

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04793

研究課題名（和文）抗体-薬物複合体を固液界面で立体選択的に合成・高純度化するクロマトグラフィー

研究課題名（英文）Chromatographic Process for the Steric Selective Synthesis and Separation of Antibody-Drug Conjugates on a Solid-Liquid Interface

研究代表者

吉本 則子 (Yoshimoto, Noriko)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：40432736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、分子特性が類似している抗体薬物複合体の修飾異性体を種々のイオン交換、疎水、アフィニティークロマトグラフィーでの分離を行った。モデル薬物として、ピレン、クマリン、フルオレセインを使用し、リンカーには分子量の異なるPEGを使用した。疎水クロマトグラフィーにおける分離は、PEGの分子量が大きいほど未修飾抗体との分離は向上され、溶出挙動は溶解度を指標としたモデルで記述でき、分離条件を合理的に設定できることが分かった。イオン交換クロマトグラフィーとアフィニティークロマトグラフィーでは分離が困難であったが、抗体薬物複合体の修飾反応場としては機能する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体タンパク質に薬理活性の高い薬物を修飾した抗体薬物複合体は分子認識能をもつ優れた医薬品として期待されている。これらの修飾構造を科学的に制御することは困難であり、薬理活性の異なる複数の修飾体が生成することが問題になっている。修飾体の分子認識能は未反応の抗体タンパク質よりも低い場合は、もとの抗体タンパク質の除去も重要となる。本研究では、これら修飾体のクロマトグラフィーによる分離挙動を操作条件の関数としてモデル化でき、分離条件を合理的に決定できることを示した。また、リンカー構造の改変や、固相反応により、修飾構造が異なり、分離が容易になる修飾体を生成できる可能性があることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：we separated modified isomers of antibody-drug conjugates (ADCs) with similar molecular characteristics using various ion-exchange, hydrophobic, and affinity chromatography techniques. Pyrene, coumarin, and fluorescein were used as model drugs, and PEG linkers of different molecular weights were employed. Separation via hydrophobic chromatography improved as the molecular weight of PEG increased, enhancing the separation from unmodified antibodies. The elution behavior could be described using a model based on solubility, allowing for rational setting of separation conditions. Although separation was challenging with ion-exchange and affinity chromatography, these methods showed potential for functioning as modification sites for ADCs.

研究分野：生物分離工学

キーワード：抗体薬物複合体 疎水性クロマトグラフィー イオン交換クロマトグラフィー protein Lクロマトグラフィー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

抗体薬物複合体 ADC は、抗体分子の優れた分子認識特性と様々な薬理活性をもつ低分子化合物を組み合わせた医薬品として期待されている。しかし、薬物修飾数(DAR)の異なる複数の修飾体および未反応抗体の混入が薬理活性の不均一性をもたらすといった課題がある。これらの分離に関しては主に疎水性クロマトグラフィー(HIC)が用いられることが一般的である。HIC は、移動相の塩濃度を高めることでタンパク質の液相中での溶解度を低下させ、クロマト担体への親和性を増加させることで吸着を行い、塩濃度を低下させることで脱離を行う。ADC に用いられる薬物は疎水性の強いものが多いため、HICにおける DAR ごとの分離が可能となる[1]。しかし、薬物の修飾と同時に ADC 分子全体の疎水性が増加し、もとの未修飾抗体と比べて溶液中の溶解度が著しく減少している可能性がある。このため、HICにおける吸着・脱離の操作条件の選定方法は難しく、分離操作方法の改善を検討している例は少ない。また、ADC の合成方法については遺伝子組み換え操作や親和性ペプチドにより純度の高い ADC を得る方法が提案されている[2]。しかし、いずれの方法においても反応操作後の分離は重要となる。一方で、抗体分子の選択的な分離が可能なクロマト担体上で抗体分子の配向性が規定できる場合、反応部位選択的な ADC の合成ができる可能性がある。この場合、反応と分離を連続化したクロマト操作により実施できる可能性がある。合理的な分離条件の選択方法や、反応と分離の連続化による操作方法の簡便化は ADC の不均一性の課題を改善し、より純度が高く高活性な ADC の獲得に寄与するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では ADC の分離において、HIC 担体における保持機構を解析し、これらの保持機構に基づいた簡便な操作条件の決定を可能とすることを目的とした。モデル薬物としては、すでに報告例のあるピレン[3]、クマリン[3]、フルオレセイン[4]を用い複数の修飾体を用いることで、解析方法の汎用性の検証を行った。また、薬物と抗体分子間にリンカー分子を導入することで ADC の薬理活性が向上されることが報告されている。これらのリンカーには炭素数 12 前後のポリエチレングリコール(PEG)が用いられる。PEG はタンパク質の分子半径の増大、溶解度の向上、免疫原性の増加といった効果をもつことが報告されている[5]。このため、ADC 分子への PEG 鎖の導入は、タンパク質表面の分子特性の変化をもたらす、クロマトプロセスにおける安定性の向上や分離の改善につながる可能性が期待できる。このため、本研究では分子量の異なる PEG をリンカーとして有する ADC の分離特性についても検討を行った。

また、反応と分離を連続化し、ADC の合成操作全体の簡便化も目指し、クロマト担体上での抗体タンパク質の修飾反応操作を実施し、液相反応操作との違いについても明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

モデル薬物としてタンパク質修飾用の活性化基をもつピレン、クマリン、フルオレセインを使用して、ヒト化モノクローナル抗体に修飾した。抗体分子表面の Lysine 残基の ϵ -アミノ基をターゲットとした場合は、NHS 基をもつモデル薬物を使用した。抗体分子内部の Cysteine 残基のメルカプトドシル基をターゲットとした場合は、抗体分子をチオグリセロールで還元処理したのち、マレイミド基を有するモデル薬物を用いて、修飾反応を行った。スペーサとして、分子量の異なる PEG を用いた場合は、NHS 基とマレイミド基の二官能基型の PEG を使用し、予めモデル薬物と PEG を結合させた後、抗体分子への修飾反応を実施した。反応液は、遠心ろ過あるいは脱塩操作により、修飾剤由来の不純物を取り除いたあと、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーでの分離を実施した。

また、クロマト担体上での ADC の合成反応については、抗体のアフニティー担体を使用した。予め担体に吸着させた抗体タンパク質の修飾反応を実施し、遊離状態で反応させた場合の修飾構造を比較した。

4. 研究成果

4.1 イオン交換クロマトグラフィーを用いた ADCs の分離

陽イオン交換クロマトグラフィーで修飾抗体の分離を検討したところ、未反応抗体とほぼ同じ位置に溶出し分離はできなかった。さらに、還元処理を行った抗体のフルオレセイン修飾体では、溶出過程において修飾抗体の集合物が生成する挙動がみられた。

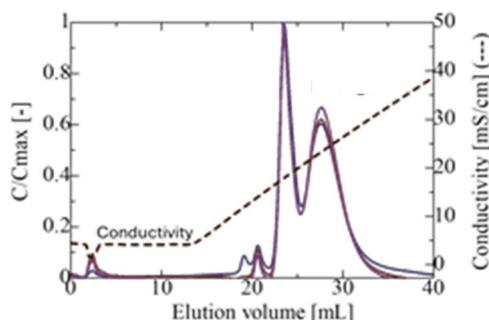


Fig. 1 イオン交換クロマトグラフィーによるフルオレセイン修飾抗体の保持溶出挙動

4.2 疎水クロマトグラフィーを用いたADCsの分離

ピレン-Lys 修飾抗体、クマリン-Lys 修飾抗体を疎水カラム (MabPac HIC-10, thermofisher) で分離した場合、未修飾抗体が最初にカラムから溶出し修飾数の少ない順に溶出する (Fig. 2 上段)。クマリン、ピレンは 430 nm と 340 nm にそれぞれ吸収をもつため、それらの吸光度と 280 nm における 2 波長の吸光度の比から、修飾割合の評価を行った (Fig. 2 下段)。修飾抗体の溶解度により、疎水クロマトの分配係数 ($K = C_s / C_l$, C_s : 固定相中溶質濃度, C_l : 液相中溶質濃度) が決定されると仮定し ($K = K' + ae^{bl}$, K' : 塩の分配係数, a, b : パラメータ)、一連の塩濃度勾配 GH における溶出塩濃度 I の測定を行った。前述の分配係数を用いてカラム内の移動速度 ($dz/dt = u/(1+HK)$ u : 移動相速度, H : 固液体積比) から溶出塩濃度を想定したモデル式 ($GH = 1/(ab) * (e^{bl} - e^{bl_0})$ I_0 は初期塩濃度) により GH と I の関係を記述することが可能であることが分かった (Fig. 3)。パラメータ a の値は、クマリンで 0.41 から 0.68, ピレンで 0.13 から 0.28 となり修飾数の多いものほど大きくなった。また、 b の値は修飾数に関係なくクマリンで 8~10, ピレンで 12~16 となった。 a の値は、溶液中の溶解度が反映されるパラメータでありモデル薬物自体の疎水性の影響を受けたものと考えられる。また、 b の値は塩濃度の変化に対する分配係数の変化の応答性を示すものであるが、分子の高さが大きいピレンの方が修飾体とリガンドとの結合を阻害する可能性が高く、抗体の b の値よりも低下した可能性があると考えられる。これらのパラメータを用いて、等組成溶出法により修飾体を分離した際の分配係数の計算を行った。分配係数が 10 以下の条件で計算結果と実際の実験結果は良く一致しており、これらのパラメータによる計算が分離条件の予測に使用できることが示された。

フルオレセイン修飾体を用いて、疎水性の異なる HIC 担体 (TOYOPEARL Ether-650M, PPG-600M, Phenyl-650M, Butyl-650M, Hexyl-650C) での保持溶出挙動、およびリンカーで PEG 鎖を導入した際の影響についても調べた。フルオレセインは pH7 近傍では 2 価の負電荷をもち、pH の低下とともに電荷数は減少する。pH7 の条件では、フルオレセインのみを修飾した場合、疎水性の弱いリガンドの場合 (Ether-650M) は、未修飾抗体と修飾抗体がよく分離されていたが、リガンドの疎水性が増加するにつれて、未修飾抗体と修飾体の溶出位置は近くなった。また、いずれの担体においても PEG 鎖をリンカーにもつ修飾抗体の方が、リンカーをもたない修飾抗体よりも遅れて溶出しており、未修飾抗体と修飾抗体の分離が改善できることが分かった (Fig. 5)。なお、抗体に修飾さ

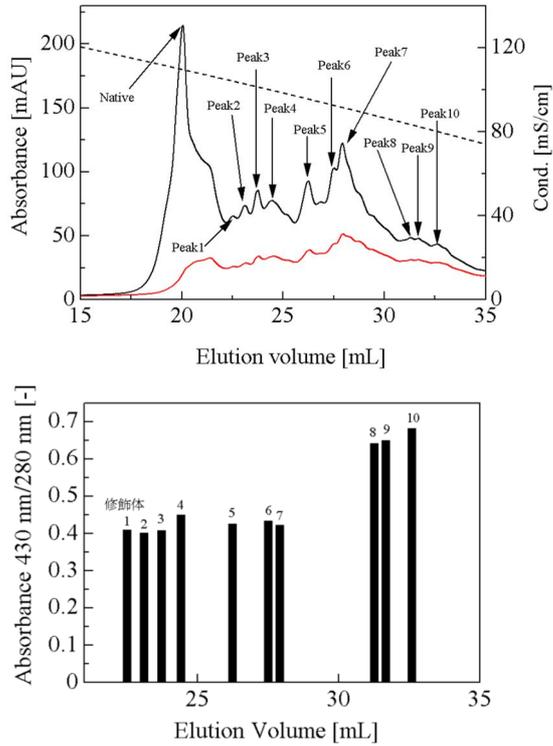


Fig. 2 塩濃度勾配溶出法によるクマリン修飾抗体の疎水クロマトグラフィーの溶出曲線 (上段) と各修飾体のクマリンの割合 (下段)

Column: MabPac HIC-10
mobile phase: 62mM sodium phosphate + 0-1.2 M ammonium sulphate + 5 vol% isopropanol pH7 $F = 0.2$ mL/min
Sample vol. = 200 μ L, [IgG] = 10 mg/mL, [modifier]/[IgG]=3

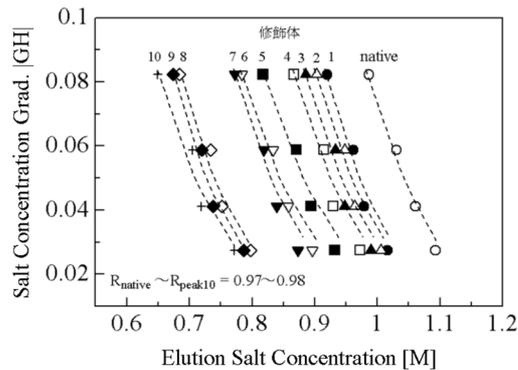


Fig.3 クマリン修飾体の溶出塩濃度 I と塩濃度勾配 GH の関係

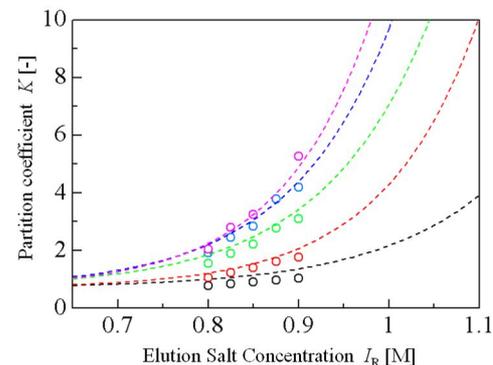


Fig.4 クマリン修飾体の分配係数
点線はモデル式による計算値で、プロット点は等組成溶出実験により得られた分配係数

れていないフルオレセインおよび PEG は HIC 担体に吸着せずフルオレセインを PEG 化したもの(FI-PEG5K)、抗体修飾体(FI-IgG)は担体に吸着可能となる。このため、フルオレセイン分子のみの場合は HIC 担体からの反発が大きい、抗体修飾体とすることで、部分的に疎水性の認識が行われているものと考えられる。

4.3 固相担体上における ADCs の合成と分離

ADC の合成を行う固体担体として protein L 担体(kancap L, Kaneka)および protein A 担体(mabeslect sure, Cytiva)を用いてフルオレセインの修飾反応を行った。液相反応で修飾反応を実施した場合、抗体が本来吸着する pH 条件で吸着できなくなる修飾体が多く生成する。しかし、カラムで反応させた場合は、吸着条件で脱離してくるものではなく、脱着する酸性条件で脱離してくる(Fig.6)。抗体濃度(0.5- 10 mg/mL)、修飾剤比率([フルオレセイン]/[IgG] = 30 ~ 200)、反応時間(1-24 h)を検討したところ、担体ごとの修飾体の生成収率の大きな違いはなく修飾剤濃度を増加させると生成する修飾体の量は増加した。ただし、HIC により分析したところ修飾体の組成の不均一化は増加する傾向が確認された(Fig.7)。以上より、アフィニティー担体上で抗体の修飾反応を実施した場合、担体への結合力を維持した修飾体の合成が可能であり、修飾剤の比率が低い条件で反応させた方が、均一な構造をもつ修飾体の合成が可能であることが分かった。

4.4 まとめ

ADC の HIC における保持溶出挙動は、溶液中の溶解度を塩濃度の関数とするモデルで記述することができる。これらのモデルのパラメータは塩濃度勾配溶出実験により得ることができる。モデル式を用いて、様々な塩濃度における溶出塩濃度を計算により求めることができるようになる。これにより HIC の分離操作条件を合理的に決定することができるようになる。また、アフィニティー担体上で ADC を合成した場合、アフィニティー担体に対する親和性を保持した状態の修飾体を選択的に合成することが可能となる。

引用文献

1. B. Bovaly, *et. al.*, *J. Chromatogr. A*, 1481, **82** (2017).
2. Y. Matsuda, *et al.*, *J. Chromatogr. B*, **1140**, 121981, (2020).
3. S. Andris, *et. al.*, *J. Biotechnol.*, **317**, 48, (2020).
4. E. Muller, *et. al.*, *J. Sep. Sci.*, **43**, 2255, (2020).
5. M. Acchione, *et. al.*, *MAbs* **4**, 362, (2012).

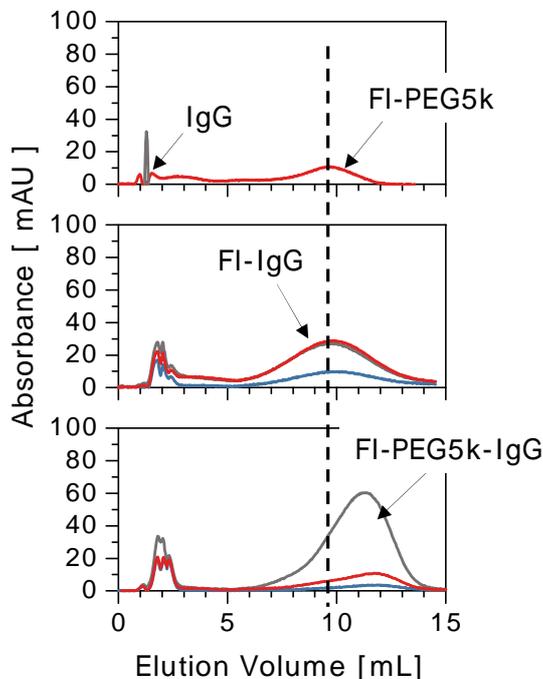


Fig. 5 フルオレセイン修飾体の HIC における保持溶出挙動

mobile phase: 62mM sodium phosphate + 0-1.2 M ammonium sulphate + 5 vol% isopropanol pH7 $F = 1.0$ mL/min

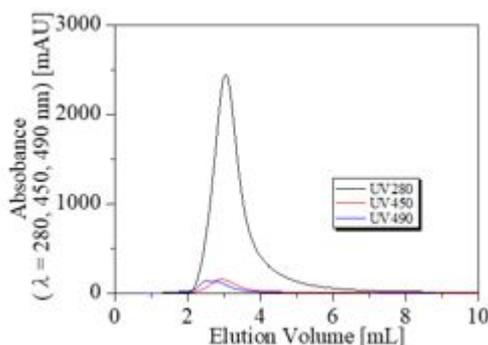


Fig. 6 protein L 担体上で生成したフルオレセイン修飾体

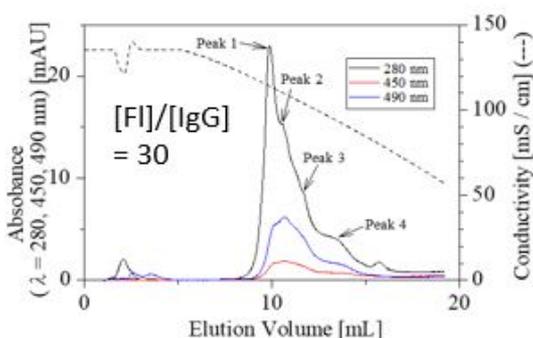


Fig. 7 protein L 担体上で生成したフルオレセイン修飾体の HIC による分析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshimoto Noriko	4. 巻 23
2. 論文標題 Continuous Protein Modification and Separation Process with Chromatography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japan Journal of Food Engineering	6. 最初と最後の頁 1と12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11301/jsfe.21601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田 俊哉、吉本則子
2. 発表標題 PEGリンカー鎖長が抗体薬物複合体のクロマト分離に与える影響
3. 学会等名 日本食品工学会第23回（2022年度）年次大会（岡山）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 裕輔、吉本 則子
2. 発表標題 疎水性相互作用クロマトグラフィーにおける抗体薬物複合体 溶出挙動のモデル解析
3. 学会等名 分離技術会年会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 俊哉、吉本 則子
2. 発表標題 抗体薬物複合体の分離に及ぼすPEGリンカー鎖長の影響
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀨中 誠司、吉本 則子
2. 発表標題 イオン交換クロマトグラフィーを用いたペプチド修飾アルブミンの分離
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------