

Simple Westernでバイオプロセス中の不純物質の検出

医薬品製造過程関連の不純物の同定および定量

Introduction

バイオ医薬品の開発および製造過程の関連不純物の同定および定量は、治療薬の品質、有効性および安全性を証明するために重要です。通常、これらの不純物は、生産細胞株、細胞培養/維持またはその後の処理中に使用された試薬あるいはその成分に由来する残留物である。微量の残留蛋白質は、in vivoで外来抗原として認識され、致命的な免疫応答を引き起こす可能性があります。さらに、処理中に使用された試薬または成分の微量残渣は、製品の安定性を変化させ、治療効果を低下させることがあります。従って、不純物の正確な検出は必須ですが、潜在的な不純物の元や種類の範囲、それらの残存の微量さ、あるいは試料の複雑なマトリックスを考慮すると簡単ではありません。

このアプリケーションノートでは、バイオ医薬品およびワクチン開発プロセスの様々な段階で存在し得る4つの主要なコンタミ物質(ホストセル蛋白質(HCP)、Protein A、GFP(緑色蛍光蛋白質)およびBSA(ウシ血清アルブミン))の正確な検出を中心に説明します。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、フローサイトメトリーおよび従来のウェスタンブロッティングのような残留物の濃度を評価する現在の方法は、手間がかかるうえエラーが発生しやすいものです。これら従来の方法は、より詳細なコンタミネーションプロファイルを得るために必要な特異性と柔軟性が不足しているため、分子量に基づくデータ、多量体、および検出下限などといった重要な情報に気がつかないことがあります。結果を見誤る可能性があります。これら従来法の欠点を高感度で分解能の良いSimple Western™イムノアッセイがどのように解決するのかを示します。

Simple Westernの利点

現在のアプローチは、残留物質の濃度が規制ガイドラインを下回っているかどうかを調べる目的では十分であるかもしれませんが、しかしながら、Simple Westernイムノアッセイでは、アッセイの感度や精度を損なうことなく、より短い時間で測定することができます。分子量または電荷に基づく分離、蛋白質断片または多量体の分離、シグナルの直線性、変動係数(CV)、検出限界(LOD)および定量限界(LOQ)と様々な角度から情報を再現性高く得ることができます。Simple Westernアッセイは、変性または還元条件との適合性により、試料マトリックスによる干渉も減らします。また時間のかかるプレート洗浄や試薬/緩衝液調製ステップを排除することで、解析等に多くの時間を費やせるようになります。

Simple Westernイムノアッセイは、従来のウェスタンブロッティングで問題となる多くの課題を解決するキャピラリーベースの全自動蛋白質分析ツールです。Wes™ (PN 004-600)、Peggy Sue™ (PN 004-800)、

Sally Sue™ (PN 004-700)、NanoPro™1000 (PN 004-109)の4種類のシステムがあり、分子量に基づいて分離し、pg/mLレベルの感度を得るには、proteinsimple Master Mixで希釈したわずか3 μ L(Wes)または5 μ L(Peggy Sue / Sally Sue)のサンプルを使用するだけです。Peggy SueまたはNanoPro 1000での電荷に基づく分離アッセイでも、12 μ Lのサンプルしか必要としません。Simple Western用のソフトウェアのCompassで自動解析を行い、再現性の高い定量結果をアッセイ内CV値15 %未満で提供します。

すべてはオープンプラットフォームなので、検出用の一次抗体があれば、不純物質の存在を評価することができます。Wesは、わずか30分のセットアップと測定3時間ですべての工程を完了して25個の分子量に基づき分離されたデータが得られます。高いスループットが必要な場合や、分子量と電荷の両方による分離を行うことができる機器が必要な場合は、Sally Sue(分子量のみ)、NanoPro 1000(電荷のみ)、Peggy Sue(分子量と電荷)が、約1時間の手作業と測定一晚で96個のデータを提供します。

ホストセル蛋白質

ホスト: 哺乳動物細胞

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、治療用蛋白質生産のために最も一般的に使用される宿主です。理由の一つは、大規模な無血清あるいは既知組成の懸濁培養に迅速に適応して増殖するためです。二つ目は製品が生物活性を発現するために必要である翻訳後修飾に必要な構造を有するためです²。バイオ医薬品を宿主細胞培養上清中に分泌させて回収する場合、培養上清には宿主細胞(HCPs)に特異的な蛋白質不純物も含み、この例では、CHO細胞の培養上清には、CHO細胞に特異的な蛋白質不純物も含まれます。宿主細胞蛋白質(HCP)の法的な許容限度レベルは設定されていませんが、バイオ製品1 mgあたり100 ng以下のHCPが一般に許容範囲とみなされています³。

Simple WesternのPeggy Sueを使用したサイズおよびチャージベース(分子量および電荷に基づく)でのHCPの検出におけるアッセイの有用性を実証するために、CHO HCP control antigen concentrateおよびBiotinylated goat CHO HCP antibody(Cygnus Technologies、PN F553Xおよび3G-0016-AFB)を用いてアッセイ検出範囲を決定しました。Premix G2、pH 3-10分離勾配およびpI standard Ladder I(PN 040-968および040-644)におけるCHO HCP control

antigen lysate の $1 \mu\text{g/mL}$ ~ $0.037 \mu\text{g/mL}$ の段階希釈溶液を、デフォルトのPeggy Sue等電点電気泳動(IEF)条件を用いて評価しました。Biotin Detection Module(PN DM-004)を用いてCHO HCP control antigenを検出しました。その際、Biotinylated anti-CHO HCP primary antibody(50倍希釈)を60分間、Ready-to-use Secondary Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) conjugateは30分間反応させました。**図1A**のCompass for Simple Westernソフトウェアで生成したCHO HCP control antigen lysateのチャージベースの分離レーンビューに示すように、Anti-CHO HCP antibodyはわずか37 ng/mLのCHO HCP (LOD)も検出しています。その直線性を評価するために、各サンプルの濃度は、Compassでピーク面積に対してプロットして標準曲線を作成することができます;**図1B**は、この結果と相関係数 $R^2 \geq 0.99$ と強い直線関係を示しています。アッセイLOQは104ng/mLでした。

様々なpH値で不純物が存在するため、分解しているように見える最終製品の純度を分析する場合、数あるアプリケーションの中でも電荷分布情報は有用です。 $1 \mu\text{g/mL}$ のCHO細胞由来のHCPサンプルの電荷分離プロファイルを、レーンビューとグラフビューの両方で、**図2**に示しています。

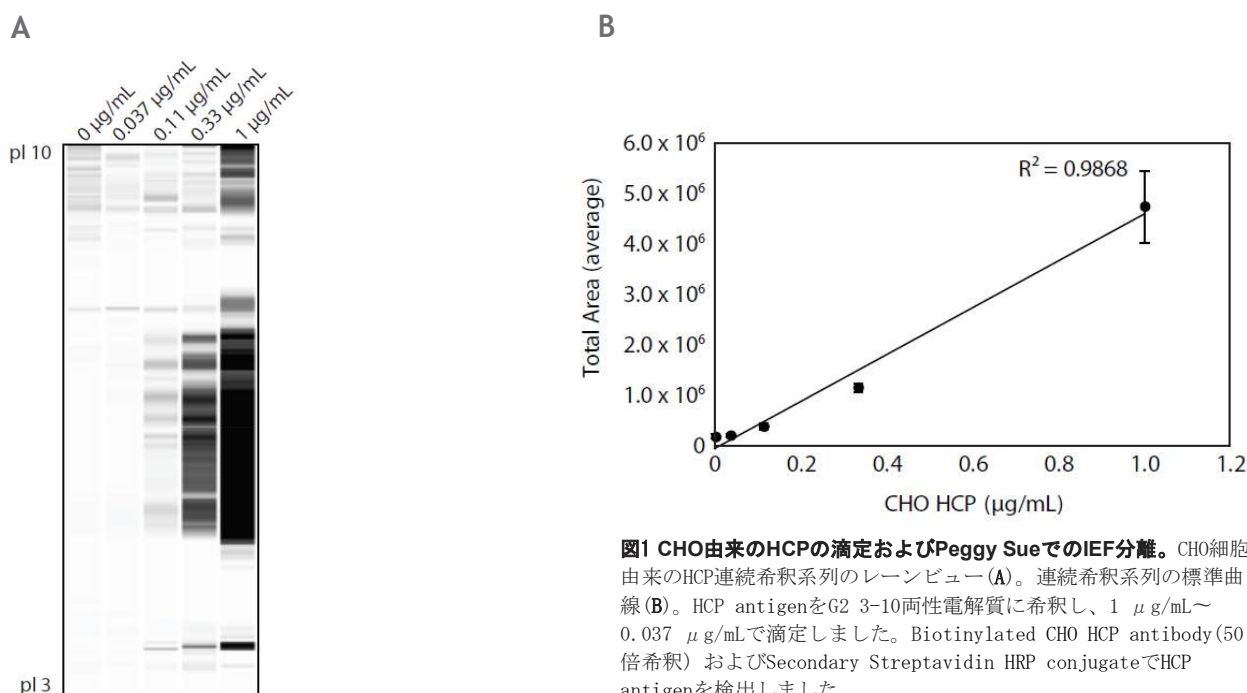


図1 CHO由来のHCPの滴定およびPeggy SueでのIEF分離。CHO細胞由来のHCP連続希釈系列のレーンビュー(**A**)。連続希釈系列の標準曲線(**B**)。HCP antigenをG2 3-10両性電解質に希釈し、 $1 \mu\text{g/mL}$ ~ $0.037 \mu\text{g/mL}$ で滴定しました。Biotinylated CHO HCP antibody(50倍希釈)およびSecondary Streptavidin HRP conjugateでHCP antigenを検出しました。

Peggy SueのIEFアッセイの必要サンプル量はわずか12 μ Lですが、生成されるデータの高解像度を損なうことはありません。同じサンプルウェル(Sally Sue、Peggy SueまたはNanoPro 1000)から複数のサイクルを実行することにより、貴重な材料を無駄にせずに複数の不純物質を検出することができます。また、Peggy Sueで1 μ g/mLを分析することと、キャピラリーにわずか400 pgをロードすることは同じことです。このように、Peggy Sueの電荷ベース分離は、純度に影響しうる一連の開発プロセスの様々な段階での製品の安定性の管理/測定を強化することができます。

サイズとチャージの両方に基づいて分離できるPeggy Sueと同様、Sally Sueのサイズベース分離やNanoPro 1000のIEFアッセイを使用して、バイオ医薬品の精製プロセス中のHCPおよび他の不純物の存在を評価することもできます。Biogen社の研究者は、最近、組換え融合-Fc蛋白質の産生による残留宿主セルのHSP70の存在やその除去を定量し、相関係数 R^2 値が0.99以上の精度で、検出範囲が250 ng/mL～1.25 μ g/mLであることを示しました⁴。Biogen社の研究者は、ウェスタンブロッティングと比較して、不純物と融合-Fcポリペプチドとの違いをSally Sueでは明確な解像度を持った分子量で検出可能であるが、他の方法では検出できないことを指摘しています。別の刊行物において、Genentech社の蛋白質分析化学者は、HCPの存在が懸念される粗細胞ライセート中の電荷バリエーションをモニターするためのNanoPro 1000の応用について報告しています⁵。

採取した細胞培養液を様々なpI値の精製IgG蛋白質に加えることにより、研究者は、マトリックス干渉なしに、3%未満のCV値で、そのライセートから蛋白質生成物を正確に検出することができました⁵。4 μ g/mL～12.5 ng/mLの連続希釈ライセート溶液を作って分析した結果、優れたアッセイ直線性($R^2 \geq 0.99$)を示し、分析された電荷バリエーションのLODは6ng/mLでした。NoproPro 1000で粗製細胞ライセート中の蛋白質産物を、pI値で正確に評価することはバイオ製剤の開発および生産に非常に有用です。

ホストセル蛋白質

ホスト: 細菌細胞

組換え蛋白質の産生のために一般的に使用されるもう一つの発現系は、大腸菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) ですが、これも同様にそのHCPを定量化し、そして最小化するように努めなければなりません。この例では、Wesと12-230 kDa Wes Separation Module (PN SM-W004) を用いて大腸菌由来のHCPを検出します。*E. coli* HCP control antigenおよびanti-*E. Coli* HCP antibodyは、Cygnus Technologies (PN F417およびF117-PA) から購入しました。Anti-*E. Coli* HCPは、Anti-Goat HRP Detection Module (PN DM-006) を用いて検出しました。図3は、anti-*E. Coli* HCP antibody (10倍希釈) で検出された大腸菌HCPの滴定範囲 (100 μ g/mL～1.23 μ g/mL) を示しています。標準曲線に基づいて、滴定データの直線性 ($R^2 = 0.9659$) やアッセイ LOD (15.7ng/mL) を算出しました。

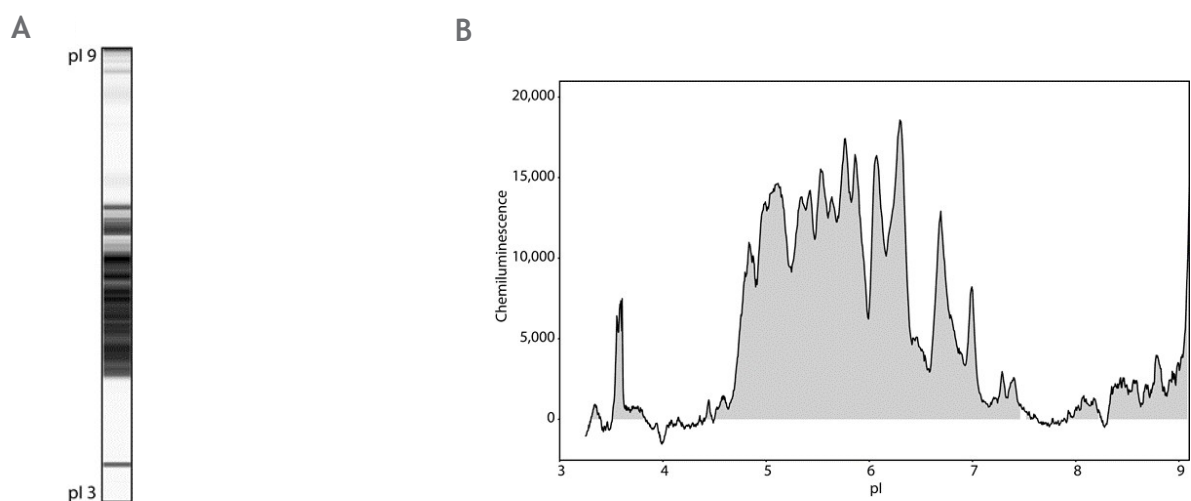


図2. CHO由来のHCPライセート (1 μ g/mL) のPeggy Sueでの分離。 CHO由来のHCPライセートのレーンビュー(A)。CHO由来のHCPライセートとピークフィッティングのグラフビュー(B)。Biotinylated CHO HCP antibody(50倍希釈)およびSecondary Streptavidin HRP conjugateでHCP antigenを検出した。

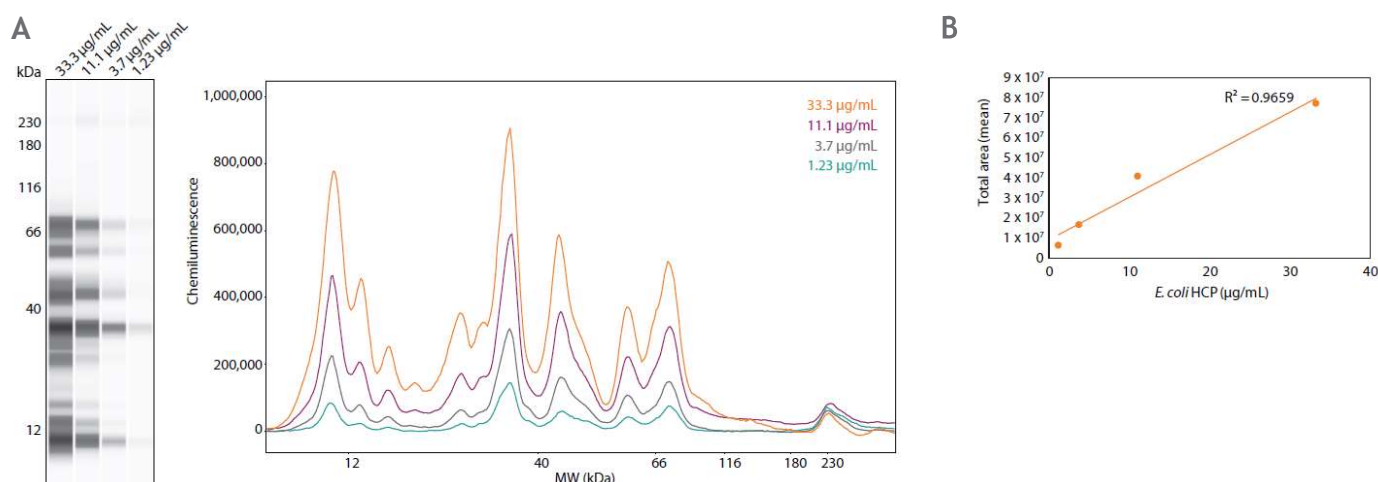


図3 Wesでの*E. coli* HCP antigenの検出。Compass for Simple Westernでのレーンビューとグラフビュー(A)。HCPライセートの濃度を、平均バックグラウンドで補正後の総ピーク面積に対してプロットしました(B)。*E. coli* HCP antigenを0.1×Sample bufferで希釈し、デフォルトのSimple Westernプロトコルに従って33.3 µg/mLから1.23 µg/mLまで滴定した。Goat anti-*E. coli* HCP antibodyをAntibody Diluent 2(PN 042-203)で希釈し、続いてAnti-goat secondary HRP conjugateを希釈した。他のすべての機器およびアッセイ条件は標準設定であった。

Protein A

Protein Aクロマトグラフィーを用いて、多くの治療用蛋白質が細胞培養培地から単離されます⁶。精製行程中にProtein Aが固相から浸出し、精製製品中に混入することがあります。in vivoでの潜在的な免疫原性の影響を未然に防ぐために、残留Protein Aの検出および低減が必要であると規制ガイドラインが示すように残留Protein Aは問題となり得ます。Protein AおよびProtein A由来のリガンドには、IgGと結合し得る領域がいくつか存在するため、検出には工夫が必要で、定量は容易ではありません⁷。いくつかの最適なアプローチがあるかもしれませんが、Wesは標的蛋白質と同様の分子量をもつ他の不純物とを分けて定量できるという点で優れています。

図4では、Wes 12-230kDa Separation Moduleを使用し、長短二種の組換えProtein A (Novus Biologicals、NBP2-34964 および NBP2-34966) の倍希釈シリーズ(400 µg/mL～25 µg/mL)を用いてその分離を評価しWesの感度を実証しています。R&D Systemsのanti-Protein A antibody(PN MAB99761) およびDonkey anti-rat HRP secondary antibody(Jackson ImmunoResearch Laboratories、PN 712-035-153)をAntibody Diluent 2で希釈し、それぞれ1.2 µg/mLと13.5 µg/mLの最終濃度で検出に使用しました。Protein Aの短い方(図4、左)および長い方(図4、右)の抗原滴定の電気泳動図および直線性の結果を示しています。

抗Protein A抗体は、内部蛍光標準(230 kDa)とのわずかな交差反応性を示します。この(交差)結合はProtein Aの長短それぞれ約42 kDaおよび55 kDaの見かけの分子量を有し、230 kDaのピークから十分に分離されているので定量には影響しません。Wesの感度および信頼性を検証するために、各アッセイの直線性の結果を用いてLODおよびLOQ値を決定しました。Protein Aの短い方のアッセイLODは28.1 pg/mLで、LOQは74.1 pg/mLでした。Protein Aの長い方のアッセイLODは39.6 µg/mLで、LOQは133.0 µg/mLでした。

実際の条件に近い状態で測定するために、組換えProtein Aの短い方を連続的に段階希釈し、CHO細胞由来のHCPライセートに添加しました。Cygnus TechnologiesのHCP Antigen Concentrate (0.1 mg/mL)を使用し、CHO細胞由来のHCPライセートの存在下および非存在下でLOD/LOQを計算しました。その直線性の比較から、CHO細胞由来のHCPの存在下で、Protein Aの検出能力はわずかに低下していました(図5、左)。そのためわずかに高いLOD/LOQとなっていました(図5、右)。しかしながら、アッセイのLODは、標準曲線に基づいて検出されたProtein Aで28.1pg/mLというわずかな量でした。CHO細胞由来のHCPライセート溶液が高密度で複雑な環境においても、Protein Aの低いLOD(35.3 pg/mL)が得られており、これは現行の規制ガイドラインに沿ったものです⁸。

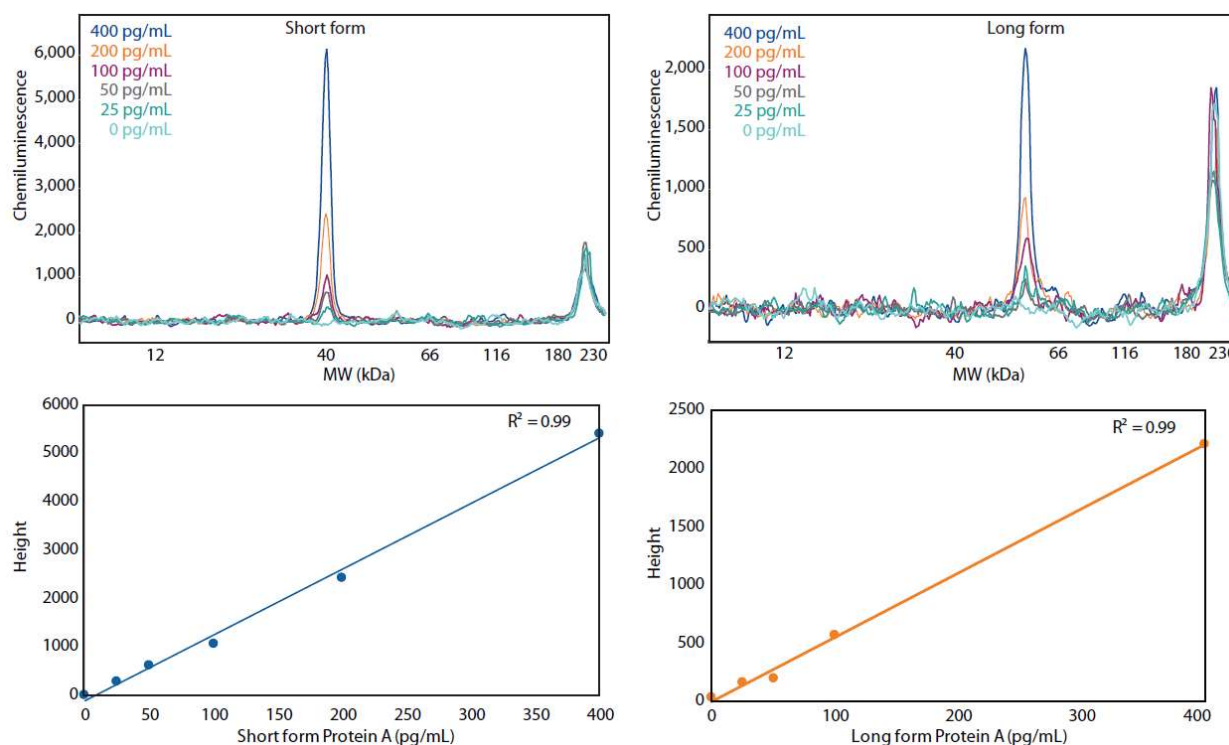


図4 WesでのProtein Aの検出およびアッセイの直線性。Protein Aの短い方(左)および長い方(右)のCompass for simple westernによるグラフビュー。Protein Aの短い方(左)および長い方(右)を0.1×Sample bufferに希釈し、400 pg/mL～25 pg/mLで滴定した。Protein Aの両方の形態は、同じ一次および二次抗体を用いて検出することができました。

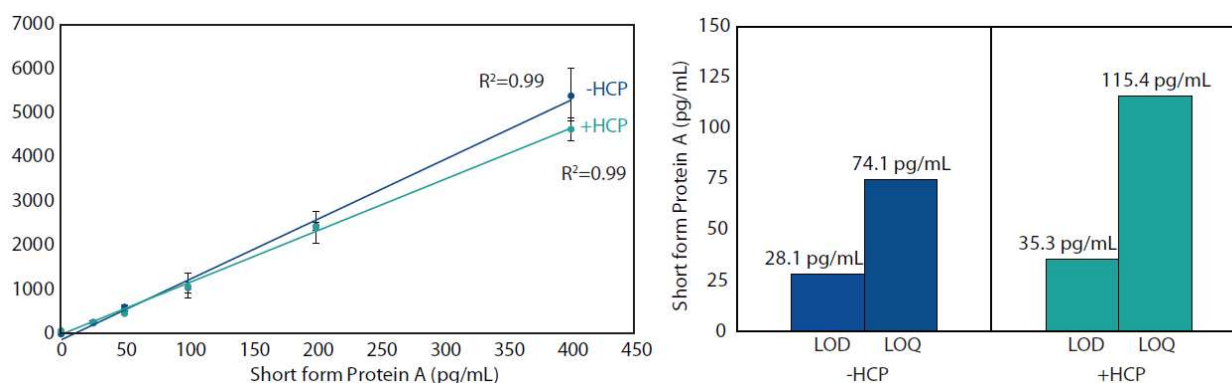


図5 CHO細胞由来のHCPに添加したProtein Aの直線性およびLOD / LOQデータ。Protein A(短い方)をCHO HCP control (0.1 mg/mL)で滴定した。データを0.1 × Sample Bufferで段階希釈したProtein Aと比較した。直線性データ(左)では、Protein Aの標準曲線の傾きにおいて、HCPで希釈すること、わずかな減少がみられたことを示しています(n=2)。CHO HCP antigenの存在下でLODおよびLOQはわずかに増加した(右)。

GFP (緑色蛍光蛋白質)

哺乳類細胞が標的産物をコードする組換えDNAでトランスフェクトされる上流のバイオプロセスでは、トランスフェクション効率を測定するためのマーカーとしてGFPを日常的に同時にトランスフェクトされています。さらに組換え蛋白質産物は、しばしばバイオセンサーとしてのGFPと遺伝的に融合されて、発現モニター、可溶性の促進、あるいは精製を容易にするために利用されています。残留GFPの検出には、分解または凝集したGFPタグ付き蛋白質断片を判別するに十分な高感度の方法が必要です。

Wesは、1 ng/mL以下の感度でGFP混入物の同定ができます。図6Aでは、標準曲線を使用して、

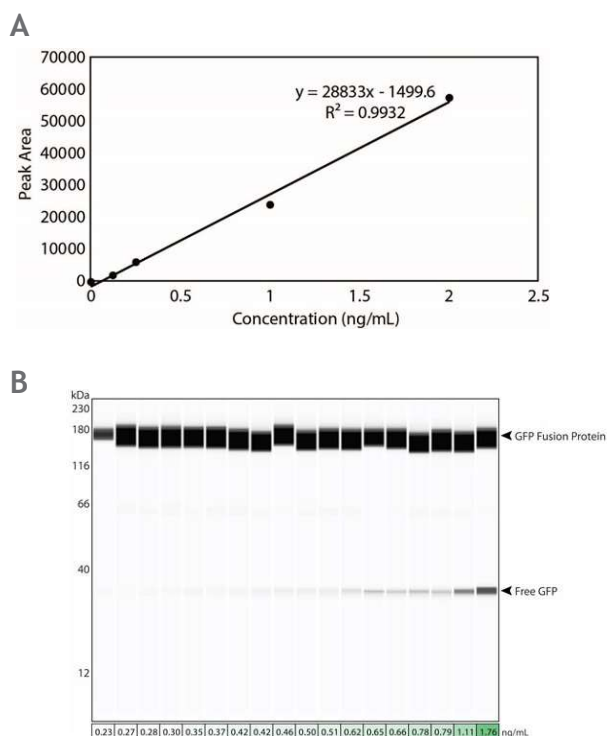


図6. WesでのGFP検出。Compass for Simple Westernソフトウェアを使用して、組換えGFPの段階希釈(2 ng/mL~0.125 ng/mL)における各試料濃度とそのピーク面積をプロットし、それに基づく近似曲線(A)。コンパスソフトウェアによって生成された遊離GFPのレーンビュー(B)。150 kDaのバンドはGFP標識された標的蛋白質を表し、30 kDaのバンドは、遊離(残留) GFPです。(A)で生成された線形方程式を用いて各試料中の遊離GFP濃度を計算し、白色から緑色の陰影は低~高濃度のGFPをそれぞれ表しています。

0.1×Sample bufferで組換えクラゲGFP (Novus Biologicals、NBC1-22949)を段階希釈し、調製した試料中のGFP残存濃度を計算する例を示します。図6Bは、Wes 12-230 kDa Separation Module、Anti-Goat Detection ModuleおよびAntibody Diluent 2(15 μg/mL)で希釈したanti-GFP antibody(R&D Systems、PN AF4240)を用いて、トランスフェクトしたHEK293細胞のライセートで2つの別々のバンドを分離したケースを示しています。観察された低分子量(30 kDa)および上位分子量(150 kDa)蛋白質は、Wesではっきりと分離し、GFPタグ付き標的蛋白質および残留遊離GFPをそれぞれ表しています。図6Aの標準曲線を用いて各試料中の遊離GFPの濃度を計算します。その下の図6Bは各レーンのゲル表示で、Compassソフトウェアを用いてレーンを並び替え、GFPの低~高検出の順に表示しています。ここではわずか0.23 ng/mLの残留GFPも検出しました。

次の例では、GFPに融合した様々な組換え蛋白質を発現させるために、同じ宿主細胞株HEK293を使用しました。氷上で30分間、Aqueous Inhibitor Mix (PN 040-482)およびDMSO Inhibitor Mix(PN 040-510)を含んだBicine/CHAPS Lysis Buffer(PN 040-764)中で細胞を溶解しました。試料を15,000×gで10分間遠心し、前述のGoat anti-GFP antibodyを検出に用いて、細胞ライセート0.1 mg/mLを、Wesで分析しました(図7)。標的蛋白質産物は、緑色の枠で囲まれています。標的蛋白質の下に現れるバンドはおそらく蛋白質分解物で、上のものは多量体、またはより高次の凝集体の可能性があります。これらは、クローン選択およびスケールアップの際、望ましくない事象です。これらは、異なる分子量の蛋白質を区別することができないELISAおよびフローサイトメトリのような他のアッセイでは検出できない典型的な状況です。Wesは、感度を損なうことなく迅速な同定が可能で、従来のウェスタンブロットやフローサイトメトリあるいはELISAでは得られない濃度と分子量の情報を提供します。

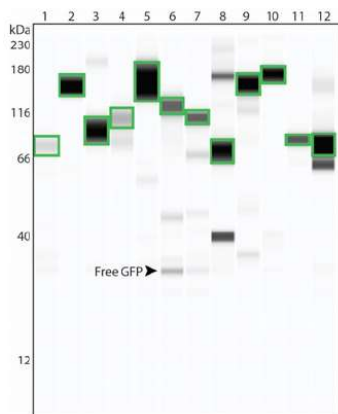


図7 様々なGFPタグ付き組換え蛋白質でトランスフェクトされたHEK293細胞。細胞を、Aqueous Inhibitor MixおよびDMSO Inhibitor Mixを含むBicine/CHAPS Lysis Bufferで溶解した。検出用のGoat anti-GFP antibodyを用いてWesで0.1 mg/mLを分析した。標的蛋白質産物は緑色のボックスで囲まれています。未融合GFPは矢印で示されています。

BSA(牛血清アルブミン)

BSAは、ワクチンの製造中に使用される培地の主要成分であるため、ワクチンの調製中に一般に混入がみられる不純物質です⁸。残留BSAは、in vivoでアレルギー性免疫応答を誘発する可能性があり、世界保健機関(WHO)によって厳しく規制されています⁹。Simple Westernの堅牢な分析能力を実証し、ここで示されている“概念を実証する”研究を確認するために、ワクチン製剤中の残留BSAの検出のためにWesとPeggy Sueの両方を採用したメルク社のワクチン開発研究者による最新の出版物を紹介します⁸。

研究者らは、12-230 kDa Separation Moduleを使用して、純度が $\geq 98\%$ のBSA protein reference standard ampules (ThermoFisher, PN 23209)の連続希釈系列(600 ng/mL $\sim$ 7.4 ng/mL)とRabbit anti-BSA antibody (Bethyl Laboratories, PN A10-127A)を用いて標準曲線を作成しました($R^2 \geq 0.9994 \pm 0.0008$)。この曲線に基づいて試験ワクチン試料中のBSA濃度を決定しました⁸。Simple Westernの分子量に基づいたアッセイにより、分析されたワクチン製品内で二量体および高次凝集体の同定が可能になり、またCV値が10%未満でデータを再現することができました。特に、著者らが強調するように、従来のウェスタンブロットの再現性はCV値で35%を超えると指摘しています。

Conclusions

Simple Westernの精度、感度、柔軟性は、バイオ生産でプロセス関連の不純物質を検出する従来のアプローチのよきライバルとなります。これは文献やここで提示されているように、業界認定基準内で、達成可能な R^2 、LOD、LOQおよびCV値によって立証されています。最小限の手作業とアッセイ時間で、Simple Westernは分子量、蛋白質の電荷、分解生成物、オリゴマー化状態などの情報を他の属性と組み合わせて提供します。また分析には変性または還元された試料を用いることもできます。サンプル調製後のプロトコルは完全自動化されていて、Compass for Simple Westernソフトウェアは、不純物の残留量を自動的に定量化し、時間と労力を最小限に抑えます。このアプリケーションノートで概説されているHCP、Protein A、GFPおよびBSAの評価および特性評価のための方法は、バイオ医薬品の開発プロセス全体にわたる定量的および信頼性の高いプロトコルとしての適応が可能であることを示しています。

References

1. Applications of an automated and quantitative CE-based size and charge Western blot for therapeutic proteins and vaccines, RR Rustandi, M Hamm, C Lancaster and JW Loughney, Chapter 16 in *Methods in Molecular Biology: Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides*, NT Tran and M Taverna (editors), Springer Science+Business Media New York, 2016; 1466:197-217.
2. Posttranslational modification and the immunogenicity of biotherapeutics, R Jefferis, *Journal of Immunology Research*, 2016; 5358272.
3. Assays for controlling host-cell impurities in biopharmaceuticals, T Wolter and A Richter, *BioProcess International*, 2005; 2:40-6.
4. Characterization of a biopharmaceutical protein and evaluation of its purification process using automated capillary Western blot, D Xu, S Mane and Z Sosic, *Electrophoresis*, 2015; 36:363-70.
5. Charge heterogeneity of monoclonal antibodies by multiplexed imaged capillary isoelectric focusing immunoassay with chemiluminescence detection, DA Michels, AW Tu, W McElroy, D Voehringer and O Salas- Solano, *Analytical Chemistry*, 2012; 83:5380-6.
6. Protein A chromatography for antibody purification, S Hober, K Nord and M Linhult, *Journal of Chromatography B*, 2007; 848:40-7.
7. Product Datasheet: Recombinant Protein A Long Form Protein NBP2-34966, Novus Biologicals, Available online at https://www.novusbio.com/products/protein-a-biologically-active-protein_nbp2-34966. Accessed March 28, 2018. Updated February 18, 2018.
8. Residual bovine serum albumin (BSA) quantitation in vaccines using automated Capillary Western technology, J Loughney, C Lancaster, S Ha and R Rustandi, *Analytical Biochemistry*, 2014; 461: 49-58.
9. WHO expert committee on biological standardization, *WHO Technical Report Series 941*, Geneva, 2007.



Toll-free: (888) 607-9692
Tel: (408) 510-5500
info@proteinsimple.com
proteinsimple.com

© 2018 ProteinSimple. ProteinSimple, NanoPro 1000, Wes, Sally Sue, Peggy Sue, and the ProteinSimple logo are trademarks and/or registered trademarks of ProteinSimple.

PL7-0009 , Rev A