[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

疎水性モノクローナル抗体および抗体薬物複合体の特性解析における課題克服に向けた親水性相互作用クロマトグラフィーの活用

Jacquelynn Smith,[1] Matthew A. Lauber,[3] Stephan M. Koza,[3] Erin E. Chambers,[3] Jason C. Rouse,[2] and Olga V. Friese[1]
Biotherapeutics Pharm. Sci., Pfizer Inc, St. Louis, MO, USA,[1] Andover MA, USA,[2]
and Waters Corporation, Milford MA, USA[3]

アプリケーションのメリット

- 逆相と相補的かつ直交する分離
- 疎水性タンパク質成分の回収率向上
- オンカラムでの分解を減少する温度依存性の低減

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® Glycoprotein BEH Amide、300 Åカラム

ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

キーワード

ACQUITY UPLC H-Class Bio システム、
BEH Amide 300 Å、ADC、疎水性タンパク質、
mAb、mAb サブユニット、
グリコシル化タンパク質、
グリコシル化、HILIC

はじめに

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は低分子化合物の分離に幅広く使用されるようになっている一方で、遊離糖鎖を除いて高分子生体分子への適応は驚くほど限られています。これは、高分子に適した HILIC カラムテクノロジーと頑健な分離分析法が不足していることに大部分起因しています。ホールのタンパク質をグリコシル化の有無で特性解析するために HILIC は有用である可能性があるにも関わらず、限定的にしか使用されていません。IgG ベースのモノクローナル抗体（mAb）は、全く同じ 2 つの重鎖と全く同じ 2 つの軽鎖がジスルフィド結合による共有結合と相互作用による非共有相互結合により形成されています。さらに重要な点として、mAb は 2 種類の機能的に重要なサブユニットにより構成されています。2 つの抗原結合フラグメント（Fab ドメイン）と、*N* 型複合型二分岐糖鎖でグリコシル化した 1 つの結晶化可能なフラグメント（Fc ドメイン）です。これらサブユニットの構造特性解析では、一般的に IdeS プロテアーゼ（Immunoglobulin Degrading Enzyme of S. pyogens）を用いて消化が行われます（図 1）。IdeS は mAb の低ヒンジ領域に維持された Gly-Gly シークエンスモチーフに高い選択性を持ち、ジスルフィド結合の還元とともに用いられた場合、IdeS は3つの異なる 25 kDa の mAb フラグメントを生成します。すなわち、軽鎖（LC）と重鎖由来の Fd' および一本鎖 Fc（scFc）ドメインです [1]。通常、これら 3 種類の抗体成分の特性解析は、逆相液体クロマトグラフィーと超高分解能質量分析計（MS）を組み合わせることにより達成されます。多くの場合、3 種類全てのサブユニット / ドメインについてクロマトグラフィーでの十分な回収率を達成するのは、その疎水性により難しくなります。超高温では回収率が向上しますが、分析種の分解や、分析条件による副生成物の可能性など、逆相 LC 分析条件が問題となる可能性があります。

親水性相互作用クロマトグラフィーは、mAb サブユニット分析に関して逆相 LC に対して有望な代替となると考えられます。本アプリケーションノートでは、最近開発された、アミド結合ワイドポア有機シリカパーティクルの固定相を、逆相 LC を補完し、疎水性の mAb や抗体薬物複合体（ADC）サブユニットのクロマトグラフィー回収率を向上する分離を実施するために用いました。

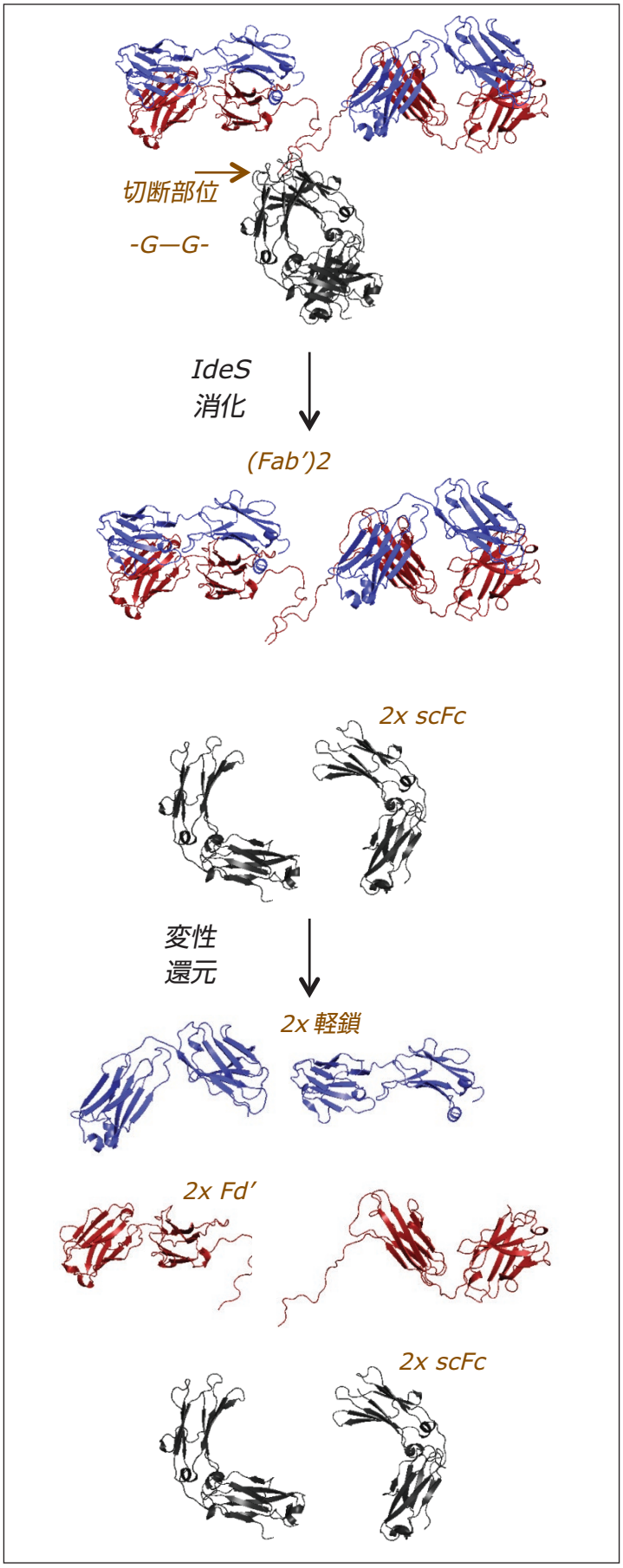


図 1. IgG LC、Fd'、scFc サブユニット調製のための IdeS 消化および還元のスキーム

実験方法

サンプル詳細

mAbのIdeS消化および還元：

本研究に用いた治療用 mAb および ADC は Pfizer 社で製造されたものです。低ヒンジ領域でタンパク質を分解する酵素である IdeS (Genovbis AB, Lund, Sweden) により処理した後、ジスルフィド結合を還元し、mAb の軽鎖および重鎖の scFc と Fd' サブユニットを生成しました。

例えば、治療用 mAb は消化バッファー (pH6.6) で 2 mg/mL (トータル 50 µL) に希釈し、IdeS 酵素 (約 118U) 2 µL と混合して、37℃で 1 時間インキュベートしました。得られたサブユニットの変性および還元には、8 M グアニジン 100 µL、IdeS 消化バッファー 25 µL、1M DTT 25 µL をサンプルに添加して、37℃で 90 分間インキュベートしました。

Intact mAb Mass Check スタンダード (マウスモノクローナル IgG1) は Waters の製品を用いました (製品番号 186006552)。

分析条件 (特に記載の無い限り同じ)

カラムコンディショニング

ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カラムは一貫したピーク形状が得られるまで mAb を高負荷量繰り返し注入してコンディショニングしました。

LC 条件 (図2および図4)

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class システム

サンプル温度： 8℃

流速： 0.2 mL/min

注入量： 10 µL (逆相)、2.5 µL (HILIC)

サンプル負荷量：5 µg (逆相)、1.3 µg (HILIC)

カラム： ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm (製品番号 176003702 Glycoprotein Performance Test Standard を添付して出荷)

ACQUITY UPLC Protein BEH C_4、300 Å、1.7 µm、2.1×100 mm (製品番号 186004496)

温度： 記載の通り

UV 検出： A_{214}

HILIC クロマトグラフィー条件

移動相 A： 100% 水 (v/v)
移動相 B: 100% ACN (v/v)
移動相 C： 2%TFA (v/v)

時間	%A	%B	%C	Curve
0.00	20.0	77.5	2.5	6
1.00	20.0	77.5	2.5	6
21.0	34.5	63.0	2.5	6
22.0	97.5	0.00	2.5	6
24.0	97.5	0.00	2.5	6
25.0	20.0	77.5	2.5	6
35.0	20.0	77.5	2.5	6

逆相クロマトグラフィー条件

移動相 A： 100% 水 (v/v)
移動相 B: 100% ACN (v/v)
移動相 C： 2%TFA (v/v)
移動相 D： 80:20 IPA:ACN (v/v)

時間	%A	%B	%C	%D	Curve
0.0	87.4	5.7	5.0	1.9	6
3.0	87.4	5.7	5.0	1.9	6
5.0	71.2	11.3	5.0	12.5	6
45.0	52.2	17.8	5.0	25.0	6
47.0	4.7	34.1	5.0	56.2	6
53.0	4.7	34.1	5.0	56.2	6
53.1	87.4	5.7	5.0	1.9	6
54.0	4.7	34.1	5.0	56.2	6
55.0	87.4	5.7	5.0	1.9	6
62.0	87.4	5.7	5.0	1.9	6

LC条件（図3）

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

サンプル温度：10℃

流速： 0.2 mL/min

注入量： 0.5 µL（2 mg/mL Intact mAb Check スタンダード）

カラム： ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm、2.1×150 mm（製品番号 176003702 Glycoprotein Performance Test Standard 添付して出荷）

ACQUITY UPLC Protein BEH C_4、300 Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm（製品番号 186004497）

移動相 A： 0.1%（v/v）TFA 水溶液

移動相 B： 0.1%（v/v）TFA アセトニトリル溶液

温度： 記載の通り

UV 検出： A_{214}

HILICクロマトグラフィー条件

時間	%A	%B	Curve
0.0	20.0	80.0	6
1.0	32.0	68.0	6
21.0	39.0	61.0	6
22.0	80.0	20.0	6
24.0	80.0	20.0	6
25.0	20.0	80.0	6
35.0	20.0	80.0	6

逆相クロマトグラフィー条件

時間	%A	%B	Curve
0.0	95.0	5.0	6
1.0	62.0	38.0	6
21.0	55.0	45.0	6
22.0	20.0	80.0	6
24.0	20.0	80.0	6
25.0	95.0	5.0	6
35.0	95.0	5.0	6

結果および考察

生体高分子に向けたHILIC

ワイドポア有機シリカパーティクルとアミド結合相で構成される新規の粒子径 2 µm 以下の固定相により、タンパク質バイオ医薬品の特性解析に向けた HILIC の使用が可能となりました。この固定相は、タンパク質が結合相にアクセスできる十分に大きな平均細孔径をもつため、大きな分析種の分離を促進します[2]。この固定相を用いた以前の研究では、タンパク質のグライコフォーム、タンパク質のサブユニット、ペプチドの分離に対する能力について焦点を当てました[3-5]。本研究では、HILIC および逆相で達成する mAb および ADC のサブユニットの分離を異なる観点から比較し、HILIC のさらなる利点について明らかにしました。

疎水性mAbサブユニット

多くの場合、タンパク質の疎水性の性質により、定量的なクロマトグラフィーの回収を確実にするために、高いカラム温度で逆相を実施することが必要とされます[6]。残念ながら、これらの条件では、特に極性の近いサブユニットを分離するために緩やかな勾配の長時間におよぶグラジエントを用いる必要がある場合、オンカラムでの加水分解を引き起こすことが時々あります。さらに、非常に疎水性の高い mAb 由来の全ての分析種について完全なクロマトグラフィーでの回収を達成するのは実質的に実現不可能な可能性があります。

図 2 には、逆相による治療用 mAb のサブユニット分析で問題が見られた例を示しています。この逆相分離において、分析法開発は推奨温度の 65℃で TFA は 0.1%から開始しました（図 2A）。しかしながら、この条件では Fd' サブユニットの回収率が著しく低く、更なる分析法の最適化により、Fd' サブユニットの定量的な回収を確実にするためには 0.1%TFA とカラム温度 85℃を組み合わせる必要があることが明らかになりました（図 2B）。85℃で得られた逆相のクロマトグラムでは、3 つのm Ab サブユニットそれぞれについて、シャープかつ十分な面積値のピークが得られ、また保持時間 22.9 分のピークで示されるオンカラムでの分解の兆候が見られました。オンライン MS で分析して精密質量を測定したところ、アスパラギン酸とプロリン残基の間の不安定なアミド結合における加水分解の結果として見られるピークであることが分かりました。この顕著な副生成物のピークと併せて、得られた逆相クロマトグラムのベースラインには多くの疑似ピークが見られました。

副生成物を生成しやすい分析法は、データの解釈が曖昧であるため採用するのは困難です。このため、これら mAb サブユニットをクロマトグラフィーで分析する代替手段として HILIC について検討しました。0.05% TFA と 80℃のカラム温度を用いたこのモードの分離で、mAb サブユニットの最適な分離および回収の両方が達成できることが分かりました。図 2C に示すように、mAb サブユニットについて得られた HILIC クロマトグラムでは 3 つ以上のピークが確認されました。最初に溶出する 2 つのピークは Fd' および LC サブユニットに相当し、一方の後半のピーク群は scFc サブユニットのグライコフォームです。これは予測通り、逆相により得られる場合と逆の溶出順序です。

HILIC と逆相の分離が直交することは明らかです。これは双方の保持メカニズムが全く異なることからも妥当です。逆相でのタンパク質の保持は、疎水性の吸着と、比較的分配が制限された "on/off" 分離により起こります。一方、HILIC では、例えタンパク質の場合にも、固定相表面に形成された水和層への分析種の分配と、固定相との水素結合、双極子 - 双極子相互作用、イオン性相互作用による複合メカニズムです [7]。これは、直交する分離が得られることを意味するだけでなく、タンパク質と固定相との間の相互作用が、逆相においてよりも HILIC においてより可逆であることを示唆しています。実際に、図 2C に示すように、疎水性の Fd' サブユニットに対し HILIC は逆相よりも良好な回収を示しています。

興味深いことに、これら mAb サブユニットの HILIC 分離ではまた、逆相ベースの分離において見られたオンカラムの分解は全く認められないと思われます。この現象の性質は明らかにされていませんが、おそらく、より温度が低いこと、より TFA の濃度が低いこと、移動相中の水比率が比較的低いことの効果によるものと考えられます。さらに、逆相ベースの疎水性表面においてタンパク質の折り畳み構造が崩れる性質も 1 つの要因かもしれません [8]。

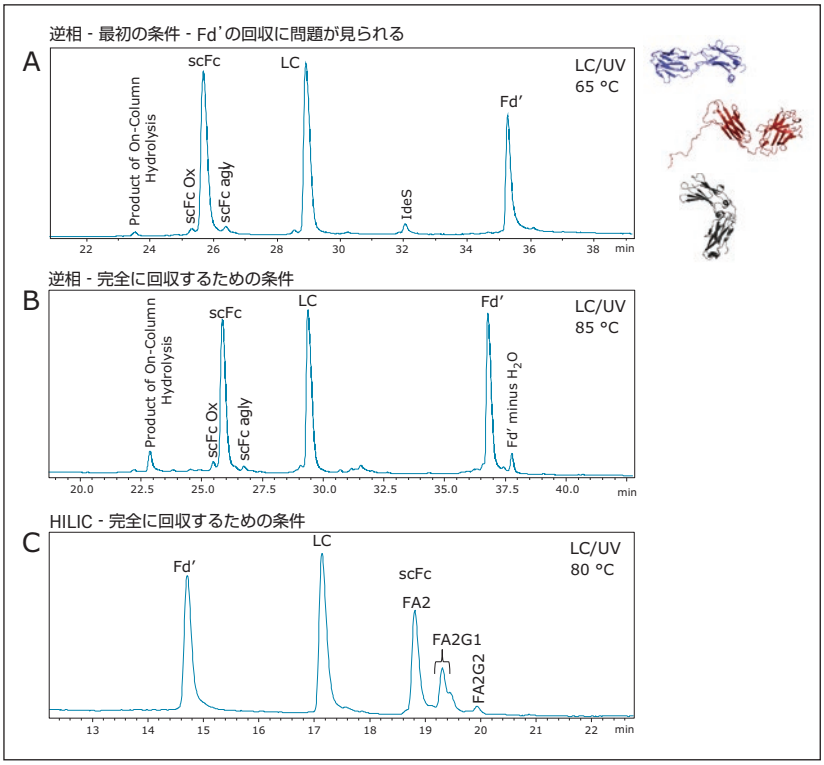


図 2. mAb サブユニット分析に向けた逆相および HILIC の分離比較。Fd' サブユニットについて一部（A）もしくは完全な回収（B,C）が見られた。グリコシル化は Oxford notation に従った表記で記載。F はフコース、A2 は 2 分岐構造、G はガラクトースを示す（FA2 = G0F, FA2G1 = G1F, and FA2G2 = G2F）。"Ox" および "agly" はそれぞれ酸化、非グリコシル化を示す。

温度に応じた回収率の違い - HILIC vs. 逆相

上記観測結果が重要であることを考え、HILIC と逆相それぞれにおける温度の影響についてより詳細を明らかにすることを目的としました。インタクトモノクローナル IgG1 抗体、具体的には Waters Intact mAb Mass Check スタンダードを逆相と HILIC で同じ移動相を用いて、カラム温度 30℃から 80℃の範囲で分離しました。これら分析のクロマトグラムは図 3A および 3B に示しました。予測通り、逆相カラムからの mAb 回収は、分離する温度を上昇させることで向上し、この結果は、逆相充填剤に問題となるほど強く吸着する mAb とそのフラグメントに関する報告と一致していました [6]。一方 HILIC では、分離する温度に関わらず mAb は高い回収率を示しました。この結果は、温度に対するピーク面積のプロットで最も明らかです（図 3C）。HILIC では 50℃で得られるピーク面積が、80℃で得られるピーク面積と同等である点に留意ください。一方、逆相では、50℃で得られるピーク面積は、80℃で得られるピーク面積の 53%にしかなりません。結果として、これらデータは、このインタクト mAb については、50℃の分離において HILIC が最適であることを示しています（図 3B、青線）。実際、このような温度での HILIC 分離は、各グライコフォーム [4]（FA2/FA2 vs. FA2/FA2G1; Oxford notation[9]）を部分的に分離するのに十分な選択性および分離度を示します。

これらの結果は、HILIC が逆相に比べて実際に温度依存性が著しく低いことを裏付けています。通常よりも低いカラム温度で、HILIC により非常に高い回収率を達成でき、これは非常に疎水性が高い、もしくは温度により加速される劣化の影響を受けやすい、非常に困難な分子の LC プロファイリング技術を開発する際に役に立ちます。

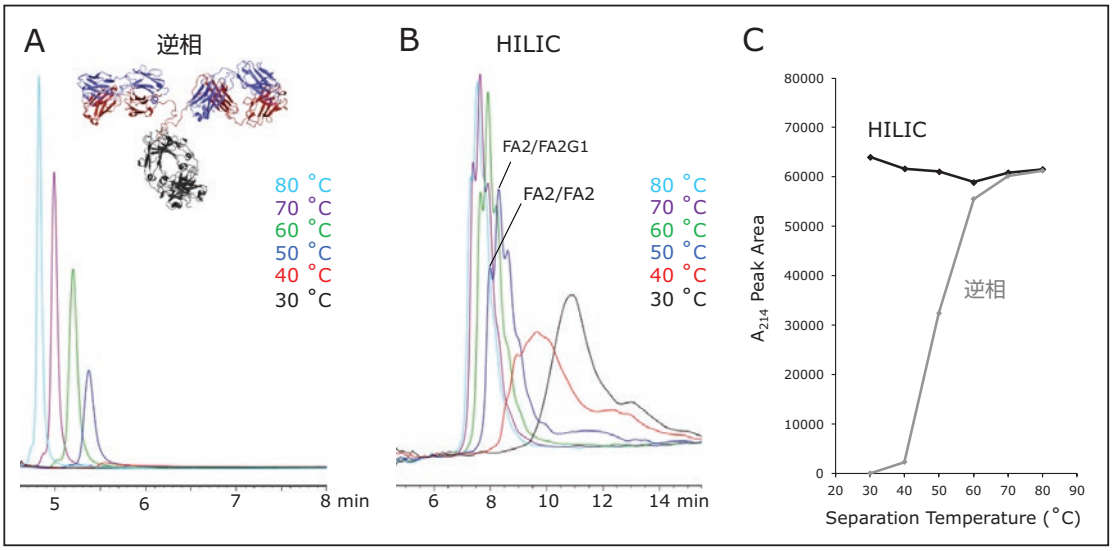


図 3. HILIC vs. 逆相の温度依存性。逆相（A）および HILIC（B）を用いて様々な温度で得られた Intact mAb mass check スタンダード（マウスモノクローナル IgG）のクロマトグラム。温度による UV ピーク面積（C）。グリコシル化は Oxford notation に従った表記法で記載。A2 は構造が二分岐であること、G はガラクトースを示す（FA2 = G0F, FA2G 1 = G1F, FA2G2 = G2F）。

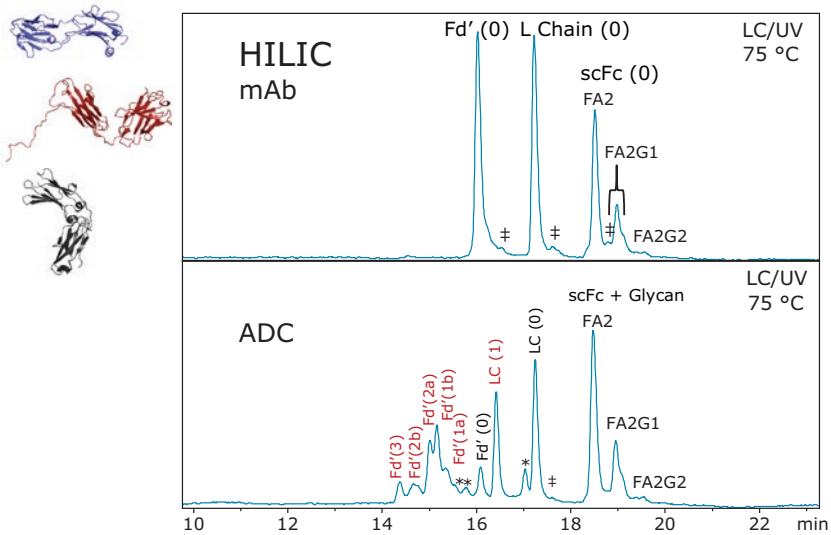
ADCサブユニット分析における高い回収率

HILIC が疎水性分析種のクロマトグラフィー回収率を促進することは、ADC の分析に適しています。現在、市販の ADC 製品は Kadcyla® と Adcertris® の 2 種類のみですが、前臨床および臨床ステージではもっと多くの ADC が開発中です [10-11]。

ADC の IdeS を用いたサブユニット分析は、結合の割合を確認し、結合に関してドメイン特有の情報を迅速に評価するためによく用いられます。

しかしながら、auristatin や maytansinoid 複合体などのいわゆるリンカー / 薬物 “ペイロード” の疎水性により、全てのサブユニット / ドメインの適切なクロマトグラフィー回収率を得るのは困難となります。また、特に、多くの ADC は非常に疎水性の強い重鎖および Fd’ シークエンスを持ちます。疎水性のペイロードを mAb の元々疎水性の高い部位に結合させることが、逆相での分析を複雑にしています。それにも関わらず、その高分離および MS 検出との適合性の可能性から、こういった分析における分離のスタンダードプラットホームは逆相です。

興味深いことに、ADC 開発品のサブユニットサンプルの分離は、HILIC が説得力のある代替手段であることを示唆しています（図 4）。予測通り、ADC サブユニットの HILIC 分離は、逆相に対して直交性を示します。当然のことながら、疎水性ペイロードのサブユニットへの結合により、逆相の場合とは逆に、保持が低減します。分離度は逆相ほど高くはありませんが、それでもなお、HILIC は各位置異性体（Fd’ 1a vs. Fd’ 1b など）を分離できる能力を示しています。最も重要で、また表示したプロファイルに示したように、前駆体の mAb とそれに対応する ADC の両方について、HILIC を用いて Fd’、LC、scFc サブユニットの定量的な回収率が得られました。特に、様々な Fd’ ADC 種の%ピーク面積の合計（35%）は前駆体である mAb の Fd’ サブユニットの%ピーク面積（36.7%）と十分に一致していました。結果として、ペイロードの追加は、HILIC クロマトグラフィーでのサブユニットの回収率に対して、影響があったとしても最小限であると思われます。



Isoforms	mAb Relative % Peak Area	mAb Total % Subunits	ADC Relative % Peak Area	ADC Total % Subunits
Fd' (0)	36.70%	36.70%	5.20%	35.00%
Fd' (3)	N/A		2.80%	
Fd' (2b)	N/A		3.80%	
Fd' (2a)	N/A		7.30%	
Fd' (1b)	N/A		10.30%	
Fd' (1a)	N/A		5.60%	
LC (0)	30.60%	30.60%	16.90%	29.90%
LC (1)	N/A		13.00%	
scFc FA2 (0)	21.40%	32.80%	23.60%	35.10%
scFc FA2G1 (0)	10.40%		10.70%	
scFc FA2G2 (0)	1.00%		0.80%	

*図 4. mAb と対応する ADC の親水性相互作用クロマトグラフィー。数字はいくつのリンカー / ペイロードが複合体中に存在するのか、a および b は位置異性体を示す。*リンカー / ペイロードの加水分解物を表示。‡ 微量の酸化物を表示。グリコシル化は Oxford notation に従った表記法で記載。F はフコース、A2 は構造が二分岐であること、G はガラクトースを示す (FA2 = G0F, FA2G 1 = G1F, FA2G2 = G2F)。*

結論

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、従来の mAb 分離モードで長く直面していた課題の解決に向けて、逆相液体クロマトグラフィーの強力な代替手段となります。例えば、モノクローナル抗体および抗体薬物複合体の疎水性サブユニットでは、不都合なほどに強く分析種が官能基に吸着する傾向にあるため、逆相では十分な回収率を得るのは困難です。HILIC では全く異なる保持メカニズムにより分離されるため、疎水性のタンパク質サブユニットは HILIC の固定相に強く吸着せず、結果として、それほど極端でない条件で溶出できます。

ここで試験に用いた分子では、オンカラムでの加水分解の兆候無しに、逆相に比べて HILIC で非常に高い回収率を得られました。mAb と ADC のサブユニットどちらも効果的に分離できました。HILIC は MS に適合しているため、HILIC の分析法を MS と組み合わせ、オンラインで精密質量を分析することで、同定が可能となります。つまり、HILIC は、逆相を補完し有望なバイオ医薬品タンパク質特性解析の新規ツールとなります。mAb サブユニットの HILIC 分離は *N*- グリコシル化のプロファイルの評価に用いることができますが、さらに本研究では mAb および ADC のサブユニットについてより十分に回収できる利点が活かせることも示しました。

参考文献

1. An, Y.; Zhang, Y.; Mueller, H.M.; Shameem, M.; Chen, X. A new tool for monoclonal antibody analysis: application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization. *MAbs* **2014**, *6* (4), 879–93.
2. Renkin, E.M. *J. Gen. Physio.* **1954**, (38), 225.
3. Lauber, M.A.; Koza, S.M. Mapping IgG Subunit Glycoforms using HILIC and a Wide-Pore Amide Stationary Phase. Waters Application Note 720005385EN, 2015.
4. Lauber, M.A.; Koza, S.M. Developing High Resolution HILIC Separations of Intact Glycosylated Proteins using a Wide-Pore Amide-Bonded Stationary Phase. Waters Application Note 720005380EN, 2015.
5. Lauber, M.A.; Koza, S.M. HILIC Glycopeptide Mapping with a Wide-Pore Amide Stationary Phase. Waters Appication Note 720005409EN, 2015.
6. Fekete, S.; Beck, A.; Wagner, E.; Vuignier, K.; Guillarme, D. Adsorption and recovery issues of recombinant monoclonal antibodies in reversed-phase liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38* (1), 1–8.
7. Alpert, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 177–96.
8. McNay, J.L.; Fernandez, E.J. How does a protein unfold on a reversed-phase liquid chromatography surface? *J. Chrom. A* **1999**, *849* (1), 135–148.
9. Oxford Notation: FA2 = G0F, FA2G1 = G1F. F denotes fucose, A2 represents a biantennary structure, and G stands for galactose.
10. Casi, G.; Neri, D. Antibody-Drug Conjugates and Small Molecule-Drug Conjugates: Opportunities and Challenges for the Development of Selective Anticancer Cytotoxic Agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (22), 8751–61.
11. Shen, W.-C. Antibody-Drug Conjugates: A Historical Review. In Antibody-Drug Conjugates: *The 21st Century Magic Bullets for Cancer*, Shen, W.-C.; Wang, J.; Zaro, J.L., Eds. 2015.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。Kadcyla は Genentech の登録商標です。Adcetris は Seattle Genetics の登録商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年8月 720005684JA PDF