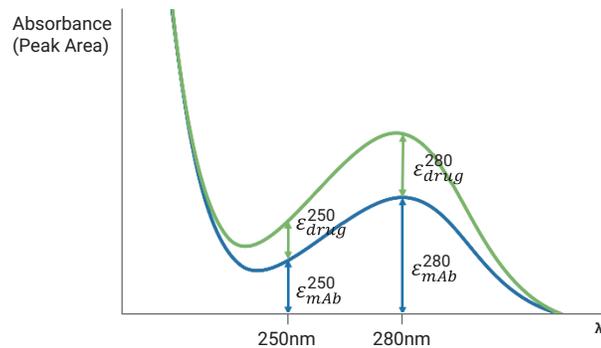


# Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼을 사용한 항체 약물 접합체(ADC)의 UV 기반 약물 대 항체 비율(DAR) 분석



## 저자

유재영  
한국애질런트테크놀로지스 (주)

## 개요

항체 약물 접합체(Antibody Drug Conjugates, ADC)의 약물 대 항체 비율(Drug to Antibody Ratio, DAR)은 약효와 독성을 고려하여 철저히 조절되어야 합니다. 페이로드가 갖는 흡광이 약물 대 항체 비율 평가에 영향을 미칠 수 있으며, 이를 고려한 약물 대 항체 비율 계산은 정확한 항체 약물 결합체의 평가에 중요한 요소가 됩니다.

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 높은 농도의 염 조건에서의 분석에 적합한 장비로, 항체 약물 결합체의 분석에 사용되는 소수성 상호작용 크로마토그래피(Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)를 활용해 Brentuximab vedotin을 평가하였습니다. 또한 정확한 약물 대 항체 비율 확인을 위해 높은 감도로 UV 스펙트럼 확인이 가능한 Bio-inert 60mm Max-Light Cartridge Cell이 장착된 1290 Infinity II DAD를 사용함으로써, 두 개 이상의 파장에서 결과를 수집하였고, OpenLab CDS 2.x의 바탕 감산(Blank Subtraction) 기능을 통해 얻은 면적값을 바탕으로 약물 대 항체 비율 산출에 대해 고찰할 수 있었습니다.

## 서론

항체 약물 접합체(Antibody Drug Conjugates, ADCs)는 세포독성이 높은 의약품을 단클론항체와 결합하여 약효 발현의 선택성을 높이고 독성을 낮추기 위해 개발된 의약품입니다. 일반적인 정맥주사의 투여경로를 통해 주입된 세포독성의약품은 전신의 독성작용을 나타내게 되는데, 특정 표적과 결합하는 단클론항체에 세포독성의약품을 결합시킴으로써 표적 단백질을 가지고 있는 세포에만 특이적으로 약효를 발현할 수 있도록 설계되었습니다.

항체 약물 결합체는 약효를 발현하기 위한 페이로드와 단클론항체와 결합시키기 위한 링커, 표적 특이적인 단클론항체로 구성되며, 표적 세포 내로 흡수되어 리소좀 분해(lysosomal degradation)를 통해 페이로드를 세포질로 방출하는 것으로 약효를 나타냅니다. 따라서, 혈액 중 안정적인 항체 약물 결합체 형태를 유지해야 하며, 세포 내에서는 쉽게 약물을 방출함으로써 원하는 만큼의 약효를 나타낼 수 있도록 항체 약물 결합체 구조를 설계하는 것이 굉장히 중요합니다.

### 라이신 링커

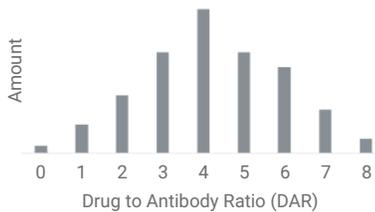
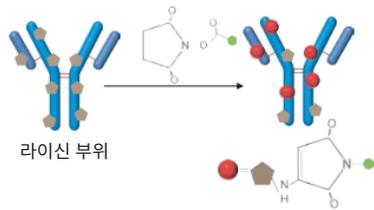


그림 1. 항체 약물 결합체의 링커 결합위치와 DAR.

시스테인 링커 ADC는 약물 부착 위치를 관리하기 용이함과는 별개로, 단클론항체의 이황화결합을 환원시켜 약물이 결합된 형태를 가지고 있는 이유로 분석조건에 따라 원형을 유지하지 못할 수 있습니다. 또한, 약 150kDa 크기의 단백질에 비해 페이로드가 나타내는 극성의 정도는 미미하기 때문에 일반적으로 원형 분석에 사용되는 역상 크로마토그래피의 사용이 제한적입니다. 따라서 이를 고려하여 항체 약물 결합체의 링커 결합 위치와 특성 분석의 목적에 따라 여러 분석 기술을 사용해야 합니다. 소수성 상호작용 크로마토그래피(Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)는 시스테인과 약물을 결합시킨 형태의 항체 약물 결합체의 원형으로써 약물 대 항체 비율을 평가하는 목적으로 사용하는 대표적인 분석 기술입니다. (그림 2)

세포내에서의 약효 발현은 항체 약물 결합체에 결합되어 있는 페이로드의 양을 정확하게 예측하여 조절하는 것이 필요한데, 단클론항체에 결합된 약물의 숫자를 약물 대 항체 비율(Drug to Antibody Ratio, DAR)이라고 부릅니다. DAR은 약물의 동태와 독성을 고려하여 조절되어야 하며, 각 개발 의약품별로 정해진 범위의 DAR을 충족해야 합니다.

일반적으로 결합에 사용하는 단클론항체의 작용기로 라이신과 시스테인이 이용됩니다. 트라스투주맙(Trastuzumab)의 경우 분자 내에 90개의 라이신 잔기를 가지고 있어 약물은 확률적으로 여러 위치에 결합할 수 있는데 반해, 시스테인은 항체의 경첩 부위(Hinge region)에 존재하는 시스테인과 결합할 수 있어 2의 배수로 약물이 부착될 수 있습니다. (그림 1)

### 시스테인 링커

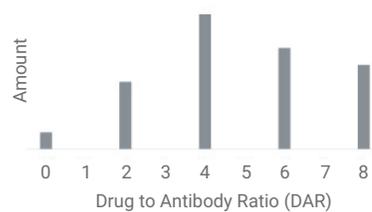
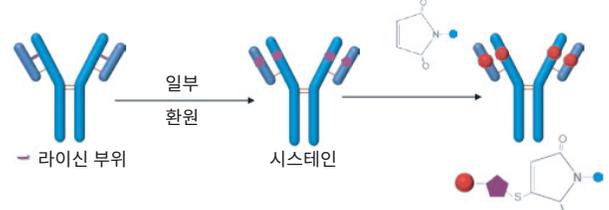
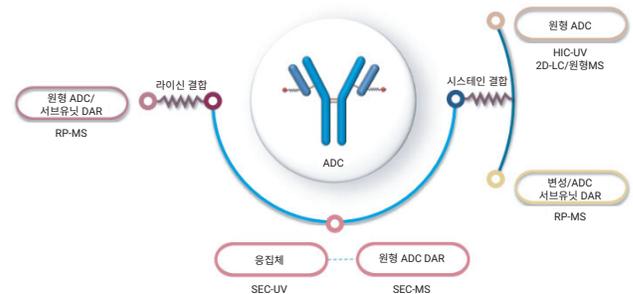


그림 2. 항체 약물 결합체의 분류와 분석 목적에 따른 분석법.



소수성 상호작용 크로마토그래피는 항체 약물 결합체에 결합한 약물의 소수성 상호작용에 따라 각 DAR 피크를 분리할 수 있습니다. 분석에 사용되는 황산암모늄은 높은 염석작용으로 단클론항체의 극성 작용기에 의한 상호작용을 억제할 수 있을 뿐 아니라, 단클론항체의 변형을 최소화할 수 있는 물질로써, 소수성 상호작용 크로마토그래피 분석을 위해 2M 이내의 농도가 사용됩니다. 높은 농도의 염은 HPLC 시스템의 금속을 부식시킬 수 있어, 내부식성 특성을 가지고 있는 Bio-inert LC 또는 Bio-compatible LC의 사용이 요구됩니다. 본 응용자료의 분석에는 1290 Infinity II Bio UHPLC가 사용되었습니다.

소수성 상호작용 크로마토그래피에 사용되는 고농도의 염은 질량검출기를 오염시킬 수 있어, 일반적으로 약물 대 항체 비율 확인에는 UV 검출기가 사용됩니다. 단클론항체의 통상적인 UV 분석 파장은 280nm로 설정하여 분석이 진행되므로, 항체 약물 결합체의 약물 대 항체 비율 확인도 280nm에서 이루어집니다. 하지만, 페이로드와 링커가 280nm 이상의 장파장에서 흡광을 나타낼 경우 약물 대 항체 비율의 증가에 따라 280nm의 흡광은 증가하는 결과를 보이게 됩니다. UV 검출기를 사용한 약물 대 항체 비율 분석에서 DAR 피크의 UV 스펙트럼 차이를 확인하였습니다.

## 실험

### 표준물질 및 시약

Sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, ammonium sulfate와 human IgG는 Sigma-Aldrich에서 구매하였고, brentuximab vedotin은 MedChemExpress에서 구매했습니다. Doxorubicin은 고객사에서 제공받았습니다.

### 분석 기기

- Agilent 1290 Infinity II Bio Flexible Pump(G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler(G7137A), 시료 온도 조절 장치 포함
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116B), 바이오 호환표준 유량 열 교환기 포함
- Agilent 1290 Infinity II Diode Array Detector(G7117B), Max-Light 카트리지가 셀 60mm(G5615-60017)

### 컬럼

Agilent AdvanceBio HIC 3.5µm, 4.6 x 100mm (P/N 685975-908)

## 소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.7

## 이동상 및 시료 조제방법

이동상은 Sodium phosphate dibasic 1.91g, sodium phosphate monobasic 1.39g과 ammonium sulfate 198.21g을 물에 넣어 녹여 pH를 7.0으로 맞춘 뒤 1L로 하여 이동상 A를 제조하였고, Sodium phosphate dibasic 1.91g, sodium phosphate monobasic 1.39g을 물에 넣어 녹여 pH를 7.0으로 맞춘 뒤 1L로 하고 이 용액 800mL와 isopropanol 200mL를 혼합하여 이동상 B를 제조하였습니다.

Brentuximab vedotin은 물에 녹여 5mg/mL로 하고 이동상 A로 희석하여 1mg/mL로 조제하였습니다.

## 분석 기기 및 조건

표 1. Agilent HPLC 분석조건.

파라미터	값		
이동상	A: 25mM Sodium phosphate pH 7.0 + 1.5M Ammonium sulfate B: 25mM Sodium phosphate pH 7.0 : IPA = 8 : 2		
유속	0.5mL/분		
분석시간	40분		
주입량	20µL		
시료 주입기 온도	4°C		
컬럼 온도	25°C		
검출기	UV 280nm, 250nm		
그라디언트	시간	A	B
	0	80	20
	1	80	20
	5	50	50
	10	40	60
	15	15	85
	17	10	90
	23	0	100
	25	0	100
	30	80	20
	40	80	20

## 결과

### IgG와 Doxorubicin의 UV 280nm에서의 약물 대 항체 비율 산출

페이로드가 갖는 고유의 UV 스펙트럼이 약물 대 항체 비율에 미치는 영향을 평가하기 위해, 비교적 장파장에서 흡광을 보이는 Doxorubicin을 페이로드의 예제로 하여 인간 IgG와 함께 분석하였습니다. Doxorubicin과 IgG를 각 DAR에 해당하도록 아래 표2의 농도로 혼합하여 컬럼을 장착하지 않은 채로 UV 280nm와 250nm 조건에서 분석하였고, 피크 스펙트럼과 면적을 확인했습니다. IgG 5 $\mu$ M의 UV 스펙트럼은 279nm에서 흡수극대를 보였고, doxorubicin은 256nm, 500nm에서 흡수극대를 보였습니다. Doxorubicin 또한 280nm에서 흡광을 보이므로, DAR이 증가함에 따라 280nm 면적도 함께 증가하는 결과를 보입니다. 따라서, 280nm에서의 흡광은 페이로드와 mAb의 흡광을 모두 반영한 결과임을 의미합니다.

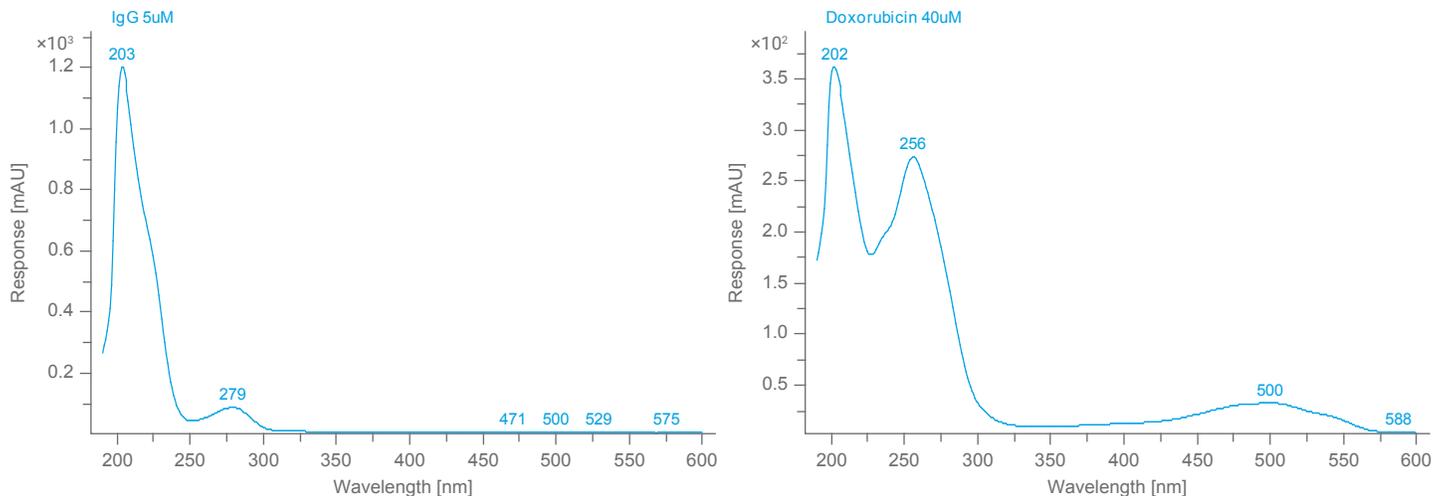


그림 3. IgG와 Doxorubicin의 UV 스펙트럼.

표 2. IgG와 Doxorubicin의 UV 280nm, 250nm 면적.

DAR(n)	IgG 농도( $\mu$ M)	Doxorubicin의 농도( $\mu$ M)	280nm 면적	250nm 면적	500nm 면적	$\epsilon^{280}$	$\epsilon^{250}$	$\epsilon^{500}$
0	5	0	1122.409	558.936	0	224.482	111.787	0
N/A	0	40	1973.773	3362.445	1027.932	49.344	84.061	25.698

Doxorubicin이 DAR 2, 4, 6, 8의 분량으로 포함되어 있을 때, 각 UV 스펙트럼의 흡수극대는 그림 4와 같이 279nm에서 258nm로 점차 이동하는 것으로 확인되었습니다. 이를 통해, 280nm의 흡광은 페이로드에 의해 영향을 받을 수 있음을 짐작할 수 있습니다.

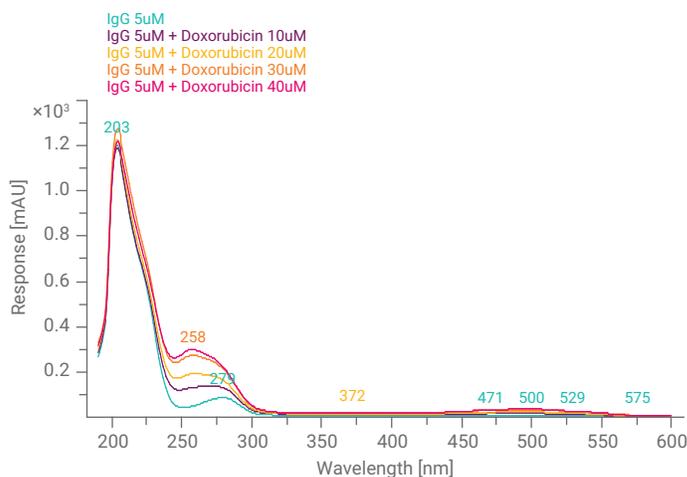


그림 4. IgG와 Doxorubicin의 DAR별 스펙트럼 겹쳐보기.

일반적인 약물 대 항체 비율의 계산은 아래의 수식을 사용하여 진행합니다.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{Peak\ area \times n}{Total\ peak\ area}$$

하지만, 페이로드의 UV 280nm 흡광이 클 경우 위의 수식은 잘못된 약물 대 항체 비율 결과를 초래할 수 있으므로, 각 DAR 별 농도는 아래 수식을 고려해야 합니다.

$$C_{DARn} = \frac{Area_{\lambda}}{n \times \epsilon_{drug}^{\lambda} + \epsilon_{mAb}^{\lambda}}$$

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{C_{DARn} \times n}{Total\ concentrate}$$

이 수식에서 각 물질의 소광 계수(extinction coefficient)( $\epsilon$ )는 각 파장에서의 면적 ÷ 농도로 산출합니다.

표 2에서 확인된 각 파장에서의 면적과 첨가한 IgG 및 doxorubicin의 농도를 바탕으로, 각 DAR의 몰농도비를 아래와 같이(DAR 0:2:4:6:8 = 1:3:5:3:1) 가정했을 때, 기존의 UV 280nm만을 기준으로 한 시험 결과와 UV 250nm를 함께 고려했을 때의 시험 결과는 다음과 같이 차이를 보이는 것을 확인할 수 있습니다.

표 3. 소광 계수(extinction coefficient)를 고려한 약물 대 항체 비율 계산.

DAR(n)	IgG 비율	Doxorubicin의 비율	280nm 면적	몰농도비	DAR 이론량	280nm 기반 DAR	보정 DAR
0	1	0	224.482	1	0.00	0.00	0.00
2	1	2	969.511	3	0.46	0.37	0.46
4	1	4	2109.296	5	1.54	1.54	1.54
6	1	6	1561.643	3	1.38	1.70	1.38
8	1	8	619.236	1	0.62	0.86	0.62
				DAR	4.00	4.48	4.00

280nm에서 산출한 약물 대 항체 비율과 소광 계수(extinction coefficient)가 보정된 약물 대 항체 비율은 각각 4.48과 4.00으로, 소광 계수(extinction coefficient)가 반영되어야 정확한 결과를 확인할 수 있음을 알 수 있습니다.

### Doxorubicin의 소광 계수(extinction coefficient)를 산출할 수 없을 경우 500nm 면적을 통해 약물 대 항체 비율 산출

Doxorubicin은 mAb와 달리 500nm에서도 흡광을 나타내는 페이로드입니다. 따라서, 위 수식에서 500nm에 대한 mAb의 소광 계수(extinction coefficient)는 0으로 계산할 수 있어, 페이로드의 소광 계수(extinction coefficient)와 DAR의 농도의 비율을 산출할 수 있습니다.  $\epsilon_{drug}^{500}$ 을 산출할 수 없는 상태라고 가정하고 a라고 했을 때 다음과 같이 계산됩니다.

$$C_{DARn} = \frac{Area_{500}}{n \times \epsilon_{drug}^{500} + \epsilon_{mAb}^{500}(=0)} = \frac{Area_{500}}{n \times \epsilon_{drug}^{500}}$$

표 4. Doxorubicin의 DAR별 500nm DAR 계산.

DAR	280nm 면적	500nm 면적	DAR 이론량	UV 500nm 기반 농도(/a)
0	224.482	0	0.00	-
2	969.511	154.190	0.46	77.10
4	2109.296	513.966	1.54	128.49
6	1561.643	462.569	1.38	77.09
8	619.236	205.586	0.62	25.70
		DAR	4.00	

DAR0의 농도는 n = 0으로 위의 수식으로 계산이 불가합니다. 280nm에서의 면적과 500nm에서의 면적은 각 페이로드의 DAR과  $\epsilon_{drug}^{280}/\epsilon_{drug}^{500}$ 에 상관성을 가지므로  $C_{DARn}/Area_{280}$ 으로 DAR0을 외삽하여 산출할 수 있습니다.

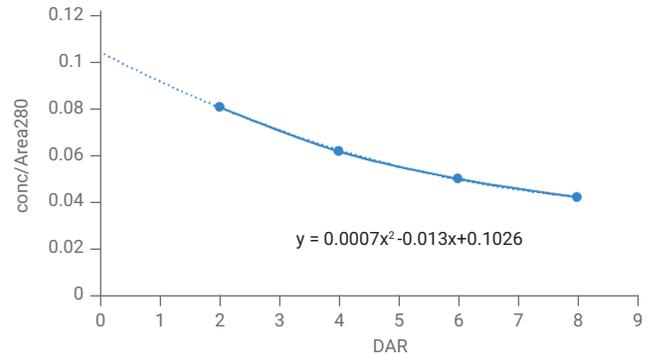


그림 5. DAR과  $C_{DARn}/Area_{280}$  상관관계 그래프.

2차 함수의 추세선을 0으로 외삽하여 DAR0 농도는 다음과 같이 추산되며, 이를 바탕으로 약물 대 항체 비율을 환산하면 4.03으로, 약물 대 항체 비율 이론량과 거의 동일한 결과를 얻을 수 있었습니다. 따라서  $\epsilon_{mAb}^{lambda} = 0$ 이고 해당 파장에서 흡광을 보이는 페이로드에 대한 항체 약물 결합체의 경우, 별도의  $\epsilon_{drug}^{280}$  또는  $\epsilon_{drug}^{500}$ 을 측정하지 않더라도 정확한 약물 대 항체 비율을 확인할 수 있습니다.

표 5. Doxorubicin의 500nm를 보정한 약물 대 항체 비율 결과.

DAR (n)	280nm 면적	500nm 면적	DAR 이론량	UV 500nm 기반 농도(/a)	보정 DAR
0	224.482	0	0.00	23.04	0.00
2	969.511	154.190	0.46	77.10	0.47
4	2109.296	513.966	1.54	128.49	1.55
6	1561.643	462.569	1.38	77.09	1.40
8	619.236	205.586	0.62	25.70	0.62
		DAR	4.00		4.03

### Doxorubicin의 소광 계수(extinction coefficient)를 산출할 수 없을 경우 두 파장에 대한 항체의 소광 계수(extinction coefficient)를 통해 DAR 산출

정확한 약물 대 항체 비율의 계산을 위해서는 페이로드와 mAb 두 물질에 대한 280nm에서의 소광 계수(extinction coefficient)가 필요합니다. mAb의 소광 계수(extinction coefficient)는 실험을 통해서 산출이 가능하지만, mAb와 페이로드 사이에 cross-linker를 연결하여 결합시키는 경우, 페이로드의 소수성 상호작용 크로마토그래피 조건에서의 용해도가 충분치 않은 경우 페이로드의 소광 계수(extinction coefficient)를 산출할 수 없습니다. 흡광을 보이는 두개의 파장에서의 DAR별 면적을 근거로  $\epsilon_{drug}^{280}$ 을 얻을 수 있습니다.  $\epsilon_{drug}^{250}$ 으로 항을 정리하면 다음과 같습니다.

$$\frac{A_{DAR2}^{250}}{A_{DAR2}^{280}} \epsilon_{drug}^{280} + \left( \frac{A_{DAR2}^{250}}{A_{DAR2}^{280}} - \frac{A_{n=0}^{250}}{A_{n=0}^{280}} \right) / 2 \times \epsilon_{mAb}^{280} = \frac{A_{DAR4}^{250}}{A_{DAR4}^{280}} \epsilon_{drug}^{280} + \left( \frac{A_{DAR4}^{250}}{A_{DAR4}^{280}} - \frac{A_{n=0}^{250}}{A_{n=0}^{280}} \right) / 4 \times \epsilon_{mAb}^{280}$$

$$0.8661 \times \epsilon_{drug}^{280} + (0.8661 - 0.4980) / 2 \times \epsilon_{mAb}^{280} = 1.0620 \times \epsilon_{drug}^{280} + (1.0620 - 0.4980) / 4 \times \epsilon_{mAb}^{280}$$

$$\epsilon_{drug}^{280} = \frac{0.04306}{0.19591} \times \epsilon_{mAb}^{280} = 0.2198 \epsilon_{mAb}^{280}$$

따라서,  $C_{DARn}$ 은 다음의 수식으로 표현할 수 있습니다.

$$C_{DARn} = \frac{Area_{lambda}}{n \times \epsilon_{drug}^{lambda} + \epsilon_{mAb}^{lambda}} = \frac{A_{280}}{n \times \epsilon_{drug}^{280} + \epsilon_{mAb}^{280}} = \frac{A_{280}}{(n \times 0.2198 + 1) \epsilon_{mAb}^{280}}$$

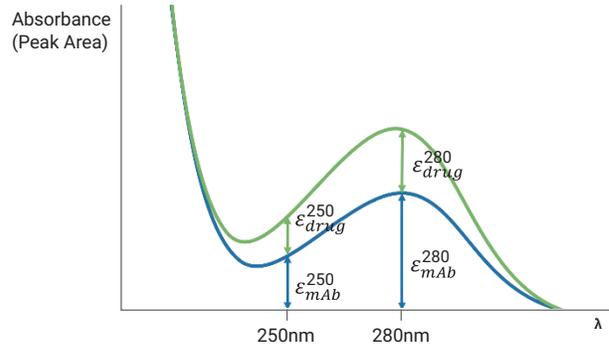


그림 6. 페이로드와 항체에 대한 특정 파장에서의 UV 흡광.

$$\epsilon_{drug}^{250} = \frac{A_n^{250}}{A_n^{280}} \epsilon_{drug}^{280} + \left( \frac{A_n^{250}}{A_n^{280}} - \frac{A_{n=0}^{250}}{A_{n=0}^{280}} \right) / n \times \epsilon_{mAb}^{280}$$

대표적으로, DAR2와 DAR4의 280nm에서의 면적( $A_{DAR2}^{280}$ ,  $A_{DAR4}^{280}$ )과 250nm에서의 면적( $A_{DAR2}^{250}$ ,  $A_{DAR4}^{250}$ )을 이용하여  $\epsilon_{drug}^{280}$ 과  $\epsilon_{mAb}^{280}$ 의 비율을 구할 수 있고, 가장 면적값이 높은 두 DAR 피크를 예를 들어 아래와 같이 계산할 수 있습니다.

표 6. Doxorubicin의 DAR별 280nm와 250nm 피크 면적.

DAR(n)	IgG	Doxorubicin	물농도비	A280	A250	A500	DAR 이론량	A250/A280
0	1	0	1	224.482	111.787	0.000	0.00	0.4980
2	1	2	3	969.511	839.728	154.190	0.46	0.8661
4	1	4	5	2109.296	2240.159	513.966	1.54	1.0620
6	1	6	3	1561.643	1848.462	462.569	1.38	1.1837
8	1	8	1	619.236	784.276	205.586	0.62	1.2665
						DAR	4.00	

이를 요약하여 최종 약물 대 항체 비율을 환산하면 각 DAR별 DAR 이론량과 산출된 DAR이 일치하는 것을 확인할 수 있습니다.

표 7. Doxorubicin의  $\epsilon_{drug}^{280}$ 을 고려한 약물 대 항체 비율 결과.

DAR(n)	IgG	Doxorubicin	몰농도비	A280	DAR 이론량	$C_{DARn} / \epsilon_{mAb}^{280}$	DAR result
0	1	0	1	224.482	0.00	224.482	0.00
2	1	2	3	969.511	0.46	673.445	0.46
4	1	4	5	2109.296	1.54	1122.409	1.54
6	1	6	3	1561.643	1.38	673.445	1.38
8	1	8	1	619.236	0.62	224.482	0.62
				Sum	4.00	2918.263	4.00

결과적으로, DAR0의 두 파장에서의 피크 면적 및 각 피크의 결합된 페이로드의 수(DAR)와 두 파장에서의 피크 면적을 알고 있을 경우  $\epsilon_{drug}^{280}$ 과  $\epsilon_{mAb}^{280}$ 을 알지 못하는 경우라도 정확하게 약물 대 항체 비율을 계산할 수 있습니다.

### Brentuximab vedotin의 약물 대 항체 비율

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 이용해서 위의 분석방법을 통해 1mg/mL 농도의 Brentuximab vedotin을 소수성 상호작용 크로마토그래피 조건에서 분석하였습니다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 조건은 고농도의 염을 사용합니다. 따라서 Bio LC 시스템이 지니고 있는 내부식성과 단백질과 같은 바이오 분자와의 상호작용 및 변성을 최소화할 수 있는 특성을 통해 소수성 상호작용 크로마토그래피 분석이 수행되는 것이 바람직합니다.

시험을 통해 Brentuximab vedotin의 각 DAR 피크는 DAR에 따라 280nm에 비해 250nm의 흡광이 증가하는 것이 확인되었습니다. 또한 높은 DAR의 스펙트럼일수록 흡수 극대파장이 278nm에서 276nm로 이동하였습니다. 이를 통해 페이로드의 비율이 각 피크의 UV 스펙트럼에 영향을 미치는 것을 알 수 있습니다.

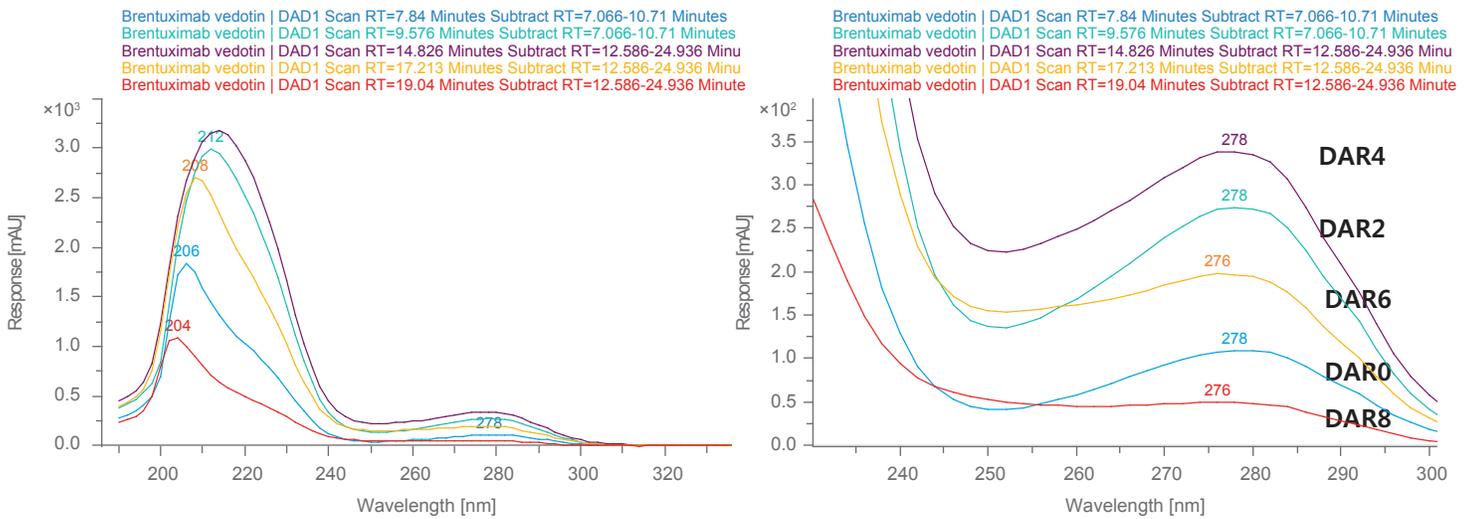


그림 7. Brentuximab vedotin의 DAR 피크 UV 스펙트럼.

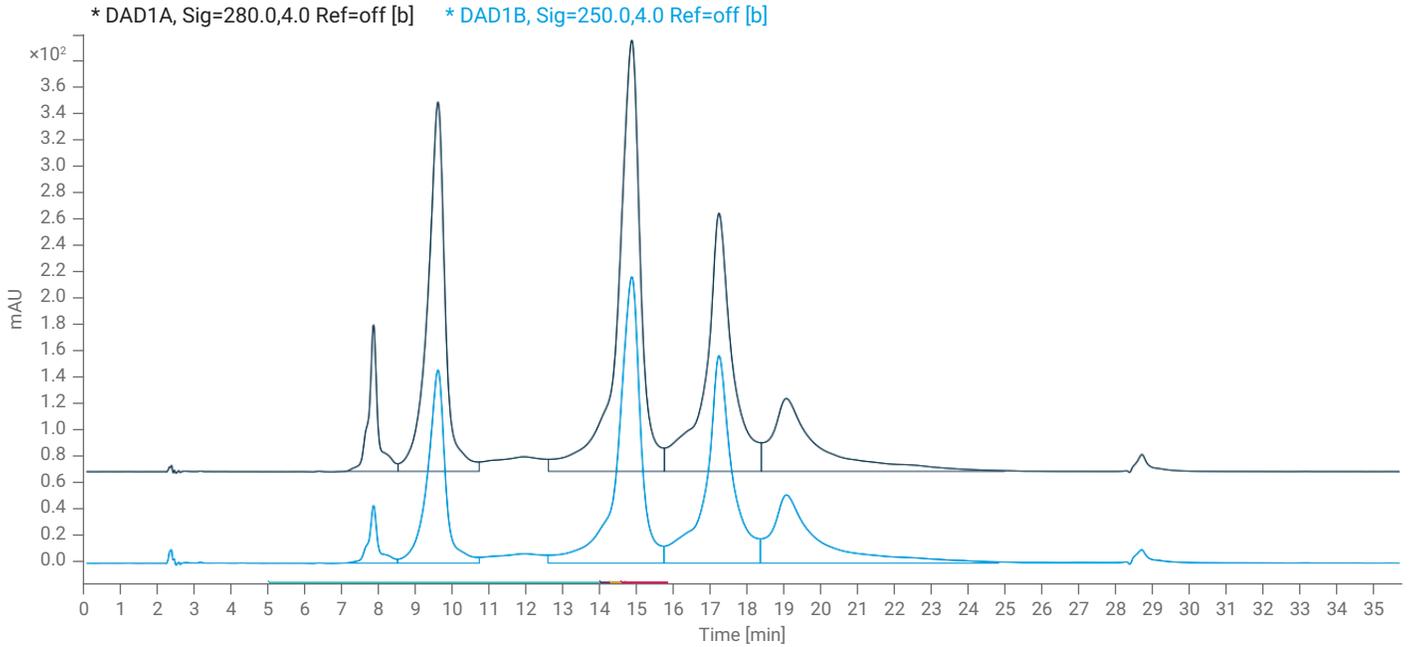


그림 8. Brentuximab vedotin의 소수성 상호작용 크로마토그래피 크로마토그램.

소수성 상호작용 크로마토그래피 크로마토그램은 OpenLab CDS 2.7을 사용하여 바탕선 감산을 수행한 뒤 면적을 확인했습니다. 280nm에서의 각 피크 면적과 250nm에서의 각 피크 면적을 확인하고, 위의 수식에 따라 DAR4 피크와 DAR6 피크에 대해 아래와 같이  $\epsilon_{drug}^{280}$ 을 확인하였고,  $\epsilon_{drug}^{280} = 0.0049 \epsilon_{mAb}^{280}$ 으로 산출되었습니다. 280nm의 피크 면적만으로 산출한 약물 대 항체 비율은 4.32였으나,  $\epsilon_{drug}^{280}$ 을 보정한 약물 대 항체 비율은 4.30으로 큰 차이가 없는 것으로 확인되었습니다.

$\epsilon_{drug}^{280}$ 을 DAR2 피크와 DAR4 피크를 기준으로 계산했을 때  $\epsilon_{drug}^{280} = -0.0240 \epsilon_{mAb}^{280}$ 으로, DAR6 피크와 DAR8 피크를 기준으로 계산했을 때,  $\epsilon_{drug}^{280} = 0.0003 \epsilon_{mAb}^{280}$ 으로 확인되었습니다. 종합적으로 페이로드는 280nm에서 피크면적에 거의 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있습니다.

표 8.  $\epsilon_{drug}^{280}$ 을 반영한 Brentuximab vedotin의 약물 대 항체 비율.

DAR	A280	A250	A250/A280	280nm 기반 DAR	보정 DAR
0	988.447	404.781	0.4104	0.00	0.00
2	2877.312	1568.963	0.5339	0.46	0.47
4	3553.422	2414.190	0.6705	1.40	1.41
6	2605.156	2116.903	0.7968	1.48	1.47
8	1210.333	1104.939	0.9253	0.97	0.96
			DAR	<b>4.32</b>	<b>4.30</b>

$$\frac{A_{DAR4}^{250}}{A_{DAR4}^{280}} \epsilon_{drug}^{280} + \left( \frac{A_{DAR4}^{250}}{A_{DAR4}^{280}} - \frac{A_{n=0}^{250}}{A_{n=0}^{280}} \right) / 4 \times \epsilon_{mAb}^{280} = \frac{A_{DAR6}^{250}}{A_{DAR6}^{280}} \epsilon_{drug}^{280} + \left( \frac{A_{DAR6}^{250}}{A_{DAR6}^{280}} - \frac{A_{n=0}^{250}}{A_{n=0}^{280}} \right) / 6 \times \epsilon_{mAb}^{280}$$

$$0.6705 \times \epsilon_{drug}^{280} + (0.6705 - 0.4104) / 6 \times \epsilon_{mAb}^{280} = 0.7968 \times \epsilon_{drug}^{280} + (0.7968 - 0.4104) / 6 \times \epsilon_{mAb}^{280}$$

$$\epsilon_{drug}^{280} = \frac{0.0006}{0.1263} \times \epsilon_{mAb}^{280} = 0.0049 \epsilon_{mAb}^{280}$$

## 결론 및 고찰

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 AdvanceBio HIC column을 이용하여 시스테인 링커 구조를 갖는 Brentuximab vedotin에 대한 약물 대 항체 비율을 확인하였습니다. 시험에 사용된 1.5M 농도의 ammonium sulfate 조건에서도 안정적인 분석 성능을 보였으며, Bio-inert로 구성된 60mm 층장의 Max-Light 카트리지가 셀을 1290 Infinity II DAD에 장착하여 사용함으로써 두개 이상의 파장에서 높은 감도의 정확한 약물 대 항체 비율을 얻을 수 있었습니다.

일반적으로 UV 검출기를 통한 약물 대 항체 비율 계산은 280nm에서의 피크 면적을 바탕으로 수행됩니다. 하지만, 페이로드가 갖는 UV의 흡광은 280nm에 영향을 미칠 수 있습니다. 위 사례를 통해 페이로드의 280nm에서의 몰흡광계수를 고려해야, 정확한 약물 대 항체 비율을 산출할 수 있습니다.

이 실험을 통해 Brentuximab vedotin의 페이로드가 280nm에서의 약물 대 항체 비율 계산에 거의 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었습니다.

## 참고 문헌

1. Sonja, S. Convenient and Reliable Analysis of Antibody Drug Conjugates. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3522EN, **2021**.
2. Andrew C., Sandeep K., An AdvanceBio HIC Column for Drug-to-Antibody Ratio (DAR) Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs). *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0149EN, **2018**.
3. Nathan T. Antibody-Drug Conjugates: Methods and Protocols. *Method in Molecular Biology*, **2020**.
4. Charles, D., Et al. Antibody-drug conjugates come of age in oncology. *Natural Reviews Drug Discovery*, **2023**.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

DE80796837

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023  
2023년 10월 9일, 한국에서 발행  
5994-6837KO

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

