

Agilent ProteoAnalyzer System での NIST 抗体の分析

はじめに

米国商務省の一部門である米国国立標準技術研究所（NIST）は、さまざまな分野における技術の革新と標準化を促進するために標準物質を開発しています。その 1 つが、NISTmAb と呼ばれるモノクローナル抗体（mAb）であり、複数の分析技法で徹底的に特性解析されています^{1, 2, 3}。この抗体は、2 本の重鎖と 2 本の軽鎖で構成されジスルフィド結合により形成されています。しかし、製造、保管、取り扱いの過程において、低分子量のフラグメント不純物が生成され、モノマーより小さい重鎖と軽鎖の組み合わせが生じる場合があります。これらのフラグメントのパターンを分離し検出するための標準的な方法として電気泳動が使用されており、mAb のサイズ、濃度、組成、純度に関する情報を得ることができます。mAb 純度とグリカン占有率を完全に特性解析するには、還元状態下と非還元状態下の両方で mAb を分析できる高分解能なシステムが必要になります。

広範な特性解析の結果、NISTmAb はバイオ医薬品業界では確立された標準となっており、mAb の品質確認のための分析方法の評価に広く使用されています。アジレントは mAb 特性解析ソリューションとして、従来のシングルキャピラリー CE-SDS に代わる高速で自動化されたハイスループットを実現する新しい技術の Agilent ProteoAnalyzer system⁴ を提供しています。この技術概要では、ProteoAnalyzer での NISTmAb の特性解析結果を従来のシングルキャピラリー CE-SDS で得られた NIST の公開データと比較しました^{1, 2}。

実験手法

NISTmAb (Sigma, p/n NIST8671、標準物質 8671 の分注品、Lot 14HB-D-002)¹ は、Agilent Protein Broad Range P240 kit (p/n 5191-6640) のマニュアル⁵ に従い、還元状態下および非還元状態下の両方において、PBS で 2,000 ng/μL に調製しました。サンプルは、キット付属の試薬と 70°C で 10 分間インキュベートし共有結合によりラベル化されました。Agilent ProteoAnalyzer system⁴ を用いて、Protein Broad Range P240 Kit、LM only method で、還元抗体と非還元抗体を複数のキャピラリーで同時分析しました。非還元状態で

は、最適な結果を得るためにサンプル注入を 7 kV 6 秒に設定しました。ProteoAnalyzer でのサンプルの分析結果をデータシートおよび公開されている分析結果の NISTmAb の既知の仕様^{1,2} と比較しました。

結果と考察

NISTmAb のピーク解析

従来のシングルキャピラリー CE-SDS を用いた NISTmAb の特性解析結果は、公開されている NIST データシートに記載されています¹。ProteoAnalyzer で分析した NISTmAb の結果を NIST データシートおよび公開されている分析結果² と比較しました。

公開されている非還元 NISTmAb データと ProteoAnalyzer で得られた結果と比較した代表例を図 1 に示します。いずれの分析でも、サンプルピークの補正と定量にはマーカーを使用しています (シングルキャピラリー CE-SDS : 10 kDa ピーク、ProteoAnalyzer : 6 kDa Lower Marker (LM))。NISTmAb のメインピーク (モノマー) といくつかのより低分子のフラグメントのピークは、シングルキャピラリー CE-SDS と ProteoAnalyzer の両方で同定することができます。非還元サンプルで検出される低分子のピークには、軽鎖 (L または LC)、重鎖 (H または HC)、およびその 2 つの組み合わせ (HC:LC、HC:HC、HC:HC:LC) が含まれています。NISTmAb

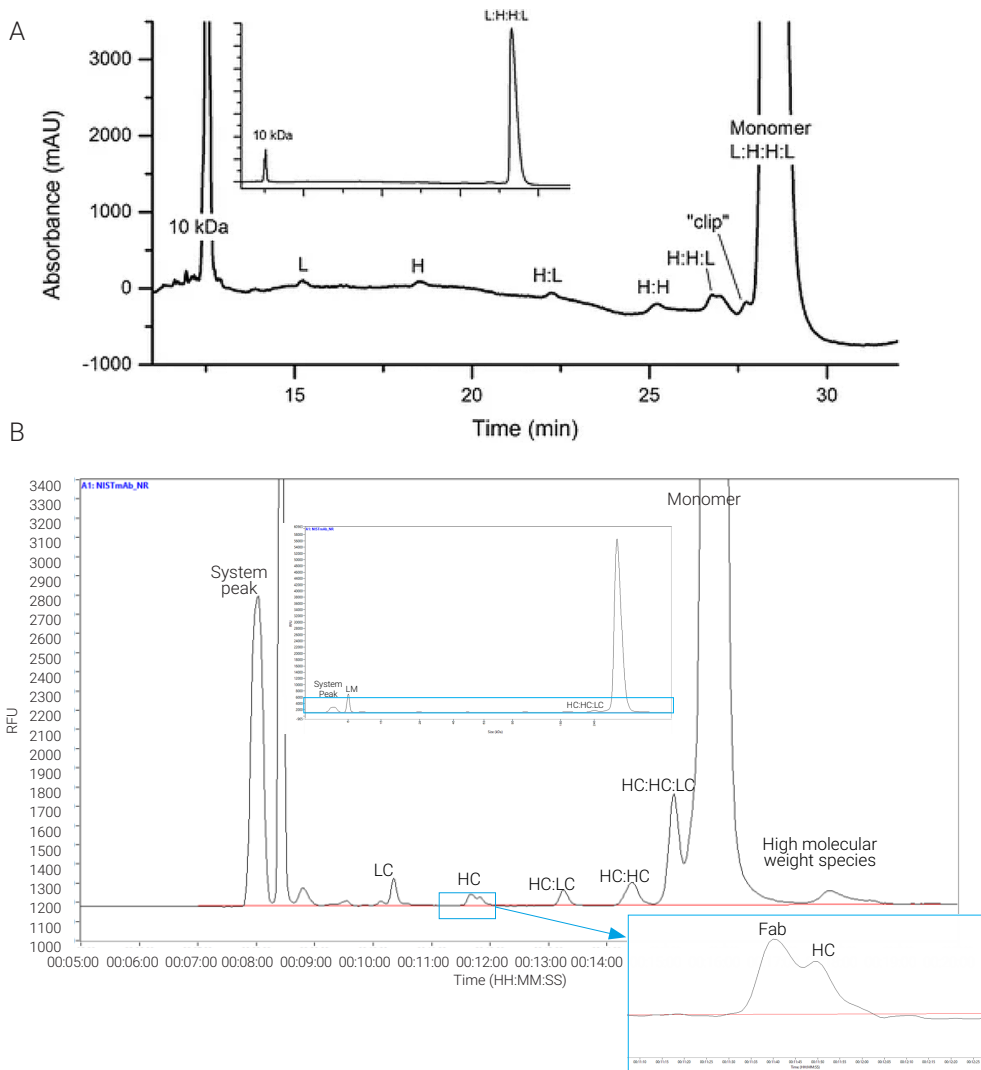


図 1. 非還元 NISTmAb

A) Turner et al.² より転載

B) Agilent ProteoAnalyzer system を用いた非還元 NISTmAb 分析結果

[Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) に基づき転載。

Turner, A., Yandrofski, K., Telikepalli, S. et al. Development of orthogonal NISTmAb size heterogeneity control methods.

Anal Bioanal Chem 410, 2095–2110 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0819-3>

データシートには示されていませんが、HC を ProteoAnalyzer で分析した場合には、2つのピークが部分的に分離され、ジスルフィド結合した抗原結合性フラグメント (Fab) 領域が検出できます⁶。さらに、高分子量 (HMW) 凝集体が存在する場合は、モノマーの右側に、以前は多量体として同定されていたピークが観察されます⁶。

同じ NISTmAb サンプルを ProteoAnalyzer で還元条件下でも分析し、そのエレクトロフェログラムを NIST データシートおよび文献^{1, 2}

と比較しました (図 2)。いずれのシステムでも、軽鎖と重鎖を容易に検出することができました。重鎖の左側の小さなピークは、非グリコシル化重鎖 (NGHC) を示しており、右側はチオエーテル (Thioether) のピーク (または nonreduced species、NRS) です。ProteoAnalyzer による還元 NISTmAb の分析では、オプションの Upper Marker (UM) を使用することで、より適切に補正され、サンプルピークのサイジング精度が向上しました。

ProteoAnalyzer による NISTmAb の評価では、従来のシングルキャピラリー CE-SDS と同等の結果が得られており、分析にどちらのシステムを使用した場合でも、信頼性の高い結果を得ることができます。

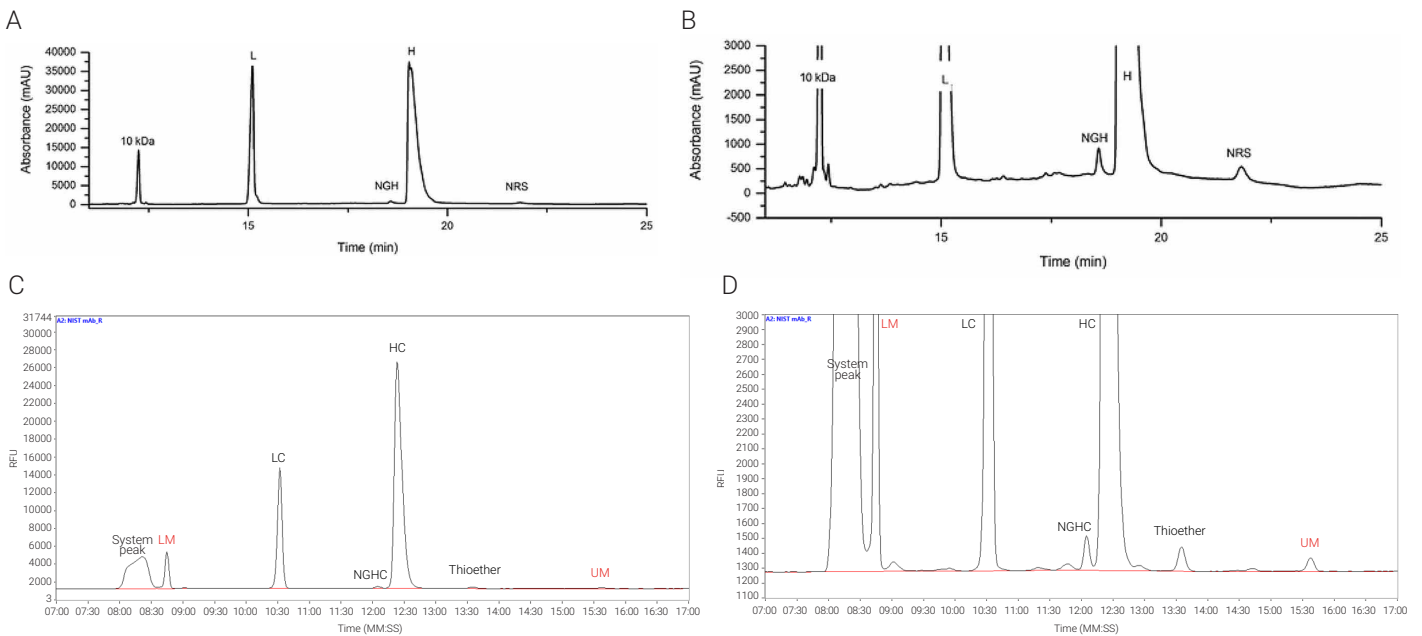


図 2. 還元 NISTmAb (NRS = nonreduced species)

A, B) Turner et al. より転載²

C, D) Agilent ProteoAnalyzer system を用いた還元 NISTmAb 分析結果

[Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) に基づき転載。

Turner, A., Yandrofski, K., Telikepalli, S. et al. Development of orthogonal NISTmAb size heterogeneity control methods.

Anal Bioanal Chem 410, 2095–2110 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0819-3>

表 1. NISTmAb の純度に関する重要品質特性をAgilent ProteoAnalyzer system で測定し、公開されている NIST データシート¹ と比較しました。
ProteoAnalyzer : 非還元条件 n = 11、還元条件 n = 33

	NIST Datasheet ¹		ProteoAnalyzer system	
	Size heterogeneity (%)	Combined standard uncertainty (%)	Size heterogeneity (%)	%CV
Monomeric Purity (nonreduced)	98.47	1.03	98.18	0.09
Thioether (reduced)	0.30	0.03	0.40	6.35
Glycan Occupancy (reduced)	99.39	0.07	99.30	0.02

NISTmAb の重要品質特性

モノクローナル抗体の品質と有効性を測定する際にきわめて重要になるのは、モノマー純度、グリカン占有率、チオエーテル (NRS) の割合といった重要品質特性 (CQA) です。バイオ医薬品を適切に評価するためには、正確で信頼性の高い分析が必要です。ProteoAnalyzer を評価するために、NISTmAb のモノマー純度、グリカン占有率、チオエーテルの割合といった CQA を確立されている式 (図 3) を用いて計算し、シングルキャピラリ CE-SDS を用いた NISTmAb の公開データ^{1,2} と比較しました。

$$\text{Monomeric Purity(\%)} = \frac{\text{Conc}_{\text{monomer}}}{\text{Conc}_{\text{monomer}} + \sum \text{Conc}_{\text{fragments}}} \times 100$$

$$\text{Glycan Occupancy(\%)} = \frac{\text{Conc}_{\text{HC}}}{\text{Conc}_{\text{HC}} + \text{Conc}_{\text{NGHC}}} \times 100$$

$$\text{Thioether(\%)} = \frac{\text{Conc}_{\text{thioether}}}{\text{Conc}_{\text{LC}} + \text{Conc}_{\text{HC}} + \text{Conc}_{\text{NGHC}} + \text{Conc}_{\text{thioether}}} \times 100$$

図 3. NISTmAb の純度に関する重要品質特性に使用した計算式 (Conc = Agilent ProteoAnalyzer system およびデータ解析ソフトウェア ProSize により測定された指定ピークの濃度 (ng/μL))

非還元タンパク質の品質の基準は、モノマーピークの純度です。NISTmAb の公開データシートでは、モノマー純度は 98.47% と報告されています¹。一方、ProteoAnalyzer を用いた分析では、モノマー純度は 98.18% であり、報告されているシングルキャピラリ CE-SDS データとの差はわずか 0.29% でした (表 1)。

還元状態については、公開データシートに 2 つの CQA が記載されており、チオエーテル量は 0.30%、グリカン占有率は 99.39% です¹。ProteoAnalyzer で分析した場合、チオエーテル量は 0.40%、グリカン占有率は 99.30% でした (表 1)。チオエーテルの測定値は公開データと同等であると同時に、グリカン占有率は非常に近い値であり、差はわずか 0.09% でした。

グリカン占有率を評価する際にきわめて重要なのは、NGHC フラグメントと HC フラグメントを分離する能力です。図 2D に示すように、ProteoAnalyzer は NGHC ピークと HC ピークを優れた分解能で分離しており、その平均 R 値は 1.60 で、還元状態での NISTmAb では NGHC/HC R ≥ 1 というキットの仕様に適合しています。R 値はキャピラリ間での再現性も高く、4.5% CV (n = 33) でした。このデータと公開されている NIST データシートとの比較結果より、ProteoAnalyzer では非還元と還元両方の NISTmAb で非常に適切な分離と CQA 評価が実施可能であることが示されました。

結論

十分に特性解析された NISTmAb は、新たな分析技術の評価用のモデルタンパク質として使用されています。この技術概要では、以前に公開されたシングルキャピラリ CE-SDS のデータ^{1,2} と ProteoAnalyzer でのデータから、これまでに確立されている計算式を用いた純度値を比較しました。ProteoAnalyzer は、サンプル分析を自動化し最大 12 サンプルを同時分析することが可能です。一度に最大 8 回の分析をユーザーによる操作なしでプログラムでき、高いスループットを実現しています。データはデジタルゲルまたはエレクトロフェログラムで表示され、各フラグメントの濃度等の情報はピークテーブルに示されます。NISTmAb の評価により、ProteoAnalyzer は公開されている参照データと相関性の高い確実な分離と純度の値が得られ、分析ワークフローにおいて高い信頼性で使用できることが示されました。

参考文献

1. National Institute of Standards and Technology; U.S. Department of Commerce. *Reference Material 8671: NISTmAb, Humanized IgG1κ Monoclonal Antibody, Lot 14HB-D-002. Reference Material Information Sheet*. Nist.gov. <https://tsapps.nist.gov/srmext/certificates/8671.pdf> (accessed 2023-10-24).
2. Turner, A.; Yandrowski, K.; Telikepalli, S.; King, J.; Heckert, A.; Filliben, J.; Ripple, D.; Schiel, J. E. Development of Orthogonal NISTmAb Size Heterogeneity Control Methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410 (8), 2095–2110. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0819-3>.
3. Schiel, J. E.; Turner, A.; Mouchahoir, T.; Yandrowski, K.; Telikepalli, S.; King, J.; DeRose, P.; Ripple, D.; Phinney, K. The NISTmAb Reference Material 8671 Value Assignment, Homogeneity, and Stability. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410 (8), 2127–2139. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0800-1>.
4. Dependable Denaturing Protein Electrophoresis; Agilent ProteoAnalyzer system. *Agilent Technologies brochure*, publication number 5994-6716EN, **2023**.
5. Agilent Protein Broad Range P240 Kit. *Agilent Technologies quick guide*, publication number D0031125, **2023**.
6. Moritz, B.; Stracke, J. O. Assessment of Disulfide and Hinge Modifications in Monoclonal Antibodies. *Electrophoresis* **2017**, 38 (6), 769–785. <https://doi.org/10.1002/elps.201600425>.

www.agilent.com/genomics/proteoanalyzer-jp

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタマコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

G240628

www.agilent.com/genomics/genomics-jp

© Agilent Technologies, Inc. 2024

本書の一部または全部を画面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, January 18, 2024

5994-6960JAJP