

## SYNAPT XS 質量分析計を使用したモノクローナル抗体中の ppm レベル以下の宿主細胞タンパク質（HCP）の同定

---

Catalin E. Doneanu, Alexandre Gomes, Brad J. Williams, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

---

### 要約

このアプリケーションノートでは、高純度のモノクローナル抗体中の ppm レベル以下の HCP を同定および定量する、創薬用の高感度 HCP 分析について説明します。

### アプリケーションのメリット

- HDMS<sup>E</sup> データインディペンデント測定（DIA）モードを使用した創薬用の高感度 HCP 分析では、高純度のモノクローナル抗体から非常に低レベルの HCP（最低 100 ppb）を同定することができます。
- 文献で報告されているサンプル前処理法と組み合わせたところ、NIST mAb から 48 種の HCP が同定され、低含有量の HCP を同定する性能が大幅に向上していることが実証されました。

---

### はじめに

残留宿主細胞由来タンパク質（HCP）は低レベル（通常は 100 ppm 未満）の工程関連不純物で、徹底的な精製を行った後でもタンパク質性バイオ医薬品に存在する場合があります。HCP は患者に望ましくない免疫原性反応を引き起こ

し、医薬品の有効性や安定性が低減したり、薬物の分解の原因となったりする場合があります<sup>1</sup>。このような理由から、規制当局は、医薬品承認の前に HCP の同定および定量することを要求しています。バイオ医薬品業界では、ppm（あるいは ng HCP/mg バイオ医薬品）単位での合計 HCP 濃度の測定に ELISA 分析を用いています。近年、ELISA の強力な代替策として質量分析ベースの HCP 分析が登場しました<sup>2-6</sup>。その理由は、より広範な（プロテオームレベルの）HCP に対応でき、個別の HCP レベルを特定および測定できるためです。



---

図 1. SYNAPT XS 質量分析計

---

---

## 実験方法

### サンプル前処理

マウスの細胞培地中で生産した高純度のモノクローナル抗体（NIST mAb 候補標準物質 LRM 8670）を米国国立標準技術研究所（NIST）から入手しました（濃度 100 mg/mL）。Huang ら（Eli Lilly & Company）が最初に発表したプロトコルを調整し、それを使用して NIST mAb を消化しました<sup>3</sup>。モノクローナル抗体の消化は、100 µg の Lys-C/トリプシン酵素混合物（Promega、Madison、WI）を含むガラスバイアルで実施しました。125 µL の NIST mAb を 50 µL の 100 mM CaCl<sub>2</sub> および 625 µL の 100 mM 重炭酸アンモニウムと混合しました。消化は一晩（約 16 時間）かけて 37 °C で行いました。次にモノクローナル抗体のサンプルを 0.05% *RapiGest* 存在下で変性し（60 °C で 1 時間）、25 mM ジチオスレイトール（DTT）で還元し（60 °C で 1 時間）、12 mM ヨードアセトアミド（IAM）でアルキル化しました（室温暗所で 45 分）。アルキル化のステップでモノクローナル抗体の沈殿が生じ始めました。ギ酸（FA）を 5 µL 添加した後、消化物を 37 °C で 30 分間インキュベーションしてから、遠心分離（10 分、13,000 x g）して、沈殿したモノクローナル抗体と界面活性剤 *RapiGest* を分離しました。すべての消化試薬（CaCl<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、DTT、IAM、FA）は Sigma-Aldrich（ミズーリ州セントルイス）から入手しました。上清をオートサンプラーバイアル（Waters、製品番号 186000327C <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/vials-containers--collection-plates/186000327c-lcgc-certified-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-vial-max-recover.html>>）に移し、5 種の MassPREP タンパク質消化標準品を次の濃度でスパイクしました：100 nM ENL（酵母エノラーゼ、製品番号 186002325 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186002325-massprep-enolase-digestion-standard.html>>）、40 nM ClpB（Hi3 *E. coli*、製品番号 186006012 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006012-hi3-e-coli-standard.html>>）、20 nM ADH（酵母アルコール脱水素酵素、製品番号 186002328）、20 nM PHO（ウサギホスホリラーゼ b、製品番号 186002326）、5 nM BSA（ウシ血清アルブミン、製品番号 186002329 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186002329-massprep-bsa-digestion-standard.html>>）。50 µL の注入済みサンプル中のオンカラムでロードした添加タンパク質の量は、5000 fmol ENL、2000 fmol ClpB、1000 fmol ADH、1000 fmol PHO、250 fmol BSA です。LC-MS グレードの溶媒（アセトニトリル-ACN および水）は Thermo Fisher Scientific（マサチューセッツ州ウォルサム）から購入しました。

### LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
カラム:	ACQUITY Premier CSH C <sub>18</sub> カラム 1.7 µm、2.1 × 150 mm（製品番号：186009462）

カラム温度: 60 °C

流速: 50  $\mu$ L/分

移動相: 溶媒 A: 0.1% ギ酸含有脱イオン水  
 溶媒 B: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル

注入量: 50  $\mu$ L

洗浄溶媒: パージ溶媒: 50% メタノール  
 サンプルマネージャー洗浄溶媒: 50% メタノール

## グラジエント

時間 (分)	流速 (mL/分)	溶媒 A の組成 (%)	溶媒 B の組成 (%)	検量線プロファイル
0.00	0.2	100	0	初期条件
2.00	0.2	100	0	6
2.10	0.05	100	0	6
25.00	0.05	90	10	6
82.00	0.05	80	20	6
112.00	0.05	70	30	6
113.00	0.4	70	30	6
120.00	0.4	50	50	6
122.00	0.4	50	50	6
123.00	0.4	100	0	6
124.00	0.4	100	0	6
134.00	0.4	100	0	6

## MS 条件

MS システム: SYNAPT XS QToF 質量分析計

イオン化モード: ESI+

キャピラリー電圧:	2.5 kV
コーン電圧:	40 V
ソースオフセット:	4 V
ソース温度:	120 °C
脱溶媒温度:	300 °C
コーンガス流量:	35 L/時間
脱溶媒ガス流量:	600 L/時間
ネブライザーガス圧:	7 bar
データ取り込み:	HDMS <sup>E</sup> モード
質量範囲 ( $m/z$ ):	50 ~ 2000
スキャンレート:	1.0 秒
低エネルギー CE:	6 V
高エネルギー CE ランプ:	0 ~ 85 V の範囲の CE のトランスファーのルックアップテーブル (LUT)
データ取り込みソフトウェア:	MassLynx 4.2 SCN 1009
データ解析ソフトウェア:	Progenesis QI for Proteomics v4.2

注: CE の値はペプチド前駆体の IMS ドリフト時間と  
 相関しています (UDMS<sup>E</sup> 取り込み)

---

## 結果および考察

NIST mAb (100 mg/mL) に含まれる HCP の不純物は、以前に特性解析されています<sup>2-6</sup>。3つのラボで同じ実験条件を用いました。2次元マイクロフロックロマトグラフィー (高 pH RP/低 pH RP) に SYNAPT G2-Si 質量分析計を組み合わせ、計 35 種の HCP を同定しました。そのうち 14 の HCP が共通していました。このアプローチでは、検出限界 1 ppm を達成しました<sup>2</sup>。

近年、LC-MS 分析における感度を向上させ、モノクローナル抗体サンプル中のさらに低レベルの HCP を同定するための、複数の代替サンプル前処理プロトコルが導入されています。これらのプロトコルでは、モノクローナル抗体の沈殿により主要な医薬品種を除去するか<sup>4</sup>、低分子量フィルターを使用してモノクローナル抗体を除去して HCP を濃縮するか<sup>5</sup>、あるいはタンパク質レベルでの HILIC による分画を用いて、主要なサンプル成分を除去し、HCP を濃縮していません<sup>6</sup>。今回は、Eli Lilly and Company が発表したプロトコル<sup>4</sup>を採用し、NIST mAb を沈殿することで、LC-MS 分析時に含有量が多い NIST mAb ペプチドによるイオン化抑制および干渉現象を大きく低減し、最小限に抑えることができました。タンパク質変性、還元およびアルキル化の後にトリプシン消化を行う従来の消化プロトコルとは異なり、このアプローチではネイティブな立体構造のモノクローナル抗体がトリプシン消化に抵抗性であることを利用しています。この理由から、モノクローナル抗体に非共有結合で結合している HCP は、長時間 (一晚) の消化を行ってもほぼ変わらないままのモノクローナル抗体よりも容易にトリプシン消化されます。このプロトコルに従い、サンプルを、トリプシン消化の後に変性、還元およびアルキル化し、沈殿して、主要なサンプル成分を遠心分離により除去しました。ここで使用した消化プロトコル (「実験方法」セクションに詳述) は、他のモノクローナル抗体製品にも適用できます。

消化後のサンプルを MS<sup>E</sup> および HDMS<sup>E</sup> の 2 つの取り込みモードでそれぞれ 3 回繰り返し分析し、データセットを Progenesis Q1 for Proteomics v4.2 で解析して、HCP の同定および定量を行いました。LC-MS での 3 回の繰り返しすべてで、タンパク質あたり 3 つ以上のペプチドが同定された HCP のみが報告されました。MS<sup>E</sup> 取り込みにより、含有量の最も多い HCP 5 種のみが同定でき、検出限界約 10 ppm を達成しました (データは示さず)。MS<sup>E</sup> とは対照的に、HDMS<sup>E</sup> 取り込みでは 48 種と大幅に多くの HCP が同定でき、検出限界が 100 倍改善され、検出レベル 100 ppb を達成しました。3 桁の範囲にわたる 3 回繰り返しで同定されたすべての HCP の詳細リストを表 1 に示します。MS<sup>E</sup> と比較し、HDMS<sup>E</sup> の感度は大幅に向上していました。その理由は、この取り込みモードでは、共溶出するペプチド前駆体が非常に高速 (15 ~ 20 ミリ秒) のイオンモビリティ分離で、フラグメンテーションの前に分離されるためです。結果として、SYNAPT XS 質量分析計において、よりきれいな MS/MS フラグメンテーションスペクトルが得られ、より多くの HCP が同定できるようになります。更に、HDMS<sup>E</sup> モードでは、ペプチドのフラグメンテーションに使用されるコリジョンエネルギー (CE) が、トランスファーセルにかかる CE を、ペプチド前駆体の IMS ドリフト時間と同期させることによって、さらに最適化されています。

番号	アクセッション番号	タンパク質の詳細	配列カバー率 (%)	平均 MW (kDa)	オンカラム注入量		濃度		RSD (%)
					fmol	ng	ng/mL	ppm	
1	P00924	エノラーゼ 1 酵素 (ENL) - 5000 fmol	51.4	46.6	3747	175	27938	279	9.6
2	P63284	タンパク質シャペロン ClpB (CLP) - 2000 fmol	11.2	95.6	1617	155	24734	247	5.3
3	P05064	フルクトース-ビスホスフェートアルドラーゼ A	55.5	39.3	2675	105	16820	168	4.2
4	P00489	ウサギグリコーゲンホスホリラーゼ (PHO) - 1000 fmol	43.2	97.1	1000	97	15536	155	0.0
5	P05063	フルクトース-ビスホスフェートアルドラーゼ C	42.4	39.4	1416	56	8926	89	7.3
6	P00330	アルコール脱水素酵素 (ADH) - 1000 fmol	39.2	36.7	1028	38	6036	60	3.3
7	Q922R8	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A6	8.8	48.1	413	20	3178	32	16.5
8	P02769	ウシ血清アルブミン (BSA) - 250 fmol	31.3	66.3	232	15	2461	25	0.4
9	P17225	ポリリミジントラクト結合タンパク質 1	11.4	56.5	208	12	1880	19	1.0
10	P06745	グルコース-6-リン酸イソメラーゼ	22.4	62.7	164	10	1645	16	2.2
11	P40142	トランスケターゼ	7.2	67.6	126	9	1363	14	2.1
12	Q61937	ヌクレオスミン	18.3	32.6	247	8	1288	13	2.1
13	Q60864	ストレス誘導性リン酸化タンパク質 1	11.7	62.5	83	5	830	8	4.8
14	Q9Z0X1	アポトシス誘導因子 1	5.1	66.8	75	5	802	8	4.6
15	Q9CZY3	ユビキチン結合酵素 E2 リアクト 1	15.5	16.3	296	5	772	8	0.8
16	P08101	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体	19.7	36.7	121	4	711	7	14.7
17	Q8K4F5	$\alpha\beta$ ヒドロラーゼドメイン含有タンパク質 11	9.7	33.4	129	4	689	7	6.2
18	Q91YR9	プロスタグランジンシクロオキシゲナーゼ 1	8.1	35.5	109	4	619	6	7.1
19	Q9CZ44	NSFL1 補因子 p47	8.3	40.7	76	3	495	5	16.6
20	Q8C7U7	ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 6	6.6	71.5	40	3	458	5	10.2
21	Q6PB93	ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 2	3.9	64.5	44	3	454	5	2.3
22	Q3UEB3	ポリ (U) 結合-スプライシング因子 PUF60	6.2	60.2	44	3	424	4	8.5
23	P17892	腓肭パーゼ関連タンパク質 2	4.9	52.6	46	2	387	4	1.2
24	Q9WVA4	トランスジェリン-2	6.7	22.4	104	2	373	4	3.8
25	Q923D2	フラビンシクロオキシゲナーゼ (NADPH)	11.5	22.2	104	2	369	4	5.1
26	P60335	ポリ (rC) 結合タンパク質 1	6.3	37.5	60	2	360	4	9.8
27	O88569	ヘテロ核リボ核タンパク質 A2/B1	5.6	37.4	56	2	335	3	20.1
28	P01887	$\beta$ -2 ミクログロブリン	18.3	13.8	145	2	320	3	15.7
29	P49312	ヘテロ核リボ核タンパク質 A1	9.5	34.2	58	2	317	3	3.0
30	P26928	肝細胞増殖因子様タンパク質	2.3	80.6	21	2	271	3	22.3
31	Q9CQF3	切断・ポリアデニル化特異的因子サブユニット 5	4.4	26.2	64	2	268	3	5.5
32	Q9CQE1	タンパク質 NipSnap ホモログ 3B	5.2	28.3	49	1	222	2	3.1
33	Q8BL97	セリンアルギニンリッチスプライシング因子	5.2	30.8	44	1	217	2	20.2
34	Q9WTP6	ミトコンドリアアデニル酸キナーゼ 2	7.8	26.5	41	1	174	2	2.8
35	P33174	クロモゾーム関連キネシン KIF4	0.6	139.5	7	1	156	2	14.3
36	Q9ER00	シンタキシン-12	3.4	31.2	27	1	135	1	19.2
37	Q9DBP5	UMP-CMP キナーゼ	2.9	22.2	34	1	121	1	7.8
38	P35700	ヘルオキシレドキシニン-1	4.5	22.2	33	1	117	1	19.3
39	P45878	ペプチジルプロリルシトランスイソメラーゼ FKBP2	4.6	15.3	42	1	103	1	2.4
40	P10126	伸長因子 1- $\alpha$ 1	3.4	50.1	11	1	88	0.9	5.4
41	Q01768	ヌクレオシド二リン酸キナーゼ B	3.6	17.4	31	1	86	0.9	6.8
42	P57722	ポリ (rC) 結合タンパク質 3	3.2	39.3	12	0.5	75	0.8	8.3
43	P02798	メタロチオネイン-2	1.5	6.2	51	0.3	51	0.5	3.0
44	P99029	ヘルオキシレドキシニン-5	6.7	21.8	14	0.3	49	0.5	7.1
45	P56812	プログラム細胞死タンパク質 5	2.7	14.3	18	0.3	41	0.4	5.6
46	Q9D7P6	鉄硫黄クラスターアセンブリー酵素 ISCU	2.5	18.1	14	0.3	41	0.4	7.1
47	O35166	ゴルジ体 SNAP レセプター複合体メンバー 2	4.1	24.7	10	0.2	40	0.4	10.0
48	P07724	マウス血清アルブミン	5.3	68.7	3	0.2	33	0.3	21.7
49	P15532	ヌクレオシド二リン酸キナーゼ A	3.3	17.2	9	0.2	25	0.2	11.1
50	Q9JIX0	転写および mRNA 輸送因子 ENY2	2.2	11.5	11	0.1	20	0.2	10.8
51	Q9CR16	ペプチジルプロリルシトランスイソメラーゼ D	1.5	40.7	3	0.1	20	0.2	17.3
52	Q9WV55	VAMP 関連タンパク質 A	3.3	27.9	4	0.1	18	0.2	13.3
53	P62843	40S リボソームタンパク質 S15	1.8	17.0	3	0.1	8	0.1	21.7

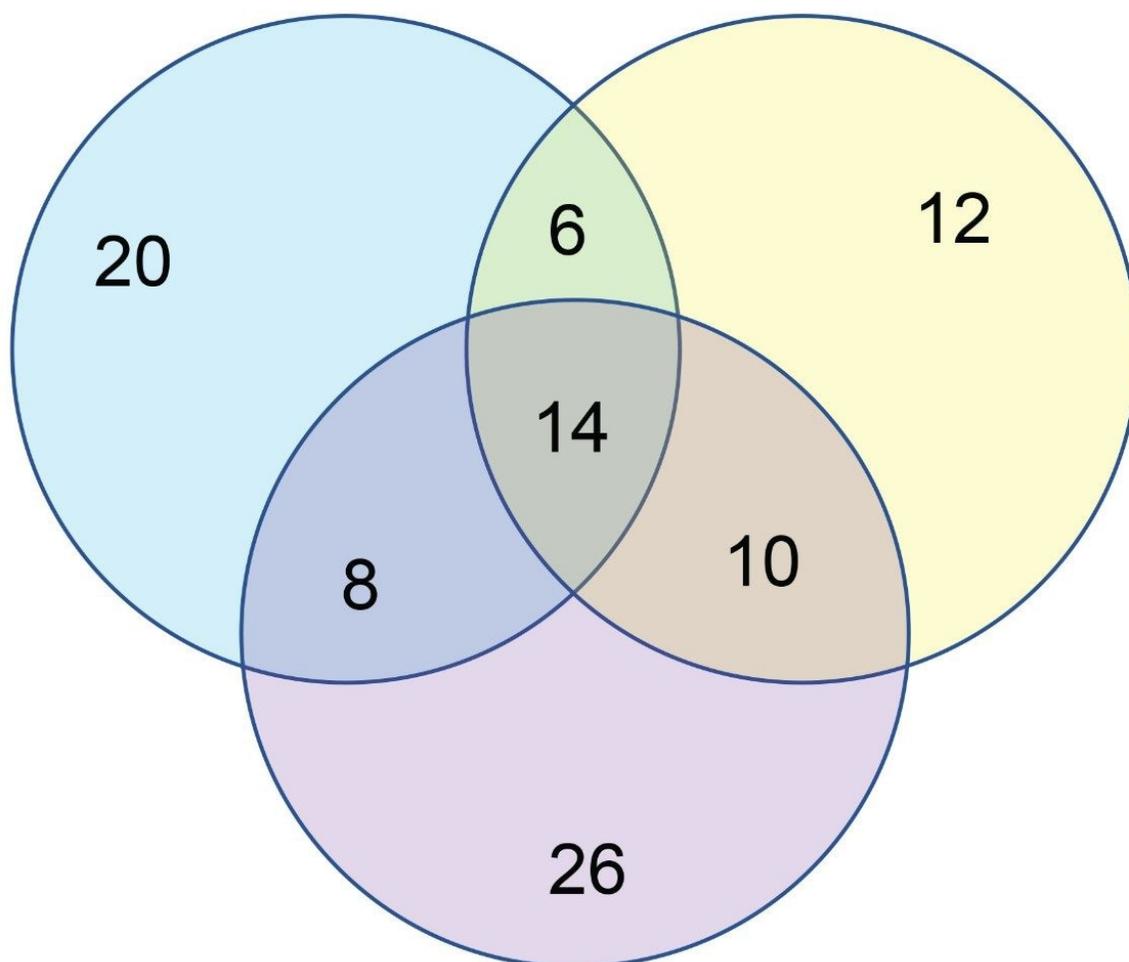
表 1. SYNAPT XS 質量分析計で開発された HDMS<sup>E</sup> 分析を使用して、NIST mAb について同定および定量された全 HCP

---

のリスト。3回の繰り返し注入すべてで、スパイクしたタンパク質5種（ENL、ClpB、ADH、PHO、BSA）が48種のHCPとともに同定されました。濃度1 ppm未満のHCPが14種同定され、分析の検出限界は100 ppbでした。

HDMS<sup>E</sup> 実験で同定されたHCPのリストと、以前の文献で発表されたHCPの同定を比較し<sup>4,6</sup>、結果を図2のベン図にまとめています。3つのデータセットすべてに、当社のグループが最初報告した14種のHCPのサブセットが含まれています<sup>2</sup>。加えて、3つのデータセットそれぞれに、単一のラボでのみ同定された独自のHCPのサブセットが含まれています。当社の場合、20種のHCPが、SYNAPT XSでのHDMS<sup>E</sup> 取り込みによってのみ同定されていました。この20種のHCPのうち14種（表1に黄色の背景色で表示）はppm以下の範囲（100～1000 ppb）の濃度であり、この分析の感度が優れていることが実証されました。NIST mAb サンプル中含有量の高いHCPの方が明らかに容易に同定できますが、異なるサンプル前処理手順により、非常に低レベルの固有のHCPが得られました。この観察結果から、この困難なモノクローナル抗体サンプルについて包括的なHCPプロファイルを得るには、様々なサンプル前処理法を行う必要があることが示唆されました。

## HDMS<sup>E</sup> データセット    レファレンス 3 データセット



## レファレンス 5 データセット

図 2. 今回の試験で同定された HCP と、以前に文献で報告されている NIST mAb の HCP との比較を示すベン図

### 結論

- HDMS<sup>E</sup> データインディペンデント取得を使用した創薬用の高感度 HCP 分析では、高純度のモノクローナル抗体が

ら非常に低レベルの HCP（ppm 以下）を同定することができます。

- NIST mAb から 48 種の HCP が同定され、タンパク質 14 種の同定を報告した以前の結果から大幅に改善しました。

---

## 参考文献

1. Hogwood BD, Smales MC. Measurement and Control of Host Cell Proteins (HCPs) in CHO Cell Bioprocesses, *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30, 153–160.
2. Doneanu CE, Anderson M, Williams BJ, Lauber MA, Chakraborty A, Chen W. Enhanced Detection of Low-Abundance Host-Cell Protein Impurities in High-Purity Monoclonal Antibodies Down to 1 ppm Using Ion Mobility Mass Spectrometry Coupled with Multidimensional Liquid Chromatography, *Anal Chem*, 2015, 87, 10283–10291.
3. Weibin C, Doneanu CE, Lauber MA, Koza S, Prakash K, Stapels M, Fountain KJ. Improved Identification and Quantification of Host Cell Proteins (HCPs) in Biotherapeutics Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, book chapter in *Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization, Vol 3, ACS Symposium Series*, 2015, 357–393.
4. Huang L, Wang N, Mitchell CE, Brownlee T, Maple SR, De Felippis MR. A Novel Sample Preparation for Shotgun Proteomics Characterization of HCPs in Antibodies, *Anal Chem*, 2017, 89, 5436–5444.
5. Chen IH, Xiao H, Daly T, Ning L. Improved Host Cell Protein Analysis in Monoclonal Antibody Products through Molecular Weight Cutoff Enrichment, *Anal Chem*, 2020, 92, 3751–3757.
6. Wang Q, Slaney TR, Wu W, Ludwig R, Tao L, Leone A. Enhancing Host-Cell Protein Detection in Protein Therapeutics Using HILIC Enrichment and Proteomic, *Anal Chem*, 2020, 92, 10327–10335.

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10160596>>

SYNAPT XS 高分解能質量分析計 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

[Progenesis QI for Proteomics <https://www.waters.com/134790665>](https://www.waters.com/134790665)

[MaxPeak Premier カラム <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135074078>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135074078)

720007101JA、2021 年 1 月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)