

# Agilent ProteoAnalyzer system による 抗体薬物複合体（ADC）分析

## 著者

Whitney Pike,  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

このアプリケーションノートでは、キャピラリー SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）電気泳動（CE-SDS）による抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate: ADC）分析における、Agilent ProteoAnalyzer system の利用方法について示します。ProteoAnalyzerが提供する高い分解能により、これらのサンプルの正確なサイジングおよび不均一性の評価が可能になります。システインおよびリジン結合型 ADC から得られた代表的な泳動パターンおよび定量データは、ADC の特性解析および品質管理における、このシステムの高い精度と再現性を示しています。

## はじめに

抗体薬物複合体 (ADC) は、安定したリンカーを介して薬物に結合したモノクローナル抗体 (mAb) で構成される、標的バイオ医薬品です。薬物抗体比 (drug-to-antibody ratio : DAR)、複合化手法、リンカーケミストリーなどの要素は、ADC の治療効果、安全性、および生物物理学的特性に大きな影響を与えます。キャピラリー SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 電気泳動 (CE-SDS)、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)、質量分析などの高度な分析技法は、不均一性、純度、DAR、ペイロードの位置といった ADC の重要な品質特性 (CQA) を評価するのに不可欠です。

CE-SDS は、ADC 解析において、分子量、サイズ不均一性、および純度の評価に使用されます。この技術は、サイズが類似した変異体に対して高分解能で識別できるため、SDS による解離が可能な抗体フラグメントのモニタリングに最適です。電気泳動プロファイルは、システインやリジン残基などの薬物複合化部位 (図 1) によって異なります。さらに、ADC 製造プロセスにおいて、リンカーケミストリーの違いにより、軽鎖と重鎖の間に非ジスルフィドの共有結合架橋が形成されるため、抗体の構造、また結果的に分離プロファイルに影響を与える可能性があります<sup>1, 2</sup>。

ProteoAnalyzerは、還元および非還元の両方のタンパク質の CE-SDS 解析を自動化し、最大 12 サンプルを同時に分析することにより、効率的なワークフローを実現します<sup>3</sup>。抗

体サンプルの正確なサイジングは困難な場合がありますが、このシステムでは、二次構造に起因する移動度の違いを補正するために、カスタムのサイズキャリブレーションラダーを使用することができます。これまでの検討では、mAb の分析時に NIST mAb およびその関連する抗体フラグメントがラダーとして使用できることが示されており<sup>4</sup>、ここでは非還元 ADC のサイジングに使用しています。このアプリケーションノートでは、システインおよびリジン結合型 ADC の例を用いて、包括的な ADC 分析での ProteoAnalyzerの機能について紹介します。

## 実験方法

市販の ADC サンプルおよび対応する未修飾の mAb 標準を入手して、ProteoAnalyzer を用いた分析用に調製しました。サンプルには以下が含まれています。SiLu SigmaMab ユニバーサル抗体標準ヒト (Sigma、型番 MSQC4-1MG)、SigmaMab 抗体薬物複合体 (ADC) ミミック (Sigma、型番 MSQC8-0.5MG)、トラスツズマブ、トラスツズマブデルクステカン (MedChem Express、型番 HY-

138298A)、およびトラスツズマブエムタンシン (T-DM1) (MedChem Express、型番 p/n HY-P9921)。サンプルは 10 mg/mL に再溶解し、さらに Nuclease-free water で 1.5 mg/mL に希釈しました。サンプル濃度は NanoDrop により確認しました (設定 : Protein A280、曲線タイプ : other E1 %、吸光係数 : 14.3)。

その後、各サンプルを、Agilent Protein Broad Range P240 Kit (型番 5191-6640) のマニュアルに従い、還元および非還元条件下の両方で調製しました<sup>5</sup>。サンプルは、キット付属の試薬と 70 °C で 10 分間インキュベートし、共有結合によりラベル化しました。ProteoAnalyzer を用いて、ProteoAnalyzer Broad Range Kit Lowert Marker (LM) only method で、還元・非還元抗体を同時分析しました。非還元条件では、最適な結果を得るために、サンプル注入を 7 kV、6 秒に設定しました<sup>6</sup>。非還元サンプルのサイジング分析は、NIST mAb をラダーとして使用しました<sup>4</sup>。

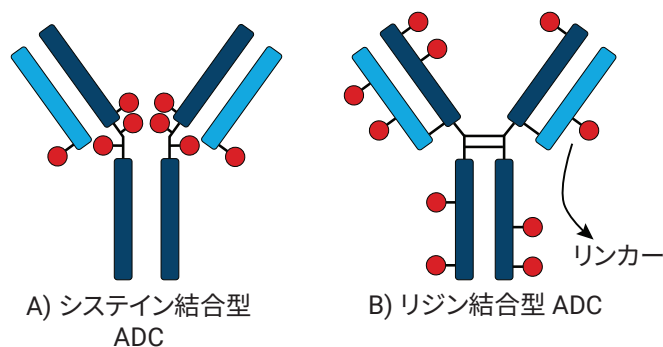


図 1. (A) システインおよび (B) リジン結合型抗体薬物複合体 (ADC) の概略図。赤い丸は、薬物が結合する可能性のある部位を示しています。

## 結果と考察

### 還元条件下でのシステイン結合型 ADC

還元条件下でのシステイン結合型 ADC の CE-SDS 分析では、軽鎖 (LC) および重鎖 (HC) を示すことが予想されます。これらのピークに加え、ペイロード非結合 LC (L0) および 1 分子のペイロードが結合した LC (L1) の部分的な分離も観察される場合があります。L0 と L1 の電気泳動による分離は、ペイロードおよび抗体のサイズと特性に依存します<sup>7,8</sup>。

SigmaMab ADC ミミックおよびその未修飾体である SigmaMab 抗体標準について、還元条件下で ProteoAnalyzer を用いて分析しました。この抗体標準は IgG1 モノクローナル抗体であり、LC および HC を示す 2 つの主要なピークが観察されることが予想されます (図 2A)。ADC ミミックは、SigmaMab 抗

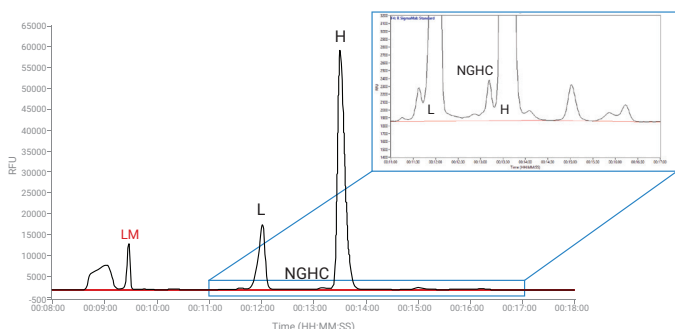
体標準に LC-SMCC クロスリンカーを介してダンシル蛍光色素分子が結合されています。ADC の電気泳動プロファイルは、予想される LC および HC が観察され、さらに LC は、L0 および L1 ペイロードに一致する 2 つのピークに分離されています (図 2B)。

システイン結合型 ADC の別の例として、トラスツマブにトポイソメラーゼ I 阻害剤であるデルクステカンを共有結合させたトラスツマブ デルクステカンが挙げられます。トラスツマブおよびトラスツマブ デルクステカン ADC は、図 2C ~ D に示すように、LC および HC の顕著なピークが存在し、さらに小さな NGHC ピークも存在するという点において、類似したプロファイルを示しました。ProteoAnalyzer では、結合型と非結合型の形態の違いを区別することはできませんで

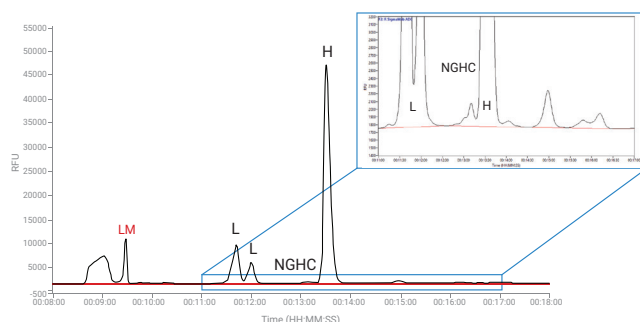
したが、LC、NGHC、および HC のピークを分離することにより、グリコシル化の割合やチオエーテルの割合といった CQA の算出が可能です。

mAb とシステイン結合型 ADC のサイジングおよび濃度解析を 3 回繰り返した結果、高い再現性が示されました。すべてのサンプルにおいて、サイジング精度は 2.5 % CV 未満、定量精度は 10 % CV 未満でした (表 1)。

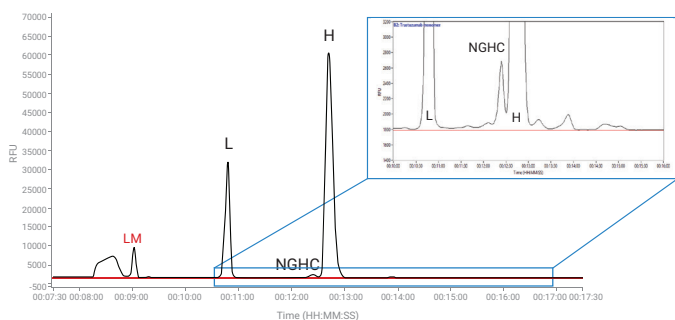
A) 還元 SigmaMab 抗体標準



B) 還元 SigmaMab ADC ミミック



C) 還元トラスツマブ



D) 還元トラスツマブ デルクステカン

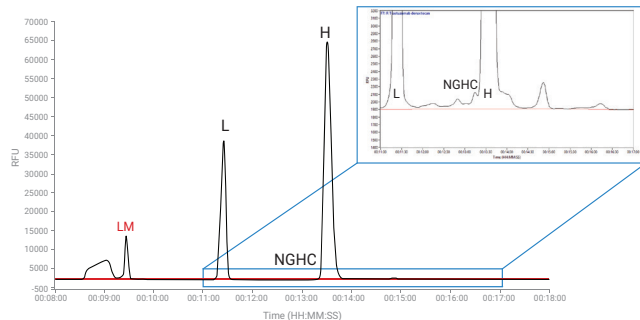


図 2. ProteoAnalyzer および Protein Broad Range P240 Kit を用いた還元条件下での分析 (A) SigmaMab 抗体標準、(B) SigmaMab ADC ミミック、(C) トラスツマブ (D) トラスツマブ デルクステカン

表 1. ProteoAnalyzer および Protein Broad Range P240 Kit を用いた還元条件下での平均サイジングおよび濃度 (n = 3) (A) SigmaMab 抗体標準、(B) SigmaMab ADC ミミック、(C) トラスツズマブ (D) トラスツズマブ デルクステカン

	mAb chains	Appx. size	Size (kDa)		Concentration (ng/μL)	
			Average	%CV	Average	%CV
還元 SigmaMab 抗体標準	L	25	36.87	0.31	239.65	1.54
	NGHC		56.97	0.51	7.40	9.25
	H	50	62.60	0.55	830.24	0.99
還元 SigmaMab ADC	L	25	32.80	0.61	190.98	0.41
	L	25	37.77	0.40	96.09	0.90
	NGHC		58.63	0.43	6.92	1.93
	H	50	65.77	0.84	846.18	1.44
還元トラスツズマブ	L	25	25.80	1.69	523.95	0.28
	NGHC		54.17	2.32	18.44	1.37
	H	50	60.03	2.11	1267.31	2.77
	L	25	27.05	0.26	431.20	0.58
還元トラスツズマブ デルクステカン	NGHC		57.90	0.49	2.59	7.84
	H	50	62.25	0.34	869.34	0.85

### 非還元条件下でのシステイン結合型 ADC の CE-SDS 分析

非還元 CE-SDS 条件下では、システイン結合型 ADC は、LC や HC といった特徴的なフラグメントのほかに、重鎖-軽鎖 (HL)、重鎖-重鎖 (HH)、および重鎖-重鎖-軽鎖 (HHL) のフラグメントを示します。ADC は、抗体に結合された薬物の数と位置に基づいて、SDS の存在下で解離します。薬物の存在により、鎖間のジスルフィド結合が再形成されなくなります<sup>9</sup>。システイン結合型 IgG1 ADC で予想されるフラグメントの例を図 3 に示します。ADC サンプルを ProteoAnalyzer で分析し、システイン結合型 ADC サンプルの評価における本システムの性能を検証しました。非還元条件下での SigmaMab およびトラスツズマブ ADC の電気泳動プロファイルの代表的な例を図 4 に示します。

薬物抗体比 (DAR)	ペイロードの位置	非還元条件下で形成されるフラグメント				
0	DAR0		mAb			
2	DAR2 <sub>f</sub>			HHL		L
	DAR2 <sub>n</sub>		mAb			
4	DAR4 <sub>ff</sub>			HH		2L
	DAR4 <sub>fn</sub>			HHL		L
	DAR4 <sub>nh</sub>				2HL	
6	DAR6 <sub>fnh</sub>			HH		2L
	DAR6 <sub>fn</sub>			HL	H	L
8	DAR8				2H	2L

図 3. システイン結合型 IgG1 ADC の位置異性体から予想されるフラグメント

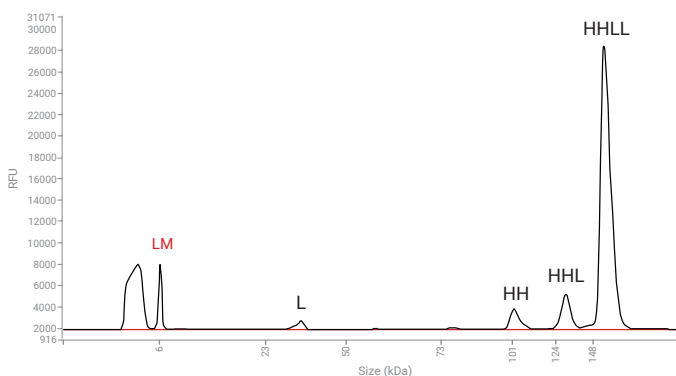
SigmaMab 抗体標準では、4つの主要なピークが観察されました。NIST mAb をラダーとしてサイジングした場合、メインのピークの平均サイズは 156 kDa であり、これはインタクト mAb (HHLL) の予想される分子量である約 150 kDa に近い値でした。他の 3 つのピークは、平均サイズ 35、103、および 131 kDa で、それぞれ L、HH、および HHL を示しています (図 4A、表 2)。SigmaMab ADC ミミックでは、L、H、HL、HH、HHL、および HHLL と一致するサイズの複数のピークが観察されました (図 4B)。L 鎖の領域内には 3 つの明確

なピークが存在しており、これらは異なるペイロードの位置を表していると考えられます。各ピークの平均サイズと濃度を表 2 に示します。

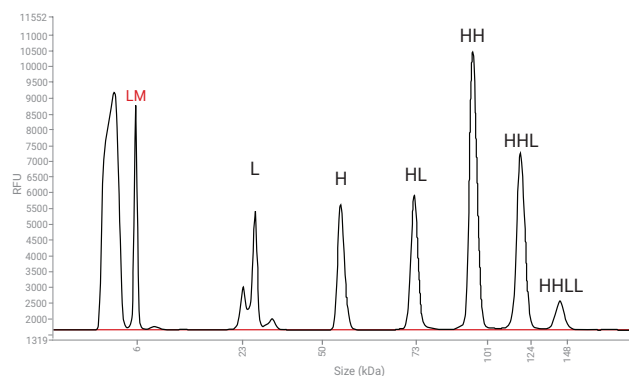
トラスツズマブおよびトラスツズマブ デルクステカン ADC を図 4C ~ D に示します。単量体のトラスツズマブサンプルは、メインピークが約 150 kDa で、これはインタクト mAb、つまり HHLL を示しています。また、L、H、HL、HH、および HHL 鎖と同様のサイズの小さなピークも確認できます。これらのピークのサイズを、トラスツズマブ デルクステカンのピークと比較することにより、サンプルのピーク同

定の信頼性が向上します。非還元分析では、ADC は 22 および 56 kDa に 2 つの大きなピークが確認され、L 鎖および H 鎖の量の増加が示されました。エレクトロフェログラムの高分子側にある 3 つの小さなピークの平均サイズは 73、100、および 126 kDa であり、これは H、HL、および HH フラグメントを示しています。これらの結果から、システイン結合型 IgG1 ADC は、ProteoAnalyzer を用いて適切に分析できることがわかります。

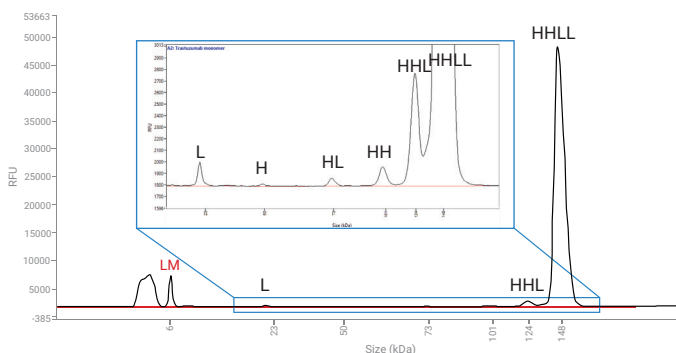
A) 非還元 SigmaMab 抗体標準



B) 非還元 SigmaMab ADC ミミック



C) 非還元トラスツズマブ



D) 非還元トラスツズマブ デルクステカン

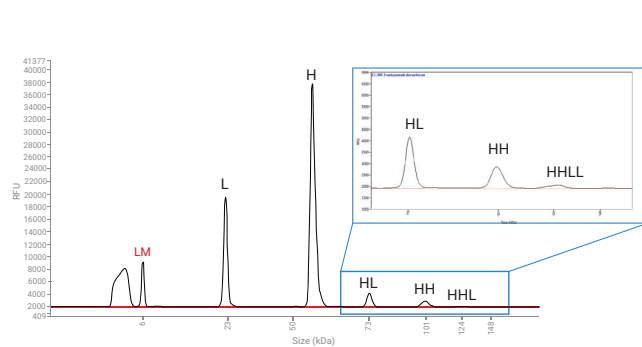


図 4. ProteoAnalyzer および Protein Broad Range P240 Kit を用いた非還元分析。NIST mAb をラダーとして使用した (A) SigmaMab 抗体標準 (B) SigmaMab ADC ミミック (C) トラスツズマブ (D) トラスツズマブ デルクステカン

表 2. ProteoAnalyzerおよび Protein Broad Range P240 Kit を用いた非還元条件下での平均サイジングおよび濃度 (n = 3) NIST mAb をラダーとして使用した (A) SigmaMab 抗体標準 (B) SigmaMab ADC ミミック (C) トラスツズマブ (D) トラスツズマブ デルクステカン

	mAb chains	Appx. size	Size (kDa)		Concentration (ng/μL)	
			Average	%CV	Average	%CV
非還元 SigmaMab 抗体標準	L	25	35.43	1.55	29.79	3.38
	HH	100	103.03	3.23	60.92	3.68
	HHL	125	131.60	3.23	94.53	2.16
	HHL (intact)	150	156.77	3.06	822.93	0.56
非還元 SigmaMab ADC	L	25	24.73	2.07	35.05	3.44
			28.63	1.72	79.74	2.03
			34.63	2.05	13.51	5.97
	H	50	56.53	1.67	104.77	0.89
	HL	75	76.10	2.94	105.56	0.46
	HH	100	100.20	3.34	213.74	0.26
	HHL	125	127.67	4.27	136.89	0.31
	HHLL (intact)	150	154.77	3.84	25.37	5.77
非還元トラスツズマブ	L	25	21.77	0.53	6.46	0.68
	H	50	48.80	0.35	0.83	9.47
	HL	75	72.13	0.21	2.34	6.45
	HH	100	98.93	0.21	6.06	4.95
	HHL	125	122.50	0.67	34.38	1.89
	HHLL (intact)	150	144.20	0.42	1641.45	0.55
非還元トラスツズマブ デルクステカン	L	25	22.37	0.52	280.83	0.97
	H	50	56.53	0.51	662.96	1.94
	HL	75	73.30	1.21	41.45	2.36
	HH	100	100.07	1.01	22.56	2.26
	HHL	125	126.03	1.55	4.37	4.60

## リジン結合型 ADC 分析

リジン結合型 ADC には、システイン結合型 ADC とは異なる分析上の考慮事項があります。非還元 CE-SDS 分析において、リジン結合型 ADC は、システインジスルフィド結合を保持しているため、電気泳動プロファイルは、未修飾の mAb のプロファイルと非常に類似しています。この類似性により、単量体の純度および全体的な分子の完全性を容易に評価することができます。

代表的な例として、SMCC リンカーを介して抗チューブリン薬 DM1 をトラスツズマブのリジン残基に結合させた ADC である、トラスツズマブ エムタンシン (T-DM1) が挙げられます。製造プロセスでは、最初にリンカーを付着させ中間体 TmAb-MCC を形成し、その後 DM1 をリンカーに結合させます。この中間体は、HC と LC の間に非ジスルフィドの共有結

合を形成する場合があります。これは CE-SDS により検出することができます。T-DM1 における抗体 1 分子あたりの薬物負荷分布は 0 ~ 8 の範囲であり、平均薬物抗体比 (DAR) は約 3.5 です。

ProteoAnalyzer を用いた非還元条件下でのトラスツズマブ エムタンシンの CE-SDS 分析では、約 150 kDa に主なピークが観察されますが、これはインタクト mAb と一致しており、未修飾のトラスツズマブと類似しています (図 5)。さらに、エレクトロフェログラムプロファイルは、顕著なフラグメント化は観察されませんでした。単量体構造の解析により、ProteoAnalyzer を用いた ADC の単量体純度に関する信頼性の高い CQA 評価が可能になります。

還元条件下での CE-SDS 分析では、予想される LC、HC、および高分子量体が認められ

した (図 6)。未修飾のトラスツズマブでは検出されなかったこれらの高分子量フラグメントは、非還元 NIST mAb をラダーとして使用した場合のサイズは、約 75、100、および 125 kDa でした (表 3)。これらの存在は、以前報告されているように、製造時に HC と LC の間に非ジスルフィドの共有結合が形成されたことを示唆しています<sup>2</sup>。

リジン結合型 ADC の場合、ProteoAnalyzer の感度は、DAR の影響を受ける可能性があります。すべてのリジン残基がペイロードに結合されている場合、色素が結合できるリジンが不足するため、ADC の検出が困難になる可能性があります。

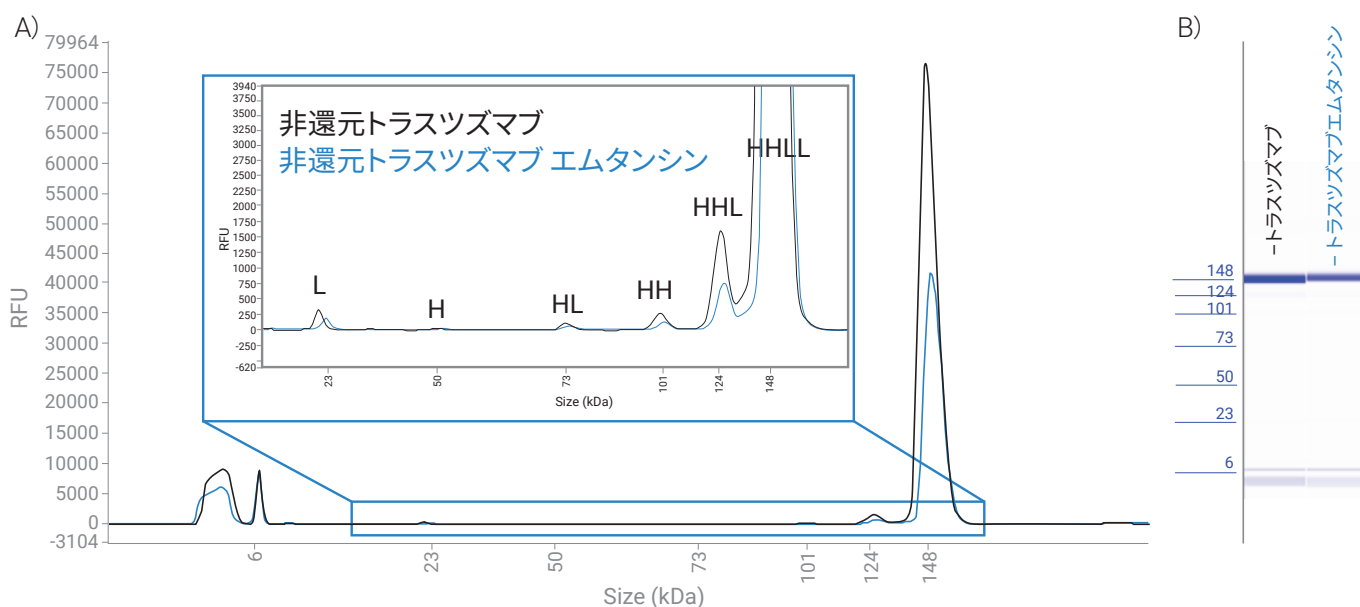


図 5. ProteoAnalyzer および Protein Broad Range P240 Kit を用いた非還元 CE-SDS 分析。ラダーとして NIST mAb を使用した (A) エレクトロフェログラムの重ね表示トラスツズマブ (黒) トラスツズマブ エムタンシン (青) の (B) ゲルイメージ

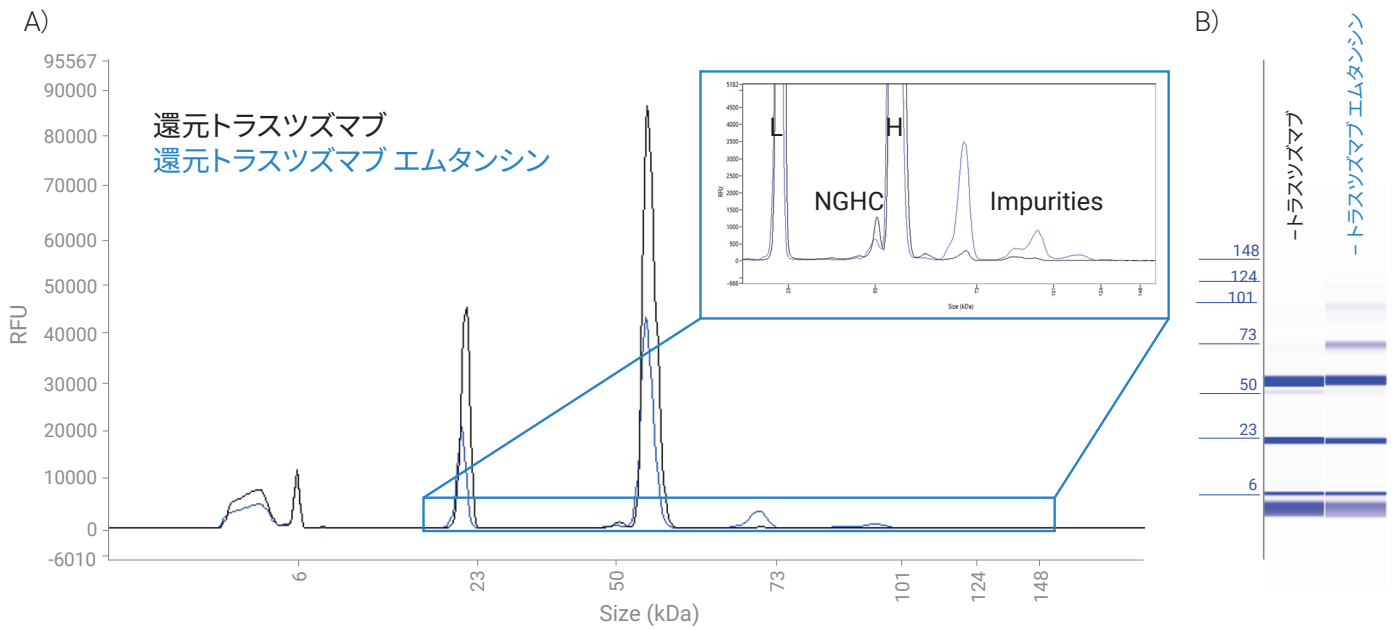


図 6. ProteoAnalyzerおよび Protein Broad Range P240 Kitを用いた還元 CE-SDS 分析。ラダーとして NIST mAb を使用した (A) エレクトロフェログラムの重ね表示トラスツズマブ (黒) トラスツズマブ エムタンシン (青) (B) ゲルイメージ

表 3. ProteoAnalyzerおよび Protein Broad Range P240 Kit を用いた非還元および還元条件下でのトラスツズマブ エムタンシンの平均サイジングおよび濃度 (n = 3) ラダーとして NIST mAb を使用した。

	mAb chains	Appx. size	Size (kDa)		Concentration (ng/ $\mu$ L)	
			Average	%CV	Average	%CV
非還元トラスツズマブ エムタンシン	L	25	22.30	1.35	3.79	5.69
	H	50	50.70	1.71	0.45	5.24
	HL	75	72.63	0.65	1.41	3.43
	HH	100	100.03	0.74	2.78	1.42
	HHL	125	123.83	1.02	17.03	2.06
	HHLL (intact)	150	146.97	0.89	965.88	1.44
	Impurity		225.70	0.94	12.69	2.64
還元トラスツズマブ エムタンシン	L	25	21.50	0.47	267.45	0.26
	NGHC		51.33	0.22	12.70	1.68
	H	50	55.13	0.21	652.78	0.71
	HL	75	71.03	0.16	69.48	0.44
	Impurities		88.60	0.20	7.49	3.10
	Impurities		97.43	0.41	21.04	3.88
	Impurities		115.27	0.70	5.29	1.99

## まとめ

Agilent ProteoAnalyzer system は、CE-SDS 分析によるシステイン結合型 ADC の詳細な特性解析が可能です。還元条件下では、エレクトロフェログラムに LC、HC の明確なピークが示されており、場合によっては、ペイロードの有無 (L0 および L1) により部分的に分離した LC も観察されます。これらの結果は、薬物複合化により生じる不均一性を明確に示しており、このシステムのサイジングおよび定量における精度が高いことを実証しています。

非還元 CE-SDS 分析では、LC、HC、HL、HH、HHL 鎖などの特徴的なフラグメントがさらに区別されており、位置異性体に関する知見が得られます。このデータを HIC と組み合わせることにより、平均 DAR とペイロードの位置を完全に特性解析することができます。これらのフラグメントの存在および相対量は、予想される分子量および分子構造と一致しており、このシステムが複雑な ADC 混合物を分離できることを示しています。また、これらの結果から ProteoAnalyzer がシステイン結合型 ADC の堅牢で再現性の高い分析を実現しており、純度評価と構造特性解析の両方をサポートすることが示されています。

トラスツズマブ エムタンシンなどのリジン結合型 ADC の CE-SDS 分析により、非還元条件下での泳動プロファイルが未修飾 mAb のプロファイルと非常に類似しており、単量体純度の評価が可能です。還元プロファイルから、固有の架橋体が認められ、複合化ケミストリーが抗体構造に及ぼす影響に関する知見が得られています。完全な特性解析を実施するためには、CE-SDS を HIC などの分析メソッドと追加で組み合わせる必要があります<sup>10</sup>。

このアプリケーションノートでは、ProteoAnalyzer がシステインおよびリジン結合型 ADC の両方に対して、詳細で再現性の高い分析を実現することを示しています。このシステムは、フラグメントの分離、サイジング、定量が可能であり、純度評価と構造特性解析の両方をサポートしているため、ADC の開発および品質管理において有用なツールになります。

## 参考文献

1. Chen, T.; Chen, Y.; Stella, C.; Medley, C. D.; Gruenhagen, J. A.; Zhang, K. Antibody-Drug Conjugate Characterization by Chromatographic and Electrophoretic Techniques. *Journal of Chromatography B*, **2016**, 1032, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.023>.
2. Wakankar, A. A.; Feeney, M. B.; Rivera, J.; Chen, Y.; Kim, M.; Sharma, V. K.; Wang, Y. J. Physicochemical Stability of the Antibody-Drug Conjugate Trastuzumab-DM1: Changes due to Modification and Conjugation Processes. *Bioconjugate Chemistry*, **2010**, 21 (9), 1588–1595. <https://doi.org/10.1021/bc900434c>.
3. Protein Sizing and Quantification with the Agilent ProteoAnalyzer System. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-6718EN, **2023**.
4. Luttgarm, K.; Pike, W. Accurate mAb Sizing Using the NIST mAb as a Ladder for the Agilent ProteoAnalyzer System. Agilent Technologies application note, publication number 5994-8815EN, **2025**.
5. Agilent Protein Broad Range P240 Kit. Agilent Technologies quick guide, publication number D0031125, **2025**.
6. Agilent ProteoAnalyzer System での NIST 抗体の分析. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-6960JAJP, 2024.
7. Ning, W.; Zhao, Y. Characterization of ADCs by Capillary Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, **2019**, 251–262. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9929-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9929-3_17).
8. Wiggins, B.; Liu-Shin, L.; Yamaguchi, H.; Gayathri Ratnaswamy. Characterization of Cysteine-Linked Conjugation Profiles of Immunoglobulin G1 and Immunoglobulin G2 Antibody-Drug Conjugates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2015**, 104 (4), 1362–1372. <https://doi.org/10.1002/jps.24338>.
9. Le, L. N.; Moore, J. M. R.; Ouyang, J.; Chen, X.; Nguyen, M. D. H.; Galush, W. J. Profiling Antibody Drug Conjugate Positional Isomers: A System-of-Equations Approach. *Analytical Chemistry*, **2012**, 84 (17), 7479–7486. <https://doi.org/10.1021/ac301568f>.
10. Schneider, S. Analysis of ADCs Using HIC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. Agilent Technologies application note, publication number 5994-2691EN, **2024**.

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタマコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail:email\_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

---

PR7004-1483

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

© Agilent Technologies, Inc. 2026

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、  
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、  
法律で禁止されています。

Printed in Japan, April 15, 2026

5994-9115JAJP