

## SEC-MALSを用いたリガンド結合法 (LBA) 試薬による 蛋白質凝集の評価

Justin Low, Mehraban Khosraviani, Sylvia (Kyung-Joo) Lee, and Jihong Yang, Genentech, Inc.

訳：昭光サイエンス(株)

### 概要

巨大分子薬剤の開発のために用いられるリガンド結合法 (LBA) では、薬剤に、一つまたは複数の異なるタグを結合させる必要があります。タグを結合させた試薬を用いたLBAが長時間良好に機能して質の高いデータを提供するためには、LBAに組み込む前に、タグ結合分子の各ロットについて機能的、生物物理学的に評価する必要があります。ロットごとの変化の原因となる可能性の一つには、薬剤を結合させる過程または取り扱いによって生じる、薬剤に特有の凝集が考えられます。

SEC-MALSはLBA試薬の凝集プロファイルを評価するための優れた方法です。超遠心分析 (AUC) などの他の方法ではより多くの試料が消費されます [1]。このことはLBA試薬の量が限られている場合には問題になり得ます。また、[SEC-MALS](#)はAUCよりハイスループットです [1]。さらに、AUCの感度は試料の濃度やUV吸光係数に制約を受けます。これに対して、光散乱 (LS) は試料の濃度と分子量の積に比例するので、LBA試薬中の低濃度の高分子量 (HMW) 凝集体の検出が可能です。

[SEC-MALS](#)はまた、凝集体ピークの分子量が速やかに確認できるので、SECに関わる複雑な問題点を捨象することができる点でSECよりも優れています。SECのみの場合、分子量標準を用いて (別の実験で) カラムによる分子量を校正する必要があります。さらに、SEC由来の分子量は、試料・担体間の可変的・予測不可能な非特異的相互作用のために保持時間がシフトしてしまい不正確になる可能性があります [1]。

### 序論

工業ガイドラインでは、安定で再現性のあるアッ

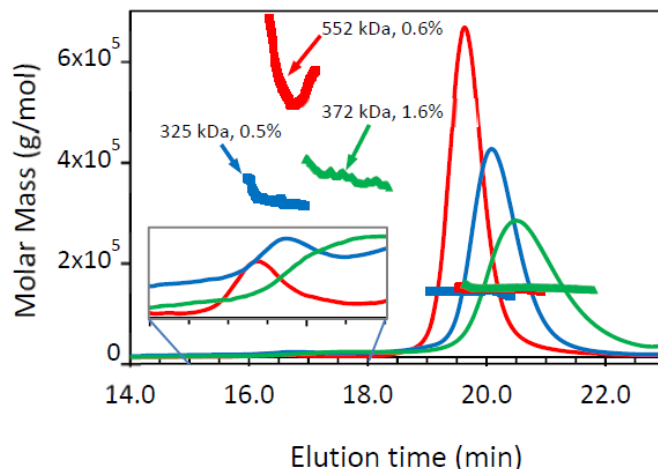


図1: 薬剤がビオチンやジゴキシゲニン (DIG) のようなタグに結合している場合には、タグを結合した試料はSEC-MALSのプロファイルがラベル化試料とは著しく異なる場合があります。赤=タグなし、青=ビオチンと結合した薬剤、緑: DIGと結合した薬剤。各試料の凝集体のピークのMWと質量%を示します。タグとの複合体のメインピークの保持時間が大きく増加し、非複合化薬剤と比較して広がっていることに注意してください。これはSECカラムの担体との相互作用によるものと考えられます。さらに、各試料の凝集体は含量 (0.5% - 1.6%) とMW (325 kDa - 552 kDa) の点で異なります。

セイを行えることを保証するために、LBAの主要試薬を十分調べなければならないことを規定しています [2]。抗薬物抗体 (ADA) スクリーニングでよく用いられるLBAフォーマットはブリッジングELISA法 (図2) で、これはビオチンおよびジゴキシゲニン (DIG) で標識することによって得られるアッセイ試薬を必要とします。判断の閾値、すなわちカットポイント以上の患者標本は陽性であると見なされます。ビオチンおよびDIG薬剤結合体の性質は非特異的結合 (NSB)、S/N比、カットポイントや他の重要なパラメータを含むADAアッセイパフォーマンスに大きく影響し得ます。ロットによる変化が調製の途中やその後の試薬の取り扱いで起こる可能性があるため、常によい性質を持つLBA試薬を作って

アッセイに取り入れることは困難です。SEC-MALSはDIGやビオチンの薬剤結合体の生物物理学的な性質を解析する強力な手法で、これらの重要なLBA試薬のロットによる違いの理解を促進する可能性があります。

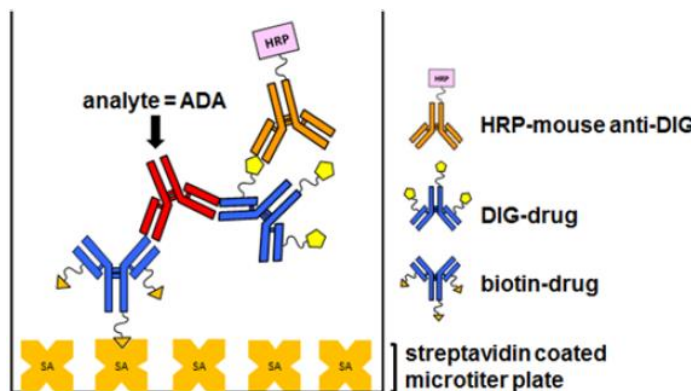


図2: 抗薬物抗体ブリッジングELISAの説明図。患者の標本(赤)からのADAがビオチン-薬剤およびDIG-薬剤を架橋しています。ADA複合体はストレプトアビジンマイクロタイタープレート上に捕捉し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を結合したマウスの抗DIG抗体を用いて検出します。発色ペルオキシダーゼ基質を加え、続いて450-630 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(ここには示してありません)を用いて測定します。

## 解析

SEC-MALSシステムを立ち上げ、MALS検出器を校正しました。ウシ血清アルブミン(BSA)を用いてMALSのノーマライズを試料と同じ移動相で行った後、標準のプロトコールに従って一連のLBA試薬および対照試料を分析しました。全ての実験は25 °Cで行いました。

各薬剤結合試料約80 μgをSEC-MALSを用いて分析しました。3ロット(A, B, C)のDIG-薬剤および2ロット(A, B)のビオチン-薬剤ロットを試験しました。対照試験として、100 μgの結合していない薬剤を分析しました。流速は0.5 mL/min で、各試料の測定時間は28分でした。

別の実験では、(想定しているHMW凝集体を取り除くために)DIG-薬剤ロットBをカットオフ分子量300 kDaのスピンドフィルターを用いてろ過し、ろ過していないDIG-薬剤ロットBとDIG-薬剤ロットAとをSEC-MALSを用いて比較しました。実験条件は上記の通りですが、注入する各試料の量を65 μg - 120 μgの間で変化させました。

全てのタグと結合したLBA試薬は機能についてADAブリッジングELISA法によってテストしました(図2)。

## 結果と考察

SEC-MALS解析によって、全てのDIG-薬剤ロットが主としてダイマーからなる光散乱(LS)の「肩」ピークを持つこと、また、DIG-薬剤ロットBはさらに13分付近にHMW凝集体を含む他のDIG-薬剤ロットにはないもう一つの光散乱ピークを持つことが示されました(図3)。ビオチン-薬剤ではいずれのロットにも凝集体は検出ませんでした(図4)。

全てのタグの結合は同じプロトコールに従い、同じ条件下で行われたにも関わらず、DIG-薬剤ロットBにはHMW凝集体があり、ロットA及びCにはない(図3)という結果はロット間のLBA試薬の違いによる可能性を示唆しています。

ADAアッセイにおけるLBA試薬の機能テストは、DIG-薬剤ロットBがロットAやCに比べてNSBシグナルが約1対数単位分増加させることを示しました(表1)。ロットBのNSBIはADAブリッジングELISAのNSBシグナルの許容範囲を越えていました。従っ

## 材料及び方法

### 試薬

移動相: 0.2 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / 0.25 M KCl / 0.02 % NaN<sub>3</sub>、pH 6.2 (0.1 μmのフィルターでろ過し、脱気を行いました)

LBA 試薬(ビオチン-薬剤およびDIG-薬剤): 薬剤は確立された方法によって社内でビオチンとDIGのどちらかと結合させました。各薬剤複合体の複数のロットは同一の条件で調製しました。

### 装置とハードウェア

GE Healthcare ÄKTAmicro FPLC

GE Healthcare A-905 Autosampler

Phenomenex BioSep-SEC-s3000 カラム (300 x 7.8 mm)

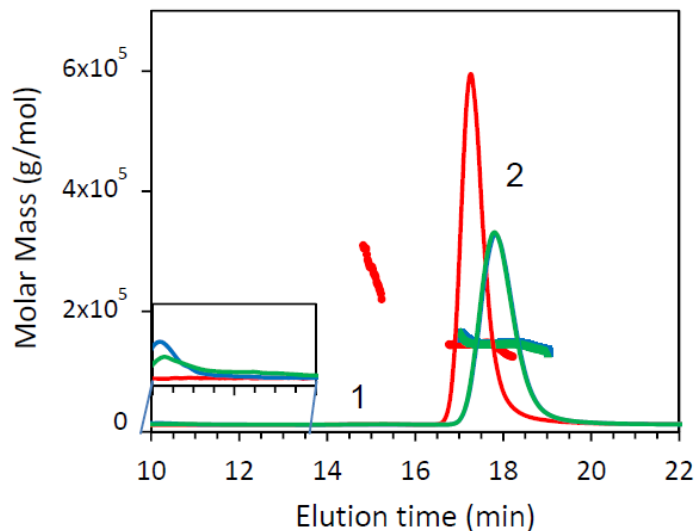
[DAWN HELEOS II 多角度光散乱検出器](#)

[Optilab T-rEX 示差屈折率検出器](#)

SEC-MALS 解析用ソフトウェアASTRA

て、DIG-薬剤ロットBはアッセイには加えることができませんでした。

DIG-薬剤ロットB中のHMW凝集体の存在がアッセイ性能に及ぼす影響を理解するために、DIG-薬剤ロットBをカットオフ分子量300 kDaのフィルターでろ過し、続いてろ過した溶液とろ過していない溶液をADAブリッジングELISAで較べました(表1)。さらに、ろ過によって凝集体が除かれたことを確認するために、両方の非ろ過のDIG-薬剤ロットBをSEC-MALSを用いて解析しました。SEC-MALSおよび機能テストのデータから、DIG-薬剤ロットB中のHMW凝集体がADAブリッジングELISAで認められたNSBシグナルの上昇に寄与していることが分かりました。

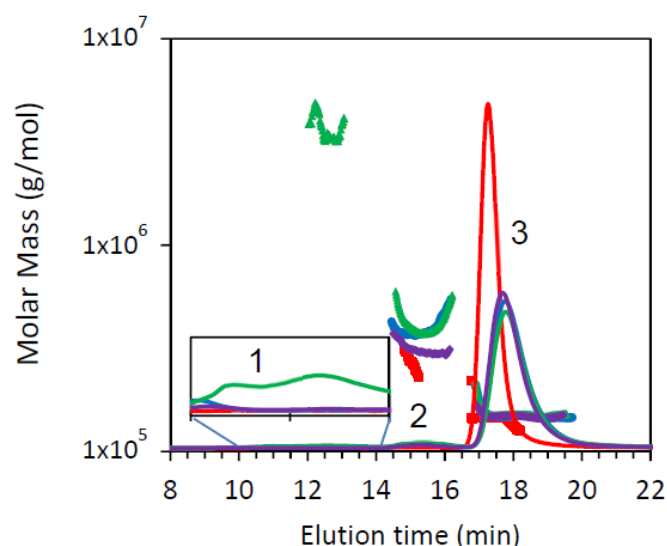


Sample	Unconjugated drug	Biotin-drug	Biotin-drug
Lot	N/A	A	B
Color code	—	—	—
Peak 1 Mw (kDa)	266.2	Not present	Not present
Peak 1 %	0.06	0	0
Peak 2 Mw (kDa)	145.4	146.6	145.9
Peak 2 %	99.9	100	100

図4: 非結合薬剤およびビオチン-薬剤の異なるロットの光散乱(LS)クロマトグラム(正規化したスケールを使用)。ピークは溶出時間の早い順に番号付けしてあります。表には、各色分けした試料について、検出されたピークごとに分子量および重量%(濃度決定のため屈折率(RI)信号を使用)を示しています。

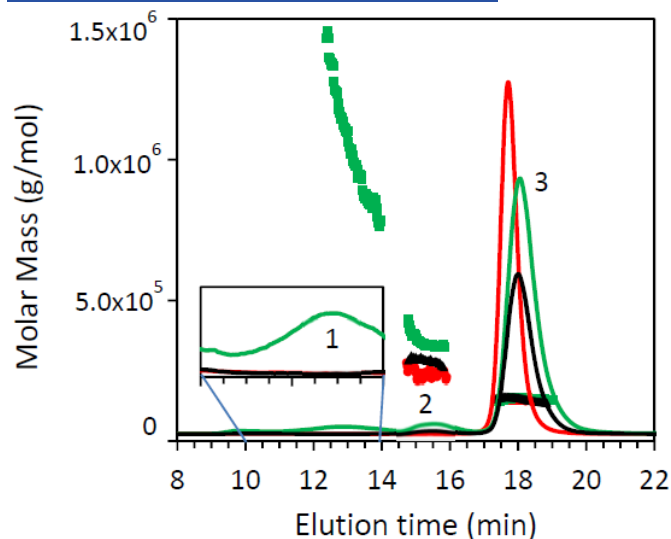
DIG-drug lot	Biotin-drug lot	NSB signal (optical density)
A	A	0.060-0.080
A	B	0.060-0.080
B	A	0.500-0.600
B (filtered)	A	0.060-0.080
C	A	0.060-0.080

表1: ADAブリッジングELISAにおけるLBA試薬の種々のロットの機能検定結果。複数回の実験による非特異的結合(NSB)シグナルの範囲が示されています。



Sample	Unconjugated drug	DIG-drug	DIG-drug	DIG-drug
Lot	N/A	A	B	C
Color code	—	—	—	—
Peak 1 Mw (kDa)	Not present	Not present	3687	Not present
Peak 1 %	N/A	N/A	0.06	N/A
Peak 2 Mw (kDa)	266.2	390.8	408.8	310.0
Peak 2 %	0.06	1.10	1.85	1.10
Peak 3 Mw (kDa)	145.5	148.7	150.7	148.2
Peak 3 %	99.9	98.9	98.1	98.9

図3: 非結合薬剤および異なるDIG-薬剤のロットの光散乱(LS)クロマトグラム(正規化したスケールを使用)。ピークは溶出時間の早い順に番号付けしてあります。表には、各色分けした試料について、検出されたピークごとに分子量および重量%(濃度決定のため屈折率(RI)信号を使用)を示しています。



Sample	Unconjugated drug	DIG-drug	DIG-drug
Lot	N/A	B	B (filtered)
Color code	—	—	—
Peak 1 Mw (kDa)	Not present	1017	Not present
Peak 1 %	0	0.66	0
Peak 2 Mw (kDa)	240.8	348.8	285.8
Peak 2 %	0.2	1.82	1.26
Peak 3 Mw (kDa)	145.6	151.0	150.0
Peak 3 %	99.8	97.5	98.7

図5: 非ろ過およびろ過DIG-薬剤ロットBと非結合薬剤の光散乱 (LS) クロマトグラム (正規化したスケールを使用)。ピークは溶出時間の早い順に番号付けしてあります。表には、各色分けした試料について、検出されたピークごとに分子量および重量% (濃度決定のため屈折率 (RI) 信号を使用) を示しています。

DIG-薬剤ロットB中の1%以下がHMW凝集体です (図3, 5)。このことはLBA試薬中のほんのわずかなレベルの凝集体でさえアッセイ性能に大きな影響を及ぼすことを意味し、凝集を検知する (SEC-MALS のような) 高感度の手法が望ましいことを示しています。

## 結論

結合薬剤中のほんのわずかな量のHMW巨大分子凝集体は、LBAの性能に大きな影響を与える可能性があります。これらの凝集体は、機能テストとともに、LBAの重要な試薬のロットによる違いを理解して潜在的に緩和するための貴重なツールである SEC-MALSで容易に検出されます。

SEC-MALSは蛋白質の品質管理において高い有用性を実証し、他の多くの応用の可能性を秘めています。巨大薬剤分子の開発において今後も重要な技術となります。

## 参考文献

- [1] Philo, J.S. (2009) Current Pharmaceutical Biotechnology, 10, 359–372.  
 [2] O' Hara, D.M.; Theovold, B.; Egan A.C.; Usansky, J.; Krishna, M.; TerWee, J.; Maia, M.; Spriggs, F.P.; Kenney, J.; Safavi, A. and Keefe, J. (2012) AAPS Journal, 14(2), 316–328.