

AdvanceBio HIC カラムによる モノクローナル抗体 (mAb) の変異体分析

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC と
疎水性相互作用 HPLC カラム

著者

Andrew Coffey and
Sandeep Kondaveeti
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio HIC カラムを用いて、酸化したモノクローナル抗体 (mAb) の変異体を、ネイティブ型から分離する方法について紹介します。メチオニン、システイン、およびトリプトファンなどの露出したアミノ酸側鎖残基の酸化は、mAb における一般的な分解経路であり、バイオテクノロジーにおける重要な分析的課題を提示します。多くの場合、酸化した mAb は、それらのネイティブ型¹と比較して活性が低下しています。したがって、モノクローナル抗体医薬品の治療効果を確実なものにするためには、このような分解の解析が重要です。mAb におけるアミノ酸残基の酸化は、酸化した極性の増加、もしくは結果として生じた構造変化²によっても、mAb の疎水性を変化させる可能性があります。疎水性の違いに基づいて生体分子を分離する HPLC 法として、逆相および疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) が挙げられます。HICは、翻訳後修飾 (PTM) の結果生じた mAb 変異体の特性分析に適用することができます。AdvanceBio HIC カラムは、未修飾体からの酸化した mAb 変異体の分離において優れた性能を提供し、mAb をサブユニットまたは他のサンプル前処理メソッドで消化することなく、酸化種を分解することが可能です。

はじめに

抗体薬複合体 (ADC) や二重特異性抗体 (bsAb) などの mAb、およびその関連製品は、最も急速に成長している類の生物学的療法です。遺伝子組み換え mAb は、処理中、配送中および保存中に多くの翻訳後修飾の影響を受けます。これらの修飾の中で、メチオニン (Met) およびトリプトファン (Trp) などの露出したアミノ酸側鎖の酸化が頻繁に生じます。さまざまな研究者が、mAb の酸化は製品の保存期間および生物活性^{1,2} に悪影響を及ぼすことを報告しています。したがって、酸化した mAb 変異体を検出するための分析メソッドの開発に関心が集まっています。メチオニン酸化された mAb 生成物のスルホキシドおよびスルホン側鎖は、タンパク質構造、安定性および生物学的機能が変化する可能性のあるネイティブ型と比較して、より大きく、より高極性です。逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) および HIC などの疎水性に基づく HPLC メソッドは、mAb 変異体の特性分析に頻繁に用いられます。近年、複数の研究において、HIC は遺伝子組み換え mAb の酸化のモニタリングに応用でき、選択性と容易さが妥当で、RPLC の優れた代替手段であることが示されています³。

HIC は固定相との疎水性相互作用に基づいて成分分離を行う点において RPLC と類似しています。HIC の溶出順序は、タンパク質の相対的な疎水性に基づいて順位付けされます。RPLC とは異なり、HIC は有機溶媒や高温を必要とせず、生理学的な pH で分離を行う非変性条件で分析可能なため、タンパク質構造を維持できます。したがって、タンパク質のネイティブ型における立体構造の変化は、HIC⁴ を用いて分析することが可能です。

AdvanceBio HIC は、mAb および関連製品の分離用に設計されたシリカベースの HPLC カラムです。アジレント独自のユニークな化学結合相は、mAb および mAb 変異体の分析において高分離能および期待どおりの選択性を提供します。このアプリケーションノートでは、AdvanceBio HIC カラムを用いた、酸化した NIST mAb 変異体の分離について説明します。

実験方法

試薬およびサンプル

すべての化学製品および試薬は HPLC グレード以上のものを使用しており、Sigma-Aldrich (現 Merck) または VWR Scientific から入手しました。ヒト化 IgG1k mAb サンプル (製品番号 8671) は NIST SRM Standards から入手しました。水は、Milli-Q A10 純水生成装置 (Millipore) を用いて精製しました。

装置構成

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC を次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)、サンプル冷却システム (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 ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、バイオイナートフローセル (オプション # 028) を搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab 2.2 CDS

t-BHP 処理による mAb 酸化

製剤緩衝液中の 1 mL の NIST mAb 溶液 (1 mg/mL) を、0.2 % (v/v) の 70 % *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (t-BHP) 溶液とともに室温で 24 時間、インキュベーションしました。分子量のカットオフ値が 10 kDa の Amicon Ultra-10 遠心フィルタを用いて、残留酸化剤を除去しました。次に、サンプルを 50 % 移動相 B で緩衝液交換しました。

図 6 のデータを得るために用いた反応条件は次の通りです。NIST mAb (1 mg/mL) の 1 mL サンプルに 2 % (v/v) の 70 % t-BHP 溶液を添加し、反応混合物をカラムに注入しました。7 °C で保存された同一のサンプルバイアルから複数回の注入を行いました。

H₂O₂ 処理による mAb 酸化

製剤緩衝液中の 1 mL の NIST mAb 溶液 (1 mg/mL) を、0.2 % (v/v) の 50 % 過酸化水素 (H₂O₂) 溶液とともに室温で 24 時間、インキュベーションしました。分子量のカットオフ値が 10 kDa の Amicon Ultra-10 遠心フィルタを用いて、残留酸化剤を除去しました。次に、サンプルを 50 % 移動相 B で緩衝液交換しました。

結果と考察

タンパク質の酸化は、製剤開発中の安定性試験やストレスを受けたサンプルで頻繁に観察されます (例: 過酸化水素 (H_2O_2) などの化学酸化剤にさらされたサンプル、紫外線、金属イオン)。この研究では、NIST mAb サンプルの酸化を促進する化学酸化剤として、*t*-BHP と H_2O_2 を使用しました。これらの試薬は、mAb のメチオニン側鎖残基を特異的に酸化する傾向があることが以前に報告されています。 H_2O_2 は、よりアクセスしにくい埋没した残基をより容易に酸化する一方、*t*-BHP は、より表面に露出したメチオニン残基⁷ をターゲットとすることが知られています。図 1 に、化学酸化剤によって誘導されたメチオニン酸化の反応スキームを示します。

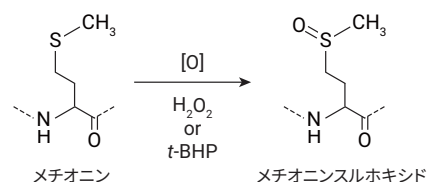


図 1. 化学酸化剤によって誘発されるメチオニン酸化

図 2 の NIST mAb (ヒト化 IgG1k) アミノ酸配列は、mAb の両方の重鎖に位置する 6 つの表面アクセス可能なメチオニン残基が存在することを示しています。多くのヒト IgG1 サブクラス抗体に関する先の研究から、 CH_2 と CH_3 領域、または Fc 領域に局在するメチオニン残基は、抗原結合における酸化に非常に影響を受けやすいことが知られています⁵ (図 3)。NIST mAb のケースでは、Met 255 および Met 431 が、酸化されやすいアミノ酸残基に相当します。

メソッド条件

HPLC 条件			
カラム	AdvanceBio HIC、4.6 × 100 mm (部品番号 685975-908)		
移動相	溶出液 A) 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0 溶出液 B) 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0 に含まれる 2 M の硫酸アンモニウム		
流量	0.3 ~ 0.5 mL/min		
カラム温度	25 °C		
注入量	5 µL		
最終サンプル濃度	1 mg/mL		
検出	UV、220 nm		
グラジエントプロフィール	流量: 0.5 mL/min		
	時間	%A	%B
	0	50	50
	20	100	0
	25	100	0
	30	50	50
より浅いグラジエント	流量: 0.3 mL/min		
	時間	%A	%B
	0	40	60
	40	90	10
	45	90	10
	50	40	60
	60	40	60

Heavy chain

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT **TAGMSVGVIR** QPPGKALEWL **ADINWDDRNH** YNPSLKRLT
 ISKDTSKNQV VLKVTNMDPA DTATYYCARD **MIFFNYEDVW** GQGTITVTSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG
 GTAALGCLVK DYFPEPTVTS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS
 NTKVDKRVEP KSCDKHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSREE **MTKNQVSLTC** LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTFPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV **MHEALHNHYT** QKSLSLSPGK

Light chain

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCSASSRVG **YMI**WYQQKPG KAPKLLIYDT **SKLAS**GVPSR FSGSGSGTEF
 TLTISSLQPD DFATYYC **FCG**SGYPTTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP
 REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYLSSTLT SKADYEKKHV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

図 2. NIST mAb アミノ酸配列

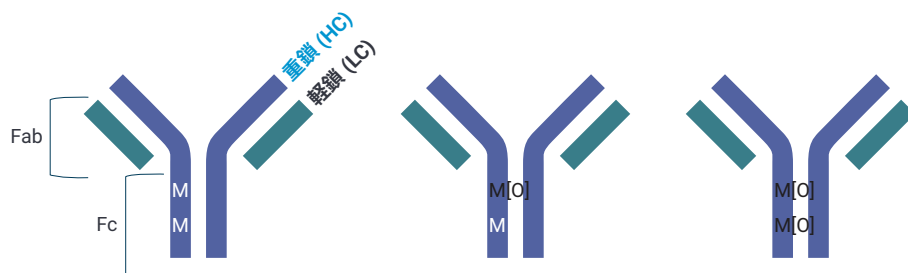


図 3. Fc 領域に位置するメチオニン残基は、ヒト IgG1 mAb において酸化の影響を最も受けやすくなります。

AdvanceBio HIC カラムは、塩濃度の低い初期条件下において、酸化した mAb 変異体を未処理の mAb サンプルから分離することができました。報告された実験条件下において NIST mAb を t-BHP で酸化すると、おそらく立体構造の変化が原因で、より短いリテンションタイムで複数のピークが生じました。1 から 6 とラベルされた、リテンションタイムの短いピークを示す HIC クロマトグラム (図 4) は、mAb の酸化されたメチオニン残基の結果を示し、リテンションタイムが約 12.6 分のピーク 7 は非酸化 mAb に相当します。H₂O₂ 処理された mAb サンプルでは完全酸化が起こり、3 つのピークがより短いリテンションタイムで溶出し、メチオニン残基のより積極的な酸化が示されました。2 つの異なる酸化試薬を用いてインキュベーションした IgG1k mAb サンプルのクロマトグラムにおけるこれらの違いは、以前に報告されたように⁶、メチオニン残基の溶媒アクセスのしやすさ、および酸化剤の立体構造の制限によって反応に影響が出ることを示唆しています。

分離能をさらに向上させるために、より流速を下げ、より浅いグラジエントを使用しました。流速 0.3mL/min で、初期濃度が 1.2 M の硫酸アンモニウムを 25mM/min の緩やかなグラジエント比率で使用すると、比較的短い分析時間でより良好な分離が達成されました (図 5)。このクロマトグラムでは、未処理の mAb サンプルから多数の mAb 酸化種が明確に観察されました。

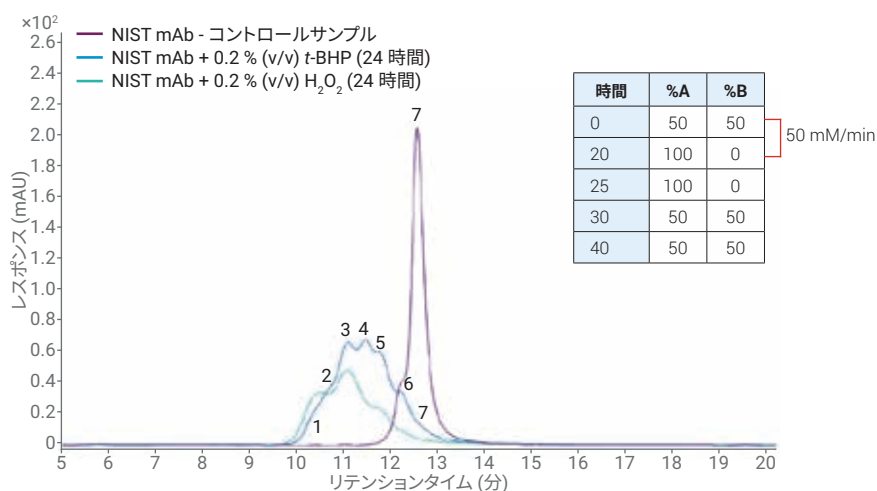


図 4. 低い初期塩濃度による、酸化された NIST mAb 変異体の分離

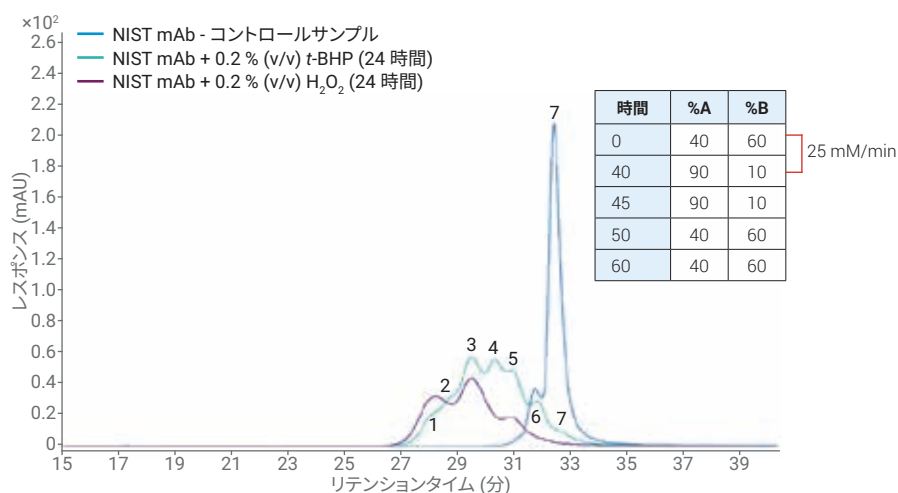


図 5. 浅いグラジエントを用いて酸化された NIST mAb 変異体の分離

図 6 では、NIST mAb サンプルを 2 % (v/v) の t-BHP とともにインキュベーションし、より浅いグラジエント条件を用いてさまざまな時点で酸化反応をモニタリングしました。クロマトグラムの重ね表示に示されているように、mAb 酸化は t-BHP インキュベーション時間とともに進行しました。数時間以内の酸化反応で多数の mAb 酸化種が観察されました。これは、以前報告されたように、mAb サンプルの両方の重鎖の表面にアクセス可能なメチオニン残基が、ランダムに酸化される可能性があることを示唆しています⁵。10 時間以上反応させた

mAb サンプルのさらなる酸化は、ピークのブロード化をもたらす強制酸化を示します。構造の深部に存在するメチオニン残基の酸化は、より劇的な構造変化をもたらし、mAb が部分的にアンフォールドする要因となる可能性がある⁷。部分的にアンフォールドした mAb は、より構造変化が起こりやすく、その結果、ピークが広がり、リテンションタイムのシフトが大きくなります。

結論

AdvanceBio HIC カラムにより、酸化した mAb 変異体をネイティブ型から分離できることが実証されました。AdvanceBio HIC カラムを使用することで、比較的短い分析時間を維持しながら、より遅い流速とより浅いグラジエント条件で、酸化 mAb 変異体の最適な分離を達成することができました。

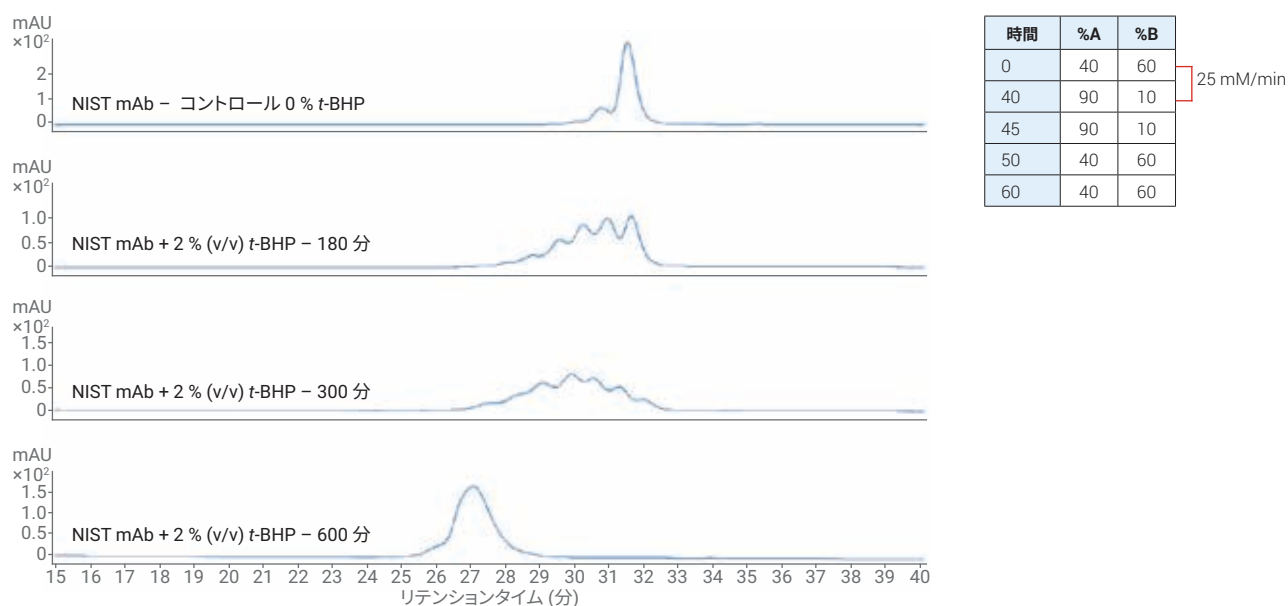


図 6. t-BHP で酸化された mAb 反応のモニタリング

参考文献

1. Zhang, Y.; *et al.* Hydrophobic interaction chromatography of soluble Interleukin I receptor type II to reveal chemical degradations resulting in loss of potency, *Anal. Chem.* **2008**, 80(18), 7022-8.
2. Gaza-Bulseco, G.; *et al.* Effect of methionine oxidation of a recombinant monoclonal antibody on the binding affinity to protein A and protein G. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, 870(1), 56-62.
3. Boyd, D.; Kaschak, T.; Yan, B. HIC resolution of an IgG1 with an oxidized Trp in a complementarity determining region, *J. Chromatogr. B.* **2011**, 879(13-14), 955-60.
4. Fekete, S.; *et al.* Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 130, 3-18.
5. Chumsae, C.; *et al.* Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 850(1-2), 285-294.
6. Shen, F. J.; *et al.* The application of tert-butylhydroperoxide oxidation to study sites of potential methionine oxidation in a recombinant antibody. In *Techniques in Protein Chemistry*; Marshak, D. R., Ed.; Academic Press, Inc.: San Diego, CA, **1996**; 7, 275-284.
7. Liu, D.; *et al.* Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry* **2008**, 47(18), 5088-5100.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, August 20, 2018
5994-0199JAJP