

# Agilent MassHunter Easy Access ソフトウェアを使用した タンパク質製剤のロット間純度分析法

## アプリケーションノート

### 著者

Ravindra Gudihal and SureshBabu C.V.  
Agilent Technologies India Pvt.Ltd.  
Bangalore, India

Madhavi H.N. and Uma Maheswari S.  
GangaGen Biotechnologies Pvt. Ltd,  
Bangalore, India

### 概要

このアプリケーションノートでは、一般的な生物薬理学環境で生化学分析の担当者が実行する、Agilent Easy Access ソフトウェアを使用したモデル治療用タンパク質のロット間純度分析方法について説明します。Agilent 1290 Infinity LC システムを Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS と組み合わせ、Agilent Easy Access ソフトウェアが提供するデータ解析を使用して、タンパク質製剤のロット間純度を分析しました。LC/MS プラットフォームの優れたクロマトグラフィー分離能と質量真度をパワフルなデータ処理機能と組み合わせることで、バッチ間のタンパク質純度を容易かつ迅速に分析することができました。このアプリケーションではワークフローを単純化し、以降の後工程の意思決定を高速化します。このソフトウェアは、規制機関により求められるバッチの一貫性を確認するためのタンパク質プロファイルの比較に便利です。さらに、スケールアップまたは製造時に精製タンパク質の不純物プロファイルに役立ちます。このデータはバイオシミラーを開発する企業にとって非常に貴重なものとなり、販売前に行う生成物とオリジナルの化合物との類似性の評価に役立ちます。



**Agilent Technologies**

## はじめに

タンパク質は、医学的利用のために販売前には生体医薬品分子として厳しい製品試験を受ける必要があります。治療用タンパク質の製造手順は非常に詳しく定義されていますが、製品や工程に関連する不純物が発生することがあります。pH、温度、培地の組成変更など、製造工程の些細な変化でも最終製品の品質に影響を与えることがあります。製造工程でのバッチ間変動は製品の微小不均一性の原因にもなります。したがって、製造工程で実施されたすべての変更を分析することが非常に重要です。このアプリケーションノートでは、High Definition Q-TOF に結合された LC を使用して、モデル治療用タンパク質のロット間変動を分析する方法について説明します。Easy Access ソフトウェアを使用すると、質量分析計の経験が少ないユーザーでも LC/MS システムを使用して生産性と効率を向上させることができます。タンパク質の純度分析のための容易で便利なメソッドも提供され、必要に応じてサンプルをさらに処理するための最適な方法を特定することができます。

## 実験方法

### サンプル

異なるロットのモデル治療用タンパク質は GangaGen Biotechnologies Pvt. Ltd (インド、バンガロール) から入手しました。

### 機器

#### LC システム

Agilent 1290 Infinity LC

表 1. 実験パラメータ

パラメータ	Agilent 1290 LC
カラム	Agilent Poroshell 300SB-C18、2.1 x 75 mm、5 µm (p/n 660750-902)
カラム温度	60 °C
サンプルのサーモスタット	5 °C
移動相 A	0.1 % ギ酸水溶液
移動相 B	90 % アセトニトリル + 0.1 % ギ酸
グラジエント	20 % B で 0 分間 85 % B で 0~15 分 20 % B で 15~16 分
ストップタイム	16 分
流速	0.5 mL/min
イオンモード	ポジティブイオンモード、ESI (プロファイル)
乾燥ガス温度	350 °C
乾燥ガス流量	8 L/min
シースガス温度	350 °C
シースガス流速	11 L/min
ネブライザ	35 psi
キャピラリの電圧	3,800 V
ノズル	1,000 V
データ解析	LC/MS で取得したデータを、Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア B.05 および Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア B.05 を使用して分析

#### MS システム

Agilent JetStream 技術を利用した  
Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

#### 分析ソフトウェア

MassHunter Easy Access ソフトウェア  
(B.05.00)

メソッドパラメータを表 1 に示します。

## 結果と考察

バイオ医薬品業界の規制要件により、製剤原料の化学的一貫性と純度のモニタリングが日常的に実施されています。薬物の同一性、強度、品質、純度、および薬効は最終製品の安全性と効果に関連しているため、工程の変更がこれらに与える影響を調べるために高感度の分析手法が必要です。高性能液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析計 (MS)、核磁気共鳴 (NMR)、およびキャピラリー電気泳動などの高感度の分析手法の向上により、工程の変更がこれらの物質に与える影響を評価するための高真度のメソッドが提供されました。図 1 に、質量分析の経験が少ない分析担当者が Agilent MassHunter Easy Access を使用してタンパク質製品の純度を測定するときのワークフローを示します。Easy Access ソフトウェアをデータ解析に使用して LC/MS メソッドを開発し、最適化しました。

図 2 に Easy Access ソフトウェアの Administrator (管理者) ウィンドウの Method (メソッド) タブを示します。このタブに入力されている最適化されたメソッドパラメータを表 1 に示します。これらの機器条件を使用し、Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS に結合された Agilent 1290 Infinity LC で各バッチを分析しました。メソッドを最適化し、保存すると、図 1 に示すように次のシーケンスが開始されます。この実験では、3 つの異なるロット (前臨床、非 GMP、GMP) のモデル治療用タンパク質の純度を分析しました。

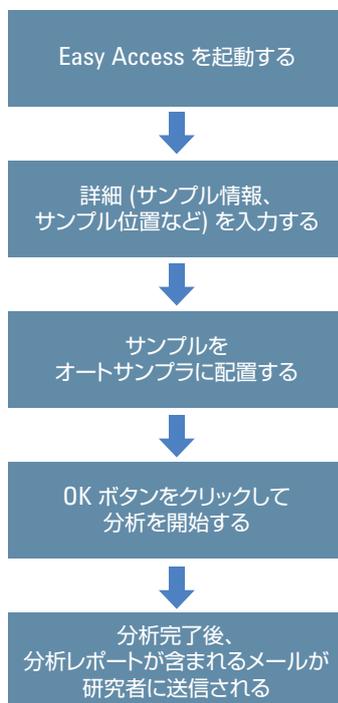


図 1. ロット間タンパク質分析のための Easy Access のワークフロー

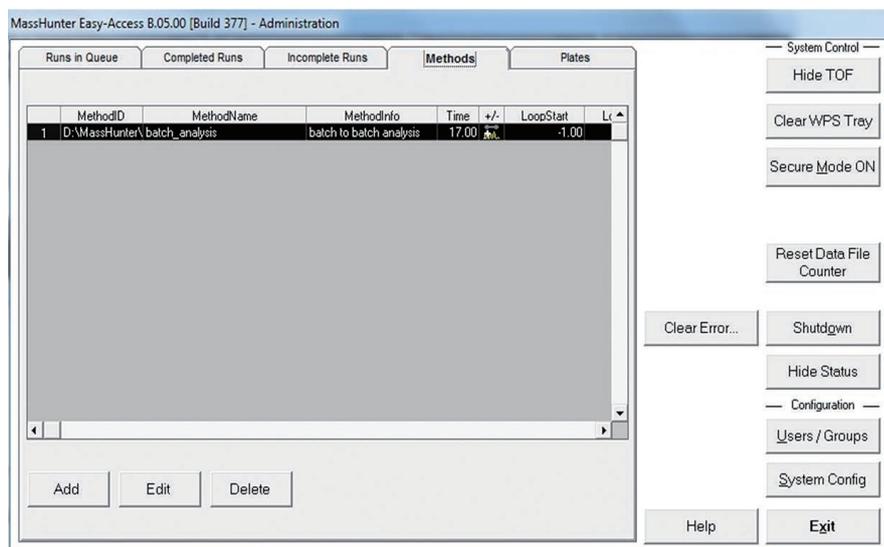


図 2. MassHunter Easy Access の Administrator (管理者) ウィンドウ、Methods (メソッド) タブを表示

サンプルをオートサンプラに入れた後、サンプルの詳細、サンプル位置、ノートブック番号、および実験対象タンパク質の分析メソッドを分析担当者が Easy Access ウィンドウ (図 3) に入力し、分析を開始しました。分析完了時にレポートとデータをユーザーにメールで送信するようにシステムを構成しました。

図 4 に、1 サンプル分析の結果についてカスタマイズしたレポートの例と、前臨床サンプルのタンパク質を同定したマッチシーケンスを示します。カスタマイズしたレポートにはデータファイル名、サンプル名、サンプル位置、取り込みおよびデータ解析に使用したメソッドが含まれます。レポートには、一致したタンパク質配列をリストした表に加えて、タンパク質のさまざまな分子種 ( intact または 付加分子種 ) とその相対存在量をリストした化合物表も含まれます。また、同定された化合物のトータルイオンクロマトグラム (TIC) およびトータルコンパウンドクロマトグラム (TCC) も含まれます。最後に、図 4 に示すレポートには、 intact 質量でも既知のタンパク質修飾でも対象のタンパク質に一致しなかった不純物が含まれ、工程に関連する不純物がサンプル内に含まれることを示唆しています。

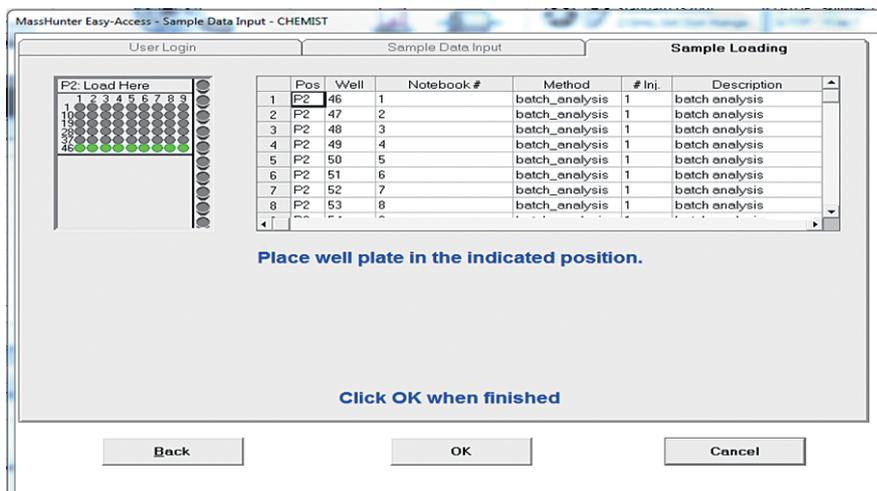


図 3. サンプル位置、ノートブック番号、およびメソッドを示す MassHunter Easy Access ユーザーウィンドウ

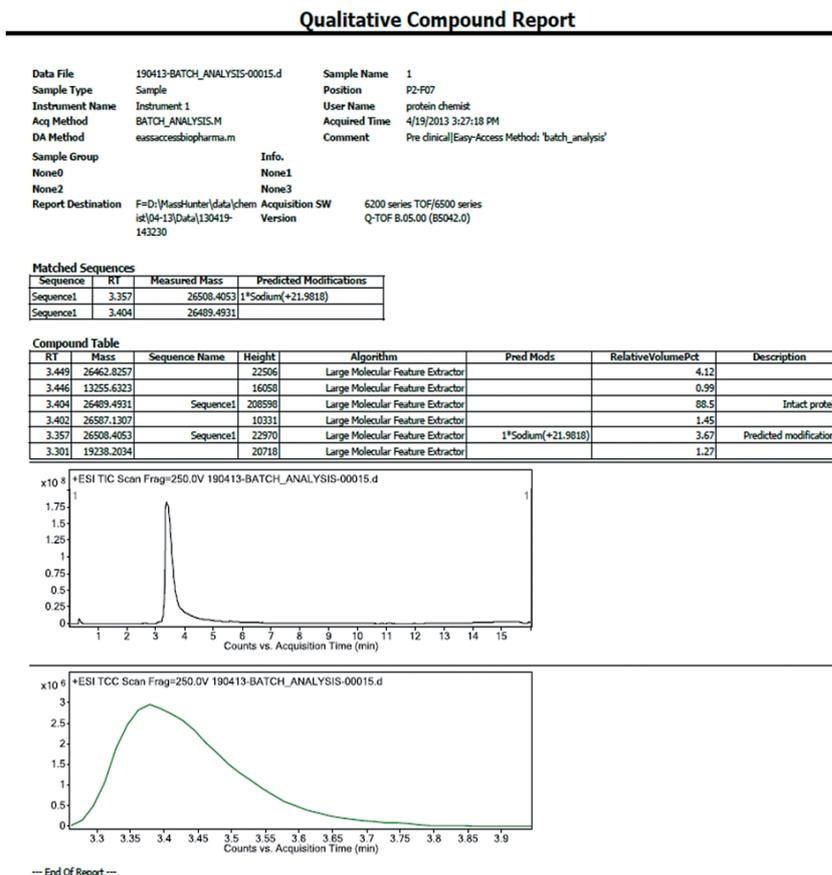


図 4. 修飾/intactタンパク質および不純物を予測するサンプル情報、サンプル位置、およびメソッドを示すカスタムレポート

このようなレポートは、精製や他の処理メソッドを研究者が最適化する場合に役立ち、今後のバッチから製品不純物を除去するために必要な工程の調整を特定することができます。表 2 の結果からわかるように、前臨床サンプルの後に分析した非 GMP および GMP のロットは 100 % の純度を示しました。

## 結論

このアプリケーションノートでは、ロット間精製メソッドの一貫性を示すために Agilent MassHunter Easy Access ソフトウェアを使用する方法について説明しました。Easy Access ソフトウェアは、LC/MS 技術の経験が少ない分析担当者が LC/MS データを解析する際に便利な方法を提供することが証明されました。このソフトウェアは分析時間を短縮し、ラボの生産性を向上します。この分析のデータが示すように、Agilent 1290 Infinity LC を Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS に結合することによって優れた分離と質量真度が実現します。このようなデータはロット間一貫性をサポートし、結果として、必要な工程の調整を決定する際に役立ちます。最後に、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアによりデータの自動抽出、デコンボリューション、およびタンパク質の確認ができます。

表 2. 分析したロットのタンパク質純度

ロット名	純度 * (%)
前臨床	92
非 GMP	100
GMP	100

\*タンパク質の純度には、分析レポートに示すようにタンパク質のすべての分子種 (インタクトおよび付加分子種) が含まれます。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

本資料記載の情報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., 2013  
Published in Japan, December 11, 2013  
5991-3521JAJP



**Agilent Technologies**