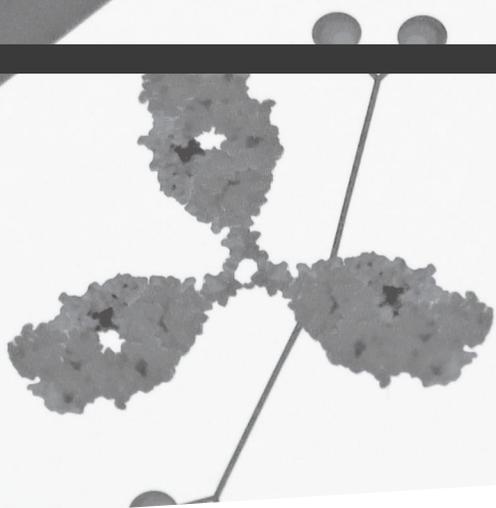


AGLink
ADC site-specific
conjugation kits-A

ite-specific AbC conjugation
gic bulle

AGLink® 部位特異結合キット



QRコードをスキャンしてこの
リソースをダウンロード



イントロ

抗体薬物複合体 (ADC) とは、一般的にモノクローナル抗体 (mAb) と細胞毒性ペイロードをケミカルリンカーを介して結合したものです。このような ADC の戦略的開発は必要不可欠で、各構成要素が最終的な治療有効性と安全性に影響を与える可能性があるため、各構成要素について慎重に検討する必要があります。¹

ADC 医薬品の重要な特性は薬物抗体比 (DAR) です。この比率は、1つの抗体に結合された細胞毒性薬物分子の数を意味します。DAR 値は医薬品の有効性に影響します: 薬物負荷数が小さい場合は効果が下がり、薬物負荷数が大きくなると毒性と薬物動態 (PK) に影響が生じます。1つの抗体に結合する薬物分子の数は、コンジュゲーション戦略に応じてバッチ間としてバッチ内で大きく変動することがあります。このように、適切なコンジュ

ゲーション戦略を選ぶことが、均一性と有効性の両面で最終的な ADC 製品に影響します。²⁻³

従来、コンジュゲーション法の多くは、あらかじめ存在するリン残基またはシステイン残基に適切なカップリング反応を介して非特異的結合により行うものです。この結果、0~8までの高い DAR 変動性とリンカーポジションの多様さにつながり、一連の不均一な ADC が生成されます。¹⁻³ ADC の有効性を高める目的で、配列工学によるシステイン残基、非天然アミノ酸、またはグリコシル基転移酵素を介した酵素結合など、部位特異的結合を活用してより均一な ADC が生成されています。³ さらには、結合部位の制御を増やすことでリンカー - ペイロードの全体の疎水性を減少させ、ペイロードが意図せず血中放出されることを回避できる可能性があります。³ 全般に、結合部位の均一性と標準化は共に、ADC の薬物動態と治療有効性を改善することで臨床的有效性を証明しています。

Conjugation strategies		Schematic diagram	Advantages	Disadvantages
Stochastic conjugation	Lysine sites		Rapid and convenient	Heterogeneous with random DAR (0-8) Reduced ADC binding affinity Poor therapeutic index
	Reduced cysteine sites		A relatively homogeneous product	The structure of antibody was broken Off-target toxicity as premature release of payloads
Site-specific conjugation	Engineered reactive cysteine residues		High homogeneity Tunable reactivity and stability	Genetic engineering required Typically limited to DAR 2
	Disulfide re-bridging		Tunable reactivity and stability No influence on spatial structure of antibody National amino acid sequence and glycosylation	Intrachain mis-bridging Typically limited to DAR 4
	Unnatural amino acids		High homogeneity Tunable reactivity and stability	Genetic engineering required Low antibody expression yields
			High efficiency of conjugation	Immunogenicity caused by unnatural amino acids sequence Aggregation as the hydrophobicity of unnatural amino acids
	Enzyme-assisted ligation		High homogeneity High homogeneity	Genetic engineering required for installation of recognition sequence Immunogenicity caused by extraneous amino acids sequence
	Glycan remodeling and glycoconjugation		High homogeneity No alteration of amino acid sequence	Glycosylation profile is important in immune recognition

図 1 ADC に用いられる各種コンジュゲーション法の特性¹

当社と Glyco-therapy Biotechnology Co., Ltd. との共同開発により、AGLink® の斬新な DAR2 と 4 つの部位に特異的結合できるキットの開発に成功しています。Glyco-therapy 社の YTConju™ 結合プラットフォームに基づいたキットは、毒素 (MMAE)、反応性官能基 (Tz/DBCO)、検出ラベル (ビオチン) など、さまざまなペイロードの効率的な結合を促進できます。結合薬物の分野における初期段階の研究と生物学的実験を強化するように設計されている製品となります。

製品一覧

分子名	製品番号	製品名	アプリケーション
MMAE	ADC-P005	AGLink® ADC Conjugation Kit (MMAE, DAR2&4, 1mg)	MMAE-ADC for Antibody screening, preparation, and performance studies
	ADC-P009	AGLink® ADC Conjugation Kit (MMAE, DAR2&4, 5mg)	
DBCO	ADC-P007	AGLink® ADC Conjugation Kit (DBCO, DAR2&4, 1mg)	Click Chemistry with Azide-MOI
	ADC-P011	AGLink® ADC Conjugation Kit (DBCO, DAR2&4, 5mg)	
Tetrazine	ADC-P006	AGLink® ADC Conjugation Kit (Tetrazine, DAR2&4, 1mg)	Click Chemistry with TCO-MOI
	ADC-P010	AGLink® ADC Conjugation Kit (Tetrazine, DAR2&4, 5mg)	
Biotin	ADC-P008	AGLink® ADC Conjugation Kit (Biotin, DAR2&4, 1mg)	Site-Specific Biotin labeled for detection antibody development
	ADC-P012	AGLink® ADC Conjugation Kit (Biotin, DAR2&4, 5mg)	

 MOI は、関心のある分子のことです。

 AGLink® コンジュゲーションキットは 2 箱: ボックス A と ボックス B で構成されています。試験を実施する前に A、B の両方が揃っていることを確認してください。

製品の特長

ワンポット、ワンステップ 	DAR 2 または DAR 4 は一つのキットで対応できる 	一晚～ 24 時間で均一な DAR 値を達成 
クリックケミストリー対応 	結合後は均質で安定している 	結合キットの種類は包括的 

製品の組成について

AGLink® ADC Conjugation Kit (MMAE, DAR2&4, 5mg*, ADC-P009) を例とします。

*5 mg の抗体結合は、5*1 mg で実行できます。

BoxA			
Name	Details	Quantity	Storage temperature
Enzyme A	GT	1×120µL	-20°C
Enzyme B	FT	1×120 µL	-20°C
Enzyme C	Endoglycosidase	1×40 µL	-20°C
Cofactor A	MnCl2 (0.1 M)	1×50 µL	-20°C
Cofactor B	MgCl2 (0.5 M)	1×50 µL	-20°C
20×Reaction buffer	20×Reaction buffer	1×100 µL	-20°C
Substrate A	UDP-Gal (0.1 M)	1×120 µL	-20°C
Substrate B	GDP-Fuc-vc-PAB-MMAE (50 mM)	1×120 µL	-20°C

BoxB			
Name	Details	Quantity	Storage temperature
Binding buffer	25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5	15ml	4°C
Elution buffer	0.1 M Glycine, pH 2.7	2mLx2	4°C
Neutralization buffer	1 M Tris-HCl, pH 8.0	1mL	4°C
Tris-HCl	250mM Tris-HCl buffer (pH7.5)	1.5mL	4°C
10xPBS	10xPBS	6ml	4°C
Desalting Spin column	Desalting Spin column, 2mL, 40K	2 pieces	4°C
Ultrafiltration concentrator	Ultrafiltration concentrator (include 2 collection tubes), 0.5 mL, 50 K	2 pieces	4°C-25°C
Pierce™ spin column	Pierce™ spin column (containing 100 µL protein A resin)	5 pieces	4°C

結合のメカニズム

ほとんどのモノクローナル抗体は、FcドメインのAsn-297(またはその付近)でグリコシル化されています。グリカンにはさまざまなアイソフォームがありますが、一般的にはG0F、G1F、G2F(>90%)を優勢なタイプとされています¹。AGLink®抗体結合キットは、Glyco-therapy Biotechnology Co., Ltd.社が部位特異的抗体結合体の構築のために開発したグリカンリモデリング戦略であるYTConju™プラットフォームを利用しています²。

DAR2の結合

DAR2結合を構築するには、まずエンドグリコシダーゼの触媒作用によりコアGlcNAcからグリカンを除く必要があります。次に、β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(GT)の触媒作用によりGlcNAcにガラクトースが付加され、コアLacNAcを形成します。最後に、α-1,3-フコシルトランスフェラーゼ(FT)がLacNAcを認識し、FucペイロードをLacNAcのGlcNAcに転移して、理論上のDARが2の結合を形成されます。

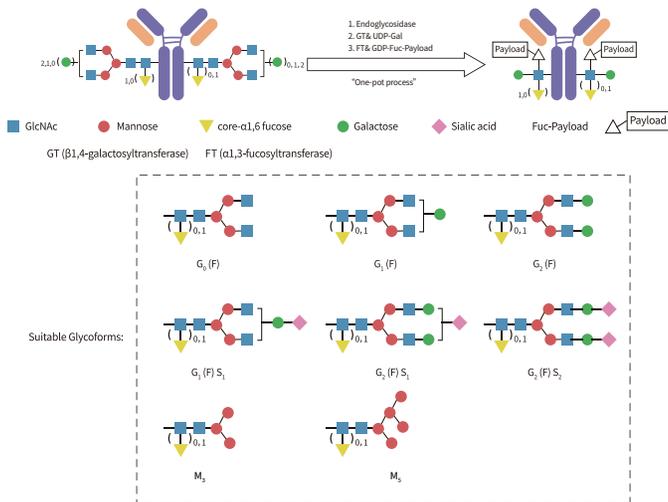


図 2-1 AGLink® を使用した DAR2 ADC 調製の原理

AGLink® ADC Conjugation Kit (MMAE, DAR2&4, 5mg*, ADC-P009) を例とします。

*5 mg の抗体結合は、5*1 mg で実行できます。

AGLink® DAR2&4 抗体結合キットは、DAR2 結合体と DAR4 結合体の構築手順を1つのキットに統合し、DAR設計の柔軟性を実現します。

DAR4の結合

DAR4の結合を構築するには、まず、β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(GT)によって触媒される末端GlcNAcにガラクトースが付加され、LacNAcが形成されます。次に、α-1,3-フコシルトランスフェラーゼ(FT)がLacNAcを認識し、FucペイロードをLacNAcのGlcNAcに転移して、理論上のDARが4つのコンジュゲートを形成されます。

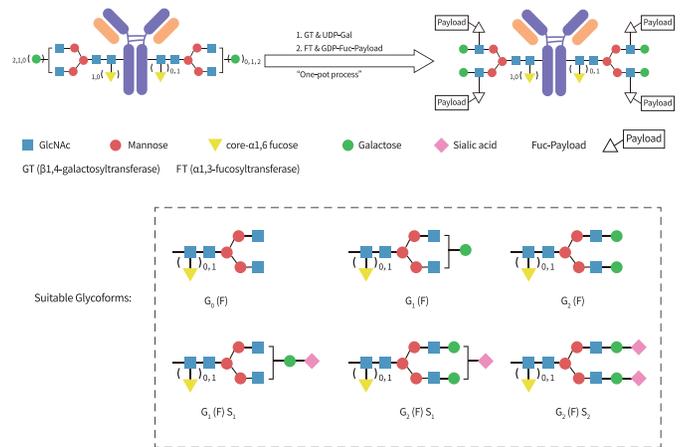
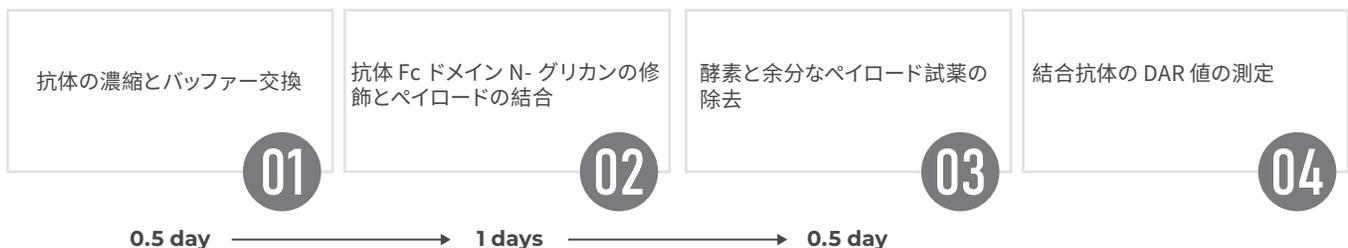


図 2-2 AGLink® を使用した DAR4 ADC 調製の原理

DAR4 と DAR2 の結合プロセスは、FT、GT、GDP-Fuc-Payload も同じになります。2つのプロセスの主な違いは、エンドグリコシダーゼの追加です。これらの手順は、精製ステップが1つだけの「ワンポット」方式で実行されるため、非常に便利で効率的です。このキットで生成される抗体結合体は、高い均質性、高い安定性、高い親水性を示します。

実験手順



結合キットの種類

• 毒素

使用例

ADC 分野における抗体のスクリーニング、調製、パフォーマンス研究のための MMAE との結合。

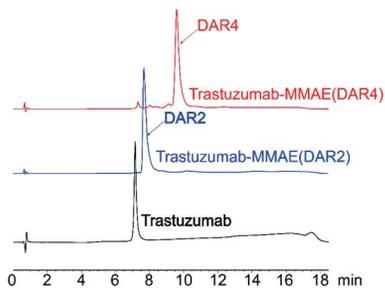
推奨製品

AGLink® ADC Conjugation Kit (MMAE, DAR2&4, 1mg)
(Cat.No.[ADC-P005](#))

AGLink® ADC Conjugation Kit (MMAE, DAR2&4, 5mg)
(Cat.No.[ADC-P009](#))

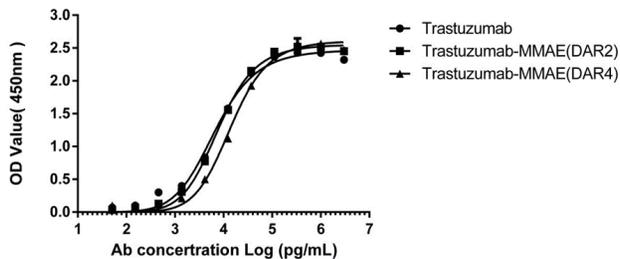
検証データ

- 均一性の高いコンジュゲート抗体



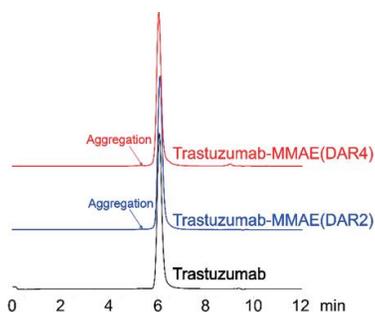
HIC-HPLC analysis of MMAE ADCs (DAR 4 & DAR 2). A shift in retention time was observed for higher DAR ADCs result associated with to the hydrophobic payload (MMAE). After conjugation using AGLink® ADC kit, it can be observed that the resulting ADCs are highly homogenous for both DAR2 and DAR4 conjugation mechanisms.

- 結合後も生物活性を維持



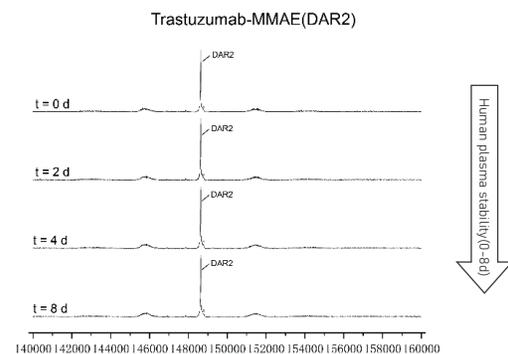
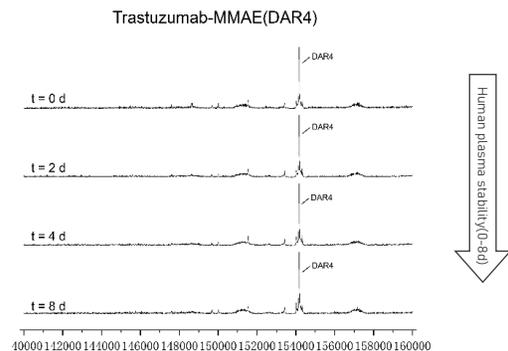
ELISA analysis was performed to test the antigen-binding capacity of both DAR2 and DAR4 ADCs. HER2 antigen binding to Trastuzumab-MMAE (DAR2/4) was unaffected after the AGLink® conjugation, preserving antibody bioactivity.

- 部位特異的な標識プロセスの一貫性により凝集を緩和



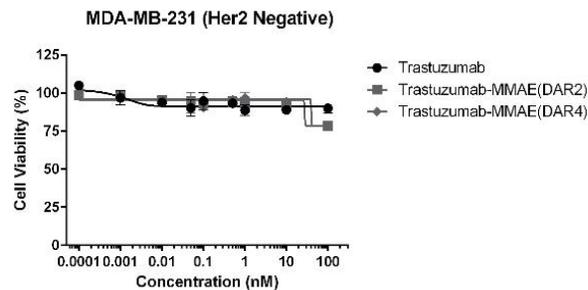
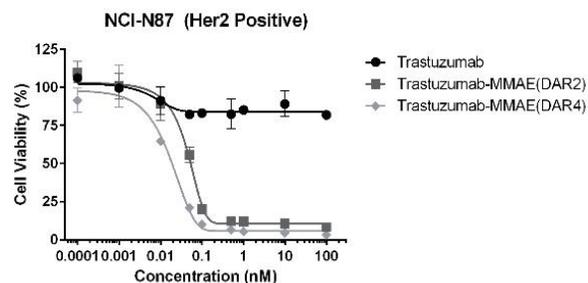
SEC-HPLC was performed to evaluate ADC aggregation. No observable peaks were seen in the resulting chromatogram, with less than 5% of antibody aggregation.

- AGLink® ADC の *In vitro* 血漿安定性試験



MMAE ADCs (DAR2/4) were spiked into human plasma and tested over 8 days and evaluated through LC-MS. Both types of ADCs were stable *in vitro* throughout the experiment.

- *In vitro* 細胞毒性活性アッセイ



MMAE ADCs (DAR 2/4) were evaluated on its cytotoxicity to HER2 positive and negative cell lines. The ADCs developed in this study were proven to induce cell death in HER2 positive cell lines, while preserving cell viability in HER2 negative cells.

・反応性官能基

官能基

・ DBCO:

DBCO はクリックケミストリーで N3 含有分子と反応し、修飾された分子の親水性を高めます。

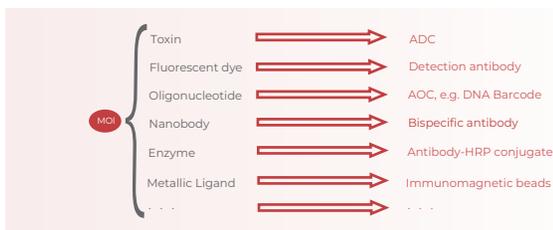
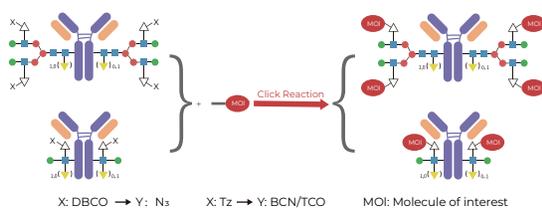
・ Tetrazine:

BCN または TCO 官能基と反応するテトラジンは優れた反応性を示し、複雑な分子の結合に適しています。

使用例

クリックケミストリー反応を利用することで、毒素、蛍光染料、オリゴヌクレオチド、ナノボディなど、さまざまな部分の結合が可能になります。

調製の原理



推奨製品

AGLink® ADC Conjugation Kit (DBCO, DAR2&4, 1mg)
(Cat.No.[ADC-P007](#))

AGLink® ADC Conjugation Kit (DBCO, DAR2&4, 5mg)
(Cat.No.[ADC-P011](#))

AGLink® ADC Conjugation Kit (Tetrazine, DAR2&4, 1mg)
(Cat.No.[ADC-P006](#))

AGLink® ADC Conjugation Kit (Tetrazine, DAR2&4, 5mg)
(Cat.No.[ADC-P010](#))

・検出ラベル

使用例

検出または診断のための抗体のスクリーニングと調製

特長

従来の化学ラベルに比べて、より均質な製品とロット間の一貫性が向上になります

推奨製品

AGLink® ADC Conjugation Kit (Biotin, DAR2&4, 1mg)
(Cat.No.[ADC-P008](#))

AGLink® ADC Conjugation Kit (Biotin, DAR2&4, 5mg)
(Cat.No.[ADC-P012](#))

FAQ

1. 反応に必要な最小用量は？

最小要件は 200 µg で、予想される回収率は 85% を超えます。これに合わせて、提供されたプロトコルに従って反応試薬を比例でスケールダウンしてください。

2. プロトコルに従って抗体を濃縮させる必要がありますか？

最適な反応効率を得るには、プロトコルで推奨されている濃度まで抗体を濃縮することをお勧めします。濃縮が不可能な場合は、抗体濃度が 1 mg/ml 以上になるようにし、結合効率を維持するために反応時間を 48 時間に延長してください。

3. この結合キットは、あらゆる種の抗体に適していますか？

この結合キットは、ヒト抗体の結合に非常に効果的です。ただし、マウスおよびウサギの抗体は構造が複雑で検証が不完全なため、結合効率を高めるために結合時間を最大 48 時間延長する必要がある場合があります。

4. AGLink® ADC 結合キットのリンカーは加水分解できますか？どのような方法で加水分解させますか？

AGLink® ADC 結合キット (MMAE, DAR2 または 4, 1 mg および 5 mg) のリンカーは vc-PAB であり、カテプシン B によって切断できます。他のキットのリンカーの切断可能性は、クリックケミストリー結合中に切断可能なリンカーが使用されるかどうかによって異なります。

5. 結合キットの結合効率は何のくらいですか。また、結合製品の薬物抗体比 (DAR) を検出するためにどのような方法が使用されますか？

これらのキットの結合効率は 90% を超えることがあり、DAR 値は HIC-HPLC (MMAE) または LC-MS (MMAE/DBCO/ テトラジン / ビオチン) を使用して分析できます。

6. 結合した製品をどのように保管し、その条件下でその安定性を保つのですか？

結合した製品は PBS バッファーで保管することをお勧めします。このバッファーでは -80° C で 6 か月以上保存できます。凍結融解を何回も繰り返すことは避けてください。

7. このキットにはどのような環境が必要ですか？

AGLink® 結合キットは通常の実験室環境で使用できます。MMAE を取り扱う際は、必ず個人用保護具 (実験着、安全メガネ、耐薬品性ニトリル手袋) を使用してください。

8 この製品には特許制限がありますか？また、CMC の開発と商業生産に影響しますか？

当社の AGLink® 結合キットの知的財産は、Glyco-therapy Biotechnology Co., Ltd. が所有または管理する特許によって一部または全部が保護されています。詳細については、inquiry@acrobiosystems.com までお問い合わせください。

9. Fc N297 部位が変異している場合でも、部位特異的結合は実行できますか？

現在の結合キットは、グリコシル化部位での部位特異的修飾用に設計されているため、N297 Fc グリコシル化部位が除去されている場合、このキットは使用できません。ただし、代替方法を使用して部位特異的結合を実現できます。



包括的な ADC カタログは
こちらから

Copyright Statement

“

This material is copyrighted by the Company. All rights in this material are reserved by the Company. Unless otherwise indicated in writing, all material in this material is copyrighted by the Company. No part of this material may be copied, photocopied or reproduced in any form or redistributed to any other person or used in any other manner which infringes the Company's copyright without the prior written authorisation of the Company.

”



BIOSYSTEMS
Acro

株式会社アクロバイオシステムズ
1 Innovation Way, Newark, DE 19711, USA
+ 81-50-547-99099 (Asia & Pacific)
techsupport@acrobiosystems.com
order.jp@acrobiosystems.com
jp.acrobiosystems.com



QRコードをスキャンしてこの
リソースをダウンロード

