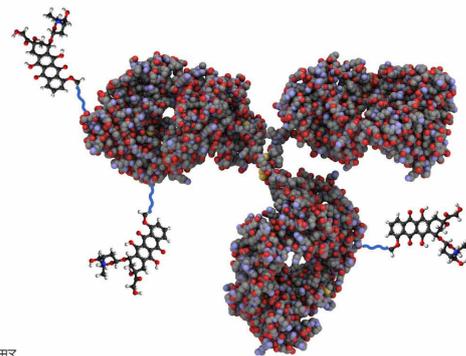


直交型分析メソッドによる 抗体薬複合体の品質の向上



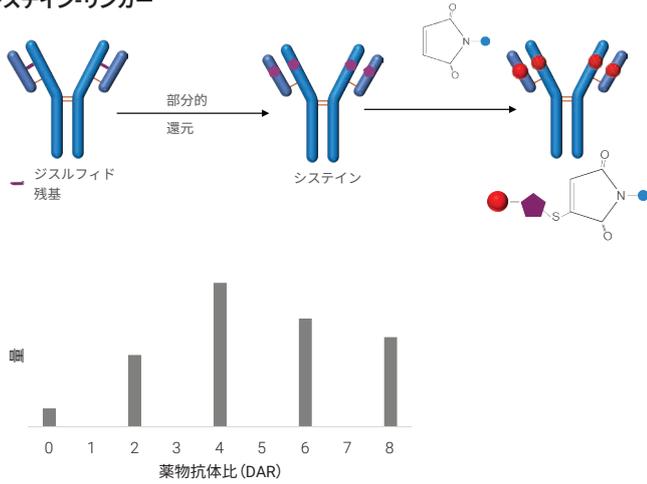
抗体薬複合体

抗体薬複合体（ADC）は新世代の期待すべき生物製剤であり、創薬パイプラインにおける急成長分野です。ADC は、細胞傷害性薬剤を、特定の細胞を標的とするモノクローナル抗体（mAb）にリンカー経路で付着することで生成されます。2019 年/2020 年に US FDA により承認された ADC は、システインおよびリジンでの複合化を基にしており、大多数はシステインリンカーです。

表 1. 2019 ~ 2020 年に承認された ADC

名前	IgG アイソタイプ	ターゲット	リンカー部位	ペイロード
ゲムツズマブオゾガマイシン	IgG4	CD33	リジン	カリケアマイシン
ブレンツキシマブベドチン	IgG1	CD30	システイン	アウリスタチン (MMAE)
トラスツズマブエムタンシン	IgG1	HER2	リジン	メイタンシン (DM1)
イノツズマブオゾガマイシン	IgG4	CD22	リジン	カリケアマイシン
ボラツズマブベドチン	IgG1	CD79b	システイン	アウリスタチン (MMAE)
エンホルツマブベドチン	IgG1	ネクチン 4	システイン	アウリスタチン (MMAE)
トラスツズマブデルクステカン	IgG1	HER2	システイン	トポイソメラーゼ I 阻害薬
サシツズマブゴビテカン	IgG1	TROP-2	システイン	イリノテカンの活性代謝物 (SN-38)
ペランタマブマフオドチン	アフコシル化 IgG1	BCMA	システイン	アウリスタチン (MMAF)

システイン-リンカー



リジン-リンカー

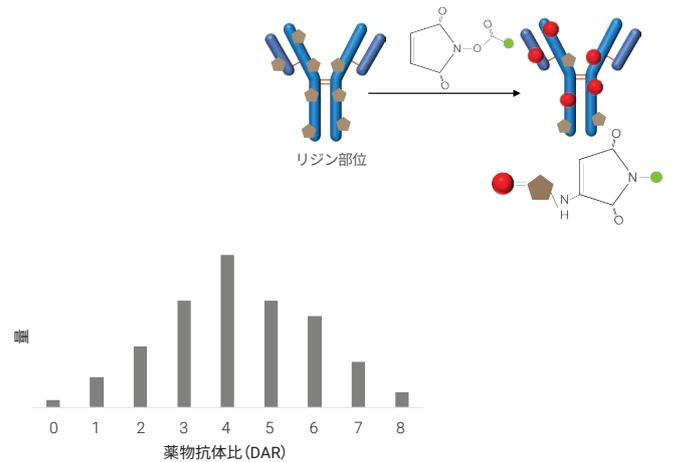


図 1. ADC 複合化のタイプ

システイン複合化では、ヒンジ領域での鎖間ジスルフィド結合の還元により、2 の倍数で最大 8 個の薬物を付着できます。多くの場合リジンリンカーは、高い不均質性を示します。例えば、トラスツマブエムタンシンには、トラスツマブ分子全体で 90 種類のリジン残基が存在しており、各分子には最大 8 個の DM1 複合体が含まれている場合があります。

業界では「早いうちに、安いうちに失敗しよう」という戦略を採用して、最終製品の承認の可能性を高めているため、ADC の構造と機能の関係について早期に短期間で十分に理解しておくことが不可欠です。これを達成するには、さまざまな直交型分析技法を使用して、分子の構造と機能の各側面を特性解析します。

通常、抗体に複合化して ADC を生成する低分子は疎水性です。システイン結合 ADC では、DAR 値が大きくなるとともに全体の疎水性が高くなるため、DAR モニタリングには疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) が完璧なツールです。反対に、リジン結合 ADC には多数のリジン残基が存在しており、位置異性体の混合物で構成されています。HIC は、リジン結合 ADC を分解するための推奨メソッドではありません^{7, 8}。逆相クロマトグラフィー (RP) と質量分析検出 (MS) (RP-MS) が最適のメソッドです。RP はインタクト mAb とフラグメントの両方に対して優れた選択性を提供している一方、MS は高感度と質量情報を提供しており、この両方がピーク同定に非常に重要です。これは、リジン結合 ADC の研究に不可欠です。その理由は、フラグメントには非複合化および可変的に複合化された軽鎖と重鎖、およびリンカーが単独で存在する軽鎖と重鎖が含まれているためです⁷。

ADC を形成する疎水性ペイロードの付着により、疎水性凝集も促進されます⁹。凝集体および分解物は低濃度で存在しますが、生物製剤の品質に大きな影響を与えるため、効能の損失、溶解性の低減、免疫原性の増大を引き起こします。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、タンパク質の凝集体の特性解析に使用される標準メソッドです。

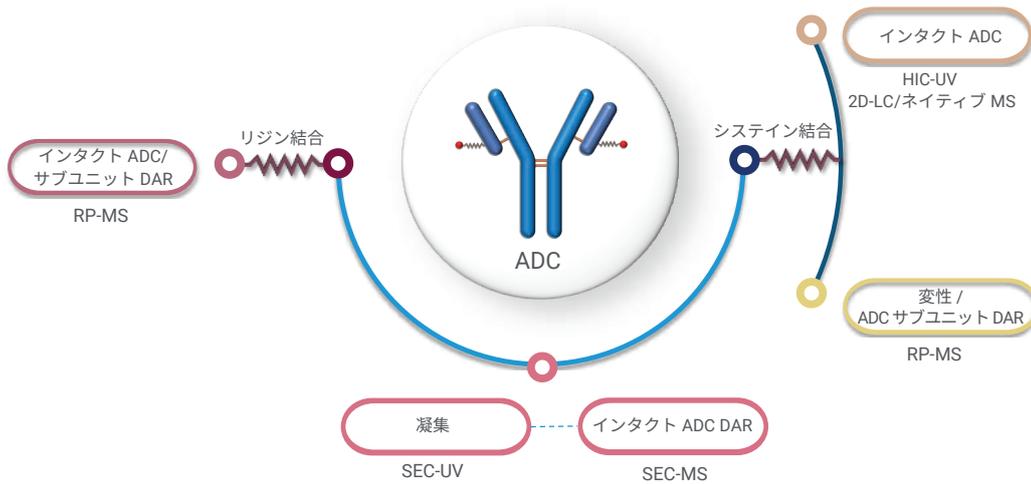


図 2. ADC を特性解析するための直交型メソッド

分離を最適化するためのヒント

サンプル前処理

- ADC サンプルは疎水性を示す傾向があるため、溶出液での溶解性を確保することが重要です。サンプルを初期移動相に溶解させるのが理想的です。
- 凝集体や不純物により発生する可能性のある損傷からカラムを保護するために、HPLC 分析の前に Captiva プレミアム PES シリンジフィルタ（「標準品、カラム、消耗品などの情報」セクションを参照）を使用して、サンプルをろ過することを推奨します。
- 複雑または「夾雑物が多い」サンプルを取り扱う際には、ガードカラム（「標準品、カラム、消耗品などの情報」セクションを参照）を使用して、カラム寿命を延長します。

Agilent AdvanceBio HIC カラム :

ADC のネイティブ型で DAR をモニタリング

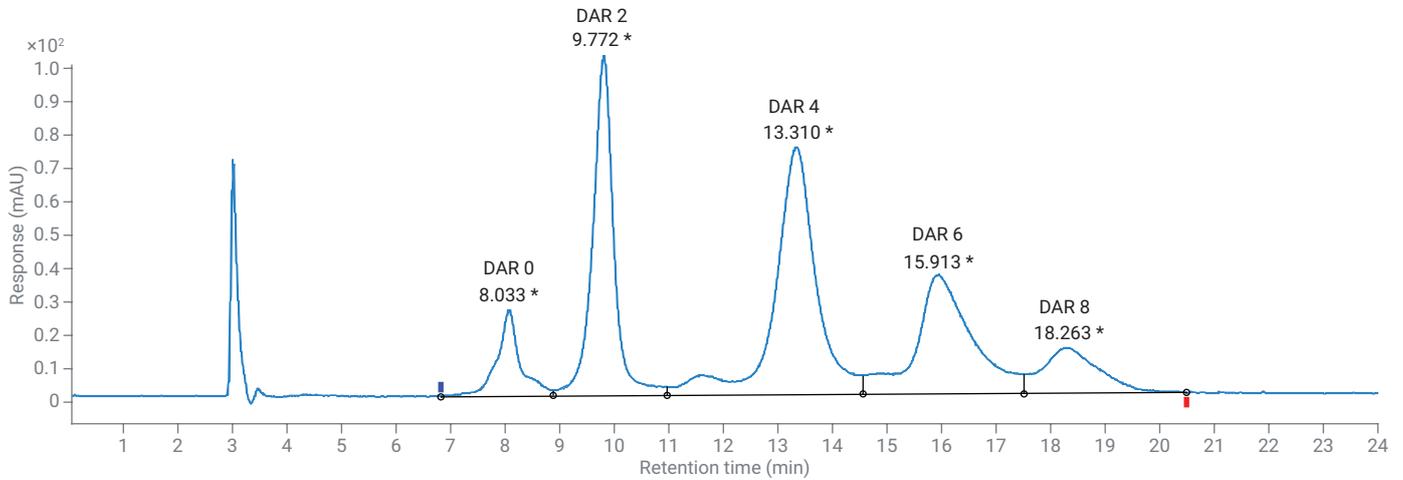


図 3. AdvanceBio HIC カラムによる抗体薬物複合体 (ADC) の薬物抗体比 (DAR) 分析 (5994-0149JAJP)

疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)

HIC では、生体分子の溶解性を低減させる移動相を含む高濃度の塩を使用します。これにより HIC 固定相への吸着が促されます。塩のグラジエント溶出により、疎水性が低い順に分子を溶出できます。HIC で使用されている塩の濃度は高いため、バイオナート LC を推奨します。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、クォータナリ LC システムを用いると、他のチャ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。DAR の高次を正確に測定してカラム寿命を延長するために、2-プロパノールが必要です¹。

- 硫酸アンモニウムは、疎水性タンパク質の相互作用をカラムに誘導する機能を備えているため HIC で一般的に使用されている塩ですが、沈殿物が生成される可能性も高くなります。沈殿物の生成を防止する最適な方法は、サンプルを高濃度の硫酸アンモニウムで希釈して、サンプルマトリックスを可能な限り初期の移動相に近づけることです²。利点は次のとおりです。
 - 最適なピーク形状と高感度を実現
 - 注入の前にサンプルが沈殿するかどうかをあらかじめ判別し、サンプルがカラムのヘッドに沈殿するのを回避
- グラジエントの最後に、数分間にわたって比較的低速の逆グラジエントを使用します。カラム容量の 2 ~ 3 倍の量で再平衡化します。(取扱説明書)。
 - 塩濃度の変化により粘度を劇的に変化させるためには、カラムの損傷を避けるために、初期の移動相に徐々に戻すことが必要
- 高温は高粘度の移動相を分析するための一般的なアプローチですが、タンパク質のピーク形状が劣化するため HIC では推奨しません。
- 2 M の硫酸アンモニウムは相当な量です。純度が低い塩を使用した場合、クロマトグラムのベースラインがドリフトする場合があります。
 - ベースラインドリフトを除去するために、[OpenLab CDS ブランク減算](#)を適用することが可能³

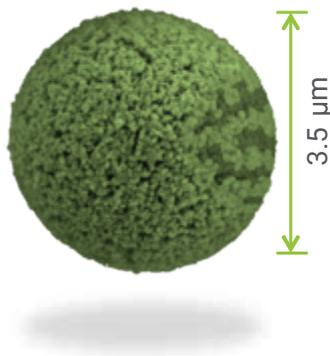


図 4. AdvanceBio HIC (ポアサイズ 450 Å)

Agilent PLRP-S カラム：

インタクト ADC およびサブユニットの DAR のモニタリング

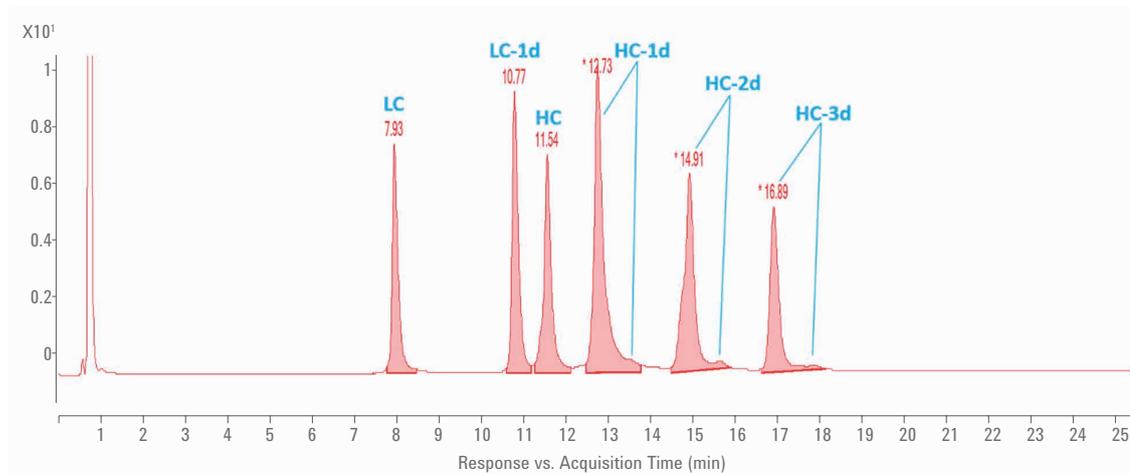


図 5. 逆相クロマトグラフィーとピーク同定により分離した還元ブレンツキシマブペドチンの波長 280 nm における UV 吸収スペクトルを、質量分析で測定しました (5991-6559EN)。

PLRP-S

- ー 通常、逆流してもカラムが損傷することはありませんが、フリットの詰まりを取り除く場合を除いて避けることを推奨します (『Column care (カラムのメンテナンス)』を参照)。
- ー 流量を低い値から開始して徐々に目的の動作流量まで増大させることにより、過剰な圧力を防止します。
- ー 移動相の準備には、高純度の試薬と、クロマトグラフィーグレードの溶媒を必ず使用してください。使用前に必ず移動相を脱気して過してください。
- ー インラインフィルタを使用してカラムを保護し、寿命を延長します。
- ー 水 100% の移動相を PLRP-S カラムに使用するとカラムの寿命が著しく短くなるため避けてください。また、ピーク幅およびピーク対称性に悪影響を及ぼすことがあります。

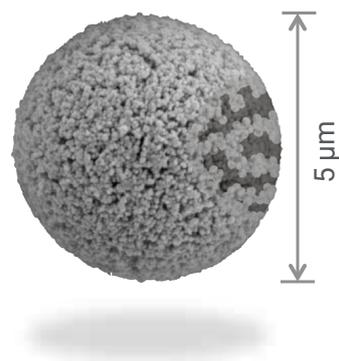


図 6. PLRP-S (ポアサイズ 1000 Å)

Agilent AdvanceBio SEC カラム :

モノマー、ダイマー、凝集体、および分解物のモニタリング

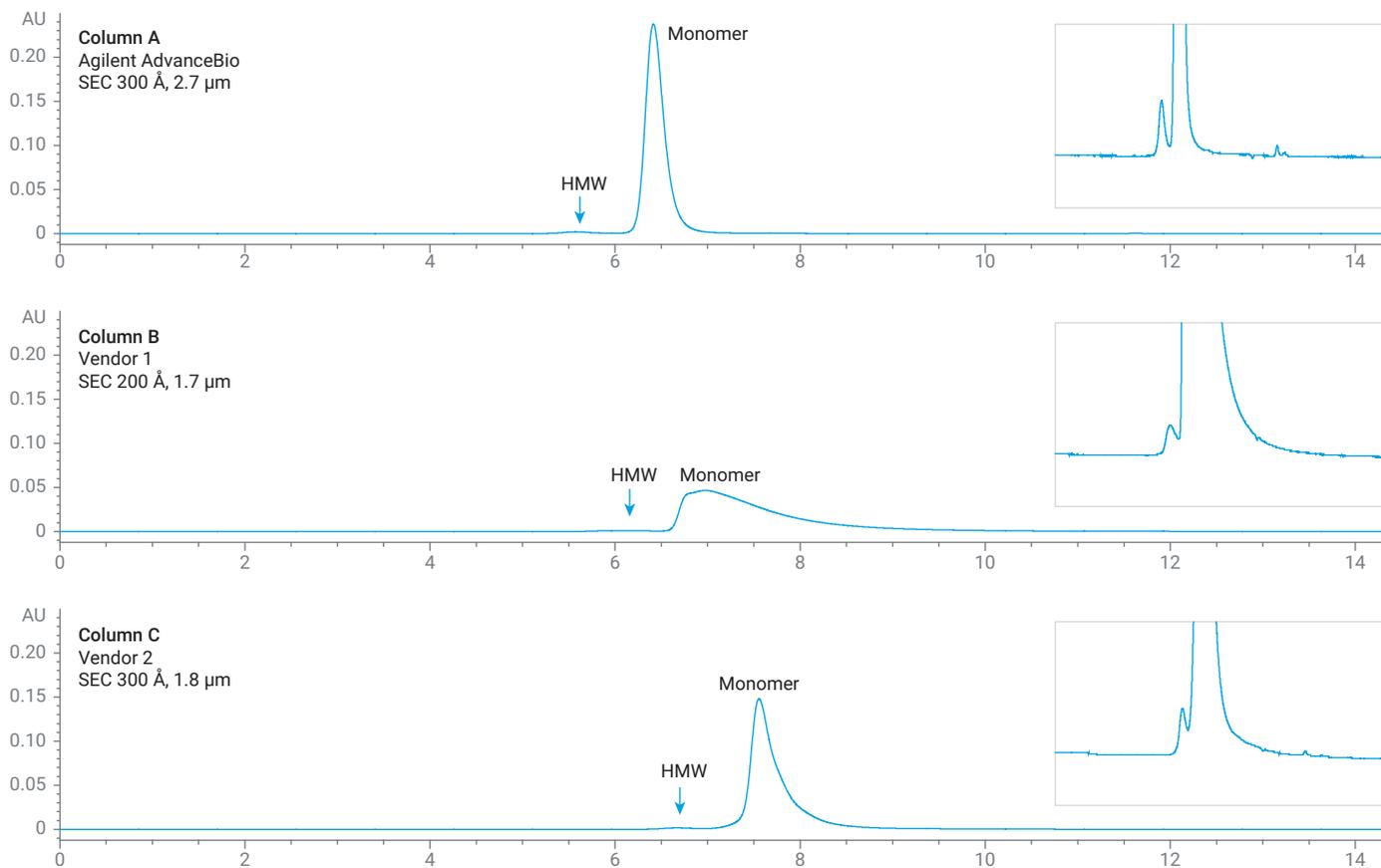


図 7. AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μm、リジン結合トラスツマブエムタンシンの分析用。カラム B では、ピークが分離されていないことからわかるように、二次的な相互作用が増大しています。カラム C ではピーク形状が多少狭くなっていますが、分解能は AdvanceBio SEC カラムを下回っています (5994-3276EN)。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

凝集体分析は、ADC 特性解析の別の重要な品質特性です。この分析は、抗体に付着した細胞毒性薬物が存在するため複雑になります。この薬物は凝集を誘導して、不純物のプロファイルがさらに複雑になる場合があります。凝集体およびフラグメントの定量において SEC は効果的ですが、依然として課題は存在します。多くの場合、ADC は mAb 単独の場合と比較して疎水性が高いため、非特異的な相互作用の影響を受けやすくなります。不活性で親水性を示す結合表面ケミストリを提供する固定相を選択して、凝集状態に影響を与える可能性のある有機溶媒を使用せずに、二次的な相互作用を最小限に抑えます。

ネイティブ LC/MS メソッドでは、システイン結合およびリジン結合 ADC DAR も測定できます。アジレントでは、ネイティブ LC/MS 条件下でインタクトシステイン結合の DAR を特性解析するための 2D-LC/MS メソッド¹⁰を開発しました。ワークフローでは、Agilent AdvanceBio HIC カラム、Agilent AdvanceBio SEC カラム、および高感度の MS メソッドを使用して、さまざまな DAR を持つすべての ADC のインタクト質量を正確に測定します。同様に、アジレントでは、Agilent AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 μm カラム、および Agilent Jet Stream イオン源付き 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを使用するネイティブ LC/MS メソッド¹¹を開発しました。このメソッドでは、移動相中の有機溶媒と酸からの干渉を最小限に抑えており、リジン結合 ADC に最適です。

- カラムが長いほど分解能が向上するため、モノマーからの高次の凝集体の分離に適しています。
- [AdvanceBio SEC 300 Å、2.7 μm カラム](#)は、さまざまなカラム長と直径で使用するにより、ADC 凝集体とモノマーを高速かつ正確に定量できます ([取扱説明書](#))。
- pH 7.4 の水系の移動相 PBS は、システイン結合およびリジン結合 ADC の両方に対して優れた分解能を実現しています⁶
- 塩濃度が高いと、ADC のピーク分離は改善されません⁶

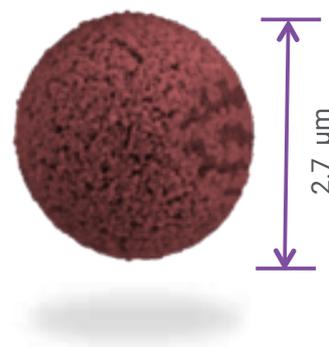


図 8. AdvanceBio SEC (ポアサイズ 300 Å)

標準品、カラム、消耗品などの情報

説明	部品番号
サンプル前処理消耗品	
Captiva ディスポーザブルシリンジ、5 mL、100 個	9301-6476
Captiva プレミアムシリンジフィルタ、PES、15 mm、0.2 μm、100 個	5190-5096
標準物質	
Agilent-NISTmAb、25 μL	5191-5744
Agilent NISTmAb、4 × 25 μL	5191-5745
AdvanceBio SEC 300 Å 用標準液	5190-9417
AdvanceBio HIC カラム	
AdvanceBio HIC、4.6 x 100 mm、3.5 μm	685975-908
AdvanceBio HIC、4.6 x 30 mm、3.5 μm	681975-908
AdvanceBio PLRP-S カラム	
PLRP-S 1000 Å、1.0 x 50 mm、5 μm	PL1312-1502
PLRP-S 1000 Å、2.1 x 50 mm、5 μm	PL1912-1502
PLRP-S 1000 Å、4.6 x 50 mm、5 μm	PL1512-1502
PLRP-S 1000 Å、5 um、2.1 x 50 mm、PEEK ライナ付き	PL1912-1502PK
PLRP-S 1000 Å、5 um、2.1 x 100 mm、PEEK ライナ	PL1912-2502PK

説明	部品番号
AdvanceBio SEC カラム	
AdvanceBio SEC 300 Å、4.6 x 150 mm、2.7 μm、LC カラム	PL1580-3301
AdvanceBio SEC 300 Å、4.6 x 300 mm、2.7 μm、LC カラム	PL1580-5301
AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 x 150 mm、2.7 μm、LC カラム	PL1180-3301
AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 x 300 mm、2.7 μm、LC カラム	PL1180-5301
AdvanceBio SEC 300 Å、4.6 x 50 mm、2.7 μm、LC ガードカラム	PL1580-1301
AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 x 50 mm、2.7 μm、LC ガードカラム	PL1180-1301
AdvanceBio SEC 200 Å、4.6 x 150 mm、1.9 μm、LC カラム	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å、4.6 x 30 mm、1.9 μm、LC ガードカラム	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å、4.6 x 300 mm、1.9 μm、LC カラム	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 um、2.1 x 150 mm、PEEK ライナ付き	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 um、2.1 x 50 mm、PEEK ライナ付き	PL1980-1201PK
HPLC 消耗品	
超低拡散キット、Bio、Agilent 1290 Infinity II Bio システムで使用	5004-0007
Agilent 1290 Infinity LC シリーズ用超低拡散キット	5067-5189
溶媒と試薬	
InfinityLab UltraPure LC/MS アセトニトリル、1 L	5191-4496
InfinityLab UltraPure LC/MS 用純水、1 L	5191-4498
ギ酸 - 純度 99.5 %	G2453-85060

説明	部品番号
カラムフィッティングとコネクタ	
Agilent InfinityLab クイックコネクタフィッティング (カラム入口での接続用)	5067-5965
Agilent InfinityLab クイックコネクタキャピラリー MP35N 0.12 x 105 mm (クイックコネクタフィッティング用)	5500-1578
Agilent InfinityLab クイックターンフィッティング (カラム出口での接続用)	5067-5966
クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 x 280 mm (クイックターンフィッティング用)	5500-1596
クイックターンフィッティング用取り付けツール	5043-0915
キャピラリー MP35N 0.17 x 100 mm SL/SL ps/ps (SEC ガードおよびカラムの接続用)	5500-1278
キャピラリー MP35N 0.12 x 90 mm SL/SL ns/ns (PLRP-S ガードおよびカラムの接続用)	5004-0018
溶媒処理消耗品	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティページボトル、1 L	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き (活性炭フィルタ 5043-1193 は含まれない)	5043-1221
タイムストリップ付き InfinityLab 活性炭フィルタ、58 g (5043-1221 で使用)	5043-1193
溶媒ろ過消耗品	
InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ	5191-6776
InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L	5191-6781
メンブレンフィルタ、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、 100 個	5191-4341
メンブレンフィルタ、再生セルロース 47 mm、 ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4340
溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm	5041-2168
サンプル容器	
A-Line スクリューバイアル、2 mL、茶色、ラベル付、100 個	5190-9590
スクリューキャップ、圧着、青色、PTFE/シリコンセブタム、100 個	5190-7021
バイアル、スクリュートップ、透明、高回収率、5 mL、LC 用、30 個	5188-5369
セブタム、スリット入り PTFE/シリコン、16 mm、100 個	5188-2758
キャップ、スクリュー、6 mL バイアル用、100 個	9301-1379
InfinityLab 96 ウェルプレート、2.0 mL、丸型ウェル、U 底、 ポリプロピレン、45 mm、30 個	5043-9302
InfinityLab 96 ウェルプレート、2.2 mL、スクウェアウェル、U 底、 ポリプロピレン、41 mm、30 個	5043-9300

注：ADC DAR カリキュレータアップグレード（部品番号 G4994AA）は、ADC から取り込んでデコンポリユートした LC/MS サンプルデータの DAR 比を確認するように設計された MassHunter DAR カリキュレータソフトウェアで使用できます。製品情報については、最寄りのアジレント販売店までお問い合わせください。

参考文献

1. 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
[5994-0149JAJP](#)
2. A Trio of Techniques on the Road to Complete CQA Characterization: Glycosylation, Aggregation, and DAR
[5994-2097EN](#)
3. High Salt—High Reproducibility
[5994-2691EN](#)
4. PLRP-S Polymeric Reversed-Phase Column for LC/MS Separation of mAbs and ADC
[5991-7163EN](#)
5. Measuring Drug-to-Antibody Ratio (DAR) for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) with UHPLC/Q-TOF
[5991-6559EN](#)
6. Evaluation of SEC Columns for Analysis of ADC Aggregates and Fragments
[5994-3276EN](#)
7. Analysis of Antibody-Drug Conjugates Using Size Exclusion Chromatography and Mass Spectrometry
[5991-6439EN](#)
8. Analysis of Monoclonal Antibodies
[5991-6376EN](#)
9. Jakob W. Buecheler, Matthias Winzer, Jason Tonillo, Christian Weber, and Henning Gieseler Molecular Pharmaceutics 2018 15 (7), 2656-2664 DOI: [10.1021/acs.molpharmaceut.8b00177](#)
10. Characterization of Antibody-Drug Conjugates Using 2D-LC and Native MS
[5994-4328EN](#)
11. Sensitive Native Mass Spectrometry of Macromolecules Using Standard Flow LC/MS
[5994-1739EN](#)

Agilent CrossLab サービス

Agilent CrossLab は、サービスと消耗品を統合してワークフローをサポートし、お客様の生産性の向上や運用の効率化などの重要な成果を実現するための機能です。アジレントは CrossLab を通じてあらゆる場面で「見えない価値」を提供し、お客様の目標達成を支援します。CrossLab は、メソッドの最適化、柔軟なサービスプラン、あらゆるスキルレベル向けのトレーニングを提供します。またお客様が機器やラボを管理して最高の性能を実現できるように、その他の製品やサービスも多数ご用意しています。

Agilent CrossLab の詳細と、見えない価値から優れた成果を生み出す例については、ホームページをご覧ください。



ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

DE73791623

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, August 2, 2022
5994-5089JAJP

