

Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS による宿主細胞タンパク質不純物の定量

著者

Linfeng Wu
Agilent Technologies, Inc.,

概要

このアプリケーションノートでは、mAb 製品に含まれる ppm 未満の宿主細胞タンパク質を定量するメソッドについて説明します。このワークフローでは Agilent AssayMAP Bravo プラットフォーム、Agilent 1290 Infinity II LC、および Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS を使用しました。

はじめに

宿主細胞タンパク質 (HCP) 不純物は低濃度のタンパク質不純物で、バイオ医薬品の製造プロセス中の宿主生物に由来します。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 濃度を規制要件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 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、下記のステップによる宿主細胞タンパク質の高感度定量の包括的なワークフローソリューションについて解説します。

- Agilent 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 によるサンプル分離
- Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS 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
- Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアおよび Skyline ソフトウェアを用いたデータ処理

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) 未満の低い濃度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 (G5571AA)
- Agilent 1290 Infinity II LC システム (以下の機器で構成されます)
 - Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル (G7167B)、サンプル冷却オプション (オプション #100) 付
 - 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 6495C トリプル四重極 LC/MS
- Agilent Jet Stream ESI ソース (G1958-65138)

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。「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 (表 1)。すべての SIL ペプチドを HPLC 精製し、LC/MS とアミノ酸分析で純度を検定しました。

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

LC 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

サンプル前処理

mAb サンプルは、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 ペプチドを等モル濃度で混合し、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、定量分析で使用しました。

LC/MS 分析

サンプルの分析には、6495C トリプル四重極 LC/MS の 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 にクロマトグラフィーと質量分析の実験条件の詳細を示します。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

Agilent 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 2. Agilent 6495C 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	JetStream、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
シースガス温度	250 °C
シースガス流量	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、精製した mAb を、AssayMAP Bravo 自動化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。得られたサンプル消化物は、後の実験で mAb バックグラウンドマトリックスとして使用しました。3 種類の SIL 標準ペプチドを検量線分析用のサンプル消化物にスパイクしました。この標準ペプチドのうち 2 種類は 2 つの混入タンパク質 (SUMO1 と SYHC) と一致するペプチドで、1 種類は内因性の HCP、CHO のタンパク質 S100-A11 と一致するペプチドでした (表 3)²。すべての SIL ペプチド標準は、95% 以上の純度です。

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。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、コリジョンエネルギーの最適化、データ解析、最終 LC/MS メソッドへのエクスポートを行いました³。

mAb マトリックス中の SIL ペプチド標準の定量

3 種類の SIL ペプチド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 = 5) を実行しました (表 4)。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 = 40) で求め、ピーク面積の再現性と定量の正確度は濃度ごとに求めました。

アジレントの自動化ツールを用いた 3 つの簡単なステップでの自動化 MRM 測定

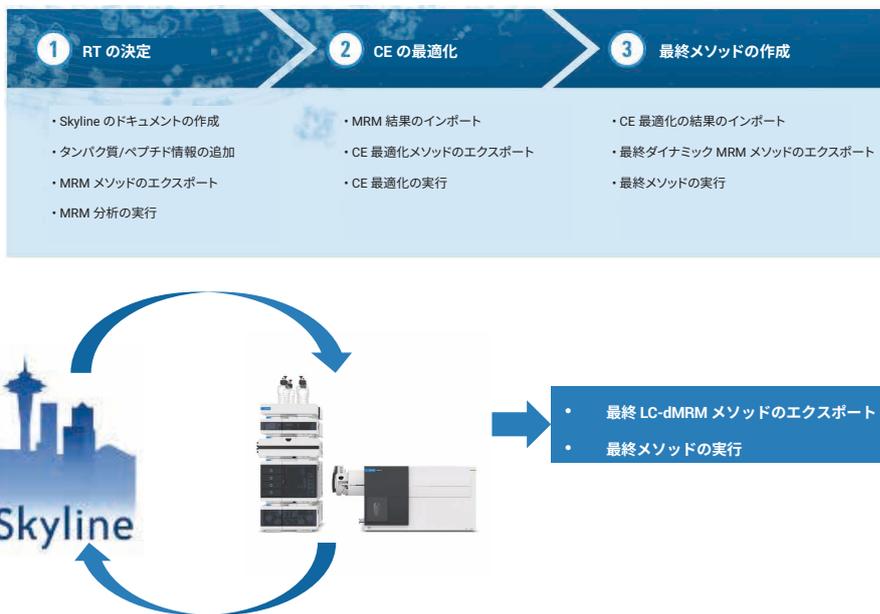


図 1. Skyline でのアジレントの自動化ツール

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	タンパク質の由来	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)
SUMO1_HUMAN	UPS2 タンパク質標準	LLLEYLEEK	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	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	DPGVLDR	95.1	386.2 → 559.3
				386.2 → 502.3
				386.2 → 403.2
				391.2 → 569.3
				391.2 → 512.3
391.2 → 413.2				

- 測定した濃度で示された優れた直線性。LLLEYLEEK は $R^2 = 0.9993$ 、VFDVIIR は $R^2 = 0.9990$ 、DPGVLDR は $R^2 = 0.9995$ (図 2A ~ 4A)
- 定量下限 (LLOQ) の濃度を含め、すべての濃度において非常に優れた精度と正確度 (表 4)
- 3 種類のタンパク質すべてにおいて LLOQ が ppm 未満という低濃度での高感度 (図 2B ~ 4B と表 4、SUMO1_HUMAN は 0.48 ppm、SYHC_HUMAN は 0.7 ppm、CHO のタンパク質 S100-A11 は 0.13 ppm)
- SIL ペプチド VFDVIIR および DPGVLDR では、バックグラウンドマトリックス中に多少の干渉はあったものの、ターゲットタンパク質で ppm 未満の LLOQ を達成 (図 3B および 4B)
- 40 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 $RSD = 0.08\%$ 、DPGVLDR は $RSD = 0.47\%$)

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。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 ペプチドの精度と正確度。赤色で示す部分が LLOQ 濃度です。

タンパク質名 / 分子量	SUMO1_HUMAN / 38,815 Da			SYHC_HUMAN / 58,233 Da			Protein S100-A11 (G3HUU6) / 11,241 Da		
	LLLEYLEEK			VFDVIIR			DPGVLDR		
ペプチド配列									
Sil ペプチド添加濃度 (amol/ μg)	%RSD (n=5)	% 正確度	タンパク質濃度* (ppm)	%RSD (n=5)	% 正確度	タンパク質濃度* (ppm)	%RSD (n=5)	% 正確度	タンパク質濃度* (ppm)
6.25	11.3	144.0	0.24	18.1	160.1	0.35	15.8	137.5	0.07
12.5	14.5	110.2	0.48	3.3	114.8	0.70	8.2	106.2	0.13
25	3.4	98.2	0.95	8.7	92.9	1.40	8.3	103.2	0.27
62.5	1.5	84.2	2.38	3.7	80.5	3.50	5.3	82.9	0.67
125	4.0	80.3	4.77	2.7	80.1	7.00	9.0	87.8	1.34
250	2.2	81.5	9.53	3.1	80.1	14.01	4.9	88.1	2.67
12,500	2.3	94.0	476.45	1.2	90.9	700.25	1.2	93.8	133.63
125,000	1.9	100.7	4,764.54	0.6	101.0	7,002.52	0.6	100.7	1,336.27

* SIL ペプチド純度で調整

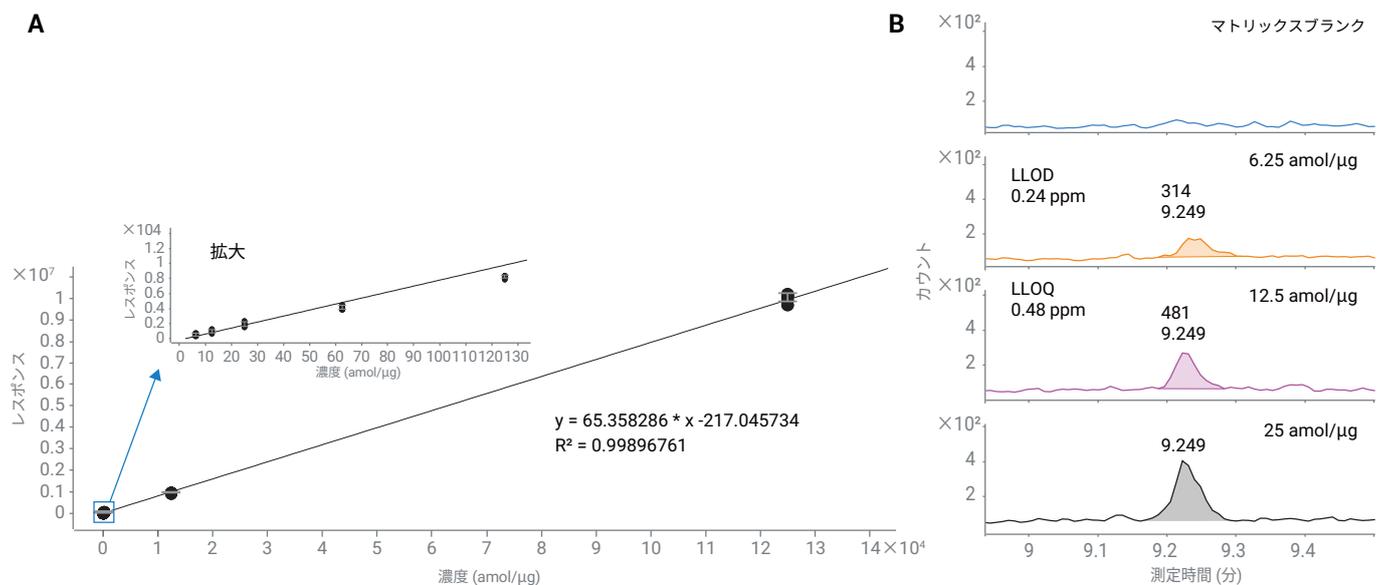


図 2. トリプシン処理済み mAb マトリックス中の重いペプチド標準 LLLEYLEEK の定量結果。A) 標準検量線と低濃度での検量線を拡大した挿入図。B) LOD と LLOQ を示す抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示

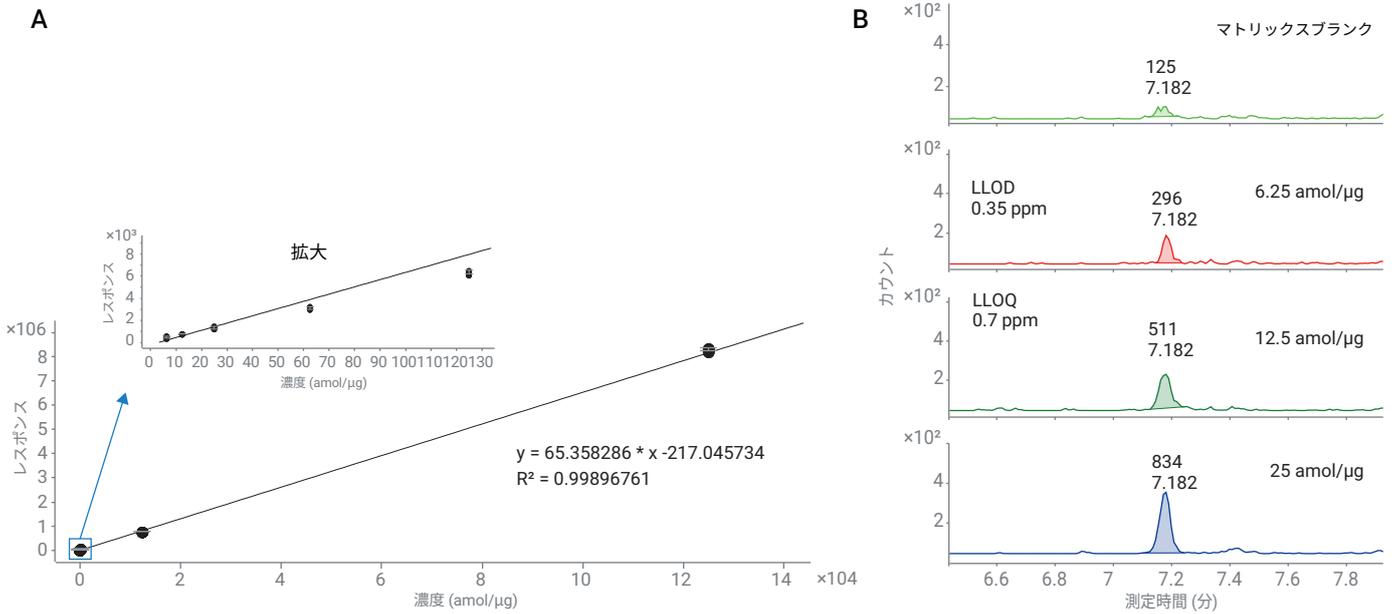


図 3. トリプシン処理済み mAb マトリックス中の重いペプチド標準 VFDVIIR の定量結果。A) 標準検量線と低濃度での検量線を拡大した挿入図。B) LOD と LLOQ を示す抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示

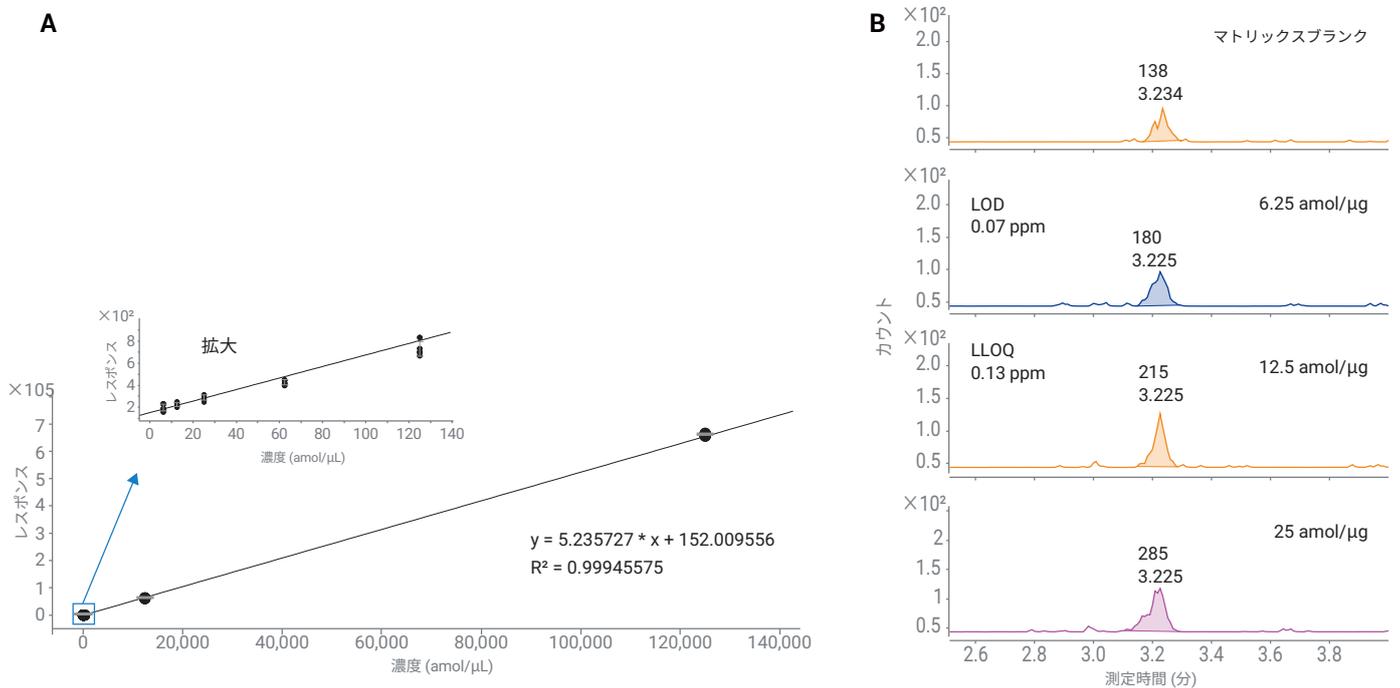


図 4. トリプシン処理済み mAb マトリックス中の重いペプチド標準 DPGVLDR の定量結果。A) 標準検量線と低濃度での検量線を拡大した挿入図。B) LOD と LLOQ を示す抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示

タンパク質の絶対定量

宿主細胞タンパク質の不純物濃度は、バイオ医薬品の製造工程においてモニタリングされ、管理されています。このプロセスで重要となるのは、対象となる HCP の絶対濃度の測定です。適切なリファレンス標準が入手可能な場合、MS ベースの分析によってきわめて特異的かつ正確な結果を得られます。入手可能性とコストのため、対象となるタンパク質の配列と一致する SIL 標準ペプチドが絶対定量に広く使用されてきました。

以前の HCP の探索研究² で同定した内因性の HCP、CHO のタンパク質 S100-A11 の絶対定量を実施しました。2 つの方法で絶対タンパク質濃度を計算しました。最初の方法では、内因性のペプチド DPGVLRD から平均レスポンスと、図 4A の標準検量線の式を用いて、絶対ペプチド濃度を求めました。2 つ目の方法では、同じ LC/MS 分析での軽いペプチドと重いペプチドのレスポンス比を用いて、内因性のペプチド濃度を求めました (図 5)。予測どおり、この 2 つの方法で CHO のタンパ

ク質 S100-A11 のタンパク質濃度は同等でした (1.05 対 1.47 ppm)。これらの結果によって、以下のことが確認できました。

- Agilent HCP 探索ワークフローにより、1 桁の ppm という低濃度で HCP を同定できます²。
- 6495C トリプル四重極 LC/MS システムでは、低濃度のペプチド定量において信頼性が高い結果を得られます。

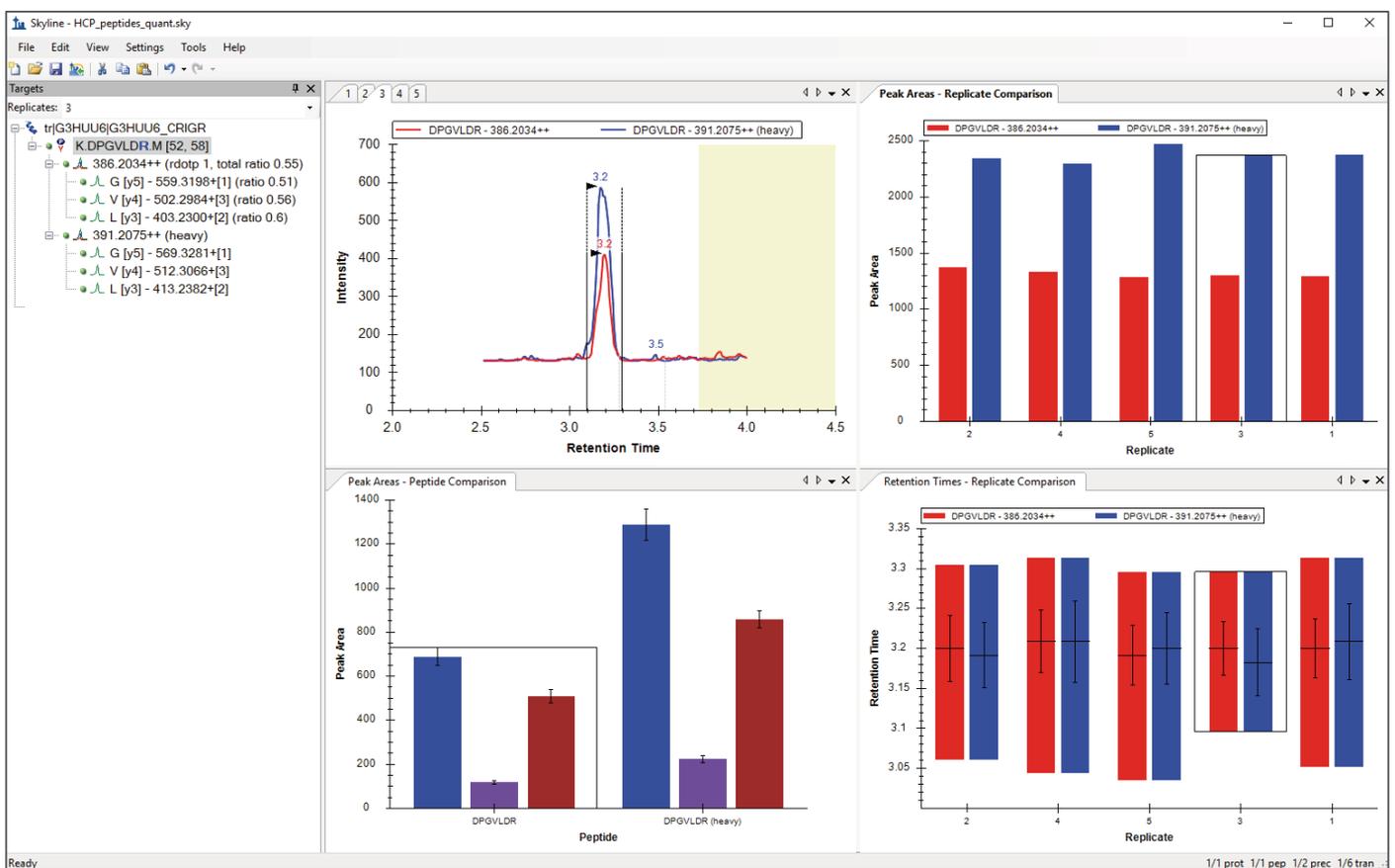


図 5. SIL ペプチド DPGVLRD を 250 amol/μg でスパイクした mAb マトリックス中の CHO のタンパク質 S100-A11 の軽いペプチドと重いペプチドのピーク面積の比較

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。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 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。自動化ツールを用いて Skyline ソフトウェアと Agilent 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。Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS を用いて、HCP を 1 ppm 未満の濃度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. 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、アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、資料番号 5991-9300JAJP, **2018**.
3. Agilent Triple Quadrupole LC/MS Peptide Quantitation with Skyline. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-9887EN, **2017**.

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. 2019

Printed in Japan, September 24, 2019

5994-1369JAJP

