バイオプロセス中の残留Protein Aへの応用

イントロダクション

治療用モノクローナル抗体（mAb）は通常、プロテインAクロマトグラフィーを用いて細胞培養液から単離されます[1]。精製工程中にプロテインAが固相から浸出し、最終的に精製品に混入することがあります。規制ガイドラインでは、インビボでの免疫原性の影響を未然に防ぐために、残留プロテインAの検出と除去が必要であると定められており、問題となる可能性があります[2]。従って、高感度およびハイスループットで製品の特性評価時に残留プロテインＡの汚染を迅速に検出することが急務となっています。ELISAベースの方法では多くの時間と手作業、そして正確な時間間隔での手動洗浄およびインキュベーション工程を必要とします。さらにELISAの感度は抗体およびタンパク質抗原によって異なるため、非常に低濃度のタンパク質（<1 ng/mL）を検出するのには適していないこともあります。これらの欠点は、ELISAの結果を複雑にすることがあるマトリックス干渉効果によってさらにひどくなります。

イムノアッセイとキャピラリー電気泳動を組み合わせたProteinSimpleのWes™は強力なソリューションとなります。Wesは完全に自動化されており、簡単なアッセイの設定後何もする必要がなく、時間と労力を大幅に削減しながら精度と再現性を高めます。 マトリックス干渉を最小限に抑えるので、サンプル中のプロテインAの定量の正確性に自信を持つことができます。 さらに残留プロテインAの分子量情報も得ることもできます。ここではELISAの問題点を心配せずに、どのようにしてWesで28 pg/mLもの低濃度プロテインAを高感度で迅速に検出できるかを紹介します。

材料

ProteinSimple

- 装置 ： Wes
- Wes 12-230 kDa 分離モジュール(PN SM-W004)
- No Secondary 検出モジュール(PN DM-003)

Protein A 試薬

- Recombinant Protein A short form (Novus Biologicals, NBP2-34964)
- Recombinant Protein A long form (Novus Biologicals, NBP2-34966)
- Anti-Protein A antibody (R&D Systems, MAB99761)

他の試薬

- Donkey anti-Rat HRP (Jackson Immunoresearch, 712-035-153)
- CHO HCP Antigen Concentrate, 3G (Cygnus Technologies, F553X)

方法

1. 10X Sample Bufferを水で100倍希釈して0.1X Sample Bufferを準備します。
2. Anti-Protein A antibodyをAntibody Diluent 2（PN 042-203）で1.2 µg/mLになるように希釈します。
3. Donkey anti-Rat HRP secondary antibodyをAntibody Diluent 2で13.5 µg/mLになるように希釈します。
4. LOD（検出限界）とLOQ（定量限界）を決定するのに、Recombinant Protein Aのshort formとlong formを製品仕様書に従って再懸濁し、0.1X Sample Bufferで段階希釈を作成します。

   この例では400 pg/mLから25 pg/mLの2倍希釈の連続段階希釈溶液を作成しました。
5. CHO HCPの存在下でLODとLOQを決定するのに、CHO HCPストックを0.1X Sample Bufferで0.1 mg / mLに希釈し、さらに0.1 X Sample BufferでCHO HCP抗原の希釈系列を作成します。
6. サンプルの準備やアッセイの条件はWesのデフォルト条件に従います。

結果

アッセイの定量範囲を確立するために、プロテインAのShort formとLong formの定量をWesで評価しました。図1ではプロテインＡ抗原の定量をエレクトロフェログラムで示し、図2ではそれを直線性で示し、そして図３ではLODおよびLOQを示しています。

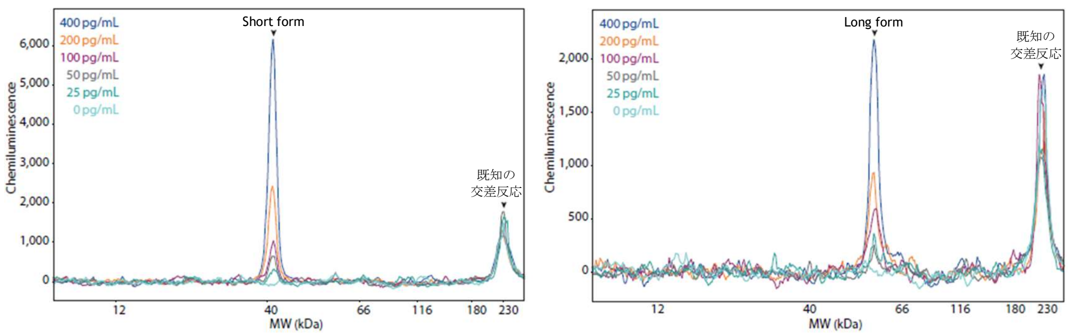

図 1. Wesを使ったプロテインAの検出。 0.1 × Sample bufferでプロテインAのShorm form（左）およびLong form（右）を希釈し、400 pg/ mLから25 pg/mLまで定量しました。抗プロテインA抗体を用いてプロテインAを検出しました。

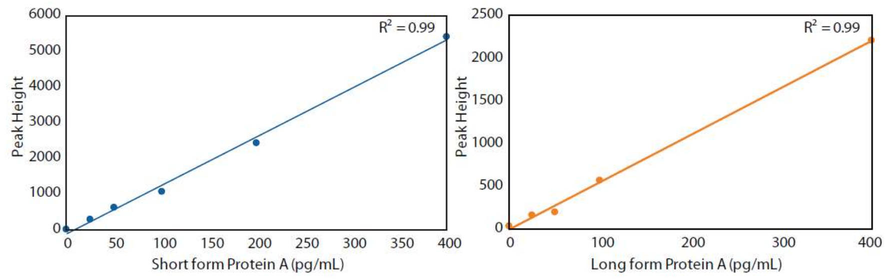

図 2. プロテインA抗原を使った定量検査の直線性。 0.1 × Sample bufferでプロテインAのShort form （青）およびLong form（橙）を希釈し、400 pg / mLから25 pg / mLまで定量しました。 プロテインAは抗プロテインA抗体を用いて検出しました。

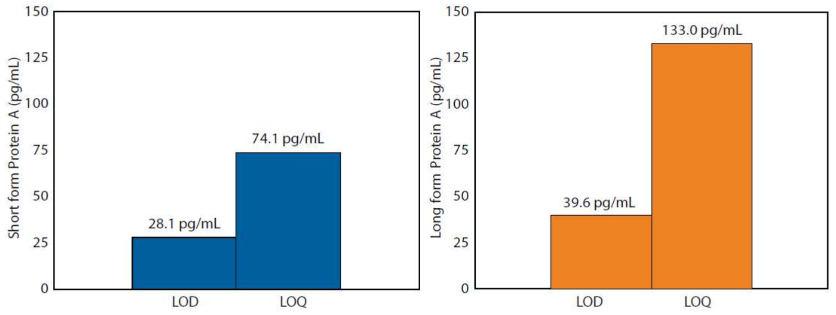

図 3. プロテインA抗原を使ったLOD / LOQ測定。 図2に示す直線性データを用いて、プロテインAのShort form（青）とLong form（橙）のLOD / LOQを決定しました。

プロテインA抗体は、230kDaの蛍光スタンダードとわずかに交差反応を起こします。 プロテインAのShort formおよびLong formの見かけの分子量は～42および～55kDaで、230kDaのピークから十分離れているので、この交差反応は定量に影響を及ぼさないと考えられます。この交差反応を避けるために、標準的な12～230 kDaのマスターミックスの代わりに2～40 kDaの蛍光マスターミックス（Fluorescent 5x Master Mix 5、PN PS-FL05-8）を使用することもできます。

実際のサンプルにより近づけるために、プロテインAのShort formをライセートにスパイクしました。 Cygnus CHO HCP Antigen Concentrate（0.1 mg / mL）を使用し、CHO HCPライセートの非存在下および存在下でのLOD / LOQを比較しました（図4）。CHO HCPの存在下で直線性の比較を行った結果、プロテインAの検出において大きな変化はありませんでした。 さらに、プロテインAのLOD / LOQは、CHO HCPの存在下で増加しました。

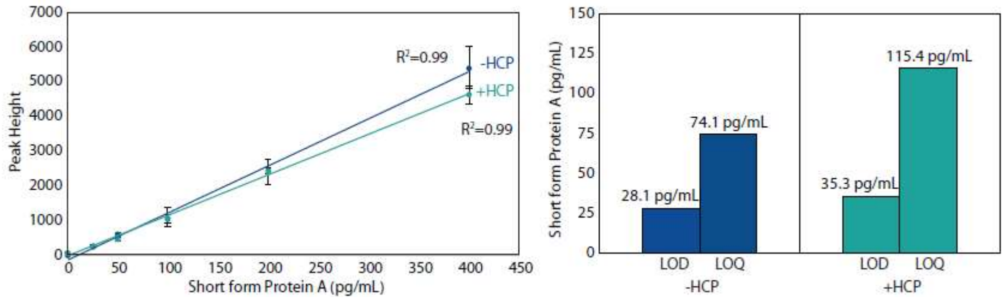

図 4. CHO HCPの非存在下および存在下でのプロテインAの直線性（左）とLOD / LOQデータ（右）。プロテインAのShort formの定量検査を一定量のCHO HCPコントロール抗原 (0.1 mg/ mL)中で行い、0.1 × Sample bufferで希釈したプロテインAの定量結果と比較しました。 直線性データ（左）では、プロテインA検出の傾きがわずかに変化しています。 LODおよびLOQ（右）は、CHO HCP抗原の存在下でわずかに増加しました。

まとめ

市販の抗体とデフォルトのWes設定を使用して、プロテインAを検出するための迅速で堅牢なアッセイを開発しました。ELISAとは異なり、初期設定後は何もする必要がなく、ELISAベースと同等もしくはそれ以上の感度を得られます。わずか28.1 pg / mLのプロテインAを検出でき、高濃度で複雑なCHO HCPライセート溶液内でも、プロテインAの検出限界は35.3 pg / mLでした。

これらの理由から、Simple Westernはモノクローナル抗体・抗体医薬品の開発パイプラインにおける規制基準を満たすためのワークフローを効率化する強力なソリューションを提供しています。

参考文献

1. Protein A chromatography for antibody purification, S Hober, K Nord and M Linhult, *Journal of Chromatography B*, 2007; 848:40-47.
2. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use, U.S. Food and Drug Administration, 1997.

proteinsimple
a biotechne brand

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

proteinsimple.com

© 2018 ProteinSimple. ProteinSimple, Simple Western, Wes and the ProteinSimple logo are trademarks and/or registered trademarks of ProteinSimple.