

ハイスループットDLSによるmAbおよび抗体-薬剤複合体 (ADCs) の性状解析と調製法のスクリーニング

Aileen La, Ananda Seneviratne[†], Gaya Ratnaswamy, Jihea Park

Agensys社

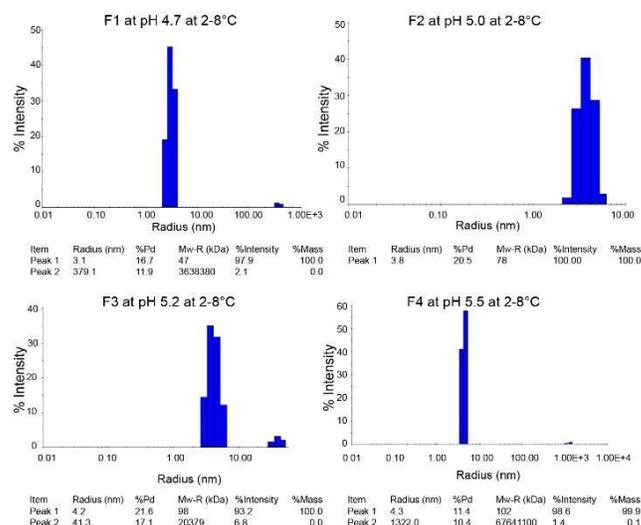
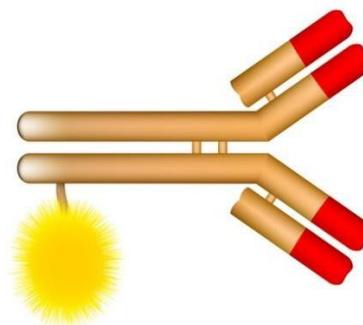
1800 Stewart Street, Santa Monica, CA 90404

概要

抗体-薬剤複合体 (ADCs) は、癌や神経変性疾患の治療におけるターゲット指向ドラッグデリバリーにおいて、強力な細胞毒性を持つ薬剤をモノクローナル抗体に結合させた重要なバイオ治療薬候補です。しかし、元になるmAbは比較的安定な分子ですが、薬剤やリンカーを結合させると、しばしば蛋白質を不安定化したり、好ましくない分子間相互作用を生じて非常に凝集しやすくなるという問題があります。凝集が制御できないと、生体内で効力が減少したり、極端な場合には深刻な免疫反応を惹起したりする可能性があります。そのため、調製中に安定性をモニターすることは、ADC複合体が市販、効力、安全なターゲットへの結合を保証するために必須です。

本アプリケーションノートでは、マイクロプレートを使用した自動測定に対応する [DynaPro PlateReader II](#) と DYNAMICSソフトウェアの使用により、2種のモノクローナル (mAb) 抗体IgG₁とIgG₂を、どのように迅速かつ高い信頼性で性状解析できるかを示します。結果によれば、mAbに小さな薬剤分子を結合しても分子の平均サイズ (流体力学的半径、R_h) はそれほど変化しません。しかし、多分散性は若干増加し、この領域にいくらかの高分子の分子種が存在することを示しています。

また、調製法のスクリーニングにDLSをどのように用いるかのデータも紹介します。pH、温度、バッファの種類による傾向を調べた結果から、全自動測定に対応する [DynaPro PlateReader II](#) がバイオ治療薬の迅速なハイスループットスクリーニングに効果的なツールであることを示します。



異なる調製法の条件下で蛋白質の流体力学的半径 (R_h) がどのように変化するかをDLSでモニターすることは安定性研究において重要です。

I. はじめに

免疫コンジュゲートとしても知られる抗体-薬剤複合体 (ADCs) は新しい種類のバイオ治療薬で、IgG1とIgG2の2種類のモノクローナル抗体 (mAb) を低分子の細胞毒性薬剤と結合させたメイタンシン、オーリスタチン、カリケアミシンなどを含んでいます。2015年の初期の段階で、2つのADCに基づく試料薬が、がんの治療に用いられており、多くのADCが臨床試験の段階にあります。

ADC薬の発展は、標準的なモノクローナル抗体治療薬と比べて、複雑な技術的困難を伴います。低分子の薬剤が多く結合するほど複合体はより疎水性になり、溶解度と物理的安定性において難しい状態になります。従って、調製におけるADC複合体の挙動をモニターし、制御することが、この薬剤が薬理学、安全性、市販のターゲットとして有効であることを保証するために必須になります。

動的光散乱 (DLS) は蛋白質及びその凝集体やナノ粒子の粒子径解析に最適の技術の一つです。DLSは流体力学的半径 (R_h)、多分散性、凝集開始温度およびコロイド安定性を迅速に測定できます。DLSを用いた調製法スクリーニングは開発者に温度、pH、濃度が、安定性、溶解性、凝集傾向に関与する合理的な解釈を助けます。スクリーニングの初期フェーズで生物学的標的と理想的な挙動を示す調製条件を明らかにすることは、その後の発展過程を促進し、下流において失敗のリスクを大きく減少させます。

伝統的なDLS測定はバッチ法で行われ、調製法の解析は多大の時間と労力がかかる過程でした。DLS技術の発展により、96穴、384穴、1536穴のマイクロウェルタイタープレートを利用した、自動的でハイスループットなDLS解析を用いて、工業的に要求される効率性と精度を保ちつつ、調製法スクリーニングの生産性を高度に増加させることができるようになりました。この報告では、IgG1, IgG2 および ADC試料のそれぞれの分子の流体力学的半径と物理的安定性をDynaProPlateReader II-ハイスループットDLSシステムを用いて種々の測定条件下で測定しています。

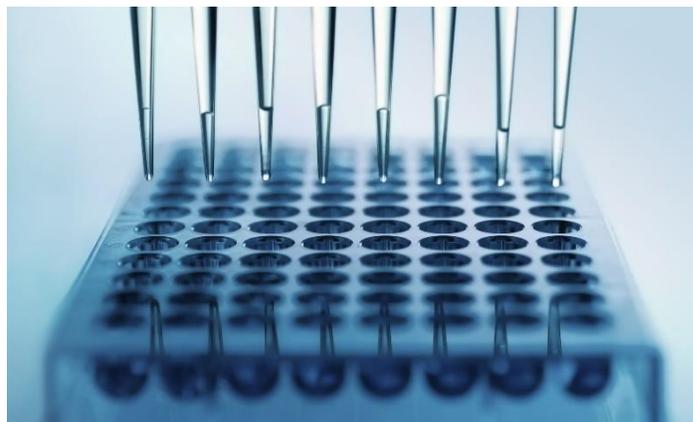


図1. DynaPro Plate Reader IIを用いて自動化したDLS測定を行うことによって調製法における安定性の試験の生産性が大幅に改良されます。

II. 材料と方法

モノクローナル抗体(2種の異なるセルラインで発現されたIgG1とIgG2) および抗体-薬剤複合体(IgG1-Drug 1 および IgG2-Drug 1複合体)につき、DLSを用いて性状解析を行いました。 R_h , 不均一性 (%Pd), および溶液中に存在するすべての高分子種を測定しました。レギュラリゼーション解析を行って R_h , %Pd およびフィットしたピークの相対的重量を決定しました。

1.0 mg/mL の各試料につき、20–70 μ L の試料を用いました。試料の測定に先立ち、ウェルプレートに3000回転で1分間遠心し気泡を取り除きました。各試料は3回の測定を行い、1回の測定で25°Cにおいて10秒間で10回測定値を得ました。生データ (自己相関関数) はキュムラント解析および/またはレギュラリゼーション解析によって解析しました。分布のプロットはレギュラリゼーション解析から得ました。

測定機器

データは25°C で温度制御したDynaPro PlateReader II およびDYNAMICSソフトウェアによって得ました。ハイスループットな試料解析を行うために 384-ウェルプレートを用いました。

III. 結果と考察

図 2 は、mAb 1a、mAb 1b (IgG1)、mAb 2、mAb 3 (IgG2)の粒度分布をヒストグラムで示しています。結果の数値は表1に載せてあります。

DLSの結果、IgG1 と IgG2はほとんど同一の R_h を持っていますが、IgG2はIgG1よりも不均一性が高いことがわかりました。これはIgG2中の2つのジスルフィド結合によるもので、その結果IgG2の不均一性が高いと考えられます。

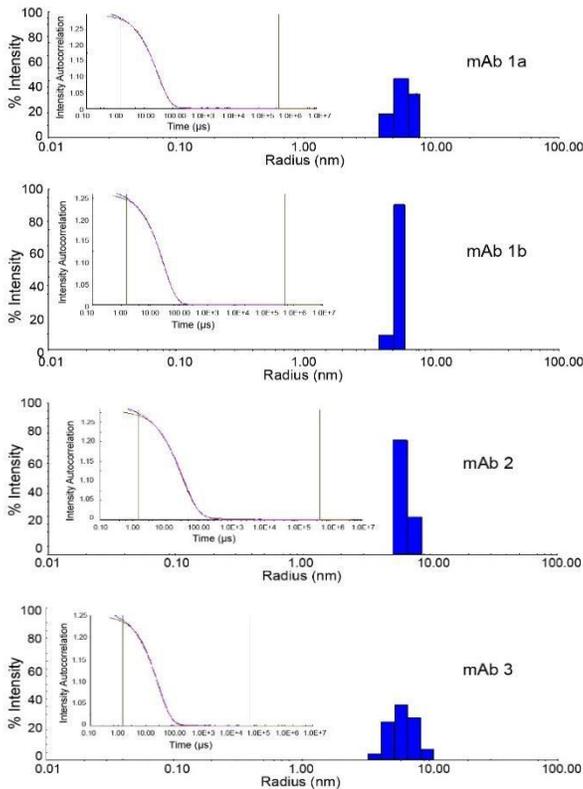


図 2. mAb 1a, mAb1b (IgG1) と mAb 2, mAb3(IgG2)の自己相関関数とレギュラリゼーションヒストグラムの比較。

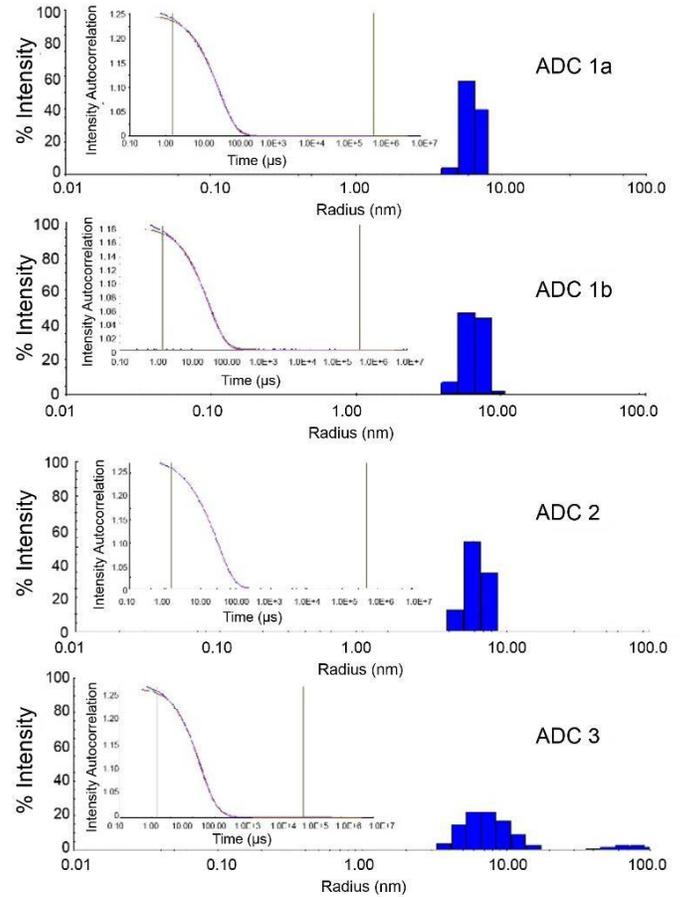


図 3. ADC 1a, ADC1b (IgG1) と ADC2, ADC3 (IgG2)の自己相関関数とレギュラリゼーションヒストグラムの比較

表 2 と表 3 はIgG1 と IgG2 ADCについて推奨される主な調製法の結果を比較しています。%Pd < 20%ならば一般的に試料は均一であると考えられます。従って、20%を超える場合には試料が不均一であることを示しています。即ち、データは、低分子の結合は R_h を変化させないが、複合体はモノクローナル抗体よりもより不均一であることを示しています。

表 1. 2つの異なる方法で計算したIgG1 と IgG2の流体力学的半径と不均一性

	Type	mAb 1a IgG1	mAb 1b IgG1	mAb 2 IgG2	mAb 3 IgG2
キュムラント法	平均半径 (nm)	5.3	5.3	5.6	5.0
	% PD	15.3	13.4	25.7	21.5
	主ピークの半径 (nm)	6.1	6.0	6.7	6.2
レギュラリゼーション法	主ピークの重量 %	100.0	100.0	99.6	100.0
	主ピークの % PD	21.6	18.0	31.6	27.3

表 2. ADC: IgG1 (Mab1a-ADC と Mab1b-ADC)と IgG2 (Mab2-ADC と Mab3-ADC)のDLSデータ

Type		mAb1a-ADC (ADC1a)	mAb1b-ADC (ADC1b)	mAb2-ADC (ADC2)	mAb3-ADC (ADC3)
キュムラント法	平均半径 (nm)	5.6	7.2	5.2	6.5
	%Pd	15.7	30.8	23.5	34.5
	主ピークの半径 (nm)	6.5	7.4	6.9	8.0
レギュラリゼーション	主ピークの重量, %	99.4	99.6	100.0	100.0
	主ピーク %Pd	21.6	18.0	32.3	33.9

また疎水性も若干増加しており、高分子量の分子種の存在も示しています。

調製法のスクリーニング

4種類のモノクローナル抗体の調製法につき、自動化DLSを用いて、異なる条件下での挙動を調べました。図4は蛋白質の R_h と%Pdが、温度条件2-8°C、pHの増加に伴いどのように変化するかを示しています。pH 5.5における%Pdは11.4を示し、蛋白質はおおむね均一で、高分子領域には少量しか存在しないことを示しています。

図4は R_h がpHと共に増加することを示しています。このシフトはより高いpHでは静電的反発が強くなるためと考えられます。さらに、温度の変化についてはpH 5.5では抗体は比較的安定で、40°Cでは、 R_h が若干増加しています。

最後に、ADCの8種の異なる緩衝液中での調製を比較しました。即ち、ヒスチジン (F1-F5)緩衝液とクエン酸緩衝液 (F6-F8)です(表3)。図5は、3種のクエン酸緩衝液で調製した試料(F6-F8)はより多分散で、ヒスチジン緩衝液で調製したものよりもより高い R_h を持つことを示しています。全体として、これらのデータは $R_h = 6$ nm、%Pd 4.2%のF5がもっとも安定な調製条件であることを示しています。

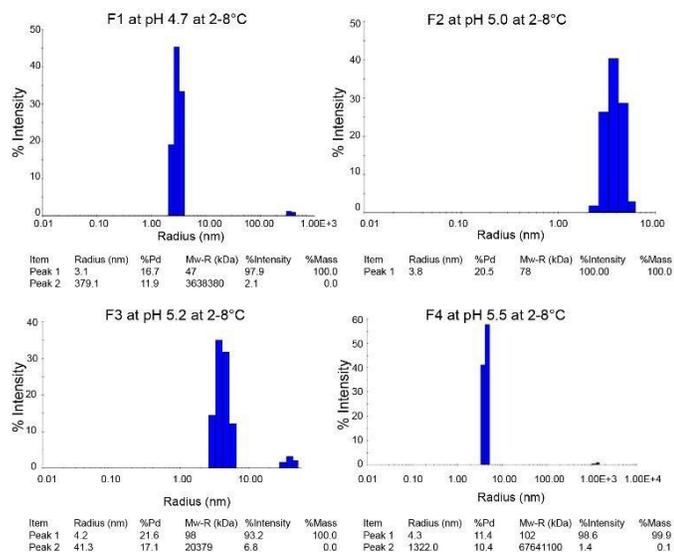


図 4. 異なる pH で調製された 4 種の mAb を DLS で測定した R_h のヒストグラム

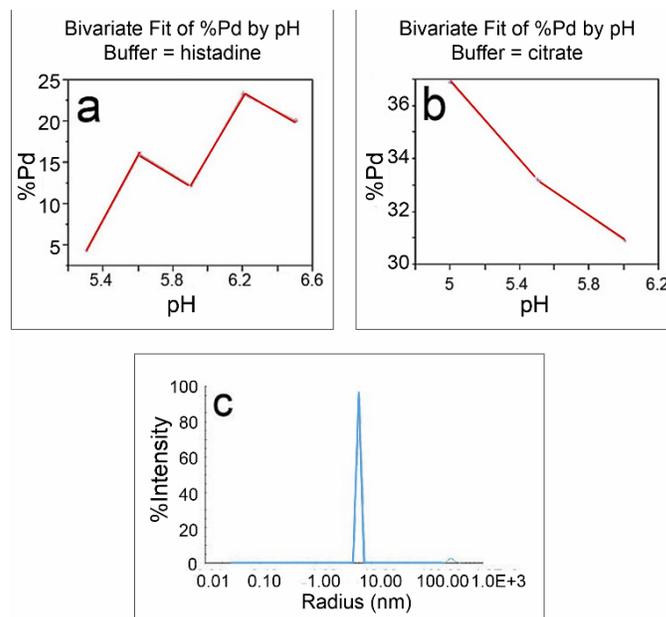


図 5. 調製法スクリーニング：ヒスチジン緩衝液 (a) とクエン酸での調製 (b) の %Pd と F5 調製のヒストグラム (c)

表 3. ヒスチジン (F1-F5)およびクエン酸緩衝液 (F6-F8)における 8 種の ADC 調製法. このデータは F5 の調製法によるタンパク質が最も安定であることを示唆している。

Formulation ID	pH	R _h	%Pd	%Mass
H6.5T (F1)	6.5	5.985	20.0	99.8
H6.2T (F2)	6.2	6.056	23.3	99.8
H5.9T (F3)	5.9	5.526	12.1	99.9
H5.3T (F4)	5.6	5.448	16.0	99.7
H5.6T (F5)	5.3	5.931	4.2	99.6
C5.0T (F6)	5.0	8.338	36.9	99.8
C5.5T (F7)	5.5	8.084	33.2	99.8
C6.0T (F8)	6.0	7.818	30.9	99.5

IV. 結論

DLSはバイオ治療薬の性状解析と調製法スクリーニングの迅速で有用なバイオ分析法です。一連の条件下でのR_hと多分散性の測定によって、DLSは開発者が調製法開発のすべてのステージにおいて、調製法の安定性をモニターし、制御することを可能にします。さらに、各薬剤候補と緩衝液の条件について、熱安定性及びコロイド安定性のプロフィールを決定することができます。

[DynaPro Plate Reader II](#)によって、調製法と薬剤候補のハイスループットスクリーニングが可能になります。また、この機器は、自動化による省力化と、マイクロタイタープレート上での反応を直接DLSで測定できるというユニークな性能によって、研究にかかる費用の抑制にも役立ちます。



[DynaPro Plate Reader II](#) は調製法の開発における、バイオ治療薬、添加剤、緩衝液の何千という組み合わせを高い信頼度で測定することができます。

