

Waters™ カラムカリキュレーターを使用した自動分析法スケーリングによる、同等の IEX クロマトグラフィー性能の取得

Pawel Bigos, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

要約

アップストリームのワークフローが開発および改良されると、関連する分析法が最終的にダウンストリームに移管され、プロセス開発がサポートされ、有効医薬品成分に関連する製品およびプロセス特性がルーチンでモニターされます。バイオ医薬品の場合、モノクローナル抗体 (mAb) に関連するチャージバリエーションのモニタリングは、製品の安定性およびプロセスの一貫性を確立するために非常に重要です。この点で、分析法がダウンストリームに移管される際に、アッセイ結果の一貫性維持が確保されることにより、適格性評価およびバリデーションの作業に費やす時間を節約できます。このアプリケーションノートでは、モノクローナル抗体 (mAb) のイオン交換クロマトグラフィー (IEX) メソッドを、Waters カラムカリキュレーターを使用して、アップストリームおよびダウンストリームの LC 構成の代表的な ACQUITY™ Premier システム (UPLC™) から Arc™ Premier システム (UHPLC) までスケーリングしました。この試験の結果により、適切なスケーリングを行うことで、選択性およびピーク面積の割合でのクロマトグラフィー性能を維持しつつ、分析法をダウンストリームのワークフローに移管できることが実証されています。

アプリケーションのメリット

- ACQUITY Premier および Arc Premier システムで、pH グラジエントまたは塩グラジエントを使用して一貫した結果が得られる
- BioResolve™ SCX mAb カラムは、さまざまな寸法で提供され、UPLC プラットホームおよび UHPLC プラットホームにわたって IEX ワークフローに対応可能
- BioResolve CX pH バッファー濃縮液により、調製にかかる時間とベンチで費やす時間が短縮され、頑健で再現性のある陽イオン交換分離が実現
- Waters カラムカリキュレーターにより、最小限のユーザー入力での簡単な分析法スケーリングが提供される

はじめに

製薬企業では、通常複数のラボにわたって多種多様のクロマトグラフィー装置を導入して、バイオ医薬品の開発と製造に対応しています。このダイナミックの一部として、分析法が頻繁に開発されて複数のラボにわたって移管され、理想的には一貫した結果が得られます。ただし、複数のシステムにわたる流路の相違がシステム容量および分散に影響を及ぼし、それが後続するクロマトグラフィー結果に影響する可能性があります。分離手法とは無関係にクロマトグラフィー性能を維持するために、カラムの形状とシステムのデュエルボリュームの違いを考慮して、多数のパラメーターを適切にスケールリングする必要があります（図1）。手でスケールリングする場合、これらの計算に時間がかかり、ミスが発生しやすくなります。ウォーターズは、必要なユーザーによる入力が最小限に抑えられ、分析法のスケールリングプロセスが自動化された、カラムカリキュレーターバージョン 2.0 を提供しています。

これを実証するため、Waters カラムカリキュレーターを使用して、ACQUITY Premier システムで開発された IEX UPLC 分析法をスケールリングし、Arc Premier システムでの UHPLC 分析法に移管しました。複数のシステムにわたって性能を最適化するため、ウォーターズは、UPLC 装置用の内径 2.1 mm カラムと UHPLC 装置用の 4.6 mm カラムに、同じ BioResolve SCX mAb カラムパーティクルテクノロジーを提供しています。これらのカラム型式を使用することで、スケールリングされた分析法は、分離性能を維持しながら移管されました。チャージバリエーションの分離で普及しているため、pH ベースのグラジエントと塩ベースのグラジエントの両方を評価しました。この研究では、ピーク面積の割合と相対保持時間を指標として使用し、ダウンストリームのワークフローをサポートするためのアップストリームメソッドの移管が正常に行われることが実証されています。

実験方法

塩化ナトリウム、MES 一水和物、MES 塩、カフェインは Sigma Aldrich から購入しました。インフリキシマブ製剤レミケード™ は、Amerisource Bergen から購入し、製造者の指示に従って滅菌水を使用して 10 mg/mL になるように調製し、そのまま注入しました。

ACQUITY Premier LC/UV の条件¹

LC システム: ACQUITY Premier システム (QSM バリエーション)

検出: ACQUITY TUV、FC = Ti 5mm、 $\lambda = 214, 280 \text{ nm}$

バイアル:	MaxPeak™ High Performance Surfaces を採用した QuanRecovery™ バイアル (製品番号: 186009186)
カラム:	BioResolve SCX mAb カラム、3 μm、2.1 × 100 mm (製品番号: 186009056)
カラム温度:	40 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	1 μL
流速:	0.100 mL/分
移動相 A:	BioResolve CX pH 濃縮液 A (製品番号 : 186009063) または 20 mM MES バッファー、pH 6.7
移動相 B:	BioResolve CX pH 濃縮液 B (製品番号 : 186009064) または 200 mM NaCl 含有 20 mM MES バッファー、 pH 6.7
クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower 3、FR4

Arc Premier LC/UV の条件

LC システム:	Arc Premier システム (QSM バリエーション)
検出:	2489 UV/Vis 検出器、光路長 10 mm、λ = 214 nm、 280 nm
バイアル:	QuanRecovery バイアル、MaxPeak High Performance Surfaces 付き (製品番号

	: 186009186)
カラム:	BioResolve SCX mAb カラム、3 μ m、4.6 \times 100 mm (製品番号: 186009060)
カラム温度:	40 $^{\circ}$ C
サンプル温度:	10 $^{\circ}$ C
注入量:	4.8 μ L
グラジェント開始時間 - 注入後:	785 μ L
流速:	0.480 mL/分
移動相 A:	BioResolve CX pH 濃縮液 A (製品番号 : 186009063) または 20 mM MES バッファー、pH 6.7
移動相 B:	BioResolve CX pH 濃縮液 B (製品番号 : 186009064) または 200 mM NaCl 含有 20 mM MES バッファー、 pH 6.7
クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower 3、FR4

ACQUITY Premier グラジエント (BioResolve CX pH 濃縮液)

時間	流速 (mL/分)	%A	%B	%C	%D	曲線
初期条件	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	初期条件
45.00	0.100	61.0	39.0	0.0	0.0	6
46.00	0.100	10.0	90.0	0.0	0.0	6
49.00	0.100	10.0	90.0	0.0	0.0	6
50.00	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	6
70.00	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	6

Arc Premier グラジエント (BioResolve CX pH 濃縮液)

時間	流速 (mL/分)	%A	%B	%C	%D	曲線
初期条件	0.480	81.5	18.5	0.0	0.0	初期条件
45.00	0.480	61.0	39.0	0.0	0.0	6
46.00	0.480	10.0	90.0	0.0	0.0	6
49.00	0.480	10.0	90.0	0.0	0.0	6
50.00	0.480	81.5	18.5	0.0	0.0	6
70.00	0.480	81.5	18.5	0.0	0.0	6

ACQUITY Premier グラジエント (20 mM MES バッファー、pH 6.7)

時間	流速 (mL/分)	%A	%B	%C	%D	曲線
初期条件	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	初期条件
38.00	0.100	72.0	28.0	0.0	0.0	6
39.00	0.100	0.0	100.0	0.0	0.0	6
44.00	0.100	0.0	100.0	0.0	0.0	6
45.00	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	6
70.00	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	6

Arc Premier グラジエント (20 mM MES バッファー、pH 6.7)

時間	流速 (mL/分)	%A	%B	%C	%D	曲線
初期条件	0.480	91.0	9.0	0.0	0.0	初期条件
38.00	0.480	72.0	28.0	0.0	0.0	6
39.00	0.480	0.0	100.0	0.0	0.0	6
44.00	0.480	0.0	100.0	0.0	0.0	6
45.00	0.480	91.0	9.0	0.0	0.0	6
70.00	0.480	91.0	9.0	0.0	0.0	6

結果および考察

創薬から市販薬まで、医薬品のライフサイクル全体を通じて、分析法は特性解析ラボから製造ワークフローおよび品質管理ワークフローまで、ダウンストリームに移管されます。理想的には、ダウンストリームの分析法では、以前に開発された分析法で生成された履歴データと同等の結果が得られる必要があります。ダウンストリームのワークフローでは、製造および品質管理に対応する装置は、分析法条件に対してより寛大であるように設計されており、頑健性を高める

ためにチューブやカラムの内径が大きい傾向があります。図 1 に示されているように、分析法をダウンストリームに正常に移管するには、これらの違いを考慮していくつかのパラメーターを検討する必要があります。Waters カラムカリキュレーターにより、最小限のユーザー入力でこれらの計算を自動化できます。示されているパラメーターのうち、デュエルボリュームオフセットのみが個々のシステムによって異なり、実験的に決定する必要があります。

パラメーター	計算	変数の定義
カラム効率	$L_1/dp_1 = L_2/dp_2$	L = カラム長
カラム容量	$V = \pi r^2 l$	dp = 粒子径
注入量	$Vi_2 = Vi_1 \times (V_2/V_1)$	V = カラム容量
流速	$F_2 = F_1 \times \left(\frac{dp_1}{D_1^2}\right) / \left(\frac{dp_2}{D_2^2}\right)$	Vd = システムデュエルボリューム
分析時間	$t_2 = t_1 \times \left(\frac{V_2}{F_2}\right) / \left(\frac{V_1}{F_1}\right)$	D = カラム内径
デュエルボリュームオフセット	$DV = Vd_1 - (Vd_2 \times \frac{V_1}{V_2})$	r = カラム半径
グラジエントセグメントのカラム容量	$GS = (FT)/V$	l = カラム長
		Vi = 注入量
		F = 流速
		T = セグメント持続時間
		t = 実行時間
		GS = グラジエントセグメントのカラム容量

図 1. 分析法を適切にスケールリングするために検討する必要があるパラメーター

この試験では、ACQUITY Premier システムおよび Arc Premier システムについて、図 2 に記載されている条件に従って、システムデュエルボリュームを決定しました²。デュエルボリュームの結果、およびカラムサイズと ACQUITY Premier システムグラジエント条件を Waters カラムカリキュレーターに入力しました (図 3)。複数の Premier システムの間でカラム寸法が異なるため、カラムカリキュレーターにより、流速と注入量を適切にスケールリングして、同一のカラム負荷量とカラム容量を維持しました。カラムカリキュレーターにより、システム間のデュエルボリュームの違いに基づいて、移管された Arc Premier システムに 785 μ L のアイソクラティックホールドが推奨され、ACQUITY Premier システムで観測された保持時間は一致しました。これらのスケールリングした条件を、図 3 の分析法パラメーターとして入力しました。

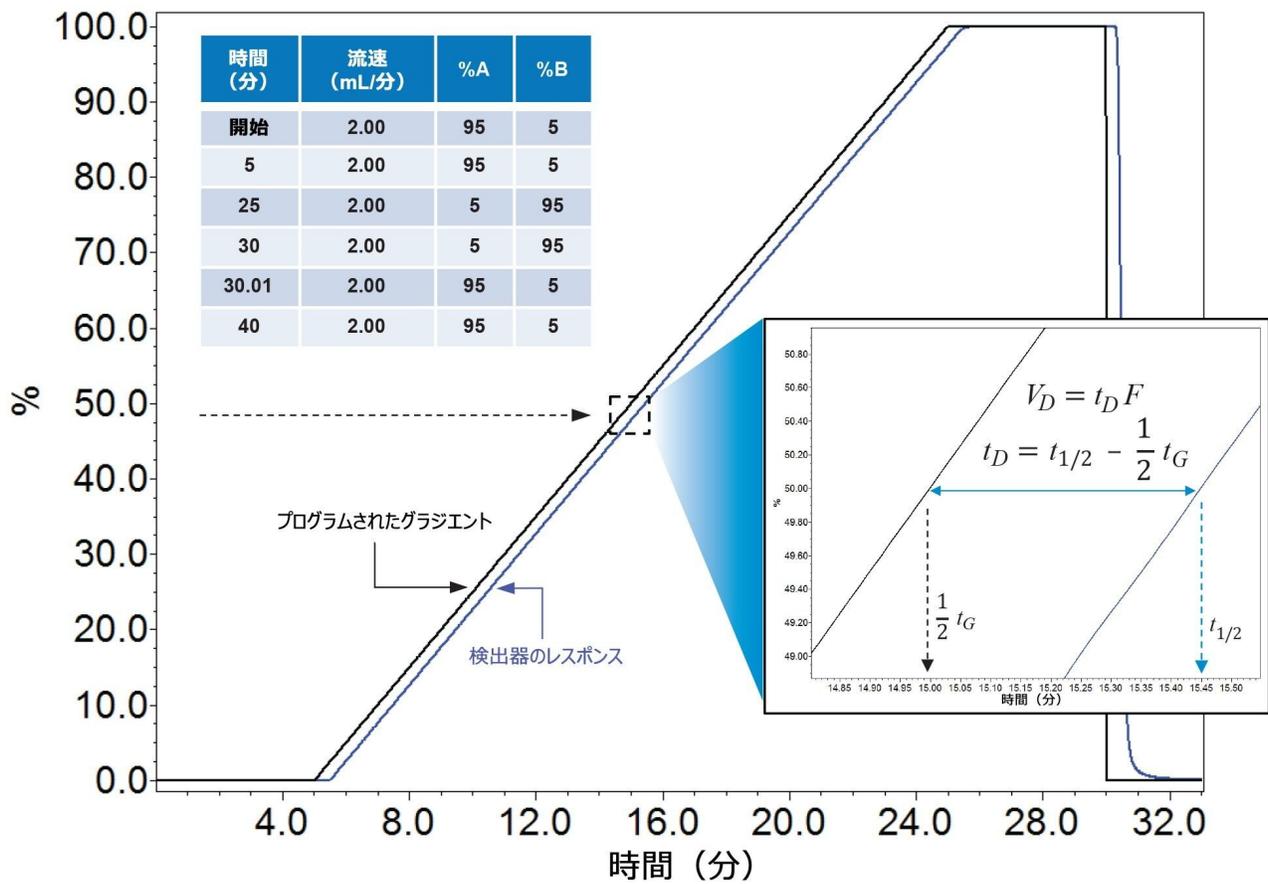


図2. 検出器のレスポンスとプログラムしたグラジエントの差を計算することによる、デュエルボリュームの測定。移動相 A: 水、移動相 B: 10 mg/L カフェイン水溶液、波長: 273 nm。



The screenshot shows the 'Columns Calculator' window with 'From...' and 'To...' sections. The 'From...' section lists parameters for a 2.100 mm diameter, 100 mm length column. The 'To...' section lists parameters for a 4.600 mm diameter, 100 mm length column. A 'Recommended isocratic hold' of 785.6 μL is highlighted. To the right, the 'Quaternary Solvent Manager-R' window shows solvent settings (A: Water, B: Water, C: , D:) and a 'Gradient Table' with 6 steps. A red box highlights the '785.6 μL' value in the solvent manager's 'Accelerate to 2 mL/min in:' field.

図 3. スケーリングされたパラメーターおよびシステムデュエルボリュームの違いの装置メソッドへの組み込み

この研究で移管した分析法は、BioResolve CX pH 濃縮液と BioResolve SCX mAb カラムを使用した IEX ベースの分析法でした。これらの BioResolve pH 濃縮液は、BioResolve SCX mAb カラムなどの IEX ベースのカラムを使用する場合に、チャージバリエーションの最適な分離を得るため、再現性のある直線的な pH グラジエントを提供するように設計されています。元の分析法とスケーリングした分析法で、同じ分解能（長さ/粒子径比）が維持され、内径が異なる、2 種類の BioResolve SCX mAb カラムを使用しました。mAb ベースの医薬品のレミケードを、元の分析法とスケーリングした分析法（デュエルボリュームの調整あり/なし）を使用して分析しました（図 4）。どちらの場合も、5 回繰り返し注入の保持時間の %RSD は 1% 未満で、BioResolve カラムテクノロジーの再現性が実証されました。ただし、アイソクラティックホールドを使用していない中央のクロマトグラムでは、全体的なプロファイルが約 2 分シフトされていることが認められます。ピーク分離の維持の観点からはこれは許容できますが、分析法の保持時間が指定されている規制ラボ環境では、クロマトグラフィープロファイルが一致することは適正な分析法移管にとって重要です。アイソクラティックホールドを使用した場合（図 4、下部クロマトグラム）、クロマトグラフィープロファイルが元の分析法とよくそろっています。

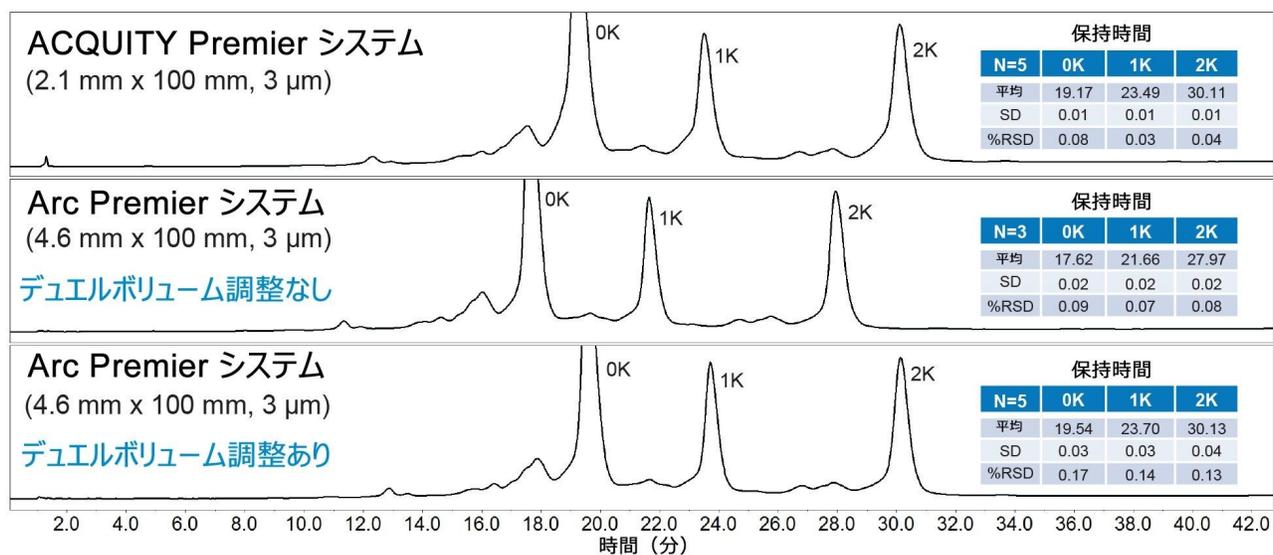
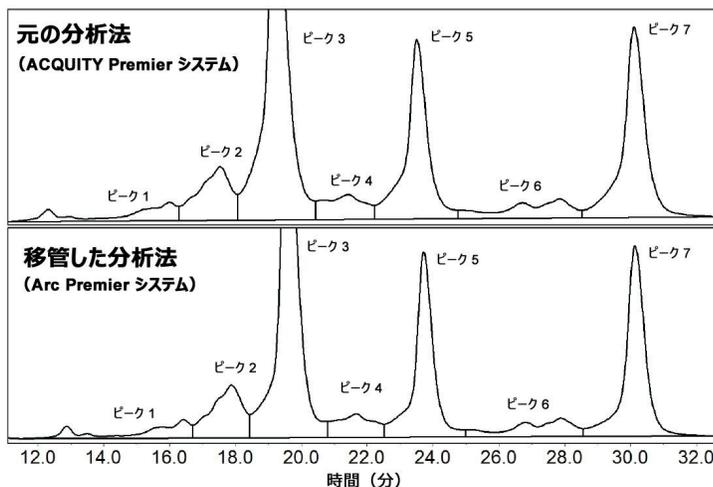


図 4. デュエルボリュームの違いが考慮されている場合と考慮されていない場合の、移管した分析法での保持時間の違いの評価

相対保持時間と相対ピーク面積を 5 回繰り返し注入について計算し、スケーリングした分析法の機能を再現性とクロマトグラフィー性能の点で評価しました。図 5 に示されているように、スケーリングした分析法では相対保持時間の絶対差が 0.03 を下回っており、相対パーセントピーク面積の差は元の分析法の約 0.5% 以内でした。さらに、従来の塩グラジエントをスケーリングして、従来の移動相を使用した場合のクロマトグラフィー性能の維持に関する BioResolve カラムの性能を評価し、より広範な適用性があることが実証されました。スケーリングした分析法では、同等の選択性とピーク面積が維持され、両方のグラジエントをさらに最適化する必要は最小限でした (図 5)。これらの結果により、いずれの装置も頑健な性能を有し、カラムカリキュレーターを用いて IEX 分析法を適切にスケーリングできることが強調されています。



相対保持時間

N=5	BioResolve CX pH 濃縮液			MES 塩バッファー		
	ACQUITY Premier	Arc Premier	絶対差	ACQUITY Premier	Arc Premier	絶対差
ピーク 1	0.834	0.841	0.007	0.823	0.808	0.015
ピーク 2	0.914	0.915	0.001	0.890	0.877	0.013
ピーク 3	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000
ピーク 4	1.117	1.108	0.009	1.106	1.094	0.012
ピーク 5	1.226	1.213	0.013	1.219	1.219	0.000
ピーク 6	1.453	1.427	0.026	1.454	1.450	0.004
ピーク 7	1.571	1.542	0.029	1.561	1.570	0.009

相対 %ピーク面積

N=5	BioResolve CX pH 濃縮液			MES 塩バッファー		
	ACQUITY Premier	Arc Premier	絶対差	ACQUITY Premier	Arc Premier	絶対差
ピーク 1	4.408	4.486	0.078	4.258	4.644	0.386
ピーク 2	8.106	8.628	0.522	7.480	7.558	0.078
ピーク 3	38.410	38.316	0.094	38.324	38.448	0.124
ピーク 4	4.704	4.660	0.044	5.670	5.714	0.044
ピーク 5	18.362	18.288	0.074	17.652	17.530	0.122
ピーク 6	5.396	5.350	0.046	5.594	5.546	0.048
ピーク 7	20.608	20.264	0.344	21.020	20.560	0.460

図 5. pH ベースのグラジエントおよび塩ベースのグラジエントを使用した場合の、元の分析法および移管した分析法での相対保持時間および相対パーセントピーク面積の比較

結論

Waters カラムカリキュレーターは、同等のクロマトグラフィー性能が得られる動作パラメーターの計算を自動化することで、分析法を迅速にスケールアップする、高い価値があるツールです。このアプリケーションノートでは、スケールアップした UHPLC システムで計算された分析法条件によって、元の UPLC 分析法の性能が再現されることが実証されました。複数のシステム間の比較では、pH ベースのグラジエントおよび塩ベースのグラジエントの両方で、レミケードの相対保持時間の絶対差は 0.03 を下回っており、相対ピーク面積は元の分析法の 0.5% 以内でした。適切にスケールアップすると、IEX 分析法をシステム間でシームレスに移管することができ、頑健な性能が得られることが期待されます。

参考文献

1. Birdsall RE, Koshel BM, Yu YQ. Accelerating Charge Variant Analysis of Biotherapeutics with the BioAccord™ System. Waters Application Note. 2022. [720007706](#).

2. Hong P, McConville PR. Dwell Volume and Extra-Column Volume: What Are They and How Do They Impact Method Transfer. Waters Application Note. 2018. 720005723. <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005723en.pdf>>

ソリューション提供製品

Arc Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

分取精製およびモジュラー LC システム用 2489 UV/可視光 (UV/Vis) 検出器 <<https://www.waters.com/134721513>>

Empower クロマトグラフィータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

BioResolve CX pH グラジエント移動相濃縮液 A <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009063-bioresolve-cx-ph-concentrate-a.html>>

BioResolve CX pH グラジエント移動相濃縮液 B <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009064-bioresolve-cx-ph-concentrate-b.html>>

BioResolve SCX mAb カラム、3 µm、4.6 × 100 mm、1 本入り <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009060-bioresolve-scx-mab-column-3--m-46-mm-x-100-mm-1-pk.html>>

BioResolve SCX mAb カラム、3 µm、2.1 × 100 mm、1 本入り <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009056-bioresolve-scx-mab-column-3-m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>>

MaxPeak HPS を採用した QuanRecovery 12 × 32 mm スクリューネックバイアル、300 µL、100 本入り <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186009186-quanrecovery-with-maxpeak-hps-12-x-32-mm-screw-neck-vial-300--l.html>>

Waters カラムカリキュレーター <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134891632&type=DWNL>>

720007807JA、2022 年 12 月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)