

HIC による 信頼性の高い mAb のスクリーニング

タンパク質精製の適切な分析



疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）は、タンパク質精製の主要な手法です。HIC では、生体分子の溶解性を低減させる移動相を含む高塩を使用します。これにより HIC 固定相への吸着が促されます。塩グラジエントでの溶出により、疎水性が低い順に分子を溶出できます。最近になって、すべての HIC カラムが、リテンションタイムとタンパク質の疎水性（Grand Average of Hydropathicity（GRAVY）とも呼ばれます）の間に直線性のあるレスポンスを示すとは限らないことがわかりました。

今回の考察では、他社 HIC カラムと AdvanceBio HIC を比較しました。AdvanceBio HIC は、タンパク質の疎水性（GRAVY）と優れた相関関係を示し、リテンションタイムは予測可能な溶出挙動を示しましたが、他社 HIC カラムのリテンションタイムは予測しにくい挙動を示しました。



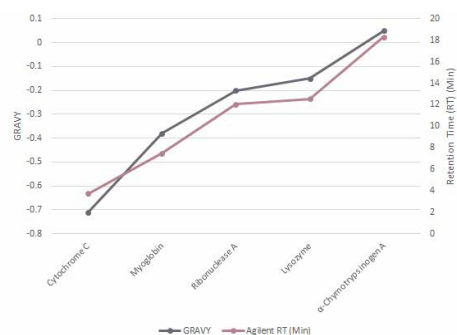
インタクトプロテインの堅牢な疎水性相互作用クロマトグラフィー

AdvanceBio HIC カラムのカタログをダウンロード

AdvanceBio HIC カラムカタログ

リテンションタイムと GRAVY の間の相関関係：Agilent AdvanceBio HIC カラムの優れた性能

AdvanceBio HIC - リテンションタイムと GRAVY の間の優れた相関関係



他社 HIC カラム - リテンションタイムと GRAVY の間の低い予測可能性

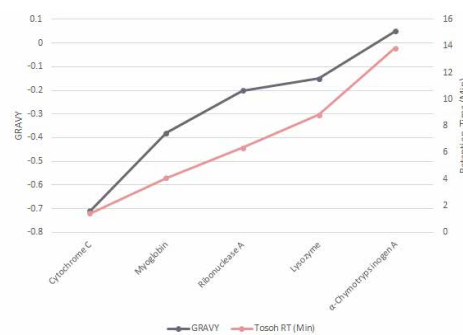


図 1. AdvanceBio HIC と他社 HIC カラムの GRAVY とリテンションタイムの関係。
条件については、2 ページをご覧ください。

タンパク質	GRAVY	他社 リテンションタイム (分)	Agilent リテンションタイム (分)
シトクローム C	-0.71	1.43	1.15
ミオグロビン	-0.38	4.1	3.41
リボヌクレアーゼ A	-0.2	6.34	5.92
リゾチーム	-0.15	8.83	6.17
α-キモトリプシノーゲン A	0.05	13.84	9.24

表 1. GRAVY インデックスとリテンションタイム

HPLC 条件

機器：	Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム 1260 Infinity II バイオイナートクォータナリポンプ (G5654A) 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ、チラーおよびマルチウォッシュ搭載 (G5668A) 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット、バイオイナート熱交換器搭載 (G7116A) 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR、バイオイナートフローセル搭載 (G7115A)
ソフトウェア：	Agilent OpenLab CDS
流量：	0.5 mL/min
溶離液 A：	20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
溶離液 B:	2M (NH4)2SO4 + 20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
サンプル：	シトクローム C リボヌクレアーゼ A リゾチーム α-キモトリプシノーゲン A
温度：	25 °C
注入量：	5 µL
検出：	UV、220 nm

グラジエントプロファイル		
時間 (分)	%A	%B
0	0 %	100 %
20	100 %	0 %
25	100 %	0 %
30	0 %	100 %
40	0 %	100 %

HIC は、抗体薬複合体（ADC）の分析に不可欠なツールでもあります。ADC は、システインまたはリジン側鎖への合成リンカーによりモノクローナル抗体（mAb）に結合された低分子医薬品で構成されている、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。通常、抗体に結合されて ADC を生成する低分子は疎水性です。結合された薬物と mAb の比（薬物抗体比：DAR）は、効力と効能に直接影響を与えるため、ADC 開発の重要な品質特性（CQA）の 1 つです。ADC では、DAR 値が大きくなるとともに、全体の疎水性が向上します。鎖間ジスルフィド結合が低減して分子の安定性が低下するシステイン結合 ADC では、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）は、DAR モニタリング用の最適なツールです。

HIC で使用されている塩の濃度は高いため、バイオイナート 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。

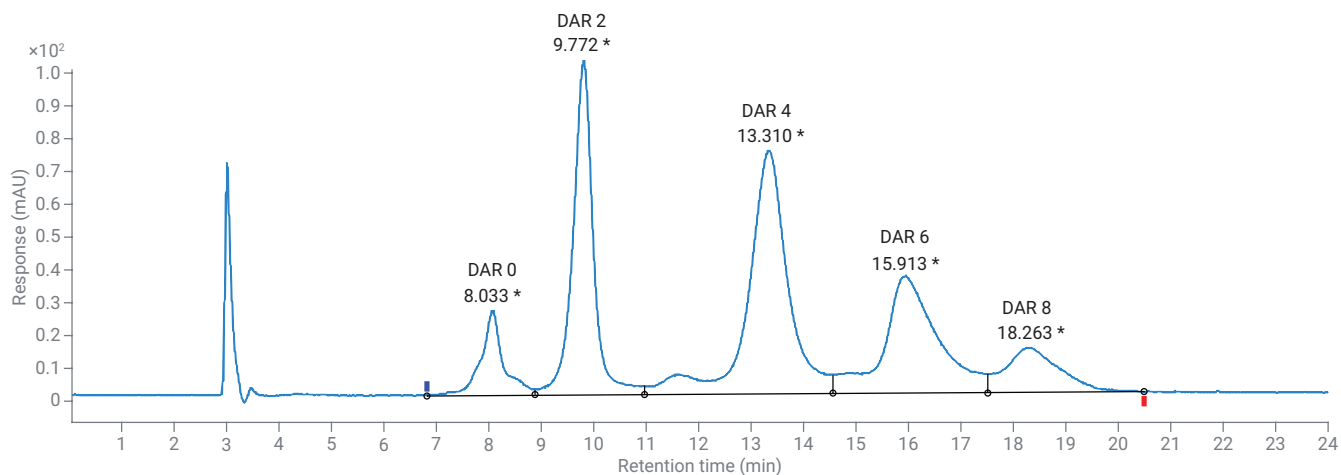


図 2. プレンツキシマブドチンの HIC 分離。条件については、アプリケーションノート [5994-0149JAJP](#) をご覧ください。

LC ネイティブ MS メソッドでは、システイン結合 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²を開発しました。ワークフローでは、一次元目で Agilent AdvanceBio HIC カラム、二次元目で脱塩カラムとして 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。

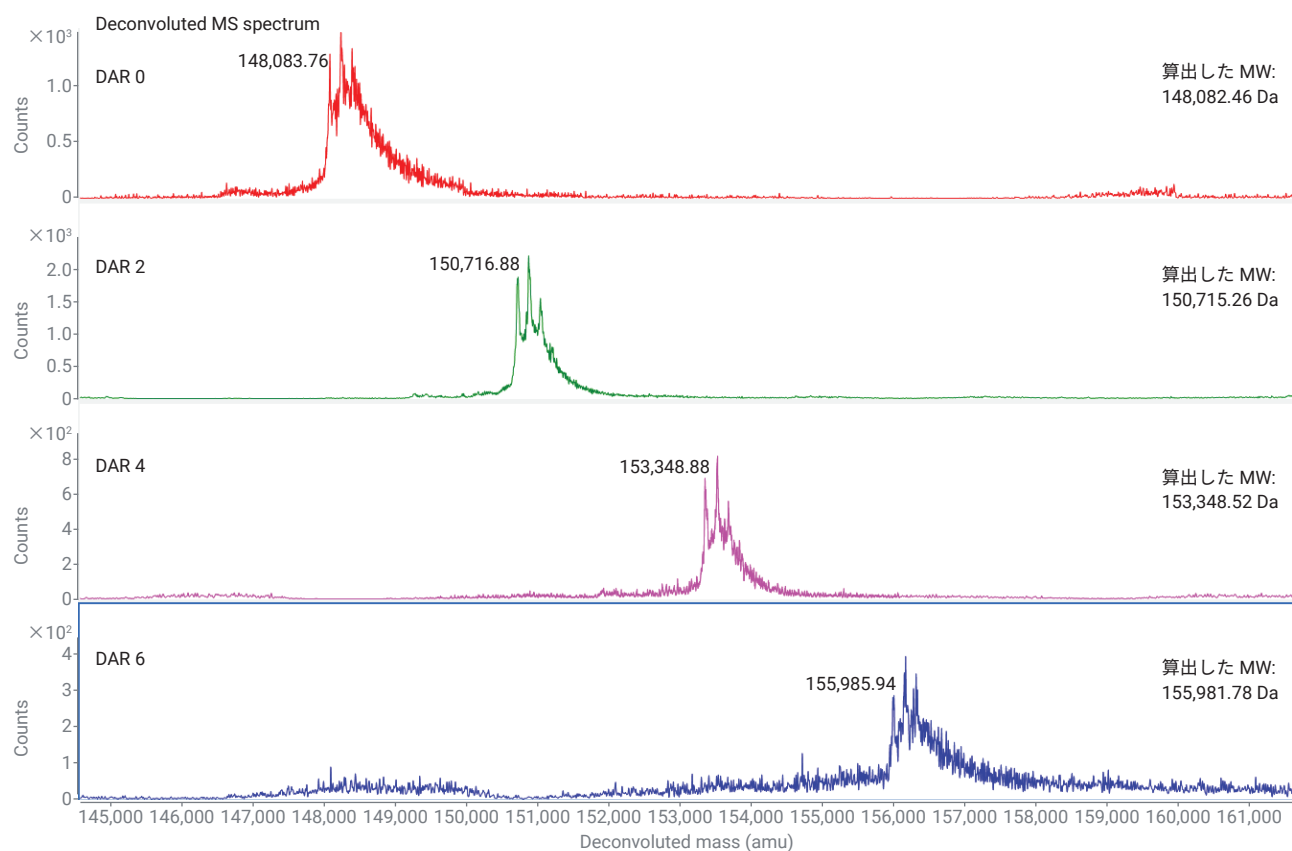
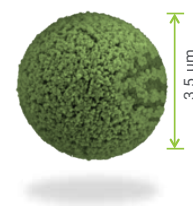


図 3. さまざまなプレントキシマブドチン DAR (DAR 0 ~ DAR 6) のネイティブ SEC LC/MS 分析のデコンボリュートした MS スペクトル。条件については、アプリケーションノート [5994-4328EN](#) をご覧ください。

AdvanceBio HIC カラムには、次の特長があります。

- **最適化された選択性**：mAb 酸化変異体と ADC DAR に対応
- **単一ケミストリ**：CQA ごとの複数のカラムスクリーニングが不要
- **堅牢性の向上**：
 - すべての充填剤バッチが NIST mAb 標準で試験済み
 - すべてのカラムが個別に試験済みで、効率的なパッキングを保証
- **生産性の向上**：短いパイオカラムにより、従来と同じ分離性能で分析の高速化を実現



AdvanceBio HIC カラムには、3.5 µm 全多孔質粒子を充填

AdvanceBio HIC 製品情報

説明	部品番号
AdvanceBio HIC、3.5 µm、4.6 × 100 mm	685975-908
AdvanceBio HIC、3.5 µm、4.6 × 100 mm、メソッドバリデーションキット	685975-908K
AdvanceBio HIC、3.5 µm、4.6 × 30 mm	681975-908
AdvanceBio HIC、3.5 µm、4.6 × 30 mm、メソッドバリデーションキット	681975-908K

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. Characterization of Antibody-Drug Conjugates Using 2D-LC and Native MS [5994-4328EN](#)

AdvanceBio HIC カラムの詳細については、[製品ページ](#) 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

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。

DE47630265

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, September 8, 2022

5994-5252JAJP

CQA モニタリングに アジレント品質を

Agilent AdvanceBio カラムがあれば、複雑な生物製剤分子について信頼性の高い分析結果が得られ、重要品質特性 (CQA) を確実にモニタリングすることができます。

アジレントでは、以下の分析に最適な Agilent AdvanceBio カラムをご用意しています。

- アミノ酸および細胞培地
- インタクトおよびサブユニット
- HIC によるインタクトの分析
- 凝集体および断片
- 電荷変異体
- ペプチドマッピング
- グリカン
- タンパク質抗体価

詳細については、www.agilent.com/chem/advancebio をご覧ください。

