[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

SYNAPT G2 HDMS および BiopharmaLynx 1.3 を用いたモノクローナル抗体にみられるジスルフィド結合の迅速自動マッピング

Hongwei Xie and Weibin Chen
Waters Corporation, Milford, MA, U.S.

アプリケーションの利点

ウォーターズは、多数のシステインを含むタンパク質を用いて、実用的なジスルフィド結合ペプチドの自動マッピングまたは自動モニタリングが可能な統合的アプローチの開発を行いました。

本アプリケーションノートでは、組換えIgG1 mAbを用いて、高度なLC/MSE ペプチドマッピングワークフローによるスクランブル化ジスルフィド結合をはじめとするジスルフィド結合の検出および同定について明らかにしています。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC
SYNAPT G2 HDMS
BiopharmaLynx Application Manager
MassLynx Software

キーワード

ジスルフィド結合、ペプチドマップ

はじめに

ジスルフィド結合の形成は、適切な三次元フォールディングを確立して維持するのに重要であるため、モノクローナル抗体(mAb)のような治療用タンパク質が機能するのに重要なものです。ジスルフィド結合の位置決定およびアサインは、タンパク質構造解析の重要な側面のひとつです。

しかし、ジスルフィド結合の形成およびジスルフィド結合のスクランブリングは不完全であるため、多数のシステイン残基を含むタンパク質のジスルフィド対を同定することは、一般にタンパク質配列の決定よりも多大な時間を要する困難な作業です[1,2]。

酵素消化と液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)法との併用は、ジスルフィド結合のアサインに対する常法としてよく用いられています[3,4]。しかし、LC/MS法によるペプチドマッピングは、伝統的にデータの処理および解釈に大きな労力と時間を要する方法です。

さらに、タンパク質に多数のシステインが含まれているときには、ジスルフィド結合の可能性があるペプチド異性体の数が有意に多いため、ときにジスルフィド結合のアサインについて結論を導き出すことができないこともあります[1]。たとえば、システイン残基8個を含むタンパク質にはジスルフィド結合の可能性がある配列組み合わせが計105個あります(これに対してIgG1 mAbには、軽鎖2個および重鎖2個に32個以上のシステインがあるのが典型です)。

これに加えて、ジスルフィド結合スクランブリングが起こる可能性があるため、手動で解析を行うときには、ジスルフィド結合のアサインが非常に難しくなります。ジスルフィド結合によって引き起こされた治療用タンパク質の不均一性を迅速に評価するには、自動ワークフローの方が望ましいと考えられます。

ウォーターズは、自動データ処理および自動データアノテーションを実施することができるように、データ収集用UPLC®/MS^{E}法および特性解析の目的のためのバイオインフォマティクスツールであるMassLynx™ソフトウェア用BioparmaLynx™アプリケーションマネージャを用いてタンパク質の配列を決定し特徴を明らかにする統合的ペプチドマッピングワークフローを開発しました[5]。

データ依存的でないMS^{E}法によって、バイアスの生じない方法でタンパク質酵素(たとえば、トリプシン)消化物から溶出したペプチドのプリカーサーおよびフラグメントに関する質量分析データを収集します[6]。統合的ワークフローは、伝統的なペプチドマッピング法にみられる欠点のほとんどを克服した方法であり[7]、迅速かつ頑健で、治療用mAbs[5]およびサブユニットワクチン[8]など、組換えタンパク質のルーチン解析

実験方法

LC 条件

LCシステム：	ACQUITY UPLC
カラム：	ACQUITY UPLC BEH300C_4、1.7 µm、2.1 x 150 mm (P/N 186004487) または ACQUITY UPLC BEH300 C_{18}、1.7 µm、2.1 x 150 mm (P/N 186003687)
カラム温度：	65℃
流速：	200 µL/分
注入量：	5 µL (パーシャルループ)
移動相A：	0.1%ギ酸/水
移動相B：	0.1%ギ酸/アセトニトリル
グラジエント：	1-40% B/95 分

MS 条件

MSシステム：	SYNAPT G2 HDMS
イオン化モード：	ESI+
データ取得モード：	MS^E
低衝突エネルギー：	4eV
高衝突エネルギー：	22 eVから48 eVへランピング
キャピラリー電圧：	3.0 kV
コーン電圧：	30 V
スキャンモード：	Resolutionモード (分解能≧20000)
データ取得時間：	0.5 秒
ソース温度：	100℃
脱溶媒温度：	350℃
質量範囲：	100 ～ 2500 Da
質量精度：	30秒毎にロックマスチャンネルからスプレーしたGFPによるロックマス

データマネジメント

MassLynxソフトウェアBiopharmaLynx 1.3アプリケーションマネージャ

試薬の調整

RapiGest (Waters, p/n 186001861)とエンドプロテイナーゼLys-C (Wako) およびヨードアセトアミド (Sigma) を使用しました。37℃で50 mMトリス緩衝液 (約7.5 pH) を用い、0.1%RapiGest SFの存在下で18時間、試料 (50:1のタンパク質/Lys-C) をインキュベートして、IgG1 mAbトラスツズマブ消化物を調製しました。消化前、80℃で10分間、タンパク質を変性させました。消化中に引き起こされる可能性があるアーティファクトスクランブリングについて試験するために、アルキル化せずに調製した消化物を直接、消化前にIAMアルキル化と同時に調製した消化物と比較しました。

に適していることが明らかにされています。さらにこの方法を用いて、IgG1 mAbで予想されるジスルフィド結合を同定することにも成功しています[9]。

本試験では、組換えIgG1 mAbを用いて高度なUPLC/MS^Eペプチドマッピングワークフローによる (スクランブル化ジスルフィド結合をはじめとする) ジスルフィド結合の検出および同定について明らかにしています。その目的は、多数のシステインを含むタンパク質を用いて、実用的なジスルフィド結合ペプチドの自動マッピングまたは自動モニタリングが実行可能な方法を開発することにあります。

統合的ワークフローの意義として、以下の点が挙げられます。

- SYNAPT® G2 HDMS™システムを用いた質量分解能および質量精度の向上[10]。分子量が大きい大型ジスルフィド結合連鎖ペプチドについて質の高いMS^Eデータを得るために重要です。
- ランダムモードでアップグレードしたBiopharmaLynx (version1.3) によるジスルフィド結合の自動アサイン。自動モードで潜在的なスクランブル化ジスルフィド結合を同定するのに重要です。

タンパク質消化物混合物の複雑性を低下させるために、エンドプロテイナーゼLys-Cを用いてmAbを消化させました。得られた消化物は、ACQUITY UPLC®システムを用いて逆相LCによって分離したのち、オンラインMS^Eによる検出およびBiopharmaLynx 1.3による解析を実施しました。試料中の遊離スルフヒドリル基[2]をアルキル化により保護して調製した消化物とアルキル化せずに調製した消化物を用いて、試料調製段階に形成された可能性があるジスルフィド結合と、mAbの天然スクランブル化ジスルフィド結合とを識別しました。

結果および考察

トラスツズマブ抗体は、あらゆるIgG1 mAbと同じように、適切に形成されるときには独特のジスルフィド結合が9個認められます。(Lys-Cpによる) in-silico消化では、予想されたジスルフィド連鎖ペプチド (または独特の結合) 8個が消化後に認められています。その内訳は、軽鎖それぞれに2個、重鎖それぞれに4個、軽鎖と重鎖との間に1個、重鎖2個の間に1個(これには連結しているジスルフィド結合が2個) となっています。

形成されたジスルフィド結合を同定するのにワークフローが適切に機能していることを明らかにするために、まず、取得したLC/MS^Eデータを用い、BiopharmaLynxにおいてシステインが適切に結合して予想通りのジスルフィド結合16個を形成したmAbシーケンスについて検索しました。

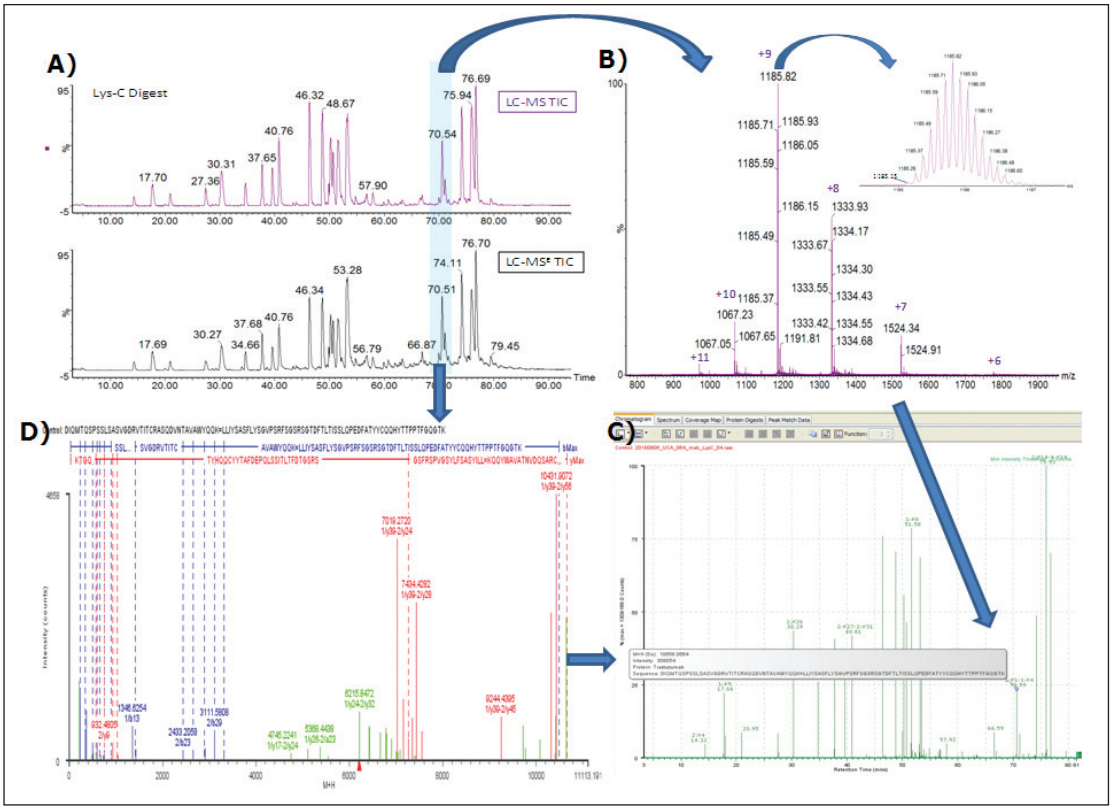

図 1. ジスルフィド結合 1:K1-1:K4 の同定手順。A) 結合の溶出時間を示した UPLC/MS クロマトグラム、B) MS スペクトル、C) BiopharmaLynx の解析およびアノテーション、D) MS^E スペクトル。

図 1 は、最も大きなジスルフィド結合 1:K1-1:K4（分子内軽鎖ジスルフィド結合、モノアイソトピック質量 10657.12 Da）の測定値を示しています。ジスルフィド結合ペプチドは、多価イオンのアイソトープ分離された MS 生データ（図 1B）から得られたプリカーサー質量 MH^+（図 1C）に基づいて検出され、アノテーションが示されます。さらにそのアサインは、（図 1A に印を付けている通り）保持時間アライメントされた、（図 1D に示されているように一価イオンに電荷を減らしてアイソトープのデコンボリューションも実施した）高エネルギーフラグメンテーション MS^E スペクトルによって確認されました。MS^E スペクトルは、2 種類のペプチド（1:K1 および 1:K4）から得られた b/y イオンを含有しているだけでなく、7019.27Da（1/y39-2/y24）および 10431.19Da（1/y39-2/y56）という両ペプチドから得られたジスルフィド結合断片に相当するイオンも含有しているため、ジスルフィド結合を示す明白な証拠が得られます。

分解能が向上した MS によるピーク分離（図 1B の挿入図参照）は、大型ペプチド断片およびプリカーサーの正確なモノアイソトピック質量を得るのに重要であることを強調するべきです。このような大型ペプチドについて十分に分離されたアイソトープパターンが得られれば、インフォマティクスツールによって、1:K1-1:K4 のような大型ジスルフィド結合を同定することがきわめて容易になります。

同じように、BiopharmaLynx によって、他に予想されたジスルフィド結合が同定されます。同定されたジスルフィド結合ペプチドすべての質量精度は 5.0 ppm 以内でした。さらに、BiopharmaLynx によって、ミスクリベージが含まれる結合ペプチドのひとつを有するジスルフィド結合ペプチドを同定することもできます。

たとえば、（ミスクリベージのない）ジスルフィド結合 2:K7-2:K8 も（ミスクリベージが 1 ヵ所ある）2:K7-2:K8-9 も同定されました（図 2A の対応するピーク B および C 参照）。その MS^E スペクトルは図 2B および図 2C にそれぞれ図示されており、確実な同定であることがわかります。リジン（K）にプロリン（P）残基が続くときには、Lys-C またはトリプシンなどのプロテアーゼは切断部位を見落としやすいため、この能力は特に重要です。

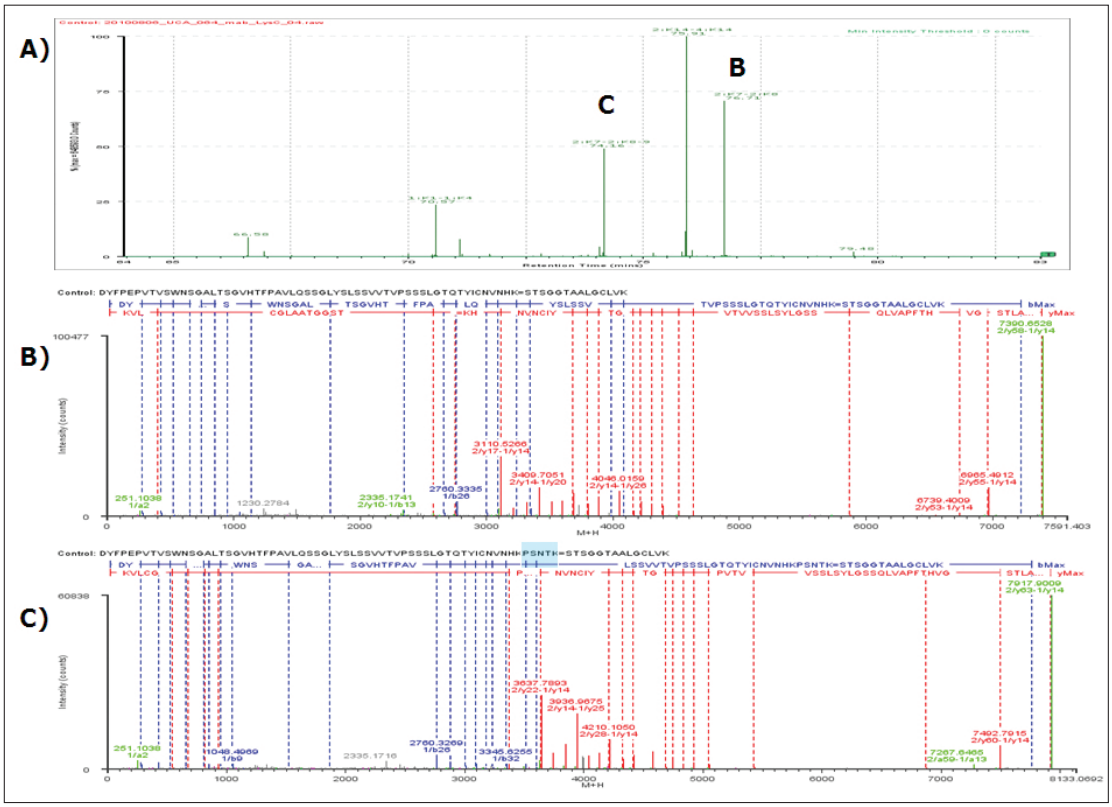

図 2. ジスルフィド結合 2:K7-2:K8 および 2:K7-2:K8-9 の同定と確認。 A) BiopharmaLynx の解析およびアノテーション、B 2:K7-2:k8 の MS^E スペクトル、C) 2:K7-2:K8-9 の MS^E スペクトル。

LC/MS 解析中に大型ジスルフィド結合ペプチドの溶解性維持を補助するには、試料中に高い比率の有機溶媒（アセトニトリル 10% 以上）が必要であることがわかっています。高濃度有機溶媒の試料緩衝液を使用することの欠点として、最も小さいジスルフィド結合ペプチド 1:K14-2:K13（SFNRGEC=SCDK）がボイド容量に溶出する可能性があることが挙げられます。

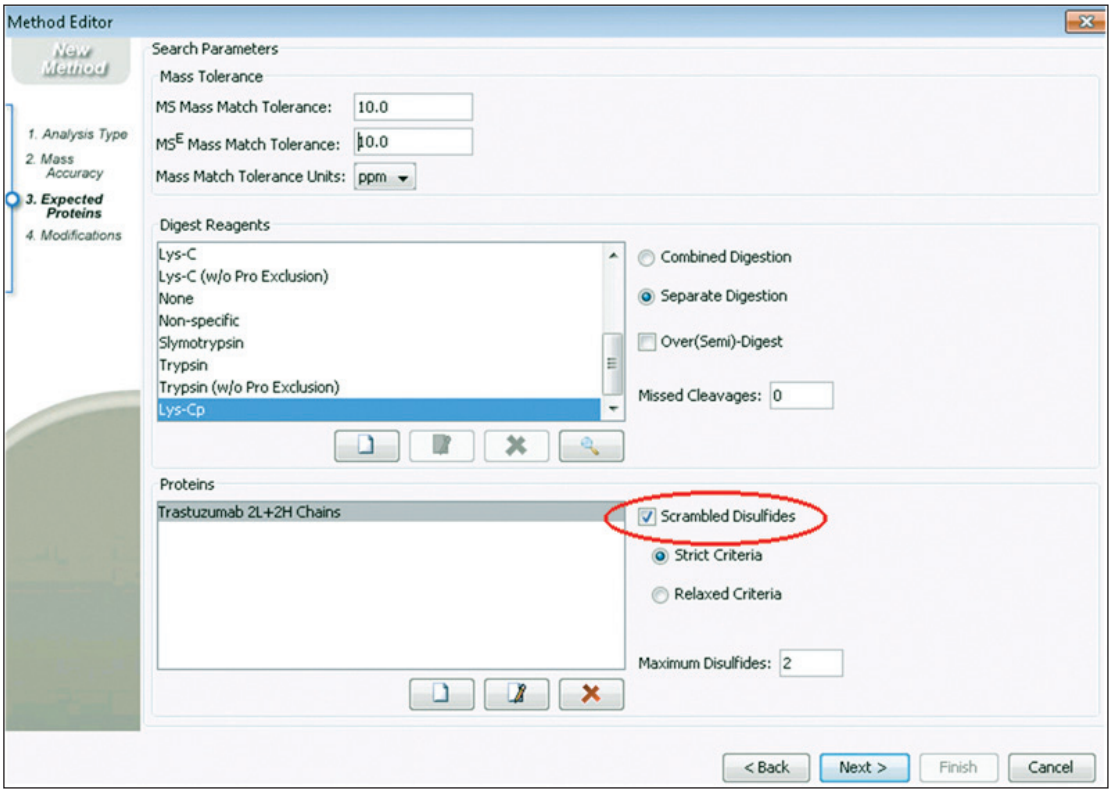

図3. BiopharmaLynx 1.3データ処理法においてスクランブル化ジスルフィド機能を示したスクリーンキャプチャー。

ジスルフィド結合マッピングの課題として、たとえばスクランブリングによって、予想外に形成されたペプチドを同定することが挙げられます。このため、次に作成されたのはスクランブル化ジスルフィドの処理方法でした（図3のハイライト部分参照）。これによって、mAbにあるシステイン2個の間で形成される可能性があるジスルフィド対をすべて検出し同定することができます。この研究のために、消化前にアルキル化した場合またはアルキル化していない場合のトラスツズマブのLys-C消化物を分析しました。

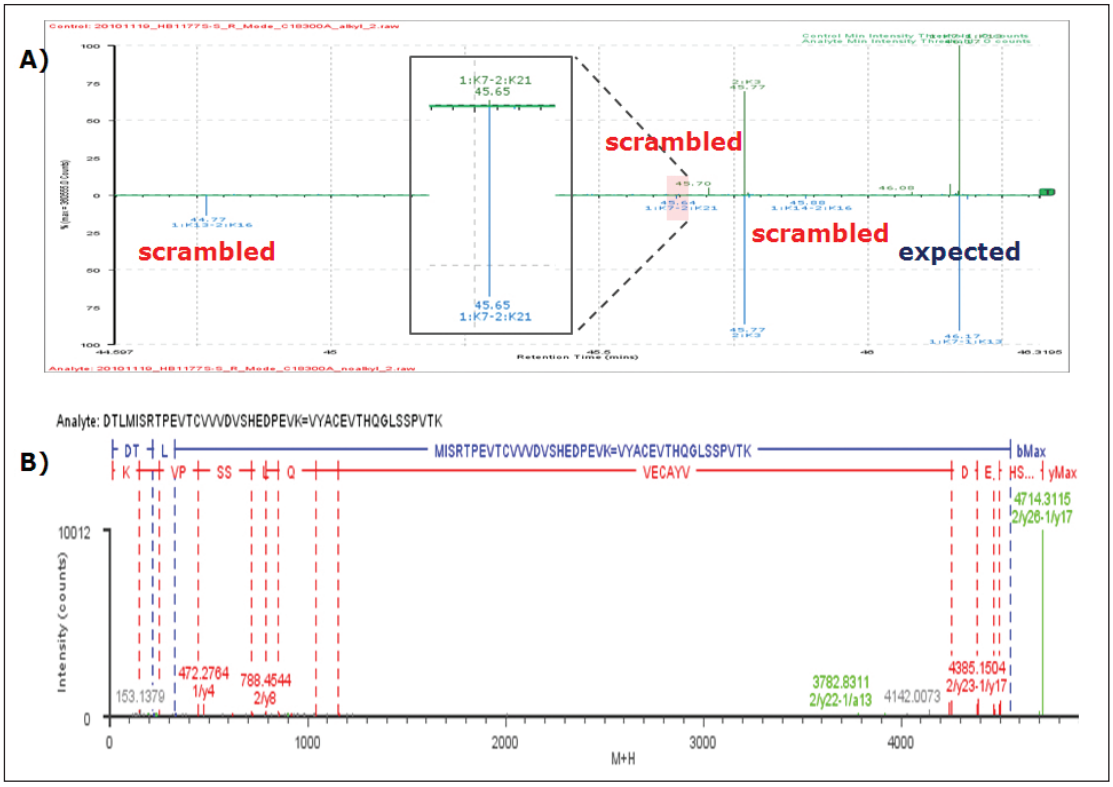

図 4. 自動解析および自動アノテーションを用いて同定したスクランブル化ジスルフィド結合の例。 A) BiopharmaLynx の解析およびアノテーション、B) スクランブル化ジスルフィド結合 1:K13-2:K16 の MS^E スペクトル。

この新しい方法を用いて、予想されたジスルフィド結合を同定しただけでなく、軽微なスクランブル化ジスルフィド結合もいくつか検出しました。図 4A は、アルキル化していない消化物で同定されたスクランブル化ジスルフィド結合 3 個(1:K13-2:K16、1:K7-2:K21、1:K14-2:K16)をまとめたものです。再度、割り当てを確認するのに高エネルギーフラグメンテーション (MS^E) データを利用しました (例として図 4B に 1:K13-2:K16 の MS^E スペクトルを図示しています)。

スクランブル化された 1:K13-2:K16 および 1:K14-2:K16 は、アルキル化していない消化物のみで同定され、アルキル化した消化物では検出されなかったため、いずれも試料調製によって取り込まれたアーティファクトである可能性が示唆されました。スクランブル化ジスルフィド結合 1:K7-2:K21 はいずれの消化物 (アルキル化したものとアルキル化していない) でも同定されましたが、その量はアルキル化した試料の方がアルキル化していない試料よりも大幅に少なくなっています(図 4A の挿入図参照)。予想通り、同定されたスクランブル化ジスルフィド結合はすべて、予想されたジスルフィド結合よりも少ないという結果が得られました(図 4A に示されている通り)。

予想されたジスルフィド結合とスクランブル化ジスルフィド結合の測定に成功したことから、統合的ワークフローによってタンパク質のジスルフィド結合に関する自動マッピングが可能であることが明らかになりました。スクランブル化ジスルフィドの増強機能は、手動による労力を必要とせず、ジスルフィド結合マッピングという困難な作業に対する完全に自動化されたデータ処理を達成することができます。

まとめ

質量分解能が高いUPLC/MS^{E}とBiopharmaLynx 1.3とを組み合わせた統合的ワークフローが、組換えIgG1 mAbのジスルフィド結合を迅速マッピングするために開発されました。このワークフローによって、予想ジスルフィド結合ペプチドおよびスクランブル化ジスルフィド結合ペプチドを同時に同定することが可能であることが明らかになりました。ジスルフィド結合連鎖ペプチドのアサインは、正確なMS測定に基づいて自動化されており、高衝突エネルギーMS^{E}フラグメンテーションデータによって裏付けられています。

SYNAPT G2 HDMSシステムで向上した質量分解能（Resolutionモードでは20,000、High Resolutionモードでは40,000）によって、酵素（たとえばLys-C）消化物の大型ジスルフィド結合ペプチドに対するMSデータの質が大幅に改善されます。BiopharmaLynx 1.3に追加されたスクランブル化ジスルフィド機能設定によって、自動モードでタンパク質に起こる可能性があるジスルフィド結合を同定することが可能になります。

この統合的方法は、多数のジスルフィド結合がみられるmAbsをはじめとするタンパク質治療薬のジスルフィド結合に関するルーチンのマッピングおよびモニタリングに適用するのが望ましいと考えられます。

参考文献

1. Gupta K, Kumar M, Balaram P. Disulfide bond assignments by mass spectrometry of native natural peptides: cysteine pairing in disulfide bonded conotoxins. *Anal Chem* 2010; 82, 8313-8319.
2. Chumsae C, Gaza-Bulseco G, Liu H. Identification and localization of unpaired cysteine residues in monoclonal antibodies by fluorescence labeling and mass spectrometry. *Anal Chem* 2009; 81, 6449-6457.
3. Wen D, Wildes CP, Silvian L, Walus L, et al. Disulfide structure of the leucine-rich repeat C-terminal cap and C-terminal stalk region of Nogo-66 receptor. *Biochemistry* 2005; 44, 16491-16501.
4. Zhang W, Marzilli LA, Rouse JC, Czupryn MJ. Complete disulfide bond assignment of a recombinant immunoglobulin G4 monoclonal antibody. *Anal Biochem* 2002; 311, 1-9.
5. Xie H, Chakraborty A, Ahn J, Yu YQ, et al. Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies. *MAbs* 2010; 2, 379-394.
6. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein, M, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem* 2005, 77, 2187-2200.
7. Xie H, Gilar M, Gebler JC. Characterization of protein impurities and site-specific modifications using peptide mapping with liquid chromatography and data independent acquisition mass spectrometry. *Anal Chem* 2009; 81, 5699-5708.
8. Xie H, Chen W, Gilar M, Skilton SJ, Mazzeo JR. Separation and Characterization of N-linked Glycopeptides on Hemagglutinins in a Recombinant Influenza Vaccine. *Waters Application Note* 2009; 720003173en.
9. Xie H, Chakraborty AB, Chen W. Towards Fast Mapping of Protein Disulfide Bonds: An Integrated Workflow for Automatic Assignment of Disulfide Pairing. Mass Spec 2010 *(Practical Applications of Mass Spectrometry in the Biotechnology Industry),* Marina Del Ray, CA, Sept. 8-10, 2010, P-107.
10. Wildgoose J, Campuzano I. SYNAPT G2 A Next-Generation, High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry Platform. *Waters Application Note* 2009; 720003027en.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC およびSYNAPTはWaters Corporationの登録商標です。HDMS、BiopharmaLynx、MassLynx およびThe Science of What's PossibleはWaters Corporationの商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan. 2012年09月 720003939 JA PDF