

タンパク質の凝集

AccuSizer® FX Nano

概要

タンパク質製剤注射液中のタンパク質凝集体は、人体に有害な免疫反応を誘発する場合があります。これまで、大きなサイズの凝集体の測定は可能でしたが、0.15 ~ 2 μm の領域の小さな凝集体の定量は困難でした。動的光散乱(DLS)を用いることで、凝集体の存在を検出することはできますが、凝集体の絶対濃度の情報は得られません。Single Particle Optical Sizing (SPOS)を用いると、サイズと凝集したタンパク質の濃度の両方を測定することができます。SPOSはタンパク質凝集体測定に適した技術といえます。

序論

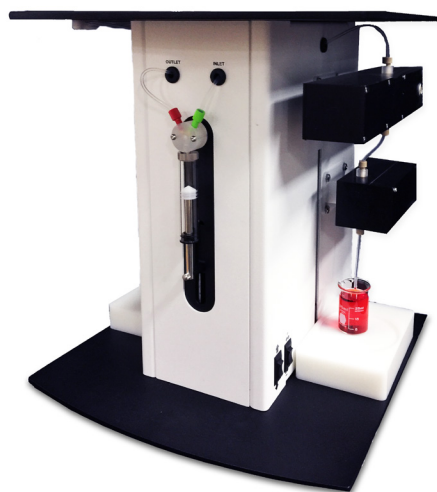
バイオ医薬品は、抗薬物-抗体反応により、生体に作用します。溶解状態のタンパク質が薬効をもたらすとされていますが、同時にタンパク質凝集体およびその粒子もまた免疫反応の原因となるといわれています。

バイオ医薬品の製造から使用までの過程において、注射用タンパク質製剤は、一般に以下のような手順をたどります。

1. タンパク質の合成と精製
2. 出荷時の安定性向上のための薬剤の凍結乾燥
3. 注射前の薬剤の再溶解

凍結乾燥は、タンパク質を安定化して輸送できる点でメリットがありますが、再溶解後にきちんと溶解状態に戻るかは明らかになっていません。このプロセスの結果、凝集タンパク質がある場合、治療の過程において、患者の免疫反応を誘起する懸念があります。

凝集の度合いを測定する簡便な手法の開発により、タンパク質の再溶解時のサイズと濃度のヒストグラムデータを得られれば、製造プロセス中の、薬剤スクリーニング能力が向上します。この分析により、製剤を再溶解しても、凝集することなく、多量の溶解タンパク質が得られる製剤を開発できます。



粒子計測技術

粒子サイズと濃度の両方を測定することで、対象の大きさごとにタンパク質凝集体を定量可能な技術もほとんどありません。

光遮蔽法は、一般的な方法で、USP-788、注射剤中の不溶性微粒子試験や、USP-729、脂肪乳剤の粗大部分を測定する試験で用いられます。ただし、これまでの光遮蔽法は一般に1 μm 付近に測定限界がありますが、凝集タンパク質はこの測定限界よりもさらに小さい粒子です。

インテグリスは装置に2つのセンサーを搭載することで、前述の問題を解決しました。AccuSizer (アキュサイザー) FX Nano (写真) は、より小さく、かつ高濃度のサンプルを測定するために開発されました。FX-Nanoセンサーは0.15 ~ 0.6 μm を測定し、0.5 ~ 40 μm を測定するFXまたはLEセンサーと組み合わせて使用します。FX-Nanoセンサーは、測定量を低減するために集束ビームを使用しており、センサーの測定上限濃度を押し上げています。これらのセンサーを250 μL 程度の少量のサンプルを測定するシリンジインジェクションサンプラー(SIS)に搭載します。この構成は、タンパク質製剤の注射剤中の微粒子を測定するためのUSP-787に使用可能です。

2つのセンサーを使用することで、0.15 ~ 40 μm の範囲にある凝集したタンパク質の大きさと数量を一度に測定できます。このシステムは柔軟な運用も可能です。例えばLEセンサーを単独で使用すると、0.5 ~ 400 μm の範囲を測定することができます。

例 1: ろ過前後の免疫グロブリン G

免疫グロブリンG型 (IgG, ~150 kDa) を1%のリン酸緩衝液 (PBS) に溶解しました。このサンプルを希釈なしに、アキュサイザー FX Nano (FX-Nano、LEセンサー、SISの構成) で測定しました。この結果を図1に示します。計測した粒子の総個数は109,343個、濃度は 9.7×10^8 個/mLでした。

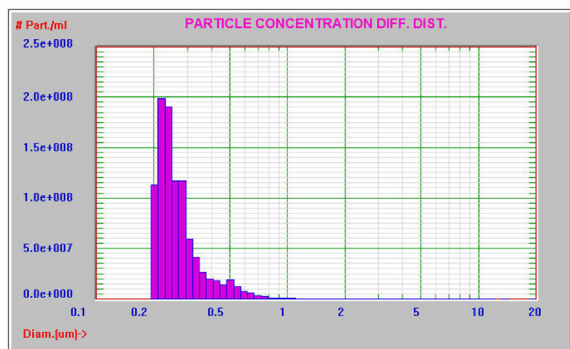


図1 IgG溶液フィルタリング前

可溶性タンパク質のサイズを測定し、凝集したタンパク質のサイズを見積もるため、同じ溶液をNicom (ナイコン) 380動的光散乱 (DLS) システムで測定しました (図2)。ピーク#1 (本来のタンパク質): 14.6 nm、52%の強度 (総重量の99.6%)、ピーク#2 (凝集した粗大粒子部分): 395 nm、48%の強度 (総重量の0.4%) が見られます。FX-Nanoにより、200 ~ 500 nmに存在する凝集体の粗大部分に対して、より詳細な研究が可能になります。

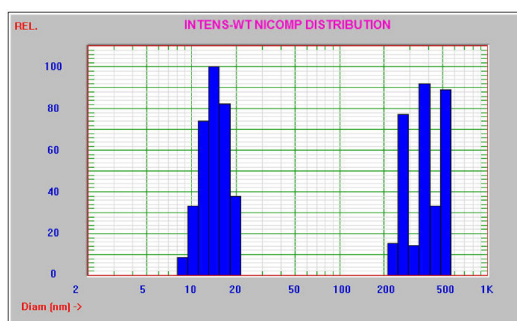


図2 IgG溶液ろ過前 DLS ナイコン 380のデータ

次にIgG溶液を0.2 μmのフィルターに通し、アキュサイザー FX-Nanoで再度測定しました。フィルターを通す前後の結果を図3に示します。PBSを測定した結果も黒で同じ図に示しています。フィルターを通すことで、粒子濃度が 9.7×10^8 個/mLから 3.1×10^8 個/mLに減少しています。FX-Nanoシステムを用いることで凝集タンパク質の粗大粒子濃度の減少をはっきりと視覚的に確認することができます。

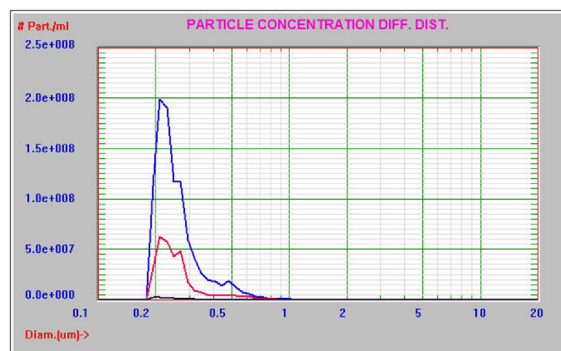


図3 IgGフィルター前 (青) 後 (赤) およびPBS (黒)

例 2: インキュベーション前後の IgG

IgGをインキュベートした場合にタンパク質が受ける影響を見るための実験結果を示します。図4はIgGの個数分布の推移を示したものです。インキュベート前、37°Cで1時間または6時間インキュベートした後のサンプルを、FXシステムのみで測定しました。0.7 μm以上の領域について、 9.77×10^5 個/mL、 7.75×10^5 個/mL、 5.08×10^5 個/mLと粒子数が減少しています。インキュベートにより、凝集が減少しているのは明確です。さらにこのデータの粗大部分の拡大を図5に示しています。

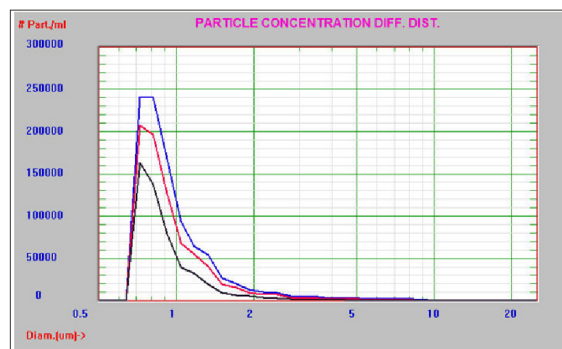


図4 IgGインキュベート0時間 (青)、1時間 (赤)、6時間 (黒)

Particle Concentration Diff. Dist

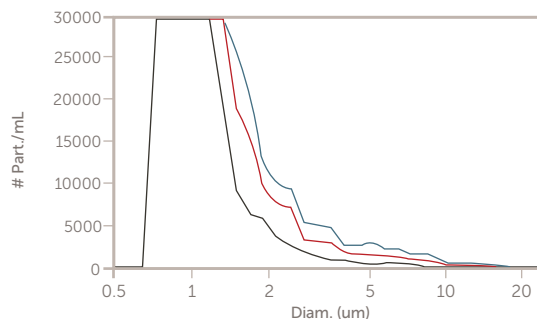


図5 IgGインキュベート粗大部分の拡大図

例 3: 異なる保管および処理条件におけるタンパク質

次に、あるタンパク質群を測定した結果を示します。バッファーと3種類の異なる調製状態のタンパク質溶液をFX-Nanoで測定し、粒子サイズとタンパク質凝集体の濃度を測定しました。表1にバッファーとタンパク質溶液について、粒子径0.19 μm以上の粒子濃度を示します。また図6、図7には、それぞれ粒子数/サイズの分布と、粒子積算数/サイズの分布を示します。

表1 3種類のタンパク質とバッファーの粒子数濃度

サンプル	個/mL >0.19 μm
タンパク質 A (赤)	4.78×10 ⁸
タンパク質 B (緑)	2.36×10 ⁸
タンパク質 C (青)	1.10×10 ⁸
バッファー (紫)	0.36×10 ⁸

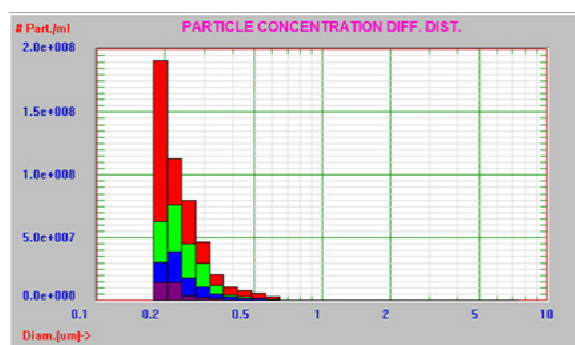


図6 粒子数/サイズ分布

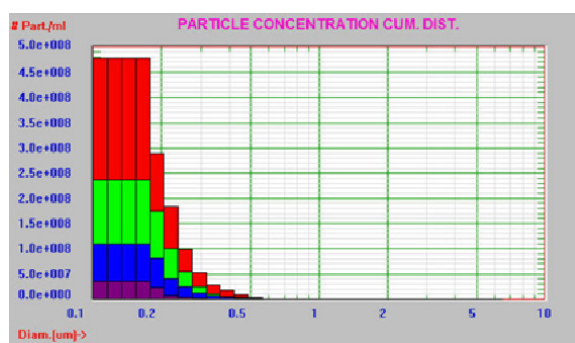


図7 粒子積算数/サイズ分布

図8と図9に同じタンパク質凝集体のデータでY軸をlogスケール表示にした図を示します。logスケール表示により、幅広い濃度分布の測定結果を比較することができます。

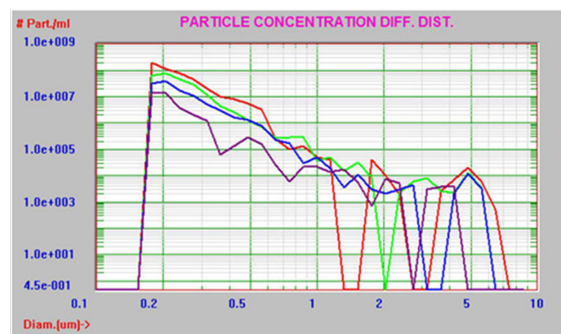


図8 粒子数/サイズ分布 logスケール

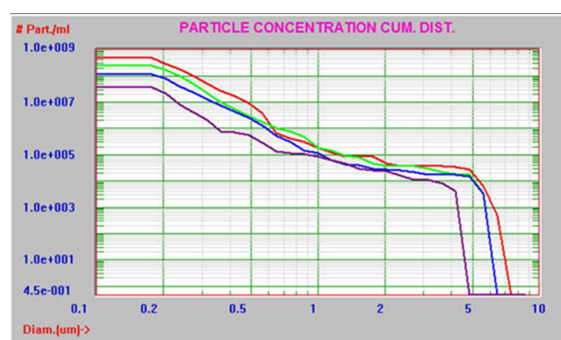


図9 粒子数積算/サイズ分布 logスケール

まとめ

アキュサイザー FX-Nanoは、簡単に凝集タンパク質の粒子数と粒子サイズを定量するための分析ツールです。2つのセンサーを搭載するユニークな測定方式により、幅広いレンジの凝集タンパク質の粗大部分を詳細かつ高感度に観測することができます。また正確な個/mLのデータにより、異なる濃度のサンプル間の比較も可能です。SISサンプラーにより、タンパク質製剤の測定で求められている少容量での測定も可能です。また、FX-Nanoセンサーを取り外すことで、通常の注射剤試験、USP-787やUSP-788試験に対応したカウンターとしても使用できます。

詳細情報

詳細情報および最新情報については、インテグリスまでお問い合わせください。
www.entegris.com の「[お問い合わせ](#)」ページから最寄りのインテグリスをご確認いただけます。

販売条件

全ての購入は、インテグリスの「販売条件」に従うものとします。インテグリスの「販売条件 (Entegris Terms and Conditions of Sale)」は、www.entegris.com のホームページのフッターにある「[販売条件](#)」をクリックすると、閲覧または印刷することができます。



日本インテグリス合同会社

東京 | TEL (03)5442-9718 FAX (03)5442-9738 〒108-0073 東京都港区三田1-4-28 三田国際ビルディング
大阪 | TEL (06)6390-0594 FAX (06)6390-3110 〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-1-1 新大阪プライムタワー
九州 | TEL (092)471-8133 FAX (092)471-8134 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-13-9 いちご博多駅東ビル

Entegris®, Entegris Rings Design®, およびその他の製品名は Entegris, Inc. の商標です。詳細はwww.entegris.comの[規定/商標](#)をご覧ください。全てのサードパーティの製品名、ロゴ、企業名、商標、登録商標は、それぞれその所有者に帰属します。それらの使用は、商標権所有者との提携、同者による支援、推奨を示すものではありません。

©2018-2021 Entegris, Inc. | All rights reserved. | 7127-10525ENT-0421JPN