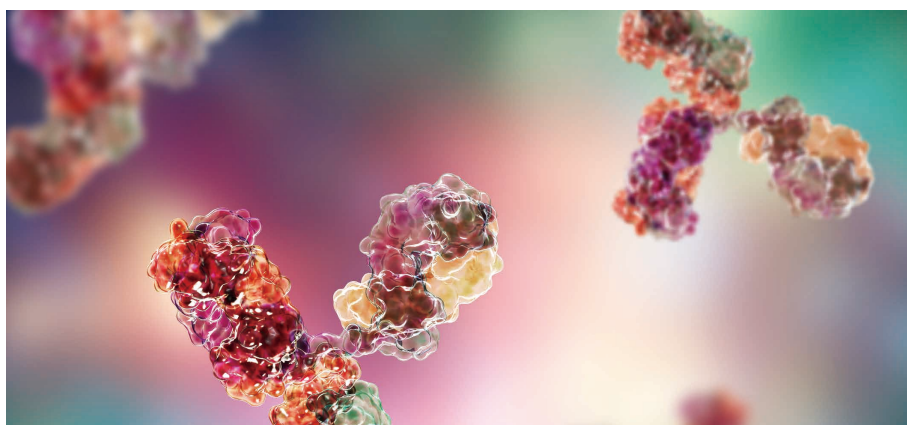


二次微分 UV-Vis 吸光分光分析を用いた 立体配座研究

先行バイオ医薬品とバイオシミラーモノクローナル抗体の
比較



著者

Devansh Shah
Vellore Institute of Technology,
India

Neethu Ayyolath
Amrita University
Kollam, India

Ursula Tems; Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、人の健康に対して治療効果があるという理由により注目を集めています (1)。バイオシミラーは特定の疾病に向けた先行バイオ医薬品 mAb のバイオ後続医薬品であり、先行バイオ医薬品の特許期限が切れたことにより、市場で急速に広まっている製品です (2)。一部のメソッドはタンパク質構造の安定性に関する研究に使用されており (3)、先行バイオ医薬品とバイオシミラー間で比較可能な項目として UV 分光分析、円偏光二色性、蛍光が挙げられています (4)。この研究では Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を用いて、先行バイオ医薬品 (リツキシマブ) とバイオシミラーを分析しました。その後、独自の Cary WinUV ソフトウェアを用いてデータを解析し、二次微分吸収スペクトルを用いて詳細に比較しました。その結果に基づいて、Cary 60 がこのアプリケーションの分析ソリューションとして固有の能力を有していることだけでなく、収集したデータから、タンパク質の球状構造中の芳香族アミノ酸の微小環境に関する情報、つまりさまざまなテスト条件下での mAb の安定性に関する情報を得る方法についても説明します。

UV-Vis 分光光度計の利点

UV-Vis 分光光度計は、タンパク質構造を総体的に分析するための成熟した信頼性の高い技術です。この機器は幅広く使用されており、高価な試薬や消耗品は必要ありません。さらに重要なのは、UV-Vis 分光光度計は非破壊分析を実施できるため、測定後のサンプルを回収できる場合があることです。UV-Vis は、このような重要な特長を有しているため、LC や質量分析などの手法による詳細な分析の前に用いるオーソゴナルなツールとして最適です。

Cary 60 UV-Vis 分光光度計は、堅牢で効率的な分析ツールです。キセノンフラッシュランプをベースにした独自の光学設計は、サンプルの光による劣化を防ぐと同時に、機器のウォームアップ時間をなくすことにより、生産性向上に役立ちます。これらの機能を備えた Cary 60 UV-Vis 分光光度計は、幅広いアプリケーション分野において一般的に使用されており、正確かつ高精度で再現性の高いデータを得ることができます。

材料と方法

L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、および L-チロシンは、アジレント・テクノロジーから入手しました。リツキシマブ先行バイオ医薬品とバイオシミラーは、地元の薬局から入手しました。その他の化学物質はすべて Sigma-Aldrich から入手しました。

サンプル前処理

抗体は、濃度 500 mg/mL の Tris HCl バッファ (pH 6.0) で前処理しました。濃度範囲 0 ~ 6 M の GdnHCl (塩酸グアニジン) を用いて、mAb を GdnHCl 誘導変性させました。適切な量のタンパク質原液 (10 mg/mL) と Tris HCl バッファ (pH 6.0) 中に濃度 0 ~ 6 M の GdnHCl を含む溶液を混合し、サンプルを前処理しました。L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、および L-チロシンを水中で前処理しました。

吸光度測定とデータ解析

Cary 60 UV-Vis 分光光度計を用いて、高分解能の吸収スペクトルを取得しました。すべてのサンプルを、光路長 1 cm の 3 mL 石英製キュベットを用いて室温で分析しました。波長範囲 240 ~ 350 nm にわたりデータ間隔 0.5 nm で、スペクトルを収集しました。

Cary WinUV ソフトウェアアプリケーション内で、Savitzky Golay アルゴリズムと 5 点データフィルタを用いて、二次微分スペクトルを算出しました。各生データ点間で 99 補間点を用い、算出した微分スペクトルにスプライン関数を適用して分解能を 0.01 nm に拡張し、GdnHCl により誘導された抗体のアンフォールディングをモニタリングしました。

結果と考察

タンパク質構造の指標として、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン残基 (それぞれ、W、Y、F) の微小環境を分析するには、二次微分吸光分光分析が有用です (5、6)。芳香族アミノ酸のスペクトルバンドを分解するという二次微分スペクトルの機能により、タンパク質が秩序立った状態から無秩序状態に変化する際に生じる、吸光度の固有のシフトをモニタリングできます。図 1 は、モノクローナル抗体および遊離 L-芳香族アミノ酸のスキャンとそれに対応する二次微分スペクトルを示しています。それぞれの二次微分吸収スペクトルを観察してみると、これらのアミノ酸とタンパク質の特性が明確に識別されていることがわかります。二次微分スペクトルの 291 nm にある負のピークを、バイオシミラーおよび先行バイオ医薬品 mAb 中のトリプトファン残基の微小環境の変化をモニタリングするための指標として選択しました。

Cary 60 を用いて二次微分吸収スペクトルを収集し、化学的変性剤 GdnHCl 存在下での変性に対するそれぞれの反応性を比較することにより、先行バイオ医薬品とバイオシミラー-リツキシマブの構造的安定性を比較しました。図 2 に、GdnHCl 濃度 0 M および 5 M における先行バイオ医薬品とバイオシミラーの二次微分スペクトルを示します。これらのスペクトルを観察してみると、mAb サンプルが GdnHCl に曝露された際に、291 nm (図 2 の矢印で示す部分) あたりで負の吸収ピークがシフトしていることがわかります。これは、mAb 中のトリプトファン残基の微小環境が変化したことを示しています。

GdnHCl の濃度を増大させて、先行バイオ医薬品とバイオシミラーの変性を比較しました。図 3 は、濃度を増大させた GdnHCl に mAb を曝露させた際に生じた波長シフトを示しています。先行バイオ医薬品とバイオシミラーはともにほぼ同じ GdnHCl 濃度で変性しており、これはタンパク質構造内のトリプトファン残基の微小環境が類似していることを示しています。この結果から、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、およびペプチドマッピングを用いた初期の研究結果が立証され、この 2 種類の mAb がアジレントの HPLC 機器で分析した一次および高次構造のいずれにおいても類似していることが示されています (7)。

また、微分分光分析によりタンパク質のアミノ酸配列中のチロシン残基の微小環境を分析して a/b 比を生成することにより、タンパク質構造を比較できました (8, 9)。ここで、a はチロシンによって生成された負のピークの最大 ($\sim\lambda_{288}$) および最小 ($\sim\lambda_{283}$) 吸光度間の距離であり、b はトリプトファンによって生成された 2 番目の最大 ($\sim\lambda_{294}$) および最小 ($\sim\lambda_{291}$) 吸光度間の距離です (図 4 の挿入図)。

図 4 は、濃度を増大させた GdnHCl 中で、タンパク質構造の変化に応じて a/b 比が変化していることを示しています。低濃度では a/b 比は約 1.05 であり、これはタンパク質の球状構造と一致しています⁹。高濃度では a/b 比は増大していますが、これはチロシン残基の曝露の程度が増大していることを示しています。先行バイオ医薬品とバイオシミラーのスペクトルプロファイルはほぼ同じであり、これはどちらの mAb でもチロシンの微小環境が類似していることを示しています。

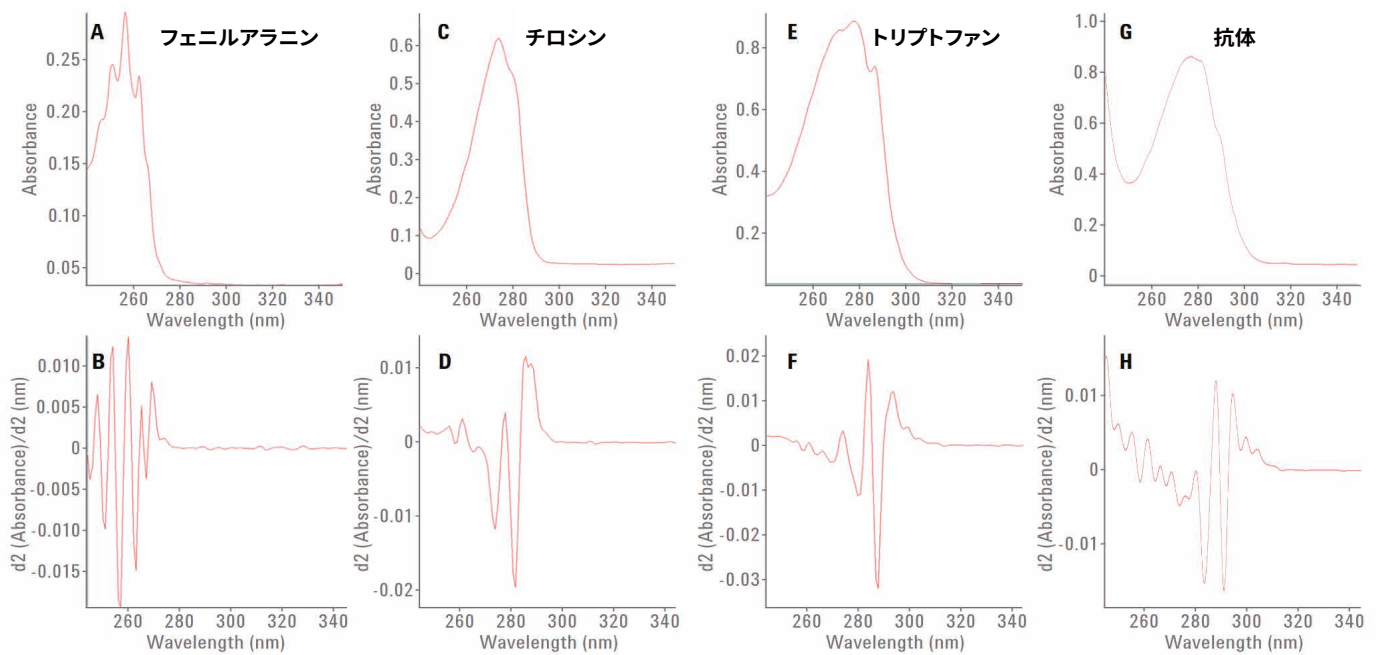


図 1. フェニルアラニン (A, B)、チロシン (C, D)、トリプトファン (E, F)、および抗体 (G, H) の吸光度と二次微分スペクトル

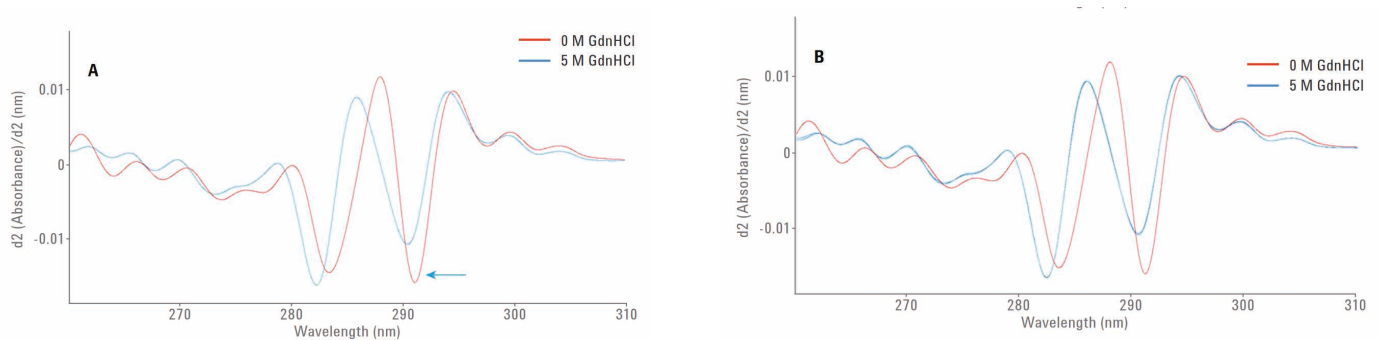


図 2. 0 M GdnHCl(赤) および 5 M GdnHCl(青) における先行バイオ医薬品 (A) とバイオシミラー (B) の二次微分スペクトル

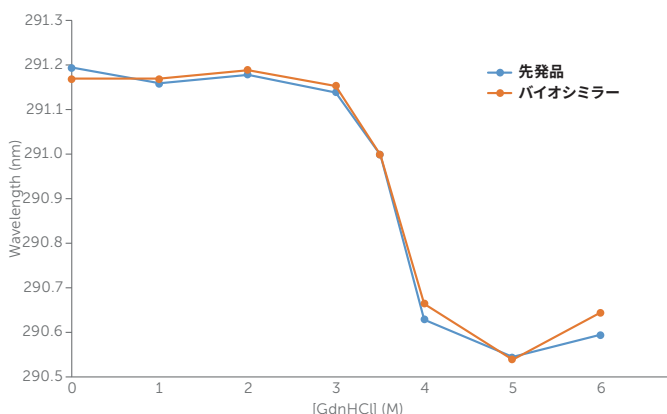


図3. GdnHCl 濃度に対する先行バイオ医薬品とバイオシミラーの変性プロファイル

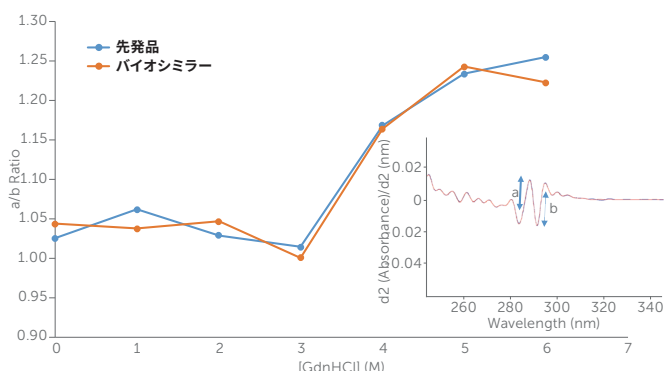


図4. 異なる濃度の GdnHCl における先行バイオ医薬品とバイオシミラーの a/b 比。挿入図は、a と b の定義を示しています。

UV-Vis 分光光度計の高精度で詳細かつ正確な情報を生成する能力は、今回の手法の技術的な可能性を十分に示しています。さらに、UV-Vis 分光光度計のような低コストで使いやすい機器をラボに設置し、他の重要な分析機器の負荷を軽減する代替分析手法として使用できる可能性を、過小評価すべきではありません。

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, February 17, 2020
5991-7026JAJP
DE 6145023148

結論

- Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計は、先行バイオ医薬品とバイオシミラー mAb のタンパク質構造を比較するために必要な分解能と精度を備えています。
- 今回の mAb 先行バイオ医薬品とバイオシミラーは、化学的変性剤 (GdnHCl) に対して類似したアンフォールディングパターンを示しています。これは、2 種類の mAb のタンパク質構造全体が類似していることを示しています。
- また、この研究では、二次微分吸光分光分析を用いて先行バイオ医薬品とバイオシミラー mAb を比較し、構造を分析する方法についても実証しました。

参考文献

1. Scott, A.; Wolchok, J.; Old, L. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12, 278–287 (2012)
2. Udpa, N.; Million, R. Monoclonal antibody biosimilars. *Nat. Rev. Drug Discov* **2016**, 15, 13–14.
3. Pace, C. N.; Scholtz, J. M. Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach*; Creighton, T. E., Ed.; Oxford University Press: New York, 1997; pp 299–321.
4. Zheng K.; Bantog C.; Bayer R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability mAbs **2011**, 3:6, 568–576.
5. Levine R.; Federici M. Quantitation of aromatic residues in proteins: model compounds for second-derivative spectroscopy *Biochemistry* **1982**, 21, 2600–2606.
6. Mach H.; Middaugh C.R.; Simultaneous Monitoring of the Environment of Tryptophan, Tyrosine, and Phenylalanine Residues in Proteins by Near-Ultraviolet Second-Derivative Spectroscopy *Anal. Biochem.* **1994**, 222, 323–331.
7. Comparison of Biosimilar and Innovator Monoclonal Antibody Rituximab Using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC System and Agilent OpenLAB Match Compare Software, Agilent Technologies application note publication number [5991-4920EN](#).
8. Ragone R.; Colonna G; et al. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy *Biochem.* **1984** 23 (8), 1871–1875..
9. Katayama D.; Nayar R.; et al. Solution behavior of a novel type 1 interferon, interferon- τ *J. Pharma.Sci.* **2005**, 94, 2703–2715.