

Agilent AssayMAP Bravo および 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF による 宿主細胞タンパク質分析

著者

Linfeng Wu, Shuai Wu and
Te-Wei Chu

Agilent Technologies, Inc.,
Santa Clara, CA, USA

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) などのバイオ医薬品の使用は急速に拡大しています。バイオ医薬品は生物由来であるため、最終製品には複数手順による精製後でも、微量の宿主細胞タンパク質 (HCP) が含まれている場合があります。HCP は製品の安全性と効能に影響を及ぼす可能性があるため、医薬品に含まれる HCP レベルを規制要件¹に従ってモニタリングし、管理する必要があります。治療用タンパク質に含まれる HCP の定量には、以前から、酵素免疫測定法 (ELISA) が標準メソッドとして選ばれています。しかし、ELISA には個々の HCP を同定および定量するための特異性とカバレッジが不足しています。そのため、HCP 分析に LC/MS 手法が選ばれるようになりました。HCP の LC/MS 分析における主な課題点は、医薬品由来の大量のペプチドと低存在量の HCP ペプチドが共溶出することです。つまり、ペプチドに対する優れた分離能と LC/MS システムの広いダイナミックレンジが必要になります。

今回の研究では、自動サンプル前処理に Agilent AssayMAP Bravo プラットフォームを、LC-MS/MS 分析に Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を、データ解析に Protein Metrics 社のベンダーニュートラルなソフトウェアを用いた HCP 分析ワークフロー (図 1) について説明します。AssayMAP Bravo プラットフォームは、タンパク質の消化、脱塩、カートリッジでの高 pH 逆相 (HPRP) 分画などの自動サンプル前処理に使用します。HPRP 分画をする場合としない場合の消化サンプルを LC-MS/MS 分析に供し、プラットフォーム性能を調べました。新しい測定メソッドである反復 MS/MS により、タンパク質同定の改善が示されました。この標準フロー LC/Q-TOF は、広いダイナミックレンジ、優れた再現性、定量機能を有します。実験結果から、2 ppm を超える HCP はすべて、カートリッジでのサンプル分画と反復 MS/MS によって高い信頼性で同定されることが示されました。



図 1. アジレント HCP ワークフローの概要

実験方法

材料

ヒト IgG1 mAb (パートナーから入手した R&D 製品) は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞から産生され、プロテイン A で精製しました。プロテオミクスダイナミックレンジスタンダードセット (UPS2) は Sigma-Aldrich 社から購入しました。

装置構成

- Agilent AssayMAP Bravo システム
- Agilent 1290 Infinity II LC システム (下の機器で構成)
 - Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ G7120A
 - Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ G7167B
 - Agilent 1290 Infinity II サーモスタット付カラムコンパートメント G7116B
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
- Agilent Dual Jet Stream ESI イオン源

サンプル前処理

UPS2 を 1:1,000 の比率で mAb に添加しました。2 つ目のサンプルは UPS2 を添加しない mAb であり、ネガティブコントロールとして同時に調製し、分析しました。このコントロールの分析により、UPS2 タンパク質の同定が、コントロールサンプルの配列ホモログによるものではないことを確認しました。いずれのサンプルも AssayMAP Bravo システムを用いて、還元、アルキル化、トリプシン消化、脱塩を行いました。次にサンプルを分注し、一方を Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを用いて直接 LC-MS/MS 分析に供し、もう一方を AssayMAP Bravo システムによる HPRP メソッドを用いて分画した後、LC-MS/MS 分析に供しました。

HPRP 分画

消化サンプルをアジレントの逆相 (RP-S) カートリッジで 6 つのフラクションに分画しました。AssayMAP Bravo の設定済みの Protein Sample Prep WorkBench Fractionation アプリケーション (図 2) を用いました。RP-S カートリッジはまず、70 % アセトニトリル (ACN)、0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) でプライミングし、0.1 % TFA で平衡化しました。次に、150 µg の消化サンプルを各カートリッジにロードした後、10 mM ギ酸アンモニウムバッファ (pH 10) で ACN を段階的に増やして (10、15、20、25、30、90 %) 6 つのフラクションに溶出しました。

LC/MS 分析

LC 分離は、Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラム (2.1 × 150 mm、2.7 µm、部品番号 675950-902) を用いて、60 分の LC メソッドで流量 0.4 mL/min で実施しました (表 1)。各サンプルは 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムで、従来の自動 MS/MS メソッドまたは反復 MS/MS メソッドを使用して測定しました (表 2)。

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

LC 分析パラメータ	
分析カラム	AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 × 150 mm、2.7 µm (部品番号 675950-902)
移動相 A	H ₂ O、0.1 % ギ酸
移動相 B	90 % ACN、0.1 % ギ酸
流量	0.4 mL/min
グラジエント	1.0 分 - 3 % B 50.0 分 - 21 % B 53.0 分 - 90 % B 55.0 分 - 90 % B 55.1 分 - 3 % B
ストップタイム	60 分
カラム温度	60 °C

表 2. MS パラメータ

MS パラメータ	
ドライガス温度	290 °C
ドライガス流量	13 L/min
ネプライザ	35 psi
ソースガス温度	275 °C
ソースガス流量	12 L/min
Isolation Width (選択幅)	狭い (~ 1.3 m/z)
分析でのダイナミック排除	0.2 分後に 1 スペクトル放出
MS 質量範囲	250 ~ 1,700 m/z
MS 取り込みレート	10 スペクトル/秒
MS/MS 質量範囲	50 ~ 1,700 m/z
MS/MS 取り込みレート	3 スペクトル/秒
取り込みモード	反復 MS/MS または自動 MS/MS
反復 MS/MS	質量誤差許容範囲: 15 ppm RT 排除許容範囲: -0.2 ~ +0.4 分



図 2. 分画アプリケーションのユーザーインターフェースのデフォルト設定

データ処理

生データファイルは Protein Metrics 社のソフトウェアを用いて処理しました。1 つの生データファイルを Preview を用いて検索し、Byonic パラメータを作成します。すべての生データファイルについて、Byonic を用いて mAb および UPS2 タンパク質配列を連動させた Uniprot CHO K1 タンパク質データベースで検索しました。検索パラメータには、半特異的トリプシン消化、最大 2 つの切断ミス、プリカーサ許容範囲 20 ppm、フラグメント許容範囲 30 ppm、固定のシステイン (C) のアルキル化、可逆のメチオニン (M) の酸化、アスパラギン (N) とグルタミン (Q) の脱アミド化、そして Preview 解析で示されたその他種々の可逆修飾などがあります。Byonic の結果ファイルを Byologic にインポートし、タンパク質配列のより小さなセットで詳細を解析して、結果を作成しました。MS2 検索の最少スコアを 150 としてペプチドを検索しました。

結果と考察

反復 MS/MS と自動 MS/MS の比較

Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF システムは、新しいデータ測定メソッドである反復 MS/MS により、存在量の少ないプリカーサイオンの同定を改善します (図 3)。このメソッドを使用して、タンパク質消化サンプルを複数回、LC-MS/MS で分析します。最初の分析はデータ依存型測定による従来の自動 MS/MS で実施しました。次に反復 LC-MS/MS 分析を実施し、MS/MS フラグメンテーション用に事前に選択したプリカーサイオンを、カスタマイズ可能な質量誤差許容範囲およびリテンションタイム排除許容範囲を用いてローリングベースで自動的に排除しました。その結果、より多くのプリカーサイオンに対して LC-MS/MS を自動的に行うことができました。

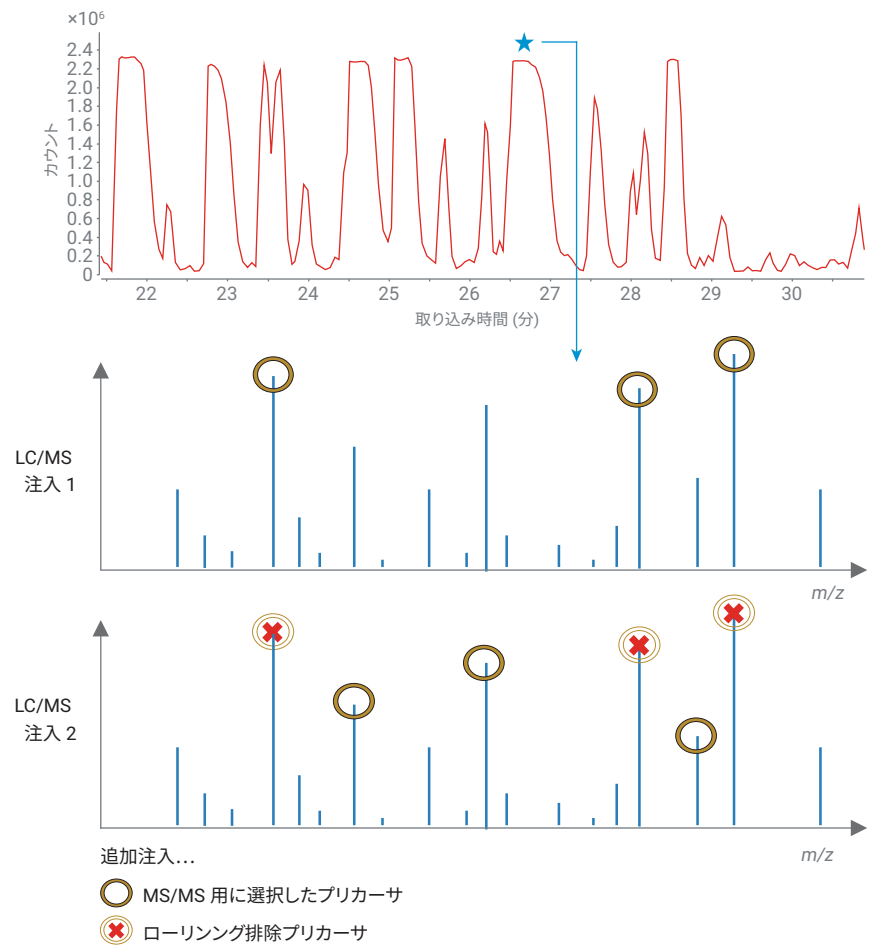


図 3. 自動化された反復 MS/MS 測定メソッドのダイアグラム

まず、オフライン分画のない LC/Q-TOF システムを用いて、反復 MS/MS と自動 MS/MS を比較しました。すなわち、UPS2 を添加した精製 mAb を両方のメソッドで分析しました。UPS2 は、Sigma-Aldrich 社から購入したプロテオミクスダイナミックレンジスタンダードで、500 amole から 50 pmole の 6 つの濃度範囲の 48 種類のヒトタンパク質を含む複雑なタンパク質混合物です。消化前に 1:1,000 の比率 (w/w) で、mAb サンプル

に UPS2 を添加すると、タンパク質レベルは 0.0004 から 313 ppm の範囲となり、19 種類のタンパク質が 1 ppm を超えて存在します。この添加サンプルは、治療用タンパク質に存在する HCP の広いダイナミックレンジを再現したものです。今回の研究で調べるように、異なるメソッドの感度およびダイナミックレンジを評価することもできます。

表 3 に、それぞれの測定メソッドで同定した mAb および UPS2 タンパク質のペプチド配列の総数を示します。同じアミノ酸配列で修飾が異なるペプチドは、1 つのペプチド配列とカウントしました。注入ごとのサンプルロード量は 32 µg で、それぞれの測定メソッドで 3 回の注入を実施しました。全体的に、反復 MS/MS は広いダイナミックレンジにわたって、タンパク質あたりより多くのペプチド配列を同定しました。8 ppm 以上添加したタンパク質はすべて、高い信頼性で同定されました。ここに示した追加の結果のすべては反復 MS/MS で分析しました。

クロマトグラフィーの再現性およびダイナミックレンジ

反復 MS/MS 分析の 3 回の注入で得られた上記データセットを用いてクロマトグラフィーの再現性およびダイナミックレンジについても評価しました。図 4 に、3 回の反復 LC-MS/MS 測定によるベースピーククロマトグラム (BPC) と 4 つの共溶出したプリカーサイオンの抽出イオンクロマトグラムの重ね表示を示します。カラムへのサンプルロード量が多いため、mAb のペプチドからの多くのシグナルにおいて検出器が飽和しました。BPC はプラトーになっています。4 つの共溶

表 3. 反復 MS/MS または自動 MS/MS 測定メソッドで同定したペプチド配列の数

タンパク質アクセッション	分子量 (kDa)	タンパク質添加レベル (ppm)	1 回の測定で 3 回の注入	
			反復 MS/MS	自動 MS/MS
mAb_HC	49.7	NA	419	382
mAb_LC	24.0	NA	201	186
ALBU_HUMAN_spike	66.4	313.0	46	43
CAH2_HUMAN_spike	29.1	137.3	19	15
CAH1_HUMAN_spike	28.7	135.6	9	9
LEP_HUMAN_spike	16.2	76.2	4	1
HBB_HUMAN_spike	15.9	74.8	12	10
HBA_HUMAN_spike	15.1	71.3	7	6
UBIQ_HUMAN_spike	10.6	50.0	6	6
CO5_HUMAN_spike	8.6	40.4	4	4
CATA_HUMAN_spike	59.6	28.1	2	2
SUM01_HUMAN_spike	38.8	18.3	3	1
NQO1_HUMAN_spike	30.7	14.5	2	0
PRDX1_HUMAN_spike	22.0	10.4	3	0
PPIA_HUMAN_spike	20.2	9.5	4	4
MYG_HUMAN_spike	17.1	8.0	2	1

出したペプチドプリカーサイオンについての詳細を表 4 にまとめます。共溶出したペプチドにおいてクロマトグラフィーの優れた再現性が得られ、定量の再現性も極めて広いダイナミックレンジで良好でした (ピーク強度は 6.76×10^3 から 1.38×10^6)。存在量が最も少ない、8 ppm を添加したミオグロ

ビンペプチドの RSD 値は、10.3 % でした。これらのデータより、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムのスペクトル内のダイナミックレンジおよび再現性は良好であることが実証されました。

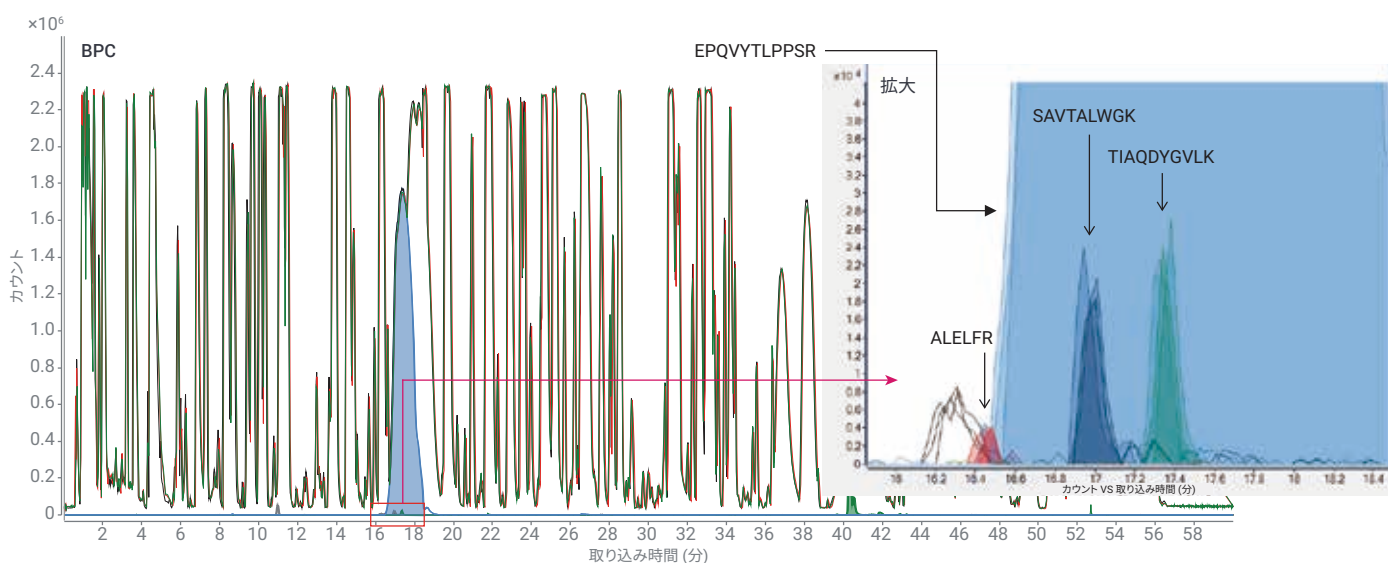


図 4. 3 回の LC-MS/MS 測定の BPC と 4 つの選択したペプチドプリカーサイオンの抽出イオンクロマトグラムの重ね表示

定量

反復 MS/MS 分析の 3 回の注入で得た上記のデータファイルを用いて、ワークフローソリューションの定量機能についても調べました。測定したペプチドすべてを用いて同定した各 UPS2 タンパク質のすべての抽出イオンクロマトグラム (XIC) をサンプル内で最も存在量が多いタンパク質 (ここでは mAb の重鎖) に対して正規化しました。値は Byologic ソフトウェアから直接エクスポートしました。図 5 にタンパク質あたりの正規化した XIC (Y 軸左側、mAb コントロールサンプルは青、UPS2 添加サンプルはオレンジ) と UPS2 添加サンプルの実際のタンパク質レベル (Y 軸右側、緑) を示します。予想どおり、mAb コントロールサンプルには UPS2 タンパク質からの XIC シグナルはありませんでした。よって、今回のワークフローソリューションは高い特異性があることが示されました。UPS2 添加サンプルでは、正規化した XIC は、実際のタンパク質添加レベル (ppm) と相関していました。これらの結果から、Byologic ソフトウェアからの正規化した XIC 値により、HCP 存在量の定量推定値が得られることが示されました。

表 4. 4 つの選択したペプチドプリカーサイオンのデータ

ペプチド	プリカーサイオン (m/z)	質量誤差 (ppm)	強度	強度 %RSD	タンパク質添加レベル (ppm)	タンパク質名
ALELFR	374.7208	-1.1	6.76E+03	10.3 %	8	ミオグロビン
TIAQDYGVLK	554.3049	-1.8	1.51E+05	6.2 %	10.4	ペルオキシレドキシシ 1
SAVTALWGK	466.7659	4.8	1.36E+05	6.0 %	74.8	ヘモグロビンβサブユニット
EPQVYTLPPSR	643.844	1.0	1.38E+08	1.2 %	NA	mAb

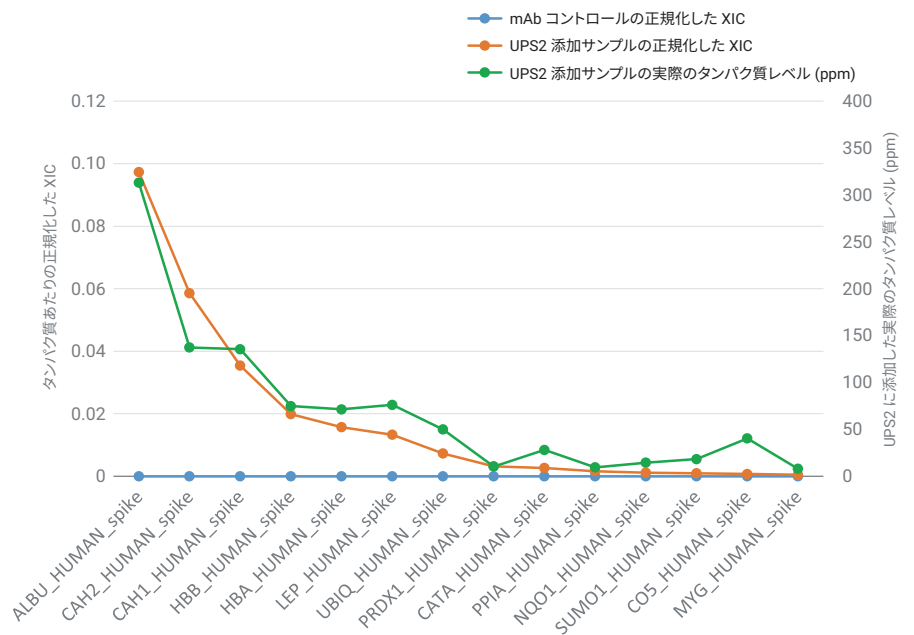


図 5. タンパク質あたりの正規化した XIC と実際に添加した UPS2 レベルの比較。タンパク質あたりの XIC を、mAb 重鎖に対して正規化。mAb コントロールサンプル (青) および UPS2 添加サンプル (オレンジ) の値を UPS2 添加サンプルの実際のタンパク質レベル (緑) とともにプロット

AssayMAP Bravo を用いた HPRP 分画による同定の改善

主要なタンパク質サンプル前処理 (タンパク質消化、ペプチド精製、免疫アフィニティー精製) を Agilent AssayMAP Bravo サンプル前処理プラットフォームと、マイクロクロマトグラフィーカートリッジおよびタスク中心の自動化プロトコル^{2~4}を用いて自動化しました。同じ自動化

プラットフォームで、RP-S カートリッジを用いた HPRP 分画により、同定の感度が向上することが示されました。消化サンプル 150 µg を各 RP-S カートリッジにロードし、使いやすい高 pH 分画のプロトコルで 6 つのフラクションに溶出させました。各フラクションは 2 回の反復 MS/MS 測定で分析しました。図 6 に、分画していないサンプルと RP-S カートリッジで

クロマトグラフィー分離させた HPRP 溶出サンプルを比較した LC-MS/MS 分析の TIC シグナルを示します。

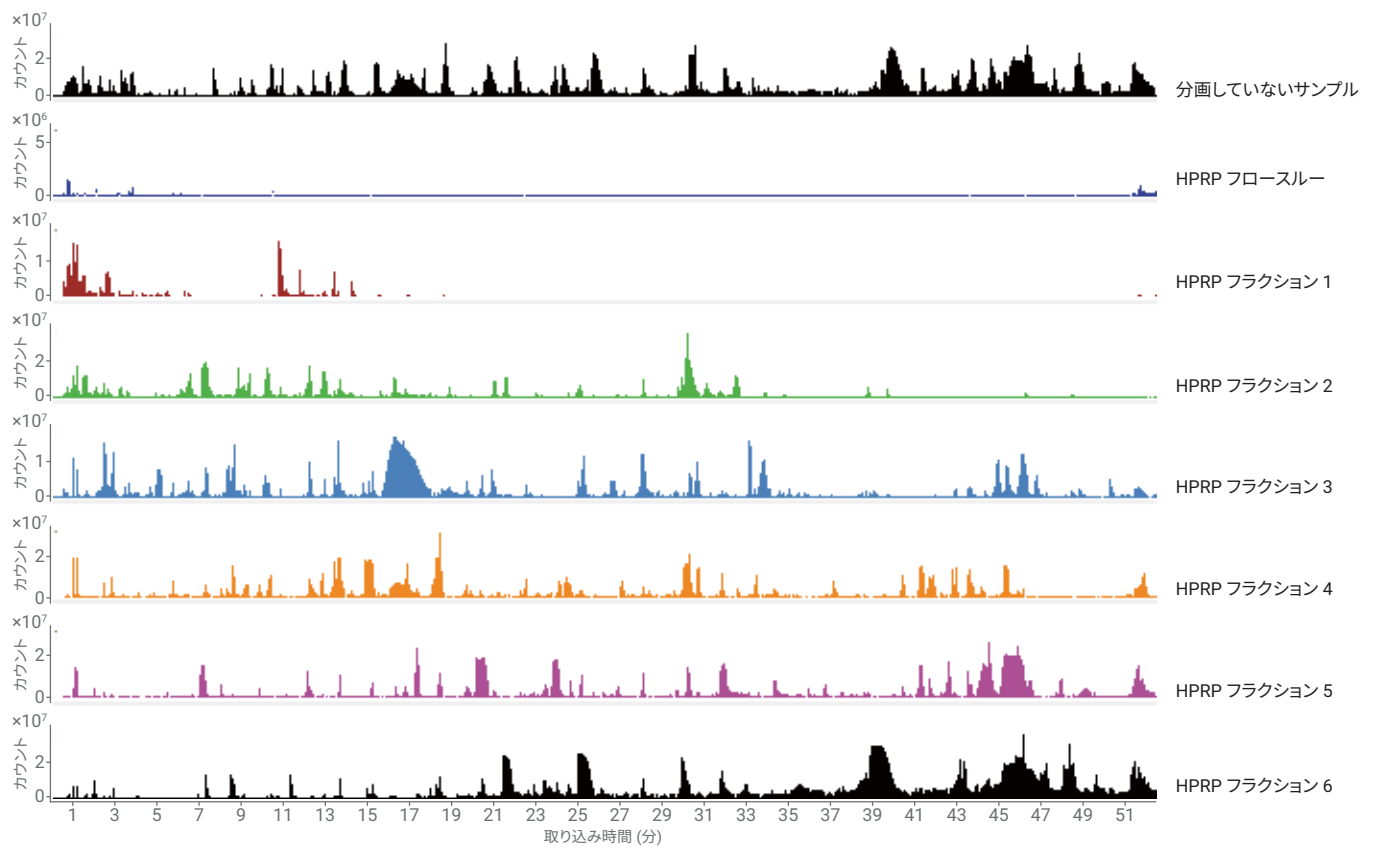


図 6. 分画していないサンプルと HPRP 分画したサンプルの TIC シグナル

添加した存在量の少ないタンパク質由来ペプチドの MS/MS スペクトルは手作業で調べ、高品質のスペクトルで、内因性の CHO HCP からのホモログの汚染がないことを確認しました。2 ppm 以上添加したタンパク質はすべて、高い信頼性で同定されたことから、HPRP 分画により同定の感度が向上することが示されました (表 5、表 3 と比較)。図 7 に、2 ppm 添加したヒト KCRM タンパク質からのペプチド IEEIFK の MS/MS スペクトルの例を示します。

表 5. AssayMAP HPRP 分画後、各フラクションにつき 2 回の反復 MS/MS 測定による UPS2 添加タンパク質由来ペプチド配列の同定

タンパク質アクセッション	分子量 (kDa)	タンパク質添加レベル (ppm)	ペプチド配列の数
ALBU_HUMAN_spike	66.4	313.0	79
CAH2_HUMAN_spike	29.1	137.3	32
CAH1_HUMAN_spike	28.7	135.6	15
LEP_HUMAN_spike	16.2	76.2	6
HBB_HUMAN_spike	15.9	74.8	22
HBA_HUMAN_spike	15.1	71.3	14
UBIQ_HUMAN_spike	10.6	50.0	9
CO5_HUMAN_spike	8.6	40.4	6
CATA_HUMAN_spike	59.6	28.1	14
SUM01_HUMAN_spike	38.8	18.3	11
NQ01_HUMAN_spike	30.7	14.5	8
PRDX1_HUMAN_spike	22.0	10.4	9
PPIA_HUMAN_spike	20.2	9.5	11
MYG_HUMAN_spike	17.1	8.0	2
CYB5_HUMAN_spike	16.0	7.6	2
EGR_HUMAN_spike	6.4	3.0	1
SYHC_HUMAN_spike	58.2	2.7	5
KCRM_HUMAN_spike	43.1	2.0	3

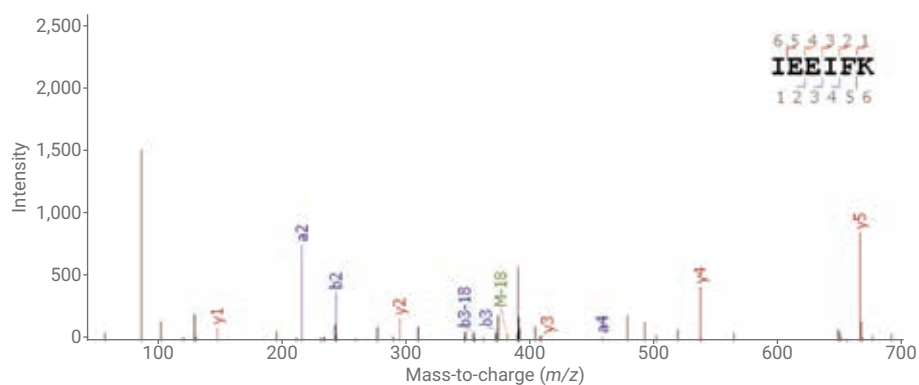


図 7. 2 ppm 添加した KCRM タンパク質由来のペプチド IEEIFK の MS/MS スペクトル

内因性の CHO HCP の同定における HPRP 分画の影響についても調べました。図 8 に、1 % のタンパク質誤同定率において、分画していないサンプルと HPRP 分画したサンプルで同定された CHO タンパク質の数について示します。分画していないサンプルは 3 回の反復 MS/MS 測定、HPRP 分画したサンプルは各フラクションにつき 2 回の反復 MS/MS 測定を実施しました。その結果 HPRP 分画したサンプルは、反復 MS/MS と組み合わせることによって、数が 3 倍以上増加することが示されました (138 対 38)。

以上により、HCP の同定の改善がカートリッジによる HPRP 分画の利点であることが実証されました。

結論

自動サンプル前処理に AssayMAP Bravo プラットフォームを、LC-MS/MS 分析に 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を、データ解析に Protein Metrics のベンダーニュートラルなソフトウェアを用いた宿主細胞タンパク質分析ワークフローについて説明しました。

- マイクロクロマトグラフィーカートリッジとタスク中心の自動化プロトコルを用いた AssayMAP Bravo プラットフォームにより、比類のない再現性、拡張性、柔軟性、使いやすさを備えたサンプル前処理の自動化が実現します。
- 反復 MS/MS により、タンパク質の同定能も改善されます。反復 MS/MS 測定を組み合わせた LC-MS/MS を用いると、8 ppm 以上添加した標準タンパク質すべてが高い信頼性で同定されました。
- 広いダイナミックレンジおよび優れた再現性が標準フロー LC/Q-TOF システムで実証されました。

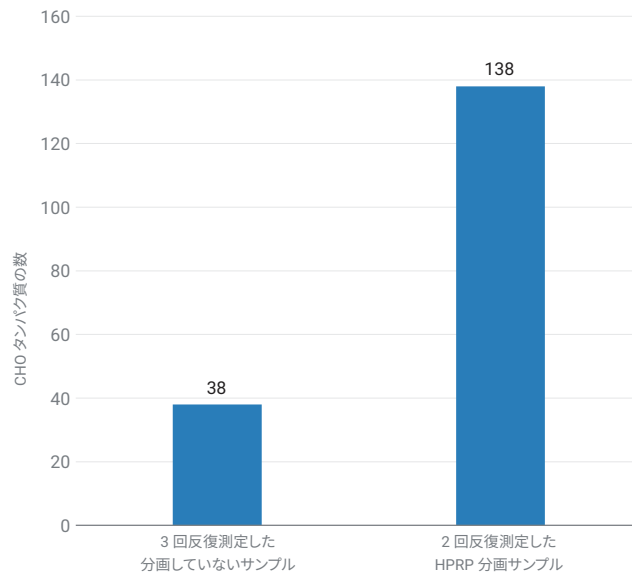


図 8. 同定した内因性の CHO HCP の数について、分画していないサンプルと HPRP 分画後に反復 MS/MS 測定したサンプルとの比較

- AssayMAP Bravo を用いた HPRP 分画も実施すると、2 ppm 以上添加したタンパク質がすべて、高い信頼性で同定されました。
- データ依存型測定により得たデータファイルにより、高速でシンプルなタンパク質の同定と定量が可能になりました。

参考文献

1. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.
2. Automation for LC/MS Sample Preparation: High Throughput In-Solution Digestion and Peptide Cleanup Enabled by the Agilent AssayMAP Bravo Platform. *Agilent Technologies*, publication number 5991-2957EN.
3. Automation of Sample Preparation for Accurate and Scalable Quantification and Characterization of Biotherapeutic Proteins Using the Agilent AssayMAP Bravo Platform. *Agilent Technologies*, publication number 5991-4872EN.
4. Agilent AssayMAP Bravo Technology Enables Reproducible Automated Phosphopeptide Enrichment from Complex Mixtures Using High Capacity Fe(III)-NTA Cartridges. *Agilent Technologies*, publication number 5991-6073EN.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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. 2018
Printed in Japan, July 2, 2018
5991-9300JAJP