

抗体の LC/MS 分析

川崎ナナ、原園 景、伊藤さつき、橋井則貴、松石 紫、川西 徹、早川堯夫
国立医薬品食品衛生研究所
03-3700-9074, nana@nihs.go.jp

液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)は、タンパク質同定や翻訳後修飾解析のための強力なツールとして広く利用されており、バイオ医薬品の特性解析・試験においても、既にペプチドマッピングなどに導入されている。本シンポジウムでは、タイプの異なる検出器を有する2種のESIMS、すなわち、ESI-QqTOF MS/MS (QSTAR, AppliedBiosystems) 及び ESI-QIT MS (LTQ, Thermoelectron)を用いて抗体を分析した例を紹介しながら、バイオ医薬品の特性解析・品質評価における LC/MS の可能性について述べたい。

一次構造、類縁物質、及び不純物

図1は、QqTOF タイプの LC/MS/MS を用いて得られた市販のヒト IgG のペプチドマップである。ここで得られた MSMS データを用いて Mascot によるデータベース検索を行ったところ、IgG に属する様々な分子種が同定された。図2は、データベース検索の結果、最も高いスコアが得られたタンパク質(IgG2 H鎖)の一次構造を示したもので、下線部は同定されたペプチド断片を表している。

N 結合糖鎖を含むペプチドを除く IgG H鎖定常部が高い coverage で同定されていることがわかる。アミノ酸配列が決定されている抗体医薬の場合、その配列を予めデータベースに入力しておくことによって、可変部を含むより高い coverage が得られることが期待される。また、翻訳後修飾に関する情報をデータベースに追加しておくことによって、翻訳修飾の種類やその位置を確認することも可能である。以上の結果は、LC/MS を用いた抗体医薬のペプチドマッピングは、一次構造確認はもちろん、確認試験、類縁物質、不純物試験としての可能性も秘めていることを示唆するものである。

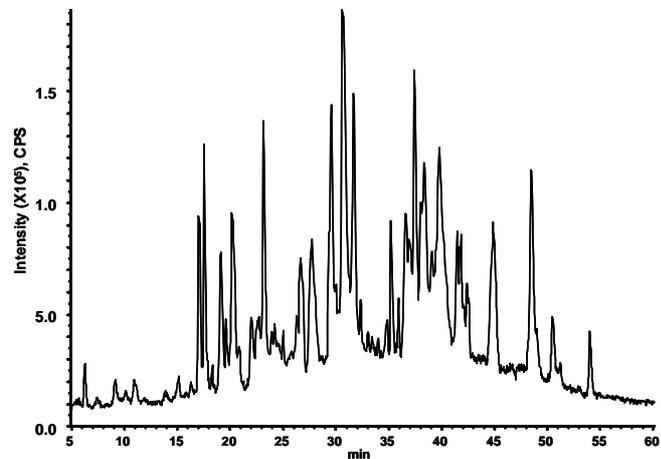


図1 IgG のペプチドマップ

```
MELGLSWVFL VAILEGVQCE VQLVESGGGL VQPGGSLRSL CAASGFTFSS  
YWMSWVRQAP GKGLEWVANI KQDGSEKYYV DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL  
QMNSLRAEDT AVYYCAREFE STMTVFNADY YFYMDVWGK GTITVSSAS  
TKGFSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSVHT  
FPAVLQSSGL YLSLSSVTVF SSSLGTQTYI CNVNHKPSMT KVDKRVPEKS  
CDKTHCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHY  
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNKEY  
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ  
GNVFCSCVMH EALHNYHTQK SLSLSPGK
```

図2 同定された IgG2 H鎖(AAH41037)の一次構造

糖鎖

LC/MS/MS を用いて得られたペプチドマップには、糖鎖に関する情報も含まれている。ペプチドマップから糖鎖の情報を引き出すためには、まず、無数のペプチドのマススペクトルの中から、糖ペプチド由来のマススペクトルを選び出す必要がある。糖ペプチドを特定する方法として、プリカーサーイオンスキャン、データ依存的CID-MS/MS、及びインソースCIDなどが利用されている。いずれも糖鎖に特徴的なオキシニウムイオンを指標として糖ペプチドを特定する方法である。

図3はLC/ESI-QqTOF MS/MSを用いて得られたモノクローナル抗体のペプチドマップにおいて糖ペプチドと特定されたピークのマススペクトルである。糖ペプチドの計算値とペプチドの理論値の差(糖鎖の分子量)から、結合している糖鎖構造とその分布を知ることができる。

図4はLC/ESI-QITMSを用いたモノクローナル抗体のペプチドマッピングで検出された糖ペプチドイオンのMS², MS³, MS⁴スペクトルを示したものである。糖鎖の分子量に加えて

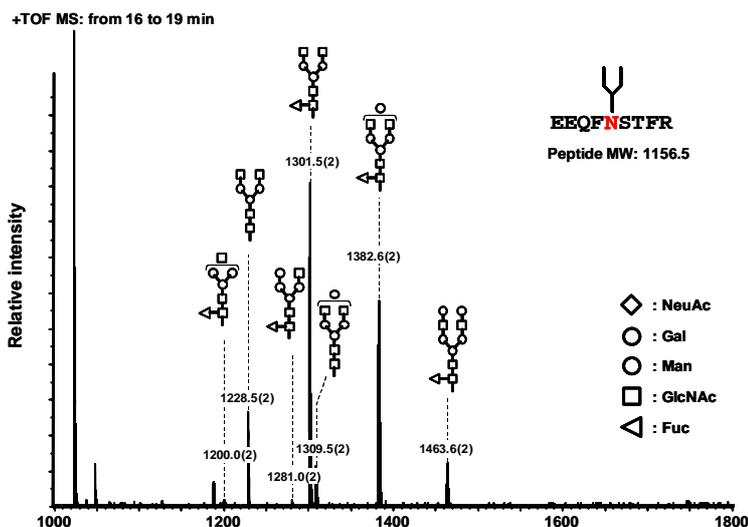


図3 モノクローナル抗体の糖ペプチドのMSスペクトル

単糖配列が確認できることから、より詳細な糖鎖構造情報が得られることがわかる。

以上のようにLC/MS/MSは、一度の分析で多くの情報を提供してくれることから、今後、抗体医薬の特性解析や試験法の効率化に大いに役立つものと期待される。

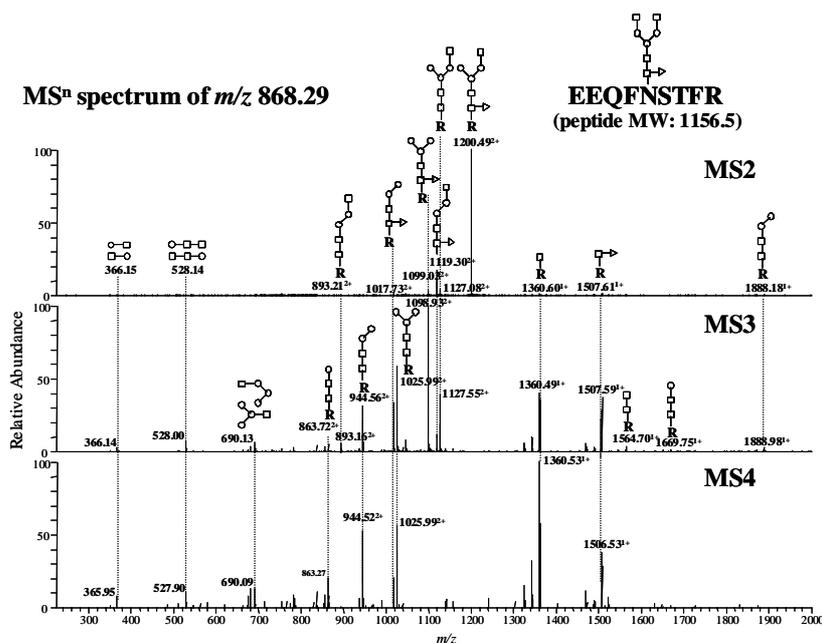


図4 モノクローナル抗体の糖ペプチド(m/z868.29)のMS², MS³, MS⁴スペクトル