

高分解能質量分析計を用いた モノクローナル抗体の糖鎖付加解析

中園 純菜

ユーザーベネフィット

- ◆ FcRカラムと高分解能質量分析計LCMS-9030を用いて糖鎖付加状態の違いによる抗体の分離と分子量確認が可能です。
- ◆ 本システムにより抗体に付加した糖鎖におけるガラクトース等の付加数の違いを検出できます。
- ◆ LabSolutions Insight Explore™ CSDにより高分子化合物の多価イオン解析が可能です。

■はじめに

標的分子に対する特異性の高さと副作用の少なさから、モノクローナル抗体や抗体薬物複合体といった抗体医薬品が近年注目を集めています。抗体医薬品は化学合成による大量生産が可能な低分子医薬品とは異なり、動物細胞を利用して産生されるため、構造上の不均一性を防ぐことが困難です。不均一性の一例として糖鎖付加の違いがあります。糖鎖付加の違いにより抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性が異なることから、抗体医薬品の糖鎖付加状態のモニタリングは品質管理において重要です。

本稿では、四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030を使用して、モノクローナル抗体の糖鎖付加解析を行った事例を紹介いたします。

■分析条件

サンプルはモノクローナル抗体（NISTmAb, 10 mg/mL）を用いました。

分析条件を表1、LC/MS分析システム流路図を図1に示します。TSKgel® FcR-IIIa-NPR®カラム（東ソー株式会社）を用いて糖鎖付加の違いによりモノクローナル抗体を分離し、LCMS-9030を用いて各ピーク中の糖鎖付加抗体の分子量を確認しました。FcRカラムは、遺伝子組換えヒトFcγレセプター-IIIaをリガンドとして用い、抗体Fc領域のM結合型糖鎖構造の違いを認識して抗体を分離することが可能なカラムです。

質量分析におけるイオン化効率を向上させるために、FcRカラムでサンプルを分離後、オンラインでメイクアップ溶液（1.0%ギ酸、50%アセトニトリル-水）を添加してから質量分析計に導入しました。

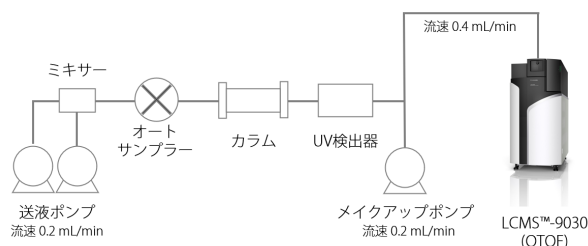


図1 LC/MS分析システム流路図

■FcRカラムによるモノクローナル抗体の分離

NISTmAbのUVクロマトグラム（280 nm）を図2に示します。FcRカラムを用いた分離により3つのピークが確認されました。ADCC活性はPeak 3、2、1の順に高いことが知られています。

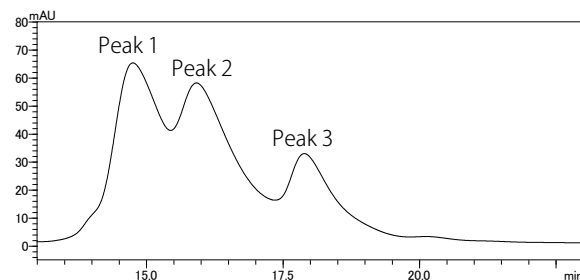


図2 NISTmAbのUVクロマトグラム（280 nm）

表1 分析条件

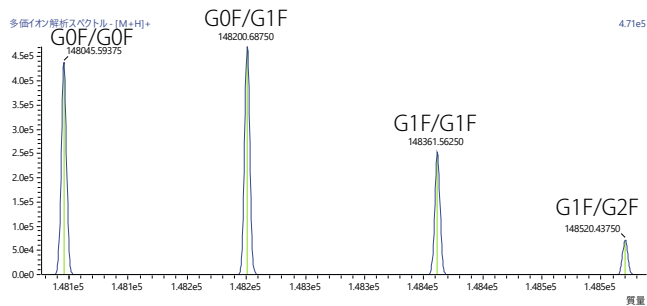
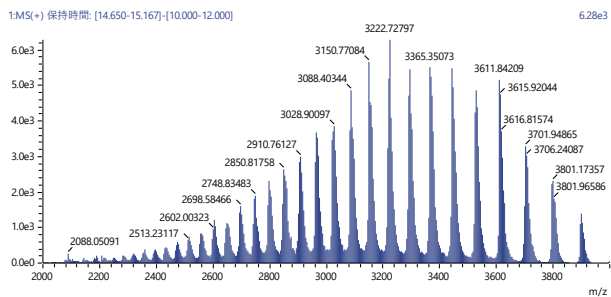
UHPLC (Nexera™ X3 system)	
Column	: TSKgel FcR-IIIa-NPR (75 mm×4.6 mm I.D., 5.0 μm)
Mobile Phase A	: 20 mmol/L Ammonium acetate – Water, pH 6.0
Mobile Phase B	: 20 mmol/L Ammonium acetate – Water, pH 4.0
Makeup Solution	: 1.0% Formic acid, 50% acetonitrile – Water
Gradient Program	: B Conc. 0% (0-2 min) – 30% (20 min) – 100% (20.1-25 min) – 0% (25.1-30 min)
Flowrate	: 0.2 mL/min (0.4 mL/min after makeup)
Column Temperature	: 20 °C
Injection Volume	: 5 μL
Detector	: 280 nm (SPD-M40)
MS (LCMS-9030)	
Ionization	: ESI positive
Nebulizing Gas Flow	: 2.0 L/min
Drying gas Flow	: 10.0 L/min
Heating gas Flow	: 10.0 L/min
Interface Temp.	: 300 °C
DL Temp.	: 250 °C
Block Heater Temp.	: 400 °C
MS Range	: m/z 1000-4000

■高分解能質量分析計による糖鎖付加解析

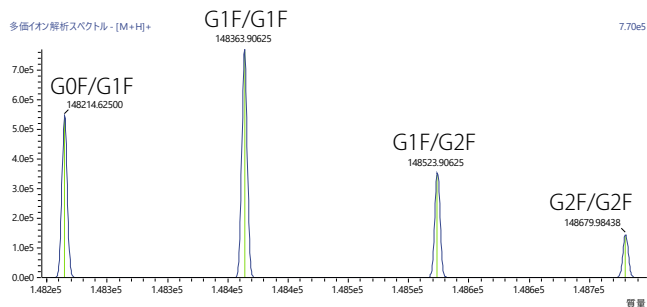
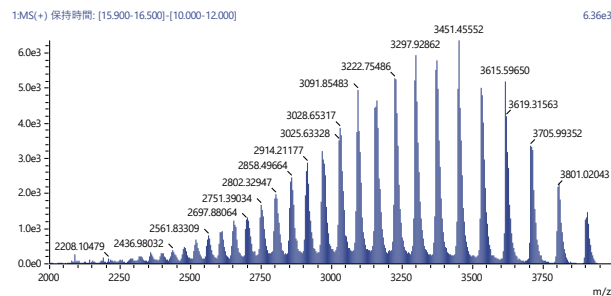
FcRカラムにより分離した各ピーク（図2のPeak 1、2、3）のマススペクトルおよび多価イオン解析結果を図3に示します。多価イオン解析は解析ソフトウェアLabSolutions Insight Explore CSDを用いて行いました。本ソフトウェアに搭載されたReSpectアルゴリズム（Positive Probability社）は、多価イオンが分布するマススペクトルから、各分子の質量を解析することができます。

Peak 1、2、3について、NISTmAb（分子量約148,000）のガラクトース（平均分子量：162）付加数違い（図4参照）と推定される多価イオン解析結果が得られました。Peak 1、2、3はそれぞれ、G0F/G0FとG0F/G1F、G0F/G1FとG1F/G1F、G1F/G1FとG1F/G2Fが優位に検出されました。各グライコフォームの多価イオンのうち強度が最も強い45価のイオンの抽出イオンクロマトグラムを図5に示します。Peak3、2、1の順にガラクトース（Gal）数の多い糖鎖が付加している割合が大きいことが確認できました。

Peak 1



Peak 2



Peak 3

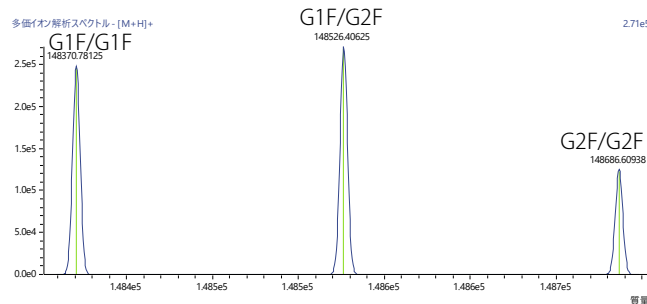
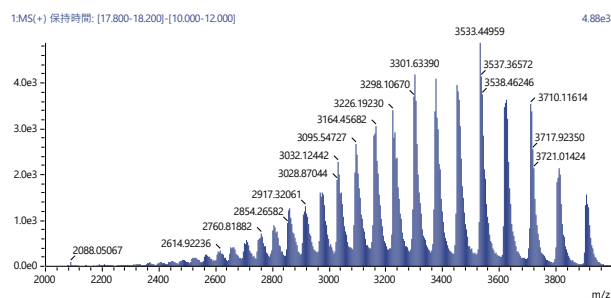


図3 NISTmAbのマススペクトル(左)と多価イオン解析結果(右)
上段: Peak 1、中段: Peak 2、下段: Peak 3

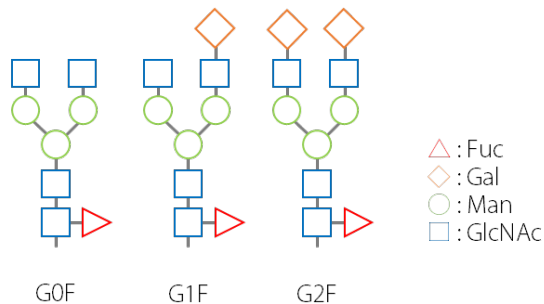


図4 抗体に付加する糖鎖の違い

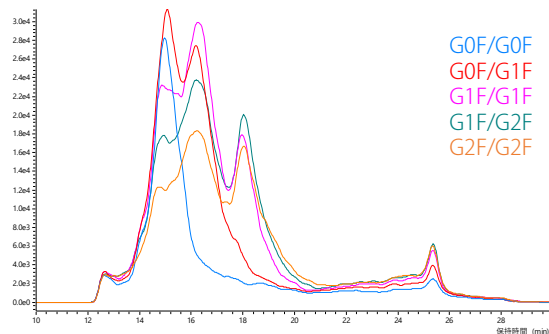


図5 各グリコフォームの抽出イオンクロマトグラム

■まとめ

FcRカラムを用いてモノクローナル抗体を糖鎖付加状態の違いによりADCC活性の異なる3つのピークに分離しました。四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030を検出器として使用することで、分離した各ピークにおけるガラクトースの付加数の違いを検出できました。本システムにより抗体の糖鎖付加状態を評価することができます。

<関連アプリケーション>

1. 抗体医薬品における糖鎖および凝集体評価の自動化
[Application News No.01-00576-JP](#)

* 本件は、東ソー株式会社との協業による成果です。

LCMS、LabSolutions Insight Explore、およびNexeraは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。TSKgel、NPRは日本、米国、欧州共同体、中国等における東ソー株式会社の登録商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00782-JP 初版発行: 2024年 10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。本文中に記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。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ LCMS-9030

四重極飛行時間型質量分析計



＞ Nexera™シリーズ

超高速液体クロマトグラフ



＞ LabSolutions
Insight™

GC/MS & LC/MS用 多検体定量支援ソフトウェア LabSolutions Insight

関連分野

＞ 医薬・バイオ医薬品

＞ バイオ医薬品

＞ 低分子医薬品

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ