

博士学位論文

抗体薬物複合体の薬物抗体比解析における
各種分析法の比較研究

東京薬科大学 2020 年度

松田 豊

目次	2
略語表	4
緒論	7
1 章 位置選択的 ADC の各種分析法の比較	13
1-1 序論	13
1-2 材料, 及び方法	17
1-2-1 試薬	17
1-2-2 Trastuzumab-AJICAP®-MMAE の合成と分取 HPLC 精製 ..	17
1-2-3 DAR 解析方法	18
1-3 結果	22
1-3-1 Reduced RPLC/UV 分析	22
1-3-2 HIC/UV 分析	26
1-3-3 RPLC/QTOF-MS 分析	30
1-3-4 Denaturing SEC/QTOF-MS 分析	34
1-3-5 Native SEC/QTOF-MS 分析	38
1-3-6 Ellman's assay	41
1-4 考察	43
1-5 小括	49
2 章 GMP 戦略に基づいた位置選択的な ADC の調製と工程内分析	50
2-1 序論	50
2-2 材料, 及び方法	53
2-2-1 試薬	53
2-2-2 ADC 合成	53
2-2-3 工程内管理 (in process control = IPC) 方法	56
2-3 結果	57
2-3-1 HIC/UV による工程内分析	57
2-3-2 Reduced RPLC/UV による工程内分析	59
2-3-3 Ellman's assay による工程内分析	60
2-4 考察	61

2-5 小括.....	64
3章 Cysteine 型 ADC の DAR 分析法比較.....	65
3-1 序論.....	66
3-2 材料, 及び方法.....	68
3-2-1 試薬.....	68
3-2-2 ADC 合成.....	68
3-2-3 分析方法.....	69
3-3 結果.....	70
3-3-1 少量スケールでの DAR 比較.....	70
3-3-2 GLP 用サンプルでの DAR 比較.....	76
3-4 考察.....	80
3-5 小括.....	83
総括.....	84
謝辞.....	87
参考文献.....	88

略語表

略語	英語表記	日本語表記
ABPS	Ajinomoto Bio-Pharma Services	味の素バイオフーマサービス社
ADC	Antibody Drug Conjugate	抗体薬物複合体
AJICAP	Ajinomoto Conjugation by Affinity Peptide	アジキャップ法 (味の素社の位置選択的抗体修飾法)
CMC	Chemistry Manufacturing and Control	医薬品製造における製造物の品質と製造法の評価
COA	Certificate of Analysis	試験成績書
DAR	Drug Antibody Ratio	薬物抗体比
DHAA	Dehydroascorbic acid	デヒドロアスコルビン酸
DOE	Design of Experiments	実験計画法
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)
DTT	Dithiothreitol	ジチオトレイトール
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELN	Electronic lab notebook	電子実験ノート
FA	Formic acid	ギ酸

略語	英語表記	日本語表記
Fc	Fragment crystallizable	抗体の Fc 領域
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice	優良試験所規範
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography	疎水性相互作用クロマトグラフィー
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IPA	Isopropyl alcohol	イソプロピルアルコール
IPC	In Process Control	工程内管理
LC	Liquid Chromatography	液体クロマトグラフィー
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization	マトリックス支援レーザー脱離イオン化
MBR	Master Batch Record	製造指示書原本
MPA	Mobile Phase A	溶離液 A
MPB	Mobile Phase B	溶離液 B

略語	英語表記	日本語表記
MS	Mass Spectrometry	質量分析法
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide	<i>N</i> -ヒドロキシスクシンイミド
PBSE	Phosphate Buffered Saline containing EDTA	リン酸緩衝生理食塩水 (EDTA 添加)
QTOF-MS	Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry	四重極-飛行時間型質量分析法
R&D	Research & Development	研究開発
RP	Reverse Phase	逆相
RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatography	逆相液体クロマトグラフィー
SEC	Size Exclusion Chromatography	サイズ排除クロマトグラフィー
SOP	Standard Operating Procedures	標準業務手順書
TCEP	Tris(2-carboxyethyl) phosphine	トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン
TFA	Trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
TFF	Tangential Flow Filtration	タンジェンシャルフロー・フィルトレーション
TI	Therapeutic Index	治療指数
TIC	Total Ion Chromatogram	全イオンクロマトグラム

緒論

近年、抗体薬物複合体（Antibody-drug conjugates = ADCs）の研究開発が急速に進んでいる。ADC は、適切なリンカーを介して高活性な低分子の薬物（payload）を抗体にコンジュゲートした医薬品である（Fig. 1A）¹⁻³。これまでに、9 品目の ADC が米国食品医薬品局（Food and Drug Administration = FDA）によって承認され、更に 90 品目以上の ADC が臨床開発段階にある¹⁻³。承認を受けた 9 品目の ADC のうち、7 品目の ADC は、抗体の複数の異なる部位にランダムに高活性な payload を連結させており、薬物抗体比（Drug Antibody Ratio = DAR）及び薬物の修飾位置が不均一なものとなっている。このような不均一性が存在すると、ADC の薬効の低下と毒性の増加が引き起こされ、治療指数（Therapeutic index = TI）が狭く制限されることが報告されている⁴。

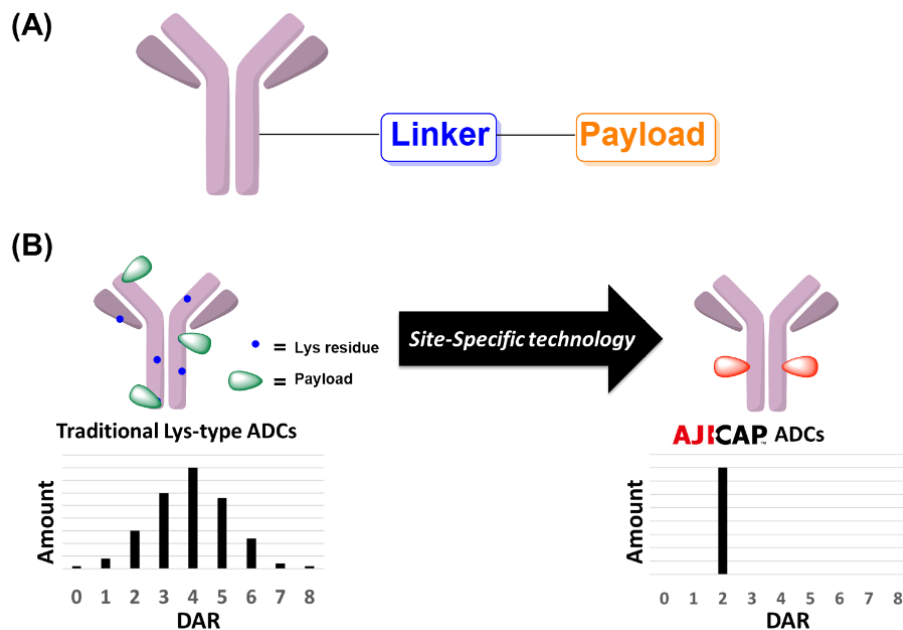


Fig. 1 Overview of antibody-drug conjugate: A) The structure of ADC; B) Traditional random ADCs (left), site-specific ADCs (right)

また、ADC に特有な不均一性は、レギュラトリーサイエンスの観点からも望ましいものではない。特に ADC の薬効と安全性に大きな影響を与える DAR の解析

においては、理想的な分析法は確立されておらず、ADC に関わる分析化学者にとってチャレンジングな課題となっている^{5,6)}。DAR 解析に汎用的に使用されるのは液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography = LC) であり、これまで多くの報告がある⁷⁻¹¹⁾。DAR 解析の観点から、各種 LC の特徴を以下に示す (Table 1)。

Table 1 Summary of LC characteristics applicable to ADC

Method	Column temperature	MS Compatibility	Peak separation	Application to ADC
HIC/UV	RT	Typically, No	Yes	Yes
RPLC/UV	70-80°C	Yes	Yes	Yes
SEC/UV	RT-80°C	Yes	No	Yes

紫外検出疎水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophobic Interaction Chromatography with UV Detection = HIC/UV) は、非変性条件で ADC を分析できるため、DAR 解析において標準的な手法として知られており、一般に正確な DAR を与えると考えられている⁹⁾。しかし HIC/UV は、溶離液 (移動相) の溶質として高濃度かつ低揮発性の塩を必要とするため、与えるピーク形状を高幅化させる欠点がある。すなわち、位置異性体などを含む不均一性の高い ADC の分析に用いると、適切なピーク分離ができず、しばしば DAR を算出することができない。また、この高濃度で低揮発性の塩は、質量分析計のイオン源並びに質量分離部の汚染の原因となることから、HIC から質量分析計へ直接 ADC サンプルを注入することはできない。よって、上記の溶離液条件と質量分析法 (Mass Spectrometry = MS) を組み合わせ、HIC/MS へと展開させることは困難である。すなわち、HIC を利用して、DAR 種の分子量を同定することは通常できない¹¹⁾。

紫外検出逆相液体クロマトグラフィー (Reverse Phase Liquid Chromatography with UV Detection = RPLC/UV) もまた、DAR 解析、特にシステイン型 ADC の分離分析に一般的に使用されている^{12,13)}。RPLC の溶離液は、適切なインターフェイスを用いれば質量分析計への直接注入が可能であり、RPLC/MS として装置を構築すれば、理論的には ADC のすべての DAR 種を分析できる。しかし、RPLC は 70 ~ 80°C の高いカラム温度が必要であり、かつ移動相には ADC の変性を促す有機溶媒が高い割合で含まれるため、温度に敏感な ADC には使用できない欠点がある。

紫外検出サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography with UV Detection = SEC/UV) は、「非変性」の観点から ADC を分析するための有力な方法と考えられる¹⁴⁾。SEC/UV による測定は、通常、室温で中性 pH の緩衝液を溶離液として用いて行われる。SEC は、揮発性の高い塩で構成された溶離液を用いることができるため、MS と組み合わせて SEC/MS とすることも可能である。2012 年に Valliere-Douglass のグループは、ADC の特性評価のための SEC/MS の最初の例を報告した¹⁵⁾。この報告の後、比較的温和な条件での DAR 解析が可能な SEC/MS が注目されており、複数の論文が発表されている¹⁵⁻²²⁾。しかしながら、SEC カラムは分離性能に課題がある。分子量に大きな違いがある payload のような低分子と ADC を分離することはできるものの、比較的分子量に差がない各 DAR 種をクロマトグラム上で分離することは困難で、クロマトグラムからは DAR の分布を知ることができない。

このように多くの分析法が研究されているにもかかわらず、それらの方法は前述した通り、何れも長所と短所がある。そのため、複数の方法を組み合わせる分析戦略が望ましいとの見解が 2018 年に報告されている²³⁾。Källsten と Bergquist のグループは、同一バッチの ADC を用いて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry = MALDI/TOF-MS) を含む複数の DAR 解析法を比較した。しかしながら、彼らは各々の分析法によって DAR の結果に違いがあることは報告したものの、詳しい考察は行っておらず、MALDI/TOF-MS の有用性について主張した論文となっていた。この Källsten と Bergquist グループの報告以外にも、ADC の DAR 解析に複数の分析法を記載している論文はいくつかあるが²³⁻²⁶⁾、各分析法の特徴についての比較評価はこれまで報告されていなかった。これらを踏まえると、古くから ADC の研究と開発を行っている製薬会社やバイオベンチャーは、それぞれの独自の DAR 解析法を確立しているが、情報公開に積極的でないことから、論文発表が少ないと予想され、そのために ADC の分析法の技術革新が進んでいないと考えられた。

一方、ADC 分野に参入しようとする企業や研究機関は近年増加している^{27, 28)}。ADC は、前述の通り抗体に低分子化合物が結合した複合体であるため、これまで抗体を取り扱ってきた免疫学領域の研究者にも、payload のような低分子化合物を取り扱ってきた有機合成化学者にも、比較的馴染みやすい分野である。しかし、

ADC 分野に新規参入する研究者は、DAR 解析の知見や経験を多くは有しておらず、各種分析法の特徴を比較した報告は有用な情報であると考えられる。

また、ADC 分野に新規参入した企業や研究機関が、ADC の製造を見据える上での関門が、プロセス開発である。特に、ADC 合成のためのコンジュゲーション反応における工程内管理 (In Process Control = IPC) の情報は乏しい。IPC は製薬会社にとってノウハウの一環であり、製造現場における標準作業手順書 (Standard Operating Procedures = SOP) や、製造指示書原本 (Master Batch Record = MBR) といった機密性の高い資料として保管されているケースが多いため、製薬会社は公開に積極的ではなく、多くの研究者が目にするような論文として発表されるケースは非常に限られている²⁹⁻³¹⁾。このように、DAR 解析法の確立とプロセス開発における IPC の確立の困難さは、ADC 分野への新規参入における主要な技術的障壁である。

ADC の開発における DAR 解析法や IPC の確立の上で、技術的障壁の主たる要因は、前述した ADC の不均一性にある。Payload が抗体に結合する位置、及び個数が不均一であれば、DAR は複数の値をとる (Fig. 1B 左)。この不均一性は、LC 分析においてはピークの高幅化や複雑化を引き起こし、また、MS 分析においては、payload とした薬物と抗体の物性の違い (一般に薬物は脂溶性が高いが、抗体は水溶性が高い) に起因するイオン化効率の違いによって、正確な定量を困難にさせる。そこで、著者は不均一性の低い位置選択的な ADC (Fig. 1B 右) をモデル化合物として用いて分析法を確立させ、その分析条件を不均一性の高い ADC へと応用させる分析戦略を立案した。得られる知見は、DAR 解析法の特徴の評価を効率化できると予想された。

これまでに、複数の位置選択的な ADC 製法が開発されている^{32,33)}。これらは、分子生物学的な手法で抗体遺伝子を改変させる方法や、酵素を用いる手法であり、開発期間の長さや合成効率の低さが課題とされてきた。抗体遺伝子を改変して目的の抗体を得るまでの時間と、反応に用いる酵素の DAR 解析への影響等を考慮すると、これらの手法で合成した位置選択的 ADC を上記の分析戦略に用いることは、本研究を進める上で問題点が多いと判断した。一方、これらの課題の解決策として注目されているのが、有機合成化学的手法による位置選択的 ADC 製法である³⁴⁾。化学的な ADC 製法は、副生成物が少なく、簡便な CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) を可能にするという大きな利点があるため、近年注目が集まってい

る³¹⁾。著者が所属する味の素株式会社においても、Fc 親和性ペプチドを用いる化学的かつ位置選択的な ADC 製法 (AJICAP®第一世代法) を開発し、2019 年にそのコンセプトの実証を報告した³⁵⁾。この基礎検討において、合成した位置選択的 ADC の DAR 解析は、RPLC/QTOF-MS のみで行われていた。また、少量スケールで ADC を合成したのみであり、本方法を用いて ADC を製造するためには、製造現場への円滑な技術移管を意識したプロセス開発が必須であった。なおごく最近、味の素株式会社では AJICAP®法を改良し、還元酸化工程を含まないより効率的で簡便な手法 (AJICAP®第二世代法) を開発した。そのため、本論文の手法を「第一世代法」と記述している。ただし、本論文の中では第一世代法を省略し、AJICAP®法と記す。

このように研究初期段階にあった AJICAP®法であるが、主要な副生成物は Fc 親和性ペプチド由来の化合物のみと予想され、精製工程で除去できると考えられた。加えて、得られた ADC の位置選択性がペプチドマッピング法で証明できたことから³⁶⁾、分析法を比較評価するためのモデル化合物として、AJICAP®法で合成した ADC を利用できると考えた。更に、将来的な AJICAP®法の ADC の製造現場への技術移管を考えると、スケールアップ検討において IPC を確立させる必要がある。前述の通り、得られる成果は既存の ADC 研究者、技術者だけでなく、新規参入する ADC 研究者にも有用であるため、不純物が少なく反応の堅牢性が高いと期待できる AJICAP®法によるスケールアップ検討は、ADC 製造の IPC を確立するためのモデル実験となると考えられた。

以上の背景から、著者は ADC の開発に関与する研究者に対して、技術的な障壁となっている DAR 解析と、ADC 製造における IPC のガイダンスを提供することを目的として、下記の 3 章にわたる研究を実施した。

第 1 章では、同一バッチの AJICAP®-ADC に対して、複数の分析法 (reduced RPLC/UV, HIC/UV, RPLC/QTOF-MS, denaturing SEC/QTOF-MS, native SEC/QTOF-MS, Ellman's assay) を用いて、DAR 解析のための分析法の比較評価を行い、目的に適した分析法を示すことができた³⁷⁾。同様の比較実験を、分取精製によって得られた DAR = 2 の位置選択的 ADC に対しても行い、精製工程が分析結果に及ぼす影響も確認した。

第2章では、位置選択的 ADC を大量合成するために、AJICAP®法のプロセス開発の検討を行い、第1章の結果を基に、適切な IPC を確立させた³⁸⁾。確立された IPC の分析法は、バイオ医薬品における Good Manufacturing Practice (GMP) 戦略に従い、Good Laboratory Practice (GLP) 試験に向けた位置選択的 AJICAP®-ADC のグラムスケール合成の管理に用いられた。

第3章では、第1章で確立した分析法の比較を、不均一性の高い従来のシステム型の ADC に応用させ、3つの DAR 解析法を比較し、合成の工程の異なる ADC を評価できることを示した³⁹⁾。また第2章で提案した GMP 戦略を用いて、システム型の ADC の GLP サンプルの合成と分析法を確立させた。

1 章 位置選択的 ADC の各種分析法の比較

1-1 序論

AJICAP®法は、抗体の Fc 領域の特定の amino 酸残基のみを生体直交性官能基で化学修飾する方法である (Fig. 2) . 2018 年, 鹿児島大学の岸本, 伊東らは, 抗体の Fc 領域に高い親和性を持つ環状ペプチドを見出した⁴⁰⁾. このペプチドと抗体の Fc 領域の共結晶を用いた X 線構造解析により, ペプチドの近傍に, Fc 領域の Lys248 (Eu numbering で 248 番目の Lys 残基) が存在していることがわかった. この知見を基に, 味の素株式会社の山田らは, 後に切断可能なジスルフィド結合と, Lys の ϵ -アミノ基と反応できる NHS 基を導入した AJICAP®ペプチド試薬 (1) をデザインした³⁵⁾. モデル抗体として抗 HER2 抗体 trastuzumab を用い, ペプチド試薬 (1) を反応させたところ, 2 分子のペプチドが抗体上に導入された trastuzumab-ペプチド複合体を得た. 続いて抗体とペプチド部分の間にあるジスルフィド結合を還元剤であるトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP) によって切断し, ペプチド試薬を除去した. この際, 同時に抗体の分子内ジスルフィド結合も切断され, 還元抗体が得られる. この分子内ジスルフィド結合は温和な酸化剤であるデヒドロアスコルビン酸 (DHAA) を用いることで再構築され, 結果的に二つのチオールが導入された抗体を得ることができる. このチオール導入抗体に任意の薬物を付加させることで位置選択的な ADC が得られる.

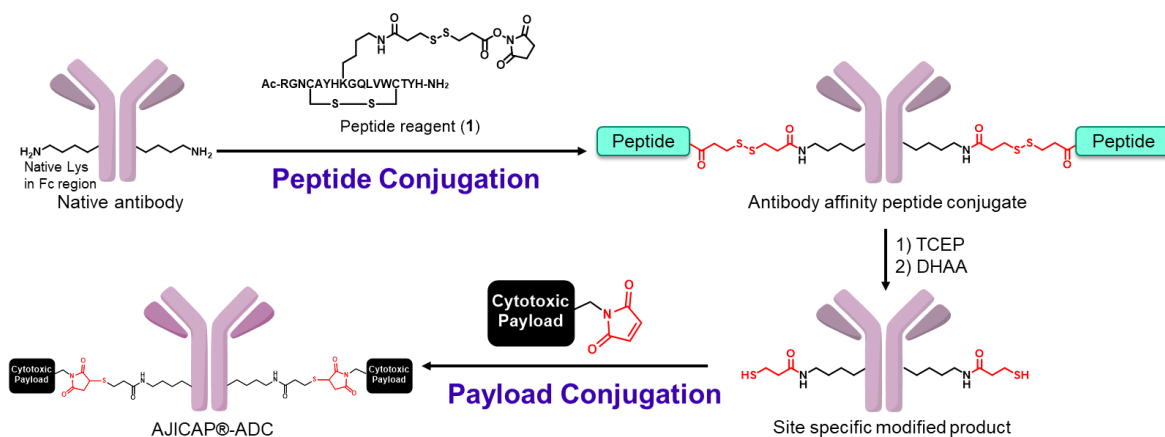


Fig. 2 AJICAP® technology overview

このように, AJICAP®第一世代法では, 4 工程で効率的に位置選択的な ADC を得ることができる. しかし, 得られた ADC の分析は十分に行われていなかった.

特に DAR 解析においては, RPLC/QTOF-MS を用いて分析したのみであった. そこで本章では, 6 つの異なる分析法を用いて AJICAP®-ADC の DAR の比較を行うことで, 各々の分析法の特徴について評価した. 採用した 6 つの分析法 (reduced RPLC/UV, HIC/UV, RPLC/QTOF-MS, denaturing SEC/QTOF-MS, native SEC/QTOF-MS, Ellman's assay) について以下に示す (Fig. 3, Table 2) .

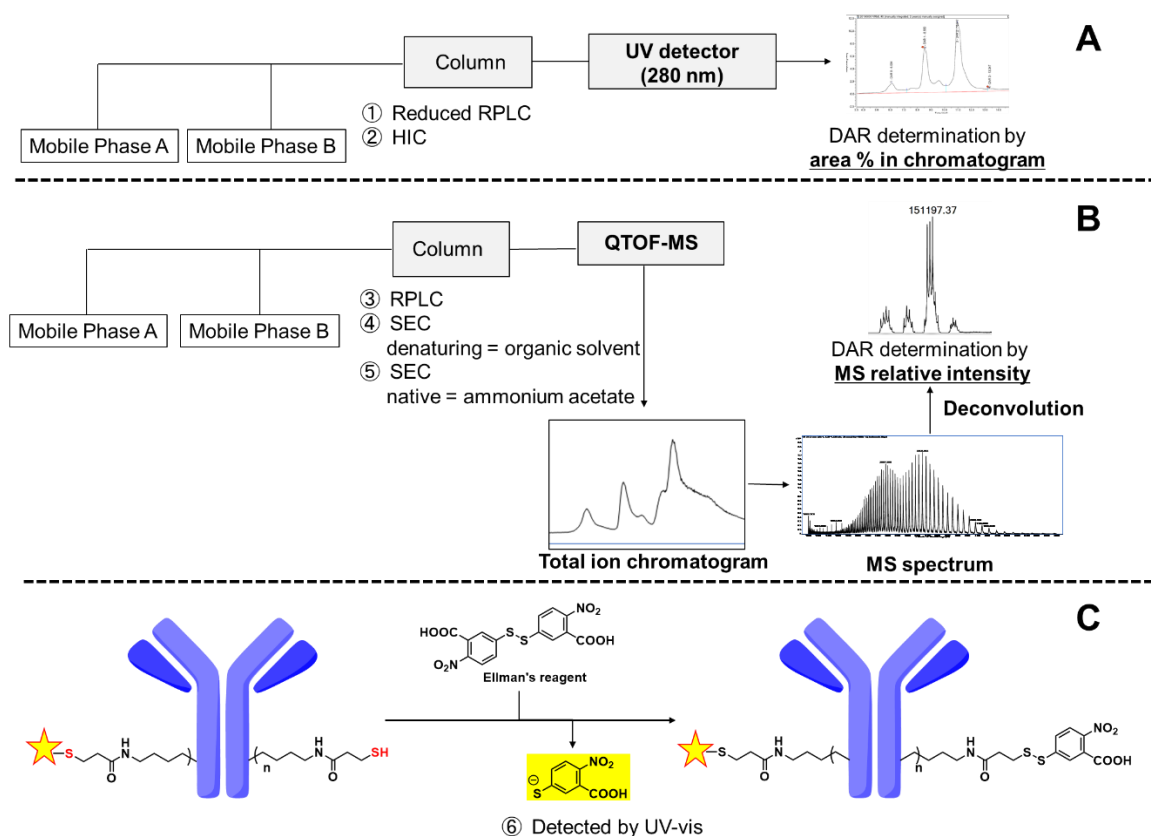


Fig. 3 Comparison of six different analyses A) Illustration of HPLC/UV analyses including reduced RPLC/UV and HIC/UV; B) Illustration of LC/QTOF-MS analyses including RPLC/QTOF-MS, denaturing SEC/QTOF-MS and native SEC/QTOF-MS; C) Illustration of Ellman's assay

Table 2 Summary of analytical methods used in this chapter

Analytical method	DAR determination	Detector	LC Column
Reduced RPLC/UV	Area % in chromatogram	UV (280 nm)	RPLC
HIC/UV	Area % in chromatogram	UV (280 nm)	HIC
RPLC/ QTOF-MS	MS intensity by deconvolution	QTOF-MS	RPLC
Denaturing SEC/ QTOF-MS	MS intensity by deconvolution	QTOF-MS	SEC
Native SEC/ QTOF-MS	MS intensity by deconvolution	QTOF-MS	SEC
Ellman's assay	Absorbance by UV-vis	UV (412 nm)	-

Fig. 3A に示すように、2種類の HPLC/UV (reduced RPLC/UV と HIC/UV) による測定を行った。両方法とも、吸収波長 280 nm で測定した UV クロマトグラムにおける、ピーク面積比より DAR が求められる。Reduced RPLC/UV 分析を行うにあたり、還元剤処理を行い、ADC を軽鎖由来のフラグメントと重鎖由来のフラグメントへと変換させた。これらのフラグメントを RPLC に注入して相互分離させ、未反応の軽鎖、薬物が導入された軽鎖、未反応の重鎖、薬物が導入された重鎖のピーク面積比から、平均 DAR を算出した。HIC/UV では、reduced RPLC/UV 分析のような前処理をしなくても、ADC の各 DAR 種 (DAR = 0 のもの、DAR = 1 のもの、DAR = 2 のもの) を、疎水性の違いによって分離できる。そのため、UV クロマトグラムのピーク面積の比較から、DAR の分布と、平均 DAR を計算できる。また、異なる 2 種類の溶離液条件を比較し、溶離液がクロマトグラムに与える影響も調べた。

続いて、LC 条件の異なる 3 種類の LC/QTOF-MS による測定を行った (**Fig. 3B**)。QTOF-MS では、マススペクトル上に ADC 由来のフラグメントの多価イオンが現れるので、それらに対してデコンボリューション処理を行うことで、各 DAR 種の

イオンピークの相対強度を算出し、その平均値から **DAR** を求めることができる。本研究では **QTOF-MS** の **MS** 条件（イオン源の温度や電圧などのイオン化条件等）を統一し、3種類の **LC** の比較と評価を行った。**RPLC/QTOF-MS** では、**LC** カラムとして逆相カラムを用い、**QTOF-MS** で得られたフラグメントイオンのマススペクトルをデコンボリューション処理し、平均 **DAR** を求めた。**Denaturing SEC/QTOF-MS** では **SEC** カラムを **QTOF-MS** に接続し、同様に **DAR** を算出した。また、溶離液にギ酸を含んだアセトニトリルを用いており、流路内で **ADC** を変性させて、分離を行っている。一方、**native SEC/QTOF-MS** は、酢酸アンモニウム水溶液を溶離液として用い、非変性条件での分離を行い、**QTOF-MS** 測定の結果から、**DAR** を求めた。

Ellman's assay は、チオールに対して選択的に反応する **Ellman** 試薬を用いるチオール滴定法として知られている (**Fig. 3C**)⁴¹⁾。**Ellman** 試薬 (5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)) がチオールと反応すると、波長 412 nm に吸収極大を有する 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸が脱離する。そのため、412 nm の吸光度の増加を測定することで、チオールの当量を求めることができる。**ADC** へ応用すると、残存チオールを測定することができるので、間接的に **DAR** を算出した。

位置選択的 **ADC** は、**payload** の付加する位置がランダムな従来型の **ADC** よりも分子種が少なく、測定対象が限定されるために、分析の難易度が下がることが期待できる。この特徴をより活かすためには、さらに **ADC** の不均一性を下げればよいと考え、分取 **HPLC** で精製を行い⁴²⁻⁴⁵⁾、精製後の **AJICAP®-ADC** についても前述の分析法で **DAR** を算出した。

1-2 材料及び方法

1-2-1 試薬

抗HER2抗体 trastuzumab はロッシュ社 (スイス) より購入した。Payload である maleimide-C6-valine-citrulline-monomethyl auristatin E (MC-VC-MMAE) は Abzena 社 (アメリカ) より購入した。他の試薬は Sigma-Aldrich 社 (アメリカ) より購入した。AJICAP®ペプチド試薬 (1) は既報³⁵⁾に従って合成した。

1-2-2 Trastuzumab-AJICAP®-MMAE の合成と分取 HPLC 精製

Fig. 4 に示した既報³⁵⁾の手順に従って、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) を合成した。

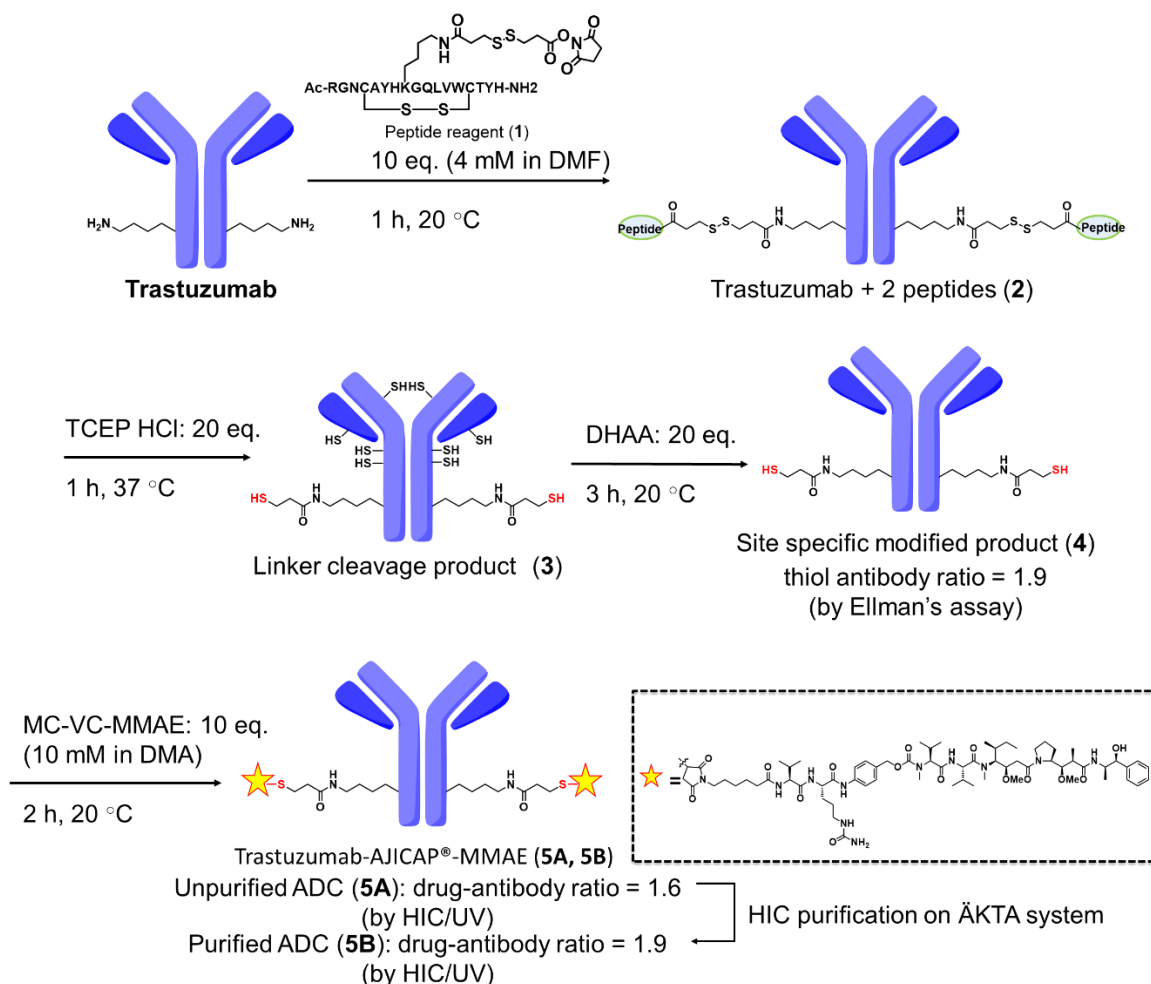


Fig. 4 Synthesis of trastuzumab-AJICAP®-MMAE

具体的には、ペプチド試薬 (1) を trastuzumab と反応させ trastuzumab-ペプチド複合体 (2) を得た。続いて、2 を TCEP で処理し、ペプチド-抗体間のジスルフィド結合と抗体の分子内ジスルフィド結合を開裂させた。得られたリンカー切断生成物 (3) を、DHAA によって酸化し、チオール導入抗体 (4) に変換した。MC-VC-MMAE への 4 のコンジュゲーションを行い、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) を得た。

続いて、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) を、カラム液体クロマトグラフィー (ÄKTA Pure システム) にて、分取精製した⁴⁵⁾。HIC レジンは ToyoPearl Phenyl-650S (東ソーバイオサイエンス) を用い、メーカー推奨のカラム体積 (0.8×10 cm, 5 mL) を選択した。全ての工程を室温で行い、サンプル注入の前にカラムを緩衝液 A (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.0), 2 M 塩化ナトリウム (NaCl)) で平衡化した。未精製の ADC (20 mg/mL in histidine buffer, 2.5 mL) に緩衝液 A を 2.5 mL 加え、その混合物 (合計 5 mL) をカラムに注入した。グラジエント条件は、100% 緩衝液 A の組成から 100% 緩衝液 B (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.0), 20 vol% イソプロピルアルコール (IPA)) へ 30 分間で変化させるリニアグラジエント条件を用い、DAR = 2 と想定される trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) を得た。

1-2-3 DAR 解析方法

Reduced RPLC/UV 分析

LC への注入前の還元処理は、下記のように行った。1.0 mg/mL の ADC サンプル (5A 及び 5B) 溶液に、8 M グアニジン塩酸トリス溶液 (pH 7.5) 及び、1 M DL-ジチオトレイトール (DTT) を添加した (ADC の最終濃度は 0.6 mg/mL)。混合物を 80°C で 5 分間加熱処理し、軽鎖由来の ADC フラグメントと重鎖由来の ADC フラグメントを得た。

RPLC/UV 分析は下記のように行った。AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 3.5 µm カラム (Agilent) を Agilent 1260 HPLC システムに接続して使用した。溶離液 A (MPA) には 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を用い、溶離液 B (MPB) には 0.1% TFA アセトニトリル (ACN) 溶液を用いた。カラム温度は 70°C で流

速は0.4 mL/min とし, 280 nm (参照波長 450 nm) で吸光度をモニタリングした. 各 ADC サンプル (0.6 mg/mL, 20 μ L) をシステムに注入し, 30% MPB の組成で 2 分間ホールドした後, 30% MPB から 48% MPB への 22 分間のリニアグラジエント溶離にて ADC の各フラグメントを溶出させた. 溶出後に 95% MPB の組成で 3 分間カラムを洗浄し, 30% MPB に戻すことで 8 分間カラムの再平衡化を行った.

HIC/UV 分析 (Condition A)

Condition A の HIC/UV 分析は下記のように行った. Tosoh Bio-butyl NPR, 2.5 μ m, 4.6 \times 35 mm カラム (東ソーバイオサイエンス) を, Agilent 1260 HPLC システムに接続して使用した. MPA は 1.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0) を用い, MPB は 25 v/v% IPA を添加した 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0) を使用した. カラム温度は 25 $^\circ\text{C}$ で, 流速は 0.8 mL/min とし, 280 nm (参照波長 450 nm) で吸光度をモニターした. 各 ADC サンプル (1 mg/mL, 40 μ L) を注入し, 0% MPB で 2 分間ホールドした後, 0% から 50% MPB への 6 分間のリニアグラジエント溶離にて ADC を溶出させた. 溶出後に 50% MPB を用いて 3 分間カラムを洗浄し, その後 0% MPB に戻し, 7 分間カラムの再平衡化を行った.

HIC/UV 分析 (Condition B)

Condition B の HIC/UV 分析は下記のように行った. MabPac HIC Butyl, 5 μ m, 4.6 \times 100 mm カラム (Thermo Scientific 社) を, Agilent 1260 HPLC システムに接続して使用した. MPA は 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0) を用い, MPB は 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0) を使用した. カラム温度は 25 $^\circ\text{C}$ で, 流速は 0.8 mL/min とし, 吸光度を 280 nm (参照波長 450 nm) でモニターした. ADC サンプル (1 mg/mL, 40 μ L) をシステムに注入し, 16% MPB の組成で 4 分間ホールドした後, 16% MPB から 100% MPB への 16 分間のリニアグラジエント溶離にて ADC を溶出させた. 溶出後に, 100% MPB の組成で 4 分間カラムを洗浄し, 16% MPB に戻すことで 11 分間カラムの再平衡化を行った.

RPLC/QTOF-MS 分析

RPLC/QTOF-MS 分析は下記のように行った. カラムに BioZenTM-Glycan, 2.1 \times

100 mm, 2.6 μm (Phenomenex) , LC システムに Agilent 1260 HPLC を使用し, これらを Agilent 6550 QTOF-MS に接続して用いた. MPA には水/ACN/ギ酸/TFA 混液 (98:2:0.1:0.01, v/v) を使用した. MPB には ACN/ギ酸/TFA 混液 (99.9:0.1:0.01, v/v) を使用した. カラム温度は 50°C , 流速は 0.2 mL/min とした. ADC サンプル (1 mg/mL, 5 μL) をシステムに注入し, 5% MPB の組成で 5 分間ホールドした後, 5% MPB から 95% MPB への 5 分間のリニアグラジエント溶離にて ADC を溶出させた. 溶出後に 95%MPB の組成で 2 分間カラムを洗浄し, 5 % MPB に戻すことで 3 分間カラムの再平衡化を行った.

データ解析には, MassHunter BioConfirm ソフトウェア (Agilent) を使用した. デコンボリューション処理は 100,000-180,000 の質量範囲, 1000-5000 の限定された m/z 範囲を使用した. さらに, DAR Calculator ソフトウェア (Agilent) を使用して DAR を決定した.

Denaturing SEC/QTOF-MS 分析

Denaturing SEC/QTOF-MS 分析は下記のように行った. カラムに Biozen™ SEC-3, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μm (Phenomenex) を, LC システムに Agilent 1260 HPLC を使用し, これらを Agilent 6550 QTOF-MS に接続して用いた. MPA には水/ACN/ギ酸/TFA 混液 (98:2:0.1:0.01, v/v) を使用した. MPB には ACN/ギ酸/TFA 混液 (99.9:0.1:0.01, v/v) を使用した. カラム温度は 25°C, 流速は 0.02 mL/min とした. ADC サンプル (1 mg/mL, 20 μL) をシステムに注入し, 50% MPB の組成で 15 分間ホールドして ADC を溶出させた. データ解析は RPLC/QTOF-MS 分析と同様に行った.

Native SEC/QTOF-MS 分析

Native SEC/QTOF-MS 分析は下記のように行った. カラムに Biozen™ SEC-3, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μm (Phenomenex) を, LC システムに Agilent 1260 HPLC を使用し, これらを Agilent 6550 QTOF-MS に接続して用いた. 溶離液には, 150 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.0) を使用した. カラム温度は 25°C で 流速は 0.02

mL/min とした。ADC サンプル (1 mg/mL, 40 μ L) をシステムに注入し, 15 分間ホールドして ADC を溶出させた。

データ解析は, RPLC/QTOF-MS 分析と同様に行った。データ解析ソフトとして, MassHunter BioConfirm ソフトウェア (Agilent) を使用した。デコンボリューション処理は 100,000-180,000 の質量範囲, 4000-6000 の限定された m/z 範囲を使用した。さらに, DAR Calculator ソフトウェア (Agilent) を使用して DAR を決定した。

Ellman's assay

Ellman's assay は下記のように行った。5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) の 50 mM PBS 溶液 (pH 7.4) 2 μ L に対して, 98 μ L の ADC サンプル (1 mg/mL, 50 mM PBS 溶液, pH7.4) の溶液を加えた。この反応混合物を 25°C で 10 分間保温し, 280 nm (タンパク質濃度の指標として用いられる吸収波長) 及び 412 nm (2-ニトロ-5-チオ安息香酸の極大吸収波長) で吸光度を測定した。ベースライン補正のためにブランクとして, 2 μ L の 50 mM PBS 溶液 (pH 7.4) に, 98 μ L の ADC サンプル (1 mg/mL, 50 mM PBS 溶液, pH 7.4) を加えたものを用いた。各サンプルを Slope Spectroscopy®法³⁵⁾で分析した。

分取精製と各種分析に用いた LC 条件を比較するために, 下記に一覧としてまとめた (Table 3)。

Table 3 LC conditions for each analytical method

Entry	Objective	Native or denaturing	Column/Resin	Column temp	Loaded amount
1	Prep. HIC/UV	Native	HIC/phenyl	25°C	50 mg
2	Reduced RPLC/UV	Denaturing	RPLC/diphenyl	70°C	18 μ g
3	Anal. HIC/UV	Native	HIC/buthyl	25°C	40 μ g
4	RPLC/QTOF-MS	Denaturing	RPLC/glycan	50°C	5 μ g
5	Denaturing SEC/QTOF-MS	Denaturing	SEC	25°C	20 μ g
6	Native SEC/QTOF-MS	Native	SEC	25°C	40 μ g

1-3 結果

1-3-1 Reduced RPLC/UV 分析

Reduced RPLC/UV 分析は、還元的な試料前処理を行った後に、逆相カラムを用いる LC 分離を行い、DAR を算出する方法である。ADC は 4 本の鎖間ジスルフィド結合を有しているため、還元剤によってこれらを切断すると、軽鎖由来の抗体フラグメントと重鎖由来の抗体フラグメントが生じる (Fig. 5)。軽鎖と重鎖は分子量に大きな差があり (通常、軽鎖は 25 kDa 程度、重鎖は 50 kDa 程度)、疎水性も異なるため、RPLC での分離性は良好であり、それが本手法の利点である。今回は還元剤に DTT を用いて ADC をフラグメント化し、分析を行った。

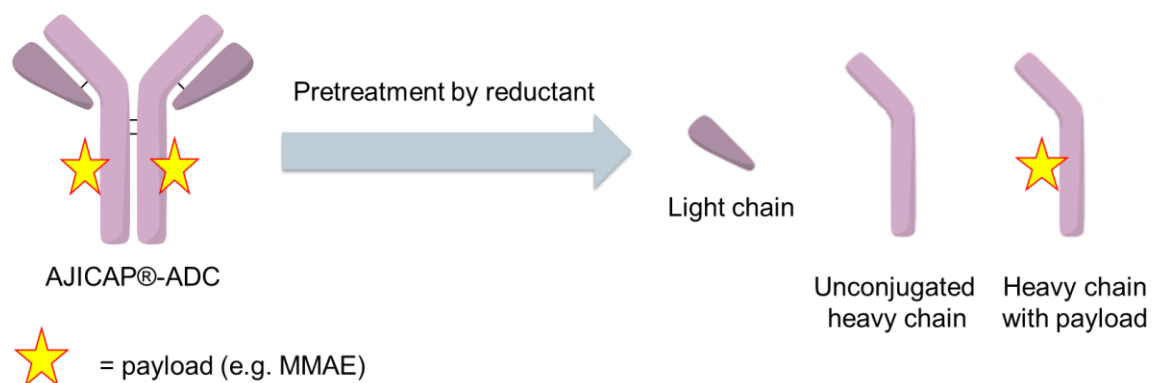


Fig. 5 Reductive pretreatment for reduced RP-HPLC/UV analysis.

DAR の算出は、下記の Formula 1~3 を用いた。まず、軽鎖の payload 修飾率 (DAR (軽鎖)) を UV クロマトグラムのピーク面積比から算出し (Formula 1)、続いて重鎖の payload 修飾率 (DAR (重鎖)) も同様に UV クロマトグラムのピーク面積比から算出する (Formula 2)。なお、Reduced RPLC/UV 分析の前処理の還元反応によって、左右対称のホモダイマーである抗体部分をモノマー化しているため、還元前の ADC の DAR を求めるために、Formula 1, 2 はどちらも算出した値に 2 を乗じている (2 倍している)。最後に両者を足し合わせ、DAR とした (Formula 3)。

$$\text{DAR (軽鎖)} = 2 \times (0 \times A + 1 \times B) \quad (\text{Formula 1})$$

A: 未反応の軽鎖のピーク面積比

B: 一つの MMAE が付加した軽鎖のピーク面積比

ただし, $A + B = 1$ とする.

$$\text{DAR (重鎖)} = 2 \times (0 \times A' + 1 \times B' + 2 \times C' + 3 \times D') \quad (\text{Formula 2})$$

A': 未反応の重鎖のピーク面積比

B': 一つの MMAE が付加した重鎖のピーク面積比

C': 二つの MMAE が付加した重鎖のピーク面積比

D': 3つの MMAE が付加した重鎖のピーク面積比

ただし, $A' + B' + C' + D' = 1$ とする.

$$\text{DAR} = \text{DAR (軽鎖)} + \text{DAR (重鎖)} \quad (\text{Formula 3})$$

まず, 未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) を測定したところ, 5つのピークが確認できた (**Fig. 6A**). 最も早く出現したピーク (保持時間 = 7.5 分) は, 原料の trastuzumab のクロマトグラム (**Fig. 7A**) 上に, 保持時間が一致するピークが存在することから, 未反応の軽鎖に対応していると考えられた. 最も高いピーク (保持時間 = 13.9 分) は, trastuzumab (**Fig. 7A**) の重鎖 (保持時間 = 11.0 分) より保持時間が大幅に遅れていることから, 疎水性の高い MMAE が一つ付加した重鎖に対応していると考えた. 続いて, 残りの三つのピークについて解析した. 最も保持時間の遅いピーク (保持時間 = 17.5 分) は, 疎水性の高い MMAE が二つ付加した重鎖である可能性が高く, この結果は重鎖との過反応の発生を示唆している. 最後に, 保持時間が 11 分前後に観測される二つのピークについてさらなる解析を行った. 保持時間が 11.0 分のピークは, trastuzumab (**Fig. 7A**) との比較から, 未反応の重鎖に対応していると考えられたが, 残りの一つのピーク (保持時間 = 11.6 分) を推定するために, 更なる検討が必要であった. 原料の trastuzumab に加え, trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) の反応前駆体に当たるチオール導入抗体 (**4**) の reduced RPLC/UV 分析を行った (**Fig. 7**). チオール修飾された trastuzumab (**Fig. 7B**) と未修飾の trastuzumab (**Fig. 7A**), 及びそれらの混合物 (**Fig. 7C**) を測定すると, 未修飾の重鎖のピーク (保持時間 = 11.0 分) の後にチオール修飾された重鎖のピークが出現し, これは **Fig. 6** で検出された

AJICAP®-ADC のクロマトグラム中の残りの一つのピーク（保持時間 = 11.6 分）と、保持時間が一致した。

次に、精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) を測定したところ、未精製の 5A とほぼ同様のピークパターンのクロマトグラムが得られた (Fig. 6B)。ただし、未修飾の重鎖のピーク（保持時間 = 11.0 分）、チオール修飾された重鎖のピーク（保持時間 = 11.6 分）及び MMAE が過剰に反応したと思われる重鎖のピーク（保持時間 = 17.5 分）の減少が確認できた (Fig. 6B)。

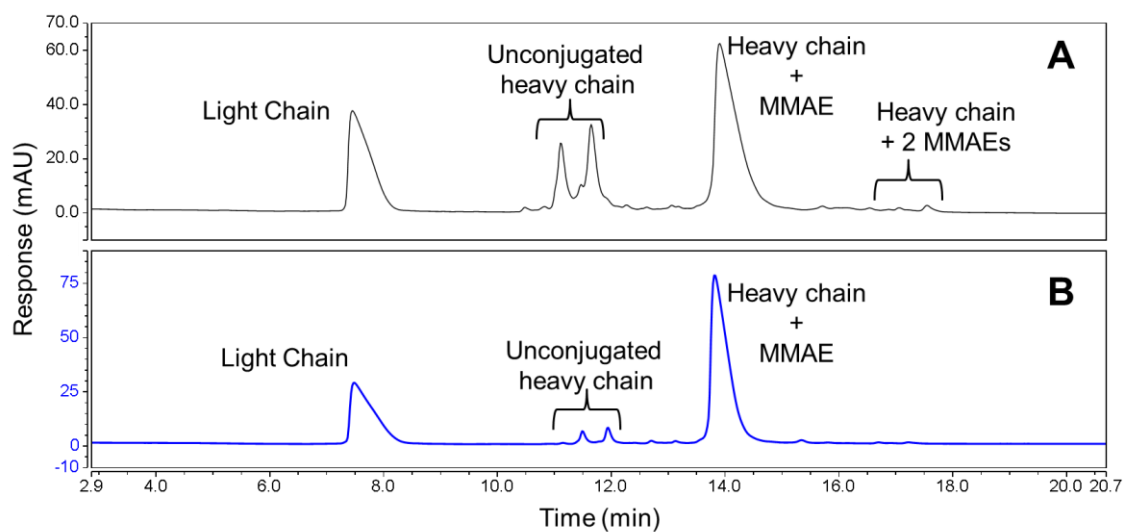


Fig. 6 RPLC/UV results for the AJICAP®-ADCs: A) Unpurified AJICAP®-MMAE (5A); B) Purified AJICAP®-MMAE (5B).

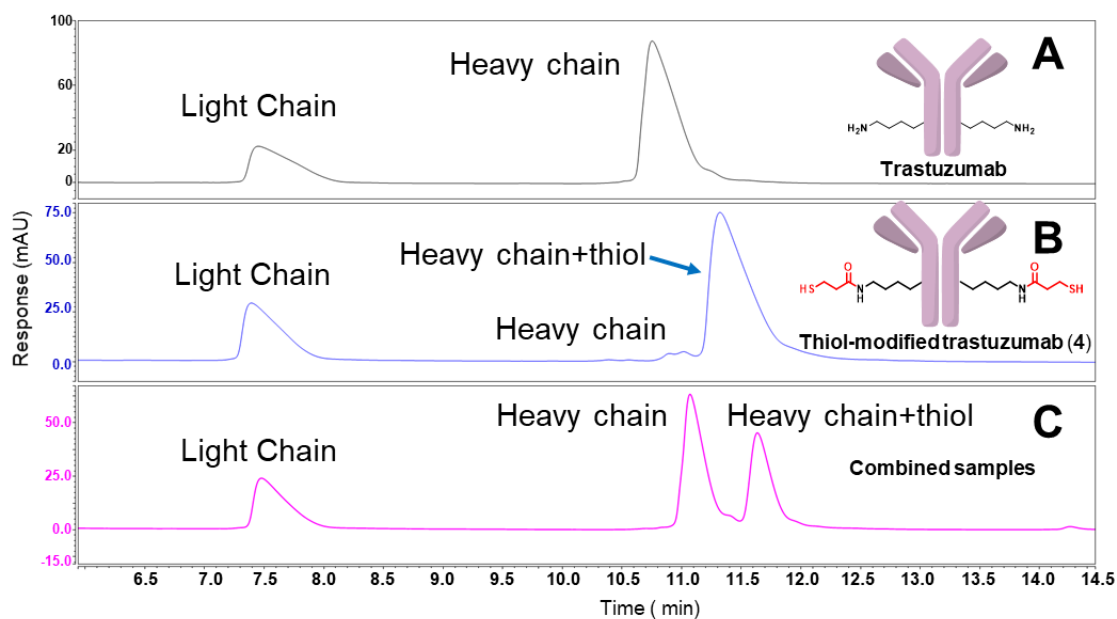


Fig. 7 RPLC/UV results for the naked mAb and ADC precursor: A) Trastuzumab; B) Thiol-modified trastuzumab (4); C) Combined sample.

続いて、クロマトグラム上で分離できたピークの面積の比を、軽鎖と重鎖のそれぞれについて算出した (Table 4).

Table 4 Summary of peak area ratio in reduced RPLC/UV analysis

	Unpurified ADC (5A)	Purified ADC (5B)
Unconjugated Light Chain	1.000	1.000
Light Chain + MMAE	0.000	0.000
Unconjugated Heavy Chain	0.290	0.0712
Heavy Chain + MMAE	0.659	0.913
Heavy Chain + 2 MMAE	0.0515	0.0159
DAR	1.52	1.89

Formula 1~3 を用いて、ピーク面積比から DAR を算出した. 未精製の 5A の DAR の算出手順を示す.

Formula 1 より,

$$\text{DAR (軽鎖)} : 0 = 2 \times (0 \times 1.00)$$

Formula 2 より,

$$\text{DAR (重鎖)} : 1.52 = 2 \times (0 \times 0.290 + 1 \times 0.659 + 2 \times 0.0515)$$

Formula 3 より,

$$\text{DAR: } \mathbf{1.52} = 0 + 1.52$$

軽鎖に MMAE が付加したピークは確認できないことから、DAR (軽鎖) は 0 となる。重鎖は、目的の MMAE が一つ付加したピーク (保持時間 = 13.9 分, ピーク面積比: 0.659), 及び MMAE が過剰に付加したピーク (保持時間 = 17.5 分, ピーク面積比: 0.0515) が確認できる。過剰に付加した MMAE を二つとすると、DAR (重鎖) の値は 1.52 となり、これがそのまま DAR となる。

同様に、精製した ADC である **5B** のクロマトグラム of ピーク面積比を用いて計算をしたところ、DAR = 1.89 となった。

Formula 1 より,

$$\text{DAR (軽鎖)} : 0 = 2 \times (0 \times 1.00)$$

Formula 2 より,

$$\text{DAR (重鎖)} : 1.89 = 2 \times (0 \times 0.0712 + 1 \times 0.913 + 2 \times 0.0159)$$

Formula 3 より,

$$\text{DAR: } \mathbf{1.89} = 0 + 1.89$$

1-3-2 HIC/UV 分析

HIC/UV 分析は前述の reduced RPLC/UV 分析と異なり、LC 測定のための試料の還元前処理は必要ではなく、ADC を非変性条件 (native 条件) で分析することができる。DAR の算出は、それぞれの DAR 種のピーク面積比に基づく Formula 4 を用いた。

$$\text{DAR} = 0 \times A'' + 1 \times B'' + 2 \times C'' + 3 \times D'' \quad (\text{Formula 4})$$

A'': DAR = 0 のピーク面積比

B'': DAR = 1 のピーク面積比

C'': DAR = 2 のピーク面積比

D'': DAR = 3 のピーク面積比
ただし, $A'' + B'' + C'' + D'' = 1$ とする.

また, HIC/UV の測定は, 二つの異なる溶離液条件で実施した (Fig. 8, Fig. 9).
Condition A では, IPA を溶離液 B に加え, 溶離液の塩濃度を下げる条件を用いた (Fig. 8).

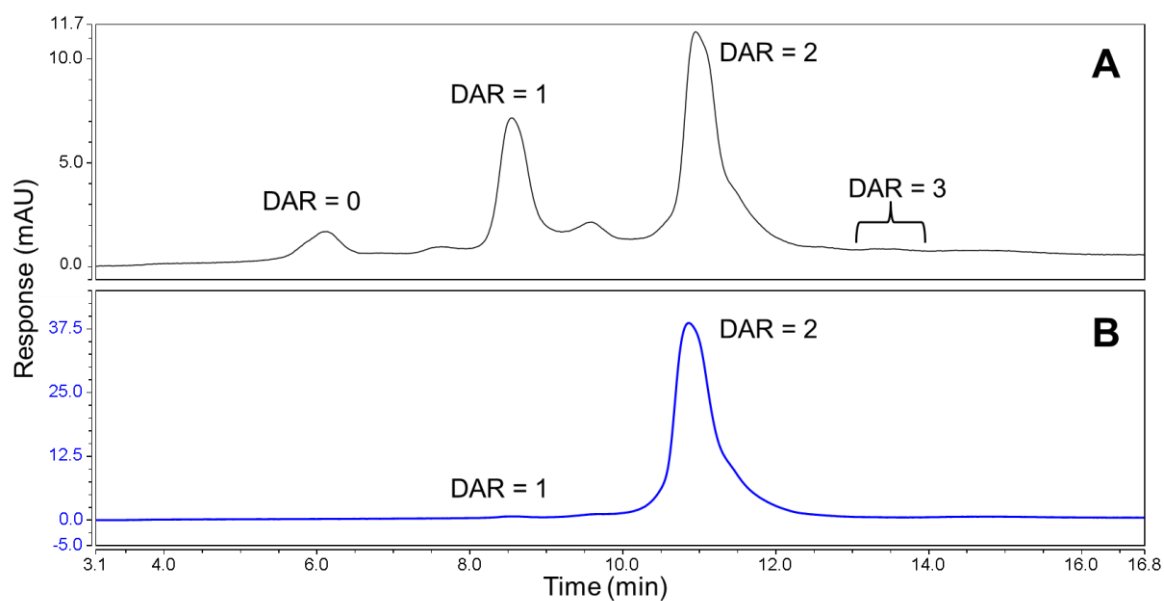


Fig. 8 HIC/UV results for the AJICAP®-ADCs using condition A: A) Unpurified AJICAP®-MMAE (**5A**); B) Purified AJICAP®-MMAE (**5B**).

Condition B では、IPA を使用せず、塩濃度を上げた溶離液を用いた (Fig. 9).

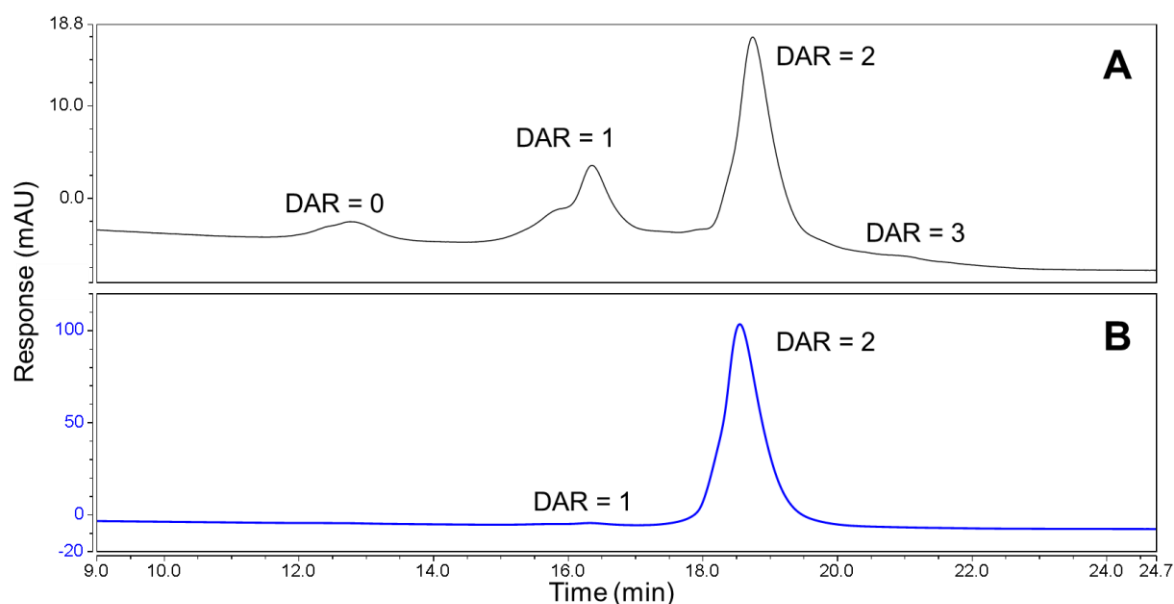


Fig. 9 HIC/UV results for the AJICAP®-ADCs using condition B: A) Unpurified AJICAP®-MMAE (**5A**); B) Purified AJICAP®-MMAE (**5B**).

どちらの溶離液条件でも未精製の trastuzumab- AJICAP®-MMAE (**5A**) は 4 つのピークを与えた. それぞれ未反応のチオール導入抗体 (DAR = 0), MMAE が一つ付加した抗体 (DAR = 1), MMAE が二つ付加した抗体 (DAR = 2), 過剰の MMAE が付加した抗体 (DAR = 3) に対応すると考えられた. 精製後の trastuzumab- AJICAP®-MMAE (**5B**) では, MMAE が二つ付加した抗体 (DAR = 2) がメインピークとして確認でき, 僅かながら MMAE が一つ付加した抗体 (DAR = 1) の存在を示唆する結果となった.

続いて, クロマトグラムで観察された各ピークの面積比を算出し (Table 5), Formula 4 から DAR を求めた.

Table 5 Summary of peak area in HIC/UV analysis

	Condition A		Condition B	
	Unpurified ADC (5A)	Purified ADC (5B)	Unpurified ADC (5A)	Purified ADC (5B)
DAR = 0	0.0928	0.00	0.0567	0.00
DAR = 1	0.267	0.0209	0.325	0.0154
DAR = 2	0.611	0.970	0.591	0.985
DAR = 3	0.0297	0.00	0.0274	0.00
DAR	1.59	1.96	1.59	1.99

Formula 4 より, Condition A の **5A** の DAR は 1.59 と求められた.

$$\text{DAR: } 1.59 = 0 \times 0.0928 + 1 \times 0.267 + 2 \times 0.611 + 3 \times 0.0297$$

同様に Condition A の **5B** の DAR は 1.96 となった.

$$\text{DAR: } 1.96 = 0 \times 0.00 + 1 \times 0.0209 + 2 \times 0.970 + 3 \times 0.00$$

Condition B の **5A** の DAR は 1.59 となり,

$$\text{DAR: } 1.59 = 0 \times 0.00567 + 1 \times 0.325 + 2 \times 0.591 + 3 \times 0.0274$$

Condition B の **5B** の DAR は 1.99 であった.

$$\text{DAR: } 1.99 = 0 \times 0.00 + 1 \times 1.54 + 2 \times 98.5 + 3 \times 0.00$$

1-3-3 RPLC/QTOF-MS 分析

続いて未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) に対して, RPLC/QTOF-MS 測定を実施した (Fig. 10).

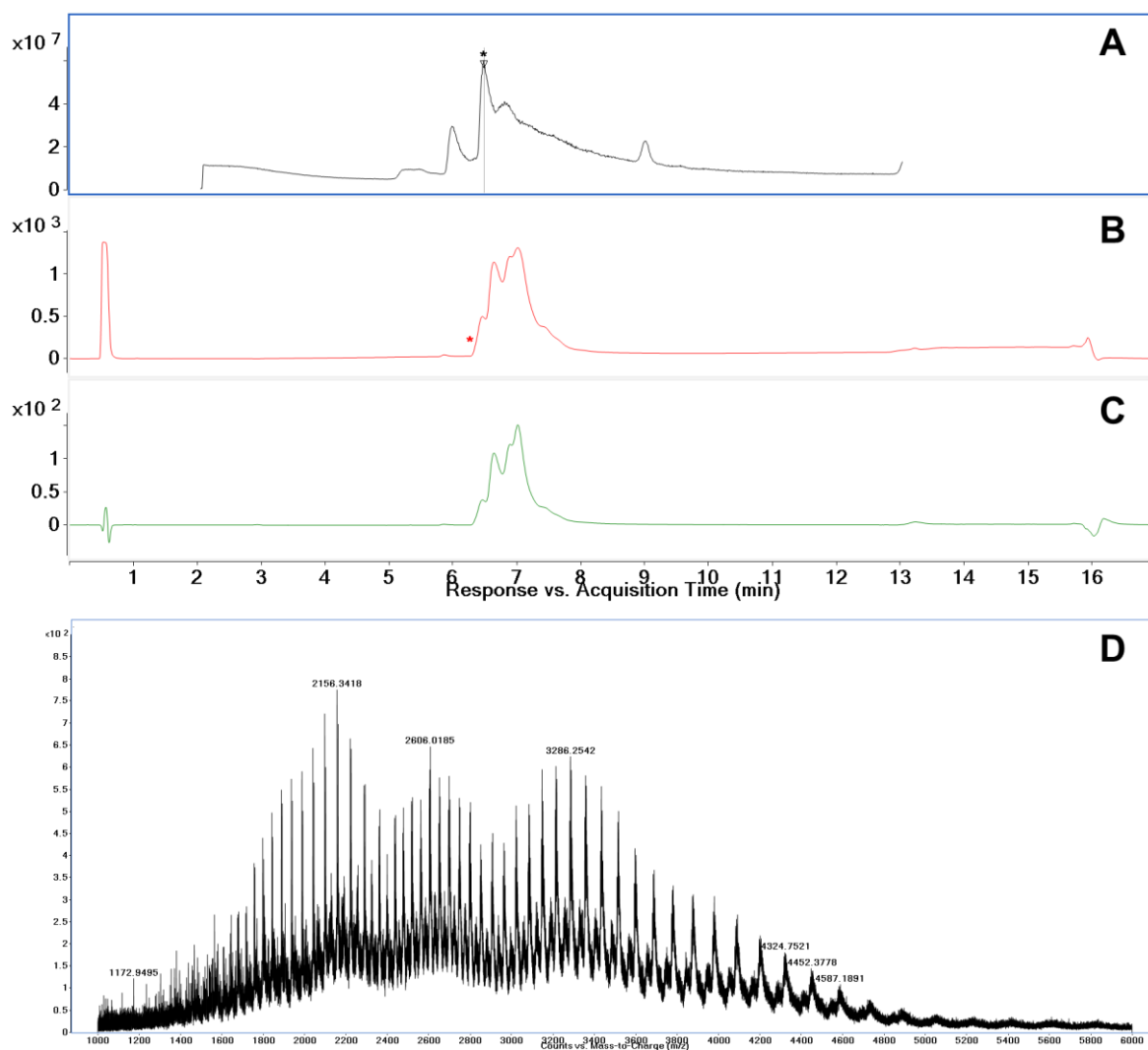


Fig. 10 RPLC/QTOF-MS of unpurified AJICAP®-MMAE (**5A**); A) total ion chromatogram; B) UV chromatogram (215 nm); C) UV chromatogram (280 nm); D) mass spectrum.

全イオンクロマトグラム (Total Ion Chromatogram = TIC) では、複数のピークが観察されたため (**Fig. 10A**)、マススペクトルを抽出する保持時間の範囲を指定した。そのために、抗体を含むタンパク質の UV 吸収波長として利用される 215 nm 及び 280 nm の UV クロマトグラム (215 nm (**Fig. 10B**), 280 nm (**Fig. 10C**)) を測定し、ADC は保持時間 6-8 分のピークとして溶出されていると考えた。TIC から 6-8 分の m/z 1000-6000 のイオンを抽出したマススペクトルを **Fig. 10D** に示す。複雑な多価イオンを与えたので、デコンボリューション処理の範囲を m/z 1000-5000 に設定した。

同様に、精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) の TIC を測定した (Fig. 11A). こちらも、215 nm と 280 nm の UV クロマトグラム (Figs. 11B, 11C) のピークを基に、保持時間 6-8 分に溶出する m/z 1000-6000 のイオンを TIC から抽出したところ、多価イオンが確認できた (Fig. 11D). デコンボリューション処理の範囲は、5A と同様に m/z 1000-5000 に設定した.

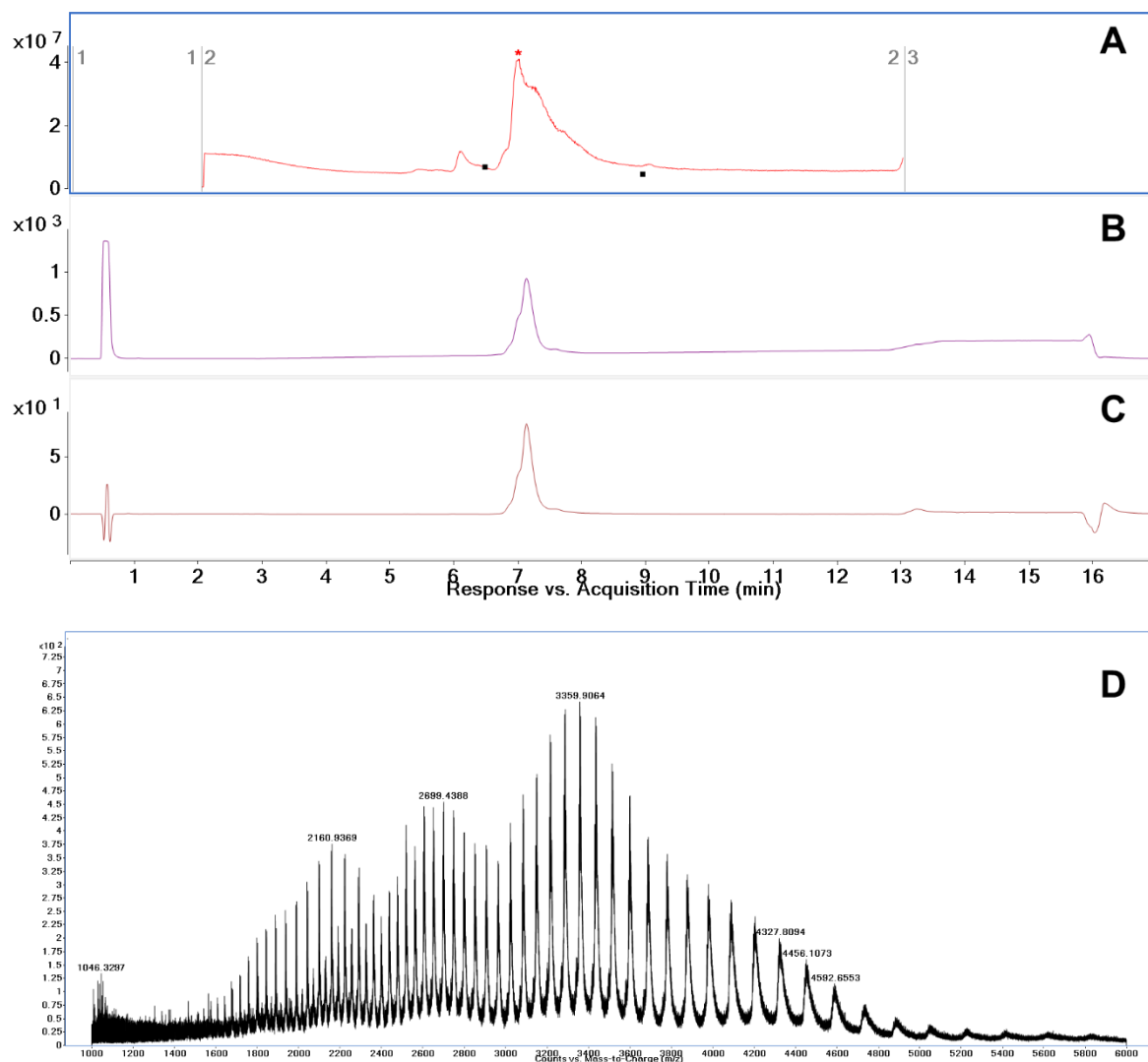


Fig. 11 RPLC/QTOF-MS of purified AJICAP®-MMAE (5B); A) Total ion chromatogram; B) UV chromatogram (215 nm); C) UV chromatogram (280 nm); D) mass spectrum.

続いて、デコンボリューションスペクトルの解析を行った (Fig. 12). 未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) では大きく3つのピークが観察された (Fig.

12A). それぞれのピークは、観測された質量から未反応のチオール導入抗体 (DAR = 0), MMAE が一つ付加した抗体 (DAR = 1), MMAE が二つ付加した抗体 (DAR = 2) と同定した. 一方, 精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5B**) は MMAE が二つ付加した抗体 (DAR = 2) のピーク群のみが確認できた (**Fig. 12B**). DAR は, HIC/UV 分析でも用いた Formula 4 を用いて, ピーク面積比から求めた. その結果, 未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) の DAR は 1.76, 精製後の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5B**) の DAR は 2.00 と算出された.

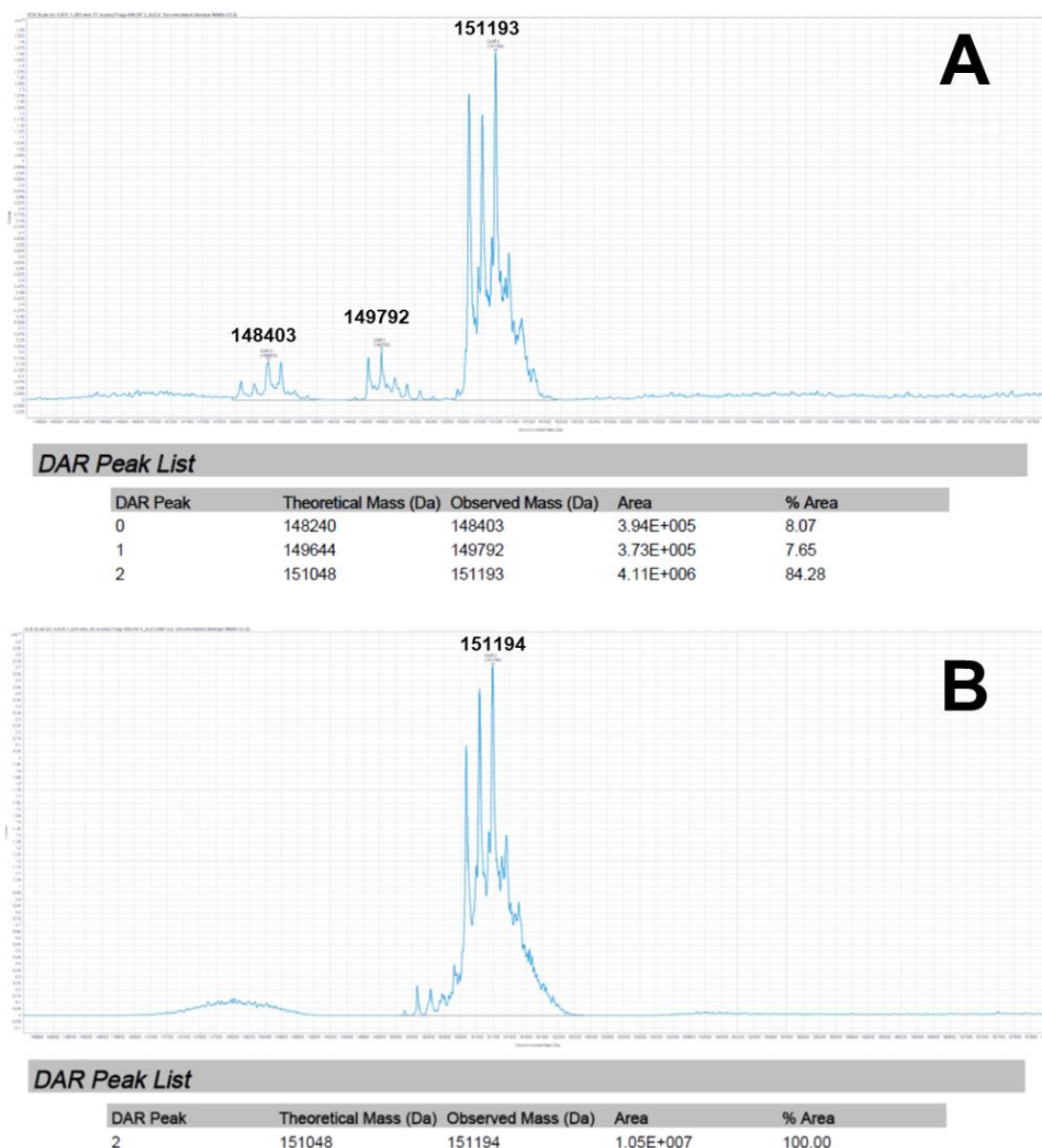


Fig. 12 Deconvolution spectra of trastuzumab-AJICAP®-MMAE analyzed by RPLC/QTOF-MS: A) Unpurified ADC (**5A**); B) Purified ADC (**5B**)

1-3-4 Denaturing SEC/QTOF-MS 分析

続いて、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) に対して denaturing SEC/QTOF-MS 測定を実施した. RPLC/QTOF-MS と同様に, TIC を得たのち (Fig. 13A), 2 波長の UV クロマトグラム (Figs. 13B, 13C) から, 保持時間を 6-8 分に決めて m/z 1000-6000 のイオンを抽出したところ, マススペクトル上に多価イオンが確認できた (Fig. 13D). 多価イオンの分布から, デコンボリューション処理の範囲を m/z 1000-5000 に設定した.

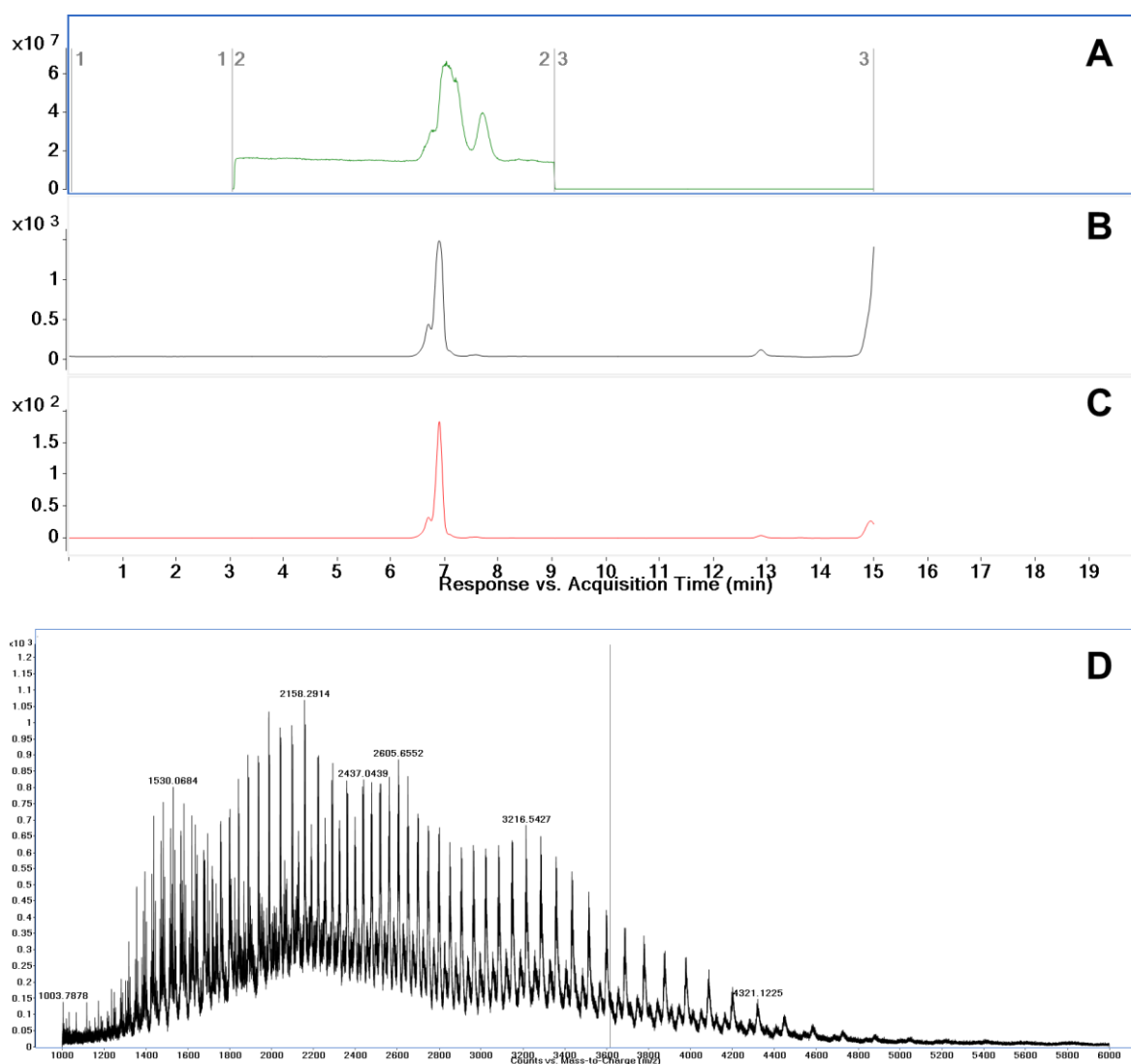


Fig. 13 Denaturing SEC/QTOF-MS of unpurified AJICAP®-MMAE (5A); A) total ion chromatogram; B) UV chromatogram (215 nm); C) UV chromatogram (280 nm); D) mass spectrum.

同様の実験操作を、精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) にも行った。TIC (Fig. 14A) と2波長の UV クロマトグラム (Figs. 14B, 14C) を得て、それらの結果を基に、保持時間 6-8 分の m/z 1000-6000 のマススペクトル (Fig. 14D) が得られた。多価イオンの分布から、デコンボリューション処理の範囲を m/z 1000-5000 に設定した。

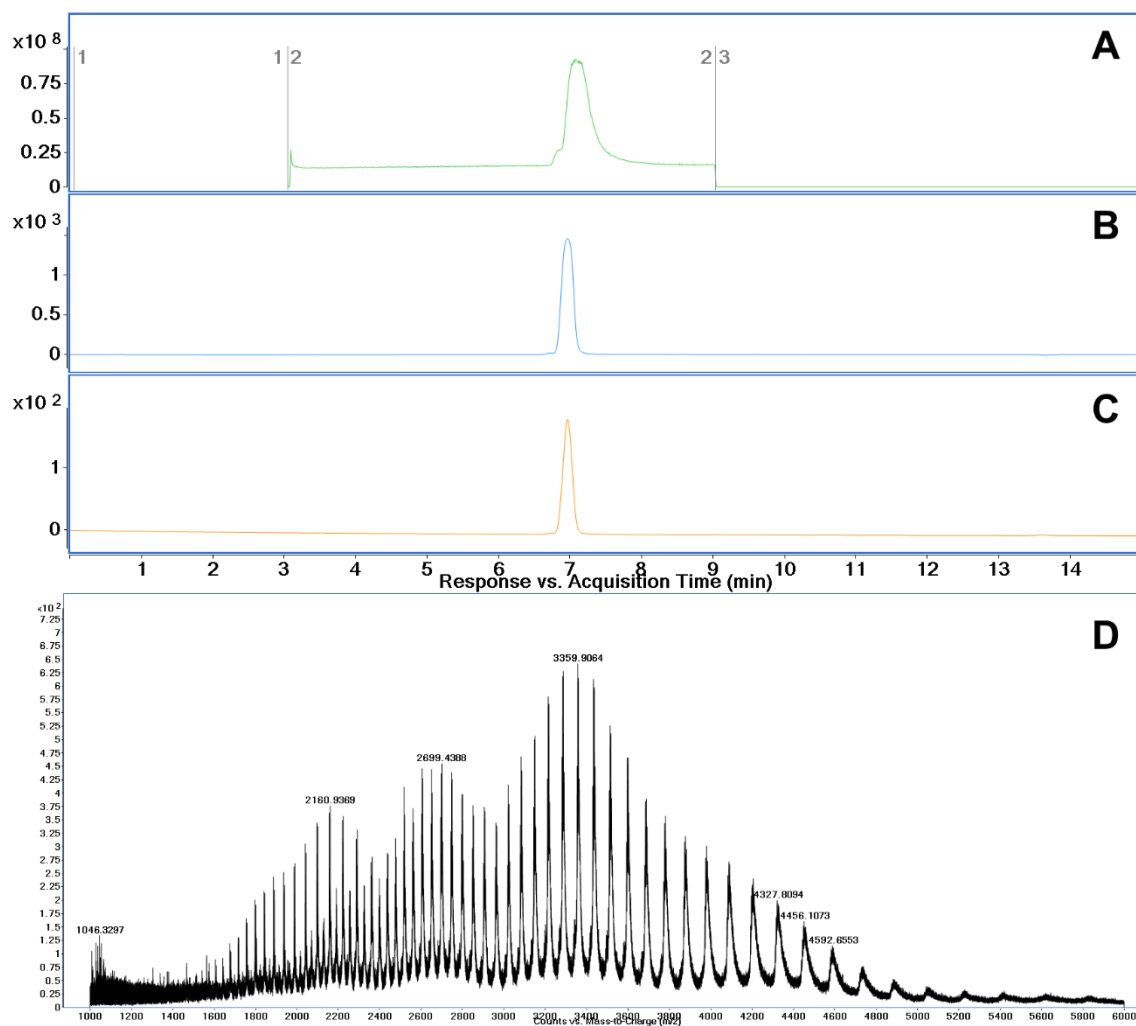
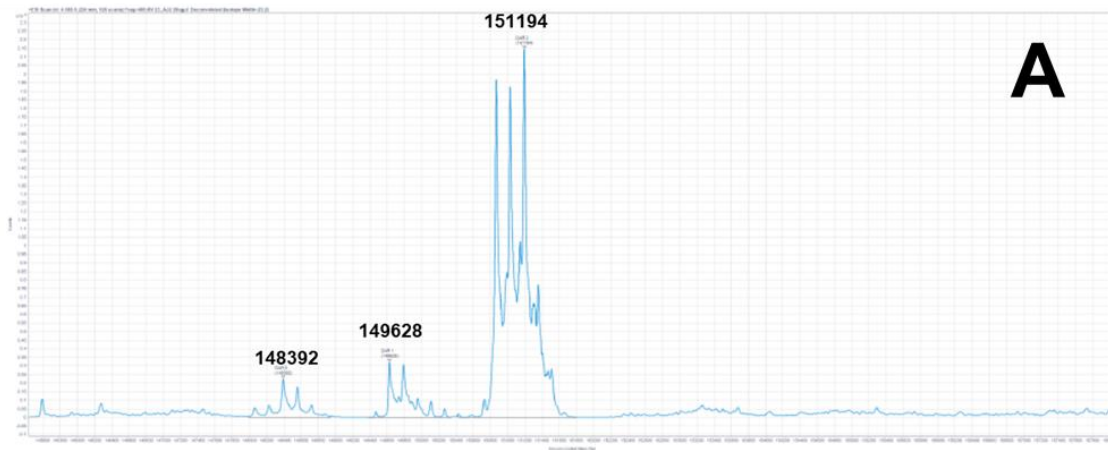


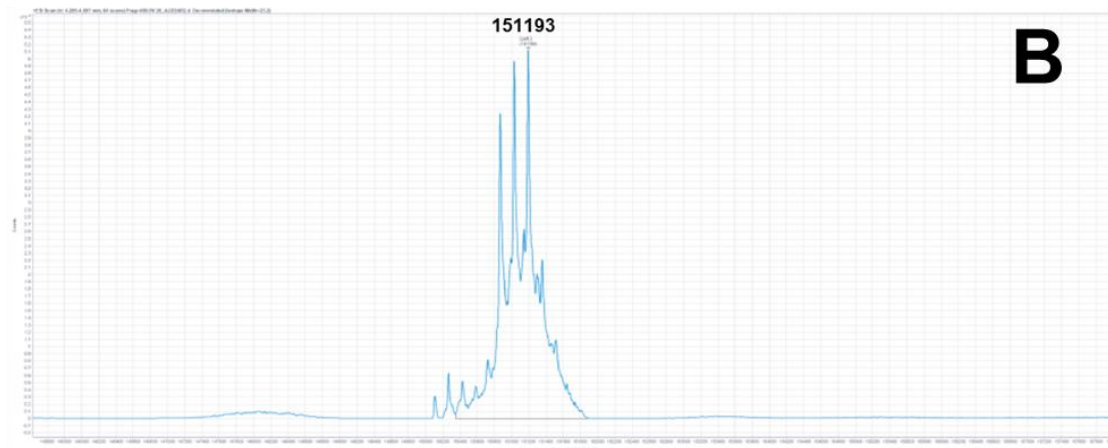
Fig. 14 Denaturing SEC/QTOF-MS of purified AJICAP®-MMAE (5B); A) total ion chromatogram; B) UV chromatogram (215 nm); C) UV chromatogram (280 nm); D) mass spectrum.

続いて、デコンボリューションスペクトルの解析を行った (**Fig. 15**)。未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) では、大きく 3つのピークが観察された (**Fig. 15A**)。観測された質量から、保持時間の短い方のピークより未反応のチオール導入抗体 (DAR = 0)、MMAE が一つ付加した抗体 (DAR = 1)、MMAE が二つ付加した抗体 (DAR = 2) と同定した。一方、精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5B**) は、MMAE が二つ付加した抗体 (DAR = 2) のみが確認できた (**Fig. 15B**)。DAR は、Formula 4 を用いて、ピーク面積比から求めた。その結果、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) の DAR は 1.78、精製後の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5B**) の DAR は 2.00 と算出された。



DAR Peak List

DAR Peak	Theoretical Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Area	% Area
0	148240	148392	4.40E+005	6.49
1	149644	149628	5.98E+005	8.82
2	151048	151194	5.74E+006	84.69



DAR Peak List

DAR Peak	Theoretical Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Area	% Area
2	151048	151193	1.80E+007	100.00

Fig. 15 Deconvolution spectra of trastuzumab-AJICAP®-MMAE analyzed by denaturing SEC/QTOF-MS: A) Unpurified ADC (**5A**); B) Purified ADC (**5B**)

1-3-5 Native SEC/QTOF-MS 分析

続いて、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) に対して native SEC/QTOF-MS 測定を実施した。得られた TIC (Fig. 16A), 2 波長の UV クロマトグラム (Figs. 16B, 16C), TIC から抽出した保持時間 5-7 分の m/z 1000-6000 のマススペクトル (Fig. 16D) を示す。このマススペクトル (Fig. 16D) では、 m/z 6000 以上の多価イオンを取得することが装置の特性上できなかった。しかし、多価イオンの分布のパターンは確認できたため、 $m/z = 4000-6000$ の範囲で確認できた多価イオンにデコンボリューション処理を行った。

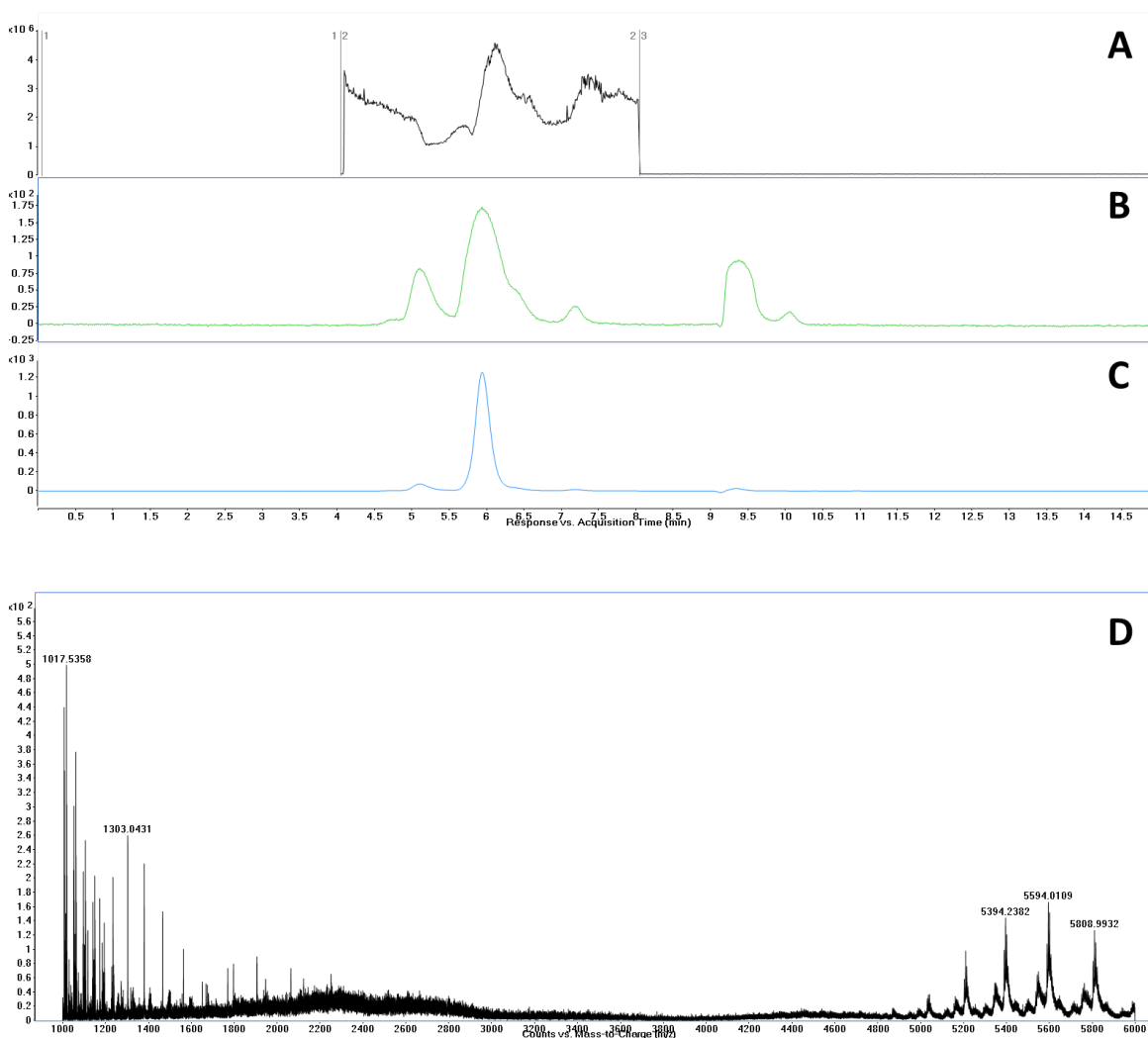


Fig. 16 Native SEC/QTOF-MS of unpurified AJICAP®-MMAE (5A); A) Total ion chromatogram; B) UV chromatogram (215 nm); C) UV chromatogram (280 nm); D) mass spectrum.

同様の native SEC/QTOF-MS 測定を精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) にも行った. TIC (Fig. 17A), 2 波長の UV クロマトグラム (Figs. 17B, 17C), 保持時間 5-7 分の TIC から抽出した m/z 1000-6000 のマススペクトル (Fig. 17D) を示す. 5A と同様に, m/z 6000 以上の多価イオンを取得することができなかつたため, 確認できた多価イオンの分布のパターンから $m/z = 4000-6000$ の範囲でデコンボリューション処理を行った.

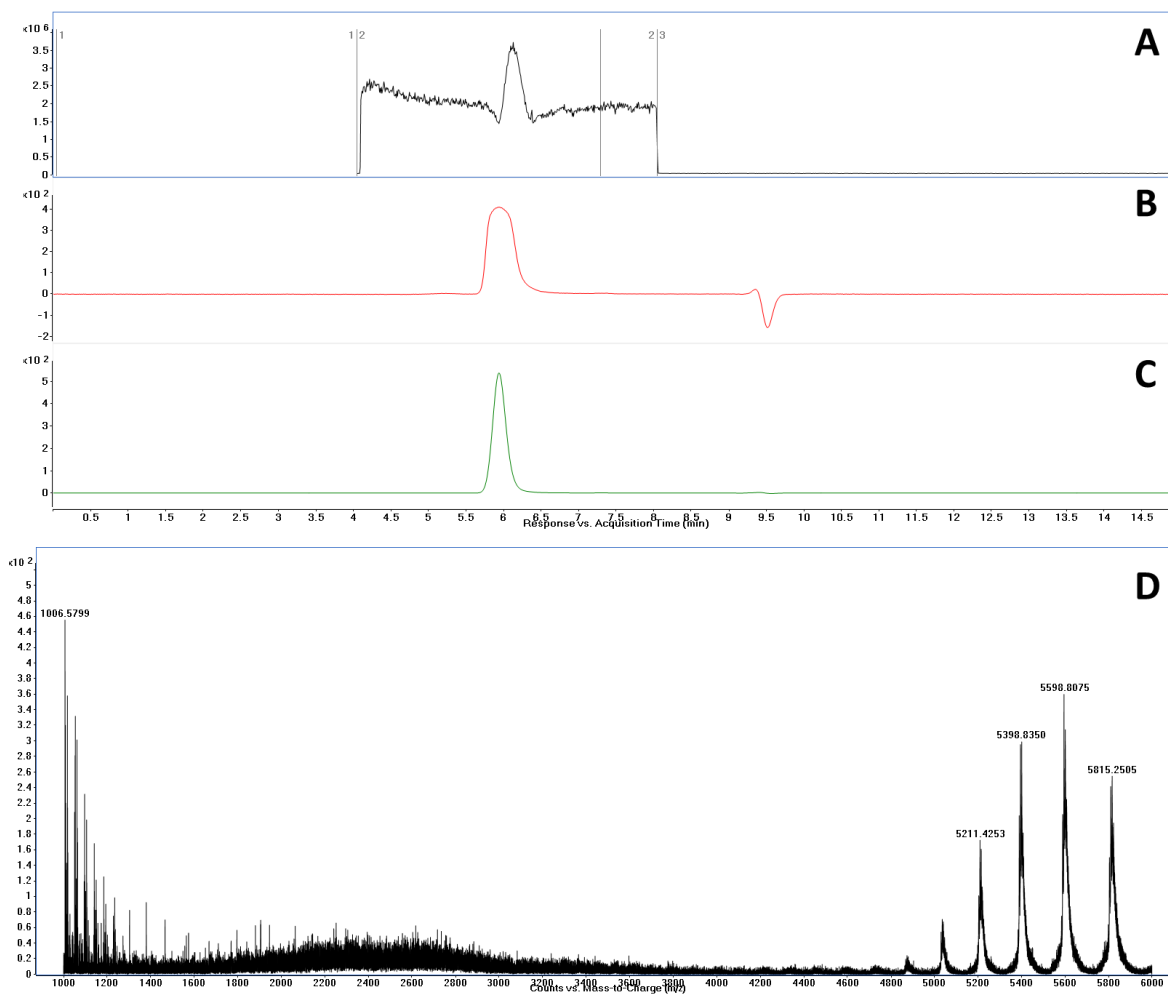
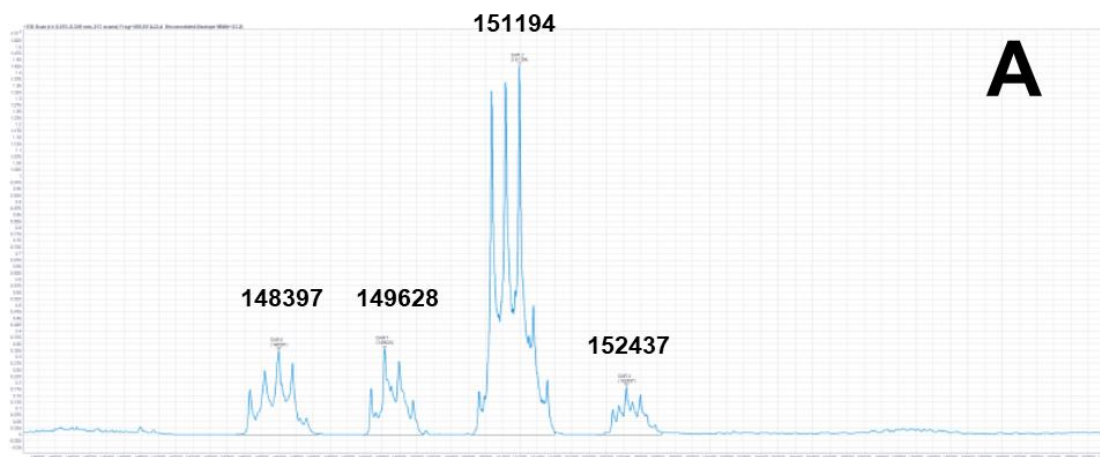


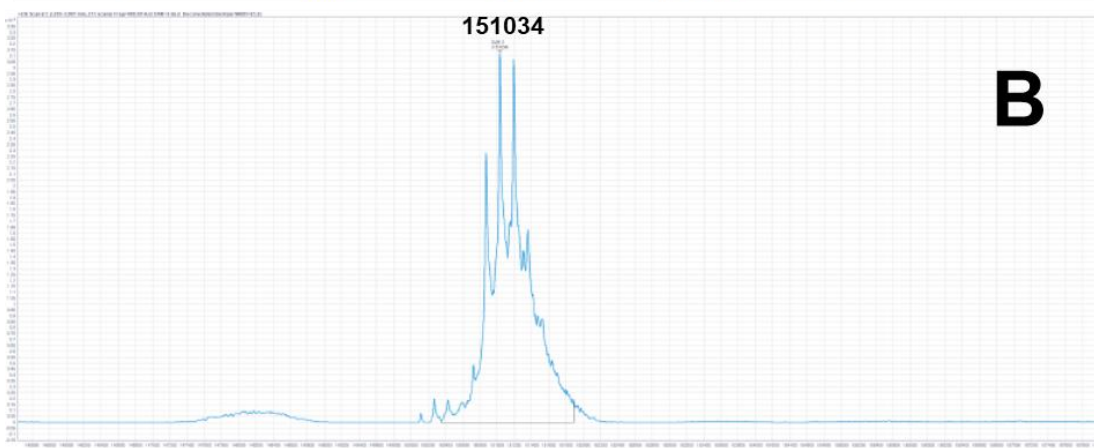
Fig. 17 Native SEC/QTOF-MS of unpurified AJICAP®-MMAE (5B); A) Total ion chromatogram; B) UV chromatogram (215 nm); C) UV chromatogram (280 nm); D) mass spectrum.

続いて、デコンボリューションスペクトルの解析を行った (**Fig. 18**). 未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) は、4つのピークを与えた (**Fig. 18A**). それぞれのピークは、観測された質量から、未反応のチオール導入抗体 ($\text{DAR} = 0$), MMAE が一つ付加した抗体 ($\text{DAR} = 1$), MMAE が二つ付加した抗体 ($\text{DAR} = 2$), MMAE が過剰に付加した抗体 ($\text{DAR} = 3$) と同定した. 一方、精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5B**) では、MMAE が二つ付加した抗体 ($\text{DAR} = 2$) のみが確認できた (**Fig. 18B**). ピーク面積比から Formula 4 を用いて DAR を求めたところ、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**) は 1.58, 精製後の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5B**) は 2.00 と算出された.



DAR Peak List

DAR Peak	Theoretical Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Area	% Area
0	148240	148397	9.74E+005	15.85
1	149644	149628	7.89E+005	12.84
2	151048	151194	3.92E+006	63.87
3	152452	152437	4.58E+005	7.45



DAR Peak List

DAR Peak	Theoretical Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Area	% Area
2	151048	151034	1.28E+007	100.00

Fig. 18 Deconvolution spectra of trastuzumab-AJICAP®-MMAE analyzed by native SEC/QTOF-MS: A) Unpurified ADC (**5A**); B) Purified ADC (**5B**)

1-3-6 Ellman's assay

6つめの分析法として、抗体の遊離チオールを測定する Ellman's assay を実施した。Ellman's assay はチオールのモル濃度と ADC のモル濃度をそれぞれ測定し、一分子当たりの遊離チオール数 ($[SH]/[mAb]$) を算出する方法である。ADC 濃度は trastuzumab のモル吸光係数 ($212400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 及び分子量 ($MW = 148225$) を用いて、DTNB を添加していないブランク ADC サンプルの 280 nm の吸光度から算出した。チオール濃度は、前述の通り (Fig. 3C), DTNB とチオールとの反応で脱離した 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の極大吸収波長が 412 nm であるため (モル吸光係数: $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 吸光度を測定することによって間接的にチオール濃度を算出した。すなわち、ADC サンプルに DTNB を添加し、412 nm の吸光度を測定することでチオール濃度とした。

まず、ADC の前駆体にあたるチオール導入抗体 (4) 一分子当たりの遊離チオール数 ($[SH]/[mAb]$) を測定したところ、1.91 であった (Table 6)。この結果より、チオールは目的の値である 2 に近く導入できており、出発原料である trastuzumab からチオール導入抗体 (4) への誘導はほぼ定量的に進行していることが分かった。続いて、未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) を測定したところ、遊離チオール数 ($[SH]/[mAb]$) は 0.33 であった (Table 7)。この値を前駆体であるチオール導入抗体 (4) の遊離チオール数 ($[SH]/[mAb]$) から差し引くと 1.58 となり、この分だけチオールが MMAE と反応したと間接的に推測できた。一方、精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) の遊離チオール数 ($[SH]/[mAb]$) は 0.019 であった (Table 8)。この結果から、精製した ADC において MMAE と反応したと推測されるチオールは $1.91 - 0.019 = 1.891$ となり、DAR は 2.0 に近いことが示唆された。

Table 6 Ellman's assay of thiol modified trastuzumab (4)

Sample	Conditions	Abs (280 nm)	Abs (412 nm)	[mAb] M	[SH] M	[SH]/[mAb]
4	with DTNB	0.195	0.0116	Non	7.915E-07	1.913
blank	blank	0.0899	0.00061	4.138E-07	-	-

Table 7 Ellman's assay of unpurified trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**)

Sample	Conditions	Abs (280 nm)	Abs (412 nm)	[mAb] M	[SH] M	[SH]/[mAb]
5A	with DTNB	0.303	0.00106	Non	3.746E-08	0.330
Blank	blank	0.0264	0.00081	1.136E-07	-	-

Table 8 Ellman's assay of purified trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5B**)

Sample	Conditions	Abs (280 nm)	Abs (412 nm)	[mAb] M	[SH] M	[SH]/[mAb]
5B	with DTNB	0.488	0.00110	Non	1.484E-08	0.019
Blank	blank	0.173	0.00094	7.997E-07	-	-

1-4 考察

これまで得られた DAR の比較 (Ellman's assay 以外) を下記にまとめた (Table 9, 10).

Table 9 Peak area ratios and DARs of unpurified trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) as measured by different Methods.

	Reduced RPLC/UV	HIC/UV Condition A	HIC/UV Condition B	RPLC/ QTOF-MS	Denaturing SEC/ QTOF-MS	Native SEC/ QTOF-MS
DAR = 0	-	0.0928	0.0567	0.0807	0.0649	0.121
DAR = 1	-	0.267	0.325	0.0765	0.0882	0.267
DAR = 2	-	0.611	0.591	0.842	0.847	0.519
DAR = 3	-	0.0297	0.0274	-	-	0.0931
Light Chain	1.00	-	-	-	-	-
LC+MMAE ^{a)}	0.00	-	-	-	-	-
Heavy Chain	0.290	-	-	-	-	-
HC+MMAE ^{b)}	0.659	-	-	-	-	-
HC+ 2 MMAEs ^{c)}	0.0515					
DAR	1.52	1.59	1.59	1.76	1.78	1.58

a) LC+MMAE: light chain conjugated with 1 MMAE

b) HC+MMAE: heavy chain conjugated with 1 MMAE

c) HC+2 MMAEs: heavy chain conjugated with 2 MMAEs

Table 10 Peak area ratios and DARs of purified trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) as measured by different Methods.

	Reduced RPLC/UV	HIC/UV Condition A	HIC/UV Condition B	RPLC/ QTOF-MS	Denaturing SEC/ QTOF-MS	Native SEC/ QTOF-MS
DAR = 0	-	-	-	-	-	-
DAR = 1	-	0.0290	0.0154	-	-	-
DAR = 2	-	0.970	0.985	1.00	1.00	1.00
DAR = 3	-	-	-	-	-	-
Light Chain	1.00	-	-	-	-	-
LC+MMAE ^{a)}	0.00	-	-	-	-	-
Heavy Chain	0.0712	-	-	-	-	-
HC+MMAE ^{b)}	0.913	-	-	-	-	-
HC+ 2 MMAEs ^{c)}	0.0159	-	-	-	-	-
DAR	1.89	1.96	1.99	2.00	2.00	2.00

- a) LC+MMAE: light chain conjugated with 1 MMAE
b) HC+MMAE: heavy chain conjugated with 1 MMAE
c) HC+2 MMAEs: heavy chain conjugated with 2 MMAEs

未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) は、分析法によって得られる DAR に違いがあった。特に、MMAE が過剰に反応したと考えられる DAR = 3 のピークを認めた reduced RPLC/UV, HIC/UV 及び native SEC/QTOF-MS は、DAR の値として 1.52~1.59 を与えた。一方、RPLC/QTOF-MS 及び denaturing SEC/QTOF-MS では、DAR = 3 の ADC は確認できず、DAR はそれぞれ 1.76 と 1.78 であった。DAR = 3 の存在を明らかにするために、AJICAP®法の最初の工程の生成物である trastuzumab-ペプチド複合体 (2) を 3 つの分析法で測定した (Fig. 19)。

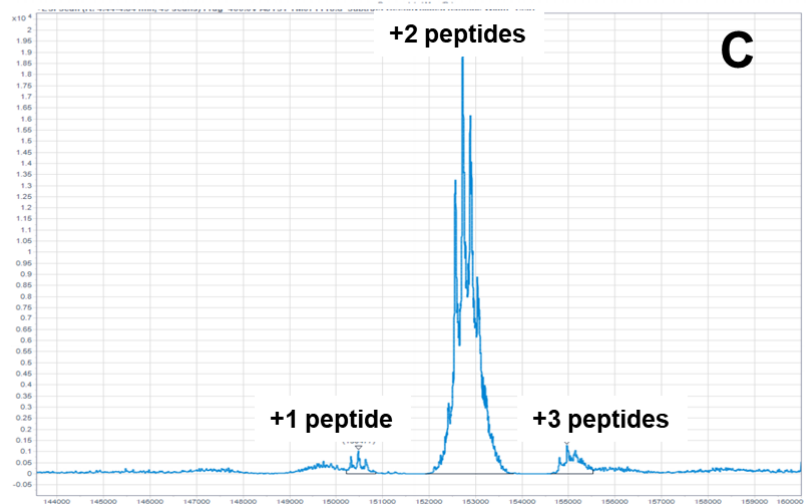
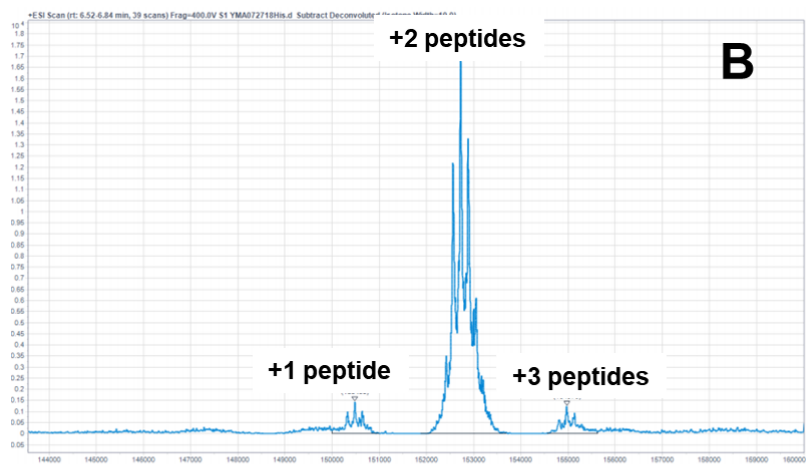
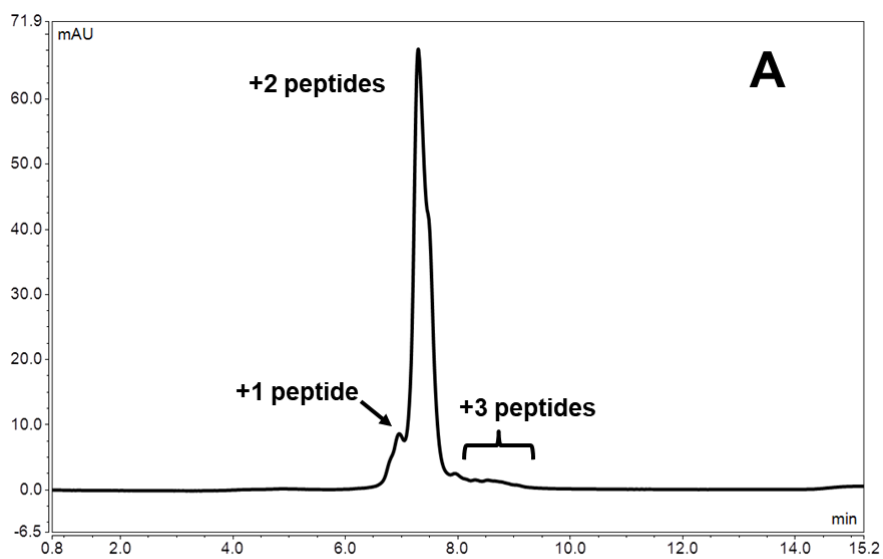


Fig. 19 Analysis of trastuzumab-peptides (**2**): A) HIC/UV analysis (Condition A); B) Deconvolution spectra produced by RPLC/QTOF-MS; C) Deconvolution spectra produced by native SEC/QTOF-MS

未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) の結果と異なり, trastuzumab-ペプチド複合体 (2) は HIC/UV, RPLC/QTOF-MS 及び native SEC/QTOF-MS の 3 つの分析法ではほぼ同様の結果を与えた. 3 つの何れの分析法でも, 主要な ADC (2) のピークに加えて, 3 当量のペプチド試薬 (1) で修飾された trastuzumab に対応するピークを与えた. これには 1 分子過剰にペプチド試薬が反応しており, その後の合成工程を進めると, linker 切断を経て, 3 つの遊離チオールを有する抗体へと変換される. これは, 3 分子の MC-VC-MMAE と反応することができ, DAR = 3 の ADC を生成したと考えられる. 以上の考察から, DAR = 3 の存在を示唆する reduced RPLC/UV, HIC/UV, 及び native SEC/QTOF-MS は, 他の方法に比較して正確に DAR の分布を測定できていると考えた. 一方, DAR = 3 が検出されなかった RPLC/QTOF-MS 及び denaturing SEC/QTOF-MS は, データの信頼性に疑問が残った. Denaturing SEC/QTOF-MS の問題点については, 同様の傾向が 2015 年, Beck と Cianférani のグループによって報告されている⁴⁶⁾. 彼らは市販の ADC である Kadcyła® を分析対象として, denaturing SEC/QTOF-MS と native SEC/QTOF-MS を比較し, native SEC/QTOF-MS は信頼性のある DAR を提供するものの, denaturing SEC/QTOF-MS は正確でない DAR を与えることを示した. しかし, 両方法の与える DAR が異なる原因について, 十分な比較研究や考察は行われていない.

Native SEC/QTOF-MS に比較して, denaturing SEC/QTOF-MS や RPLC/QTOF-MS で得られた DAR が異なっていた理由を, 筆者はイオン源での ADC 等のイオン化に対する溶離液の影響の違いによるものではないかと考察した. RPLC/QTOF-MS 及び denaturing SEC/QTOF-MS は, どちらもギ酸を添加した溶離液で LC-MS 測定を行った. ギ酸はタンパク質やペプチドのイオン化を促進するため, これら二つの方法で得られたマスペクトル (Fig. 10D, 11D, 13D, 14D) は, 非常に多くの多価イオンを与え, デコンボリューション処理は m/z 1000-5000 という広い範囲を設定できた. 一方, native 条件での測定はギ酸ではなく, 酢酸アンモニウムを用いた. 酢酸アンモニウムの場合, フラグメンテーションが十分ではなく, m/z 4000 未満では抗体由来の多価イオンは確認できなかった (Fig. 16D, 17D). 二つの結果を考え合わせると, ギ酸を用いた場合に得られた非常に多くの多価イオンには, 目的の ADC 以外の不純物由来のシグナルが含まれ, 一方, それらの不純物は酢酸アンモニウムの存在下では付加イオンにはなりにくく, 結果として目的の ADC が選択的にデコンボリューションスペクトルを与えたのではないかと推測し

た。

未精製の trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) の結果と対照的に, trastuzumab-ペプチド複合体 (2) や精製した trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5B) は, 分析法によらず, ほぼ同様の DAR を与えた (Fig. 19 及び Table 10). ただし, reduced RPLC/UV のみ少し異なる DAR を与え, これは reduced RPLC/UV 特有の試料の前処理によるものと考えている⁴⁷⁾. Trastuzumab-ペプチド複合体 (2) と精製後の ADC (5B) が, 分析法によらずに同様の DAR を示した理由として, 両者の不均一性の低さが関与すると考えた. 不均一性が低いと不純物の含量が少ないため, 不純物のイオン化による ADC のイオン化への影響が小さく, 得られるシグナルは ADC に選択的となり, デコンボリューション処理の結果は ADC の含量を反映したと考えている. ここまで議論したように, UV 検出の結果を基に DAR を算出できる RPLC/UV 分析や HIC/UV 分析とは違い, イオン化効率の違いや不純物の影響を受けやすい QTOF-MS 測定は, 測定サンプルの不均一性や不純物の影響を受けやすい可能性が示唆された. これらの原因を突き止めるためには, イオン化条件の最適化など, さらなる検討が必要である.

最後に, DAR の結果に差が観察された 3 つの LC/QTOF-MS 分析法の特徴を相互に比較した (Table 11).

Table 11 Characteristics comparison of three different QTOF-MS analyses.

	RPLC/ QTOF-MS	Denaturing SEC/ QTOF-MS	Native SEC/ QTOF-MS
Required ADC amount	5 µg	20 µg	20 µg
Accuracy	semi-reliable	semi-reliable	reliable
Removal of small molecules	Necessary	not necessary	necessary

DAR の測定の確度という視点でみると, 前述の通り native SEC/QTOF-MS が最も正確であった. しかし, この分析手法は一般にイオン化効率が比較的弱いアンモニウムイオンを含有する溶離液を使用し, 更に分析カラム内での ADC と不純物との分離は困難なため, ノイズとして検出されてしまう低分子を機器への注入前の前

処理によって除去する必要がある。すなわち、反応のモニタリングなど夾雑物が多いことが予想される *in situ* 分析への応用は難しいと考えられる。一方、denaturing SEC/QTOF-MS はギ酸を含む溶離液を使用しており、TFA の添加と組み合わせることで、低分子と ADC のカラム内での分離が比較的容易に達成できる。このように試料の複雑な前処理を必要とせず、短時間での測定が可能である denaturing SEC/QTOF-MS は、コンジュゲーション反応をモニタリングする *in situ* 分析への応用が期待できる。反応のモニタリングでは反応が進行したか否かが最も大切な情報であり、DAR の正確性は厳格には求められないことから、denaturing SEC/QTOF-MS が有用であると考えられる。RPLC/QTOF-MS は、分析に必要な試料量が少ない（通常 5 μg 程度の ADC）ことが特徴として挙げられる。スクリーニング研究などプロジェクトの初期段階では、実験計画法（Design of experiment = DOE）に基づいて最適反応条件を確立する必要があるが、この時点ではなるべく少量スケールでの実験が望ましい。また、スケールアップ時に更なる条件検討を行うことから、DAR の正確性は初期段階では厳格には求められないと考えられる。このような視点から、RPLC/QTOF-MS はコンジュゲーションの初期検討時に適した分析手法であると考えられる。

1-5 小括

AJICAP® 法を利用して得られた位置選択的 ADC を分析対象とし、6つの分析法によってその DAR を算出し、分析法の相互比較を行った。未精製及び分取 HPLC 精製された trastuzumab-AJICAP®-MMAE の平均 DAR は、それぞれ 1.6 及び 2.0 であった。本検討は、同一バッチの位置選択的 ADC を使用した複数の分析法の初の比較研究であり、各分析法の長所と短所を明らかにすることができた。特に未精製の ADC に関しては、LC/QTOF-MS の LC 条件の違いによって DAR が異なる結果を与えることがわかり、それらが溶離液や不純物の存在によるものである可能性が示唆された。本研究により、分析対象や目的に合わせた最適な LC/QTOF-MS 法を明らかにすることができた。LC/QTOF-MS 法は、DAR の分布とその分子量の同定のどちらも一度にできるため、大変魅力的な方法である。今後、イオン化条件や溶離液の検討などを行い、不均一性の高い ADC であっても正確に DAR 解析ができる分析法の確立が望まれる。

LC/UV 法は LC/QTOF-MS 法のように分子量を求めることはできないものの、未精製の ADC であっても正確な DAR 解析が可能であった。非変性条件で DAR を求めることができる HIC/UV 法と、変性条件ながらもより分離度の高いピーク形状を与える reduced RPLC/UV 法を適切に組み合わせることで、より正確な DAR 解析を行うことができると考えられる。

2章 GMP 戦略に基づいた位置選択的な ADC の調製と工程内分析

2-1 序論

AJICAP®法を利用すると、抗体の Fc 領域の特定の Lys 残基のみを生体直交性官能基で修飾することができる（第 1 章, Fig. 2）。山田らは、本法の初期検討において、位置選択的な抗体の化学修飾をラボスケールで実現した。更に、得られた AJICAP®-ADC の生物活性の評価と、表面プラズモン共鳴を利用する結合親和性解析を行い、標的細胞に対する選択的な親和性と薬効を確認した³⁵⁾。また 2019 年に著者と Mendelsohn らは、Thorpe らの報告を基にした TCEP 還元反応の酸性条件での実施や⁴⁸⁾、MC-VC-MMAE の酸性緩衝液への溶解度を利用したタンジェンシャルフロー・フィルトレーション（Tangential Flow Filtration = TFF）精製の最適化など^{30, 49)}、AJICAP®法による ADC 合成手法をスケールアップ可能な条件に改良し、trastuzumab-AJICAP®-MMAE のグラムスケール合成を達成した⁵⁰⁾。そこで、次の課題として ADC の GMP 戦略を確立し、GLP 試験にむけた trastuzumab-AJICAP®-MMAE の合成を行い、将来の製造を見据えたプロセス開発を完成させることが浮上した。GMP 製造現場への簡便な技術移管を考慮すると、この GLP 試験用のサンプル調製は、製造現場と同様の反応系、精製機器、品質管理基準を採用することが求められた。しかし、GLP 試験用の ADC 製造に関する明確な規定は FDA から提示されておらず、製薬会社や受託製造会社の裁量に任されている部分が多くあった。そこで本研究を行った Ajinomoto Bio-Pharma Services (ABPS) 社は、FDA が発行した“FDA Guidance Documents for Process Validation“と呼ばれるガイダンス文書や⁵¹⁾、医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use = ICH) の解釈に従い⁵²⁾、GLP 試験用の ADC 調製のための内部基準を設定した (Table 12)。

Table 12 Comparison of research & development, GMP manufacturing and ABPS approach to produce ADC materials for GLP pre-clinical studies

Topic	Research & Development	GMP	Ajinomoto’s approach to produce GLP grade ADCs
Facility	Not product dedicated	Separate or defined areas	Use of segregated area in a GMP manufacturing facility
Equipment	Equipment qualification not completed	Equipment installation, operational and performance qualifications (IOPQ) completed	Equipment used for analytical testing is classified as GMP and has full IOPQ execution
Manufacturing controls	Experiments and studies are documented	All manufacturing operations are documented at the time of execution Second person verification is required	All process steps are documented at the time of execution with a second verifier, in a part 11 compliant ELN system
Laboratory controls	Analytical methods are not qualified	Appropriate qualification, validation and documentation of test methods in place	Analytical methods are documented prior to completion depending on the maturity of the product lifecycle

製造施設はクロスコンタミネーションのリスクを低減するために、他の実験室から隔離されたプロセス開発用の実験室を選択した。

コンジュゲーション反応及び製剤化に使用される原材料は、FDA の製造、試験及び品質に関するガイドラインに適合したものをを用いた。原材料の受け入れのための分析は確立された方法にて行われ、結果が適格であることが確認された後、メソッドと結果は電子文書として記録された。全ての製造工程は、使用する機器や施設こそ GMP 準拠ではないものの、製造におけるすべての作業工程を MBR としてあらかじめ文書化しておくなど、GMP 基準に近い運用にて実施した。また、実験をするオペレーターに加え、全ての工程を目視で確認するレビュアーとの 2 人作業として、全製造工程を実施した。全ての製造工程は電子ノート（Electronic lab notebook = ELN）及び MBR の両方にリアルタイムで記録した⁵³⁾。MBR は作業を一つ一つ行うたびに更新され、その都度レビュアーの承認を行った。GLP 試験用に用いられることになる tastuzumab-AJICAP®-MMAE の分析は、バリデーションと日常的な校正が行われた分析機器のみを用い、専門のトレーニングを受けたオペレーターが GMP 準拠の分析室で行った。分析結果は承認者による確認作業を経て、分析証明書（Certificate of Analysis = COA）として文書化された。すなわち、ADC の分析においては GMP と同じ基準を用いた⁵⁴⁾。

このように作られた MBR と COA は独立した品質管理部門によって、修正や逸脱がないかの最終レビューが行われた⁵⁵⁾。

本章ではこの GMP 戦略に従い、tastuzumab-AJICAP®-MMAE の GLP 試験用のサンプル合成をした際に用いられた、各工程の IPC 分析について述べる。

2-2 材料及び方法

2-2-1 試薬

抗 HER2 抗体 trastuzumab はロッシュ社（スイス）より購入した。Payload である MC-VC-MMAE は NJ Biopharmaceuticals LLC 社（アメリカ）より購入した。他の試薬は Sigma-Aldrich 社（アメリカ）より購入した。AJICAP®ペプチド試薬 (1) は既報³⁵⁾に従って合成した。

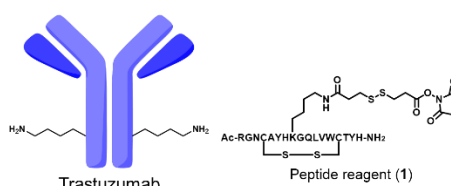
2-2-2 ADC 合成

ADC の合成は下記のフローダイアグラムの通りに行った (Fig. 20) .

Step-1: Peptide conjugation

- Trastuzumab: **1900 mg**
Concentration: 10 mg/mL
Buffer: AcONa buffer (pH 5.5)
- Peptide Reagent: **9 eq**
- 1 h, rt
- IPC analysis
- Purification with TFF system

Amount: 1.92 g, Yield: 98%

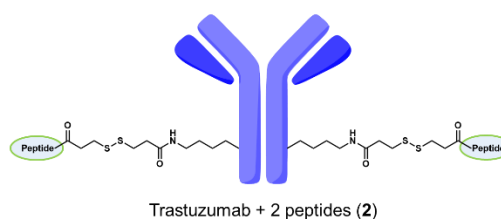


Step-1

Step-2: Linker cleavage

- Step-1 product: **1920 mg**
Concentration: 6.9 mg/mL
Buffer: histidine buffer (pH 5.2)
- TCEP: **20 eq**
- 1 h, 37 °C
- IPC analysis
- Purification with TFF system

Amount: 1.79 g, Yield: 96%

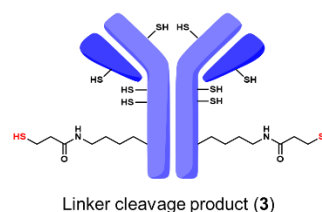


Step-2

Step-3: Re-oxidation

- Step-2 product: **1790 mg**
Concentration: 6.6 mg/mL
Buffer: PBSE buffer (pH 7.4)
- DHAA: **40 eq**
- 3 h, rt
- IPC analysis
- Purification with TFF system

Amount: 1.78 g, Yield: 100%

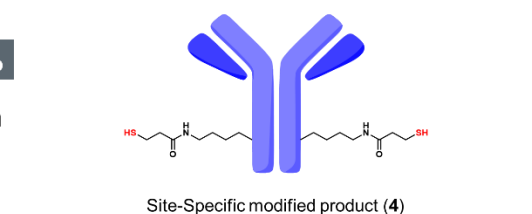


Step-3

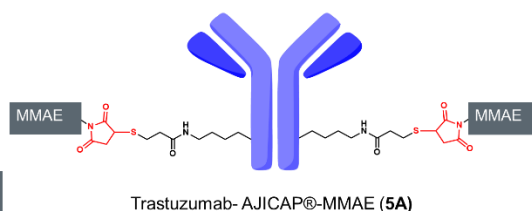
Step-4: Payload conjugation

- Step-3 product: **1780 mg**
Concentration: 6.8 mg/mL
Buffer: PBSE buffer (pH 7.4)
- MC-VC-MMAE: **10 eq**
- 1 h, 20 °C
- N*-acetyl cysteine: **25 eq**
- 15 min, 25 °C
- Filtration
- IPC analysis
- Purification with TFF system

Amount: 1.73 g, Yield: 95%



Step-4



Overall Yield: 90% (4 steps)

Fig. 20 Gram-scale flow diagram: synthesis of trastuzumab-AJICAP®-MMAE (**5A**)

ペプチドコンジュゲーションの実験方法 (AJICAP®法の Step-1)

Trastuzumab (10 mg/mL, 1.90 g) を含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に、ペプチド試薬 (1) (9 eq., 5.15 mL, *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液) を添加し、Chemglass®システムを用いて 25°C で攪拌した。1 時間後、少量の反応混合物 (0.5 mL) を IPC のためにサンプリングした。反応完結を確認した後、Sartocon Slice 200 Eco Hydrosart メンブレン (30 kDa; Sartorius 社製) と酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を用いる TFF システムに混合物をアプライし、抗体濃度が 20 mg/mL になるまで濃縮精製した。次に同じ TFF 装置を用いて、抗体濃度が 6.9 mg/mL になるように formulation buffer (20 mM histidine, 5wt% トレハロース添加, pH 5.2) への置換を行い、trastuzumab-ペプチド複合体 (2) 溶液を得た。得られた溶液の抗体濃度を Solo-VPE system³⁰⁾による Slope Spectroscopy®で測定し、その値より 2 の収率を計算した。1.92 g の 2 が得られ、収率は 98%であった。

リンカー切断の実験方法 (AJICAP®法の Step-2)

Step-1 で得られた trastuzumab-ペプチド複合体 (2) 溶液に、0.25 M のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 水溶液 (12 eq., 0.572 mL, pH 7.4) , 100 mg/mL のポリソルベート 20 (0.0265 mL) , 及び 0.5 M の TCEP 水溶液 (20 eq., 0.476 mL) を 37°C で添加した。得られた混合物を pH メーターで測定し、pH が 5.2 であることを確認した。37°C で 1 時間反応させた後、少量の反応混合物 (0.5 mL) を IPC のためにサンプリングした。反応完結を確認した後、Sartocon Slice 200 Eco Hydrosart メンブレン (30 kDa; Sartorius 社製) と酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を用いる TFF システムに混合物をアプライし、抗体濃度が 20 mg/mL になるまで濃縮精製した。次に同じ TFF システムを用いて、抗体濃度が 6.6 mg/mL になるように、PBSE (50 mM PBS, 10 mM EDTA, pH 7.4) への置換を行い、1.79 g のリンカー切断生成物 (3) を得た。その収率は 96%であった。

再酸化工程の実験方法 (AJICAP®法の Step-3)

リンカー切断生成物 (3) を含む PBSE に、DHAA の 50 mM DMSO 溶液 (40 eq., 8.60 mL) を加え、反応混合物を室温で攪拌した。3 時間後、少量の反応混合物 (0.5 mL) を IPC のためにサンプリングした。反応完結を確認した後、Sartocon Slice 200 Eco Hydrosart メンブレン (30 kDa; Sartorius 社製) と PBSE (pH 7.4) を用いる

TFF システムに混合物をアプライし、抗体濃度が 6.8 mg/mL を保つように精製し、1.78 g のチオール導入抗体 (4) を得た。その収率は 100%であった。

Payload コンジュゲーションの実験方法 (AJICAP®法の Step-4)

チオール導入抗体 (4) (6.8 mg/mL, 1.78 g) を含む PBSE に、ジメチルアセトアミド (DMA) (11.5 mL) 及び MC-VC-MMAE の 10 mM DMA 溶液 (10 eq. 13.3 mL) を添加し、混合物を 20°C で攪拌した。2 時間後、少量の反応混合物 (0.5 mL) を IPC のためにサンプリングした。反応完結を確認した後、反応混合物に過剰量の *N*-アセチルシステインを加え、25°C で 15 分間攪拌し、余剰の MC-VC-MMAE をクエンチした。Sartocon Slice 200 Eco Hydrosart メンブレン (30 kDa; Sartorius 社製) と PBSE (pH 7.4) を用いる TFF システムに混合物をアプライし、20 mg/mL の抗体濃度になるまで濃縮精製した。次に同じ TFF 装置を用いて、抗体濃度が 6.8 mg/mL になるように、formulation buffer (20 mM histidine, 5wt%トレハロース添加, pH 5.2) への置換を行い、trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5A) 溶液 (1.73 g, 収率 95%) を得た。

2-2-3 工程内管理 (in process control = IPC) 方法

IPC のための前処理

IPC のためにサンプリングした反応混合物を、NAP-5 desalting columns (GE Healthcare Life Sciences 社製) にてゲルろ過し、不純物を除去する簡易精製を行った。得られた抗体由来化合物を、IPC 分析に供した。

使用機器, 分析手順

HIC/UV 分析は第 1 章 (1-2-3) に記載の Condition A を用いた。Reduced RPLC/UV 及び Ellman's assay も第 1 章 (1-2-3) に記載の条件を用いた。

2-3 結果

2-3-1 HIC/UV 分析による工程内分析

DAR 解析に汎用される HIC/UV は、IPC においても視覚的に分かりやすい結果を与えた (Fig. 21). Trastuzumab-ペプチド複合体 (2) の保持時間は trastuzumab (保持時間 = 5.6 分) に比べて遅くなり、反応の進行を確認することができた (Fig. 21A, 21B). 二つのペプチド試薬 (1) の付加体が主生成物であることが示唆され (保持時間 = 6.8 分)、それ以外にペプチド試薬 (1) が一つだけ付加したもの (保持時間 = 6.3 分) 及び、ペプチド試薬 (1) が過剰に付加したもの (保持時間 = 8.2 分) と考えられるピークがクロマトグラム上で確認できた. これらのピークの同定は、Trastuzumab-ペプチド複合体 (2) の RPLC/QTOF-MS 分析によって行った (Fig. 22). RPLC/QTOF-MS 分析において、 m/z から二つのペプチド試薬 (1) の付加体が主生成物であることがわかり、HIC/UV 測定と同様にペプチド試薬 (1) が一つだけ付加したものとペプチド試薬 (1) が過剰に付加したものの存在を確認することができた.

2 工程目で合成するリンカー切断生成物 (3) は、出発物質の trastuzumab よりもわずかに遅い保持時間に一つのピーク (保持時間 = 5.8 分) を与えた (Fig. 21C). また、前述の Trastuzumab-ペプチド複合体 (2) のメインピーク (保持時間 = 6.8 分) の消失が確認でき、切断反応が適切に進行しリンカー切断生成物 (3) が得られていることが推測された. これらの結果から、HIC/UV はペプチドコンジュゲーション工程とリンカー切断工程の両方において、IPC に利用可能であることが示唆された. チオール導入抗体 (4) の保持時間は、原料であるリンカー切断生成物 (3) と変わらず、AJICAP®反応の 3 工程目の再酸化においては、HIC/UV の IPC としての利用は難しいことが分かった (Fig. 21D). 最後の工程の MMAE とのコンジュゲーションでは、HIC は複数のピークを与え、反応完結を確認し、DAR の算出へ適用することができた (Fig. 21E). なお、DAR は第 1 章記載の Formula 4 を用いて求め、1.59 となった.

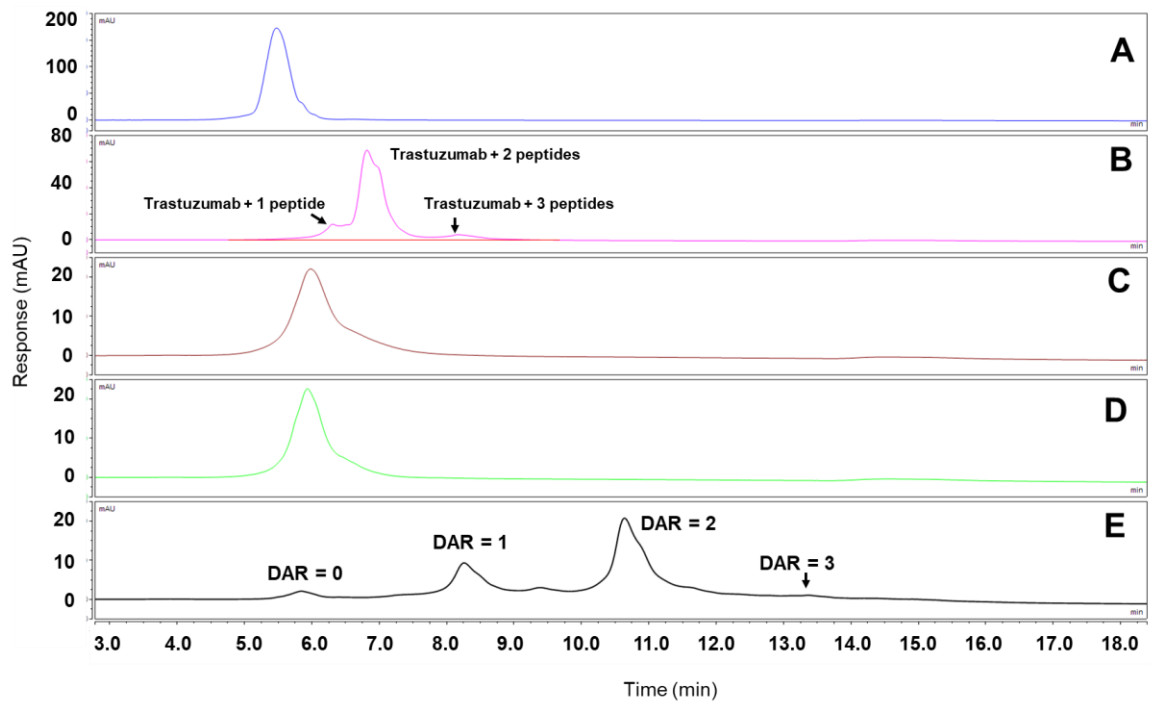
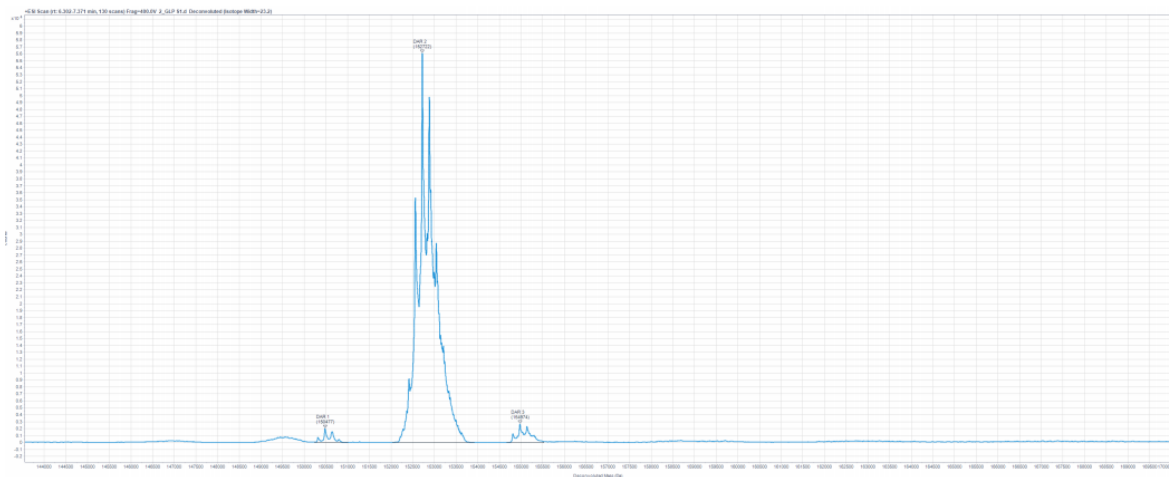


Fig. 21 HIC/UV analysis for IPC: A) Trastuzumab; B) Trastuzumab-peptides (2); C) Linker cleavage product (3); D) Thiol-modified trastuzumab (4); E) Trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5).



DAR Peak List

DAR Peak	Theoretical Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Area	% Area
1	150316	150477	3.62E+005	1.55
2	152572	152722	2.23E+007	95.34
3	154828	154974	7.26E+005	3.11

Fig. 22 RPLC/QTOF-MS analysis of Trastuzumab-peptides (2).

2-3-2 Reduced RPLC/UV による工程内分析

HIC/UV と同様に, reduced RPLC/UV も IPC の分析法として一般的に利用されている (Fig. 23). DTT による前処理で trastuzumab-ペプチド複合体 (2) を還元すると, その RPLC/UV クロマトグラムは, 3 つのピークを示した (Fig. 23B). ピーク高さが最大のピーク (保持時間 = 12.0 分) は, trastuzumab の重鎖のピーク (保持時間 = 11.0 分) とわずかにずれており, ペプチド試薬の反応進行を示唆した. リンカー切断生成物 (3) 及び次の生成物であるチオール導入抗体 (4) は, どちらも trastuzumab-ペプチド複合体 (2) と同様のクロマトグラムを与え, これらの IPC に, 本 RPLC/UV は適していないことが分かった. 最終工程の MMAE とのコンジュゲーションでは, RPLC/UV は 4 種類のピーク (DAR = 0, DAR = 1, DAR = 2, DAR = 3) を与え, 原料であるリンカー切断生成物 (3) との保持時間の差から, DAR の算出と反応完結を確認することができた. なお, DAR は第 1 章記載の Formula 1~3 を用いて, 1.52 と算出された.

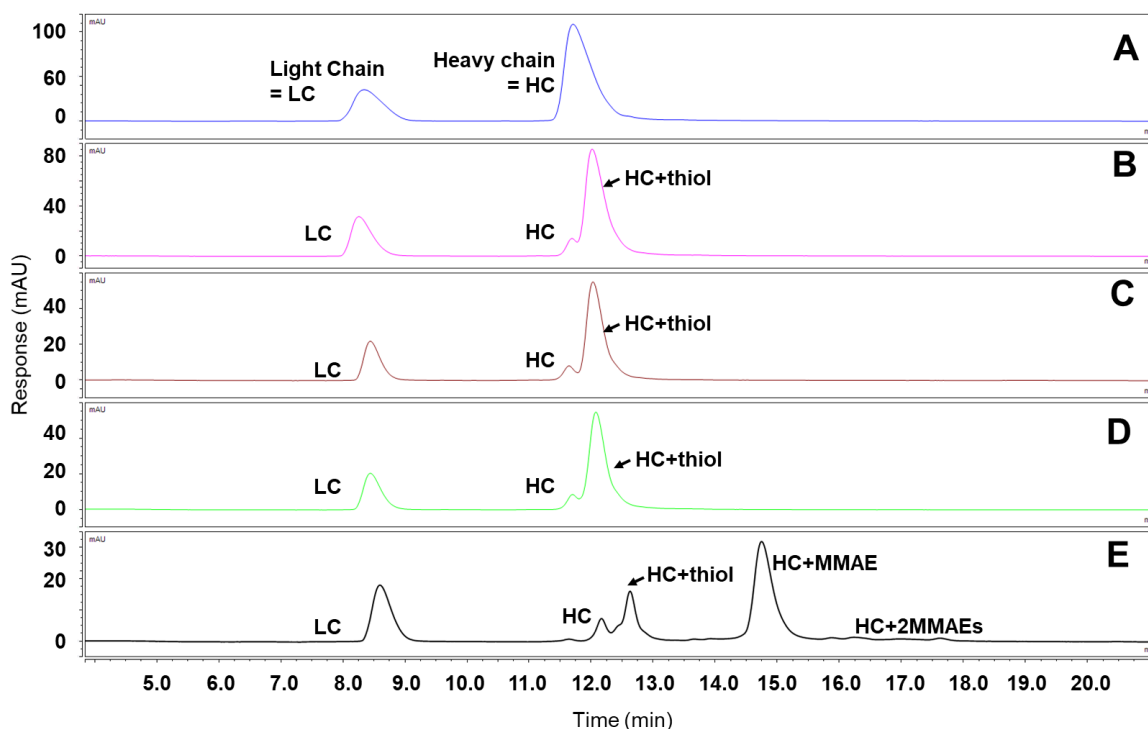


Fig. 23 RPLC/UV analysis for IPC: A) Trastuzumab; B) Trastuzumab-peptides (2); C) Linker cleavage product (3); D) Thiol-modified trastuzumab (4); E) Trastuzumab-AJICAP®-MMAE (5).

2-3-2 Ellman's assay による工程内分析

リンカー切断生成物 (3) よりチオール導入抗体 (4) を得る工程において, HIC/UV と reduced RPLC/UV の両方が IPC の分析に適用できない (クロマトグラム上で, 原料と生成物の間に変化が見られない) ことから, 別の工程内分析法を試すことにした. 第 1 章で議論した LC/QTOF-MS 分析も一つの選択肢であるが, 前述の通り LC/QTOF-MS は不純物の存在や化合物の不均一性に大きく影響を受けるため, IPC には適当でないと判断した. そこで, 第 3 の選択肢として同じく第 1 章で議論した Ellman's assay を選択した. まずリンカー切断生成物 (3) の Ellman's assay を行ったところ, 抗体あたり平均 10.2 個の遊離チオール基を有することが確認された (Table 13). 続いてチオール導入抗体 (4) を測定したところ, 抗体あたり平均 1.87 個の遊離チオール基が存在することがわかった (Table 14).

Table 13 Ellman's assay of linker cleavage product (3)

Sample	Conditions	Abs (280 nm)	Abs (412 nm)	[mAb] M	[SH] M	[SH]/[mAb]
3	with DTNB	0.221	0.1101	Non	7.090E-07	10.2
blank	blank	0.149	0.661	6.926E-07	-	-

Table 14 Ellman's assay of thiol-modified trastuzumab (4)

Sample	Conditions	Abs (280 nm)	Abs (412 nm)	[mAb] M	[SH] M	[SH]/[mAb]
4	with DTNB	0.328	0.020	Non	1.365E-06	1.87
blank	blank	0.164	0.00095	7.313E-07	-	-

2-4 考察

AJICAP®法の第一工程であるペプチドコンジュゲーションでは、最も有効な工程内分析法は HIC/UV 分析であった。Trastuzumab-ペプチド複合体 (2) は、trastuzumab に比べて遅く溶出され、ペプチドが一つ付加した trastuzumab のピーク (Fig. 21B, trastuzumab + 1 peptide) 及びペプチドが過剰に付加した trastuzumab のピーク (Fig. 21B, trastuzumab + 3 peptides) も観察された。この結果は第 1 章の Fig. 19 とも一致し、HIC/UV の再現性が確認できた。

一方、Trastuzumab-ペプチド複合体 (2) は、reduced RPLC/UV では、trastuzumab の重鎖と比較し、わずかなピークシフトが起こるだけであった。Reduced RPLC/UV 測定の前処理では、DTT を用いてジスルフィド結合を切断し、抗体を軽鎖と重鎖に還元している (第 1 章 Fig. 5)。この処理は、Trastuzumab-ペプチド複合体 (2) のペプチド部分と trastuzumab との間にあるジスルフィド結合も同時に開裂させてしまう。その結果、ペプチド部分が抗体より除去され、チオール部分の修飾が残った重鎖のピークがクロマトグラム上に現れる。このわずかな置換基の違いが、ピークの僅かなずれとして確認される (保持時間 = 12.0 分)。また、残り二つのピークは trastuzumab のクロマトグラムで観察されたピークと保持時間が一致しているため、それぞれ未反応の軽鎖 (保持時間 = 8.3 分) と未反応の重鎖 (保持時間 = 11.7 分) に対応していると考えられる。一方、重鎖にペプチドが過剰に付加したピークは、クロマトグラム上には確認できなかった。HIC/UV 分析 (Fig. 21B) と RPLC/QTOF-MS 分析 (Fig. 22) では、ペプチドの過剰反応に相当するピーク (trastuzumab + 3 peptides) が観察されているため、trastuzumab-ペプチド複合体 (2) はわずかながら過剰反応の生成物を含むと考えられる。過剰反応の生成物は、reduced RPLC/UV では、軽鎖の過剰付加体又は重鎖の過剰付加体として観察されると予想される。重鎖の過剰付加体は、チオール修飾された重鎖 (保持時間 = 12.0 分) よりも遅れて溶出されるはずであるが、今回の IPC では対応するピークは観察されなかった。一つの可能性として、チオール修飾された重鎖と重なって溶出されたことを考えている。一方、未修飾の重鎖 (保持時間 = 11.0 分) とメインピークであるチオール修飾された重鎖 (保持時間 = 12.0 分) は、RPLC によって分離することができた。チオールが導入される位置によって、重鎖の二次構造の変化が誘導され、reduced RPLC/UV における保持に影響を及ぼしているのではないかと推測した。

このように多くの分子種を確認するという観点で考えると、HIC/UVの方がIPCとして優れていると考えられる。これに対し、reduced RPLC/UVでは、反応の位置選択性を推定できる利点がある。Trastuzumab-ペプチド複合体(2)の測定では、軽鎖の修飾を示すピークは前述の通り確認できなかった。この結果から、ペプチド試薬(1)とtrastuzumabの架橋反応は重鎖選択的に進行したと推測できる。Reduced RPLC/UVでは詳細な位置選択性(抗体の248位のLysに特異的に反応が進行しているかどうか)は決定できず、又、分離できていない修飾体が存在している可能性は否定できないため、正確な情報はペプチドマッピングが必要である。ペプチドマッピングでは、ADCを酵素反応によってフラグメント化し、LC/MSとMS/MSを駆使して修飾位置を証明する³⁶⁾。しかし、ペプチドマッピングは時間と手間を必要とするため、ADCの製造工程のIPCとしては不向きである。Reduced RPLC/UVでは限定的な情報しか得られないものの、一度のLC分析だけで反応の進行と位置選択性に関する情報が得られる点は魅力的である。前述のHIC/UV分析と組み合わせてIPCとすることで、ADC製造における副反応のリスクを低減できると考えられる。

以上のように、reduced RPLC/UVの結果から、ペプチドコンジュゲーションの工程で、反応の重鎖選択性が生じていることを考察できた。ADCの製造に用いられるChemglass®システムを用いた攪拌法⁵¹⁾によって、AJICAP®法の第一工程の反応は意図しているように進行すると予想できる(その後、詳細なペプチドマッピングを行い、本章で合成したAJICAP®-ADCが確かに位置選択性を有していることを証明した³⁶⁾)。

AJICAP®法の第二工程であるリンカー切断では、HIC/UVにより反応の進行を確認できるものの、Ellman's assayでダブルチェックすることが望ましいと考えられる。本研究では、リンカー切断生成物(3)の抗体当たりの遊離チオール基の数は10.2個であった。抗体は4本の鎖間ジスルフィド結合を有しており、抗体-ペプチド間に1本のジスルフィド結合があることを勘案すると、リンカー切断後のチオール基の理論値は10であり、実測値と一致する。また、本切断反応ではTCEPを大過剰(20当量)用いているが、この過剰量のTCEPは副反応(鎖間ジスルフィド以外のジスルフィドの切断など)をほとんど起こしていないことが示唆された。なお、既報にてリンカー切断反応の条件検討を行い⁵⁰⁾、比較的温和な条件(酸性buffer中、EDTAとポリソルベート20を用いる)が収率向上をもたらすことを報

告した。その条件を利用した本研究の結果、温和な反応条件が TCEP の副反応も抑えた可能性があると考えられた。

AJICAP®法の第三工程である再酸化では、IPC の有力な分析法として Ellman's assay を利用できることが分かった。本研究ではチオール導入抗体 (4) の抗体当たりの遊離チオール数 ($[SH]/[mAb]$) は 1.87 であり、理論値である 2.0 に近いことを示した。

AJICAP®法の最終工程である payload コンジュゲーションでは、HIC/UV 及び reduced RPLC/UV のどちらも、反応進行の確認と DAR 解析を目的とする有力な分析法として、適用できることがわかった。

2-5 小括

GLP 前臨床試験に供する位置選択的 ADC を得るため、GMP 戦略を立て、それに従い製造と同様の反応系 (Chemglass®システム) と TFF 精製を用いて、グラムスケールで trastuzumab-AJICAP®-MMAE を合成した。総収率は 90% であり、1.72 g の trastuzumab-AJICAP®-MMAE が得られた。また、各工程の生成物を 3 種類の工程内分析法 (HIC/UV, reduced RPLC/UV 及び Ellman's assay) によって測定し、結果を比較した。今回の比較研究により、反応の特徴によって適切な IPC 分析法は異なることがわかり、製造における IPC 戦略を確立することができた (Table 15)。

Table 15 Suitable IPC methods for each AJICAP® conjugation step

Step	Proposed analysis
Step-1: peptide conjugation	HIC/UV, reduced RPLC/UV
Step-2: linker cleavage	HIC/UV, Ellman's assay
Step-3: re-oxidation	Ellman's assay
Step-4: payload conjugation	HIC/UV, reduced RPLC/UV

3章 Cysteine 型 ADC の DAR 分析法比較

3-1 序論

ADC 分野の成長に伴い、その特性評価は ADC の R&D, プロセス開発, 製造において、継続的に重要である^{5,6)}. FDA は製薬会社に対し、不均一性と構造の複雑さを持つ抗体由来のバイオ医薬品を、特に慎重に分析することを要求している^{57, 58)}. 第 1 章と第 2 章で議論した通り、ADC の DAR 解析には様々な方法が用いられているが、これらの特徴を評価し比較した研究は非常に限られている²³⁻²⁶⁾. そこで、本論文の第 1 章では、6 つの分析法による位置選択的 ADC の測定を行い、得られた DAR から分析法の特徴を比較した. しかし、市販の ADC はランダムに payload を付加した不均一性の高いシステイン型の ADC が主流であり、位置選択的な ADC は少ない (Table 16)³¹⁾. 2011 年に、Seattle Genetics 社 (現在名: Seagen 社) と Millennium 社 (現在は武田薬品工業社の 100% 子会社) の共同開発の ADC である Adcetris® が FDA から承認されたのち、これまでに 4 つのシステイン型の ADC が上市されている. そのうち 3 つ (Adcetris®, Polivy®, Padcev®) は全く同じ payload (MC-VC-MMAE) を使っており、「MC-VC-MMAE を payload としてランダムに付加したシステイン型の ADC」は現時点では最も一般的な ADC である.

Table 16 FDA-approved antibody-drug conjugates

General name	Antibody-drug conjugate	Approval (year)	Conjugation strategy
Mylotarg®	Gemtuzumab ozogamicin	2000 approved 2017 re-approved	Random Lys
Adcetris®	Brentuximab vedotin	2011 approved	Random Cys
Kadcyla®	Trastuzumab emtansine	2013 approved	Random Lys
Besponsa®	Inotuzumab ozogamicin	2017 approved	Random Lys
Polivy®	Polatuzumab vedotin	2019 approved	Random Cys
Padcev®	enfortumab vedotin-ejfv	2019 approved	Random Cys
Enhertu®	Trastuzumab deruxtecan	2019 approved	Site-specific Cys
Trodelyv®	sacituzumab govitecan	2020 approved	Site-specific Cys
Blenrep®	belantamab mafodotin	2020 approved	Random Cys

このような背景から筆者は、MC-VC-MMAE を **payload** としてランダムに付加したシステイン型の ADC に対し、第 1 章で議論したような分析法の比較を行えば、市場ニーズに応えた分析戦略を提供できると考えた。システイン型の ADC の合成は、抗体に 4 本ある分子内ジスルフィド結合を部分的に TCEP で還元する工程及び、マレイミド基を有する **payload** とコンジュゲーションする工程の二つのステップで行われる (Fig. 24)^{59, 60}。TCEP で還元されて生じるチオールは反応性が高く、ほぼ定量的に **payload** のマレイミド基と反応することが知られているため⁶¹、適切な DAR を得るためには TCEP 還元工程を制御する必要がある。しかし、TCEP 還元の DOE について議論された論文は限定されており^{30, 62}、異なる TCEP 量から得られる ADC の DAR を比較した報告はこれまでなかった。そこで、本章では第 1 章で議論した分析法の比較検討を、システイン型の ADC へと応用し、DAR 解析法の比較評価を行った。

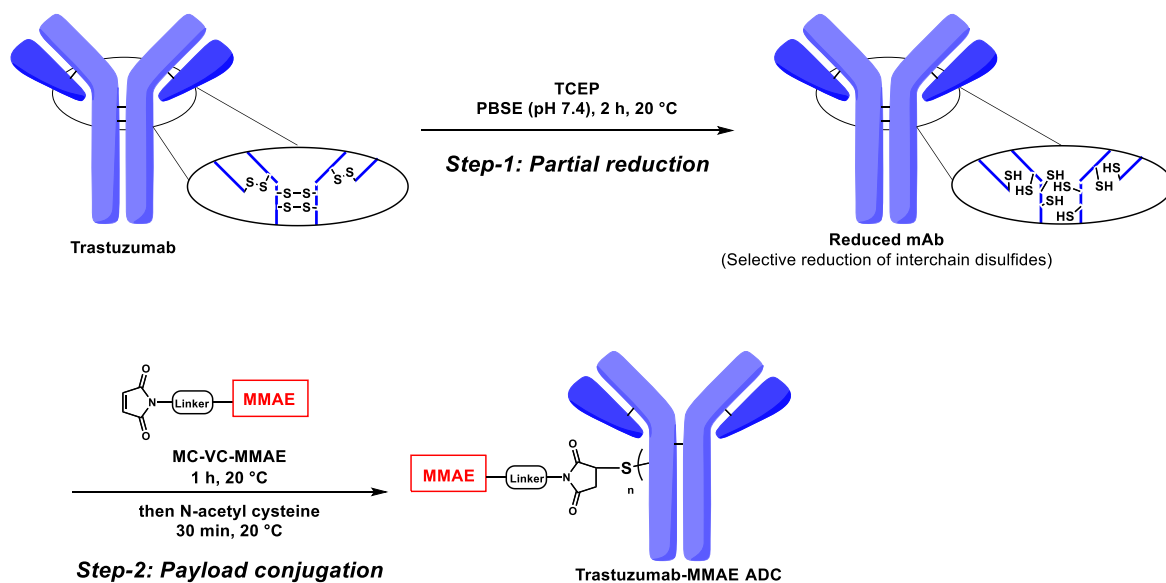


Fig. 24 Overview of the cysteine-based conjugation

第 1 章で用いた位置選択的な ADC と比べ、システイン型の ADC は不均一性が高く、それゆえ正確な DAR 解析が難しいと考えられた。特に、第 1 章の考察で述べた通り、LC/QTOF-MS 測定によって不均一性の高い ADC の正確な DAR を求めることは困難であろうと推測した。更に、第 1 章で正確な DAR を与えた native SEC/QTOF-MS であっても、不均一性の高い ADC に使用するためには、イオン化条件を含めた MS 条件の設定の精査や、試料前処理の最適化が必要であろうと考えた。従って、残る 3 種類の分析法である HIC/UV, reduced RPLC/UV, Ellman's assay による DAR 解析をシステイン型の ADC の同一バッチに対して行い、得られた DAR を比較することにした。さらに第 2 章で議論した ADC の GMP 戦略をシステイン型の ADC に応用し、GLP 試験に用いる 400 mg の ADC を合成した。このスケールアップによって得られた ADC の DAR も同様に 3 種類の分析法を用いて解析し、システイン型の ADC 合成の堅牢性についても議論した。

3-2 材料及び方法

3-2-1 試薬

第2章(2-2-1)記載に従い、試薬を準備した。

3-2-2 ADC 合成

TCEP 当量数の比較検討用 ADC の合成方法

Trastuzumab の PBSE 溶液 (5 mg/mL, 0.2 mL, pH 7.4) に 5 つの異なる当量数の TCEP (2.15 eq., 2.35 eq., 2.55 eq., 2.75 eq., 2.95 eq.) を加え, 20°C で 2.5 時間攪拌した。得られた反応混合物に DMA (8% v/v) 及び MC-VC-MMAE の 10 mM DMA 溶液 (7.0 eq.) を順次添加し, 20°C で 1 時間穏やかに攪拌した。反応混合物に過剰量の *N*-アセチルシステインを加え, 25°C で 15 分間攪拌し, 余剰の MC-VC-MMAE をクエンチした。最終混合物を, NAP-5 脱塩カラムを用いて精製し, formulation buffer (20 mM histidine, 5wt%トレハロース添加, pH 5.2) で溶出し, ADC を得た。

GLP サンプルの合成方法

Trastuzumab の PBSE 溶液 (5 mg/mL, 55 mL, pH 7.4) に TCEP (2.35 eq.) を加え, 20°C で 2.5 時間攪拌した。得られた反応混合物に DMA (6% v/v) 及び MC-VC-MMAE の 10 mM DMA 溶液 (6.0 eq.) を順次添加し, 20°C で 1 時間穏やかに攪拌した。反応混合物に *N*-アセチルシステイン (25 eq) を加え, 25°C で 35 分間攪拌し, 余剰の MC-VC-MMAE をクエンチした。最終混合物を, Centripure P100 脱塩カラムを用いて精製し, formulation buffer (20 mM histidine, 5wt%トレハロース添加, pH 5.2) で溶出し, GLP 試験に用いる ADC を得た。

3-2-3 分析方法

使用機器・DAR 解析方法

IPC のための前処理

第 2 章 (2-2-3) 記載の条件を用いた.

Ellman's assay

Ellman's assay は第 1 章 (1-2-3) 記載の条件を用いた.

Reduced RPLC/UV 分析

Reduced RPLC/UV 分析は第 1 章 (1-2-3) 記載の条件を用いた.

HIC/UV 分析

HIC/UV 分析は第 1 章 (1-2-3) 記載の Condition A の条件を用いた.

3-3 結果

3-3-1 少量スケールでの DAR 比較

5つの異なる TCEP 当量 (2.15 eq., 2.35 eq., 2.55 eq., 2.75 eq., 2.95 eq.) による還元を行い、システイン型の ADC を 1 mg スケールにて合成した後、それぞれの DAR を 3つの分析法を使って求めた。第一工程の還元が完了した後、この反応段階の IPC 分析を Ellman's assay で行い、抗体あたりの遊離チオール数 ([SH]/[mAb]) を決定した。Ellman's assay から得られた抗体あたりの遊離チオールの数に基づいて、DAR を計算した (Table 19, 後述)。続いて、中間体の遊離チオールに payload の MC-VC-MMAE を結合させ、システイン型の ADC を得た。得られた ADC に対し、reduced RPLC/UV 分析及び HIC/UV 分析を実施した。

システイン型の ADC の reduced RPLC/UV 分析は、第 1 章の AJICAP®-ADC とは大きく異なり、複雑なクロマトグラムを与える。抗体は 4本のジスルフィド結合を有し、これらが還元されることで生じるチオール基に payload を結合させると、ADC が合成できる (Fig. 24)。このジスルフィド結合は「重鎖-軽鎖間」に 2本、「重鎖-重鎖」に 2本存在しているが、もともと抗体は左右対称のダイマーであるため、還元反応が完全に進行すると、チオール基を一つ有する軽鎖とチオール基を 3つ有する重鎖が得られる (Fig. 25)。

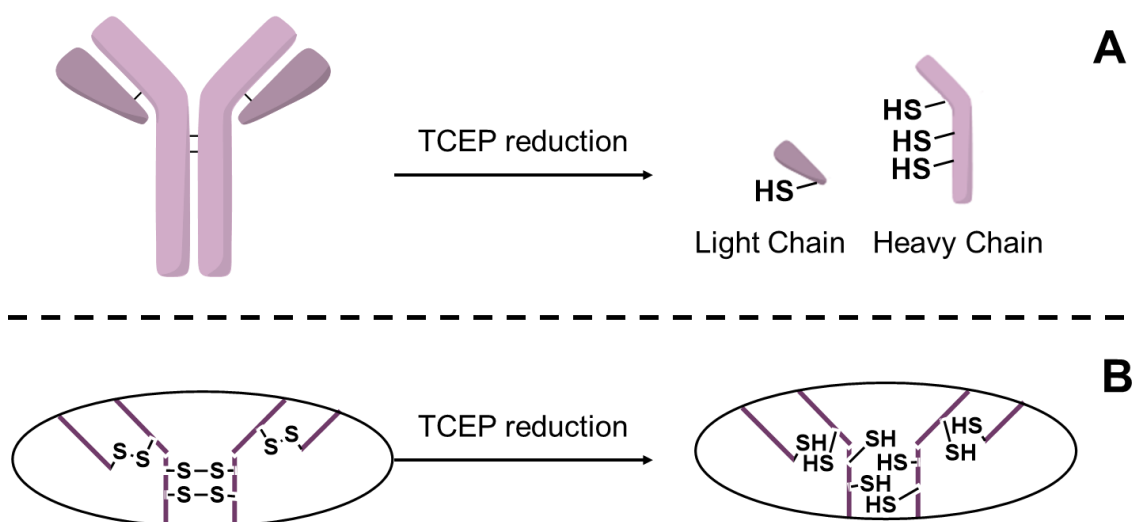


Fig. 25 Illustration of TCEP reduction: A) Reduction of full antibody; B) Reduction of disulfide bonds of antibody.

システイン型の ADC, 特に疎水性の高い MMAE を payload とする ADC は, payload の過剰な付加による医薬品としての品質の低下 (凝集, 体内動態の悪化など) を避けるため, DAR = 4 を目指して合成されるものが多い⁶³⁾. 一般的には, 純粋な DAR = 4 の ADC を得ることは難しく, 抗体のジスルフィド結合を部分的に還元して生じるチオール基の数をできるだけ 4 つに近づかせ, DAR = 4 に近い ADR を合成しているのが現状である. 従って, 合成される ADC は 5 つの DAR 種 (DAR = 0, DAR = 2, DAR = 4, DAR = 6, 及び DAR = 8) の混合物となる. これらの混合物に対する reduced RPLC/UV では, 前処理の DTT 還元によって, ADC を完全にフラグメント化させて分析を実施する. その結果, クロマトグラム上で下記の①と②の 6 つのフラグメント (L0, L1, H0, H1, H2, H3) に由来するピークが出現した (Fig. 26) .

- ① 軽鎖由来のフラグメント
 - 未反応の軽鎖 (L0)
 - 一つの MMAE が付加した軽鎖 (L1)
- ② 重鎖由来のフラグメント
 - 未反応の重鎖 (H0)
 - 一つの MMAE が付加した重鎖 (H1)
 - 二つの MMAE が付加した重鎖 (H2)
 - 3 つの MMAE が付加した重鎖 (H3)

これらの reduced RPLC/UV 分析を実施し, 原料である trastuzumab と比較したところ, TCEP の当量数の増加に伴って未反応の軽鎖 (L0) 及び未反応の重鎖 (H0) のピーク面積が減少し, 代わりに MMAE が付加したフラグメント (L1, H1, H2, H3) のピーク面積が増加することが分かった (Fig. 26A~26C).

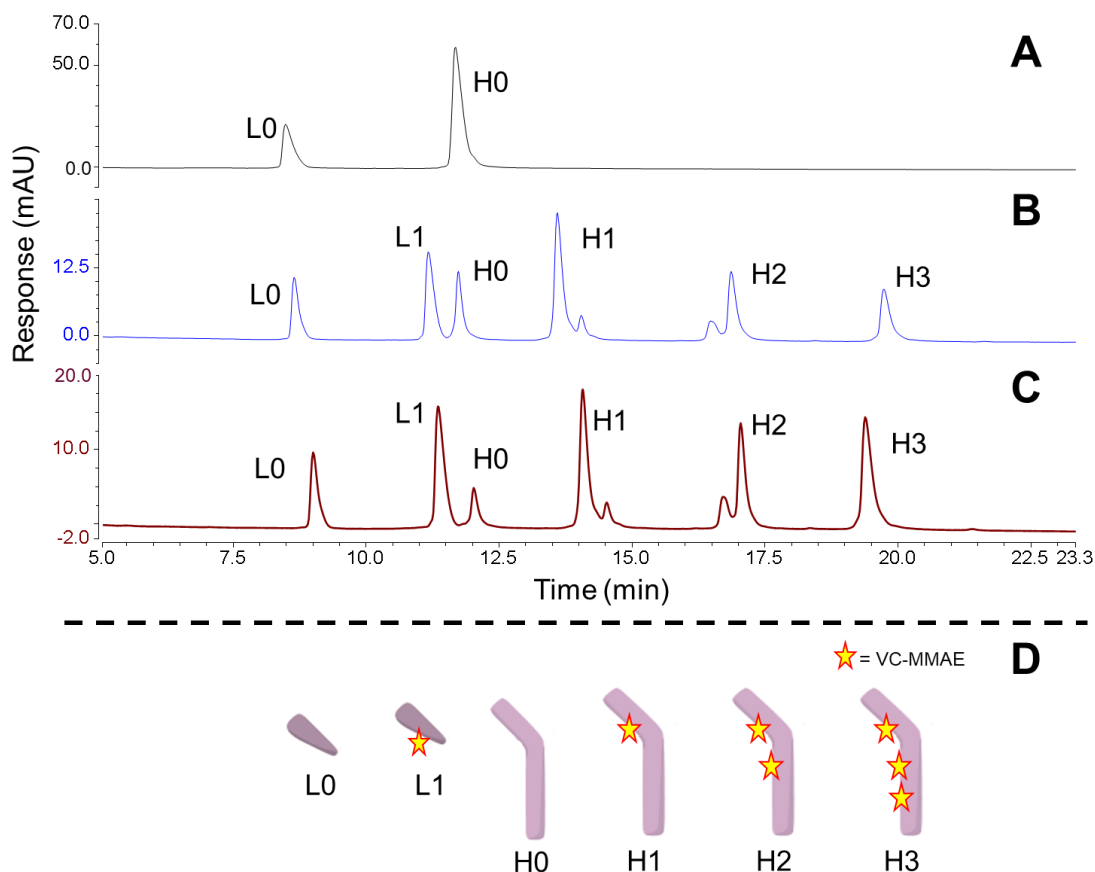


Fig. 26 Representative chromatograms of reduced RPLC/UV analysis: A) Trastuzumab; B) Trastuzumab-MMAE produced by 2.15 eq. TCEP (Entry 1 in **Table 19**); C) Trastuzumab-MMAE produced by 2.95 eq. TCEP (Entry 5 in **Table 19**). D) Abbreviation and illustration for peak assignments

Reduced RPLC/UV による DAR の算出は、第 1 章に記載した Formula 1~3 を用いて行った。まず、軽鎖の payload 修飾率 (DAR (軽鎖)) を UV クロマトグラムのピーク面積比から求め、続いて重鎖の payload 修飾率 (DAR (重鎖)) を同様にして求め、これらを足し合わせて DAR を得た。

具体例として、**Fig. 26** に示したクロマトグラムから、各フラグメントに対応するピーク面積比を求め、DAR を算出した手順を示す (**Table 17**)。なお、ピークの面積比は、L0 と L1 のピーク面積の和、及び H0-H3 のピーク面積の和を、それぞれ 1.00 として求めた。

Table 17 Summary of peak area in reduced RPLC/UV analysis

	Lowest DAR ADC	Highest DAR ADC
TCEP equivalent	2.15 eq.	2.95 eq.
Unconjugated Light Chain (L0)	0.422	0.342
Light Chain + MMAE (L1)	0.578	0.658
Unconjugated Heavy Chain (H0)	0.186	0.0828
Heavy Chain + MMAE (H1)	0.431	0.333
Heavy Chain + 2 MMAEs (H2)	0.238	0.282
Heavy Chain + 3 MMAEs (H3)	0.145	0.302
DAR	3.8	4.9

TCEP を 2.15 当量用いて合成した ADC の DAR は次のように求めた。

Formula 1 より,

$$\text{DAR (軽鎖)} : 1.16 = 2 \times (0 \times 0.422 + 1 \times 0.578)$$

Formula 2 より,

$$\text{DAR (重鎖)} : 2.68 = 2 \times (0 \times 0.186 + 1 \times 0.431 + 2 \times 0.238 + 3 \times 0.145)$$

Formula 3 より,

$$\text{DAR: } \mathbf{3.84} = 1.16 + 2.68$$

同様に, TCEP を 2.95 当量用いて合成した ADC の DAR を算出したところ, 4.9 となった。

Formula 1 より,

$$\text{DAR (軽鎖)} : 1.31 = 2 \times (0 \times 0.342 + 1 \times 0.658)$$

Formula 2 より,

$$\text{DAR (重鎖)} : 3.61 = 2 \times (0 \times 0.0828 + 1 \times 0.333 + 2 \times 0.282 + 3 \times 0.302)$$

Formula 3 より,

$$\text{DAR: } \mathbf{4.92} = 1.31 + 3.61$$

続いて、HIC/UV 分析を実施した (Fig. 27) . システイン型の ADC の HIC/UV では、AJICAP®-ADC と同様に、5 つの DAR 種 (DAR = 0, DAR = 2, DAR = 4, DAR = 6, 及び DAR = 8) の、クロマトグラム上でのベースライン分離を達成した。また、TCEP 当量数を増加させると、DAR = 0 と DAR = 2 の ADC のピーク面積比が減少し、一方、DAR = 6 と DAR = 8 の ADC のピーク面積比が増加した。

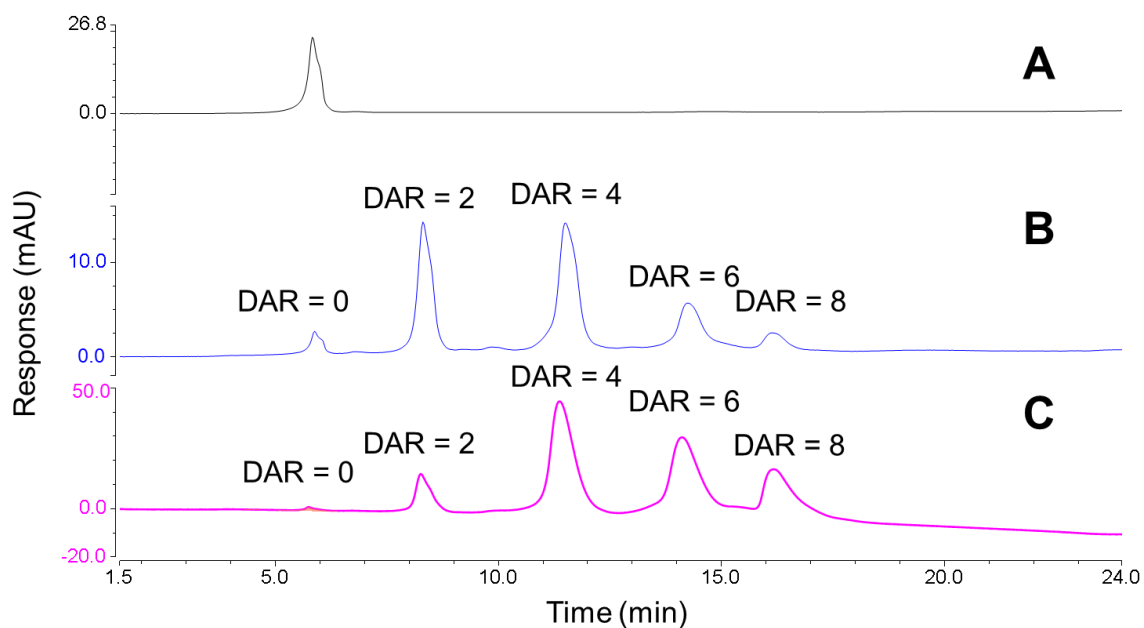


Fig. 27 Representative chromatograms of HIC/UV analysis: A) Trastuzumab; B) Trastuzumab-MMAE produced by 2.15 eq. TCEP (Entry 1 in Table 19); C) Trastuzumab-MMAE produced by 2.95 eq. TCEP (Entry 5 in Table 19).

Fig. 27 のクロマトグラムで分離された ADC のピーク面積比 (5 つのピークの面積の和を 1.00) を **Table 18** に示す。

Table 18 Summary of each peak area ratio in HIC/UV analysis

	Lowest DAR ADC	Highest DAR ADC
TCEP equivalent	2.15 eq.	2.95 eq.
DAR = 0	0.0541	0.0092
DAR = 2	0.298	0.0898
DAR = 4	0.394	0.351
DAR = 6	0.195	0.330
DAR = 8	0.0594	0.220
DAR	3.8	5.3

DAR の算出は、システイン型の ADC の夫々の DAR 種のピーク面積比を用いる下記の式に従って行った (Formula 5).

$$\text{DAR} = 2 \times A^* + 4 \times B^* + 6 \times C^* + 8 \times D^* \quad (\text{Formula 5})$$

A*: DAR = 2 のピーク面積比

B*: DAR = 4 のピーク面積比

C*: DAR = 6 のピーク面積比

D*: DAR = 8 のピーク面積比

TCEP を 2.15 当量用いて合成した ADC の DAR は、3.8 となった。

Formula 5 より、

$$\text{DAR: } 3.82 = 2 \times 0.298 + 4 \times 0.394 + 6 \times 0.195 + 8 \times 0.0594$$

TCEP を 2.95 当量用いて合成した ADC の DAR は、5.3 となった。

Formula 5 より、

$$\text{DAR: } 5.32 = 2 \times 0.0898 + 4 \times 0.351 + 6 \times 0.330 + 8 \times 0.220$$

HIC/UV 及び reduced RPLC/UV のクロマトグラムから得られた DAR を示す (Table 19) . HIC/UV は、5 つの DAR 種 (DAR = 0, DAR = 2, DAR = 4, DAR = 6, 及び DAR = 8) を相互に分離し、これらの結果から平均 DAR を算出できた。Reduced RPLC/UV 分析では、フラグメント化された ADC の 6 つのピークが良好に分離され、DAR を求めることができた。Ellman's assay によって求めた抗体当

たりの遊離チオールは、HIC/UV 及び reduced RPLC/UV で求めた DAR と同様の結果を示した。

Table 19 Summary of three different analyses

Entry	TCEP equivalent	DAR by reduced RPLC/UV	DAR by HIC/UV	Free thiol per antibody by Ellman's assay*
1	2.15	3.7	3.9	3.8
2	2.35	4.1	4.4	4.4
3	2.55	4.4	4.8	4.5
4	2.75	4.8	5.0	5.1
5	2.95	4.9	5.3	5.3

* assuming DAR based on reduced antibody intermediate analysis

3-3-2 GLP 用サンプルの DAR 比較

最後に、GLP 試験で使用するための 400 mg の ADC を、第 2 章に示した GMP 戦略に基づいて合成した。Table 19 に記載した TCEP の当量検討の結果を利用し、システイン型の ADC を数百ミリグラムスケールで合成することを目的とした。得られた ADC を Centripure P100 脱塩カラムを用いて精製し、DAR 解析をまとめた試験証明書を作成した (Table 20)。また、収率は 92.1%であった。

Table 20 Certificate of testing for final ADC material

Target ADC	Trastuzumab-MMAE
DAR by HIC	4.9
DAR by reduced RPLC	4.4
Yield, %	92.1%

HIC/UV 分析のクロマトグラムを **Fig. 28** に示す. 5 つの DAR 種 (DAR = 0, DAR = 2, DAR = 4, DAR = 6, 及び DAR = 8) は, クロマトグラム上でベースライン分離された.

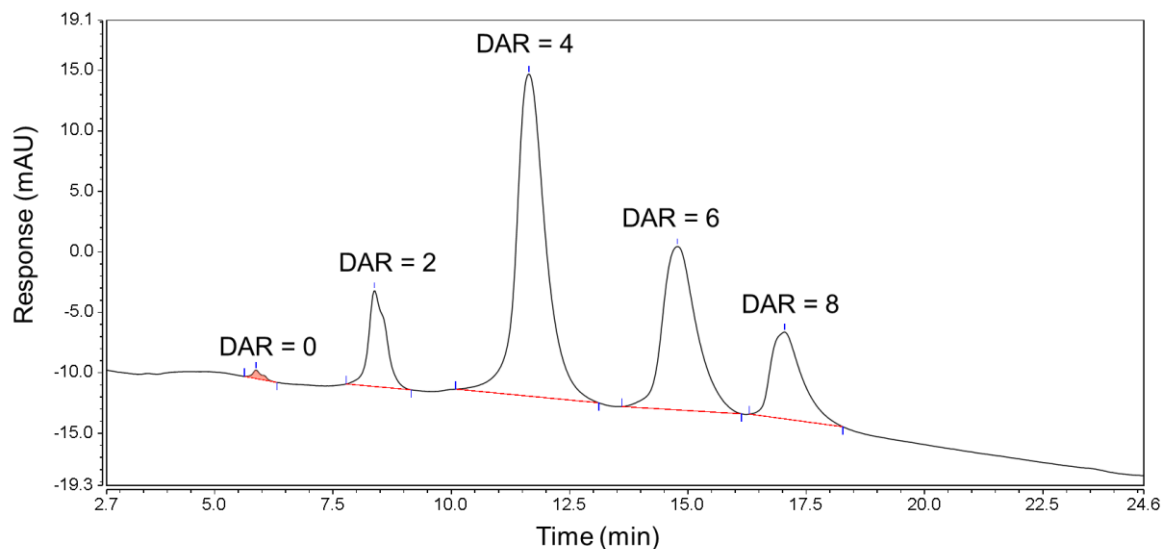


Fig. 28 HIC/UV of trastuzumab-MMAE

続いて reduced RPLC/UV のクロマトグラムを **Fig. 29** に示す. 本法では, 前項に示した通り, 6 つのピーク (未反応の軽鎖 (L0), MC-VC-MMAE が一つ付加した軽鎖 (L1), 未反応の重鎖 (H0), MC-VC-MMAE が一つ付加した重鎖 (H1), MC-VC-MMAE が二つ付加した重鎖 (H2), 及び MC-VC-MMAE が 3 つ付加した重鎖 (H3)) が得られた.

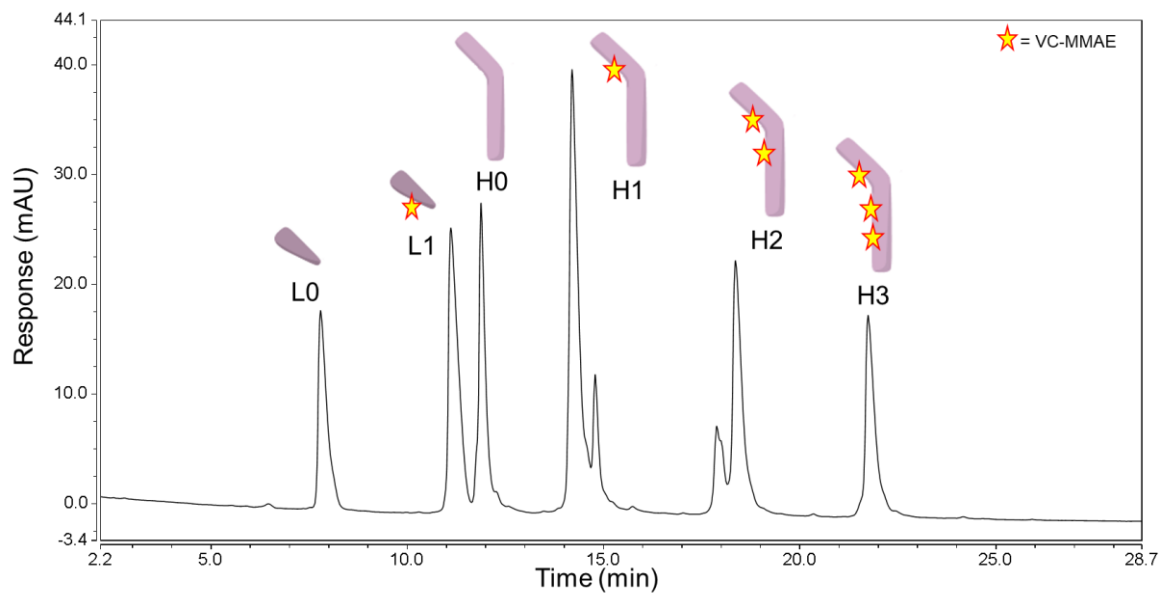


Fig. 29 Reduced RPLC/UV of trastuzumab-MMAE

Table 21 に、Fig. 28 と Fig. 29 のクロマトグラムから得られたピーク面積比を示す。Fig. 28 のクロマトグラム (HIC/UV) からの DAR の算出には Formula 5 を、Fig. 29 のクロマトグラム (reduced RPLC/UV) からの DAR の算出には Formula 1~3 をそれぞれ用いた。

Table 21 DARs of trastuzumab-MMAE as measured by two different Methods.

	reduced RPLC/UV	HIC/UV
DAR = 0	-	0.0043
DAR = 2	-	0.0848
DAR = 4	-	0.486
DAR = 6	-	0.286
DAR = 8		0.139
Light Chain	0.355	-
LC+MMAE ^{a)}	0.645	-
Heavy Chain	0.127	-
HC+MMAE ^{b)}	0.396	-
HC+2 MMAEs ^{c)}	0.259	-
HC+3 MMAEs ^{d)}	0.218	
DAR	4.4	4.9

- a) LC+MMAE: light chain conjugated with 1 MMAE
b) HC+MMAE: heavy chain conjugated with 1 MMAE
c) HC+2 MMAEs: heavy chain conjugated with 2 MMAEs
d) HC+3 MMAEs: heavy chain conjugated with 3 MMAEs

3-4 考察

Table 19 に示したように、システイン型の ADC の DAR の値は、3 種類の分析法で若干の違いが見られた。この傾向は、第 1 章の未精製の AJICAP®-ADC の結果 (**Table 9**) と同様であった。システイン型の ADC は構造が複雑であるため、適用可能な分析法が限定される。例えば、第 1 章で用いた HIC/UV の Condition B (IPA を用いず、塩濃度を高めた溶離液を使用する条件) では、ピーク分離が不十分で、システイン型の ADC には適用できなかった。HIC は、溶離液中に高濃度かつ揮発性の低い塩を必要とするため、ピーク形状を高幅化させることが知られている。今回用いた Condition A では、IPA の使用によってピーク形状を整えることができたと考えられる。IPA は、水系の溶離液に溶解性が高い有機溶媒であり、ADC を含むタンパク質と競合してカラム充填剤との相互作用を示す^{64, 65)}。また、溶離液の表面張力を弱める働きもあるため⁶⁶⁾、IPA を適切に添加すると HIC のピーク形状をシャープなものに整えることができる場合がある。添加量によっては、ピークが重なり合うことで高幅化してしまうこともあり、測定する ADC の疎水性、等電点などを勘案し、適切な溶離液条件を設定する必要がある。

Reduced RPLC/UV は、第 1 章の AJICAP®-ADC と同様に、HIC/UV の結果より少し低めの DAR を与えた。今回合成したシステイン型の ADC は、抗体が trastuzumab であり、payload が MC-VC-MMAE であるため、抗体も payload も AJICAP®-ADC と同じものである。従って、AJICAP®-ADC と同様に LC の流路内で payload の脱落が進行し、DAR が低くなった可能性を考えている。また、RPLC/UV のクロマトグラム (**Fig. 26B, 26C, Fig. 29**) 上には、メインピークに加えて複数のピーク (例えば、**Fig. 29** の 15.0 分付近や 18.0 分付近) が出現した。これらは、MC-VC-MMAE がコンジュゲーションしている位置異性体だと考えられる。システイン型の ADC は抗体に 4 本ある鎖間ジスルフィド結合をランダムに還元し、MC-VC-MMAE とコンジュゲーションさせることで合成している。すなわち、切断されるジスルフィド結合の位置によって位置異性体が生じる。また、DAR も 0, 2, 4, 6, 8 の混合物となることから、理論上は 12 個のコンジュゲートによる混合物として、システイン型の ADC は存在している (**Fig. 30**)⁶⁷⁾。このシステイン型の ADC が有する不均一性は、AJICAP®-ADC のような位置選択的 ADC に適用できた多くの分析法による比較を困難にしている^{5, 6, 68)}。この不均一性を低減するために、酵素的に ADC の糖鎖を除去することで糖鎖由来の不均一性を除去したのちに、質量分析を行うことが報告されている⁶⁸⁾。今後、PNGaseF などの酵素でシス

テイン型の ADC の糖鎖除去を行い、MS のイオン化条件（キャピラリー電圧や MS チャンバーの温度など）を糖鎖除去抗体に合わせて適切に調整し、MS 測定を実施する予定である。

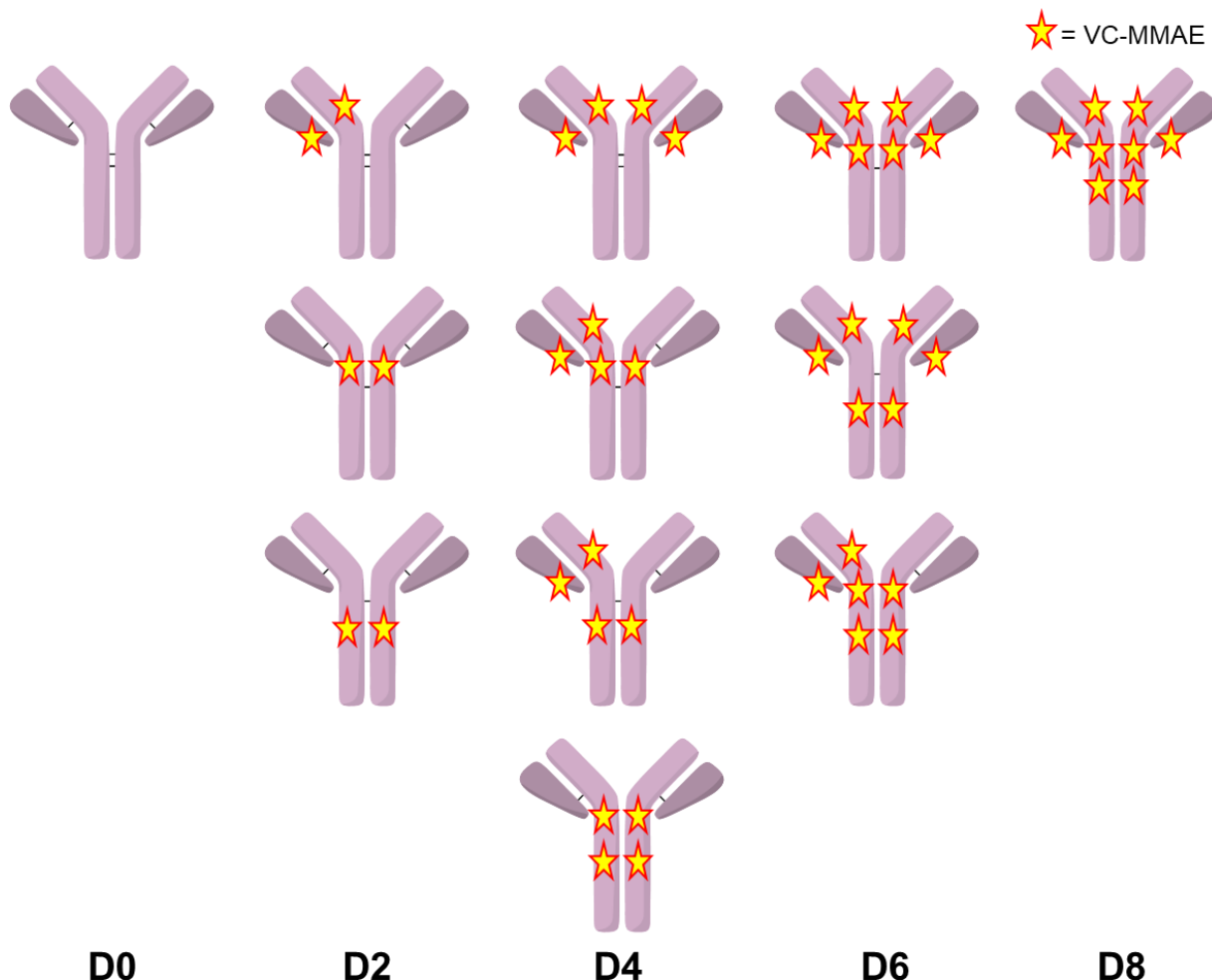


Fig. 30 Proposed ADC species after cysteine conjugation

GLP 試験用のシステイン型の ADC は、TCEP を 2.35 当量用いてスケールアップ合成を行った。この ADC の DAR は、1 mg スケールで合成した初期検討品 (Table 19, Entry 2) よりも高くなった。初期検討の 1 mg スケールでの合成では、TCEP を 2.35 当量用いて DAR = 4.4 (HIC/UV) の ADC を得たのに対し、400 mg スケールでは、DAR = 4.9 (HIC/UV) であった。これは、攪拌効率などのスケールギャップに起因するものと考えている。一般的に、ADC 合成を含むコンジュゲーションの初期検討では、マイクロチューブを反応系として利用し、シェイカーによる攪拌

を行っている (Fig. 31)⁵⁶⁾. しかし, 100 mg を超える ADC の合成には, 製造工程と同様の攪拌子を備えたガラス製の反応容器がしばしば使用され, 今回のスケールアップでもガラス製の容器を用いた. この攪拌効率の違いは, スケールアップ品の DAR を増加させた可能性がある. しかし, HIC/UV の結果から算出された DAR は, TCEP の当量から算出される理論値 (4.7) より高くなるなど, 単純なスケールギャップ以外のファクターも考えられるため, 今後は他のシステム型の ADC を用いて, 更なる分析比較検討が必要であると考えられる.

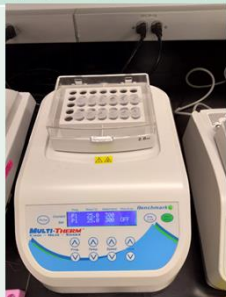

	Feasibility stage	Process Development
Reactor	Shaker with Eppendorf tube (μg-mg scale)	Glass reactor (g scale)
Appearance		
Mixing method	Shaking	Stirring

Fig. 31 Comparison of mixing methods for ADC preparation

3-5 小括

第1章で確立した分析法を用いて、多くの市販のADCと同じ分子フォーマットであるシステイン型のADCのDAR解析を行い、分析法間の違いについて議論した。IPAを加えた溶離液条件のHIC/UV, reduced RPLC/UV及びEllman's assayは、システイン型のADCのDAR解析に適用できることが分かった。また、これらの3種の分析法で得られたDARと、還元剤の当量数は相関していることが確認できた。次に、これらの分析法を400 mgスケールのシステイン型のADCの分析に用いたところ、このスケールアップ品は想定よりも高いDARを与えた。おそらく攪拌効率の違いに起因すると考えられる、システイン型のADC合成のスケールギャップの発生が示唆された。

総括

近年のモダリティ分野で注目されている ADC であるが、その分析法は課題が多く、特にその薬効と安全性に最も関与する特性の一つである、DAR を解析するためのガイダンスとなる研究の報告は、極めて少ない。また、ADC の合成スケールを製造レベルまで増加させた際の、IPC に関する情報は不足しており、企業の研究者にとっては新たに参入するときの障壁となっていた。そのような背景から、本研究では同一バッチの位置選択的 ADC と、その合成中間体を測定対象として用い、DAR 解析に適用可能な分析法の比較研究を行い、それぞれの分析法の特徴について議論した。更に、その議論の結果を基に、位置選択的 ADC 合成のスケールアップと IPC 構築、位置選択的ではないシステイン型 ADC の DAR 解析へと展開した。本論文の第 1 章から第 3 章で述べた結果を以下に総括する。

第 1 章

新規位置選択的 ADC 合成法 (AJICAP®法) を利用し、得られた位置選択的 ADC を測定対象 (モデル化合物) として、分析法の比較評価を行った。未精製及び分取 HPLC 精製された AJICAP®-ADC の DAR は、それぞれ DAR = 1.6 及び DAR = 2.0 であった。未精製の ADC の分析において、用いる LC/QTOF-MS 法の LC の違いによって DAR の結果が異なることが分かった。その原因として、溶離液中の揮発性塩や酸が ADC のイオン化に与える影響の違いと、ADC に含まれる不純物の影響の違いによるものである可能性が示唆された。また、LC 条件を変えた 3 種類の LC/QTOF-MS を比較評価し、それぞれの特性から推奨の用途を見出すことができた。

第 2 章

第 2 章では AJICAP®法による ADC 製造を見据えて、製造現場と同様の反応系と精製装置を用いたプロセス開発を行い、GMP 戦略に基づき IPC に適用可能な分析法を検討した。第 1 章で用いた HIC/UV, reduced RPLC/UV, Ellman's assay を工

程内分析に用いて結果を比較し、製造現場において各合成工程の中間体の DAR を求めるための最適な分析法を見出すことができた。

第 3 章

第 1 章の結果から、不均一性の高い ADC にも適用できると考えられた分析法の HIC/UV, reduced RPLC/UV, Ellman's assay を、市販の多くの ADC と同じ分子フォーマットであるシステイン型の ADC の DAR 解析へと応用した。見込み通り、HIC/UV, reduced RPLC/UV 及び Ellman's assay は、何れもシステイン型の ADC の DAR 解析に有効であることが示された。しかし、より正確な DAR を得るためには、3 つの分析法を組み合わせることで総合的に判断することが推奨された。また、400 mg スケールの合成を行うと、スケールギャップが生じた。

このように本研究は、ADC の DAR 解析の分析法を比較検討し、それらの特徴について考察し、議論を行ったものである。第 1 章で述べた通り、LC/QTOF-MS は不均一性の高い ADC へ適用して正確な DAR を得ることが難しい。しかし、理論的には DAR 解析と分子量の同定を同時に行うことができるため、大変魅力的な分析法である。例えば、LC 条件を最適化できれば、装置構成を HIC/UV/QTOF-MS とし、UV クロマトグラムから DAR を算出し、且つ TIC から分子量に関する情報を得ることが可能になると考えている。そのような試みに関する既報は幾つかあり、例えば HIC/QTOF-MS による抗体分析の報告が、Wei らによって 2019 年に行われており、今後は ADC への応用が期待される⁶⁹⁾。HIC の大きな長所として、ADC を変性させない native 条件で測定できることがあげられる。近年、このような温和な条件での LC/QTOF-MS 測定が注目されており^{22, 70-72)}、著者もカチオンクロマトグラフィーを LC として用いた、native 条件での QTOF-MS 法による DAR 解析を最近報告した⁷³⁾。非変性の温和な条件で、ADC を含む抗体関連の化合物を分析する方法に対するニーズは、今後ますます高くなると予想される。近年、モダリティは複雑化し、抗体に対して payload だけではなく、タンパク質やオリゴ核酸を付加させ、更なる高機能化を狙うことが報告されている^{74, 75)}。そのような複雑な新しい分子の中には、高温条件や有機溶媒に耐えられないものも含まれていると考え

られる。高機能化、複雑化された分子を分析するため、**native** 条件で効率的に分析できる **LC/QTOF-MS** 法の確立は、この分野で強く求められている実感がある。

一方、**reduced RPLC/UV** 法や **HIC/UV** 法に代表される **LC/UV** 法も、依然として有力な分析法である。まず、**LC/QTOF-MS** では測定の高い不均一性の高い **ADC** には、**LC/UV** 法が第一選択である。また、**LC/QTOF-MS** の機器は高価なものであり、**ADC** 分野に新規参入することを考えているアカデミアやベンチャー企業には、研究の立ち上げに要する資金だけでは、購入が難しいと推測される。比較的安価でかつ正確な **DAR** 解析が可能な **LC/UV** 法は、今後も有用な分析法として利用されると考えられる。

このように本論文は、**ADC** 分野の研究者、特に新規参入を目論む産官学の研究者に対して、**DAR** 解析と **ADC** 製造における **IPC** 分析のガイダンスを提供することを目的として、3章にわたる研究を実施した。近年ますます広がりを見せる **ADC** 分野に、多くの異分野の研究者が参画することを期待したい。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、御懇切なる御指導を賜りました東京薬科大学分析化学教室 袴田 秀樹 教授に心から感謝致します。

本論文をまとめるにあたり、御指導を頂きました東京薬科大学 根岸 洋一教授、林 良雄教授、柳田 顕郎教授に感謝致します。

本研究への適切な御助言、御協力を賜りました東京薬科大学 小谷 明 准教授に深く感謝致します。

本研究に関し、終始ご指導とご鞭撻を賜りました恩師である **Brian Alan Mendelsohn** 博士(**Ajinomoto Bio-Pharma Services** 社 director, 現 **Exelixis** 社 senior director) に心より深く感謝いたします。

本研究に関し、有益な御助言と御協力をいただいた **Ajinomoto Bio-Pharma Services** 社 **Zhala Tawfiq** 研究員, **Veronica Robles** 研究員, **Monica Leung** 研究員, **Colin Clancy** 研究員, **Melody Jane Alfonso** 研究員に心より深く感謝いたします。

本研究の第1章の研究に関し、有益な御助言と御協力をいただいた **Phenomenex** 社 **Maria-Christina Malinao** 研究員(現 **TAE Life Sciences** 社 研究員), **James Song** 研究員に心より深く感謝いたします。

本研究に関し、有益な御助言と御討論を賜りました、味の素株式会社、奥住 竜哉 博士, 山田 慧 博士, 新保 和高 博士, 敷田 奈都紀 研究員, 平間 竜介 研究員, 畑田 紀子 研究員, 鈴木 裕美子 研究員ならびに **Ajinomoto Bio-Pharma Services** 社 藤井 友博 博士に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、ご助言をいただいた慶應義塾大学 蛭田勇樹 専任講師に感謝いたします。

また、研究生生活を多大な支援と激励をもって、支えてくれた妻・麻夕香、娘・葉那、息子・航希、陸弥に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) A. T. Lucas, R. Robinson, A. N. Schorzman, J. A. Piscitelli, J. F. Razo, W. C. Zamboni, *Antibodies*, **8**, 3 (2019).
- 2) M. Abdollahpour-Alitappeh, M. Lotfinia, T. Gharibi, J. Mardaneh, B. Farhadhosseinabadi, P. Larki, B. Faghfourian, K. S. Sepehr, K. Abbaszadeh-Goudarzi, G. Abbaszadeh-Goudarzi, B. Johari, M. R. Zali, N. Bagheri, *J. Cell Physiol.*, **234**, 5628–5642 (2019).
- 3) D. Leung, J.M. Wurst, T. Liu, R. M. Martinez, A. Datta-Mannan, Y. Feng, *Antibodies*, **9**, 2 (2020).
- 4) J. R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D. D. Leipold, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S. P. Tsai, M. S. Dennis, Y. Lu, Y. G. Meng, C. Ng, J. Yang, C. C. Lee, E. Duenas, J. Gorrell, V. Katta, A. Kim, K. McDorman, K. Flagella, R. Venook, S. Ross, S. D. Spencer, W. L. Wong, H. B. Lowman, R. Vandlen, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, M. Mallet, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 925–932 (2008).
- 5) A. Beck, V. D’Atri, A. Ehkirch, S. Fekete, O. Hernandez-Alba, R. Gahoual, E. Leize-Wagner, Y. Francois, D. Guillaume, S. Cianfèrani, *Expert. Rev. Proteomics.*, **16**, 337–362 (2019).
- 6) K. Todoroki, T. Yamada, H. Mizuno, T. Toyo’oka, *Anal. Sci.*, **34**, 397–406 (2018).
- 7) A. Cusumano, D. Guillaume, A. Beck, S. Fekete, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **121**, 161–173 (2016).
- 8) M. Rodriguez-Aller, D. Guillaume, A. Beck, S. Fekete, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **118**, 393–403 (2016).
- 9) J. Ouyang, *Methods Mol. Biol.*, **1045**, 275–283 (2013).

- 10) M. Haverick, S. Mengisen, M. Shameem, A. Ambrogelly, *MAbs*, **6**, 852–858 (2014).
- 11) V. D'Atri, S. Fekete, D. Stoll, M. Lauber, A. Beck, D. Guillarme, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, **1080**, 37–41 (2018).
- 12) S. Fekete, I. Molnar, D. Guillarme, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **137**, 60–69 (2017).
- 13) L. Basa, *Methods Mol. Biol.*, **1045**, 285–293 (2013).
- 14) T. Botzanowski, S. Erb, O. Hernandez-Alba, A. Ehkirch, O. Colas, E. Wagner-Rousset, D. Rabuka, A. Beck, P.M. Drake, S. Cianférani, *MAbs*, **9**, 801–811 (2017).
- 15) J. F. Valliere-Douglass, W. A. McFee, O. Salas-Solano, *Anal.Chem.*, **84**, 2843–2849 (2012).
- 16) J. Chen, S. Yin, Y. Wu, J. Ouyang, *Anal. Chem.*, **85**, 1699–1704 (2013).
- 17) S. M. Hengel, R. Sanderson, J. Valliere-Douglass, N. Nicholas, C. Leiske, S. C. Alley, *Anal. Chem.*, **86**, 3420–3425 (2014).
- 18) F. Debaene, A. Boeuf, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. Van Dorsselaer, A. Beck, S. Cianférani, *Anal. Chem.*, **86**, 10674–10683 (2014).
- 19) J. F. Valliere-Douglass, S. M. Hengel, L. Y. Pan, *Mol. Pharm.*, **12**, 1774–1783 (2015).
- 20) T. Botzanowski, S. Erb, O. Hernandez-Alba, A. Ehkirch, O. Colas, E. Wagner-Rousset, D. Rabuka, A. Beck, P. M. Drake, S. Cianférani, *MAbs*, **9**, 801–811 (2017).
- 21) K. J. Pacholarz, P. E. Barran, *EuPA Open Proteomics*, **11**, 23–27 (2016).
- 22) C. Tse-Hong, Y. Yang, Z. Zhang, C. Fu, Q. Zhang, J. D. Williams, M. J. Wirth, *Anal. Chem.*, **91**, 2805–2812 (2019).

- 23) M. Källsten, R. Hartmann, K. Artemenko, S. B. Lind, F. Lehmann, B. Bergquist, *Analyst*, **143**, 5487–5496 (2018).
- 24) F. Debaene, A. Boeuf, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. Van Dorsselaer, A. Beck, S. Cianféroni, *Anal. Chem.*, **86**, 10674–10683 (2014).
- 25) L. N. Le, J. M. R. Moore, J. Ouyang, X. Chen, M. D. H. Nguyen, W. J. Galush, *Anal. Chem.*, **84**, 7479–7486 (2012).
- 26) D. Firth, L. Bell, M. Squires, S. Estdale, C. McKee, *Anal. Biochem.*, **485**, 34–42 (2015).
- 27) M. R. Gordon, M. Canakci, L. Li, J. Zhuang, B. Osborne, S. Thayumanavan, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 2198–2215 (2015).
- 28) K. C. Nicolaou, S. Rigol, *Acc. Chem. Res.*, **52**, 127–139 (2019).
- 29) Y. Xu, G. Jiang, C. Tran, X. Li, T. H. Heibeck, M. R. Masikat, Q. Cai, A. R. Steiner, A. K. Sato, T. J. Hallam, G. Yin, *Org. Process Res. Dev.*, **20**, 1034–1043 (2016).
- 30) D. V. Nadkarni, Q. Jiang, O. Friese, N. Bazhina, H. Meng, J. Guo, R. Kutlik, J. Borgmeyer, *Org. Process Res. Dev.*, **22**, 286–295 (2018).
- 31) Y. Matsuda, B. A. Mendelsohn, *Expert. Opin. Biol. Ther.*, *in press*.
- 32) K. Tsuchikama, Z. An, *Protein&Cell*, **9**, 33–46 (2018).
- 33) Q. Zhou *Biomedicines*, **5**, 64 (2017).
- 34) K. Yamada, Y. Ito, *ChemBioChem*, **20**, 2729–2737 (2019).
- 35) K. Yamada, N. Shikida, K. Shimbo, Y. Ito, Z. Khedri, Y. Matsuda, B. A. Mendelsohn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **58**, 5592–5597 (2019).
- 36) Y. Matsuda, M-C. Malinao, V. Robles, J. Song, K. Yamada, B. A. Mendelsohn, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1140, 121981 (2020).

- 37) Y. Matsuda, V. Robles, M-C. Malinao, J. Song, B. A. Mendelsohn, *Anal. Chem.*, **91**, 12724–12732 (2019).
- 38) Y. Matsuda, C. Clancy, Z. Tawfiq, V. Robles, B. A. Mendelsohn, *ACS Omega*, **4**, 20564–20570 (2019).
- 39) Z. Tawfiq, Y. Matsuda, M.J. Alfonso, V. Robles, M. Leung, B. A. Mendelsohn *Anal. Sci.*, **36**, 871–875 (2020).
- 40) S. Kishimoto, Y. Nakashimada, R. Yokota, T. Hatanaka, M. Adachi, Y. Ito, *Bioconjugate. Chem.*, **30**, 698–702 (2019).
- 41) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70–77 (1959).
- 42) C. L. Becker, R. J. Duffy, J. Gandarilla, S.M. Richter, *Methods Mol. Biol.*, **2078**, 273–290 (2019).
- 43) E. Müller, M. Sevilla, P. Endres, *J. Sep. Sci.*, **43**, 2255–2263 (2020).
- 44) K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace, M. M. C. Sun, J. Lenox, J. C. G. Cerveny, K. M. Kissler, S. X. Bernhardt, A. K. Kopcha, R. F. Zabinski, D. L. Meyer, J. A. Francisco, *Clin. Cancer. Res.*, **10**, 7063–7070 (2004).
- 45) Y. Matsuda, M. Leung, T. Okuzumi, B. A. Mendelsohn, *Antibodies*, **9**, 16 (2020).
- 46) J. Marcoux, T. Champion, O. Colas, E. Wagner-Rousset, N. Corvaia, A. V. Dorselaer, A. Beck, S. Cianférani, *Protein Sci.*, **24**, 1210–1223 (2015).
- 47) V. D’Atri, R. Pell, A. Clarke, D. Guillarme, S. Fekete, *J. Chromatogra. A.*, **1586**, 149–153 (2019).
- 48) D. J. Cline, S. E. Redding, S. G. Brohawn, J. N. Psathas, J. P. Schneider, C. Thorpe, *Biochemistry*, **43**, 15195–15203 (2004).
- 49) B. A. Mendelsohn, S. D. Barnscher, J. T. Snyder, Z. An, J. M. Dodd, J. Dugal-Tessier, *Bioconjugate Chem.*, **28**, 371–381 (2017).

- 50) Y. Matsuda, K. Yamada, T. Okuzumi, B. A. Mendelsohn, *Org. Proc. Res. Dev.*, **23**, 2647–2654 (2019).
- 51) Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies. Title 21 CFR Part 58. February 18 (2004).
- 52) Pharmaceutical Development. ICH Harmonized Tripartite Guideline Q8 (R2). Current Step 4 version, August (2009).
- 53) cGMP in Manufacturing, Process, Packing, or Holding of Drugs and Finished Pharmaceuticals. Title 21 CFR Parts 210 & 211.
- 54) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH Harmonized Tripartite Guideline Q2 (R1). Current Step 4 version, November (2005).
- 55) Electronic Records; Electronic Signatures. *Title 21 CFR Part 11*.
- 56) B. Stump, J. Steinmann, *Methods Mol. Biol.*, **1045**, 235–248 (2013).
- 57) US Food and Drug administration (FDA), Guidance for Industry- Monoclonal Antibodies Used as Reagents in Drug Manufacturing <https://www.fda.gov/media/72408/download>.
- 58) US Food and Drug administration (FDA), Assay Development and Validation for Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products - Guidance for Industry <https://www.fda.gov/media/77796/download>.
- 59) S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cervený, D. F. Chace, R. L. DeBlanc, R. P. Gearing, T. D. Bovee, C. B. Siegall, J. A. Francisco, A. F. Wahl, D. L. Meyer, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 778–784 (2003).
- 60) Z. Tawfiq, N. C. Caiazza, S. Kambourakis, Y. Matsuda, B. Griffin, J. C. Lippmeier, B. A. Mendelsohn, *ACS Omega*, **5**, 7193–7200 (2020).
- 61) G. T. Hermanson, “Bioconjugate Techniques”, 3rd ed., Elsevier, London, 240–246 (2013).

- 62) Y. Matsuda, Z. Tawfiq, M. Leung, B. A. Mendelsohn, *ChemistrySelect*, **5**, 8435–8439 (2020).
- 63) T. Satomaa, H. Pynnönen, A. Vilkmann, T. Kotiranta, V. Pitkänen, A. Heiskanen, B. Herpers, L. S. Price, J. Helin, J. Saarinen, *Antibodies*, **7**, 15 (2018).
- 64) M. R. Rodriguez, D. Guillarme, A. Beck, S. Fekete, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **118**, 393–403 (2016).
- 65) S. Fekete, J-L. Veuthey, A. Beck, D. Guillarme, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **130**, 3–18 (2016).
- 66) D. Ekeberg, K. S. Gretland, J. Gustafsson, S. M. Braten, G. E. Fredheim, *Anal. Chim. Acta*, **565**, 121–128 (2006).
- 67) P. D. Senter, E. L. Sievers, *Nat. Biotechnol.*, **30**, 631–637 (2012).
- 68) M. Källsten, M. Pijnappel, R. Hartmann, F. Lehmann, L. Kovac, S. B. Lind, J. Bergquist, *Anal. Bioanal. Chem.*, **41**, 2569–2576 (2019).
- 69) B. Wei, G. Han, J. Tang, W. Sandoval, Y. T. Zhang, *Anal. Chem.*, **91**, 15360–15364 (2019).
- 70) A. O. Bailey, G. Han, W. Phung, P. Gazis, J. Sutton, J. L. Josephs, W. Sandoval, *MAbs*, **10**, 1214–1225 (2018).
- 71) Y. Leblanc, V. Faid, M. A. Lauber, Q. Wang, N. Bihoreau, G. Chevreux, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1133**, 121814 (2019).
- 72) F. Fussl, A. Trappe, K. Cook, K. Scheffler, O. Fitzgerald, J. Bones, *MAbs*, **11**, 116–128 (2019).
- 73) Y. Matsuda, M. Kliman, B. A. Mendelsohn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **31**, 1706–1712 (2020).
- 74) W. R. Strohl, *BioDrugs*, **29**, 215–239 (2015).

75) I. Dovgan, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.*, **30**, 2483–2501 (2019).

研究結果の掲載誌

1. Y. Matsuda, V. Robles, M-C. Malinao, J. Song, B. A. Mendelsohn, *Anal. Chem.*, **91**, 12724–12732 (2019).
2. Y. Matsuda, C. Clancy, Z. Tawfiq, V. Robles, B. A. Mendelsohn, *ACS Omega*, **4**, 20564–20570 (2019).
3. Z. Tawfiq[†], Y. Matsuda[†], M. J. Alfonso, V. Robles, M. Leung, B. A. Mendelsohn, *Anal. Sci.*, **36**, 871–875 (2020).

[†] These authors contributed equally to this work