリングソフトウェアでは、データをリアルタイムに処理して表示することもできます。図 3 のトレンドプロットでは、メインピークの減少を緑色で示しています。酸性変異体の増加は青色、塩基性変異体の微減は紫色で示しています。

また、1290 Infinity II Bio オンライン LC では全般的に、3 日間の個々の酸性ピーク、塩基性ピーク、メインピークの保持時間の精度が非常に高く、すべての RSD 値が 0.2 % 未満です (表 3)。カラムの平衡化が不十分であったため、初回の注入は除外しました。

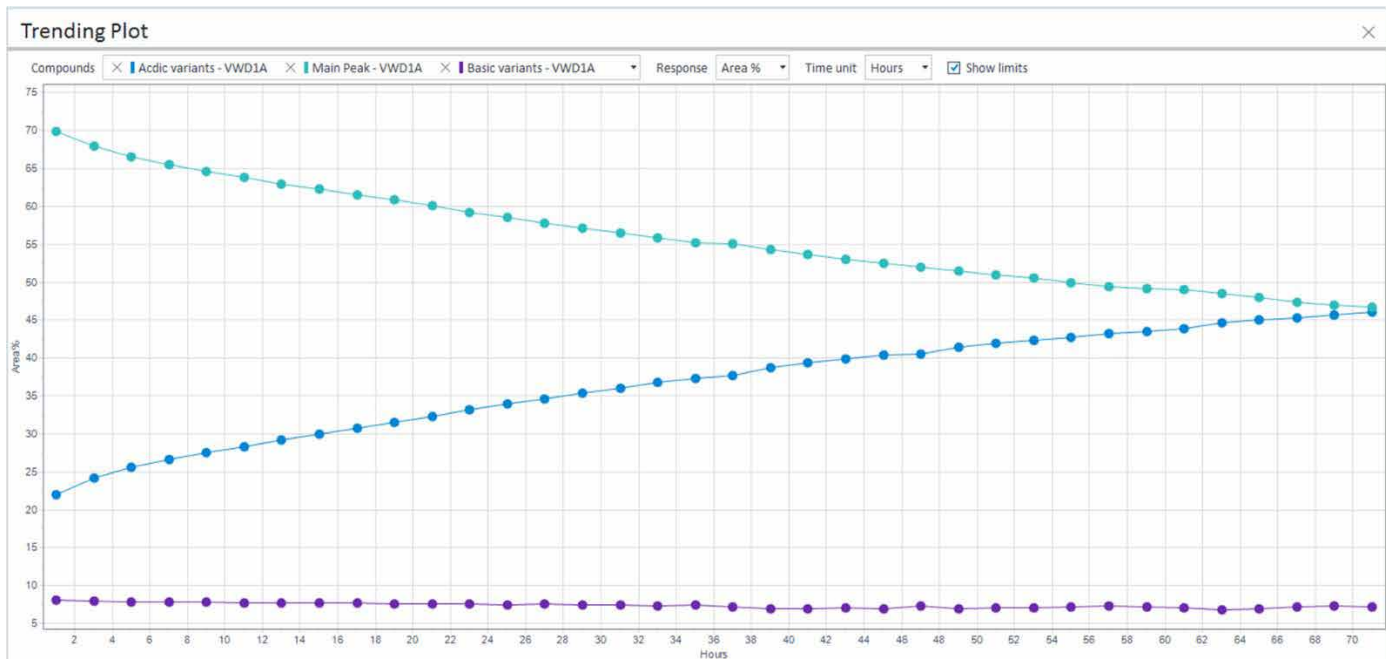


図 3. Agilent 1290 Infinity II Bio オンライン LC と Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアによるモノクローナル抗体の強制的な脱アミド化の視覚化。トレンドプロットは、メインピークの減少（緑色）、塩基性変異体の微減（紫色）、酸性変異体の増加（青色）を示しています。

表 3. 3 日間の酸性ピーク、塩基性ピーク、メインピークの保持時間（RT）の相対標準偏差（RSD）値（n = 35）

RT RSD (%)						
A4	A3	A2	A1	メインピーク	B1	B3
0.19	0.12	0.16	0.12	0.13	0.14	0.19

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II Bio オンライン LC と Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアを組み合わせ、3 日間にわたりバイオリアクタ内のモノクローナル抗体の品質をモニタリングできることを証明しました。実験中の酸性変異体の増加とメインピークの減少については、小さな差異しかなくてもトレース可能でした。また 3 日間の分析を通して、このシステムは保持時間の安定性と分離の効率性が高いこともわかりました。

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。

DE02414427

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, October 15, 2024

5994-7091JAJP

参考文献

1. Khawli, L.; *et al.* Charge Variants in IgG1. *MAbs* **2010**, *2*(6), 613–624.
2. Nowak, C.; *et al.* Forced Degradation of Recombinant Monoclonal Antibodies: A Practical Guide. *MAbs* **2017**, *9*(8), 1217–1230.
3. Naegele, E.; Kutscher, D. Agilent InfinityLab オンラインLC ソリューションによるオンライン反応モニタリング. *アジレント・テクノロジー*, 資料番号 5994-3528JAJP, **2021**.