

Application Note

Wyatt Technology Corporation

コロイド及び熱安定性の指標としての 拡散相互作用パラメータ (k_D)

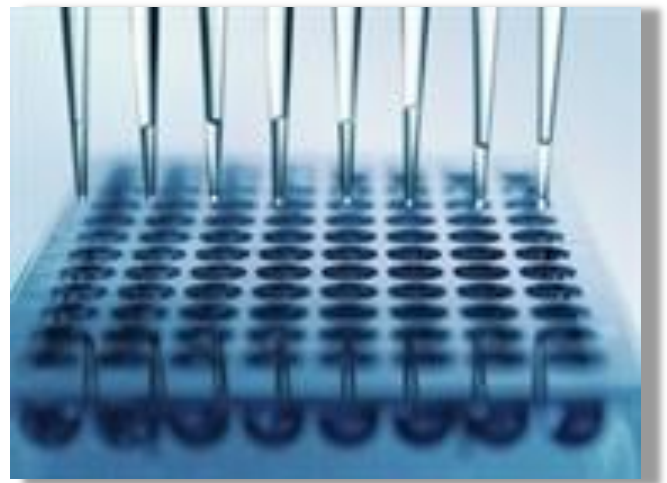
Sophia Kenrick, Ph.D.* and Daniel Some, Ph.D.†

日本語訳：昭光サイエンティフィック（株）

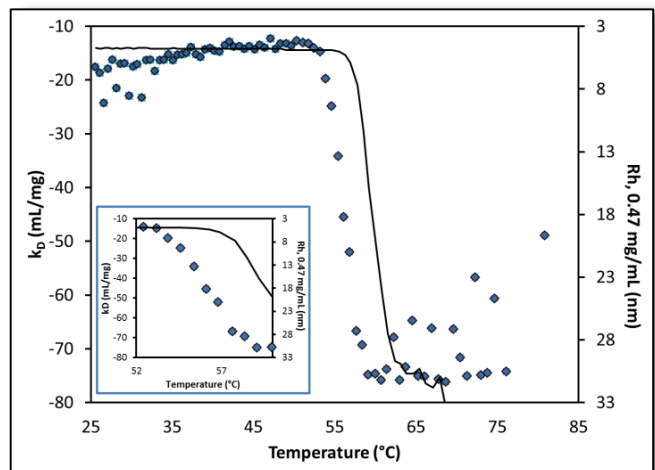
概要

タンパク質のコロイド安定性は、治療に用いられる生体分子の調製法の鍵となり得る重要な性質です。安定性の研究に費やされる時間、労力やコストを最小にするために、バッファー条件、添加剤、製剤の膨大な組み合わせを確実にテストすることができるハイスループットスクリーニング法が用いられます。スクリーニングで利用されるこれらの技術は、安定性の指標となるパラメータ (SIPs) を決定できるものでなくてはなりません。現在、最も役立つ SIPs は、短期間での凝集、熱安定性およびコロイド安定性です。

開発の初期段階にタンパク質製剤をスクリーニングできると、開発者は最適な候補製剤に集中することができます。時間、材料、予備実験を大幅に短縮することができます。本実験では、タンパク質の熱安定性とコロイド安定性、すなわち、凝集のしやすさに関する 2 つの指標と凝集状態を、動的光散乱(DLS)を用いたスクリーニングによって決定することができ、候補となる製剤の有効性と調製法の条件を同時にランク付けすることができることを示しています。DLS はまた、製剤の化学的安定性や溶液中の平均分子量や比容積を決定することができます。これらの理由から、HTS(ハイスループットスクリーニング)-DLS は候補分子、バッファー条件や添加剤についての多くの情報を提供してくれます。DnyPro® PlateReader II を使用することにより、調剤研究において最大限の生産性が得られます。



プレートリーダー型 DLS 装置を使用することにより、製剤研究において候補となるバイオ治療薬、添加剤、バッファー条件の多くの組み合わせについて信頼性の高い評価をすることができます。



DLS で測定される拡散相互作用パラメータ k_D は流体力学的半径の測定以前に、タンパク質の変性開始点の決定及びコロイド安定性の指標となります。

I. 序論

安定性は治療的に用いられる生体分子の鍵となる重要な性質で、人に用いられる薬の特性と適合性を確立するために重要です。しかし、候補分子の安定性や調製法を確立するには、多くの時間と手間がかかります。長期の安定性の研究に費やされる時間や労力、資金を最小化するために、生物製剤の開発者は、候補分子・添加剤・バッファー条件の数多くの組み合わせを確実にテストし、ランク付けることができるハイスループットのスクリーニング法に注目しています。

これらのスクリーニングで使用される実験技術は、安定性を示すさまざまなパラメータ(Stable-indicating parameters:SIPs)を決定できなければなりません。というのは、どのパラメータも1つでは、高温や凍結融解のような環境条件の様々なストレス下における長期的な貯蔵寿命や安定性を与えることが未だ証明されていないからです。

現在、もっとも有用な SIPs のいくつかを以下に挙げます。すなわち、短期間での凝集(普通、小さな凝集の形成); 熱安定性(通常、温度の上昇によって疎水性のコアが露出することによって変性ないし凝集する傾向); コロイド安定性(表面電荷、疎水性表面残基や類似の構造に関連した弱い引力による会合しようとする分子の傾向)です。これらの SIP は、お互いに全く独立しているわけではありません。例えば、コロイド安定性は、一般的に、可逆的の会合をもたらしますが、分子がより近づくような条件下では不可逆的な凝集の速度が増加します。逆に、表面電荷が増加するとコロイド間の引力が減少し、コロイド安定性が改善されます。ただし、電荷はタンパク質の3次構造を不安定化するので、熱安定性は下がります。

示差走査型熱量測定、内部蛍光や外因性蛍光の測定、円偏光二色性、赤外やラマン分光法、静的光散乱のような様々な測定法によって SIP が評価されてきました。特に、1つの測定法はその素晴らしい反応性ゆえに際立っています。すなわち、動的光散乱(DLS)です。DLS は、安定性に関連した幅広い現象について定量的な洞察を与えてくれます。それは DLS が凝集と凝集体の大きさの分布を同時に定量化できること、また、温度変化による単なる変性と凝集を区別できること、そして、拡散の濃度依存性を通してコロイド安定性を測定することが出来るからで

す。同じデータを用いて、平均分子量や比容積の変化も決定できます。

生体分子の安定性は、全くその分子の固有の特性というわけではなく、タンパク質が調製される際のバッファー組成や濃度に依存します。タンパク質の安定性は、至適でうまくいく調製法の決定のために、pH、イオン強度、特定のイオン種および添加剤の関数として、測定する必要があります。幸いなことに、DLS は、市販の規格化されたプレートを利用し、プレートリーダーを用いることによって、少量の試料でハイスループットなスクリーニングが可能であり、1時間に数百もの条件でのスクリーニングを行うことができます。動的光散乱によるハイスループットスクリーニング (HTS-DLS) は、[DynaPro Plate Reader II](#) (Wyatt Technology, Santa Bar-bara, CA)を使うことにより実現されます。それは、96、384、1536 プレートにそれぞれ対応していて、全てのサンプルを並行して 4-85°C で温度走査できます。HTS-DLS による多重化されたアプローチによって、タンパク質の挙動を迅速に特徴づけ、他の調製条件に拡張することができます。

熱安定性とコロイド安定性の同時測定は、定性的に新しい情報を提供します。すなわち、熱安定性とコロイド安定性のメカニズムの間の直接的な相互作用であり、転移温度近傍におけるコロイド相互作用パラメータの温度依存性に反映されるものです。この論文では、HTS-DLS 測定が、熱によるタンパク質の変性がコロイド相互作用に及ぼす影響を明らかにするとともに、タンパク質製剤の調製法をすみやかにランク付けするためのもう一つの定量的な基準を与えることを示しています。

相互作用パラメータ

DLS は、直接的に、ブラウン運動による散乱強度の揺らぎを測定し、並進運動の拡散係数 D_t と、その結果から、分子の有効サイズ、すなわち、流体力学的半径 R_h を決定することができます。DLS はまた、モノマーと凝集体の分布を評価するための大まかな粒径分布を与えます。サイズ排除クロマトグラフィーと光散乱検出器を組み合わせた SEC-MALS ほど精密ではありませんが、この方法は、スクリーニング目的には十分で、さらに、半径で 3-5 倍異なる分子種の存在を検知することができます。



主として電荷や疎水残基に由来する非特異的なタンパク質間相互作用の結果として、拡散係数 D_t は、濃度 c の関数になります。 D_t 対 c の直線を解析すると、一次拡散相互作用パラメータ k_D (平衡解離定数 k_D と混同しないこと) を式 1 によって、求めることができます:

$$D = D_0 (1 + k_D c + \dots) \quad \text{Eq. 1}$$

正の k_D は分子間の斥力を示し、一方負の k_D は、引力を示します。この拡散相互作用パラメータは、第二ビリアル係数 A_2 、すなわち、一般に受け入れられているコロイド安定性と凝集傾向の熱力学的な指標と直接関係しています^{2, 3}。 A_2 は一般的に、少量かつハイスループットで測定するのは難しいため、 k_D は便利な代替として、役に立ちます。その結果、 k_D は異なるタンパク質の調製法を迅速に比較し、より安定なタンパク質の選択または、作成に利用することができます^{4,5,6}。

II. 材料と方法

[DynaPro PlateReader II](#) を用いて、熱安定性、コロイド安定性および両者の含まれる安定性解析を行うために、また同時に、凝集の程度や粒子径分布を評価する目的で、HTS-DLS 測定を行いました。この装置が特に便利なのは完全にウェル内で測定を行うことで、ハイスループットであるにもかかわらず、マクロ流路系のプラットフォームでありがちな持ち込みの可能性を排除していることです。

試料及び試料調整は以下の通り行いました。モノクローナル抗体(mAb1)を pH が、6.5、7.5、8.5、9.5 で、濃度が 15mg/ml になるように 50mM ビストリスプロパン(BTP)で溶解しました。このストック溶液を $0.1 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、希釈して、各ウェルに、タンパク質濃度を 0.47~15mg/ml 間で 6 点とり、各 4 種の pH で、5 回分を 384 プレート(Aurora)に $20 \mu\text{l}$ ずつアプライしました。このプレートを 400g で 1 分間、遠心し、蒸発を防ぐために、各ウェルに 1~2 滴のパラフィンオイルをアプライしました。測定の前に、再度、このプレートを 400g で 1 分間、遠心しました。

25°Cでの最初の測定では、コントロールとして、同じプレートにウシ血清アルブミンとリゾチムを入れて、測定しました。(ここでは議論しませんが、幾つかの図ではその測定が示されています)。それから、測定の範囲

を広げ、25°Cから 85°Cまで 1 分間に 0.1°C割合で、温度が上がるように温度勾配を付けて測定しました。その勾配の間、mAb1 溶液は、毎回 0.5°Cごとに、各濃度と pH で 3 ウェルに対して、2 秒間データを取得し、それを 5 回行って、完了しました。

装置の制御、データの取得や解析は、Wyatt 社の専用ソフトウェア Dynamics とエクセルを利用して、行いました。 D_t と R_h は自己相関関数解析から決定され、 k_D は D_t vs c の線形回帰から計算されました。凝集体の初めの温度 T_{onset} は適切なモデルに、 R_h vs 温度のプロットを適応させることにより、濃度と pH ごとに決定されました。

III. 結果と考察

pH の関数としての相互作用パラメータ

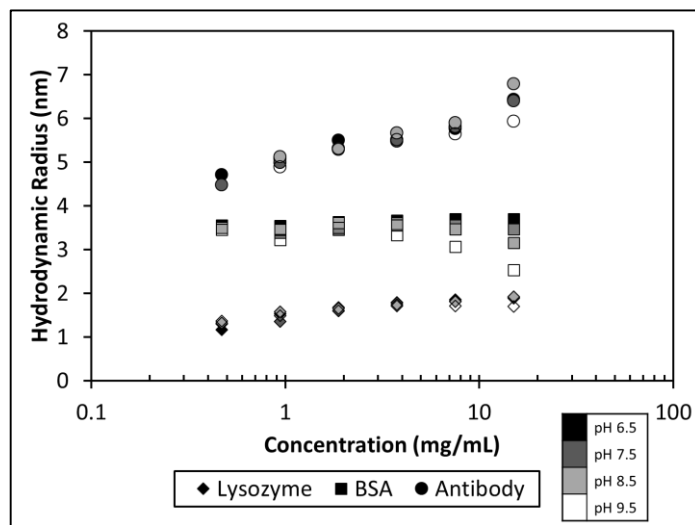


図 1: 3 種のタンパク質に対する濃度と pH、流体力学的半径 (R_h) の関係

mAb1 は、濃度の関数(図 1)として、 R_h の増加(D_t の減少)を示し、これは、負の k_D すなわち、タンパク質間に引力があることを示しています。この抗体は、テストされた全ての pH に対して、 k_D がゼロ以下を示し(図 2)、オリゴマー種が会合する傾向を示しています。



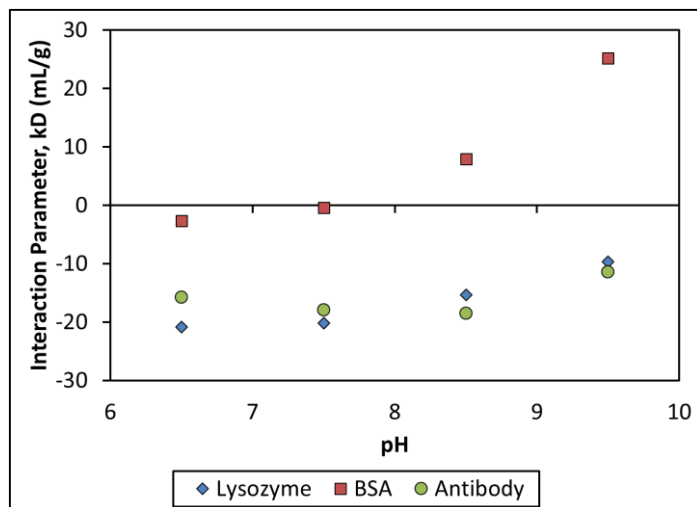


図 2: 3種のタンパク質に対する pH と k_D の関係。

熱による凝集

pH8.5 で、mAb1 は約 55°C の転移温度以上で、急速に大きな複合体を形成し、75°C における R_h は 80~800nm です (図 3)。 T_{onset} は濃度に依存して 55°C から 56.8°C の範囲で減少します (図 3 の内部の図)。最終的な凝集状態は濃度に大きく依存し、最も低い濃度と最も高い濃度では平均粒子径は 2 桁以上異なります。第 2 の変化は、70~75°C で起こり、IgG ドメインの変性に関係している可能性が高く、1 μm 以上の大きな凝集体粒子の存在が見られます。高い凝集性は熱転移を過ぎた観測される濃度依存性が、主として、より高い分子の衝突頻度によるものであると推測されます。このことは、温度上昇の速度を変化させることによって、確認されました。

これに対して、pH9.5 では、mAb1 は、62°C 以上では、濃度に依存して、典型的な IgG の R_h である ~4.8nm から、15~22nm の安定した値にシフトしたことを示しています (図 4)。この pH における凝集体の小さなサイズと安定性は、可逆的なオリゴマー化があることを示唆しています。これは、温度勾配を逆転したり、温度変化の速度を変えることにより確認できます。75°C 付近では、抗体は pH8.5 と類似の 2 回目の変性転移に入るようです。ただし、その大きさはかなり小さく、低濃度側ではその効果がほとんど見られません。

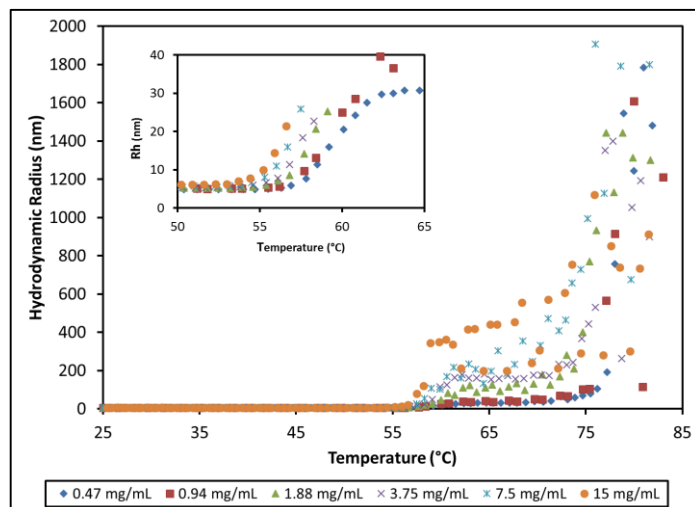


図 3: pH8.5 における抗体の調製濃度と温度、流体力学的半径 (R_h) の関係。56°C 以上の温度で、高次の凝集体が形成されることが確認できます。

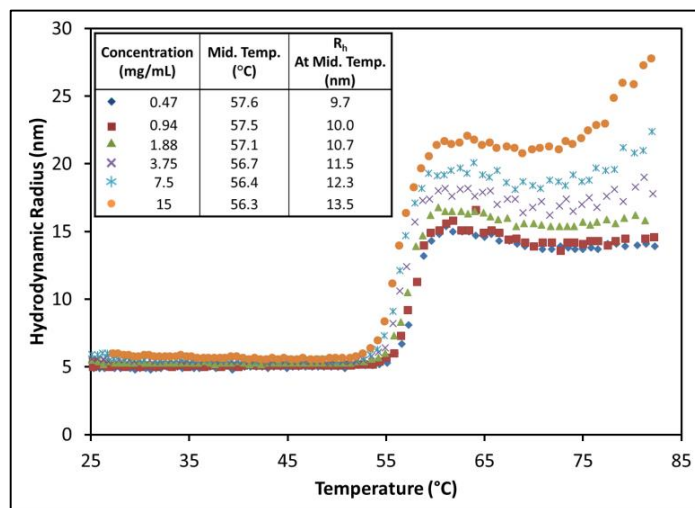


図 4: pH9.5 における抗体の調製濃度と温度、 R_h の関係。 R_h は全ての抗体濃度で、温度とシグモイド型の相関を示しており、濃度の中間点で僅かな変化が見られます。

2 つの条件下における凝集過程の定性的な違いが、DLS の正規化解析により得られた粒径分布からさらに明らかになりました。80°C において、濃度が 1.88mg/ml の pH8.5 の試料は 30-100nm と 300-3000nm に 2 つの山を持つ分布を示しています。一方で、pH9.5 の同じ濃度の試料は、図 5 に示されているように、80-300nm に 1 つのピークをもつ分布を示しました。



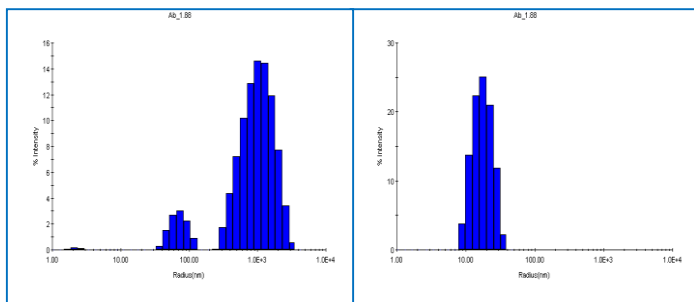


図 5. 80°Cにおける粒子径分布 左: pH 8.5; 右: pH 9.5.

熱転移における相互作用パラメータ

熱転移以下の温度では、 k_D は負で、両 pH において一定になります。pH8.5 における k_D の値は、pH9.5 における値のおよそ 2 倍で、分子間により強い引力があり、凝集の挙動がかなり異なることに対応しています。変性再生転移の近傍及び凝集開始点においては、 k_D は pH に対して、異なる転移の挙動を示しています。

pH8.5 では、 k_D は 53-59°C の間で、劇的な段階変化を起こしています(図 6 とその内部の図)。明らかに、有意な凝集体が現れる数°C前にシフトが始まり、変性によってタンパク質間の引力が増加したことを示唆しています。59°C を過ぎると、 k_D は一定になります(山が 2 つある分布のため、数値計算で 1 つの平均半径を求めることが困難なためにノイズが大きくなります)。図 3 にみられるように、凝集の度合いは濃度に依存していますが、これは、主としてより高い衝突の確率によるものようでありしたがって、約 56°C を超えた温度における k_D の測定値は、必ずしも、真の熱力学的相互作用をあらわすものではなく、むしろ、凝集過程の経路や速度論を示しています。

k_D の似たような変化が、pH9.5 における変性転移を示しています。ここでも、凝集の始まる数°C前に、 k_D がより大きな負の値を示します(引力が強くなります)。しかし、段階的変化ではなく、ちょうど測定された流体力学的半径が凝集を示し始めるところで、極小値が見られます。(図 7)。凝集が起こる際に、 k_D の値が減少して、より小さい負の値になります。 k_D のこの傾向は、この場合も引力が、最初の変性転移の間に、疎水性のコアが露出するとともに、増加していることを示しています。しかしながら、この条件下では、一旦安定な構造が形成されると、これらの相互作用は露出された領域が、溶液から隠されることによって部分的に緩和されます。約 75°C にお

ける第 2 の変性転移は、明らかに k_D に反映されています。

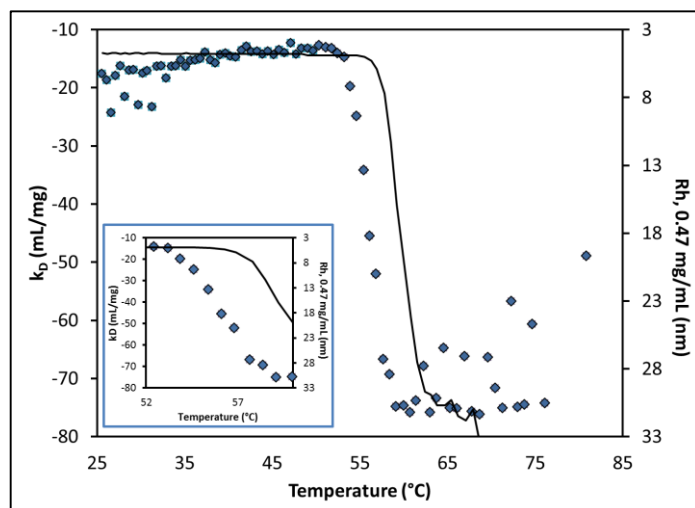


図 6: pH8.5、抗体の最も低い濃度における温度と k_D (◆, 左軸)、 R_h (—, 右軸 (反転)) の関係。内部の図は変化の領域を強調した図です。

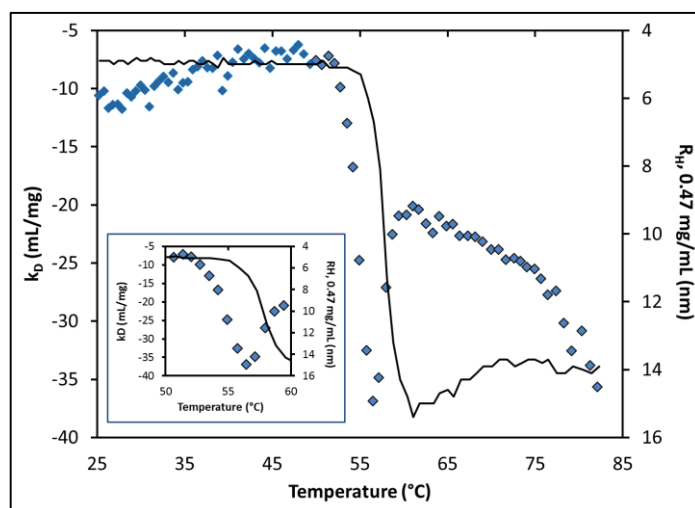


図 7: pH9.5、抗体の最も低い濃度における温度と k_D (◆, 左軸)、 R_h (—, 右軸 (反転)) の関係。内部の図は変化の領域を強調した図です。



IV. 結論

タンパク質の調製法を開発の初期段階でスクリーニングすることができれば、研究者は最も有力な候補タンパク質に集中することができ、相当多くの時間、試料、実験器具を削減することができます。本実験では、タンパク質の熱安定性とコロイド安定性、すなわち、凝集しやすさの2つの指標と凝集状態を、動的光散乱(DLS)を用いたスクリーニングによって決定することができ、候補となる製剤の有効性と調製法の条件を同時にランク付けすることができることが示されます。

V. 参考文献

1. Jocks, T., & Roessner, D. Performing Automated Dynamic Light Scattering Using Plate Reader Technology. *IPI* **2**(1), 22-25 (2009).
2. Some, D., Hitchner, E. & Ferullo, J., Characterizing Protein-Protein Interactions via Static Light Scattering: Nonspecific Interactions. *American Biotechnology Laboratory* **27** (2), 16-20 (2009).
3. Kuehner, D. E. et al., Interactions of lysozyme in concentrated electrolyte solutions from dynamic light-scattering measurements. *Biophysical Journal* **73**, 3211-3224 (1997).
4. Lehermayr C., Mahler H.-C., Mader K., Fischer S. Assessment of Net Charge and Protein-Protein Interactions of Different Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **100**(7), 2551-2562 (2011).
5. He F., Woods C. E., Becker G. W., Narhi L. O., Razinkov V. I. High-Throughput Assessment of Thermal and Colloidal Stability Parameters for Monoclonal Antibody Formulations. *J. Pharm. Sci.* **100**(12), 5126-5141 (2011).
6. Saito S., Hasegawa J., Kobayashi N., Tomitsuka T., Uchiyama S., Fukui K. Effects of Ionic Strength and Sugars on the Aggregation Propensity of Monoclonal Antibodies: Influence of Colloidal and Conformational Stabilities. *Pharm. Res.* **30**(5), 1263-1280 (2013).

熱安定性は、 T_{onset} とコロイド安定性 k_D として、定量化されます。 k_D の温度依存性は、変性過程がそれ以前はバッファーや他のタンパク質によって隠されていた部分を明らかにするので、変性のコロイド相互作用に関する新たな知見を与えます。ここでは、考察しませんでした。DLSは、化学的安定性、分子の平均分子量や比容を温度の関数として決定します。また、溶液の粘度も測定されますが、これは高濃度のバイオ治療薬の調製において、もうひとつの重要な因子です。従って、HTS-DLSは、より高い生産性を推進するために、迅速な候補分子のスクリーニングや、緩衝液の条件や添加剤に関する多くの情報をもたらします。

7. He F., Becker G. W., Litowski J. R., Narhi L. O., Brems D. N., Razinkov V. I. High-throughput dynamic light scattering method for measuring viscosity of concentrated protein solutions. *Anal. Biochem.* **399**(1), 141-143 (2010).



The DynaPro Plate Reader II enables high-throughput DLS studies of aggregation and stability-indicating parameters, increasing productivity in formulation studies.

