



Innovation by Chemistry

2023年8月作成（初版）

抗体・抗体薬物複合体（ADC） の分析サービス

株式会社 東レリサーチセンター
バイオメディカル分析研究部



分析メニュー一覧

- ① ペプチドマップ（全アミノ酸配列解析）
- ② 翻訳後修飾の解析（脱アミド、酸化、末端解析）
- ③ 分子量測定
- ④ 薬物抗体結合比（DAR）の測定
- ⑤ 抗体薬物複合体（ADC）の薬物結合位置解析
- ⑥ LC-MS/MSを用いた抗体医薬品の定量
- ⑦ LC-MS/MSを用いたADCの定量
- ⑧ ADCC（抗体依存性細胞障害）活性
- ⑨ CDC（補体依存性細胞障害）活性
- ⑩ 免疫チェックポイント阻害活性

ペプチドマップ[®]（全アミノ酸配列解析）

抗体

ADC

分析の流れ

還元
アルキル化

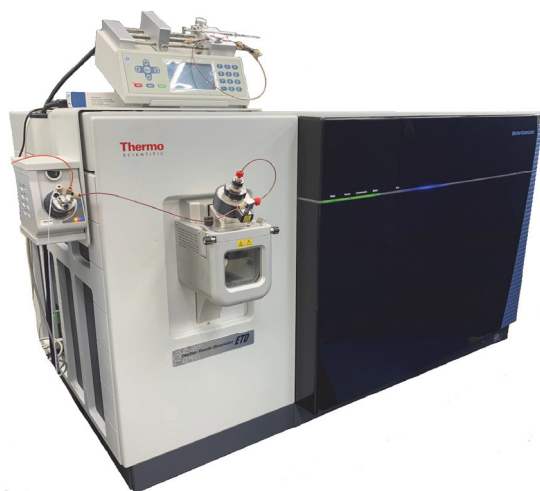
断片化

複数の酵素や化学分解
も併用可能です

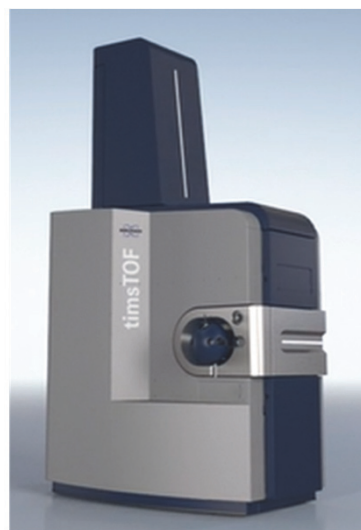
LC-MS/MS
測定

解析

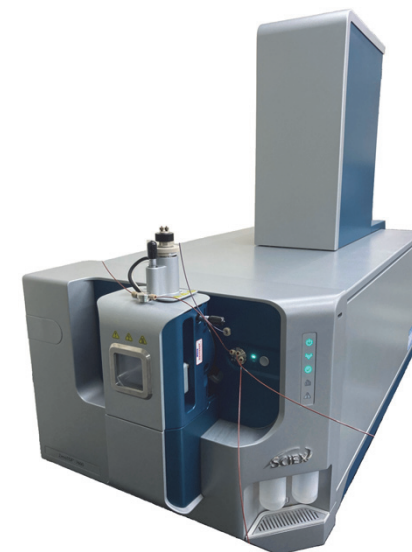
自動解析だけでなく、
手動での解析やシーケンサーを組み
合わせた解析が可能です



Orbitrap Fusion Lumos (FT-MS)
(ThermoFisher Scientific)
高分解能、高分子量測定、ETD搭載



timsTOF Pro (Q-TOF)
(Bruker)
高分解能、高分子量測定
イオンモビリティ搭載



ZenoTOF 7600 (Q-TOF)
(AB SCIEX)
高分解能、EAD搭載

ペプチドマップ°（全アミノ酸配列解析）

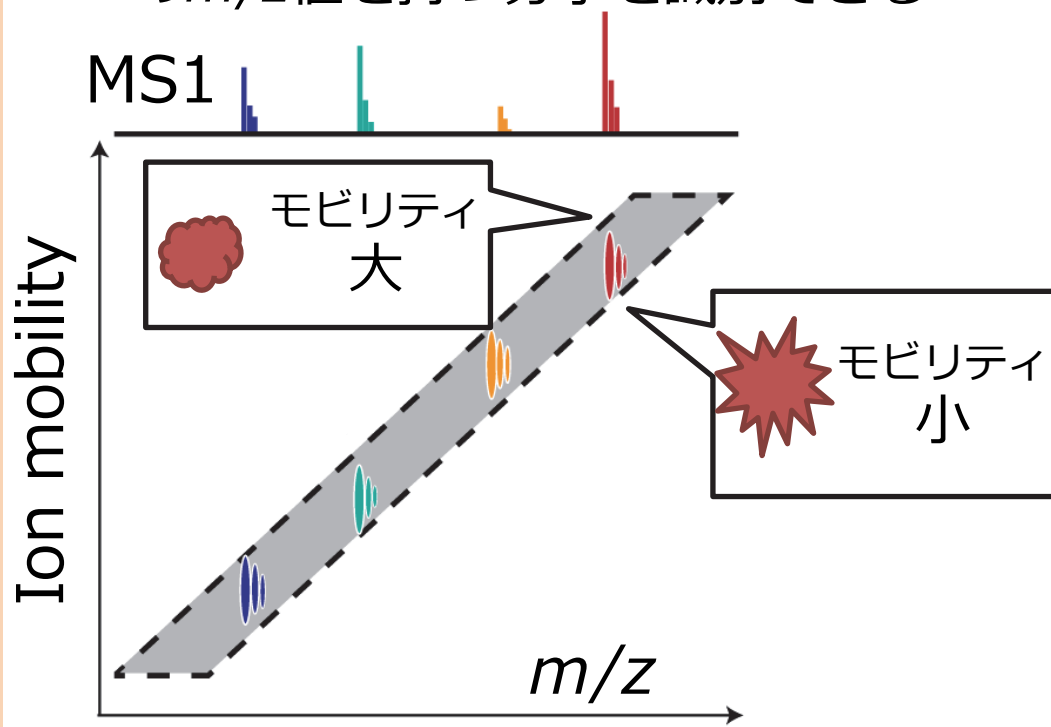
抗体

ADC

装置に搭載された機能の特徴

TIMS（Trapped Ion Mobility Spectrometry）

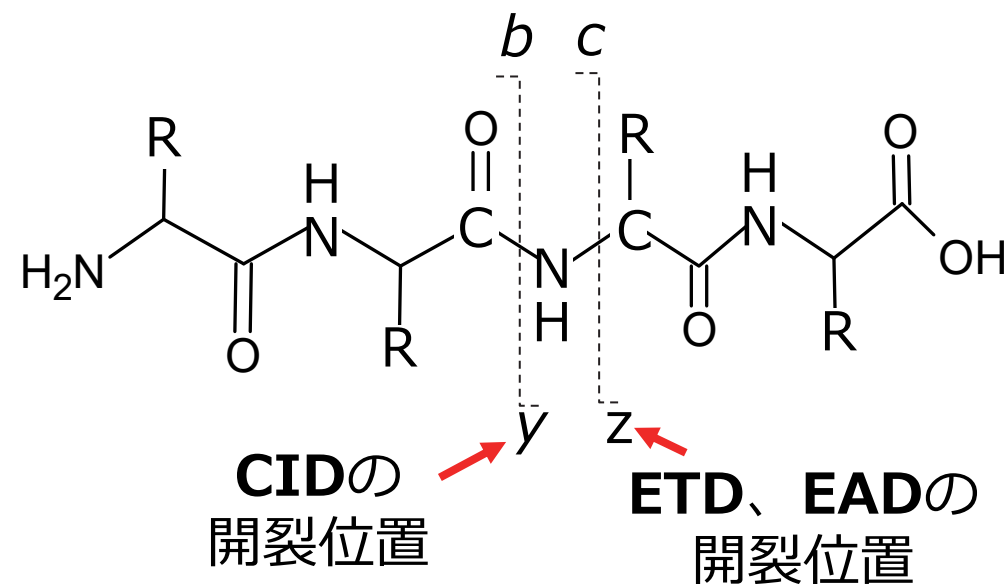
イオンのかさ高さの違いを利用して同一の m/z 値を持つ分子を識別できる



- 構造異性体の分離が可能
- クリーンアップ効果により微量のペプチドを検出可能

EAD（電子励起解離） / ETD（電子移動解離）

ラジカル反応によりタンパク質を開裂させる。CIDとは開裂位置が異なる。



※反応効率はCIDの方が高い

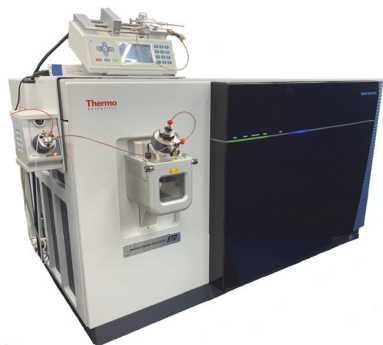
- 糖鎖などの修飾基が外れにくい
- CIDで識別できないアミノ酸を識別可能（LeuとIle、AspとisoAsp等）

ペプチドマップ[®]（全アミノ酸配列解析）

抗体

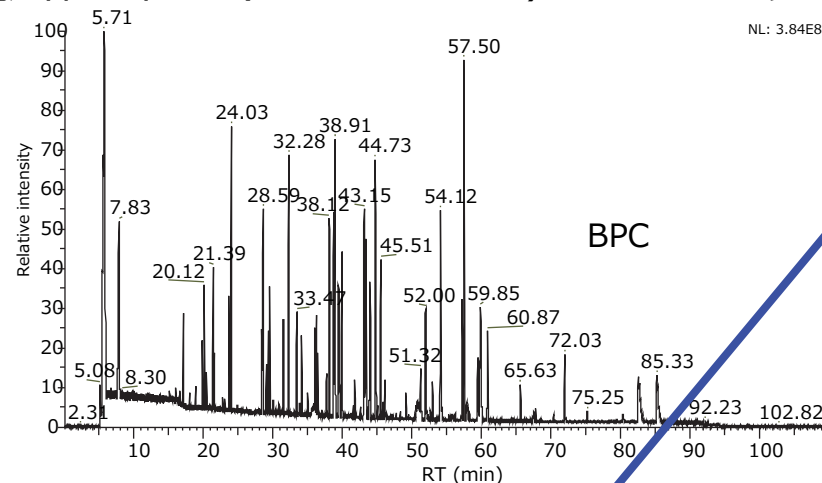
ADC

分析結果の例（Orbitrap Fusion Lumos を使用）

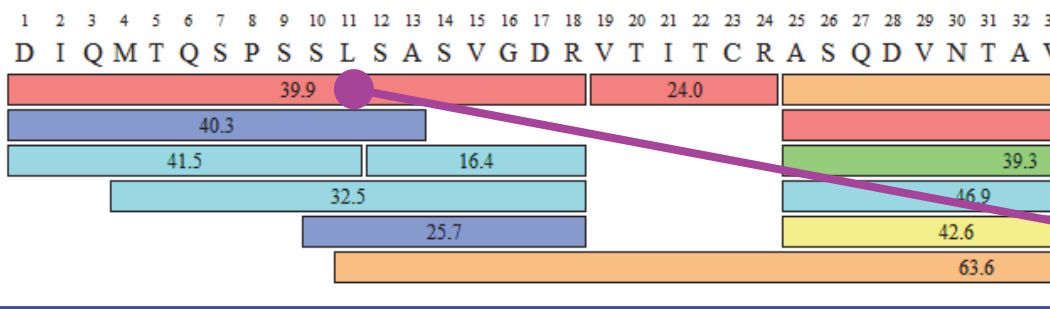
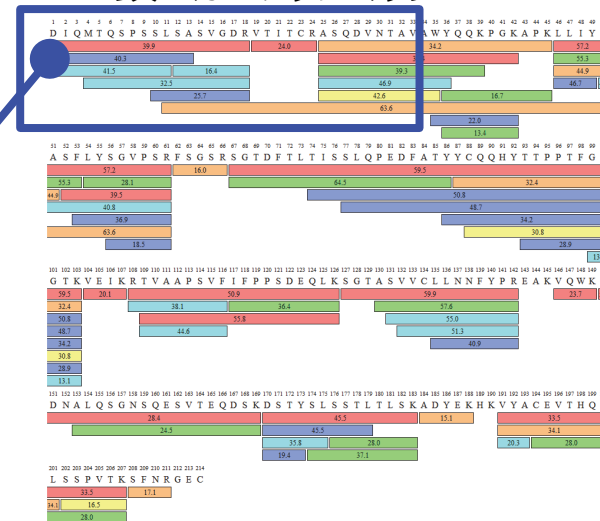


Orbitrap Fusion Lumos
(ThermoFisher Scientific)

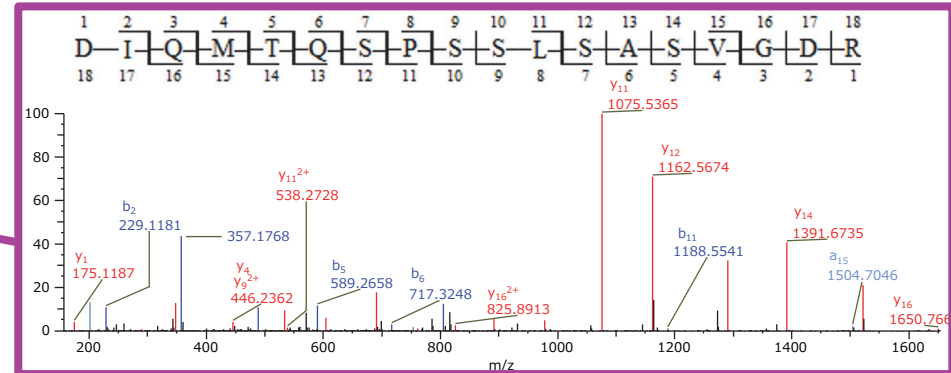
抗体医薬品（Trastuzumab）のペプチドマップ



L鎖のカバレッジマップ



検出したペプチドでカバーできる配列が表示されます
様々な修飾を考慮した解析が可能です
配列のカバー率も同時に算出可能です



任意のペプチドのMS/MSスペクトルを確認することも可能です

ペプチドマップ（全アミノ酸配列解析）

抗体

ADC

ご報告の内容

基本的な内容

- ペプチドマップ
- カバレッジマップ
(自動解析)
- 配列カバー率
(自動解析)

オプション

- 多検体のペプチドマップの拡大比較図
- 任意のペプチドのMS/MSスペクトル
- 各ピークの詳細解析結果
(自動解析、マニュアル解析)
- 配列に帰属できないピークの分取、
プロテインシーケンサーによる配列解析結果
- 修飾されたペプチドの存在比
(MSのピーク面積に基づく)

詳細解析結果の例

Peak No.	Time (min)	Accurate mass	Error (ppm)		Position	Sequence
1	11.84	868.3498	-1.0	L	208-214	SFNRGEC
2	15.11	748.3902	-0.5	L	19-24	VTITCR
3	21.82	487.3006	-3.2	L	104-107	VEIK
4	23.65	2134.9614	-1	L	150-169	VDNALQSGNSQES VTEQDSK
5	25.41	2140.0735	0.7	L	189-207	HKVYACEVTHQG LSSPVTK
6	28.71	903.4814	-3.2	L	143-149	EAKVQWK
7	31.28	1874.9196	1	L	191-207	VYACEVTHQGLSS PVTK
8	34.71	2286.1757	-1	L	25-45	ASQDVNTAVAWY QQKPGKAPK
9	37.15	1989.9908	2	L	25-42	ASQDVNTAVAWY QQKPGK
10	37.44	575.3067	-3.4	L	146-149	VQWK
11	38.60	2676.2627	-0.6	L	146-169	VQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSK

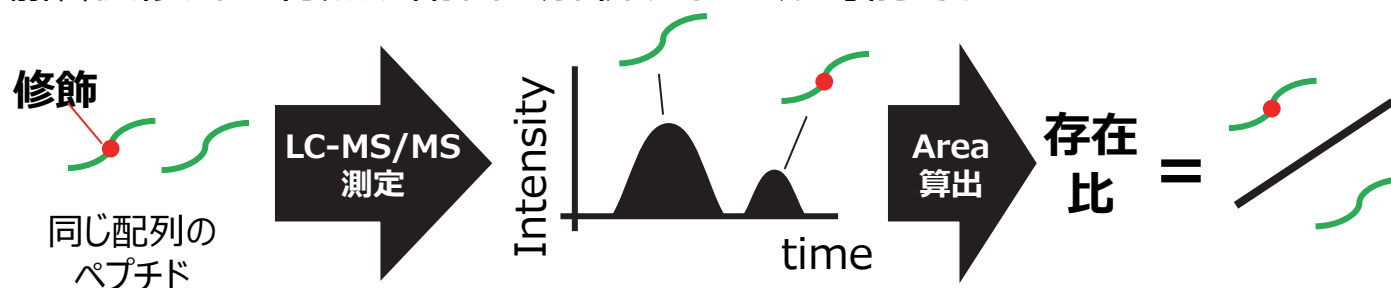
分析に必要な情報

- 検体数
- 分子量
- アミノ酸配列（ペプチドマップ取得のみの場合は不要です）
- タンパク質の修飾の有無（糖鎖，薬物など）
- 試料の形態（粉末、液体など）
- 試料の溶媒（又は可溶性溶媒）
- 試料に含まれる分析対象の純度
- タンパク質濃度

翻訳後修飾の解析

抗体

ペプチドマップで検出したペプチドごとに
翻訳後修飾の有無や割合を解析することが可能です

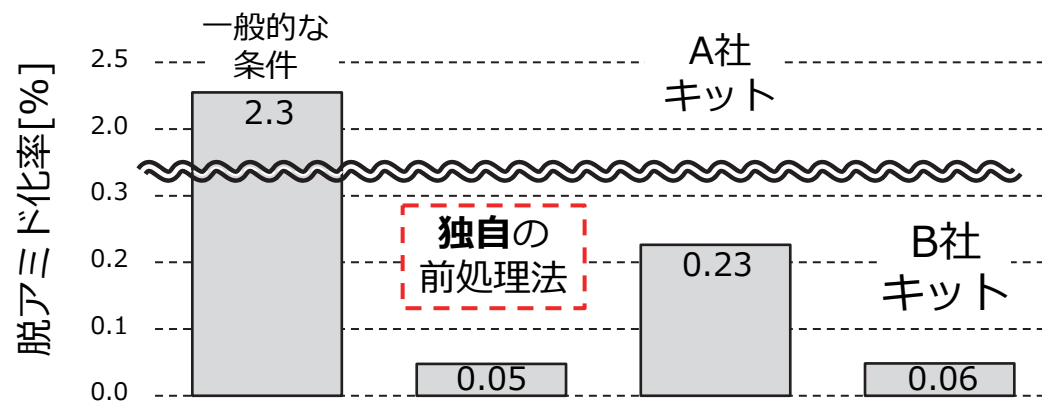


受託実績のある修飾の例

- 脱アミド化 (Asn、Gln)
- 酸化 (Met、Trp)
- N末端のアセチル化
- N末端のピログルタミル化

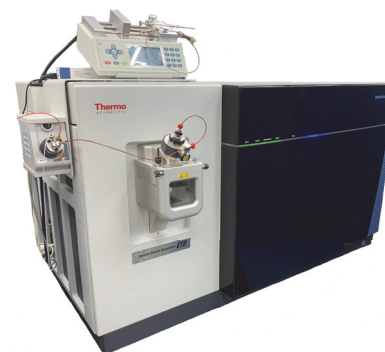
豊富な前処理技術 (例：脱アミド化解析)

Asnを含むペプチドについて脱アミド化率を比較

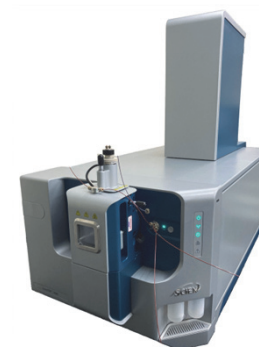


- 市販のキットと同等以上に前処理中の人為的な脱アミド化を抑制 (試料本来の情報に近い)
- 様々な酵素での消化が利用可能 (配列によらず解析可能) ※他社キットでは酵素が限定される

高機能な装置による異性体の識別



Orbitrap Fusion Lumos
(FT-MS)
(ThermoFisher Scientific)
ETD搭載



ZenoTOF 7600
(Q-TOF)
(AB SCIEX)
EAD搭載

衝突誘起解離(CID)法を用いる質量分析計では識別できないAspとiso-Aspなどの識別が可能

ご報告の内容

基本的な内容

- ペプチドマップ
(UVクロマトグラム、トータルイオンクロマトグラム)
- カバレッジマップ
(自動解析)
- 修飾されたペプチドの位置、
アミノ酸配列

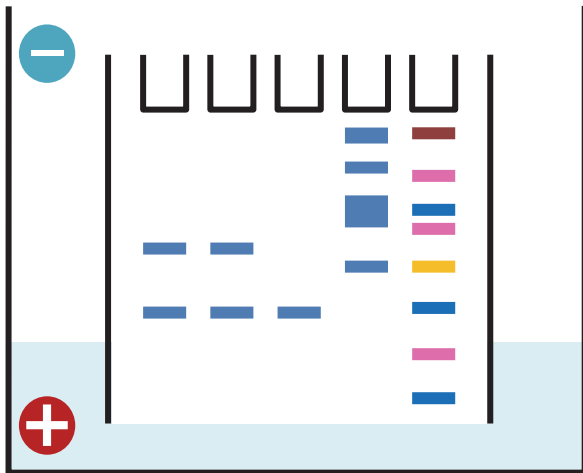
オプション

- 修飾されたペプチドの抽出イオンクロマトグラム
及びMS/MSスペクトル
- 修飾されたペプチドを含むピークの詳細解析
(自動解析又はマニュアル解析)
- 修飾されたペプチドの存在比
(自動解析又はマニュアル解析、UV又はMSの
ピーク面積に基づく)

分析に必要な情報

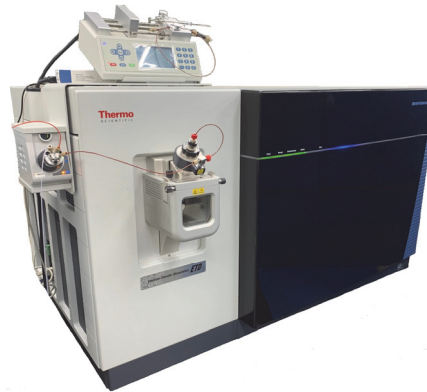
- 検体数
- 分子量
- アミノ酸配列
- タンパク質の修飾の種類、位置
- 試料の形態（粉末、液体など）
- 試料の溶媒（又は可溶性溶媒）
- 試料に含まれる分析対象の純度
- タンパク質濃度

大まかな分子量
が知りたい場合
(夾雑物が含まれる等)

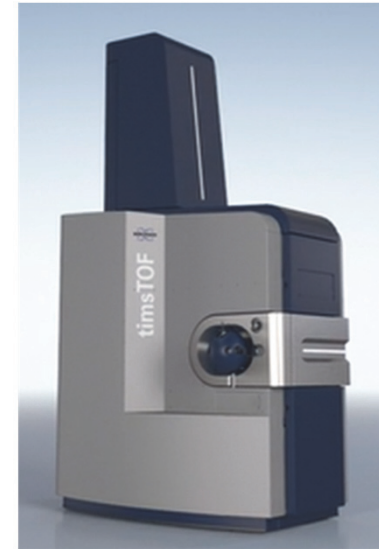


SDS-PAGEにより分子量を
確認します。泳動像から、タンパク質のおおよその存在比がわかります

正確な分子量が知りたい場合



Orbitrap Fusion Lumos
(FT-MS)
(ThermoFisher Scientific)
高分解能、高分子量測定



timsTOF Pro (Q-TOF)
(Bruker)
高分解能、高分子量測定
異性体分離



Autoflex speed
(MALDI-TOF/MS)
(Bruker)

質量分析計を用いて高精度に質量を検出します
脱糖鎖処理の有無、還元処理の有無で比較も可能です

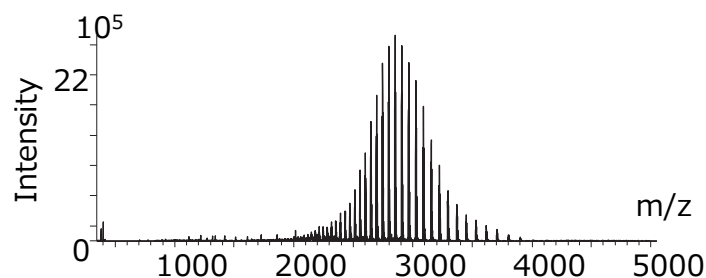
ご報告の内容

大まかな分子量 が知りたい場合

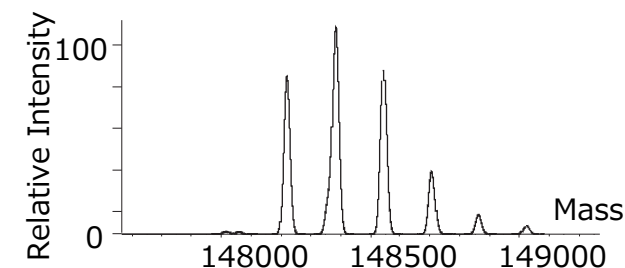
- 電気泳動像
- タンパク質の存在比
(ソフトによる自動解析)

正確な分子量が知りたい場合

- 測定結果 (UVクロマトグラム、マスペクトル)
- Deconvolution結果 (FT-MS、Q-TOFのみ)
- 予想される分子量 (情報がある場合) との誤差



試料のマスペクトル



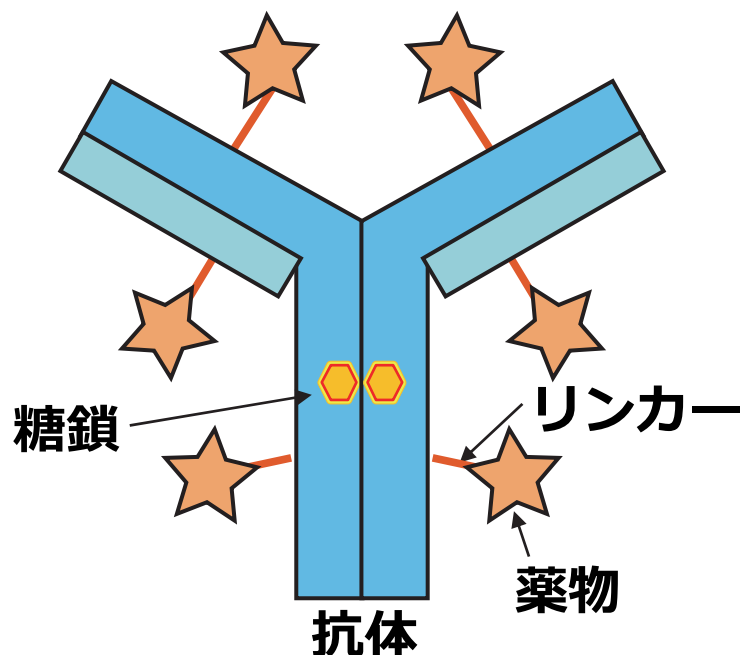
Deconvolution結果

分析に必要な情報

- 検体数
- 予想されるおよその分子量
- タンパク質の修飾の有無 (糖鎖, 薬物など)
- 糖鎖遊離や還元処理後の測定をご希望か
- 試料の形態 (粉末、液体など)
- 試料の溶媒 (又は可溶性溶媒)
- 試料に含まれる分析対象の純度
- タンパク質濃度

薬物抗体結合比（DAR）の測定

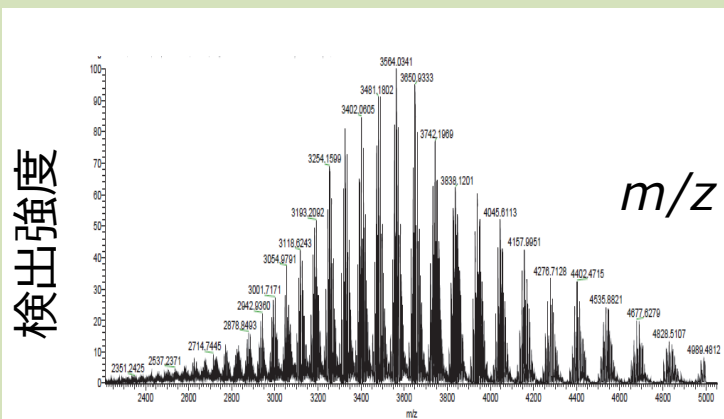
Lys結合型、Cys結合型の
いずれも受注実績があります



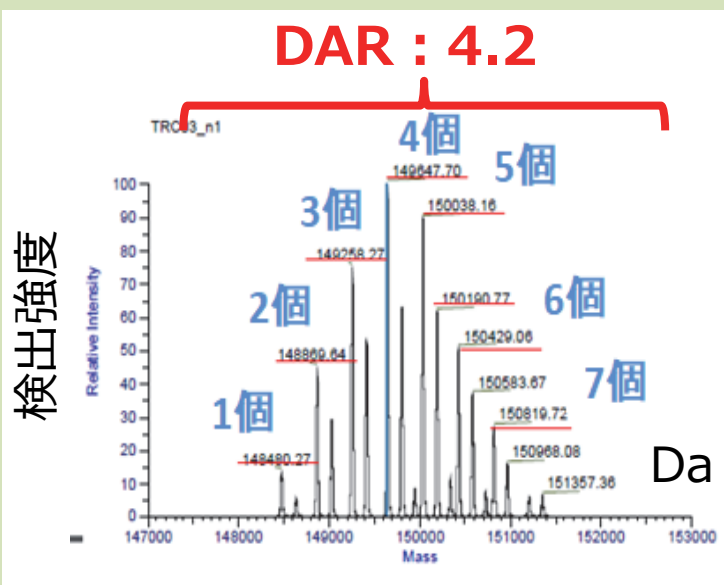
薬物の結合様式

- ① Lys結合型
- ② Cys結合型 など

Lys結合型ADCのDARを算出する場合



Deconvolution



質量分析計で
マスペクトルを
取得します

分子量を算出し
ピーク面積から
DARを算出します

薬物抗体結合比（DAR）の測定

ご報告の内容

Lys結合型ADCの場合

- 測定結果（UVクロマトグラム、マスペクトル）
- Deconvolution結果
- DARの算出結果

Cys結合型ADCの場合

- 測定結果（UVクロマトグラム、マスペクトル）
- Deconvolution結果
- DARの算出結果
- 予想される薬物結合位置に基づくサブユニットとの質量誤差（2D-LC/MSによる分析方法のみ）

分析に必要な情報

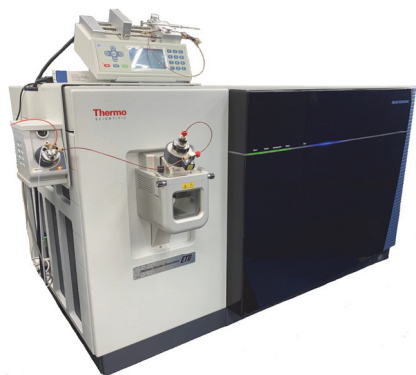
- 検体数
- 結合様式（Lys結合型、Cys結合型など）
- 推定される薬物結合位置
- 分子量（抗体、薬物）
- タンパク質の修飾の有無（糖鎖など）
- 試料の形態（粉末、液体など）
- 試料の溶媒（又は可溶性溶媒）
- 試料に含まれる分析対象の純度
- タンパク質濃度
- 高活性物質など、取り扱いの注意点

抗体薬物複合体（ADC）の薬物結合位置解析

ADC

東レリサーチセンター保有の質量分析計の特徴的な開裂方法により薬物結合位置解析を高精度に実施できます

ETD(電子移動解離) / EAD(電子励起解離)



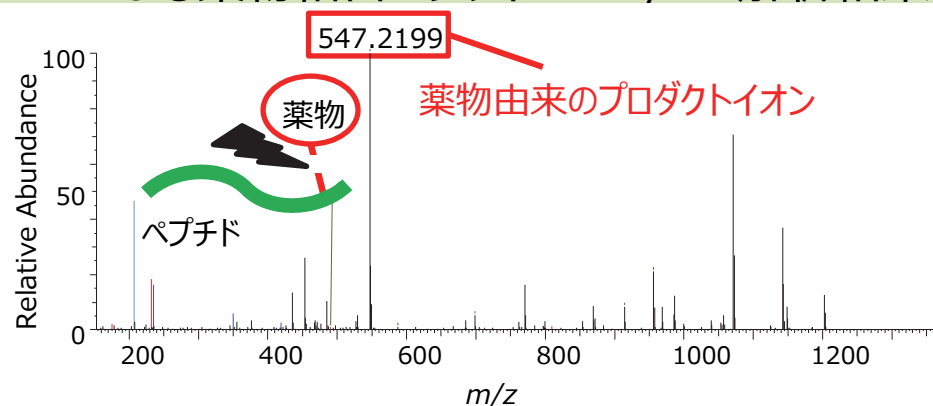
Orbitrap Fusion Lumos
(FT-MS)
(ThermoFisher Scientific)
ETD搭載



ZenoTOF 7600
(Q-TOF)
(AB SCIEX)
EAD搭載

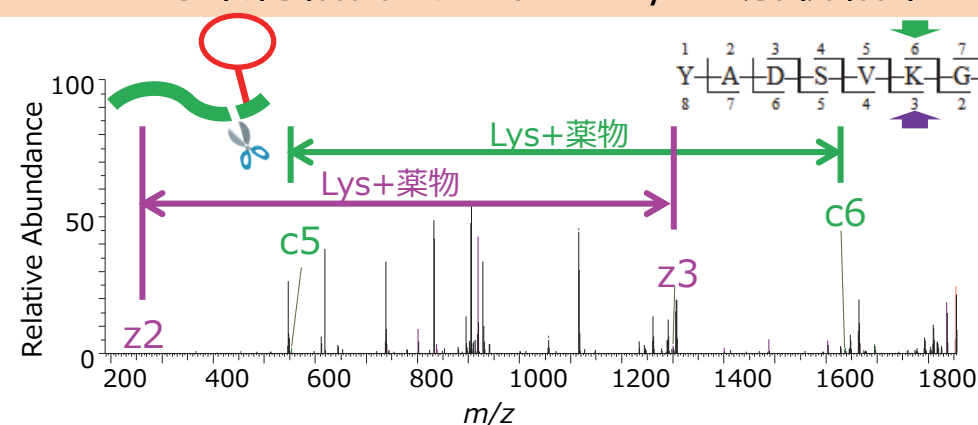
タンパク質をマイルドに開裂させるため
薬物を保持したままペプチドを観測できる

CIDによる薬物結合ペプチドのMS/MS解析結果



薬物由来のプロダクトイオンのみが観測され
薬物結合位置が特定できない

ETDによる薬物結合ペプチドのMS/MS解析結果



薬物が結合したアミノ酸を含むc、zイオンにより
薬物結合位置が特定できる

抗体薬物複合体（ADC）の薬物結合位置解析

ADC

ご報告の内容

基本的な内容

- ペプチドマップ（UVクロマトグラム、トータルイオンクロマトグラム）
- カバレッジマップ（自動解析）
- 自動解析で検出された薬物結合ペプチドのMS/MS解析結果（MS/MSスペクトル、プロダクトイオンによる結合位置の推定結果）

オプション

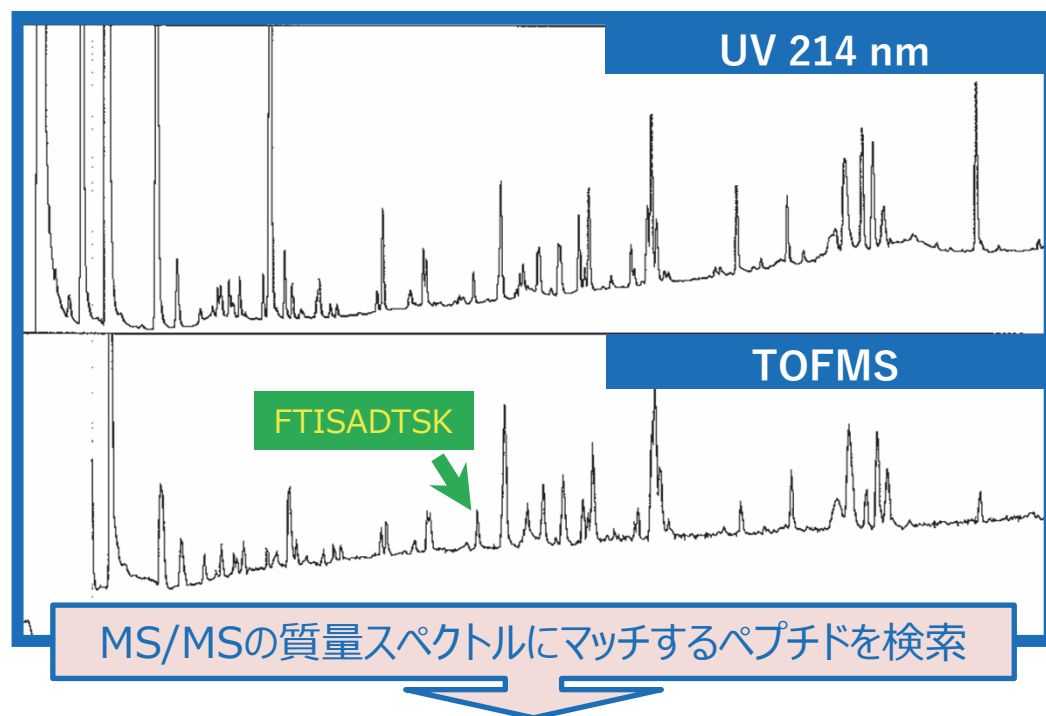
- 抽出イオンクロマトグラムを用いたマニュアル解析（予想される薬物結合ペプチドが自動解析で検出されなかった場合など）

分析に必要な情報

- 検体数
- 結合様式（Lys結合型、Cys結合型など）
- 推定される薬物結合位置
- 分子量（抗体、薬物）
- タンパク質の修飾の有無（糖鎖など）
- 試料の形態（粉末、液体など）
- 試料の溶媒（又は可溶性溶媒）
- 試料に含まれる分析対象の純度
- タンパク質濃度
- 高活性物質など、取り扱いの注意点

LC-MS/MSを用いた抗体医薬品の定量

ペプチドマッピング（サロゲートペプチドの選定）



抗体医薬品（重鎖可変領域）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAT
 GKGLEWVAR⁽⁵⁰⁾IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
 TVSSASTKG⁽¹²⁵⁾PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

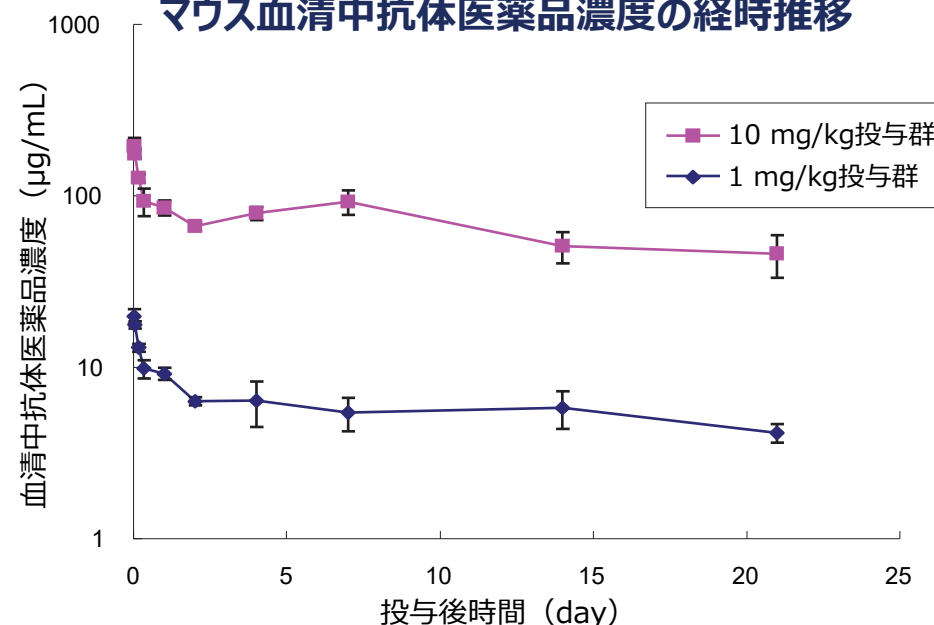
分子量変化を伴うメチオニン（酸化）やアスパラギン及びグルタミン（脱アミド）が含まれないことに注意

マウス血清中抗体医薬品濃度測定

マウスに抗HER2ヒト化モノクローナル抗体を単回静脈内投与し、血清中濃度をLC-MS/MSを用いて測定

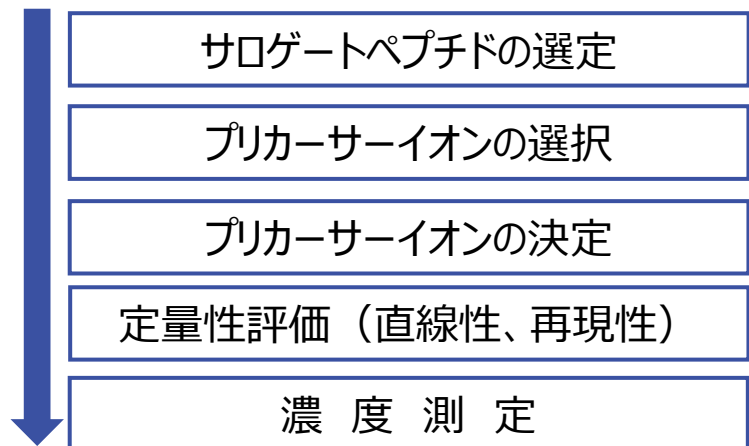
- サロゲートペプチド：FTISADTSK（自社で合成）
- 内標準物質：F(+10)TI(+7)SADTSK（自社で合成）
- 投与量：1 mg/kg, 10 mg/kg
- 血清使用量：20 μ L
- 採血時点：投与後0.5, 1, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 336, 504 hr（10時点）

マウス血清中抗体医薬品濃度の経時推移



LC-MS/MSを用いたADCの定量

作業フロー



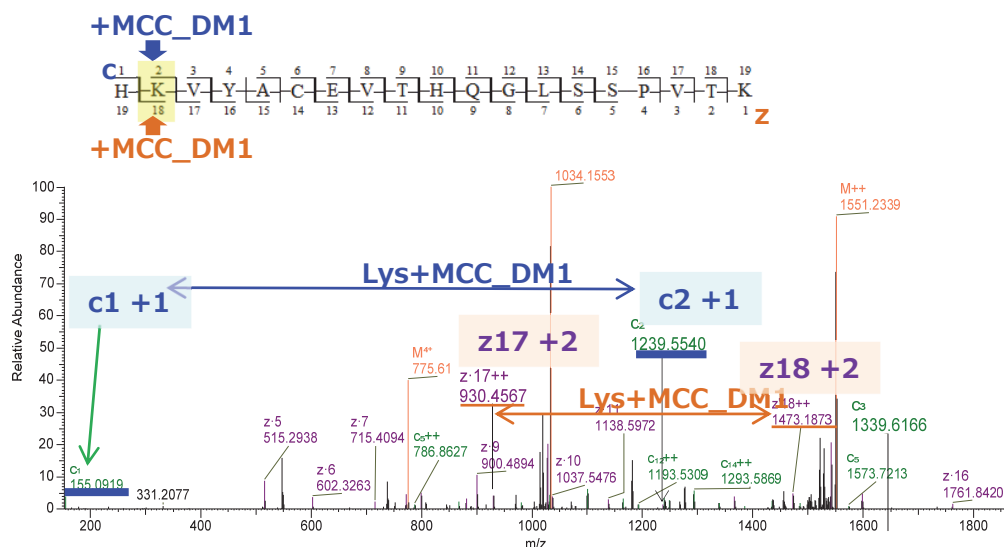
ラット血漿中のADC濃度測定

ラットにトラスツズマブエムタンシンを単回静脈内投与し、血漿中濃度をLC-MS/MSで定量

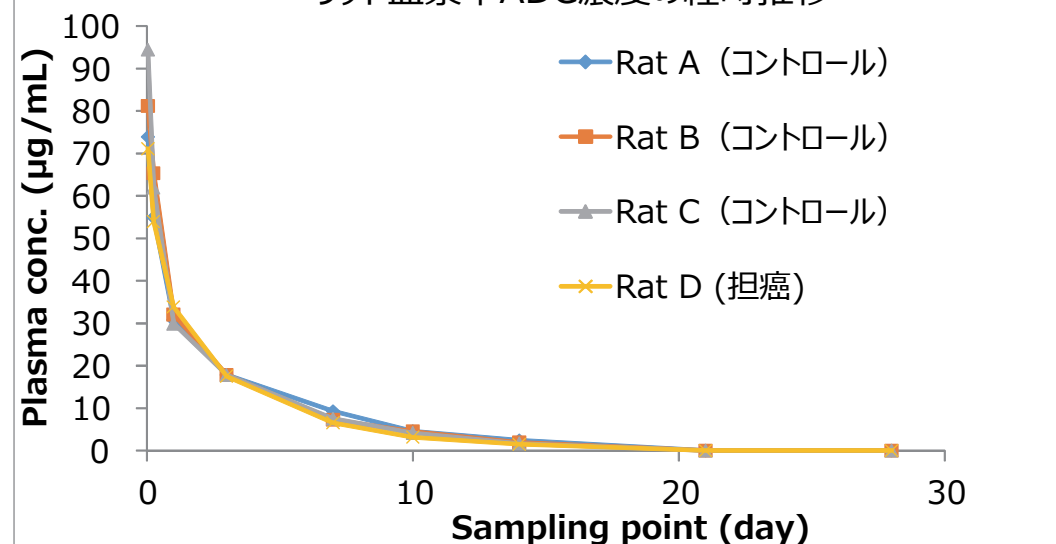
群構成	コントロール (n=3) , 担癌 (n=1)
投与量	静脈内投与 : 5 mg/kg, 2 mL/kg
採取方法	頸静脈より採血後、血漿を分離
抗凝固剤	ヘパリンナトリウム
採血時点	投与後0.04, 0.25, 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28 d

サロゲートペプチドの選定

ETDによるMS/MSスペクトル (Lumos使用)



ラット血漿中ADC濃度の経時推移



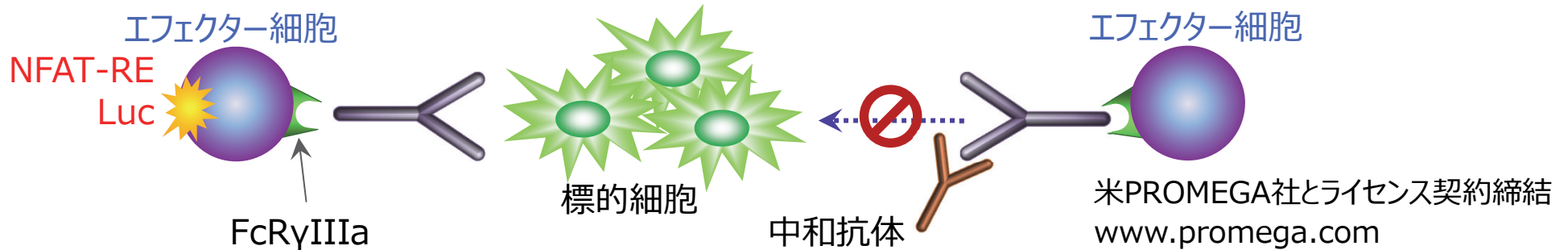
ADCC（抗体依存性細胞障害） 活性

ADCC活性とは

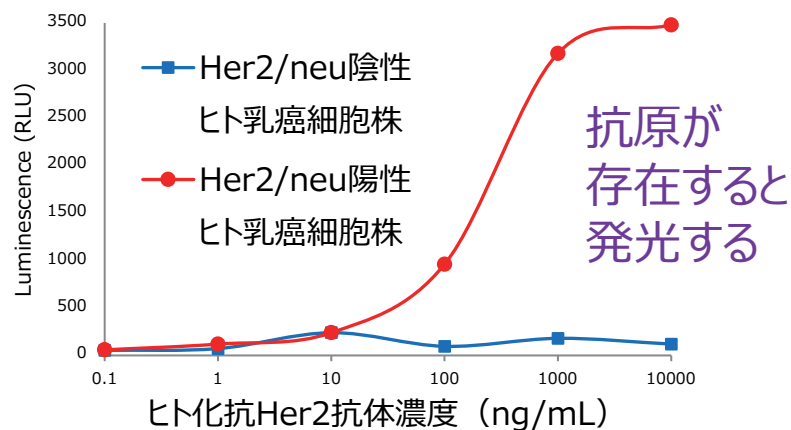
標的細胞の抗原に抗体が結合，その抗体をNK細胞などがアポトーシスを誘導

ルシフェラーゼバイオアッセイ

FcγRIIIa遺伝子及びルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞をエフェクター細胞として使用

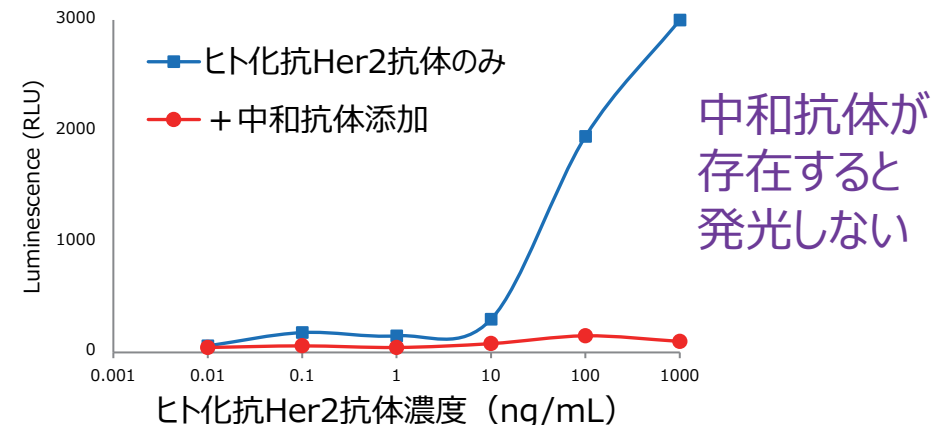


Her2陽性乳癌細胞株とエフェクター細胞に
抗Her2抗体を添加



応用

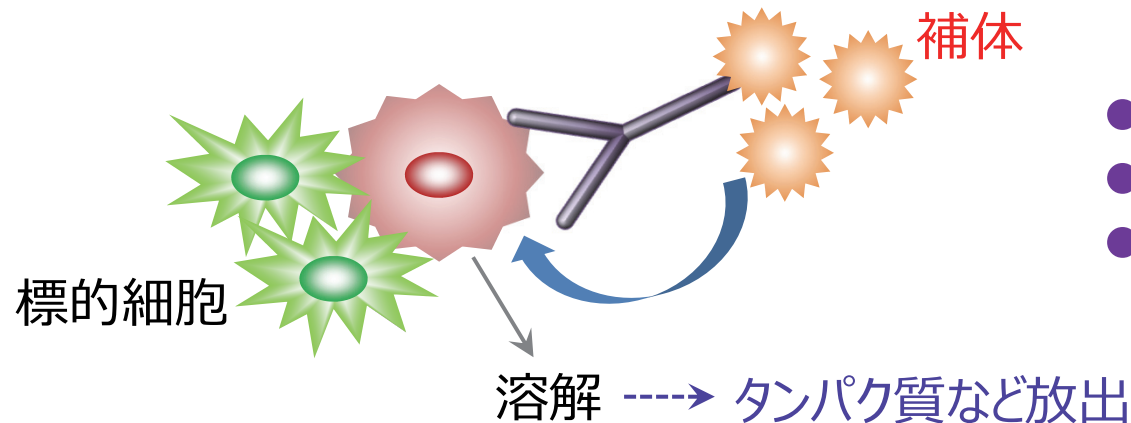
中和抗体の中和活性測定に応用可能



CDC（補体依存性細胞障害） 活性

CDC活性とは

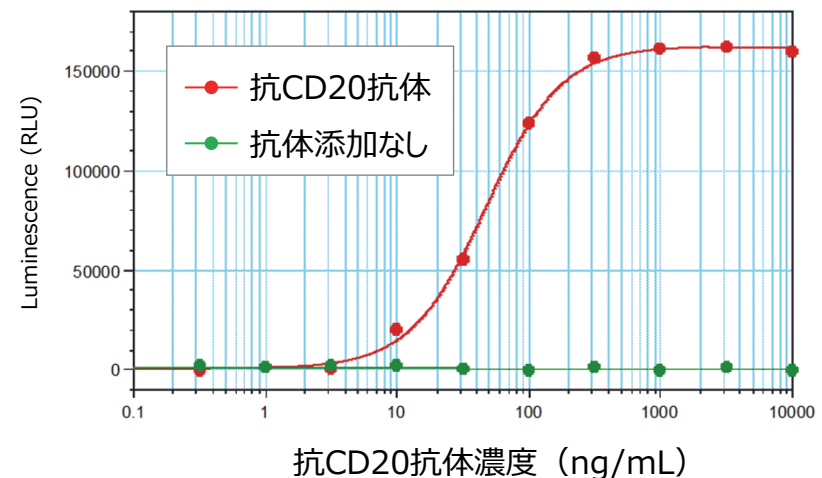
標的細胞の抗原に抗体が結合，その抗体に補体が結合して補体系が活性化し標的細胞が溶解



- Classical pathway
- Alternative pathway
- Lectin pathway

- ✓ リンパ腫細胞株と血清由来補体に抗CD20抗体を添加
- ✓ 死細胞由来のプロテアーゼを測定
- ✓ 放射性元素を用いない

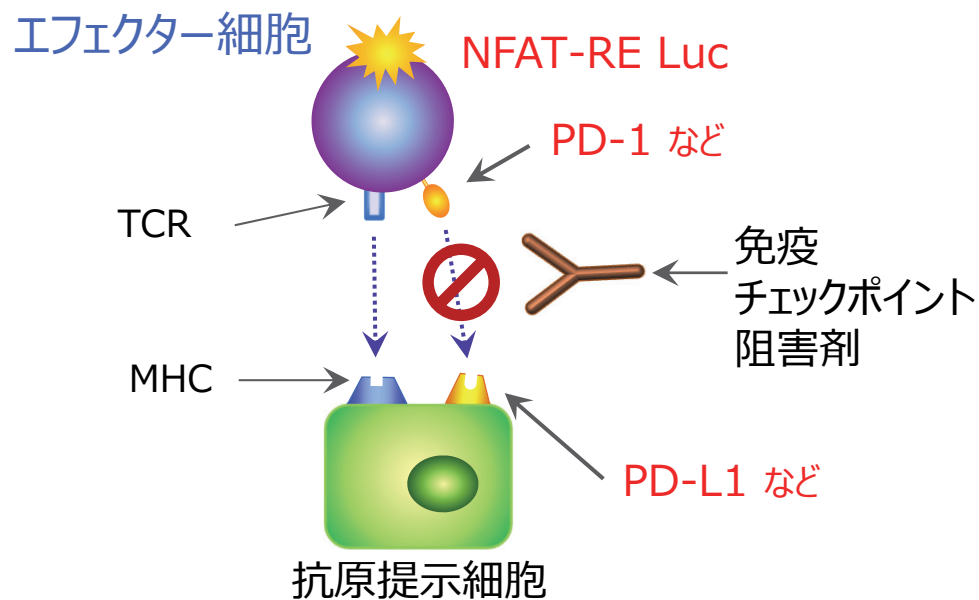
死細胞が存在すると
プロテアーゼが増加→発光



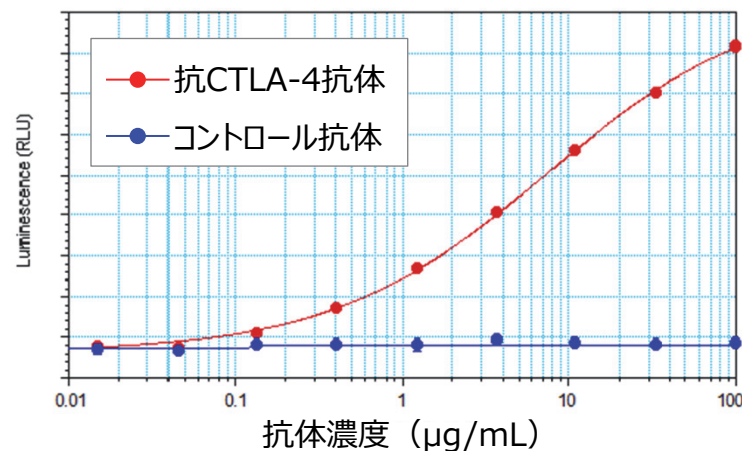
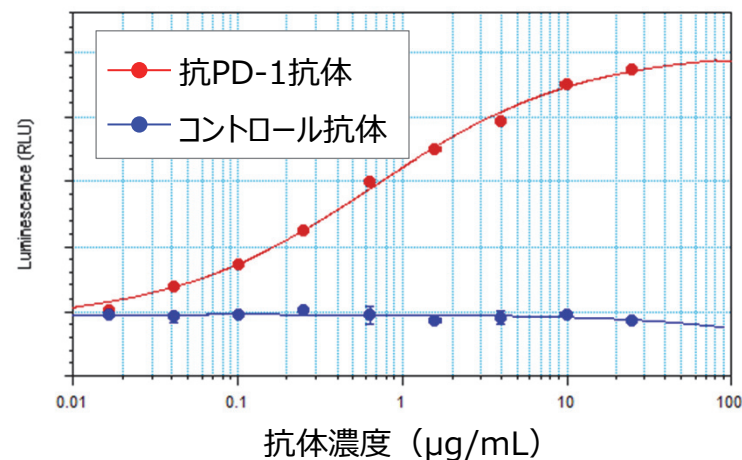
免疫チェックポイント阻害活性

Blockade Bioassay

共抑制分子の遺伝子及びルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を使用
免疫チェックポイント阻害剤（抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体など）によって、
エフェクター細胞が活性化するとシグナルが得られる。



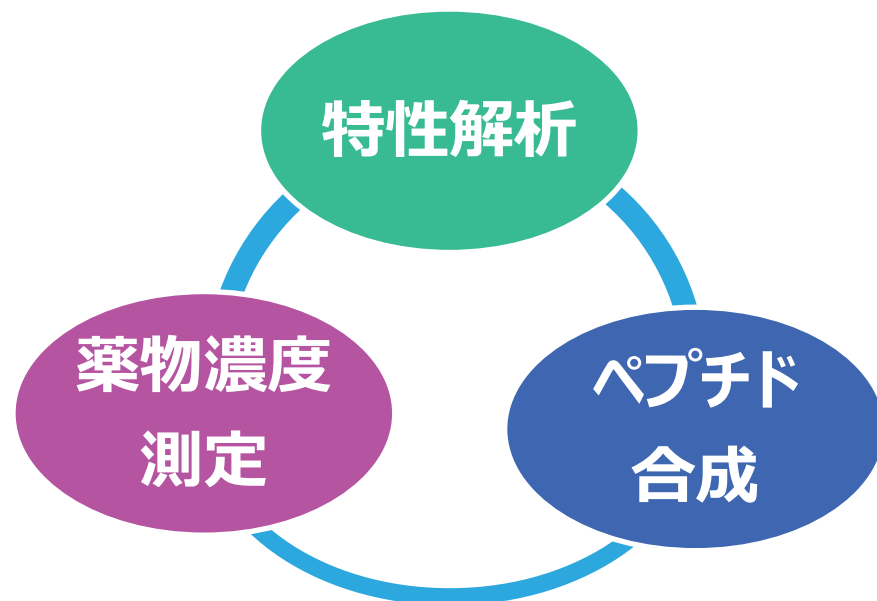
免疫チェックポイント阻害剤の
濃度依存的にシグナルが上昇



米PROMEGA社とライセンス契約締結
www.promega.com

お問合せ先

ワンストップサービス



**分析でお困りの際は、
当社営業部までお気軽に
お問合せください。**

株式会社 東レリサーチセンター

URL : <https://www.toray-research.co.jp/>

ライフサイエンス営業部
関西営業部（ライフサイエンス）
お問い合わせ専用 E-mail

Tel 03-3245-5666
Tel 077-534-1655
bunseki.trc.mb@trc.toray