

機能性タンパク質の 自動ハイスループット脱塩、バッファー交換、SEC用 PhyTip® Gel Filtration カラム

High Performance:

- 塩>95%を除去、収率>80%
- 様々な分子量のタンパク質分離
- タンパク質機能の保持
- 回収量および濃度が10%CV未満
- 下流アッセイの準備

Automated desalting/buffer exchange of functional proteins:

- 完全自動化プロセス
- 約30分で、1-96サンプルを脱塩/緩衝液交換/SEC



Introduction

抗体や組換えタンパク質分子に焦点を当てているバイオ医薬品企業にとって、生理学的に効力、毒性、他の因子の問題に関係する可能性が高い場合について、より多くのスクリーニングを実施することがますます望まれています。これらのアッセイフォーマットはすべて、抗体および組換えタンパク質が十分に精製され、濃縮され、そして機能的であることを必要とします。高性能の小規模な機能的タンパク質分離を利用することにより、高含量スクリーニングステップでより生理学的に適切なデータを得ることができ、その結果、発見過程の最も早い段階で意思決定力を利用できるようになりました。PhyNexus PhyTipカラムテクノロジーはスケールアップを必要とせず、機能アッセイの準備ができている多数の潜在的リードを調製するプロセスを容易にするために、抗体および組換えタンパク質のハイスループット前処理のために開発されました。

多くの場合、様々な下流の機能アッセイには異なる溶出条件が必要です。さらに最終精製製造物は、毒性緩衝塩を減少させるか、または緩衝条件を完全に交換するために、さらなる前処理ステップを必要とします。この後者のステップは完全に自動化された脱塩と緩衝液の交換によって、PhyTipゲルろ過カラムとMEA Personal Purification Systemと組み合わせて用いることで可能になります。これらの独特なカラムは95%を超える塩を除去しながら、関心のある機能的抗体の高回収を可能にします。タンパク質凝集はタンパク質治療における重大な問題です。さらに、複雑なサンプルから様々なタンパク質を分離するHTPメソッドを研究職の方々は探しています。PhyNexusはPhyTip形式の各サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)培地を用いて、各サイズの分子量のタンパク質を分離する方法を開発しました。

PhyTip Gel Filtration Columns

特許申請中のゲルろ過カラム(Fig 1)のデザインは、ピペットチップにゲルろ過レジンを含む独自の製造工程に基づいています。薄いスクリーンをレジンを上下に置き、ゲルろ過媒体をカラム組織内に保持しながら、液体を通過させます。トップフリットはより大きな液体界面障壁であり、カラムの上部への液体の移動を容易にするのを助けます。PhyTipゲルろ過カラムは小分子を保持し、一方、より大きな分子はゲル濾過媒体を通過します。

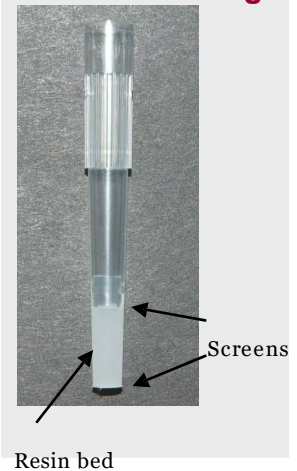


Fig 1

Desalting or Buffer Exchange Process

MEA Personal Purification Systemを用いて、200 μ Lまたは600 μ LのレジンをPhyTipゲルろ過カラムの列を1 mlの緩衝液中で調整します。カラムを調整した後、サンプルを添加して処理し、続いて異なる量のチェイサーバッファーを添加して処理します。サンプルをフラクションとして収集し、最適なサ

ンプル回収および塩除去条件を決定できます。MEA Personal Purification Systemを使用すると、12個のサンプルの各列の処理には30分かかり、96個のサンプルは2.5時間で処理できます。ゲルろ過アプリケーションとしてPhyTipカラムは、96チャンネルヘッドロボットにも適応しています。

Results and Discussion

PhyTipゲルろ過カラムおよびMEA Personal Purification Systemを用いた脱塩または緩衝液交換のプロセスは、対象タンパク質の最大限の回収と脱塩の両方を確実にするために綿密に最適化されています。

Consistent Volume Recovery

ほとんどの製薬会社は細胞ベースのアッセイのために、抗体/タンパク質の製造、精製、脱塩/緩衝液交換のプロセスを合理化しています。製造から細胞ベースのアッセイまで、サンプルを効率的に処理するためにはハイスループットソリューションが望ましいです。しかしながら、実際には真のハイスループットソリューションを達成するには、容易に達成できないレベルの精度が必要です。次のアッセイの前に後続の定量化が必要な場合、ハイスループット サンプル前処理はあまり利点を有していません。この溶液は一貫した質量および濃度の回収を必要とします。

200 μ LのレジンをPhyTipゲルろ過カラムからの容量回収の一貫性を決定するために、80 μ Lまたは130 μ Lの緩衝液を11または12の調整カラムの上に負荷しました。フロースルーを採取し、ボリュームを測定しました。3回の反復実験を行い、回収量は10% CV未満しか変化しなかった(Fig 2A & Fig 2B)。

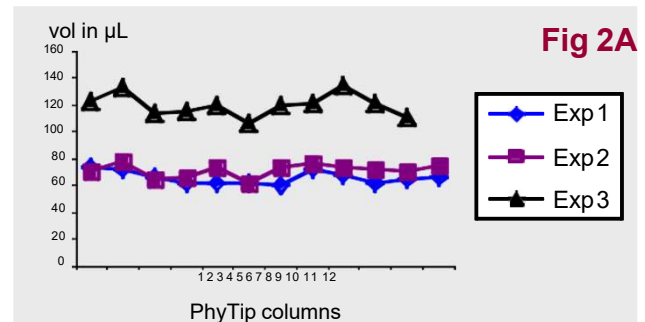


Fig 2A

Fig 2B

Chaser Vol	E1: (80 μ L)	E2: (80 μ L)	E 3: (130 μ L)
Column1	73.4	70.9	122.6
Column2	71.4	77.4	132.6
Column3	65.9	64.4	112.6
Column4	61.8	65.2	115.0
Column5	61.6	73.8	118.8
Column6	61.9	61.6	106.5
Column7	60.0	73.6	119.4
Column8	71.4	76.7	120.6
Column9	67.1	72.6	133.4
Column10	61.6	71.6	121.0
Column11	64.7	70.7	110.0
Column12	65.4	74.9	
Average	65.5	71.1	119.3
SD	4.5	5.0	8.4
CV	6.9	7.0	7.0

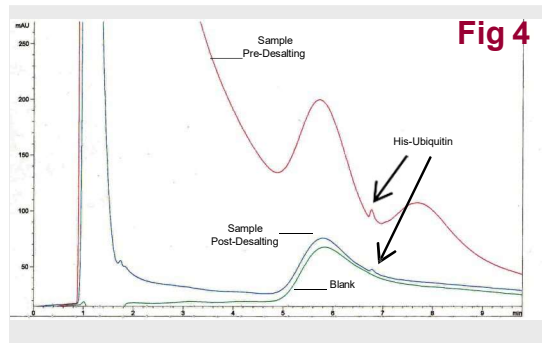
Separation by PhyTip Gel Filtration Column

褐色ミオグロビンタンパク質 (16.7kDa) および黄色 DNP-グルタミン酸塩 (313Da) を含むサンプル (Fig 3、左側の微量遠心チューブ) を、600 μ L の PhyTip ゲルろ過カラムにロードしました。脱塩の異なった段階における同じ PhyTip カラムを、回収されたフロースルーと共に示します。左側から: 1) サンプルローディングの前に PBS 緩衝液によって調整されたカラム、2) 200 μ L サンプルがレジン床に入った後のカラム、3-6) 100 μ L PBS 緩衝液を適用した後のカラム、7) 400 μ L PBS 緩衝液の最終チェースの後のカラム。この例は典型的な分離を示しており、濃縮精製を維持するために、ユーザーが (2) を通るサンプルフローを捨てるのが可能なことを示しています。さらに、塩分はフラクション (6) まで保持されるが、タンパク質の大部分はフラクション (4) によって放出されます。



HPLC Chromatogram

(Fig 4) は 0.05 mg/mL 濃度の His-Tagged ubiquitin を 250 mM imidazole でスパイクしたものです。300 μ L のサンプル (赤色) を 600 μ L カラムに適用しました。得られた脱塩試料を採取し、水 (青色) で 300 μ L に調整し、開始サンプルと比較しました。水を空白 (緑色) として注入しました。脱塩後サンプルはタンパク質の回収と、imidazole の完全除去の両方を示します。



Myoglobin Recovery and Salt Removal

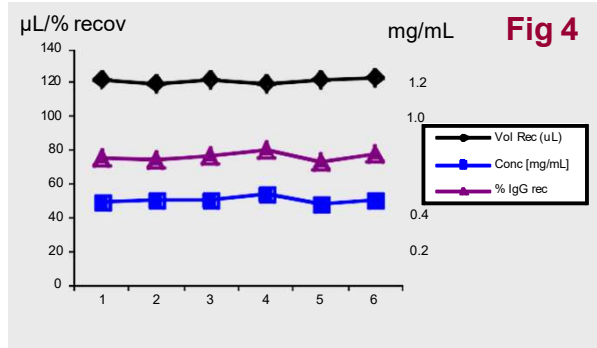
カラムを調整した後、サンプルをまず添加して処理し、続いて種々のボリュームのチェーサー緩衝液を添加して処理します。サンプルをフラクションとして採取し、サンプルの最大回収率を測定することができます。本試験ではミオグロビンと DNP グルタミン酸 (20 μ L サンプルボリューム) を用い、80 μ L チェーサーボリューム (Table 1) と 200 μ L レジン床ゲルろ過カラムを用いて DNP-グルタミン酸からミオグロビンを分離しました。下表に示したようにミオグロビンの ~80% を回収し、DNP-グルタミン酸の ~99.8% を除去できました。MEA Personal Purification System を用いれば、約 30 分で各列 12 サンプルを分離することができます。96 サンプルの全プレート进行处理するのに約 2.5 時間かかります。PhyTip 5K 脱塩カラムと MEA Personal Purification System を用いた脱塩または緩衝液交換のプロセスは、対象タンパク質の最大限の回収と脱塩を確実にするために綿密に最適化されています。

Table 1:

	A364	A409	Volume	pmol Myo	mol Salt	% prot rec	% salt rem
Myoglobin input		1.165	20.0	47843.9			
Myoglobin sample1		0.205	90.5	38095.5		79.6	
Myoglobin sample2		0.200	94.8	38932.2		81.4	
DNP-glutamate input	2.440		20.0		70469.3		
DNP-glutamate sample1	0.003		88.7		96.1		99.9
DNP-glutamate sample2	0.006		89.3		193.4		99.7

IgG Separation and Recovery

200 μL のレジン床ゲルろ過カラムを用いて、遊離色素からIgGを分離しました。この試験ではPhyTipゲルろ過カラムを800 μL のPBSでまずコンディショニングしました。調整後、40 μL の[2mg/mL]サンプルを添加、処理し、次に130 μL のチェイサー(PBS)緩衝液をPhyTipゲルろ過カラムに添加して、IgGを収集し、非標識色素から分離しました。Figure 4およびTable 2は、平均最終ボリューム121 μL (table 2, fig 4 black)における平均



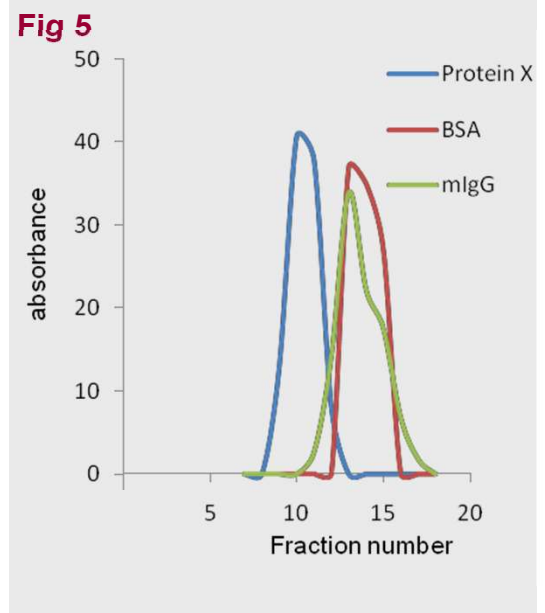
0.5 mg/mL濃度(Table 2, Fig. 4 blue)のIgG(Table 2, Fig. 4 red)の平均76%を示しています。Table 2に示すように、IgG回収率、濃度、最終回収量はCV値が非常に低いといえます。これらのSD値およびCV値は、PhyTipゲルろ過カラムの信頼性および一貫性を示します。

Table 2

Column #	Final Volume [μL]	Concentration [mg/mL]	Mass Recovered (mg)	% Protein Recovered
1	122	0.49	0.060	75
2	119	0.50	0.060	74
3	122	0.50	0.061	76
4	119	0.54	0.064	80
5	122	0.48	0.059	73
6	123	0.51	0.063	78
Ave	121	0.50	0.061	76
SD	2	0.02	0.002	3
CV	1.4	4.1	3.5	4

Separation of Different Molecular Weight Proteins

1000 μL のレジン床(Sephacryl S-300)PhyTipゲルろ過カラムを用いて、Protein X(>300kDa)をmIgG(150kDa)およびBSA(70kDa)から分離しました。この試験ではPhyTipゲルろ過カラムをまず1.5 mlのPBSで調整しました。調整後、100 μL のサンプル(0.2 mg/mLのProtein X、0.05 mg/mLのmIgGおよび0.95 mg/mLのBSA)を加え、レジン床に入れました。サンプル加工後、チェイサー緩衝液PBS 50 μL をカラムに加え、フラクションを採取しました。フラクションネーションを20回チェイサー添加まで続け、回収したフラクションをFigure 5に示すようにHPLCまたはNanoDropで分析しました。グラフからわかるように、Protein XはmIgGおよびBSAから十分に分離されていました。興味深いことに、BSAは70kDaタンパク質のように振舞わず、はるかに大きなmIgGと共にカラムを通して溶出しました。



Conclusion

PhyTipゲルろ過カラムとMEA Personal Purification Systemは、高速脱塩、緩衝液交換、サイズエクスクルージョンクロマトグラフィー(SEC)のためのハイスループットソリューションです。面倒で時間のかかる透析手順と比較してみると、PhyTipゲルろ過カラムはMEAと併用して30分で12サンプルを処理することができます。PhyTipゲルろ過カラムは96サンプルを30分で処理する、96チャンネルヘッドリキッドハンドリング ロボットシステムのほとんどと互換性があります。PhyTipゲルろ過カラムを用いれば、高水準の性能を得ながら時間を節約できます。スピнкаラムとは異なり、PhyTipカラムは従来のサイズエクスクルージョンクロマトグラフィーをシミュレートし、タンパク質サンプルのフラクションを行うことができます。これにより自動化されたハイスループットの方法で、最大限のタンパク質回収と脱塩、ならびに異なるサイズのタンパク質分離を最適化することができます。

PhyTipゲルろ過カラムはMEA Personal Purification Systemや、他のリキッドハンドリング ロボットシステム上のPhyTip精製カラムと併用することができます。これにより、精製と脱塩、緩衝液交換、およびSECを組み合わせたことができます。例えば、6His-taggedタンパク質は、PhyNexus IMAC PhyTipカラムによって精製可能で、そして高濃度のimidazoleを用いて溶出可能です。これはPhyTipゲルろ過カラムによって除去できます。これらのプロセスは研究者がハイスループット、ウォークアウェイのシナリオで複数のサンプル処理ステップを実行することを可能にします。

PhyTipゲルろ過カラムは特に自動化MEAベンチトップ、ウォークアウェイシステム用に製造されています。



PhyTipゲルろ過カラムは、ほとんどのリキッドハンドリング ロボットシステムと互換性があります。

