

● 質量分析を用いたモノクローナル抗体の糖鎖構造解析

TN429

Mass Spectrometry-based Glycan Structural Analysis of Monoclonal Antibodies

[概要]

今般、世界的に多くのバイオ医薬品が開発・上市されている中、その多くは、糖タンパク質により構成されている医薬品です。糖鎖は多くの糖タンパク質の生物活性や安定性等^{1), 2)}に関与していることから、特性解析および品質評価項目として糖鎖解析は重要です。糖タンパク質性バイオ医薬品の糖鎖解析方法としては、酵素的あるいは化学的手法によりタンパク質から切り出された遊離糖鎖のプロファイリングが広く知られています。糖鎖プロファイリングはバイオ医薬品ロット間の恒常性評価や、製造方法変更あるいはバイオ後続品開発における同等性評価法として有用です。1) HPLC/蛍光検出法、2) キャピラリー電気泳動法 (CE)、3) 高速陰イオン交換クロマトグラフィー/電気化学検出器法 (HPAEC-PAD)、そして 4) 質量分析法 (MALDI-TOFMS、LC-ESI-MS) 等はそのための手法として広く利用されています。特に、質量分析法については構造情報を取得できる点で優れています。当社では、精密質量分析計 (Q Exactive™) にナノ流速液体クロマトグラフィー (以下、nanoLC) を接続することで、オンラインによる糖鎖分離に加え、未標識 (ラベルフリー) での高感度な MS 測定を実施しております。以下、nanoLC/Q Exactive を用いて実施したモノクローナル抗体の糖鎖プロファイリング例を示します。

[実施例]

nanoLC-MS によるモノクローナル抗体の糖鎖プロファイル、およびトータルイオンクロマトグラム上に検出された G1F 糖鎖 (ピーク 5) の MS² スペクトルを図 1 に示しました。グラファイトカーボンカラム^{3), 4)}を用いることで、分岐異性体を含む各糖鎖由来ピークの分離を確認しました。またナノスプレー技術^{5), 6)}と組み合わせることで、抗体定常領域に結合している G0F (ピーク 4)、G1F (ピーク 5)、G2F (ピーク 6) および Man5 (ピーク 11) 糖鎖ピークに加え、可変領域に存在する微量糖鎖ピークについても検出することができました (注入量 10 pmol protein)。検出された各糖鎖ピークについては、精密質量と MS² スペクトルによる単糖配列解析から、表 1 に示した通り推定しました。糖鎖プロファイルの結果は、文献情報⁷⁾とも良く一致していました。

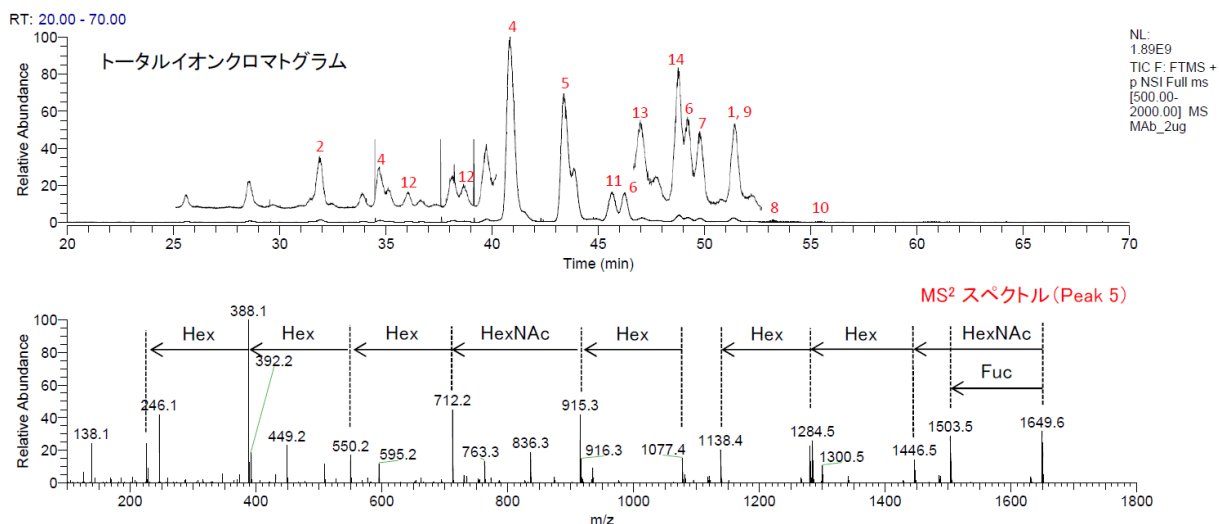


図 1. モノクローナル抗体の糖鎖プロファイル (TIC) と MS² スペクトル (G1F、ピーク 5)

表 1. nanoLC- MS/MS にて推定されたモノクローナル抗体中の糖鎖構造

ピーク番号	糖鎖構造	保持時間 (分)	観測 m/z [M+2H] ²⁺	質量精度 (ppm)
1		41.5 51.3	631.749	+1.7
2		32.0	660.258	-1.0
3		40.5 44.9	712.776	+2.3
4 (G0F)		40.8	733.288	+0.5
5 (G1F)		43.4 43.8	814.315	+1.2
6 (G2F)		46.3	895.342	+1.8
7		49.7	996.882	+1.9
8		53.6	1077.911	+4.2
9		51.4	976.370	+3.3
10		55.5	1057.400	+6.4
11 (Man5)		45.6	619.233	+1.5
12		36.1 38.7	720.773	+1.7
13		43.6 47.1	793.803	+2.9
14		48.8 49.8	874.830	+3.3

△; フコース、■; N-アセチルグルコサミン、○; マンノース、●; ガラクトース

[参考文献]

- 1) *Eur. J. Biochem.* (1990), 194, 457-462、2) *J. Biol. Chem.* (2002), 277, 26733-26740
- 3) *Anal. Biochem.* (1999), 269, 297-303、4) *J. Chromatogr. A.* (2002), 968, 89-100
- 5) *Anal. Chem.* (1997), 69, 4530-4535、6) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2004), 18, 2282-2292
- 7) *Anal. Biochem.* (2007), 364, 8-18

[関連技術リンク]

- ・ 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
<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn428.pdf>
- ・ バイオ医薬品の品質規格試験 (キャピラリー電気泳動法)
<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn361.pdf>