

Agilent 6495C QQQ LC/MS를 이용한 숙주 세포 단백질 불순물 정량

저자

Linfeng Wu
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 mAb 제품 내의 sub-ppm 숙주 세포 단백질의 정량 분석법을 설명합니다. 해당 워크플로는 Agilent AssayMAP Bravo 플랫폼, Agilent 1290 Infinity II LC 및 Agilent 6495C QQQ LC/MS를 이용하였습니다.

서론

숙주 세포 단백질(HCP) 불순물은 바이오의약품 제조 공정 중 숙주 생물로부터 유래하는 저농도 단백질 불순물입니다. 약물에 포함된 HCP는 제품 안전성과 효능에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있으므로, 반드시 규제 요건에 따라 모니터링하고 제어해야 합니다¹. 전통적으로는 단백질 치료제 내의 HCP 정량을 위한 표준 분석법으로 효소결합면역흡착측정법(ELISA)을 사용해 왔습니다. 그러나, ELISA는 개별 HCP를 식별하고 정량하기에 적용 범위 및 특이성 면에서 한계가 있습니다. 그 결과 LC/MS 기술이 HCP 분석에 대한 대안으로 떠오르고 있습니다. HCP에 대한 LC/MS 기반 정량 분석의 주요 난점은 의약품에 존재하는 저농도 HCP 펩타이드와 고농도 펩타이드의 동시 용리에 있습니다. 이 때문에 약품 매트릭스의 높은 백그라운드에서 낮은 존재비의 펩타이드를 높은 감도와 재현성으로 정량할 수 있는 방법이 필요합니다.

이 응용 자료에서는 다음의 시스템 구성을 통해 숙주 세포 단백질을 고감도로 정량하는 전체 워크플로 솔루션을 소개합니다.

- 자동 시료 전처리를 위한 Agilent AssayMAP Bravo 플랫폼
- 시료 전처리를 위한 Agilent 1290 Infinity II LC
- 데이터 수집을 위한 Agilent 6495C QQQ LC/MS
- MRM 분석법 개발을 위한 Skyline 소프트웨어 내 Agilent Automation 도구
- Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어와 Skyline 소프트웨어 모두를 사용한 데이터 처리

다중 반응 모니터링(MRM) 기반의 동위원소 희석 분석법을 사용하여 낮은 수준의 sub-ppm(ng/mg) HCP를 정확하게 정량할 수 있음을 입증하였습니다.

실험

기기

- Agilent AssayMAP Bravo 시스템 (G5571AA)
- Agilent 1290 Infinity II LC 구성:
 - Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B), 시료 냉각기 옵션(옵션 100) 장착
 - Agilent 1290 Infinity II 항온 컬럼 장치(G7116B)
- Agilent 6495C QQQ LC/MS
- Agilent Jet Stream ESI 이온화원 (G1958-65138)

재료 분석

인간 IgG1 mAb(파트너사 R&D 제품)는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 생산한 뒤 Protein A로 정제하였습니다. Heavy 안정 동위원소 표지(SIL) 펩타이드 표준물질은 타사 공급업체에서 맞춤 합성하였습니다 (표 1). 모든 SIL 펩타이드는 HPLC로 정제하였으며, LC/MS와 아미노산 분석으로 그 품질을 측정하였습니다.

표 1. 액체 크로마토그래피 파라미터

LC 파라미터	
분석 컬럼	하전된 표면의 역상 C18 컬럼
이동상 A	H ₂ O, 0.1% 포름산 함유
이동상 B	90% Acetonitrile in H ₂ O, 0.1% 포름산 함유
유속	0.5mL/분
주입 부피	20µL
그라디언트	0분 → 3% B 1분 → 3% B 10분 → 21% B 10.5분 → 90% B 12분 → 90% B 12.5분 → 3% B
중지 시간	13분
사후 시간	1분
컬럼 온도	60°C

시료 전처리

mAb 시료는 AssayMAP Bravo 시스템을 사용하여 변성, 환원, 알킬화 및 트립신 분해를 거쳤습니다. SIL 펩타이드를 동일 물 농도로 혼합한 뒤, 정량 분석을 위해 8개의 서로 다른 농도(SIL 펩타이드당 6.25, 12.5, 25, 62.5, 125, 250, 12,500, 125,000amol/µg)로 시료 분해물에 스파이킹하였습니다.

LC/MS 분석

시료는 6495C QQQ LC/MS에서 dMRM 모드로 9분간의 LC 그라디언트를 사용해 분석하였습니다. 표 1과 표 2에 크로마토그래피 및 질량 분석법에 대한 상세 실험 조건이 나와 있습니다. LC-dMRM 분석법은 Skyline 소프트웨어에 통합된 Agilent Automation 도구 및 Agilent MassHunter 워크스테이션을 사용해 자동으로 최적화하였습니다.

데이터 처리

펩타이드 정량을 위한 데이터 분석은 Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어와 Skyline 소프트웨어를 사용해 수행하였습니다.

표 2. Agilent 6495C QQQ dMRM 분석법

파라미터	설정
이온 모드	JetStream, 양이온 모드
가스 온도	150°C
건조 가스 유속	19L/분
Nebulizer 가스	35psi
Sheath 가스 온도	250°C
Sheath 가스 유속	11L/분
캐필러리 전압	4,000V
노즐 전압	0V
고압/저압 RF 전압	200/110V
델타 EMV	200V
Q1 및 Q3 분해능	Unit/Unit
주기 시간	500ms
최소/최대 MRM 측정 시간	28.85ms/60.39ms

결과 및 토의

LC-dMRM 분석법 개발

HCP분석의 정량 성능을 평가하기 위해, AssayMAP Bravo 자동화 시스템을 사용해 정제된 mAb를 변성, 환원, 알킬화 및 트립신 분해하였습니다. 이 시료 분해물을 다음 실험에서 mAb 백그라운드 매트릭스로 사용하였습니다. 표준 곡선 분석을 위해 3종의 SIL 표준 펩타이드를 시료 분해물에 스파이킹하였으며, 이것은 두 가지 외인성 단백질(SUM01 및 SYHC)에 매칭되는 펩타이드 2종과 내인성 HCP인 CHO 단백질 S100-A11에 매칭되는 펩타이드를 포함하고 있습니다(표 3)². 모든 SIL 펩타이드 표준물질은 95%이상의 순도를 갖습니다.

LC-dMRM 분석법은 MassHunter 및 Skyline Automation 워크플로를 사용하여 최적화하였습니다(그림 1). 이 워크플로에서는 먼저 Skyline 소프트웨어에서 표적 펩타이드와 전이 이온(transition ions)을 생성하였습니다. Automation 도구를 이용해 MRM 분석법 및 워크리스트를 자동으로 생성한 다음 펩타이드 머무름 시간 측정, 충돌 에너지 최적화, 데이터 분석, 최종 LC/MS 분석법 내보내기 등을 수행하였습니다³.

mAb 매트릭스 내 SIL 펩타이드 표준물질 정량

mAb 백그라운드 매트릭스 내 SIL 펩타이드 표준물질 3종에 대한 정량 감도 성능을 평가하였습니다. 시스템 청결성 확보를 위한 바탕 주입을 수행한 뒤 6.25amol/μg~125fmol/μg의 농도에 걸쳐 주입당 8μg의 시료 로딩으로 반복 주입(n = 5)을 수행하였습니다(표 4). 표준 곡선은 모든 표적 단백질에 대하여 sub-ppm부터 1,000ppm이상의 범위를 제공하며, HCP 분석과 관련된 넓은 범위를 포함하고 있습니다. 모든 시료(n=40)에 대한 머무름 시간(RT) 재현성을 측정하였고, 각 농도별 피크 면적 재현성 및 정량 정확도도 측정하였습니다. 이에 대한 전반적인 결과는 다음과 같습니다.

Agilent Automation 도구를 이용한 자동 MRM 세 단계

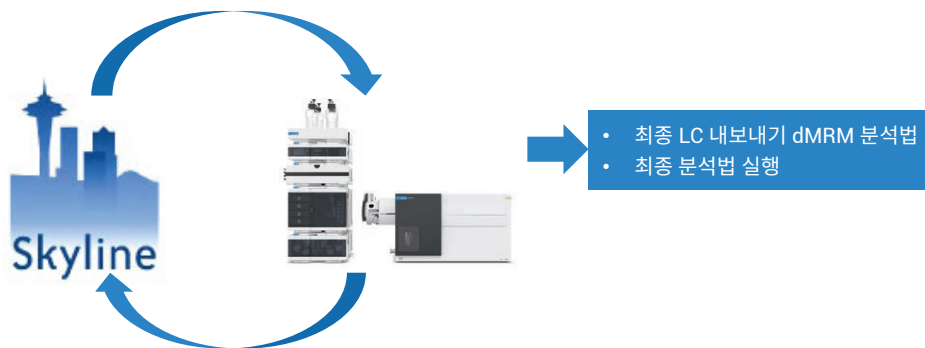
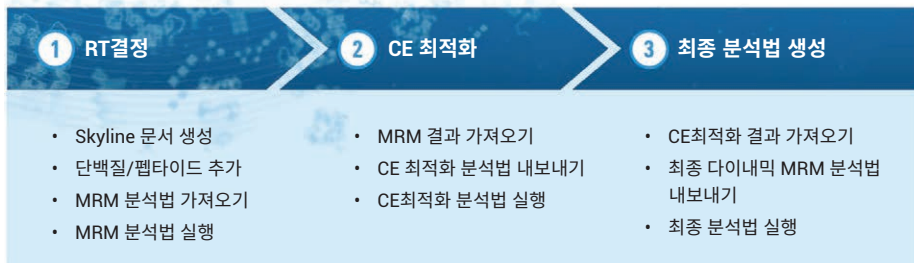


그림 1. Skyline의 Agilent Automation 도구

표 3. 표적 단백질, 펩타이드 및 전이

표적 단백질	단백질 원천	표적 펩타이드 시퀀스	SIL 펩타이드 품질(%)	모니터링 전이(m/z)
SUM01_HUMAN	UPS2 단백질 표준물질	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
SYHC_HUMAN	UPS2 단백질 표준물질	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
단백질 S100-A11(G3HUU6)	CHO 세포	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

- LLEYLEEEK의 경우 $R^2 = 0.9993$, VFDVIIR의 경우 $R^2 = 0.9990$, DPGVLDR의 경우 $R^2 = 0.9995$ 로 분석 농도에 대한 우수한 직선성을 나타냄 (그림 2A~4A).
- 최저정량한계(LLOQ)를 포함한 모든 농도에서 우수한 정밀도와 정확도가 관측되었음(표 4).
- 3종 단백질 모두에 대해 sub-ppm의 LLOQ로 낮은 농도에 대한 감도를 보임 (그림 2B~4B 및 표 4, SUMO1_HUMAN의 경우 0.48ppm, SYHC_HUMAN의 경우 0.7ppm, CHO 단백질 S100-A11의 경우 0.13ppm).
- SIL 펩타이드 VFDVIIR과 DPGVLDR의 경우 백그라운드 매트릭스에서 일부 간섭 현상이 발생하였으나, 표적 단백질에 대해 sub-ppm LLOQ 성취 (그림 3B와 4B).
- 40회 주입 모두에서 탁월한 RT 재현성 (LLEYLEEEK에서 $RSD = 0.06\%$, VFDVIIR에서 0.08% , DPGVLDR에서 0.47%).

이 실험에 사용된 컬럼의 로딩 용량은 $8\mu\text{g}$ 이상이었습니다. 따라서 필요한 경우, 더 많은 양의 온컬럼 시료 로딩을 통해 보다 낮은 수준의 LLOQ를 성취할 수 있습니다.

표 4. mAb 매트릭스 내 SIL 펩타이드의 정밀도 및 정확도. LLOQ 농도는 빨간색으로 강조 표시되었습니다.

단백질명/분자량	SUMO1_HUMAN / 38,815Da			SYHC_HUMAN / 58,233Da			단백질 S100-A11(G3HUU6) / 11,241Da		
	LLEYLEEEK			VFDVIIR			DPGVLDR		
SIL 펩타이드 스파이킹 농도 (amol/ μg)	%RSD(n=5)	%정확도	단백질 농도*(ppm)	%RSD(n=5)	%정확도	단백질 농도*(ppm)	%RSD(n=5)	%정확도	단백질 농도*(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 펩타이드 순도로 조정

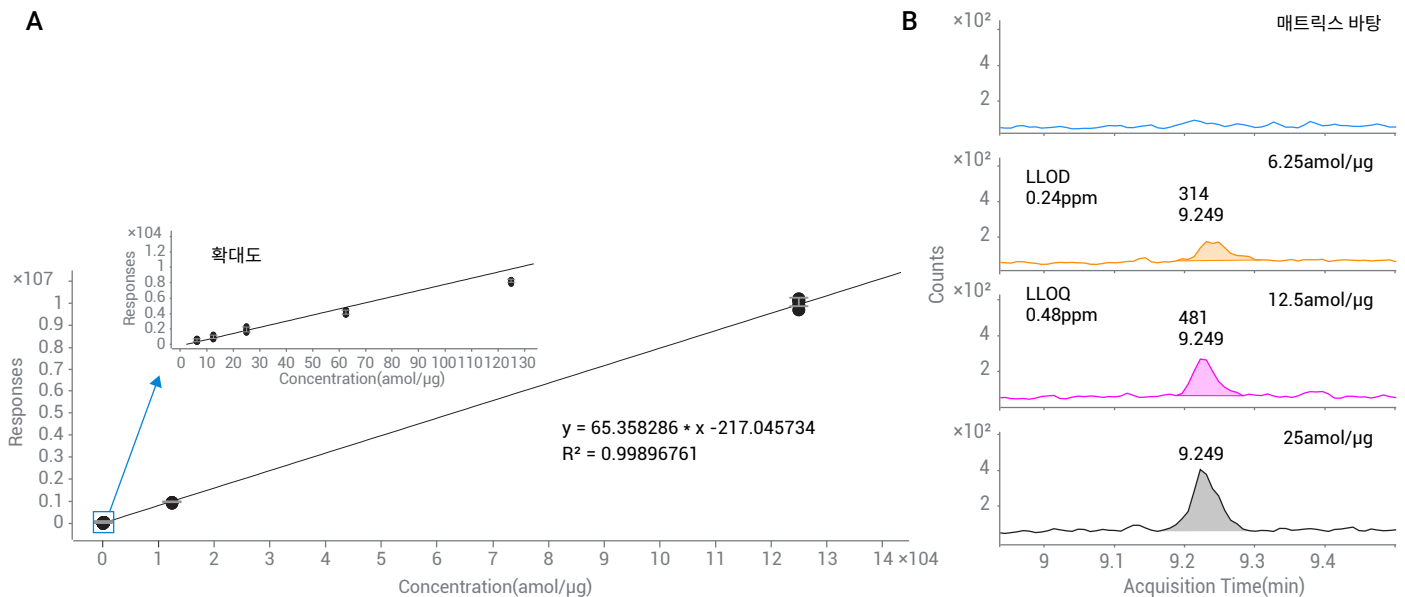


그림 2. 트립신 분해 mAb 매트릭스 내 heavy 펩타이드 표준물질 LLEYLEEEK의 정량 결과. A) 표준 곡선 및 저농도 부분의 곡선을 상세하게 나타낸 삽도. B) LOD 및 LLOQ를 보여주는 추출 이온 크로마토그램 정렬화면

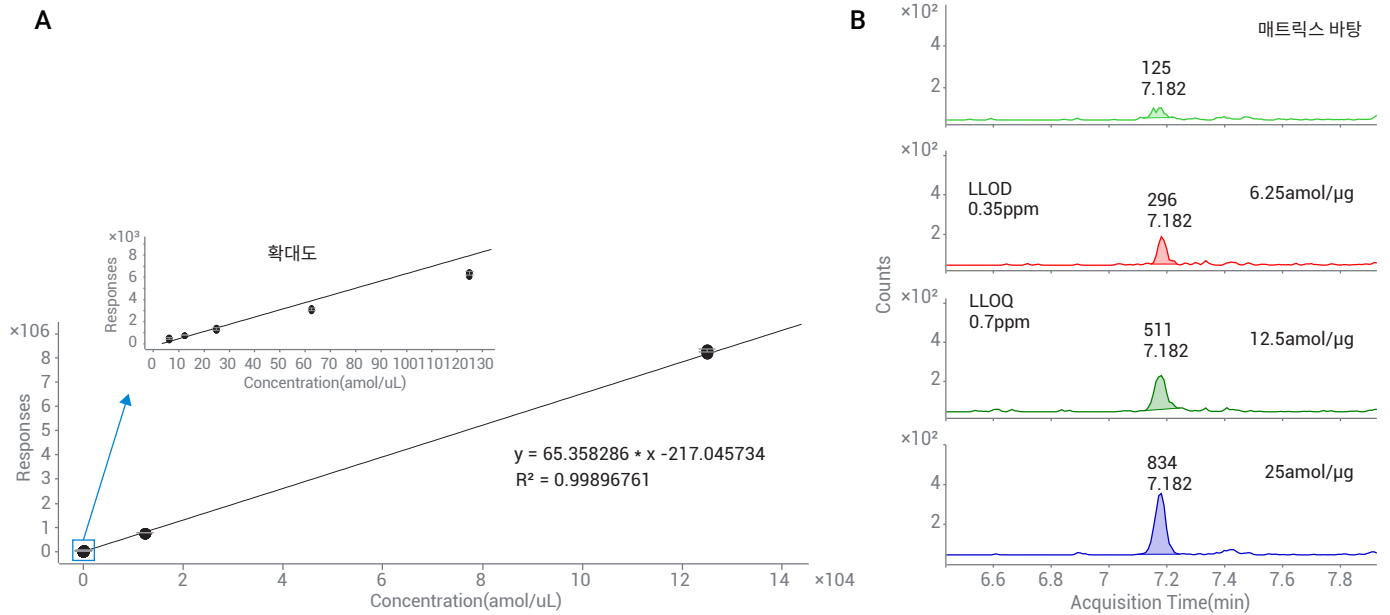


그림 3. 트립신 분해 mAb 매트릭스 내 heavy 펩타이드 표준물질 VFDVIIR의 정량 결과. A) 표준 곡선 및 저농도 부분의 곡선을 상세하게 나타낸 삽도. B) LOD 및 LLOQ를 보여주는 추출 이온 크로마토그램 정렬화면

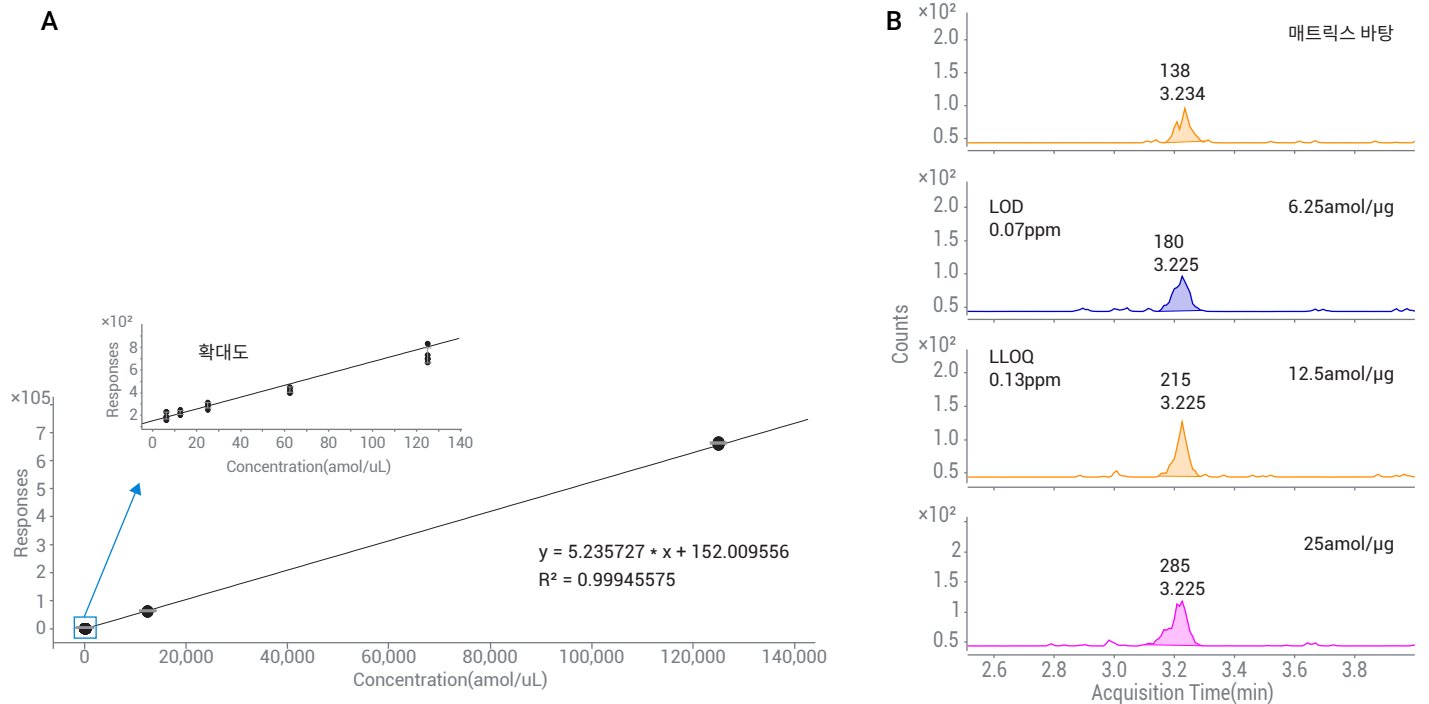


그림 4. 트립신 분해 mAb 매트릭스 내 heavy 펩타이드 표준물질 DPGVLDR의 정량 결과. A) 표준 곡선 및 저농도 부분의 곡선을 상세하게 나타낸 삽도. B) LOD 및 LLOQ를 보여주는 추출 이온 크로마토그램 정렬화면

단백질의 절대 정량

생물의약품의 제조 과정에서는 숙주 세포 단백질 불순물의 농도를 모니터링 및 규제합니다. 이 과정에서 표적 HCP의 절대 농도를 측정하는 것이 매우 중요합니다. MS 기반 분석은 적절한 참조 표준물질의 이용이 가능한 경우 이러한 응용에 매우 높은 특이성과 정확성을 제공할 수 있습니다. 절대 정량에서는 가용성 및 비용 등의 요인으로 인해 표적 단백질의 시퀀스와 매칭되는 SIL 표준 펩타이드가 널리 사용되어 왔습니다.

본 연구에서는 이전의 HCP 발견 작업에서 식별한 바 있는 내인성 HCP, CHO 단백질 S100-A11에 대한 절대 정량을 수행하였습니다². 단백질의 절대 농도 계산을 위해 2가지 접근법을 사용하였습니다. 첫 번째 접근법에서는, 내인성 펩타이드 DPGVLDLDR의 평균 감도와 그림 4A의 표준 곡선 방정식을 사용해 펩타이드 절대 농도를 측정하였습니다. 두 번째 접근법에서는, 동일한 LC/MS 분석 실행에서 light 펩타이드와 heavy 펩타이드 사이의 감도 비율을 사용해 내인성 펩타이드

농도를 측정하였습니다(그림 5). 예상한 바와 같이, 2가지 접근법을 통해 얻은 CHO 단백질 S100-A11의 단백질 농도는 유사하게 나타났습니다(1.05와 1.47ppm). 이러한 결과를 통해 다음 내용을 확인할 수 있습니다.

- Agilent HCP 발견 워크플로는 낮은 단자리 수 ppm 농도의 HCP를 식별할 수 있습니다².
- 6495C QQQ LC/MS 시스템은 저농도 펩타이드 정량을 위한 신뢰성 있는 시스템입니다.

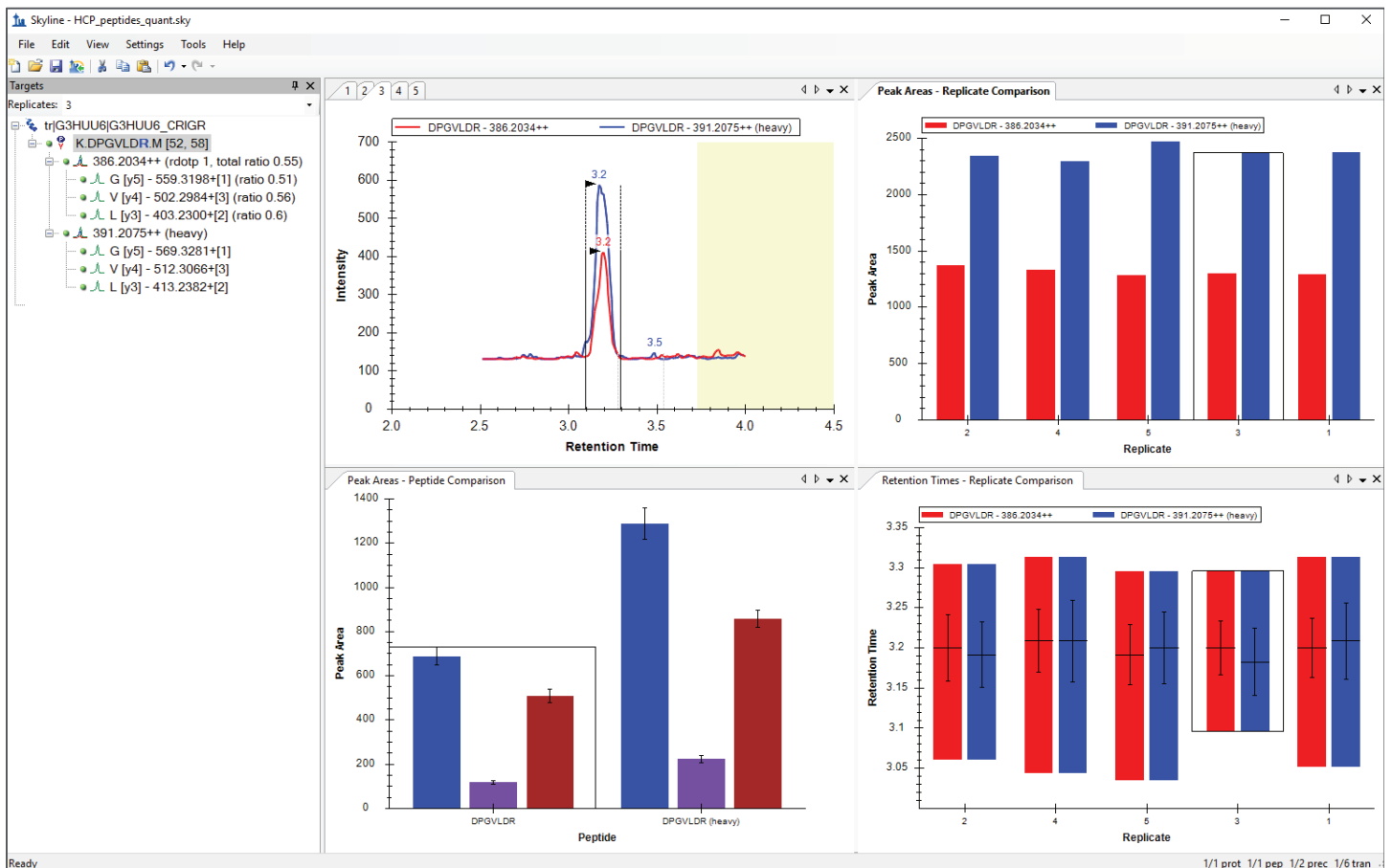


그림 5. 250amol/μg 스파이킹한 SIL 펩타이드 DPGVLDLDR와 mAb 매트릭스 내 CHO 단백질 S100-A11에 대한 light 및 heavy 펩타이드의 피크 면적 비교

결론

본 응용 자료에서는 HCP 정량을 위한 애질런트 워크플로 솔루션의 성능을 증명하였습니다. 작업 중심의 자동화 프로토콜을 사용하는 AssayMAP Bravo 플랫폼은 시료 전처리 자동화에 있어 전례 없이 탁월한 재현성, 확장성, 유연성 및 사용의 편의성을 제공하였습니다. 차세대 UHPLC인 Agilent 1290 Infinity II LC는 보다 우수한 크로마토그래피 분리능과 더욱 높은 머무름 시간 정밀도를 제공합니다. Automation 도구를 이용한 Skyline 소프트웨어와 Agilent MassHunter 소프트웨어의 원활한 통합은 LC-dMRM 분석법 최적화를 위한 직관적 솔루션을 제공합니다. Agilent 6495C QQQ LC/MS를 이용하여 sub-ppm 수준의 정확한 HCP 정량을 입증하였습니다. Skyline과 MassHunter 소프트웨어의 조합은 표적 데이터 분석을 위한 강력한 도구입니다.

참고문헌

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 Application Note*, publication number 5991-9300EN, **2018**.
3. Agilent Triple Quadrupole LC/MS Peptide Quantitation with Skyline. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-9887EN, **2017**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 9월 24일, 한국에서 인쇄
5994-1369KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울 특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

