

2023年6月29日

キーワード：

Octet® BLI、Fcγ受容体、抗原、カインेटイクススクリーニング、結合、解離、カインेटイクス曲線、バイオシミラー、アップストリームプロセス、ダウンストリームプロセス、バイオプロセス

Octet® BLIを用いたFcγ受容体および抗原のカインेटイクススクリーニングによるダウンストリームプロセスでのバイオシミラーの迅速評価

Kirsty McBain¹, Daryl Cole¹ Ph.D, Stuart Knowling² Ph.D¹ Sartorius UK Ltd, Units 2 & 3 The Quadrant, Newark Close, Royston, Hertfordshire, SG8 5HL, UK² Sartorius Corporation, 47661 Fremont Blvd, Fremont, CA 94538 USA

要旨

Octet® バイオレイヤー干渉法 (BLI) 生体分子間相互作用解析システムはハイスループット能を有し、さまざまな医薬品開発プロセスで得られるサンプルから高品質のカインेटイクスデータを直接生成できます。このようなサンプルには、アップストリームプロセスの細胞株開発 (CLD) で生じる小規模な上清から、プロセス開発や他のダウンストリームプロセスで生じるカラム溶出分画までが含まれます。

本アプリケーションノートでは、カインेटイクススクリーニング技術を使用してOctet® Rシリーズのスループットをさらに向上させる方法を説明します。ここでは、複数のアナライト濃度を使用してカインेटイクスデータを得るのではなく、単一濃度のアナライトを使用して目的となる標的 (リガンド) との相互作用についてカインेटイクスパラメーター (k_{on} , k_{off}) の範囲を求めます。これにより、複数のアナライトおよびリガンド、またはそのいずれかのスクリーニングを1回の測定で迅速に行えます。カインेटイクススクリーニングとOctet® BLIのハイスループット能を組み合わせることで、ELISAなどの複数パラメーターの直交フォーマットを避けることができます。あるいはターゲット分子のトリアージを行うことで、目的の特性を有する分子のみをダウンストリームプロセスに進めてさらに評価することができます。

イントロダクション

手頃な価格の医薬品は、治療の選択肢を増やし救命薬へのアクセスを改善する一方、医療費を削減する可能性がありますことから、引き続き必要とされています。近年、ブロックバスターとなる生物製剤をめぐって競争が激化していますが、その理由のひとつはバイオシミラーの増加です。バイオシミラーはすでに承認されている生物製剤（先行品または先発薬（Reference Medicinal Product: RMP））にきわめて類似しており、先行品の特許満了後に製造できます。2015年に最初のバイオシミラーが上市されて以来、FDAは現在33種類のバイオシミラーを承認しており、そのうち21種類が2022年1月現在市販されています¹。2022年から2027年の間に31の生物製剤が特許満了となるのに従い、各バイオシミラーの年間売上高は最大200億ドルに達する可能性があり、全体的な市場規模は2028年までに1,000億ドルに相当すると予測されます。そのため、開発ファネルを迅速に狭めることが可能な測定機器とアッセイフォーマットに対して大きな関心が寄せられています²。

低分子のジェネリックとは異なり、バイオシミラーはRMPのジェネリックには分類されません。これは、生物製剤の製造に固有の変動性と複雑さのために正確な複製を行えないためです。このため、バイオシミラーとRMPとの間に安全性、純度、力価について臨床的に有意な差があることは許容されないものの、臨床的に不活性な成分のわずかな差は許容されます³。

バイオシミラーの開発は、目的の生物製剤の一次アミノ酸配列を含む複数の細胞クローンを作製することから始まります。目的の生物製剤を発現させたら、次にアップストリームバイオプロセスについて評価と最適化を行います。具体的には、この作業は細胞株開発とプロセス開発中に行われます。この段階で不適切なクローンを選択すると選択のし直しが必要になることがあるため、このアップストリームプロセスが重大な律速段階となる可能性があります。一般に、CLDにおいて評価される特性のうち最も重要なものは収量です。他の重要品質特性（CQA）については、ダウンストリームプロセス（バイオプロセス開発）に進む前のプロセス開発中に修正が行われます。

ダウンストリームプロセスは生物製剤開発において不可欠な一連の技術からなり、生物学的または化学的成分の複雑な混合物から目的の生物製剤を分離し、精製および特性解析を行います。このプロセスは、収量を最大化し、臨床使用または商業化に適すると同時にコストが最小限に抑えられ、不純物や混入物に関するリスクができる限り小さい、高純度で強力な生物製剤を得るために実施します。

ダウンストリームプロセスには通常、細胞回収、細胞破碎、抽出、クロマトグラフィーによる精製、ろ過、製剤化などが含まれます。その目的は、最終製剤が必要とされる純度、力価および安全性を確実に満たすようにすることです。

アップストリームおよびダウンストリームの全製造プロセスにおいて生物学的同等性を実証する必要があります。しかし、すべての候補分子についてスクリーニングを行う標準的な解析法には大きな困難が伴うことがあります。そのため、ハイスループットな解析アプローチが望ましい代替法となります。

従来、バイオシミラーとそのRMPとの類似性を実証する主な手続きとして、規制当局であるEMA、FDAおよびWHOが指示する同等性／同質性の試験が行われています。この試験では、Fcγ受容体、および目的の抗原などのさまざまな相互作用について、申請するバイオシミラーの結合がRMPの80～125%の範囲に入らなければなりません。

Octet® BLIシステムは、アップストリームおよびダウンストリームのさまざまなポイントでいくつかの重要な生物製剤特性を評価するために使用できます。これには、標的の結合の特性解析、Fcγ受容体の結合評価、グリカンスクリーニング、不純物や宿主細胞タンパク質ならびに他のCQAの評価が含まれ、この評価は開発プロセスの簡易化に役立ちます。

本アプリケーションノートでは、モノクローナルIgG1抗体と抗原TNFαの結合のほか、IgG1抗体とFcγ受容体CD16a V176およびCD64との結合を解析する単一アナライト濃度カインेटクススクリーニングにより、開発中のバイオシミラーのカラム溶出分画をいかにして迅速に評価できるかを明らかにします。このプロセスは簡単な調節を行うことで複数のCQAの評価に使用でき、必要となるタンパク質はきわめて少量です（ここで使用するのは1ウェル当たり1 μg未満）。

カインेटクススクリーニングをOctet® BLIシステムのハイスループット能と組み合わせると、簡易な直交的なアプローチが可能となり、精製または非精製上清から直接、Fcγ受容体結合の評価やグリカンのスクリーニングなど複数の特性評価を迅速に行うことが可能です。

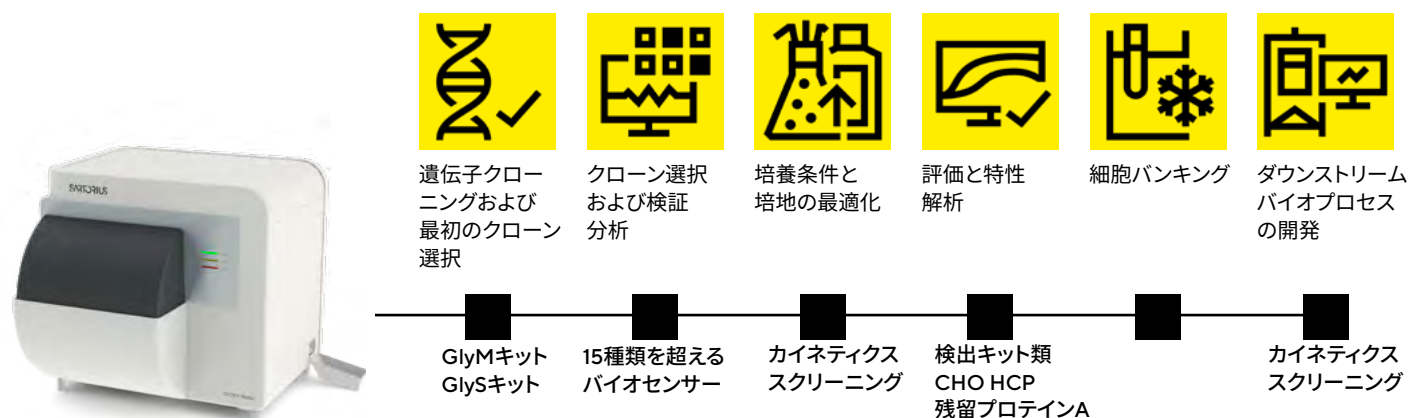


図1: Octet® BLIシステムをアップストリームおよびダウンストリームの複数のポイントで使用することで、標的結合の特性解析など、主要な特性の評価が可能。Octet® BLIバイオセンサーおよび関連キットを使用することで、複数のアッセイフォーマットで広範囲の生物学的情報を評価・解析できる。

カイネティクススクリーニング-アナライト反応の最適化

古典的なカイネティクス評価では、ひとつのリガンドとの結合を試験するために、アナライトを数段階の濃度で測定します。これは、カイネティクス空間全体をカバーし、正確なカイネティクスの速度定数を確実に求められるようにするためです。アナライトがリガンドに結合しアナライト・リガンド複合体が形成されるプロセスは秒単位で、観察される結合レスポンスの大きさはアナライトとリガンドの濃度に依存します。リガンドの濃度は一定とみなせることから、単一濃度のアナライトから正確な結合カイネティクス（濃度依存）を測定できる可能性があります⁴。一般に、すべてのカイネティクス評価において、結合カイネティクスパラメーター (k_a) を正確に測定するには、観察される反応曲線に十分な屈曲が存在する必要があります。屈曲がカイネティクスを反映するからです（図2）。アビディティ効果が最小限に抑えられており、結合フェーズの時間が長すぎず低親和性の非特異的な相互

作用が生じる可能性がないと仮定されれば、解離速度定数（濃度非依存性）の最適化は必要ありません。

カイネティクススクリーニングで結合反応中に十分な屈曲を得るために必要なアナライト濃度は、推察された相互作用の K_D に基づいて決定します。最初にアナライト反応を最適化するには、広範囲のアナライト濃度を試験して、カイネティクススクリーニングに最適な単一の濃度を定めることを推奨します。図2に示すように、アナライトの濃度が高いと、結合反応の速度が速すぎ、単一の濃度からは正確なカイネティクスを求められませんが、逆にアナライト濃度が低いと反応が基本的に線形となり、カイネティクスイベントに関する十分な情報が得られません。最適な単一アナライト濃度では、正確なカイネティクス速度定数を求められる十分な屈曲が存在しますが、平衡状態にある時間は短く、低親和性の非特異的な相互作用により生じる得る結合イベントが減少します。

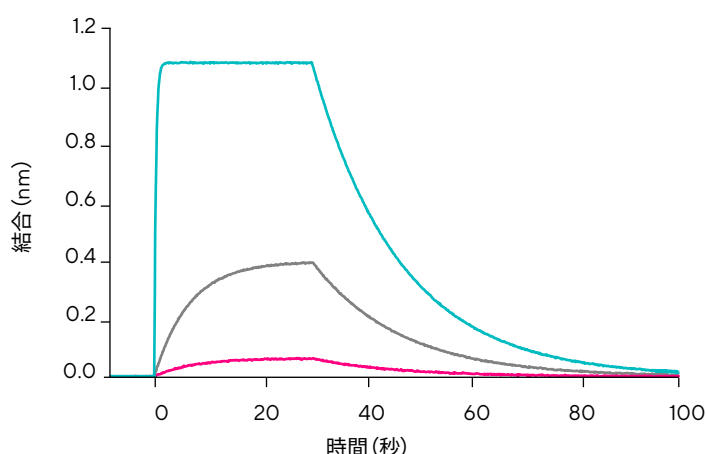


図2: 屈曲がカイネティクスを反映する。単一濃度で測定を行うときには、信頼性あるカイネティクスを求めるために十分な屈曲が観察されることが重要である。この図の青の曲線では結合と平衡が急速に生じており、そのためカイネティクスの測定が不正確になる。赤の曲線は反応レスポンスと屈曲が小さく、この場合もカイネティクスの測定が不良となる。灰色の曲線は結合フェーズでの屈曲が良好であり、平衡にも達していることから、単一濃度での評価でカイネティクスと親和性について許容できる推定を行えるはずである。結合フェーズの時間が長すぎ結合曲線が長時間平衡状態にあると、弱い非特異的な相互作用が生じる可能性が残り、カイネティクスパラメーターの測定が不正確になり得ることから、これを避けることが重要である。

解離速度定数はアナライトの濃度非依存性ですが、表面が飽和するとセンサー表面の混み合い度が高まり非特異的な結合イベントの増加につながる可能性があります。

ハイスループットのカイネティクススクリーニングを設定する際に重要な考慮事項は、どちらをリガンド・アナライトとするかのアッセイの方向性、相互作用で予測される化学量論比、ならびに最も単純なカイネティクスモデル(1:1結合)でデータの当てはめを正確に行えるかという点です。本研究のように、アナライトが2価である場合、アビディティ効果のリスクが増大します。(参照: Application Note: **Optimizing Kinetics Assays to Avoid Avidity Effects**)。したがって、カイネティクススクリーニングを実施するときにはアッセイデザインを検討しなければならず、必要な場合にはアビディティ効果を排除するアッセイの方向性で実施します。

材料および方法

測定機器および試薬

すべてのアッセイはOctet® BLI DiscoveryおよびAnalysis Studioソフトウェア・バージョン13.0.1を用いてOctet® R8で実施しました。Octet® SAXバイオセンサー(18-5117(トレイ)、18-5118(パック)、18-5119(ケース))および96ウェルの黒色平底マイクロプレート(Greiner Bio-Oneカタログ番号655209)をすべての解析に使用しました。バイオセンサーは、Sartorius 10X Kinetics Buffer(18-1105)をPBSで1:10に希釈して調製した1X Kinetics Buffer(pH 7.4)で、室温において少なくとも30分間、使用前に水和しました。特に記載のない限り、アッセイはすべて25°Cで実施しました。

組み換えAviTag™ビオチン化ヒトTNFα、AviTag™ビオチン化ヒトCD64、AviTag™ビオチン化ヒトCD16a V176はACROBiosystems社から購入しました。ヒュミラ®RMPはWEP Clinical社から購入しました。

アダリムマブのクローンは、ヒュミラ®(アダリムマブ)の一次アミノ酸配列を用いてCellca社が調製しました。湊流プロセスで単一クローンを調製し、アフィニティカラムバッファの最適化を実施しました。アダリムマブのサンプルをプロテインAカラムにて捕捉し、pH 3.0、3.2、3.4、3.6、3.8の100 mMグリシンバッファ、並びにpH 3.6 + 1 M L-アルギニンおよびpH 3.8 + 1 M L-アルギニンの100 mMグリシンバッファを用いて溶出しました。溶出液はTrizma(pH 9.0)で中和し、さらにPBSで1:1に希釈してから無菌ろ過し、4°Cで保存しました。

アナライト反応の最適化

SAXバイオセンサーに固相化するビオチン化リガンドの最適化を、提案されたアナライト濃度のうち最高濃度で各受容体に使用して実施し、Octet®プラットフォームでTNFαとCD64については約0.6 nM、CD16a V176については約1.0 nMのアナライト結合レスポンスが観察されるようにしました(データはここには示しません。詳しい情報については次を参照してください。「**Octet®プラットフォームを用いた生体分子の結合カイネティクス解析**」および「**Octet® BLI Kinetics**

Assay:Method Development Guideline」)。ヒュミラ®は1X Kinetics Bufferで最終濃度300 nM(TNFαおよびCD64の場合)ならびに5 μM(CD16a V176の場合)に調製し、3倍希釈系列で測定を行いました。バックグラウンドに相当する参照サンプルの解析を、関連するリガンドを固相化したSAXバイオセンサー、および1X Kinetics Buffer(アナライト溶液として使用)を用いて同時に行いました。

データのフィッティングは、1:1モデル(TNFαおよびCD64の場合)または2:1モデル(不均一リガンドモデル:CD16a V176)により、Octet® Analysis Studioソフトウェアを使用して行いました。

カイネティクススクリーニングの適格性評価-再現性

カイネティクススクリーニングの再現性の評価は、アナライト反応の最適化において決定したビオチン化リガンド固相化量を用いて行いました。再現性評価ごとにリガンドの原液濃度を調製し、アッセイ法ファイルでリガンド固相化レベルに閾値を設けました。評価ごとに新しいバイオセンサーを使用しました。ヒュミラ®をアナライト反応最適化で決定した濃度に1X Kinetics Bufferを用いて調製し、複数日にわたり複数のユーザーが7回の結合測定をトリプリケートで実施し、アッセイ内・アッセイ間変動性を求めました。

データのフィッティングは、1:1モデル(TNFαおよびCD64の場合)または2:1モデル(不均一リガンドモデル:CD16a V176)により、Octet® Analysis Studioソフトウェアを使用して行いました。

結果および考察

アナライト反応の最適化

CD64

カイネティクススクリーニングに最適な単一のアナライト濃度を求めるときには、最初は広範囲の濃度について試験することを推奨します。図3Aに示したように、CD64についてはまず300、100、33.3、11.1、3.7、1.23および0.41 nMの濃度希釈系列について評価を行いました。高いアナライト濃度(300、100、33.3 nM)では結合反応が速すぎ、したがって単一の濃度から結合カイネティクス速度定数を正確に求められません。反対に、低濃度のアナライト(1.24および0.41 nM)では結合反応が基本的に線形であり、したがってカイネティクスイベントに関する十分な情報が得られません。

3.7 nMまたは11.1 nMをアナライトの単一濃度として使用すると、カインेटクス速度定数を正確に求められる十分な屈曲が得られたことから、この範囲に入る10 nMをカインेटクススクリーニングのアナライト濃度として選択しました。解離はアナライト濃度非依存性ですが、センサー表面が飽和すると表面の混み合い度が高まり非特異的結合イベントの増加につながる可能性があります。図3Bに示すように、最高濃度 (300 nM) では、試験した他の濃度とは顕著に異なる解離フェーズが認められました。このように、反応曲線の見た目の確認は、完全なカインेटクススクリーニングに進む前に実施すべき重要な品質チェックです。

カインेटクス測定のコミュニティでは、正確な解離カインेटクスを測定し、正確な K_D 値を求めるには、解離フェーズにおいて5%を超えるレスポンスの減少が必要であるという考えが一般に受け入れられています⁵。5%の数学的な減少に加え、レスポンスの減少が目視で観察されることが望ましく、カインेटクススクリーニングに使用する最適濃度と解離時間を決定するときにはこの点を考慮する必要があります (参照: **A Compendium for Successful BLI and SPR Assays**)。

TNF α

バイオシミラーの開発で重要な要素は、RMPと同等のカインेटクスおよび親和性で、そのバイオシミラーが抗原に結合できるかという点です。上記のように、カインेटクススクリーニングを実施するときにはアッセイデザインならびに相互作用に予測される化学量論比を検討する必要があり、必要な場合にはアビディティ効果が最小限に抑えられるか排除される、リガンドとアナライトの方向性でアッセイを実施すべきです。これにより、最も単純なカインेटクスモデル (1:1結合) でデータを評価でき、データの正確なフィッティングを行うことができます。

ここではIgG1抗体であるヒュミラ®をアナライトとして評価を行いました。アッセイ中にアビディティ効果が生じるリスクがあります。固相化されるリガンド密度を十分低くし、十分な屈曲が得られるアナライト濃度を使用することで、この問題を排除できました。

図4Aに示すように、アナライトがモノクローナル抗体であり、したがって2価である場合、アナライト濃度が高いとアビディティ効果が増大する可能性があるため、1:1モデルによるデータのフィッティングが不良になります (参照: **Application Note: Optimizing Kinetics Assays to Avoid Avidity Effects**)。

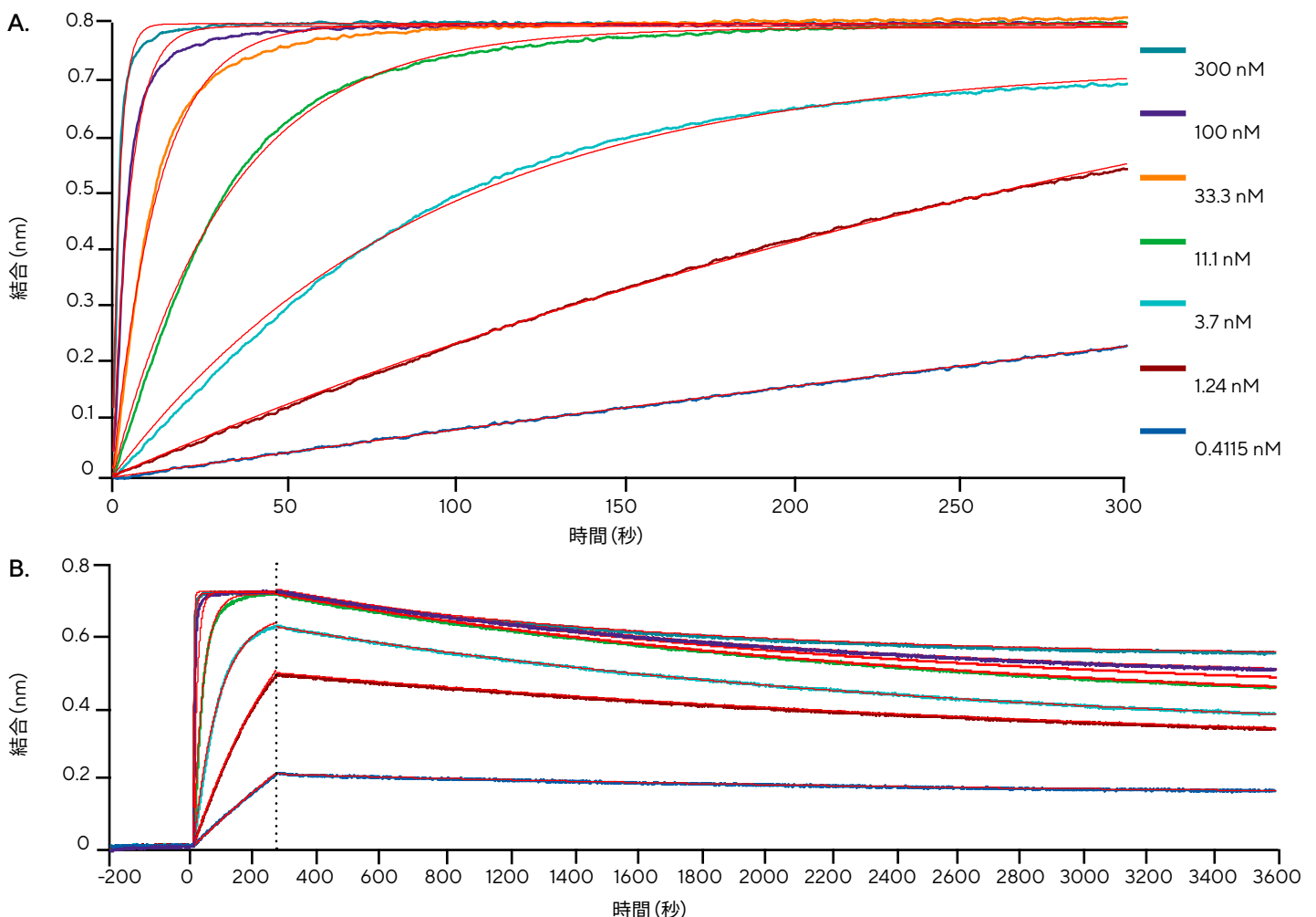


図3: ヒュミラ®・CD64結合アッセイの最適化に使用したアナライト濃度希釈系列 (A) 結合カインेटクスはアナライトが最高濃度のときは速すぎ、一方、最低濃度のときは直線性が強すぎる。薄青 (3.7 nM) および緑 (11.1 nM) の屈曲は良好な範囲にあり、この範囲周辺のアナライト濃度がカインेटクススクリーニングに適していると思われる。(B) 解離カインेटクスは一般にアナライト濃度の最適化を必要としないが、アナライト濃度300 nMで認められるような逸脱はバイオセンサー表面における作用の増大を示唆するものと思われる。

CD64で観察されたように、アナライト濃度が高いと(300および100 nM) 結合反応が速すぎ、単一濃度で測定した結合カインेटクスパラメーターが不正確になると考えられますが、反対にアナライト濃度が低いと(1.24および0.41 nM) 結合反応が基本的に線形になり、したがってカインेटクスイベントに関する十分な情報が得られません。3.7 nMまたは11.1 nMを単一のアナライト濃度とした場合、カインेटクス速度定数を正確に求められる十分な屈曲が示されることから、10 nMをカインेटクススクリーニングの濃度として選択しました。

CD64で上述したように、カインेटクス測定のコミュニティでは、正確な解離カインेटクスを測定し、正確な k_d 値を求めるには、解離フェーズにおいて5%を超えるシグナル減少が必要であるという考えが一般に受け入れられています。

TNF α とヒュミラ®の相互作用は親和性が高く(pMレベル)、90分の解離フェーズによる測定では、解離速度定数はゆっくりとした解離(10^{-5} s^{-1})でした。このカインेटクススクリーニングではアッセイを25°Cで実施しましたが、必要な場合にはアッセイ温度を37°Cに上げることで反応の変化が増大し、正確な解離速度定数が算出される可能性があります。

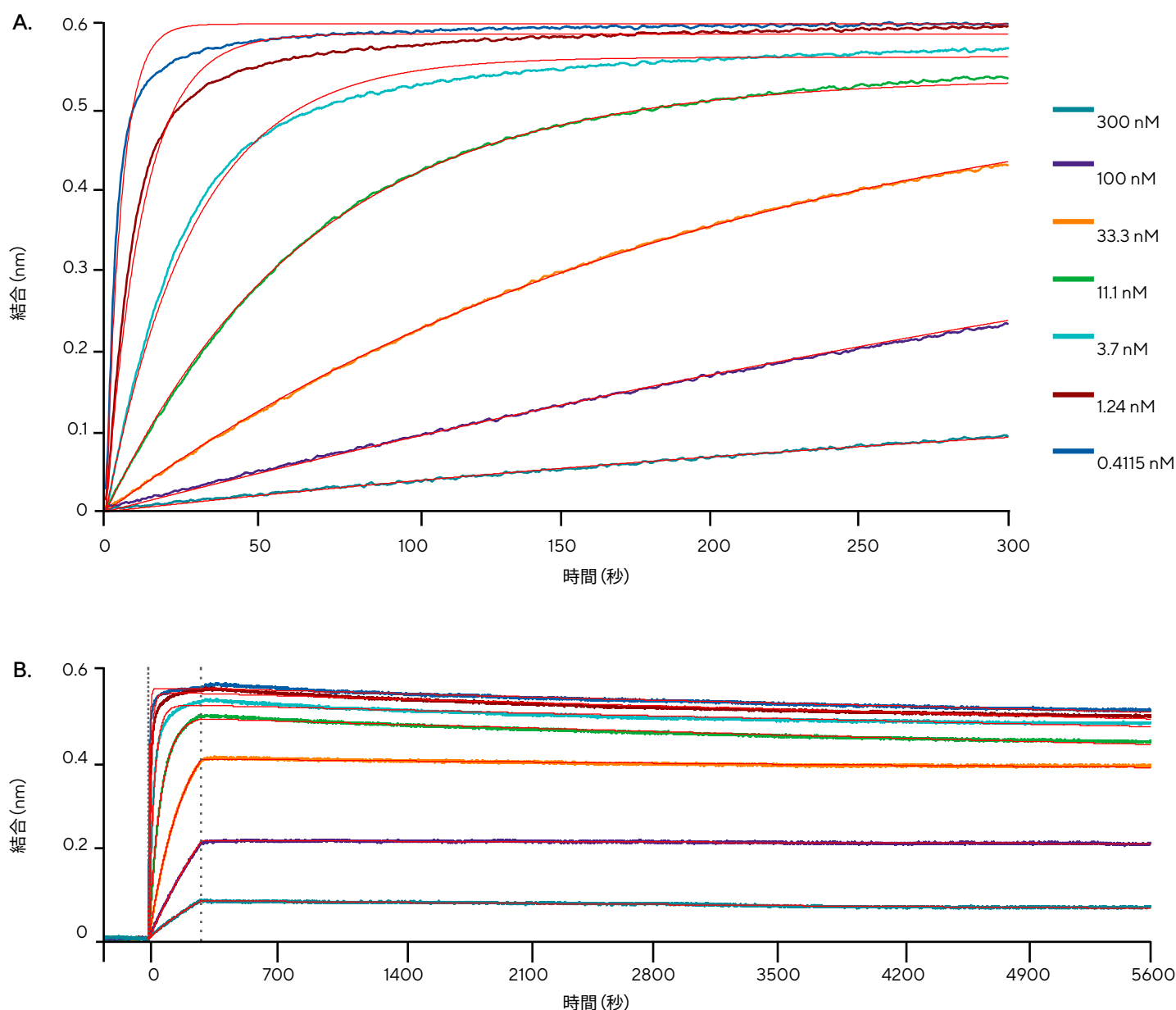


図4:TNF α との結合の最適化に使用したアナライト濃度希釈系列 (A) アナライトが2価であるときのアッセイフォーマットでは、アビディティの問題を考慮しなければならない。図に示すように、アナライト濃度が増大すると屈曲も増大するが、アビディティ効果のリスクも増大し、1:1の単純な結合モデルから離れる。図に示すように、低い濃度では1:1カインेटクスモデル(赤色)に十分当てはまる結合データ(各色)が得られたが、アナライト濃度が高いと1:1モデルは観察されたデータに当てはまらなくなる。これはアビディティ効果および飽和によるバイオセンサー表面の組み合わせに起因すると思われる。(B) 25°Cでは、ヒュミラ®のTNF α からの解離フェーズでの結合レスポンス減少はわずかである。

CD16a V176

CD16a (FcγRIIIa) V176 (別名V158) は親和性が中程度のFcγ受容体であり、高親和性のFcγ受容体であるCD64 (FcγRI) とは異なりその5つのグリコシル化部位が著しい不均一性を示す可能性があるため、カインेटクス解析は1:1モデルでは行えません^{6,7,8}。

CD16aのIgG1抗体に対する親和性はCD64よりも低いことが知られており⁹、そのため最初に評価する濃度系列を5000、1667、555.6、185.2、61.7、20.6、6.86 nMとしました(図5A)。高いアナライト濃度(5000、1667 nM)では結合反応が速すぎ、したがって単一の濃度からカインेटクスを正確に求められないと思われます。反対に、低濃度のアナライト(6.86、20.6、61.7、185.2 nM)では結合反応が遅く平衡に近づかないため、カインेटクスイベントに関する十分な情報が得られません。

アナライト濃度555.6 nMでは、カインेटクス速度定数を正確に求められる十分な屈曲が示され、平衡に近づきます。したがって、500 nMをカインेटクススクリーニングの濃度として選択しました。1:1の相互作用とは異なり、不均一な相互作用の場合には両部位が飽和状態にあることが保証されるため、短いプラトー(平衡状態)でも許容されます。

CD64やTNFαでは解離速度が遅く、正確な解離定数を求めるには時間がかかりますが、CD16a V176はIgG抗体に対する親和性が中程度であるため解離速度が速く、解離フェーズ開始から60秒以内に5%を超える結合シグナルの低下が認められます(図5B)。必要な場合には、解離時間を縮小して全体のアッセイ時間を短縮し、カインेटクススクリーニングのスループットを高めることができます。

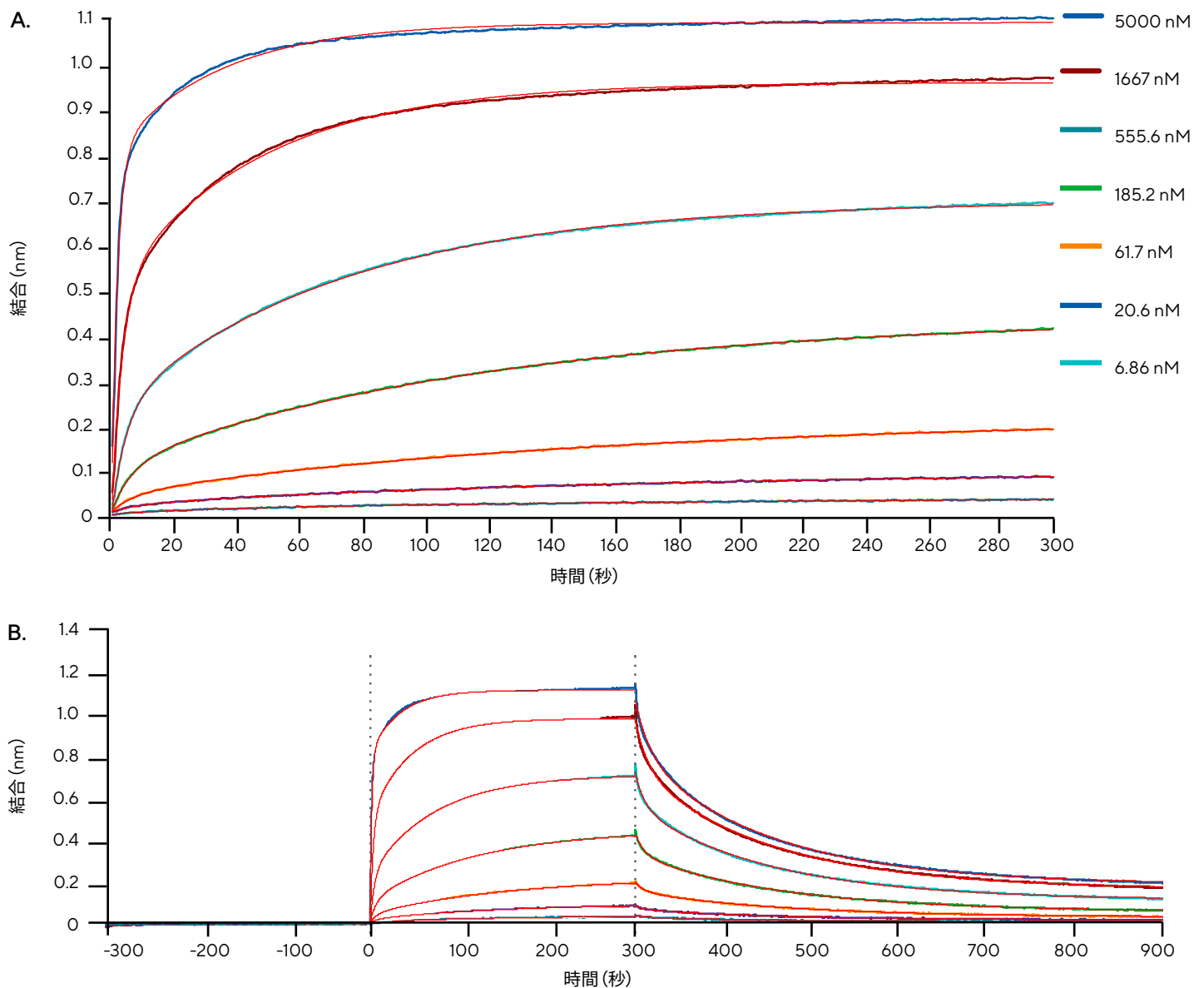


図5: ヒュミラ®・CD16a結合アッセイの最適化に使用したアナライト濃度希釈系列 (A) CD16a V176は不均一なリガンドで典型的な結合反応を示し、短い結合フェーズの後にプラトーに達する。(B) CD16a V176などが示す中程度の親和性の相互作用では、解離速度が速く、結合レスポンスの減少が確実に観察される。

カインेटイクススクリーニングの適格性評価-再現性

「材料および方法」で検討したように、カインेटイクススクリーニングの適格性評価を行うことで、ユーザー間の違いおよびサンプル調製に起因するアッセイの自然な変動性を評価できます。すべてのカインेटイクススクリーニング適格性評価 (CD64、TNFα および CD16a V176) で、3 回のアッセイをそれぞれトリPLICATEで実施しました。各回のアッセイにリファレンスパイオセンサーを含め、アッセイ当たり計 21 (3 × 7)、全体で 63 の測定を行いました (図 6)。Octet® R8 は 8 つの反応を同時に測定できるため、このプロセスが単純になり、トリPLICATEで評価を行ってもアッセイ時間が最小限に抑えられ、多数の異なるサンプルを評価する場合には最適化も可能です。

リガンド固相化量および結合レスポンスの結果

AviTag™ ビオチン化タンパク質を用いて実施したすべてのアッセイで、リガンド固相化量は良好な変動係数 (CV 値) を示しました。CD64 リガンド固相化量 (閾値 0.25 nm) のアッセイ内変動性は CV 3% 未満、アッセイ間変動性は CV 1.5% 未満でした (図 7A、表 1)。TNFα (固相化閾値 0.12 nm) のアッセイ内変動性は 6% 未満、アッセイ間変動性は 3.5% 未満でした (図 7B、表 1)。CD16a V176 (固相化閾値 0.25 nm) のアッセイ内変動性は 5% 未満、アッセイ間変動性は 3% 未満でした (図 7C、表 1)。

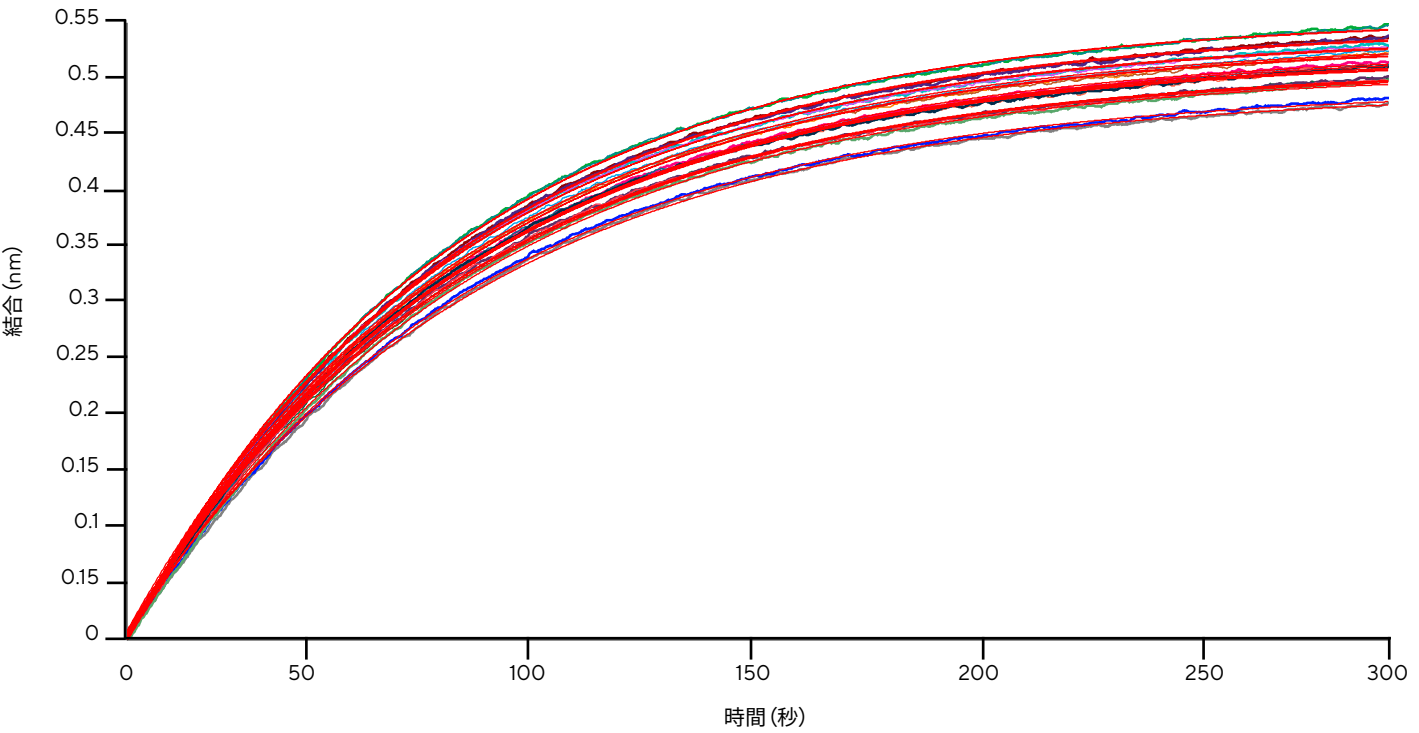


図 6: ヒュミラ® と TNFα の単一濃度結合の例 (k_a)。3 回のアッセイのそれぞれで、7 回の測定をトリPLICATEで実施し、ユーザーの違いおよびサンプル調製の変動に起因する k_a 、 k_d 、および K_D の自然な変動範囲を求めた。

	アッセイ内1	アッセイ内2	アッセイ内3	アッセイ間1、2、3
CD64	2.89	2.50	2.76	1.02
TNFα	5.64	5.39	3.72	3.48
CD16a V176	3.79	4.67	3.73	2.37

表 1: カインेटイクススクリーニング適格性評価におけるリガンド固相化量の %CV

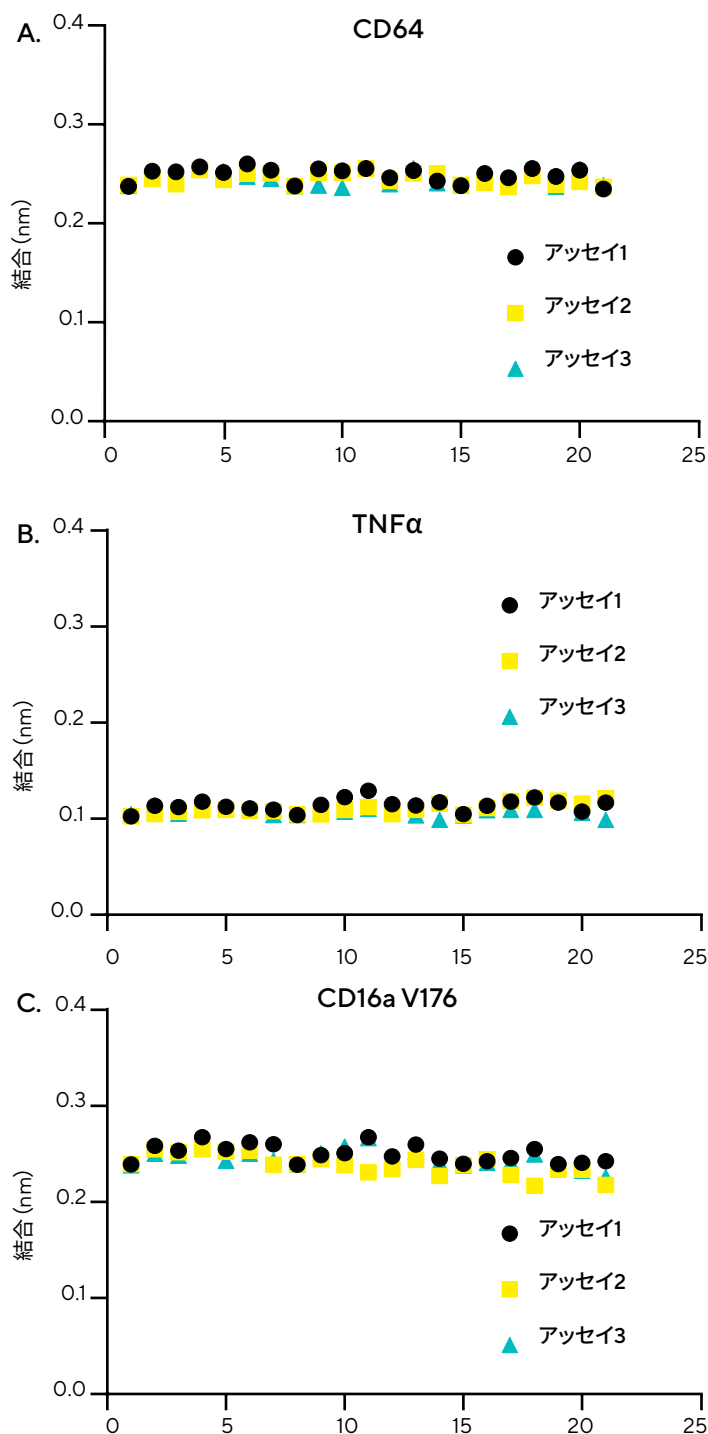


図7:リガンド固相化量 (A) CD64 (固相化閾値0.25 nm)、(B) TNFα (固相化閾値0.12 nm) および (C) CD16a V176 (固相化閾値0.25 nm) は、カインेटクススクリーニングの適格性評価において良好な精度を示している。

リガンド固相化量から予想されるように、アナライト結合レスポンスの値は解析するアナライトに依存します。ヒュミラ®・CD64結合のカインेटクススクリーニングでは、正確なリガンド固相化量レベル下では、アナライト結合レスポンスはアッセイ内CVでは約3%、アッセイ間CVは2%未満でした (図8A、表2)。ヒュミラ®・TNFα結合のカインेटクススクリーニングでは、アッセイ内およびアッセイ間CVは約5%でした (図8B、表2)。ヒュミラ®・CD16a V176結合のカインेटクススクリーニングでは、アッセイ内およびアッセイ間CVは5%未満でした。このように、このバイオシミュラー・カインेट

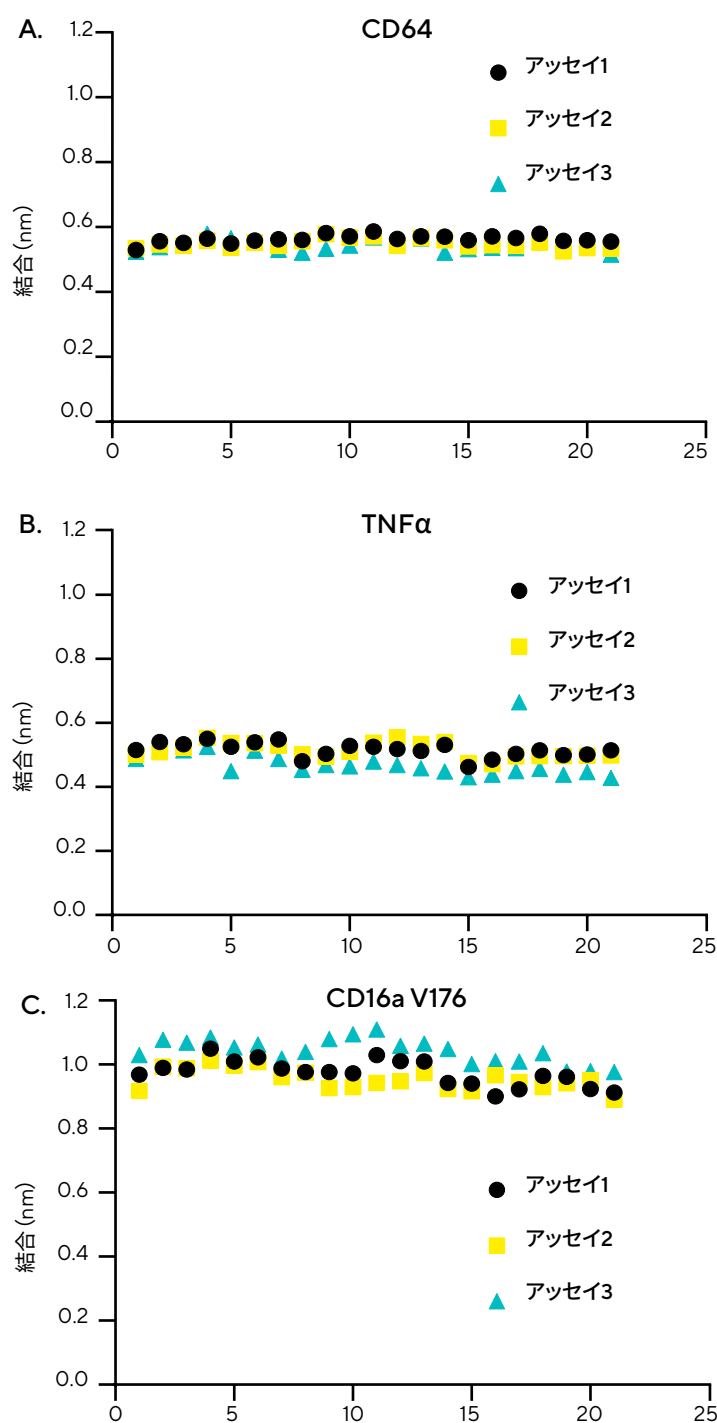


図8:カインेटクススクリーニング適格性評価-再現性におけるアナライト結合レスポンス (A) CD64 (B) TNFα (C) CD16a V176。

クススクリーニングにおいて認められたアナライト反応のアッセイ内変動性は5%未満、全体的なアッセイ間変動性は5%未満でした (図8C、表2)。

	アッセイ内 1	アッセイ内 2	アッセイ内 3	アッセイ間 1,2,3
CD64	2.20	2.53	3.23	1.81
TNFα	4.38	4.76	6.53	5.15
CD16a V176	4.12	3.46	3.75	4.65

表2:カインेटクススクリーニング適格性評価におけるアナライトレスポンス%CV

CD64

ヒュミラ®・CD64結合の場合、アッセイ1、2、3のすべての単一濃度での反復測定について求めた全親和性の平均値は780 pMでした(範囲:699~915 pM)。この値は文献にある値と良く一致します。結合カインेटクス速度定数は、アッセイ内CV 4%未満、アッセイ間CV 6%未満と範囲が十分限定されており、平均値は $6.24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、範囲は $5.82 \sim 6.52 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ でした。解離カインेटクスのアッセイ内CVは9%未満、アッセイ間CVは10%未満で、平均値は $4.81 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、範囲は $4.46 \sim 5.34 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ でした。

TNFα

3回の単一濃度アッセイで評価したTNFαに対するヒュミラ®結合の全親和性は268 pM(範囲:197~385 pM)で、この値は文献にある値と良く一致します。結合カインेटクス速度定数はアッセイ内CV 4%未満、アッセイ間CV 3%未満と範囲が十分限定されており、平均値は $1.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、範囲は $1.20 \sim 1.26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ でした。上記の通り(参照:アナライト反応の最適化)、90分の解離時間中に結合レスポンスレベルは線形の減少を示し、約5%の変化が認められました。この変化は、アッセイ内およびアッセイ間CVの上昇に反映されています。解離速度定数(k_d)は、平均 $3.23 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、範囲 $2.49 \sim 4.55 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ でした。

CD16a V176

ヒュミラ®のCD16a V176に対する結合は不均一リガンドモデルを用いて評価したため、2組のカインेटクス値と親和性値が生成されています。3回の単一濃度アッセイで得られた平均全親和性は180 nMおよび129 nMでした(範囲はそれぞれ177~183、121~133 nM)。結合カインेटクス速度定数は両 k_a 値についてアッセイ内CV 4%未満、アッセイ間CV 3%未満と範囲が十分限定されており、平均値はそれぞれ 3.7×10^4 、 $5.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、範囲はそれぞれ $3.61 \sim 3.79 \times 10^4$ 、 $5.53 \sim 5.73 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ でした。解離カインेटクスは、解離速度定数(k_d)の両方の値についてアッセイ内CV 5%未満、アッセイ間CV 5%であり、範囲が十分限定されていました。2つの解離カインेटクス値の平均値はそれぞれ 6.68×10^{-3} 、 $7.26 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、範囲はそれぞれ $6.63 \sim 6.71 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $6.96 \sim 7.60 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ でした。

カインेटクススクリーニング-バイオシミラーの評価

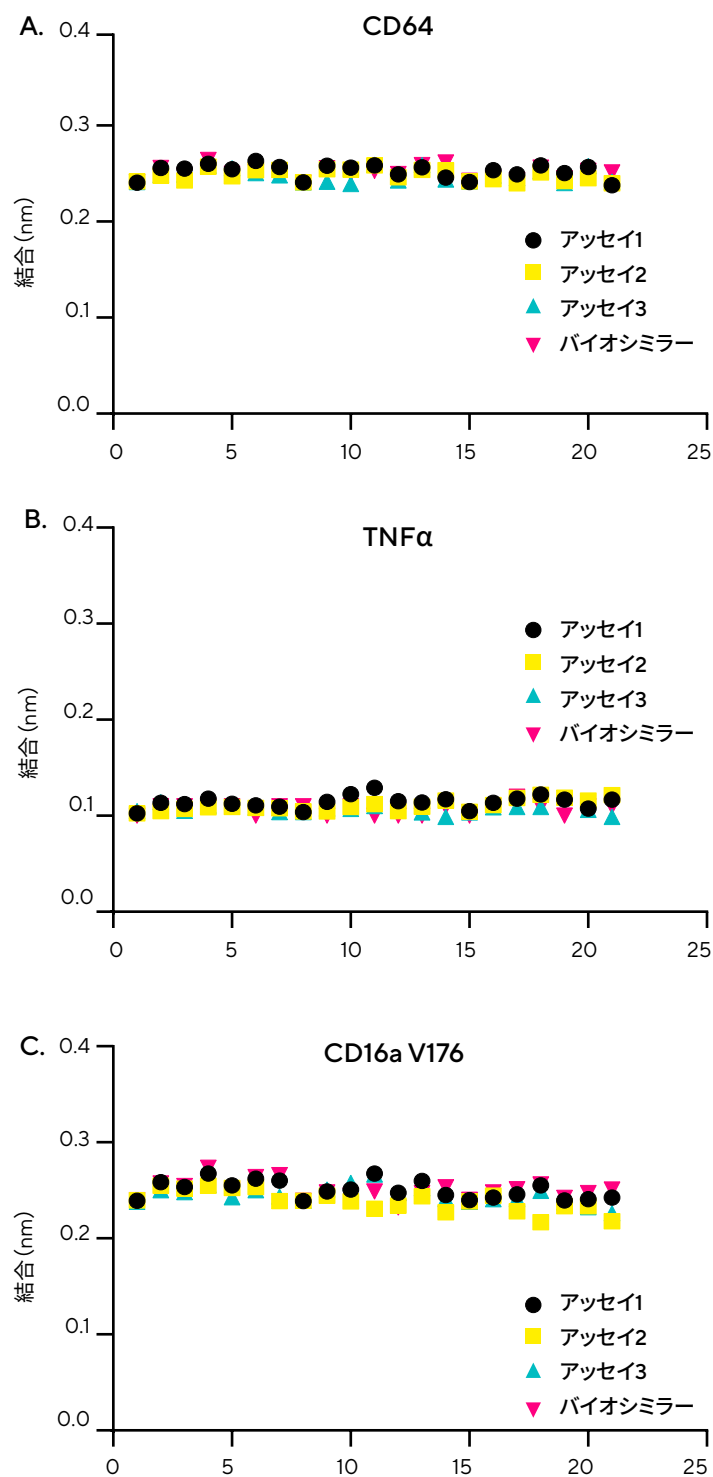
前述のカインेटクススクリーニング適格性評価-再現性試験の目的は、状態が既知・不明のバイオプロセスサンプルを、多数の受容体、抗原に対して、あるいはCQAについて今後迅速に評価できるようにパラメーターを設定することです。ここでいう範囲では、単一アナライト濃度で、ユーザーはカインेटクスデータに基づいて、クローン、生産プロセス、または他のパラメーターが、自分が決定した範囲内のデータが得られるかを判断できます。ここで留意すべき重要な点は、カインेटクススクリーニングは十分な適格性評価またはバリデーションが行われているアッセイの代わりに使用すべきではなく、あくまで医薬品候補またはCLDプロセスの大規模なライブラリーの評価とトリアージを行う簡易な方法として使用すべきだということです。通常、IgGは低pH条件のプロテインA親和性カラムで精製されます。IgGはまず生理的pH条件でプロテインAを充填したカラムに結合し、その後低pHで溶出されます。しかし、アダリムマブの場合、低pH条件では凝集体が溶出する可能性があるため、溶出プロセスを最適化する必要があります。溶出プロセスの最適化のほか、L-アルギニンバッファー(溶出剤)に添加すると正しく折り畳まれた単量体の抗体の回収率が大幅に増大し、その後の凝集が減少することが示されています。本研究では、アダリムマブの単一のクローンをアフィニティー精製したサンプルを用い、プロテインAカラムの溶出バッファーがCD64、TNFαおよびCD16a V176に対するカインेटクスおよび親和性に及ぼす影響を評価し、また望ましいカインेटクス特性を有する製剤を生成するためにはサイズ排除などの直交プロセスがさらに必要になるかを検討しました。

リガンド固相化および結合レスポンスの結果

カインेटクススクリーニング適格性評価-再現性試験と同様に、バイオシミラーのカラム溶出液の評価でも、すべてのアッセイでリガンド(AviTag™ビオチン化タンパク質)の固相化量について良好な変動係数(CV)が認められました。リガンドCD64の固相化量(固相化閾値0.25 nm)は、アッセイ内変動性4%未満、アッセイ間変動性1.5%未満でした(図9A、表3)。TNFα(固相化閾値0.12 nm)のアッセイ内変動性は5%未満、アッセイ間変動性(合同)は3.5%未満でした(図9B、表3)。CD16a V176(固相化閾値0.25 nm)のアッセイ内変動性は4%未満、アッセイ間変動性は3%未満でした(図9C、表3)。

	カインेटクス スクリーニング 適格性評価- 再現性	アッセイ内 バイオ シミラー	アッセイ間 (合同)
CD64	1.02	3.20	1.12
TNFα	3.48	4.34	3.20
CD16a V176	2.37	3.8	2.21

表3: カインेटクススクリーニングによるバイオシミラー評価におけるリガンド固相化量の% CV。



カインेटクススクリーニング適格性評価では一種類のアナライトを繰り返し評価しましたが、バイオシミラーのカラム溶出液または他のサンプルの評価では、アナライトの反応はアナライトの結合特性に依存し、したがってRMPに比べ高い場合も低い場合もあります。ヒュミラ®とバイオシミラーカラム溶出液について実施したカインेटクススクリーニングでは、CD64に対するバイオシミラー（アナライト）の結合レスポンスのデータを合同した場合、アッセイ内CVは3%未満、アッセイ間CVは6%未満でした（図10A、表4）。正確なりガンド固相化レベルを示したTNFαについては、カインेटクススクリーニングでヒュミラ®とバイオシミラーの評価を行った場合、アッセイ内およびアッセイ間CV（合同）は良好で、それぞれ5%程度でした（図10B、表4）。CD16a V176については、カインेटクススクリーニングでヒュミラ®およびバイオシミラーを評価した場合、アッセイ内CVは5%未満で、アッセイ間アナライト反応CVは合同データとして7%未満でした（図10C、表4）。

	カインेटクス スクリーニング 適格性評価-再 現性	アッセイ内 バイオシミ ラー	アッセイ間 (合同)
CD64	1.81	2.57	5.72
TNFα	5.15	6.04	4.89
CD16a V176	4.65	4.48	6.46

表4: カインेटクススクリーニングによるバイオシミラー評価におけるアナライト結合レスポンスの%CV

図9: バイオシミラーのカラム溶出液評価を含むリガンド固相化量評価 (A) CD64 (固相化閾値0.25 nm)、(B) TNFα (固相化閾値0.12 nm) および (C) CD16a V176 (固相化閾値0.25 nm) は、カインेटクススクリーニングの適格性評価およびバイオシミラー評価において良好な精度を示している。

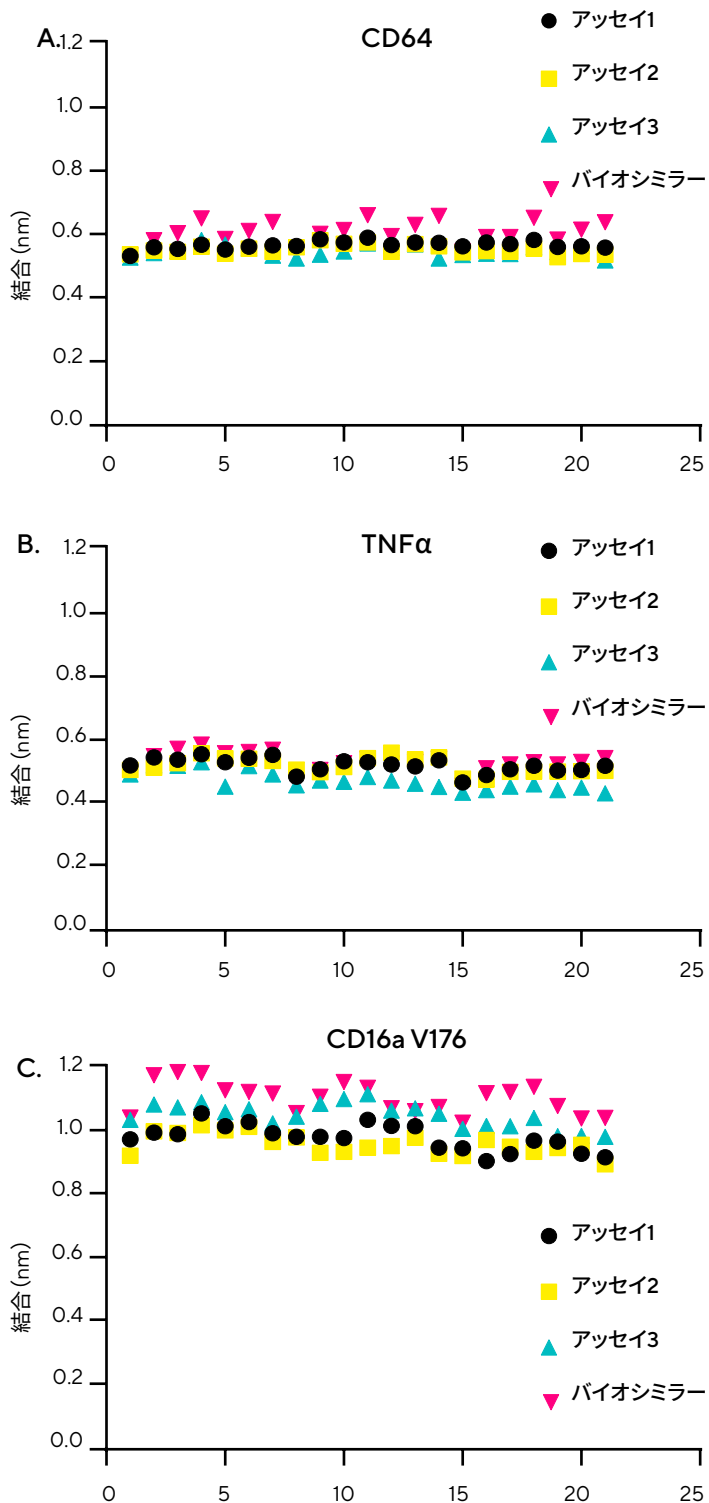


図10: バイオシミラーのカラム溶出液評価を含むアナライズ結合レスポンスの評価 (A) CD64、(B) TNFα (C) CD16a V176は、カインेटクススクリーニング適格性評価およびバイオシミラー評価において良好な精度を示している。

CD64

図11に示すように、バイオシミラーカラム溶出分画のスクリーニングで測定したヒュミラ®標準品 (RMP) の k_a および k_d は、いずれもヒュミラ®RMPのカインेटクススクリーニング適格性評価で測定した値の範囲内でした。

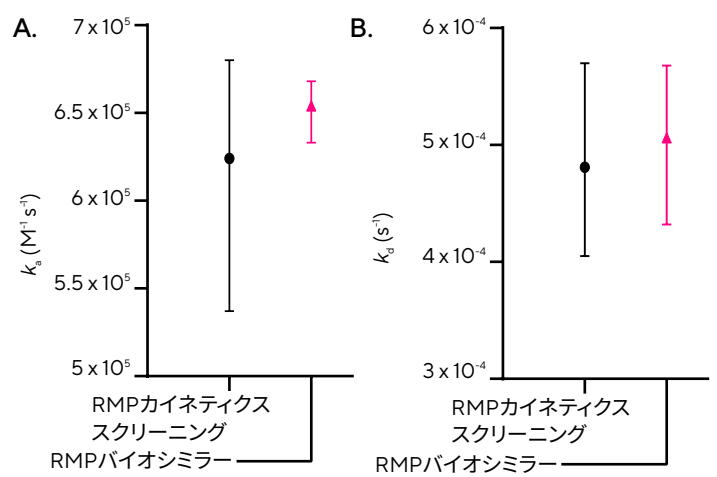


図11: CD64との結合の場合、カインेटクスパラメーターは以前に測定した値の範囲内である。バイオシミラー評価で求めたヒュミラ標準品の (A) k_a および (B) k_d は、カインेटクススクリーニング適格性評価で特定された範囲内であった。

大半のカラム溶出条件で、 k_a はヒュミラ®RMPの値に近いものでしたが、図12Aからわかるように、pH 3.6 + L-アルギニンおよびpH 3.8 + L-アルギニンの条件では明確な逸脱が観察されました。

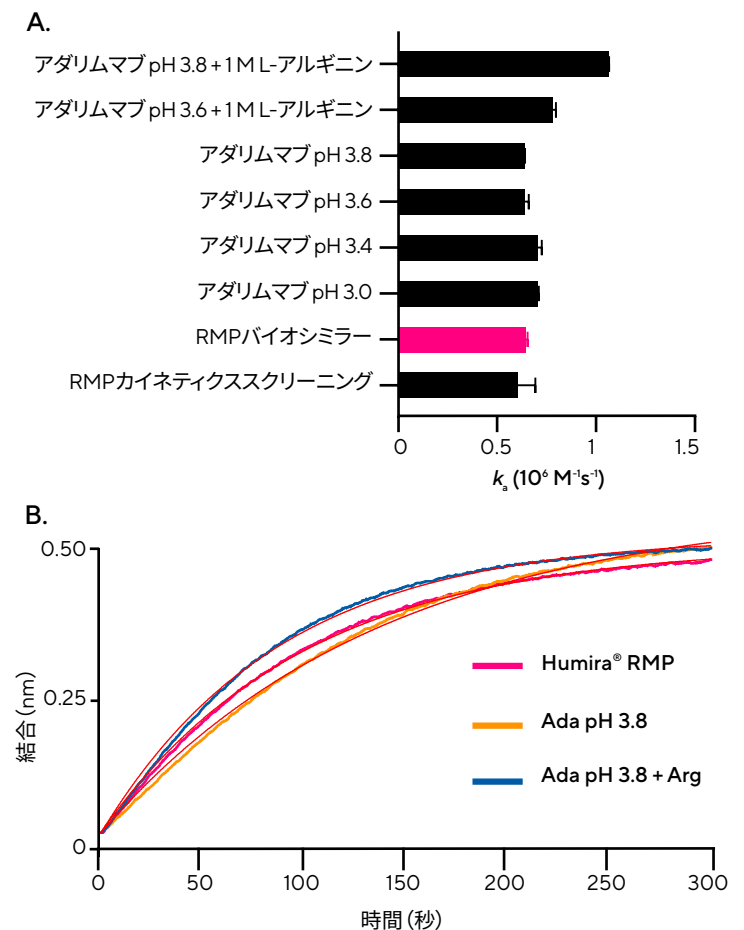


図12: 結合カインेटクスに対するL-アルギニンの影響 (A) バイオシミラーのカインेटクススクリーニングで得られた k_a 値について、L-アルギニン含有サンプルと非含有サンプルの間に差が認められた。(B) ヒュミラRMP (赤) は、アダリムマブpH 3.8 (オレンジ) およびアダリムマブpH 3.8 + 1M L-アルギニン (青) とは異なる結合カインेटクスを示している。

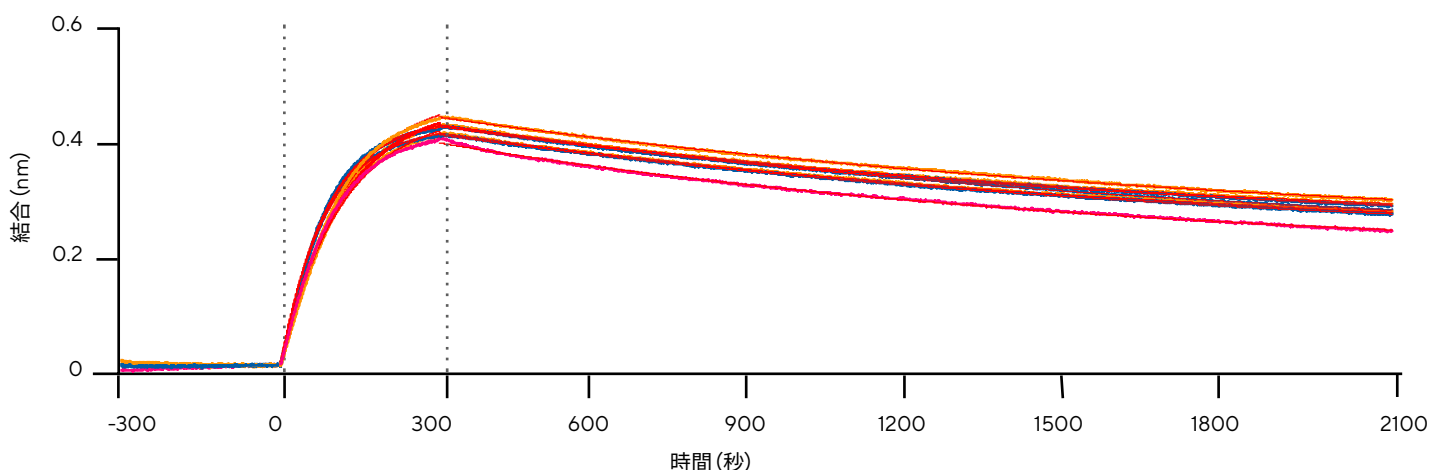


図13: 解離カインेटクスに及ぼすL-アルギニンの影響。pH 3.6 + 1 M L-アルギニン(オレンジ)、pH 3.8 + 1 M L-アルギニン(青)のカラム溶出条件の結果は、ヒュミラ®RMP(赤)とは明らかに異なっている。

pH 3.6 + L-アルギニンおよびpH 3.8 + L-アルギニンの解離曲線は、ヒュミラ®RMPサンプルと明らかに異なっており、平均 k_d はそれぞれ 6.61×10^{-4} 、 6.48×10^{-4} とした(図13)。

リガンドCD64について正確な固相化量およびアナライト結合レスポンスが得られたことを考慮すると、カラム溶出後のカインेटクスで上記の差が認められたことは、ヒュミラ®RMPとの差、ならびに同一pHにおけるL-アルギニン非含有条件でのカラム溶出分画との差が生じた理由を明らかにするためにさらに直交研究が必要であることを示しています。

TNFα

CD64の場合と同様に、バイオシミラーのカラム溶出分画のスクリーニングで測定したヒュミラ®標準品(RMP)の k_a および k_d は、いずれもヒュミラ®RMPのカインेटクススクリーニング適格性評価で測定した値の範囲内でした(図14)。

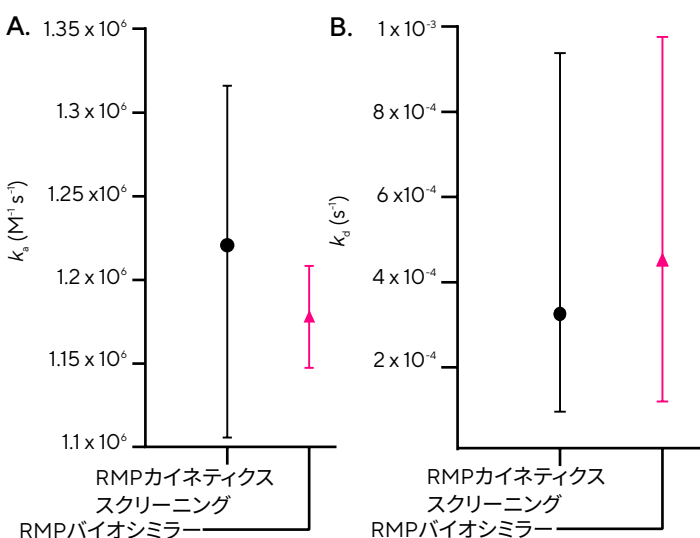


図14: TNFαのカインेटクスパラメーターは以前に測定した値の範囲内である。TNFαへのヒュミラ®RMPの結合パラメーターは、カインेटクススクリーニング適格性評価とカラム溶出液評価において同等の値を示した。

すべてのカラム溶出サンプルの結合カインेटクスは、適格性評価で認められたヒュミラ®RMPの値とは異なりました(図15A)。L-アルギニンを含むカラム溶出サンプルは、L-アルギニンを含まないサンプルとは異なる結合特性を示し、速い結合フェーズでバイオセンサーが飽和し、RMPで観察された1:1のカインेटクスとの差が生じた(図15B)。

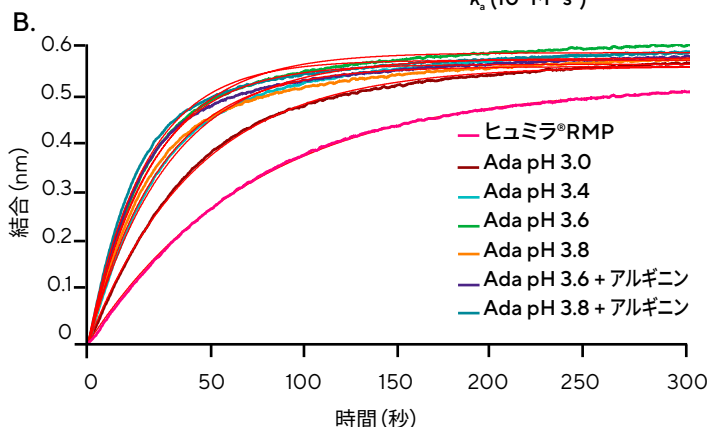
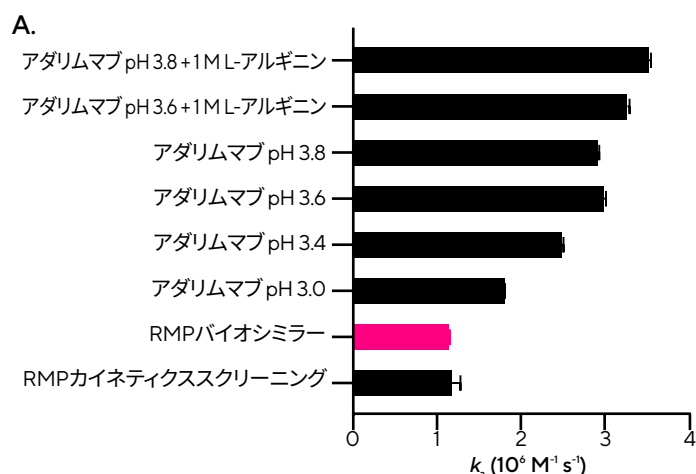


図15: 結合カインेटクスに対するL-アルギニンの影響 (A) バイオシミラーカラム溶出液サンプルはすべて高い k_a 値を示したが、アルギニン含有サンプルの結果はアルギニン非含有サンプルとは異なっていた。(B) バイオシミラーカラム溶出液サンプルは一般に速い結合フェーズを示した。L-アルギニン含有サンプルではバイオセンサーの飽和が生じ、1:1のカインेटクスを示したヒュミラ®RMPとの差が生じた。

CD16a V176

カイネティクススクリーニング適格性評価およびRMPバイオシミラー評価において、CD16a V176のフィッティングには不均一リガンドモデルを使用しました。その結果、結合と解離のカイネティクスは両評価間で良好な一致を示しました(図16) 独立の2組のカイネティクスパラメーター値 k_a 、 k_{a2} と k_d 、 k_{d2} が得られましたが、観察された結合反応は2つの独立の反応の合計でした。

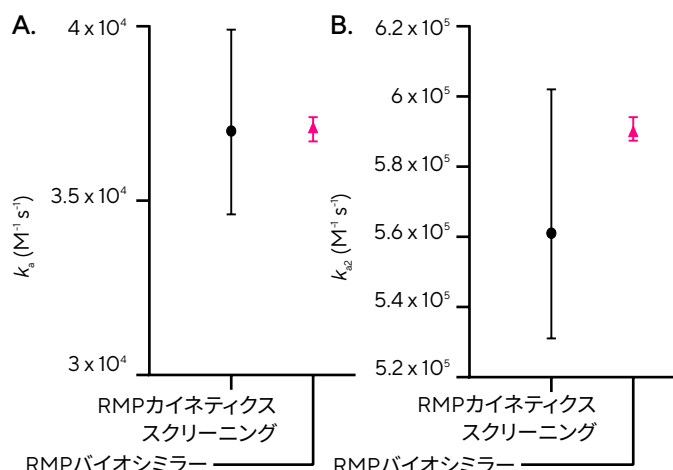


図16:不均一リガンドモデルはアッセイ全体にわたり良好な精度を示している。ヒュミラ®RMP・CD16結合の k_a および k_{d2} (A、B) は、カイネティクススクリーニング適格性評価-再現性試験においてヒュミラ®RMPで認められた値と同等であった。

評価した3つのリガンドのうち、CD16a V176に対する結合において、バイオシミラーカラム溶出分画とヒュミラ®RMPとの間に最も明確な変化が認められました。結合速度定数 k_a はヒュミラ®RMPよりも小さいことが目視でわかり(図17A)、 k_{a2} についても同じ影響が認められます(図17B)。図17Cに示すように、Octet® BLIによるアッセイの結合フェーズで、 k_a と k_{a2} はCD64およびTNF α の結合の場合と同様に単一の結合イベントとして観察されました。ヒュミラ®RMP、pH 3.6 + L-アルギニンおよびpH 3.8 + L-アルギニンのサンプルの間に明確なグラデーションが認められます。アルギニン含有サンプルは中間域を占め、アルギニン非含有サンプルは上方域にまとまっています。

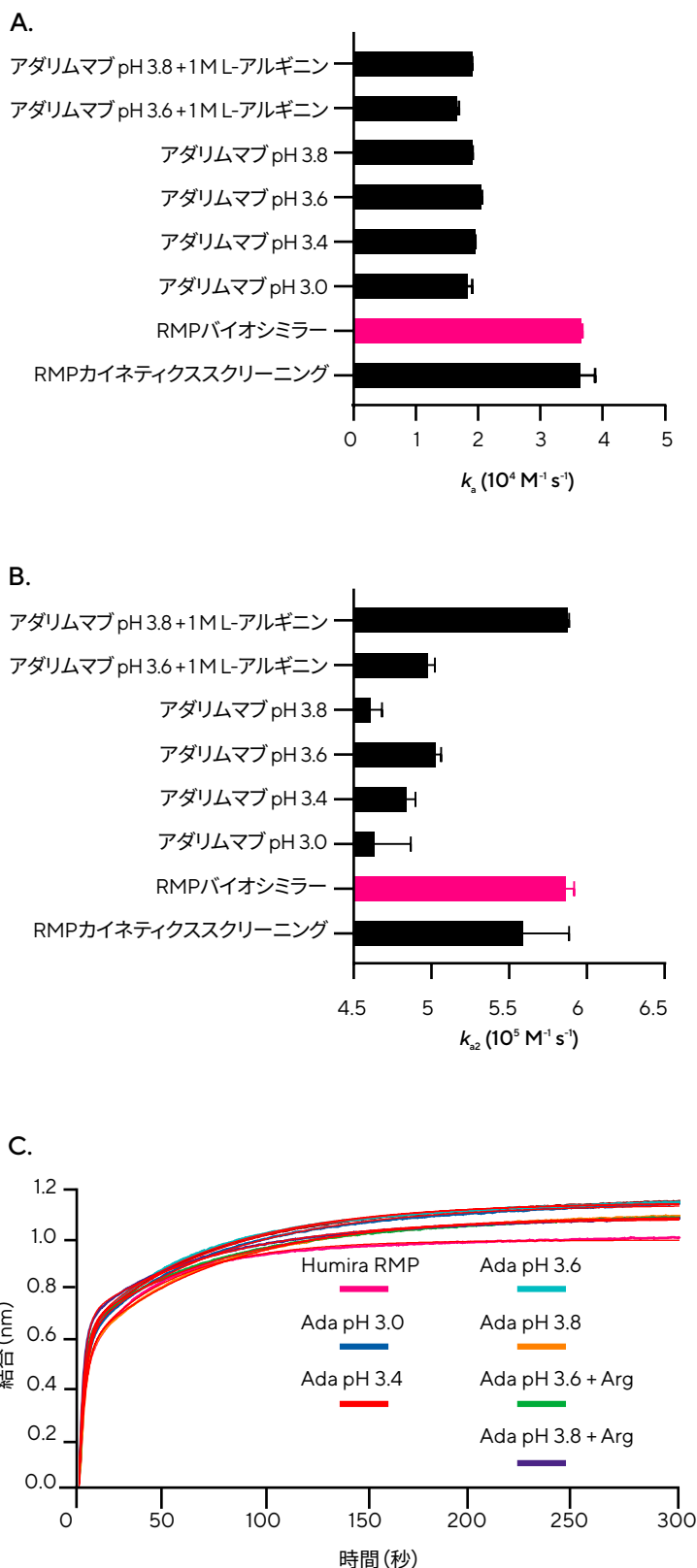


図17:CD16a V176結合カイネティクス (A) k_a (B) k_{d2} (C) 結合反応曲線 CD16a V176に対するヒュミラ®RMPの結合は最も低い域にあり、L-アルギニン含有サンプル(pH 3.6およびpH 3.8)は明らかにグループを形成しており、一方、アルギニン非含有溶出液は上方域でまとまっている。

バイオシミラーカラム溶出分画の解離カインेटクスは結合カインेटクスと同等の傾向を示し、バイオシミラー溶出分画とヒュミラ®RMPとの間に大きな差が認められます。図18Aに示すように、 k_d 値はすべてのサンプルでヒュミラ®RMPに比べて遅くなりました。ただし、2つ目の解離定数 k_{d2} はヒュミラ®RMPに比べて速く、図18Bに示すように、pH 3.6 + L-ア

ルギニンおよびpH 3.8 + L-アルギニンサンプルの値はアルギニン非含有溶出液とは明確に異なっています。これらは解離フェーズの結合レスポンス (図18C) で目視でもわかり、ヒュミラ®RMPは最も解離が速く、L-アルギニン含有サンプルは中間域でまどまどっており、L-アルギニン非含有サンプルは明確なまとまりを形成しています。

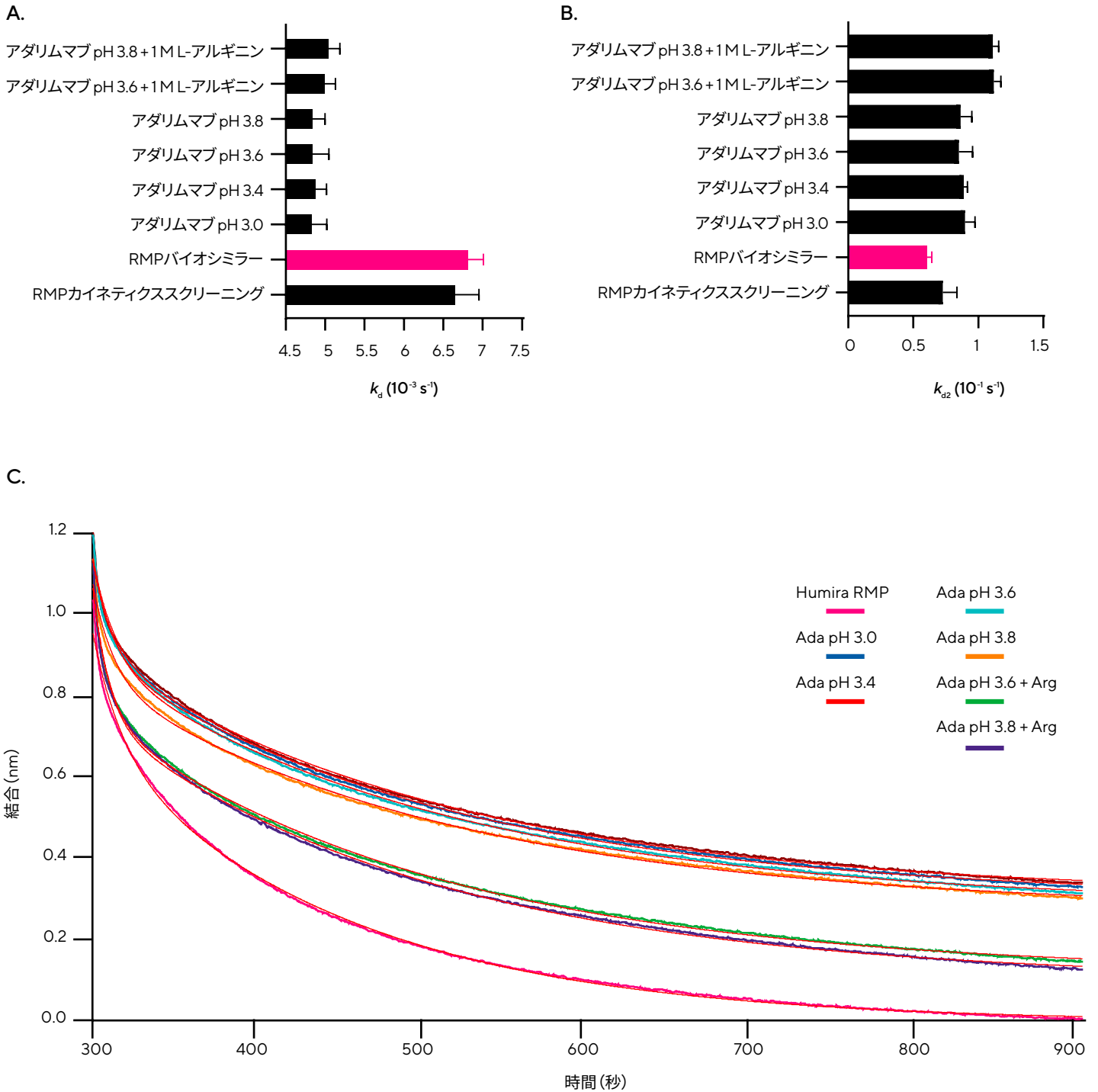


図18: CD16a V176の解離カインेटクス (A) バイオシミラーカラム溶出液の k_d はヒュミラ®RMPよりも遅く、(B) k_{d2} はヒュミラ®RMPよりも速い。L-アルギニン含有サンプルの結果は非含有サンプルとは明確に異なる。(C) ヒュミラ®RMPの解離フェーズは、バイオシミラーカラムL-アルギニン含有溶出液とも非含有溶出液とも異なっている。

結論

標準的なカインेटクス研究では複数のアナライト濃度での測定が必要なため、標準的な96ウェルまたは384ウェルマイクロプレートの大きなスペースを使用しますが、単一濃度カインेटクススクリーニングではマイクロプレートのスペースを最大限に利用してさまざまな関連のパラメーターを迅速に測定できます。

本アプリケーションノートに示したように、ヒュミラ®のバイオシミラー（アダリムマブ）開発プロセス（プロテインAによる抗体精製プロセス）のサンプルを、規制当局に提出する詳細なクオリフィケーションで必要になると思われる、3種類の主要リガンドを用いて迅速に試験できました。バイオシミラーのカラム溶出液についてトリプリケートで測定した結果を上に示しましたが、たとえば1M L-アルギニン溶出バッファーに添加することで認められる傾向に焦点を当てるのであれば、一回の測定で十分でした。「結果および考察」の項で検討したように、約30分（CD16a V176）から約1時間45分（親和性が高いTNF α との相互作用）の反復アッセイを実施しましたが、CD16a V176のアッセイ時間は解離時間を短縮することで短くすることができました。

適切なアナライト濃度とリガンド固相化レベルの選択後、単一濃度カインेटクススクリーニングによりアナライトのカインेटクスプロファイルを包括的に記述することができ、そのカインेटクスプロファイル（または、必要な場合には結合反応）に従って最適な抗体、タンパク質、または生産プロセスを順位付けして選択することができます。これにより意思決定が簡単になり、アナライト濃度要件が低く、アッセイ構成を簡単に行えるため、創薬サイクルの早期においてより適切な判断を下せます。すなわち、CQAと生産収量を組み合わせることで、時間の節約となり、ダウンストリームでの問題を軽減できます。

この簡易化したカインेटクススクリーニングのアッセイ構成により、結合、解離および親和性に関する大量のデータを迅速に生成できます。これは、ダウンストリームで最適なクローン選択をやり直す必要性を回避するために重要です。複数のリガンド、アナライトおよびバイオセンサーを一回のOctet® BLIアッセイに組み込むため、単一濃度カインेटクスアッセイでさまざまなリガンドとアナライトとの結合相互作用を1日で迅速に評価できることが容易に想像できるかと思います。

このアプローチで抗体ライブラリー全体を新規抗原に対して迅速に、高いコスト効率で試験できることから、創薬サイクルを加速することも可能です。古典的な解析技術では、ヒット抗体を同定した後に抗体の最適化を行うため、コストと時間がかかり失敗率が高いですが、これとは異なり、カインेटクススクリーニングと機械学習を組み合わせることで、大規模な抗体のライブラリーを作製し、これを迅速に試験、選択、選別ができます。この方法では、有効なデータがすぐに蓄積されるため、創薬サイクルが年単位から、月単位または週単位に短縮される可能性があります。

参考文献

1. Biosimilars: Global Markets | 241 © 2021 | BCC Research LLC
2. <https://pharmanewsintel.com/features/anticipating-the-2023-biosimilar-boom>
3. U.S. Food and Drug Administration. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product: Guidance for Industry. 2015. Cited: November 4, 2016 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/>
4. Canziani, G. A., Klakamp, S., & Myszk, D. G. (2004). Kinetic screening of antibodies from crude hybridoma samples using Biacore. *Analytical biochemistry*, 325(2), 301-307.
5. Katsamba, P. S., Navratilova, I., Calderon-Cacia, M., Fan, L., Thornton, K., Zhu, M., Bos, T. V., Forte, C., Friend, D., Laird-Offringa, I., Tavares, G., Whatley, J., Shi, E., Widom, A., Lindquist, K. C., Klakamp, S., Drake, A., Bohmann, D., Roell, M., Rose, L., Myszk, D. G. (2006). Kinetic analysis of a high-affinity antibody/antigen interaction performed by multiple Biacore users. *Analytical biochemistry*, 352(2), 208-221.
6. Kremer, P. G., & Barb, A. W. (2022). The weaker-binding Fc γ receptor IIIa F158 allotype retains sensitivity to N-glycan composition and exhibits a destabilized antibody-binding interface. *The Journal of biological chemistry*, 298(9), 102329.
7. Hayes, J. M., Frostell, A., Karlsson, R., Müller, S., Martín, S. M., Pauers, M., Reuss, F., Cosgrave, E. F., Anneren, C., Davey, G. P., & Rudd, P. M. (2017). Identification of Fc Gamma Receptor Glycoforms That Produce Differential Binding Kinetics for Rituximab. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 16(10), 1770-1788.
8. Wagner, N. D., Huang, Y., Liu, T., & Gross, M. L. (2021). Post-HDX Deglycosylation of Fc Gamma Receptor IIIa Glycoprotein Enables HDX Characterization of Its Binding Interface with IgG. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(7), 1638-1643.
9. Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daéron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16), 3716-3725.

ザルトリウス・ジャパン株式会社

東京本社

〒140-0001

東京都品川区北品川 1-8-11

Daiwa 品川 North ビル 4 階

Phone: 03-6478-5200

Email: info.lps@sartorius.com

大阪営業所

〒532-0003

大阪市淀川区宮原 4-3-39

Phone: 03-6478-5203



詳細はこちら：www.sartorius.com

掲載されている内容は、予告なく変更される場合があります。

©2025 Sartorius Japan K.K.

無断複写・複製・転載を禁じます。

ザルトリウス製品の名称はすべて、ザルトリウス AG および／

またはその関係各社の登録商標および財産です。

12 | 2025