

StunnerとUncleでADCの秘密を解き明かす

はじめに

抗体薬物複合体(ADC)は主に3つの成分から構成されています。モノクローナル抗体(mAb)、リンカーそして低分子の薬物です。これらの組み合わせは非常に強力ですが、このような複雑な分子の特性評価には低分子やmAbそれぞれにはない特有の課題を伴います。抗体の濃度、薬物抗体比(DAR)のモニタリングや凝集の監視はADC開発の初期段階で重要です。しかしながら、その他にも考慮すべき点があります。低分子を追加することで前駆体であるmAbの表面の特性が変化し、しばしば疎水性が高まります。薬物、リンカーおよび結合部位の選択は、すべてこの表面の特性変化に影響を与えます。これらの変化はADCの開発適性プロファイル、特にその熱安定性に影響を与えます。そのためADCの製剤を最適化する必要が、しばしば出てくる場合があります。

ADCのDARを決定し、凝集体を検出するためには通常HPLC、サイズ排除クロマトグラフィーや質量分析などの検出技術の組み合わせが考えられます。しかしながら、これらの方法は時間がかかりすぎます。また多くのサンプル量を必要とすることがあり、すべての候補ADCに対応するには最適化が必要になることもあります。Stunner(図1A)は、わずか2 μL のサンプルでUV/Vis分光法を使用し、一度に最大96サンプルの濃度とDARを決定します。^{1,2}

ユーザーが保存した参照スペクトルは、StunnerのUnmixアルゴリズムがADCのUV/Vis吸光スペクトルを構成要素ごとにデコンボリューションするのに役立ちます。これらのデコンボリューションされたスペクトルからStunnerはタンパク質と薬物ペイロードの総量を定量し、それを利用してDARを計算できます。同時にStunnerは動的光散乱(DLS)を利用してADCのサイズとサイズ分布を確認し、凝集体を検出します。

ADCの開発適性評価には、その物理化学的な特性の評価が含まれています。最終的にはさまざまな条件下での熱安定性を理解することが目的です。これらの特性を早期に評価することで、深刻になる前に凝集傾向などの潜在的な問題を特定できます。また、製剤スクリーニングを早期に開始することができます。しかしながら、これらの利点は高スループットでサンプル消費量が少ない方法に依存する

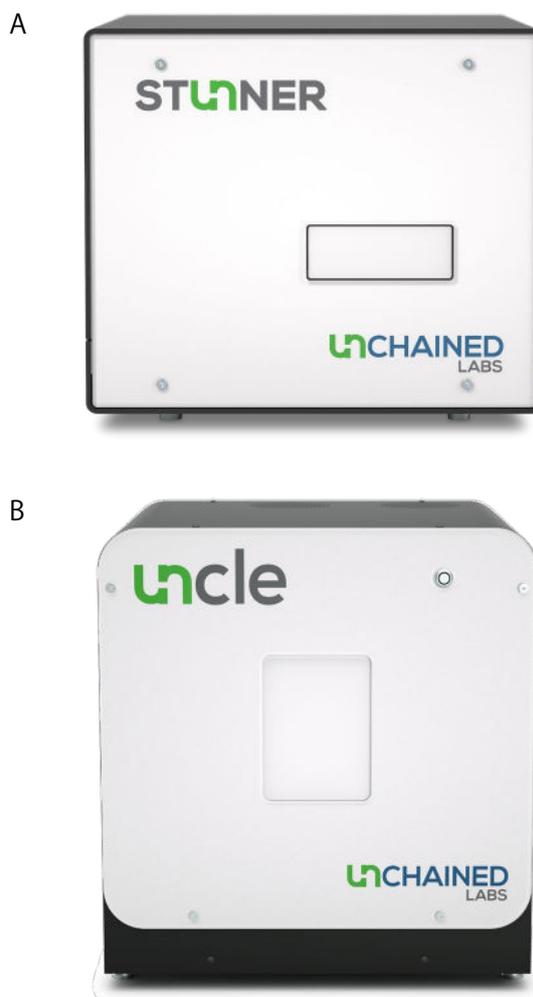


図1: Stunner (A) は、同じ2 μL のサンプルでUV/VisとDLSデータを統合できる唯一のプレート・ベースのシステムです。Uncle (B) は生物学的な安定性を評価するオリジナルのall-in-oneプラットフォームです。

ことです。なぜならばADCの材料は貴重であり、初期段階の研究や発見では容易に入手できないからです。

Uncleはタンパク質の安定性を評価するためのオリジナルのall-in-oneプラットフォームとして、その問題を解決します。わずか9 μL のサンプルからADCの熱安定性を徹底的にプロファイルするため、全スペクトル蛍光、静的光散乱(SLS)およびDLSの3つの検出方法を駆使します。(図1B)。温度制御(15–95 $^{\circ}\text{C}$)と密封性の高いサンプル・ホルダ

ーにより、プロファイリングの実行においてより柔軟な対応が可能になります。蛍光、凝集、サイズ、多分散性や熱変性などの複数のパラメーターを同じサンプル量から1回の実験で評価でき、さまざまな角度から詳細な情報を得ることができます。Uncleは1度に最大48サンプルを測定できます。高スループットでmAbおよびADCを特性評価し、幅広い結果を迅速に提供することができます。

この研究ではmAbを3種類の異なるペイロード/リンカーの組み合わせでコンジュゲートし、ADCをモデル化しました。濃度、DARおよびADCの品質をStunnerで評価し、有望なADC候補を特定するための基準を確立しました。次に3つの候補を選んで、製剤スクリーニングとUncleでの熱ストレス試験に使用しました。この結果はStunnerとUncleを使ってADCをスクリーニングする方法を示しています。また開発適性プロファイルの決定や製剤の最適化方法についても示しています。

方法

モノクローナル抗体へのコンジュゲーションとADCの定量

フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC, Thermo Fisher 46425)、Alexa Fluor™ 350 (AF350) NHSエステル (Thermo Fisher A10168) および AF350 C5 マレイミド (Thermo Fisher A30505) は、それぞれ 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5)、100 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) または 1X リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で 10 mg/mL のモノクローナル抗体と指定された色素対タンパク質モル比で反応させました。100 µg のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP, Thermo Fisher T2556) を還元剤としてマレイミド反応に加えしました。反応混合物は光を遮断しながら室温で1時間インキュベートしました。

インキュベーション後にUnagiを利用して反応混合物をPBSにバッファー交換し、薬物に関連する不純物を除去しました。タンパク質濃度、薬物-抗体比 (DAR)、サイズおよび多分散指数 (PDI) はStunnerで4回測定しました。DLSの取得設定として1秒ずつ5回の取得をおこないました。ソフトウェアの自動で外れ値を除外する機能を使用しました。

ADCの熱安定性および製剤添加物のスクリーニング

ADCとmAbの小分け分注にTween 80、トレハロースまたはアルギニンをそれぞれ添加し、最終濃度0.01%、80 mg/mLと10 mg/mLにしました。タンパク質の濃度は2 mg/mLに調整しました。各サンプルをUni (16個の9 µL 石英キュベットがシリコーン・ガスケットにより密封されたUncleでの測定に使用する消耗品) に3回の測定をするためにアプライしました。タンパク質の変性および凝集実験はUncleの T_m & T_{agg} アプリケーションにておこないました。サンプルをUncleにて15–95°Cの範囲で0.3°C/分の速度で加熱し、266 nmと473 nmで励起しました。同時に蛍光の発光とSLSをモニターしました。Uncle Analysis ソフトウェアは300–380 nmの蛍光強度曲線の重心平均 (BCM) から T_m を、266 nmで散乱した光の強度から T_{agg} を決定しました。

結果

最適な反応条件と薬物、リンカーやmAbの組み合わせを特定するためには、多くの条件で高スループットのスクリーニングをおこなう必要があります。またDARや回収率など、さまざまなパラメーターの閾値や目標値を設定することも含まれます。最後に、得られたADCが高品質であり、凝集体を含まないことを確認する必要があります。場合によっては、これらの基準が密接に関連していることがあります。それゆえにStunnerのような多くのパラメーターを有するアッセイ・ツールを使用することによりプロセスを効率化し、新たな発見をもたらすことができます。

ADCのDARを決定するため、Stunnerは溶液中の抗体と薬物の濃度を同時に測定します。AF350 NHSエステル対mAbのモル反応比を増加させるとADCのDARが増加しました (図2)。2:1または10:1のモル比を使用した場合、DARはモル比とほぼ等しくなりました。しかしながら、この線形関係はモル比の増加とともに弱まりました。20:1および40:1の実験では、それぞれDARが15と30.3になりました。この実験ではリンカーがmAbのリシン残基と優先的に反応します。そのため反応速度と利用可能な反応部位の数に基づき、DARが上限 (停滞状態) に達する可能性があります。

抗体濃度を基にすれば、4つの異なるモル比でのコンジュゲーション反応および精製ステップの回収率を算出することもできます。40:1の反応を除いて、すべての回収率は80%以上でした。このアプリケーションでは許容範囲と見なしました。

StunnerはUnmixデコンポリューションの一環としてUV/Visスペクトルに基づいてバックグラウンドの濁度補正値を決定します。それをA330の値として報告します。濁度は2:1および10:1の反応では、ほぼゼロでした。しかしながら20:1および40:1の反応では高くなりました。一般的に濁度の増加はタンパク質、ADCまたは色素関連の凝集体と考えられる「大きな粒子」の形成を意味します。これは40:1の反応で回収率が低かった理由になるかもしれません。ADCの一部は、沈殿した大きな凝集体の形成により失われた可能性があります。

色素や(実際には)薬物をコンジュゲートさせることで、mAbの流体力学的直径を含む生物物理的な特性が変化します。AF350 NHSエステルコンジュゲートではDARが増加するにつれ、parental mAbと比較してADCの流体力学的直径も増加しました(図3)。2.1のDAR ADCは未反応のmAbに近い直径でしたが、他のADCはそれよりも大きくなりました。サイズの増加はDARの増加に比例しました。より多くの色素がコンジュゲートするとADCは大きくなります。

凝集体や他のタンパク質または薬物関連の不純物を含むADCは、正常で安定した単分散のADCよりも高いPDIを示します。一般的な目安としてPDIが0.1以下のタンパク質やADCは単分散といえます。PDIが0.2を超える場合はタンパク質の凝集を示唆します。AF350 NHSエステルADCは、30.3のDARサンプルを除きPDIが0.1未満でした。30.3のDARサンプルのPDIは0.11でした。高いPDI、低い回収率および高い濁度という結果を考慮するとmAbへの「薬物」の搭載が可溶性や安定性のあるADCの生成を妨げたことを示唆します。

Stunnerでの測定により2.1 DAR ADCは、未反応のmAbとほぼ同じ流体力学的直径とPDIを示しました。これはADCが少なくともparental mAbと同じくらい均一であることを示しています。またコンジュゲーション反応や精製中に凝集が起こらなかった可能性が高いこともわかります。

コンジュゲーションの直後には正常に見えるADCでも後になって問題が生じることがあります。DLSは問題が大きくなる前に異常を検出することができます。DARが15のAF350エステルADCの初期の強度と質量分布は、12 nmの単一のピークを示しました。これは単分散の抗体の典型的なサイズです(図4)。しかしながら4°Cで1週間保存した後、強度分布から大きな凝集体が出現したことが確認されました。質量分布は凝集体が全体の質量のごく一部であり、おそらくADC全体の約1%にすぎないことを示しています。しかしながら凝集体は、時間とともに増加す

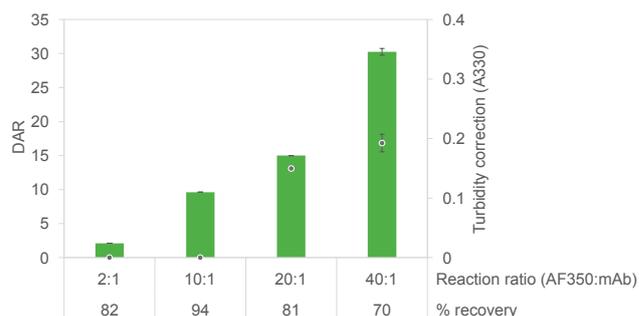


図2: AlexaFluor™ 350 NHSエステルで標識されたmAbの薬物-抗体比(DAR)は2:1、10:1、20:1と40:1の色素対タンパク質モル比で反応後、精製しました(緑の棒グラフと左のY軸)。Stunnerによる濁度評価(灰色の点と右のY軸)と共にコンジュゲートされたmAbの回収率も示しています。エラー・バーは4回の測定における1標準偏差を表しています。

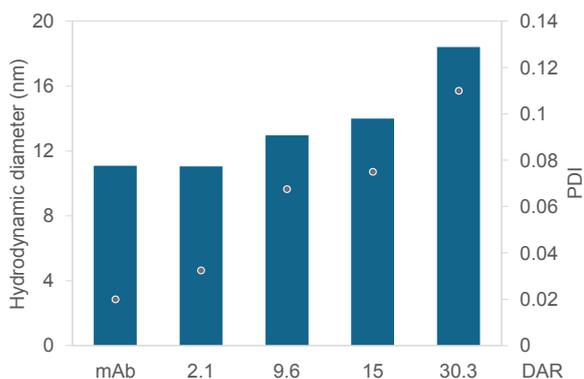


図3: 図2のAlexaFluor™ 350 NHSエステルで標識された精製mAbの流体力学的直径(青い棒グラフと左のY軸)およびPDI(灰色の点と右のY軸)。

る可能性があります。DAR 30.3のサンプルは、さらに深刻な凝集が確認されました(非公開データ)。

StunnerではDAR、濁度、直径やPDIを1回の実験で測定できます。これらの情報を総合することで、mAbへのコンジュゲーションの反応条件を選定・改善するための有益な指標と具体的な結果が得られます。上記のパイロット実験に基づき、さらなる分析に適したサンプル模索への反応条件を同定するため、以下の4つの基準を設定しました。

- 1 DARが2~4の範囲にあること。
- 2 流体力学的直径が12 nmに近いこと。
- 3 PDIが0.1以下であること。
- 4 回収率が80%を超えていること。

これらの基準を満たす、またはそれ以上の3つのコンジュゲート・ペイロードのモル比を特定することに成功しまし

た。得られたADCは製剤化とUncleでの熱安定性試験に進められました (表1)。

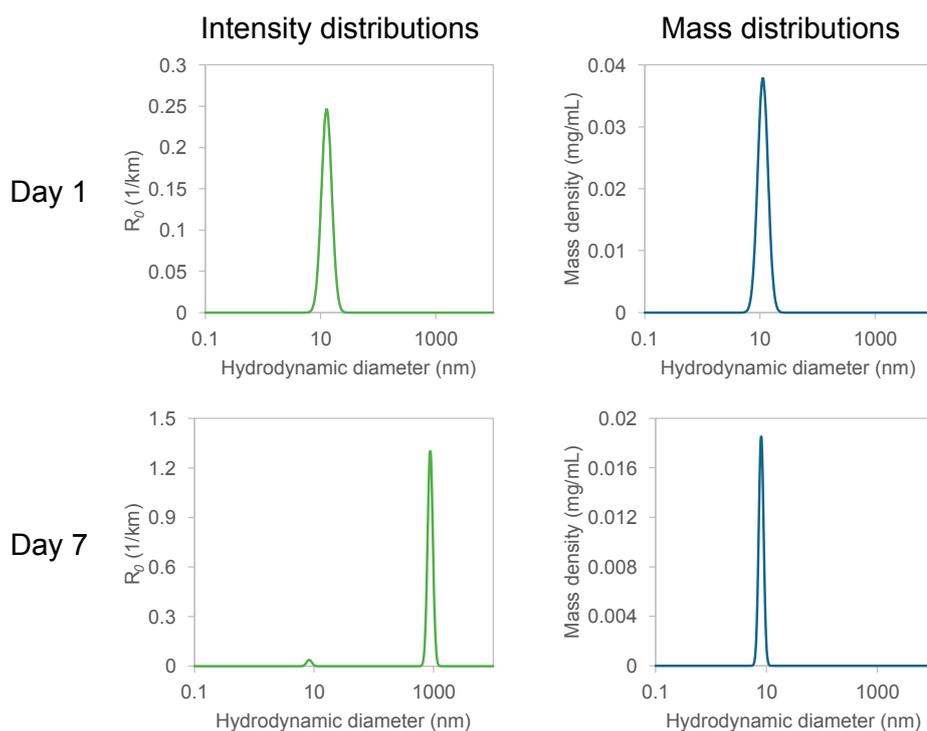


図4: AlexaFluor™ 350 NHSエステルで標識されたmAbの強度分布 (緑で左)、質量分布 (青で右)、DAR 15 (図2および3参照)、反応/精製直後 (上部) および4°Cで7日間保存後 (下部)。

Label	Molar ratio (Dye: mAb)	DAR	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Recovery
FITC	10:1	3.7	13.2	0.1	86%
AF350 NHS Ester	2:1	2.1	11.1	0.03	82%
AF350 C ₅ maleimide	10:1	2.1	11.4	0.1	93%

表1: FITC、AlexaFluor™ 350 NHSエステルおよびAlexaFluor™ 350 C5マレイミドで標識されたmAbの色素対タンパク質の標識モル比、得られたDAR、流体力学的直径、PDI、濁度および回収率。これらのサンプルは追加の熱安定性試験のために選ばれました。

熱安定性スクリーニングはADC、mAbや製剤の高スループットな開発の適性試験において重要な方法です。^{3,4} 内因性の蛍光はタンパク質やmAbの溶解を追跡できますが、ADCでは追加の課題が発生することがあります。ADCに使用される多くの薬物はUV励起により蛍光を発生し、結果として得られる薬物の発光スペクトルが分析を妨げる可能性があります。ADCのmAb成分は、通常300~450 nmの範囲で蛍光を発生します(図5)。ADCが変性・溶解するにつれ発光のピークは長波長側にシフト「red shift」し、強度が減少する傾向があります。ここで使用した分析対象物の場合ではmAbにコンジュゲートしたAF350はUVレーザーで励起されると400~550 nmの範囲で光を発生し、タンパク質の内因性の蛍光発光とわずかですが重なります。

Uncleは全スペクトル蛍光検出の機能を備えており、薬物と抗体の発光スペクトルが重なっているかどうかを確認することができます。

また特定のサンプルに適した方法を見つけるため、分析をカスタマイズするツールも備えています。この柔軟性によりUncleはCPMやSYPRO Orangeのような熱安定性色素にくわえ、SYBR Goldのような核酸に対する色素を使用してADC、ウイルスベクター、LNPや膜タンパク質などの幅広いターゲットを分析することができます。このADCのセットでは300~380 nmの範囲でのBCMに焦点を当てて分析をおこない、コンジュゲートした色素による干渉を除きました。

高い T_m および T_{agg} 値はmAb、ADCさらには製剤の開発適性が優れていることを示唆します。⁴ 一般的な補助成分の中にはTween 80、トレハロースやアルギニンなどがあり、それぞれ異なる目的で添加されます。⁵ Tween 80は界面活性剤および洗剤であり、空気と液体の接触面において表面吸着とタンパク質の変性を抑制します。

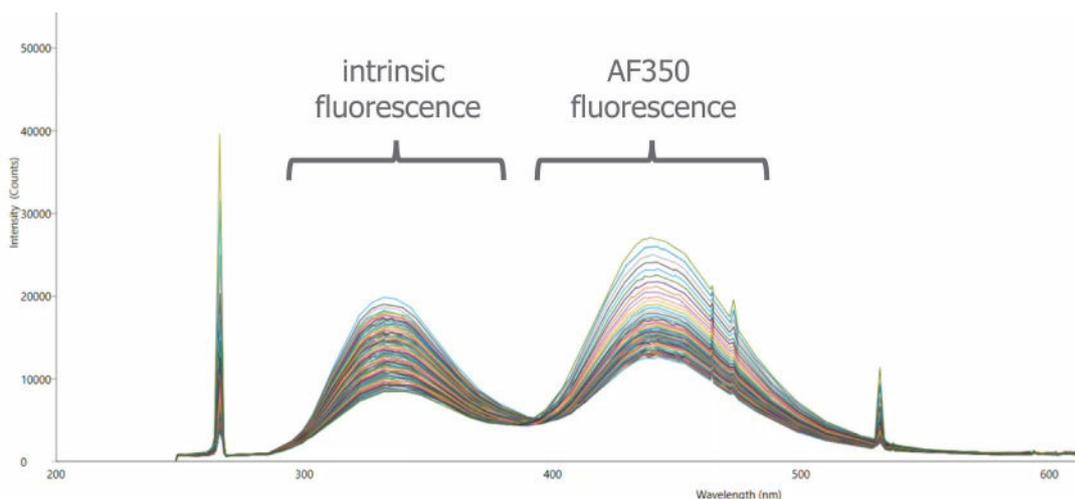


図5: 266および473 nmのレーザーで励起されたAlexaFluor™ 350標識mAbの発光スペクトルをUncleで15~95°Cの昇温中に観察しました。タンパク質と色素の蛍光発光は、それぞれ約330 nmと440 nmに明確なピークが見られます。

トレハロースは凍結保護剤です。アルギニンが高濃度mAb製剤の粘度を低減するためによく使用されます。これら3つの補助成分は、熱ストレスにさらされたmAbやADCの溶解や凝集にも影響を与えます。これらの影響は一様ではありません。mAbの配列や構造、さらには薬物やリンカーの位置や特性によって異なる可能性があります。

T_m および T_{agg} に基づいて製剤をランク付けします。PBSを「デフォルト」と設定することで、どの補助成分がmAbの構造安定性やコロイド安定性に最も大きな影響を与えるかがわかります(図6)。トレハロースの添加はmAbの T_m および T_{agg} に最も大きくポジティブな効果をもたらしました。カオトロープであるアルギニンは T_m を低下させ、 T_{agg} を上昇させました。PBS単独の場合と比較すると、アルギニンによる T_{agg} の上昇はトレハロースによる上昇よりも小さいことが確認されました。Tween 80は T_m や T_{agg} に影響を与えませんでした。また、タンパク質が凝集を開始するよりもはるかに早い段階で変性が始まったことも重要なポイントです。言い換えれば、すべてのサンプルで T_m が T_{agg} よりもかなり低い値を示しました。

ADCを生成すると前駆体mAbの表面の特性が変化し、疎水性が高まる場合があります。この変化は熱安定性のプロファイルにも影響を与えます。FITCやAF350 NHSエステルとのコンジュゲートの場合、親水性のリシン残基がより疎水性を示すようになりました。マレイミド反応ではTCEPを使用することでジスルフィド結合を還元しました。これによりフリーのシステインが生成され、疎水性の薬物と反応しました。Uncleを利用すると同じツールでmAbおよびADCの熱安定性を評価でき、異なる薬物やリンカーを簡単に比較することができます。

mAbとFITCのコンジュゲーションは T_{agg} をわずかに低下させましたが、 T_m には影響を与えませんでした(図7A)。しかしながらAlexa Fluor™ 350 NHSエステルを追加すると、 T_m が0.7°Cそして T_{agg} が0.6°C上昇しました。これらのコンジュゲーション試薬は、いずれもアミンを標的としています。けれども、リンカーや構造は異なり、タンパク質の安定性に対して逆の影響を及ぼしました。ジスルフィド結合を切断し、フリーのシステインにマレイミド反応を用いてAlexa Fluor™ 350を加えると T_m が0.3°C減少し、 T_{agg} が3.6°C減少しました。これはコンジュゲーションによって生じた最大の変化であり、顕著な差異が確認されました。

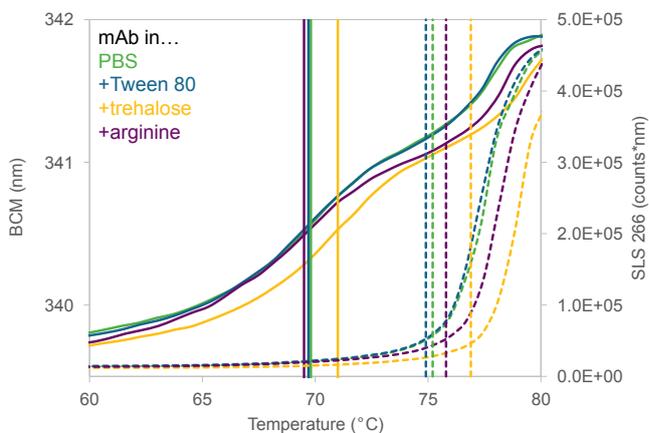


図6: PBS中の2 mg/mL mAbの溶解(実線と左のY軸)と凝集(破線と右のY軸)を示しています。Tween 80(青)、トレハロース(黄)とアルギニン(紫)の添加による影響も示しています。それぞれの製剤の T_m (実線の垂直線)および T_{agg} (破線の垂直線)の値も描かれています。曲線は3回の測定の代表であり、 T_m と T_{agg} は同じ3回の測定の平均値です。

リンカー、薬物、そしてターゲットとするアミノ酸の選択は、すべてADCの熱安定性に影響を与えます。それらの挙動は、関連する化合物から常に予測できるわけではありません。ただしmAbと同様に望ましくない熱安定性プロファイルを示すADCも、適切な製剤や補助成分を選択することで改善できることがよくあります。トレハロースを製剤に加えることでparental mAbと同様、すべてのADCが安定しました(図7B)。マレイミド結合体は、熱安定性が大きく改善されました。PBSでの T_{agg} は71.6°Cでしたが、トレハロース添加により76.2°Cに上昇し約5°Cの向上が見られました。

他の補助成分であるアルギニンとTween 80もADCの熱安定性にさまざまな影響を与えました。しかしながら、最も大きな安定化効果を示したのはトレハロースでした。全ての結果を表2にまとめています。アルギニンは T_m を低下させ T_{agg} を増加させる傾向がありましたが、AF350マレイミドを含むADCに添加すると両方のパラメータが改善されました。

結果はUncleの T_m および T_{agg} 測定の再現性も示しています。すべての値の標準偏差は1°C未満でした。これによりUncleが熱安定性を評価するための信頼性が高く、堅牢な方法であることが示されました。

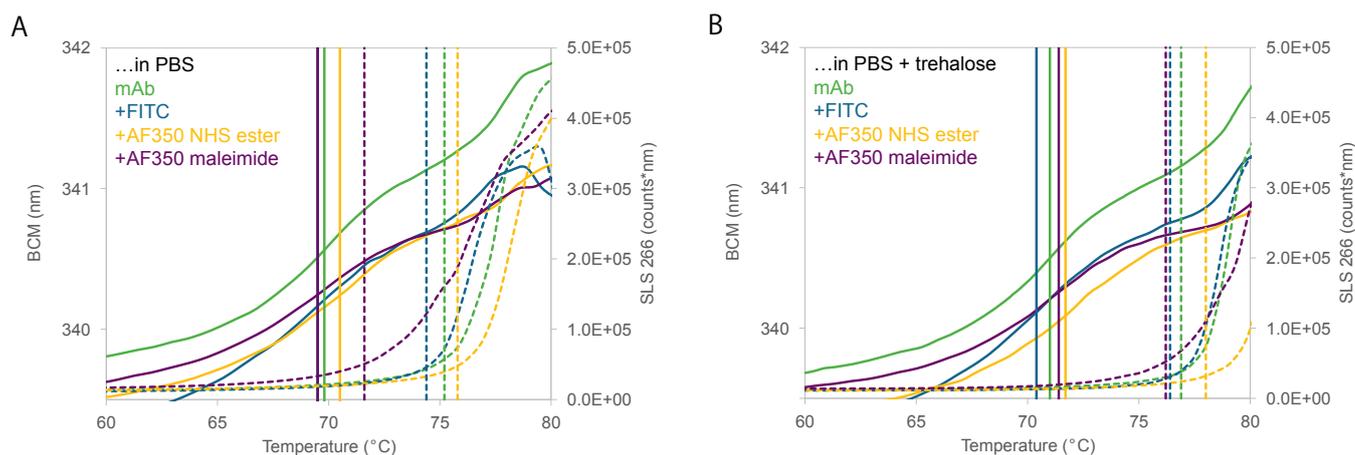


図7: PBS中の2 mg/mLのmAb (緑)、FITC標識mAb (青)、AlexaFluor™ 350 NHSエステル標識mAb (黄)およびAlexaFluor™ 350 C5マレイミド標識mAb (紫)の溶解(実線と左のY軸)と凝集(破線と右のY軸)を示しています。またPBS (A) およびPBSにトレハロースを含む条件 (B) での T_m (実線の垂直線)と T_{agg} (破線の垂直線)の値も示しています。曲線は3回の測定を代表するものであり、 T_m と T_{agg} は同じ3回の測定の平均値です。

結論

ADCは単なる抗体ではありません。薬物とリンカーという2つの低分子も含まれているため、ADCの特性評価はさらに複雑になります。mAbの評価に使用される多くのツールはADCにも応用できます。ただしプロセスや開発適性に関して適切な判断をおこなうためには、特定の専門知識が求められます。

StunnerとUncleはDAR、濃度、凝集や熱安定性を高スループットかつ少量のサンプルで評価することで、これらに関する知識を提供します。このツールを使用することで、問題のあるコンジュゲーション反応や凝集しやすいサンプルを簡単に特定できます。さらに安全で効果的なADCを迅速に市場に提供するため、製剤を最適化することが可能です。

Sample		PBS	+trehalose	+arginine	+Tween 80
mAb	T_m	69.8 ± 0.1	71.0 ± 0.1	69.5 ± 0.1	69.7 ± 0.0
	T_{agg}	75.2 ± 0.3	76.9 ± 0.2	75.8 ± 0.3	74.9 ± 0.1
+ FITC (DAR 3.7)	T_m	69.5 ± 0.1	70.4 ± 0.1	69.3 ± 0.2	69.4 ± 0.3
	T_{agg}	74.4 ± 0.3	76.4 ± 0.1	75.0 ± 0.2	74.2 ± 0.4
+ AF350 NHS ester (DAR 2.1)	T_m	70.5 ± 0.1	71.7 ± 0.7	69.6 ± 0.1	70.6 ± 0.2
	T_{agg}	75.8 ± 0.2	78.0 ± 0.9	75.5 ± 0.2	75.8 ± 0.2
+ AF350 maleimide (DAR 2.1)	T_m	69.5 ± 0.1	71.5 ± 0.2	70.1 ± 0.2	70.0 ± 0.2
	T_{agg}	71.6 ± 0.2	76.2 ± 0.4	74.4 ± 0.2	71.5 ± 0.9

表2: この研究におけるすべての分析対象物および製剤の溶解温度 (T_m) および凝集温度 (T_{agg})。値は3回の測定の平均値 ± 1標準偏差として示しています。

参考文献

1. Drug-to-Antibody Ratio (DAR) by UV/Vis Spectroscopy. Y Chen. In: Ducry L, ed. Antibody-Drug Conjugates. Totowa, NJ: Humana Press; 2013:267–273.
2. Monitoring of antibody-drug conjugation reactions with UV/Vis spectroscopy. S Andris, et al. Journal of Biotechnology. 2018; 288:15–22.
3. Predictive Nature of High-Throughput Assays in ADC Formulation Screening. BJ Mills, et al. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2023; 112(7):1821–1831.
4. Developability assessment during the selection of novel therapeutic antibodies. A Jarasch, et al. Journal of pharmaceutical sciences. 2015; 104(6):1885–1898.
5. A review of Formulations of Commercially Available Antibodies. RG Strickley, et al. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2021; 110(7):2590-2608.e56.



Unchained Labs

東京都千代田区神田須田町 2-9-2
PMO神田岩本町 3F

Phone: 03-3526-2811

Email: unchained.labsjp@unchainedlabs.com

© 2024 Unchained Labs. 禁無断複写・転載。Unchained Labsのロゴ、StunnerとStunnerのロゴ、およびUncleとUncleのロゴはUnchained Labsの登録商標です。掲載されているその他すべてのブランドや製品名は、各社が所有する商標です。

Rev B