

バイオモノリスプロテイン A カラムと LC/MS を用いた細胞クローン選択

アプリケーションノート

生物製剤・バイオシミラー

著者

Emmie Dumont, Isabel Vandenheede,
Pat Sandra, Koen Sandra
Research Institute for Chromatography
(RIC)
President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

James Martosella, Phu Duong,
Maureen Joseph
Agilent Technologies, Inc

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを用いて、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養上清の組み換えモノクローナル抗体価を測定する方法を説明します。また、このカラムを用いて μg レベルの抗体を濃縮し、質量分析によるさらなる構造分析を行う方法を説明します。このワークフローは、生物製剤およびバイオシミラー開発におけるクローン選択プロセスの指針となるものです。



Agilent Technologies

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、癌や自己免疫疾患といった命にかかわる疾患の治療に広く用いられています。現在、30 を超えるモノクローナル抗体が販売されており、2010 年には 9 種類が爆発的に売れました。また、2009 年の売り上げトップ 10 の生物製剤のうち、5 つが mAb でした [1]。mAb は現在、もっとも急成長しているタイプの治療薬と見なされています。売り上げ上位の mAb は今後数年で特許が失効することから、バイオシミラーに関する活動が活発化しています。モノクローナル抗体のバイオシミラーについては、最初の 2 種類が 2013 年に認可されました。いずれも活性成分としてインフリキシマブが含まれています [2]。

mAb に関しては、先発薬でもバイオシミラーでも、クローン選択が開発プロセス初期において重要となります。このアプリケーションノートでは、このプロセスで Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを使用した例を紹介し、この HPLC カラムは、ポリ (グリシジル メタクリレート-コ-エチレンジメタクリレート) 多孔質モノリス支持材を *Staphylococcus aureus* のプロテイン A でコーティングした構造になっています。高速高効率分離とキャリアオーバーが少ないというモノリスの利点と、免疫グロブリン G (IgG) の Fc 領域に対するプロテイン A レセプターの選択性を兼ね備えています。そのため、mAb 抗体価および細胞培養上清から直接採取したサンプルのハイスループット測定に理想的なカラムです。また、mAb を分析スケールで精製し、質量分析 (MS)、イオン交換 (IEX)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) などによるさらなる分析を行う場合にも適しています。

ここでは、バイオモノリスプロテイン A カラムを用いて、抗体価および構造特性をもとに、トラスツズマブのバイオシミラーを産生するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) クローンを選択する手法を説明しています。トラスツズマブは 1998 年からハーセプチンとして販売されています。現在でも、HER2 陽性乳癌の治療に広く用いられています [3]。主要な生物製剤であるトラスツズマブの特許は、欧州では 2014 年、米国では 2018 年に失効します。バイオシミラー mAb 抗体価をもとにクローンを選択するために、先発薬のハーセプチンにより作成した検量線を用いて絶対濃度を測定しました。構造特性を評価し、先発薬分子と比較するために、プロテイン A カラムを用いて mAb を分析スケールで濃縮したのち、質量分析を行いました。

実験方法

材料

アセトニトリル、水、イソプロパノールを Biosolve (ファルケンスワールト、オランダ) から入手しました。クエン酸、ギ酸、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (TCEP) を Sigma-Aldrich, Corp. (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。ヒト化モノクローナル抗体のトラスツズマブ (ハーセプチンとして販売) を Roche (バーゼル、スイス) から入手しました。トラスツズマブのバイオシミラー CHO 細胞培養上清については、地元のバイオテクノロジー企業から入手しました。

サンプル前処理

21 mg/mL のハーセプチン原液を移動相 A で希釈し、検量線を作成しました。細胞上清を 50 mM Na_2HPO_4 で 1:1 に希釈しました。上清を 5.000 g で 5 分間遠心分離してから注入しました。10 mM TCEP を添加し、採取したフラクションを室温で 1 時間還元しました。

使用機器

バイオモノリスプロテイン A 測定には、以下の機器を使用しました。

- Agilent 1100 シリーズクオートナリポンプ (G1311A)
- Agilent 1100 シリーズオートサンブラ (G1313A)
- Agilent 1100 シリーズダイオードアレイ検出器 (G1315A)
- Agilent 1200 Infinity シリーズ分析スケールフラクションコレクタ (G1364C)

LC/MS 測定には、以下の機器を使用しました。

以下を搭載する Agilent 1290 Infinity バイナリ LC

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220B)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット (G1330B)
- Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF および Agilent Jet Stream LC/MS (G6540A)

ソフトウェア

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation リビジョン C01.05 (35)
- Agilent MassHunter、機器コントロール用 (B05.01)
- Agilent MassHunter、データ解析用 (B06.00)
- Agilent BioConfirm ソフトウェア、MassHunter 用 (B06.00)

条件、バイオモノリスカラム

| | |
|-------------------|---|
| カラム: | Agilent バイオモノリスプロテイン A (p/n 5069-3639) |
| 移動相: | A) 50 mM リン酸、pH 7.4 B) 100 mM クエン酸、pH 2.8 |
| グラジエント: | 時間 (分) %B 0~0.5 0 (結合) 0.6~1.7 100 (溶出) 1.8~3.5 0 (再生) |
| 流量: | 1 mL/min |
| 注入量: | 50 µL |
| 検出: | UV、280 nm |
| フラクション コレクション: | 時間ベース |

条件、LC/MS

| | |
|-------------|--|
| カートリッジ: | オンライン脱塩カートリッジ、 2.1 × 10 mm |
| 移動相: | A) 0.1 % ギ酸を含む水 (v:v) B) 0.1 % ギ酸を含むアセトニトリル (v:v) |
| 流量: | 400 µL/min |
| 注入量: | 可変 (タンパク質量 1 µg に対応) |
| ニードル洗浄溶媒: | 60 % アセトニトリル、35 % 水、 5 % イソプロパノール |
| オートサンブラ温度: | 7 °C |
| グラジエント: | 時間 (分) % B 0 5 0.5 5 2 80.0 3 80.0 3.10 5 5 5 |
| Q-TOF ソース: | Agilent Jet Stream、 ポジティブイオン化モード |
| ドラインガス温度: | 300 °C |
| 乾燥ガス流量: | 8 L/min |
| ネブライザ圧力: | 35 psig |
| シースガス温度: | 350 °C |
| シースガス流量: | 11 L/min |
| ノズル電圧: | 1,000 V |
| キャピラリ電圧: | 3,500 V |
| フラグメンタ電圧: | 200 V |
| Q-TOF 検出: | 質量範囲 3,200 amu |
| データ取り込み範囲: | 500~3,200 m/z 高分解能モード (4 GHz) |
| データ取り込みレート: | 毎秒 1 スペクトル プロフィール取り込み |
| ダイバータバルブ: | 時間 (分) 対象 0 廃液 1 MS 3.5 廃液 |

結果と考察

トラスツマブ抗体価測定によるクローン選択

図 1 では、特定のトラスツマブ産生クローン上清およびハーセプチン先発薬のプロテイン A クロマトグラムを重ねて表示しています。結合していない物質がフロースルーで溶出した一方で、mAb は pH が低くなった後にはじめて溶出しています。先発薬では、フロースルーで溶出した物質は観察されませんでした。このサンプルは販売されている製品であるため、この結果は当然といえます。上清のケースでは、結合していない物質に起因する大きなシグナルが見られます。

図 2 では、バイオシミラー開発プログラムの枠組みに沿って作成された 12 のトラスツマブ産生クローンのプロテイン A クロマトグラムを重ねて表示しています。これらのクロマトグラムから、低収率クローンと高収率クローンの違いがすでに生じていることがわかります。ハーセプチン先発薬を希釈して作成した外部検量線にピーク面積を関連付ければ、mAb の絶対濃度を測定することができます。

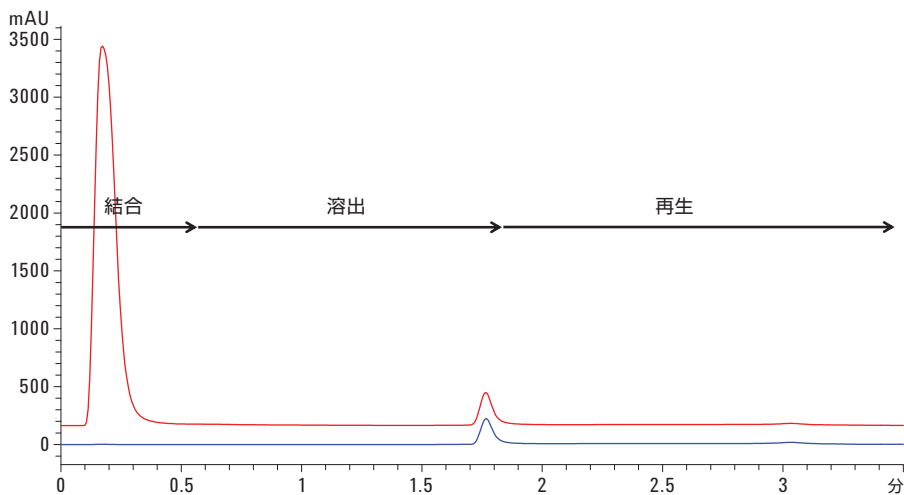


図 1. トラスツマブ産生 CHO クローン、クローン 9 (赤) と、50 mM Na-リン酸 pH 7.4 で 0.2 mg/mL に希釈したハーセプチン先発薬 (青) の UV 280 nm Agilent バイオモノリスプロテイン A クロマトグラム。上清はリン酸緩衝液で 1:1 に希釈しました。

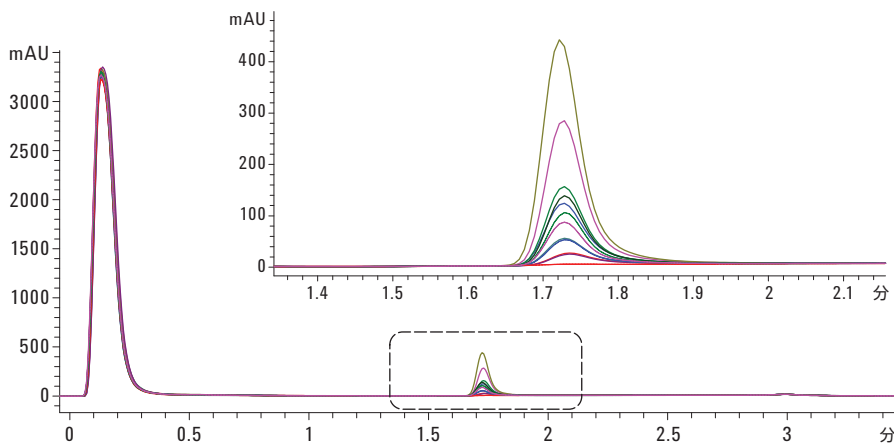


図 2. 12 のトラスツマブ産生 CHO クローンの UV 280 nm Agilent バイオモノリスプロテイン A クロマトグラムの重ね表示

検量線と、それに対応するハーセプチンキャリブレーションポイントのクロマトグラムを、図 3 および 4 に示しています。0.02~2 mg/mL で良好な直線性が得られています。この値は、CHO 細胞における通常の mAb 抗体価範囲です。得られた mAb 抗体価を表 1 にまとめ、図 5 で図示しています。これらの知見から、さらなるバイオシミラー開発に関して明確な判断を下すことが可能

になります。具体的には、高収率クローン 9 および 10 を選択し、サブクローン段階へ進めるという判断が可能です。表 1 には、2 種類の細胞培地で CHO クローンを培養した場合に得られた抗体価も示しています。この結果から、どちらの培地が適しているかが明確にわかります。

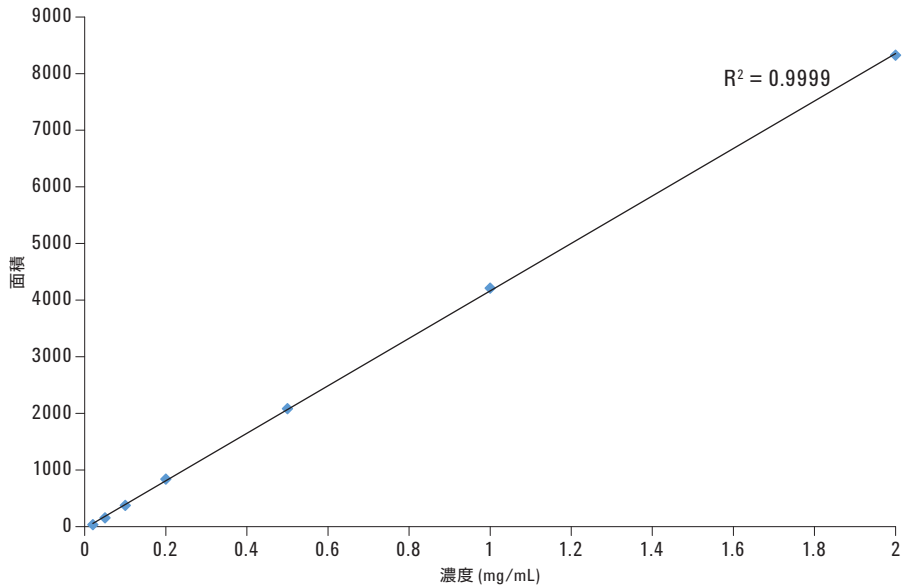


図 3. Agilent バイオモノリスプロテイン A を用いたハーセプチンの検量線、0.02~2 mg/mL

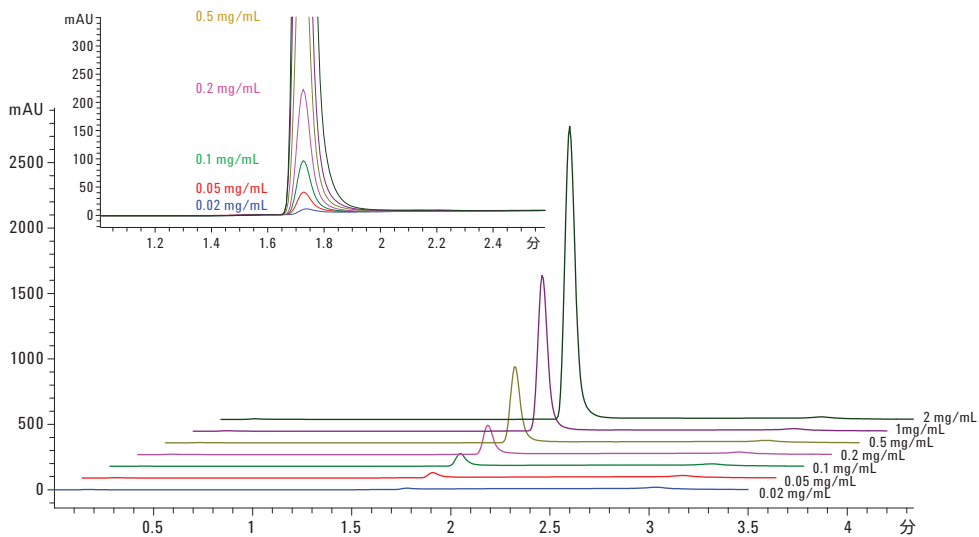


図 4. ハーセプチンキャリブレーションポイントの UV 280 nm Agilent バイオモノリスプロテイン A クロマトグラムの重ね表示

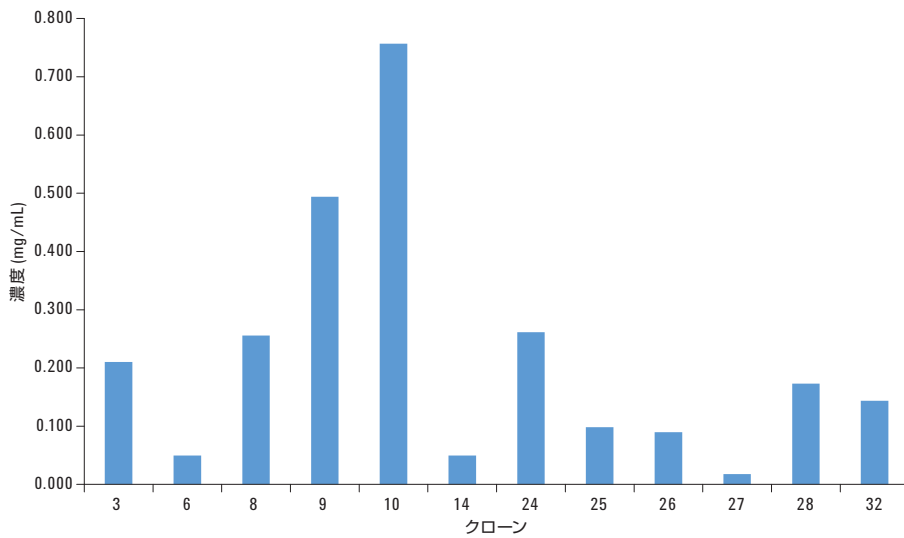


図 5. 各種トラスツマブ CHO クローンにおけるバイオシミラー mAb 抗体価 (mg/mL) を示すグラフ

表 1. 2 種類の培地で培養した各種の CHO クローンで測定されたトラスツマブバイオシミラー絶対濃度

| CHO クローン 培地 A | 濃度 (mg/mL) | CHO クローン 培地 B | 濃度 (mg/mL) |
|------------------|---------------|------------------|---------------|
| 3 | 0.156 | 3 | 0.210 |
| 6 | 0.048 | 6 | 0.050 |
| 8 | 0.155 | 8 | 0.256 |
| 9 | 0.215 | 9 | 0.494 |
| 10 | 0.311 | 10 | 0.757 |
| 14 | 0.038 | 14 | 0.050 |
| 24 | 0.082 | 24 | 0.262 |
| 25 | 0.049 | 25 | 0.098 |
| 26 | 0.037 | 26 | 0.090 |
| 27 | – | 27 | 0.018 |
| 28 | 0.117 | 28 | 0.173 |
| 32 | 0.156 | 32 | 0.144 |

構造特性の評価によるクローン選択

クローン選択において、mAb 抗体価の次に重要な基準は、構造特性にもとづく基準です。バイオシミラー開発の場合、構造は先発薬との類似性がきわめて高くなければならず、先発薬バッチ間の変動範囲内に収まることが求められます。そのため、プロテイン A フラクションを採取し、ジスルフィド結合還元による軽鎖および重鎖の生成後、高分解能質量分析により測定しました。この手法を用いれば、アミノ酸配列を確認し、グリコシル化パターンを解明することができます。

酸性緩衝液の入った捕集バイアル内で直接 mAb を還元するため、一般的な還元剤のジチオスレイトール (DTT) ではなく、TCEP を選択しました。TCEP を使えば、低 pH を含む広い pH 領域での還元が可能です。それに対して、DTT の場合は、還元効果は 7 以上の pH 値に限定されます。オンライン脱塩後、還元したフラクションを MS システムに注入しました。図 6 および 7 は、1 つのハーセプチン先発薬および 2 つの高収率トラスツマブバイオシミラー産生クローンについて、軽鎖および重鎖スペクトルをデコンボリューションしたものを示しています。

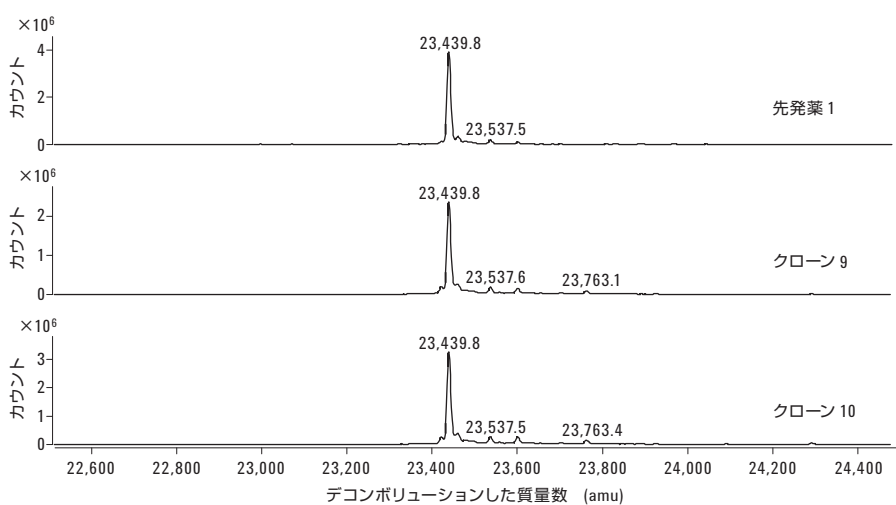


図 6. ハーセプチン先発薬および 2 つのトラスツマブ産生クローンのデコンボリューションした軽鎖スペクトル

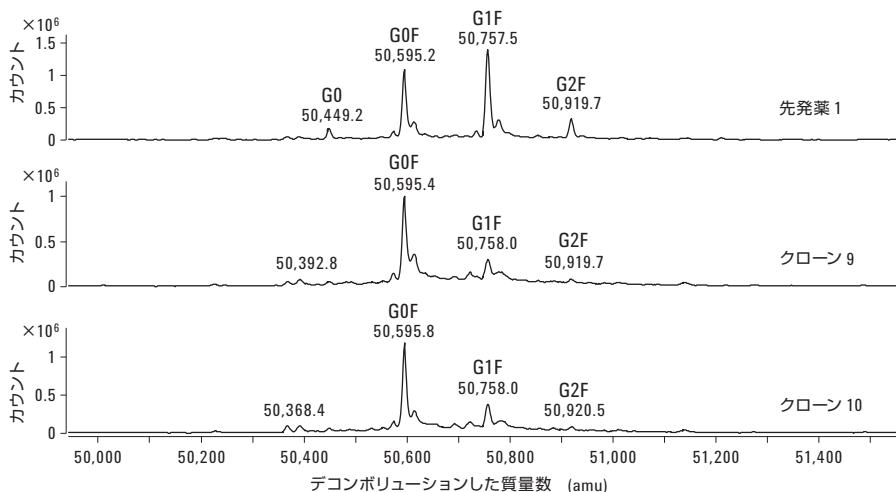


図 7. ハーセプチン先発薬および 2 つのトラスツマブ産生クローンのデコンボリューションした重鎖スペクトル。G0、G0F、G1、G2F の記号は、mAb 主鎖に結合する N-グリカンを示しています。

表 2 および 3 は、4 つの先発薬製造バッチおよび 12 のトラスツズマブクローンにおける MW 測定値と主要糖型の相対強度を示しています。これらの結果から、ハーセプチン先発薬およびクローンに由来するトラスツズマブは、同様の軽鎖および重鎖分子量値を示していると結論づけられます。

また、先発薬およびクローンに由来する mAbs の重鎖において、複雑なタイプである同じ N-グリカンも観察されました。これらの特性は、米国および欧州の規制当局の規定では、きわめて重

要な構造特性 (一次配列が同一で、グリコシル化が保存されていること) とされています。グリコシル化については、定性的観点からは同様でしたが、定量的には違いが見られました。別のアプリケーションノートでは、プロテイン A バイオモノリスを用いて培地を調整し、グリコシル化を先発薬仕様に適合させる方法について説明しています [4]。

表 2. 先発薬およびトラスツズマブクローンにおける軽鎖および重鎖 MW の測定値

| MW (Da) | 先発薬 1 | 先発薬 2 | 先発薬 3 | 先発薬 4 | クローン 3 | クローン 6 |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 軽鎖 | 23,439.8 | 23,439.8 | 23,439.8 | 23,439.8 | 23,439.8 | 23,440.2 |
| 重鎖 * | 49,149.9 | 49,150.2 | 49,150.1 | 49,150.1 | 49,150.5 | 49,151.0 |

| MW (Da) | クローン 8 | クローン 9 | クローン 10 | クローン 14 | クローン 24 | クローン 25 |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 軽鎖 | 23,439.8 | 23,439.8 | 23,439.8 | 23,439.9 | 23,439.8 | 23,439.9 |
| 重鎖 * | 49,150.6 | 49,150.1 | 49,150.5 | 49,150.2 | 49,150.6 | 49,151.1 |

| MW (Da) | クローン 26 | クローン 27 | クローン 28 | クローン 32 |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| 軽鎖 | 23,440.0 | 23,441.4 | 23,439.8 | 23,439.9 |
| 重鎖 * | 49,150.9 | 49,151.9 | 49,150.7 | 49,150.9 |

*理論上脱グリコシル化した MW 値。

表 3. 4 つの先発薬製造バッチおよびトラスツズマブクローンにおける主要糖型の相対強度

| 糖型 | 先発薬 1 | 先発薬 2 | 先発薬 3 | 先発薬 4 | クローン 3 | クローン 6 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % Man 5 | 1.6 | 1.6 | 1.3 | 1.1 | 2.7 | 1.6 |
| % G0F-GlcNAc | 1.5 | 2.7 | 3.3 | 2.4 | 3.2 | 3.2 |
| % G0 | 5.7 | 5.9 | 5.0 | 4.9 | 2.8 | 3.3 |
| % G0F | 35.2 | 44.8 | 50.5 | 48.2 | 66.1 | 56.2 |
| % G1F | 45.2 | 38.4 | 34.0 | 36.8 | 20.6 | 27.7 |
| % G2F | 10.7 | 6.6 | 5.9 | 6.7 | 4.7 | 8.1 |

| 糖型 | クローン 8 | クローン 9 | クローン 10 | クローン 14 | クローン 24 | クローン 25 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % Man 5 | 2.6 | 3.3 | 5.0 | 1.2 | 1.9 | 5.1 |
| % G0F-GlcNAc | 3.8 | 4.8 | 4.6 | 2.1 | 3.6 | 4.2 |
| % G0 | 1.7 | 2.9 | 2.9 | 3.9 | 2.2 | 2.3 |
| % G0F | 69.9 | 66.1 | 64.1 | 64.6 | 68.6 | 60.7 |
| % G1F | 18.4 | 18.5 | 19.5 | 22.9 | 19.4 | 20.9 |
| % G2F | 3.6 | 4.3 | 3.8 | 5.3 | 4.3 | 6.7 |

| 糖型 | クローン 26 | クローン 27 | クローン 28 | クローン 32 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % Man 5 | 5.4 | 0.0 | 1.5 | 3.1 |
| % G0F-GlcNAc | 5.8 | 0.0 | 2.9 | 4.3 |
| % G0 | 1.8 | 0.0 | 1.2 | 2.7 |
| % G0F | 61.6 | 67.2 | 61.6 | 64.3 |
| % G1F | 19.5 | 32.8 | 26.3 | 20.3 |
| % G2F | 5.8 | 0.0 | 6.5 | 5.3 |

結論

先発薬との抗体価および構造類似性にもとづくトラスツズマブバイオシミラー産生クローンの選択において、Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを問題なく適用することができました。このクローン選択プロセスは、先発薬およびバイオシミラー mAb の開発初期段階におけるきわめて重要なプロセスです。

参考文献

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra. *J. Chromatogr.A.*, **1335**, 81 (2014).
2. www.ema.europa.eu
3. www.gene.com
4. E. Dumont, *et al.*, Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5124EN (2014).

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Japan

August 21, 2014

5991-5124JAJP



Agilent Technologies