

AdvanceBio HIC カラムによる 抗体薬物複合体 (ADC) の薬物抗体比 (DAR) 分析

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC

著者

Andrew Coffey and
Sandeep Kondaveeti
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、AdvanceBio HIC カラムの特性と抗体薬物複合体 (ADC) 分析について説明します。疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) は、疎水性が高い生体分子を分離するメソッドです。ADC 分子は非修飾抗体と比べて疎水性が高い場合が多いため、HIC は ADC の分析に最適な手法です。この手法により、異なる薬物抗体比 (DAR) を持つ ADC など、疎水性がわずかに違う種を高分離能で分析できます。HIC は緩やかな条件下で溶出できることが利点であり、生体分子が未変性状態で分析でき、システイン結合 ADC の分析に最適です。

はじめに

HIC は、生体分子の溶解性を低下させる塩を含む移動相を用います。これにより HIC 固定相への吸着が促されます。グラジエント溶出で塩濃度を減少させることにより、疎水性が低い順に分子の溶出ができます。分離方法は逆相クロマトグラフィーと類似していますが、タンパク質を変性させることが多いイオンペア試薬や高濃度の有機溶媒は必要ありません。これはシステイン結合した ADC の分析において重要です。ペイロードとして用いた低分子化合物が、部分的に還元したモノクローナル抗体 (mAb) の遊離チオール基と結合しますが、多分散分布となります (図 1)。DAR と呼ばれるこの分布を算出することが、得られた ADC の効能を知るために不可欠です。

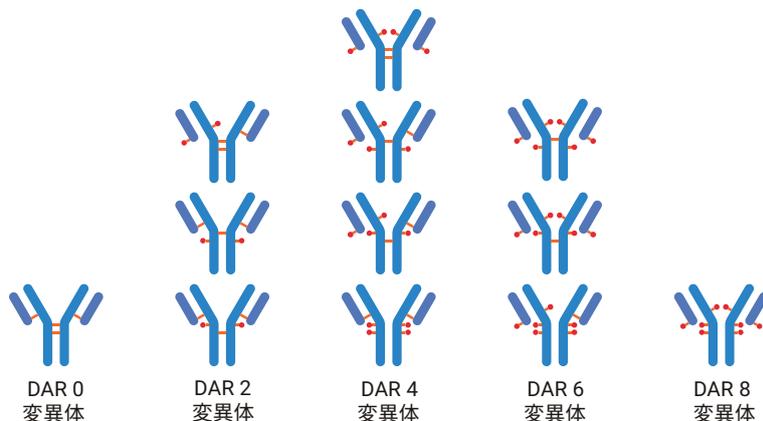


図 1. ペイロード化合物の量と位置が異なるシステイン結合ADC の多分散分布

実験方法

試薬

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用し、Sigma-Aldrich (現 Merck) または VWR Scientific から入手しました。水は、Milli-Q A10 純水製造装置 (Millipore) で精製しました。

装置構成

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC は次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)、サンプル冷却システム (オプション #100) 付
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、バイオイナート熱交換器 (オプション #019) 付
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、バイオイナートフローセル (オプション #028) 付

ソフトウェア

Agilent OpenLab 2.2 CDS

メソッド条件

HPLC	
カラム	AdvanceBio HIC 4.6 × 100 mm (部品番号 685975-908) AdvanceBio HIC 4.6 × 30 mm (部品番号 681975-908)
移動相	溶離液 A) 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 溶離液 B) 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 2 M の硫酸アンモニウム 溶離液 C) プロパン-2-オール 溶離液 D) HPLC グレード水
流量	0.5 mL/min
カラム温度	25 °C
注入量	5 µL
合計分析時間	31 分

典型的なグラジエントプロフィール (図 2 参照)

時間	%A	%B	%C
0	50	45	5
15	75	0	25
20	75	0	25
21	50	45	5
31	50	45	5

結果と考察

HIC で使用する高濃度の塩には、完全なバイオイナート LC が適しています。特に、塩の沈殿を避けるために、シール洗浄やニードル洗浄などの追加の機能を使用する場合があります。しかし、短時間でも LC システムやカラムが高濃度の塩溶液に触れるのを避けることが重要です。そのため、クォータリ LC システムを用いると、他のチャンネルを有機溶媒や水またはその他の洗浄溶媒に使用できます。mAb と複合体を形成した低分子の疎水性医薬品により、mAb 分子全体の疎水性が大幅に変化し

ます。そのため、移動相に少量の有機溶媒を添加する必要があります (メソッド条件およびグラジエントプロフィールを参照)。

HIC を用いると、システイン結合 ADC をインタクトな状態で分析できます (図 2)。逆相クロマトグラフィーで分析すると、システイン結合していない重鎖および軽鎖が分離します。逆相クロマトグラフィーでシステイン結合 ADC の分析は可能ですが、分子が完全に還元された場合に限られます¹。

異なる DAR 変異体のピーク面積を積分することにより、全体の DAR を計算できます (式 1)。

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ ピーク面積} \times n_{\text{変異体}}}{\text{総 LC ピーク面積}}$$

式 1

表 1 にサンプルの計算値を示します。DAR 4.04 は予測値と一致しており、以前得られた値²とも一致しています。

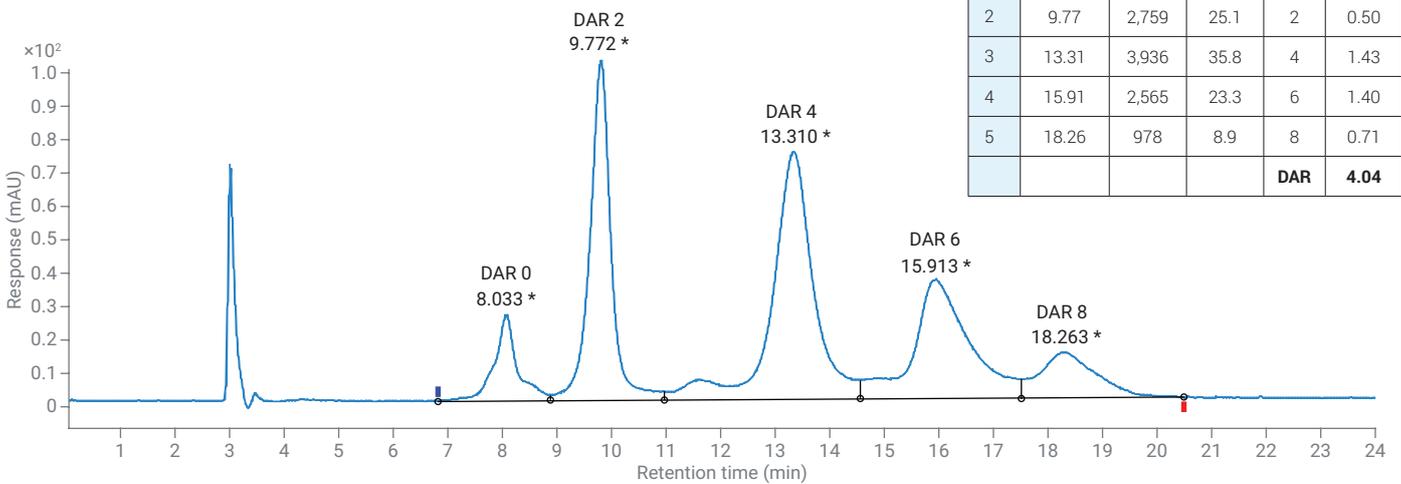


図 2. HIC によるプレントキシマブ ベドチン (アドセトリス) の分析

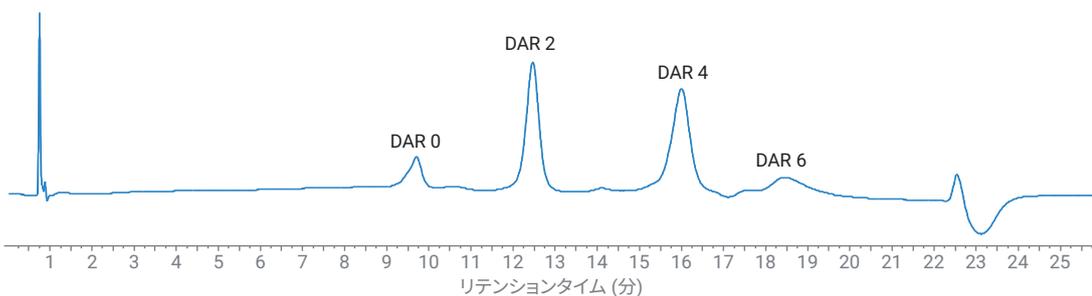
表 1. ピーク面積による DAR の結果

No.	RT (分)	面積	% 面積	DAR	
1	8.03	763	6.9	0	0.00
2	9.77	2,759	25.1	2	0.50
3	13.31	3,936	35.8	4	1.43
4	15.91	2,565	23.3	6	1.40
5	18.26	978	8.9	8	0.71
				DAR	4.04

サンプルを完全に溶解させ、DAR 変異体が識別できないよう、サンプル前処理では注意する必要があります。DAR 0 は、DAR 8 より親水性が高く、移動相に選択的に溶解されるからです。そのため、すべてのサンプルが完全に溶解されない場合には、誤った結果が得られます。

また、移動相条件にプロパン-2-オールグラジエントが含まれていることが重要です。含まれていないと、DAR 6 および DAR 8 変異体がカラムに吸着したままになる可能性があります。図 3A、3B、3C に示すように、プロパン-2-オール濃度が不十分な場合、疎水性の高い DAR 6 および DAR 8 変異体はカラムに保持されたままです。

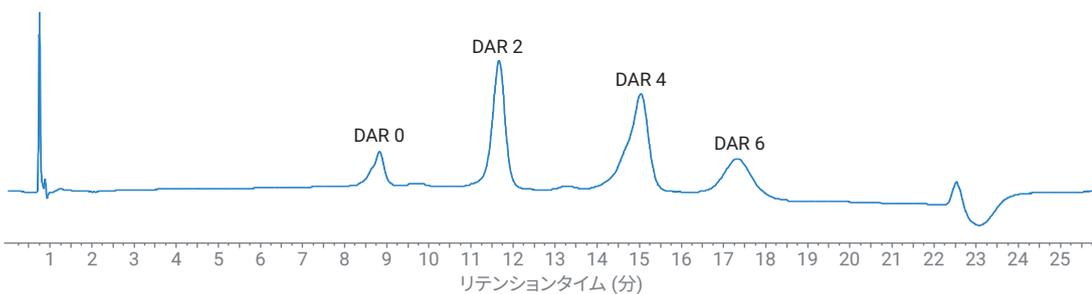
A プロパン-2-オール グラジエント 5~10 %



A. 5~10% グラジエントのプロファイル

時間	%A	%B	%C
0	20	75	5
15	90	0	10
20	90	0	10
21	20	75	5
26	20	75	5

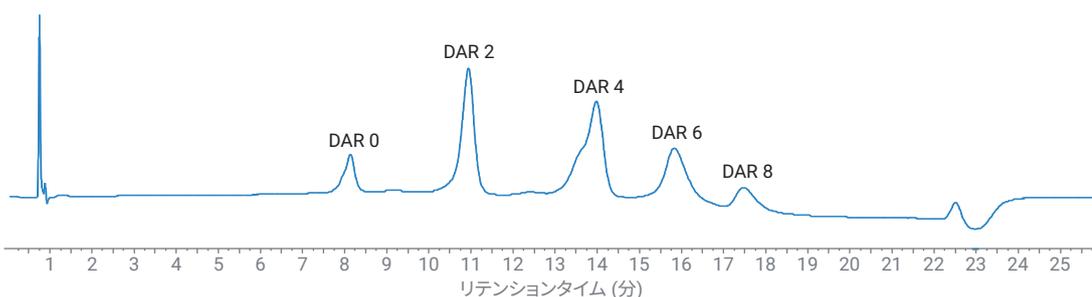
B プロパン-2-オール グラジエント 5~15 %



B. 5~15% グラジエントのプロファイル

時間	%A	%B	%C
0	20	75	5
15	85	0	15
20	85	0	15
21	20	75	5
26	20	75	5

C プロパン-2-オール グラジエント 5~20 %



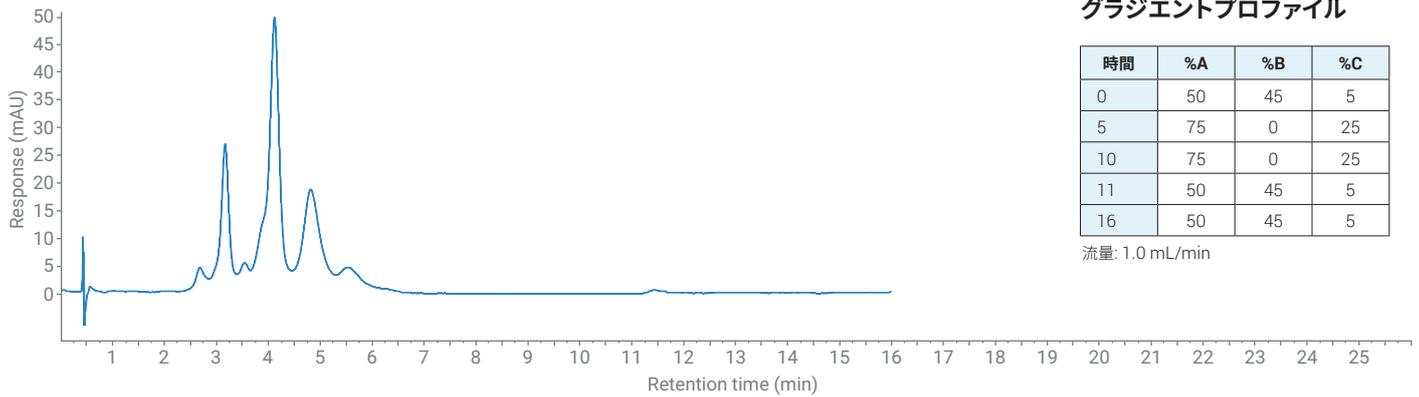
C. 5~20% グラジエントのプロファイル

時間	%A	%B	%C
0	20	75	5
15	80	0	20
20	80	0	20
21	20	75	5
26	20	75	5

図 3. ADC の DAR 変異体分離におけるプロパン-2-オールのグラジエント効果

グラジエント中の有機溶媒の必要量や、流量とカラム長を適切にすることで、10 cm の長いカラムを用いた緩やかなグラジエント (図 5) と比べて、3 cm の短いカラム (図 4) で分離時間を大幅に短縮できます。表 2 および 3

の結果は、これらのクロマトグラムから求めた DAR 値がほぼ同じであることを示しています。

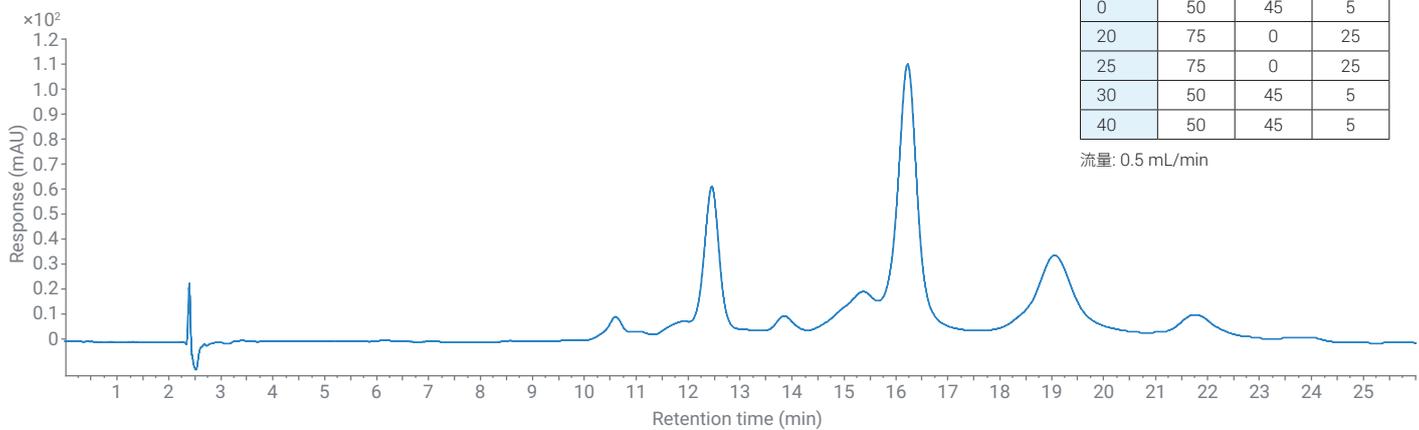


グラジエントプロフィール

時間	%A	%B	%C
0	50	45	5
5	75	0	25
10	75	0	25
11	50	45	5
16	50	45	5

流量: 1.0 mL/min

図 4. AdvanceBio HIC 4.6 × 30 mm カラムによる ADC の高速 (8 分間) 分離



グラジエントプロフィール

時間	%A	%B	%C
0	50	45	5
20	75	0	25
25	75	0	25
30	50	45	5
40	50	45	5

流量: 0.5 mL/min

図 5. AdvanceBio HIC 4.6 × 100 mm カラムによる ADC の低速 (24 分間) 分離

表 2. 高速分離 (8 分間) の DAR 値 (図 4)

No.	RT (分)	面積	% 面積	DAR	
1	2.66	61.5	3.2	0	0.0
2	3.14	321.4	16.9	2	0.3
3	4.10	894.1	46.9	4	1.9
4	4.80	471.1	24.7	6	1.5
5	5.52	158.0	8.3	8	0.7
				DAR	4.4

表 3. 低速分離 (24 分間) の DAR 値 (図 5)

No.	RT (分)	面積	% 面積	DAR	
1	10.61	304.3	3.0	0	0.0
2	12.46	1,768.9	17.2	2	0.3
3	16.22	4,905.3	47.7	4	1.9
4	19.04	2,420.5	23.5	6	1.4
5	21.76	879.1	8.6	8	0.7
				DAR	4.4

結論

このアプリケーションノートでは、適切な流量やカラムを選択し、移動相組成をコントロールすることにより、AdvanceBio HIC カラムを用いて ADC の DAR 値を迅速かつ高精度で分析できることを実証しました。

参考文献

1. S. Zuo, Measuring Drug-to-Antibody Ratio (DAR) for Antibody Drug Conjugates (ADCs) with UHPLC/Q-TOF, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-6559EN, **2016**.
2. S. Schneider, Analysis of Cysteine-Linked Antibody Drug Conjugates, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8493EN, **2017**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, July 26, 2018
5994-0149JAJP