

タンパク質製剤開発のための品質評価技法

—高分解能質量分析計を用いた抗体医薬の品質特性解析—

小木曾 英夫, 小島 理恵子, 薬事研究会生物部会

Quality evaluation techniques for protein drug development using a time-of-flight mass spectrometry coupled with liquid chromatography

Hideo OGISO, Rieko KOJIMA,
The Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) は、精密質量測定によりタンパク質の構造不均一性を解析可能なことから、タンパク質製剤開発における構造確認や品質評価に威力を発揮する。

本研究は、標準抗体NISTmAbを用いたLC-TOF/MSによる品質特性解析をテーマとして、本センターで作成した種々の解析プロトコルをブラッシュアップするとともに、新たに、宿主細胞由来タンパク質の解析のためのプロトコルを作成した。これら分析手法を確立することを通して、タンパク質製剤の品質特性解析における質量分析装置の有用性を確認した。

Summary

Liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS) is a very useful tool for structural confirmation and quality evaluation in protein drug development, because it can analyze structural heterogeneity of proteins by accurate mass measurement.

This study focused on the quality characterization of the standard antibody, NISTmAb, by LC-TOF/MS. We brushed up protocols that have been already prepared for the measurement performed in our center, and also prepared a new protocol for the analysis of host cell-derived proteins. Through the establishment of these analytical methods, we have shown the usefulness of mass spectrometry in the characterization of protein drugs.

緒 言

バイオシミラー開発は、タンパク質の生産とその品質評価において、低分子医薬品の開発とは異なるノウハウを必要とする。薬事総合研究開発センターでは、抗体医薬の品質評価を1つの重要テーマとして位置付けており、日々、ノウハウの蓄積に取り組んでいる。これまでに高分解能質量分析計を用いて、抗体分子の品質特性解析を行うための基本的分析手法を習得し、更に再現性及び測定感度の向上を目的として、解析方法のブラッシュアップを進め、これらをプロトコル化してきた。

令和2年度の生物部会は、この「抗体分子の品質特性解析」に関するノウハウを県内製薬企業に共有化することを目的として開催した。内容は、基礎編として、1) 抗体分子を丸ごと測定するインタクト解析、2) 抗体分子を25 kDまで分解して測定するサブユニット解析、3) 抗体分子をペプチドまで分解して測定するペプチドマッピングを実施した。更に、応用編として、4) ペプチドマッピングを応用した糖ペプチ

ド解析、5) インタクト解析を応用した抗体のオリゴマー解析、6) ペプチドマッピングを応用したホストセルタンパク質解析を実施した。これら解析技術の経験を積み重ねながら、薬事総合研究開発センターのこれまでのプロトコルを更にブラッシュアップした。

方 法

薬事総合研究開発センターのプロトコル（実験マニュアル）に従い実施した。新規プロトコルやバージョンアップしたプロトコルについては、順次改訂を予定している。（<https://www.pref.toyama.jp/1285/kurashi/kenkou/iryuu/1285/research/manual.html>）

結果と考察

1. インタクト解析

インタクト解析とは、抗体タンパク質分子をプロテアーゼ処理等行わずに丸ごと測定し、質量分析を行うことにより、タンパク質の状態（品質）を評価するも

の。ただし、逆相液体クロマトグラフ (LC) 分離時は80 °Cで加熱し、タンパク質の立体構造を解いた状態を測定する。熱変性を行わないとLCでの分離効率が悪くなることに加え、分子表面しかイオン化しないため価数が小さくなり、測定範囲 ($m/z < 5000$) に収まらないため、熱変性は必要となる。分解能80,000の質量分析装置では、50kDa以下のタンパク質であれば、モノアイソトピック質量の測定が可能であるが、IgG分子の場合150kDaと大きな分子であるためモノアイソトピック質量は測定できず、平均質量での評価となる。従って、インタクト解析では、主要糖鎖の不均一性を含む主要な構造多様性のみを評価することになる。

今回の測定では、抗体のインタクト分子を評価するために質量15万前後のみならず、解離したサブユニットを検出するために、質量計算を4万以下にまで範囲を広げた。その結果、Light Chain (LC) 単量体とHeavy Chain (HC) 単量体に加え、抗体が半分に分離したLC1-HC1を検出できた (図1, 表1)。一方、HCの二量体 (HC2) やLCが1本脱離した分子 (LC1-HC2) は検出されなかった。また、糖鎖が付加したHC単量体は検出されなかった。このことは、糖鎖がHCとLCとの結合安定性に関与している可能性を示しているかもしれない。

2. サブユニット解析

抗体分子のインタクト解析では平均分子量でしか評価できないのに対して、25kDaまで限定分解して測定するサブユニット解析では、モノアイソトピック質量での評価が可能となる。平均分子量での評価の場合、最大7 Da程度の誤差を許容する必要があるのに対し、モノアイソトピック質量測定の精度は0.1Da程度まで向上する。このことにより、糖鎖やアミノ酸残基の不均一性の評価がサブユニットレベルでもある程度可能となる。サブユニット解析は、ペプチドマッピングの操作より簡便でかつ、前処理工程で生ずる人為的なメチオニン (M) 酸化やアスパラギン (N) 脱アミド化を最小限に抑えることができるのがメリットである。

これまでにNISTmAbで報告された糖鎖構造は多種多様に及んでおり、概ね47種の構造は確からしいとされている (参考文献1)。この糖鎖構造をProtein Reference Listに追加入力することにより、我々の解析システムにおけるプライベートデータベースを拡充させた。これにより今回の測定では、これまでアサインされなかった糖鎖をいくつか追加でアサインできるようになった (図2, 表2)。

3. ペプチドマッピング

抗体分子の特性解析においてペプチドマッピングは、アミノ酸配列の確認やアミノ酸残基の修飾割合を把握する上で重要な解析手法である。今回、抗体量として4 μ g並びに14 μ g相当それぞれをLC-MSに注入したときに得られたデータを比較したところ、14 μ g注入では主要ピークが飽和していたため、アミノ酸修飾率のような量的評価を行うときは4 μ g注入の飽和してないデータを用いることとした。4 μ g注入でも今回の測定ではシーケンスカバー率95%以上、フラグメントカバー率は92%以上のデータが取得でき、シーケンス評価としても十分であった (図3)。このデータから評価したMの酸化やNの脱アミド化などのアミノ酸修飾率を表3に示した。なお、モノグリコシル化はセリン残基 (S) とリジン残基 (K) にのみ生ずる可能性を考慮し、他のアミノ酸残基のグリコシル化の可能性を考慮しなかったことから、推定評価とした。Kにモノグリコシル化が生じた場合トリプシンによる切断が行われなくなることから、miss cleavageを含むペプチドが生ずる。グリコシル化修飾されていない場合、トリプシンで切断されるため、Kの糖化の修飾率を同一ペプチドの検出量の比から求めることはできなかった。従って、糖化の割合を算出するには、トリプシン以外のプロテアーゼを用いる必要があると考えられる。

4. 糖ペプチド解析

トリプシン消化によるペプチドマッピングは最も効率の良い一次構造解析手法である。既知のアミノ酸修飾は、ペプチドマッピングにより解析可能であるが、糖鎖修飾を解析しようとする場合、幾つかの問題点に直面する。糖ペプチドはイオンサプレッションによる感度低下を招き易く、主に、共溶出する他のペプチドやトリフルオロ酢酸 (TFA)、Tris等の影響を受けるものと考えられる。また、ペプチドマッピングで通常用いられるC18カラムの分離条件では、糖鎖の違いによる分離が期待できないことも主な問題点となっている。我々はこれまでに、糖ペプチドを濃縮する前処理を追加することでイオンサプレッションによる感度低下を抑え、C18カラムの分離効率をわずかながら改善したLC条件を用いることにより、NISTmAbの糖鎖構造をペプチドレベルで解析するプロトコルを作成している。

今回の測定では、前処理方法をスピンカラム化して操作性を向上させるとともに、前述した47種類の糖鎖構造 (参考文献1) を反映した糖ペプチドをプライベートデータベース化することにより、従来のプロトコルに比べ、より多くの糖ペプチドを検出できるよ

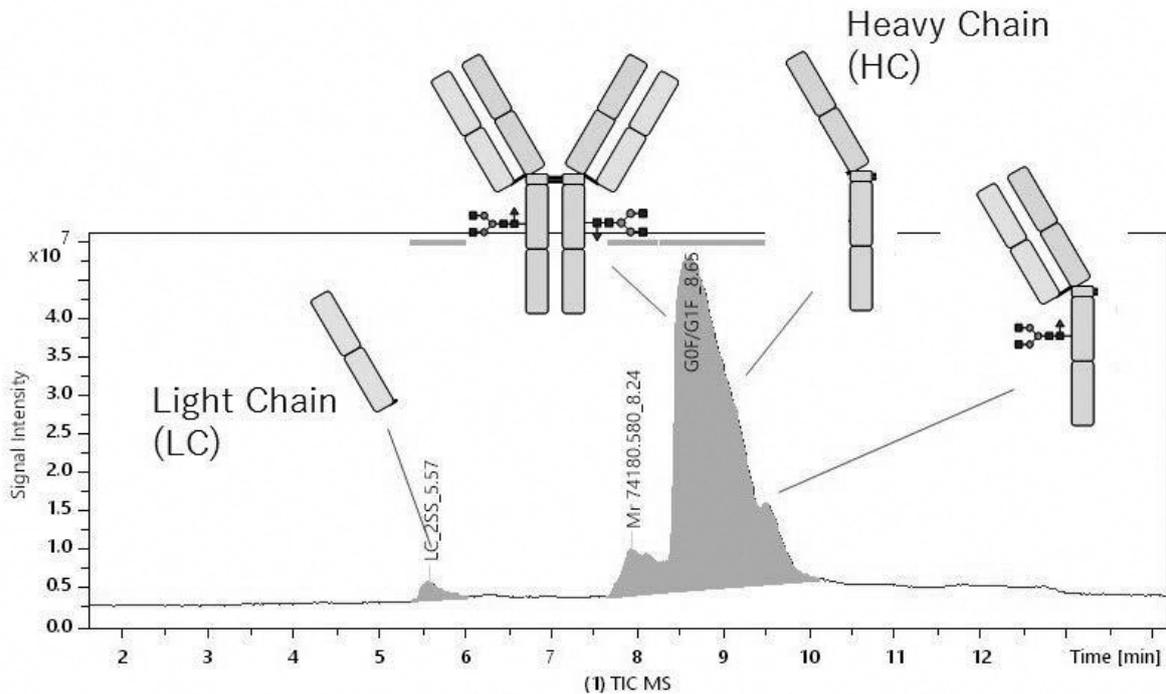


図1. インタクト解析のLC-MSクロマトグラム（ギ酸酸性下、80℃の変性条件でタンパク質をLC分離）

NISTmAb 2 μg/2 μLをBioResolve RP mAb Polyphenylにて分離したときのトータルイオンクロマトグラムを示した。インタクト抗体（2HC+2LC）の他に、解離したサブユニット（HC, LC, HC+LC）が検出された。

表1. インタクト解析結果

Protein	Form	Mr Ref	Mr Sample	Δ Mr [ppm]	Δ Mr [Da]	Int. [a.u.]	Rt Sample [min]
NISTmAb_LC1	2disulfide	23109.2729	23109.2229	-2.16	-0.05	1.00E+04	5.57
NISTmAb_HC	aglycon	49453.5116	49454.6942	23.91	1.1826	1.18E+04	9.26
NISTmAb_LC1_HC1	G0F	74020.3463	74019.6377	-9.57	-0.7086	3.96E+03	9.5
NISTmAb_LC1_HC1	G1F	74182.4869	74181.6019	-11.93	-0.885	5.85E+03	9.5
NISTmAb_LC1_HC1	G2F	74344.6275	74342.7288	-25.54	-1.8987	1.02E+03	9.5
NIST mAb	G0F/ aglycon	146591.8	146592.2227	2.88	0.4227	1.95E+02	8.65
NIST mAb	G1F/ aglycon	146754	146756.227	15.18	2.227	3.15E+02	8.65
NIST mAb	G0F/G0F - GlcNAc	147834	147837.3891	22.92	3.3891	1.19E+03	8.65
NIST mAb	G0F/G1F - GlcNAc	147996.1	148001.062	33.53	4.962	1.65E+03	8.65
NIST mAb	G0F/G0F	148037.2	148038.7573	10.52	1.5573	1.31E+04	8.65
NIST mAb	G0F/G0F + K	148165.3	148165.7181	2.82	0.4181	4.98E+03	8.65
NIST mAb	G0F/G1F	148199.3	148200.9196	10.93	1.6196	2.38E+04	8.65
NIST mAb	G0F/G1F + K	148327.5	148328.7658	8.53	1.2658	4.98E+03	8.65
NIST mAb	G1F/G1F	148361.4	148363.2871	12.72	1.8871	1.96E+04	8.65
NIST mAb	G1F/G1F + K	148489.6	148491.0321	9.64	1.4321	2.43E+03	8.65
NIST mAb	G1F/G2F	148523.6	148525.4238	12.28	1.8238	8.58E+03	8.65
NIST mAb	G1F/G2F + K	148651.8	148655.1649	22.64	3.3649	7.60E+02	8.65
NIST mAb	G2F/G2F	148685.7	148686.9945	8.71	1.2945	2.91E+03	8.65
NIST mAb	G2F/G2F + Hex	148847.7	148848.0657	2.46	0.3657	1.21E+03	8.65

(NISTmAb_Intact_4022d /NISTmAb_intact_tutorial_7.8)

BioPharmaCompass®を用いて、質量<40,000はモノアイソトピック質量にて、質量>40,000は平均質量にて評価した。

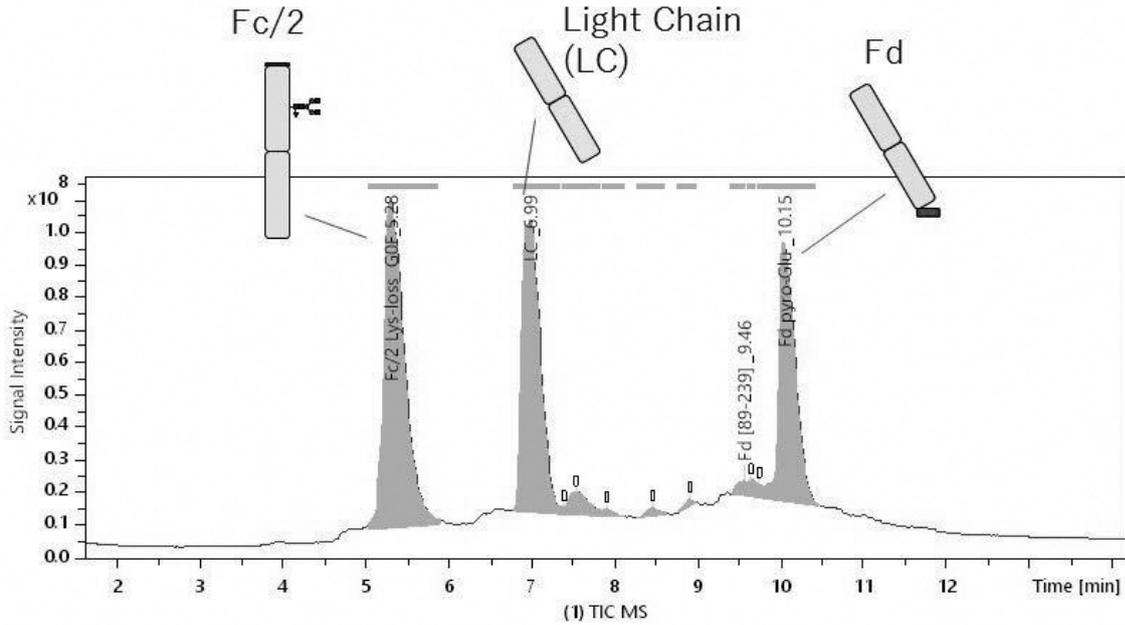


図2. サブユニット解析のLC-MSクロマトグラム

(限定分解した25kDのサブユニット3種をギ酸酸性下80℃の変性条件でLC分離)

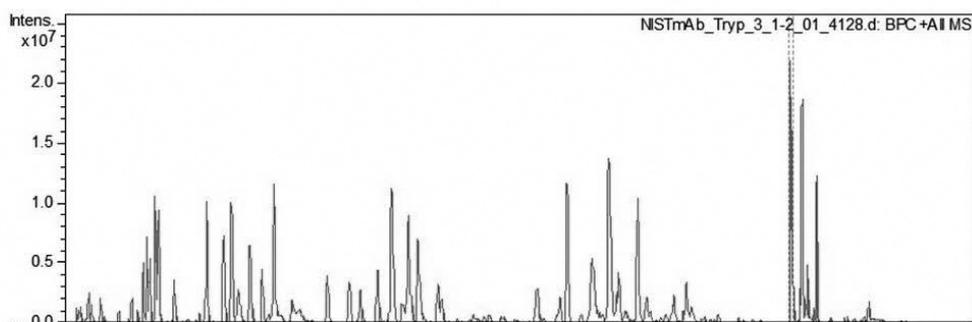
NISTmAb 20 μgをIdeSにより限定分解，変性還元処理，脱塩処理後，4 μg相当をBioResolve RP mAb Polyphenylにて分離したときのトータルイオンクロマトグラムを示した。

表2. サブユニット解析結果

Protein	Annotation	Mr Ref	Mr Sample	Δ Mr [ppm]	Δ Mr [Da]	Int. [a.u.]	Rel. Int. Sample [%]	Rt Sample [min]
LC	LC TFA	23227.3	23227.2524	-2.05	-0.0476	2.19E+03	0.1	6.57
LC	LC 20x Dea	23146.2781	23146.261	-0.73	-0.017	8.14E+03	0.4	6.57
LC	LC SS	23111.2886	23111.2707	-0.77	-0.0178	8.73E+04	3.9	6.57
LC	LC Hex	23275.357	23275.3358	-0.91	-0.0212	9.84E+04	4.4	6.99
LC	LC	23113.3042	23113.2987	-0.24	-0.0055	2.06E+06	91.3	6.99
Fd [89-239]	Fd [89-239] Hex	16026.7906	16026.762	-1.78	-0.0286	1.52E+03	1.9	9.46
Fd [89-239]	Fd [89-239]	15864.7377	15864.7283	-0.59	-0.0094	7.83E+04	98.1	9.46
Fd	Fd pyro-Glu Hex	25834.8594	25834.84	-0.75	-0.0194	5.25E+04	4.2	10.15
Fd	Fd pyro-Glu	25672.8066	25672.8177	0.43	0.0111	1.19E+06	95.8	10.15
Fc/2	Fc/2 Lys-loss	23775.9295	23775.9559	1.11	0.0264	3.13E+03	0.4	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G1F+G (G2+A)	25689.6066	25689.6195	0.5	0.0129	7.63E+03	0.9	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G1F+N	25585.5956	25585.5715	-0.94	-0.0241	7.16E+03	0.9	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G0F-N	25017.384	25017.401	0.68	0.017	1.71E+04	2.1	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G1F-N+G	25486.5272	25486.5311	0.15	0.0039	1.79E+04	2.2	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G0F	25220.4634	25220.4792	0.63	0.0158	2.77E+05	33.4	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G2F2+H	25706.6219	25706.6353	0.52	0.0134	1.94E+04	2.3	5.28
Fc/2	Fc/2 G0	25202.5005	25202.4687	-1.26	-0.0317	2.25E+04	2.7	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G2F+2H	25868.6747	25868.6819	0.28	0.0072	7.97E+03	1	5.28
Fc/2	Fc/2 -Lys G2F+H	25706.6219	25706.6353	0.52	0.0134	1.94E+04	2.3	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G2F	25544.569	25544.5791	0.39	0.0101	7.73E+04	9.3	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G2F+G	25851.6594	25851.6649	0.21	0.0055	6.27E+03	0.8	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G1F-N+A	25470.5323	25470.5039	-1.11	-0.0284	4.61E+03	0.6	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G1F	25382.5162	25382.5286	0.49	0.0124	2.77E+05	33.4	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G2F+H+G	26013.7122	26013.7208	0.33	0.0086	5.33E+03	0.6	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G1F-N	25179.4369	25179.4446	0.31	0.0077	2.08E+04	2.5	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G2F+N	25747.6484	25747.6362	-0.47	-0.0122	3.65E+03	0.4	5.28
Fc/2	Fc/2 G1	25364.5533	25364.5145	-1.53	-0.0388	2.55E+04	3.1	5.28
Fc/2	Fc/2 Lys-loss G1+A	25527.5537	25527.5657	0.47	0.012	9.84E+03	1.2	5.28

(NISTmAb_IdeS_4085d / NISTmAb IdeS Digested_Tutrial_10.0, 11.0, 8.13)

BioPharmaCompass®を用いて，保持時間4.0–12.0minを一度にデータ処理した。



Row	Proteins & Peptides	Unidentified	MW [kDa]	pI	#Peptides	SC [%]	FragCov [%]	Score	RMS90 [ppm]
1	<input checked="" type="checkbox"/>	NIST mAb PM_Ogiso20200212a.HC	49.6	8.5	85	99.6	92.7	6542.0	0.71
2	<input checked="" type="checkbox"/>	NIST mAb PM_Ogiso20200212a.LC	23.1	7.8	62	98.6	92.0	3884.3	0.69

NISTmAb_Tutorial_7.0

図3. ペプチドマッピングのLC-MSクロマトグラム

(抗体を変性条件下、トリプシンによりペプチドに分解したものをギ酸酸性下LC分離)

NISTmAb 50 μ gを還元変性後、脱塩処理し、トリプシン消化後、4 μ g相当をAQUITY UPLC BEH C18にて分離したときのベースピーククロマトグラムを示した。この時のシーケンスカバー率 (SC) は>98%、フラグメントカバー率 (FragCov) は>92%であった。

表3. ペプチドマッピングから算出したアミノ酸修飾率

サブユニット	アミノ酸残基	アミノ酸修飾	%	ピーク強度比
HC	Q1	ピログルタミン酸化	99.9	修飾体(1価)/[未修飾体(1価)+修飾体(1価)]
	K450	脱離	85.1	修飾体(1価)/[未修飾体(1価+2価)+修飾体(1価)]
	M34	酸化	2.4	修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]
	M87	酸化	1.2	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	M101	酸化	1.2	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	M255	酸化	2.9	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	M361	酸化	3.5	修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]
	M431	酸化	1.3	修飾体(5価)/[未修飾体(5価)+修飾体(5価)]
	N78	脱アミド化	0.4	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	N86	脱アミド化	1.0	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	N289	脱アミド化	1.3	修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]
	N318	脱アミド化	16.0	修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]
	N364	脱アミド化	1.9	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	N383 (N392, N393)	脱アミド化	11.0	修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]
	S257?	モノグリコシル化	0.1	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	K291?	モノグリコシル化	?	(未修飾の同一ペプチド検出されず)
	K329?	モノグリコシル化	?	(未修飾の同一ペプチド検出されず)
	S340?	モノグリコシル化	?	(未修飾の同一ペプチド検出されず)
K341?	モノグリコシル化	?	(未修飾の同一ペプチド検出されず)	

サブユニット	アミノ酸残基	アミノ酸修飾	%	ピーク強度比の算出
LC	M4	酸化	1.2	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	M32	酸化	3.2	修飾体(4価)/[未修飾体(4価)+修飾体(4価)]
	N136	脱アミド化	7.8	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	N137	脱アミド化	2.0	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	N151	脱アミド	1.7	修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]
	S51?	モノグリコシル化	57.2	修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]
	K148?	モノグリコシル化	?	(未修飾の同一ペプチド検出されず)

- 1) Mの酸化, Nの脱アミド化, S, Kのモノグリコシル化の可能性を考慮したときにアサインされたアミノ酸残基を示した。
- 2) 同一ペプチド同一価数の修飾体と非修飾体とのピーク強度比から修飾率を算出した。
- 3) フラグメントイオンから修飾アミノ酸残基が特定できた場合、太字で示した。
- 4) C末K脱離に関しては、同一価数を考慮せず、ピーク強度比を算出した。
- 5) グリコシル化については推定評価であるため、「?」を付した。

うになった (表4, 図4).

5. オリゴマー解析

抗体医薬に含まれる凝集体は、抗原性の原因になる可能性が指摘されており、評価が必要である。質量分析で行える凝集体評価は、粒子径1~100 nm程度を分析対象とするサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によるオリゴマー (2量体, 3量体等) の評価に留まる。これまでに我々は、SECとインタクト質

量分析 (MS) とを組み合わせる行うオリゴマーの測定法についてプロトコル化している。

今回の測定では、酸性条件下で60℃加熱処理したNISTmAbの強制劣化物についてSEC-MSを用いて測定することにより、ダイマーの形成し始めからオリゴマー形成に至る過程を分子量変化で捉えることを試みた (図5a)。その結果、ギ酸酸性下の加熱処理によりダイマー形成が起こり、ギ酸濃度を高めた酸性度の強い条件においてダイマー形成が促進された。また、オ

表4. 糖ペプチド解析結果

No.	RT [min]	m/z meas.	$\Delta m/z$ [mDa]	M meas.	mSigma	Ions	Name	Molecular Formula	Annotations	Area	%
1	18.95	878.6872	0.336	2633.04	35.9	[M+H+H2]3+	G0F	C106H164N18O59	Analyte List 201121	1786526	35.69405
2	18.88	932.7048	0.363	2795.093	32.4	[M+H+H2]3+	G1F	C112H174N18O64	Analyte List 201121	1685680	33.67919
3	18.84	986.7223	0.221	2957.145	33.9	[M+H+H2]3+	G2F (G1F+H)	C118H184N18O69	Analyte List 201121	457410	9.138864
4	18.92	1215.987	0.556	2429.96	16.5	[M+H+H]2+	G0F-N	C98H151N17O54	Analyte List 201121	158880	3.174357
5	18.95	865.0118	0.47	2592.013	35.1	[M+H+H2]3+	G1F-N	C104H161N17O59	Analyte List 201121	135236	2.70196
6	18.84	1040.739	-0.353	3119.196	44.9	[M+H+H2]3+	G2F+H	C124H194N18O74	Analyte List 201121	99538	1.988728
7	19.19	967.3754	0.685	2899.104	13.7	[M+H+H2]3+	G1F-N+G	C115H178N18O68	Analyte List 201121	90898	1.816105
8	19.82	595.26	0.319	1188.505	37	[M+H+H]2+	aglycosylated	C50H72N14O20	Analyte List 201121	78820	1.574791
9	18.88	919.0283	-0.574	2754.063	62.9	[M+H+H2]3+	G1F-N+H	C110H171N17O64	Analyte List 201121	60716	1.213081
10	18.8	1094.757	-0.459	3281.249	26.5	[M+H+H2]3+	G2F+2H	C130H204N18O79	Analyte List 201121	54184	1.082574
11	18.95	1203.472	0.965	2404.93	64.5	[M+H+H]2+	M5	C96H148N16O55	Analyte List 201121	53728	1.073463
12	19.06	1142.959	0.922	2283.903	140.7	[M+H+H]2+	G0-N	C92H141N17O50	Analyte List 201121	51176	1.022475
13	18.95	1000.398	0.113	2998.171	49.2	[M+H+H2]3+	G1F+N	C120H187N19O69	Analyte List 201121	36058	0.720424
14	19.16	1035.068	0.15	3102.182	40.8	[M+H+H2]3+	G2+A	C123H191N19O73	Analyte List 201121	29882	0.59703
15	18.92	1054.416	0.442	3160.225	50.1	[M+H+H2]3+	G2F+N	C126H197N19O74	Analyte List 201121	26722	0.533895
16	19.1	1089.086	0.137	3264.235	105.4	[M+H+H2]3+	G2F+G	C129H201N19O78	Analyte List 201121	24544	0.490379
17	18.95	946.3777	-2.263	2836.111	63.5	[M+H+H2]3+	G0F+N	C114H177N19O64	Analyte List 201121	23784	0.475195
18	18.99	1114.447	-0.266	2226.879	71.7	[M+H+H]2+	M3F	C90H138N16O49	Analyte List 201121	21256	0.424686
19	18.84	973.0416	-4.942	2916.103	109.7	[M+H+H2]3+	M5G1F hybrid	C116H181N17O69	Analyte List 201121	18582	0.371261
20	18.95	924.3595	-1.075	2770.057	90.5	[M+H+H2]3+	M5G1 hybrid	C110H171N17O65	Analyte List 201121	16420	0.328065
21	18.88	1108.433	0.331	3222.277	33.6	[M+H+H2]3+	G2F+N+H	C132H207N19O79	Analyte List 201121	12224	0.24423
22	19.1	830.0006	-0.244	2486.98	148.1	[M+H+H2]3+	G0	C100H154N18O55	Analyte List 201121	11256	0.22489
23	18.92	1134.961	0.278	2267.907	95	[M+H+H]2+	H2N3F1	C92H141N17O49	Analyte List 201121	11252	0.22481
24	19.13	1021.393	0.833	3061.158	66.5	[M+H+H2]3+	M5G0F hybrid+G	C121H188N18O73	Analyte List 201121	9070	0.181215
25	18.99	748.6329	0.708	2242.877	101	[M+H+H2]3+	M4	C90H138N16O50	Analyte List 201121	8322	0.16627
26	19.06	816.3265	1.121	2445.958	162.8	[M+H+H2]3+	G1-N	C98H151N17O55	Analyte List 201121	7166	0.143174
27	19.03	870.3439	0.968	2608.01	181.3	[M+H+H2]3+	G1-N+H	C104H161N17O60	Analyte List 201121	6170	0.123274
28	19.28	1026.725		1025.717		[M+H]+	H6N3G1 (3+)		Manual	5002	0.099938
29	19.06	884.0192		883.0119		[M+H]+	G1 (3+)		Manual	4745	0.094863
30	18.95	978.3784		977.3711		[M+H]+	M5G1 hybrid+H (3+)		Manual	4258	0.085073
31	18.95	981.3894		980.3821		[M+H]+	G1F2 (3+)		Manual	3638	0.072656
32	19.1	1075.409		1074.401		[M+H]+	M5G1F hybrid+G (3+)		Manual	3112	0.062176
33	19.1	694.6163		2080.827		[M+H+H2]3+	M3 (3+)		Manual	2204	0.044035
34	18.99	856.6663		1711.318		[M+H+H]2+	M6 (3+)		Manual	2016	0.040279
35	19.27	1539.586	4.042	3077.158	124.4	[M+H+H]2+	H6N3G1	C121H188N18O74	Analyte List 201121	1752	0.035004
36	19.4	1027.062		1026.054		[M+H]+	M5G1F hybrid+H (3+)		Manual	1704	0.034045
37	19.13	1102.763		3305.267		[M+H+H2]3+	G1F+N+G		Manual	1174	0.023456

N, GlcNAc; H, Hex; G, NGNA; A, NANA

NISTmAb_Trp_celbound_1-2_01_4149d

MetaboScape®を用いて、各種糖ペプチドの精密質量からペプチドをアサインした。

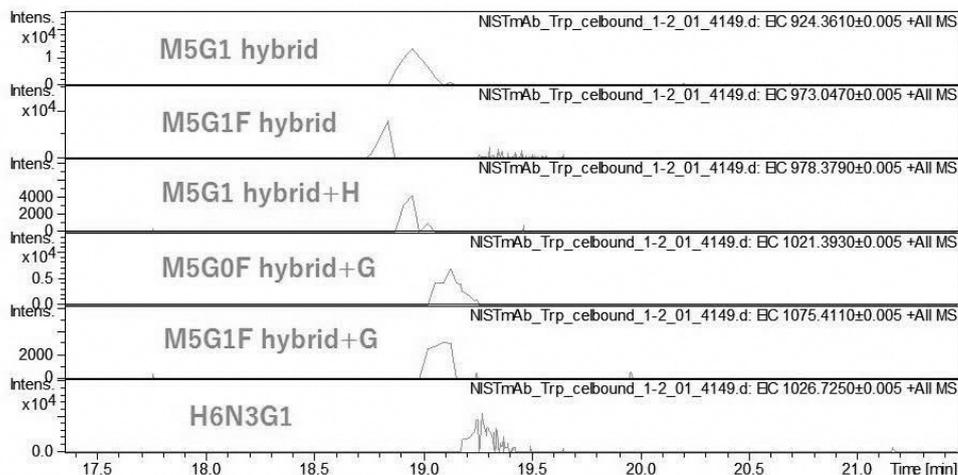


図4. 微量糖ペプチドのマスクロマトグラム例

NISTmAb 50 μ gを処理して得たペプチドマッピング用試料について、微結晶セルロースを充填したスピンカラムを用いて糖ペプチドを濃縮後、20 μ g相当をAQUITY UPLC BEH C18にて分離したときのマスクロマトグラム。検出限界付近のマイナー糖ペプチドを例示した。

リグマー形成の初期段階では、疎水性相互作用等による可逆的ダイマーが形成され、酸性度のより強い条件下では分子間ジスルフィド結合による不可逆的ダイ

マーに至ることが質量測定から推察された (図 5 b, c).

6. 宿主細胞由来タンパク質の解析

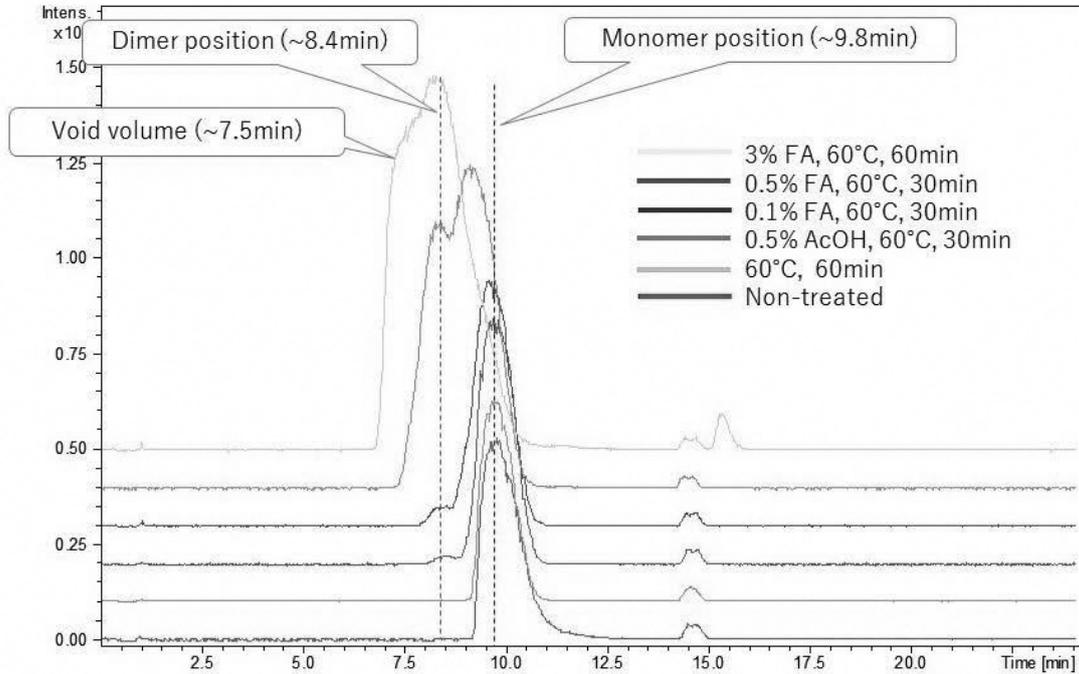


図 5 a. 抗体分子のサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) -MSクロマトグラム
(抗体をネイティブ条件下でSEC分離後、ギ酸酸性とレイオン化)

NISTmAb 20 μ g を加熱処理した後、10 μ g 相当をAQUITY UPLC Protein BEH SECにて分離した時のクロマトグラム (m/z 3000-6000) を示した。FA:ギ酸, AcOH:酢酸。

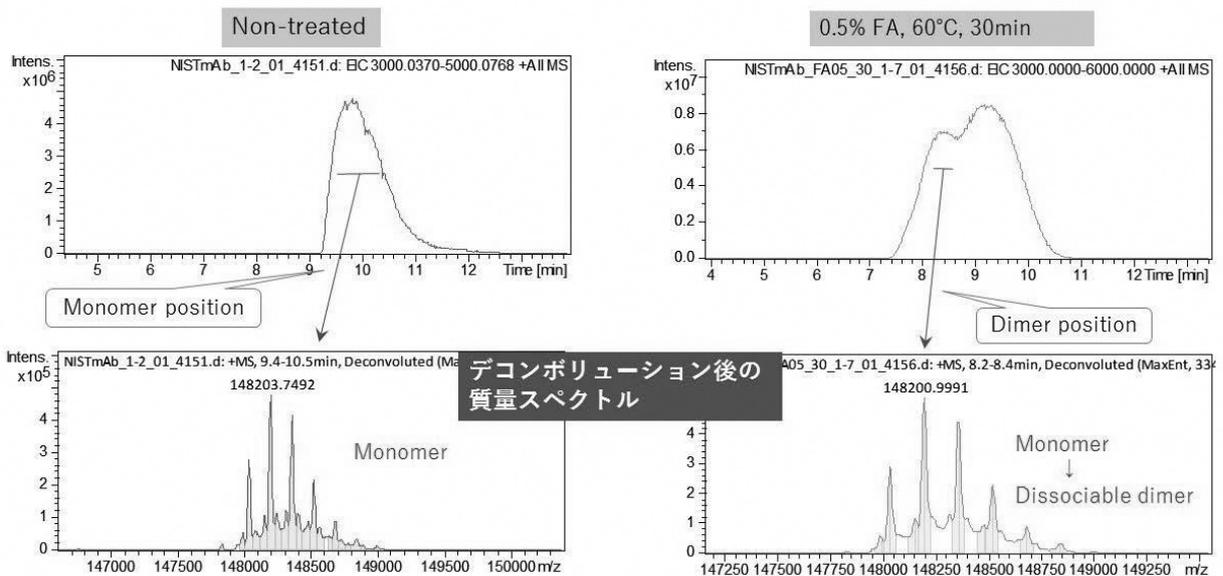


図 5 b. 0.5%ギ酸添加, 60°C, 30分処理によって生ずるダイマーの質量スペクトル

0.5%ギ酸, 60°C, 30分処理後に形成されるダイマーは、酸性条件下でのイオン化時にはモノマーに解離し得ることから、解離性ダイマーが生成したものと判断した。

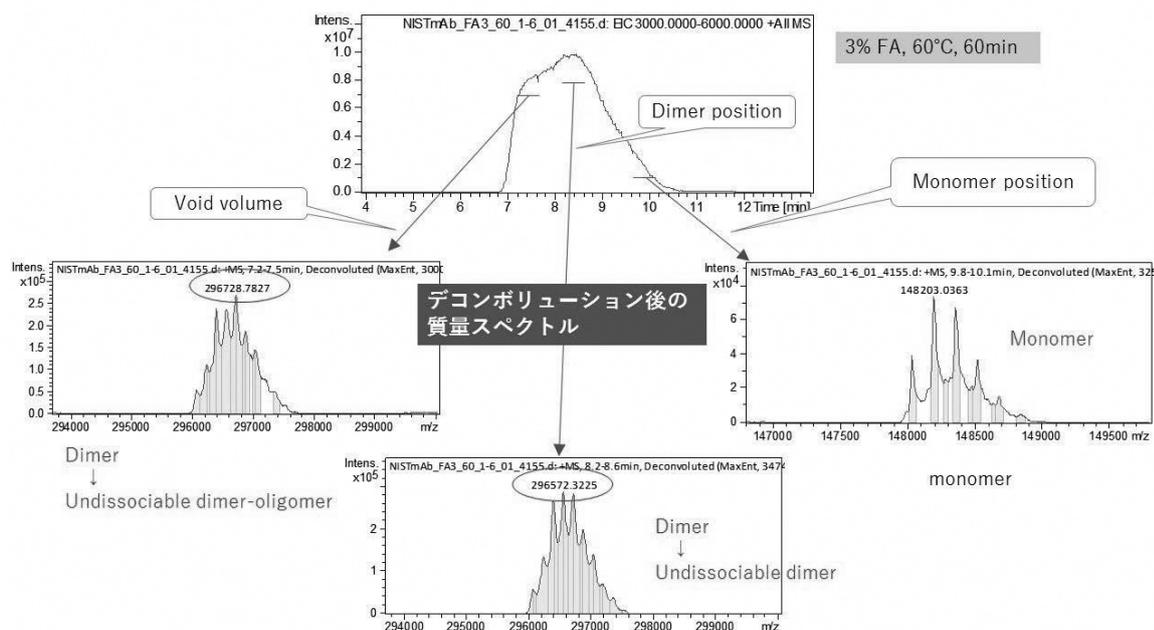


図 5c. 3%ギ酸添加, 60 °C, 60分処理によって生ずるオリゴマーの質量スペクトル

3%ギ酸, 60 °C, 60分処理後に形成されるダイマーやオリゴマーは, 酸性条件でのイオン化時にダイマーの質量として測定されることから, 非解離性ダイマーが生成したものと判断した。

動物培養細胞に特定のタンパク質を産生させ, 高度に精製したタンパク質製剤であっても, 微量の宿主細胞由来タンパク質 (Host Cell Proteins, HCP) の混入は避けられない。HCP不純物はELISAにより品質管理が行われているが, 課題も多く, より正確なHCP評価には質量分析手法が適していると考えられている。NISTmAbについて質量分析計を用いてHCPを測定した報告のうち, 2017年にHuangら (参考文献2) は, 1 ppm以上のレベルで検出されるHCPは50種類程度に及ぶことを報告している。このうち10 ppmレベル以上のHCPは8種類程度検出されている。質量分析によるHCP解析の多くは, 感度の高いオービトラップ型質量分析計やナノLCを組み合わせたプロテオミクス用システムにより行われているが, 我々のシステムはコンベンショナルLCにQ-TOFを組み合わせた装置であり, プロテオーム解析レベルの高感度性能を備えていない。そこで, 本システムを用いたHCP測定の限界を把握することも含め, 比較的少ない100 μ gのNISTmAbを測定試料とした方法のプロトコル化を検討した。その結果, Huangらの方法を参考にした時, 簡便で再現性良くHCP解析ができたことからプロトコルとして採用することとした。

更に今回の測定では, トリプシンとNISTmAbの量比を400:1に下げ, ノイズデータをカットオフすべく, かつシグナルthresholdを上げる等の改変を加えることにより, より効率的なHCP由来ペプチドの質量

データを取得することができた (図6)。これにより, Huangらが報告した20 ppm以上含まれるHCP定量値について, Huangらの報告値 (参考文献2) により近い値を導き出すことができた (表5 a, b)。

結 語

薬事総合研究開発センターのLC-TOF/MSシステムを用いて, 抗体医薬の特性解析を目的とした一連のプロトコルをブラッシュアップすることができた。本研究を通して, タンパク質分析におけるLC-TOF/MS装置の性能とその限界について理解を深めることができた。本研究の成果は, 抗体医薬のみならず全てのタンパク質製剤の特性解析や品質評価にも適用できるものである。日進月歩で進むこの分野において, 我々は創薬支援の立場から, 新規プロトコルの追加や既存プロトコルのブラッシュアップ作業を続けていく必要があると考えている。

参考文献

- 1) Mol. Cell. Proteomics (2020) 19, 11-30
- 2) Anal. Chem. (2017) 89, 5436-5444.

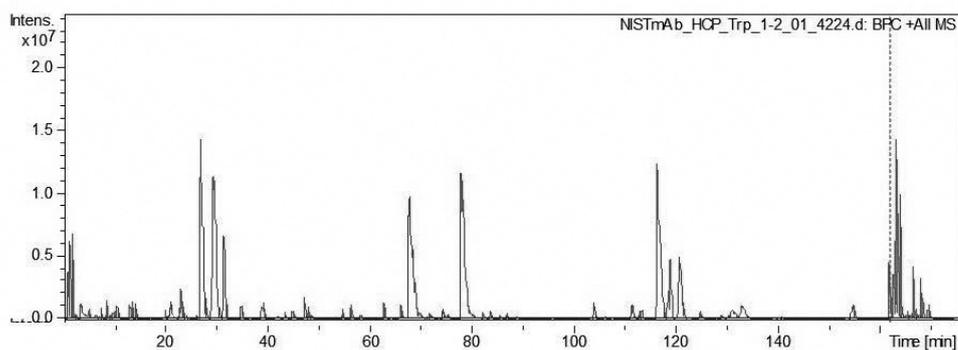


図 6. 宿主細胞由来タンパク質 (HPC) のためのペプチドマッピング

Huangらの方法を改変して、前処理、測定、解析を行った。NISTmAb 100 μ gを非変性下、トリプシン処理した全量を AQUITY UPLC BEH C18にて分離した時のベースピーククロマトグラム。この時、クロマト上で確認されるメジャーピークはNISTmAb由来ペプチドであり、HCP由来ペプチドは微小ピークとして検出された。

MS data file D:\Data\Ogiso\Bukai\210115\NISTmAb_HCP_Trp_1-2_01_4241.d\NISTmAb_HCP_Trp_1-2_01_4241.mgf

Database NCBIprot 20180907

Taxonomy Mus musculus (house mouse) (177,456 sequences)

Family Member	Database	Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of significant matches	Num. of significant sequences	emPAI	Description	
1	1	NCBIprot	AIU56799.1	11126	25944	328	328	8	1.57	anti-lox-1 15C4 light chain [Mus musculus]
2	1	NCBIprot	AIU56798.1	10162	51300	347	347	7	0.62	anti-lox-1 15C4 heavy chain [Mus musculus]
3	1	NCBIprot	NP_031464.1	8146	39331	319	319	23	5.11	● fructose-bisphosphate aldolase A isoform 2 [Mus musculus]
3	2	NCBIprot	NP_033787.2	5106	39370	228	228	19	3.44	● fructose-bisphosphate aldolase C [Mus musculus]
3	3	NCBIprot	EDL15562.1	1394	11284	58	58	5	2.66	aldolase 3, C isoform, isoform CRA_c [Mus musculus]
4	1	NCBIprot	AOR52367.1	2854	11248	64	64	2	0.69	immunoglobulin light chain variable region, partial [Homo sapiens]
5	1	NCBIprot	Q922R8.3	2574	48070	81	81	5	0.38	● protein disulfide-isomerase A6
6	1	NCBIprot	ABC86083.1	761	15988	40	40	1	0.21	immunoglobulin kappa light chain, partial [Mus musculus]
7	1	NCBIprot	AAF04609.1	476	10884	12	12	1	0.31	immunoglobulin kappa chain, partial [Mus musculus]
8	1	NCBIprot	1BI1_B	344	13814	13	13	2	0.54	Chain B, The Crystal Structure Of H-2dd Mhc Class II In Complex With The Hiv-1 Derived Peptide P18-110
9	1	NCBIprot	BAA03821.1	281	49129	17	17	3	0.21	cytokeratin 15 [Mus musculus]
9	2	NCBIprot	AAA39391.1	249	57807	14	14	3	0.18	epidermal keratin subunit I, partial [Mus musculus]
10	1	NCBIprot	AAB05161.1	158	11369	12	12	1	0.3	Ig 4A1.A4 light chain, partial [Mus musculus]
11	1	NCBIprot	AAA39825.1	151	62728	12	12	5	0.28	● neuroleukin [Mus musculus domesticus]

表 5 a. MASCOT®によるタンパク質同定

MASCOT解析でヒットした上位11種類のタンパク質を示した。Huangらの報告した上位4種類に相当するHCP (●) を検出できた。他は抗体由来ペプチド、または、混入ケラチン等であった。

	Peak Area				ppm
	pep1	pep2	pep3	mean	
β -casein	5162269	4824839	2333042	4106717	500
neuroleukin	194855	177339	137987	170060	20.7
protein disulfide-isomerase A6	1145629	821096	698311	888345	108.2
fructose-bisphosphate aldolase A	1976489	1631712	1380518	1662906	202.5
fructose-bisphosphate aldolase C	655691	576363	489457	573837	69.9

表 5 b. NISTmAbに含まれるマウス細胞由来タンパク質の評価

各タンパク質に対してヒットしたペプチドのうち検出量の多い上位3つのピーク面積の平均値をそのタンパク質の量に相当すると仮定して、内部標準 β カゼインを基準に含有量を評価した。