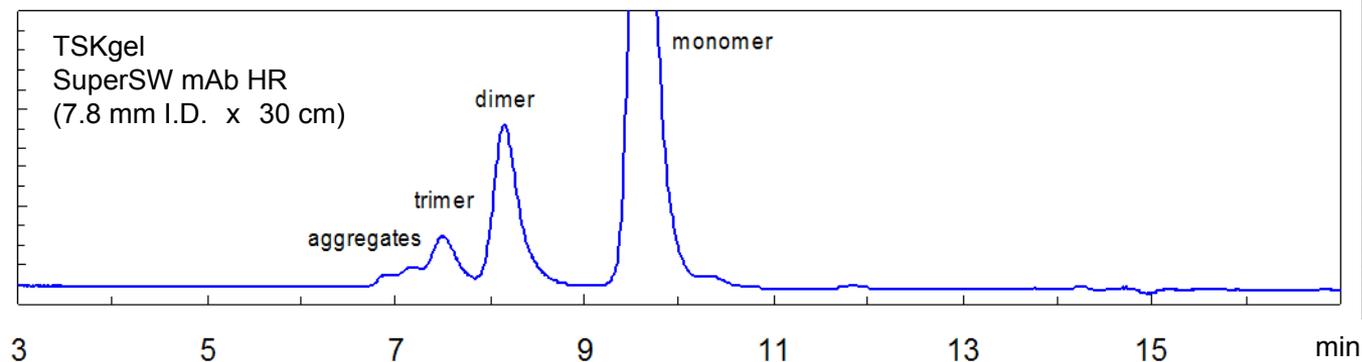
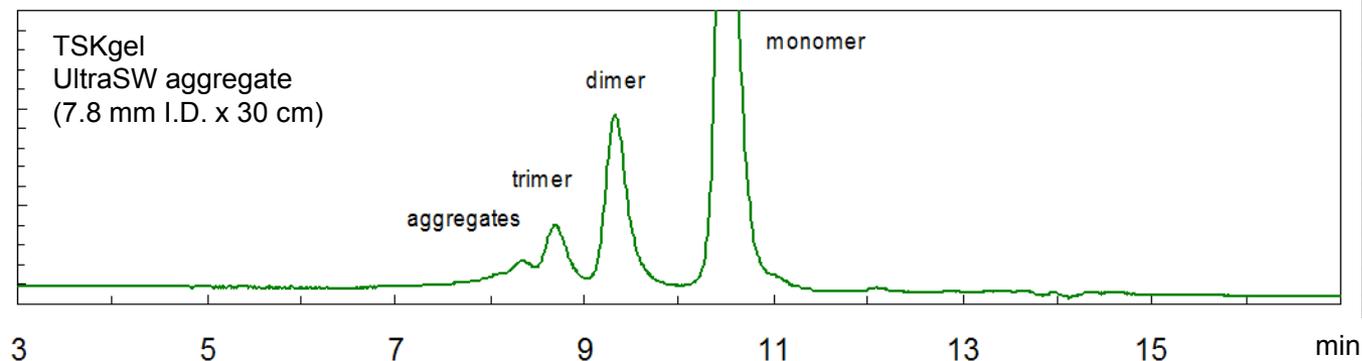


# バイオ医薬品分離へのアプローチ

# 発表内容

- 抗体凝集体の分離(SEC)
- 抗体医薬品のバリエーション分離(IEC)
- 抗体のメチオニン酸化異性体分離(HIC)
- 還元処理した抗体の分離(RPC)
- 糖鎖解析(HILIC)
- PEG化修飾抗体フラグメントの分離(HIC, SEC)
- ADCの分離(HIC, SEC)

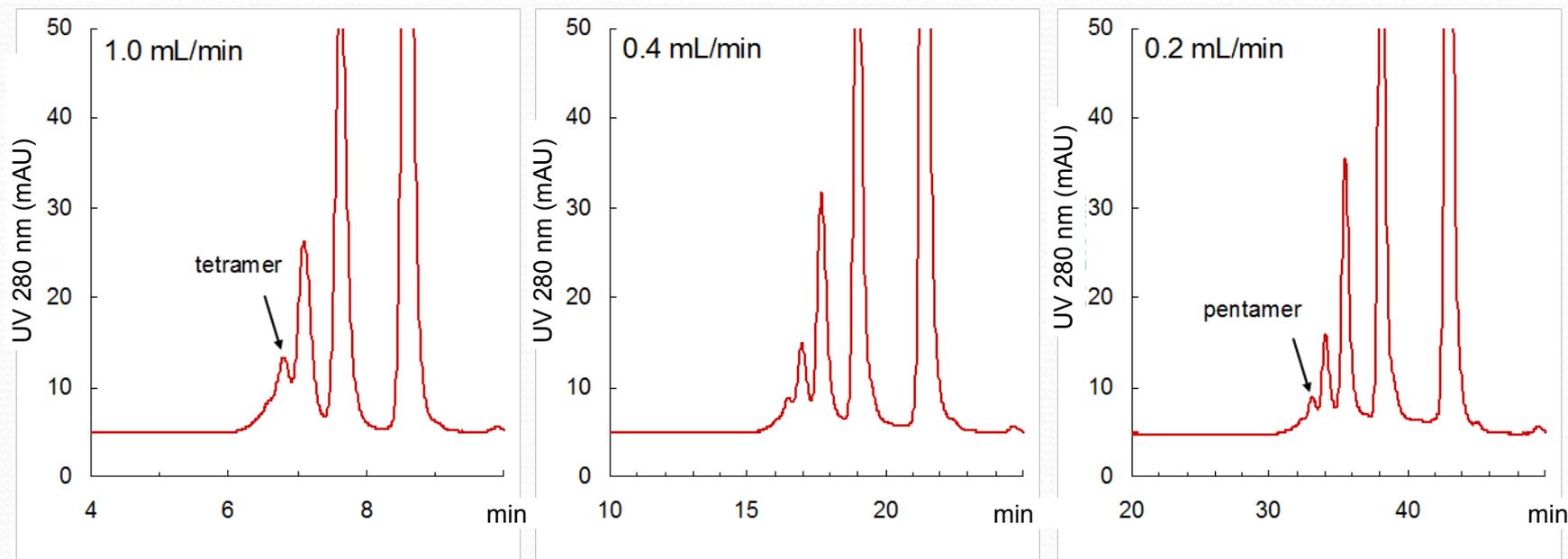
# 抗体医薬品の凝集体の分離(SEC)



## Conditions

- Column : TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mm I.D. x 30 cm), TSKgel SuperSW mAb HR (7.8 mm I.D. x 30 cm)  
Eluent : 0.05 %  $\text{NaN}_3$ を含む0.2 mol/L リン酸塩緩衝液(pH6.7)  
Flow rate : 0.8 mL/min  
Temperature : 25 °C  
Detection : UV(280 nm)  
Sample : monoclonal IgG, mouse-human chimeric

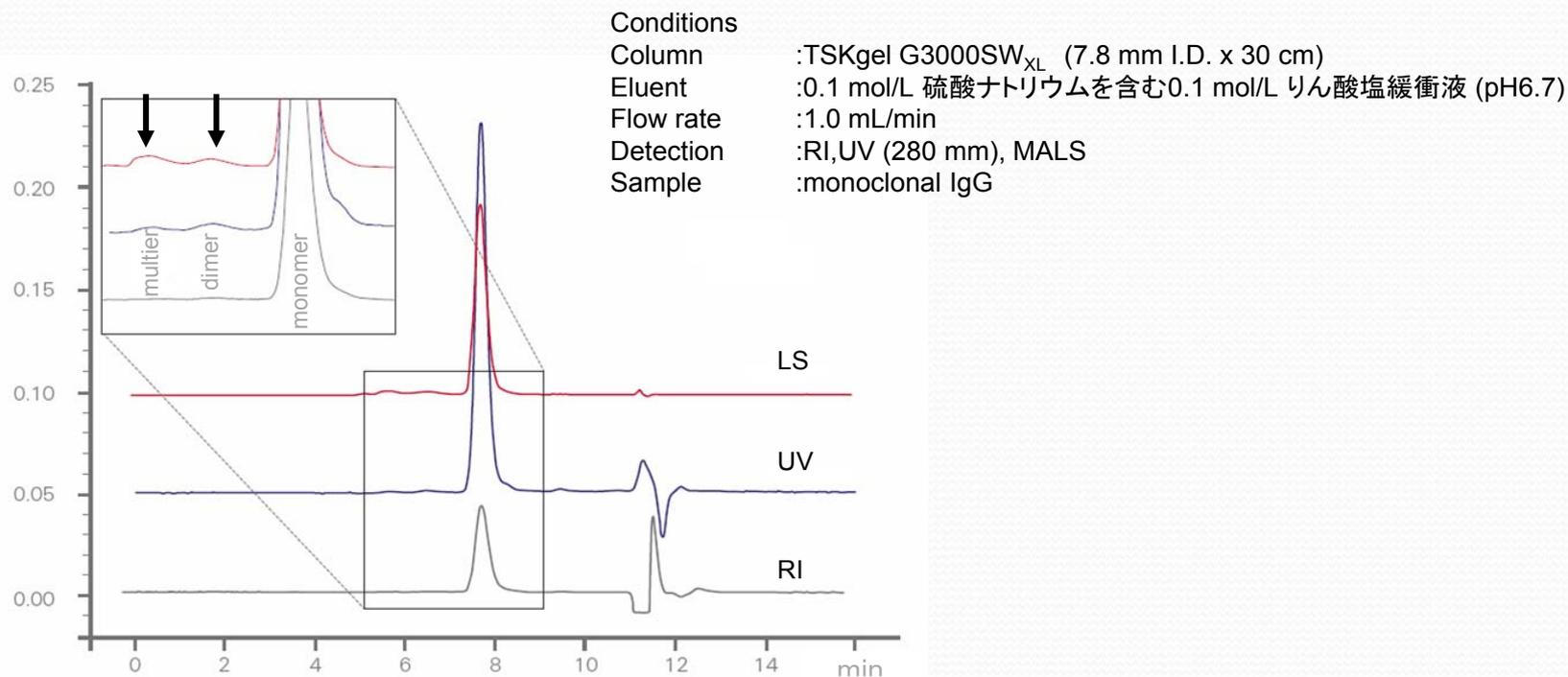
# 抗体の凝集体の精密分離(SEC)



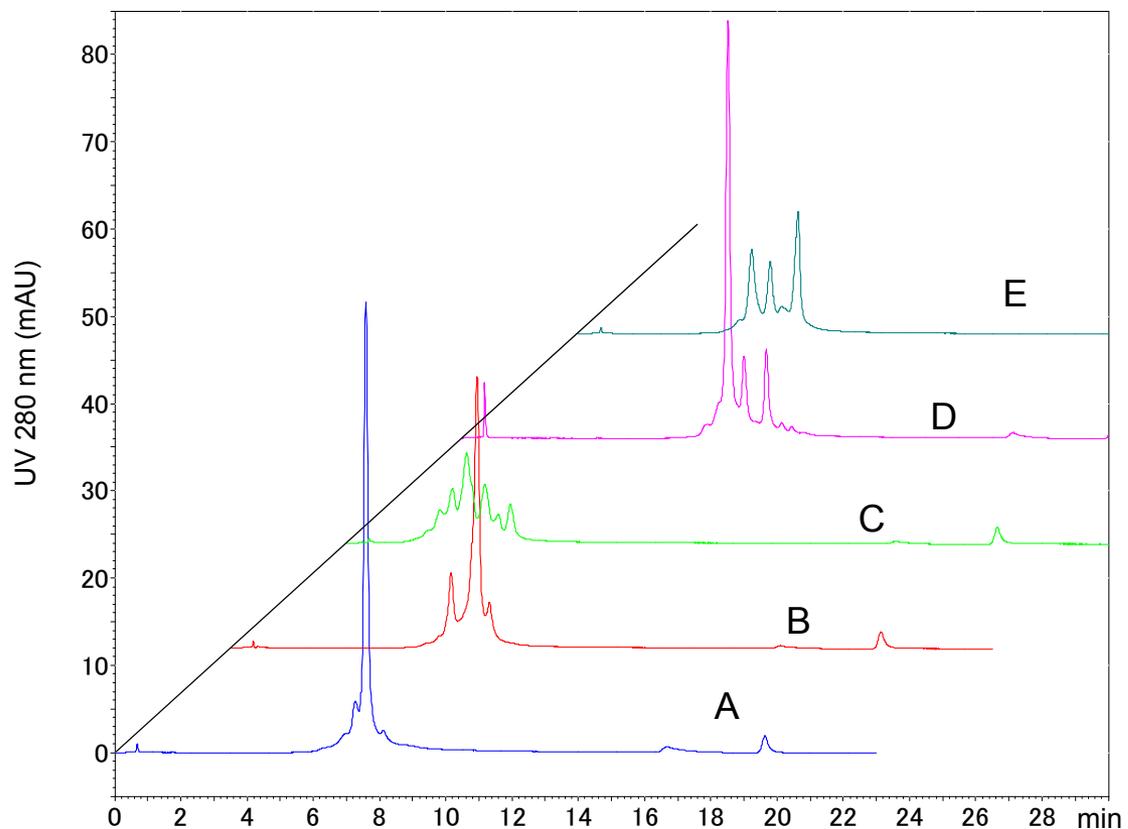
## Conditions

Column : TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mm I.D. x 30 cm)  
Eluent : 0.05 %  $\text{NaN}_3$ を含む0.2 mol/L リン酸塩緩衝液(pH6.7)  
Flow rate : 0.2~1.0 mL/min  
Temperature : 25 °C  
Detection : UV (280 nm)  
Sample : monoclonal IgG, human, 5 g/L

# 光散乱検出器(LS)を用いた SECによるモノクローナル抗体凝集体の分離



# 抗体医薬品の分析(IEC)



## Conditions

Column : TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm)

Eluent : A; 20 mmol/L MES 緩衝液 (pH6.0)

B; 20 mmol/L MES 緩衝液 + 0.5 mol/L NaCl (pH6.0)

Gradient : B conc.(0 min)10 %→(15 min)30 %

Flow rate : 1.0 mL/min, Detection: UV (280 nm), Temperature: 25 °C

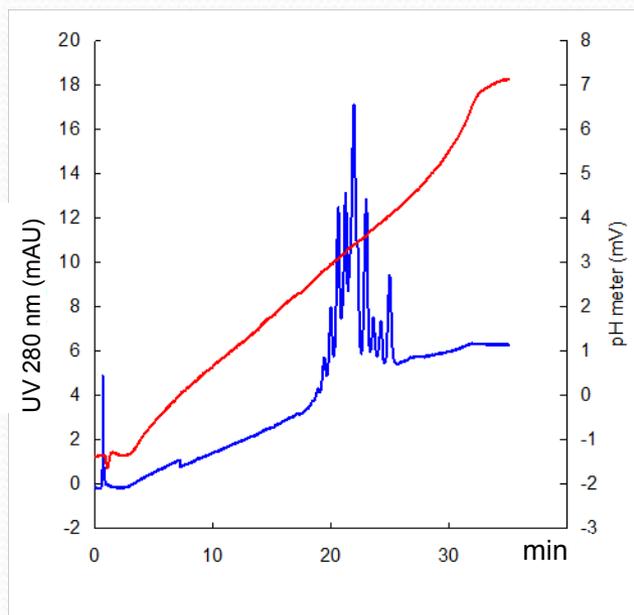
Sample : A; IgG1, humanized, B; IgG1, humanized, C; IgG1, chimeric,

D; IgG1, chimeric, E; IgG1, chimeric

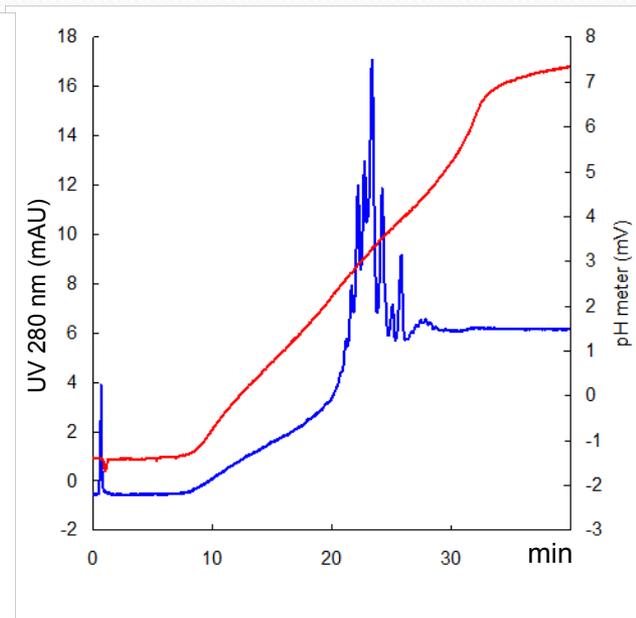
(財)相模中央化学研究所 柿谷均博士のご厚意によります。

# 抗体医薬品の分離(IEC, pHグラジエント)

SP-STAT



CM-STAT



## Conditions

Column : TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm), TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm)

Eluent : A; 10 mmol/L NaCl を含む 20 mM MES + 20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH5.4)

B; 10 mmol/L NaCl を含む 20 mM MES + 20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH9.0)

Gradient : B conc.(0 min)0 %→(30 min)100 %

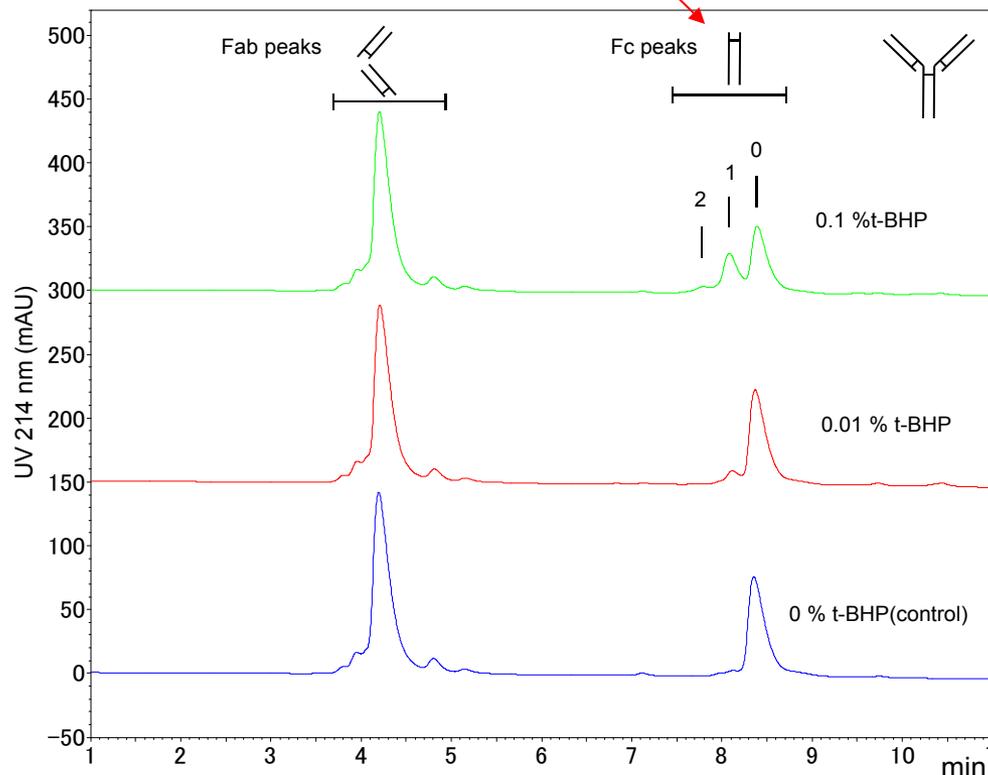
Flow rate : 1.0 mL/min

Detection : UV (280 nm)

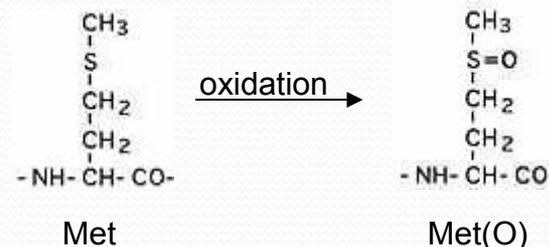
Sample : monoclonal IgG

# メチオニン酸化異性体の分離(HIC)

酸化されたメチオニンの数  
(Met-255 → Met(O)-255  
and/or Met-431 → Met(O)-431)



## メチオニン酸化

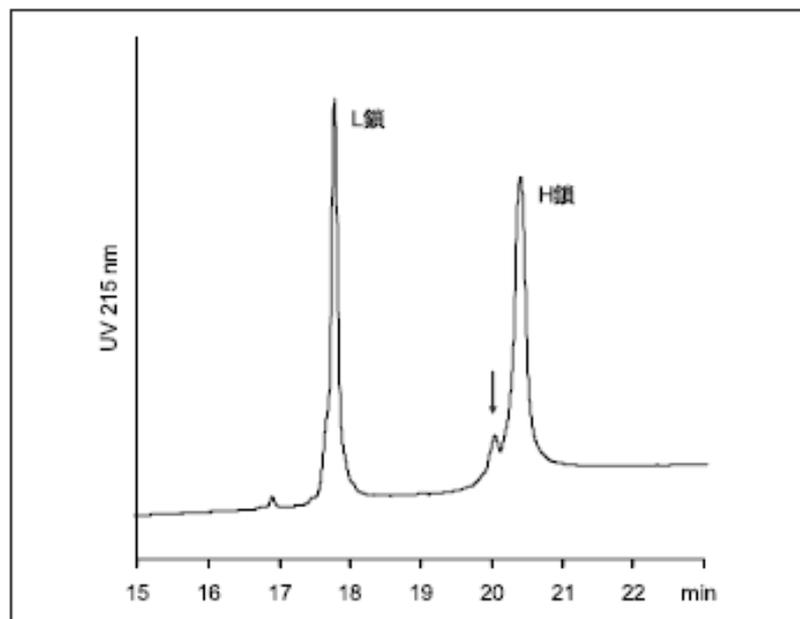


### Conditions

Column : TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. x 3.5 cm)  
 Eluent : A; 2 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む  
 20 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)  
 B; 20 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)  
 Gradient : B conc.(0 min)25 %→(10 min)60 %  
 Flow rate : 1.0 mL/min  
 Detection : UV (214 nm)  
 Temperature : 35 °C  
 Sample : 抗体医薬品, t-BHPを加えて酸化後、パパイン消化したもの

t-BHP : t-Butyl hydroperoxide

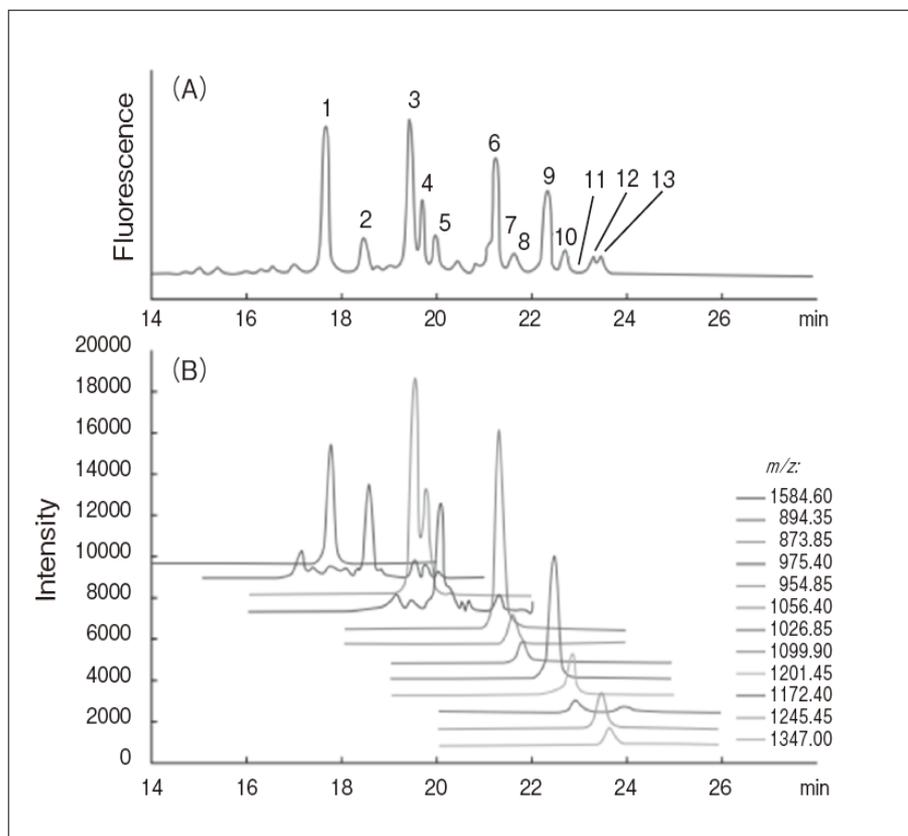
# 還元処理したIgGの分離(RPC)



## Conditions

Column : TSKgel ProteinC4-300(4.6 mm I.D. x 15 cm)  
Eluent : A; H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05(v/v/v)  
          B; H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05(v/v/v)  
Gradient; : B conc.(0 min)0 %→(45 min)100 %  
Flow rate : 1.0 mL/min  
Detection : UV(215 nm)  
Temperature : 50 °C  
Sample : monoclonal IgG,mouse,還元処理したもの

# 2-ABラベル化した抗体由来糖鎖の分析(HILIC)



## Conditions

Column : TSKgel Amide-80 2  $\mu$ m (2.0 mm I.D. x 15 cm)

Eluent : A; 50 mmol/L ギ酸アンモニウム(pH7.5)  
B; アセトニトリル

Gradient : B conc.(0-5 min)75 % $\rightarrow$ (30 min)50 %

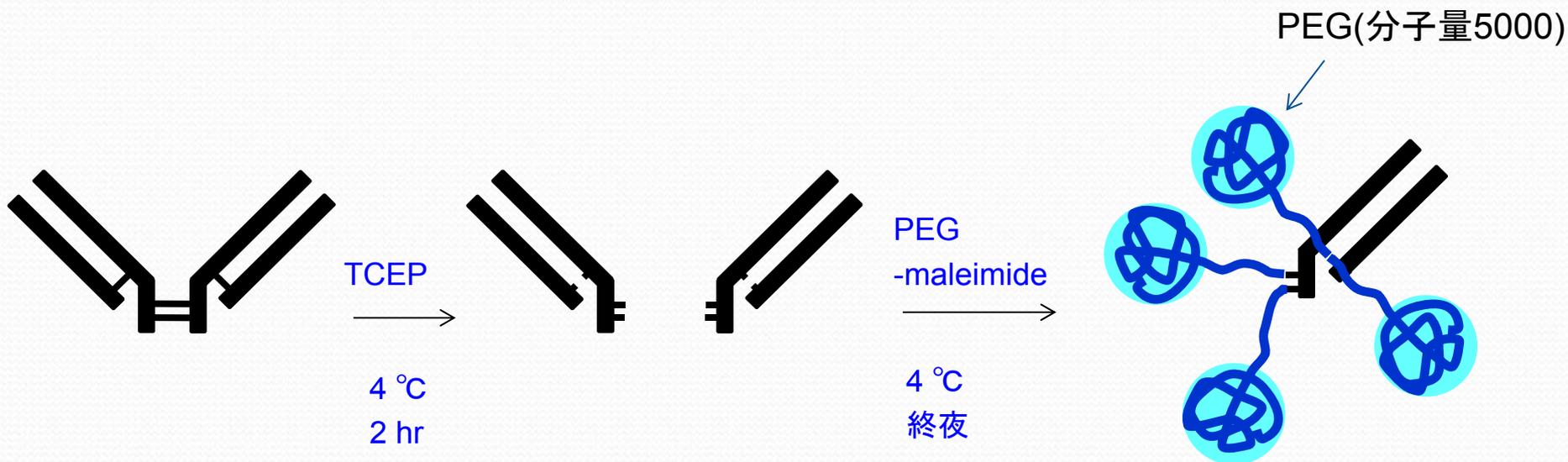
Flow rate : 0.3 mL/min

Temperature : 40  $^{\circ}$ C

Sample : 2-AB化N型糖鎖(ヒトIgG)(Ludger, cat.#CLIBN-IGG-01)  
~80 pg(80 %アセトニトリルで希釈)

Detection : (A); FLD(ex. 330 nm, em. 420 nm)  
(B); MS,ESI positive,SIM

# PEG導入反応(Fab')



## 混合モル比

	F(ab') <sub>2</sub>	TCEP <sup>1)</sup>	PEG-Maleimide <sup>2)</sup>
条件1	1	160 (40)	40 (5)
条件2	1	80 (20)	40 (5)
条件3	1	40 (10)	40 (5)
条件4	1	20 (5)	40 (5)
条件5	1	10 (2.5)	40 (5)
条件6	1	5 (1.25)	40 (5)
条件7	1	2.5 (0.625)	40 (5)
条件8(ref)	1	0 (0)	40 (5)

## PEG導入反応条件(maleimide誘導体)

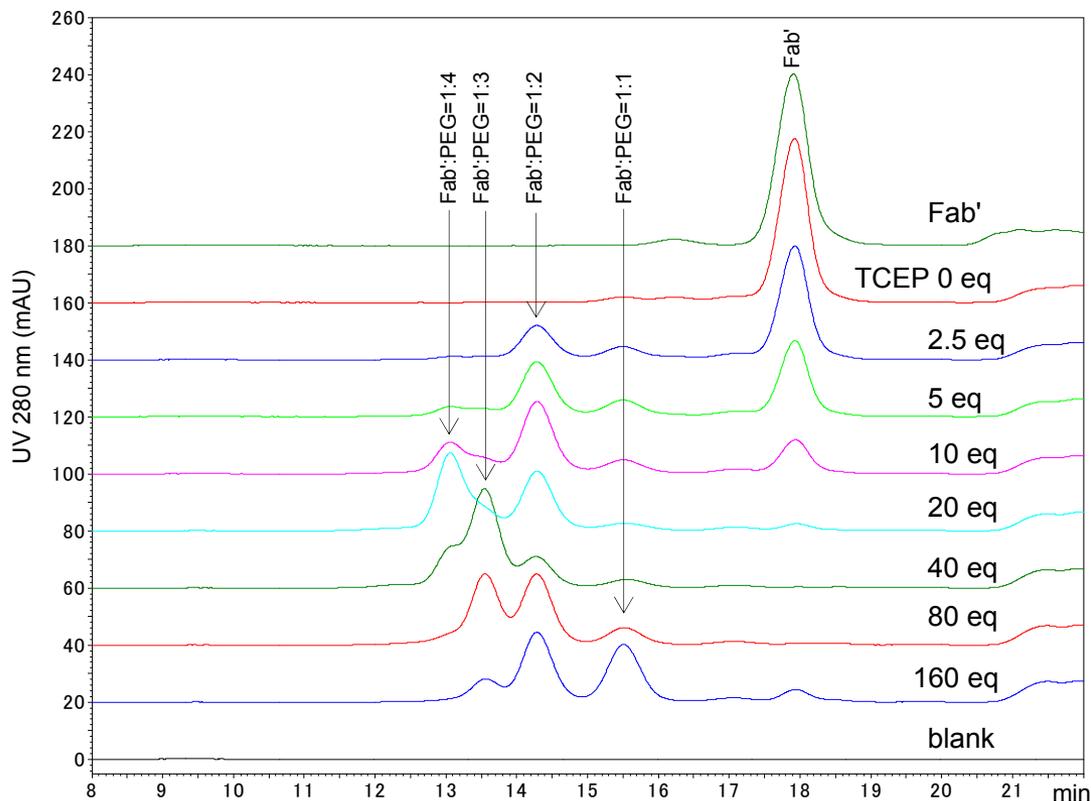
りん酸塩緩衝液(pH7.5)+1 mmol/L EDTA  
抗体濃度1 g/L

TCEP:Tris(2-carboxyethyl)phosphine

1) カッコ内はジスルフィドに対する当量数

2) カッコ内はスルフヒドリル基に対する当量数

# PEG化Fab'の分離(SEC)



Conditions

Column : TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 30 cm)

Eluent : 2-プロパノール/ 20 mmol/L リン酸塩緩衝液 +  
0.3 mol/L NaCl (pH7.0) = 15/85

Flow rate : 0.175 mL/min

Temperature: : 25 °C

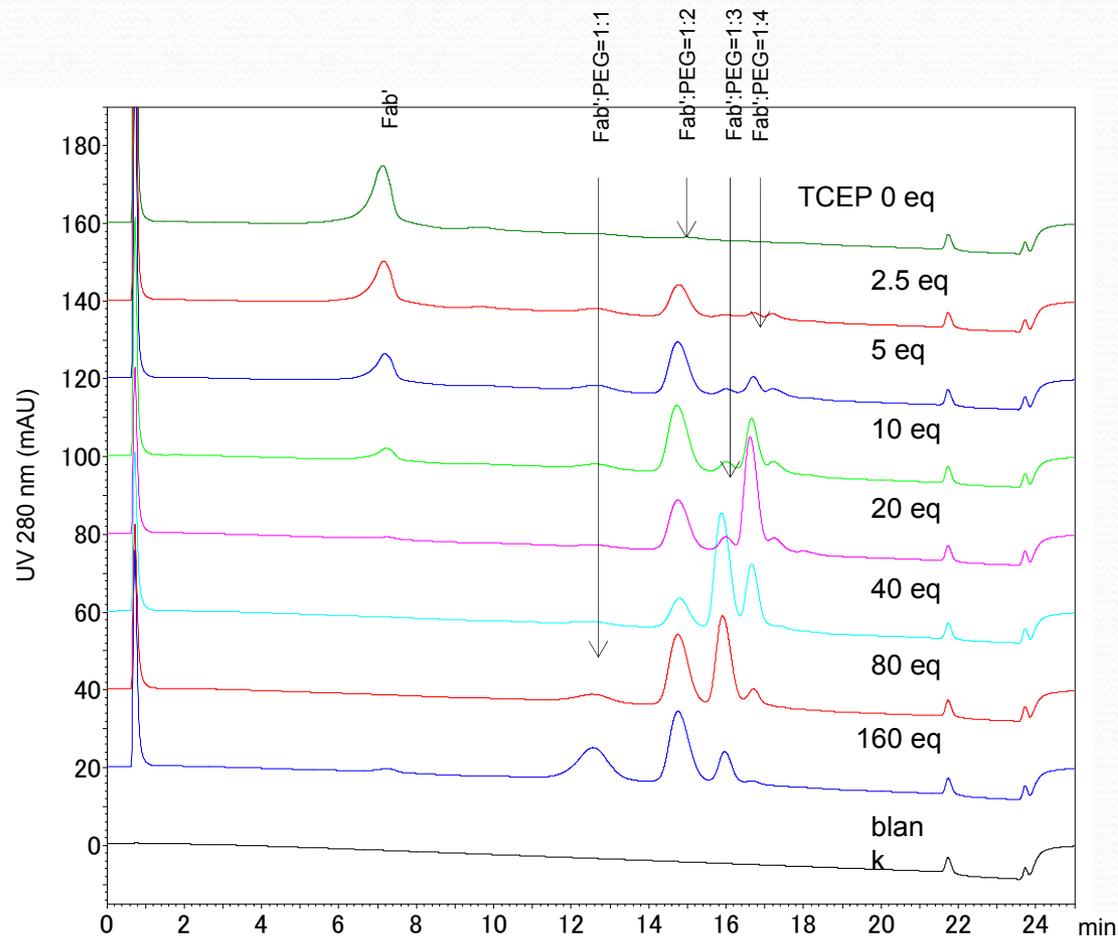
Detection : UV(280 nm)

前処理: 測定前にTCEPを加えて還元処理

TCEP < PEG-maleimide の条件では PEG が偶数個導入されたものが主に生じる

TCEP ≥ PEG-maleimide の条件では、TCEP の増大とともに PEG 導入率が低下し、また奇数個の PEG が導入されたものも生成

# PEG化Fab'の分離(HIC)



Conditions

Column : TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. x 10 cm)

Eluent : (A); 1.5 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む  
25 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)  
(B); 25 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)

Gradient : B conc.(0 min)0 %→(20 min)75 %

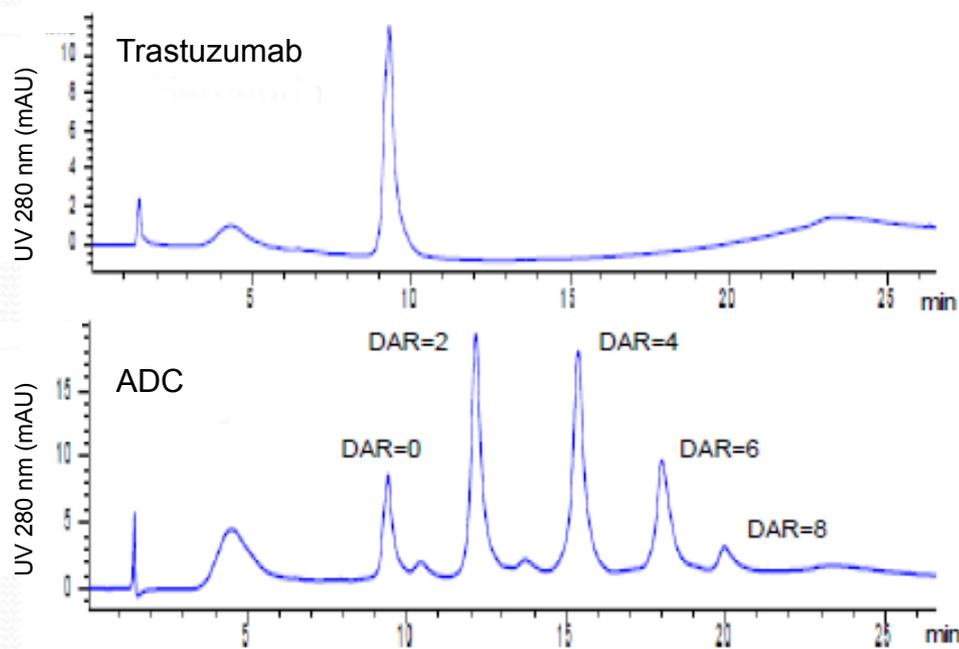
Flow rate : 1.0 mL/min

Temperature : 35 °C

Detection : UV(280 nm)

前処理: 測定前にTCEPを加えて還元処理

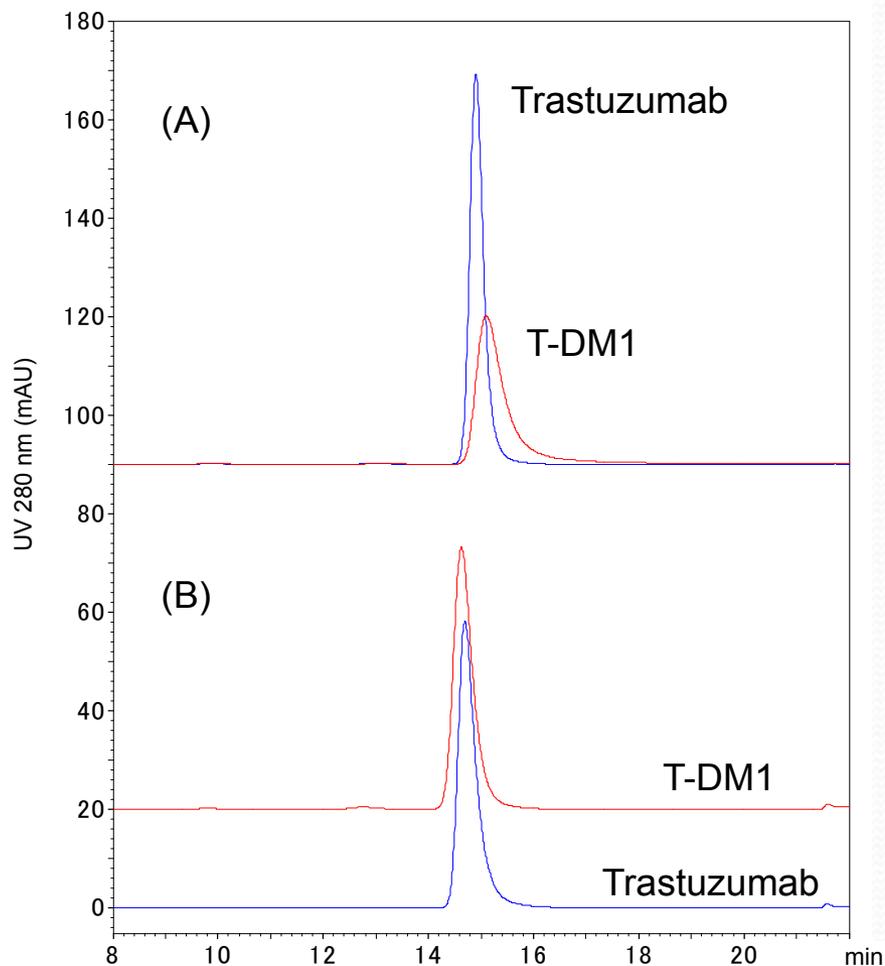
# ADCの分離(HIC)



## Conditions

- Column : TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. x 10 cm)  
Eluent : A; 1.5 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む25 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH7.0)  
          B; 2-プロパノール/25 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH7.0) =2/8  
Gradient : B conc.(0 min)0 % →(20 min)100 %  
Flow rate : 0.5 mL/min  
Detection : UV(280 nm)  
Sample : Trastuzumab, ADC(Trastuzumab-vcMMAE)

# ADCの分離(SEC)



Conditions

Column : TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 30 cm)

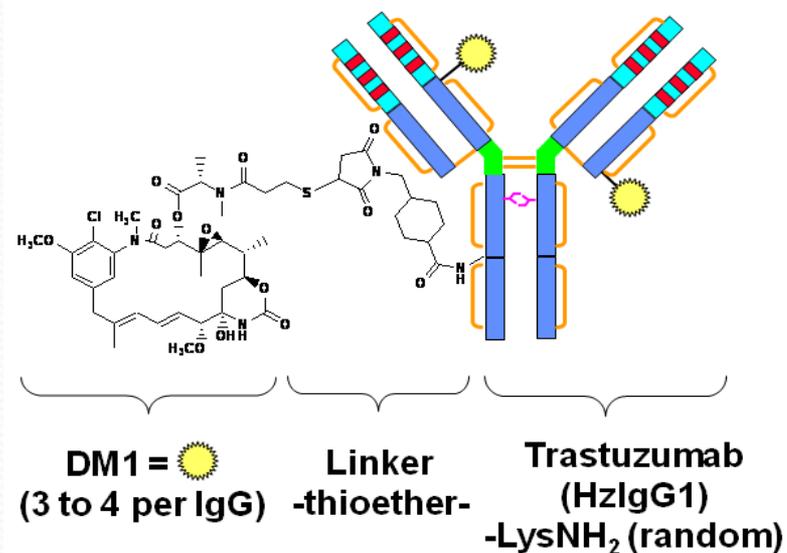
Eluent : (A); 20 mmol/L リン酸塩緩衝液 + 0.3 mol/L NaCl (pH7.0)  
(B); 2-プロパノール/20 mmol/L リン酸塩緩衝液 + 0.3 mol/L NaCl (pH7.0)=15/85

Flow rate : 0.175 mL/min

Temperature : 25 °C

Detection : UV(280 nm)

Sample : Trastuzumab, T-DM1(trastuzumab emtansine)

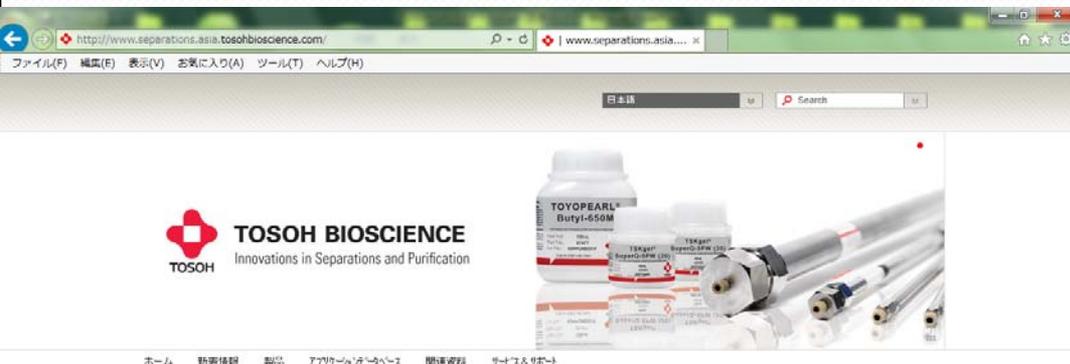


# まとめ

- ・ バイオ医薬品の開発や品質管理において、凝集体の有無の確認やバリエーションの解析は非常に重要です。今回抗体医薬品について、凝集体のSECによる分離やバリエーションのIEC、HIC、RPCによる分離、糖鎖のHILICによる分離例を紹介しました。バイオ医薬品はたんぱく質をベースとしているため、凝集体のほか、翻訳後修飾や脱アミド、アスパラギン酸異性化、メチオニン酸化、酵素による切断など種々の要因により多種多様なバリエーションが生じる可能性があります。今回紹介した分離モードを駆使することでこれらを分離/分析することが可能です。
- ・ バイオ医薬品は近年ますます進化しています。PEGを導入することで血中での半減期を延ばし薬効を高めたものや、抗体に細胞殺傷性が強い薬物を結合させたADCなど、化学的に修飾されたバイオ医薬品も上市されています。PEGや薬剤の導入によりたんぱく質の物性は大きく変化します。PEGの導入では分子サイズや疎水性に大きな変化が生じるため、PEG化たんぱく質の分離にはSECやHICが適しています。一方ADCは、分子サイズの変化は比較的小さいものの、導入する薬剤により疎水性が増大するため、HICによる分離が適しています。

# 東ソーバイオサイエンスホームページ

http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/



東ソーHPLCデータベースシステムです。  
下のグレー枠の中にある「Field Search」テキストボックスに検索語を入力して、「Search」ボタンを押してください。

Choose one or multiple options below to begin your search

Compounds (A-Z)

Separation Mode

Column Type

[Start Your Search](#)

Or use the full text search option below

Field Search:

[Search](#)





東ソーブースにもお立ち寄りください

東ソーブース :6A-602