

# 抗体薬物複合体(ADC)の非変性分析はこれで決まり！

## SEC カラムと HIC カラムを用いて凝集体と薬物抗体結合比(DAR)を分析



近年の抗体医薬品の開発は、抗体薬物複合体(ADC)と二重特異性抗体が主流となってきています。ADCの開発は1970年代後半から始まり、これまで15品目が承認されています。

現在、ADCは第三世代として、抗体分子(例；低分子抗体や二重特異性抗体など)と薬物(例；薬物、ペプチド、オリゴ核酸など)を特異的なリンカーを用いて結合(例；部位特異的結合、多価薬物・異種薬物の結合、薬物の選択的放出など)することにより、より低濃度で薬効に優れ(バイスタンダー効果も含む)、安定性が高く、かつ副作用の低いADCが開発されています<sup>1-4</sup>。

ADCの分析法としては、非変性状態(native)で分析するサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)および疎水クロマトグラフィー(HIC)が非常に重要な手法となります。そのためSECによる凝集体の分析、HICによる薬物抗体結合比(DAR)の分析が1セットの評価法として実施されています。下表にADCの結合薬物種による分類と、非変性状態でのクロマトグラフィー(SECおよびHIC)の分析実施例を示します。

最近では、より高分離能で迅速分析が可能なUHPLC用SECカラム<sup>5,6</sup>の利用や、HICカラムにオンラインで質量分析計(MS)を接続してDAR分析する応用例も報告されています<sup>7</sup>。

表 最近の抗体薬物複合体の分析；TSKgel カラムを用いた非変性状態での分析例

| 薬物 (ペイロード) の作用  | 主な薬物名                                                         | HPLC分離モードおよびTSKgelカラム使用例                          |                                                         |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                 |                                                               | SEC(凝集体分析)                                        | HIC(DAR分析)                                              |
| チューブリン阻害        | モノメチルアウリスタチンE (MMAE)<br>モノメチルアウリスタチンF (MMAF)<br>ドラスタチン        | TSKgel UP-SW3000*<br>TSKgel G3000SW <sub>XL</sub> | TSKgel HIC-ADC Butyl**<br>TSKgel Butyl-NPR <sup>®</sup> |
|                 | メイタンシノイド；DM1、DM4                                              | TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>                      | TSKgel Butyl-NPR                                        |
| DNA切断、損傷、副溝結合など | カリケアマイシン、オゾガマイシン                                              | (推定；TSKgel G3000SW <sub>XL</sub> )                | TSKgel Phenyl-5PW***                                    |
|                 | デュオカルマイシン                                                     | TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>                      | TSKgel Butyl-NPR                                        |
|                 | ピロロベンゾジアゼピン (PBD)<br>ピリジノベンゾジアゼピン (PDD)                       | TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>                      | TSKgel Butyl-NPR                                        |
| トポイソメラーゼⅠ阻害     | カンプトテシン；MF-6、095<br>デルクステカン(Dxd)、イリノテカン<br>ゴビテカン、エキサテカン；SN-38 | TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>                      | TSKgel Butyl-NPR                                        |
| その他             | STING作動薬；dSA3                                                 | TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>                      | TSKgel Butyl-NPR                                        |
|                 | BETたんぱく質阻害剤；EBET-2113                                         |                                                   |                                                         |
|                 | PROTAC                                                        | TSKgel SuperSW mAb HR                             | TSKgel Butyl-NPR                                        |

\* 現行品のTSKgel UP-SW3000-LSを推奨

\*\* TSKgel HIC-ADC Phenylも応用可能

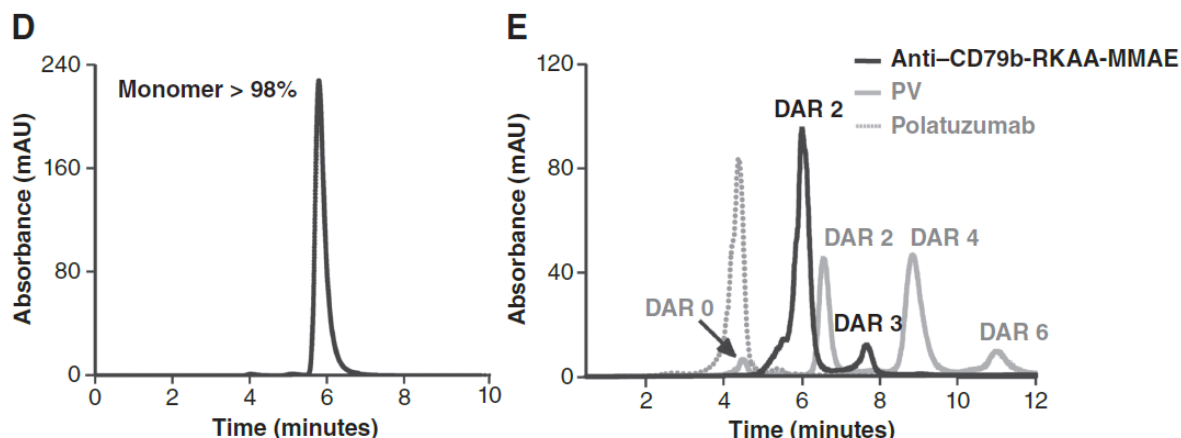
\*\*\*TSKgel Phenyl-5PWはADC調製時の未反応抗体の定量

STING; Stimulator of interferon genes, BET; Bromodomain and extra-terminal protein degrader, PROTAC; Proteolysis targeting chimeras

尚、疎水性薬物を結合したADCの分析では、分子全体の疎水性が増すためUHPLC/HPLC分析時に溶離液に10～20%の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を添加し、カラムと試料間の疎水的相互作用を低減させます。一方、HICによるDAR分析において、薬物結合数が少ない(DAR=1または2)場合や親水性の高いリンカーを用いた場合には、TSKgel HIC-ADC Butylのほか、やや疎水性の高いHICカラムTSKgel HIC-ADC Phenylなどが効果的な場合もあります。

## ●文献紹介；MMAE 結合抗体(ADC)の凝集体分析(SEC)および DAR 分析(HIC)（引用文献<sup>5)</sup>）

下図に MMAE がペプチドリinkerを介して部位特異的に結合された抗体(anti-CD79b-RKAA-MMAE ADC)の凝集体（単量体の純度；> 98 %）と DAR をそれぞれ SEC および HIC で分析した例を示します。用いた ADC は、LC/MS 解析で DAR=2.0 と定量されています。



カラム：D) SEC：TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 15 cm)、E) HIC：TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. x 10 cm)

試料：D) anti-CD79b-RKAA-MMAE、E) anti-CD79b-RKAA-MMAE (DAR=2.0)、未反応抗体(polatuzumab)、異なる DAR 種の抗体(PV; DAR=3.5)

分析条件の詳細記載サイト：[https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/instance/12134749/bin/mct-24-0983\\_supplementary\\_methods\\_suppsm.pdf](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/instance/12134749/bin/mct-24-0983_supplementary_methods_suppsm.pdf)

## ●引用文献

1. R. Colombo et al., The journey of antibody-drug conjugates: Lessons learned from 40 years of development, *Cancer Discovery*, 2024, 14, 2089-2108, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-24-0708>
2. M. Grairi et al., Antibody-drug conjugates: prospects for the next generation, 2024, *De*;29(12), 104241, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104241>
3. I. Sevilla-Carrillo et al., Antibody drug conjugates (ADCs): Shaping the future of precision oncology, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2025, 25, 993-1016, <http://dx.doi.org/10.2174/0118715206348204241128063329>
4. Q. Fan et al., A review of conjugation technologies for antibody drug conjugates, *Antibody Therapeutics*, 2025, Apr 17;8(2), 157-170, <https://doi.org/10.1093/abt/tbaf010>
5. P. Probst et al., Broadening the therapeutic window of ADCs using site-specific bioconjugation showcased by an MMAE-containing peptide linker in a CD79b-targeting ADC, *Mol. Cancer Ther.*, 2025, 24(6), <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-24-0983>
6. A. Goyon et al., Streamlined characterization of an antibody-drug conjugate by two-dimensional and four-dimensional liquid chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2019, 91, 14896-14903, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02454>
7. T. Kempen et al., Online native hydrophobic interaction chromatography-mass spectrometry of antibody-drug conjugates, *MABS*, 2025, 17, No.1, 2446304, <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2446304>
8. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 30、抗体薬物複合体(ADC)のクロマト分離は、これで決まり！
9. 東ソー、テクニカルノート トヨパール No. 6、No. 11、No.18、抗体薬物複合体(ADC)の精製は、これで決まり！

※たんぱく質、ペプチド、核酸等の HPLC 分離に関する技術資料は、弊社ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litjp> からアクセスできます



TOSOH

※“TSKgel”、“NPR”は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※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) 6636-3733      | 〒104-0028 東京都中央区八重洲2-2-1   |
| 大阪支店 営業部 ☎ (06) 6209-1948      | 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9   |
| 名古屋支店 営業部 ☎ (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  |

お問い合わせe-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>