

抗体の安定性を予測するための 電荷及び相互作用解析

Julia Deuel and John Champagne, Wyatt Technology Corp.

日本語訳：昭光サイエンティフィック (株)

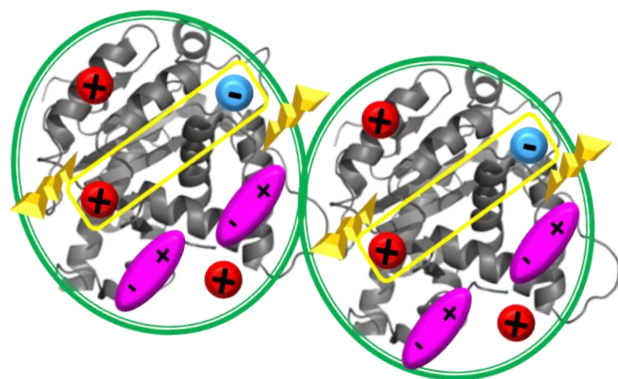
概要

コロイド安定性はバイオ医薬品の長期安定性の指標となる重要な溶液物性です。この物性は表面電荷、疎水性パッチや他の関連する現象に基づく弱い相互作用の総和に由来し、凝集の指標となります。この物性は長期間保存の際の安定性評価はもとより、劣化促進安定性評価よりもずっと短時間で測定可能であるため、コロイド安定性の測定は、不適切な調製・保存条件を除外するための条件検討（フォーミュレーション作業）においてしばしば用いられます。

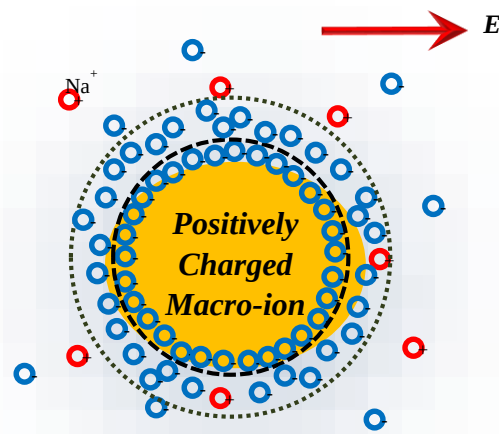
正味表面電荷は、電気泳動光散乱測定により求められます。[ゼータ電位測定器Möbius](#)は超並列位相解析光散乱法（MP-PALS）法により電気泳動光散乱測定を行い、同時に動的光散乱（DLS）法による流体力学的半径を求めることができます。電荷が大きく、かつ適当な濃度のある試料においては、正味電荷を測定することで凝集しやすさを十分に予測できます。しかしながら、電荷が比較的小さい試料の場合は、他の情報と組み合わせた解釈が必要になります。

適当な濃度の蛋白質溶液における非特異的相互作用の大きさは、拡散相互作用パラメータ k_D で記述されます。この物理量はDLSによって決定される拡散係数の濃度依存性から得られます。[Möbius](#)はオートサンプラーに接続でき、電荷の決定と並行して k_D の測定の自動化に対応します。

このアプリケーションノートでは、異なる安定性の挙動を示す2つの調製法の違いを理解するために、正味電荷と k_D を組み合わせた測定例について述べています。その結果、抗体はほぼ同じ正味電荷をもっているものの、その値は相対的に小さく、安定性は非対称の電荷分布や疎水性残基といった二次的な効果によって支配されていることがわかります。



コロイド安定性は正味電荷と他の弱い相互作用の総和の影響を受けます



電荷は電気泳動移動度すなわち、電場を掛けた際の荷電分子の動き及び流体力学的半径から求められます



WYATT
TECHNOLOGY



SHOKO
SCIENTIFIC

I. 序論

タンパク質のコロイド凝集は、比較的弱い静電的相互作用の複雑な配置に由来します。タンパク質の正味電荷及び非理想性（非特異性相互作用）を解析することは、凝集形成の傾向予測のみならず、特定の製剤における溶解性や粘性の特徴を理解することに繋がります。Möbiusを用いると、タンパク質の電荷及び非理想性を求めることができ、その自動化にも対応します。電荷は電気泳動移動度から求められ、非理想性は拡散相互作用パラメータ k_D から求められます。Möbius は位相解析光散乱（PALS）法により 高分子の電気泳動移動度を測定し、同時に動的光散乱（DLS）により k_D も測定できます。

$Z_{\text{effective}}$	Z_{DHH}	Colloidal Stability
0 to 0.5	0 to 1.5	Coagulation/Flocculation
1 to 3	3 to 9	Incipient Instability
3 to 4	9 to 12	Moderate Stability
4 to 6	12 to 18	Good Stability
> 6	>18	Excellent Stability

表 1. 有効電荷 ($Z_{\text{effective}}$)、Debye-Henry-Huckel 電荷と予測されるコロイド安定性の関係
Dr. Tom Laue, Biomolecular Interactions Technology Center, University of New Hampshire よりご提供頂いたデータです。

DLS により移動度から正味電荷を求める際に必要な流体力学的半径 (r_h) を測定できます。この r_h は以下の Debye-Henry-Hückel の式に使用できます。

$$Z^*e = 6\pi\eta r_h \mu_E \frac{1 + \kappa r_h}{f_1(\kappa r_h)}$$

ここで η は溶媒粘度、 κ はデバイ長の逆数、そして $f_1(\kappa r_h)$ はヘンリー関数です。表 1 に示すように Debye-Henry-Hückel 電荷はコロイド安定性の指標になります。

電荷はタンパク質の溶解性、安定性、粘度を予想する唯一の指標として使われることもあります（表 1）、もう一つのタンパク質安定性の指標として、拡散相互作用パラメータ (k_D) が、タンパク質表面の他の現象による相互作用を理解するために用いられます。

拡散相互作用パラメータは DLS で測定でき、多角度光散乱検出器で測定される第二ビリアル係数 (B_{22} または A_2) と関連します。第二ビリアル係数は、非特異的な溶質-溶質相互作用の測定値です。非特異的相互作用には、双極子-双極子相互作用、ファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用が含まれます。 A_2 すなわち k_D の負の値は引力相互作用を示し、正の場合には斥力を示します。一般的に引力相互作用はタンパク質安定性が低いことを示し、これらの相互作用の結果として凝集が起こります。これらの相互作用は、緩衝液の塩濃度、pH および添加物による影響を受けるため、これらの測定は製剤開発において有用なツールになります。 k_D は、以下の式に従って、濃度(c)に対して拡散係数(D)をプロットした際の傾きから計算できます： $D = D_0 + k_D c D_0$ 。Möbius は DLS と PALS の同時測定を実現でき、タンパク質の性状解析の理想的な装置です。

本アプリケーションノートでは、様々な条件下で安定な抗体と不安定な抗体の 2 つの試料の電荷と k_D を比較しています。

II. 材料と方法

本実験は、Möbius と加圧システム Wyatt Atlas に Agilent 1260HPLC を接続することによる自動測定を行っています。試料はオートサンプラーによって Möbius のフローセル内に移動します。試料封入後、測定セル内は Atlas によって加圧され、移動度測定中に、電気分解による気泡が発生するのを防いでいます。また、すべてのデータ取得は DYNAMICS ソフトウェアで行っています。

試料は 10mMNaCl および 10mM のヒスチジンを含む pH 6.7 の緩衝液に対して透析しました。抗体 1 と抗体 2 はおよそ 2.0 ~ 10mg/mL で調製しました。DYNAMICS を用いて、まず DLS のみの自動測定を行い、次に、各濃度で DLS と PALS の同時測定を行いました。電流が試料の挙動に影響しないように、DLS は電圧をかける前に測定しました。 k_D を求めるために拡散係数対濃度のデータに対して直線回帰を行い、両抗体の k_D を求め、平均電荷は上述のように計算しました。



III. 結果と考察

両抗体の平均電荷は、抗体1では8,4、抗体2では6.1という近い値が得られました。つまり、表1の情報からは両抗体が“若干不安定”であることが示されました。

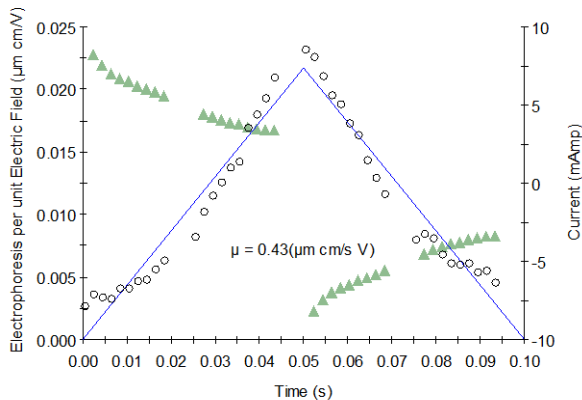


Figure 1. 抗体1の移動度グラフ、移動度データ (○), 電流 (Δ).

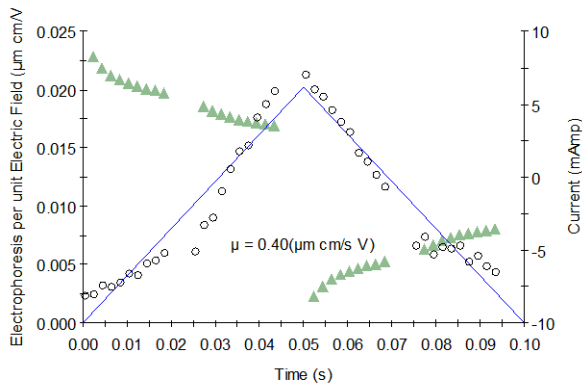


Figure 2. 抗体2の移動度グラフ、移動度データ (○), 電流 (Δ).

しかしながら、抗体1の安定性は低く、抗体2は優れた安定性を示し、正味電荷の情報と実際の傾向は異なっています。このような場合、 k_D 測定の実行は、溶液中での抗体挙動の有益な情報になります。測定の結果、抗体1は負の k_D (図3) を示し、抗体2は正の k_D を示しました。すなわち、抗体1の k_D の値が負であることから凝集しやすい傾向が説明できます。

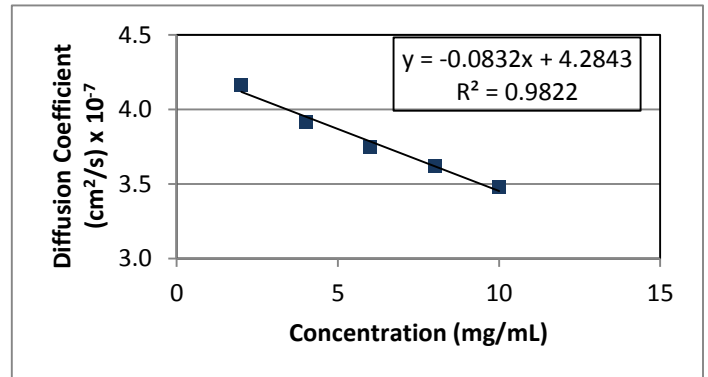


図3. 抗体1の濃度と拡散係数の関係を示します。傾きをy切片で割ることで k_D : -1.9×10^{-2} ml/mg と算出できます。

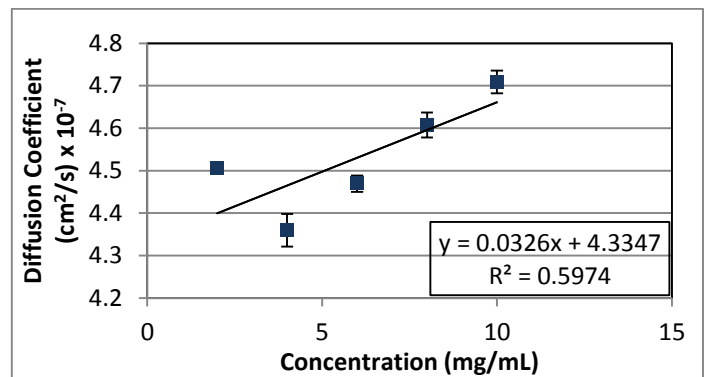


図4. 抗体2の濃度と拡散係数の関係を示します。傾きをy切片で割ることで k_D : 7.5×10^{-2} ml/mg と算出できます。



IV. 結論

電荷と拡散相互作用パラメータは双方とも、コロイド安定性の指標となる重要なパラメータです。しかし、電荷のみでは、安定性の要因を完全に理解できません。正味電荷は安定性の基準にはなりますが、分子の正味電荷が安定化に有利であるように見えても、局所的な電気双極子や疎水性残基によって不安定化される可能性があります。Wyatt Möbius は、電荷と k_D を同時に自動測定が可能な世界唯一の測定器です。この特長は、電荷や k_D を個々に測定するよりも、タンパク質の安定性の要因をより完全に理解することを可能としています。

V. 参考文献

1. He et. al; *High Throughput Assessment of Thermal and Colloidal Stability Parameters for Monoclonal Antibody Formulations*. J. Pharm. Sci. **100**(12), 5126-5141 (2011).
2. C. Lehermayr et al. *Assessment of Net Charge and Protein-Protein Interactions of Different Monoclonal Antibodies*, J. Pharm. Sci. **100**(7), 2551-2562, (2011)
3. Charles Tanford. *The physical chemistry of macromolecules* - Wiley (1961).

