【技術資料】FcR-MS によるインタクト抗体の糖鎖組成解析(2)

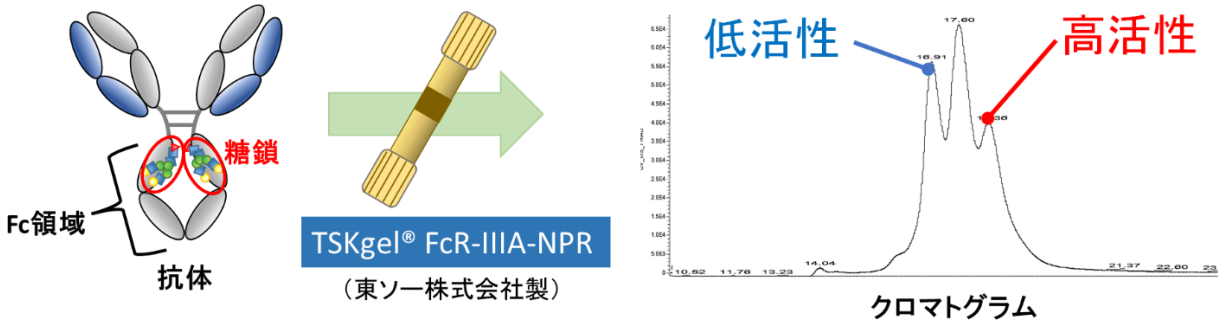
概要

抗体の Fc 領域に結合する N 型糖鎖はタンパク質の安定性や機能に影響を及ぼすことが知られており、抗体医薬品の開発・製造においては結合する糖鎖の種類や組成の違いが品質変動の要因になると考えられています。

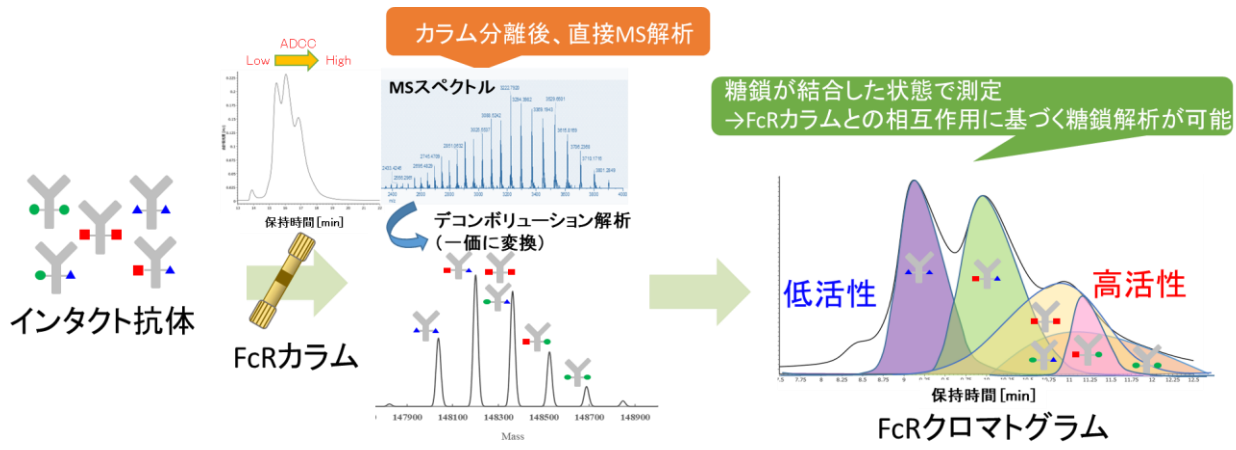
FcR-IIIA-NPR カラム（以下、FcR カラム）は、N 型糖鎖に起因する Fc 領域の構造変化を認識し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性と相関のある抗体を分離可能なアフィニティ分析カラムです [1)]（図 1）。

FcR カラムとインタクト MS 解析技術を組み合わせることで、FcR カラムとの相互作用により分離した抗体を MS に直接導入し、各ピークに対応する糖鎖組成を推定することが可能になります（FcR-MS 法）（図 2）。今回は、市販のモノクローナル抗体 NISTmAb を対象としたインタクト抗体*の解析事例を紹介します。

＊インタクト抗体：プロテアーゼ処理等を行っていない状態の抗体



【図 1】FcR カラムによる抗体分離の概要



【図 2】FcR-MS 法による抗体の糖鎖組成解析イメージ

株式会社　東ソー分析センター
お問い合わせ tarc_toiawase@tosoh-arc.co.jp

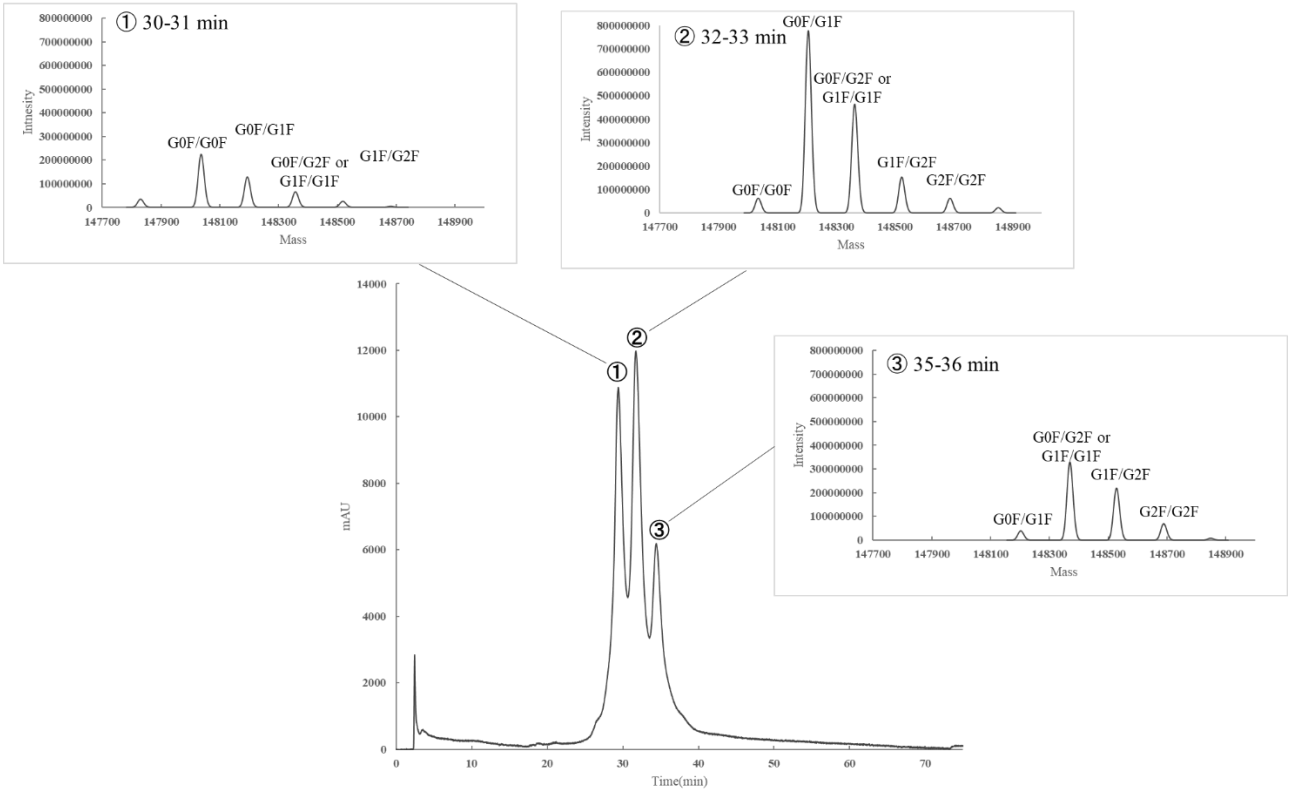
試料

NISTmAb 標準品

手順

モノクローナル抗体の品質特性評価の標準物質として開発された NISTmAb を用い、FcR-MS 法による測定を行いました。

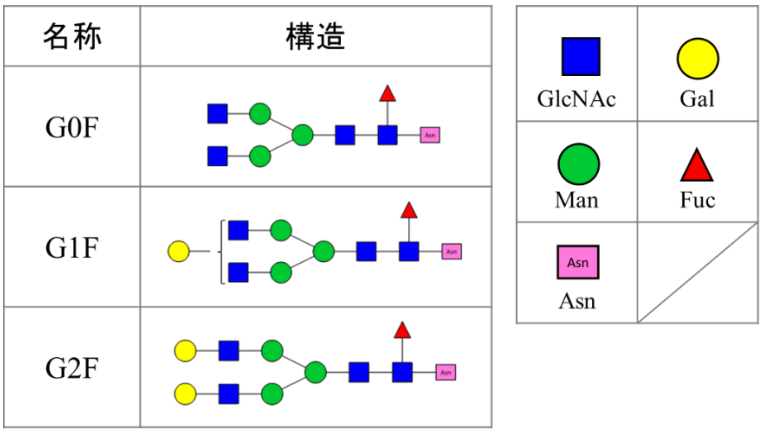
LC で分離された 3 つのピーク(①～③)について、デコンボリューション解析によって多価イオンのマススペクトルを一価に変換しました(図 3)。また、得られた分子量から糖鎖構造を推定しました(表 1)。



【図 3】NISTmAb の FcR-MS 測定結果

【表 1】NISTmAb の糖鎖推定結果

推定糖鎖組成	平均質量(Da)	理論質量(Da)	質量誤差(ppm)
G0F/G0F	148039.96	148037.15	18.9
G0F/G1F	148202.99	148199.30	24.9
G0F/G2F or G1F/G1F	148361.70	148361.44	1.8
G1F/G2F	148527.29	148523.58	25.0
G2F/G2F	148689.32	148685.72	24.2



【図 4】推定された糖鎖の構造

結果

NISTmAb に結合する N 型糖鎖は約 50 種類の組成が報告されていますが [2]、今回の解析では主に二分岐型糖鎖（G0F、G1F、G2F）が推定されました（図 4）。

また、先に溶出した①のピークはガラクトース残基が少ない糖鎖の割合が高く、後に溶出した③のピークはガラクトース残基が多い糖鎖の割合が高くなっていました。末端のガラクトース残基は FcR との相互作用を増強することが報告されており [3) 4)]、今回の解析結果と一致しています。このように、FcR カラムによる分離とインタクト MS 解析を組み合わせて、ADCC 活性に関連する糖鎖組成の違いを評価できました。

まとめ

FcR カラムとインタクト MS 解析を組み合わせた FcR-MS 法により、ADCC 活性に相関のある抗体の分離と糖鎖組成の推定が可能です。本手法は抗体に糖鎖が結合した状態で測定するため、非対称な糖鎖の組み合わせを有する抗体医薬品も評価できます。

参考文献

1） 寺尾陽介、山中直紀他、東ソー研究・技術報告第 61 巻（2017）
2） Zhao J et al., *J. Proteome Res,* vol.20, 818–830 (2021)
3） Subedi GP, Barb AW, *MAbs*, vol. 8, 1512–1524 (2016)
4） Hatfield G et al., *Front. Immunol.*, vol. 13, Article 972168 (2022)

適用分野：医薬品

キーワード：抗体医薬品、IgG、糖鎖、糖タンパク質、FcRIIIA-NPR カラム、3 型 FcR、インタクト MS、ADCC 活性

株式会社　東ソー分析センター
お問い合わせ tarc_toiawase@tosoh-arc.co.jp