

Waters™ Empower®ソフトウェアでMauriceをエンパワー

イントロダクション

Mauriceはバイオ医薬品の同一性、純度、および不均一性を高解像度で再現性良く解析するcIEFおよびCE-SDSプラットフォームで、一つの装置で全ての測定が可能です。シンプルで自動化されたワークフローは手間がかからず、ハンズオン時間を短縮し、エラーの潜在的な原因やユーザー間のばらつきを最小限に抑えます。MauriceはCompass for iCEソフトウェアを使って制御することもできますが、Waters™Empower®3 Chromatography Dataソフトウェアに対応しており、貴方のラボ環境にシームレスに統合することができます。

このアプリケーションノートでは、Empower®を使ってMauriceでモノクローナル抗体のデータの収集と解析を行います。また、cIEFデータを3Dスペクトル(グラフ)で表示する新しい機能により、一つの3D画像でタンパク質が収束する様子をより包括的に理解できるようになります。



はじめよう

Empower®でMauriceを制御するには、Empower® 3 FR2 SR2 (Win7) もしくはEmpower® 3 FR4 (Win10)のソフトウェアとEmpower®システムコントロールライセンスのあるWaters™LAC/E32サーバー、およびWaters™LAC/E32サーバーに直接接続したMaurice機器が必要になります。またMauriceシステムにMaurice Empower® Control kit (ProteinSimple, 104-0040)に含まれるEmbedded ソフトウェアをインストールする必要があります。すべてのセットアップ方法については、「[Maurice with Empower®インストールガイド](#)」をご覧ください。

Empower®でMauriceをコントロールできるようにした後、Mauriceの製品添付書に従ってサンプルと試薬を準備し、Sample Set Generatorを使用してサンプルセットを作成します(図1)。cIEFもしくはCE-SDSのメソッドの作成、Batchのモニタリング、(Batchを一時停止して)メソッドの編集、カートリッジのクリーニングまたはページ、データをEmpower®で表示する方法の詳細については「[Maurice Empower® Controlソフトウェアユーザーガイド](#)」をご覧ください。

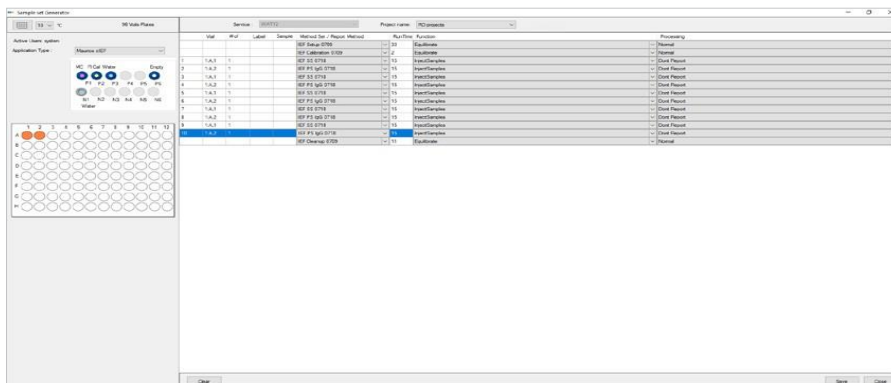


図1. Empower®ソフトウェアを使用して作成したMaurice cIEFメソッド

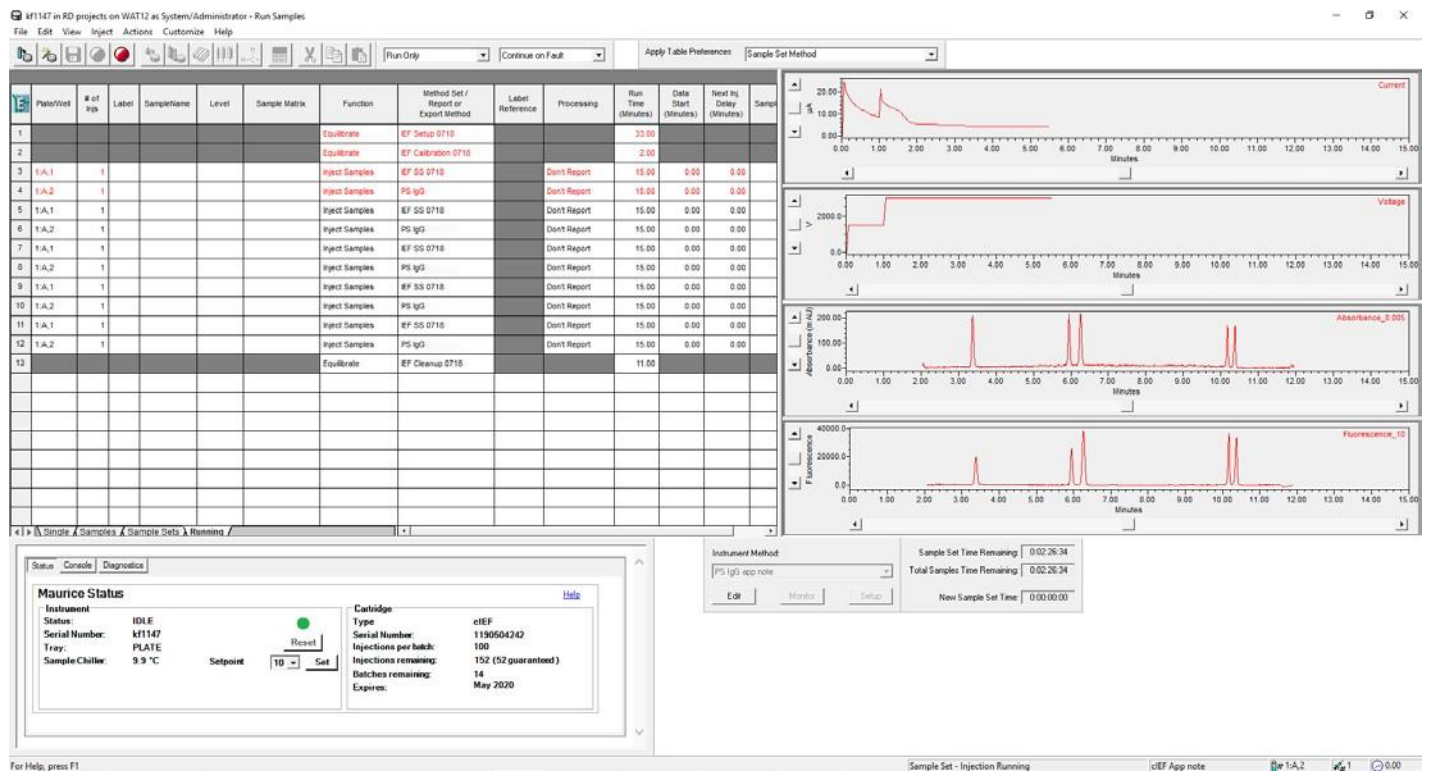


図2. Empower®ソフトウェアを使用したSystem Suitability peptideのcIEF分離。フォーカス電圧、電流、吸光度をリアルタイムでモニタリングし、分離後の蛍光画像を表示することもできます。

cIEFメソッドの実行

測定とcIEFデータの表示

Maurice cIEFメソッドを用いたサンプル分析は、吸光度検出方式と、より高感度な測定のための自家蛍光方式の両方で測定しました。製品添付書に従ってMaurice cIEF System Suitability (ProteinSimple, 046-044)に含まれるSystem Suitability peptideを準備し、デフォルトのSystem Suitabilityメソッドを使用して測定しました。また、0.1mg/mLのIgG Standard (ProteinSimple、046-039)は、2%の3-10 Pharmalyte/2%の5-8 Pharmalyte、10mMのイミノニ

酢酸、10mMのアルギニンおよび2Mの尿素中にpIマーカー4.05および8.40を混合し調製しました。各Batchに対してIgG Standardを10回繰り返しランし、1500 Vで1分間、続いて3000 Vで8分間フォーカスしました。Empower®とCompass for iCEのそれぞれでMauriceを制御しサンプルを測定しました。サンプルの分離をEmpower®の「Run Samples」ウィンドウでリアルタイムにモニタリングしました(図2)。

3Dスペクトルプロットを使用して、時系列でピークが収束する様子を空間的に視覚化することもできます(図3)。これにより、分離中に撮影した10秒ごとの一連の2D画像スライスと比較する代わりに、

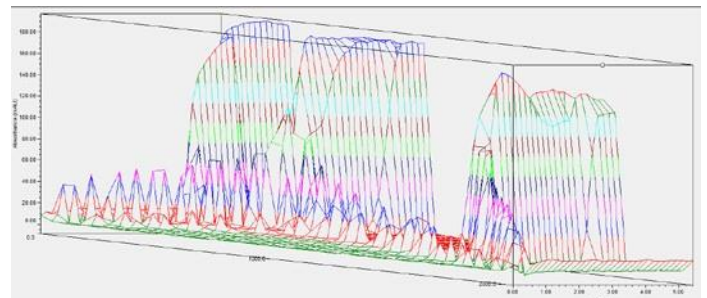
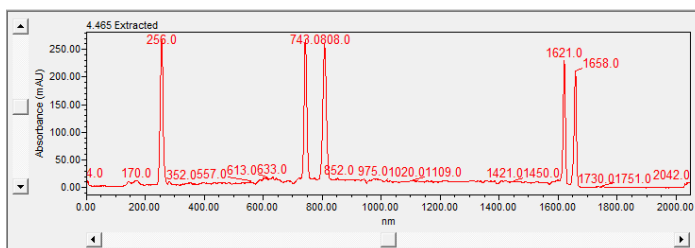


図3. 2D(左)および3D(右)のSystem Suitability peptideのスペクトルデータ。3Dデータは、サンプルの分離中に10秒ごとに撮影した一連の2D画像を比較する代わりに、1つの3D画像でピークが収束したことを確認するのに役立ちます。

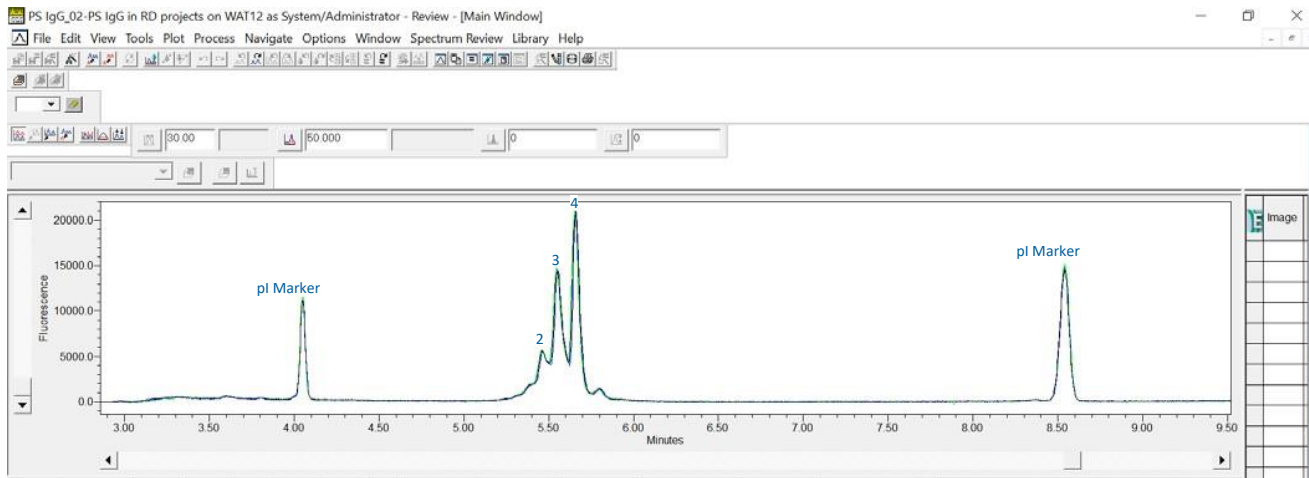


図4. IgG standardの3回連続のcIEFラン結果を重ね合わせることで、Empower®でMauriceを制御し測定したサンプルのデータの再現性を視覚的に示しています。

		EMPOWER® %組成(蛍光)			COMPASS FOR ICE %組成(蛍光)		
インジェクション	ピーク2	ピーク3	ピーク4	ピーク2	ピーク3	ピーク4	
1	13.76	36.19	43.48	13.88	36.82	43.72	
2	13.82	36.25	42.90	13.95	36.61	43.40	
3	12.94	37.47	44.08	14.10	36.35	43.76	
4	13.44	36.67	42.54	14.00	37.47	43.75	
5	13.98	36.58	43.33	13.69	37.86	44.38	
6	13.56	36.11	42.60	13.78	37.57	43.75	
7	13.13	37.07	44.00	13.81	36.72	44.70	
8	13.75	35.45	42.89	14.17	36.43	43.14	
9	12.88	36.87	42.93	13.87	36.94	43.87	
10	13.59	36.74	44.05	14.43	37.78	43.36	
平均	13.48	36.54	43.28	13.97	37.06	43.78	
% RSD	2.83	1.55	1.38	1.57	1.52	1.06	

表1. ピーク面積が全てのピーク面積の10%を超えるIgG standardピークのデータ概要。Empower®とCompass for iCEのそれぞれでMauriceを制御し測定した。Empower®でデータを解析すると、両方のソフトウェアプラットフォーム間でデータは一貫しており、予想される測定間およびサンプル調製による差異内で、ピーク組成比の差はすべて0.5%以内であり、CV<2.9%で再現可能であることが証明されました。

1つの画像でピークが最適な焦点に到達するタイミングを確認することができます。プロットは、x軸に時間、y軸に吸光度の単位、z軸にピクセル位置が表示されます。

再現性良く同等のcIEFデータ

Empower®とCompass for iCEのそれぞれで測定したデータを解析し、データの再現性と同等性を評価しました。Empower®ソフトウェアでIgG Standardを3回連続でランし、その結果のオーバーレイ (図4)とデータの定量化により、10回の測定でピーク面積のCVがすべて2.9%未満であることから、Empower®で

Mauriceを制御したデータの一貫性を実証しました(表1)。すべてのピーク面積のうち10%を超えるピーク面積をもつシグナルのピーク面積の組成比の差はすべて0.5%以内であり、ソフトウェア間およびサンプル処理によるばらつきは予想範囲内でした (表1)。このような定量結果により、Empower®およびCompass for iCEを使ってMauriceで取得した両データの同等性も証明しました。両システムで得られたすべてのピークのpIの平均を求めた結果、ソフトウェア間での差は0.02 pI単位以内であったため、データの同等性をさらに証明しました(表2)。

pIの平均値、 (N=10)		
ピーク	Empower® (% CV)	Compass for iCE (% CV)
1	5.42 (0.18%)	5.40 (0.18%)
2	5.46 (0.08%)	5.46 (0.04%)
3	5.55 (0.09%)	5.55 (0.04%)
4	5.66 (0.08%)	5.66 (0.04%)
5	5.80 (0.14%)	5.79 (0.07%)

表2. Empower®およびCompass for iCEでMauriceを制御測定し、得られたIgG standardのpI値。括弧内は%CVを示す。データはEmpower®で解析した。

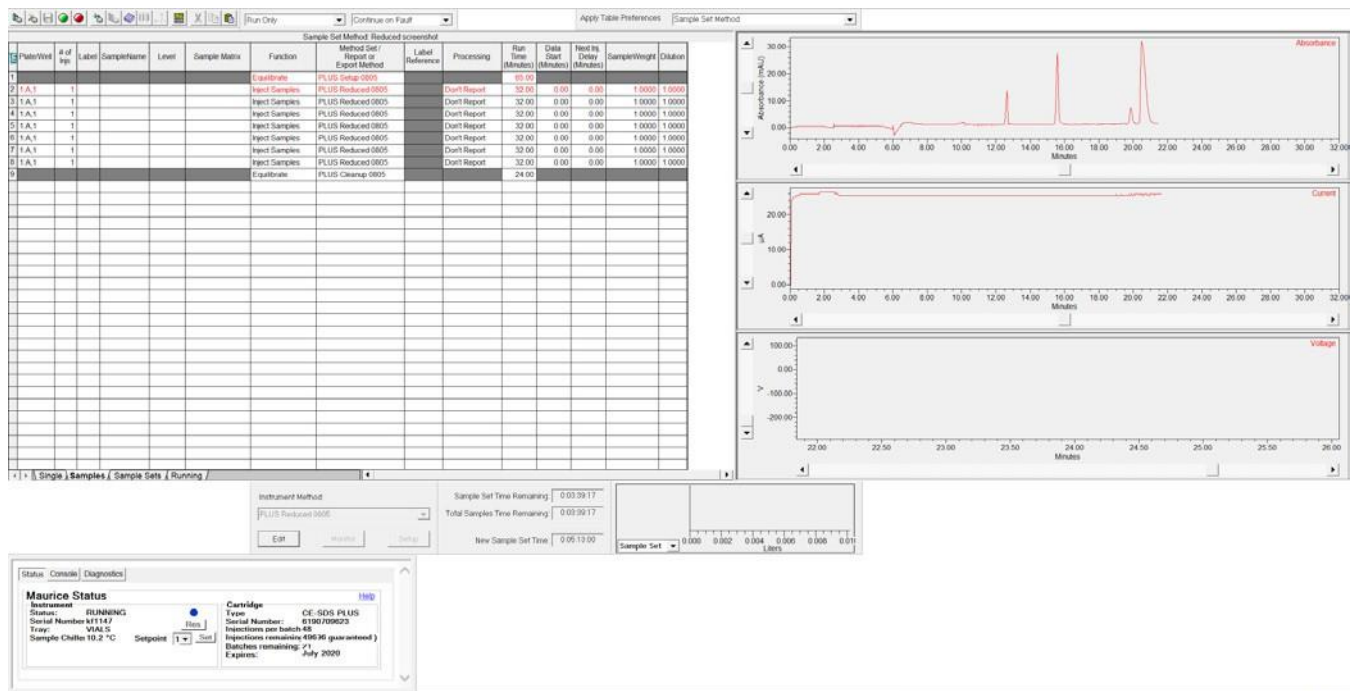


図5. Empower®ソフトウェアを使用してリアルタイムでモニタリングしたProteinSimple製 IgG StandardのCE-SDS分離。

CE-SDSメソッドの実行

CE-SDSデータのモニタリングと表示

ProteinSimple CE-SDS IgG standardの製品インサートの推奨に従って、1.0mg/mLの還元型IgG standardを調製し、Empower®およびCompass for iCEでMauriceを制御しそれぞれ10回繰り返し測定しました。サンプルを5750 Vで25分間分離し、Empower®の「Run Samples」ウィンドウでサンプル分離をリアルタイムでモニタリングしました(図5)。

再現性良く同等のCE-SDSデータ

Empower®ソフトウェアで、IgG standardを3回連続ランした結果を重ね合わせるにより、Empower®でMauriceを制御し、高いデータの再現性が得られることを視覚的に立証しました(図6)。Empower®もしくはCompass for iCEでサンプルを測定すると、すべてのピーク面積のCVは1.0%未満であり、データを定量化するで、データの一貫性をさらに確認することができました(表3)。

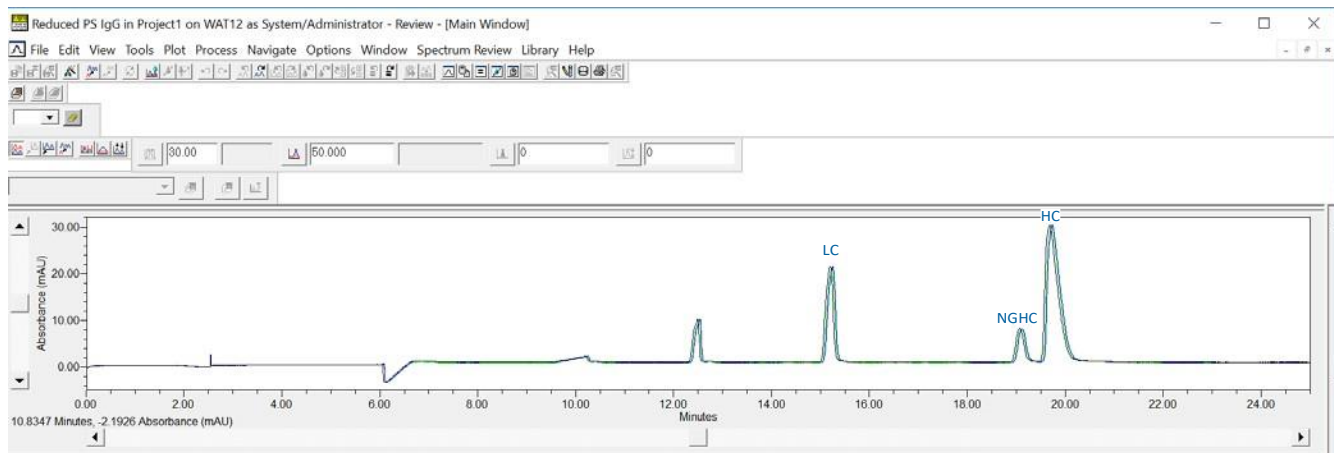


図6. 還元型IgG standardの3回のCE-SDS連続ランデータを重ね合わせることで、Empower®でMauriceを制御測定したデータの再現性を実証しています。

インジェクション	EMPOWER®			COMPASS FOR iCE		
	LC % ピーク面積	NGHC % ピーク面積	HC % ピーク面積	LC % ピーク面積	NGHC % ピーク面積	HC % ピーク面積
1	24.09	8.96	58.51	24.55	8.87	57.92
2	24.05	9.00	58.53	24.40	8.88	58.09
3	24.15	8.98	58.35	24.30	8.92	58.18
4	24.14	8.93	58.44	24.36	8.90	58.22
5	24.01	8.95	58.36	24.31	8.88	58.26
6	24.07	8.99	58.48	24.31	8.87	58.29
7	24.09	8.98	58.49	24.39	8.87	58.11
8	24.05	8.97	58.45	23.97	8.92	58.66
9	23.76	8.86	59.04	24.35	8.91	58.20
10	24.08	8.99	58.54	24.24	8.88	58.33
平均	24.05	8.96	58.52	24.32	8.89	58.23
% RSD	0.46	0.46	0.33	0.61	0.23	0.33

表3. Empower®およびCompass for iCEそれぞれでMauriceを制御測定した還元型ProteinSimple IgG Standardのピーク面積の割合の概要。Empower®でデータを解析した結果、0.7%未満のCVで再現可能で、両方のソフトウェアプラットフォーム間でのデータは同等であり、ピーク面積の割合はすべて0.3%以内でした。

各ソフトウェアでMauriceを制御し、得られた測定データをEmpower®で解析すると、還元型軽鎖 (LC)、非グリコシル化重鎖 (NGHC)、および重鎖 (HC) の両ソフトウェアでの測定間のピーク面積の差はすべて0.3%以内であったため、データの同等性が実証されました(表3)。すべてのデータは再現可能で、それらのCVはすべて0.7%未満でした。

まとめ

Mauriceを使用してバイオ医薬品をシンプルで簡単に特性分析が行えます。サンプルと試薬を準備し、測定するアプリケーションに応じてcIEFまたはCE-SDSカートリッジをセットし、メソッドパラメータを設定するだけです。あとはMauriceがすべてを行い、正確で信頼できる結果を提供します。それぞれわずか10分あるいは35分で、1ランのcIEFもしくはCE-SDSデータを得ることができます。そのためタンパク質製剤の品質と同一性に関する結果をすぐに得ることができます。

Waters™ Empower®ソフトウェアを使用してMauriceを操作することが可能になりました。このソフトウェアは、業界をリードするセキュリティとデータの完全性を保つために、21 CFR Part 11の機能を含め、法令に準拠し、Empower®のすべての主要機能を維持したMauriceシステムのシームレスなコントロールを提供します。今回の検討では、Empower®またはCompass for iCEで設定されたメソッドを使用して、ProteinSimple IgG standardの特性分析を行いました。すべてのcIEFおよびCE-SDSデータをEmpower®で分析し、Compass for iCEまたはEmpower®で制御されたMaurice間のデータ再現性と定量化について評価しました。

Empower®でcIEFおよびCE-SDSデータを定量化すると、ピーク面積のCVはそれぞれ2.9%および0.7%未満で、優れた堅牢性を示しました。Compass for iCEで測定した結果、Empower®を使用して得られた

結果と非常に一貫しており、Mauriceの制御測定に使用するソフトウェアプラットフォームに関係なく同じ結果が得られました。cIEFデータを解析すると、各ソフトウェアプラットフォームでの測定間の差は、互いに0.02以内のpIと0.5%以内のcIEFのピーク面積の組成比でした。またCE-SDSデータから計算したLC、NGHC、およびHCの割合もすべて互いに0.3%以内であったため、Mauriceの制御測定に使用するソフトウェアプラットフォームに関係なくCE-SDSの結果も同等でした。

cIEFメソッドとCE-SDSメソッドを簡単に切替えてできる柔軟性をMauriceは常に提供してきました。そして今、Empower®コントロールを使用し、Empower®内で、cIEFおよびCE-SDSデータをすべて操作および解析することができるオプションも選択できます。これにより、期待どおりのデータの再現性と常に同等な結果を得ることができます。