

Agilent 1290 Infinity II LC と 6495B トリプル四重極 LC/MS システムによる 宿主細胞タンパク質不純物の定量

著者

Linfeng Wu and Yanan Yang
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

はじめに

宿主細胞タンパク質 (HCP) 不純物は、バイオ医薬品に含まれる製品およびプロセスに起因する低濃度のタンパク質不純物で、製造中の宿主有機物に由来します。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。タンパク質医薬品に含まれる 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、LC/MS 技法が HCP 分析の代替手段となりました。HCP の LC/MS ベースの定量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。したがって、医薬品マトリックスの高いバックグラウンドに含まれる低存在量のペプチドを、優れた感度と再現性で定量する必要があります。

このアプリケーションノートでは、次のステップによる宿主細胞タンパク質の高感度定量のワークフローを解説します。

- AssayMAP Bravo プラットフォームによるサンプル前処理の自動化
 - Agilent 1290 Infinity II LC システムによるサンプル分離
 - Agilent 6495B トリプル四重極によるデータ取り込み
 - Skyline ソフトウェアのアジレント自動化ツールによる MRM メソッド開発
 - Skyline と Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアを組み合わせたデータ解析
- マルチプルリアクションモニタリング (MRM) ベースの同位体希釈メソッドを用いて、HCP を ppm (ng/mg) 以下の低いレベルで正確に定量できることを実証します。

実験方法

装置構成

- Agilent AssayMAP Bravo システム
- Agilent 1290 Infinity II LC システム (以下の機器で構成)
 - Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ
 - Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ
 - Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント
- 6495B トリプル四重極
- Agilent Dual Jet Stream ESI イオン源

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。「重い」安定同位体標識 (SIL) のペプチド標準品は、サードパーティベンダーによってカスタム仕様で合成され、提供されました。すべての SIL ペプチドを HPLC 精製し、LC/MS 分析とアミノ酸分析で純度を測定しました。

サンプル前処理

UPS2 を精製済み mAb に 1:1,000 の比率でスパイクした後、AssayMAP Bravo システムを使用して変性、還元、アルキル化、トリプシン消化しました。SIL ペプチドを等モルで混合し、8 種類の濃度 (各 SIL ペプチドについて 6.25、12.5、25、62.5、125、250、12,500、125,000 amol/μg) でサンプル消化物にスパイクして、検量線分析で使用します。

LC/MS 分析

サンプルの分析には、6495B トリプル四重極 LC/MS のダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) モードで、9 分間の LC グラジエントを使用しました (表 1 および 2)。Skyline と Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアに統合されたアジレントの自動化ツールを用いて、LC-dMRM メソッドを自動的に最適化しました。

データ処理

MassHunter ワークステーションソフトウェアと Skyline ソフトウェアを使用して、ペプチド定量のためのデータ解析を実行しました。

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	電荷表面を持つ逆相 C18 カラム
移動相 A	H ₂ O、0.1 % 酢酸
移動相 B	90 % アセトニトリル水溶液、0.1 % 酢酸
流量	0.5 mL/min
注入量	20 μL
グラジエント	0 分 → 3 % B 1 分 → 3 % B 10 分 → 21 % B 10.5 分 → 90 % B 12 分 → 90 % B 12.5 分 → 3 % B
ストップタイム	13 分
ポストタイム	1 分
カラム温度	60 °C

表 2. 6495B トリプル四重極 dMRM メソッド

パラメータ	設定
イオンモード	Jet Stream、ポジティブ
ガス温度	150 °C
ドライガス流量	19 L/min
ネブライザガス	35 psi
ソースガス温度	250 °C
ソースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	4,000 V
ノズル電圧	0 V
高/低圧 RF 電圧	200/110 V
デルタ EMV	200 V
Q1 および Q3 分解能	Unit/Unit
サイクル時間	500 ms
最小/最大ドウェルタイム	28.85 ms/60.39 ms

結果と考察

LC-dMRM メソッド開発

HCP 分析における定量性能を評価するために、酵素消化の前に UPS2 タンパク質標準を精製済み mAb に 1:1,000 (w/w) の比率でスパイクした結果、タンパク質濃度は 0.0004 ~ 313 ppm (ng/mg) となりました。次に、AssayMAP Bravo 自動化システムでサンプルの変性、還元、アルキル化、トリプシンによる消化処理を行いました。この消化サンプルは、後の実験の中で mAb バックグラウンドマトリックスとして使用しました。同じスパイクサンプルで実施した過去の HCP 同定の研究²を基に、ターゲットを絞った定量として 3 種類のペプチドを選択しました。そのうち 2 種類は UPS2 タンパク質 (SUM01 と SYHC) と一致するペプチドで、1 種類は内因性の CHO HCP のタンパク質 S100-A11 と一致するペプチドでした (表 3)²。SIL ペプチド標準は、すべてのペプチドが 95 % 以上の純度です。

荷電表面を持つ逆相 C18 カラムで 9 分間の LC 分離を実行しました²。MassHunter および Skyline 自動化ワークフローにより、LC-dMRM メソッドを最適化しました (図 1)。このワークフローでは、まず対象のペプチドとトランジションイオンを Skyline ソフトウェアで作成しました。アジレントの自動化ツールを使用して、MRM メソッドとワークリストを自動的に作成して実行し、ペプチドのリテンションタイムの決定、トランジションのコリジョンエネルギーの最適化、データ解析、最終 LC/MS メソッドのエクスポートを行いました³。

表 3. ターゲットタンパク質、ペプチド、トランジション

ターゲットタンパク質	タンパク質源	タンパク質の濃度 (ng/mg)	ターゲットのペプチド配列	SIL ペプチド純度 (%)	モニタリングされたトランジション (m/z)
SUM01_HUMAN	UPS2 タンパク質標準	18.3	LLEYLEEK	98.2	575.3 → 1036.6 575.3 → 923.5 575.3 → 810.4 575.3 → 681.3
					579.3 → 1044.6 579.3 → 931.5 579.3 → 818.4 579.3 → 689.4
SYHC_HUMAN	UPS2 タンパク質標準	2.7	VFDVIIR	96.2	431.3 → 762.5 431.3 → 615.4 431.3 → 500.4 431.3 → 401.3
					436.3 → 772.5 436.3 → 625.4 436.3 → 510.4 436.3 → 411.3
Protein S100-A11 (G3HUU6)	CHO 細胞	該当なし	DPGVLDLDR	95.1	386.2 → 656.4 386.2 → 559.3 386.2 → 502.3 386.2 → 403.2
					391.2 → 666.4 391.2 → 569.3 391.2 → 512.3 391.2 → 413.2

Agilent Automation ツールを使用した、簡易な 3 ステップの自動化 MRM 測定

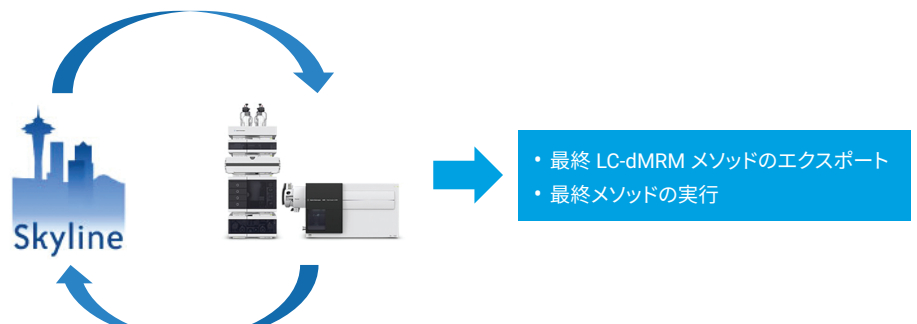
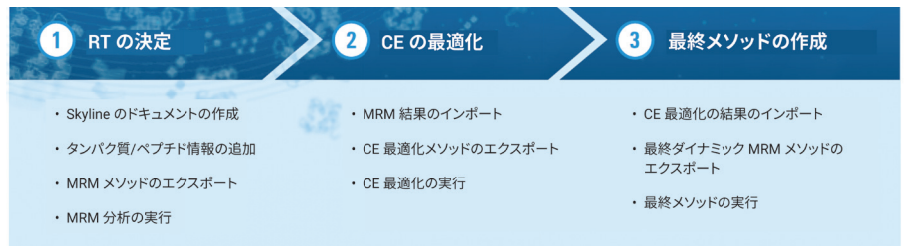


図 1. Skyline でのアジレントの自動化ツール

mAb マトリックス中の SIL ペプチド 標準の定量

3 種類の SIL 標準の定量に必要な感度性能を mAb バックグラウンドマトリックス中で評価しました。ブランク注入によってシステムをクリーンアップした後、6.25 amol/μg ~ 125 fmol/μg のすべての濃度で、1 回のサンプルロード量を 8 μg として繰り返し注入 (n = 7) を実行しました (表 4 ~ 6)。すべてのターゲットタンパク質について、標準検量線が 1 ppm 未満の低い濃度から 1,000 ppm を超える濃度までの範囲となり、HCP 分析に関連する広い範囲がカバーされています。リテンションタイム (RT) の再現性はすべてのサンプル (n = 56) で求め、ピーク面積の再現性と定量の正確度 (真度) は濃度ごとに求めました。

- テスト対象のレベルで示された優れた直線性。LLLEYLEEK は $R^2 = 0.9996$ 、VFDVIIR は $R^2 = 0.9983$ 、DPGVLDR は $R^2 = 0.9996$ (図 2B ~ 4B)
- 低い定量下限 (LLOQ) のレベルを含め、すべてのレベルにおいて非常に優れた精度と真度 (表 4 ~ 6)
- 3 種類のタンパク質すべてにおいて ppm 以下の LLOQ での低レベルの感度 (図 2A ~ 4A と表 4 ~ 6、SUMO1_HUMAN は 0.24 ppm、SYHC_HUMAN は 0.7 ppm、CHO Protein S100-A11 は 0.13 ppm)
- SIL ペプチド DPGVLDR では、バックグラウンドマトリックス中に多少の干渉があったものの、対象の CHO タンパク質 S100-A11 で、0.065 ppm の検出下限 (LOD) と 0.13 ppm の LLOQ を達成 (図 4A)
- 56 回の注入すべてにわたり優れた RT の再現性 (LLLEYLEEK は RSD = 0.06 %、VFDVIIR は 0.07 %、DPGVLDR は 0.32 %)

この実験では、8 μg 以上とロード容量が大きいカラムを使用しました^{2, 4}。したがって、必要に応じてカラムへのサンプルロード量を増やす

ことにより、LLOQ をさらに下げられる可能性があります。

表 4. mAb マトリックス中の SIL ペプチド LLLEYLEEK の精度と真度

ターゲットタンパク質	SUMO1_HUMAN		
タンパク質の MW	38,815 Da		
ペプチド配列	LLLEYLEEK		
SIL ペプチド濃度 (amol/μg)	% RSD (n = 7)	% 真度	タンパク質濃度* (ppm)
6.25	17.0	110.3	0.24
12.5	17.3	107.1	0.48
25	10.7	96.8	0.95
62.5	10.5	91.6	2.38
125	5.7	93.8	4.77
250	3.3	91.7	9.53
12,500	2.8	100.9	476.45
125,000	2.1	99.9	4,764.54

* SIL ペプチド純度で調整

表 5. mAb マトリックス中の SIL ペプチド VFDVIIR の精度と真度

ターゲットタンパク質	SYHC_HUMAN		
タンパク質の MW	58,233 Da		
ペプチド配列	VFDVIIR		
SIL ペプチド濃度 (amol/μg)	% RSD (n = 7)	% 真度	タンパク質濃度* (ppm)
12.5	14.1	98.2	0.70
25	9.9	100.3	1.40
62.5	7.5	83.4	3.50
125	3.3	85.4	7.00
250	4.5	82.4	14.01
12,500	2.8	93.7	700.25
125,000	3.8	100.7	7,002.52

* SIL ペプチド純度で調整

表 6. mAb マトリックス中の SIL ペプチド DPGVLDR の精度と真度

ターゲットタンパク質	Protein S100-A11 (G3HUU6)		
タンパク質の MW	11,241 Da		
ペプチド配列	DPGVLDR		
SIL ペプチド濃度 (amol/μg)	% RSD (n = 7)	% 真度	タンパク質濃度* (ppm)
12.5	8.3	106.9	0.13
25	10.8	112.3	0.27
62.5	10.3	102.9	0.67
125	8.7	89.0	1.34
250	7.4	93.2	2.67
12,500	1.2	95.3	133.63
125,000	0.9	100.5	1,336.27

* SIL ペプチド純度で調整

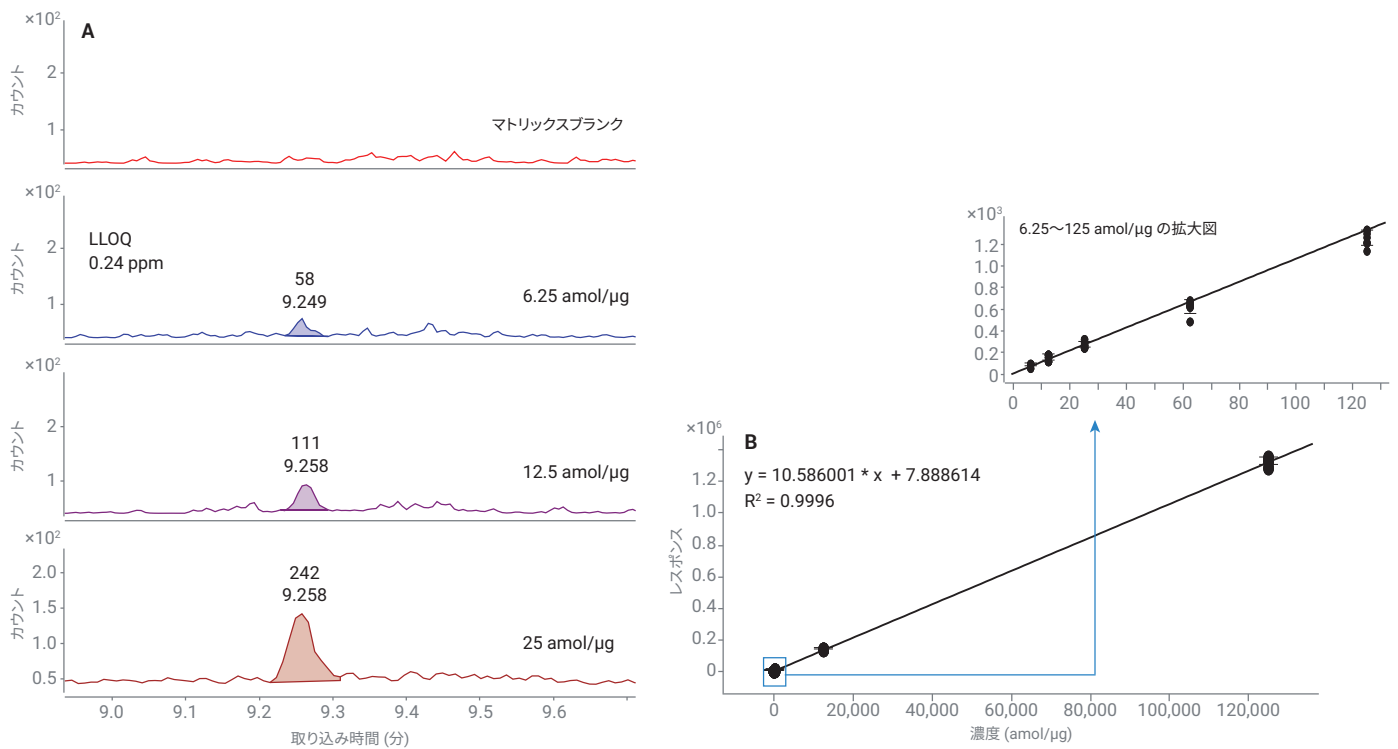


図 2. トリプシン処理済み mAb マトリックス中の重いペプチド標準 LLEYLEEK の定量結果。A) LLOQ を示す抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示。B) 標準検量線と 6.25 ~ 125 amol/μg の範囲で検量線を拡大した挿入図

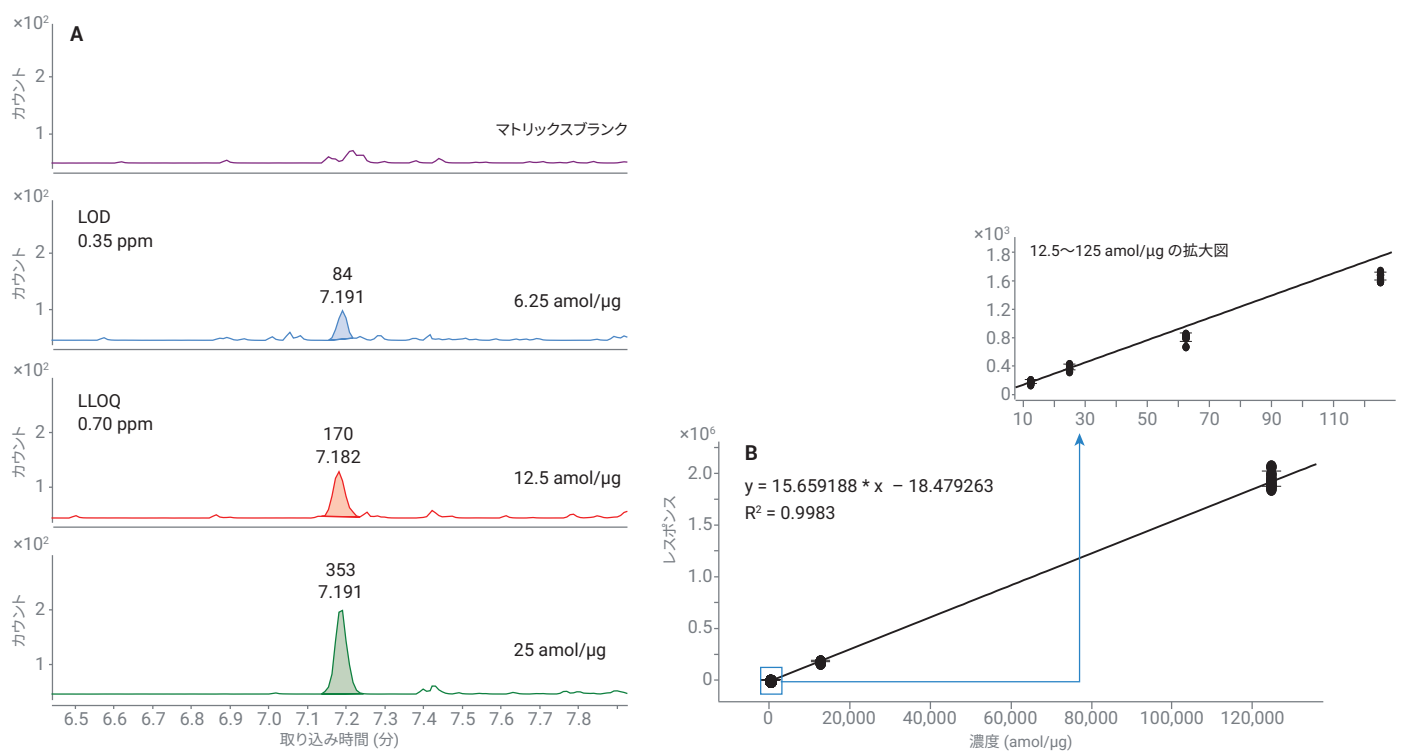


図 3. トリプシン処理済み mAb マトリックス中の重いペプチド標準 VFDVIR の定量結果。A) LOD と LLOQ を示す抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示。B) 標準検量線と 12.5 ~ 125 amol/μg の範囲で検量線を拡大した挿入図

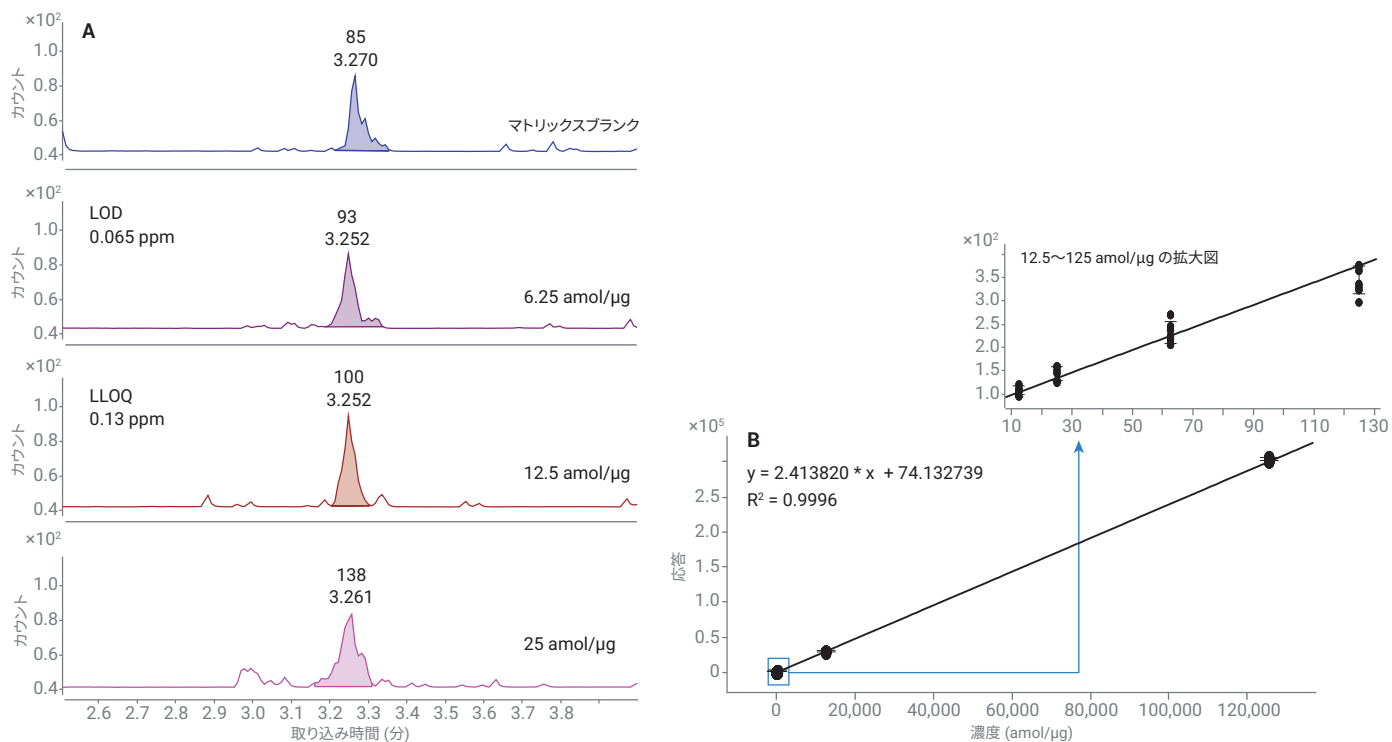


図 4. トリプシン処理済み mAb マトリックス中の重いペプチド標準 DPGVLDL の定量結果。A) LOD と LLOQ を示す抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示。B) 標準検量線と 12.5 ~ 125 amol/μg の範囲で検量線を拡大した挿入図

タンパク質の絶対定量

HCP の不純物濃度は、バイオ医薬品の製造工程においてモニターされ、管理されています。このプロセスでは、HCP の絶対濃度の測定が重要です。適切なリファレンス標準が入手可能な場合は、MS ベースの分析によってきわめて明確かつ正確な結果を得られます。MS によるタンパク質の絶対定量では一般に、サンプル処理の早い段階で SIL バージョンのターゲットタンパク質をサンプルに追加します。しかし、SIL タンパク質はあまり市販されておらず、カスタム仕様の合成は非常に高価です。代替として、トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列を含む SIL ペプチドが、タンパク質の絶対定量に使用されてきました⁵。SIL ペプチド手法では、タンパク質の絶対定量にサ

ロゲートペプチドが選択されます。一般的には、一致した配列を持つ SIL ペプチドが、タンパク質消化の後にサンプルに追加されます。SIL ペプチドは、サンプル前処理中に生じ得るタンパク質の損失に対して濃度を補正することができず、プロテアーゼの消化ステップの収率も考慮されません。したがって、多くの場合、SIL ペプチドメソッドによって計算されたタンパク質濃度は、実際のタンパク質濃度よりも低くなります。

この研究では、SIL ペプチドを用いて 3 種類のターゲットタンパク質の絶対定量を実行しました。スパイクしたタンパク質のうち SUMO1 と SYHC の 2 種類について、絶対定量の精度を評価するために、標準分析法（サンプル消化の前に追加した mAb 中の UPS2 タンパク質標準）と比較しました。図 5 に、mAb マトリックス中の LLLLEYLEEK、VFDVIIR、DPGVLDL の 3 ペアの軽いペプチドと重いペプチドのクロマトグラムを示します。図 6 に、重い SIL ペプチドを 250 amol/μg でスパイクした 3 ペアについて、軽いペプチドと重いペプチドのピーク面積の比較を示します。

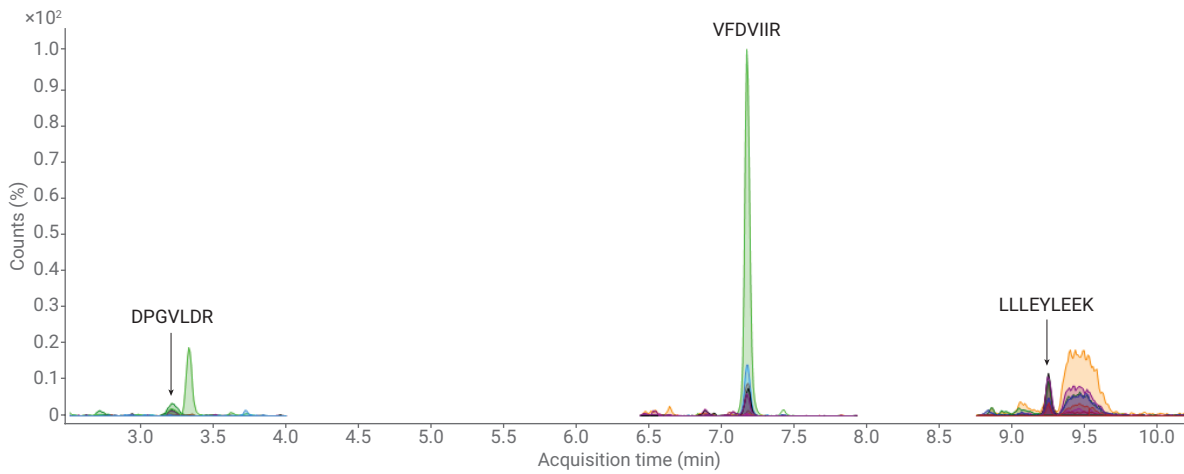


図 5. 重い SIL ペプチドを内部標準として使用し測定したタンパク質の絶対定量。トリプシン処理済み mAb マトリックス中の LLEYLEEK、VFDVIIR、DPGVLDLDR の 3 ペアの軽いペプチドと重いペプチドのクロマトグラム

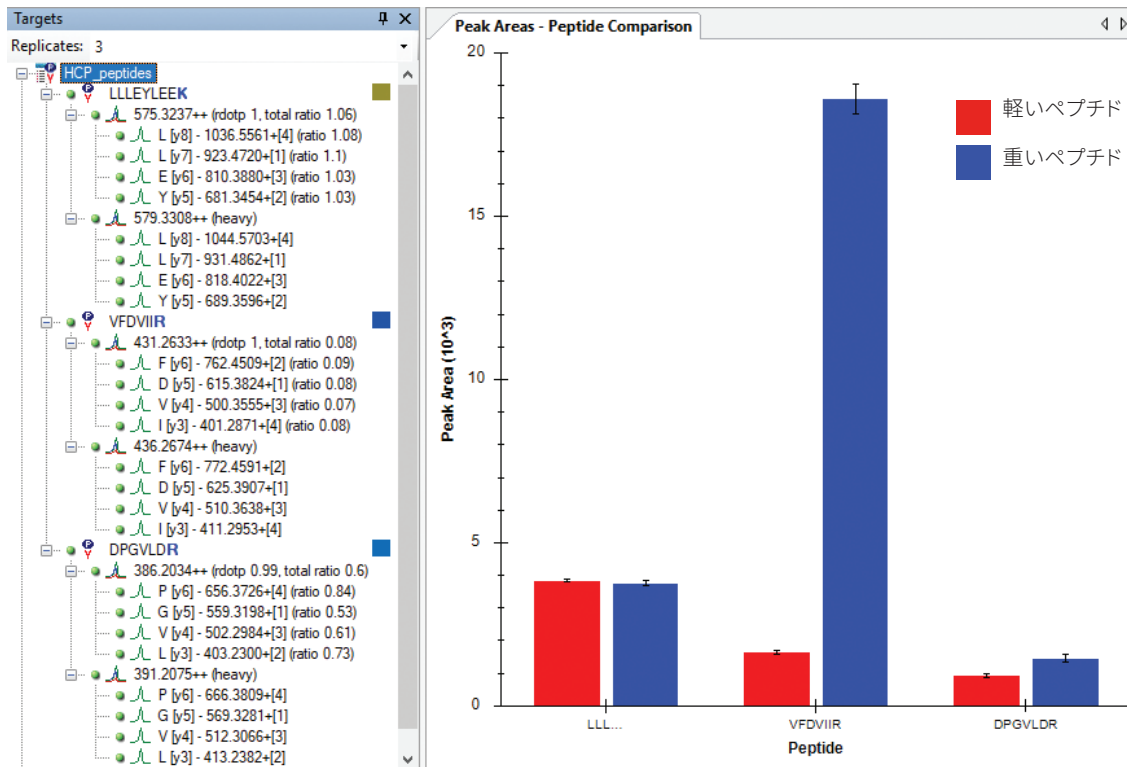


図 6. SIL ペプチドを 250 amol/μg でスパイクした mAb マトリックス中の 3 種類のターゲットペプチドの軽いペプチドと重いペプチドのピーク面積の比較

表 7. mAb マトリックス中の 3 種類のターゲットタンパク質のスパイク時の絶対濃度と測定された絶対濃度の比較

ターゲットタンパク質	SUMO1_HUMAN	SYHC_HUMAN	Protein S100-A11 (G3HUU6)
タンパク質の MW (Da)	38,815	58,233	11,241
ペプチド配列	LLEYLEEK	VFDVIIR	DPGVLDLDR
スパイク時の濃度 (ppm)	18.3	2.7	NA
測定された濃度 (ppm)	10.1	1.2	1.6

表 7 に、mAb マトリックス中の 3 種類のターゲットタンパク質について、スパイク時の絶対濃度と測定された絶対濃度の比較を示します。内因性の CHO HCP、タンパク質 S100-A11 は、この実験で 1.6 ppm と計算されました。SUM01 および SYHC タンパク質標準のスパイク時の濃度はそれぞれ 18.3 および 2.7 ppm で、測定されたタンパク質濃度はそれぞれ 10.1 および 1.2 ppm でした。予想どおり、SIL ペプチド手法ではタンパク質濃度が過小評価 (約 50 %) されました。この結果は他のレポート^{6,7}とも一致しています。これらの結果は、タンパク質の絶対定量に SIL ペプチド手法を使用する場合、正確な絶対定量を得るには、ターゲットペプチドのタンパク質消化からの回収率を評価する必要があることを示唆しています。さらに、絶対タンパク質濃度をサンプル間と実験間で比較するには、再現性の高いサンプル前処理ステップをラボで維持することが重要です。AssayMAP Bravo と LC/MS サンプル前処理用のツール群が、この目標を達成する上で役立つ可能性があります^{8,9}。

結論

アジレントの HCP 定量用ワークフローソリューションの性能を実証しました。このソリューションの内容は次のとおりです。

- AssayMAP Bravo プラットフォームによるサンプル前処理の自動化
- 1290 Infinity II LC システムによるペプチド分離
- 6495B トリプル四重極によるデータ取り込み

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, November 7, 2018

5994-0288JAJP

- Skyline ソフトウェアの自動化ツールによる MRM メソッド開発
- Skyline と MassHunter ソフトウェアを組み合わせたデータ解析

次のことが確認されました。

- タスク重視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を実現できました。
- 次世代 UHPLC である Agilent 1290 Infinity II LC システムにより、クロマトグラフィー分離能とリテンションタイム精度が向上します。
- アジレントの自動化ツールを用いて Skyline ソフトウェアと MassHunter ソフトウェアをシームレスに統合することで、LC-dMRM メソッドを最適化するシンプルなソリューションを実現できます。
- 6495B トリプル四重極 LC/MS を用いて、HCP を 1 ppm 未満のレベルで正確に定量できることが示されました。
- Skyline と MassHunter ソフトウェアを組み合わせることで、ターゲットデータ解析のための優れたツールが得られました。

参考文献

1. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.
2. Host Cell Protein Analysis Using Agilent AssayMAP Bravo and 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF *Agilent Technologies*, publication number 5991-9300EN.

3. Agilent Triple Quadrupole LC/MS Peptide Quantitation with Skyline. *Agilent Technologies*, publication number 5990-9887EN.
4. Separation of Peptide Standards Using Formic Acid as a Mobile Phase Additive. *Agilent Technologies*, publication number 5991-8597EN.
5. Gerber, S. A.; et al. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2003**.
6. Oeckl, P.; Steinacker, P.; Otto, M. Comparison of Internal Standard Approaches for SRM Analysis of Alpha-Synuclein in Cerebrospinal Fluid. *J. Proteome Res.* **2018**.
7. Brun, V.; et al. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics* **2007**.
8. 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.
9. 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.