

参考技術資料 (測定事例)

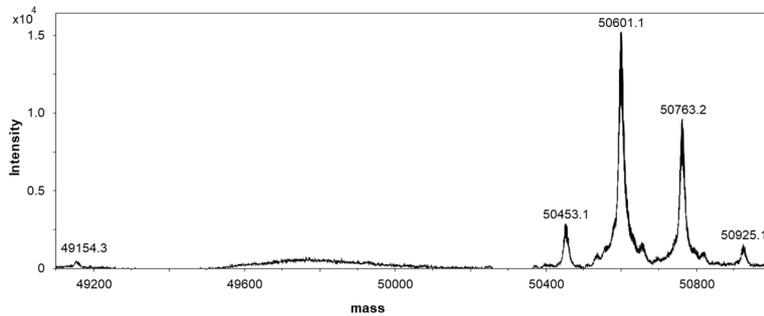
モノクローナル抗体溶液 (NMIJ RM 6208-a, AIST-MAB) について、産業技術総合研究所 計量標準総合センターで取得された主に一次構造に関する測定結果について参考技術資料 (測定事例) Aとしてまとめた。また、次世代バイオ医薬品技術研究組合で取得された測定結果については参考技術資料 (測定事例) Bとしてまとめた。これらの測定結果は各種分析の参考のための測定事例であり、分析成績書の範囲には含まれない。

参考技術資料 (測定事例) A

産業技術総合研究所 計量標準総合センターで取得された主に一次構造に関する測定結果を示す。

1. 軽鎖および重鎖の質量分析による構造解析

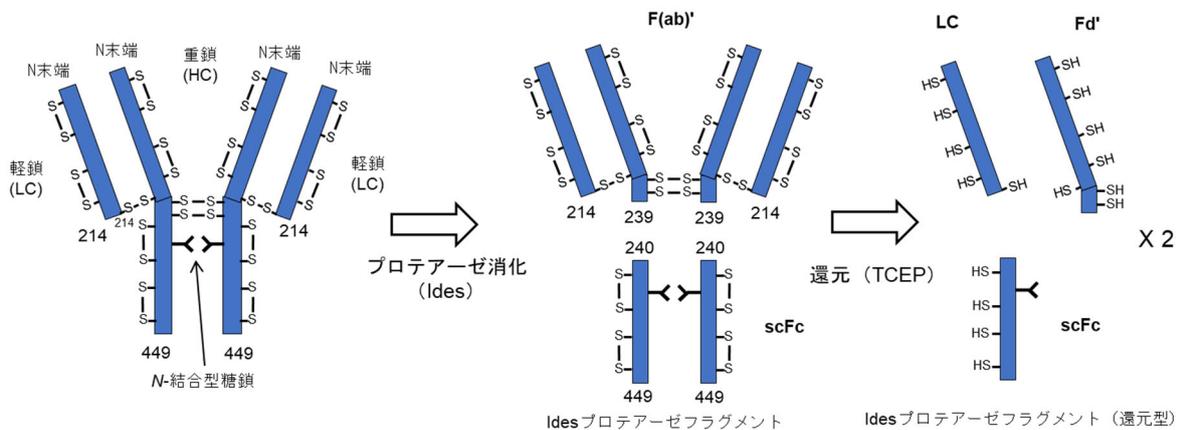
本標準物質をTCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine]により還元して得られた軽鎖および重鎖について、逆相クロマトグラフ-エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析装置 (LC-MS) により質量を測定した。測定結果、および重鎖についてはデコンボリューションしたマススペクトルを下に示す。重鎖において、糖鎖修飾 (G0, G0F, G1F, G2F) に対応するピークの外、糖鎖を持たないペプチド鎖 (w/o glycan) が確認された。



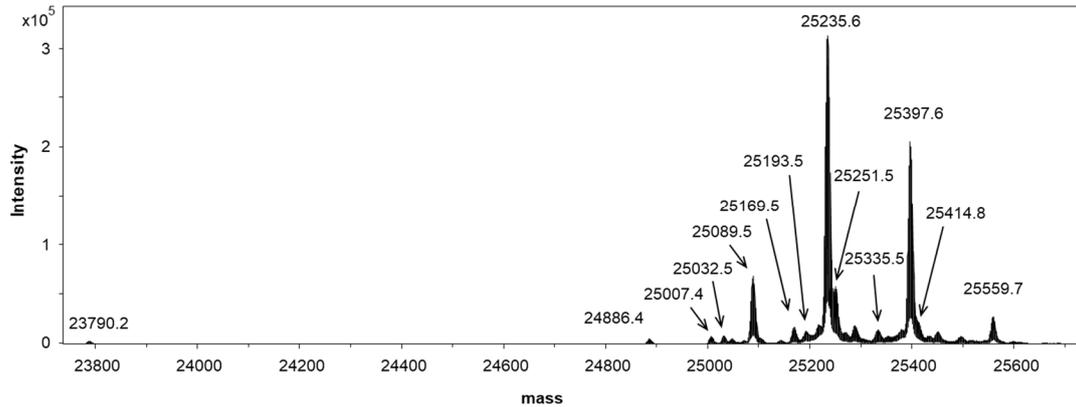
	Glycan structure	Theoretical mass		Measured mass	
		Monoisotopic	Averaged	Monoisotopic	Averaged
Light chain		23428.5	23442.8	23428.5	23442.6
Heavy chain	w/o glycan	49125.4	49155.9		49154.3
	G0	50423.9	50455.1	50423.9	50453.1
	G0F	50570.0	50601.3	50570.0	50601.1
	G1F	50732.0	50763.4	50732.1	50763.2
	G2F	50894.1	50925.5		50925.1

2. Idesプロテアーゼ消化物の質量分析による構造解析

Idesプロテアーゼによる本標準物質の消化物、およびそのTCEPによる還元体についてLC-MSによる測定を行った。Idesプロテアーゼはパパイインやペプシン様の基質特異性を持ち、ヒンジ領域を加水分解して下記に示す消化物を与える。



F(ab)', Fd', scFcについての測定結果、およびscFcフラグメントについてはデコンボリューションしたマスペクトル下記に示す。



scFcフラグメントのマスペクトル (平均質量を表示)

	Glycan structure	Theoretical mass		Measured mass	
		Monoisotopic	Averaged	Monoisotopic	Averaged
F(ab)'		97567.9	97628.0		97629.8
Fd'		25367.5	25383.3	25367.6	25382.6
scFc	w/o glycan	23775.9	23790.7	23775.1	23790.2
	G0-GlcNAc	24871.3	24886.7	24871.4	24886.4
	Man5	24992.4	25007.7	24992.4	25007.4
	G0F-GlcNAc	25017.4	25032.8	25017.4	25032.5
	G0	25074.4	25089.8	25074.5	25089.5
	Man6	25154.4	25169.9	25154.5	25169.5
	G1F-GlcNAc	25179.4	25194.9	25178.4	25193.5
	G0F	25220.5	25236.0	25220.5	25235.6
	G1	25236.5	25252.0	25237.5	25251.5
	Man7	25316.5	25332.0	25319.5	25335.5
	G1F	25382.5	25398.1	25382.6	25397.6
	G2	25398.5	25414.1	25400.5	25414.8
	G2F	25544.6	25560.3	25544.6	25559.7

scFcフラグメントについては、12種の糖鎖付加ペプチド鎖および糖鎖を持たないペプチド鎖(w/o glycan)が確認された。

3. ペプチドマッピングによる構造解析

本標準物質のトリプシン消化物のペプチドマッピングにより、下記の構造を確認した。

1) 重鎖において、部分的なN末端のグルタミン酸のプログルタミル化およびC末端のリシン残基の付加が見られた。

2) アスパラギン残基の脱アミド化は下記の残基で観測された。

軽鎖: Asn 30

重鎖: Asn 55, Asn 84, Asn 318, Asn 387 or 392 or 393

3) メチオニン残基の酸化は下記の残基で観測された。

重鎖: Met 107, Met 255

4) 糖鎖修飾部位は重鎖のAsn 300である。

5) 非還元状態でのトリプシン消化物についてペプチドマッピングを行いジスルフィド結合部位を確認した。ジスルフィド結合は下記のシステイン残基から形成されている。

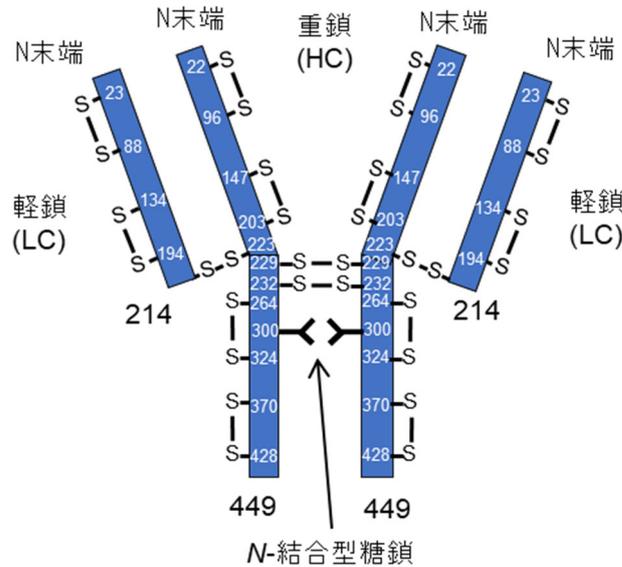
軽鎖: Cys 23-Cys 88, Cys 134-Cys 194

重鎖: Cys 22-Cys 96, Cys 147-Cys 203, Cys 264-Cys 324, Cys 370-Cys 428

軽鎖-重鎖: Cys 214 (LC)-Cys 223 (HC)

重鎖-重鎖: Cys 229 (HC1)-Cys 229 (HC2), Cys 232 (HC1)-Cys 232 (HC2)

本標準物質の、ジスルフィド結合と糖鎖を含む構造を下に示す。



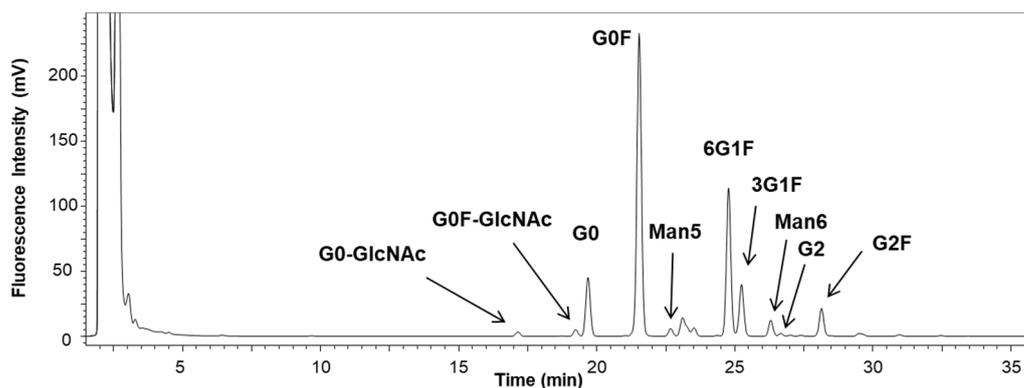
4. グリカナーゼ処理によるインタクト質量分析と軽鎖および重鎖の質量測定

N-グリカナーゼ (PNGase F) を用いて糖鎖を除いた本標準物質のインタクト質量分析、およびTCEPを用いて還元して得られた軽鎖と重鎖の質量について、LC-MSを用いて測定した。その結果を下記に示す。

	Theoretical mass		Measured mass	
	Monoisotopic	Averaged	Monoisotopic	Averaged
Full body	145076	145165		145172
LC	23428.5	23442.8	23428.6	23442.6
HC	49125.4	49155.9	49125.5	49155.5

5. N-結合型糖鎖の糖鎖マッピング

本標準物質の糖鎖構造について、PNGaseFにより抗体分子より切り出したN-結合型糖鎖混合物について、2-アミノベンズアミドで誘導体化、還元したのちLC-蛍光検出器により分析を行った。



LC-蛍光検出による糖鎖マッピング

総ピーク面積の0.1%以上の面積をもつ20のピークのうち、10種類のN-結合型糖鎖の構造を帰属した。これらのピークの面積百分率により糖鎖の組成を求め次ページの表にまとめた。

	Area ratio (%)	
	Average	SD
G0-GlcNAc	0.71	0.002
G0F-GlcNAc	1.02	0.004
G0	8.85	0.025
G0F	45.02	0.092
Man5	1.17	0.012
6G1F	21.39	0.051
3G1F	7.78	0.004
Man6	2.38	0.019
G2	0.44	0.006
G2F	4.27	0.017
Other peaks	6.98	0.053

試料調製と測定条件

1. 軽鎖および重鎖の質量分析による構造解析

抗体溶液5 μ Lに50 μ Lの水と5 μ L 500 mmol/L TCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine]を加え、37 $^{\circ}$ C 2 hインキュベーションしたのち、2 μ LをLC-MSに注入して測定を行った。

液体クロマトグラフ (LC) : Nexera 30A高速液体クロマトグラフ装置 (島津製作所社製)

カラム : AQUITY UPLC Protein BEH C4 (Waters社製、1.7 μ m, 2.1 mm diameter \times 100 mm length) 移動相A: 0.1 % ぎ酸/H₂O、B: 0.1 % ぎ酸/アセトニトリル、流量0.2 mL/min、カラム温度 60 $^{\circ}$ C、グラジエント条件: 5 %B 2 min, 5-15 %B 1 min, 15-25 %B 3 min, 25-35 %B 15 min

エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析装置 (MS) : maXis-II飛行時間型質量分析装置 (ブルカー社製)

Capillary Voltage: 4500 V, nebulizer gas: 1.2 bar, dry gas: 6 L/min, isCID: 30 eV, Quadrupole ion energy 4 eV, Collision energy: 8 eV, Mass range: m/z 500-3000, Spectra rate: 3 Hz

2. Idesプロテアーゼ消化物の質量分析による構造解析

抗体溶液50 μ Lに50 μ L 50 mmol/Lりん酸緩衝液と4 μ L Idesプロテアーゼ (Ides FabRICATOR、270 U, Sigma-Aldrich社製)を加え、37 $^{\circ}$ C 1 hインキュベーションした。還元体は、さらに5 μ L 500 mmol/L TCEPを加えて37 $^{\circ}$ C 1 hインキュベーションすることで得た。それぞれ、3 μ LをLC-MSに注入して測定を行った。測定は1と同様に行った。

3. ペプチドマッピング

抗体溶液20 μ Lを100 μ L 8 mol/L 塩酸グアニジン、1 mmol/L エチレンジアミン四酢酸/250 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)に加え、さらに5 μ L 500 mmol/L ジチオスレイトール (DTT) を加え37 $^{\circ}$ C 1 hインキュベートした。さらに12 μ L 500 mmol/L ヨード酢酸を加え室温暗所で 1 hインキュベーションしたのちに5 μ L 500 mmol/L DTTを加えた。NAP-5ゲル濾過カラム (Cytiva社製)を用いて脱塩したのち、300 μ Lのフラクションにタンパク質量1:25(酵素:基質)相当のトリプシン (富士フイルム和光純薬社製、質量分析グレード)を加え37 $^{\circ}$ C 終夜インキュベートした。1 μ Lトリフルオロ酢酸を加えて反応を停止させ、5 μ LをLC-MSに注入して測定を行った。非還元状態でのペプチドマッピングは、DTTとヨード酢酸を使用せず、上記と同様の試料調製を行った。

液体クロマトグラフ (LC) : Nexera 30A高速液体クロマトグラフ装置 (島津製作所社製)

カラム : X Bridge Peptide BEH C18 (Waters社製、3.5 μ m, 2.1 mm diameter \times 150 mm length) 移動相A: 0.1 % ぎ酸/H₂O、B: 0.1 % ぎ酸/アセトニトリル、流量0.2 mL/min、カラム温度 45 $^{\circ}$ C、グラジエント条件: 2 %B 3 min, 2-7 %B 1 min, 7-10 %B 4 min, 10-25 %B 32 min, 25-35 %B 15 min

エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析装置 (MS) : maXis-II飛行時間型質量分析装置 (ブルカー社製)

Capillary Voltage: 4500 V, nebulizer gas: 1.2 bar, dry gas: 6 L/min, isCID: 0 eV, Quadrupole ion energy 5 eV, Collision energy: 10 eV, Mass range: m/z 200-5000, Spectra rate: 5 Hz

Data dependent MS/MS, Precursor Ions cycle time 1.5 sec, Active exclusion exclude after 1 Spectra, Reconsider Precursor 1.5

4. グリカナーゼ処理によるインタクト質量分析と軽鎖および重鎖の質量測定

抗体溶液24 μ Lに85 μ L 50 mmol/Lりん酸緩衝液と12 μ L PNGase F (PNGase F Plus、1.2 U, Agilent Technologies社製)を加え、37 $^{\circ}$ C 2 hインキュベーションした。還元体は、さらに5 μ L 500 mM TCEPを加えて37 $^{\circ}$ C 1 hインキュベーションすることで得た。それぞれ、10 μ LをLC-MSに注入して測定を行った。測定は1と同様に行った。

5. 糖鎖マッピング

一連の試料調製は EZGlyco mAb-N Kit with 2-AB(住友ベークライト社製、BS-X4410)を用いて行った。抗体溶液 8 μ L を用いて得られた誘導体化糖鎖混合物のうち 2 μ L を LC-蛍光検出装置に注入して分析を行った。

液体クロマトグラフ (LC) 島津製作所社製 Nexera 30A 高速液体クロマトグラフ装置

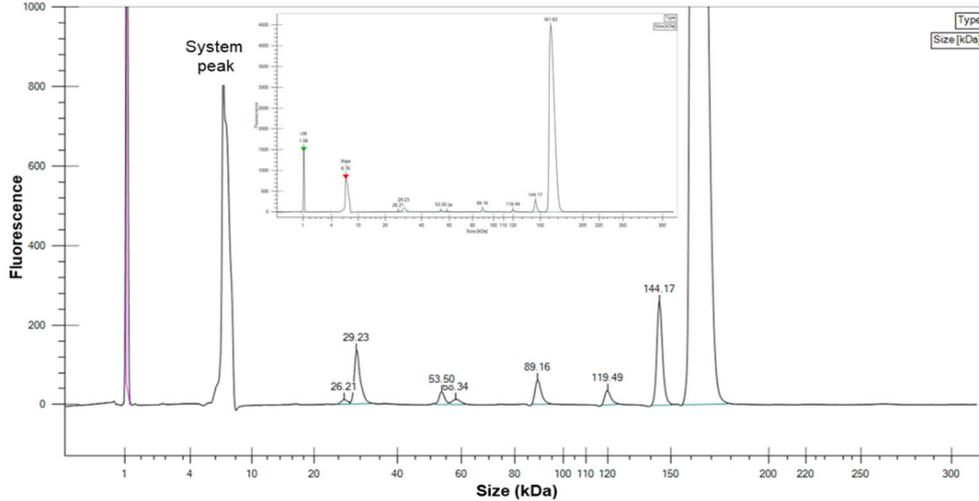
カラム : AQUITY UPLC BEH Amide (Waters 社製、1.7 μ m, 2.1 mm diameter \times 150 mm length) 移動相 A: 100 mmol/L ぎ酸アンモニウム、B: アセトニトリル、流量 0.2 mL/min、カラム温度 45 $^{\circ}$ C、グラジエント条件: 75 -50 %B 50 min、蛍光検出: 励起波長 330 nm、検出波長 420 nm

参考技術資料 (測定事例) B

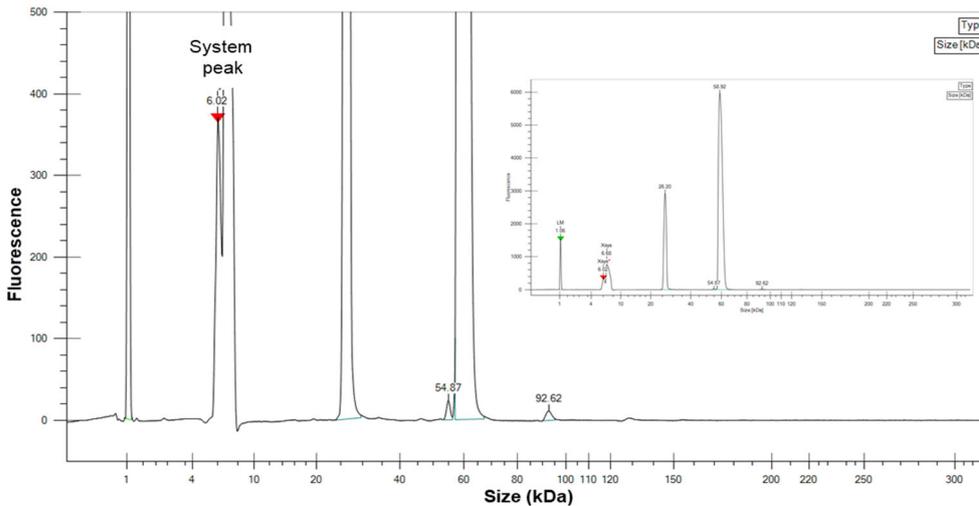
次世代バイオ医薬品技術研究組合で取得された本標準物質の分析結果を下記に示す。

1. マイクロチップ電気泳動

マイクロチップ型電気泳動装置を用いた本標準物質の非還元条件下、および還元条件下でのSDS (Sodium dodecyl sulfate) マイクロチップ電気泳動の結果について下記に示す。



非還元条件下での電気泳動結果



還元条件下での電気泳動結果

	Molecular mass (kDa)		Ratio (%)		Condition of electrophoresis
	Average	SD	Average	SD	
Full body	161.3	0.9	92.9	0.1	non-reduced
Truncated form	143.8	0.8			
	119.1	0.6			
	88.8	0.5			
	58.1	0.3			
	53.2	0.3			
29.1	0.2				
26.1	0.1				
Heavy chain	93.0	0.4			reduced
	59.3	0.3	72.6	0	
Light chain	55.1	0.2			
	26.4	0.2	27.2	0.1	

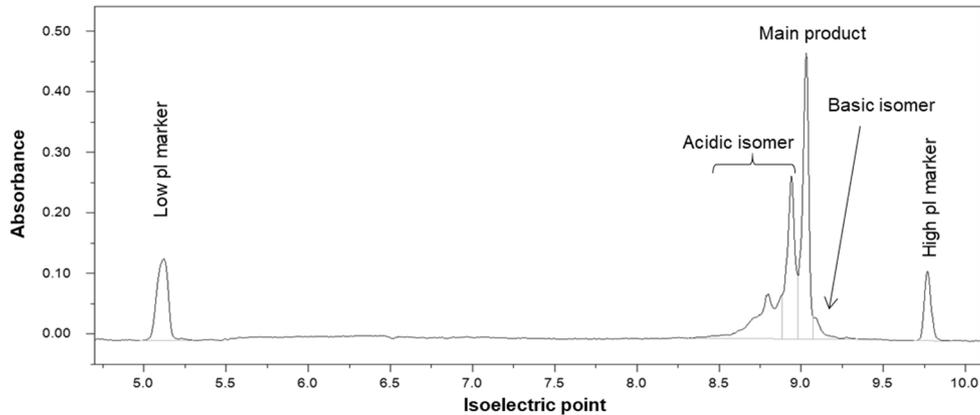
試料調製と測定条件

試料2 μL (抗体濃度 2.5 mg/mL) をProtein Express Assay Reagent Kit (PerkinElmer社製) を用いて変性/還元反応 70 $^{\circ}\text{C}$ 10分で処理し、3レーン分の泳動結果を平均して測定結果とした。

装置 : LabChip GXII electrophoresis system電気泳動装置 (PerkinElmer社製)

2. キャピラリー等電点電気泳動

キャピラリー等電点電気泳動装置を用いて本標準物質の電荷異性体の比率および等電点を測定した。



キャピラリー等電点電気泳動によるエレクトロフェログラム

	電荷異性体の比率	
	Average (%)	
	Ratio	SD
Acidic isoform	54.3	0.9
Main product	42.1	0.6
Basic isoform	3.6	0.3

等電点 9.03 ± 0.003 (\pm 以下の数値は標準偏差を示す)

試料調製と測定条件

4% Pharmalyte (pH 3-10)、0.35% メチルセルロース、10 mmol/L アルギニン溶液として最終抗体濃度 0.4 mg/mL に調製した。

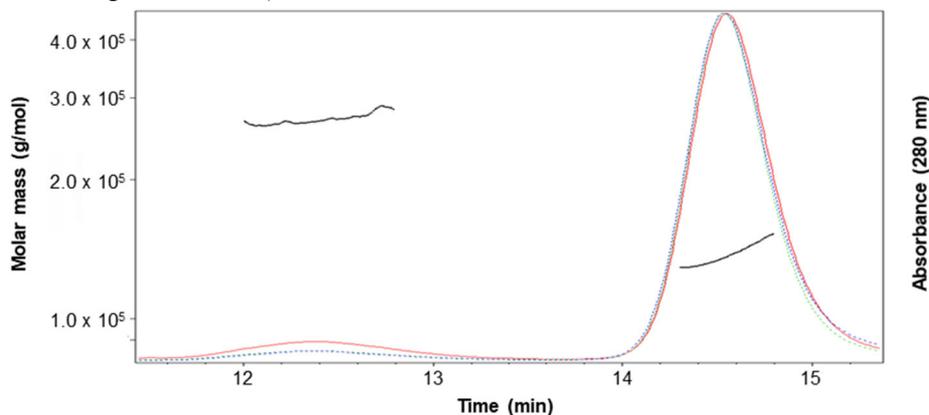
装置 : キャピラリー等電点電気泳動装置 iCE3/Alcott720NV (ProteinSimple社製)

キャピラリー : Fc cartridge (100 μ m diameter \times 50 mm length)、検出波長 : 280 nm

測定条件 : Prefocusing time: 1 min, 1500 V、Focusing time: 4.5 min, 3000 V。3回繰り返し測定を行った。

3. サイズ排除クロマトグラフィー—多角度光散乱検出

サイズ排除クロマトグラフィー—多角度光散乱検出器(Size exclusion chromatography - multi-angle static light scattering, SEC-MALS)により分子量分布を測定した。



本測定による主ピークのピークトップ分子量は $(1.350 \pm 0.004) \times 10^5$ であった。 (\pm 以下の数値は標準偏差を示す)

試料調製と測定条件

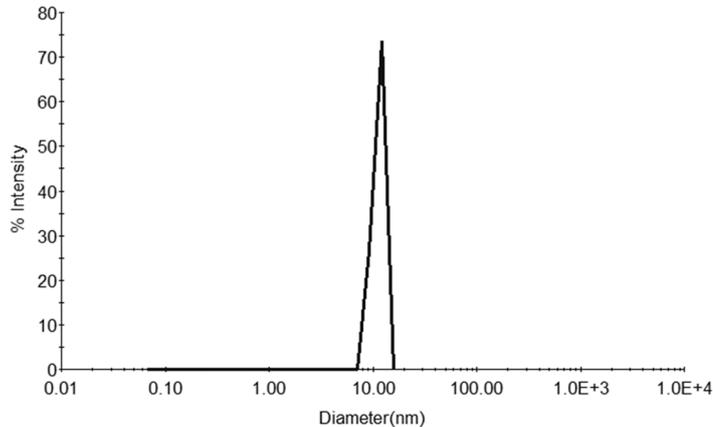
試料10 μ L (抗体濃度2.5 mg/mL)を注入した。

装置 : 高速液体クロマトグラフ: Infinity 1220 LC (Agilent Technologies社製)、多角度光散乱検出器: DAWN HELEOS

II 8+ (Wyatt Technology社製)、示差屈折率検出器: Optilab T-rEX (Wyatt Technology社製)
 カラム: TSKgel G3000SW_{XL} (東ソー社製 7.8mm diameter × 300 mm length)、移動相: 50 mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液, 200 mmol/L NaCl (pH7)、カラム温度: 室温
 流量: 0.6 mL/min、検出: UV 280 nm, MALS (dn/dc: 0.185, UV Extinction Coefficient: 1.400)

4. 動的光散乱 (DLS) 法による粒子径分布測定

動的光散乱 (Dynamic light scattering, DLS) 法によりナノサイズの粒子径分布を測定した。



測定の結果、平均粒子径 (11.4 ± 0.2) nm、キュムラント法で求めた多分散指数 (不均一性, Pd) は (10.6 ± 1.0) %であった。(±以下の数値は標準偏差を示す)

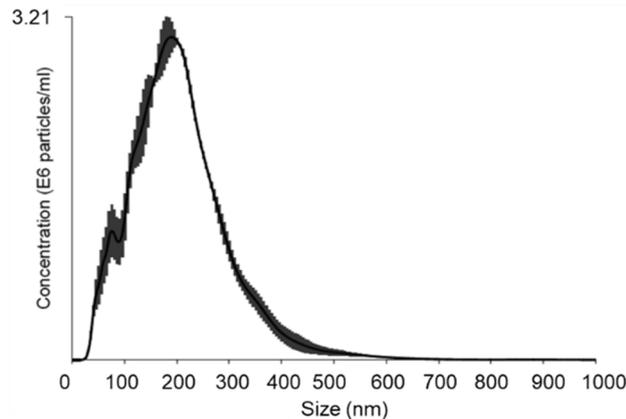
試料調製と測定条件

装置: DynaPro PlateReader II (Wyatt Technology社製)

測定条件: 測定時間10秒、10回積算、測定温度25 °C、粘度: 0.890 mPa · s(25 °C) 屈折率: 1.333 (20 °C, 589nm)、3回繰返し測定を行った。

5. ナノ粒子トラッキング (NTA) 法による粒子径分布測定

ナノ粒子トラッキング (NTA) 法により subvisible particle の粒子径分布、粒子濃度を測定した。



測定の結果、平均粒子径 (206 ± 0.4) nm、モード粒子径 (194 ± 7.9) nm、粒子数 (5.81 ± 0.36) × 10⁸ particles/mLであった。(±以下の数値は標準偏差を示す)

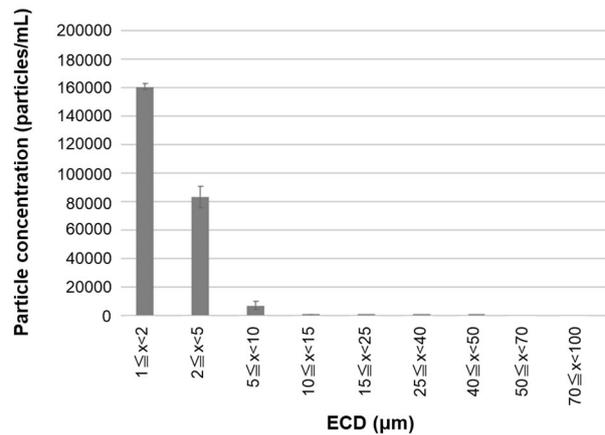
試料調製と測定条件

装置: NanoSight NS500 (Quantum Design社)、測定・解析ソフトウェア: NanoSight NTA2.3

測定条件: Camera level: 12, Recording time: 60 sec、3回繰返し測定を行った。

6. マイクロフローイメージング (MFI) 法による凝集体 (不溶性微粒子) の測定

マイクロフローイメージング (MFI) 法により粒子径1 μmのサイズを超える subvisible particle の粒子濃度を測定した。



測定の結果、粒子濃度は (251712 ± 12062) particles/mL ($>1 \mu\text{m}$)であった。(±以下の数値は標準偏差を示す)

試料調製と測定条件

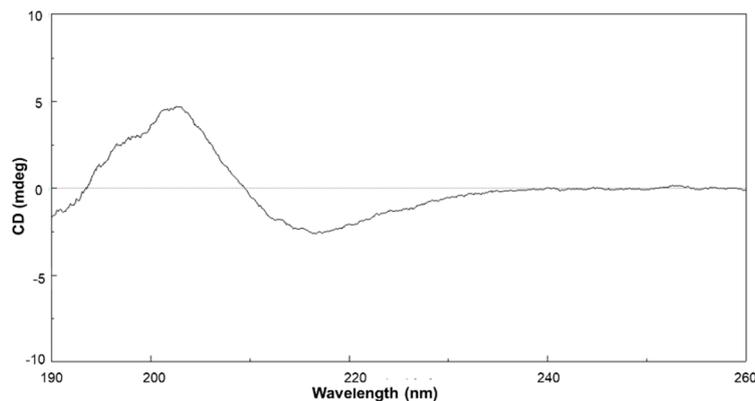
試料を穏やかに5回転倒混和したのち測定に供した。

装置：MFI 5200 (ProteinSimple社製)、測定ソフト：MVSSソフトウェア

測定条件：測定条件：SetPoint3、 $100 \mu\text{m}$ Depth flow cell、フローセルのプライムに 0.2 mL 使用、その後 0.1 mL/min の流速でサンプルを測定し、2262フレームのイメージを取得。3回繰返し測定を行った。

7. 円偏光二色性スペクトルの測定

円偏光二色性(CD)スペクトルの測定を行い、二次構造比率を推定した。



本標準物質のCDスペクトル

推定された二次構造の比率

	Ratio of secondary structure (%)	
	Ratio	SD
Helix	11.3	8.8
Sheet	42.2	5.9
Turn	10.2	2.4
Other	36.3	1.3

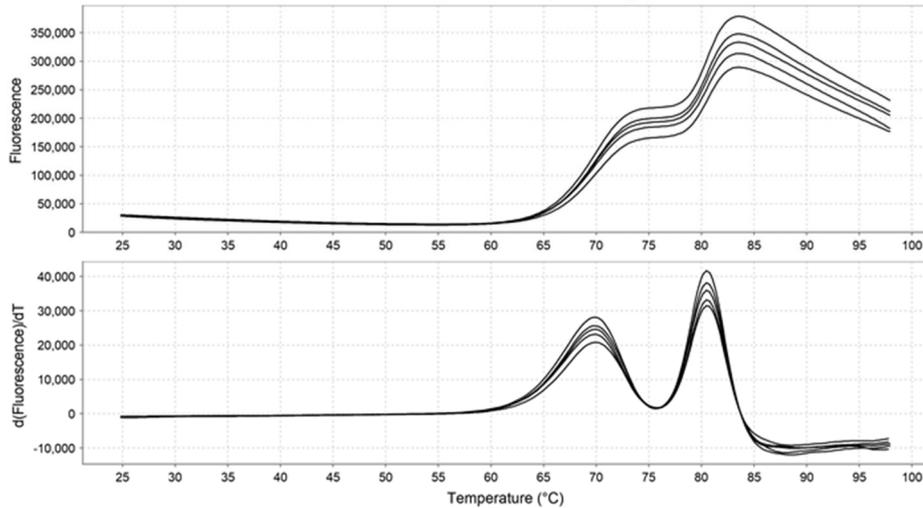
試料調製と測定条件

りん酸カリウム緩衝液をブランクとして、 0.1 mg/mL の抗体溶液を光路長 1 mm 石英セルを用いて測定した。

装置：円二色性分散計 J-1500 (日本分光製)、二次構造の比率の推定は、CD多変量SSE解析プログラム JWSSE-513 (日本分光製) を用いた。

8. 融解曲線による高次構造変化測定

Protein Thermal Shift (Applied Biosystems社製) キットを用いて融解曲線による高次構造変化を測定した。



T _m Boltzmann (°C)		T _m Boltzmann (°C)		
Average	SD	Peak 1	Average	SD
73.64	0.02	Peak 1	69.72	0
		Peak 2	80.36	0

本測定により、融解温度 (T_m 値) について表に示す結果が得られた。

試料調製と測定条件

装置：StepOnePlus リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems社製)、解析ソフトウェア：Protein Thermal Shift Software (Applied Biosystems社製)

9. 不純物等の定量分析結果

1) 宿主細胞由来残存タンパク質定量 ELISA法

ELISA測定キット：CHO Host Cell Proteins 3rd Generation F550 (Cygnus Technologies社製)

測定結果：3.2 ng/mg protein (IgG 5.00 mg/mL換算)

定量下限：1.39 ng/mL

2) 宿主細胞由来残存DNA定量 定量PCR法

DNA抽出キット：DNA Extraction and Amplification Kit D555T (Cygnus Technologies社製)

増幅ターゲット領域：glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

検出方法：SYBR Green I

測定結果：定量下限以下

定量下限：10.0 pg/mg protein (IgG 5.00 mg/mL換算)

3) 残存プロテインA定量 ELISA法

ELISA測定キット：Residual Protein A kit AL287 (PerkinElmer社製)

測定結果：0.2 ng/mg protein (IgG 5.00 mg/mL換算)

定量下限：8.7 pg/mL

4) エンドトキシン定量 比濁法

測定キット：リムルスES-I シングルテスト (富士フイルム和光純薬社製)

測定結果：0.002 EU/mg protein 以下 (IgG 5.00 mg/mL換算)

定量下限：0.01 EU/mL