

●Q Orbitrap 質量分析計とナノ LC を組み合わせた

モノクローナル抗体の特性解析

TN428

Characterization of Monoclonal Antibodies Using Q Orbitrap Mass Spectroscopy Coupled with Nano-flow Liquid Chromatography

[概要]

Q Exactive™ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) は、Alexander Makarov¹⁾ によって考案された Orbitrap analyzer と Quadrupole mass filter を搭載した高分解能 (最高 140,000@m/z 200) かつ高い質量精度 (外部標準 5 ppm) で測定可能な Q Orbitrap 質量分析計として、プロテオミクスやバイオ医薬品の特性解析をはじめ、幅広い分野で利用されています。モノクローナル抗体をはじめバイオ医薬品については、ICH Q6B ガイダンス「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定」を参考に特性解析を実施し、a)分子構造、b)物理化学的性質、c)免疫学および生物学的性質、d)純度および不純物について明らかにする必要があります。以下、ナノ LC システムと Q Exactive™ を組み合わせて実施したモノクローナル抗体の特性解析例を示します。

[実施例 1] モノクローナル抗体の物理化学的性質

モノクローナル抗体の物理化学的性質の解析は、目的物質の不均一性を含む物性を明らかにし、品質の恒常性を評価する上で重要です。質量分析は目的タンパク質の分子量を得られる他、分子量の異なる分子異型や糖鎖パターン (グリコフォーム) の違いを識別することが可能です。Q Exactive™にて測定したモノクローナル抗体のインタクトMS測定結果を図1に示しました。多価イオンスペクトル (30価~70価) をデコンボリューション処理にて分子量換算し、モノクローナル抗体に由来する各異型ピークの質量を求めました (表1)。各ピークの質量差分はヘキソース由来の162 Daであり、これら異型ピークが糖鎖構造の違いを反映していることを確認できました²⁾。分子量148 kDaのモノクローナル抗体より得られた各ピークの質量精度は10 ppm (1.5 Da) 前後でした。モノクローナル抗体のインタクトMS測定により、各異型ピークのグリコフォーム情報に加え、C末端Lysの欠損情報についても合わせて取得することができました。

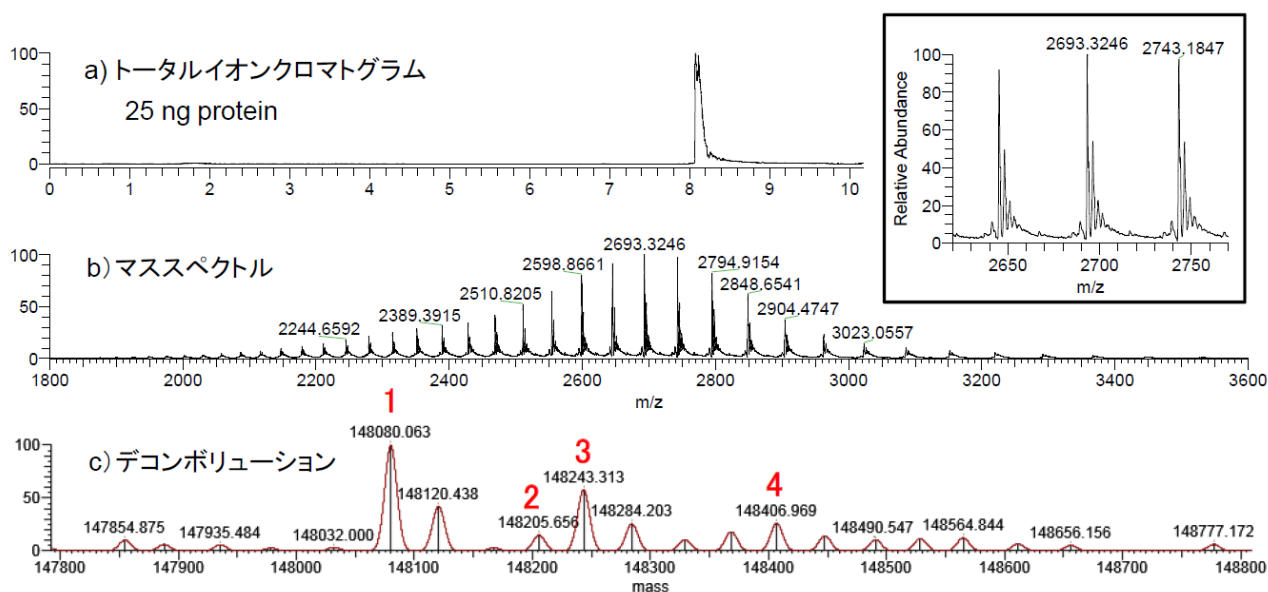


図 1. モノクローナル抗体のインタクト MS 測定結果

表 1. モノクローナル抗体の分子異型ピークの質量情報

ピーク	グリコフォーム	C 末端 Lys	観測質量	理論質量	質量精度 (ppm)	相対比
1	G0F/G0F	-	148080.06	148079.90	+1.1	1.00
2	G0F/G0F	+	148205.66	148208.00	-15.8	0.15
3	G0F/G1F	-	148243.31	148242.02	+8.7	0.58
4	G1F/G1F (G0F/G2F)	-	148406.99	148404.18	-18.9	0.26

[実施例 2] モノクローナル抗体のタンパク一次構造解析

モノクローナル抗体を還元アルキル化後にトリプシン消化した試料溶液 (160 fmol) を nanoLC-MS/MS 分析へ供した結果を図 2 に示しました。Sequest および Mascot 検索エンジンを用いて、各ピークのプロダクトイオンスペクトルに基づいた配列検索を実施した結果、84% のアミノ酸カバー率を得ることができました。トリプシン消化にて同定できなかったペプチド断片については、他のエンドプロテアーゼ (Lys-C、Asp-N 等) を用いてそのアミノ酸配列を確認しました。さらに、翻訳後修飾に関する情報をあらかじめデータベースに登録することで、翻訳後修飾の種類やその修飾位置を特定することも可能でした。今回の配列検索から、重鎖 N 末端のピログルタミン酸形成、および C 末端リジン欠損についても合わせて確認することができました³⁾。

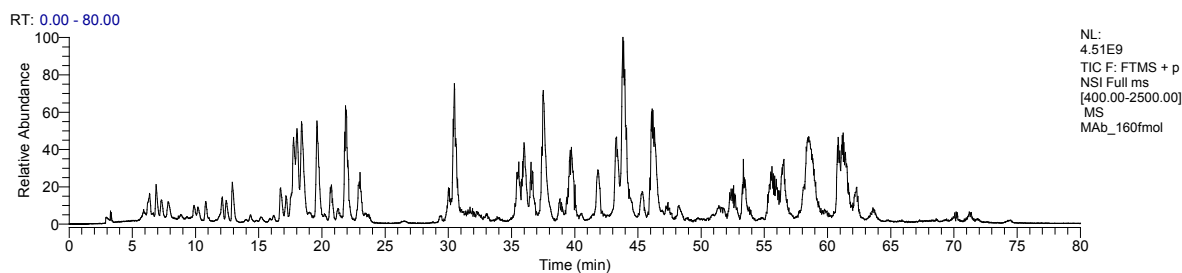


図 2. モノクローナル抗体の還元ペプチドマップ (トータルイオンクロマトグラム)

当社では、質量分析を用いたバイオ医薬品の特性解析試験に関する受託サービスを承っております。ジスルフィド結合や糖鎖結合位置の解析等、他の評価項目についてもお気軽にご相談ください。

[参考文献]

- 1) *Anal. Chem.* (2000), 72, 1156-1162
- 2) *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* (2009), 20, 1415-1424
- 3) *Anal. Chem.* (2013), 85, 715-736