

ChromSwordAuto ソフトウェアによる 脂質核酸送達システムの AQbD ベースの 分析法の開発

著者

Dr. Aline Bayerle
Agilent Technologies, Inc.

概要

UHPLC メソッドは、自動化された分析のクオリティバイデザイン (Analytical Quality by Design : AQbD) アプローチを用いた、脂質ベースの核酸送達システムとその構成要素の分析用に開発されました。ChromSwordAuto ソフトウェアと、対応するスマートアルゴリズムを使用することで、このプロセスが容易になりました。実験計画法 (Design of Experiment : DoE) とクロマトグラフィー分離能を分析目標プロファイル (analytical target profile: ATP) として使用して、デザインスペースを生成しました。開発したメソッドは Agilent ZORBAX StableBond CN カラムに基づいており、すべてのピーク間のベースライン分離と、各種媒体タイプでの高いメソッド堅牢性を示しています。

はじめに

RNA ベースの製品は、グローバルなワクチン接種用のデフォルト技術として確立されました。RNA 技術の科学的分野は幅広いため、その生産プロセスと制御戦略は不均一で複雑です。製品品質の確保に向けた RNA 製品のより厳格な規制ガイドラインは、まだ確立されていません。^{1,2} 製品と製造に関するより深い知識を構築する方法の 1 つは、RNA プラットフォームのライフサイクル全体で、クオリティバイデザイン（Quality by Design：QbD）を適用することです。³ このプロセスの基本的要素は分析メソッドの開発です。これにより、ICH ガイドラインに記載されている品質原則を実践できます。この新しいキャリアシステムクラスの分析に体系的な AQbD アプローチを適用することは、パラダイムシフトとなりうるものであり、安定した製品品質の確保に役立つ可能性があります。

ステージ 1 の手順設計

QbD の基本概念は、単独の試験を増やしても製品品質の確保には不十分であるということです。このため、DoE のリスク評価を使用して、メソッド性能に影響するパラメータを調査します。DoE の結果により、信頼性の高いメソッド使用条件の領域、つまりメソッド運用に許容できる入力因子の変動可能領域（Method Operable Design Region：MODR）を特定できます。ステージ 1 の手順設計へのアプローチについては、ICH ガイドラインなどを参照してください。^{4, 5}

一般的に、手順設計は図 1 のステップに従います。まず、化学構造、物理化学的性質、およびその他のあらゆる関連情報に関する知識を収集してから、ATP が定義されます。図 1 の ATP は、このメソッドの性能要件を示しています。次に、開発するメソッドに適した重要な品質特性（critical quality attribute：CQA）が定義され、最初リスク評価に使用されます。脂質ベースの RNA 媒体に関連する CQA は、脂質含有量と脂質特性です。特定の分析メソッド（許容基準など）は、まだ規制のフレームワークで定義されていません。³

重要工程パラメータ（critical process parameter：CPP）は、メソッド性能への影響が最も大きいパラメータです。これらのパラメータは、データ生成中のマルチバリエーションアプローチにおいて変わります。DoE と ChromSwordAuto を付属のスマートアルゴリズムと共に適用すると、高速なデータ取り込みと信頼性の高い MODR の設計が可能になります。DoE は、使用できるケモメトリックスツールの 1 つにすぎません。この他に、予測モデリングツールや、パターン認識用のその他の数学的ツールがあります。

ステージ 1 の手順設計により知識が強化され、規制に関する柔軟性が向上して、承認後の変更や根本原因の分析が簡素化されます。

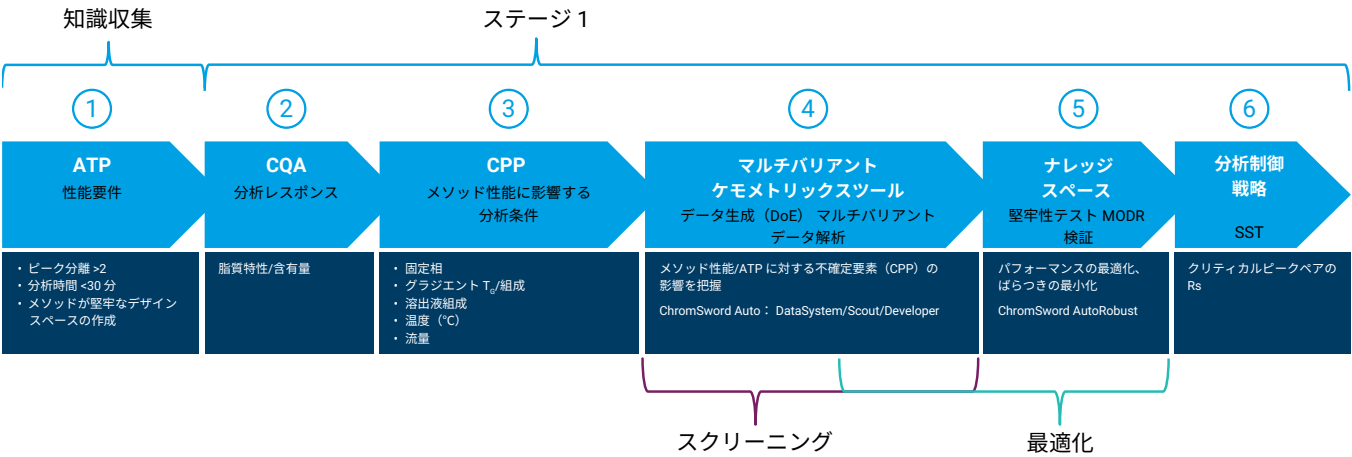


図 1. ステージ 1 の手順設計。ATP：分析目標プロファイル、CQA：重要品質特性、CPP：重要工程パラメータ、DoE：実験計画法、MODR：メソッド運用に許容できる入力因子の変動可能領域、SST：システム適合性テスト

脂質ナノ粒子関連の知識収集

脂質ナノ粒子（LNP）は通常、4つの主成分、つまりコレステロール、中性リン脂質（主にジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC））、イオン化脂質、ポリエチレングリコール（PEG）脂質で構成されます。^{6,7} これらの構造脂質が、粒子のサイズ、構造、安定性、核酸カプセル化効率、細胞への取り込み、エンドソーム脱出を制御します。⁸

LNP 組成の製剤とイオン化脂質の設計は、大きく進歩してきました。⁸ この結果、さまざまな送達システムの組成が誕生し、DSPC の量を減らし、新たに設計されたイオン化脂質の量を増やす傾向が強まっています。これに対し、一部の古い送達製剤には、最大 85 mol% のリン脂質が含まれていました。⁹ リボソーム、安定化されたプラスミド脂質粒子（SPLP）などの製剤は、DNA プラスミドを水性コアに取り込みます。^{9,10,11} リポブレックス¹² や LNP は、いくつかの核酸カーゴタイプ（siRNA、mRNA、microRNA、DNA など）と一緒に取り込まれてきました。⁸ 今回の実験で使用する各種媒体タイプの組成と、それらを表す原型脂質の概要については、表 1 を参照してください。

表 1. 各種媒体タイプと原型脂質の組成の概要。脂質ナノ粒子（LNP）の組成は、Onpatro、Moderna（Spikevax）、Pfizer（Comirnaty）のワクチンのものです。

媒体タイプ	脂質の役割	脂質の例
リボソーム	ヘルパー脂質	コレステロール
	リン脂質	DSPC
	PEG 脂質	PEG-DSPC
リポブレックス	カチオン性脂質	DOTMA
	リン脂質	DSPC
SPLP	ヘルパー脂質	コレステロール
	リン脂質	DSPC
	カチオン性脂質	DOTAP
LNP	イオン化脂質	MC3、ALC-315、SM102
	PEG 脂質	ALC-159、PEG-DMG
	リン脂質	DSPC
	ヘルパー脂質	コレステロール

実験

標準試薬および化学物質

脂質標準 N-[2,3-(ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム（DOTMA）、1,2-ジオレイル-3-N,N,N-トリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、およびコレステロールは、Avanti Polar Lipids, Inc. から購入しました。DLin-MC3-DMA（MC3）、（ヘプタデカン-9-イル 8-((2-ヒドロキシエチル)(6-オキソ-6-(ウンデシレノイル)ヘキシル)アミノ)オクタン酸（SM-102）、DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N,N-ジテトラデシルアセトアミド（ALC-0159）、2-ヘキシル-デカン酸、および 1,1'-[[4-ヒドロキシブチル]イミノ]ジ-6,1-ヘキサンジイル]エステル（ALC 0315）は Cayman Chemical から購入しました。

各標準液は原液用にメタノールで溶解し、等モルの混合液に添加して同等のピーク面積を達成しました。使用した溶媒は、すべて LC/MS グラジエントグレードです。酢酸アンモニウムは Sigma-Aldrich（シュタインハイム、ドイツ）から購入しました。

機器

初期スクリーニング段階用：

- Agilent 1260 Infinity II クォータリポンプ（G7111B）
- Agilent 溶媒選択バルブ：外部バルブドライブ（G1170A）+ 12 ポジション/13 ポートバルブ（G4235A）
- Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラ（G7116A）
- Agilent 1290 Infinity II MCT（G7116B）、#058：内部バルブドライブ
- Agilent 8 カラム選択バルブ（G4239C）
- Agilent 1290 Infinity II ELSD（G7102A）

その他のすべての実験：

- Agilent 1290 Infinity II Bio バイナリポンプ（G7132A）
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ（G7137A）、サンプルサーモスタット付き（オプション 101）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）と Agilent バイオコンパチブル 6 カラム選択バルブ（部品番号 5320-0025）および 6 カラム選択バルブバイオコンパチブルキャピラリーキット、内径 0.12 mm（部品番号 5005-0070）
- Agilent 1290 Infinity II ELSD（G7102A）

ソフトウェア

- 自動実験には ChromSword AutoRobust を含む ChromSwordAuto 5.1 自動メソッド開発ソフトウェアパッケージ（バージョン 5.1.340.944）を使用
- 最終検証には Agilent OpenLab CDS 2.7 を使用

結果と考察

ワークフロー

表 1 の化合物はそれぞれ化学的性質が異なるため、すべての化合物を 1 つのメソッドで分離し、優れたピーク形状を得るのは困難です。ChromSword ソフトウェアの利点を適切に評価するため、メソッド開発プロセスには次の 4 つのステップを含めました。

- 1. スクリーニング (ChromSwordAuto DataSystem)
- 2. 最適化 (ChromSwordAuto Developer/AutoRobust)
- 3. 堅牢性テスト (ChromSword AutoRobust)
- 4. 検証 (ChromSwordAuto DataSystem/Agilent OpenLab CDS 2.7)

ChromSwordAuto は市販されており、AQbD の原則に準拠したメソッド開発のためのスタンドアロンソフトウェアとして使用されます。ChromSwordAuto は、必要なすべての取り込みメソッドを作成し、データ解析ツールを提供することで、メソッド開発の自動化を支援します。

スクリーニング

この実験段階では、DoE アプローチを導入し、AQbD の原則に準拠してメソッドを開発しました。図 1 に、メソッドパラメータ (選択性、分離能、リテンション、ピーク形状など) に対する重大な影響が確認された重要工程パラメータを示します。このため、メソッド開発のスカウティング段階で、可変のカラムケミストリ、グラジエント時間、有機溶媒組成を調査しました。

ChromSwordAuto DataSystem ではクォータナリグラジエント組成を使用できるため、最初のスクリーニングの実行は表 2 の設定で設計しました。図 2 のとおり、8 種類のグラジエントを適用しました。有機溶媒 1 としてのイソプロパノール (グラジエント 1 ~ 4) または有機溶媒 1 としてのアセトニトリル (グラジエント 5 ~ 8) を、量を増やしながらメタノールと混合しました。

スクリーニング段階用に設計されたグラジエント

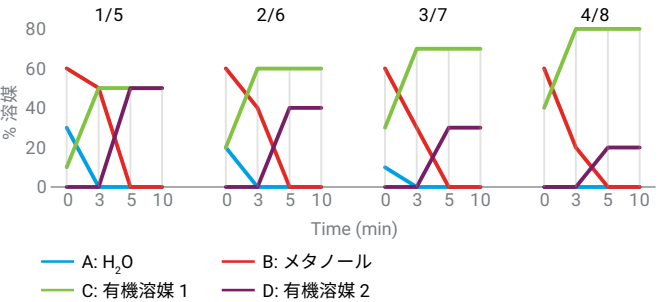


図 2. カラムスクリーニングと溶媒組成用に設計されたグラジエント。グラジエント 1 ~ 4 ではイソプロパノール、グラジエント 5 ~ 8 ではアセトニトリルの割合を高めています。

表 2. スクリーニングパラメータ

パラメータ	値
溶媒	A) 10 mM NH ₄ Ac、H ₂ O で溶解 B) 10 mM NH ₄ Ac、90:10 MeOH:H ₂ O で溶解 C) 10 mM NH ₄ Ac、90:10 IprOH:H ₂ O で溶解 D) 10 mM NH ₄ Ac、90:10 ACN:H ₂ O で溶解
分析時間	10 分
流量	0.4 mL/min
温度	40 °C
カラム	P1 : 50 × 2 mm Agilent ZORBAX Eclipse Plus Silica/C18 P2 : 50 × 2 mm Agilent ZORBAX StableBond Silica/Phenyl P3 : 50 × 2 mm Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP P4 : 50 × 2 mm Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl P5 : 50 × 2 mm Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 P6 : 50 × 2 mm Agilent ZORBAX StableBond Silica/CN

ChromSword では、1 回の分析あたりのピーク数と全体的な分離能が統計的に評価されるため、データ解析が容易です。図 3 のとおり、2 種類のカラム/グラジエントの組み合わせ (ZORBAX StableBond Silica/CN と InfinityLab Poroshell 120 CS-C18) では、10 個のピークのうち 7 個が検出されました (許容可能なピーク形状と最高の全体的分離能を含む)。一般的に、イソプロパノールは強い溶媒なので、分離度が下がります。このため、以後のステップには H₂O:MeOH:ACN の間のグラジエントが適しています。CS-C18 相でのピークはすべて、100 % の有機溶媒で、イソクラティックホールドで溶出しました。つまり、CS-C18 相は分離能力が低く、選択したターゲット化合物にとっては保持が強すぎると考えられます。

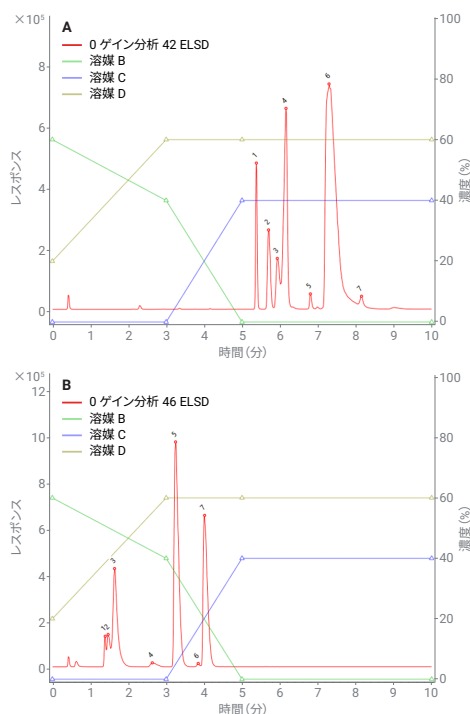


図 3. スクリーニングからの結果。(A) Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 とグラジエント 7。(B) Agilent ZORBAX StableBond Silica/CN とグラジエント 7。1 % 未満のピーク面積は考慮しませんでした。

最適化

スクリーニングの結果を使用して、ChromSwordAuto Developer 内のアルゴリズム「高分子の高速最適化」を用いた最適化の実行を設計しました。1290 Infinity II Bio LC とバイナリポンプを使用して高速グラジエントを実行し、化合物と内部表面の間の二次的反応を最小限に抑制しました。この実験には、2 種類の寸法と同じカラムケミストリを選択しました。

- **P1** : 50 × 3 mm ZORBAX StableBond Silica/CN (部品番号 857700-305)
- **P2** : 100 × 3 mm ZORBAX StableBond Silica/CN (部品番号 858700-305)

その他の設定：

パラメータ	値
流量	0.5 mL/min
温度	30 °C
分析時間	18 ~ 48 分
溶媒 A1	10 mM NH ₄ Ac, 30:70 H ₂ O:MeOH で溶解
溶媒 B1	10 mM NH ₄ Ac, 90:10 ACN:H ₂ O で溶解

溶媒の濃度は、Developer ツール内で B1 10~100 % に制限しました。

高速最適化アルゴリズムは、グラジエントの複雑さ、勾配、長さ、ブレイクポイントタイミングが異なる 4 回の分析を設計します。フォローアップ分析と対応するグラジエントは、結果に従って、シーケンス中にインテリジェントに適合されます。結果は設定の除去レベルに依存し、これによりピーク積分が制御されます。各分析後に、平衡化とカラム洗浄が自動的にスケジュールされます。

いずれのカラム寸法でも、必要なピーク 10 個がすべて検出されました。100 mm のカラムは、図 4A のとおり、優れたピーク形状と分離能を示しました。

化合物の数と化学的特性の違いを考えると、この時点ですでに優れた結果を得られています。興味深いことに、ピーク 1 とピーク 2 の間で、1 つ以上の余分なピークの移動が見られました。これは、予測したピーク数を超えるものでした。他の隠れた化合物を除外し、ピークを正確に追跡するため、「高分子の長時間の高速最適化」アルゴリズムを用いて、別のシーケンスを設計しました。このアルゴリズムには、5 ~ 6 回の分析で構成される同様のルールが適用されます。溶媒の濃度を B1 25 ~ 85 % に制限し、流量を 0.6 mL/min に設定しました。結果を図 4B に示します。

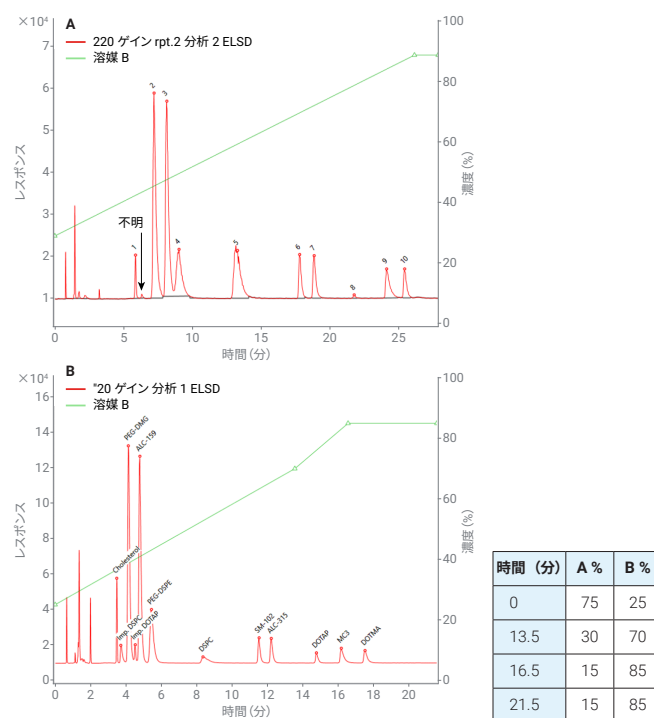


図 4. 結果の最適化。(A) Agilent ZORBAX StableBond Silica/CN 100 mm による最高の高速最適化シーケンス。(B) Agilent ZORBAX StableBond Silica/CN 100 mm による最高の長時間高速最適化シーケンス。2 分未満のリテンションタイムは考慮しませんでした。

2 回目の最適化の結果で、2 種類の不純物の存在が確認されました。単一の標準液を注入して発生源を慎重に調査したところ、これらの不純物が DOTAP と DSPC に由来することがわかりました。2 分未満で検出されたピークは、使用した標準液の対イオンに由来するもので、今回の実験では考慮しません。

DoE を使用すると、メソッド開発プロセスの初期で不純物の存在を検出できることがわかります。このため、この知識を用いて MODS を作成し、メソッド性能に対する CPP の影響を完全に理解します。これまで、流量と温度の影響は調査していませんでした。基本グラジエントを適合させて、同定された不純物用のスペースをナレッジスペース内に作りました。

基本メソッド設定：

パラメータ	値
カラム	Agilent ZORBAX StableBond Silica/CN、100 × 3 mm (部品番号 858700-305)
流量	0.6 mL/min
温度	30 °C
グラジエント	0 ～ 6 分 27 %B 6 ～ 15 分 27 ～ 85 %B 15 ～ 20 分 85 %B
溶媒 A	10 mM NH ₄ Ac、30:70 H ₂ O:MeOH で溶解
溶媒 B	10 mM NH ₄ Ac、90:10 ACN:H ₂ O で溶解

これに応じて、表 3 の基準で AutoRobust を使用しました。

表 3. デザインスペース作成用の ChromSword AutoRobust の設定

特性	値	± 値	± ステップ
濃度 B (%)	27 開始 85 終了	5	3
ブレイクポイントタイム (分)	15	1	2
カラム温度	30	5	3
流量 (mL/min)	0.6	0.1	2

図 5 に、温度と移動相の濃度の関係を示します。ブレイクポイント時間の変化により、少し影響があることがわかりました。溶媒 B の開始濃度と終了濃度、温度、流量は、ピーク分離能への影響が非常に大きい CPP です。

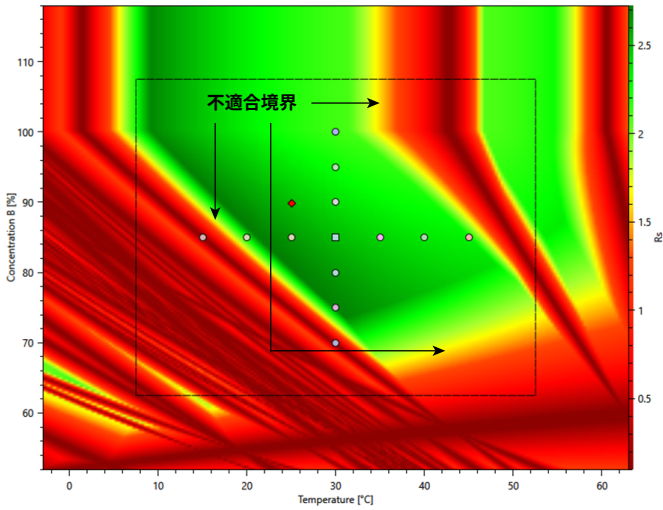


図 5. Agilent ZORBAX StableBond Silica/CN 100 mm によるメソッド運用に許容できる入力因子の変動可能領域 (MODR)。分離能は >2 に設定しています。点は、同時に 1 つの係数で取得したデータを表します。赤い点は、選択した作用点です。

選択した条件によっては、後のピークの溶出が不完全でした。したがって、リテンションタイム (RT) の予測は不正確です。対象のピークは共溶出として追跡され、MODR 内の赤色のスペースに表示されています。

不適合境界の外側の作用点を選択しました (図 5 の赤い点)。この際には、不純物の存在を考慮しました。実際には、これらの化合物が共存することはありません。

作用点の設定は次のとおりです。

パラメータ	値
カラム	ZORBAX StableBond Silica/CN、100 × 3 mm (部品番号 858700-305)
流量	0.5 mL/min
温度	25 °C
グラジエント	0 ～ 6 分 27 %B 6 ～ 15 分 27 ～ 90 %B 15 ～ 25 分 90 %B
溶媒 A	10 mM NH ₄ Ac、30:70 H ₂ O:MeOH で溶解
溶媒 B	10 mM NH ₄ Ac、90:10 ACN:H ₂ O で溶解
ELSD 設定	
エバポレータ温度	50 °C
ネブライザ温度	45 °C
ガス流量	1.6 SLM
データレート	10 Hz

堅牢性

2 回目は ChromSword AutoRobust を厳しい制限で使用し、一般的な LC 操作範囲の失敗を再現して、堅牢なスペースを描出しました。条件を表 4 に示します。基本メソッド設定は、選択した作用点と同じです。

表 4. 堅牢なスペース作成用の ChromSword AutoRobust の設定

特性	値	± 値	± ステップ
濃度 B (%)	27 開始 90 終了	5	1
ブレイクポイントタイム (分)	15	1	1
カラム温度	25	5	1
流量 (mL/min)	0.5	0.05	1

堅牢なスペースの視覚化 (図 6A) と対応するクロマトグラム (図 6C) から、メソッド運用で許容できるスペース内に作用点が入っていることを確認できます。すべての不純物を堅牢なスペースに含めると (図 6B)、スペースが非常に小さくなり、最悪のシナリオになります。図 6D のクロマトグラムのとおり、作用点でのピーク分離能は引き続き >2 です。最悪のシナリオ内で MODR を再び小さくすることで、QbD の効果がわかります。実験結果により、メソッド変更 (不純物の追加発生の実装など) が可能になります。

検証

ステージ 1 のメソッド開発の最終ステップは、デザインスペースの検証です。この目的のため、堅牢なスペース内で選択した条件を再実行しました。結果は図 6E の予測リテンションタイムに対してプロットします。リテンションタイムの予測値と実験値の一致率は高く、決定係数 $R^2 = 0.9999$ となります。

メソッドの検証データと堅牢性に基づき、リスク評価では、メソッド性能について豊富な知識を得られることがわかります。適切なシステム適合性テストは、メソッド制御戦略に必要な唯一の制御要素となる可能性があります。

また、各種媒体タイプ (SPLP、リボプレックス、リボソーム、LNP 製剤) の実際の混合物内の全体的な分離能について、検証ステップからのデータを調査しました。全体的に、すべての検証実験において、検出された最小分離能は 3.74 でした。図 6F のとおり、作用点での最小分離能は 4.1 です。これらはいずれも組成内で見られるもので、Moderna の LNP 製剤 (Spikevax) でも同じです。これらの結果から、メソッドを実際のサンプルに使用できることがわかります。

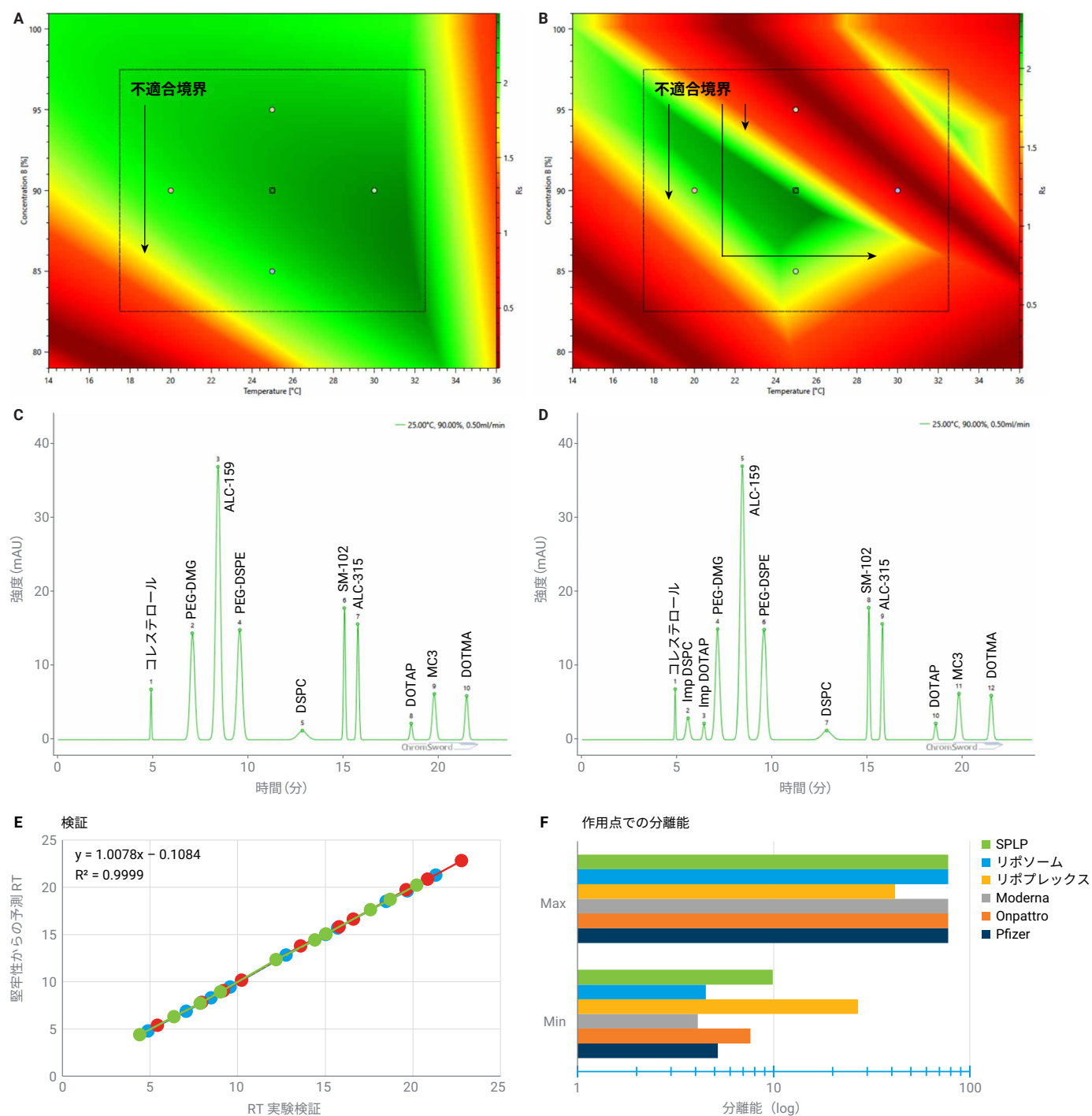


図 6. (A) ターゲット化合物の作用点での堅牢なスペースと予測クロマトグラム (C)。(B) 不純物を含む作用点での堅牢なスペースと予測クロマトグラム (D)。分離能は >2 に設定しました。点は、同時に 1 つの係数で取得したデータを表します。緑色の点は、選択した作用点です。(E) すべての化合物の堅牢なスペースの検証 (5 つの検証条件をプロット)。(F) 選択した作用点での各種媒体タイプと脂質ナノ粒子製剤の最小/最大分離能。X 軸は対数スケールです。

結論

Agilent 1290 Infinity II Bio LC と Agilent ZORBAX StableBond Silica/CN のカラムケミストリを用いて、さまざまな脂質ベースの核酸の媒体タイプを分析しました。最新のバイオ医薬品アプリケーションと複雑な各種成分の課題を考えると、ChromSwordAuto ソフトウェアとアジレントのシステムを組み合わせることは、メソッド開発プロセス全体の自動化にとってメリットがあります。本書で説明した効率的なメソッド開発プロセスに必要なのは、(全部で) 4 つのステップと 5 回の測定、そして目的に適したアルゴリズムを使用し、ターゲット分子のニーズを取り込むことだけです。

分析メソッドの開発において AQbD の原則を使用することで、堅牢で再現性の高いメソッドを取得し、特定の LNP 製剤のアクセシビリティや純度など、将来のテストに向けたバックグラウンドを構築できます。

参考文献

1. Knezevic, I. *et al.* Development of mRNA Vaccines: Scientific and Regulatory Issues. *Vaccines* **2021**, 9(2), 81.
2. Liu, M. A. *et al.* WHO Informal Consultation on Regulatory Considerations for Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of RNA-Based Prophylactic Vaccines for Infectious Diseases, 20–22 April 2021. *Emerg. Microbes & Infect.* **2022**, 11(1), 384-391.
3. Daniel, S. *et al.* Quality by Design for Enabling RNA Platform Production Processes. *Trends Biotechnol.* **2022**.
4. Peraman, R.; Bhadrara, K.; Padmanabha Reddy, Y. Analytical Quality by Design: a Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. *Int. J. Anal. Chem.* **2015**.
5. Reid, G. L. *et al.* Analytical Quality by Design (AQbD) in Pharmaceutical Development. *Am. Pharm. Rev.* **2013**, 144191.
6. Schoenmaker, L. *et al.* mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *Int. J. Pharm.* **2021**, 601, 120586.
7. Evers, M. J. W. *et al.* State - of - the - Art Design and Rapid - Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* **2018**, 2(9), 1700375.
8. Albertsen, C. H. *et al.* The Role of Lipid Components in Lipid Nanoparticles for Vaccines and Gene Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, 188, 114416.
9. Wheeler, J. J. *et al.* Stabilized Plasmid-Lipid Particles: Construction and Characterization. *Gene Ther.* **1999**, 6(2), 271–281.
10. Tam, P. *et al.* Stabilized Plasmid-Lipid Particles for Systemic Gene Therapy. *Gene Ther.* **2000**, 7(21), 1867–1874.
11. Maurer, N. *et al.* Spontaneous Entrapment of Polynucleotides Upon Electrostatic Interaction with Ethanol-Destabilized Cationic Liposomes. *Biophys. J.* **2001**, 80(5), 2310-2326.
12. Khatri, N. *et al.* Development and Characterization of siRNA Lipoplexes: Effect of Different Lipids, *In Vitro* Evaluation in Cancerous Cell Lines and *In Vivo* Toxicity Study. *AAPS PharmSciTech.* **2014**, 15, 1630–1643.

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。

DE92376743

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, August 14, 2023

5994-6641JAJP