

RP-LC/MS による 宿主細胞由来タンパク質の分析



低分子およびオリゴとは異なり、mAb や、アデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドなどその他のタンパク質ベースの治療薬は、細胞株を使用してエンジニアリングされ、製造されます。このような細胞株として、mAb には CHO（チャイニーズハムスター卵巣）、HEK293（ヒト胚腎臓）、または NS0（マウス）が、また AAV には HEK293 およびバキュロウイルスが用いられています。これらの細胞株からは、治療用タンパク質以外に宿主細胞由来タンパク質（host cell protein, HCP）と呼ばれる数種類のタンパク質が産生されます。HCP には、免疫応答を引き起こしたり、製剤緩衝液中の安定剤との相互作用により治療用タンパク質を不安定化させるものもあります。そのため、HCP は工程内不純物とみなされ、これらの余分なタンパク質を除去するために多数の精製ステップが取られています。

精製後も残留する少量の HCP に対し、一般に許容限度値 1 ～ 100 ppm (mg/L) が定められています。米国食品医薬品局、欧州医薬品庁、医薬品規制調和国際会議（ICH）は、宿主細胞由来タンパク質やその他の工程内不純物に関するガイダンスを提示しており、例えば ICH の Q6B では「不純物は、十分に制御された適切な製造プロセスを使用することにより最小化すること¹」としています。宿主細胞由来タンパク質は重要品質特性としてモニタリングされており、世界中のバイオ医薬品会社が宿主細胞由来タンパク質の検出、同定、定量を行っています。

酵素免疫測定法（ELISA）は、高感度で比較的単純な分析法であることから、HCP の定量に標準的に用いられています。また、ELISA に対するオーソゴナルな分析法として、個々の宿主細胞由来タンパク質の同定および相対定量が可能な液体クロマトグラフィー / 質量分析法（LC/MS）が急速に普及しつつあります。

LC/MS は HCP 分析に非常に効果的な手法ですが、課題がないわけではありません。最大の課題の 1 つは、宿主細胞由来タンパク質と主な治療用タンパク質のアバンダンスに大きな差があることであり、1 ppm は宿主細胞由来タンパク質であれば 1 ng、治療用タンパク質であれば 1 mg に相当します。特にペプチドが共溶出する場合は、質量分析計に広いスペクトル内ダイナミックレンジが求められます (図 1)。イオントラップ型の質量分析装置は、トラップできるイオン量が限られているため、ダイナミックレンジが狭くなります。

一方、AdvanceBio 6545XT Q-TOF などの Q-TOF 機器は 6 桁のスペクトル内ダイナミックレンジを備え、低濃度の種を高い信頼性で同定できます。反復 MS/MS 機能は、低アバンダンス種の特異解析にも役立ちます (図 2)。HCP が既知の場合、安定同位体標識ペプチドと組み合わせれば、トリプル四重極質量分析計は絶対定量に最適な機器となります。

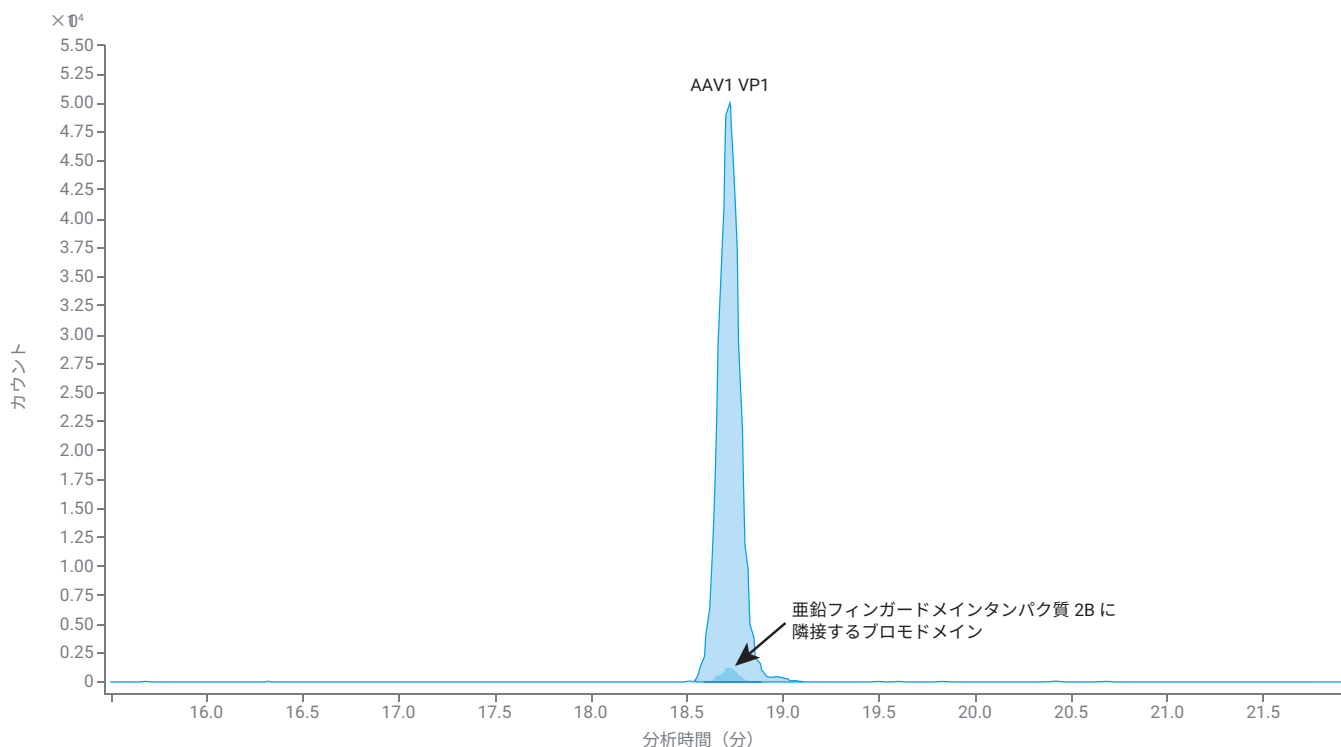


図 1. 2 種類のペプチド (主な治療用タンパク質と低アバンダンスの HCP) が共溶出している例。ロード量が多いにもかかわらず、AAV カプシドペプチドに対して、テーリングファクターの低いシャープなピーク形状が得られています。

もう 1 つの課題は、HPLC 分析カラムに対するサンプルロード量が多いことです。実際、HCP を検出して特性解析する際には、過量の治療用タンパク質が HPLC カラムに注入されます。Agilent AdvanceBio ペプチドプラス HPLC カラムは、宿主細胞由来タンパク質の分析に最適です。固定相の荷電表面が高いロード量に対する耐性を備えているからです。また、MS に適したギ酸添加の溶媒を使用しても、高アバンダンスのペプチドのテーリングを防いでシャープなピークが得られます。

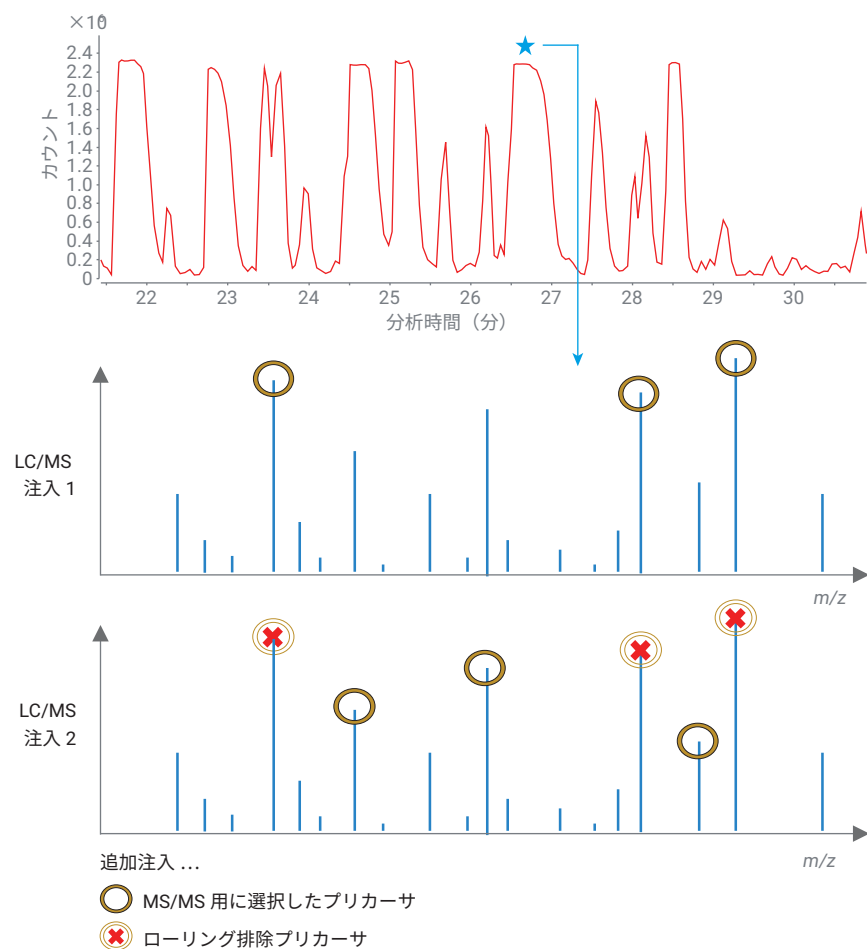


図 2. 反復 MS/MS アルゴリズムによる分析イメージ

ベストプラクティス：

サンプル前処理：

- トリプシン消化により大量のサンプルが生成されることがあります。サンプルをクリーンアップするため、またサンプル量を低減するために、[Assay Map Bravo](#) でペプチドクリーンアッププロトコルを実行することを検討してください。
- サンプルを開始時の移動相条件で再溶解してください。

移動相：

- ギ酸は調整剤として最適です。これは、ギ酸が質量分析に適しており、移動相でギ酸を使用することで、シラノールとペプチド間の不要な相互作用が排除されるようにペプチドプラスカラムの荷電表面が設計されているからです。
- イオン抑制を低減し、質量分析計をクリーンな状態に保つため、LC/MS グレードの溶媒と純粋なギ酸（純度 99 % 超）を使用してください。
- 藻類の繁殖を防ぐため、移動相を頻繁に調製し直してください。

カラムの操作/メンテナンス：

- 各内径の AdvanceBio ペプチドプラスカラムではガードカラムをご使用いただけます。ガードカラムにより分析カラムの寿命を延長できます。
- 流量の増加率をデフォルトから 1 mL/min² 以下に下げてください。流量を徐々に増やすとカラム寿命が延び、急激な過圧を防ぐことができます。そのための設定は、アジレントソフトウェアの LC ポンプ制御の「[詳細設定]」セクションにあります。
- カラムに適合するように、LC メソッドの圧力上限を設定してください（ここで推奨するすべてのカラムでは 600 bar）。これは、LC の最大圧力機能がカラムの最大圧力機能より大きい場合に重要です。
- AdvanceBio ペプチドプラスカラムの定格最高使用温度は 90 °C です。カラムを常にこの最高温度未満で使用すれば、カラムの寿命が延びます。
- AdvanceBio ペプチドプラスカラムは、最初に水 95 %、アセトニトリル 5 %、ギ酸 0.1 % の溶液で 4 時間以上コンディショニングしてから、100 % のアセトニトリルでフラッシュして保管してください。流量に関する指示は、カラムのユーザーガイドに記載されています。
- 長期保管する場合は、純粋な有機溶媒に置換して保管してください。
- カラムのクリーニングについては、Agilent BioHPLC および AdvanceBio 逆相カラムの[ユーザーガイド](#)をご覧ください。

質量分析：

- 質量分析計のイオン源は定期的にクリーニングしてください。
- Agilent Jet Stream イオン源を使用する場合は、使用に伴う機器の汚染を防ぐため、乾燥状態を保ち、シースガスを高流量（11 L/min 以上）に維持してください。
- 目的のリテンションタイム外、特にグラジエント最後の高濃度有機溶媒によるカラム洗浄段階では、LC ストリームを廃液側に分岐させてください。

推奨する初期条件

パラメータ	値
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドプラス 2.1 x 150 mm (p/n 695775-949)
カラム温度	50 °C
移動相 A	水、0.1 % ギ酸
移動相 B	アセトニトリル、0.1 % ギ酸
流量	0.4 mL/min
グラジエント	0 ~ 3 分 3 %B、3 ~ 90 分 3 ~ 40 %B、90 ~ 93 分 40 ~ 90 %B、 93 ~ 95 90 %B、95 ~ 96 分 90 ~ 3 %B
ポストタイム	3 分

表 1. 推奨 HPLC 条件

パラメータ	値
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream
乾燥ガスの温度と流量	325 °C および 13 L/min
ネブライザ	35 psig
シースガスの温度と流量	275 °C および 12 L/min
VCap	4000 V
ノズル	0 V
フラグメンタ電圧	175 V
取り込みレート	MS および MS/MS の場合は 5/3 スペクトル/秒
リファレンス質量	121.0509、922.0098

表 2. Agilent Q-TOF での推奨初期条件

カラムの選択条件：宿主細胞由来タンパク質の分析

カラム寸法：

- 感度および MS 検出への適合性から、内径がより小さいカラムが、内径の大きいカラムよりも推奨されます。内径 2.1 mm のカラムは低流量で使います。これにより、効率的なエレクトロスプレーイオン化が実現し、感度の向上にも役立ちます。
- 逆相カラムの場合、カラム長が長くなるほど分離能が向上します。サンプルが複雑なことから、このアプリケーションには長さ 150 mm 以上のカラムが推奨されます。

固定相の化学的性質：

- AdvanceBio ペプチドプラスカラムは、HCP の分析に最適です。高いロード量に対する耐性を備え、ギ酸移動相に問題なく対応できるため、質量分析に推奨されます。
- AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、ペプチドマッピングに最適である一方、HCP 分析では第 2 の選択肢となります。このカラムは、小さな親水性ペプチドのリテンションのバランスを取るのに優れ、より疎水性のペプチドを適度に溶出させますが、HCP 分析に必要な要素である高いロード量に対する耐性に劣ります。

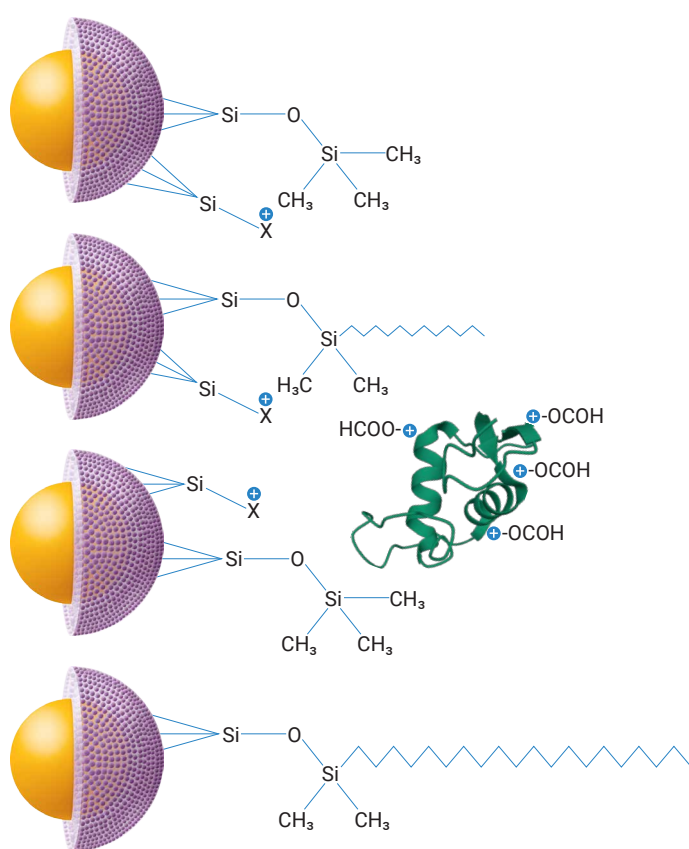


図 3. AdvanceBio ペプチドプラスカラムの粒子の荷電表面がシリノールの脱プロトン化を防ぎます。これにより、シリノールとペプチド間の相互作用が排除され、MS 感度が向上します。

カラム、標準試料、消耗品などの情報

すべての製品は、アジレント営業所および販売店にご注文いただけます。

リスト 1：HCP 分析用 AdvanceBio ペプチドプラスカラム

製品名	部品番号
AdvanceBio ペプチドプラス 2.1 x 150 mm、2.7 µm	695775-949
AdvanceBio ペプチドプラス 2.1 x 250 mm、2.7 µm	693775-949
UHPLC ガードカラム、AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 mm、2.7 µm、3 パック	821725-954

リスト 2：タンパク質/ペプチド標準試料

製品名	部品番号
Agilent NIST mAb、25 µL	5191-5744
Agilent NIST mAb、4 x 25 µL	5191-5745
ペプチド 10 種標準試料、71 µg、凍結乾燥済み	5190-0583
HSA ペプチド標準	G2455-85001

リスト 3：消耗品と溶媒

製品名	部品番号
接続部品およびチューブ	
Agilent InfinityLab クイックコネクタ LC フィッティング	5067-5965
クイックコネクタキャピラリー、ステンレス、0.12 x 105 mm	5500-1173
Agilent InfinityLab クイックコネクタフィッティングアセンブリ、固定済み 0.12 x 105 mm キャピラリー付き（カラム注入口接続用）	5067-5957
Agilent InfinityLab クイックターンフィッティング（カラム出口接続用）※別途クイックコネクタフィッティングが必要	5067-5966
クイックターンキャピラリー SST 0.12 x 280（クイックターンフィッティング用）	5500-1191
クイックターンフィッティング用取り付けツール	5043-0915
Agilent 1290 Infinity II 用超低拡散チューブキット	5067-5963
インラインフィルタ	
InfinityLab クイックチェンジインラインフィルタアセンブリ、UHPLC 用、5 個のフィルタディスク（内径 2.1 mm、ポアサイズ 0.2 µm）を含む、90 mm フレキシブルキャピラリー付き	5067-1603
InfinityLab クイックチェンジフィルタディスク、内径 2.1 mm、ポアサイズ 0.2 µm、5 個、InfinityLab クイックチェンジインラインフィルタ用	5067-1610

リスト 3：消耗品と溶媒（続き）

製品名	部品番号
サンプル容器	
高回収率バイアル、スクリュートップ、固定インサート付き、透明、インサート容量 300 µL、100 個、バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ)	5188-6591
キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個、キャップサイズ：12 mm	5182-0717
バイアル、クリンブ/スナップトップ、ポリプロピレン、250 µL、1,000 個、バイアルサイズ：12 x 32 mm (11 mm キャップ) *	5190-3155
キャップ、スナップ、透明、PTFE/シリコン/PTFE セプタム、100 個、キャップサイズ：11 mm (5190-3155 用)	5182-0566
InfinityLab 96 ウェルプレート、0.5 mL、30 個	5043-9310
InfinityLab 96 ウェルプレートクロージングマット、50 個	5042-1389
溶媒と添加物	
InfinityLab UltraPure LC/MS 純水、1 L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル、1 L	5191-4496
ギ酸、5 mL	G2453-85060
溶媒処理	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティバージボトル	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き	5043-1221
タイムストリップ付き InfinityLab 活性炭フィルタ、58 g	5043-1193
セーフティスターターキットとバージボトル、InfinityLab セーフティバージボトル（部品番号 5043-1339）とセーフティキャップスターターキット（部品番号 5043-1222）を含む	5043-1340
質量分析	
LC/MS 標準溶液、ESI-TOF、100 mL	G1969-85000
API-TOF リファレンス質量溶液キット	G1969-85001
リントフリー布、23 x 23 cm、綿 100 %、15 個	05980-60051
布ヤスリ、8000 グリット（2 µm）、（マイクログリットペーパー）	8660-0852

*一部、対象外の国や地域もあります

参考文献：

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline Specifications: Test Procedures And Acceptance Criteria For Biotechnological/Biological Products Q6B. Step 4 Edition, International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 1999.
<https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
2. Optimizing Adeno-Associated Virus Loading Amounts for Host Cell Protein Analysis using the AdvanceBio Peptide Plus column and the 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF [5994-6885EN](#)
3. Adeno-Associated Virus Characterization with Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF and Protein Metrics Byos Software [5994-5110EN](#)
4. 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 [5991-9300JAJP](#)
5. 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 [5994-1369JAJP](#)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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いません。
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。

DE67742337

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, December 13, 2023

5994-6833JAJP