

画像キャピラリー等電点電気泳動(icIEF)分析のためのタンパク質可溶化剤SimpleSolの特性評価

Lekha Priya, Will McElroy, Jiaqi Wu, Diksha Gupta, Annegret Boge, Chris Heger, Jessica Dermody ProteinSimple, 3001 Orchard Parkway, San Jose, California, 95134



要旨

治療用タンパク質の電荷の不均一性の検証は、薬の開発および製造中にタンパク質の品質やその一貫性をモニタリングする品質特性の1つです。しかしながら、等電点電気泳動(IEF)中にタンパク質が凝集または沈殿し、再現性のない電荷プロファイルを生じる可能性があります。尿素は一般的にタンパク質可溶化剤として使用され、IEF分析中における凝集や沈殿を軽減しますが、サンプルを分析する直前に尿素溶液を準備し、サンプル分析に追加のステップと余分に時間をかける必要があります。尿素には、タンパク質のカルバミル化を引き起こす可能性や、見かけ上のpI値の変化を引き起こす陽極勾配ドリフト、4Mを超えた時のタンパク質変性効果などの欠点があります。これらの問題を克服するために、iCEおよびMauriceシステムではicIEF分析用にタンパク質を可溶化する代替試薬を同定しました。このポスターでは、この試薬SimpleSolがicIEFのタンパク質を効果的に可溶化でき、尿素よりもはるかに安定した薬剤であり、毎回フレッシュな尿素を調製する必要がないことを示します。SimpleSolは、尿素とは対照的にメチルセルロースと事前に混合した場合でも安定しており、Maurice icIEFの吸光度およびネイティブ蛍光検出と互換性があります。さらに、SimpleSolは、尿素と比較してicIEF中に形成されるpH勾配の酸性部分への影響が少なく、尿素の使用に比べてタンパク質ピークのpI値がより安定することも示します。溶液の安定性、pH勾配の形成、および使いやすさの利点により、SimpleSolは、分析ラボにとって日常的に使われる有用な添加剤として位置付けられ、icIEF分析で凝集と沈殿を最小限に抑えることができます。

材料と方法



材料

- Maurice cIEFカートリッジ
- Maurice cIEF Method Development Kit (SimpleSol等このポスターで使われた試薬を含みます)

サンプル

タンパク質を以下の販売会社から入手しました: IgG1 kappa (Protos Immunoresearch, PN 523)、Human recombinant EPO (R&D Systems, PN 286-EP)、Alpha-amylase (Sigma-Aldrich, PN A4551)、NISTmAb (Sigma-Aldrich, PN NIST8671)

Maurice cIEF解析の方法

IgG kappa – サンプル準備: 0.35%のmethyl cellulose、30%のSimpleSol、2.56%の8-10.5 Pharmalyte、2.05%の3-10 Pharmalyte、7.05と9.50のMaurice pI marker、0.15 mg/mLのIgG kappaを含む溶液。分離条件: 1分間1500Vに続き、10分間3000Vで分離。

ヒト組換えEPO – サンプル準備: 0.35%のmethyl cellulose、40%のSimpleSol、3%の2.5-5 Pharmalyte、1%の5-8 Pharmalyte、10 mMのiminodiacetic acid (IDA)、3.38と5.85のMaurice pI marker、0.3 mg/mLのEPOを含む溶液。分離条件: 1分間1500Vに続き、12分間3000Vで分離。

Maurice用pIマーカー混合溶液 – サンプル準備: 0.35%のmethyl cellulose、4%の3-10 Pharmalyte、10 mMのarginine、10 mMのiminodiacetic acid (IDA)、SimpleSol (14, 20, 24もしくは30%)もしくは尿素(1, 2, 3もしくは4 M)、2 ulの各Maurice pI marker (3.38, 4.05, 5.84, 6.14, 7.05, 8.40, 9.50, 9.99, 10.17)を含む溶液。分離条件: 1分間1500Vに続き、5分間3000Vで分離。

融合タンパク質医薬品 – サンプル準備: 0.35%のmethyl cellulose、1%のServalyte混合液(3:3:4比で3-5、5-8、2-9 Servalyteを含む)、50%のSimpleSol、4 mMのarginine、5.6 mMのiminodiacetic acid (IDA)、4.05と9.50のMaurice pI marker、5 mg/mLのタンパク質を含む溶液。分離条件: 1分間1500Vに続き、12分間3000Vで分離。

サンプルをボルテックスし、13,000gで3分間遠心しました。遠心後、溶液の上澄み溶液160ulを96ウェルプレートまたはサンプルバイアルに移し、遠心してMauriceIに入れました。データをCompass for iCEソフトウェアで吸光度(露光時間0.005秒)およびネイティブ蛍光(露光時間5、10、15、20秒)で分析しました。

SimpleSolは効果的な可溶化剤です

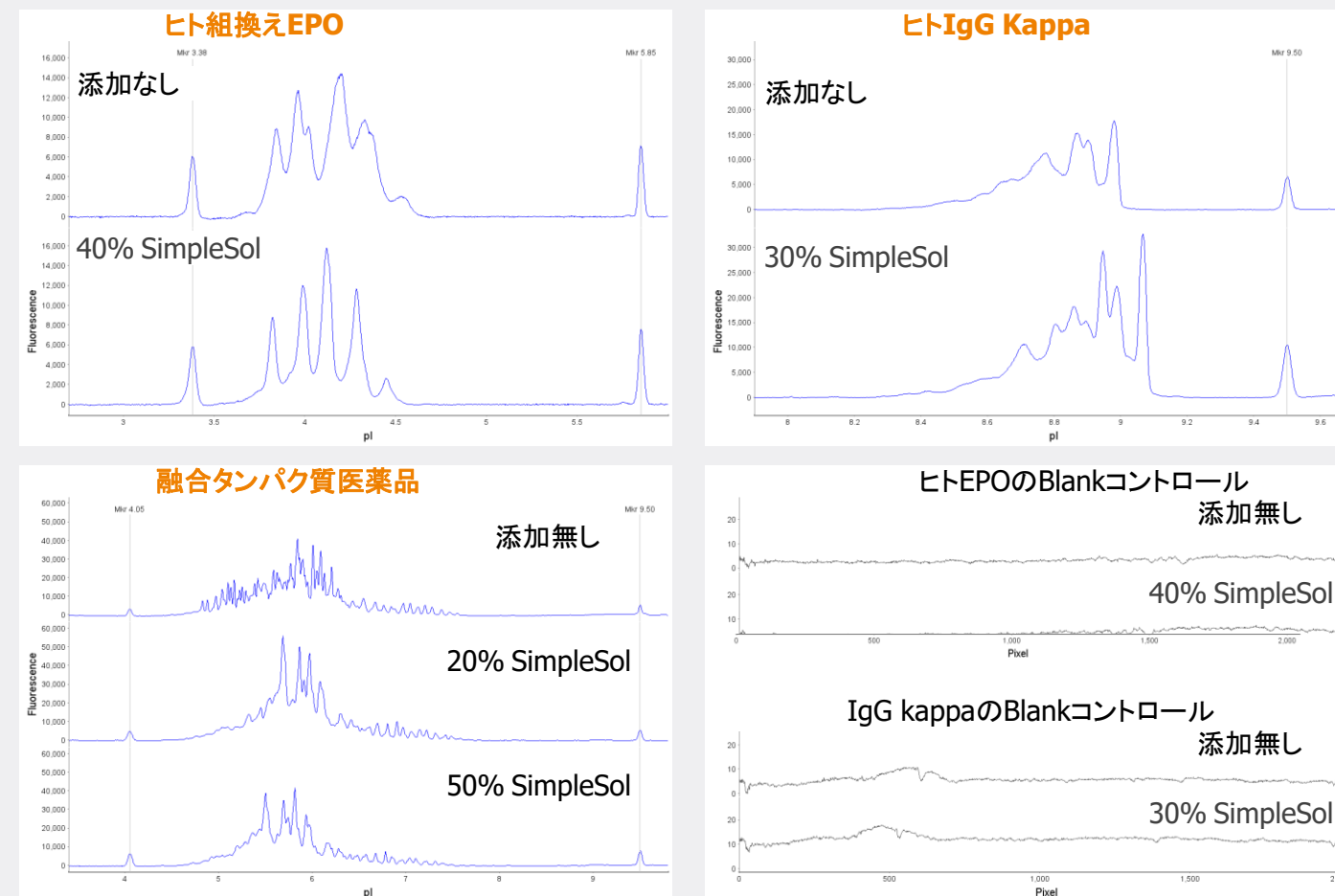


図1. SimpleSolは、icIEF分析中におけるタンパク質の凝集/沈殿を軽減します。SimpleSolの有無で業界の共同研究者から提供されたヒト組換えエリスロポエチン(EPO)、精製ヒトIgG kappaモノクローナル抗体、融合タンパク質医薬品のMaurice icIEFネイティブ蛍光トレース。EPOおよびIgG kappaと同じ条件でBlankコントロール(タンパク質なし)をインジェクションすることにより、SimpleSolがバックグラウンドに影響を及ぼさないことを示しています。

SimpleSolとEPOを使用したインジェクションでの再現性

ピークのpI	平均	標準偏差	RSD	ピークの%面積	平均	標準偏差	RSD
Peak 1	4.46	0.001	0.02%	Peak 1	5.57	0.08	1.50%
Peak 2	4.29	0.002	0.04%	Peak 2	23.79	0.14	0.58%
Peak 3	4.11	0.000	0.01%	Peak 3	30.29	0.32	1.07%
Peak 4	3.93	0.001	0.02%	Peak 4	23.73	0.34	1.43%
Peak 5	3.79	0.001	0.03%	Peak 5	13.16	0.37	2.83%

表1と2. SimpleSolを使用してサンプルを複数回インジェクションした結果、優れた再現性を示します。40%のSimpleSolでヒト組換えEPOを分離し、Maurice icIEFのネイティブ蛍光検出でピーク面積百分率の定量分析。定量では、5つのピークすべてに関して、3%未満のピーク面積百分率のRSDと0.05%未満のpI値のRSDと非常に一貫したピーク面積百分率を示しています。ピーク1は最も塩基性側のピークで、ピーク5は最も酸性側のピークです。

SimpleSolと尿素との比較

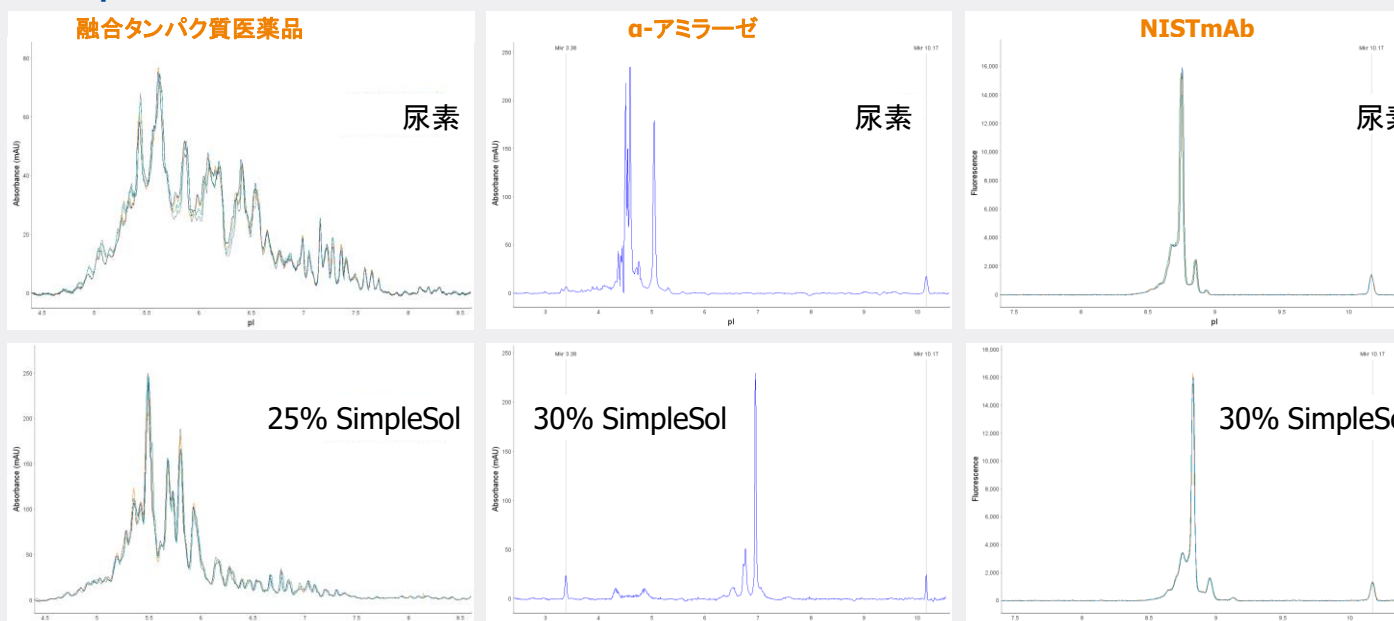


図2. 尿素でデータの品質が不十分なサンプルにSimpleSolを使用できます。可溶化剤として尿素もしくはSimpleSolを使用して各サンプルをMaurice icIEFで分析しました。4Mの尿素に比べてSimpleSolを使用すると、融合タンパク質医薬品の電荷プロファイルの再現性が改善しました(N = 4)。SimpleSolを加えると、α-アミラーゼに4Mの尿素を使用した際に見られる沈殿が劇的に減少しました。同じicIEF条件で3Mの尿素をSimpleSolに置き換えると、NIST mAbの標準物質の分解能が向上しました。

SimpleSolによるpH勾配とpIへの影響は最小限

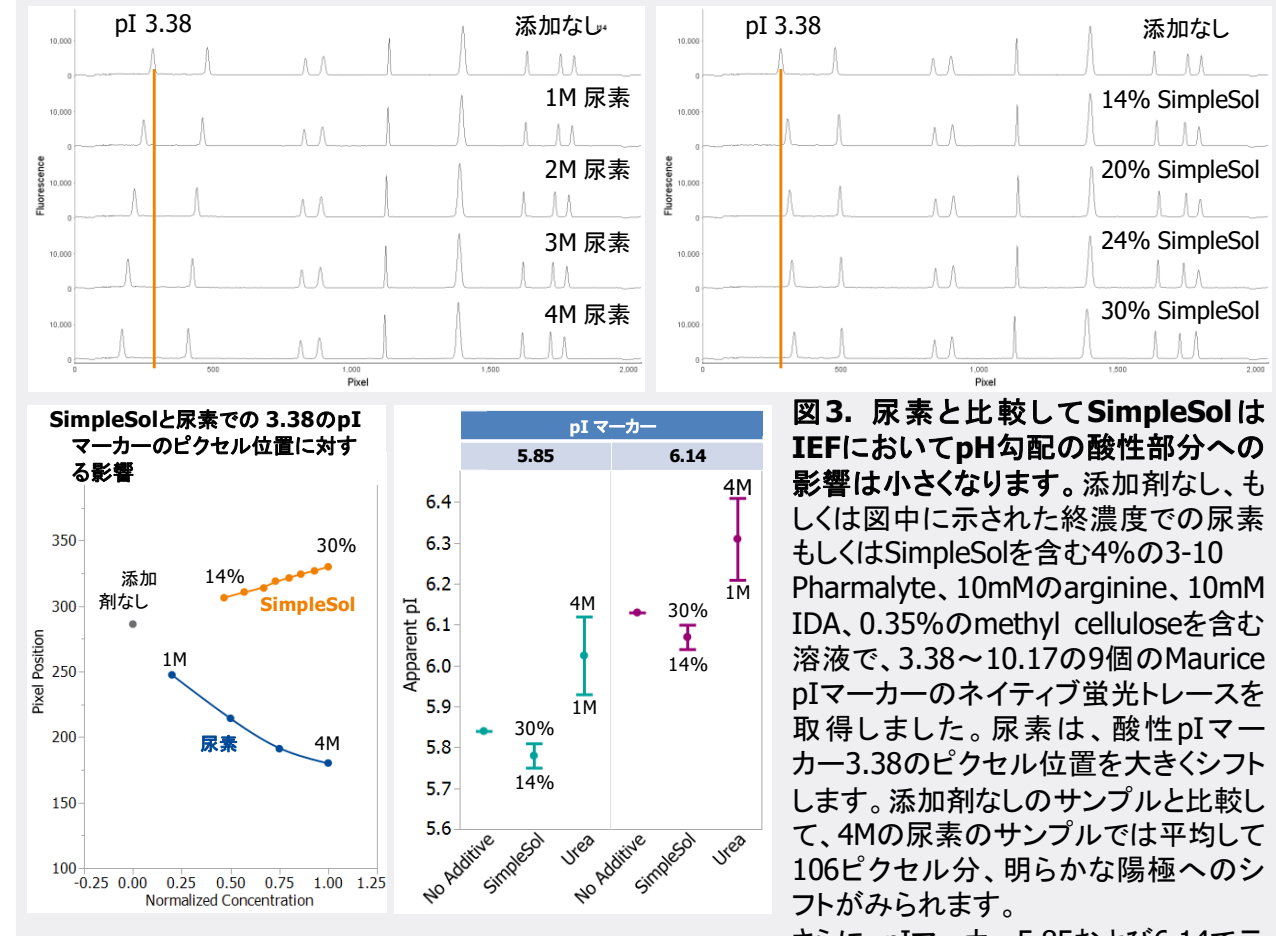
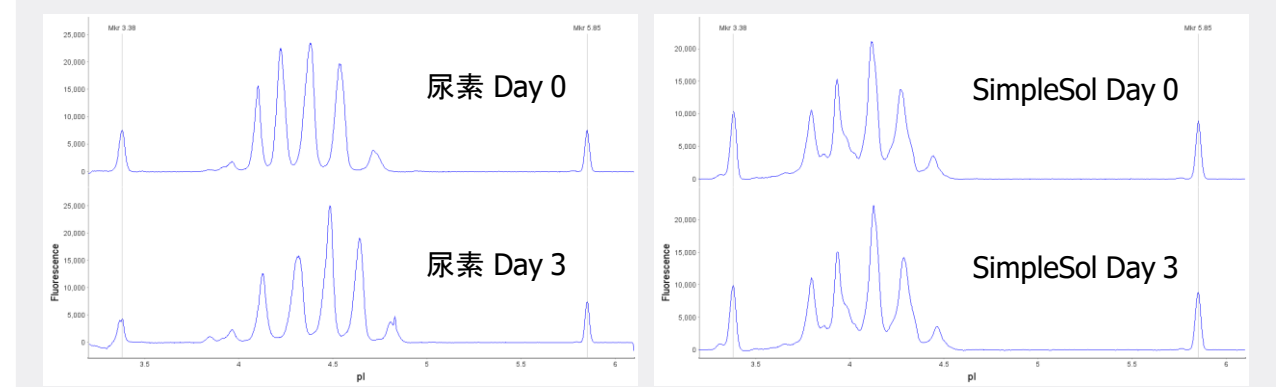


図3. 尿素と比較してSimpleSolはIEFにおいてpH勾配の酸性部分への影響は小さくなります。添加剤なし、もしくは図中に示された終濃度での尿素もしくはSimpleSolを含む4%の3-10 Pharmalyte、10mMのarginine、10mM IDA、0.35%のmethyl celluloseを含む溶液で、3.38~10.17の9個のMaurice pIマーカーのネイティブ蛍光トレースを取得しました。尿素は、酸性pIマーカー3.38のピクセル位置を大きくシフトします。添加剤なしのサンプルと比較して、4Mの尿素のサンプルでは平均して106ピクセル分、明らかな陽極へのシフトがみられます。さらに、pIマーカー5.85および6.14で示されているように、幅広い濃度(14~30%)でSimpleSolを使用した際の見かけ上のpI値の差が小さくなり、そのpI値は添加剤のないサンプルにより近い値になります。

尿素に比べてSimpleSolの試薬安定性が向上しました



%ピーク面積	尿素 Day 0	尿素 Day 3	SimpleSol Day 0	SimpleSol Day 3
Peak1	5.43	5.14	5.56	5.58
Peak2	24.52	22.67	25.13	25.17
Peak3	29.52	28.94	29.11	29.55
Peak4	24.30	24.68	23.61	23.28
Peak5	13.57	13.99	16.59	16.42

pI値	尿素 Day 0	尿素 Day 3	SimpleSol Day 0	SimpleSol Day 3
Peak1	4.71	4.81	4.44	4.46
Peak2	4.53	4.64	4.27	4.29
Peak3	4.37	4.48	4.12	4.13
Peak4	4.22	4.30	3.93	3.93
Peak5	4.10	4.13	3.80	3.80

図4. icIEFで分析したサンプルに対しSimpleSolは尿素より安定性に優れています。フレッシュな尿素(0日目)、もしくは4Cで3日間おいておいた尿素またはSimpleSolでヒトEPOを測定しました。3日間おいておいた尿素で測定したEPOでは、見かけ上のpI値やピーク面積百分率の組成などピークプロファイルに変化を示しました。3日間おいておいたSimpleSolとフレッシュなSimpleSolでも同様に測定しました。ピーク1は最も塩基性側のピークで、ピーク5は最も酸性側のピークです。

結論

- 新規タンパク質可溶化剤SimpleSolは、icIEF中に起こるさまざまなタンパク質の凝集/沈殿を軽減するために使用できます。
- SimpleSolはMauriceでの吸光度および蛍光検出を含む様々なタンパク質のicIEF分析と互換性があり、pIおよびピーク面積百分率に関して再現性の高いデータを生成します。
- SimpleSolは、尿素よりも安定したすぐに使用できるソリューションとして、各タンパク質分析用にフレッシュな試薬を準備する必要がなく、場合によっては尿素よりも優れた可溶化剤です。
- SimpleSolは、IEFでの勾配形成への影響が少ないため、見かけ上のpIを求める計算への影響が少ないです。