



# EZGlyco® mAb-N Kit with 2-AB を用いた 抗体薬物複合体 (ADC) の抗体N型糖鎖分析

## はじめに

抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate, ADC) は、低分子薬物 (ペイロード) がリンカーを介して抗体に結合された薬剤であり、がん治療における革新的なアプローチとされている。ADCの抗体部ががん細胞表面の抗原を認識して結合し、ペイロードの低分子薬物ががん細胞を攻撃する。通常の低分子薬物は経口および静脈内注射で使用すると正常細胞も攻撃してしまうため副作用が大きいという問題があったが、ADCではがん部に局所的に薬剤が放出されるため、正常細胞への影響が最小限に抑えられるとされる。

抗体には糖鎖が結合しており、その構造および結合量が抗体の物理化学的性質、細胞傷害活性 (ADCC)、抗原認識性などに影響することが知られている。糖鎖は抗体産生細胞の培養条件、細胞株の違いなどによって変動する可能性があり、製造プロセス開発、品質管理において糖鎖分析が重要な技術となる。ADCにおいても従来型の抗体医薬品と同様に糖鎖分析が重要であり、分析のための効率的なサンプル調製手段が求められていた。

本アプリケーションノートでは、抗体N型糖鎖分析キット EZGlyco® mAb-N Kit with 2-AB を用いたADC糖鎖分析事例を紹介する。

## 実験手順

### ・ADCサンプル

下記の市販 ADC 2種を用いた：

Trastuzumab deruxtecan (MedChemExpress製, HY-138298A)

Trastuzumab emtansine (同, HY-P9921)

### ・糖鎖調製

抗体N型糖鎖分析キット EZGlyco® mAb-N Kit with 2-AB (住友ベークライト, BS-X4410) を用いた。キット添付の抗体糖鎖調製プロトコルに従って2-ABラベル化糖鎖サンプルの調整を行った。キット付属のAntibody Capturing BufferでADCサンプルを濃度 40 µg/600 µL となるように希釈し、その全量をAntibody Capturing Columnにアプライ後、所定の方法でタンパク変性、糖鎖遊離、2-ABラベル化、クリーンアップを行った。(図1)

### ・LC-MS分析

キット処理で得られた2-ABラベル化糖鎖サンプル溶液約50 µLのうち、1µLをLC-MS測定に供した。測定条件は下記の通り：

#### LC：Nexera (島津製作所)

カラム：ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide, 1.7µm  
(2.1 mm I.D. × 150 mm L)

温度：40 °C

検出器：RF-20Axs (励起波長 330nm, 蛍光波長 420nm)

移動相A：0.1%ギ酸含有40%アセトニトリル水溶液

移動相B：0.1%ギ酸含有90%アセトニトリル水溶液

グラジエント：100% A (0 min) → 100% B (50 min)

流速：0.2 mL/min

注入量：1 µL

#### MS：LCMS-IT-TOF (島津製作所)

イオン化モード：ESIネガティブイオンモード

### ・糖鎖組成推定

MS測定で得られた各LCピークの質量データ ( $m/z$  値) より、GlycoMod Tool<sup>\*1</sup> を用いて糖鎖組成の推定を行った。

<sup>\*1</sup> GlycoMod Tool: <https://web.expasy.org/glycomod/>  
Cooper C.A. et al. "GlycoMod - A software Tool for Determining Glycosylation Compositions from Mass Spectrometric Data"  
*Proteomics* 1:340-349 (2001).

本アプリケーションノートで示したデータはすべて弊社で実施された測定の一例であり、保証値ではありません。  
また、あらゆる条件下での性能を保証するものではありません。

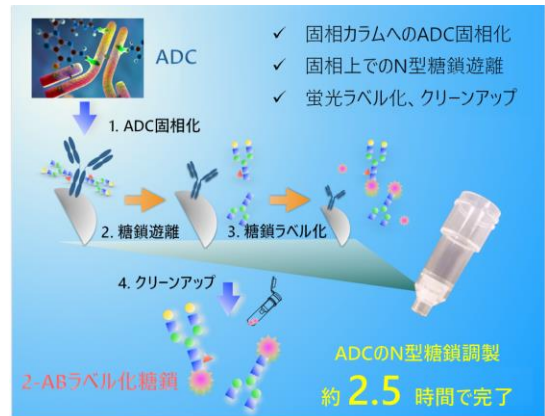


図1. EZGlyco® mAb-N Kit with 2-ABによるADC糖鎖調製

## 結果

EZGlyco® mAb-N Kit with 2-AB を用いて調製した2-ABラベル化糖鎖のHPLCチャートおよび推定糖鎖構造<sup>\*2</sup>を示す(図2)。これらの糖鎖構造はTrastuzumab (IgG) のN型糖鎖として報告されている構造<sup>\*3</sup>と一致した。EZGlyco® mAb-N Kit with 2-AB を用いて、プロトコルの変更を行うことなく、ADCの糖鎖分析に適用できることが確認された。

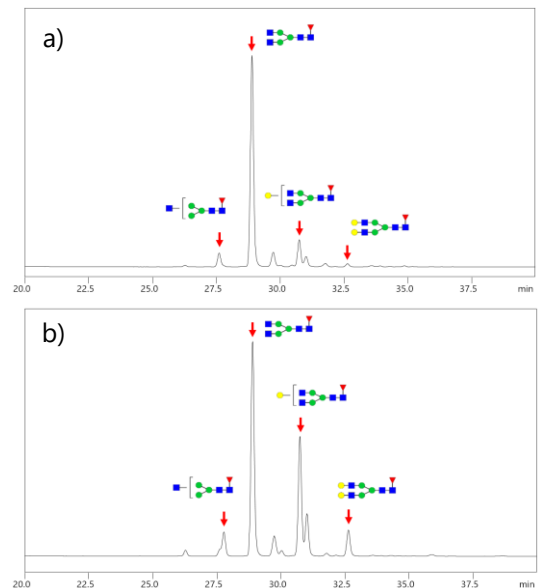


図2. ADCの抗体N型糖鎖解析結果 (HPLC)

a) Trastuzumab deruxtecan b) Trastuzumab emtansine

<sup>\*2</sup> GlycoMod Tool による糖鎖組成推定結果および論文情報から推測した糖鎖構造の例

<sup>\*3</sup> Segu, Z. et al. "A rapid method for relative quantification of N-glycans from a therapeutic monoclonal antibody during trastuzumab biosimilar development." *MABs*. Vol. 12, No. 1. (2020)

## まとめ

EZGlyco® mAb-N Kit with 2-ABを用いて抗体薬物複合体 (ADC) の糖鎖分析を簡便に行うことができた。がん治療の新たなアプローチであるADCの研究開発・品質管理の効率化への寄与が期待される。