

WP5003: マイクロプレートを利用した全自動動的及び静的光散乱測定器によるバイオ医薬品の迅速な生産開発

Daniel Some, Ph.D., Wyatt Technology

日本語訳・編集：昭光サイエンス株式会社

はじめに

動的光散乱 (DLS) 法は、1nm未満～数 μm までのサイズの蛋白質、ナノ粒子、コロイド及び高分子の研究開発における重要なツールです。バイオ医薬品のハイスループット分析とスクリーニングが関係する場合、Wyatt社のプレートリーダー型動的光散乱測定器 DynaPro PlateReaderが事実上の標準機となり、製剤の開発可能性、事前処方、凝集及び安定性を評価するために、世界中のバイオ医薬品開発研究者に、使われています。

[DynaPro PlateReader III \(PRIII\)](#) は、この機器の最新世代のモデルで、粒子径と安定性の主要なスクリーニングツールとして、その価値をさらに高める新機能を提供します。

治療用蛋白質、モノクローナル抗体、抗体薬物複合体、ウイルス様粒子、ワクチン、及びバイオシミラーの開発のために、PRIIIは、複数の生物物理学的特性を同時に、堅牢かつ簡便に測定します：

- ・粒子径と粒度分布
- ・分子量
- ・多分散度
- ・%粗大凝集
- ・コロイド安定性： k_D 、 A_2 とそれらの温度依存性
- ・温度安定性： T_m/T_{onset} (アンフォールディング)、 T_{agg} (凝集)
- ・溶解性
- ・粘度

DynaPro PlateReader IIIは、生物物理学的特性の測定だけでなく、全ての測定ウェル内の写真を撮り、目視で試料の不安定さを確認することもできます。



図1. DynaPro PlateReader IIIは、市販のマイクロプレートのウェル内で動的及び静的光散乱を測定します。

誰が、プレートリーダー型DLSを必要とするのか？

DLS測定は、少量かつ迅速に行われ、溶液もしくは懸濁液試料の粒子径、凝集体、安定性、純度などの特性を評価するために使われています。但し、従来のDLS装置は、手動による試料の充填と「一度に1つずつ」の測定しかできません。

従来のDLS測定は、使い捨てもしくは石英キュベットのいずれかを使用し、実際のデータ取得に数分しか掛からない場合でも、僅か数回の測定を行うために、かなりの時間を必要とします。このため、複数の繰り返しのデータ取得、試料の複製、コントロール及び多くの異なる条件での測定を実行しようとする場合、測定者にDLSの完全かつ適切な利用を思いとどませることがあります。それでは研究を行き詰まらせることになるため、良い解決策が求められてきました。

DynaPro PlateReaderは、自動化されたDLS装置であり、市販の96、384、1536ウェルプレートに試料を充填し、測定を実行します。キュベットを1つずつ交換する代わりに、複数試料を充填したプレートを装置内に配置し、スタートボタンをクリックするだけです。測定開始後は、測定者は現場を離れることができます。

何百人もの医薬品、蛋白質、ナノ粒子の研究者がこの装置の前世代機種であるDynaPro PlateReader Plus DynaPro PlateReader IIを使用して、生産性を一桁以上向上させてきました。彼らはプレートリーダー型DLSが登場するまでは、実用的でないと考えられてきたDLSのハイコンテントスクリーニングワークフローを実装しました。バイオ医薬品の処方と安定性のスクリーニング、ナノ粒子のプロセス開発、結晶化バッファの最適化は全てDynaPro PlateReaderの恩恵を受けています。

DynaPro PlateReader III (PRIII) は、DynaPro製品ラインナップの最新機種です。前モデルから複数の技術的進歩を取り入れ、価値ある機能が追加されています。最も重要な新機能は、静的光散乱による溶液中の試料の重量平均分子量 (Mw) と第二ビリアル係数 (A2またはB22) のプレート内測定です。

飛躍的な進歩を想像してみてください

以前は遅くて退屈であったプロセスの自動化が定性的に新しい研究に繋がる時、科学は飛躍的な進歩を経験します。超並列コンピューティングから、創薬における化合物ライブラリのスクリーニング、PCR及びゲノムシーケンスまで、ハイスループット自動化の利点は、単に時間を節約するだけではありません。スループットが高くなると、以前は殆どラボではアクセスできなかった新しい研究を想像し、実行することができます (1測定ずつ行う装置が複数あり、次々に測定できる場合を除く)

PRIIIは、通常数週間を要するデータを1日で取得できる夢のような装置です。数百の試料と数千のバッファ/賦形剤/温度条件を1つのマイクロウェルプレートに充填するだけで、それ以上の労力を掛けることなく、自動測定します。DYNAMICS®ソフトウェアのヒートマップ作成機能であるSpectral Viewを使用すれば、データセット全体を一挙に分析及び視覚化し、関心のあるデータはズームインして、最も有望な条件の詳細な調査を行えます。

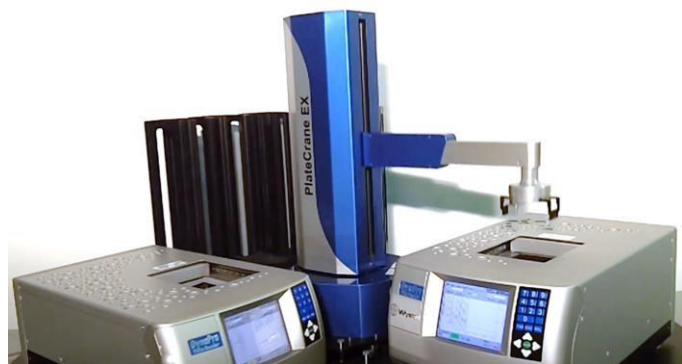


図2. ここで示すようにプレートクレーンを用いてロードとアンロードを自動化できます。DYNAMICS APIは装置を制御し、結果を外部ソフトウェアに転送するためのツールを提供します。

ロボットによる液体処理と統合すると、さらに大規模な自動化を実現します。DYNAMICS APIは、プレートの処理、データ取得、温度制御、及び追加のPRIII機能を、液体処理、試料の準備と充填、及びその他の分析手法を組み込んだ完全に自動化されたプレートベースのワークフローに統合するツールを提供します。

品質を犠牲にせずにハイスループット分析を行えます

DynaPro PlateReader IIIで行う、全ての測定はCorning社やGreiner社などの業界標準のマイクロウェルプレートを使用し、ウェル内で実行されます。プレートへのピペッティング以外の試料の処理が不要であるため、相互汚染の恐れがなく、大幅な時間の節約を実現します。

さらに分析を拡張するために、プレートを分光プレートリーダーやクロマトグラフィーウェルプレートサンプラーにシームレスに転送して、追加分析を行うこともできます。

自動化とハイスループットの実現が、データ品質を犠牲にすることはありません。安価な使い捨てプレートを使用时も、Wyatt社の研究開発チームによって設計された機器の感度と堅牢性は、高価な石英キュベットを使用した他のDLS機器と同様で、かつ高価なキャピラリーアレイによる測定よりもはるかに優れたデータを得ることができます。

より多くのデータを、より少ない時間で、より少ない労力で、より高い精度で収集できます。複数の複製を全ての実験に簡単に組み込むことができるため、ロバスト統計分析も容易に行えます。

装置の内部

動的と静的光散乱

“動的”と“静的”は、文化的な意味を持つ専門用語です。私たちは皆、”動的”な個人であり、機敏で前向きであることを望んでいます。誰も”静的”で定位置に留まっていると分類されることを望んでいません。しかし、これらの言葉の肯定的または否定的な意味合いは、光散乱の文脈では意味がありません。動的及び静的光散乱法は、どちらも強力な分析技術です。双方の光散乱法は、高分子と微粒子の異なる特性を測定し相乗的に組み合わせ、研究または治療用途での試料の品質と実行可能性について、完全な理解を構築します。

光を利用した分子量測定

静的光散乱 (SLS) 法は、2つの重要な情報、高分子とナノ粒子の分子量と分子サイズを測定します。この測定法は第一原理を利用しており、非常に健全で堅牢な測定技術です。

SLS測定は、溶液中にレーザー光を照射し、照射強度に対する溶液から散乱された光の強度を測定することで、実行されます。粒子が照射レーザーの波長よりもはるかに小さければ (PRIIIでは約12~15nm未満)、分析は非常に簡単に行えます。分子量は、光散乱強度と試料濃度の比から得ることができます。溶液中の高分子が分布を持つ場合、測定値は重量平均分子量Mwになります。

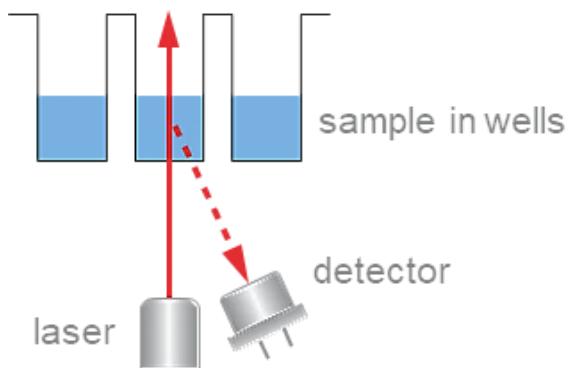


図3. ウェルプレートでの静的及び動的な光散乱測定イメージ。レーザー照射と検出は下から行います。

より大きな粒子の場合、光散乱信号は角度により変化するため、SLSの補正が必要です。DYNAMICSソフトウェアは、分子の立体配置を仮定することにより、半径50nmまでの高分子の分子量値に対して、この二次補正を行うことができます。

より正確な測定精度または大きな粒子の静的光散乱測定を行うには、多角度光散乱検出器 (MALS) が有用です。分子量とRMS半径の観点からのサイズの双方を求めることができます。多角度光散乱検出器DAWN®は、一般的には、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) やフィールド・フローフラクショネーション (FFF) などの分離システムと組み合わせて、真の分子量分布及びサイズ分布を測定できます。PRIIIは、SLSによる大きな高分子の分子量測定には適していませんが、DLSからサイズを決定し、特定のコンフォメーションを想定して分子量を推定することができます。

ノイズからの情報

動的な光散乱は、溶液または懸濁液中の粒子のブラウン運動を利用して、粒子の粒子径を測定する手法です。流体は、細いレーザー光で照射され、光路内の各粒子は、全方向に光波を散乱させます。粒子が拡散すると、特定方向に散乱する光の強度に変動が生じます。散乱光にさらされた検出器は、それに応じて時間と共に変化する信号を生成します。粒子のブラウン運動はランダムであるため、信号の変化もランダムになります。これは、マイクロ秒からミリ秒の時間スケールで相関の無い強度変動として表示され、図4に示すDLS生データのように、検出器ノイズのように計測されます。

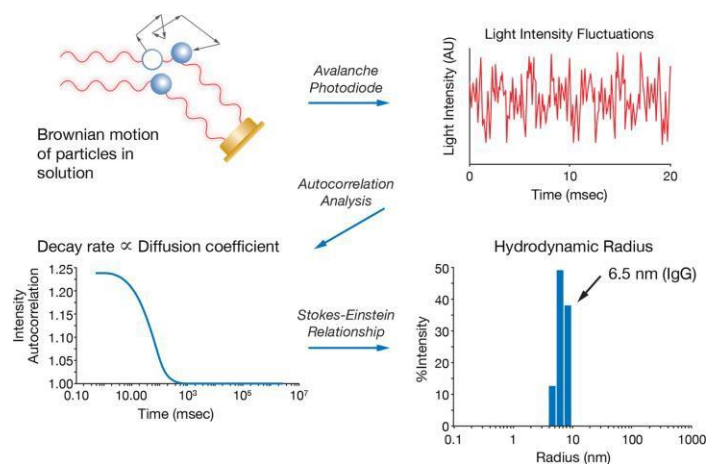


図4. 粒子のブラウン運動は、ノイズのように見える動的な光散乱信号を生成します。この光散乱強度の変動には、粒子径に変換できる拡散係数の情報が含まれています。

しかしながら、拡散速度は（溶液の粘度と温度に加えて）、粒子径に依存するため、光信号の変動には重要な情報が含まれています。変動率は、散乱粒子の拡散率に直接関係します。大きな粒子は、よりゆっくりと拡散し、光学的変動を遅くしますが、小さな粒子は、より急速に拡散し、光学的変動を速くします。粒子の拡散係数 Dt は、生の光散乱信号に対して、“自己相関分析”と呼ばれる数学的アルゴリズムを実行し、その結果得られる自己拡散関数をフィッティングすることにより決定できます。粒子径は、ストークス・アインシュタインの式を使用して、拡散係数から決定できます。

より多くの情報

DynaPro PlateReader IIIには、各ウェルの画像を撮影するカメラが搭載されています。DLS測定を行う際に試料内のほこりや沈殿物、気泡などに起因する奇妙なデータが得られることがあります。奇妙なデータの原因を見つける唯一の方法は、キュベットに光を当てて、ルーペで試料内の様子を確認することでした。PR IIIでの測定では、搭載カメラが撮影した、測定ウェル内の画像から、沈殿、結晶化、破片、気泡などが含まれていないかを容易に確認できます。目を細めたり推測の作業は、もう必要ありません。

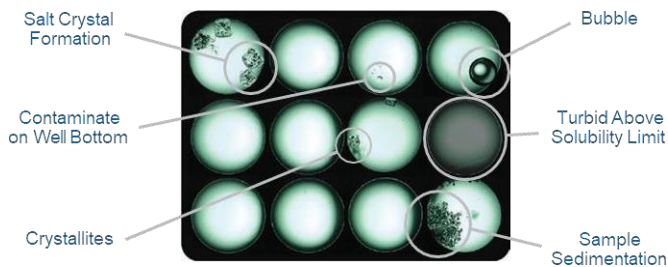


図5 DynPro PlateReaderに搭載されているカメラで撮影されたウェル底部の画像を観察することにより、粒度分布結果では確認できない試料の状態を確認できます。

何が新しいか？

プレートを用いて分子量を測る

時折、DLSを使用して蛋白質の分子量を決定できると誤解されることがありますが、残念ながら、これは物理学ではサポートされていません。DLSは拡散係数を決定し、そこから粒子径を算出する手法です。分子量は、蛋白質の場合は球状、高分子の場合はランダムコイルなどの特定の分子コンフォメーションを想定することで推定できます。しかしながら、非球状蛋白質や分岐高分子など、これらの仮定に適応しない試料も多く存在します。

PR IIIは、静的光散乱（SLS）の測定機能も追加され、プレート内の蛋白質やその他の高分子の真の分子量測定が可能となりました。SLSは、コンフォメーションを仮定する必要がなく、溶解している全ての高分子に適応します。分子量を適切に測定するためには、試料濃度と屈折率増分 dn/dc の情報に加え、直線性の高い検出器が必要です。

検出器については、モジュールの速度、感度、直線性には、妥協すべき点が存在します。MALS検出器で使用されているPINフォトダイオードは、何桁もの信号に対して非常に高い直線性を示しますが、高ゲインで動作すると、応答が遅くなり、DLS測定には適当ではありません。一方、DLS測定で、通常使用されるアバランシェフォトダイオード（APD）は、サブマイクロ秒の応答時間で高ゲインと高速検出を実現しますが、通常は非常に非直線的で

PR IIIでは、それまでに搭載していたAPDを、かなりの広範囲の信号に渡って直線性を維持できる新しいモジュールに置き換えました。この範囲は、DLS及びSLS測定で、一般的な蛋白質や高分子を測定するのに適した濃度範囲をカバーしています。試料が高純度で単分散の場合、プレートでのSLS測定により真の分子量値を得ることができます。試料に分布がある場合は、SLSは、重量平均分子量を算出します。PR IIIは、高度な自動化と微量分析に対応し、分子量を決定できる最初の（そして唯一の）プレートリーダーです。

B22とA2

図6で示される荷電残基や疎水性残基などの表面部分から生じる非特異的な蛋白質間相互作用は、コロイドの安定性とバイオ医薬品の凝集傾向に影響を与えます。これらの相互作用を説明する主要な熱力学的パラメーターの1つは、第二ビリアル係数A2、別名B22です。A2は、SLSで測定できます。

従来のSLSは、かなり大量の蛋白質を必要としますがバイオ医薬品開発の初期段階では、測定に必要な量を準備できないことがよくあります。そのため、近年、初期段階の生物学に取り組んでいる研究者は、DLSを使用し、A2の合理的で信頼できる代替値として利用できる拡散相互作用パラメータ k_D を測定しています。 k_D は、純粋な熱力学品質ではありませんが（ k_D には流体力学的特性と熱力学的特性の双方が組み込まれています）、SLSよりも、はるかに少ない試料量で、DLSにより測定できます。更には、DynaPro PlateReaderを使用することで、自動測定が可能で、かつ高濃度モノクローナル抗体の凝集傾向や溶液粘度とかなり関連することも示されています。

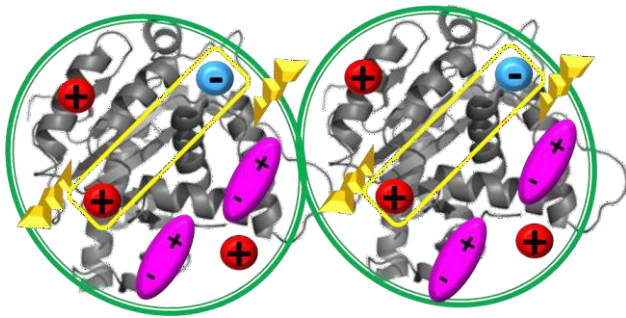


図6. 非特異的な蛋白質間相互作用は、ハードコアの反発、正味電荷、電荷の均一性、局所的な双極子、疎水性残基、及びその他の要因から発生します。一次的には、これらは、第二ビリアル係数 A_2 （SLSで測定）もしくは、拡散相互作用パラメータ k_D （DLSで測定）によって定量化されます。

PRⅢのこの新しい機能は、複数の製剤または候補の自動ハイスループットスクリーニングを拡張し、A2を含め、 K_D 測定を適切に補完します。温度勾配、変性材のシリーズもしくは、高温での加速安定性試験を使用した熱及び立体配座安定性のスクリーニングとの組み合わせにより、A2分析はPRⅢの包括的な安定性スクリーニング及びバイオ医薬品製品の実行可能性の予測を提供します。

蒸発の影響を無くす

PRⅢは、安定性テストとプロセス開発のための非常に用途の多いプラットフォームになります。多くの場合、これらのアッセイでは、長時間の温度上昇または室温または高温での長期保存が必要であり、その為に、全てのプレート内の溶液は蒸発してしまいます。1試料あたり、僅か数十マイクロリットル程度しかないため、蒸発はそれほど時間が掛からず、試料濃度を大幅に増加させ、沈殿や凝集を引き起こす可能性があります。

DynaPro PlateReaderでの蒸発を防ぐための好ましい手段は、ミネラルオイルまたはシリコンオイルで、ウェルを覆うことです。オイルは空気よりも疎水性が低く、変性に関して蛋白質のより穏やかな界面を作り出します。またウェルの下から照射されるレーザー光を散乱させず、検出体積から遠く離れたきれいで完全に滑らかな表面を作成するため、光学システムにも有益です。

しかしながら、オイルの使用は、ウェルを覆う面倒な追加の流体処理が必要になります。また界面活性剤は、オイルの一部を溶液に引き込み、配合を変える可能性もあります。

透明なシーリングテープは、蒸発を防ぐための効果的な方法であり、オイルよりも使いやすく、面倒ではありません（フォイルはカメラの照明を遮るため使用できません）。しかしながら、DynaPro PlateReaderの以前のモデルでは、テープ上に蒸気が結露し、その液滴が光を散乱させ、DLS測定に影響を及ぼすため、シーリングテープを使用することができませんでした。

PRⅢでは、結露の問題を完全に解決しました。温調メソッドを実行している際には、装置は非常に穏やかな発熱体をオンにして、テープの温度をプレートよりも2~3°C高くします。このことで、プレート内部の温度に影響を与えることなく、結露を防ぎ、光学的悪影響を改善させることができます。

従って、PRⅢは、光学性能に悪影響を与えることなく、蒸発を防ぐために、オイルキャッピングまたは透明なシーリングテープの何れかお好みの方法を選択して、使用することができます。

何が起きているのかを確認できます

PRⅢは、他の全てのWyatt装置と同様に、フロントパネルにグラフィックタッチスクリーンディスプレイを組み込んでおり、機器の手動操作、信号と温度の履歴の迅速な確認、アラームや障害の診断に役立ちます。必要なのは、何が起きているのかを素早く確認できることです。

改良されたPRⅢのフロントパネルディスプレイは、主要なシステムパラメータと操作の詳細を一目で簡単に識別できるようになっています。画面をタップするだけで、チャートやその他のディスプレイをナビゲートして、より詳細を確認できます。



図7 PRⅢのフロントパネルディスプレイ

初心者から専門家までの実験を構築

DYNAMICSは、包括的なデータ分析のための強力なソフトウェアパッケージです。そのイベントスケジュールスクリプト言語により、複数の温度プロファイルにわたって、プレート内のウェルをスキャンするための複雑な方法を構築できます。このことは、多くのオプションを必要とする専門家に非常に有用な機能です。

基本的な部分プレートスキャンと温度プロファイルを実行したいだけの初心者の方は、DYNAMICSバージョン7.7以降に実装されたExperiment Builderを使用すると、以下の幾つかの簡単な手順で基本的なメソッドを簡単に作成できます。

1) 温度プロファイル（一定、傾斜、または個別のステップ）を選択し、目的の温度を指定します。

2) 測定するウェルをグラフィカルに選択し、その内容を特定します

3) 繰り返し測定の回数、測定間の待機時間、カメラ画像を取得するか否かなどの追加情報を指定します。

4) Go を押して、測定を開始します。

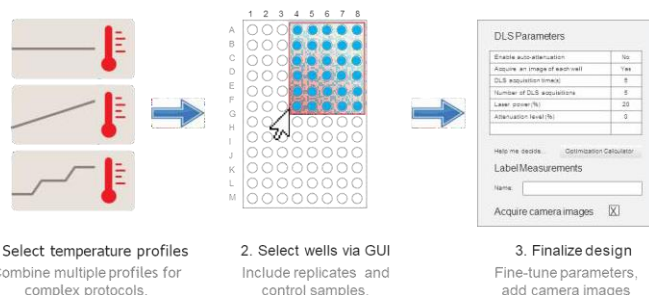


図8. DYNAMICS7.7以降のExperiment Builderを使用すると、メソッドを簡単に作成できます。

PRⅢは、このように簡単に自動分析を実行できます。温度サイクリングなどのより複雑な方法が必要な場合は、イベントスケジュール機能を利用することができます。

アプリケーション 蛋白質と粒子の粒子径

サブミクロン粒子、蛋白質、ウイルス、リポソーム、及びその他の高分子の粒子径と凝集測定は、DLSで日常的に行われています。しかしながら、数十、数百の試料を簡単に自動ハイスループット測定することは、従来のDLSでは行えない画期的なことです。以下にDynaPro PlateReaderを用いた自動測定による粒子径と凝集測定の例を紹介します。

図9は1枚のウェルプレートを用いて、96検体を45分間で自動測定した結果を示しています。Spectra Viewは、予めユーザーが設定した基準（平均粒子径、平均分子量、多分散度、Rh=10nm以上の%massなど）に従って、プレートの色を色

分けできます。ここでは、各試料の凝集体の量を色分けしています。また各ウェルをクリックすることで、その試料の粒度分布を表示し、詳細情報を得ることもできます。全体の結果を表形式で転送することも可能です。

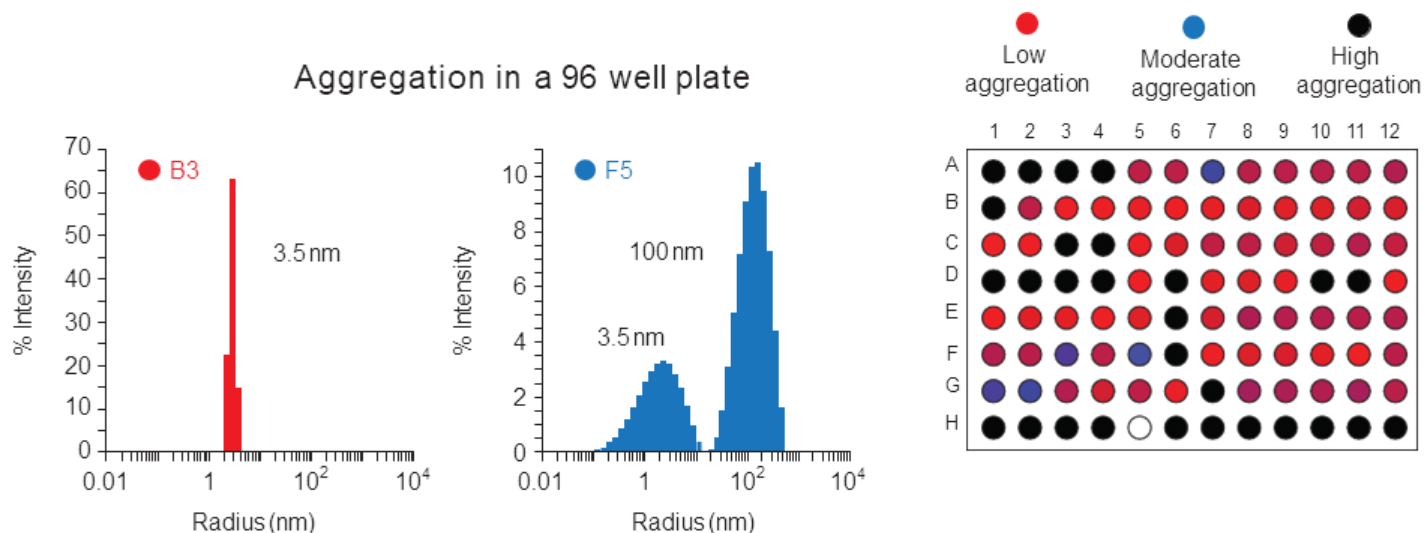


図9. 96ウェルプレートを用いた粒子径と凝集の自動スクリーニングを僅か45分で実施した測定結果。Spectra Viewヒートマップと個々の粒度分布を表示できます。（Sbin Inst. より提供）

蛋白質の結晶化

蛋白質の結晶化に適したバッファーを見つける作業は時間と材料を消費するだけでなく、イラつかせることがあります。数百または数千の条件を試しても、結晶が形成されるか、されないか（殆どの場合は後者）判らないからです。

多くの場合、DLSを使用することで、そのプロセスは合理化され、はるかに迅速に各条件の凝集度と多分散度をマッピングし、収束させます。最初に確実に正確な条件を決められなくても、補間によって結晶化のスイートスポットを見つけることができる場合がよくあります。これを実行するために、全ての測定を手動で行うことは現実的ではなく、ハイスループットDLSを用いることに大きな意味があります。

蛋白質の安定性評価

製剤開発のための自動ハイスループット凝集スクリーニング

実験計画法 (DoE) は、Quality by Designを実装するための製剤スクリーニングを設計するためのスマートな方法です。DoEは、大規模な設計スペースでの製剤の最適化に役立ちますが、最終的には、試料の数と測定の統計的有効性によって、調査できる全体のパラメータセットに制限があります。

PRIIIは、1536ウェルプレートを使用することで、1ウェルあたり、4μL容量で測定ができます。これにより、妥当な量の蛋白質を消費しながら、複数の複製を使用して、多くの治療薬候補、バッファー、賦形剤、及び条件にわたって拡張されたDLS/SLS凝集スクリーニングが約束されます。

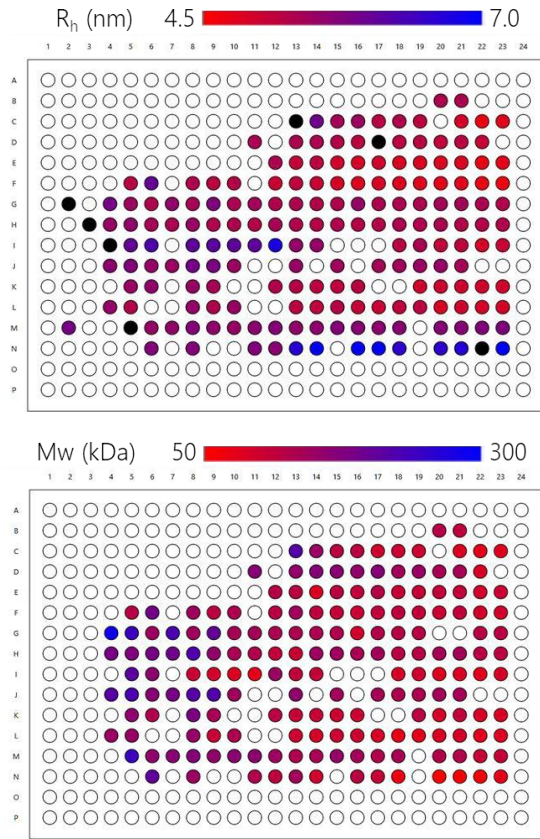


図10. 製剤スクリーニング：384ウェルプレートで測定した6種のバッファー中の2種のモノクローナル抗体の平均粒径（上）と見かけの分子量（下）。見かけの分子量は、蛋白質間相互作用の濃度依存性の結果として得たもので、真の分子量とは異なります。各ウェルをさらに調べて、大きな凝集体の粒度分布、及び小さな凝集体の多分散度を求めることができます。沈殿物によるいくつかの無効なデータは表示されていません。

加速ストレスと凝集率

PRⅢは、加速ストレス研究に特に適しています。

- ・試料は、装置内で直接低温または高温でインキュベートできます。
- ・プレートは、温度チャンバー、凍結溶解チャンバー、または振とう/攪拌装置に移し、分析のために戻すことができます。
- ・プレートは、追加/直交の実験のために、他のプレートベースの分析機器もしくは、プレートサンプラーに移すことができます。

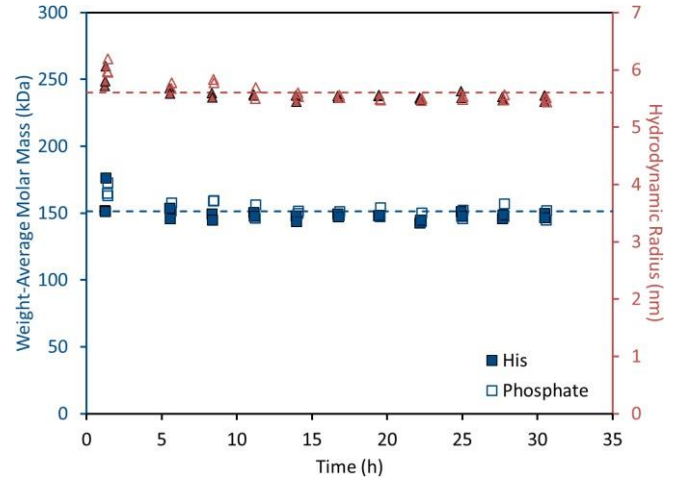


図11. NIST提供の非常に安定したmAb標準試料の40°Cにおける経時変化測定結果。青は重量平均分子量、赤は流体力学的半径で、これらの加速ストレス条件下では双方とも変化しません。

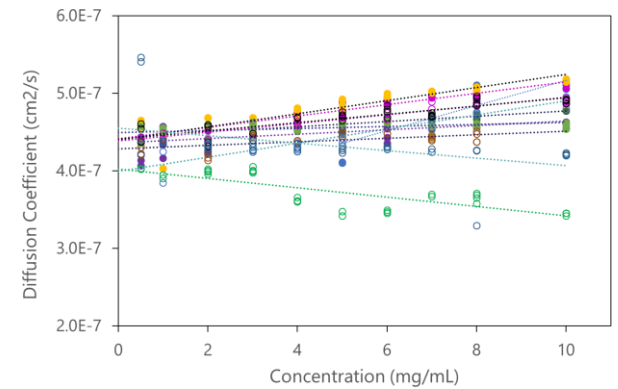
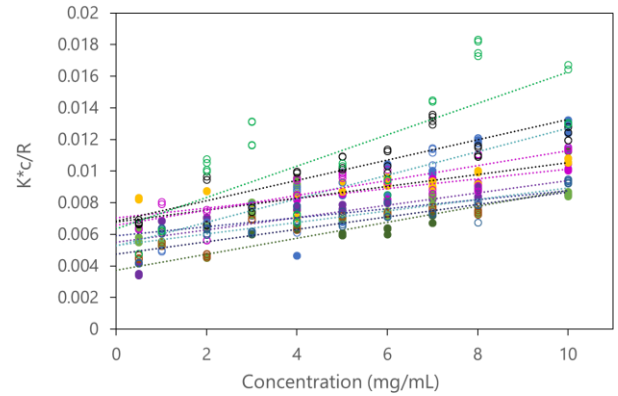


図12. 図10で使用したデータを用いて、複数条件のA2とk_Dの測定データ。各々見かけの分子量（上）と拡散係数（下）対濃度のプロットを示し、その傾きが、各々A2、k_Dと関連します。

コロイド安定性：A2とKD

複数の蛋白質濃度既知の試料を測定し、光散乱強度及び拡散係数の濃度依存性を測定することで、第二ビリアル係数A2と拡散相互作用パラメータK_Dを得ることができます。図12は、1枚の384ウェルプレートで、12種類の製剤条件をn=3で測定した例です。PRIIIは、プレートをスキャンし、データを取得した後（1.5時間以内）、DYNAMICSソフトウェアは、グラフを自動的に上書きし、結果を分析して、各条件のコロイド安定性のこれらの指標を決定します。

温度安定性：アンフォールディングと凝集の温度

熱変性は、バイオ製剤候補の開発可能性と最適な安定性を評価するために、利用される別の安定性を示す測定値です。熱安定性を決定する手法は、幾つかあり、それぞれが分子の異なる物理的特性を分析します。これらの技術の多くは、蛍光色素などの外因子プローブ、または内部蛍光（IF）や示差走査熱量測定（DSC）などの間接信号に依存しています。唯一、光散乱のみが、熱に誘発された変化の直接的な生物物理学的証拠を提供します。

- SLSによる分子量測定は、凝集の直接的な証拠になります。
- DLSによる粒子径測定は、アンフォールディング及び/または、凝集の直接的な証拠になります。

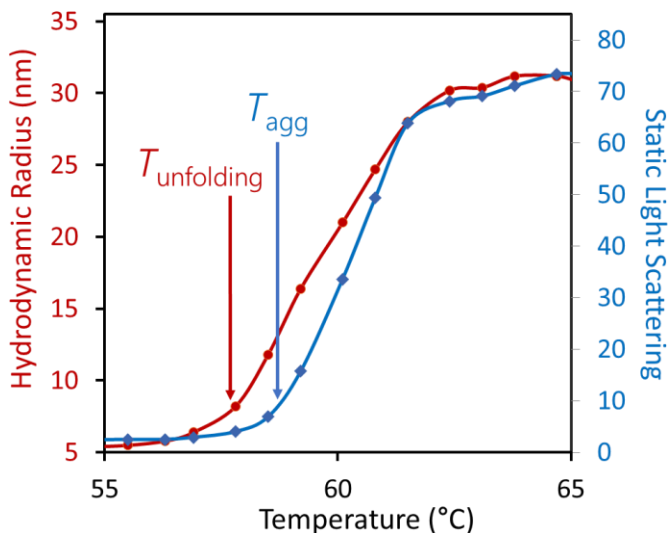


図13. IgGの2つの遷移温度の同時測定例。凝集はSLSから、アンフォールディングはRh（DLS測定）から決定できます。凝集が起こるため、この蛋白質の真の融解温度を決定することはできません。

PRIIIは、一度の温度勾配で、複数の候補または製剤の複数の遷移温度を決定できます。

- T_{agg}は、SLSにより決定できる、凝集の開始温度です。
- T_{onset}は、DLSにより決定できる、アンフォールディングの開始温度です。
- T_mは融解温度、つまり折りたたまれた状態と変性した状態の間の遷移の中間点であり、凝集が発生していないことをSLSで確認し、DLSにより決定されます。

内部蛍光（IF）は適切なフルオロフォア、通常はトリプトファンまたはチロシンの存在を必要とし、これらのアミノ酸を含まないドメインのアンフォールディングを報告しない場合があります。更にIFは、様々なバイオ製剤、特に抗体薬物複合体（ADC）で凝集を誘発することが実際に知られている短波長UV励起を使用する必要があります。従って凝集を定量化するためにUV散乱に依存する装置は、実際には凝集を発生させる原因である可能性があります。DynaPro PlateReaderで使用しているレーザー波長は、赤外線波長830nmであり、凝集を誘発することはありません。

相互作用の開始温度

IFとDSCでは、それらの信号がアンフォールディングや構造的不安定性を示している十分な理由がある場合でも、熱遷移の過程で、蛋白質相互作用にどのような変化が起こっているかを示すことはできませんが、光散乱測定では、それが可能です。

A₂とK_Dは、蛋白質間相互作用の直接的な証拠になります。それらの温度依存性を測定することで、蛋白質の構造がどの温度で変化したかを知るだけでなく、変化がより引力の働く相互作用（したがって不安定）に繋がるのか、より斥力の働く相互作用（したがって安定）に繋がるのか、あるいは、どちらにもならないのかが判明します。

場合によっては、蛋白質間相互作用の転移温度は、アンフォールディングまたは凝集の開始温度とは、異なることが観測されています。これらの3つの温度は、蛋白質の安定性の様々な側面と相関している可能性が高く、それらの測定により各蛋白質候補または製剤の特性に関する追加の洞察を得ることができます。

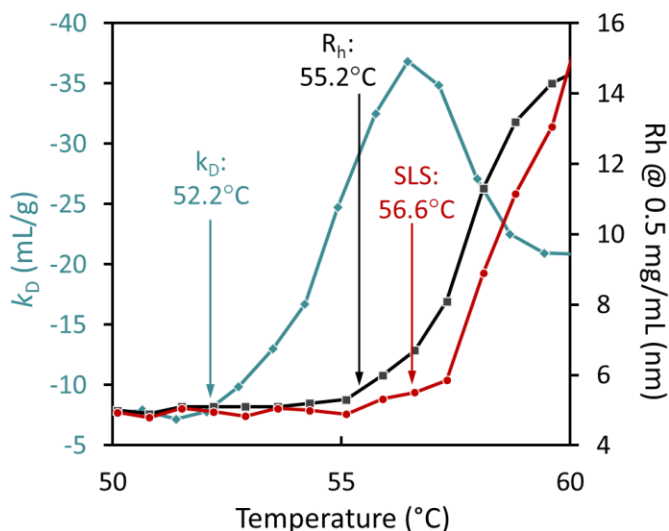


図14. IgGの3つの遷移温度の同時測定例。凝集（SLSより）、アンフォールディング（Rhより）、相互作用（ k_D より）。 k_D の値が、ますます負になることは、アンフォールディングまたは凝集が始まるかなり前に、コロイド引力が強くなっていることを示しています。

粘度

皮下注射であろうと眼への送達であろうと、モノクローナル抗体及び他のバイオ製剤の製剤化は、ますます高濃度で行われています。これらの条件下での溶液粘度は、製造、加工、保管だけでなく、注入性にも悪影響を与える可能性があるため、開発パイプラインのできるだけ早い段階で、高粘度を特定して、それを軽減することが不可欠です。

PRⅢは、ハイスループット、少量の粘度スクリーニングに最適な装置です。測定に必要なのは、マイクロプレートの各ウェルに、100nmのポリスチレンラテックスやPEGコーティングされた金ナノ粒子などの粒子径既知の標準粒子を微量滴下することのみです。粒子の拡散係数は、溶液粘度 η に反比例するため、DYNAMICSは試料溶液で測定した標準粒子の拡散係数と、水中で測定した時の（もしくは既知の粒子径から計算された）拡散係数を比較することにより、即座に粘度 η を計算します。DLSで測定した値は、従来の低スループットかつ大量の手法で測定した値と相関が取れています。

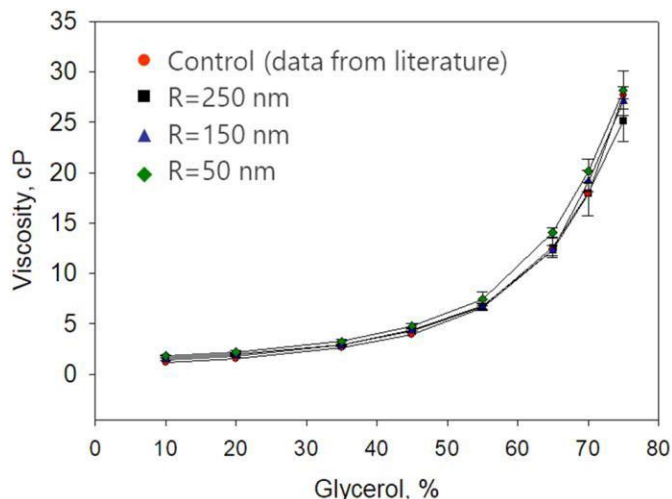


図15. DLS測定で求められた粘度と従来の測定法で求められた粘度の比較。RはDLS粘度測定に使用されたポリスチレンラテックスビーズの粒子径を示します。

濁度による溶解度

溶解度は通常、濁度を測定することにより評価され、それは透過率の低下または散乱強度の増加として表されます。PRⅢは、プレートを用いたハイスループット、少量での静的光散乱による溶解度測定の手段を提供します。これは必要に応じて、比濁単位で校正することも、単にノーマライズされた散乱強度として表すこともできます。

PEG誘導沈殿は、一連の製剤の溶解度を評価するために、PRⅢで実施できるもう1つの一般的安定性アッセイです。散乱による比濁分析に加えて、カメラ画像から沈殿を視覚的に捉えることもできます。

製剤の状態図

バイオ製剤は、特徴付ける非常に多くの特性と、pH、イオン強度、使われている塩の種類、様々な種類の糖や界面活性剤を含む追加の賦形剤などの非常に多くの製剤の変数を備えているため、研究者が全ての情報を要約しやすいように整理する手法を探していることは驚くべきことではありません。1つのアプローチは、図17のような状態図です。

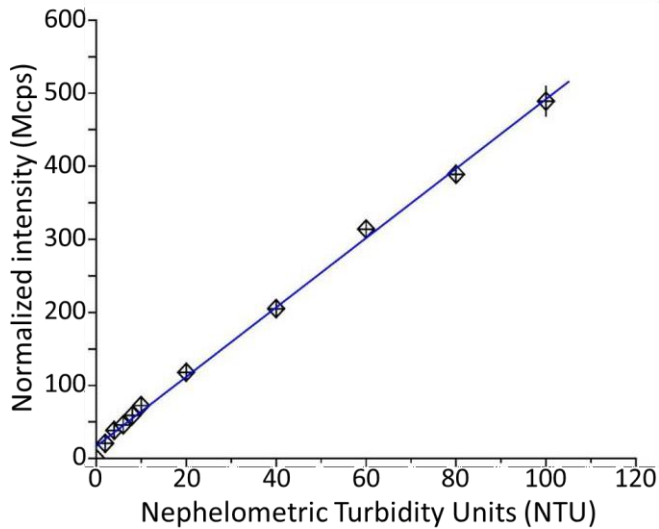


図16. SLS測定値は、ネフェロ分析濁度単位 (NTU) に校正できます

状態図は、2つの製剤変数 (pH、塩濃度、蛋白質濃度 など) と、2つ以上の溶液特性 (T_{agg} 、 K_D 、粘度など) を決定する実験マトリックスを組み合わせたものです。境界線は、各特性の許容範囲と許容範囲外を生成する様々な範囲の製剤を分離し、許容範囲の交点は白で強調されています。この多変量分析は、最適な製剤設計区域を決定するのに役立ちます。

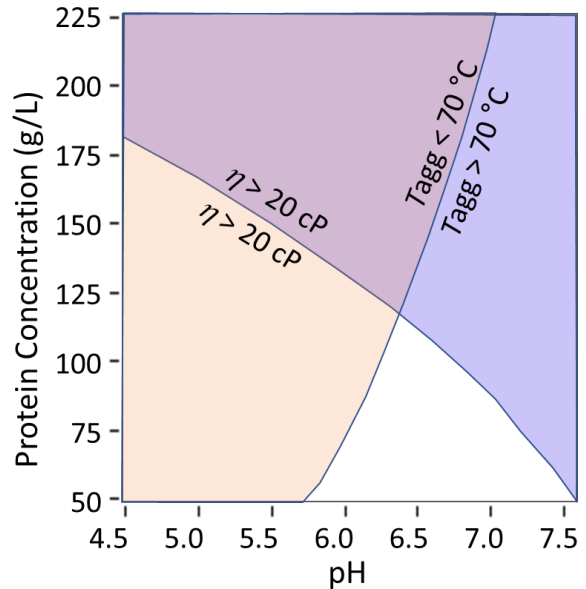
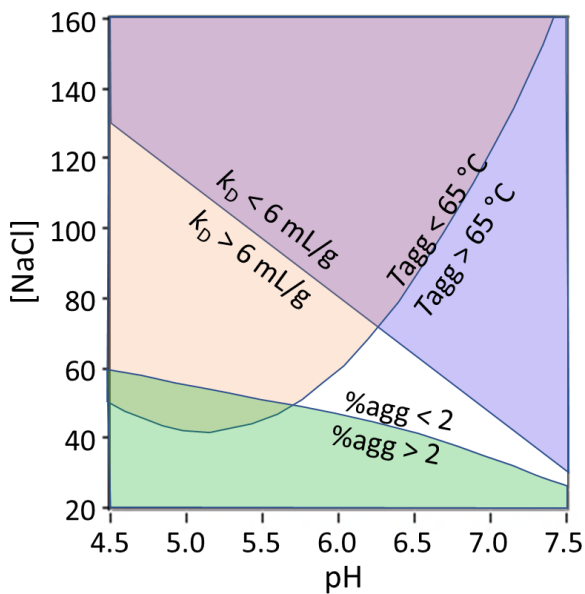


図17. 最適な製剤スペースの計画を立てるために使用される状態図。左：白スペースは、コロイド安定性を示す k_D が6mL/gを超える値に対応し、コンフォメーション安定性に関連する T_{agg} は65°Cを超え、2%未満の25°Cでの大きな凝集体の発生に対応します。右：白スペースは、注入性に関連する溶液粘度が20cP未満、熱安定性に関連する T_{agg} は70°Cを超える温度に対応します。

PRIIIは、一度の測定で、以下の複数の重要な生物物理学的特性を堅牢かつ簡便にマッピングできます。

- 平均粒子径
- 平均分子量
- 多分散度
- 大きな凝集体の検出と定量
- 拡散相互作用パラメーター k_D
- アンフォールディングの開始温度 T_{onset}
- 凝集開始温度 T_{agg}
- 相互作用の開始温度
- 溶解性
- 溶液粘度

さらに、標準プレートで、多数の条件を測定することにより、状態図の作成やさらに複雑な多変量分析を可能にします。

エピローグ：より生産的に

バイオ医薬品を早く市場に出すことが目標である場合、いかに生産性を向上させるかが重要です。より多くの指標をカバーする、より多くの蛋白質の品質と安定性分析をより迅速に行う必要があります。DynaPro PlateReader IIIは、この夢の実現に役立ちます、多くの試料、条件、及び複製にわたって、堅牢で信頼性の高い動的及び静的光散乱測定を提供します。そして、それら全てを自動で、簡便に行うことができます。

本資料に関する問い合わせ先：昭光サイエンス株式会社 (info@shoko-sc.co.jp) まで



本ホワイトペーパーは、Wyatt Technology Corporationが全著作権を所有しています。Wyatt Technology社による書面での事前許可なく、電子的、機械的、コピー、記録、またはいかなる手段を問わず、本ホワイトペーパーの一部を複製したり、検索システムに保存したり、変換することはできません。