

SEC-MS による抗体のオリゴマー解析編

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、これについて評価しなければならない。質量分析では、粒子径 1~100 nm 程度を分離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) の凝集体評価が可能である。粒子径 100 nm~10 μ m までの凝集体については、粒子トラッキング法など別の測定手段が用いられる。ここでは、SEC とインタクト質量分析を組み合わせるオリゴマー (主に 2 量体) の測定方法について解説する。

【材料】

カラム: Waters AQUITY UPLC Protein BEH SEC, 200 \AA , 1.7 μ m, 2.1x150mm, Cat#186008471
その他、抗体標品、キャリブレーション液等は「抗体のサブユニット解析」と同じ。

【装置】

質量分析計、LC システムは「抗体のサブユニット解析」と同じ。

【調製液】

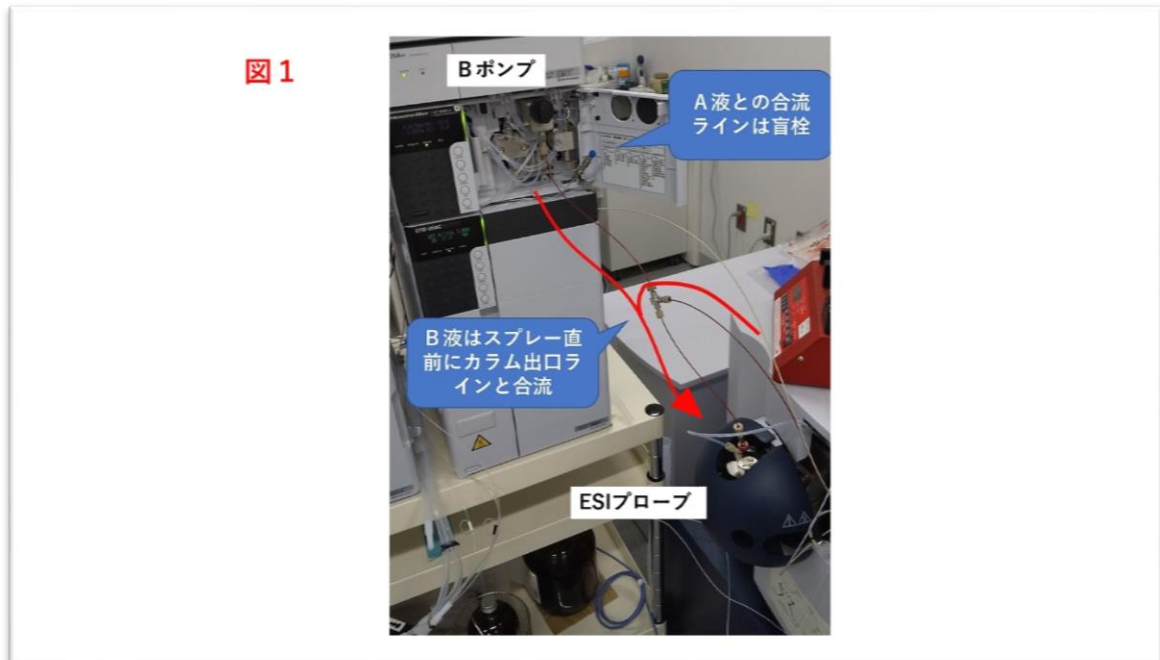
抗体試料液: 100mM ギ酸アンモニウム 5 μ L と NISTmAb (10 mg/mL) 5 μ L を混合。

移動相 A 液: 100mM ギ酸アンモニウム水

移動相 B 液: 水・アセトニトリル・ギ酸 (100:100:2)

移動相 A 液は、カラム内をイソクラティックに通液する移動相として用いる。

移動相 B 液は、カラム後のラインに合流するように配管する (図 1)。



<Tips>

SEC カラムでの分離は 100 mM ギ酸アンモニウムで行ったのち、ポストカラムで液性をギ酸酸性にする。もし 100 mM ギ酸アンモニウムのまま質量分析計に導入すると、抗体分子は m/z 5500 前後の 27 価程度のイオンとして検出される。本質量分析装置は実質 m/z 6000 までの範囲で測定するため、十分なスペクトル情報が得られない。カラム分離後に液性をギ酸酸性とすることにより、分子表面のイオン化が起こりやすくなり、 m/z 4000 前後の 37 価程度のイオンとなる。これにより解析に必要なスペクトルデータを取得できる。

【LC-MS 条件】

移動相： 100 mM ギ酸アンモニウム

流量： 0.03 mL/min

カラム温度： 20°C

分析時間： 30 min

注入量： 5~10 $\mu\text{g}/1\sim2\ \mu\text{L}$

<Tips>

注入量 4 μL では分離が悪化した。

水・アセトニトリル・ギ酸 (100:100:2) を 0.03 mL/min の流量でポストカラムラインに合流させて質量分析装置に導入する。

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

➤0.1～1.0 min のタイミングでキャリブレーション液に切り替える。

Bruker TOF/MS (maXisII)の主要パラメータは次のとおり(インタクト抗体測定用)。

Polarity: positive
Mode : MS
Capillary: 4500 V
Nebrizer: 1.6
Dry Gas: 6.0
Dry temp: 220
Mass Range: 500 to 6000 m/z
Spectra Rate: 1 Hz

【データ解析】

データ解析方法は、ソフトウェアによって異なるため詳述しない。現在、我々が使用しているマニュアル用解析ソフト(Bruker 製 DataAnalysis®)による解析処理の流れは次のとおり。

1. 測定ごとのキャリブレーションデータを使って、測定データごとに再キャリブレーション。
2. トータルイオンクロマトで全体の溶出ピークを確認。
3. m/z 3000–5000 のマスクロマトグラムを表示させ、抗体分子の溶出ピークを確認。
4. モノマー、ダイマーそれぞれについてピーク範囲を指定して Spectral deconvolution。
5. 検出された成分スペクトルの平均質量の計算。
6. 平均質量の値から、成分を同定。

<Tips>

インタクト解析の場合、モノアイソトピック質量は求められない。平均質量での評価となるため、最大 7 Da 程度の誤差が含まれる。

【結果】

モノマーピークのデータ処理過程を図 2 に、ダイマーピークのデータ処理過程を図 3 に示した。m/z 3000–5000 のマスクロマトグラムのピーク面積比から求めたダイマーの割合を図 4 に示した。

図 2 A

SEC-MSによる抗体のクロマトグラム

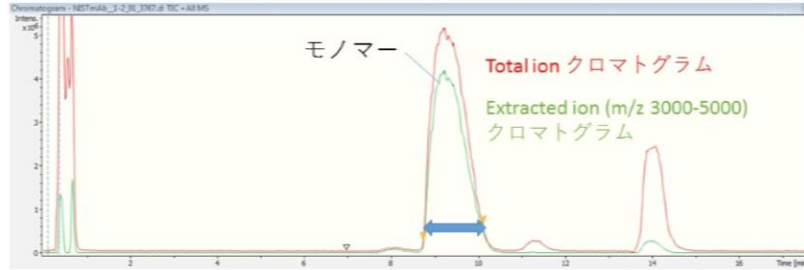
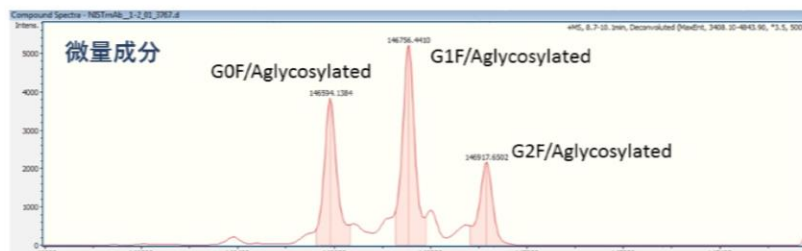
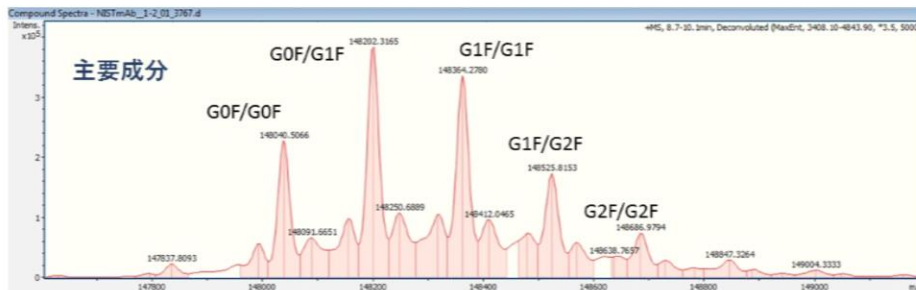
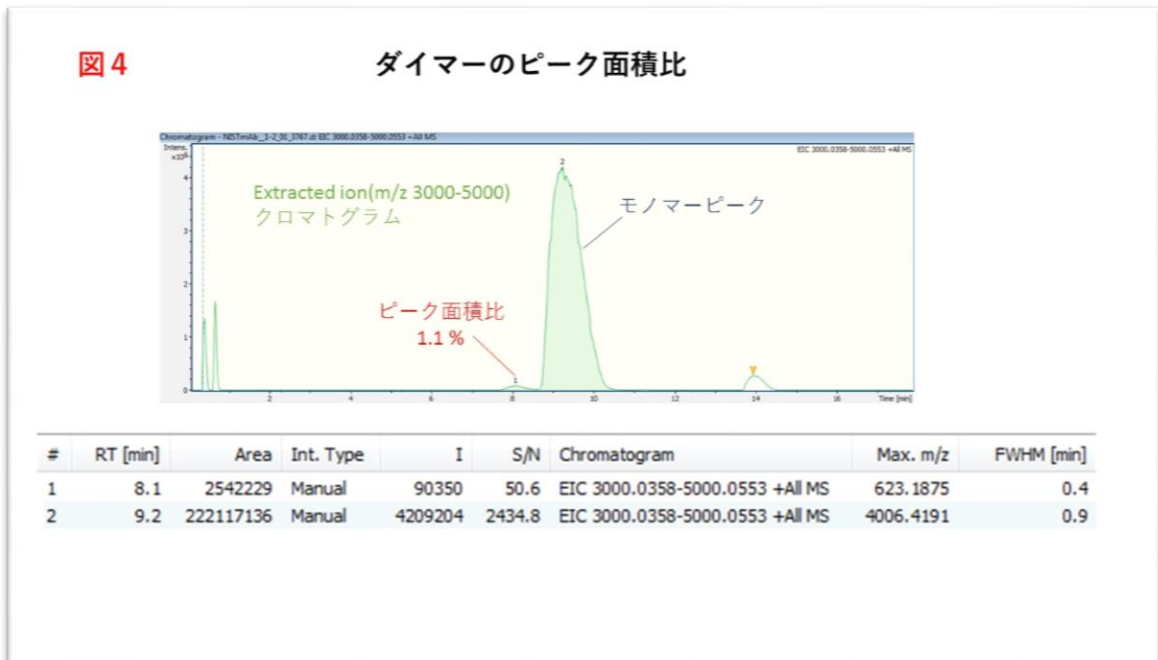
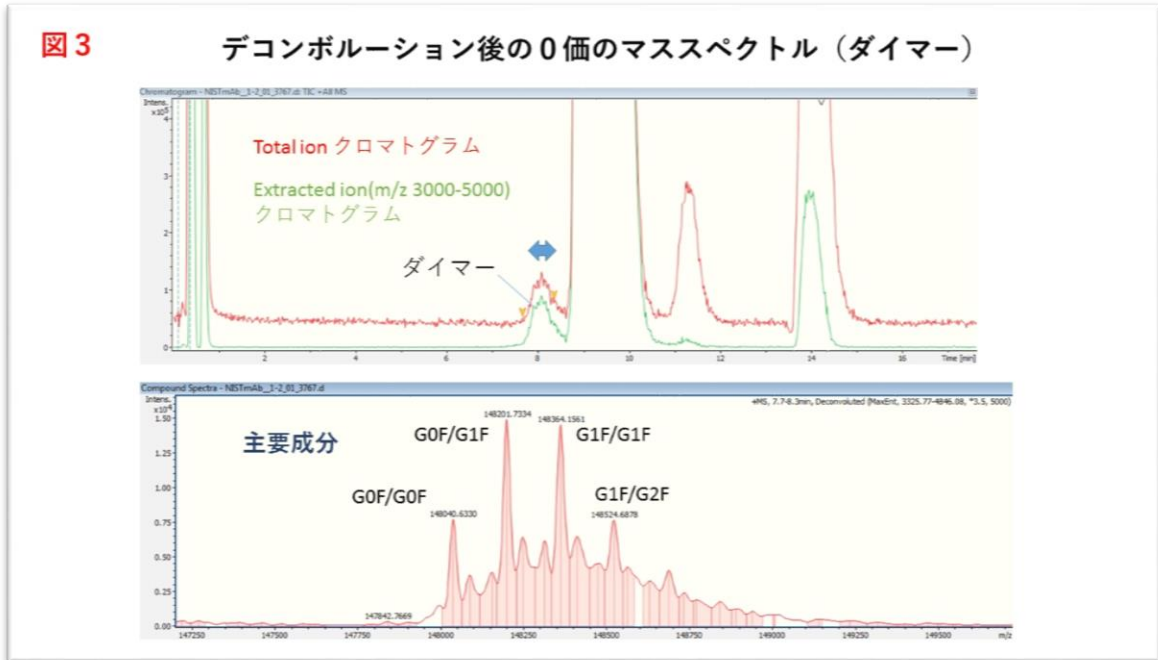


図 2 B

デコンボリューション後の0価のマススペクトル (モノマー)



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



【考察】

今回の測定では分子量マーカーを測定していなが、通常の NIST mAb では、2 量体に比べて 3 量体がほとんど検出されないことから、検出されたオリゴマーのピークをダイマーとみなした。ダイマーの溶出ピークでは、抗体分子はダイマー(分子量約 30 万)として存在している

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

が、ポストカラムで液性を酸性にしているため、イオン化時にはモノマーに解離していると推定され、質量はモノマーと同じ約 15 万として検出されたと考えている。SEC を行う際に、UV 検出ではなく質量分析を用いる利点は、ダイマーに相当するピークがモノマーと同じ抗体由来であることを質量スペクトルから確認できる点にある。また、この SEC-MS の手法はタンパク質の native MS としても利用可能と考えている。

なお、今回検出された約 11 min と約 14 min の溶出ピークについては、断片化した抗体や添加物の可能性があるが、詳細は検討していない。