

緒言：質量分析による抗体分子の特性解析とは

抗体医薬を開発する上で、抗体分子の不均一性評価は欠くことのできない研究試験項目である。抗体を含むタンパク質製剤は、動物培養細胞から作られるなど、種々の理由から、多様な翻訳後修飾を受けることにより不均一性が生じる。現状ではタンパク質製剤を均一な成分を持つ医薬品として開発するのは不可能であるため、実際にはある一定範囲の成分多様性を持った製剤について、安全性と有効性が確認された後、医薬品として利用されている。したがって、タンパク質製剤の場合、どの程度不均一であるかを可能な限り評価し(図1)、生物活性や副作用との関係性を解析することが求められる。

このうち質量分析計を使って行える分析項目は、アミノ酸配列及びアミノ酸残基の修飾の解析、糖鎖付加がある場合には糖鎖構造の解析、その他に、タンパク質凝集体及び抗体分子以外の不純物の解析等である(図2)。例えば、糖鎖の不均一性評価を行う場合、糖タンパク質を丸ごと測定することにより、糖鎖構造の違いによる糖タンパク質全体の不均一性評価を行うことができる。しかし、個々の糖鎖の詳細な構造確認や、どのアミノ酸残基に修飾されているか、等の情報は得られない。他方で、グリコシダーゼ処理等により糖鎖を遊離させた後、糖鎖をラベル化して測定する遊離糖鎖解析では、糖鎖構造をより詳細に調べることができる一方で、タンパク質のどのアミノ酸残基に付加していたか、どの程度の割合で付加していたかの情報は得られない。このように1つの解析手法にとどまらず、あらゆる角度からの解析を行い総合的に評価することが必要になってくる(図3)。どの解析手法も万能ではないため、ある手法の欠点を他の手法が補うことにより多方面から解析することが求められる。

現在、抗体分子の特性解析において、質量分析計を利用した基本的な解析手法は次の通り。

1. インタクト解析
2. サブユニット解析
3. ペプチドマッピング
4. 遊離糖鎖解析

これらに加えて、上記の基本的分析手法を発展させた解析手法は次のとおり。

5. ペプチドマッピングによるジスルフィド結合解析
6. ペプチドマッピングによる糖ペプチド解析
7. ペプチドマッピングによる残存ホストセルタンパク質解析
8. インタクト解析とサイズ排除クロマトグラフィーを組み合わせた凝集体解析

我々のラボでは、これら解析手法について日々、効率化や再現性向上の検討を行っており、逐次プロトコルを作成している。なお、ここで公開するプロトコルは、主に、ラボメンバーによって検討されたものだが、不十分な点もきっと多いに違いない。したがって公的なマニュアルではないことに留意していただきたい。

抗体の特性解析は一から取り組むにはハードルが高く、このマニュアルを参考にしていれば、きっとハードルを下げるができるに違いない。本マニュアルの不備な点をご指摘いただくことも含め、この分野の技術者間での情報交流を深めることができれば幸いである。

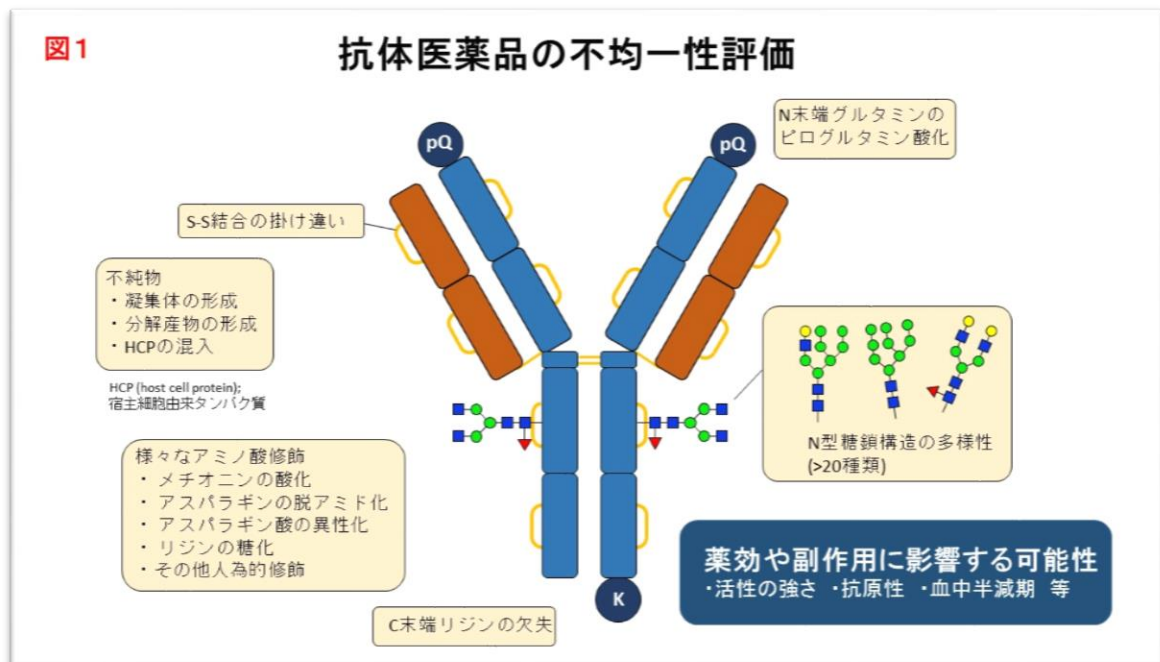


図2 **バイオ医薬品の特性解析項目**

ICHガイドライン Q6B
「生物製品の規格及び試験方法の設定」より第6項

6.1.1 構造解析・構造確認

- a) **アミノ酸配列**
- b) **アミノ酸組成**
- c) **末端アミノ酸配列 (N末・C末)**
- d) **ペプチドマップ**
- e) **スルフィド基及びジスフィド結合**
- f) **糖組成・糖鎖構造**

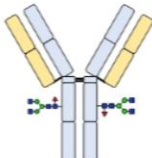
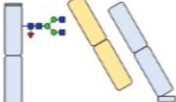

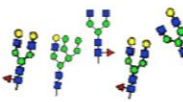
6.1.2 物理化学的性質

- a) **分子量・分子サイズ**
- b) **アイソフォームパターン (キャピラリー電気泳動)**
- c) **比吸光度 (又はモル吸光係数)**
- d) **電気泳動パターン**
- e) **液体クロマトグラフィーパターン**
- f) **分光学的性質 (円偏光二色性, NMR)**

赤字：質量分析により解析可能な項目

ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
(医薬品規制調和国際会議)

図3 **質量分析による抗体の分析手法**

分析手法	＜得られる情報＞
 インタクト解析	<ul style="list-style-type: none"> ・抗体分子全体の分子量 (平均質量) ・主に存在する糖鎖の構成比
 サブユニット解析	<ul style="list-style-type: none"> ・サブユニットの分子量 (モノアイソトピック質量) ・糖鎖の構成比 ・一部のアミノ酸修飾の有無
 ペプチドマッピング	<ul style="list-style-type: none"> ・ペプチドの分子量 ・アミノ酸配列の同定 ・アミノ酸修飾や糖鎖修飾の位置と比率 ・ジスフィド結合の位置
 遊離糖鎖解析	<ul style="list-style-type: none"> ・糖鎖の分子量と種類 ・糖鎖の構成比

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません