

Application News

No. B86

MALDI-TOF 質量分析法

化学修飾抗体の簡易質量測定

— 卓上型MALDI-TOF MSを用いた修飾有無、修飾数の確認 —

抗体に薬物を結合させた抗体薬物複合体 (Antibody drug conjugate: ADC) は、抗体の持つ高い選択性と低分子薬剤の効果を組み合わせることで、従来の低分子医薬品よりも、より効果的な抗癌作用が期待される医薬品として 2000 年代に登場しました。すでにいくつかの製品が市場に出ていますが、ADC のようにタンパク質に別の化合物を人為的に結合させる場合、その化合物がどの程度結合しているか、またどの部分に結合しているか、ということは重要な品質特性の一つとなります。

そこで、本稿では研究用標準抗体に低分子化合物を人為的に結合させた疑似 ADC を作成し、卓上型 MALDI-TOF MS を用いて分析した事例を報告します。

S. Nakaya

■ 非還元状態での低分子化合物修飾抗体の質量分析

Seki らの手法¹⁾で Me-fluorescein-ABNO をトリプトファン残基に修飾させた標準抗体 (図 1、NISTmab, Humanized IgGκ monoclonal antibody, RM8671) および未処理の標準抗体 (各 0.5 μL) を、それぞれマトリックス溶液 (10 mg/mL シナピン酸、50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸) と混合した後、MALDI ターゲットプレートに搭載して質量分析を行いました。分析には卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” (図 2) を用いました。

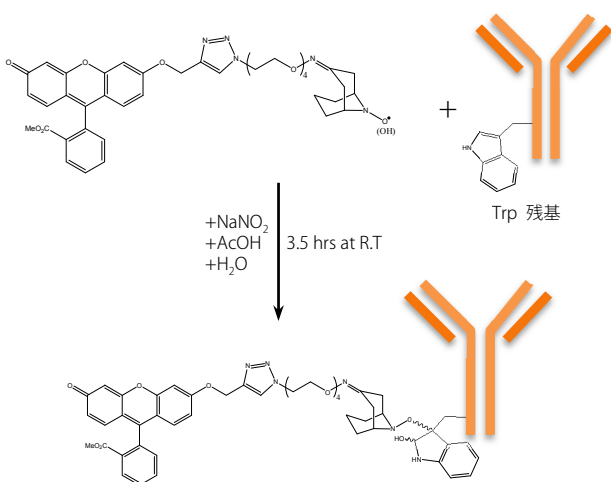


図 1 抗体の Me-fluorescein-ABNO 修飾



図 2 卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 外観

非還元状態での修飾処理抗体と未処理抗体の MS スペクトルを比較したところ、図 3 に示したように、修飾処理抗体では、未処理抗体に対して修飾基約 3 つ分の質量差を持ったシグナルが検出されました。

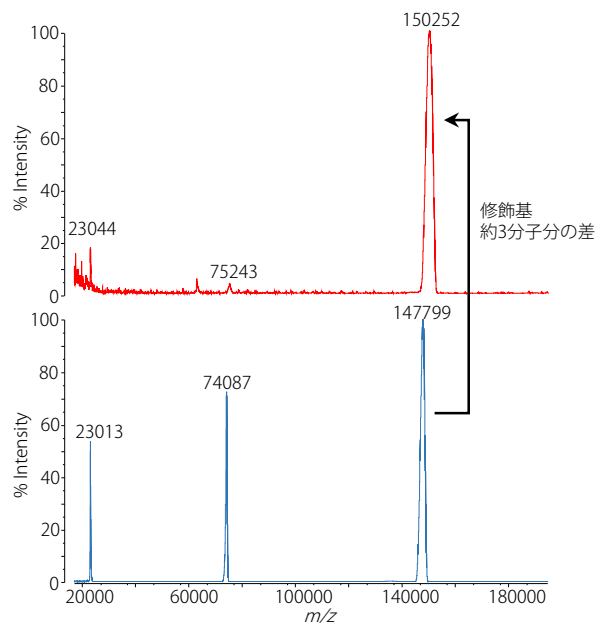


図 3 修飾処理抗体と未処理抗体のマススペクトル (上：修飾処理抗体、下：未処理抗体)

■還元処理した抗体の質量分析

修飾処理抗体および未処理抗体（各 4 μ L）に、それぞれ 50 mM DTT 水溶液（1 μ L）を加え、57 $^{\circ}$ C で 1 時間還元処理した後、各反応溶液（0.5 μ L）を MALDI ターゲットプレートに搭載しました。さらに 0.5 μ L のマトリックス溶液（10 mg/mL シナピン酸、50% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸）を重層し、乾燥後に質量分析を行いました。

測定の結果、図 4 に示したように、抗体の軽鎖については修飾処理抗体および未処理抗体とで変化は見られませんでした。一方、重鎖に関して、修飾処理抗体では未処理抗体のシグナルから修飾基約 1 つおよび 2 つ分マシフトしたシグナルが検出されました。

以上の結果から、今回作製した修飾処理抗体には Me-fluorescein-ABNO が全部で 3 分子結合したものが最も多く存在

し、化学修飾は抗体の重鎖のみ生じていること、さらに抗体分子を構成する重鎖 2 本の内、一方には 1 か所のみ修飾が起こり、他方には 2 か所の修飾が起きているものが多いことが明らかとなりました（図 5）。

今回用いた標準抗体には Me-fluorescein-ABNO が結合できるトリプトファン残基が合計 22 か所存在していましたが、そのうち 3 か所のみトリプトファンが修飾された抗体がもっとも多く作製されたこととなります。おそらく、抗体の立体構造が Me-fluorescein-ABNO のアクセスを制限したものと予想されます。

卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” はサンプル導入から数分で分析を開始できます。そのため今回の事例のような、分子量数百程度の化合物がどの程度の数タンパク質に導入されたのかを、素早く簡便に確認することが可能です。

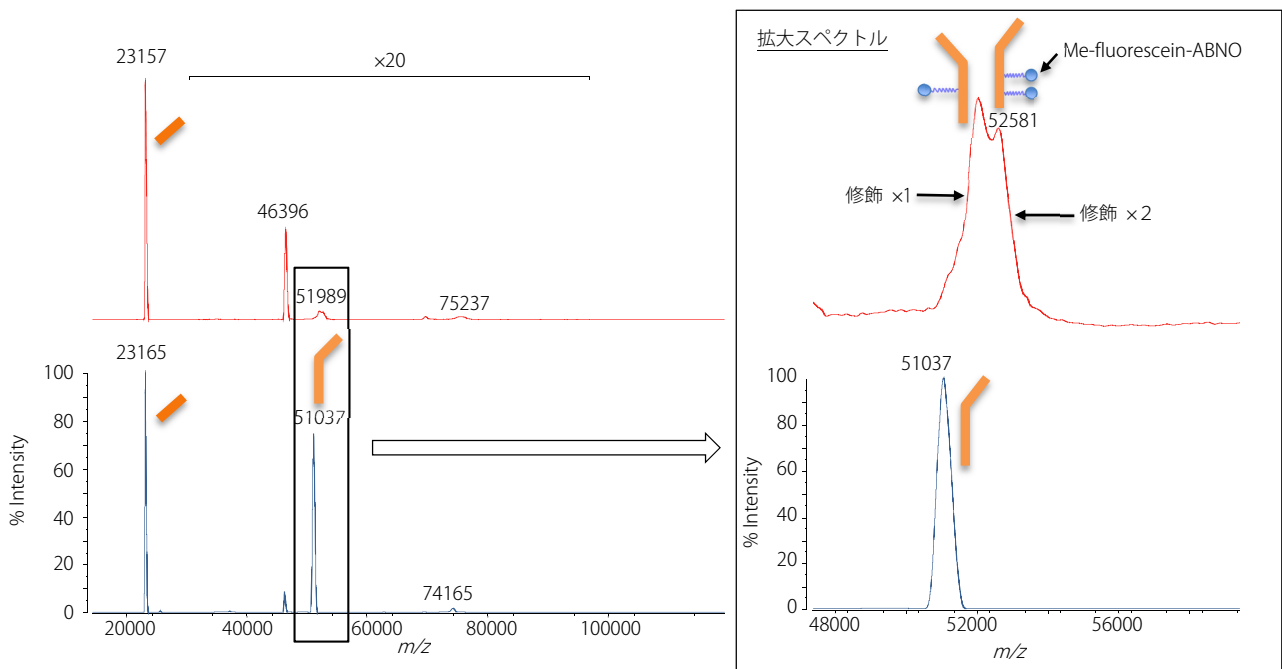


図 4 還元処理後の修飾処理抗体と未処理抗体のマススペクトル
(上：修飾処理抗体、下：未処理抗体)

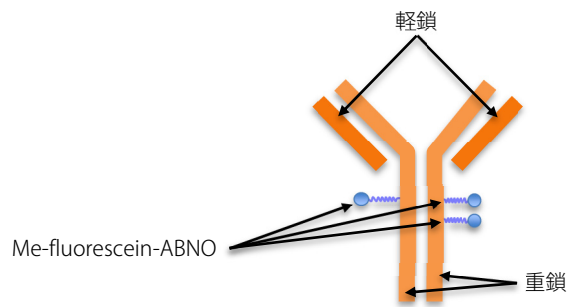


図 5 今回の分析で主要成分であると推定された修飾処理抗体の模式図

参考文献

- 1) Y Seki, T Ishiyama, D Sasaki, J Abe, Y Sohma, K Oisaki, and M Kanai, Transition Metal-Free Tryptophan-Selective Bioconjugation of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2016,138 (34), 10798-801.

謝辞

Me-fluorescein-ABNO 修飾抗体は、東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室のご厚意にて作製していただきました。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2018年12月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。