抗体医薬の新規 HPLC 分析法の開発研究

轟 木 堅 一 郎

Development of HPLC Analysis Methods for Therapeutic Monoclonal Antibodies

Kenichiro Todoroki

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka; 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan.

(Received August 11, 2014)

Therapeutic monoclonal antibody (mAb) preparations are produced from cultured cells; therefore, detailed and multidimensional analyses of their heterogeneities are required. We analyzed five commercially available mAb preparations by high-temperature reversed-phase LC using a wide-pore core-shell column for pluralistic quality assessment. At a highly elevated column temperature, isopropanol with high elutropic strength coefficients and a wide-pore core-shell type octyl column showed good peak resolution of the investigated mAbs and their related constituents. We used this method to estimate the residual rate of intact mAbs after a heat aggregation treatment and conducted fragmentation analysis by analyzing their pepsin digests. Each peak component was identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. All results were compared with those of reversed-phase and size exclusion analyses.

Key words—therapeutic monoclonal antibody; high-temperature reversed-phase LC; aggregate

1. はじめに

次世代型医薬品である抗体医薬品は、その高い有効性と特異性、副作用の少なさから、がんや自己免疫疾患など幅広い分野で利用されている。¹⁻³⁾ また、ブロックバスターの特許切れから、バイオシミラーの開発競争も盛んになっており、抗体医薬品の利用は今後ますます広がるものと予想される。低分子化合物である合成医薬品とは異なり、抗体医薬は培養細胞を利用して生産されることから、わずかな培養条件の違いによって生産物の分子構造に影響を及ぼす可能性がある。⁴⁻⁷⁾ そのため、抗体医薬品製剤中には様々な分子種が含まれる可能性があり、これら分子種を詳細かつ多角的に解析する必要がある。⁸⁻¹⁰⁾ 現在、抗体医薬品製剤の分析には、液体クロマトグラフィー (LC)、¹¹⁾ 質量分析、¹²⁻¹⁴⁾ 電気泳動¹⁵⁾等が利用される。なかでも LC 分析は、様々な分離モード [イオン交換、逆相、疎水、サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography; SEC) 等] を分析目的に応じて使い分けることができる。

Amgen の Dillon らは、これまで難しかったイムノグロブリン (immunoglobulin G; IgG) 抗体の逆相 LC による直接分離を高温条件下、イソプロパノールを多く含む移動相により達成している。¹⁶⁾ この知見を基に本研究では、抗体医薬品の LC による多角的な品質評価を目的として、市販の抗体医薬品及びその凝集体、酵素消化断片について高温逆相 LC 分析を行い、その分離挙動を解析した。シンポジウムではほかにも臨床現場における血漿薬物濃度分析法として、トリプシン消化 LC/MS による抗体医薬の血漿薬物濃度分析法の開発についても紹介した。この方法では、血漿試料に対してトリプシン消化を行い、抗体医薬に特異的なペプチド配列を標的とすることで、血中に多量に含まれる IgG の中から検討した 3 種の抗体医薬品のみをそれぞれ選択的に定量することが可能となった。本誌上シンポジウムでは誌面の都合上、高温逆相 LC 分析による市販の抗体医薬品及びその凝集体、酵素消化断片分析の結果について成果を紹介する。

2. 高温逆相 LC を用いた抗体医薬品の分析

従来、タンパク質の逆相 LC 分析には吸着を抑えるため butyl カラム、移動相にはアセトニトリルと

静岡県立大学薬学部 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

e-mail: todoroki@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 134 年会シンポジウム S29 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Chromatograms of Five Monoclonal Antibody (mAb) Preparations by (A) HT-RPLC, (B) RPLC Using a Core-shell Type Butyl Column, and (C) SEC

mAbs: (i) cetuximab, (ii) tocilizumab, (iii) bevacizumab, (iv) trastuzumab, and (v) infliximab.

水との系が広く用いられている。一方、Amgen の Dillon らは、カラム温度を 75°C という高温条件下かつイソプロパノール (isopropanol; IPA) を多く含む移動相を、分離を向上させるため octyl カラムを用いた分離モード (高温逆相 LC) により、IgG の直接分離に成功している。¹⁶⁾ 高温分離により、固定相表面への IgG の吸着抑制及び変性 IgG のリフォールディング抑制効果が期待できる。また、IPA を移動相に添加することで、吸着した IgG の高い脱離効率と IgG の凝集抑制効果が期待できる。これにより、抗体医薬品をシャープなピークとして分離検出することが可能となる。さらに分離カラムに粒子径 $3.6\ \mu\text{m}$ 、厚さ $0.2\ \mu\text{m}$ のコアシェル型カラムである Aeris Widepore¹⁷⁾ を使用することで高速分離を実現した。

2-1. 抗体医薬品の LC 分離結果 市販の 5 種抗体医薬品製剤を分析対象とし、高温逆相 LC と通常の逆相 LC、SEC の 3 種の分離モードを比較した。高温逆相 LC と逆相 LC ではグラジエント溶出を用いているため、理論段数 (N) や理論段高さ (H) といった、通常 LC 分離で用いられるパラメーターを算出することができない。他のパラメーターとして、ピークキャパシティーやピーク幅も汎用されるが、流速、分離条件及びグラジエント勾配が

モード毎で大きく異なることから、各最適分離条件におけるピーク形状を比較すべきと考えられた。

そこで本研究では、分離モード比較のために、ピーク高さとピーク幅の比である peak sharp factor (PSF) を定義して用いた。PSF の値が高いほど、ピークがシャープであることを示す。抗体医薬品のピークに対して PSF を算出することにより、分離モードのピーク形状を比較した。また、高温逆相 LC において得られたピークをマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析計 (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MALDI-TOFMS) を用いて分子量を確認した。高温逆相 LC による 5 種抗体医薬品製剤を分離したときのクロマトグラムを Fig. 1 (A) に、通常の逆相 LC によるクロマトグラムを Fig. 1 (B) に、SEC によるクロマトグラムを Fig. 1 (C) にそれぞれ示す。Table 1 には、それぞれの製剤に対して各分離モードにおける保持時間 (min) と PSF ($\mu\text{AU}/\text{min}$) を記す。高温逆相 LC 条件を用いることで 5 種抗体医薬品の分離が達成できた。通常の逆相 LC では 5 種抗体医薬品の保持時間は一致し、bevacizumab に関しては検出できなかった。しかし高温逆相 LC を用いることで、20 分以内に良好なピーク形状で 5 種を分離でき、その溶出順は

Table 1. Retention Times (t_R) and Peak Shape Factors (PSFs) for Each Peak Separated by HT-RPLC, RPLC, and SEC

	HT-RPLC		RPLC		SEC	
	t_R (min)	PSF (μ AU/min)	t_R (min)	PSF (μ AU/min)	t_R (min)	PSF (μ AU/min)
Cetuximab	19.5	54.1	7.8	325.0	9.5	23.3
Tocilizumab	17.9	72.7	8.0	49.7	9.9	23.4
Bevacizumab	18.3	52.4	—	—	10.9	16.0
Trastuzumab	17.0	15.2	7.6	22.2	9.8	3.7
Infliximab	17.3	29.6	7.7	161.1	10.0	20.2

trastuzumab, infliximab, tocilizumab, bevacizumab, cetuximab であった。高温逆相 LC は、IgG₁ と IgG₂ のようなアイソフォーム分離だけでなく、抗体医薬品のようなわずかな構造の違いに対しても分離が可能であることがわかった。また SEC では 5 種を 12 分以内に分離できたものの、それぞれのピークは広がっており、高温逆相 LC とは異なる溶出順であった。PSF 値を算出したところ、tocilizumab を除いて、octyl カラムを用いた高温逆相 LC は butyl カラムを用いた通常の逆相 LC の方がより低い値であったが、SEC より高い値が得られた。このことから、高温逆相 LC は抗体医薬品毎に分離かつ良好なピーク形状で溶出できる分析法であることが示された。高温逆相 LC は SEC とは異なり、塩を含まない移動相で各成分を分離することが可能である。そのため LC により分取した試料を、脱塩操作を行わずに直接 MALDI-TOFMS で測定することが可能である。そこで Fig. 1 (A) の各 mAb ピーク成分を分取し、MALDI-TOFMS 測定した。得られた分子量を、括弧内に記した審査報告書記載の推定分子量¹⁸⁻²²⁾と比較したところ、cetuximab が 151572.7 (約 152000)、tocilizumab が 147515.8 (約 148000)、bevacizumab が 148863.0 (約 149000)、trastuzumab が 147746.3 (約 148000)、infliximab が 148080.4 (約 149100) となり、良好な一致を得た。このことから、高温逆相 LC による分離中の mAb の分解等は起こっていないこと、また高温逆相 LC が MALDI-TOFMS に適用可能であることが示された。

3. 高温逆相 LC の加熱凝集試験への適用

抗体医薬品に限らず、タンパク質を主成分とするバイオ医薬品において、凝集性には開発初期から注

意が必要である。製剤中の凝集体の割合が高い場合、製剤の生産過程においては活性体である抗体医薬の精製効率、生産量の低下が引き起こされる可能性や、市場後においては凝集体がときとして免疫原性を示し、副作用を惹起する可能性があるためである。²³⁻²⁵⁾凝集体の分析には専ら SEC が用いられているが、今回、高温逆相 LC を用いて凝集体を捉えることを試みた。本研究では、5 種抗体医薬品製剤に対して異なる 3 温度で加熱凝集させ、得られた加熱凝集物を高温逆相 LC と SEC により測定し、結果を比較した。また、それぞれの分離モードに対し、抗体医薬の残存率を算出し比較することで、本法が加熱凝集試験に適用できるか検証した。

3-1. 凝集体の分析結果 Cetuximab の加熱凝集物を高温逆相 LC により分析したときのクロマトグラムを Fig. 2 (A) に、SEC によるクロマトグラムを Fig. 2 (B) にそれぞれ示す。分析システムの都合上、同一バッチの反応物を分析することができなかったが、いずれのクロマトグラムにおいても、残存する cetuximab のピークは加熱温度の上昇に伴って低下した。また今回の分離条件では、抗体の 2 量体や 3 量体の凝集体をピークとして捉えることはできなかった。Table 2 には、両分離モードで測定した 5 種抗体医薬の加熱処理後の抗体医薬の残存率を示す。加熱凝集する温度は製剤毎に大きく異なることが示唆された。この性質の違いは、抗体医薬の構造の違いによる凝集の起こり易さの違いや、製剤中に含まれる添加物の違いに基づくものであると考えられる。また、抗体医薬の残存率は、高温逆相 LC と SEC 分離において概ね一致する結果を与えた。以上の結果より、高温逆相 LC は抗体医薬品の凝集評価に対しても利用できることが示唆された。

Fig. 2. Chromatograms of the Cetuximab Sample after Heat Aggregation Treatment at Three Different Temperatures, Obtained by (A) HT-RPLC and (B) SEC

4. HT-RPLC による抗体フラグメント分析

高温逆相 LC がフラグメント分析に適用できるかを評価すべく、ペプシン消化物である $F(ab')_2$ とその還元体である Fab' をモデル化合物として分析した。

4-1. 抗体フラグメントの分析結果 Figure 3 (A) には、抗体医薬品とそれらのペプシン消化物をそれぞれ SEC で分析したときのクロマトグラムを、Fig. 3 (B) には SEC で分取した $F(ab')_2$ を高温逆相 LC で分析したときのクロマトグラムを、Fig. 3 (C) には分取した $F(ab')_2$ を還元することで得られた Fab' を高温逆相 LC で分析したときのクロマトグラムを示す。 $F(ab')_2$ に対応するピークは抗体医薬品より先に、Fab' に対応するピークは抗体医薬品の後にそれぞれ溶出した。このことから高温逆相 LC は、これらのフラグメントを分子のコンフォメーションだけでなく、分子サイズや疎水性も認識し、分離していることが示唆された。高温逆相 LC において得られたピーク成分を MALDI-TOFMS 測定した結果、分子量に相当する $F(ab')_2$ の m/z 値は、

cetuximab が 101674.5, tocilizumab が 97355.5, bevacizumab が 98681.5, trastuzumab が 97610.1, infliximab が 98036.9 であった。また、Fab' の m/z 値は、cetuximab が 50873.7, tocilizumab が 48502.2, bevacizumab が 49337.6, trastuzumab が 48547.9, infliximab が 48903.1 であった。これら成分については基準となる標品が存在しないため、理論上の分子量と比較することはできなかったが、 $F(ab')_2$ と Fab' においてそれぞれ約 100 kDa, 50 kDa の妥当な分子量を与えた。また、還元により生じた Fab' の分子量は $F(ab')_2$ の約半分であった。以上の結果から高温逆相 LC は、抗体の断片化評価の分析に対しても適用可能であることが示された。さらに高温逆相 LC 分離中における $F(ab')_2$ と Fab' の断片化についても起こっていないことが示唆された。

5. おわりに

以上のように筆者は、高温逆相 LC により、5 種抗体医薬品製剤、それらの加熱凝集体、抗体の断片化をシミュレートして作製した $F(ab')_2$ 及び Fab' をそれぞれ分析した。製剤中の抗体医薬は高温逆相 LC により良好に分離できることが示された。また、加熱凝集時の抗体医薬の残存率から凝集評価が可能であることが示された。さらに、 $F(ab')_2$ 及び Fab' についても良好に分離され、MALDI-TOFMS において妥当な結果を与えた。今回確立した分析法は、抗体医薬品製剤を良好に分離分析できるのみならず、直接質量分析計とつなぐことができる方法である。本分析法は凝集評価、断片化評価にも期待でき、抗体医薬品の製造工程、品質管理部門、病院薬剤部など様々な分野での利用が期待できる。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜

Table 2. Residual Rate of Intact mAbs after Heat Aggregation Treatment Analyzed by HT-RPLC and SEC

	HT-RPLC			SEC		
	74°C	70°C	66°C	74°C	70°C	66°C
Cetuximab	6.0±2.5	57.1±3.1	84.6±3.9	0.1±0.0	31.2±0.7	87.6±1.4
Tocilizumab	95.6±6.8	95.2±3.2	97.6±1.6	96.2±0.9	98.9±1.5	101.3±0.1
Bevacizumab	N.D.	64.4±0.8	97.9±3.7	N.D.	59.6±2.1	95.4±1.9
Trastuzumab	94.9±4.9	94.4±8.1	98.9±8.7	84.0±0.4	102.4±0.1	102.7±0.2
Infliximab	12.3±7.1	14.6±2.8	17.8±7.7	N.D.	N.D.	12.5±0.7

Mean (%) ± S.D. (n=3). N.D. means 'Not detected'.

Fig. 3. Chromatograms of (A) Pepsin Digests and Intact mAbs Separated by SEC, (B) Fractionated $F(ab')_2$ and Intact mAbs, and (C) Fractionated Fab' and Intact mAbs Separated by HT-RPLC

mAbs: (i) cetuximab, (ii) tocilizumab, (iii) bevacizumab, (iv) trastuzumab, and (v) infliximab.

りました静岡県立大学薬学部生体機能分子分析学分野 豊岡利正教授に謹んで感謝致します。本研究は、同分野 豊田耕司、中根敦子 両修士の精力的な仕事の成果でもあります。深く感謝申し上げます。本研究に際し、有益なご助言とご協力を頂きました静岡県立大学臨床薬効解析学分野 伊藤邦彦教授、林 秀樹講師（現岐阜薬科大学）、大鹿雄美学士、生体機能分子分析学分野 井之上浩一講師及び関俊哲助教に深謝致します。抗体医薬の血漿薬物濃度分析法の開発に際し、ご協力を賜りましたJA 静岡厚生病院リウマチ科 坪井声示先生、同院薬剤部 松山耐至先生に深謝いたします。抗体医薬のLC分離に際しご協力頂きました株式会社島津ジーエルシー 佐藤友紀様に感謝致します。MALDI-TOFMS分析においてご指導、ご助言を賜りました株式会社島津テクノロジー 工藤 忍様、甲斐 力様に感謝致します。SEC-多角度光散乱検出器分析において、ご指導、ご助言を賜りました株式会社島津製鉄所 山口忠行様、昭光サイエンティック株式会社 鶴田英一様に感謝致します。本研究は、JSPS 科研費 25460040 の助成を賜ることにより行ったものです。併せて感謝の意を表します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Weiner L. M., Surana R., Wang S. Z., *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 317–327 (2010).
- 2) Chan A. C., Carter P. J., *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 301–316 (2010).
- 3) Sliwkowski M. X., Mellman I., *Science*, **341**, 1192–1198 (2013).
- 4) Kuribayashi R., Hashii N., Harazono A., Kawasaki N., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **67**–**68**, 1–9 (2012).
- 5) Maeda E., Kita S., Kinoshita M., Urakami K., Hayakawa T., Kakehi K., *Anal. Chem.*, **84**, 2373–2379 (2012).
- 6) Fradkin A. H., Carpenter J. F., Randolph T. W., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3247–3264 (2009).
- 7) Kumar S., Singh S. K., Wang X., Rup B., Gill D., *Pharm. Res.*, **28**, 949–961 (2011).
- 8) Beck A., Sanglier-Cianferani S., Van Dorsselaer A., *Anal. Chem.*, **84**, 4637–4646 (2012).
- 9) Chen S.-L., Wu S.-L., Huang L.-J., Huang J.-B., Chen S.-H., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **80**, 126–135 (2013).
- 10) Liu H.C., Gaza-Bulsecu G., Faldu D., Chumsae C., Sun J., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 2426–2447 (2008).

- 11) Staub A., Guillaume D., Schappler J., Veuthey J.-L., Rudaz S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**, 810–822 (2011).
- 12) Beck A., Wagner-Rousset E., Ayoub D., Van Dorsselaer A., Sanglier-Cianféron S., *Anal. Chem.*, **85**, 715–736 (2013).
- 13) Zhang Z. Q., Pan H., Chen X. Y., *Mass Spectrom. Rev.*, **28**, 147–176 (2009).
- 14) Dillon T. M., Bondarenko P. V., Rehder D. S., Pipes G. D., Kleemann G. R., Ricci M. S., *J. Chromatogr. A*, **1120**, 112–120 (2006).
- 15) He Y., Lacher N. A., Hou W., Wang Q., Isele C., Starkey J., Ruesch M., *Anal. Chem.*, **82**, 3222–3230 (2010).
- 16) Dillon T. M., Bondarenko P. V., Ricci M. S., *J. Chromatogr. A*, **1053**, 299–305 (2004).
- 17) Fekete S., Berky R., Fekete J., Veuthey J.-L., Guillaume D., *J. Chromatogr. A*, **1236**, 177–188 (2012).
- 18) Bristol-Myers Squibb. “Product information of ERBITAX”: http://packageinserts.bms.com/pi/pi_erbitux.pdf, cited 29 July, 2014.
- 19) Roche. “Product information of AC-TEMRA”: <http://www.roche-australia.com/fmfiles/re7229005/downloads/ra/actemra-pi.pdf>, cited 29 July, 2014.
- 20) Roche. “Product information of AVASTIN”: <http://www.roche-australia.com/fmfiles/re7229005/downloads/oncology/avastin-pi.pdf>, cited 29 July, 2014.
- 21) Roche. “Product information of HERCEPTIN”: <http://www.roche-australia.com/fmfiles/re7229005/downloads/oncology/herceptin-pi.pdf>, cited 29 July, 2014.
- 22) Janssen. “Product information of REMICADE”: <http://www.remicade.com/shared/product/remicade/prescribing-information.pdf>, cited 29 July, 2014.
- 23) Fradkin H., Carpenter J. F., Randolph T. W., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3247–3264 (2009).
- 24) Carpenter J. F., Randolph T. W., Jiskoot W., Crommelin D. J., Middaugh C. R., Winter G., Fan Y. X., Kirshner S., Verthelyi D., Kozlowski S., Clouse K. A., Swann P. G., Rosenberg A., Cherney B., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1201–1205 (2009).
- 25) Hermeling S., Schellekens H., Maas C., Gebbink M. F., Crommelin D. J., Jiskoot W., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1084–1096 (2006).