

抗体薬物複合体(ADC)のクロマト分離は、これで決まり！

TSKgel を用いた ADC の非変性クロマトグラフィー分離、分析



抗体薬物複合体 (ADC) は、抗体に抗がん剤 (薬物) などを結合させたバイオ医薬品の 1 種で、これまで 14 品目以上が承認されるなど、二重特異性抗体とともに、新規な抗体医薬品として活発な開発が進められています。さらに、均一性の向上や副作用 (オフターゲット毒性) の少ない作用機序をもつ第三世代の ADC の検討も行われており、ADC の精製法や分析、品質管理法は、今後ますます重要になっていくことが予想されます。

●ADC の重要品質特性 (CQAs) と分析法

以下に ADC の重要品質特性とその分析法を示します。中でも非変性クロマトグラフィーは、抗体の高次構造や活性を維持したまま分離できる特長を有しています。右列に非変性クロマトグラフィーに適用可能な TSKgel カラム例を示します。薬物と抗体の結合比 (DAR) が異なる成分の分離には HIC が多用されますが、最近上市された TSKgel HIC-ADC Butyl¹ は、ADC の分離選択性が向上しており、より効果的な分析を可能にしています。また揮発性溶離液を用いた SEC/MS による DAR 分析も行われています²。抗体の ADCC 活性に 관련된 分離として、ADC の AFC による検討もなされています^{3,4}。

その他、抗体・オリゴ核酸複合体 (AOC) の結合比の分析では、陰イオン交換体を用いた報告もあります⁵。

重要品質特性	分析法	TSKgel (非変性クロマトグラフィー)
薬物・抗体の結合比 (DAR)	疎水クロマトグラフィー (HIC) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) /MS イオン交換クロマトグラフィー (IEC)	TSKgel HIC-ADC Butyl, Butyl-NPR TSKgel UP-SW3000-LS, G3000SWxL TSKgel SP-/CM-STAT
薬物の結合部位の分布	ペプチドマッピング (IEC, RPC; UHPLC/MSによる)	IEC; TSKgel Q-/DNA-STAT
薬物の結合部位	ペプチドマッピング (IEC, RPC; UHPLC/MSによる)	IEC; TSKgel Q-/DNA-STAT
リンカーの構造	LC/MS/MS, FTIR, NMR	(逆相などの変性クロマトグラフィー)
薬物の構造	LC/MS/MS, FTIR, NMR	(逆相などの変性クロマトグラフィー)
遊離薬物濃度	LC/MS/MS	(逆相などの変性クロマトグラフィー)
抗原結合性	ELISA, SPR, Electro-chemiluminescence (ECL)	-
生理活性 (細胞毒性)	アフィニティークロマトグラフィー (AFC) バイオアッセイ (CDC, ADCC, アポトーシスなど)	TSKgel FcR-IIIA-NPR/5PW

* MRM; Multiple reaction monitoring

Ref.; G. Petrie et al, White paper, 2017, <https://www.eag.com/wp-content/uploads/2018/01/M-028517-Keys-to-Rapid-IND-Submission.pdf> を改変

●抗体薬物複合体 (ADC) の非変性クロマトグラフィーでの分離対象と特徴

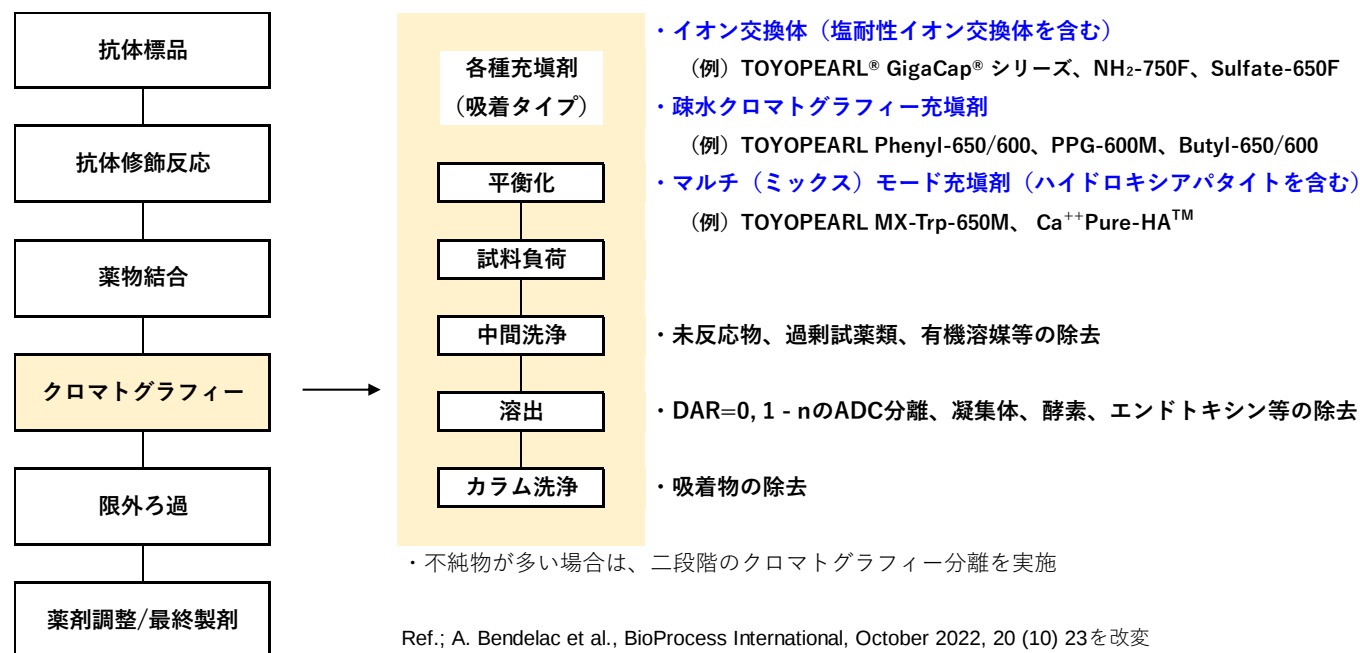
ADC の非変性クロマトグラフィーによる分析には、通常の抗体医薬品と同様の分離条件が適用できますが、薬物との結合により増大した疎水性を抑えるため、非変性条件下でも溶離液にイソプロピルアルコールやアセトニトリルなどの有機溶媒の添加 (5~25 %) が必要な場合もあります。以下に、ADC の非変性分析、変性分析に用いられる分離モードと、それぞれの分離対象および特徴を示します。

分離モード	分離対象、特徴
非変性分析	
サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)	二量体、凝集体、断片抗体など、SEC/MSによるDAR分析、血中ADCの薬物動態の分析
イオン交換クロマトグラフィー (IEC)	チャージバリエーション (Glu, Asp, Tyr, Lys, Hisなど)、CEC/MS
疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)	薬物抗体結合比 (DAR) の違いに基づく分離
マルチ (ミックス) モードクロマトグラフィー (MXC)	ADC混合物の分離、ハイドロキシアパタイト (HAP) を含む
アフィニティークロマトグラフィー (AFC)	生理活性 (ADCC活性、抗原結合能など) に関係; Fc部分、糖鎖・ガラクトース、AFC/MS プロテインA (抗体Fc部分)、FcR (抗体糖鎖部分)、ハウ酸 (抗体糖化部分)
変性分析	
逆相クロマトグラフィー (RPC)	抗体断片、ペプチド分解物などの分離、LC/MS、ワイドポア充填剤、C4型
親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)	抗体断片の分離、LC/MS、ワイドポア充填剤、アミド型

●ADC のクロマトグラフィーによる精製、分取クロマトグラフィー

ADC の分離精製においても、クロマトグラフィーは多用されます。ADC は、抗体修飾反応工程において、種々の薬剤結合数の成分が生じますが、これらの混合物から、ターゲットとする成分を選択的に分離精製する必要があります。以下にその精製工程例と、応用可能な分取クロマトグラフィー用充填剤を示します。薬剤結合数が異なる ADC の分離には、疎水クロマトグラフィーが効果的⁶⁻⁸とされていますが、同様な目的でイオン交換体や、ハイドロキシアパタイトを含むマルチ（ミックス）モードの充填剤が用いられることもあります。

初期の分離条件や充填剤の選定などのプロセス開発段階では、1～5 mL の少量の充填剤を充填した SkillPak™ カラムによるスクリーニングが有効です。



Ref.; A. Bendelac et al., BioProcess International, October 2022, 20 (10) 23を改変

●参考文献、資料

1. 東ソー、リーフレット、TSKgel HIC-ADC Butyl.
2. J. Jones et al., Native size-exclusion chromatography-mass spectrometry: suitability for antibody-drug conjugate drug-to-antibody ratio quantitation across a range of chemotypes and drug-loading levels, MABS, 2020, VOL. 12, NO. 1, e1682895, <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1682895>.
3. Y. Matsuda et al., Chromatographic analysis of site-specific antibody-drug conjugates produced by AJICAP first-generation technology using a recombinant FcγIIIa receptor-ligand affinity column, J. Chromatogr. B, 1177 (2021) 122753, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122753>
4. Y. Fujita et al., Glycoform analysis of intact antibodies using FcR column online mass spectrometer, Tosoh Research & Technology Review, 66 (2022) 47-55, https://www.tosoh.co.jp/technology/assets/22_3_5.pdf
5. A. R. Nanna et al., Generation and validation of structurally defined antibody-siRNA conjugates, Nucleic Acid Research, 48 (10), (2020) 5281-5293, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa286>
6. Y. Matsuda et al., A Purification Strategy Utilizing Hydrophobic Interaction Chromatography to Obtain Homogeneous Species from a Site-Specific Antibody Drug Conjugate Produced by AJICAP™ First Generation, Antibodies 2020, 9 (2), 16, <https://doi.org/10.3390/antib9020016>
7. 東ソー、テクニカルノートトヨパール® No. 6、抗体薬物複合体（ADC）の精製はこれで決まり！
8. 東ソー、テクニカルノートトヨパール® No. 11、抗体薬物複合体（ADC）の精製はこれで決まり！（2）



※ “TSKgel”、“NPR”、“TOYOPEARL”、“トヨパール”、“TOYOPEARL GigaCap”は東ソー株式会社の登録商標です
※ “Ca⁺⁺Pure-HA”、“SkillPak”は日本等における Tosoh Bioscience LLC の登録商標です
※ “AJICAP”は味の素株式会社の製品名です
※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオサイエンスG ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオサイエンスG ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店 ☎(092) 710-6694 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1
バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
お問い合わせE-mail ●製品全般、カタログに関するお問い合わせ hlc@tosoh.co.jp
●カラム、分離に関するお問い合わせ tskgel@tosoh.co.jp
●装置の技術相談に関するお問い合わせ csc@tosoh.co.jp