



Quality test of –EPO biopharmaceutical using iMSPR-proX & COOH chip

EPO는 적혈구 생성을 유도하는 당단백질 호르몬으로 바이오베터 개발이 활발히 이루어지는 제품입니다. SPR을 이용한 시험법은 기존의 실험용 쥐를 이용한 EPO 역가시험법의 정밀성 및 윤리적인 부분을 개선할 수 있습니다. 본 application 실험에서는 iMSPR-ProX에서 EPO와 EPO-R의 결합력을 분석하여 품질 평가 기준을 제시합니다.

Materials

- Instrument: iMSPR-pro
- Sensor chip: COOH-Au chip (PCCH1000), Carboxyl Dextran-Au chip, 50nm (DCCH1050)
- Immobilization Reagent: Amine coupling kit (ACK50)
- Immobilization buffer: Acetate buffer pH4.0 (AB40)
- Running buffer: 1xHBST (HB50)
- Regeneration buffer: 10 mM glycine pH 2.5
- Ligand: EPO-R
- Analyte: EPO

Procedure

Ligand Immobilization

- ① Baseline: 양 채널 (Ligand channel, Reference channel)에 유속 30 ul/min 조건으로 5분이상 1xHBST를 흘려주어 안정적인 baseline을 잡는다.
- ② 양 채널에 Activation buffer (175 ul)와 EDC 용액 (175 ul)을 1:1로 혼합하여 30 ul/min의 유속으로 5분동안 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ③ EPO-R 10 ug/ml (in Acetate buffer pH 4.0) 300 ul를 준비하여 Ligand channel에만 10 ul/min으로 15분 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ④ Quenching buffer를 200 ul 준비하여 양 채널에 30ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ⑤ 양 채널에 Glycine pH 1.5을 200 ul 준비하여 30 ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 30분이상 washing하여 안정화 시킨다.

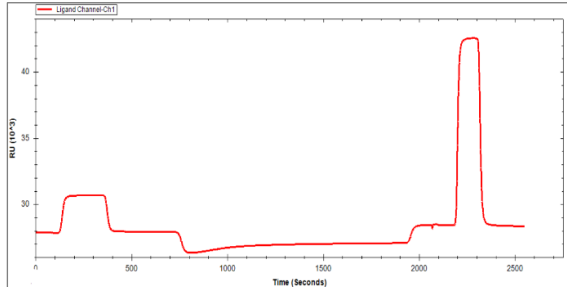
Analyte binding

- ① 실험 당일 사용하는 Running buffer에 EPO를 희석하여 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 0 nM 농도로 각각 200 ul씩 준비한다.
- ② 1.56 nM EPO를 30 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 6분 동안 washing 한다.
- ③ 10mM glycine pH 2.5 용액을 10 ul/min으로 30초 주입하여 regeneration한 후, 1xHBST로 6분동안 안정화시킨다.
- ④ 농도별로 ②-③을 반복수행

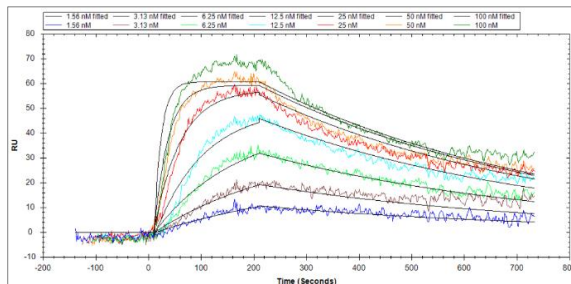


Results

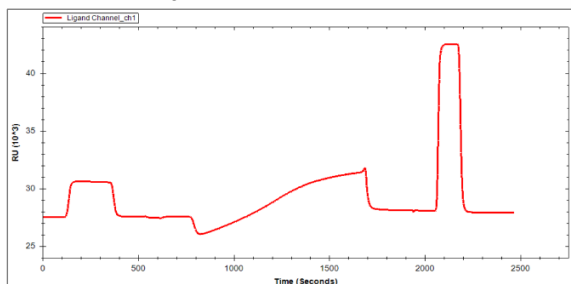
R1. Ligand 고정화 (COOH-Au chip)



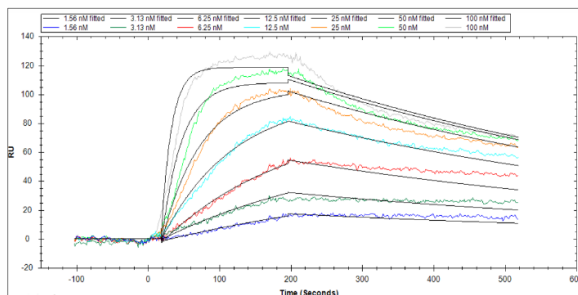
R2. Curve fitting: one to one binding model (COOH-Au chip)



R3. Ligand 고정화 (Carboxyl Dextran-Au chip)



R4. Curve fitting: one to one binding model (Carboxyl Dextran-Au chip)



Results summary

T1. Kinetic Evaluation (COOH-Au chip)

Contents	Value
Immobilization Level	1058 RU
R_{max}	62.24 RU
K_a (Association rate, 1/M*s)	7.26×10^5
K_d (Dissociation rate, 1/s)	1.82×10^{-3}
K_D (Affinity)	2.50×10^{-9} M
χ^2	10.07

T2. Kinetic Evaluation (Carboxyl Dextran-Au chip)

Contents	Value
Immobilization Level	830 RU
R_{max}	115.46 RU
K_a (Association rate, 1/M*s)	6.79×10^5
K_d (Dissociation rate, 1/s)	1.47×10^{-3}
K_D (Affinity)	2.17×10^{-9} M
χ^2	18.81