

モノクローナル抗体 (mAbs) の分析

Application Note: AN 2.001-V3

抗体は、がん、アレルギー、炎症、感染症、自己免疫疾患など、幅広い疾患の制御に重要な役割を果たす治療薬です。モノクローナル抗体は、バイオ医薬品として急成長しています。

治療用抗体のプロセス開発および品質管理における特性解析をサポートするために、キャピラリー電気泳動-ドデシル硫酸ナトリウム (CE-SDS) は、使いやすさと自動化が可能であることから、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-Page) に代わる重要なツールとして認識されています。

誘導体化剤として5-カルボキシテトラメチルローダミンスクシニイミジルエステル (5-TAMRA,SE) と3-(2-フロイル)-キノリン-2カルボキシアルデヒド (FQ) を使用すると、定量の感度と再現性が向上します。

FQ誘導体化法

FQ ($\lambda_{\text{max.Exc.}}$: 480 nm, $\lambda_{\text{max.Emis.}}$: 590 nm) は蛍光試薬であり、第一級アミンとの反応によってのみ蛍光を發します。

誘導体化の方法は迅速で、標識後の精製は不要です。

装置 : キャピラリー電気泳動 :
Agilent Technologies 7100 CE
検出器 : Picometrics ZETALIF LED with 480 nm/30 nm LED

サンプル : FQで標識されたヒト免疫グロブリン (Ig)

標識 : rMAb (2 mg/mL) を35 μL の0.1 Mクエン酸-リン酸塩 (pH 6.5)、2% SDS、10 mM NEM、1 mM KCN、25 nmol FQに混合しました。

メソッド :
- キャピラリー : 33 cm x 50 μm ID (有効長 19 cm)
- 市販ベックマンSDSキットのバッファー
- 電圧 : -16 kV
- 注入 : -10 kV, 10 s
- カセット温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

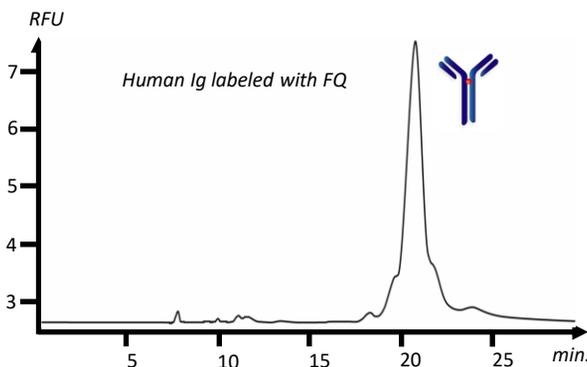


Figure 1 : 480 nmのLEDを用いたFQ標識ヒトIgの分析

検出限界を確認するために、rMAbサンプルに28 kDaのタンパク質サイズ標準物質を0.2%、0.5%、1%、2%、5%と異なる濃度で添加しました。

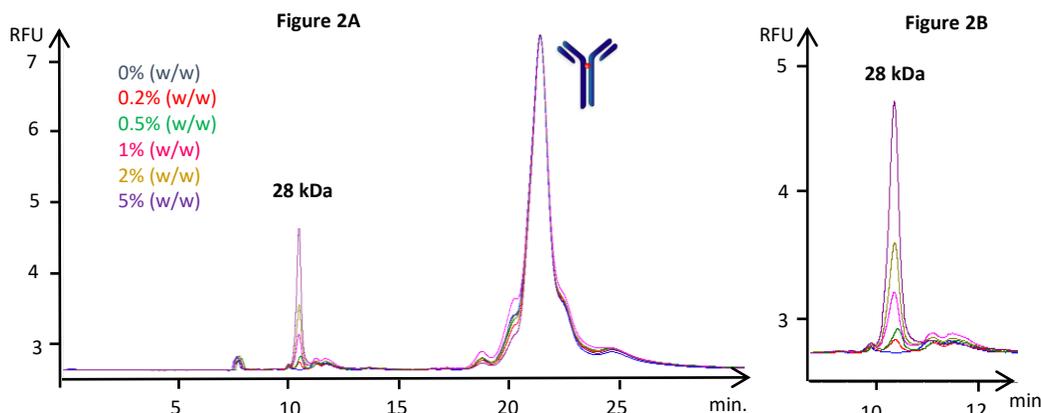


Fig 2は、0.2%におけるS/Nが26であることを示しています。

S/N 3への外挿では、検出限界は0.023% (w/w) となりました。

Figure 2A : 480 nm LEDを使用したCE/LEDIFによる5段階の汚染物質を含むFQ標識ヒトIgGの分離
Figure 2B : fig 2Aの電クロフェログラムの9分から12分を拡大表示

5-TAMRA.SE誘導体化法

5-TAMRA.SE ($\lambda_{\max.Exc.}$: 530 nm、 $\lambda_{\max.Emis.}$: 590 nm) は、感度を高め、分析種のプロファイルを維持するため、蛍光検出用のmAbsの標識試薬として一般的に使用されています。

fig 3は、2つのLED (480 nmと530 nm) を用いたヒトIgの分析を示しています。励起波長の最適化 (480 nmの代わりに530 nm) により、S/Nは18倍に増加しました。

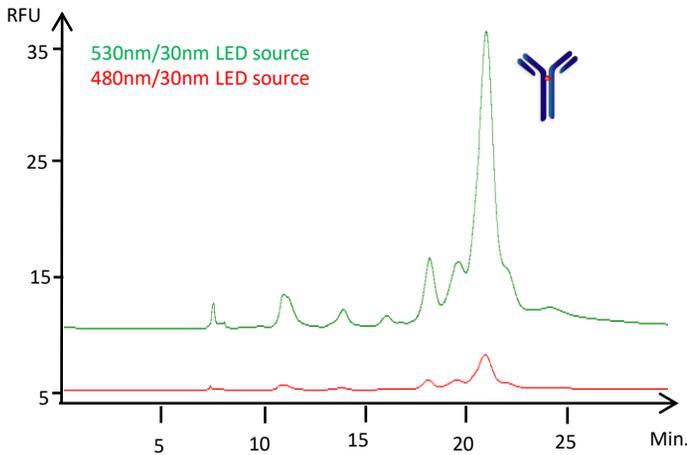


Figure 3 : 480 nmと530 nmのLEDを用いた5-TAMRA.SE標識ヒトIgの分析

装置 : キャピラリー電気泳動 : Agilent Technologies 7100 CE
 検出器 : Picometrics ZETALIF LED with 480 nm/30 nm LED and 530 nm/30 nm LED

サンプル : 5TAMRA.SEで標識されたヒトIg

標識バッファー : rMAbサンプル (2 mg/mL) を NAP-5カラムを用いて0.1 M炭酸水素ナトリウム (pH8.3) に交換しました。DMSOに溶解した5-TAMRA.SE (1.4 mg/mL) 10 μ Lを rMAb溶液190 μ Lに加え、30 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートしました。インキュベーション後、抗体-色素複合体190 μ Lを2本目のNAP-5カラムにロードし、700 μ Lの0.1 M炭酸水素ナトリウム (pH 8.3) で回収しました。非還元SDS-rmAb複合体は、rmAb-色素複合体100 μ LとCE-SDSサンプルバッファー100 μ Lを混合して調製しました。

メソッド : FQと同じ方法

Table 1 : FQ誘導体化と5-TAMRA.SE誘導体化の比較

	FQ誘導体化		5-TAMRA.SE誘導体化	
	480		480	530
波長 (nm)	480		480	530
誘導体化法	- 蛍光試薬、標識後の精製は不要 - 迅速な標識方法 (75 $^{\circ}$ Cで5分)		- 過剰の色素はNAP-5カラムで除去する必要がある - 標識と精製に長時間を要する (30 $^{\circ}$ Cで2時間 + 精製)	
主ピークの S/N	3,700		1,400	25,800

結論 :

このアプリケーションノートでは、5-TAMRA.SE および FQ による IgG の誘導体化の 2 つの方法について説明しました。

CE-LEDIFシステムは、IgGとそのアイソフォームの純度と不均一性を評価するために使用されます。

LED光源には、安価で消費エネルギーが少なく、安定性が高いなど、多くの利点があります。

参考文献 :

[I] Hunt G, Nashabeh W. Anal. Chem. 1999, 71, 2390-2397

[II] Michels DA, Brady LJ, Guo A, Balland A. Anal. Chem. 2007, 79, 5963-5971

[III] Salas-Solano, O.; Tomlinson, B.; Du, S.; Parker, M.; Strahan, A.; Ma, S. Anal.Chem. 2006, 78, 6583-6594.