

二重特異性抗体の特性解析に関する課題の克服

最適化された新しいカラムケミストリを用いた製造または保管時の製品不純物の検出

著者

Andrea Angelo Tripodi,
David L. Wong, JianQiu Mi,
and Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

概要

二重特異性抗体はその名前が示すように、2つの別のターゲットまたは抗原に同時に結合できます。この独自の挙動により、幅広いアプリケーションで使用される機会が増えています。¹いくつかの異なる種類の分子は、二重特異性モノクローナル抗体（Bs-MAB）と呼ばれています。このアプリケーションノートでは、非対称結合領域を持つ免疫グロブリン（IgG）のような Bs-MAB であるエミシズマブに焦点をあてます。

エミシズマブ²は、血友病 A1 の治療に使用される第 IXa 抗因子/第 X 因子 Bs-MAB です。これは 2 本の同一ではない重鎖（HC）および 2 本の同一の軽鎖（LC）で構成されています（図 1）。このような非対称な構造により、分子の特性解析がより困難になる場合があります。しかし、モノクローナル抗体生物製剤ではすべて、一次構造を分析して製造と保管時に発生する可能性のある一定範囲の変異体を同定することが不可欠です。

このアプリケーションノートの目的は、二重特異性に関する分野における急速な成長と開発への取り組みを考慮に入れて、複雑な改変抗体の重要な品質特性の特性解析について示すことです。LC/UV や LC/MS を含む、リリース試験、安定性試験、原薬および医薬品の特性解析で一般的に使用されている一連の分析技法を使用しています。

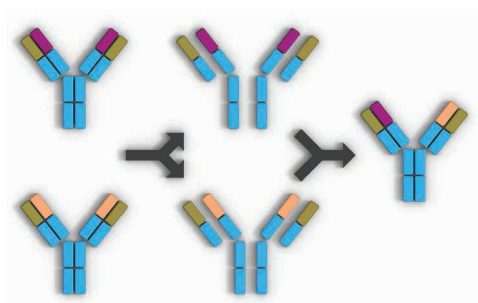


図 1. 代表的な二重特異性 Ab の組成を示す概略図。エミシズマブの場合は、2 本の異なる重鎖が示されています。

はじめに

2020 年 8 月の時点で、世界ではブリナツモマブとエミシズマブという 2 種類の Bs-MAb が承認されています。これらの Bs-MAb は、代表的な新しい改変抗体です。新医薬品開発研究の分野ですますます注目されています。Bs-Mab は、さまざまな分子構造を持つものが研究されており、そのため、このような分子を製造するステップが重要になっています。多くの場合、遺伝子組み換え型 IgG のような Bs-MAb の分離および精製は、分解時に発生する高レベルの製品関連不純物（凝集体、副生成物）およびその他の不純物と関係があります。アジレントはこれらの問題を克服するために、このような不純物の分離に対して最適化された新しい HPLC カラムケミストリを開発しました。

安全性や有効性といった重要なパラメータに留意しながら、アジレントのバイオカラムポートフォリオの製品を使用した、エミシズマブの分離と特性解析の概要について示します。凝集は、生物製剤タンパク質製造において困難な課題であり、製品の有効性や半減期に影響を与える場合があります。サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、タンパク質凝集体の分離に最適な手法です。SEC の次に、ネイティブ型のタンパク質の特性解析と精製で多く使用されている別の穏やかな非変性的テクニックは、イオン交換クロマトグラフィー（IEX）です。これは利用しやすい表面電荷を基にしてタンパク質変異体を分離する手法です。これらの電荷変異体は、グリコシル化、リジン切断などの翻訳後修飾（PTM）に起因する場合があります。

疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）および逆相クロマトグラフィー（RPC）は、類似した塩基リテンションプロセスを有していますが、どちらもインタクト Bs-MAb の特性解析において重要な手法です。HIC 移動相は非変性状態であり、ネイティブのタンパク質構造が維持されている可能性が高くなっています。ただし RPC では、有機溶媒とイオンペア試薬を使用して分離を行うため、これにより多くの場合でタンパク質が変性します。それにもかかわらず RPC は、質量分析に簡単に接続できる点において非常に有利です。

実験方法

試料調製

エミシズマブ（mg/mL）はお客様からご提供いただきました。一塩基性および二塩基性のリン酸水素ナトリウムと塩化ナトリウムは Millipore Sigma から購入しました。試薬はすべて 99.5 % 以上の純度のものを使用しました。水は、Milli-Q A10 純水製造装置（Millipore）で精製しました。移動相は毎日新しく調製し、使用前に 0.22 μm メンブレンフィルタでろ過しました。

装置構成

SEC、IEX、および HIC では、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを次の構成で使用しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートクォータリポンプ（G5654A）
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ（G5668A）、サンプル冷却器（オプション #100）を搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）、バイオイナート熱交換器（オプション #019）を搭載
- Agilent 1260 Infinity II 可変波長検出器（G7114A）

UV によるインタクトおよびサブユニット分析には、Agilent 1290 Infinity LC システムを次の構成で使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ（G4220A）
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ（G4226A）
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント（G1316C）
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器（DAD）（G7115A）

LC/MS 分析

LC/MS 分析は、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせた Agilent 1290 Infinity II LC システムで実施しました。表 1 と 2 は、使用した LC/MS パラメータを示しています。

カラム

- Agilent AdvanceBio SEC 200 $\text{\AA}$ 、 $4.6 \times 300 \text{ mm}$ 、 $1.9 \mu\text{m}$ （部品番号 PL1580-5201）
- Bio MAb、NP5、PEEK、 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ （部品番号 5190-2407）
- Agilent AdvanceBio HIC、 $4.6 \times 100 \text{ mm}$
- Agilent PLRP-S 1000 $\text{\AA}$ 、 $2.1 \times 50 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ （部品番号 PL1912-1502）

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS 2.2 ソフトウェア
- Agilent Buffer Advisor ソフトウェア
- Agilent MassHunter LC/MS（バージョン 10.1）

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

Agilent 1290 Infinity II LC		
サンプルの種類	インタクト mAb	mAb サブユニット (HC および LC)
カラム	Agilent PLRP-S、2.1 × 50 mm、1000 Å、5 µm (部品番号 PL1912-1502)	Agilent PLRP-S、2.1 × 50 mm、1000 Å、5 µm (部品番号 PL1912-1502)
サーモスタット	4 °C	4 °C
溶媒 A	0.1 % 酢酸脱イオン水溶液	0.1 % 酢酸脱イオン水溶液
溶媒 B	0.1 % 酢酸 + 100 % アセトニトリル	0.1 % 酢酸 + 100 % アセトニトリル
グラジエント	0 ~ 1 分、0 ~ 20 % B 1 ~ 3 分、20 ~ 50 % B 3 ~ 4 分、50 ~ 70 % B	0 分、25 % B 5 分、55 % B 6 分、70 % B 6 ~ 7 分、70 % B
カラム温度	80 °C	60 °C
流量	0.5 mL/min	0.8 mL/min

表 2. MS データ取り込みパラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF		
サンプルの種類	インタクト mAb	mAb サブユニット (HC および LC)
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	350 °C	350 °C
ガス流量	12 L/min	12 L/min
ネブライザ	60 psig	35 psig
シースガス温度	400 °C	350 °C
シースガス流量	11 L/min	11 L/min
VCap	5,500 V	4,000 V
ノズル電圧	2,000 V	500 V
フラグメンタ	380 V	180 V
スキマ電圧	140 V	65 V
Quad AMU	1000 <i>m/z</i>	300 <i>m/z</i>
質量範囲	500 ~ 8,000 <i>m/z</i>	100 ~ 3,200 <i>m/z</i>
取り込みレート	1.0 スペクトル/秒	1.0 スペクトル/秒
リファレンス質量	922.0098	922.0098
取り込みモード	ポジティブ、拡張 (10,000 <i>m/z</i>) 質量範囲	ポジティブ、標準 (3,200 <i>m/z</i>) 質量範囲、 HiRes (4 GHz)

結果と考察

逆相クロマトグラフィーによるインタクトおよびフラグメントの分析

PLRP-S 逆相カラムを用いて、インタクトおよび還元サンプルについて LC/MS を実施しました。デコンボリュートしたインタクト質量は明らかに、両方の重鎖において G0F、G1F、および G2F の異なる組み合わせに対応した異なるグリコフォームを示しています (図 2)。還元サンプルの分析では、1 本の軽鎖、および想定される 1 ~ 444 および 1 ~ 448 の配列に対応した同一ではない 2 本の重鎖を示す結果が得られました (図 3 と 4)。

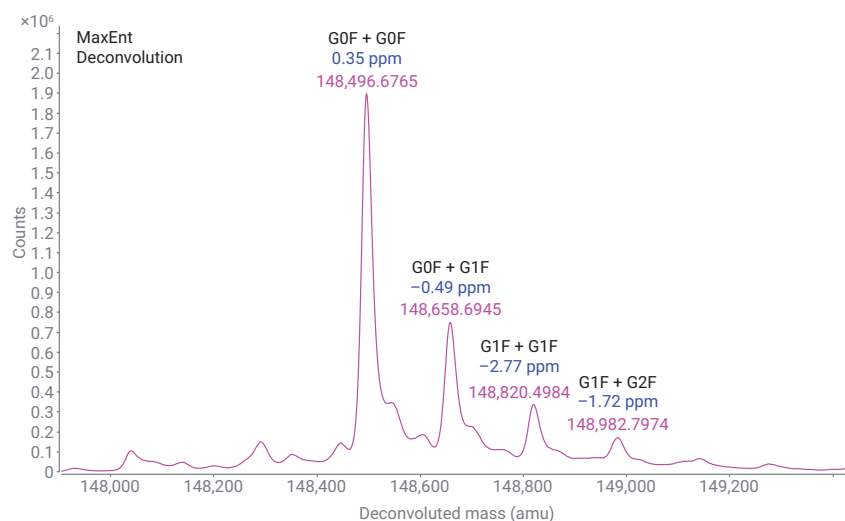


図 2. インタクトエミシズマブの MS デコンボリュートしたスペクトル (0.25 μ g 注入)

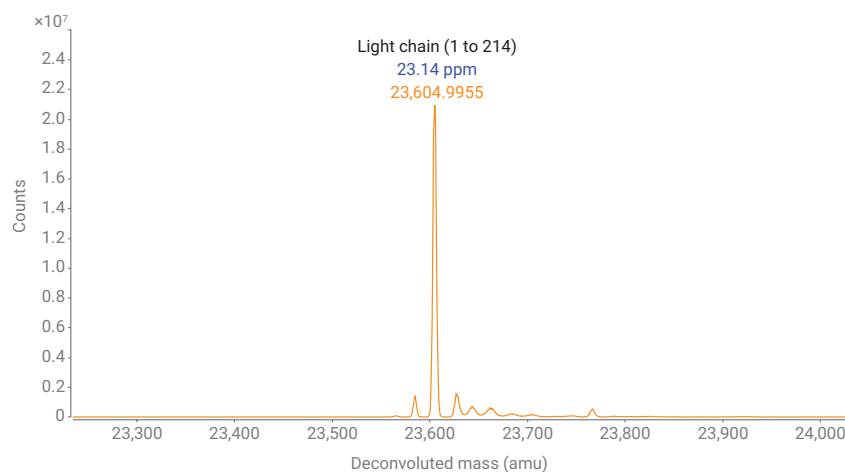


図 3. エミシズマブサブユニットの逆相クロマトグラフィー - 軽鎖 (0.5 μ g 注入)

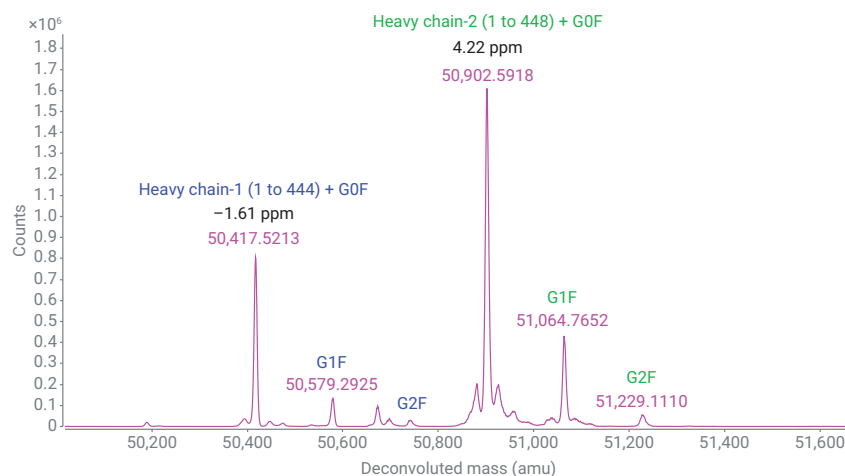


図 4. エミシズマブサブユニットの逆相クロマトグラフィー - 重鎖 (0.5 μ g 注入)

サイズ排除クロマトグラフィーによる凝集体の分析

SEC を使用して、サイズ変異体を特性解析しました。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm カラムを使用して、分離を実施しました。pH 6.8 の 150 mM リン酸緩衝液、および 200 mM

NaCl を含む pH 6.8 の 50 mM リン酸緩衝液という 2 種類の移動相を調べて、SEC 分析をしました。クロマトグラムを図 5 に示します。表 3 に、単量体のピーク対称性、ピーク半値幅、および凝集体の割合について、2 種類の移動相を使用した結果を示します。塩を添加

することにより、より対称的でより狭い単量体ピークが得られています。液体クロマトグラフィーのパラメータを表 4 に示します。

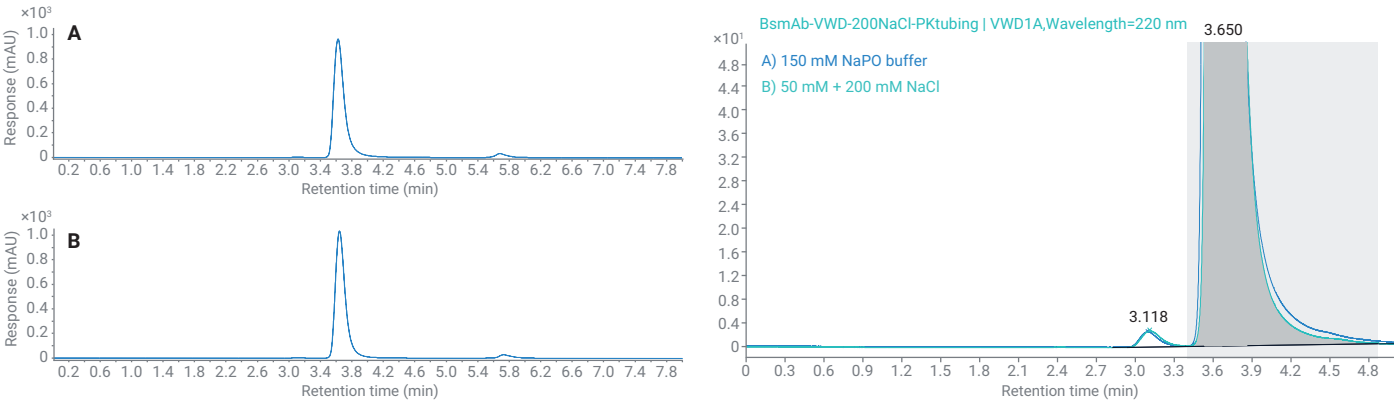


図 5. 移動相を含むエミシズマブの SEC クロマトグラム：(A) pH 6.8 の 150 mM リン酸緩衝液、(B) 50 mM リン酸緩衝液 + 200 mM NaCl、pH 6.8

表 3. 移動相を使用した SEC 単量体のピーク対称性、ピーク半値幅、および凝集体の割合：pH 6.8 の 150 mM リン酸緩衝液および 200 mM NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 6.8

	幅 50 %	非対称性 (As)	単量体 %	凝集体 %
150 mM リン酸、pH 6.8	0.137	1.45	99.7	0.25 %
50 mM リン酸 + 200 mM NaCl、pH 6.8	0.132	1.35	99.7	0.30 %

表 4. SEC 分析の LC パラメータ

パラメータ	設定値				
カラム温度	25 °C				
移動相	溶出液：NaPO、pH 7.0				
A) 水		A	B	C	D
B) 1 M NaCl					
C) 245 mM NaH ₂ PO ₄	150 mM	55.3	0.0	21.5	23.3
D) 420 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM + 200 mM NaCl	65.5	20.0	6.2	8.3
流量	0.35 mL/min				
注入量	3 μL				
検出	UV (280 nm)				

イオン交換クロマトグラフィーによる電荷変異体の分析

カチオン交換クロマトグラフィーを使用して、電荷変異体を特性解析しました。塩グラジエントによる分離を行う場合、移動相前処理の効率化、プロセスのスクリーニング、および塩グラジエントの定義において Buffer Advisor ソフトウェアが非常に有用です。最適化された移動相およびグラジエント条件下での電荷変異体のプロファイルを図 6 に示します。メインピークの前に溶出したピークは酸性変異体であると考えられ、メインピークの後に溶出したピークは塩基性変異体に相当すると考えられます。これらの種のピーク面積の積分値および LC 条件を表 5 と 6 に示します。ここに示されているように、サンプルには塩基性変異体と比較して、酸性変異体の方が多く含まれていました。電荷の不均質性は、特にグリコシル化

および C 末端リジンの損失を含むさまざまな PTM を示しており、タンパク質の表面電荷を変質させています。これらの修飾は、医薬品製造全体を通してモニタリングして定量する必要があります。

表 5. IEX による酸性変異体、メインピーク、および塩基性変異体の面積 %

	面積 %
酸性変異体	13.6
メインピーク	84.9
塩基性変異体	1.5

表 6. IEX 分析の LC パラメータ

パラメータ	設定値
カラム温度	45 °C
移動相	グラジエント：80 ~ 140 mM NaCl、10 mM NaPO ₄ 、pH 6.0
A) 水	時間 (分) A B C D
B) 1.5 M NaCl	0 44.7 5.3 43.5 6.5
C) 20 mM NaH ₂ PO ₄	40 40.0 10.0 42.1 7.9
D) 20 mM Na ₂ HPO ₄	41 16.7 33.3 37.1 12.9
流量	0.8 mL/min
注入量	3 µL
検出	UV (280 nm)

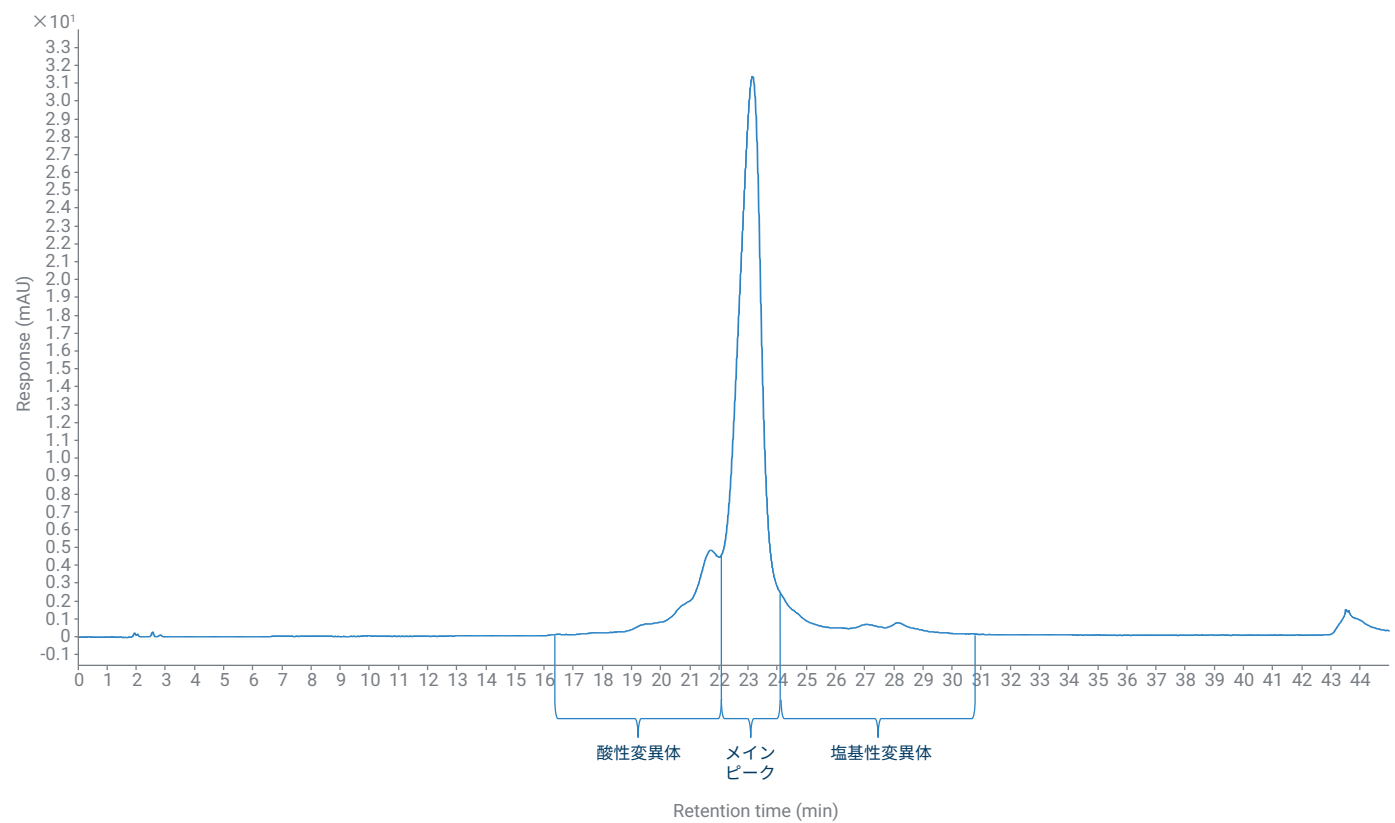


図 6. 酸性変異体および塩基性変異体が存在することを示すエミシズマブの IEX クロマトグラム

疎水性相互作用クロマトグラフィーによる
インタクトの分析

HIC は抗体薬複合体の分析で使用されるのに加えて、PTM に起因する mAb 変異体の特性解析に有用なメソッドにもなっており、他のいくつかの手法と比較して分離能が向上しています。疎水性が精密にチューニングされた

AdvanceBio HIC カラムは、IgG のような Bs-MAb を含む幅広い様式に最適です。図 7 に示すように、一部の変異体はメインピークの前に溶出しましたが、これは酸化などの PTM によるものである可能性が高く（確認には詳細な実験が必要）、メインピークの後に溶出した変異体は、一部の疎水性の高い凝集体に相

当する可能性があります。脱アミド化や異性化などのその他の PTM も、HIC で分離できる場合があります。LC 条件を表 7 に示します。

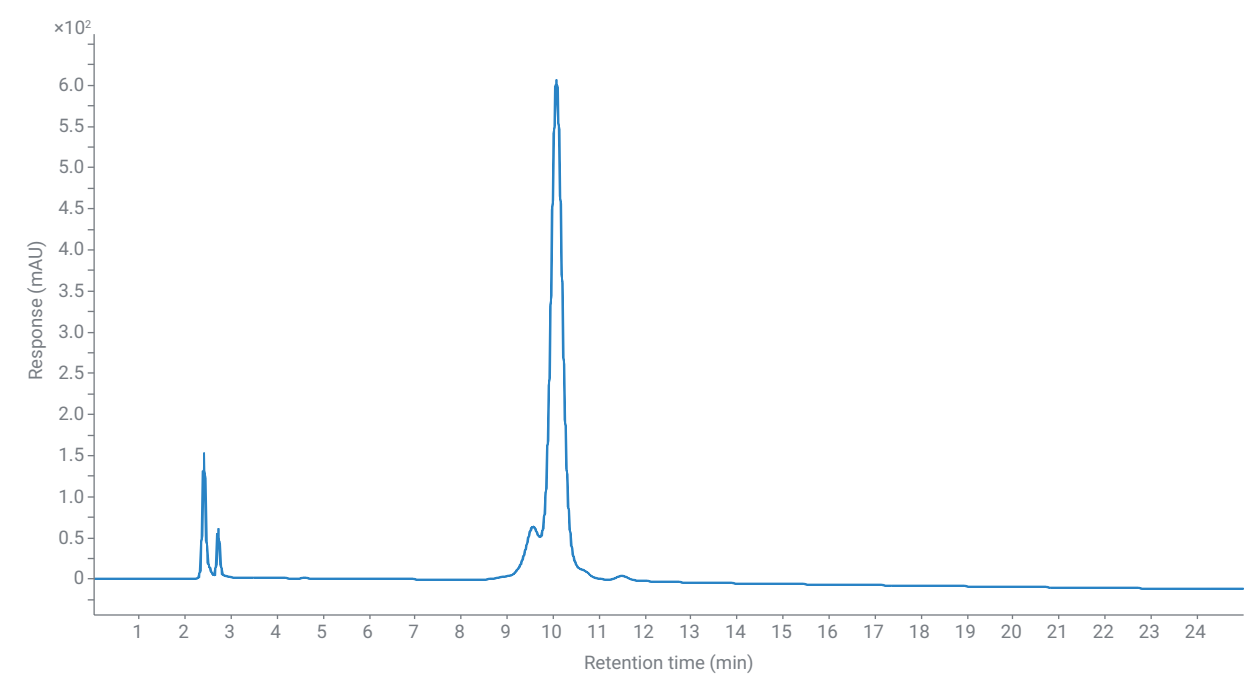


図 7. エミシズマブの HIC クロマトグラム

表 7. HIC 分析の LC パラメータ

パラメータ	設定値
カラム温度	25 °C
移動相 A) 50 mM NaPO + 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH : 7.0 B) 50 mM NaPO pH : 7.0	グラジエント : 時間 (分) B % 0 50 20 100 25 100 26 50 40 (ストップタイム)
流量	0.5 mL/min
注入量	5 µL
検出	UV (280 nm)

結論

本研究より、さまざまなクロマトグラフィー手法を用いて、二重特異性抗体のような分析困難な分子の分析に伴う欠点を克服できることが確認されました。RPC を使用して、両方のインタクト質量を備えた正しい構造を確認し、還元型分子のフラグメント分析を通して、同一の軽鎖および同一ではない重鎖について検証しました。SEC、IEX、および HIC も適切に用いることで、サイズ変異体、電荷変異体、および PTM をそれぞれ測定し、このような複雑な分子の代表的な CQA を達成しました。

参考文献

1. Fan, G. et al. Bispecific Antibodies and Their Applications J. Hematol. Oncol. **2015**, 8, 130.
2. Scott, L. J. et al. Emicizumab-Kxwh: First Global Approval. Drugs **2018**, 78, 269–274.

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。

RA44221.2924074074

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, March 3, 2021
5994-2997JAJP