

AN5008: DynaPro® Plate Reader を用いたハイスループット凍結融解安定性試験

Martin Kurnik, Ph.D., Wyatt Technology Corporation

日本語訳：昭光サイエンス株式会社

概要

凍結融解安定性試験は、様々な製品の開発において重要な鍵となります。本稿では [DynaPro® Plate Reader](#) を使用して、単一のマルチウェルプレートで凍結融解効果を測定する方法を紹介します。プレートリーダーで静的および動的光散乱を同時に測定することにより、各凍結融解サイクルにおける分子サイズと分子量を直接定量化できるので、研究者はアンフォールディング、凝集、またその他の構造と安定性の変化の始まりを評価することができます。この非破壊的アプローチにより、複数のアリコート（標品）を使用する必要がなくなり、各サイクル後に同じサンプルを評価することができます。[DynaPro Plate Reader](#) は、迅速で堅牢、かつコストパフォーマンスが高いため、凍結融解試験を効率化するための優れた選択肢となります。

イントロダクション

バイオ医薬品を含む腐敗しやすい製品は、劣化を防ぎ保存期間を延ばすために、しばしば氷点下の温度で保存または輸送されます。しかし、物質の凍結融解は、濃度勾配、低温変性、機械的ストレスなどを誘発し、凝集、効力の低下、その他の望ましくない効果をもたらす可能性があるため、望ましい物理的特性を損なう可能性があります。そのため、凍結融解安定性試験は、化粧品や食品¹からファインケミカル、医薬品、ワクチンまで、幅広い製品の開発、流通、保管を成功させるための必須条件となっています^{2,3}。凍結融解安定性を評価することは、堅牢な製品を市場に送り出すための必要条件ではあるものの、分析のためにプレートからマイクロキュベットなど他の容器にサンプルをピペティングしなけれ

ばならないなど、手間と費用がかかることがあります。

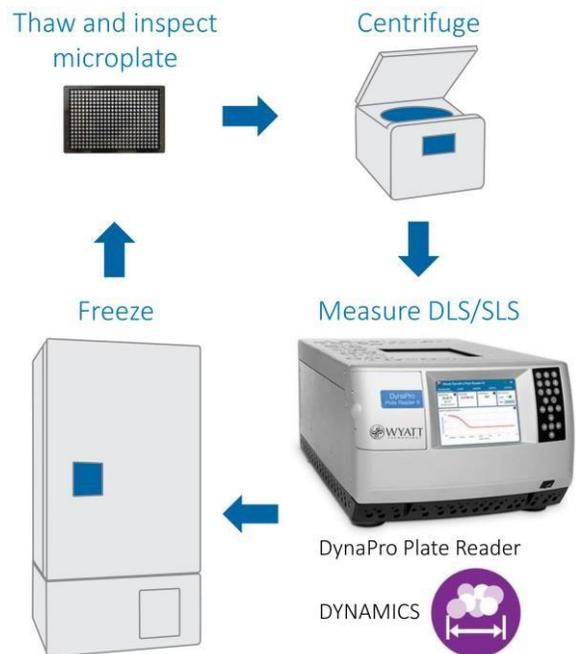


図 1. ハイスループット DLS/SLS による標準マイクロウェルプレートでの凍結融解安定性測定。

DynaPro Plate Reader は、単一のマイクロウェルプレートの中で、凍結融解効果の最初から最後までを定量化することができます（図 1）。動的光散乱（DLS）と静的光散乱（SLS）を組み合わせたその機能は、試料の安定性を定量化するのに理想的です。DLS と SLS は、粒子径 (R_h)、分子量 (M_w)、凝集傾向、分子間相互作用 (k_D と A_2 として定量化)、粒子濃度（脂質ナノ粒子やウイルスベクターの物理的力価など）など、任意の分析物に関連する複数の安定性指標を監視するために使用されます。この装置では、1 ウェルあたりわずか $30 \mu\text{L}$ という最小限の容量しか使用せず、サンプルは実験中ずっと同じプレ

ートに入ったままです。この手法は、市販のマイクロプレートを使用して行われ、最小限の消耗品コストで済みます。

このアプリケーションノートでは、DynaPro Plate Reader を使用して、ハイスループット DLS/SLS による凍結融解安定性試験を行う方法を紹介します。凍結、融解、およびその後の分析はすべて *in situ* で行われます。その結果、最初のプレートへの注入以降、液体の取り扱いが不要になり、スループットが最大化され、クロスコンタミネーションが回避されます。この方法では、各凍結融解サイクルの異なるアリコート（標品）を測定するのではなく、アッセイの全期間にわたって同じサンプルを測定します。

材料と方法

サンプルと装置

ウシ血清アルブミン (Fisher Scientific) は pH7.4 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に 2 mg/mL で調製し、炭酸脱水酵素 (Sigma-Aldrich) は同じ PBS 中に 4 mg/mL で調製しました。すべてのサンプルとバッファーを Whatman Anotop syringe tip filters (Cytiva) 0.02 μm を用いてフィルターろ過し、384-well マイクロプレート (Aurora Microplates) に注入しました。各サンプル 30 μL を各ウェルごとに注入し、タンパク質ごとに 25 回複製しました。

分子量の SLS 測定を可能にするため、ddH₂O 中に 2 mg/mL から 10 mg/mL の濃度に調製したロット認証済み 40 kDa デキストラン (Wyatt Technology) でプレートを校正しました。その後、プレートをポリオレフィンシールテープ (Thermo Fisher) で密封し、1000 x g で 1 分間遠心分離して気泡を除去しました。シーリングテープは、すべての測定とすべての凍結融解サイクルの間、所定の位置に保たれました。

凍結融解安定性測定

測定はすべて DynaPro Plate Reader を用い、DYNAMICS® software を用いて 25°C で行いました。最初の測定 (0 サイクル目) は、冷凍庫での最初のインキュベーションの前に行われました。凍結前に、

プレート外面の結露を抑えるため、チャック付きビニル袋にプレートを入れて密閉しました。

凍結融解サイクルごとに、プレートを超低温フリーザー (Fisher Scientific) に入れ、-80°C で最低 16 時間凍結させました。その後、プレートを袋から出さずに 37°C で 30 分以上解凍し、解凍を促進させました。プレートを装置にセットする前に、プレート底部にフィルターを通した圧縮空気を吹き付けて埃を除去しました。1000 x g で 1 分間遠心した後、プレート底部に再び圧縮空気を吹き付けて、次の測定のために DynaPro Plate Reader にセットしました。自己相関関数、流体力学的半径 (R_h)、多分散性指数 (PDI)、サイズ分布、重量平均分子量 (M_w) などの測定を実施しました。この手順を、合計 6 回の凍結融解サイクルで繰り返し行いました。

結果と考察

この方法を実証するために、よく知られた 2 つのタンパク質を使用しました。ウシ血清アルブミン (BSA)、およびウシ赤血球由来の炭酸脱水酵素 (CA) です。両タンパク質は、実験開始条件下では主に単量体であることが知られており、流体力学的半径はそれぞれ 3.5 nm と 2.7 nm⁴、分子量は 66.4 kDa と 30 kDa⁴です。

この 2 つのタンパク質を 6 回の凍結融解サイクルでモニタリングしたところ、BSA は安定で凍結融解プロセスの影響を受けないのに対し、CA は不安定で凝集を起こすことがわかりました。

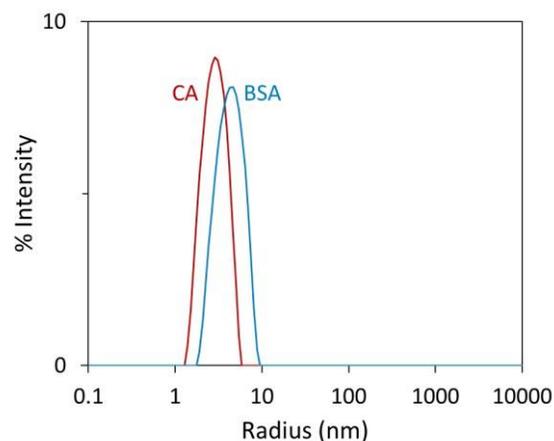


図 2. 凍結前の BSA (青) および CA (赤) サンプルのサイズ分布

凍結前のサンプルの特性評価

調製した直後のサンプルでは、BSA も CA も主に単量体として存在します。具体的には、DLS による R_h 値は BSA で 3.96 ± 0.09 nm、CA で 2.70 ± 0.04 nm であり、サイズ分布はモノモーダル、すなわち単一のピークのみを含んでいました (図 2)。PDI は BSA で 0.12 ± 0.03 、CA で 0.10 ± 0.06 であり、両サンプルは極めて単分散であることがわかりました。

SLS によって測定された M_w 値も、BSA が 71.3 ± 5.5 kDa、CA が 26.6 ± 1.3 kDa と、ほとんど単量体のタンパク質と一致しています。BSA の M_w 値は、実験条件下で二量体、三量体、高次オリゴマー成分が少量存在するため、単量体 BSA の予想より幾分か大きい値となっています。

BSA : 凍結融解ストレスに対して安定

凍結融解によって BSA が凝集することはありませんでした。自己相関関数 (ACF) は連続した凍結融解サイクルの後でも変化せず、サンプルがこのプロセスによって変化しないという結論を支持しています (図 3、上)。

DLS データの解析では、平均流体力学的半径や多分散性の増加 (増加はオリゴマー化を示す)、またレギュラリゼーション解析によって得られたサイズ分布で確認できる大きな凝集体の生成も見られませんでした (図 3、下)。6 回目の凍結融解サイクルの終了時には、 $R_h = 3.85 \pm 0.06$ nm となり、凍結前に測定した半径の 3% 以内に収まっていた (図 4)。 M_w 値も 77.4 ± 3.9 kDa と実質的に変化していません。

これらの結果から、BSA は凍結融解を繰り返しても、そのサイズ分布や分子量は変わらず、安定なタンパク質であることがわかりました。

CA: 凍結融解ストレスに対して不安定

BSA とは対照的に、CA は実験の経過とともに凝集し、不安定なサンプルの一例となりました。凍結前、CA は主に単量体であり、溶液中に大きな凝集体は存在しません (図 2)。しかし、最初の凍結融解サイクルですでに、CA サンプルに凝集の兆候が見られます。25 個の複製サンプル中 20 サンプルで少量の凝集体が形成され、ACF に収束時間の長い減衰フェーズが現れていることがわかりました (図

5、上)。PDI は 4 倍の 0.41 ± 0.19 に増加し、サンプルがより多分散になったことが示されました。 M_w も最初の凍結融解サイクルで 20% 以上増加し 32.3 ± 4.7 kDa となり、その相対標準偏差は 4.8 % から 14.5 % に増加しました。

これらの結果はすべて凝集の兆候であり、サンプルの凍結融解により、CA 粒度分布の不均一性が複製サンプル内および複製サンプル間の両方で増加することを反映しています。

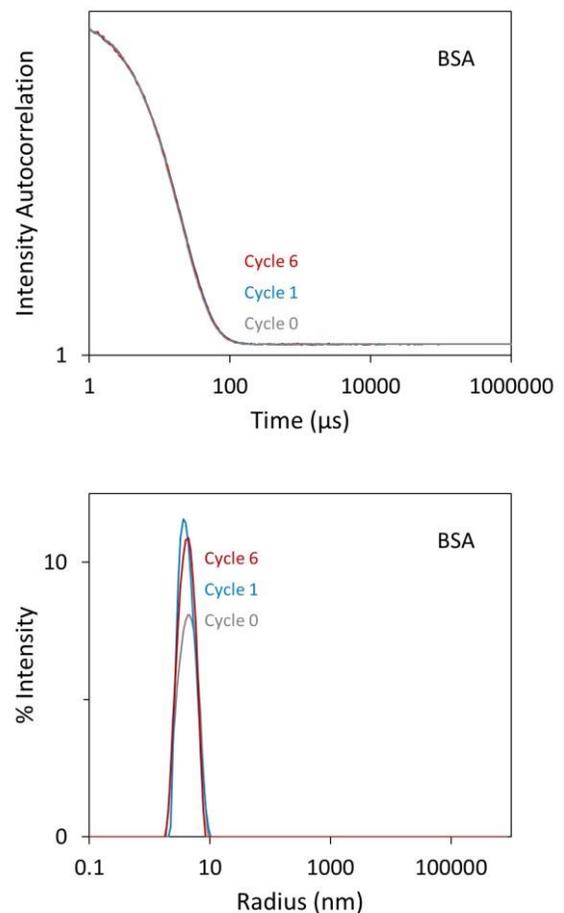


図 3. BSA の自己相関関数 (上) とそれに対応するサイズ分布 (下) の比較。凍結前 (0 サイクル、灰色)、凍結融解 1 サイクル後 (青色)、6 サイクル目 (最終凍結融解サイクル) 後 (赤色)。BSA は主に単量体のままであり、凍結融解の過程で凝集体は形成されない。

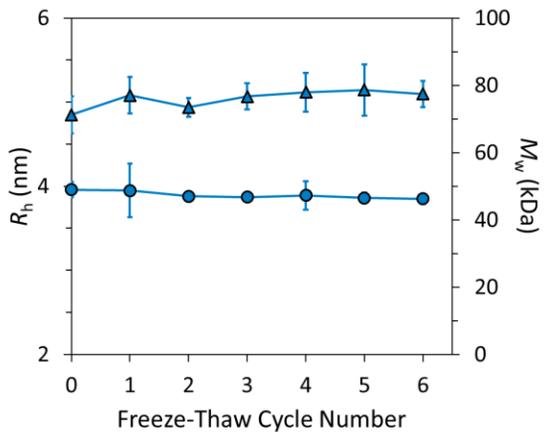


図4. 安定なサンプルである BSA の凍結融解の結果。 R_h (丸) および M_w (三角) は、6 回の凍結融解サイクルで有意な変化はない。エラーバーは 25 個の複製サンプルの標準偏差を表す。

6 サイクルの間に、25 個の CA 複製サンプルはすべて、単量体と多量体凝集体の多峰性混合物となりました。例えば 1 サイクル目では、レギュラリゼーション解析により、複製サンプルの 75% で 10-500 nm の範囲に凝集体が形成され、平均で R_h は 244 ± 135 nm、散乱強度分布における寄与率は $(8.7 \pm 6.0)\%$ であることが判りました (図 5 下段の代表データ)。1 つの複製サンプルを除いて、サイクル 1 では 1000nm を超えるさらに大きな凝集体成分も含まれており、光散乱強度分布での寄与率は $(16.8 \pm 13.7)\%$ でした。サイクル 6 では、この成分からの光散乱強度寄与率は $(21.7 \pm 15.6)\%$ に増えました。 M_w はその後の凍結融解サイクルでさらに増加し、実験終了時には (49.1 ± 10.0) kDa となりました。これは、追加 5 サイクルでサンプル中の凝集体成分の分子量または濃度が増加したことを示唆しています (図 6)。

また、レギュラリゼーション解析を用いて、元々の主要成分の相対光散乱強度が凍結融解によってどのように変化するかを調べることができます (図 7)。DYNAMICS ソフトウェアでは、相対強度に加え、大きな凝集体を含む各成分の分子量と個数の割合も推定することができます。

例えば、図 7 の CA の結果に対応する質量割合を確認すると、凝集体の大きさは非常に大きいものの、質量に占める割合は 1%をはるかに下回っていることがわかります。この結果は、DLS が初期段階の微小な凝集量でも検出できる大変優れたツールであることを示しています。

また、SEC-MALS 分析では、最大の凝集体がフィルターで除去されたり、カラムによるせん断で破壊されたりする可能性があることにもご留意下さい。したがって、バッチ DLS 測定は、SEC-MALS による凝集体分析をうまく補完することができます。

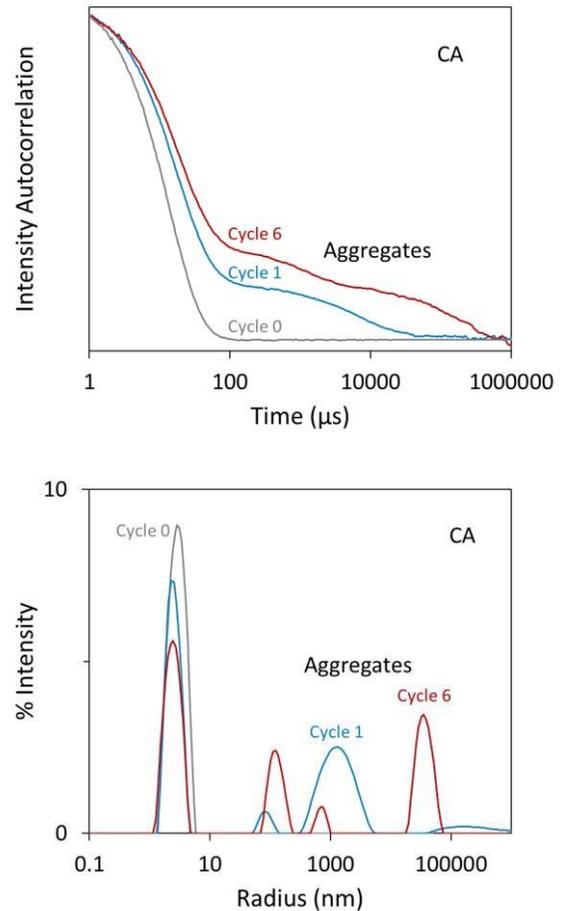


図5. CA の安定性は、自己相関関数 (上) およびサイズ分布 (下) に示すように、最初の凍結融解ステップの後に損なわれる。1 回の凍結融解サイクルで大きな凝集体が形成される (青)。凝集は最終サイクル (6 サイクル目; 赤) でさらに顕著になる。

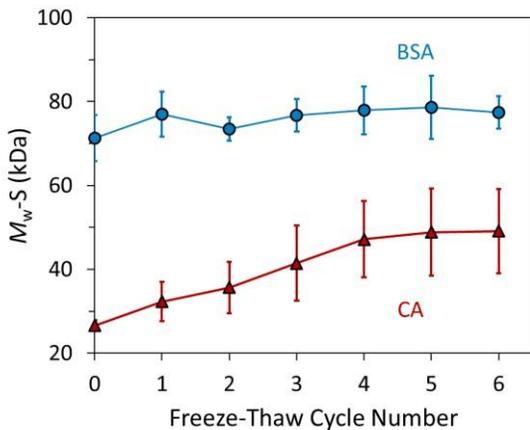


図 6. 分子量のモニタリングにより、安定したサンプルと不安定なサンプルを区別することができる。25 個の複製サンプルの分子量平均値と標準偏差を示す。BSA (青) は、6 回の凍結融解サイクルで分子量に大きな変化は見られなかった。CA (赤) の見かけの分子量は、最初の凍結融解サイクルから凝集体の形成により増加し始める。

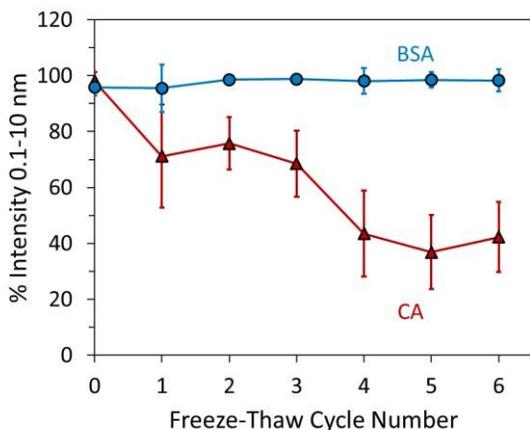


図 7. 10nm 以下の成分の相対的な光散乱強度を追跡することで、進行する凝集を監視できる。この相対的な寄与は、CA サンプルで凝集体が形成されるにつれて減少するが、安定した BSA サンプルでは変化しない。エラーバーは、25 個の複製サンプルの標準偏差を表す。

結論

ここでは、BSA と CA という 2 つの一般的なタンパク質の安定性を評価し、ハイスループット凍結融解安定性研究に DynaPro Plate Reader を使用することの利点を実証しました。標準的なマイクロウェルプレートの中で凍結融解と測定を繰り返したところ、BSA は凍結融解の影響を受けませんが、CA は最初のサイクルで凝集し、その後のサイクルでも凝集が続くことが分かりました。測定にかかる時間は 1 サンプルあたり 1 分未満で、プレートをセットした後に

必要な作業時間は、フリーザー、遠心分離機、プレートリーダー間のプレート移動のみです。

今回の検証ではタンパク質を使用しましたが、ここで説明した凍結融解のワークフローは、幅広いサンプルに使用することができます。具体的には、AAV⁵ やその他のウイルスベクター、脂質ナノ粒子など、0.5 nm から 1000 nm までの粒子を定量することができます。また、今回使用したプレートは、クリーンベンチ内で消毒して密閉できるので病原体等への暴露を防ぐことができ、-80°C までの温度にも対応しています。測定は非破壊で実施できるため、同じサンプルでの直交分析が可能で、マイクロプレートやシールテープの性能が凍結融解によって損なわれることはありません。

また、データ解析には最小限の作業時間で充分です。DYNAMICS ソフトウェアは、サンプルの定義やデータ解析のためのカスタマイズ可能なテンプレート、実用的なアドバイスを提供する自動データ品質指標、安定したサンプルと不安定なサンプルを識別するための迅速で簡単な方法を数多く提供します。DynaPro Plate Reader は、この機能に加え、精密な温度制御 (4~85°C) と自動化を実現した唯一の機器であり、より迅速でコスト効率の高い凍結融解安定性測定を可能にするユニークなツールです。

謝辞

カリフォルニア大学サンタバーバラ校の Michelle O'Malley 教授には、超低温冷凍庫での保管実験のご協力をして頂きました。感謝申し上げます。

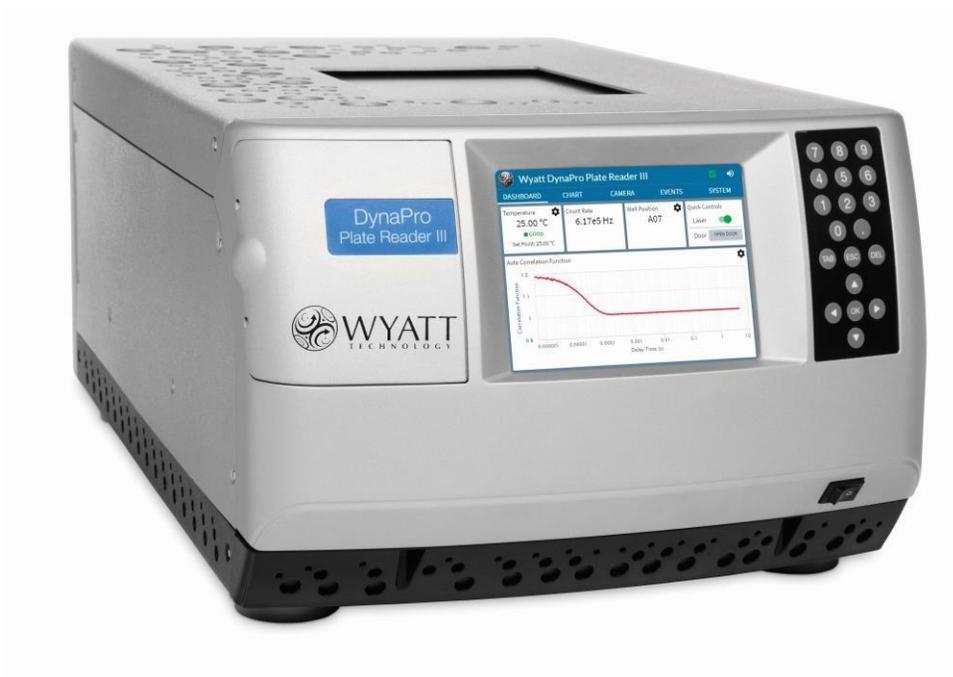
引用文献

1. Rayner, M. et al. Biomass-based Particles for the Formulation of Pickering Type Emulsions in Food and Topical Applications. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 458, 48-62 (2014).
2. Crommelin, D.J.A. et al. Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *J. Pharm. Sci.* 110, 997-1001 (2021).
3. Kahn, M.M. et al. Stability Challenges Not Addressed by Harmonized Guidance – AAPS Workshop of the Stability Focus Group, April 3rd- 4th, 2017 in Rockville, MD. *AAPS Open.* 4, 2 (2018).

4. Krishnamurthy, V.M. et al. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein–Ligand Binding. *Chem Rev.* 108(3), 946-1051 (2008).
5. Bee, J.S. et al. Impact of Time Out of Intended Storage and Freeze-thaw Rates on the Stability of Adeno-associated Virus 8 and 9. *Pharm. Biotechnol.* 111, 13461353 (2022).

DynaPro Plate Reader に
ついてさらに詳しく

DynaPro Plate Reader の
見積もり依頼



© Wyatt Technology Corporation. 無断転載を禁じます。本書のいかなる部分も、Wyatt Technology Corporation の書面による事前の許可なく、電子的、機械的、複写、記録、その他のいかなる手段によっても、複製、検索システムでの保存、送信することを禁じます。本書には、Wyatt Technology Corporation の1つ以上の商標またはサービスマークが記載されている場合があります。Wyatt Technology Corporation の商標およびサービスマークの一覧は、<https://www.wyatt.com/about/trademarks> を参照してください。