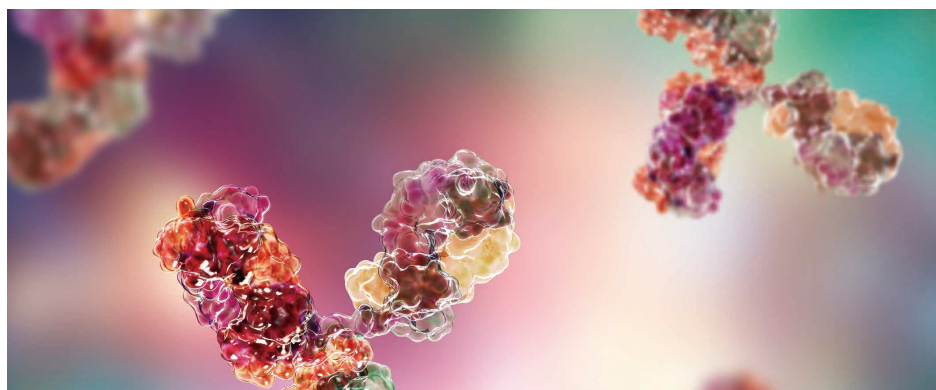


## 蛍光分光法による高スループット mAbs 凝集体分析ワークフロー

サイズ排除クロマトグラフィーを補完する蛍光分析を用いた効率の向上



### 著者

Brian Liao  
Agilent Technologies, Inc.

### はじめに

最新の生物製剤の開発では、親和性、特異性、免疫原性、グリコシル化などの最適な特性を持つ主要な開発候補物質を特定するために、数百～数千のモノクローナル抗体（mAb）変異体をスクリーニングします。抗体の凝集は、分子の特性やその発現宿主に影響されるため、最適化における想定外の副作用となる可能性があります。凝集は重要品質特性として管理され、モニタリングされます（1）。このように、凝集する mAb の傾向を迅速に評価できることが、最新の医薬品開発の主要な要件です。

今回の研究では、蛍光分光法による高スループット凝集体分析ワークフローを検証します。このワークフローは、モジュール式の Agilent Cary Eclipse マイクロプレートリーダーと市販の PEPBOPS 色素をベースとしています。このワークフローでは、従来の測定手法で通常必要な約 5 分が、1 サンプルあたり約 5 秒で高分子量凝集体の半定量推定値を得ることができます（2）。蛍光プローブとして使用した PEPBOPS 色素が抗体凝集体に与えた影響も評価しました。

この研究のために、2種類の治療用 mAb（リツキシマブとトラスツズマブ）と、広く利用されている抗体標準 NISTmAb RM 8671 を強制的に凝集させました。続いて、サイズ排除クロマトグラフィーと蛍光分光法による凝集体分析の適用性について調べました。

Cary Eclipse マイクロプレートリーダーは、サイズ排除クロマトグラフィーなどの高分離能手法向けの有用な高速プレスクリーニングツールとなって、mAb 凝集傾向を評価する全体的な効率を向上させる可能性があります。2つの手法を1つのワークフローに統合することによって、望ましくない濃度の高分子量凝集体を持つサンプルを短時間で特定することができます。より少数のサンプルセットに分析リソースを集中することで、大幅な時間の節約と生産性の向上が見込めます。

## 実験方法

### モノクローナル抗体 (mAb) の強制的な凝集

凝集された mAb サンプルを調製し、両方の分析調査に用いました。

#### 材料およびメソッド

- mAb リツキシマブとして、Ristova<sup>®</sup> (Roche AG) および Reditux<sup>™</sup> (Dr. Reddy's Laboratories)
- mAb トラスツズマブ (Herceptin<sup>®</sup> -Genentech)
- Sigma Aldrich から購入した HPLC グレード以上の緩衝液塩および移動相成分
- 希釈液およびサンプル前処理用として、新たに調製した pH 7.5 の 50 mM トリス-HCl バッファ (以降、トリスバッファと記述)
- NISTmAb RM 8671<sup>1</sup>
- Vivaspin 500 遠心濃縮器、MWCO 10 kDa (Sigma-Aldrich)
- Agilent HPLC サンプルバイアル (アジレント部品番号 5182-0714)

### バッファ交換された mAb の調製

20 mg のリツキシマブの各サンプル、20 mg のトラスツズマブ、4 mg の NISTmAb RM 8671 は、Vivaspin 500 遠心濃縮器を使用し、メーカーの指示に従ってトリスバッファにバッファ交換しました。

濃度が既知の処方された mAb (リツキシマブおよび NISTmAb RM 8671 = 10 mg/mL、トラスツズマブ = 120 mg/mL) のサイズ排除クロマトグラム ( $A_{280}$ ) の合計ピーク面積に対して、バッファ交換が行われた各 mAb の合計ピーク面積を比較することによって、濃度を計算しました。

### pH ストレスサンプルの調製

バッファ交換済み mAbs をトリスバッファで 1 mg/mL に希釈しました。9  $\mu$ L (pH 2.4) または 7.8  $\mu$ L (pH 2.6) の 1 M HCl を添加して、600  $\mu$ L サンプルを一時的に酸性にしました。5 ~ 20 分後、等量の 1 M NaOH で中和し、37 °C で一晩インキュベーションして安定した凝集体を形成させました。pH 2.4 または 2.6 にするために必要な酸の量はそれぞれ、5 mL のトリスバッファを 1 M HCl で滴定することによって求めました。トラスツズマブおよび NISTmAb を凝集するには pH 2.4 が必要でした。一方、示差走査熱量測定が示すように、リツキシマブは安定性が低いため、凝集するには pH 2.6 で十分でした (3 ~ 5)。pH ストレスサンプルは、主に可溶性の凝集体を含んでいたため、分析前に遠心分離しませんでした。

### 振動ストレスサンプルの調整

Agilent HPLC サンプルバイアルの容量の 50 % を、トリスバッファで 1 mg/mL に希釈したバッファ交換リツキシマブ 900  $\mu$ L で充填しました。ベンチトップボルテックスミキサーを用いて、バイアルの主軸に沿って 1200 RPM の前後運動で振動させて乱流を起こし、気相液相界面を増やしました<sup>6</sup>。「振動ストレス」サンプルは、不溶性凝集体を含んでおり、15,000 xg で 10 分間遠心分離して分析前に沈殿させました。

### サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析 - 機器

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC :

- 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)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)
- 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) 付き

<sup>1</sup> NIST8671 は研究使用を目的としています。動物飼料用または人間の食用、臨床試験用、治療的使用を目的とするものではありません。

- Agilent AdvanceBio SEC 4.6x300mm、300Å、2.7µm カラム (Agilent PL1180-5301)
- Agilent クロマトグラフィーデータシステム、OpenLab CDS、ソフトウェアバージョン 2.4.

表 1. に示した設定値を使用し、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC と Agilent AdvanceBio SEC カラムで SEC を実行しました。

表 1. サイズ排除クロマトグラフィーの設定値

パラメータ	設定
カラム温度	室温 (23 °C)
保管コンパートメント温度	室温 (23 °C)
移動相	50 mM リン酸緩衝液 + 150 mM NaCl (pH 7.4)
流量 (mL/min)	0.8
注入量 (µL)	20
検出	UV 吸光度、220 nm および 280 nm
リファレンス波長 (nm)	360
取り込み時間 (min)	25
ポストタイム (min)	10

表 2 の設定値を使用し、必要に応じてマニュアル積分することにより、OpenLab CDS 2.4 でサイズ排除クロマトグラムを積分しました。

表 2. Openlab CDS 2.4 での積分設定.

パラメータ	設定
インテグレートタイプ	ChemStation インテグレータ
スロープ感度	1.0
ピーク幅	1.0
面積リジェクト	1.0
高さリジェクト	0.5
ショルダーモード	ドロップ
面積 % リジェクト	0.00
積分開始時間 (min)	5.0
積分終了時間 (min)	12.0
タンジェントスキムモード	標準
テールピークスキム高さ比	0.00
フロントピークスキム高さ比	0.00
スキム谷比	20.00
ベースライン補正モード	Advanced
ピーク/谷比	500.00

## 蛍光分光法による凝集体分析 - 機器、材料、メソッド

- Agilent Cary Eclipse マイクロプレートリーダー (G9801AA)
- 白色 96 ウェルプレート (アジレント部品番号 6610022300)
- 蛍光色素、ナトリウム 3,3'-[[[(1,2-ジフェニルエテン-1,2-ジイル)ビス(4,1-フェニレン)]ビス(オキシ)]ビス(プロパン-1-スルホン酸)、(PEPBOPS)、(アジレント部品番号 5799-0025)
- 50 mM トリス-HCl バッファ (pH 7.5)
- ヒト血清アルブミン 20 mg/mL 標準溶液 (アジレント部品番号 5185-5989)
- ビス-ANS (Sigma Aldrich D41620)
- SYPRO Orange タンパク質ゲル染色試薬 (Sigma Aldrich S5692)、5000x 濃度で提供

1.3 mg PEPBOPS 粉末を 2 mL のトリスバッファで再構成し、1 mM 原液を作成して、室温の暗所で最低 2 週間保管しました。標準溶液をトリスバッファで希釈することによって、75 µg/mL ヒト血清アルブミンのポジティブコントロールを調製しました。

分析のために、1 mM PEPBOPS 原液をトリスバッファで希釈して 100 µM 作業溶液を作成しました。比較実験のため、凝集体感度の高い色素、ビス-ANS と SYPRO Orange をそれぞれ 100 µM および 10x 作業溶液としてトリスバッファで調製しました。ビス-ANS および SYPRO Orange を選んだのは、プレートベースの高スループットでの凝集体分析ワークフローでこれまでも使用していたためです (7, 8)。

100 µL の作業溶液を、白色の 96 ウェルプレートの各ウェルにロードし、そこに 100 µL の凝集した mAb サンプルを添加しました。1 ウェルあたりの最終容量は 200 µL で、最終色素濃度は 50 µM (PEPBOPS およびビス-ANS) および 5x (SYPRO Orange) でした。

光退色を防ぐために、Cary Eclipse マイクロプレートリーダーでの蛍光強度の測定の前に、サンプルを暗所に室温で 15 分間インキュベートしました。表 3 の設定値を使用し、取り込みを実行しました。図 1 に、分析ワークフローを示します。

表 3. Cary Eclipse マイクロプレートリーダーの設定値

	PEPBOPS	ビス-ANS	SYPRO Orange
アプリケーション	Advanced Reads		
励起 (nm)	350	390	495
発光 (nm)	475	500	580
スリット幅 (nm)	5		
平均化時間 (s)	0.5		
励起フィルタ	自動		
発光フィルタ	オープン		
PMT 電圧 (v)	800		
アクセサリ	ウェルプレートリーダー		
プレートフォーマット	96 ウェル		

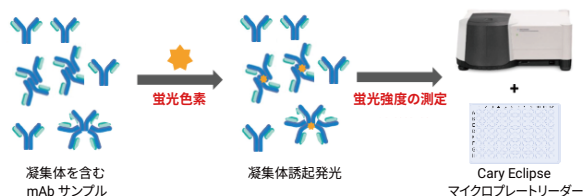


図 1. 蛍光分光法による mAb 凝集体分析ワークフロー。PEPBOPS 蛍光色素は、抗体凝集体上にある疎水性パッチに結合し、入射光によって励起した場合に凝集体誘起発光を起こします。蛍光信号は Cary Eclipse とマイクロプレートリーダーアクセサリを使用して分析します。

## データ解析

繰り返し測定を行った蛍光強度の測定値を平均化し、トリスバッファと蛍光色素のみが含まれ mAb は含まれないウェルから求めた平均蛍光強度を、ブランク値として差し引きました。最適な分析間の再現性を得るために、ブランク値が引かれた蛍光強度値を、ポジティブコントロールに対して正規化しました。正規化された蛍光強度値を、SEC で測定した高分子凝集体の割合に対してプロットして、アッセイの直線性を確立しました。

アッセイの真度を評価するために、次の式に従って推定値の標準誤差を凝集体範囲 (1 ~ 3 %、3 ~ 5 %、5 ~ 9 %) ごとに計算

$$\text{Std. Err. of Estimate} = \sqrt{\frac{\sum(\text{SEC aggregation \%} - \text{Fluor. Estimated aggregation \%})^2}{N}}$$

ここで、N は各凝集体範囲でのサンプル数です。

## 結果と考察

### pH ストレスを加えた mAb

SEC 分析から、5 ~ 20 分の一時的な酸性化は、低分子量フラグメントの割合には大きな影響を与えず、リツキシマブ、トラスツズマブ、NISTmAb 中の高分子凝集体の割合が上昇することが示されました (図 4A ~ 4C)。凝集体の程度は、適用した pH 値によって異なり、より安定したトラスツズマブおよび NISTmAb 抗体ではリツキシマブよりも凝集を誘発するためにより酸性の強い条件が必要でした。

凝集は、ストレスが加えられる時間にも依存します (図 2D)。ストレスを加えていないリツキシマブには 1.2 ± 0.3 % の高分子凝集体があり、ストレスによって 5 分後には 4.0 ± 0.5 % に、10 分後には 5.2 ± 0.8 % に、20 分後には 6.1 ± 0.5 % に増加しました。ストレスを加えると、主に可溶性の凝集体が生じますが、総ピーク面積が大幅に減少することはありません。

蛍光測定値は、PEPBOPS、ビス-ANS (7) および SYPRO Orange (8) などの凝集体感度の高い色素を用いて、mAb サンプル中の凝集体の程度を短時間で推定します (図 3A)。正確なメカニズムは異なりますが、これらの色素は通常、mAb 凝集体上の疎水性パッチと結合して、蛍光光度計で測定可能な蛍光強度や発光波長を変化させます (9)。この分析で蛍光分光光度計を使用する利点は、メソッド開発の柔軟性です。恒久的にアライメントされており短時間で取り付けられるマイクロプレートリーダーアクセサリに、メソッドを簡単に移管することができます。

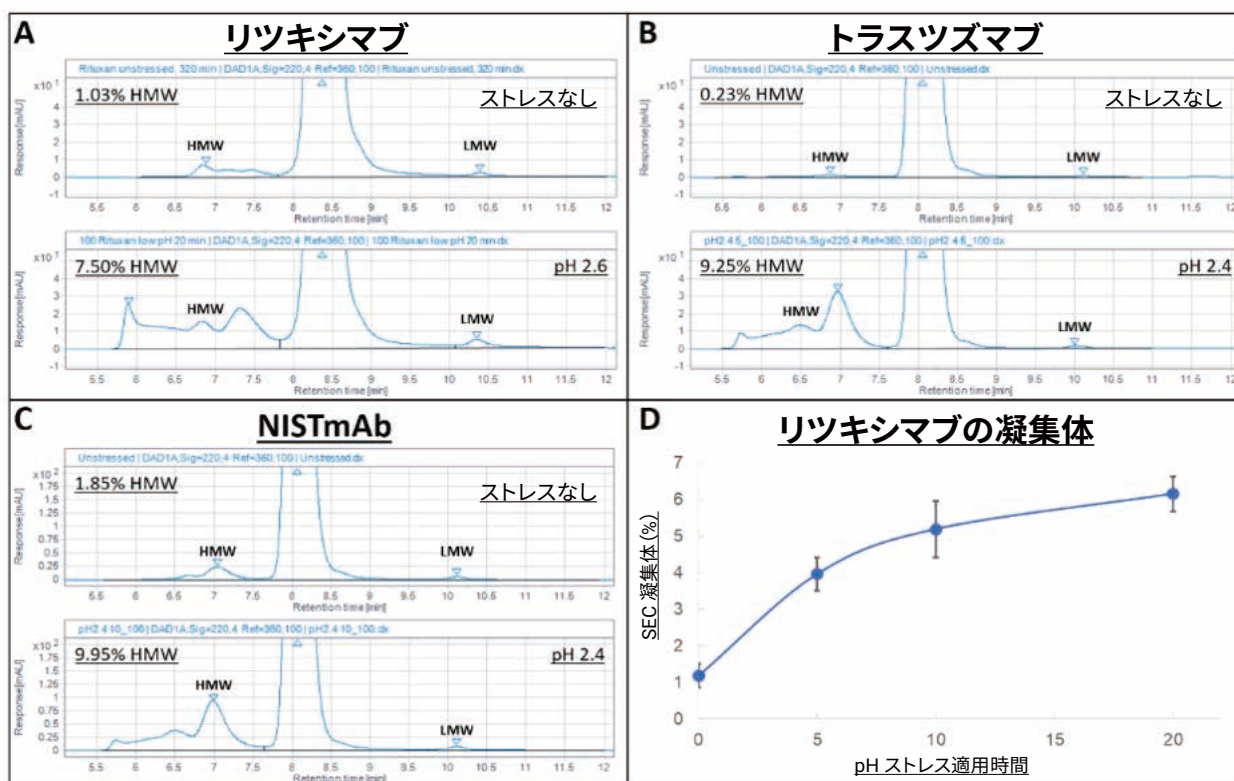


図 2： pH ストレスを加えたリツキシマブ、トラストズマブ、NISTmAb の SEC。(A) ~ (C) は代表的な SEC-UV トレースで、ストレスのない mAb (上段) と、pH 2.4 または 2.6 の一時的なストレスにさらされた mAb (下段) とを比較。(D) 5、10、20 分の pH ストレスによってリツキシマブ中で誘起される高分子量凝集体の平均割合。エラーバーは標準偏差 (N=8) を示します。

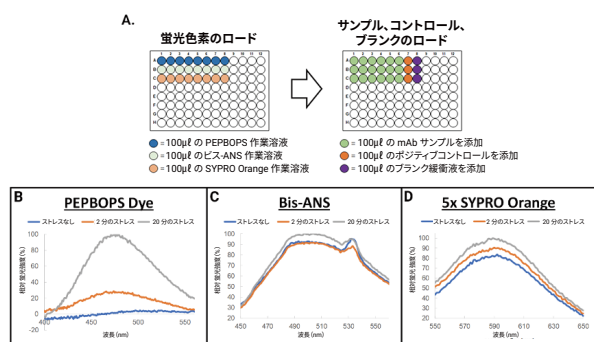


図 3. pH ストレスを加えたリツキシマブサンプル中の凝集体感度の高い色素の蛍光スペクトル。(A) サンプル、ポジティブコントロール、ブランクのウェルへのロードを示す図。ストレスなし、弱い (2 分) ストレス、強い (20 分) ストレスを加えたサンプル中の (B) PEPBOPS、(C) ビス-ANS、(D) SYPRO Orange の蛍光スペクトル。スペクトルは 20 分のストレスサンプルのピーク発光強度に対して正規化しました。

蛍光分光法では、低バックグラウンドで感度が高く、特異性があると期待されます。しかし実際には、蛍光色素はモノマー mAb ともある程度結び付き、大きなバックグラウンド信号が生じます。

図 3B ~ 3C は、ストレスなし、弱い (2 分) ストレス、強い (20 分) ストレスを加えたリツキシマブサンプル中の PEPBOPS、ビス-ANS、SYPRO Orange の蛍光スペクトルを示しています。PEPBOPS は、ビス-ANS や SYPRO Orange と比べると、ストレスを加えないリツキシマブでのバックグラウンド蛍光が非常に小さく、このため、ストレスを加えたサンプル中の凝集体に対してより高い感度を示しました。

さらに詳細な分析により、475 nm での PEPBOPS 蛍光強度と mAb サンプル中の高分子量凝集体の割合との間に、強い直線性がある相関関係が確立されました。図 4A ~ 4C に、リツキシマブ、トラストズマブ、NISTmAb について、1 % 未満から 16 % 以上の幅広い凝集体値での相関関係の直線性が示されています。図 4D

では、不溶性の凝集体を含むサンプル中の PEPBOPS の蛍光強度が、可溶性の凝集体のみとの結合によって説明される場合の蛍光強度よりも大きいことが示されており、蛍光色素は不溶性凝集体にも結合し、不溶性凝集体も検出したことが示唆されています。振動ストレスサンプルでは、不溶性凝集体の形成に起因する合計ピーク面積の減少を除くと、pH ストレスサンプルに非常に類似した SEC クロマトグラムが得られます（データは非表示）。

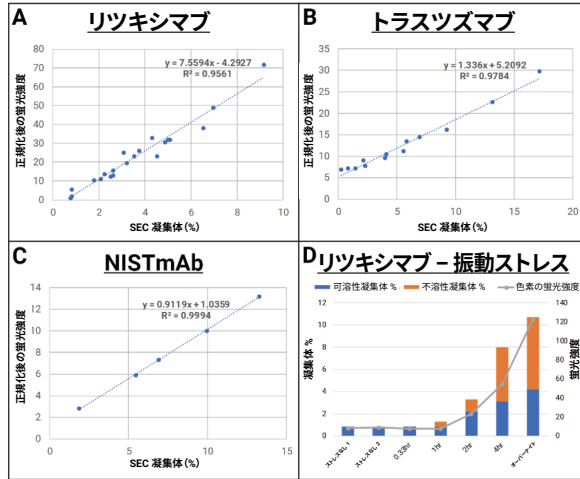


図 4. PEPBOPS 蛍光強度は、mAb サンプル中の高分子量凝集体と高い相関性があります。PEPBOPS は、(A) リツキシマブ、(B) トラスツズマブ、(C) NISTmAb サンプルにおいて、 $R^2 \geq 0.95$  という高い直線性を示しました。(D) 可溶性および不溶性の凝集体の混合物を含むリツキシマブサンプル中の PEPBOPS 蛍光強度。示されたデータは、リツキシマブは  $N = 3$ 、トラスツズマブは  $N = 2$ 、NISTmAb は  $N = 1$  の独立した実験から得ました。

次に、医薬品開発において一般的なタスクである、バイオシマラー mAb 中の凝集体の推定について、ワークフローの適合性を評価しました。図 5A の回帰直線を使用し、 $N = 4$  の独立した新しい実験セットで、リツキシマブ (Ristova 製と Reditux 製) 中の mAb 凝集体の蛍光分光法による推定値のキャリブレーションを行いました。翻訳後修飾における違いは文献にも多く記載されていますが (10)、違いに関係なく、このキャリブレーションを両方の mAb に適用しました。図 5A と 5B では、蛍光分光法による推定値を各サンプルについて高分子量凝集体の実際の濃度に対してプロットしました。どちらのプロットも、傾きが 1 に近く、切片が 0 に近いので、両方の mAb について、ワークフローの的確さが示されています。図 5C は、蛍光分光法による推定値の標準誤差が、サンプル凝集体の程度によって  $\pm 0.54\% \sim \pm 0.83\%$  の範囲にあり、半定量推定値用に許容されることを示しています (8)。同様の実験で、トラスツズマブおよび NISTmAb の標準誤差は、それぞれ  $\pm 0.61\%$  および  $\pm 0.81\%$  でした（データは非表示）。

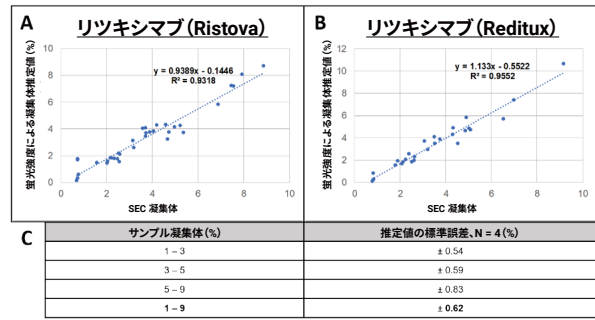


図 5. バイオシマラー mAb における蛍光分光法による凝集体推定値の真度。(A) 先発品のリツキシマブ (Ristova) および (B) バイオシマラーのリツキシマブ (Reditux) の蛍光分光法による凝集体推定値を、 $N = 4$  の独立した実験において SEC で測定された凝集体の実際の濃度に対してプロットしました。(C) 両方の抗体について異なる凝集体割合の範囲での、蛍光分光法による推定値の標準誤差。

蛍光色素の使用における 1 つの共通の懸念として、色素自体がサンプル凝集に影響を与えて、測定に人為的な影響が生じる可能性があります。図 6 は、PEPBOPS が、広い凝集体範囲のさまざまな mAb サンプル中で凝集体プロファイル (図 6A) と高分子量凝集体割合 (図 6B) の両方に与える影響が最少であることを示しています。色素が凝集体測定を混乱させるものでないことが分かります。

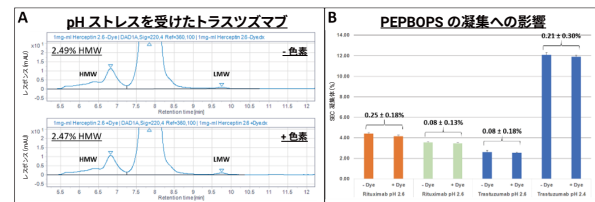


図 6. PEPBOPS が mAb 凝集に与える影響は最少です。(A) PEPBOPS を用いない場合 (上段) と用いた場合 (下段) それぞれのトラスツズマブのクロマトグラム。(B) PEPBOPS を用いた場合と用いない場合の、リツキシマブとトラスツズマブの 4 サンプルについての高分子量凝集体の割合。棒グラフの各ペアの上にある太文字の数値は 2 つの条件間の高分子量凝集体の割合の差を示します。

## 結論

Cary Eclipse マイクロプレートリーダーと PEPBOPS 色素が、mAb の凝集体含有量を推定するための高スループットワークフローとなることが証明されました。このワークフローでは、高分子凝集体の半定量推定値を 1 サンプルあたり約 5 秒で得られました。この結果を、従来からの測定手法で一般的に必要な約 5 分と比較しました (2)。

ワークフローを 2 種類の治療用 mAb (リツキシマブとトラスツズマブ) と、抗体標準 NISTmAb RM 8671 を用いて試験しました。この結果、サイズ排除クロマトグラフィーを使用した同じサンプルでの直交測定に対して、良好な相関関係が示されました。今回の研究から、PEPBOPS 色素を蛍光プローブとしてサンプルに加え、凝集にほぼ影響がないことも分かりました。

このワークフローには次の利点があることが証明されました。

- ビス-ANS や SYPRO Orange ベースのアッセイよりもバックグラウンドがかなり小さく、そのために感度がより向上する
- 蛍光信号と 1 % 未満から 16 % 以上の高分子凝集体との間の直線性に強い相関関係 ( $R^2 \geq 0.95$ ) がある
- $\pm 0.62$  % の凝集の真度 (N = 4)
- PEPBOPS がサンプルの凝集体プロファイルまたは凝集体含有量に対して大きな影響を及ぼさないこと

このワークフローは、クローンの選択、主要な最適化、製剤開発の実験における、凝集したサンプルの迅速な特定に有用です。SEC のフロントエンドとしてこのワークフローを使用する場合、スクリーニング時間の大幅な低減が期待され、高サンプルロードでの全体の生産性向上が実現します。オプションのマイクロプレートリーダーを取り付けた蛍光分光光度計を用いることで、メソッド開発と高スループットスクリーニングにおける柔軟性を得られます。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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, April 9, 2020  
5994-174JAJP  
DE 8755671296

## 参考文献

1. Eon-Duval, A., Broly, H. & Gleixner, R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnol. Prog.* 28, 608–622 (2012).
2. High-Resolution, High-Throughput Size Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal Antibodies. Agilent publication [5994-0828EN](#).
3. Saro, D. et al. Developability assessment of a proposed NIST monoclonal antibody. in *State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study*, 329–355 (ACS Publications, 2015).
4. Lee, K. H. et al. Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product. *MAbs* 10, 380–396 (2018).
5. López-Morales, C. A. et al. Physicochemical and Biological Characterization of a Biosimilar Trastuzumab. *Biomed Res Int*, (2015).
6. Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A. & Bunjes, H. Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74, 139–147 (2010).
7. Li, Y., Mach, H. & Blue, J. T. High throughput formulation screening for global aggregation behaviors of three monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 100, 2120–2135 (2011).
8. He, F. et al. Detection of IgG aggregation by a high throughput method based on extrinsic fluorescence. *J Pharm Sci*, 99, 2598–2608 (2010).
9. Hawe, A., Sutter, M. & Jiskoot, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.*, 25, 1487–1499 (2008).
10. A Comparative Study of the Intact Mass, Subunit Mass and Released Glycans of Two Rituximab Biosimilars Using High Resolution LC-MS. Agilent publication 5994-1653EN.