

Agilent 精密質量 Q-TOF LC/MS と BioConfirm ソフトウェアによる モノクローナル抗体のタンパク質 ジスフィルド結合の自動マッピング

アプリケーションノート

バイオ医薬品・バイオシミラー

著者

David L. Wong, Stephen Madden, and Javier
Satulovsky
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

概要

モノクローナル抗体 (mAb) は、バイオ医薬品分子の中でも特に重要であり、治療および診断に幅広く利用されています。mAb では、高次構造がその効能において重要な役割を担いますが、この構造はジスフィルド結合に大きく左右されます [1]。そのため、予測される架橋や摂動の確認などジスフィルドを測定することが医薬品の品質評価に不可欠となっています。ジスフィルド結合について得られた情報は、候補薬の選択から製剤にいたる mAb の各生産段階にも貢献することが期待されます。ところが、ジスフィルド結合のマッピングには通常、分析上きわめて大きな課題が伴います。分子がストレスにさらされると、多様な組み合わせの結合が形成される可能性があるためです [2]。そこで、Agilent 1290 Infinity II UHPLC、Agilent 6545 Q-TOF/MS、および Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 ソフトウェアを用いて、ジスフィルド結合を正確にマッピングする LC/MS メソッドを開発しました。このメソッドは、モノクローナル抗体に存在するジスフィルド結合スクランブルのマッピングにそのまま使用することができます。



Agilent Technologies

実験方法

サンプル前処理

mAb サンプルとして、ハーセプチン製剤 (トラスツズマブ) (Genentech 社、米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) を使用しました。ハーセプチンは、Bio-Spin 6 カートリッジ (Bio-Rad 社) による脱塩後、8 M 尿素で変性させました。その後、ハーセプチンを再溶解し、ジチオスレイトール (DTT) による還元とヨードアセトアミド (IAM) によるアルキル化を行ったサンプルとこれらの処理を行っていないサンプルを調製しました。これらのサンプルをトリプシン/Lys-C 混合液で分解し、特性解析を実施しました。

機器

LC パラメータ

機器	Agilent 1290 Infinity II UHPLC
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、 2.1 × 150 mm、2.7 μm
注入量	5 μL
移動相	A) DI 水 + 0.1 % ギ酸 B) アセトニトリル + 0.1 % ギ酸
流量	0.2 mL/min
グラジエント	35 分間で B を 0 % から 42 % に増加、 5 分間で B を 45 % から 100 % に増加、 B 100 % で 5 分間保持
ストップタイム	50 分
ポストタイム	10 分

MS パラメータ

機器	Agilent 6545 Accurate-Mass Q-TOF
イオン源	デュアル AJS、ポジティブモード
乾燥ガス温度	325 °C
乾燥ガス流量	13 L/min
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	12 L/min
ネブライザ圧力	35 psi
キャピラリー電圧	4,000 V
フラグメンタ電圧	175 V
スキマー電圧	65 V
MS 範囲	100 ~ 1,700 m/z
MS スキャンレート	5 スペクトル/秒
自動 MS/MS 範囲	50 ~ 1,700 m/z
MS/MS スキャンレート	3 スペクトル/秒

データ解析

ハーセプチンのタンパク質分解物について取得されたデータファイルを MassHunter BioConfirm B.08.00 にロードし、ノンターゲットのフィーチャー抽出アルゴリズムである Molecular Feature Extractor (MFE) で解析しました。MFE は、リテンションタイム (RT) に渡って持続しているイオンを除去し、同位体クラスター、付加体、ニュートラルロス、および複数の荷電状態の証拠をもとにイオンをフィーチャー候補にグループ化することにより、フィーチャーを検出します。各フィーチャーには、最高スコアを 100 とする品質スコアが与えられました。品質スコアの設定時には、次の要素を考慮しました。

- S/N 比
- RT ピーク形状
- RT ピーク幅
- イオンのリテンションタイムの一貫性
- イオン種間の質量差
- 単一イオン化合物かどうか

その後、検出されたフィーチャーを、翻訳後修飾、システインジスルフィド架橋、およびサンプル前処理に伴うアーチファクトを加味した分解後のハーセプチンの理論配列と比較しました。通常解析により約 2,000 種類の推定ペプチドが検出され、これらの配列特性のアノテーションに対して品質スコアが割り当てられました。また、ジスフィルド結合による架橋の品質を、バイオスコア値を使用して評価しました。バイオスコア値の算出式では、MS スコアおよび MS/MS スコア (ピーク強度や一致イオンなどさまざまな要素により決定) に対する重み付けをユーザーが指定することができます。

結果と考察

ジスフィルド結合の形成は翻訳後プロセスであり、治療用タンパク質の構造および機能に影響をおよぼす可能性があります。不完全または不正確なジスフィルド結合の架橋はタンパク質の誤った折り畳みを招き、最終的に医薬品の効能に影響する可能性があります。そのため、ジスフィルド結合による架橋がすべて適正であることを確認することが極めて重要です。

ハーセプチンは一般的な IgG-1 抗体であり、合計 16 個のジスフィルド結合を持ちます (図 1)。うち 12 個は鎖内架橋 (4 個は軽鎖内、8 個は重鎖内)、4 個は鎖間ジスフィルド結合です (それぞれ軽鎖と重鎖を架橋する 2 個のジスフィルド結合と、ヒンジ領域で 2 本の重鎖を架橋する 2 個のジスフィルド結合)。

mAb に存在するすべてのジスフィルド結合の完全なマッピングは、バイオ医薬品業界にとって極めて重要であると同時に、非常に困難な作業でもあります。今回の分析では、Agilent 6545 LC/Q-TOF と MassHunter BioConfirm B.08 ソフトウェアを用いて、ジスフィルド結合を正確にマッピングするシンプルな LC/MS/MS ベースのメソッドを評価しました。

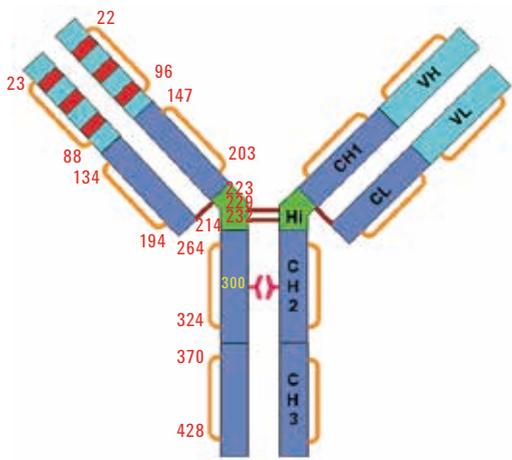


図1. ヒト化 IgG-1 ハーセプチンのジスフィルド結合架橋構造

ジスフィルド架橋ペプチドを明確に比較および特定するために、タンパク質分解前に 2 種類の mAb サンプル (非還元および還元) を調製しました。手順を簡単に説明すると次のとおりです。一方の mAb サンプルは、8 M 尿素、20 mM DTT、および 40 mM IAM による処理で完全に還元しました。もう一方のサンプルには、8 M 尿素による mAb 分子の変性のみを行いました (非還元)。次に、分解効率を高めるために、両方の mAb サンプルをトリプシン/Lys-C 混合液 (1:20、w/w) で分解しました。

その後、各サンプルについて、同一の LC/MS 条件で逆相 LC/MS/MS データを収集しました。予測どおり、還元サンプルでは mAb のジスフィルド結合が切断されていたのに対し、未変性 (非還元) サンプルでは、S-S 結合で架橋されたペプチド (質量がより大きい) が無傷のまま残っていました。次に、MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの比較分析プログラムを用いて LC/MS データを比較しました (図 2)。ミラープロット (2B) には、2 つのサンプル間の大きな違いが明確に示されています。また、トリプシン/Lys-C で分解した非還元元のハーセプチンサンプルでは、より高分子の多数のペプチドがより長い HPLC リテンションタイムで検出されています (図 2A の矢印)。

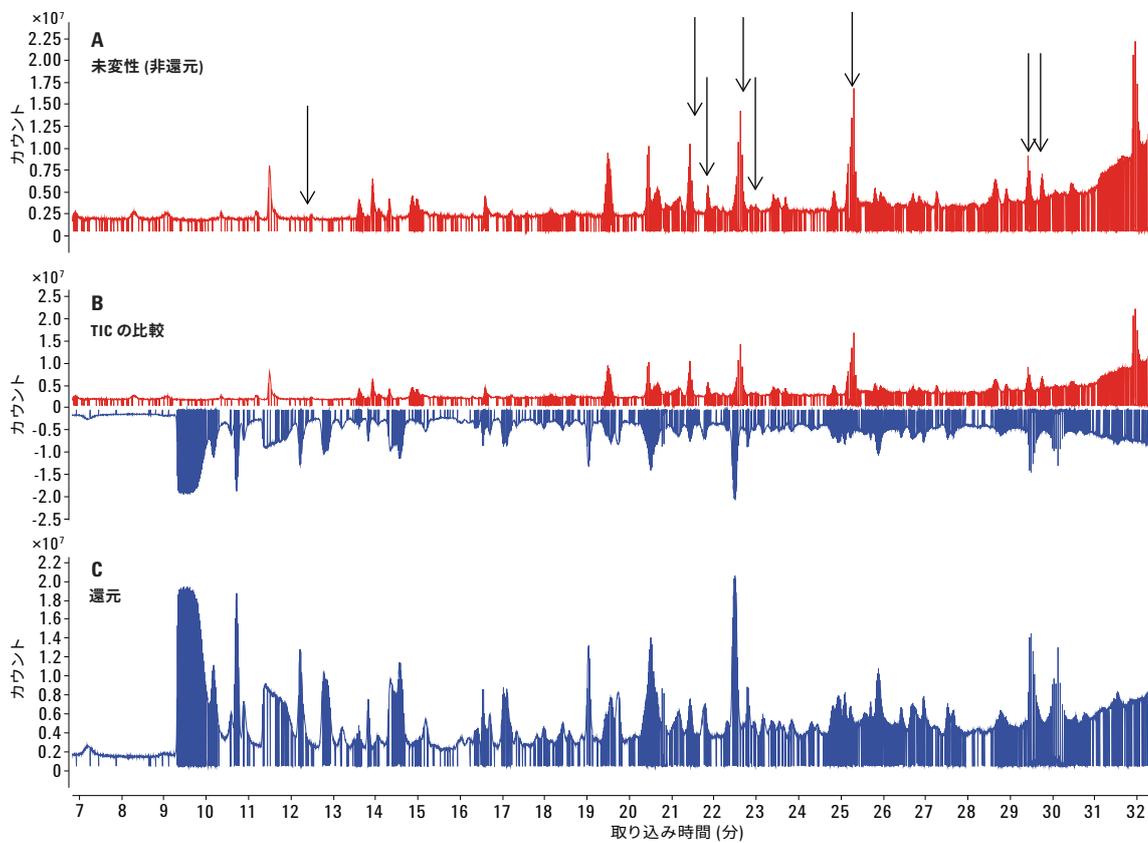


図2. 非還元 (未変性) サンプルと還元サンプルの比較

ジスフィド結合マッピングアルゴリズム (BioConfirm B.08.00) を用いることで、タンパク質、特に mAb に存在するジスフィド結合を手動によって特定する労力を必要としません。このアルゴリズムでは、実験条件 (タンパク質分解酵素、アルキル化試薬) と翻訳後修飾に基づいて、タンパク質配列から理論的に可能なすべてのペプチドが生成されます (図 3)。その後、これらのフィーチャーがペプチド MS および MS/MS データで高速検索され、その結果が品質スコアとバイオスコアとともに生成されます。

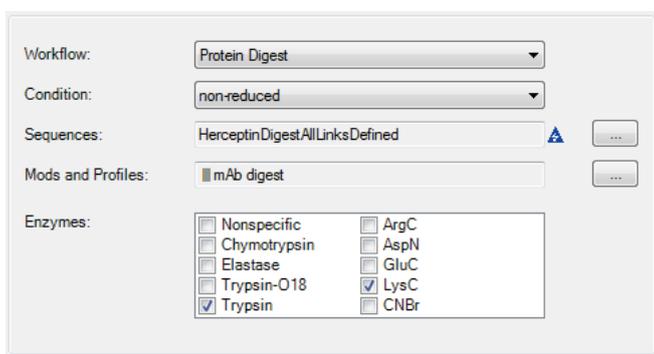


図 3. ジスフィド結合解析のメソッド設定画面 (Agilent BioConfirm B.08.00)

MassHunter BioConfirm B.08.00 のジスフィド結合マッピングアルゴリズムでは、未変性状態の架橋を識別することも可能です。また、スクランブルされた架橋は品質スコアおよびバイオスコアが大幅に低いため、考慮から除外することができます。表 1 に解析結果を示します。ハーセプチン配列において、重鎖内の B22–B96 ジスルフィド結合の存在が明らかになり、そのバイオスコアは 67.15 でした。その他のジスフィド架橋でバイオスコアがより低くなったのは、高分子のフラグメントイオンマッチングで MS/MS スコアが低かったことと、欠損した切断ペプチドによりアブundanceが低くなったことが原因と考えられます。

図 4 に示すように、これらの結果を視覚的に調べることで、マッピング結果に対する確信を高めることができます。上段は、未変性 (非還元) ハーセプチンサンプルの重鎖で得られたジスフィド架橋ペプチドのペプチド配列と分子量です。ジスフィド架橋ペプチドの 3⁺ (m/z 796.0351) イオンと 4⁺ (m/z 597.2808) イオンのみが検出されています。下段の MS/MS スペクトルは、一致フラグメントの数を示したもので、ペプチド配列にもとづくプロダクトイオンを表しています。4⁺ (m/z 597.2808) プリカーサイオンのプロダクトイオンスペクトル (B) には、b (青) および y イオン (赤) のラベルが付けられています。

表 1. 入力配列中のすべての架橋が明確化されたジスフィド結合マッピングの結果

配列	質量 (Da)	RT	スコア (MFE)	スコア (バイオ)	酵素	欠損	Links (リンク)
NQVSLTCLVK + WQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK	3,844.8329	14.561	100	48.25	トリプシン + LysC	0 + 0、 0 + 0	システインジスルフィド結合 (B370-B428) システインジスルフィド結合 (D370-D428)
TPEVTCVWVDVSHEDPEVK + CK	2,328.1014	11.996	100	66.87	トリプシン + LysC	0 + 0、 0 + 0	システインジスルフィド結合 (B264-B324) システインジスルフィド結合 (D264-D324)
LSCAASGFNIK + AEDTAVYYCSR	2,384.081	12.06	100	67.15	トリプシン + LysC	0 + 0、 0 + 0	システインジスルフィド結合 (B22-B96) システインジスルフィド結合 (D22-D96)
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK + THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK	5,004.4906	24.659	80	29.77	トリプシン + LysC	0 + 0	システインジスルフィド結合 (B229-D229) システインジスルフィド結合 (B232-D232)
VTITCR + SGTDFLTISLQPEDFATYYCQHQHYTPPTFGQGTK	4,819.2476	20.08	100	28.96	トリプシン + LysC	0 + 0、 0 + 0	システインジスルフィド結合 (A23-A88) システインジスルフィド結合 (C23-C88)
SGTASVCLLNIFYPR + HKVYACEVTHQGLSSPVTK	3,820.9116	15.65	100	56.64	トリプシン + LysC	0 + 2、 0 + 2	システインジスルフィド結合 (A134-A194) システインジスルフィド結合 (C134-C194)
SGTASVCLLNIFYPR + VYACEVTHQGLSSPVTK	3,555.7594	17.559	100	57.18	トリプシン + LysC	0 + 0、 0 + 0	システインジスルフィド結合 (A134-A194) システインジスルフィド結合 (C134-C194)

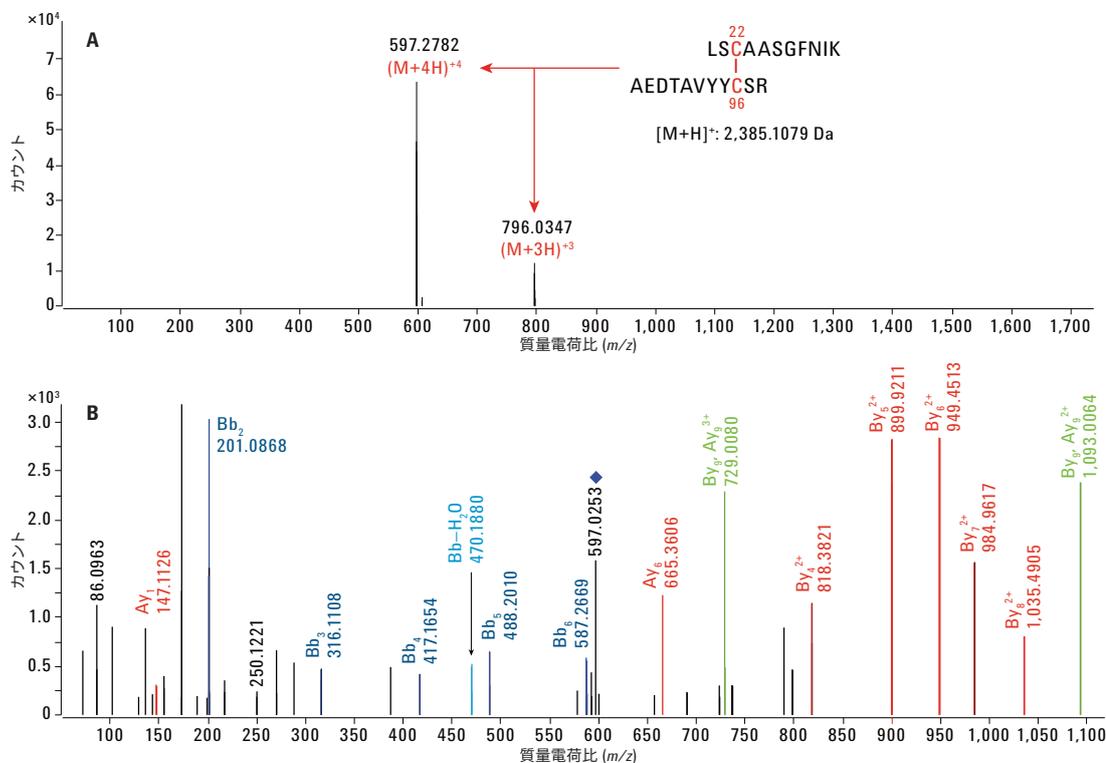


図4. ハーセプチンの重鎖に含まれるジスフィルド含有ペプチドの質量スペクトル。A) MS スペクトル、B) MS/MS フラグメンテーションスペクトル。

未変性 (非還元) ハーセプチンサンプルに存在する 16 対すべてのジスフィルド結合が BioConfirm B.08.00 により正しく検出され、特定されました (表 2)。これに対し、還元ハーセプチン分解サンプルでは、これらのジスフィルド含有ペプチドがまったく検出されませんでした。

表2. ハーセプチンサンプルで特定されたジスフィルド (S-S) 結合のまとめ

S-S 結合位置	S-S 架橋	ペプチド配列	質量測定値 (Da)
LC	A23-A88/C23-C88	VTITC(23)R + SGTDFLTLISSLPEDFATYYC(88)QQHYTTPPTFGQGTK	4,819.2467
LC	A134-A194/C134-C194	SGTASWC(134)LLNNFYPR + VYAC(194)EVTHQGLSSPVTK	3,555.7588
HC	B22-B96/D22-D96	LSC(22)AASGFNIK + AEDTAVYYC(96)SR	2,384.0811
HC	B147-B203/D147-D203	STSGGTAALGC(147)LVK + DYFPEPVTWVNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYLSVWVTPSSSLGTQTYIC(203)NVNHKPSNTK	7,916.9289
HC	B264-B324/D264-D324	TPEVTC(264)VWVDVSHEDPEVK + C(324)K	2,328.1009
HC	B370-B428/D370-D428	NOVSLTC(370)LVK + WQQGNVFC(428)SVMHEALHNYTQK	3,844.8311
LC-HC	A214-B223/C214-D223	SFNRGEC(214) + SC(223)DK	1,260.4925
HC-HC	B229-D229/B232-D232	THTC(229)PPC(232)PAPELLGGPSVFLFPPKPK + THTC(229)PPC(232)PAPELLGGPSVFLFPPKPK	5,454.7975

結論

Agilent UHPLC、Agilent 6545 LC/Q-TOF、および Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 ソフトウェアによる、モノクローナル抗体のジスフィルド結合を正確にマッピングする分析ワークフローを開発し、評価しました。このワークフローでは、ジスフィルド結合をそれぞれの位置にすばやくマッピングすることが可能です。また、ジスフィルド含有ペプチドで得られた MS/MS フラグメンテーションデータを基に品質スコアを計算することで、より信頼性の高い結果が得られます。このワークフローは、モノクローナル抗体のスクランブル化ジスフィルド結合のマッピングにも応用することができます。

参考文献

1. R. J. Harris. "Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function" *Dev. Biol.(Basel)* **122**, 117-27, PMID: 16375256 (2005).
2. H. Liu, K. May. "Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function" *MAbs* **4**, 17-23 (2012).

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。
アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, May 25, 2016

5991-6951JAJP



Agilent Technologies