

生物製剤の最終製品検査でリアルタイムリリースを実現

Thermo Scientific DXR Smartラマン分光装置

著者

Shaileshkumar Karavadra, David James, Arnau Di Bitetto, ヘメル・ヘムステッド、英国

キーワード

DXR Smartラマン、分光装置、バイオ医薬品、GMP、リアルタイムリリース試験、クオリティバイデザイン (QbD)、RTRT、製造、多属性試験

はじめに

生物学的発現（哺乳動物、細菌、昆虫細胞など）を利用して医薬品（生物製剤）を製造するバイオ医薬品産業は、成長著しい巨大な産業としての地位を確立しています。生物製剤は難解な化学構造に加えて、細胞を利用する複雑な製造方法であることから、プロセス（上流）と製品（下流）の両方において、正確に特性解析して定量する分析業務が大きな負担になります。低分子医薬品の製造では、高度な分析法および計算法を広範に取り入れたプロセス分析技術（PAT）をルーチンのプロセス制御に活用することで、プロセスの効率性と医薬品の安全性の向上につながっています。

ラマン分光法は振動分光法の一つです。分子情報（組成およびばらつき）を必要とするPATアプリケーションに特に適した有用な特性（非破壊、非接触、高い分子特異性、堅牢性）を併せ持っています。

一般的な適正製造基準（GMP）を運用する場合は、ある材料を市場に出荷、またはさらに加工する前に、承認された規格に従った広範な試験の実施が必要です。しかし、新しいICHガイドライン（ICH Q8、Q9、Q10、およびQ11）は、出荷前製品の品質を保証するための代替措置としてリアルタイムリリース試験（RTRT）を提案しています。RTRTは、リリース試験および安定性試験の最適化を図る目的でクオリティバイデザイン（QbD）の原則を医薬品製造に取り入れたものです。製造プロセスの理解、プロセス制御、および製品知識を組み合わせ、ある材料がGMPに準拠して製造されたことを実証できます。

RTRTの厳密な実施方法は、プロセス要求事項によって異なります。RTRTは、プロセスパラメーターの管理、製品属性のモニタリング、あるいはそれら両方に基づいてプロセスの該当する手順で実施されます。重要な点は、RTRTはプロセス、プロセスパラメーター間の関係性、工程内の材料属性、および製品属性に関する確かな理解に基づいて実施される必要があることです。

インライン、アットラインのモニタリングおよびリアルタイムリリースを推進するためには、品質、コストおよびスピードが重要な要素です。

本アプリケーションノートは、バイオ医薬品の製造と分析におけるラマン分光法の重要なアプリケーションのうちのいくつかを紹介します。バイオ医薬品製造プロセスの中から、原材料および細胞培養培地の同定試験（ばらつき試験）と、生物製剤の多属性製品試験、すなわち最終製品試験の二つの側面を取り上げます。

原材料の特性解析

多くの場合、原材料の受入は小規模な機能試験および（または）限られた分析法に基づいて判断されますが、これは大規模な製造プロセスでの性能を表しているとは限りません。場合によってはプロセスアウトプットのばらつきにつながり、極端なケースでは規定のリリース基準を満たさない可能性もあります。加えて、多くの臨床用製品は少量バッチ生産であることから原材料のばらつき範囲が狭く、プロセスの把握が限定的になってしまいます。特に、上流の細胞培養における培地成分の予期しないばらつきが、製品のわずかな不均一性と重要な品質特性（CQA）に影響を及ぼす可能性があります。

リスクの高い原材料に対しては、同定試験、原材料中の主成分濃度の定量試験、バッチ間のばらつき試験、劣化試験などで構成される多属性試験の実施が考えられます。

生物製剤の製造においては、細胞培養培地がこのような原材料に該当します。アミノ酸解析やビタミン解析など従来のLC法による培地サンプルの同定は、高いコストがかかる上に、高度な分析技術と実験室のスペースが必要です。ラマン分光法なら、低コスト、可搬性、限られたスキルでも機器の操作が可能といった多くのメリットがもたらされます。

下流の製造プロセスで使用する一連の重要な原材料をバッファーとします。濃度はオスモル濃度を指標とします。それらは、バイオプロセスの重要な品質特性であり、重要なプロセスパラメーターです。生物製剤の収量および品質は、下流プロセスの最適化に大きく依存します。バッファーのオスモル濃度と併せて、主成分分析と部分最小二乗回帰に基づく多属性法による同定試験が実施できます。Thermo Scientific™ DXR™ 3 Smartラマン分光装置のファイバースコープを使用することで、シングルユースバッグ越しにバッファーを迅速に試験でき、使用時点でのサンプル前処理は不要です。

最終製品の同定試験

生物製剤に対する規制要求事項の一つに、最終製品の出荷前および出荷後同定試験があります。さまざまな種類の一次包装（ガラスバイアル、シリンジ、ガラス瓶）越しに製品の同定試験を実施することは、生物製剤の製造における分析面の大きな課題です。試験の実施に必要な分析技術を持たない最終工程の拠点は、親拠点や外部の試験機関にサンプルを送付して試験を依頼しなければならず、時間と費用がかかります。

さらに、生物製剤や低分子製剤は、第三国からEU加盟国に輸入する際、また、第三国から米国への発送品については再検査が必要です。通常、最終製品の同定試験を含む全ての試験を実施しなければならず、バイオ医薬品メーカーは親拠点にサンプルを返送して分析を依頼するか、輸入国で第三者の試験機関に委託する必要があります。結果として大幅なコスト上昇につながるだけでなく、需要の高い製剤の供給が遅れることとなります。

生物製剤は、充填・製剤最終化後、または充填・製剤最終化ラインへのリリース前に、分子/登録文書の内容に基づいてさまざまな分析技術による最終製品の同定試験を実施します。

例えば、生体タンパク質の検証試験は、長年にわたり確立されたLC-MSを用いたタンパク質同定のためのワークフローであるペプチドマッピングによって行われます。ペプチドマッピングは複雑な分離技術で、最終的にスペクトルをタンパク質データベースと照合する前に、タンパク質の抽出とクリーンアップ、酵素消化、1段階または数段階の液体クロマトグラフィー、2段階の質量分析を必要とします。スタンダードな手法ですが、技術リソースを持つ認定分析ラボでなければ実施できず、調製のための膨大な時間と溶媒、カラム、分析機器に多額のコストがかかります。

DXR3 Smartラマン分光装置は、高い感度と分解能によって分子の指紋領域を評価することで、製剤の特性解析が可能です。DXR3 Smartラマン分光装置は、柔軟なサンプリングなどの独自機能によって繰り返し精度の高い測定を確保し、その後の分析で迅速なメソッドの構築と導入を可能にします。

最終製品の多属性試験の迅速な実施、15種類の製剤の識別、および製剤に使用される2種類の防腐剤の濃度測定を主な目標に設定して、多国籍製薬企業を対象としたフィジビリティスタディを実施しました。

フィジビリティスタディには、濃度0.5 mg/mL~6 mg/mLの15種類の生物製剤を使用しました。防腐剤Aおよび防腐剤Bの濃度は、それぞれ0.85 mg/mL~5.0 mg/mL、0.42 mg/mL~3.91 mg/mLでした。

市販医薬品は、さまざまなサイズおよび容量のガラスバイアルに入れて供給されます。下の写真のようなガラスバイアルを使用します。



現在、最終製品の同定試験および最終製品に含まれる2種類の防腐剤の定量測定には、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が使用されています。

ユニバーサルサンプリングアクセサリおよび180度後方散乱アクセサリを搭載したDXR3 Smartラマン分光装置を使用して、15種類の製剤のスペクトルを取得しました。各スペクトル取得時のレーザー波長は532 nm、出力は40 mW、スキャン時間は1分です。ガラスバイアルのばらつきと散乱の影響を吸収するために、各サンプルについて10のスペクトルを取得しました。

優れた選択性と繰り返し精度により、全波長域でバンドの帰属に基づいた生物製剤の特性解析が可能です。

ラマンバンドの帰属

バンド波数 (cm ⁻¹)	領域	振動モード	タンパク質構造の帰属
870~1,150	主鎖、骨格伸縮	C _α -C、C _α -C _β 、C _α -N	二次構造要素：α-ヘリックス、β-シート、不規則構造
1,200~1,340	アミドIII	N-H面内伸縮、C _α -N伸縮	水素結合、二次構造
1,400~1,480	側鎖変角	CH ₂ およびCH ₃ 変角	局所環境、側鎖の分子間相互作用
1,510~1,580	アミドII	N-H変角およびC-N伸縮（紫外共鳴ラマン分光法による。従来のラマンスペクトルでは見られない）	局所環境、側鎖の分子間相互作用
1,630~1,700	アミドI	C=O伸縮、N-H面内変角	二次構造要素：α-ヘリックス、β-シート、不規則構造

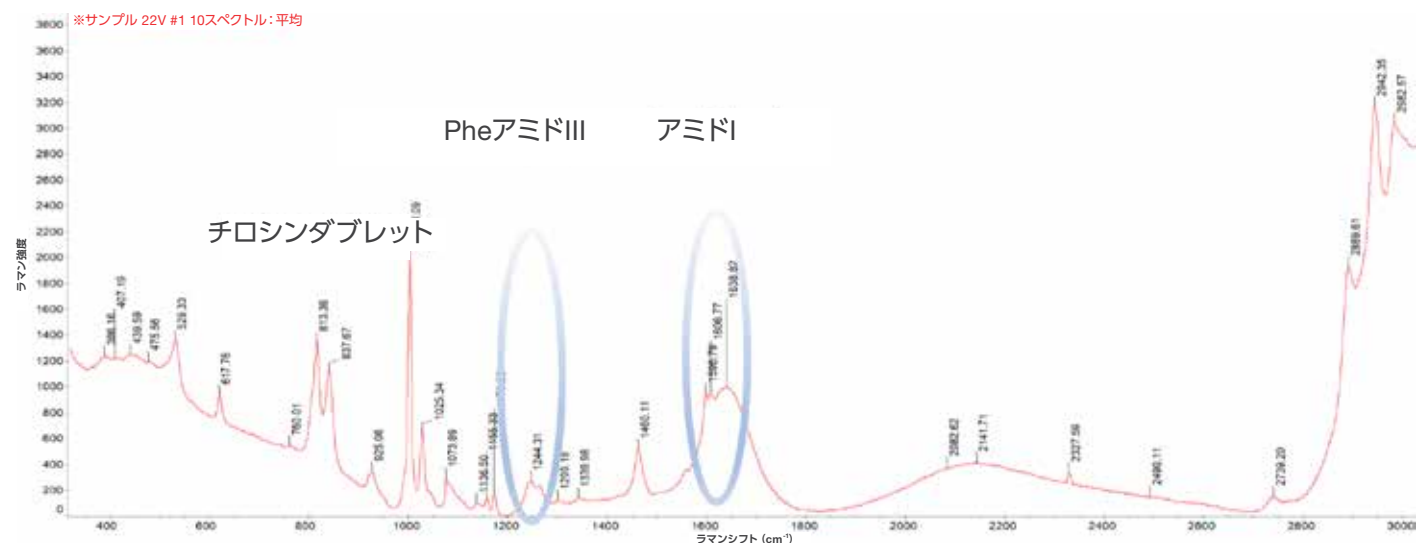


図1. DXR3 Smartラマン分光装置で測定した生物製剤のスペクトルと特定バンド。

図2は、ある製剤とそのプラセボを含むサンプルのスペクトルを比較したものです。フィジビリティスタディのために選択した手法を実証することは不可欠です。今回のケースでは、ラマン分光法は製剤とプラセボの差異を検出する十分な感度を有しています。DXR3 Smartラマン分光装置は、プラセボと実際の製剤との有意差を判別できる高い感度を提供します。

図3は、さまざまなクラスの製剤のスペクトルです。これらのスペクトルを利用して、Thermo Scientific™ TQ Analyst™ ソフトウェアで実施する判別分析法を開発しました。TQ Analystソフトウェアは、定量および定性メソッド開発のためのバリデーション済みのソフトウェアです。

判別分析による分類では、各クラスの中心から未知物質までの距離（マハラノビス距離）を計算することで、未知物質がどの既知物質のクラスに最も類似しているかを決定します。一般に、判別分析は入荷原料または最終製品のスクリーニングで実施し、材料がどの化合物（または分子a、bまたはc）に該当するのかを判定します。

2種類以上の既知物質クラスを指定することが一般的ですが、1種類のクラスでも機能します。複数の標準物質により各クラスを表すことも可能です（少なくとも一つのクラスに二つ以上の標準物質が含まれなければなりません）。複数のスペクトル領域の分析も可能です。

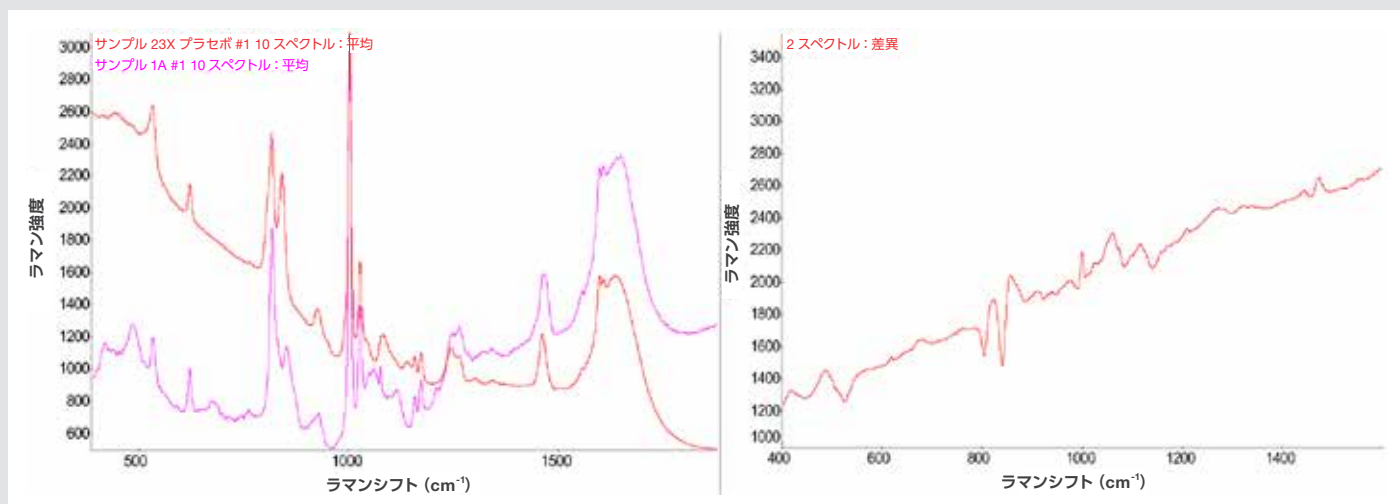


図2. 製剤およびプラセボのラマンスペクトルと差スペクトル。

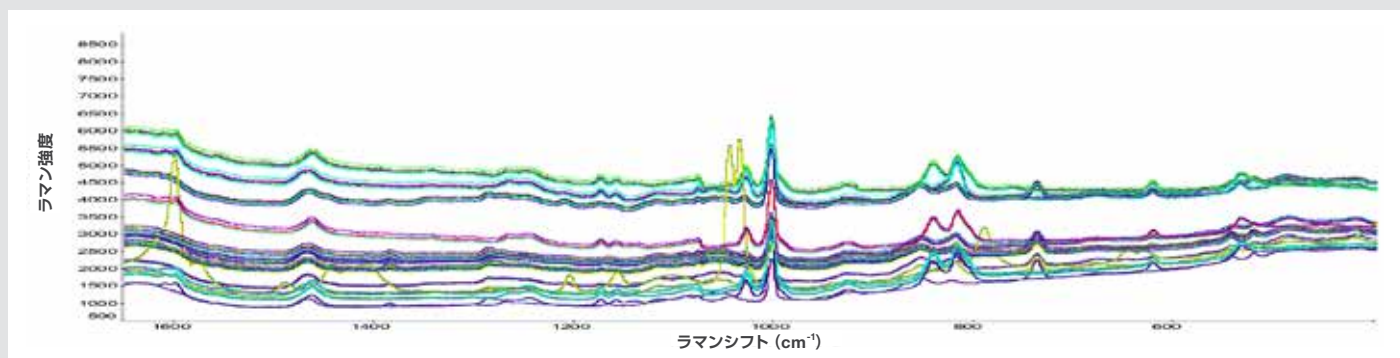


図3. 各種クラスの製剤のラマンスペクトル。

判別分析で何ができるか？

判別分析とは、未知サンプルスペクトルの特定領域におけるスペクトル情報を保存された校正モデルに当てはめて、どのクラスの標準物質がその未知サンプルに最も類似しているかを判断する分析法です。

判別分析によって未知サンプルを分析、すなわちクラス分けするには、ソフトウェアで標準物質の主成分分析を行い、その結果を基に未知サンプルスペクトルのスコアを計算します。そのスコアをプロットしてマハラノビス距離を求めることで、クラス分けを行います。

未知サンプルのスペクトルに最も近いクラスを判別結果とします。未知サンプルと、報告されたクラスとのマハラノビス距離を求めることもできます。マハラノビス距離がゼロに近いほど、一致率が高くなります。

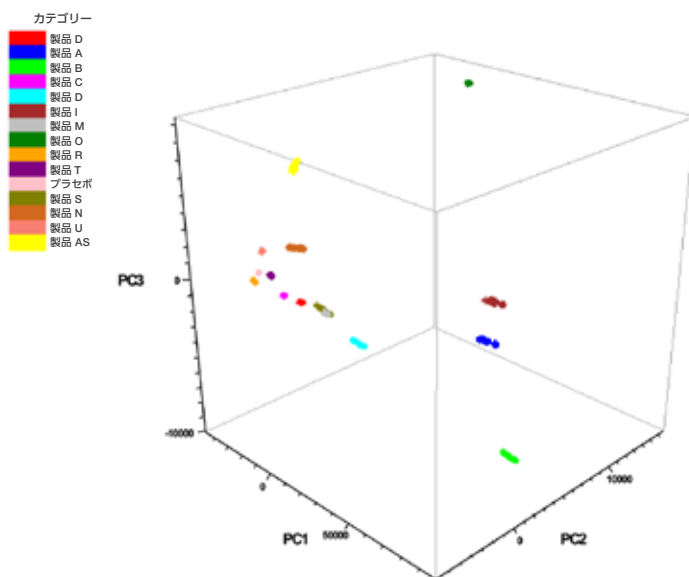
クロスバリデーション後、主成分スコアをプロットするとクラス分けされます。レポートでは、全ての製品のクラスが正確に同定されて、誤検出を示す不一致はありませんでした。

生物製剤に含まれる防腐剤Aおよび防腐剤Bの定量分析

フィジビリティスタディにおけるクライアントからの依頼事項として、製剤に含まれる2種類の防腐剤A (0.85 mg/mL~5 mg/mL) および防腐剤B (0.32 mg/mL~4.91 mg/mL) の濃度をHPLCではなく、DXR3 Smartラマン分光装置によって測定可能であるかを評価しました。

最終製剤中の含有を確認するための基準サンプルとして、何も含まない防腐剤Aおよび防腐剤Bの純品を用意しました。

実際のクラス	不一致	計算クラス	計算距離	次点のクラス	次点の距離
製品D		製品D	0.5809	C	4.5556
製品A		製品A	1.9869	I	12.9617
製品B		製品B	1.3796	E	25.1324
製品C		製品C	0.5417	D	3.8568
製品D		製品D	0.8466	M	9.0495
製品I		製品I	1.7709	A	13.9064
製品M		製品M	0.5284	S	3.3881
製品O		製品O	0.2244	X	17.3044
製品R		製品R	0.5419	C	4.4691
製品T		製品T	0.5944	X	2.3213
製品X		製品X	0.79	T	3.1646
製品S		製品S	1.1837	M	3.0829
製品N		製品N	1.0954	U	15.1798
製品U		製品U	0.1603	T	9.1738
製品S		製品S	1.8544	N	22.1624



3 mLバイアルを使用した同定試験でのスペクトル取得時と同じパラメーターで、表1に示すさまざまな濃度のサンプルのスペクトルを取得しました。図6は、2種類の防腐剤を含む製剤のスペクトルです。

基準値となる5種類の標準サンプルと、モデルの検証に使用する1種類のバリデーションサンプルをそれぞれ3 mLおよび10 mLバイアルに準備しました。

これらのさまざまな溶液から得た15種類のスペクトルを基に、ケモメトリックスのメソッドを構築しました。最終製剤サンプルをDXR3 Smartラマン分光装置でスキャンして、3,500~50 cm⁻¹のフルレンジスペクトルをCCDによる1回露光で取得しました。サンプル測定時間は約1分です。一つのサンプルにつき三つのスペクトルを取得しました。取得したサンプルスペクトルをTQ Analystソフトウェアにロードして、部分最小二乗回帰(PLS)法によるケモメトリックス分析を行いました。

結果

最終製剤サンプルの部分最小二乗回帰(PLS)分析を行った結果、供試材料においては優れた予測性能が認められました。PLS法の構築に用いた15種類のスペクトルについて、防腐剤濃度の計算値と実際値をプロットして検量線を作成しました(図7、図8)。この検量線から、PLS法がサンプル中の実際の防腐剤濃度をどのくらい正確に予測できるかを評価できます。ケモメトリックス手法により作成した防腐剤Aの検量線の相関係数は

表1. 校正およびバリデーションサンプル

	防腐剤A (mg/mL)	防腐剤B (mg/mL)
標準1 3 mLおよび10 mL	0.85	0.42
標準2 3 mLおよび10 mL	1.27	1.12
標準3 3 mLおよび10 mL	1.57	1.75
標準4 3 mLおよび10 mL	3.07	2.57
標準5 3 mLおよび10 mL	5.07	3.91
バリデーション3 mL	1.57	1.75

表2. 3 mLサンプルのバリデーション結果

	PLS結果、3 mLカートリッジ	
	防腐剤A (mg/mL)	防腐剤B (mg/mL)
バリデーション サンプル: 3 mL	1.58 実際値 1.57	1.71 実際値 1.75
実際のサンプル、 溶液: 3 mL	1.56 実際値 1.55	1.69 実際値 1.77
実際のサンプル、 懸濁液: 3 mL	0.72 実際値 0.69	1.23 実際値 1.58

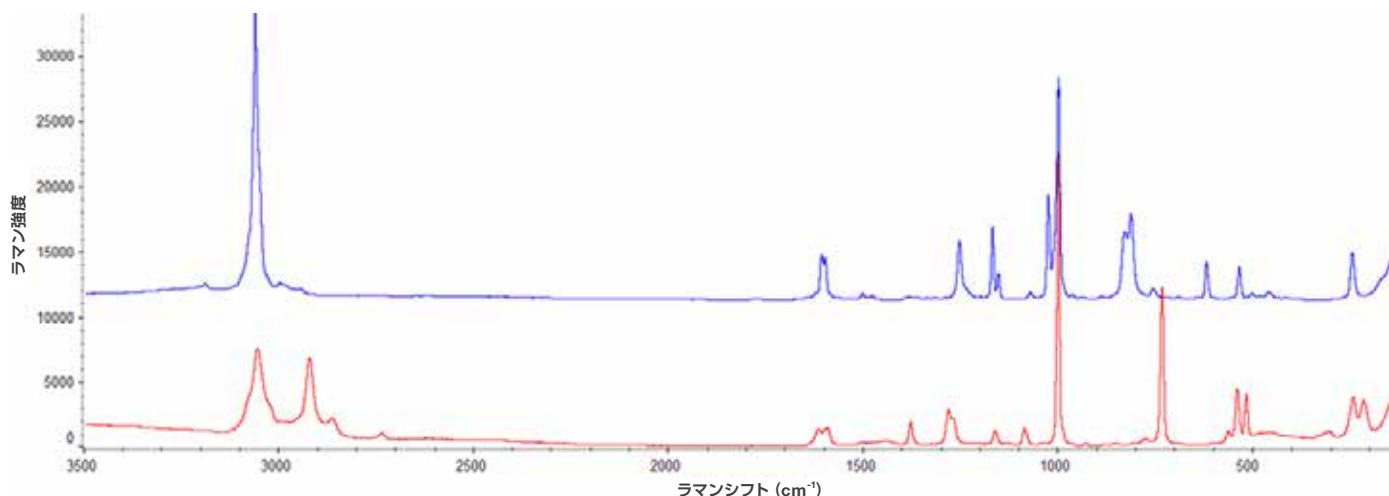


図5. 防腐剤A (青) および防腐剤B (赤) の純品のスペクトル。

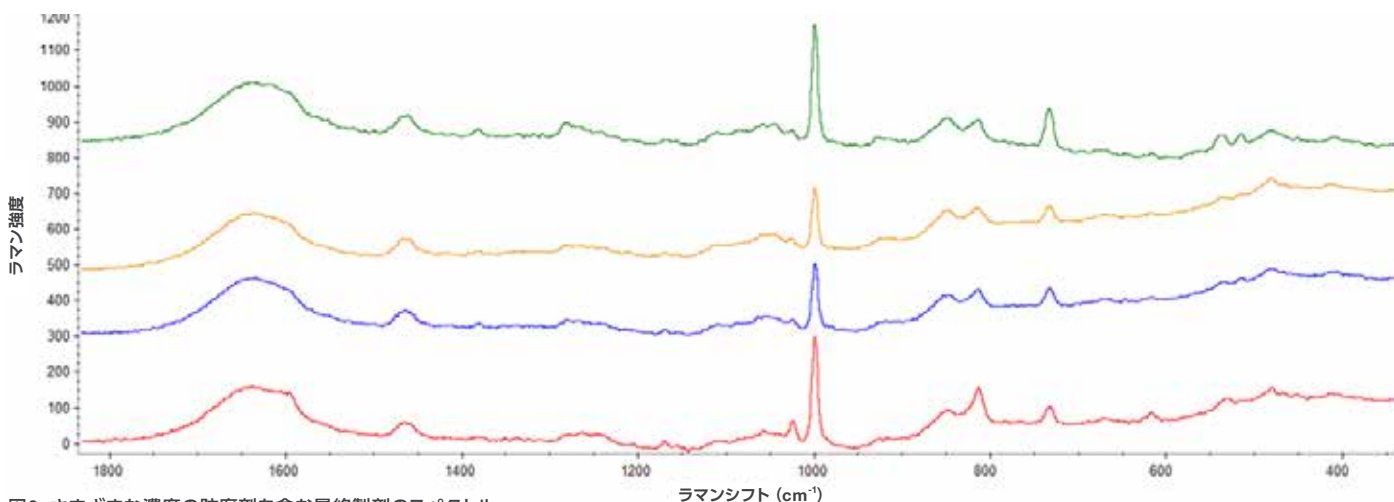


図6. さまざまな濃度の防腐剤を含む最終製剤のスペクトル。

0.998でした。検量線データの二乗平均平方根誤差 (RMSEC) は0.0425 mg/mL、推定値の二乗平均平方根誤差 (RMSEP) は0.0372でした。また、防腐剤Bの検量線の相関係数は0.999でした。RMSECは0.0316 mg/mL、RMSEPは0.0496でした。

10 mLバイアルの校正サンプルを追加でPLS分析した結果、同等のメソッド性能が確認され、10 mLバリデーションサンプルの濃度を正確に予測できました。

まとめ

判別分析法および部分最小二乗回帰法を用いて、DXR3 Smart ラマン分光装置による多属性試験により最終製剤の同定と防腐剤濃度の推計を行いました。最終製剤の同定試験はリリース試験の一つに含まれますが、現在の方法では時間と手間がかかります。しかし、ラマン分光法では、防腐剤濃度の測定とモニタリングをラボ環境やアットラインで実施できます。開発した手法で得られる値は実際の防腐剤濃度と優れた相関性を示し、誤差は基準となる分析法と同等です。本アプリケーションにより、DXR3 Smartラマン分光装置はバイオプロセス環境で生物製剤の最終製品に対する多属性試験を継続的に実施する能力を持つことが示されています。本書に挙げた例のほかにも、DXR3 Smartラマン分光装置をアットラインにおいて使用して、タンパク質濃度、賦形剤濃度、およびオスモル濃度やpHなどの重要な品質特性をモニタリングすることが可能です。このようなバイオ医薬品の製造におけるラマン分光アプリケーションの例を紹介した参考文献を他にも多く提供しています。

参考文献

1. European Medicines Agency. Guideline on Real Time Release Testing. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-real-time-release-testing-formerly-guideline-parametric-release-revision-1_en.pdf (accessed June 15, 2021).
2. Buckley, Kevin, & Ryder, Alan G. (2017). Applications of Raman Spectroscopy in Biopharmaceutical Manufacturing: A Short Review. Applied Spectroscopy, 71(6), 1085-1116. <https://aran.library.nuigalway.ie/handle/10379/7177> (accessed June 15, 2021).

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/Raman

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。
© 2021, 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc FTIR123-B2209CE

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com

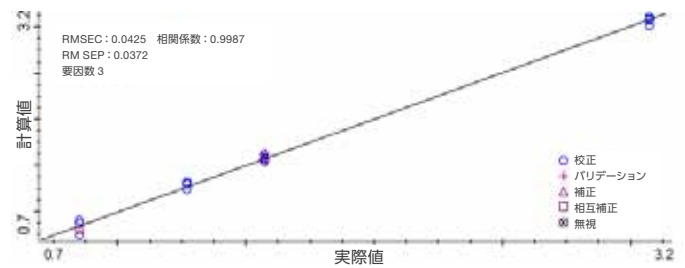


図7. 防腐剤Aの部分最小二乗回帰モデル。

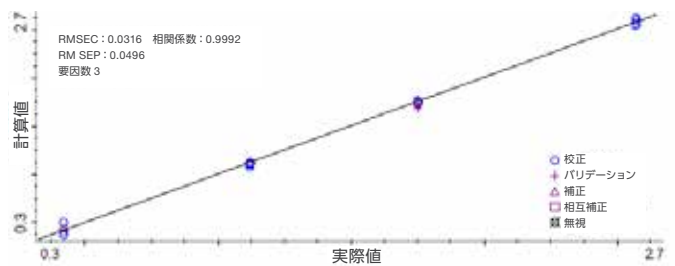


図8. 防腐剤Bの部分最小二乗回帰モデル。

表3. 3 mLおよび10 mLバイアルの校正およびバリデーション結果

	PLS結果、3 mLカートリッジおよび10 mLバイアル	
	防腐剤A (mg/mL)	防腐剤B (mg/mL)
バリデーションサンプル: 3 mL	1.58 実際値 1.57	1.71 実際値 1.75
実際のサンプル、溶液: 3 mL	1.56 実際値 1.55	1.65 実際値 1.77
実際のサンプル、懸濁液: 3 mL	0.80 実際値 0.69	1.21 実際値 1.58
実際のサンプル、懸濁液: 10 mL	0.73 実際値 0.68	1.32 実際値 1.57