

組み換えタンパク質の分析

入門書

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

目次

1. 組み換えタンパク質について	04
組み換えタンパク質製剤の製造.....	04
生物製剤の創薬から開発まで	04
タンパク質製剤の特性評価.....	05
QA/QC 手順の重要性.....	05
組み換えタンパク質製剤の特性評価という難問に 対応するためには.....	05
2. バイオプロセスモニタリング	06
バイオプロセスモニタリングにおける分析技術のまとめ	08
Agilent アプリケーション資料	08
3. インタクトタンパク質の同定、純度、不純物分析.....	09
インタクトタンパク質の同定、純度、不純物分析技術のまとめ.....	11
Agilent アプリケーション資料	12
4. グリカンの分析とプロファイリング.....	13
グリカンプロファイリング技術のまとめ	17
Agilent アプリケーション資料	18
5. ペプチドマッピング	19
ペプチドマッピング技術のまとめ.....	22
Agilent アプリケーション資料	22
6. 荷電アイソフォーム	23
荷電アイソフォーム分析技術のまとめ.....	25
Agilent アプリケーション資料	25
7. 凝集.....	26
凝集分析技術のまとめ.....	28
Agilent アプリケーション資料	28
8. 酸化.....	29
酸化分析技術のまとめ.....	31
Agilent アプリケーション資料	31
9. アミノ酸分析.....	32
アミノ酸分析技術のまとめ.....	34
Agilent アプリケーション資料	34

これまでの多くの医薬品は、化学合成された低分子化合物が中心でした。しかし近年、バイオを応用した医薬品が医薬品販売において大きなシェアを占めるようになり、今後もますます増加すると予想されます。この増加の背景には、これらの物質が標的を絞った作用機構を備えていること、特許が切れる低分子医薬品が増えることによる、ジェネリック医薬品との競合などがあります。生物製剤には、低分子 RNA (ミクロ RNA など)、オリゴヌクレオチド、ペプチド、ワクチンなどがありますが、もっとも一般的なものが組み換えタンパク質です。組み換えタンパク質が広く使われている理由は、特異性が高く、細胞特異的なモダリティを備え、化合物特異的な毒性が比較的低いためです。タンパク質製剤の創薬と開発は急速に拡大しており、まもなく化学物質を用いた医薬品開発に並び、追い抜くものと予想されています。たとえば、30 を超えるモノクローナル抗体が治療での使用を認可されており、大手製薬会社はどこも、大規模なタンパク質製剤開発プログラムを展開しています。

組み換えタンパク質製剤の製造

低分子医薬品は通常、化学合成により製造され、明確に定義された化学構造を有しています。治療用タンパク質の製造と特性分析には、それよりもずっと大きな困難が伴います。治療用タンパク質は、ヒト、動物、微生物などのさまざまな生物から分離することができますが、ほとんどの場合は、組み換え DNA 技術を用いたバイオテクノロジー手法で製造されます。通常、目的の組み換えタンパク質は、細胞培養 (真核細胞または細菌) により産生されます。培地で高密度になるまで培養すれば、大まかな大量の生物製剤を製造することができます。その後、生成物を精製して細胞成分を取り除きますが、このプロセスは、低分子医薬品で用いられているものよりも複雑です。最後に、低分子医薬品と同様、安定した医薬品となるように調剤する必要があります。

生物製剤の創薬から開発まで

組み換えタンパク質製剤の開発は、有力な候補物質を特定することのできる疾患経路の特定からはじまります。組み換えタンパク質は、組み換え DNA (rDNA) から派生します。rDNA は、自然界には通常存在しない、2 つ以上の DNA 配列で構成されています。その後、これらの rDNA ライブラリと、それから生じるタンパク質をスクリーニングし、目的の疾患経路の阻害剤や補充療法薬、その他の抗疾患薬として使用できる物質を特定します。

組み換えタンパク質のスクリーニングに用いられているテクニックの 1 つが、ファージ提示法です。rDNA をもつファージを、分離または固定化した疾患経路タンパク質のターゲットとともに、ウェルプレートに導入します。ファージが目的のタンパク質を産生および分泌したのち、ターゲットとのタンパク質間の相互作用を測定します。候補のタンパク質が選別されたら、各候補の rDNA をプラスミドにインサートし、そのプラスミドを原核細胞または真核細胞でクローニングします。その後、クローン細胞を小規模に発酵させ、*in vitro* および *in vivo* 疾患モデルに照らしてタンパク質の安全性パラメータや効率を評価するための精製スキームを策定します。こうした組み換えタンパク質候補の特定、分離、特性評価には、さまざまな手法や独自のアプローチが用いられます。医薬品開発に用いるタンパク質製剤が特定、確認、および選別されたら、製造プロセスが整備されます。

タンパク質製剤の 特性評価

組み換えタンパク質製剤の開発段階における主目的は、生物学的物質の産生と精製です。コスト効率の良い細胞培養および発酵プロセスのスケールアップ方法や生物製剤の精製手法を開発する必要があります。組み換えタンパク質の製造では、生成物の最終構造が、発酵時の翻訳後修飾や、製造工程により生じるその他の修飾により大きく左右されます。こうした修飾を分析し、制御する必要があります。不純物、特に発熱活性のある不純物や免疫学的反応を誘発する可能性のある不純物を特定および解析し、最終製品中の存在量を最小限に抑えなければなりません。酸化や加水分解などの化学的変化により生じる経時的な分解や効能の低下を抑えるためには、タンパク質製剤を適切に調剤することも重要です。したがって、タンパク質製剤の製造工程および調剤を支援し、正しい意思決定をするためには、正確で再現性の高い特性評価メソッドが必須要素となります。

QA/QC 手順の重要性

製薬会社は、製造工程全体と最終製品を厳密に監視し、製品の一貫性、品質、純度を保証しなければなりません。あらかじめ決められた仕様の準拠や最終製品の安全性と効能を確認するためには、堅牢で厳密、かつ正確な品質確認および品質管理メソッドが必要となります。生物製剤については、同一性、不純物、量(タンパク質含有量など)、安定性をテストする必要があります。あらゆる GMP 規則では、徹底的な品質管理が FDA および EMA の認可要件となっており、規制当局による監査の対象となることもしばしばあります。

組み換えタンパク質製剤の 特性評価という難問に対応 するためには

生物製剤の安全性と効能を保証するためには、製剤の特性を明確に評価する必要があります。FDA の生物製剤評価研究センター (CBER) は、1996 年に用語を定義しましたが、生物学的分子の特性評価の多様性が増すにつれ、そのコンセプトはさらに緻密なものになっています。タンパク質製剤については、「特性の明確な評価」とは、天然分子の不均質性、不純物プロフィール、効能が高い確度で定義できることを指します。開発されるタンパク質が複雑であることから、これらのニーズのすべてを 1 つで満たすことのできる分析プラットフォームやアプリケーションは存在しません。

多くの生物製剤は、分子量の近い物質や荷電アイソフォームの不均質な混合物です。生きた細胞から派生し、通常は複雑なパターンの生成物およびプロセス由来の不純物が含まれます。また、組み換えタンパク質は、複雑な翻訳後修飾を経て製造され、ジスルフィド架橋などにより決定される特異性の高い 3 次元構造を有し、凝集や吸着、切断などが生じる可能性もあります。医薬品として使用する組み換えタンパク質の不均質性、不純物プロフィール、効能を把握するためには、包括的な化学的および物理的、構造的な特性評価が不可欠です。タンパク質製剤の特性評価では、正確なアミノ酸配列、分子量、電荷変動、グリコシル化、凝集レベル、酸化レベルなどのすべてが重要な要素になります。

後のページでは、医療用組み換えタンパク質の完全な特性評価に必要な分析カテゴリーと、そうした分析に用いられる各手法や機器プラットフォームの現状を説明します。

タンパク質製剤の開発と製造において、プロセスモニタリングを効果的に行うためには、適切な分析技術が不可欠です。バイオプロセスによる製造工程を十分に理解し、組み換えタンパク質の産生方法や他の工程効率を向上させることにより、迅速で効果的なモニタリングが可能となります。また、製造工程は堅牢性を高め、標準化する必要があり、移管可能でオペレーターに左右されないことが重要です。この点も、効果的なモニタリングを行ううえで必要となります。バイオプロセスによる製造を最適化し、発売までの時間を短縮するためには、プロセスの開発をより加速させることも重要な要素となります。さらに、正確で信頼性の高いモニタリング技術には、FDA および EMA の Process Analytical Technology (PAT) のガイダンスに準拠する必要があります。発酵、抽出、精製のプロセスで最適な効率を得ることが、より良い製品の製造において重要となります。

モノクローナル抗体の製造において、免疫グロブリン G(IgG) 抗体を親和性により精製する際には、プロテイン A クロマトグラフィーが主に用いられています。分析用サンプルの前処理や、バイオリアクターにおけるターゲットタンパク質の濃度で示される力価の測定には、プロテイン A の分析用フォーマットも用いられています。AssayMAP プロテイン A カートリッジを備えた Agilent Bravo タンパク質精製用システムは、抗体力価を迅速に測定するだけでなく、グリコシル化や荷電アイソフォーム分析、サイジングアッセイなどの特性評価で用いる少量の抗体を前処理する優れた自動化ツールです。抗体の精製は、再利用可能なマイクロスケールのクロマトグラフィーカートリッジで行われます (図 1)。プロテイン A チップは 96 ウェルフォーマットで使用するため、ハイスループット分析が可能になります。AssayMap カートリッジには、抗体やプロテイン G およびプロテイン L などの組み換えタンパク質、イオン交換、逆相、ストレプトアビジンなどの高速スクリーニングに用いる樹脂を充填することもできます。AssayMap プレートには、スクリーニングのためのプロセスメディアを充填できます。一例として、イオン交換プレートをスクリーニングし、さまざまな pH および塩濃度で結合条件を調べることができます。



図 1. AssayMAP プロテイン A カートリッジを備えた Agilent Bravo タンパク質精製用システムのワークフロー。タンパク質力価分析に使用する場合。プロテイン A が中性 pH で mAb を捕捉し、その後、低 pH の酸性バッファで mAb を溶出します。検量線を作成し、バイオリアクターで生成された mAb の濃度を正確に測定することができます。

タンパク質のマイクロ流体オンチップ分析で高速化を実現する Agilent 2100 バイオアナライザは、プロセスモニタリングに有用なツールです。免疫沈降法と組み合わせることにより、未処理の E. coli 溶解物から得られたタンパク質について、感度と選択性の高い定量的な検出が可能になります。このメソッドは、未処理の細胞溶解物中の β -ガラクトシダーゼの定量に用いられ、数桁のレンジで高い再現性が得られます。2100 バイオアナライザは、タンパク質の精製や不純物除去の確認にも使用できます。

免疫グロブリン M (IgM) モノクローナル抗体の場合、細胞培地の上澄液に含まれる濃度や、さまざまなプロセスから得られた画分に含まれる IgM や不純物分布の文書化が必要となることから、IgM の製造においては正確でシンプルな高速分析法が求められます。Agilent Bio Monolith QA カラム (強アニオン交換カラム) は、IgM 精製プロセスの高速モニタリングや、細胞培地の上澄液に含まれる IgM 濃度の測定に最適です (図 2)。

組み換えタンパク質製剤の製造中にモニタリングすべきパラメータの 1 つに、タンパク質の PEG 化 (ポリエチレングリコール (PEG) の付加) の度合いがあります。タンパク質を PEG 化することにより、製剤の可溶性向上、投薬頻度や毒性の低下、薬剤の高安定化が達成されることから、多くの製剤において安全性と効能が向上します。PEG 化の度合いは、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いた分子量の測定によりモニタリングできます。タンパク質の表面電荷は PEG の結合状態により変化するため、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) も PEG 化アイソフォームの分離に用いることができます。また、PEG 化の度合いは電気泳動でも測定できます。Agilent 2100 バイオアナライザを使えば、SDS-PAGE に代わる自動メソッドが実現します。これによりサンプル前処理を簡略化し、分析時間を短縮し、30 分以内にデジタルデータを得ることが可能になります (図 3)。

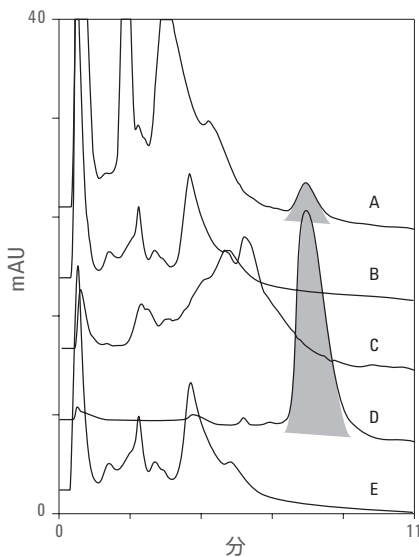


図 2. 精製およびカラム再生の確認のために、Agilent Bio-Monolith QA 分析カラムを用いて分取したヒドロキシアパタイトのクロマトグラフィーフラクション (A~E)。A. 細胞培地の上澄液、B. サンプルロード時の流出液、C. 溶出前洗浄、D. IgM 溶出ピーク、E. 溶出後洗浄

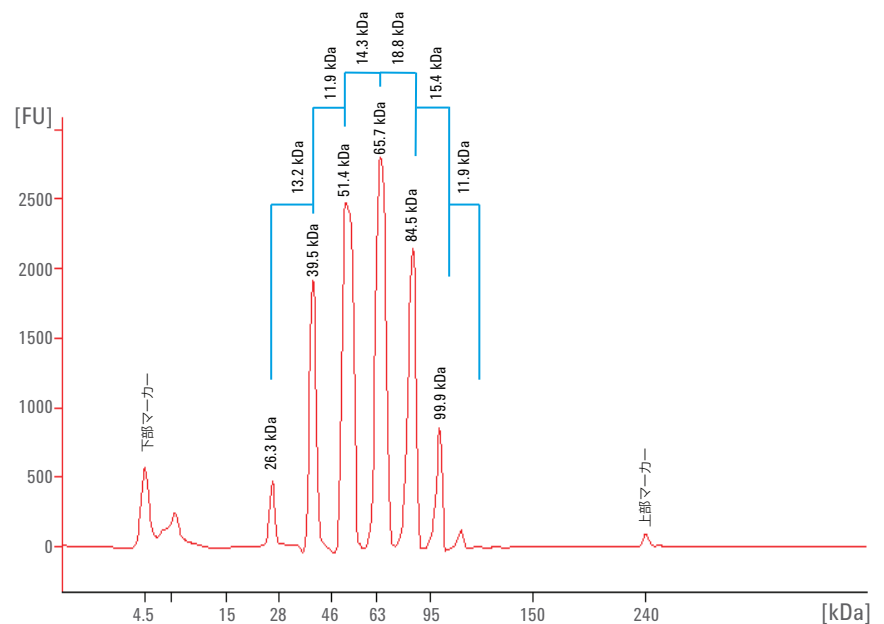


図 3. Agilent 2100 バイオアナライザおよびプロテイン 230 キットを用いた組み換えタンパク質製剤の PEG 化アイソフォームの分析。PEG を含まない遊離タンパク質は 26.3 kDa です。約 5 kDa の PEG を結合させているため、3 つの PEG (39.5 kDa)、5 つの PEG (51.4 kDa)、それ以上の PEG が結合した組み換えタンパク質が明確に分離されます。各アイソフォームに存在する PEG 分子の数を割り当てるためには、質量分析による分析がさらに必要です

バイオプロセスモニタリングにおける分析技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
MAb の力価、精製、前処理： プロテイン A-LC/UV	プロテイン A の IgG に対する親和性にもとづいた HPLC による分離 (低 pH から高 pH へのステップグラジエントによる分離)	オンライン分離および検出 LC とバイオリクターを接続したリアルタイム分析が可能	検量線はオフラインまたは手動で作成 使い捨てではないが LC カラムが高価 低いスループット、LC 分析 1 回につき 1 サンプル
MAb の力価、精製、前処理： マイクロクロマトグラフィーカートリッジプロテイン A、力価スペクトルリーダー	BRAVO リキッドハンドリングシステム、AssayMap マイクロクロマトグラフィーヘッド、AssayMap マイクロクロマトグラフィープロテイン A カートリッジ、培地などからのモノクローナル抗体の分離、高 pH から低 pH へのステップグラジエントによる分離、スペクトルリーダーによる力価検出、LC、LE/MS、CE などの技術による分析	特性評価分析用のサンプル前処理と同時に力価を計算 96 ウェルプレートフォーマット、高スループット 多目的チップ、プロテイン A カラムより安価で使い捨て 自動での検量線作成と分析	現時点で、リアルタイムで分析するオンラインシステムなし 力価の場合、個別のスペクトルリーダーによるプレート読み取りが必要
プロセスモニタリング クロマトグラフィー： イオンクロマトグラフィー	イオン交換 HPLC システム (強カチオン、弱カチオン、アニオン交換)、タンパク質の総正味電荷にもとづく充填剤との相互作用、塩濃度および/または pH を上昇させるグラジエントによる溶出	タンパク質の荷電バリエーションのクロマトグラフィー分離が可能、多様なカチオンおよびアニオン交換樹脂により選択性が豊富 製造と同様のクロマトグラフィーメカニズムが適用可能、分離効率および回収率の測定での利用が容易 分離した荷電アイソフォームの画分からさらなる分析が可能 (MS 分析では脱塩や緩衝液の交換が必要)	グラジエントが長く、緩衝液の消費量が多い cIEF より分離能が低い そのままでは質量分析に対応せず
プロセスモニタリング クロマトグラフィー： サイズ排除クロマトグラフィー	HPLC システム、サイズ排除 カラム、タンパク質の分子半径および多孔性充填剤を通過する速度にもとづく分離、UV 検出	凝集体および不純物の分子サイズにもとづく高分離能分離 SDS-PAGE より分析時間が短い 簡単なメソッド、凝集体の精製と不純物の除去をモニタリングに使用 フラクション採取によるさらなる分析が可能	分離可能な範囲が狭い、高分子量の凝集体と低分子量の不純物を 1 回で分離するのが困難 質量の情報が得られない、質量分析計への接続が困難
PEG 化プロセスのモニタリング： チップベース (バイオアナライザ) のタンパク質電気泳動アッセイ	2100 バイオアナライザシステム、高感度プロテイン 250 または 230 キット (チップ、蛍光標識バッファ、必要なすべての試薬を含む)、蛍光検出と組み合わせた電気泳動	分子サイズの違いを利用することで同じタンパク質でも PEG 化の度合いより識別可能 高分離能 定量的な分析結果 SDS-PAGE より分析時間が短い	現時点で、リアルタイムで分析するオンラインシステムなし さらなる分析のためのサンプル採取が不可能

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-7203EN	High throughput purification of human IgG using the Agilent Bravo for Protein Purification and AssayMAP1 protein A cartridges
5989-9733JAJP	アジレント HPLC 用バイオモノリスプロテイン A カラムによるヒト・ポリクローナル IgG の迅速な定量
5990-6153EN	Monitoring protein fate during purification with the Agilent 2100 Bioanalyzer
5989-9674JAJP	培養細胞生成および精製プロセスモニタリングにおける Agilent バイオモノリス QA カラムによる高速 IgM 定量

多くのタンパク質製剤は比較的安定した物質ですが、製造、調剤、保管の際に多くの化学修飾や分解が生じることがあります。タンパク質の多くは、精製プロセスでタンパク質分解により切断されることがあります。その場合、切断された分解物が患者体内で免疫反応を引き起こす可能性があることから、大きな悪影響が生じるおそれがあります。こうした修飾および分解反応の存在により、プロセス開発や製造におけるタンパク質純度と構造の完全性を評価するための信頼性の高い高感度分析が必要となっています。

インタクトタンパク質、サブユニット全体、領域の精密質量分析は、アミノ酸配列の高速確認や、翻訳後修飾、分解、サンプルハンドリングによるアーチファクトの測定に役立ちます。インタクトタンパク質とその分解生成物の分子量の測定には、電気泳動、クロマトグラフィー、質量分析 (MS) などのテクニックが一般的に用いられます。もっとも一般的な分析の 1 つが、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) です。このテクニックを使えば、タンパク質が単量体構造を有しているか、製造から調剤のプロセス間にその構造を維持しているかを確認できます。

SDS 電気泳動テクニックでは、タンパク質の分子量と純度を正確に推定できます。チップベースの自動システムを使えば、開発および製造工程全体におけるモニタリングが可能になります。Agilent 2100 バイオアナライザは、幅広いタンパク質を自動的にサイズ分類および定量できるように設計されています。重いグリコシル化タンパク質の場合、大きな糖鎖が付加されているため、電気泳動メソッドでの測定は難しいことがあります。しかし、グリカン成分の除去により、適切な移動とより正確な分子量の推定が可能になります。また、グリコシル化、脱グリコシル化、各種アイソフォームを含む多くの化合物種については、Agilent 2100 バイオアナライザにより明確に視覚化できます。

タンパク質製剤の分子量分析に用いられる手法の 1 つが、キャピラリー電気泳動 (CE) です。UV またはレーザー誘起蛍光 (LIF) 検出を用いた CE から、LIF と MS 検出器を組み合わせたソリューション (CE/LIF/MS) まで、さまざまなメソッドがあります。主に、電荷、質量、分子形状により分離を実行する CE は、抗体の一次構造やグリコシル化状態の評価にきわめて有効な手法です。LIF 検出器と飛行時間型 (TOF) MS に同時に接続すれば、モノクローナル抗体 (mAb) サンプルの少量成分の検出および分析において、これまでは不可能だった感度が得られます (図 1)。

TOF または四重極飛行時間型 (QTOF) MS と組み合わせた液体クロマトグラフィーでも、タンパク質製剤に関する精密質量情報が得られます。この手法では、精度は電気泳動よりも大幅に高くなります。一般に、分析は 1 時間未満で完了し、タンパク質や分解および修飾により生じる不純物に関する貴重な情報が得られます。たとえば、モノクローナル抗体のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) LC/QTOF MS 分析はわずか 9 分で完了し、質量精度は 25 ppm を上回ります。また、サンプル中に存在するさまざまな抗体亜集団を分離できます。

mAb を含む多くの治療用タンパク質は、ジスルフィド架橋により結合するタンパク質複合体です。この複合体は、還元によりサブユニットに解離することがあります。

HPLC と質量分析を用いれば、このサブユニットを分析できます。インタクト mAb 分析では、純度とグリコシル化レベルに関する多くの情報が得られますが、ジスルフィド架橋の還元により生じる軽鎖および重鎖サブユニットの分析を行えば、さらに多くの情報が得られます。重鎖のグリコシル化の程度や種類のほか、非酵素的グリコシル化や非特異的グリコシル化などの不要な修飾も検出できます (図 2)。

図 1. CE/LIF と蛍光 (266 nm 励起、>290 nm 検出) を用いた 1 mg/mL の部分還元 IgG の分離。グリコシル化抗体重鎖がグリコシル化されていない複合体 (*) から分離されています。挿入図では、軽鎖、N グリコシル化のない重鎖 (*), グリコシル化のある重鎖について、10~14 分の領域を拡大しています

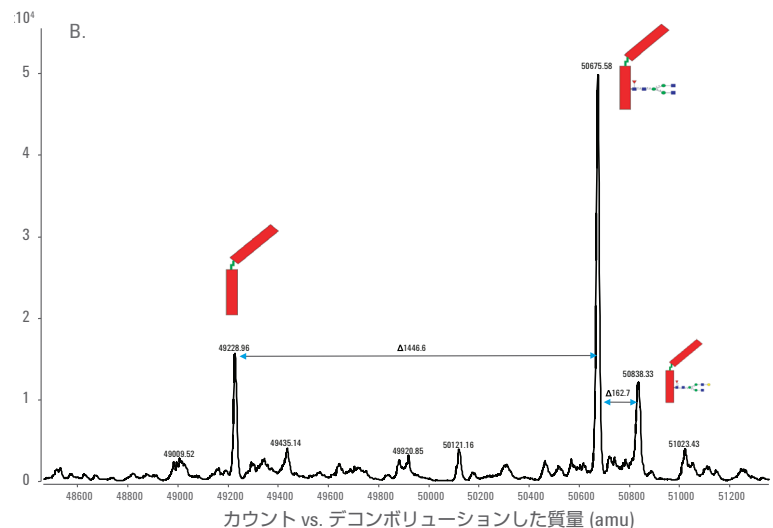
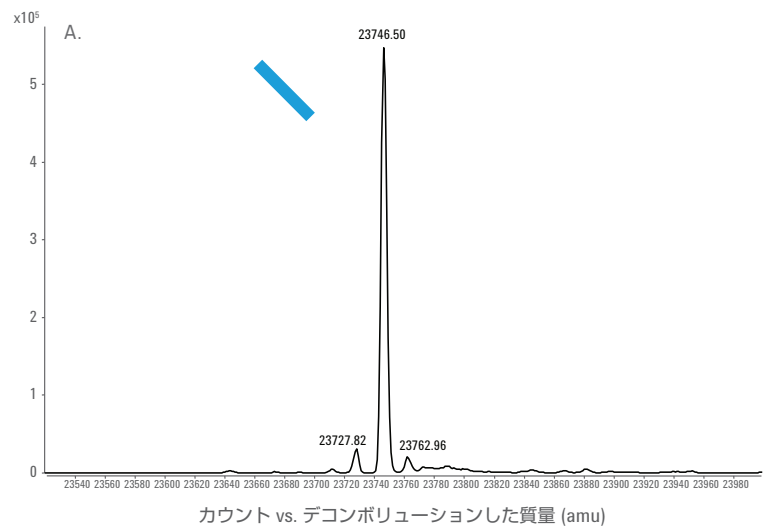
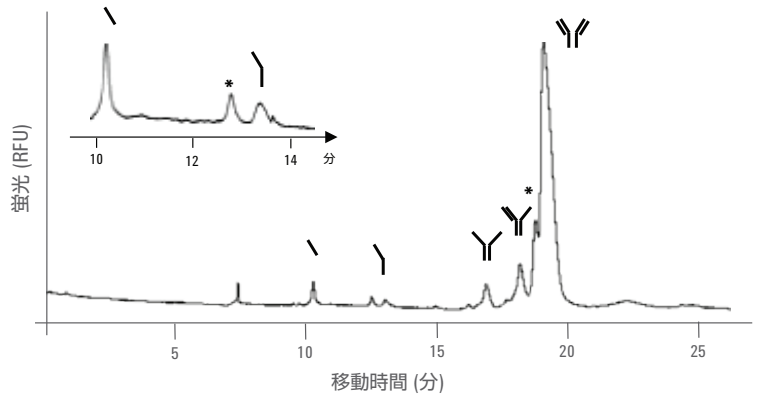


図 2. ZORBAX 300SB-C8 濃縮および分析カラムと Accurate-Mass Q-TOF MS を組み合わせた Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS システムによる還元型モノクローナル抗体の分析

A) mAb 軽鎖のデコンボリューションしたスペクトル (青いバーで表示)

B) mAb 重鎖のデコンボリューションしたスペクトル (赤いバーで表示、各種の糖付加あり)

インタクトタンパク質の同定、純度、不純物分析技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
SDS 電気泳動	電気泳動チャンバー、アクリリアミドゲル、バッファおよび試薬、クマシーブルーまたは銀染色 (電荷とサイズをもとにタンパク質を分離、小さいタンパク質または単量体は二量体および凝集体より先に移動)	タンパク質、凝集体、不純物を泳動バンドで視覚的に同定可能 ゲルバンドのカットアウトによりサンプルを採取し、さらなる分析が可能	分子量が同じで修飾や構造が異なるインタクトタンパク質と不純物の分離能が低い 非定量的
分析的サイズ排除クロマトグラフィー	HPLC システム、サイズ排除 HPLC カラム、タンパク質の分子半径および多孔性充填粒子を通過するスピードにもとづく分離、UV 検出	凝集体および不純物のサイズにもとづく高分離能分離 SDS-PAGE より分析時間が短い 簡単なメソッド、凝集体の精製と不純物の除去をモニタリングする工程に一般的に使用 フラクション採取によるさらなる分析が可能	分離範囲の制約、高分子量の凝集体と低分子量の不純物を1回で分離するのが困難 質量情報が得られない、質量分析計への接続が困難
チップベース (バイオアナライザ) のタンパク質電気泳動アッセイ	2100 バイオアナライザシステム、250 高感度プロテインキット (チップ、蛍光標識バッファ、必要ならすべての試薬を含む)、蛍光検出と組み合わせた電気泳動分離	定量的な分析結果 高分離能分離 インタクトタンパク質および凝集体とともに低分子量の不純物を分離可能 SDS-PAGE より分析時間が短い	現時点で、リアルタイムのリアクター分析が可能なオンライン接続方法なし さらなる分析のためのサンプル採取が不可能
CE/UV	キャピラリー電気泳動システム (7100 CE) を CZE モードで使用、キャピラリーおよびバッファ、分子半径をもとに分離、インタクトタンパク質と不純物を分離、UV 検出	逆相 HPLC とは異なる分離モードのテクニック 一部のケースでは、HPLC 分離よりもタンパク質の分離能が高い	質量情報が得られない、分析対象タンパクに由来する不純物の場合はさらなる分子構造の確認が必要 さらなる分析のためのサンプル採取が不可能
CE/LIF	キャピラリー電気泳動システム (7100 CE) を CZE モードで使用、キャピラリー、APTS 標識およびバッファ、分子半径をもとに分離、インタクトタンパク質と不純物を分離、APTS 標識タンパク質および不純物のレーザー誘起蛍光検出、ラダー標準にもとづく同定	逆相 HPLC とは異なる分離モードのテクニック 一部のケースでは、HPLC 分離よりもタンパク質の分離能が高い 蛍光標識および LIF 検出により特異性が向上	質量情報が得られない、タンパク質に由来する不純物の場合はさらなる分子構造の確認が必要 さらなる分析のためのサンプル採取が不可能 インタクトタンパク質と不純物の不完全な標識により問題が生じる可能性

技術	技術の説明	利点	制約
CE/LIF/MS	キャピラリー電気泳動システム (7100 CE) を CZE モードで使用、キャピラリー、APTS 標識およびバッファ、分子半径をもとに分離、インタクトタンパク質と不純物を分離、APTS 標識タンパク質および不純物のレーザー誘起蛍光検出、MS 検出、ラダー標準と分子量をもとにインタクトタンパク質とアイソフォーム、不純物を同定	逆相 HPLC とは異なる分離モードのテクニック	分析対象タンパクに由来する不純物の場合はさらなる分子構造の確認が必要
		一部のケースでは、HPLC 分離よりもタンパク質の分離能が高い	さらなる分析のためのサンプル採取が不可能
		蛍光標識およびタンデム MS 検出により特異性がさらに向上	インタクトタンパク質と不純物の不完全な標識により問題が生じる可能性
			APTS 標識試薬により MS シグナル抑制が生じる可能性
RP-LC/UV	HPLC システム、通常は C8 以下の炭素鎖逆相 HPLC カラムを用いた有機溶媒濃度上昇グラジエントにおける疎水性にもとづく分離、UV 検出 (通常はジスルフィドパターン/変動およびタンパク質分解のモニタリングに使用)	さまざまなバリエーションおよび不純物の分離に幅広いカラムを利用可能 (C18、C8、C4、C3、ジフェニル、HILIC など)	質量情報が得られない、さらなる分析にはフラクション採取が必要
		フラクション採取が可能で質量分析に対応	フラクション採取が可能で質量分析に対応
		QA/QC への移管が可能な堅牢なメソッド	
RP-LC/QTOF MS (ESI)	HPLC システム、通常は C8 以下の炭素鎖逆相 HPLC カラムを用いた有機溶媒濃度上昇グラジエントでの疎水性にもとづく分離、MS 検出	さまざまなバリエーションおよび不純物の分離に幅広いカラムを利用可能 (C18、C8、C4、C3、ジフェニル、HILIC など)	QA/QC では一般的でない、LC/MS の使用とデータ解析の専門知識をもつユーザーが必要
		フラクション採取が可能で質量分析に対応	
		インタクトタンパク質や、場合によってはバリエーション、不純物、ターゲット以外のタンパク質から派生した不純物 (これらは採取、分解、マッピングが可能) の質量情報が得られる	

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-3445EN	Primary Characterization of a Monoclonal Antibody Using Agilent HPLC-Chip Accurate-Mass LC/MS Technology
5989-7406EN	Accurate Mass LC/TOF MS for Molecular Weight Confirmation of Intact Proteins
5989-0332EN	Glycoprotein sizing on the Agilent 2100 Bioanalyzer
5989-8940EN	Performance characteristics of the High Sensitivity Protein 250 Assay for the Agilent 2100 Bioanalyzer
5989-6840JAJP	HPLC と LC/MS を用いた抗体分離の選択性最適化のための ZORBAX StableBond 300 Å LC カラムの比較

糖タンパク質は、免疫防御、細胞の成長、細胞間接着に関連を持ちます。そうした機能の仲介を助けるグリカンは、さまざまな複雑な構造をもつため、その構造を解明できる分析テクニックが求められます。既存のタンパク質製剤の 90 % 以上は糖タンパク質です。たとえば、転移性乳がんや非ホジキンリンパ腫などの命にかかわる疾患を治療する糖タンパク質製剤として、さまざまな組み換え型の免疫グロブリン (モノクローナル抗体 mAb など) が製造されています。これらの糖タンパク質製剤は複雑なオリゴ糖部分を有し、その存在の有無やプロファイルは、薬効や薬物動態、免疫原性、フォールディング、生物製剤の安定性に大きな影響を与えることがあります。たとえば、ある種のグリカン構造は、凝集を引き起こし、薬効を低下させることで知られています。また、グリコシル化の程度や種類は、抗体の製造に用いられる発現システムや細胞培養条件に大きな影響を与える要素です。そのため、発酵、精製、調剤の全てのプロセスで、タンパク質製剤に含まれる N 結合型グリコシル化構造をモニタリングし、製剤の一貫性と安定性を確認する必要があります。

糖タンパク質とそのグリカン部分の分析には、さまざまなアプローチを利用できます。たとえば、HPLC と四重極飛行時間型質量分析を組み合わせれば (LC/QTOF MS)、インタクトタンパク質に付加されたグリカン部分の数を識別し、活性形態と不活性形態を識別することが可能です (図 1)。

また、タンパク質のトリプシン消化によりグリコシル化部位を特定し、それにより得られた糖ペプチドを LC/QTOF MS により分離および同定することもできます。これらのペプチドの質量を、必要とされるタンパク質のグリカン型の理論上の消化物と比較すれば、タンパク質が適切にグリコシル化しているかどうかを測定できます。キャピラリー電気泳動 (CE) と QTOF MS の組み合わせも、この目的で使用できます。こちらの手法は、分離効率が優れ、分析時間が短く、サンプル/溶媒の消費量が最小限です。

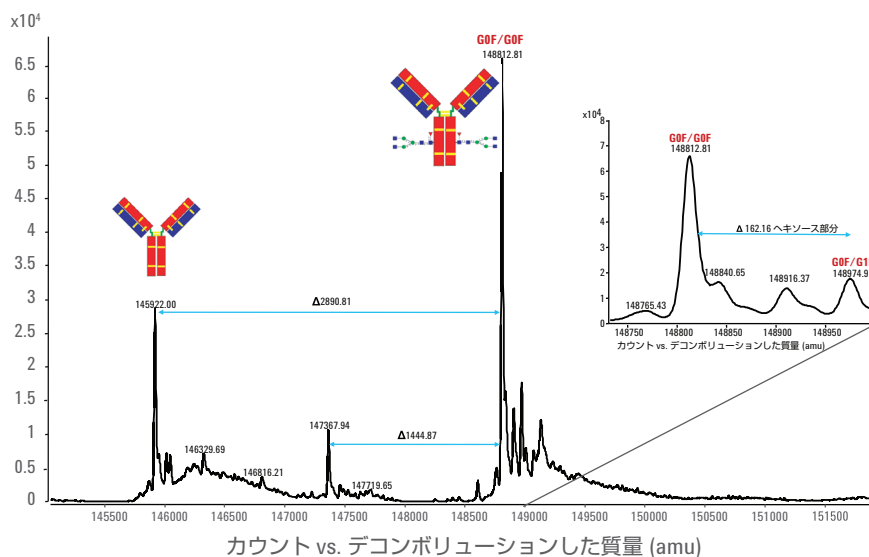


図 1. デコンボリューションしたインタクト抗体の Q-TOF MS スペクトル。挿入図は mAb の少量の G1F 型 (G0F にヘキソース部分が付加) の拡大図。Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS システムと 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS プラットフォーム、75 μ m x 43 mm ZORBAX 300SB-C8 分析カラムを使用

タンパク質に付加されたグリカン部分の分析でもっとも一般的に用いられるのが、酵素的脱グリコシル化と加水分解です (図 2)。アミダーゼの 1 つである N-グリコシダーゼ F (PNGase F) を用いて、糖タンパク質からアスパラギン結合 (N 結合) オリゴ糖を切断します。一般には、除去したグリカンを誘導体化および標識し、蛍光検出により分析します。その後、レーザー誘起蛍光 (LIF) または MS 検出を用いたキャピラリー電気泳動により、アミノピレントリルスルホン酸 (APTS) で標識したグリカンを同定および定量します。

蛍光検出 (FLD) を用いた HPLC でも、2-アミノベンズアミド (2-AB) で標識したグリカンを分離および同定できます。HPLC-FLD メソッドによるグリカンの分離では、しばしば親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムまたはその他の分離モードが用いられます。こうしたテクニックでは、質量情報が得られないほか、すべての異性体を分離することはできず、低濃度のグリカンを検出するだけの感度はありません。また、酵素反応と標識手順に時間がかかるため、完了までに 2 日ほどかかることもあります。

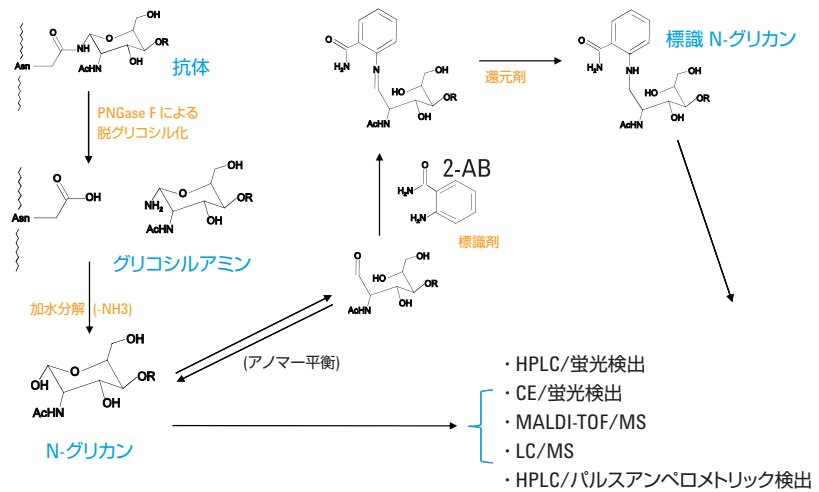


図 2. グリカン分析のワークフロー

標識されていないグリカンも、さまざまなテクニックで分析できます。従来、高性能アニオン交換クロマトグラフィーとパルスアンペロメトリック検出の組み合わせ (HPAEC-PAD) が、ヒドロキシル基と固定相の相互作用にもとづく非標識グリカンの分離に用いられています。HPAEC-PAD は、シアル酸含有量の測定に用いられます。製剤の安定性とバッチ間再現性を確認するためには、シアル酸を測定する必要があります。このメソッドでは、標識の効率に伴う問題を排除できますが、フィンガープリン的な情報が得られる点は同じで、グリカンの同定には標準が必要となります。ガスクロマトグラフィー (GC) も、堅牢性と分離能が高いことから、単糖の組成分析にしばしば用いられます。

非標識グリカンの分析では、逆相 (RP) LC/MS とマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) を用いて、グリカンの質量情報を得ることもできます。しかし、このテクニックでも、存在する可能性のある異性体を完全に分離することはできません。

アジレントは、N 結合型グリカンの特性評価に使用できる独自のチップベース LC/MS ソリューションを開発しました。このソリューションでは、一般には 2 日かかる分析が 10~30 分で完了し、自動モードでの分析が可能です。mAb-Glyco チップキットでは、オンライン PNGase F リアクターを用いて脱グリコシル化を行い、グラファイトカーボン濃縮カラムでグリカンを濃縮し、グラファイトカーボン分析カラムでグリカンを分離します。多孔性グラファイトカーボンを使えば、しばしば存在する異性体を含め、存在する可能性のあるすべてのグリカン構造を分離できます (図 3)。手順はすべて、Agilent 質量分析計と連動する単一のナノ LC チップ上で実行されます。分析者のすべき操作は、mAb サンプルを希釈および遠心分離し、オートサンプル内に設置するだけです。残りの分析は、チップ上で実行されます。その後、MassHunter ソフトウェアとグリカンデータベースを用いて、グリカンの構造、量、比率を同定および測定します。この手法には、Agilent キャピラリーおよびナノポンプ、Chip-Cube インターフェース、Agilent MS が必要です。このチップを用いた分離は再現性が高く、一般的なすべての N 結合型グリカンを定量できるため、タンパク質製剤のグリカン組成のバッチ間再現性を確認するための工程分析技術 (PAT) メソッドとしてはきわめて効果的です (図 4)。アジレントでは、オフラインで脱グリコシル化したサンプルの分析用に、酵素リアクターのない多孔性グラファイトカーボンチップも提供しています。

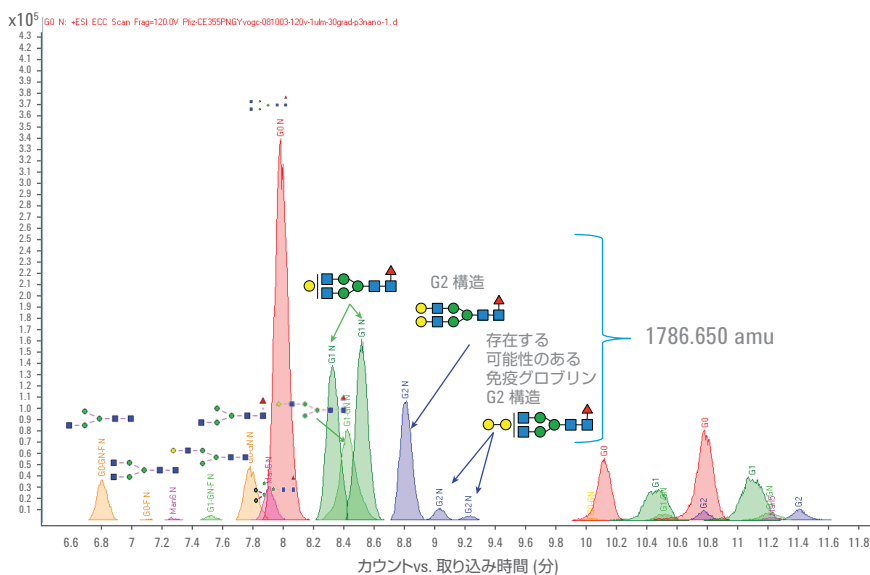


図 3. mAb-Glyco チップによる、異性体を含むモノクローナル抗体グリカンの分離。8.7~9.3 分の 3 つの G2 ピークを青で示しています。最初の G2 ピークは、各腕にガラクトース 1 つを含む一般的な G2 構造を示しています。それよりも小さい青の G2 ピークは、免疫原性があるとされる α 結合型ガラクトース構造を示しています

タンパク質製剤の完全な特性評価に 3 次元グリカン構造情報が求められる場合には、核磁気共鳴 (NMR) を用いれば、糖タンパク質およびグリカン構造の重要な機能を解明できます。2 つの天然活性核 (^{13}C および ^1H) による 2 次元 (2D) NMR では、明確な構造解明とグリカンの空間的配置の特異的検出が可能です。細菌由来の複合糖質に存在する糖質など、異常な糖質や不明な糖質の測定には、多くの場合、NMR が必要不可欠です。また、遊離グリカンの構造分析では、 ^1H NMR が強力なツールとして用いられています。

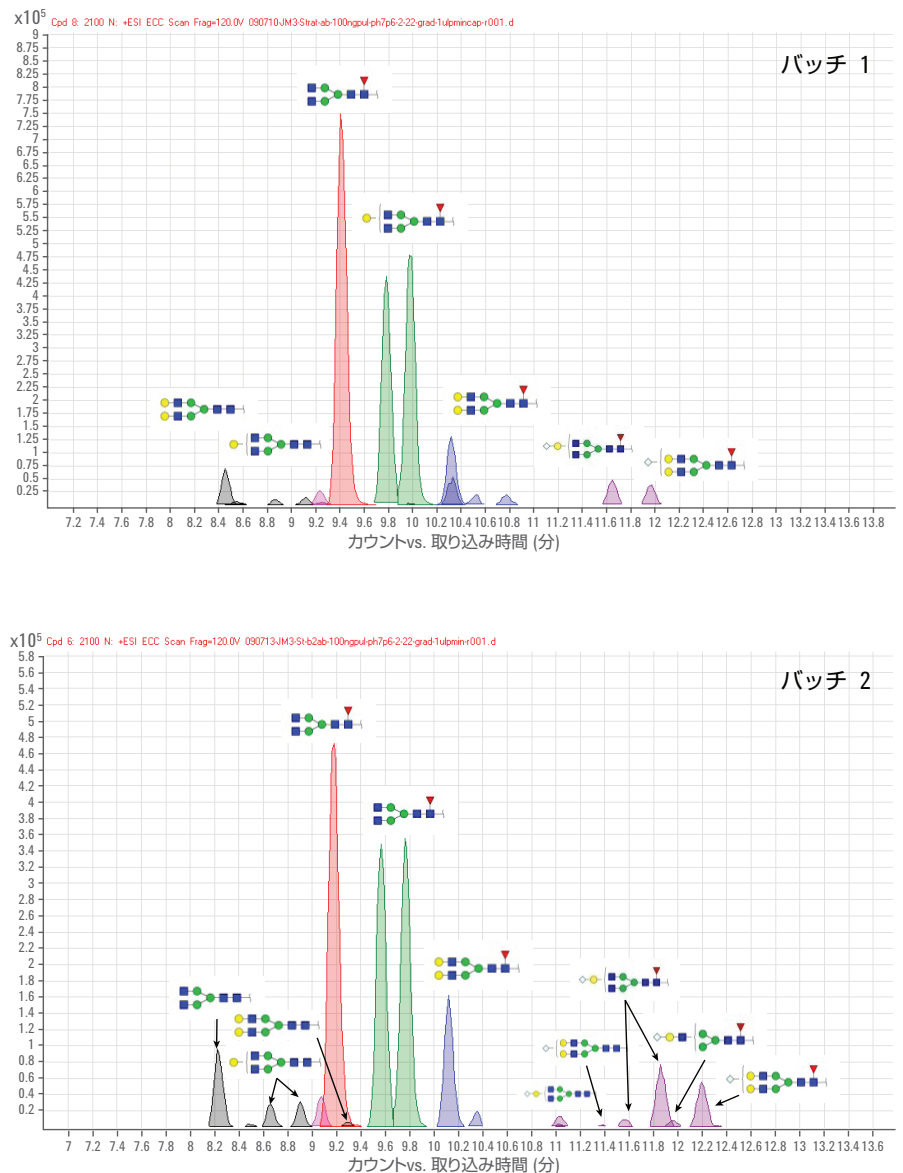


図 4. 2 つのモノクローナル抗体製造バッチのグリカンプロファイルの比較。mAb-Glyco チップを用いて分析。バッチ 2 では、シアル化グリカンの割合が高くなり、種類も多様化しています

グリカンプロファイリング技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
CE(CZE)/LIF	PNGase F による N 結合型グリカンの除去、APTS による蛍光標識、イオン状態分離 (CZE)、レーザー誘起蛍光励起および検出、ラダー標準の位置にもとづく同定	ほとんどの位置異性体を識別できる高分離能分離メソッド	酵素および標識手順に時間がかかる 同定にはグリカンラダー標準の使用が必要 標識効率の問題が生じる可能性 質量同定なし、ラダー標準に依存
CE(CZE)/MS	PNGase F による N 結合型グリカンの除去、APTS による蛍光標識、イオン状態分離 (CZE)、質量分析検出、ラダー標準の位置および分子量データベースにもとづく同定	ほとんどの位置異性体を識別できる高分離能分離メソッド グリカンの精密質量情報が得られる	酵素および標識手順に時間がかかる 標識効率の問題が生じる可能性
HILIC-LC/FLD	PNGase による N 結合型グリカンの除去、2-AB による蛍光標識、有機濃度減少条件における疎水性にもとづく分離 (HILIC)、蛍光標識検出、リテンションタイムデータベースにもとづく同定	ほとんどの位置異性体を識別できる高分離能分離メソッド フラクションを採取してさらなる分析が可能	酵素および標識手順に時間がかかる 標識効率の問題が生じる可能性 質量同定なし、リテンションタイムに依存
HPAEC-PAD	PNGase F による N 結合型グリカンの除去、蛍光標識、塩濃度上昇条件における電荷状態とアニオン交換メディアとの相互作用にもとづく分離、パルスアンペロメトリック検出 (化学変換および電極相互作用)、リテンションタイムデータベースにもとづく同定	非標識分析、標識効率の問題なし 標識手順がないため、標識テクニックより分析スピードが向上 一般にはバッチ分析の「フィンガープリント」として用いられ、定量や同定には使用されない	酵素除去手順に時間がかかる グリカンの共溶出の可能性 CE や LC/MS テクニックのような分離能と感度がない
GC または GC/MS	遊離単糖組成分析 (タンパク質に結合していない)、タンパク質からの分離、UV または MS 検出、リテンションタイムまたは分子量にもとづく同定	検出前に単糖からタンパク質を分離して除去、干渉が少ない 一般に、細胞培地の単糖のモニタリングおよび同定や精製における除去確認に用いられる	オリゴ糖への応用に制約 CE や LC/MS テクニックのような分離能と感度がない
MALDI-TOF/MS	PNGase F による N 結合型グリカンの除去、イオン化マトリックスによる MALDI プレートでの遊離グリカンのスポットティング、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化、TOF/QTOF MS 検出、分子量データベースにもとづく同定	時間のかかる標識手順が不要 グリカン構造の精密質量情報が得られ、正確な質量同定が可能	グリカンの酵素的除去に時間がかかる マトリックス起因の抑制により感度が低下する可能性があり、低濃度のグリカンの検出が難しくなる

技術	技術の説明	利点	制約
多孔性グラファイトカーボン (PGC) Chip- LC TOF/QTOF MS	PNGase F による N 結合型グリカンの除去、多孔性グラファイトカーボン (PGC) 濃縮カラムでのグリカンの濃縮、有機グラジエント条件における PGC ナノカラムでのグリカンの分離、ESI-TOF/QTOF MS 検出、リテンションタイムおよび分子量データベースにもとづく同定	<p>時間のかかる標識手順が不要</p> <p>グリカンの精密質量情報が得られる</p> <p>オリゴ糖部分の高分離能と独自の選択性により、優れたグリカンの分離能が得られ、他のテクニックよりも多くの異性体に対応可能</p>	<p>グリカンの酵素的除去に時間がかかる</p> <p>脱グリコシル化タンパク質は PGC 濃縮カラムで固定化され、分析できない</p>
MAB Glyco Chip-LC TOF/QTOF MS	オンラインでの PNGase F による N 結合型グリカンの除去、多孔性グラファイトカーボン (PGC) 濃縮カラムでのグリカンの濃縮、有機グラジエント条件における PGC ナノカラムでのグリカンの分離、ESI-TOF/QTOF MS 検出、リテンションタイムおよび分子量データベースにもとづく同定	<p>オンラインでの酵素的グリカン除去が可能、反応時間を一晩や数時間から数分に短縮</p> <p>時間のかかる標識手順が不要</p> <p>グリカン構造の精密質量情報が得られ、正確な質量同定が可能</p> <p>オリゴ糖部分の高分離能と独自の選択性により、優れたグリカンの分離能が得られ、他のテクニックよりも多くの異性体に対応可能</p>	<p>脱グリコシル化タンパク質は PGC 濃縮カラムで固定化され、分析できない</p>
2次元 (2D) NMR	基礎タンパク質研究や構造確認で3次元グリカン構造情報を提供、大型タンパク質の分析にはプローブと強磁場マグネットが必要	<p>明確な構造割り当てとグリカン空間配置の特異的検出が可能</p> <p>異常な糖質や不明な糖質の測定</p>	<p>通常は NMR の専門知識が必要</p> <p>全タンパク質構造の分析が困難、一般には特定のタンパク質領域または部位の分析に使用 (mAb の Fab または Fc 領域など)</p>

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-6924JAJP	モノクローナル抗体の N-結合型グリカンの高速全自動分析を実現する Agilent mAb-Glyco chip キット
5990-5190EN	Glycopeptide and glycan analysis of monoclonal antibodies using a microfluidic-based HPLC-Chip coupled to an Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS
5990-7138EN	Glycopeptide Analysis of Antibodies by Capillary Electrophoresis and Q-TOF Mass Spectrometry
5990-5155EN	Success Story at Boston University School of Medicine – Custom HPLC-Chip enables new research in glycan expression

ペプチドマッピングは、タンパク質の同定試験にもっとも広く用いられている手法で、特に組み換えにより生成されたタンパク質の分析に利用されています。一般には、タンパク質の酵素消化 (通常はトリプシンを使用) により、ペプチド断片を生成したのち、再現性の高い手法で断片を分離および同定します。ペプチドマッピングはきわめて強力な手法であり、単一のアミノ酸変化、酸化、アミド分解、その他の分解生成物を検出できるため、バイオテクノロジー分野に欠かせないツールになっています。また、N-末端環化、C-末端リジン処理、N-グリコシル化などの一般的なモノクローナル抗体変異や、翻訳されたイントロンなどの不測の変化を直接検出することもできます。

ペプチドマップはタンパク質のフィンガープリントです。複数のプロセスから作成され、分析対象タンパク質を包括的に理解することができます。ペプチドマッピングの主な手順は4つで、タンパク質の分離と精製、ペプチド結合の選択的切断、ペプチドのクロマトグラフィー分離、ペプチドの分析と同定で構成されます。参照用標準または参照用物質とともに、分析対象サンプルを消化および分析します。マップを有意なものにするためには、十分な量のペプチドが含まれている必要があります。タンパク質の決定的な同定を可能にするだけでなく、ペプチド配列全体の占有率を最大化する必要もあります。

タンパク質分解したペプチドの逆相 HPLC 分離と質量分析を組み合わせたペプチドマッピングは、組み換えタンパク質同定の主要メソッドとなっており、製剤の発売には欠かせない手法です。タンパク質製剤の安定性も特性評価の重要な要素で、通常の保管条件で使用期限全体を通じた長期的モニタリングを行い、酸化、還元、グリコシル化、切断などの修飾の有無を調べる必要があります。

多くのペプチド分離には、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) LC/MS 機器が用いられます。これは、LC 連結が容易なことに加えて、タンデム質量スペクトルの品質が高く、信頼性の高いタンパク質同定が可能のためです。また、分離能と質量精度が高い QTOF 機器では、特に大型ペプチドの構造情報が豊富に得られます。通常、ペプチドマッピングには、分析およびキャピラリースケールの HPLC システムとカラムが用いられます。サンプルが制限されている場合や、mAb サブユニットや小型の組み換えタンパク質の分析では、Agilent マイクロ流体チップ LC/QTOF MS システムを使えば、ごく少量のサンプル消費量で、精度の高いペプチドマップが迅速に得られます。こうした機能は、微量の不純物やターゲット以外の成分のマッピングで特に役立ちます。

タンパク質とその修飾は、LC/MS ペプチドパターン (マップ) により同定されます。まず、分子構造抽出ソフトウェアを用いて、各ペプチドに実際の質量を割り当ててから、その構造を確認します。ソフトウェアは、既知のタンパク質配列にもとづくペプチド質量の理論上の消化リストの作成にも用いられます。実験データと理論上のペプチドパターンをマッチングさせ、タンパク質同定を確認します。ペプチドプロフィールには、各ペプチドやその誘導体を示す 60 以上のピークが含まれることが

あるため、きわめて強力な分離メソッドが求められます。適切なポアサイズを備えた表面多孔性逆相粒子技術を活用したカラムを用いることで、こうした分離の効率とスピードを大幅に向上させ、モノクローナル抗体の軽鎖と重鎖のペプチド配列占有率を 100 % まで上げられると同時に、分離時間を従来カラムの 2 分の 1 に短縮することができます (図 1)。全多孔性逆相粒子も、高カバー率ペプチドマップの作成に用いることができます。多くの場合は小さい粒子を充填した長いカラムが用いられるため、Agilent 1290 Infinity LC システムなどの高耐圧 UHPLC システムが必要になります。

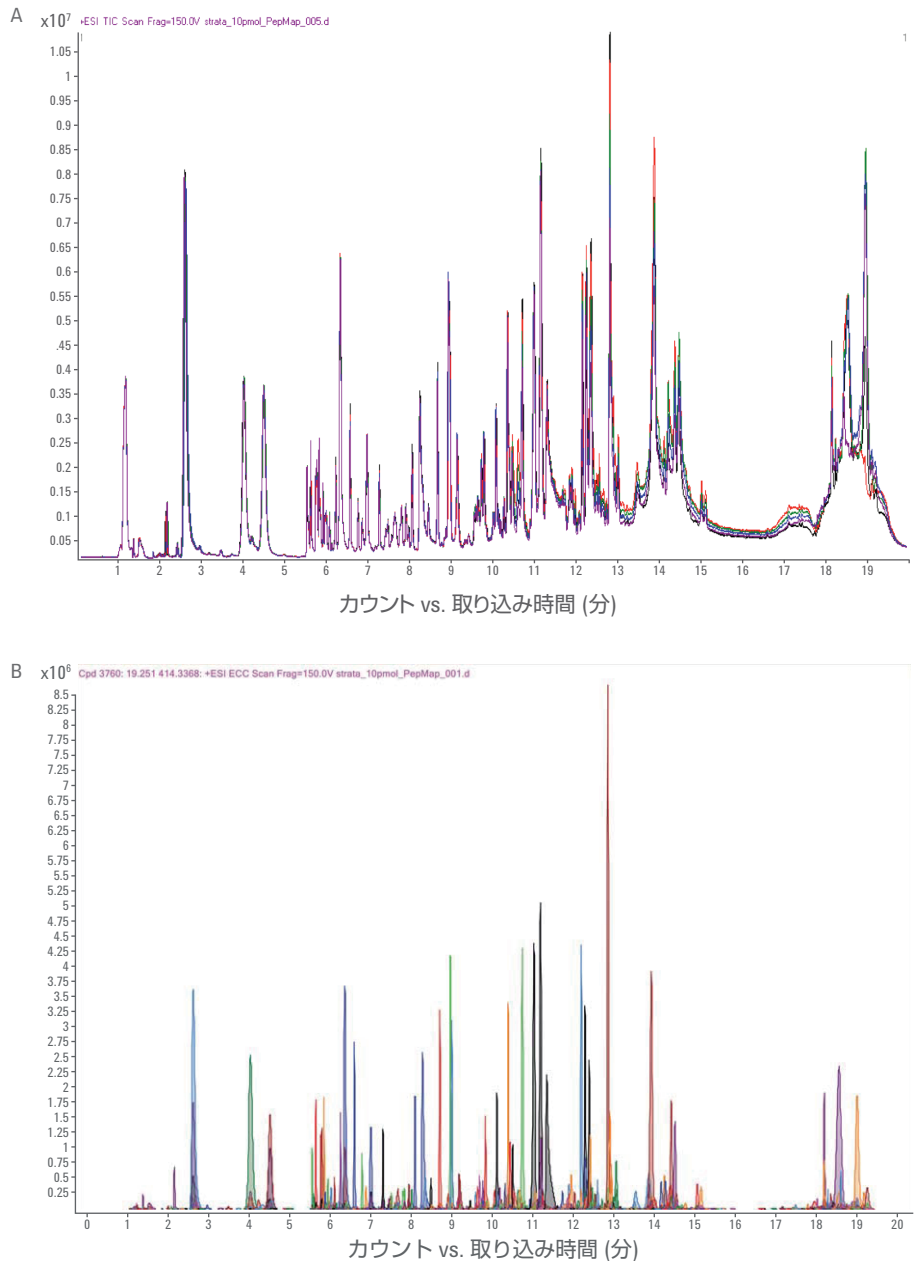


図 1. (A) Poroshell 120 逆相カラムを用いて分離した、モノクローナル抗体のトリプシンペプチド消化物のトータルイオンクロマトグラム (TIC)。ESI イオン源搭載 Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS でデータを採取。(B) mAb から得られたペプチドの抽出イオンクロマトグラム (EIC)。配列占有率は 100 %

マップ上でのペプチド同定が確認されたら、HPLC 分離パターンそのものをフィンガープリントとして、UV 検出によりタンパク質の同定を行うことができます (図 2)。その後、この高速メソッドを、工程モニタリングや QA/QC に使用できます。ただし、UV ベースのメソッドの場合、混合物中に存在するすべてのペプチドピークを分離するためには、分離効率をできる限り高くすることがきわめて重要です。

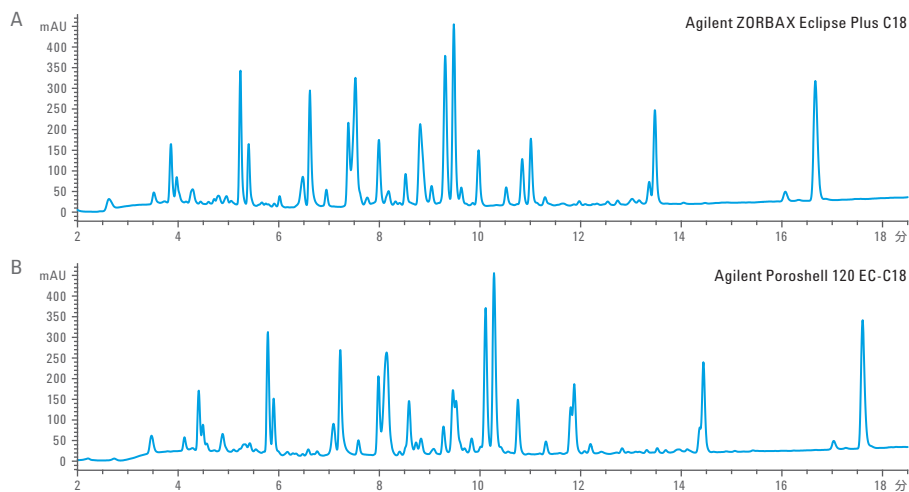


図 2. Agilent 1260 バイオイナート LC システムおよびカラムを用いた 26-kDa 組み換えタンパク質消化物の HPLC/UV ペプチドマップ。(A) Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm x 100 mm, 1.8 μ m (B) Agilent Poroshell 120 EC C18 3.0 mm x 150 mm, 2.7 μ m、対応するグラジエントで流速 0.6 mL/min を使用

最近では、ペプチド分析にキャピラリー電気泳動 (CE) が用いられるようになっていきます。CE は HPLC とは分離メカニズムが異なるため、優れた補完的ツールとなります。キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は、ペプチド分析でもっとも一般的に用いられている CE モードです。CE の利点としては、分析スピード、最小限のサンプル消費量、有機廃液が非常に少ないこと、汎用性が高いことなどがあります。CE の汎用性の高さは、分離モードの変更が容易で、バッファ組成を変えるだけで選択性を変えることが可能であるところです。CE ペプチドマッピングは、LC/UV および LC/MS ペプチドマッピングと置き換えられる手法とはみなされていませんが、補足的なデータや確認のためのデータの採取に活用できます。

ペプチドマッピング技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
RP-LC/UV	HPLC システム、グラジエント条件における C18 逆相 HPLC カラムを用いた疎水性にもとづく分離、UV 検出 (ペプチド断片が大きなタンパク質の分析には、300 Å などの大きいポアサイズを使用)	出力データは一般に「フィンガープリント」と呼ばれ、QA/QC 全体でのモニタリングに使用可能 堅牢で信頼性が高く、機器コストが低い	ペプチドの質量情報が得られない、配列情報またはペプチド配列占有率の決定が不可能 大多数のペプチドの分離には、長い HPLC カラムと、時間をかけたグラジエント分析が必要
RP-LC/MS	HPLC システム、グラジエント条件における C18 逆相 HPLC カラムを用いた疎水性にもとづく分離、MS 検出 (ペプチド断片が大きなタンパク質の分析には、300 Å などの大きいポアサイズを使用)	ペプチドの質量情報が得られ、タンパク質配列と関連付けることが可能 タンパク質の配列および構造の確認が可能、グリコシル化や脱アミドなどの翻訳後修飾の位置同定が可能 MS 検出により、短いカラムとグラジエントの使用が可能になり、分離の必要性が減少	QA/QC では一般的に使用されない、LC/MS の使用とデータ解析の専門知識をもつユーザーが必要
CE (CZE)/DAD または CE(CZE)/MS	キャピラリー電気泳動システムを CZE モードで使用 (標識なし)、キャピラリー、バッファ、ペプチドの電荷とサイズにもとづく分離、ダイオードアレイ検出 (DAD) または MS による検出	LC/UV や LC/MS に対して直交的なテクニックで、異なる選択性と分離能が得られる CE/MS では、配列確認やペプチド配列占有率決定のためのペプチドの質量情報も得られる	分離の再現性に問題が生じる可能性 CE と質量分析の連結は可能だが、LC/MS と同じ感度は得られない

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-4712EN	Rapid Peptide Mapping Method with High Resolution Using a Sub 2 µm Column
5990-4587EN	Peptide Mapping of a Monoclonal Antibody using a Microfluidic-based HPLC-Chip coupled to an Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS
5990-5096JAJP	Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを用いたペプチドおよびタンパク質特性解析の効率化と精度の向上
5990-6313EN	Increased peak capacity for peptide analysis with the Agilent 1290 Infinity LC System
5990-6192JAJP	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを用いたペプチドマッピング、SEC、IEX による治療用タンパク質の物理化学的分析
5990-4031JAJP	Agilent 1290 Infinity LC システムを用いたトリプシン消化分析
5990-7631EN	An orthogonal view of peptide mapping – analysis of bovine serum albumin digest using CE and quadrupole time-of-flight mass spectrometry
5990-8244EN	Analyze MAb and BSA digests by UHPLC with UV detection and Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18

生成および精製プロセスにおいては、タンパク質の電荷多様性が変化することがあります。こうした変化は、製剤の安定性や活性にも影響を与える可能性があり、免疫学的な有害反応を引き起こすおそれがあります。そのため、タンパク質製剤中の荷電アイソフォームの分析は、開発および製造プロセスの重要な要素です。通常、荷電バリエーション分析には、等電点電気泳動またはイオン交換クロマトグラフィーが用いられます。

等電点電気泳動 (IEF) は、等電点 (pI) をもとにタンパク質を分離するもので、組み換えタンパク質の荷電アイソフォームのプロファイリングに広く用いられています。キャピラリー電気泳動システムを用いた IEF (cIEF) では、従来のスラブゲル IEF よりも優れた分離能、スピード、定量性、自動化が得られます (図 1)。

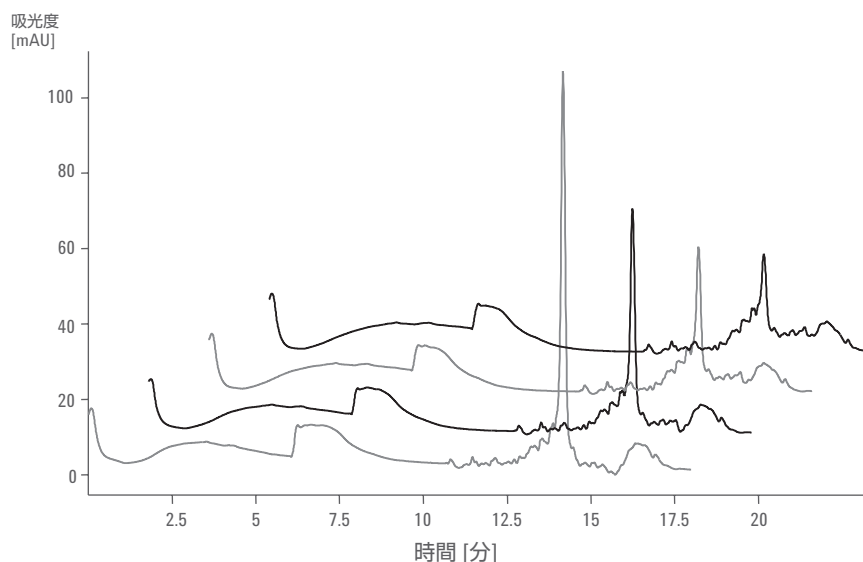


図 1. Agilent 7100 キャピラリー電気泳動システムを用いた、500、250、125、62.5 mg/L の炭酸脱水素酵素 IIa の cIEF 分離。広い濃度にわたって、ピーク面積の直線性が得られています

溶液中でのオフゲル等電点電気泳動メソッドも、固定 pH グラジエントを用いたタンパク質混合物の分画に用いられます。ゲルベースのテクニックとは異なり、溶液中でサンプルを簡単に回収し、サイズ分析や LC/MS などのダウンストリームアプリケーションに接続することができます。アジレントの OFFGEL システムを使えば、0.1 pH 単位までの分離能で、ペプチドや変性タンパク質、天然タンパク質を等電点 (pI) により分画することができます。このテクニックは、液相でフラクションの 80 % のタンパク質が回収でき、ゲルベースの分画に比べて良好な回収率が得られます。

イオン交換クロマトグラフィーは、同じ等電点をもつタンパク質を良好に分離できるため、タンパク質の荷電バリエーションの分析にはきわめて有効です。また、タンパク質の表面電荷分布の違いを検出できるという、等電点電気泳動にはない利点もあり

ます。分離には通常、水性バッファシステムと塩グラジエントが用いられますが、pHグラジエントも使用でき、クロマト分画と呼ばれるテクニックでは、pHグラジエントと塩グラジエントが組み合わせられることもあります。

アイソフォーム分析は mAb の製造において特に重要で、製造および精製後に存在する酸性および塩基性荷電アイソフォームの測定には、分析的弱カチオン交換クロマトグラフィーがしばしば用いられます。一般に、荷電アイソフォーム分析では、メインピークの左側にある酸性型の面積パーセントと、メインピークの右側にある塩基性型の面積パーセントで算出されます (図 2)。これらのアイソフォームは、一般には脱アミドおよびグリコシル化の生成物です。多くの場合、そうした分離の各ピークは、回収ののちに質量分析計で分析され、確認されます。溶出プロフィールを標準操作手順 (SOP) に導入した場合、製造プロセス全体にわたって、ピーク総数、リテンションタイム、酸性および塩基性アイソフォームのパーセンテージをモニタリングします。モノクローナル抗体や他の組み換えタンパク質は、金属表面との相互作用の影響を受けやすい傾向があります。アジレントは、完全にメタルフリーな流路を備えた 1260 Infinity バイオイナート LC システムを開発しました。このシステムなら、そうした相互作用の可能性や表面安定化処理の必要性を排除できます。このシステムでは、メタルクラッド PEEK (内部) キャピラリーが使われており、60 MPa および高塩濃度や高 pH での動作が可能です。有機溶媒での逆相メソッドにも対応できます。

カラム : Agilent Bio MAb, NP10 4.6x250 mm
移動相 : A, 10 mM リン酸, pH 7.5
 B, A + 0.1M NaCl
グラジエント : A) 30 分で 15~75 %B
 B) 30 分で 15~65 %B
 C) 30 分で 15~55 %B
 D) 30 分で 15~47.5 %B
 E) 30 分で 15~40 %B
流速 : 0.8 mL/min
サンプル : モノクローナル抗体
注入量 : 10 μ L (1.5 mg/mL)
温度 : 25 $^{\circ}$ C
検出 : UV 214 nm

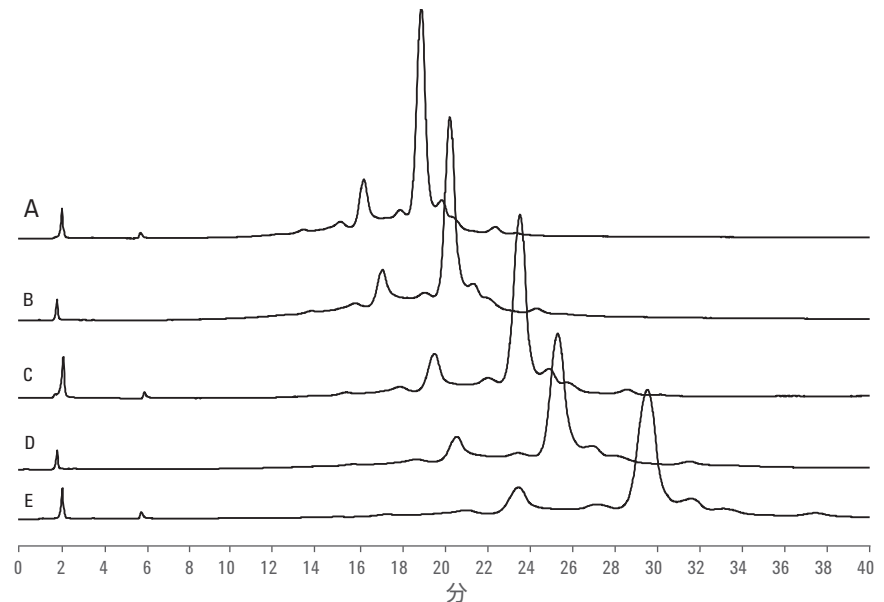


図 2. Agilent Bio mAb NP10 カラムを用いた、モノクローナル抗体製剤の電荷アイソフォームの弱イオン交換クロマトグラフィー分析

荷電アイソフォーム分析技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
ゲル等電点電気泳動 (IEF)	pH グラジエントにより共重合化したアクリルアミドゲルマトリックス、試薬、荷電状態にもとづくタンパク質がゲル中の pH グラジエントを移動	荷電状態と pI にもとづくタンパク質の視覚的な分離および同定が可能 ゲルのカットアウトによりサンプルを回収し、さらなる分析が可能	精製タンパク質の荷電アイソフォームの分離能が低く、タンパク質混合物のほうが良い結果が得られる 非定量的
キャピラリー等電点電気泳動 (cIEF)	キャピラリー電気泳動システムを IEF モードで使用、タンパク質サンプルを両性電解質と混合、混合物をキャピラリーに導入して電気泳動で分離 (電圧をかけ、タンパク質またはタンパク質アイソフォームが各 pI へ移動したのち、UV または LIF で検出)	組み換えタンパク質の荷電アイソフォームの高分離能分離が可能 イオン交換クロマトグラフィーよりも分離スピードが速い	さらなる分析のために、分離したタンパク質を分画および回収する機能に制限がある 質量分析に対応せず イオン交換クロマトグラフィーのよ うな選択性のオプションがない
全カラムキャピラリー等電点電気泳動 (iCE)	等電点電気泳動システムでタンパク質サンプルを両性電解質と混合、混合物をキャピラリーに導入して電気泳動で分離 (電圧をかけ、タンパク質が各 pI へ移動)、UV 光を全カラムに適用してデジタルカメラでタンパク質の移動を記録、UV 検出器への移動ステップなし	分離能は従来のゲル IEF と同程度だが、カラムベースの分離技術という利点がある 自動サンプル導入、UV 検出器への移動ステップが不要なので分析時間が短縮 定量的な分析結果	蛍光標識タンパク質の分離および分析に必要な蛍光検出器 (LIF) に対応せず 質量分析に対応せず
オフゲル電気泳動	タンパク質またはペプチドの pI ベース分画用のインゲルまたはオフゲルモードの電気泳動システム、移動したタンパク質の 80% が液相に回収される	pH バッファ条件のスクリーニングに使用可能、cIEF およびイオン交換メソッドの開発に対応 一般には、質量分析に先立つ複雑なタンパク質混合物 (血漿、細胞溶解物など) の分画に使用	タンパク質および混合物の分画 検出が不可能、分画のオフラインツールとしてのみ使用可能
IEX-LC/UV	HPLC システムとイオン交換カラム (強または弱カチオンまたはアニオン交換充填剤)、タンパク質の総正味電荷にもとづくカラム粒子との相互作用、塩または pH の上昇グラジエント条件、または両者を組み合わせた条件で溶出	タンパク質荷電アイソフォームのクロマトグラフィー分離が可能、幅広いカチオンおよびアニオン交換樹脂により多くの選択性オプションを提供 分離した荷電アイソフォームを分画および回収し、さらなる分析が可能 (脱塩、バッファ交換後の MS 分析が可能)	一般にグラジエントが長く、バッファ消費量が多い cIEF より分離能が低い 質量分析に対応せず

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-6192JAJP	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを用いたペプチドマッピング、SEC、IEX による治療用タンパク質の物理化学的分析
5989-9852EN	Capillary isoelectric focusing on the Agilent Capillary Electrophoresis system
5990-6521EN	Monitoring antibody charge variants using a combination of Agilent 3100 OFFGEL Fractionation by isoelectric point and high sensitivity protein detection with the Agilent 2100 Bioanalyzer

タンパク質製剤における凝集体の量、種類、サイズは、製剤の安定性と効能に重要な影響を与えます。タンパク質凝集体の形成には、疎水性領域間での非共有相互作用やジスルフィド結合形成など、いくつかのメカニズムが関係しています。凝集体は免疫原性反応を引き起こしたり (小型の凝集体)、投与の際の有害事象の原因になったり (粒子) することがあるため、タンパク質製剤では、どのような種類であれ、凝集体の存在は望ましいものではありません。タンパク質製剤において、特に長期保管や出荷の際に大きな問題となるのは、不可逆凝集です。凝集体分析に用いられる手法としては、超遠心分離法、光散乱検出を用いたサイズ排除クロマトグラフィー、native PAGE などがあります。

ほぼ中性の pH で行われる native PAGE を用いれば、タンパク質の構造や自己会合、凝集を調べることができます。SDS-PAGE を使えば凝集体を分離できますが、このテクニックはきわめて時間がかかり、分子量の近い凝集体や不純物を高分離能で分離することができません。Agilent 2100 バイオアナライザと高感度プロテイン 250 アッセイを使えば、非グリコシル化インタクト mAb や遊離軽鎖および重鎖などのインタクトタンパク質、凝集体、低分子量不純物の高速分離が可能です。このアッセイでは、再現性の高い結果が得られ (%CV <6 %)、開発や製造段階での品質管理に容易に導入できます (図 1)。

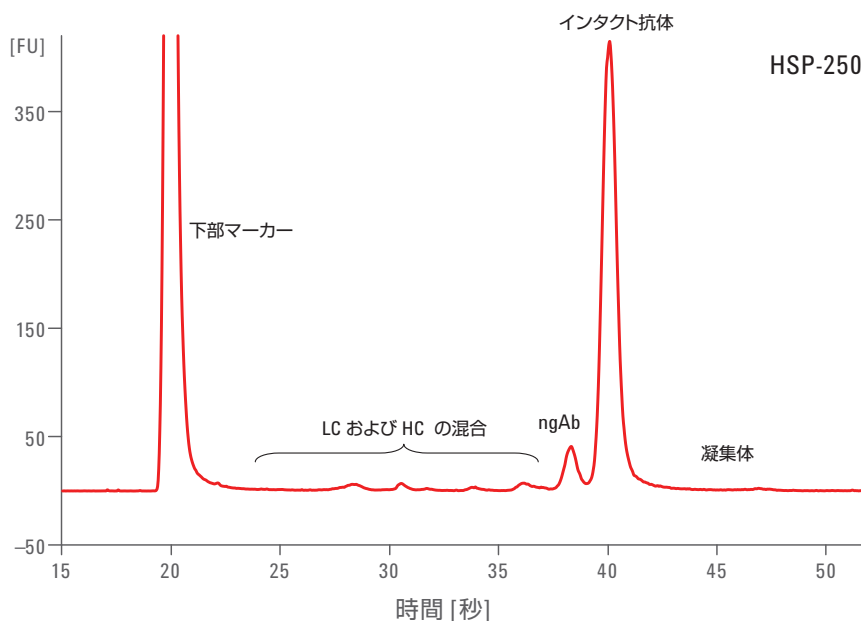


図 1. 非還元条件における IgG2 製剤の分析。Agilent 2100 バイオアナライザと高感度プロテイン 250 アッセイによりエレクトロフェログラムを作成。

略記: LC: Light Chain, HC: Heavy Chain, ngAb: 非グリコシル化抗体

非対称フィールドフローフラクショネーション (AF4) はマトリックスフリーのテクニックで、mAb 凝集体の分離において広いダイナミックレンジが得られる分析メソッドです。単量体および二量体のピークが良好に分離され、分離もきわめて高速です。未処理の細胞培養サンプルを FFF メンブレンに直接注入することができるので、凝集体の測定にわずか 10 分しかかかりません。AF4 の利点は、幅広いサイズの可溶性成分とコロイド成分の両方を分離できることです。

凝集体や均質性の測定、タンパク質構造の変化の測定、複数の合成タンパク質バリエーションの比較においては、沈降速度が特に重要となります。光散乱検出器のシグナルは、タンパク質の分子量と濃度の積に直接比例するため、多くの場合、サイズ排除クロマトグラフィーと光散乱基の組み合わせが、カラムから溶出した各ピークの分子量測定に用いられます。

高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) では、生物学的化合物の成分のサイズを正確に分析でき、使いやすさと高レベルの自動化という利点も得られます。UV または光散乱検出を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、タンパク質凝集体の検出および定量にもっとも広く用いられているテクニックで、QC/QA メソッドとしても一般的です。SEC 分離では、大きな凝集体が最初に溶出し、次いでタンパク質二量体、単量体、一部のケースではクリップと呼ばれる低分子量の形態 (小型の分解生成物) が溶出します。こうした分離の直線レスポンス範囲は、ほぼ 3 桁にわたります。分離能も優れており、凝集体と分解生成物を確実に検出できます。分離には通常、5 ミクロン (μm) 粒子のサイズ排除カラムが用いられます。ただし、より小さい粒子を使えば、分離能を高め、分離スピードを上げることができます。3- μm 粒子のカラムを使えば、モノクローナル抗体製剤中に存在する二量体と活性単量体の分離能を大幅に高め、汚染の割合を正確に推定することができます (図 2)。小さい粒子を使えば、分離能や効率を大きく損なわずに、5- μm 粒子カラムを用いた従来の分離 (0.5 mL/min) よりも高い流速 (1.0 mL/min) を用いることができます。

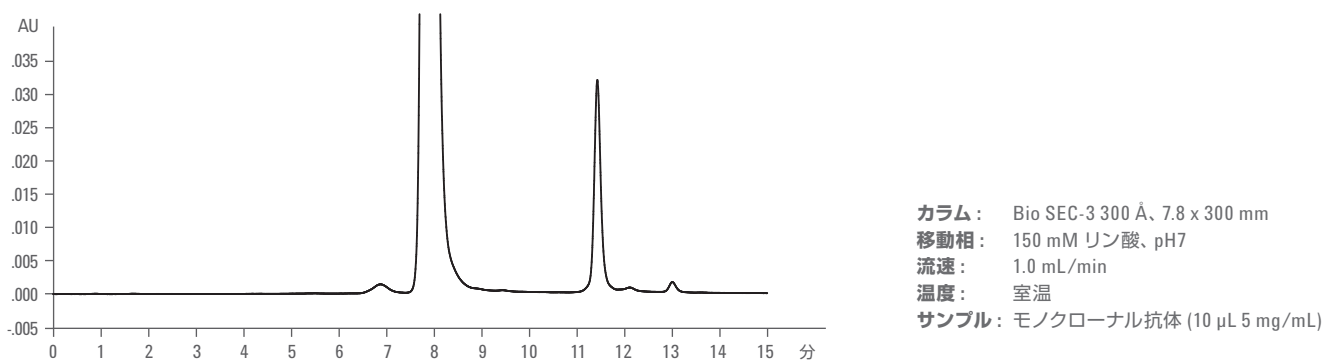


図 2. 3- μm 粒子の Agilent Bio SEC-3 300-Å カラムを用いたモノクローナル抗体製剤のサイズ排除クロマトグラフィー。単量体 (最初のピーク)、二量体 (2 番目)、バッファ関連ピーク (3 番目) を示しています

凝集分析技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
SDS-PAGE	電気泳動チャンバー、アクリリアミドゲル、バッファおよび試薬、クマシーブルーまたは銀染色 (サイズをもとにタンパク質を分離、小さいタンパク質または単量体は二量体および凝集体より先に移動)	視覚的な分析結果、ゲル内でタンパク質の移動を確認可能 タンパク質バンドを抽出し、さらなる分析が可能	定性的な分析結果 低い分離能、同じサイズの不純物が一緒に移動 低いスループット、きわめて長い分離時間
チップベース (バイオアナライザ) のタンパク質電気泳動アッセイ	2100 バイオアナライザシステム、高感度プロテイン 250 キット (チップ、蛍光標識バッファ、必要なすべての試薬を含む)、蛍光検出と組み合わせた電気泳動分離	定量的な分析結果 高分離能分離 単量体、二量体、および大きな凝集体とともに低分子量の不純物を分離可能 SDS-PAGE よりも分析時間が短い	現時点で、リアルタイムのリアクター分析が可能なオンライン接続方法なし さらなる分析のためのサンプル採取
SEC-LC/UV	HPLC システム、サイズ排除 HPLC カラム、タンパク質の分子半径および多孔性充填粒子を通過するスピードにもとづく分離、UV 検出	定量的な分析結果 二量体と凝集体の高分離能分離 SDS-PAGE よりも分析時間が短い 簡単なメソッド、凝集体の比率をモニタリングする QA/QC で一般的に使用 フラクション採取によるさらなる分析が可能	分離範囲の制約、高分子量の凝集体と低分子量の不純物を 1 回で分離するのが困難 質量情報が得られない
SEC-LC/光散乱	HPLC システム、サイズ排除 HPLC カラム、タンパク質の分子半径および多孔性充填粒子を通過するスピードにもとづく分離、UV およびタンデム光散乱検出、光散乱により相対的質量情報が得られる	定量的な分析結果 二量体と凝集体の高分離能分離 SDS-PAGE よりも分析時間が短い 簡単なメソッド、凝集体の比率をモニタリングする QA/QC で一般的に使用 フラクション採取によるさらなる分析が可能 光散乱の追加により、相対的質量情報が得られ、カラム粒子の脱落を同定可能	分離範囲の制約、高分子量の凝集体と低分子量の不純物を 1 回で分離するのが困難

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-5283EN	Protein analysis with the Agilent 2100 Bioanalyzer – An overview of the protein kit portfolio
5990-6416EN	Characterization of monoclonal antibodies on the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC by Size Exclusion Chromatography using the Agilent BioSEC columns
SI-02395	Static Light Scattering Analysis of Globular Proteins with ProSEC 300S Columns

酵素が酸化されることにより、酵素の活性が抑制されることが知られています。同様に、組み換えタンパク質の酸化も、機能の喪失につながる場合があります。したがって、タンパク質製剤の開発と製造において、酸化は深刻な問題につながります。なぜなら、酸化により製剤の生物学的活性や半減期、免疫原性が変わる可能性があるためです。治療用タンパク質を構成するアミノ酸は、製造や保管の際に酸化されやすいため、そうした酸化を継続的にモニタリングする必要があります。タンパク質中の一部のメチオニン残基は、酸化によりメチオニンスルホキシドに、場合によってはメチオニンスルホンに変化することがあります。メチオニンの酸化は、活性の低下、凝集、免疫原性の上昇につながります。また、アスパラギンの脱アミド化によりアスパラギン酸とイソアスパラギン酸が生成される反応もタンパク質が分解する原因の1つであり、特に長期保管の際に生じます。グルタミンも脱アミド化することがありますが、この反応速度はアスパラギンの100分の1程度で、組み換えタンパク質ではめったに検出されません。その他にも、トリプトファンとシステインも酸化される可能性があります。

メチオニンの酸化は、ペプチド断片の質量分析またはUVにより検出できます。酸化されたメチオニンを含むインタクトタンパク質も、イオン交換または疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を用いて、酸化されていないタンパク質と分離することができます。HICでは、塩が高濃度から低濃度へシフトする逆塩濃度グラジエントが用いられます。脱アミド化されやすいアスパラギンは、組み換えタンパク質のペプチドマッピングにより同定できます。

タンパク質製剤の酸化感受性を測定する方法として、強制酸化試験法があります。この試験法では、タンパク質を緩やかな酸化剤(通常は過酸化水素かt-ブチルヒドロペルオキシド(t-BHP))に曝露し、酸化されやすい部位や、タンパク質製剤の活性における酸化の影響を調べます。ある強制酸化試験では、逆相モードのAgilent HPLC-ChipとAccurate-Mass Q-TOF LC/MSを用いて、過酸化水素で酸化させたモノクローナル抗体の分析が行われています。この分析では、BioConfirmソフトウェアを用いて、mAbの質量の変化を解析しています(図1)。その後、トリプシン消化により生成されたペプチド断片をMSおよびMS/MSモードで分析し、酸化修飾部位を特定しました(図2および3)。さらに重要なのは、酸化感受性の程度と速度の測定です。この点では、LC/MSが貴重なツールとなります。Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MSの優れたクロマトグラフィー分離能と精密なペプチド質量測定を活用すれば、mAb配列における酸化ペプチドのピークを正確に同定することができます。MS/MS分析を行うことにより、ペプチドにおける酸化修飾の正確な位置をマッピングすることができるため、ペプチド配列の同定の信頼性が高まります。

図 1. 全インタクト抗体のデコンボリューションスペクトル (挿入図はインタクト抗体の質量スペクトル)。(A) 酸化修飾された mAb、(B) 修飾されていない mAb

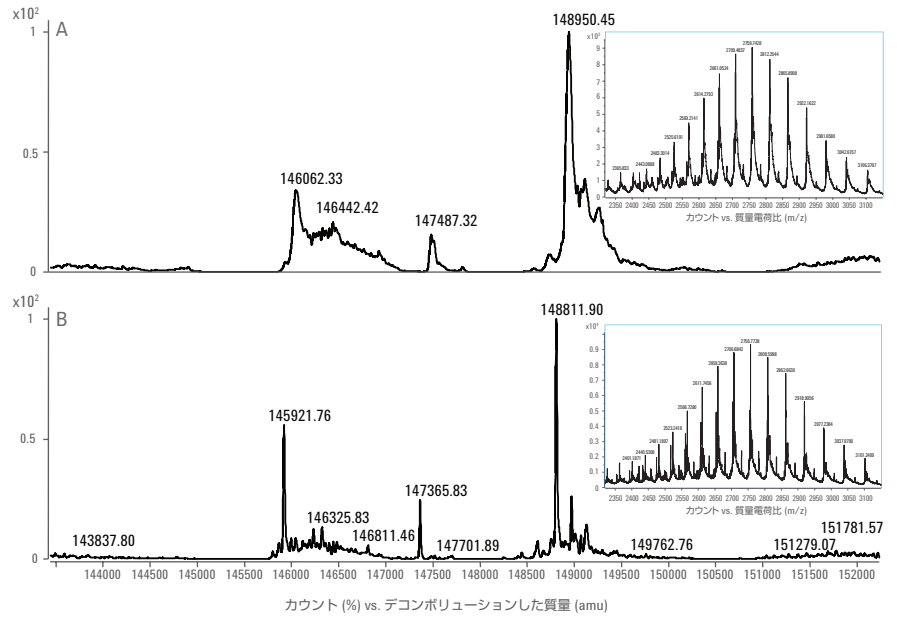


図 2. (A) C18 HPLC-Chip チップを用いて得られた、 H_2O_2 による酸化修飾後のトリプシン消化 mAb のトータルイオンクロマトグラム (TIC)。各スペクトル内の矢印は、(B) 修飾されていないペプチド、(C) 修飾されたペプチドを示しています

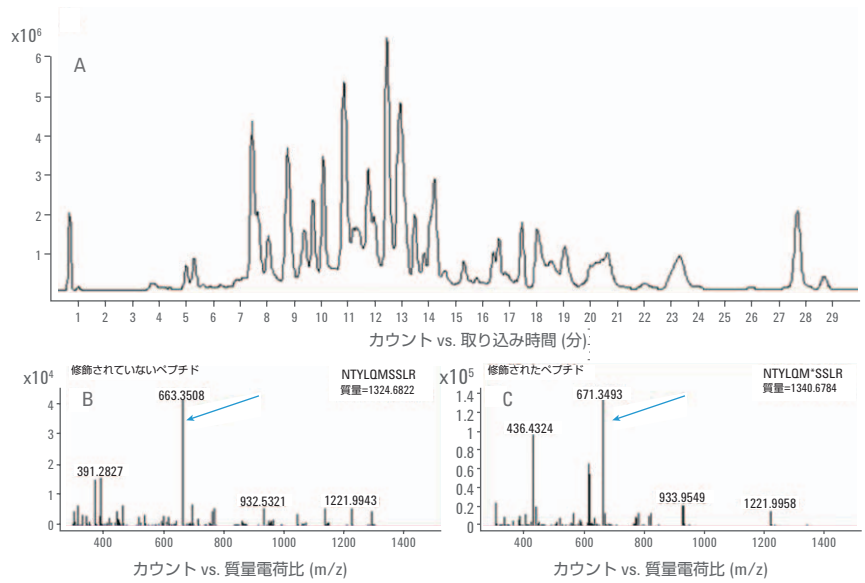
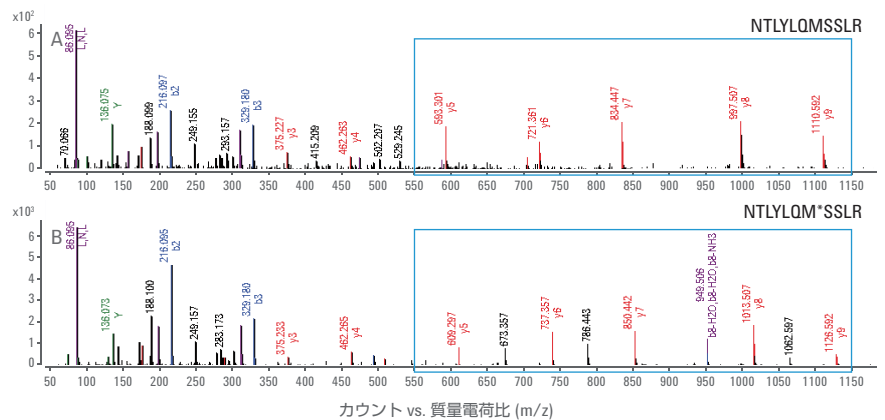


図 3. (A) 修飾されていないペプチド、(B) 修飾されたペプチドの代表的な MS/MS スペクトル。BioConfirm ソフトウェアパッケージの機能を用いて同定を行いました。青い枠内では、修飾されていないペプチドと酸化メチオニンを含む修飾ペプチドとの間で、 $y_5 \sim y_9$ イオンで約 16Da の差があることを示しています



酸化分析技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
HIC-LC/UV	HPLC システムと疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) カラム、塩濃度減少グラジエントにおける疎水性にもとづいた酸化タンパク質と非酸化タンパク質の分離、UV 検出	酸化タンパク質と非酸化タンパク質の比率情報が得られる 酸化モニタリングに対応できる 高速でシンプルな QA/QC メソッド	質量確認が不可能で、酸化部位情報が得られない HIC-LC/UV よりはメソッドが複雑
インタクト LC/MS	HPLC システムと逆相 (RP) カラム、有機濃度上昇グラジエントにおける疎水性にもとづいた酸化タンパク質と非酸化タンパク質の分離、MS 検出	酸化タンパク質の正確な質量同定が可能 QA/QC においてタンパク質同定や確認に一般的に用いられる	酸化部位の情報が得られない、部位情報を得るには酵素消化が必要 HIC-LC/UV よりはメソッドが複雑
酵素消化 + LC/MS	タンパク質の酵素消化 (一般にはトリプシンを使用) によりペプチド断片を生成、HPLC システムと逆相 (RP) カラム、有機濃度上昇グラジエントにおける疎水性にもとづいたペプチドの分離、酸化ペプチドの MS 検出	インタクト LC/MS 分析との組み合わせることにより酸化タンパク質の同定が可能、消化後は酸化部位の同定が可能、MS/MS での確認が可能 QA/QC において酸化タンパク質の同定や確認に一般的に用いられる	メソッドが複雑で時間がかかるため、QA/QC では一般的でない

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-8768EN	Identification of Oxidation Sites on a Monoclonal Antibody Using an Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS System Coupled to an Accurate-Mass 6520 Q-TOF LC/MS
5990-8769EN	Quantitation of Oxidation Sites on a Monoclonal Antibody Using an Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS System Coupled to an Accurate-Mass 6520 Q-TOF LC/MS

タンパク質やペプチドは、それぞれ固有のアミノ酸配列とアミノ酸組成をもっています。そのため、タンパク質やペプチドのアミノ酸組成の測定は、同定試験として用いることができます。アミノ酸分析は、創薬から製造までの全過程で、バッチ間の比較可能性や一貫性を実証するために用いられます。また、タンパク質断片化のためのプロテアーゼの選択を支援するためにも用いられます。アミノ酸分析は、タンパク質量の正確な測定にも役立ちます。

アミノ酸分析は4つの基本ステップで構成されます。まず、酸加水分解により、タンパク質を各構成アミノ酸に分解します。その後、検出可能なUV吸光または蛍光マーカーでアミノ酸を標識し、誘導体化したアミノ酸をクロマトグラフィーにより分離します。最後に、検出可能なマーカーの強度にもとづき、各アミノ酸の相対量を測定します。

理想的な定量的アミノ酸分析は、スピードと感度に加えて、誘導体化反応と分析テクニックの信頼性を兼ね備えている必要があります。こうした目標は、一級アミノ酸の場合は *o*-フタルアルデヒド (OPA)、二級アミノ酸の場合はクロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC) を用いた、自動化されたオンライン誘導体化により達成できます。その後、自動誘導体化手順を堅牢な HPLC 分析に統合します。Agilent 1260 Infinity または 1290 Infinity LC システムと Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使えば、手順全体で優れたスピード、精度、感度、再現性が得られます。

OPA および FMOC 誘導体化法を組み合わせれば、クロマトグラフィー分析に対応できるアミノ酸 (AA) のプレカラム誘導体化が実現します。最初に、一級アミノ酸が 3-メルカプトプロピオン酸 (3-MPA) により OPA と反応します。二級アミノ酸は OPA とは反応しませんが、その後、FMOC により誘導体化されます。この誘導体化プロセスは高速で、Agilent オートサンプラを使えば簡単に自動化できます。手順の自動化により、高度な再現性が得られます。50-mm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、1.8- μ m カラムを用いた場合の注入から次回注入までの総分析時間は、わずか 14 分(分析時間は 10 分)です (図 1)。このメソッドでは、最初に溶出する 2 つのアミノ酸 (アスパラギン酸とグルタミン酸) で高い保持力が得られるほか、使用するカラムの構成に応じて、近接して溶出する複数のアミノ酸で優れた分離能が得られます。

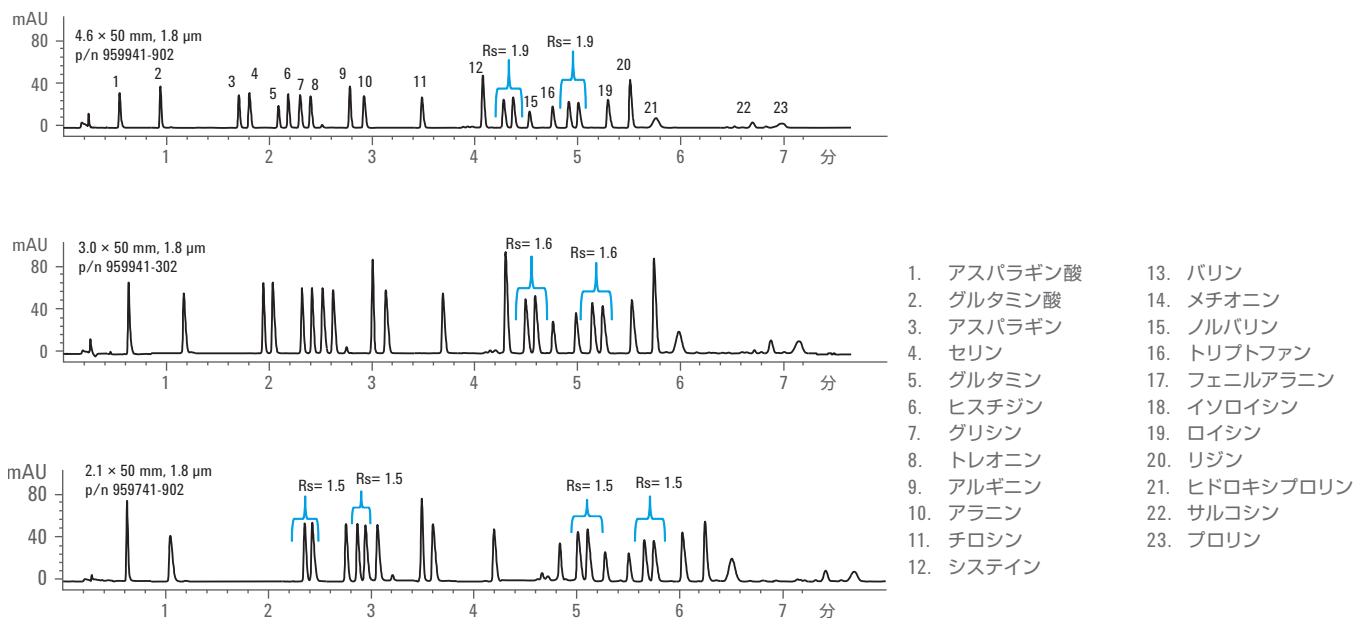


図 1. 50-mm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、1.8- μ m カラムを用いたアミノ酸分析

アミノ酸分析技術のまとめ

技術	技術の説明	利点	制約
OPA 誘導体化 + RP-LC/UV	HPLC システムと逆相カラム、OPA/チオール反応による一級アミノ酸の誘導体化と分析、有機溶媒濃度上昇グラジエントにより分離	一級アミノ酸の分離と定量が可能 LC をバイオリアクターに接続し、リアルタイム分析が可能	リテンションタイムと濃度にもとづいたアミノ酸の質量情報の取得、同定と定量が不可能
FMOC 誘導体化 + RP-LC/UV	HPLC システムと逆相カラム、FMOC-Cl 反応による二級アミノ酸の誘導体化と分析、有機溶媒濃度上昇グラジエントにより分離	二級アミノ酸の分離と定量が可能 LC をバイオリアクターに接続し、リアルタイム分析が可能	リテンションタイムと濃度にもとづいたアミノ酸の質量情報の取得、同定と定量が不可能
誘導体化 + RP-LC/MS	HPLC システムと逆相カラム、FMOC または OPA による一級または二級アミノ酸の誘導体化と分析、有機溶媒濃度上昇グラジエントにより分離、MS 検出にはイオン化のためのバッファ条件の変更が必要	LC をバイオリアクターに接続し、リアルタイム分析が可能 MS 検出の利点が得られる、質量にもとづく一級および二級アミノ酸の確認が可能	質量分析に対応するバッファに交換した際に、LC/UV クロマトグラムが変化する可能性 MS はアミノ酸の QA/QC では一般的な手段でない

Agilent アプリケーション資料

文献番号	タイトル
5990-4547JAJP	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと Agilent HPLC による既存アミノ酸分析法の改良
5990-5977EN	Separation of two sulfurated amino acids with other seventeen amino acids by HPLC with pre-column derivatization
5990-3283EN	Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection
5989-6297EN	High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on 1.8 μ m Reversed-Phase (RP) Columns
5980-1193EN	Rapid, Accurate, Sensitive and Reproducible Analysis of Amino Acids

詳細情報

ホームページ:

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ:

0120-477-111

本書の情報は研究用途のみに対応しています。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2012

Printed in Japan August 08, 2012

5990-8561JAJP



Agilent Technologies