

# Application News

## No. B99

### MALDI 質量分析法

# 小型 MALDI デジタルイオントラップ 質量分析計 "MALDImini™-1" を用いた 化学修飾抗体の修飾部位解析

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、小型 MALDI-デジタルイオントラップ (DIT) 質量分析計 "MALDImini-1" を用いて分析した事例を報告します。

S. Nakaya

### ■ 抗体のトリプシン消化と MS 測定

Seki らの手法<sup>1)</sup>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 IgG  $\kappa$  monoclonal antibody, RM8671) および未処理の標準抗体 (各 1.0  $\mu$ L) を、それぞれ溶液内でトリプシン消化し、Ziptip®  $\mu$ C18 チップ (Merck Millipore) で脱塩したものを MALDI ターゲットプレートに搭載しました。さらにマトリックス溶液 (0.5  $\mu$ L) を重層して乾燥させた後、小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1" を用いて MS<sup>n</sup> 分析を行いました。マトリックスには DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を用いました。

MALDImini-1 (図 2) を用いて、修飾抗体と未修飾抗体それぞれの測定を行い、マススペクトルを比較したところ、ほとんどのイオンは両方で共通していましたが、一部、修飾抗体のみで検出されるイオン ( $m/z$  2416.9、2430.7、2452.7、2560.9) が見出されました (図 3)。

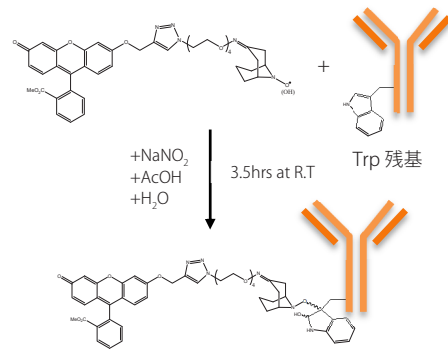


図 1 抗体の Me-fluorescein-ABNO 修飾



図 2 小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini™-1" 本体外観

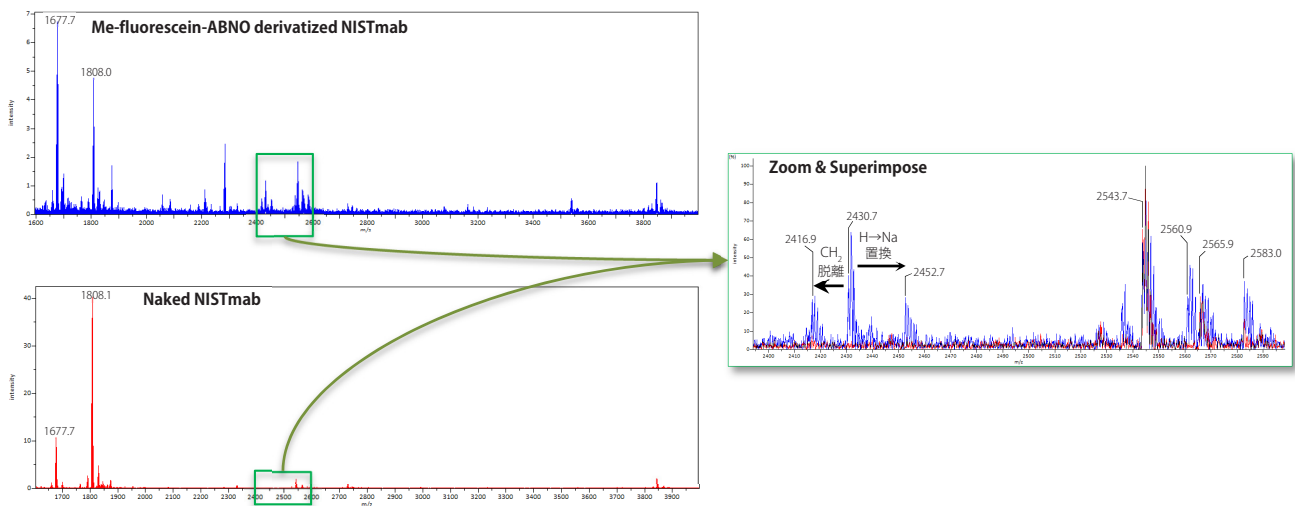


図 3 標準抗体のマススペクトル比較 (赤: 未修飾抗体、青: 修飾抗体)

このうち  $m/z$  2416.9、2430.7、2452.7 の3つは、その質量差から、1つの分子の  $\text{CH}_2$  脱離体や  $\text{H}/\text{Na}$  置換体の関係にあると考えられました。そこで、別々の分子由来であると考えられた  $m/z$  2416.9 と  $m/z$  2560.9 についてさらに分析を行うこととしました。

## MS<sup>n</sup>分析による修飾部位解析

まず、 $m/z$  2416.9 について MS/MS 分析を実施したところ、修飾基が脱離したペプチド骨格と予想されるフラグメントイオン ( $m/z$  1677.7) が検出されました (図4)。このイオンが未修飾抗体の MS 測定で検出されたイオンと同様の  $m/z$  値を示していたので、修飾抗体の MS/MS 分析で得られた上述のイオンの MS<sup>3</sup> 測定と、未修飾抗体の MS スペクトルで得られた同じ  $m/z$  値を持つイオンの MS/MS 測定をそれぞれ行い、得られたスペクトルを比較したところ、両者が同じフラグメントパターンを示していました。さらにこれらのデータを Mascot MS/MS 検索したところ、抗体の重鎖由来のペプチド配列 (278FNWYVDGVEVHNAK<sup>291</sup>) であることが確認されました。

同様に  $m/z$  2560.9 のイオンについても分析を行い、抗体の重鎖由来のペプチド配列 (305VSVLTVLHQDWLNGK<sup>320</sup>) に修飾基が存在することが判明しました (図5)。このことから、今回の化学修飾は上記2つのペプチド配列中のトリプトファンに存在していることが示唆されました。

抗体1分子は重鎖2分子と軽鎖2分子からなる複合分子であることから、今回の結果は、抗体1分子に対して最大で4か所の化学修飾が起こりうることを示しています。このことは、別実験 (アプリケーションニュース B86) で得られた結果 (抗体1分子に化学修飾が3つ存在) からも妥当であるといえます。

今回の分析結果は、小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1" が、小型ではあっても MS<sup>n</sup> 分析能力が高く、修飾ペプチドの構造解析を行うのに十分な性能を有していることを示しています。

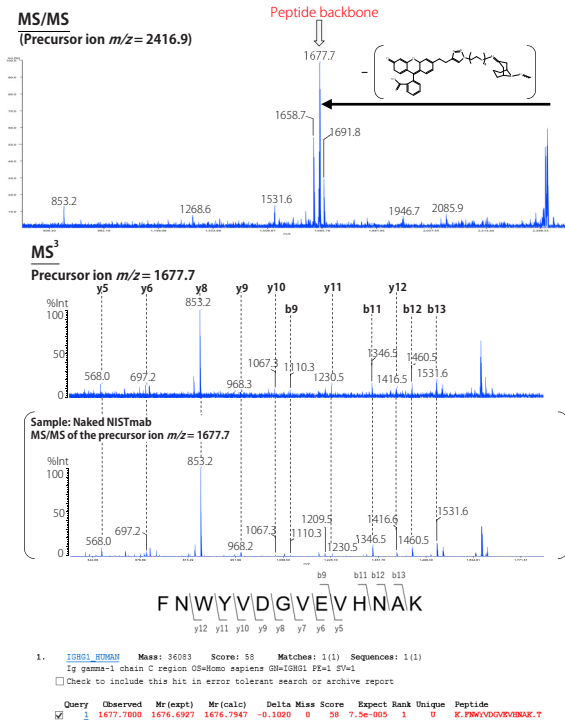


図4 MS<sup>n</sup> (n=2, 3) スペクトルと Mascot MS/MS 検索結果

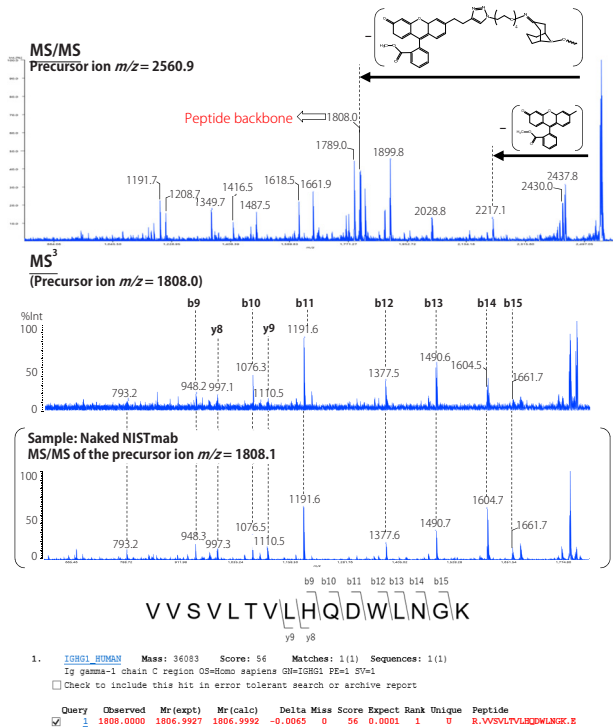


図5 MS<sup>n</sup> (n=2, 3) スペクトルと Mascot MS/MS 検索結果

QVTLRESGALVVKPTQTLTLCTFSGFSLSTAGMSVGVWIRQPPGKALEWLADIWDDKKHYN  
PSLKDRLLTISKDTSKNQVWLVKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDWVGQGTVTVYSSASTK  
GPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVGHFTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKD  
TLMSRTPETVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRWSVSLTVLHQD  
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYT  
QKSLSLSPGK

図6 抗体の重鎖アミノ酸配列と修飾基の結合位置  
(太字: Mascot MS/MS 検索で確認されたペプチドのアミノ酸配列、赤字: 修飾基が結合しているトリプトファン)

### 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。

MALDImini は、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

ZipTip は、Merck KGaA の登録商標です。

その他、本文書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。

なお、本文中には TM、® マークを明記していない場合があります。