

疎水クロマトグラフィーによる抗体薬物複合体のDAR分析

DAR Analysis of Antibody-Drug Conjugate by HIC

近年抗体医薬品市場の拡大が続いており、2012年のブロックバスター上位10位以内には抗体医薬品が7品目を占めています。抗体医薬品に次ぐ次世代のバイオ医薬品として最も有望視されているのが抗体薬物複合体(Antibody-Drug Conjugate; ADC)です。ADCは抗体(IgG)に低分子薬物が化学結合した構造をしています。抗体には低分子薬物の結合部位(Cys, Lys残基など)が複数存在するため、結合数、及び結合部位の不均一性が生じます。したがって、これらの不均一性がADCの薬効、安全性に与える影響を詳細に検討する必要があります。低分子薬物は抗体に比べ疎水性が高いため、低分子薬物の結合数が異なると疎水性に差が生じます。これを利用し疎水クロマトグラフィー(HIC)で抗体に対する低分子薬物の結合数(Drug to Antibody Ratio; DAR)を分析することが可能です。今回TSKgel Butyl-NPRを用いADCを分離した例を紹介します。

試料として Herceptin にリンカーを介して抗悪性腫瘍薬(モノメチルオーリスタチン E; MMAE)を化学結合した ADC(Herceptin-vcMMAE)を用いました。

HICで一般的な硫酸アンモニウムのグラジエント溶離条件で測定した結果、ADCは上手く溶離されませんでしたので、溶離液Bに有機溶媒(2-プロパノール)を添加し、有機溶媒濃度を最適化することによりDARの異なるピーク(DAR=0~DAR=8)を良好に分離することが可能でした(DARは各ピークを分取しLC-MS/MSで帰属しています)。

参考文献)

1. A. Wakankar, Y. Chen, Y. Gokarn and F. S. Jacobson. *mAbs* 2011, 3(2), 161-172
2. J. F. Valliere-Douglass, W. A. McFee, and O. Salas-Solano. *Anal. Chem.* 2012, 84, 2843-2849
3. N. S. Beckley, K. P. Lazzareschi, H.-W. Chih, V. K. Sharma, and H. L. Flores. *Bioconjugate Chem.*, 2013, 24 (10), 1674-1683

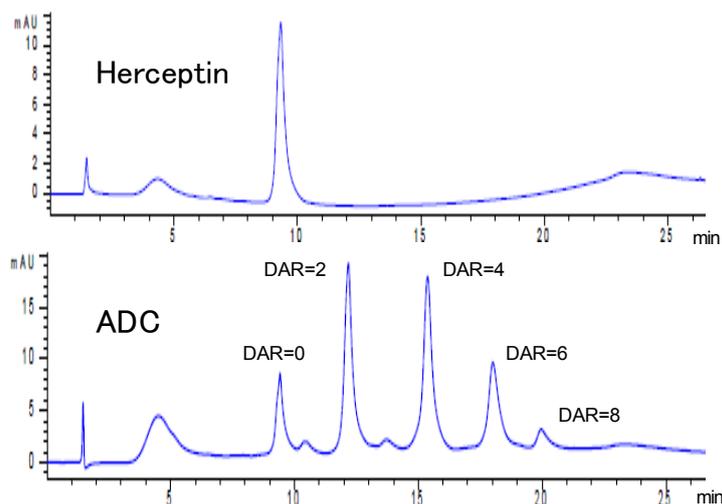


図1 Herceptin及びADCのHICによる分離

表1 分析条件

Column:	TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. x 10 cm)
Eluent:	A) 25 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0) including 1.5 mol/L ammonium sulfate B) 25 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0) / 2-propanol = 8 / 2
Gradient:	0 → 100 % B (20 minutes)
Flow rate:	0.5 mL/min
Detection:	UV 280 nm
Injection vol.:	10 µL
Sample Conc.:	Herceptin; 0.24 g/L, ADC(Herceptin-vcMMAE); 2.2 g/L