

電荷非対称フローFFF による モノクローナル抗体の特性評価

一般情報

ID0047

アプリケーション：薬剤関係、タンパク質、抗体

テクノロジー：EA4-UV-MALS

機器構成：EAF2000、PN3211 UV-Vis、PN3621 MALS

キーワード：電荷非対称フローFFF、NIST、多角度光散乱、
モノクローナル抗体、サイズ排除クロマトグラフィー、凝集体測定、
凝集体回収

はじめに

米国立標準技術研究所(NIST)は mAb の生理学及び生物物理学的属性を評価の為にモノクローナル抗体標準(RM8671 NIST mAb)を精製しました[1]。NISTmAb はシステム適合試験、装置の性能確認、分析試験方法の比較、及びメソッド開発などの幅広い使用を目的としています。このアプリケーションでは非対称フローFFF(AF4)とサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)で NISTmAb の分離、凝集、定量、そして回収率の比較を行い、そして電荷非対称フローFFF(EAF4)(図1)による抗体やタンパク質の表面電荷の測定を行います。

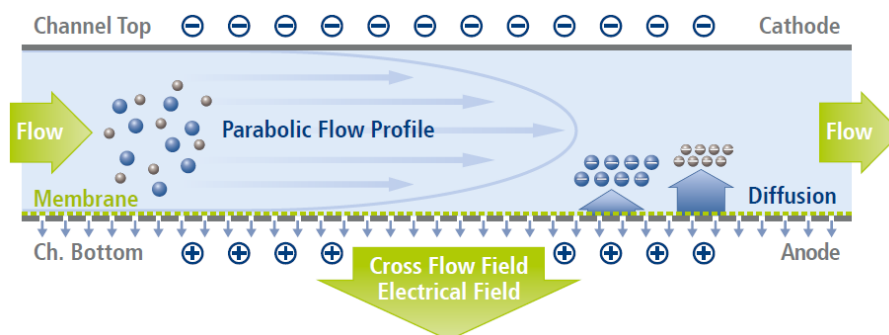


図1: EAF4 チャンネルの概略図。フロー・フィールドによる流体力学的サイズ分離に加えて、
電場は分子又は粒子の表面電荷による分離が可能

実験詳細と結果

NISTmAb は SEC-UV-MALS(図2)と AF4-UV-MALS の両手法により凝集体からモノマーの分離と回収率を評価しました(図2,3)。SEC カラムはウォーターズ社製 Ultrahydrogel1000 と Ultrahydrogel120 を直列に繋いだものを使用しました。両分析はリン酸バッファーを使用しました。SEC-MALS では凝集体は分離せず、単一ピークとして溶出しました(図2)。AF4-UV で検出された凝集体(図3)は注入されたサンプル質量の10%でした(データ非表記)。

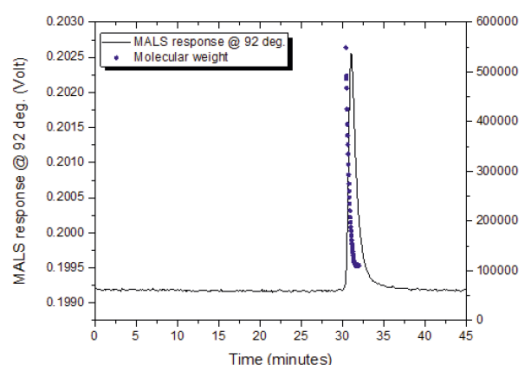


図2: SEC-MALS による NISTmAb の分析

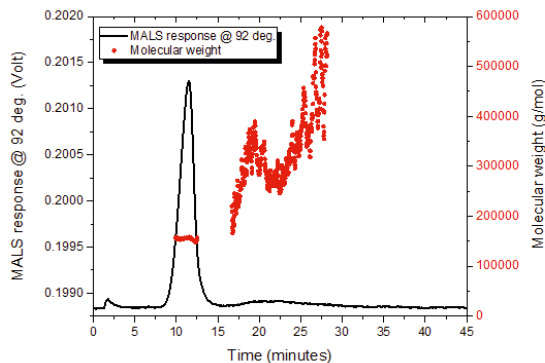


図3: AF4-MALS による NISTmAb の分析

EAF4-UV-MALS でリン酸バッファーを使用し、電場なしと二つの異なる電場にて NISTmAb を分析しました(図4)。チャンネル下部に強いマイナス電場をかけると、溶出時間が早くなる為、NISTmAb はリン酸バッファー中でマイナスに帯電していることが分かります。溶出時間の変化から換算されたドリフト速度と加えられた電場の関係性をプロットしました。傾きは電気泳動度を表し、この実験では $-1.68 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{cmV} \cdot \text{s}^{-1}$ となりました。(図5)

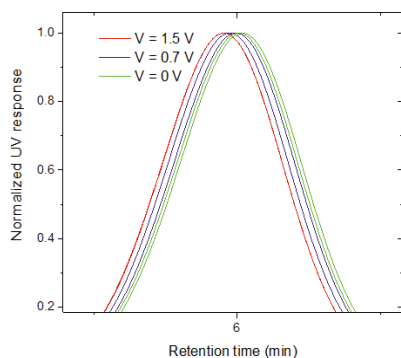


図4: 異なる電場による NIST mAb の溶出時間の変化

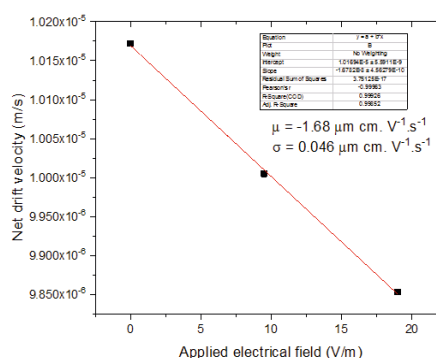


図5: NISTmAb の電気泳動移動度

まとめ

電荷非対称フローFFF システムは分子サイズと表面電荷の両方での分離が可能のため、分子サイズ/分子量分布と電気泳動度の測定が可能です。FFF のオープンなチャンネル設計によりサンプル回収率が SEC より優れています。これは比較的少量で存在するタンパク質/抗体凝集体の定量化においては SEC より FFF が有利であることが示されました。

参考文献

- [1] www.nist.gov/news-events/news/2016/07/extraordinary-standard-new-nist-protein-could-spur-iopharmaceutical