

Agilent Cary 3500 UV-Vis マルチゾーン 温度機能を用いた抗体薬物複合体の 重要品質特性の解析

著者

Aveline Neo and
Suresh Babu C.V.
Global Solution Development
Center
Agilent Technologies
Singapore (Sales) Pte Ltd.

概要

抗体薬物複合体（ADC）は、顕著な成長が見込まれているバイオ医薬品です。製造時に重要になるのは、薬物抗体比（DAR）や凝集体のような、ADC の重要品質特性（CQA）をモニタリングすることです。このアプリケーションノートでは、ADC の DAR および凝集体インデックスの分析において、複数の温度でサンプルを同時に分析するという独自の機能を備えた、Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計の機能的な利点について説明します。Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計では、ソフトウェアでのカスタムの式機能、シンプルな手法、および正確な温度制御を使用して、DAR および凝集体インデックスを高い信頼性で簡単に測定できます。

はじめに

ADC は、特異的なターゲット作用モードを備えているため、医薬品企業の創薬パイプラインの中で急速に成長を遂げている分野です。¹DAR を測定することにより、各抗体に結合している細胞傷害性低分子の平均数が得られます。これは製品の安全性や効能に大きな影響を与えるため、一般的に CQA として認識されています。さらに DAR は、凝集体を形成する製品の傾向に多大な影響を及ぼすことも知られており²、この際に免疫反応を引き起こす場合もあります。このため、開発時に ADC の DAR と凝集体を分析することが不可欠です。

UV-Vis 分光光度計は、バイオ医薬品ラボの一般的な主要テクニックであり、タンパク質の濃度を測定するための堅牢で便利な分析手法として使用されています。このアプリケーションノートでは、抗体骨格とは異なり吸光度が最大の紫外可視発色団が細胞傷害性低分子に含まれている限り、UV-Vis 分光光度計が ADC の DAR の測定にも使用できることを示します。¹

Agilent Cary 3500 UV-Vis は簡単かつ迅速に使用することができ、4 ペアのキュベットで 4 つの異なる温度実験が同時に実行可能な、ハイスループットで正確な温度制御機能が搭載されています。複数のサンプルの UV 吸光度を同時に測定することにより、不要な可変性要素を取り除き、生成される結果の信頼性を高めます。また、簡単なメソッド設定とカスタム計算は、使いやすい機能です。Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計は、Agilent OpenLab ソフトウェアに対応しています。OpenLab ソフトウェアで構成する際には、ラボが FDA 21 CFR Part 11 のコンプライアンスガイドラインに準拠するのをサポートします。この実験では、Agilent Cary 3500 UV-Vis で DAR および凝集体インデックスを測定する際の利点について示します。

実験方法

装置構成

Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計には、8 つのセルポジションが搭載されています。Cary UV ワークステーションソフトウェア (バージョン 1.0.1284) と Cary 3500 マルチゾーンソフトウェアアドオンを使用し、表 1 に示すパラメータによりデータを取り込みました。

表 1. Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計の実験パラメータ

パラメータ	設定値
X モード	nm
Y モード	吸光度
収集モード	スキャン
スキャン範囲開始	400 nm
スキャン範囲停止	200 nm
平均化時間	0.020 秒
データ間隔 (nm)	1.0 nm
スキャン速度	3,000 nm/min
スペクトルバンド幅	1.0 nm
検出器モジュール	マルチセルベルチェ UV-Vis

試料調製

ハーセプチンとその ADC 類似物は、シンガポールの地元の代理店から購入しました。両方のモノクローナル抗体 (mAb) サンプルを、Vivaspin 500 遠心濃縮スピニングカラム (10 kDa MWCO, Sartorius) を用いて濃縮しました。

Agilent Cary 3500 UV-Vis には、Agilent 角型セル、UV 10 mm、700 μ L オープンキュベット (部品番号 5061-3391) を使用しました。

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 (Merck Millipore) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。

計算

ハーセプチンの ADC 類似物は、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボン酸 (MCC) をリンカーとして、抗チューブリン細胞毒性剤 DM1 に共有結合しています。³次に示す波長における各成分の吸光係数を使用して ($\epsilon_{280 \text{ DM1}} = 5,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、 $\epsilon_{252 \text{ DM1}} = 26,790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、 $\epsilon_{280 \text{ mAb}} = 218134 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、 $\epsilon_{252 \text{ mAb}} = 76,565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)、式 1 により平均 DAR を算出できます。ここで、R は ADC の 252 と 280 nm における吸光度比です。⁴

式 1.

$$\text{平均 DAR} = \frac{(\epsilon_{252 \text{ mAb}} - R \times \epsilon_{280 \text{ mAb}})}{(R \times \epsilon_{280 \text{ DM1}} - \epsilon_{252 \text{ DM1}})}$$

凝集体インデックスは式 2 で計算します。ここで、OD350 は 350 nm での吸光度を表しており、OD280 - OD350 は、280 と 350 nm それぞれとの吸光度の差です。⁵

式 2.

$$\text{凝集体インデックス} = \left(\frac{\text{OD350}}{\text{OD280} - \text{OD350}} \right) \times 100$$

メソッド

0.5 mg/mL のハーセプチンとその ADC 類似物で実験を実施しました。DAR 値の変化を示すために、ハーセプチンとその ADC 類似物を異なる割合で混合し（図 2 内の表）、Agilent Cary 3500 UV-Vis で測定しました。DAR は、Cary UV ワークステーションソフトウェアで式 1 により計算しました。

DAR に対する温度の影響を調べるために、マルチゾーンソフトウェアアドオンを用いて、4 つの実験を同時に実施しました（図 1）。この実験で使用した「スピнкаラム濃縮」ADC の濃度は、280 nm での UV 吸光度を使用して 25 mg/mL であると推定しました。25 mg/mL サンプルの 10 μ L を、390 μ L の水で 40 倍に希釈しました。希釈した ADC 400 μ L を 4 つのキュベットに移し、Agilent Cary 3500 UV-Vis において 60、70、80、および 90 $^{\circ}$ C の温度で 90 分間同時にインキュベートしました。ベースラインを補正した後サンプルの吸光度を測定し、式 1 により DAR 値を計算しました。

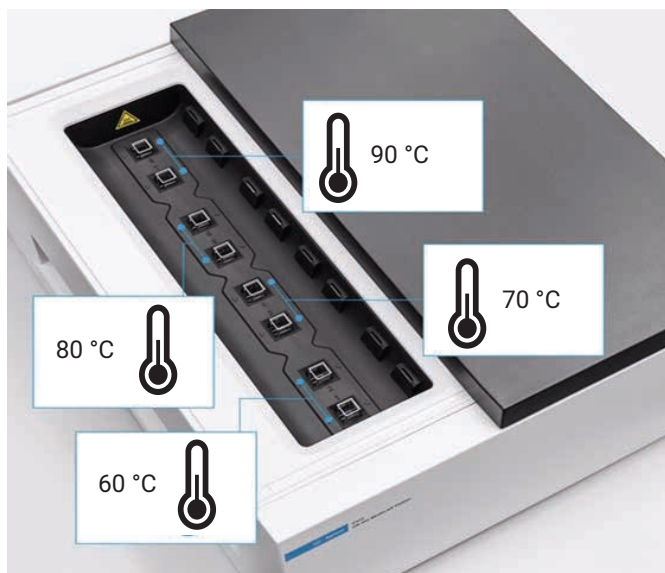


図 1. Cary 3500 マルチゾーン温度制御機能を使用した DAR のモニタリング

時間経過による凝集体の影響を調べるために、10 μ L の 25 mg/mL サンプルを 390 μ L の水で 40 倍に希釈しました。希釈した ADC 400 μ L を 1 つのキュベットに移し、Agilent Cary 3500 UV-Vis で 90 $^{\circ}$ C でインキュベートし、異なる時間間隔でサンプルの吸光度を測定しました。凝集体インデックスを式 2 により計算しました。

結果と考察

Agilent Cary 3500 UV-Vis を使用した薬物抗体比の測定

ADC 複合化の製造を再現するために、異なる割合の ADC と遊離抗体を混合し、Agilent Cary 3500 UV-Vis で DAR を測定しました。図 2 に、ADC と非複合化抗体の混合物の UV-Vis スペクトルを示します。式 2 により、DAR を計算しました。図 2 に示すように、ADC の薬物分子 DM1 は 252 nm で強い吸光度を示し、ハーセプチンの主要な発色団の 280 nm における吸光度とは異なっていました。⁴予想したように、DAR 値は、溶液中の mAb および ADC の割合に応じて異なっていました。

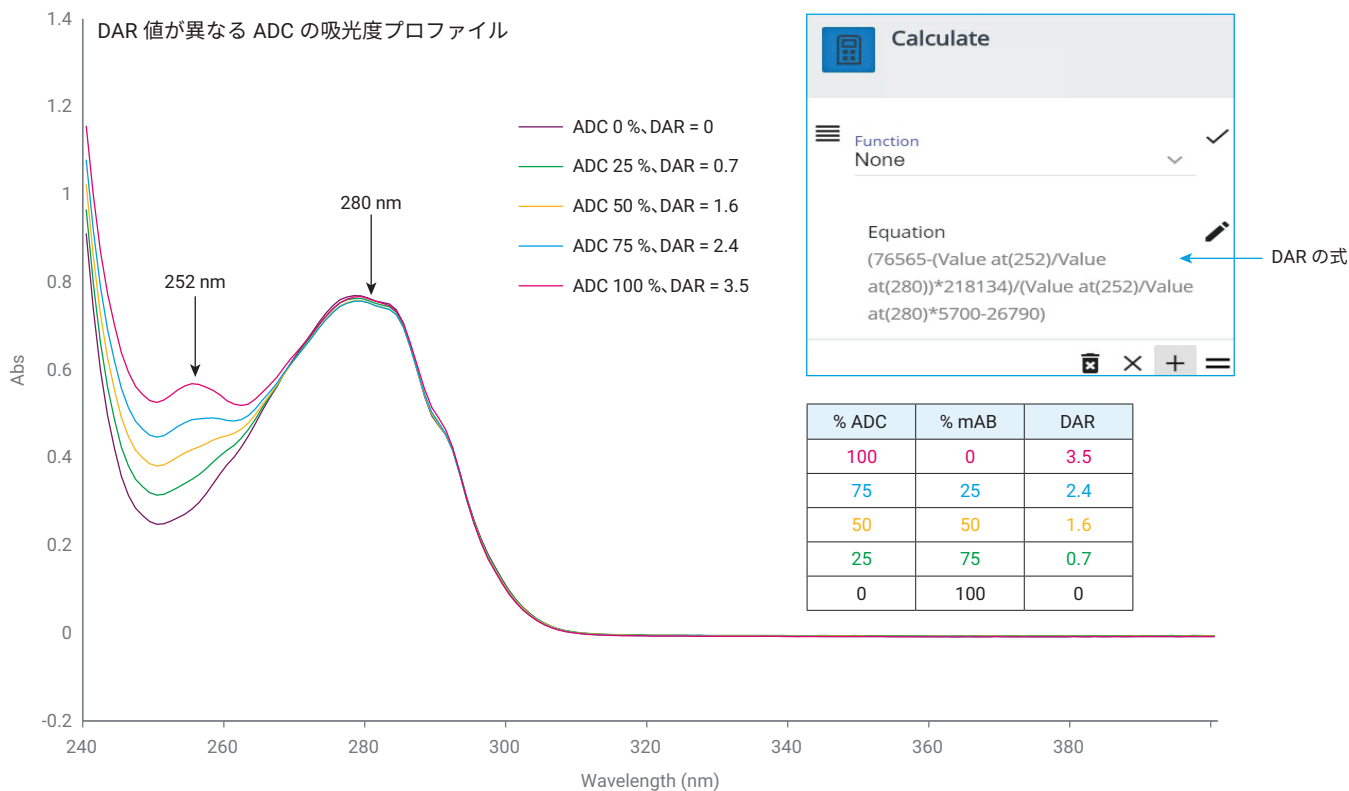


図 2. 平均 DAR 値が異なる ADC と非複合化抗体の混合物の UV-Vis スペクトル

Agilent Cary 3500 UV-Vis とマルチゾーンソフトウェアアドオンを使用して、DAR に対する温度の影響も調査しました。図 3 に、DAR に対する温度の影響を調べた結果を示します。温度が 60 ~ 90 °C に上昇するにつれて、DAR 値が多少シフトしています。このように DAR が減少しているのは、おそらく ADC の凝集体が原因です。²

凝集体の挙動を詳細に調査するために、90 °C において異なる時間間隔で ADC の凝集体インデックスを測定しました。Cary UV ワークステーションソフトウェアで式 2 により、凝集体インデックスを計算しました。図 4 に、異なるタイムポイントにわたる凝集体インデックスを示します。予想したように、高温では時間とともに凝集体が増大していました。

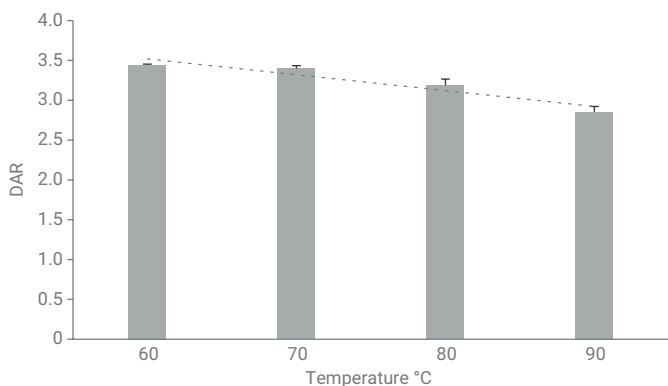


図 3. DAR に対する温度の影響 (n = 3)

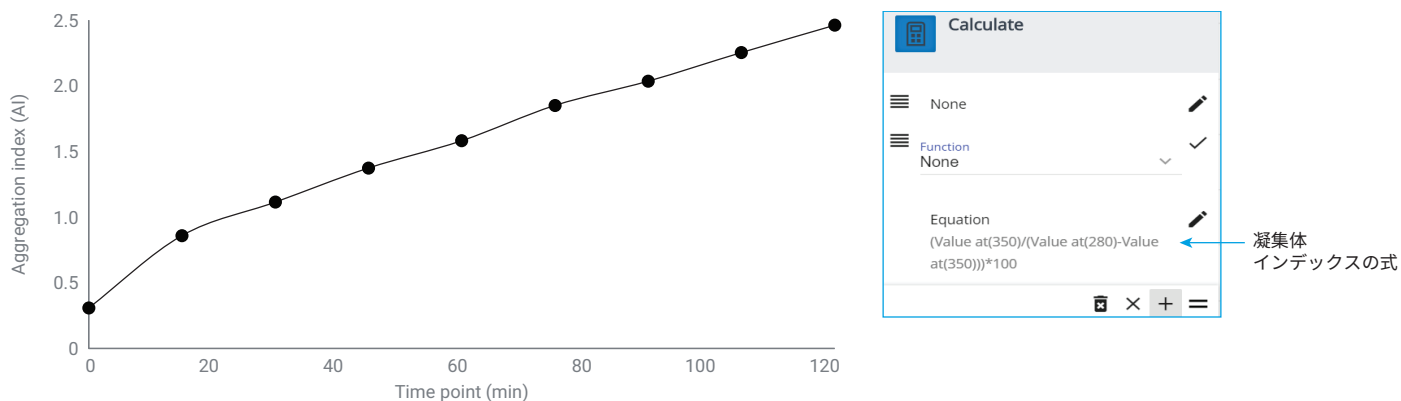


図 4. 凝集体インデックスは、時間の経過とともに変化しています。凝集体インデックスの式は、Cary UV ワークステーションソフトウェアで算出しました。

結論

この実験では、Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計を用いて、ADC 分析に対するシンプルかつ強力なアプローチについて示しました。UV を同時に読み取り、最大 4 つの独立した温度ゾーンを構成できる、Agilent Cary 3500 UV-Vis とマルチゾーンソフトウェアアドオンは、DAR および凝集体インデックス値の測定に最適です。このアプリケーションは、バイオ医薬品業界でのこれらの CQA の分析に使用でき、オプションの 21 CFR Part 11 ソフトウェアツールおよび Agilent OpenLab ソフトウェア製品も規制環境で使用できます。

参考文献

1. Wag, A. et al. Challenges and New Frontiers in Analytical Characterization of Antibody-Drug Conjugates. *MAbs*. **2018**, 10(2), 222–243. DOI: 10.1080/19420862.2017.1412025.
2. Li, W. et al. Antibody Aggregation: Insights from Sequence and Structure. *Antibodies (Basel)*. **2016**, 5(3), 19. DOI: 10.3390/antib5030019.
3. Chen, Y. Drug-to-Antibody Ratio (DAR) by UV/Vis spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 1045, 267–273. DOI: 10.1007/978-1-62703-541-5_16.
4. Abedi, M. et al. Novel Trastuzumab-DM1 Conjugate: Synthesis and Bio-Evaluation. *J. Cell Physiol.* **2019**, 234(10), 18206–18213. DOI: 10.1002/jcp.28453.
5. Padmanaban, A.; Menon, S. Characterization of mAb Aggregation. Agilent Technologies application note, publication number 5991-7971EN, **2020**.

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いません。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。

DE83250769

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, December 12, 2022

5994-5228JAJP