

ヒト IgG 及びヒト化モノクローナル抗体製剤において様々なストレスにより誘導された凝集体の粒子径及び相対光散乱強度の動的光散乱による測定

新見伸吾

Determination of the particle size and relative light scattering intensity of aggregates of human IgG and humanized monoclonal antibody product induced by various stress using dynamic light scattering

Shingo Niimi

To evaluate the usefulness of dynamic light scattering for the analysis of aggregates in the manufacturing process of monoclonal antibody and its final product, the particle size and relative light scattering intensity of aggregates of human IgG and humanized monoclonal antibody product induced by various stress such as stirring, increasing temperature, shaking and freeze-thaw were determined using dynamic light scattering. It was found that 1.3% of relative light scattering intensity as the minimum range and the range of particle size from 28.91nm to 3,000nm of aggregates induced were determined by dynamic light scattering. These findings indicate that dynamic light scattering is useful for the in-process control tests of aggregates during the manufacturing and evaluation tests of aggregates for final products including the formulation and the storage. Some points well taken at the application of dynamic light scattering are discussed from the viewpoint of its merits and demerits.

Keywords: aggregates, monoclonal antibody products, dynamic light scattering

1. はじめに

タンパク質性医薬品において目的物質由来不純物である凝集体は目的物質に比べて活性が低下するだけでなく免疫原性の原因となる可能性が懸念されている^{1,2)}。したがって、その上限値は可能な限り低く設定し、厳密に管理する必要がある。特に抗体医薬品では、精製工程にプロテイン A クロマトグラフィーで酸性溶液（約 pH 3）による溶出が含まれているため、凝集体が生成されやすい³⁾。また、1回の投与量が多く一般的に数十 mg/ml の高濃度で処方されるため、製剤化、保存の過程で凝集体が産生されやすい可能性がある⁴⁾。凝集体の分析には一般的にサイズ排除クロマトグラフィーが用いられているが、1-50nm の粒子径を有する凝集体までしか分離できない⁵⁾。一方、動的光散乱では 1 nm~5 µm の粒子

径を有する凝集体が分析可能である⁵⁾。本研究においては、ヒト IgG 及びヒト化モノクローナル抗体製剤において各種ストレスにより誘導された凝集体をモデルとして用い、動的光散乱で分析することにより、抗体医薬品で誘導される可能性のある凝集体の粒子径及び相対光散乱強度を測定し、凝集体の評価方法としての動的光散乱の有用性について考察した。

2. 研究方法

(1) サンプルの調製

研究試薬として市販されているヒト IgG の凍結乾燥品を 25mM クエン酸ナトリウム (pH6.0), 125mM 塩化ナトリウムに溶かし、0.45µm のフィルターで滅菌後、4℃に保存した。実験開始時に上記緩衝液で 0.25 mg/ml に希釈した。ヒト化モノクローナル抗体製剤溶液を 4℃で保存した。実験開始時に上記緩衝液で 0.1mg/ml に希釈した。

(2) 市販のヒト IgG のストレス条件

市販のヒト IgG は、①温度 (4℃, 25℃, 37℃で 1 日, 65℃で 15 分) ②常温での回転子による攪拌 (ガラス

To whom correspondence should be addressed:

Shingo Niimi; Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 235; Fax: +81-3-3700-9084; E-mail: niimi@nihs.go.jp

バイアル中200rpmで1時間, 2時間) ③常温での巡回による振とう (ガラスバイアル及びポリプロピレンチューブ中320rpmあるいは640rpmで6時間) ④-85℃の冷凍庫で凍結及び常温水中で融解の凍結融解 (3回, 5回, 6回) のストレスで処理した. なお, ③及び④の実験においては, 凝集体のうちストレスにより新たに誘導されたものだけを測定するために, 無処理サンプルを12,000rpmで5分遠心し, 凝集体を沈殿として除いてから用いた.

(3) ヒト化モノクローナル製剤のストレス条件

ヒト化モノクローナル抗体製剤溶液は, ①温度 (65℃で10分, 15分) ②常温での回転子による攪拌 (ガラスバイアル中200rpmで1時間, 2時間, 3時間, 5時間) ③常温での巡回による振とう (ガラスバイアル及びポリプロピレンチューブ中640rpmで3時間, 6時間, 9時間) ④上記と同じ条件の凍結融解 (2回, 4回, 8回) のストレスで処理した.

(4) 凝集体の測定

サンプルの粒子径 (nm) 及びその相対光散乱強度 (%) は Malvern 社の Zetasizer Nano-ZS により測定した. なお, 測定された相対光散乱強度は, 小さい分子よりも大きい分子のほうが高い⁶⁾. したがって, 測定された相対光散乱強度は定量的ではない.

3. 研究結果

Fig. 1に市販のヒト IgG において保存温度が凝集体の

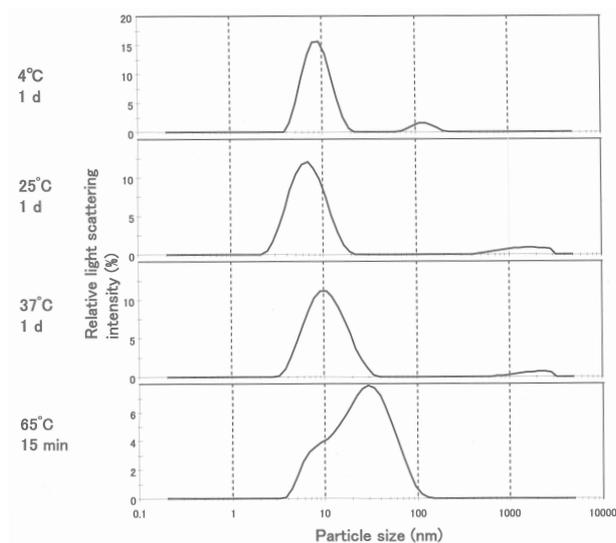


Fig. 1 Effect of increasing temperature on the induction of aggregates in human IgG using polypropylene tube as the container

Human IgG solution was transferred to polypropylene tube and incubated at 4, 25 or 37°C for 1 d, or at 65°C for 15 min. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

誘導に及ぼす作用を示す. 4℃1日保存で9.047nmの単体が約93%, 123.9nmの凝集体が7.2%検出された. データは示していないがサンプルの調製直後でも同様の結果が得られた. 25℃で1日保存すると凝集体の示すピークが1,535nmにシフトし, 同様な結果が37℃1日でも得られた. 65℃15分の処理では単体のほとんどが28.91nmの凝集体に誘導された.

Fig. 2にヒト化モノクローナル抗体製剤において保存温度が凝集体の誘導に及ぼす作用を示す. コントロールでは6.01nmの単体が検出され, 凝集体は検出されなかった. 65℃10分の処理により1,987nmの凝集体が2.5%誘導され, 15分の処理により325nmの凝集体が12.9%誘導された.

Fig. 3に市販のヒト IgG において攪拌が凝集体の誘導に及ぼす作用を示す. 1時間の攪拌により, 主に234.9

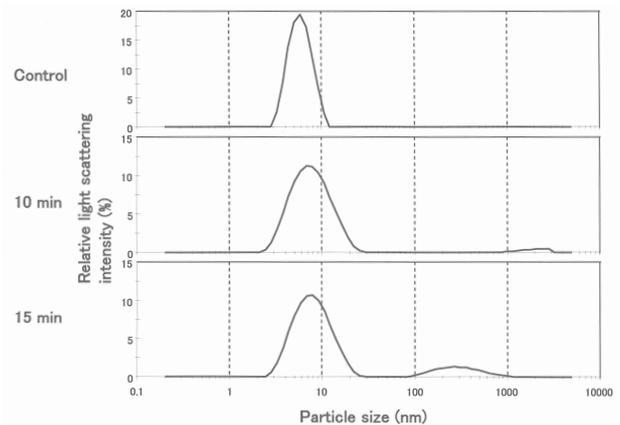


Fig. 2 Effect of increasing temperature on the induction of aggregates in humanized antibody product using polypropylene tube as the container

Humanized antibody product solution was transferred to polypropylene tube and incubated at 65°C for 10 or 15 min. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

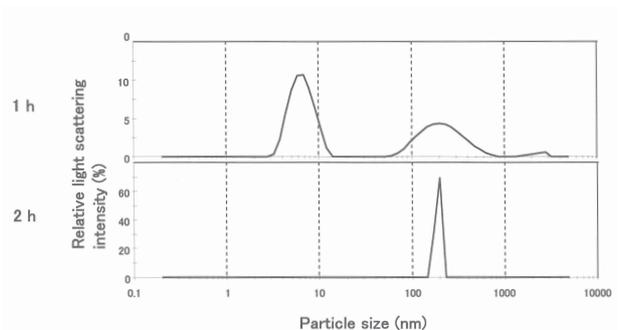


Fig. 3 Effect of stirring on the induction of aggregates in human IgG using glass vial as the container

Human IgG solution was transferred to glass vial and stirred at 200 rpm and ordinary temperature for 1 or 2 h. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

nmの凝集体が40.5%誘導され、2時間では単量体の全てが189.6nmの凝集体に誘導された。

Fig. 4にヒトモノクローナル抗体製剤において攪拌が凝集体の形成に及ぼす作用を示す。2時間の攪拌により、434nmと2,723nmの凝集体がそれぞれ16.9%と4.8%誘導された。3時間では560nmの凝集体が35.8%が誘導され、5時間では単量体の全てが880nmの凝集体に誘導された。

Fig. 5に市販のヒトIgGにおいて旋回による振とうが

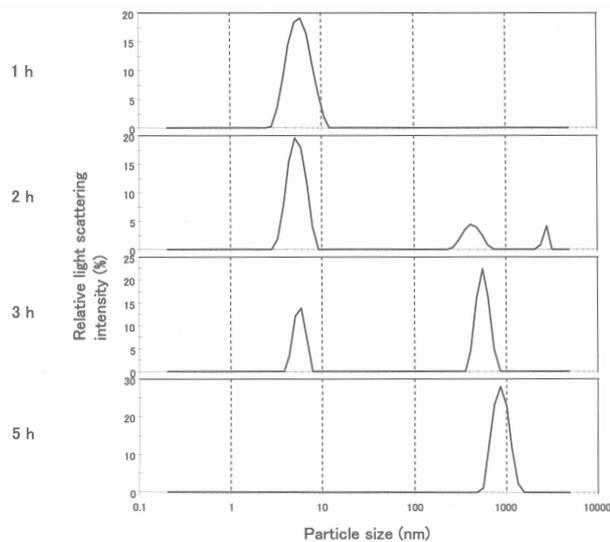


Fig. 4 Effect of stirring on the induction of aggregates in humanized monoclonal antibody product using glass vial as the container

Humanized monoclonal antibody product solution was transferred to glass vial and stirred at 200 rpm and ordinary temperature for 1, 2, 3 or 5 h. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

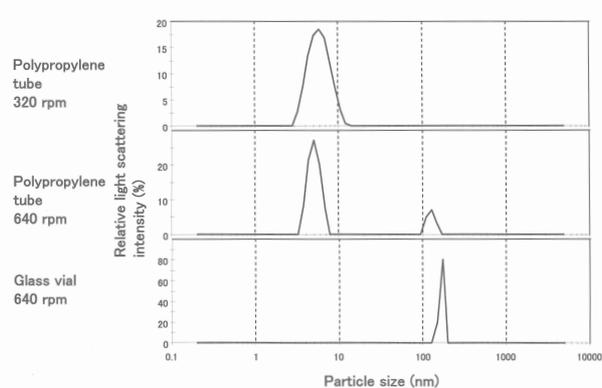


Fig. 5 Effect of shaking on the induction of aggregates in human IgG using polypropylene tube or glass vial as the container

Human IgG solution was transferred to polypropylene tube or glass vial and shaken at 320 or 640 rpm, and ordinary temperature for 6 h. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

凝集体の誘導に及ぼす作用を示す。ポリプロピレンチューブにおいて320rpm 6時間では凝集体は誘導されなかったが、640rpmでは126nmの凝集体が15.3%誘導された。一方、ガラスバイアルでは640rpmで単量体の全てが165.5nmの凝集体に誘導された。

Fig. 6.1及び6.2にヒトモノクローナル抗体製剤において旋回による振とうが凝集体の誘導に及ぼす作用を示す。ポリプロピレンチューブでは、3時間で2,099nmの凝集体が6.1%誘導されたが、その後9時間までほと

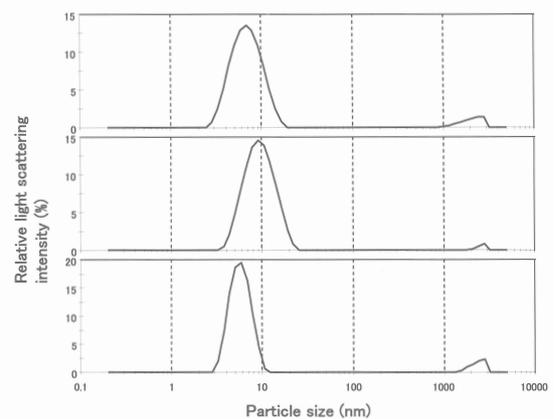


Fig. 6.1 Effect of shaking on the induction of aggregates in humanized monoclonal antibody product using polypropylene tube as the container

Humanized monoclonal product solution was transferred to polypropylene tube and shaken at 640 rpm and ordinary temperature for 3, 6 or 9 h. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

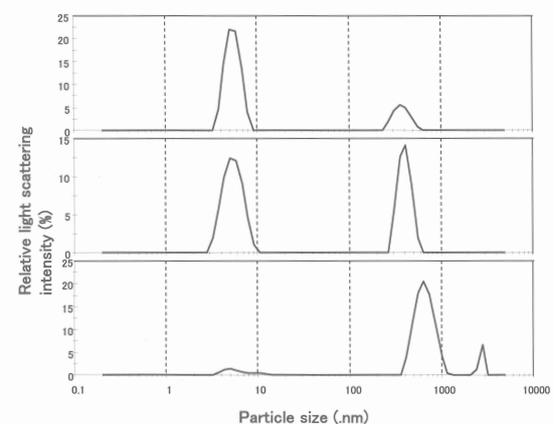


Fig. 6.2 Effect of shaking on the induction of aggregates in humanized monoclonal antibody product using glass vial as the container

Humanized monoclonal product solution was transferred to glass vial and shaken at 640 rpm and ordinary temperature for 3, 6 or 9 h. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

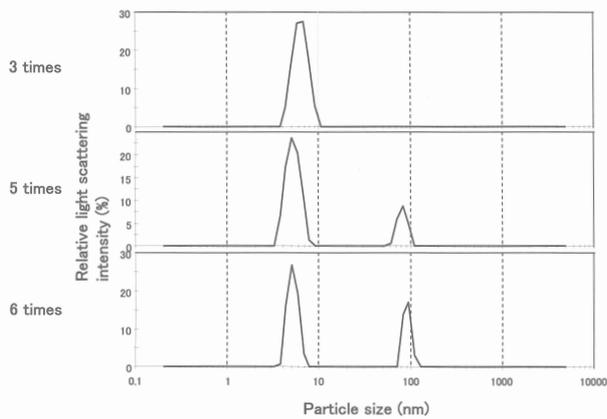


Fig. 7 Effect of freeze-thaw on the induction of aggregates in human IgG using polypropylene tube as the container. Human IgG solution was transferred to polypropylene tube, frozen in the freezer at -85°C and then thawed in water at ordinary temperature. The freeze-thaw process was repeated 3, 5 or 5 times. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

んど増加は見られなかった。一方、ガラスバイアルでは、3時間で378nmの凝集体が19.9%誘導され、6時間ではほぼ同様なピークの凝集体がさらに23.2%誘導された。9時間では659nm及び2,772nmの凝集体がそれぞれ86.5%及び7.8%誘導された。

Fig. 7に市販のIgGにおいて凍結融解が凝集体の誘導に及ぼす作用を示す。5回の凍結融解により81.42nmの凝集体が20.3%誘導され、6回でほぼ同様なピークの凝集体がさらに13.4%誘導された。

Fig. 8にヒト化モノクローナル抗体製剤において凍結融解が凝集体の誘導に及ぼす作用を示す。4回の凍結融解により608nmと1,882nmの凝集体がそれぞれ3.9%及び9.8%誘導された。凝集体の粒子径及びその相対光散乱強度は8回の凍結融解でもほとんど変わらなかった。

4. 考察

様々なストレスにより誘導される凝集体について、相対光散乱強度は定量的ではないが最小1.3%、粒子径は最小28.91nm、最大約3,000nmが動的な光散乱により測定された。ヒトIgGの 65°C 15分のストレスを除いて、誘導された凝集体の粒子径が100nm以上であることは注目すべき点である。その理由は、50nm以上の粒子径の凝集体は「1. はじめに」で述べたようにサイズ排除クロマトグラフィーでは分離できないからである。1nm~5 μm の粒子径を有する凝集体が動的な光散乱により測定可能であるため⁷⁾、以下のような免疫原性の誘導に関与する可能性が示唆されている粒子径の凝集体も動的な光散乱により測定できる。タンパク質医薬品の凝集に

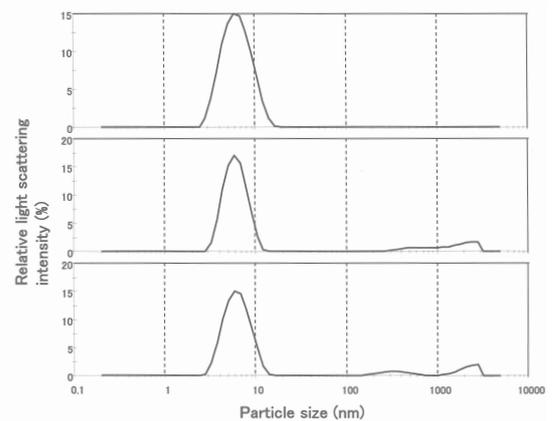


Fig. 8 Effect of freeze-thaw on the induction of aggregates in humanized monoclonal antibody product using polypropylene tube as the container. Humanized monoclonal antibody product solution was transferred to polypropylene tube, frozen in the freezer at -85°C and then thawed in water at ordinary temperature. The freeze-thaw process was repeated 2, 4 or 8 times. The particle size and relative light scattering intensity were measured by dynamic light scattering.

より誘導された二量体及び三量体は免疫原性を誘導しにくい、それ以上の数の分子から構成される凝集体は免疫原性を誘導しやすいことが示唆されている¹⁾。注射剤に含まれる10 μm 以上の凝集体を含む不溶性微粒子については日本薬局方で試験法が設定されている。しかし、肉眼では見ることでできない特に粒子径0.1~1 μm の凝集体を含む微粒子は、粒子径及びその個数について、日本を含め世界的に薬局方で試験法が設定されていない。アメリカのFDA及び医者品業界において、このような微粒子は免疫原性が懸念されるため分析が今後必要であるとの認識で一致しているが、その具体的な方法論について統一的な見解は得られていない^{8,9)}。これは例えば、広い測定範囲、定量性、高分解能、高感度、タンパク質の凝集体とタンパク質以外の微粒子の識別、操作中における凝集体の解離の防止、簡便な操作性、多検体処理能等、凝集体の粒子径及びその数の分析に必要な全ての条件を満たす単一の方法が存在しないためであり、最適な方法の組み合わせについては結論が得られていない。

動的な光散乱の長所は測定可能な粒子径の範囲が広いことに加えて、吸光度の測定と同様にサンプルをセルに入れてレーザー光源を照射し直接測定できるという点である。後者の点はサイズ排除クロマトグラフィーで問題となっている、サンプルが移動相により希釈され凝集体が解離する懸念、凝集体がカラム担体と相互作用し回収率が低下する懸念を回避できる優れた特徴である。また、測定に要する時間は数分程度の短時間であることも動的な光散乱の長所である。したがって、動的な光散乱は凝集体

の工程内管理試験、製剤化および貯蔵を含めた最終産物の評価試験に有用と考えられる。一方、短所としては、市販IgGの65℃15分で誘導される二相性の凝集体から示されるように、単量体と二量体及び三量体を区別して検出することは困難である。また、「2. 研究方法 (4)

凝集体の測定」で述べた理由により、同じ質量でも単量体に比べ凝集体のほうが相対光散乱強度は高く測定され、凝集体は定量的に測定されない。一方、サイズ排除クロマトグラフィーでは紫外外部吸収に基づいた定量的な分析が可能である。したがって、凝集体の管理及び評価試験としては、動的散乱だけでなくサイズ排除クロマトグラフィーも設定し、お互いの短所を補う必要があると思われる。例えば動的散乱で測定された凝集体の相対光散乱強度は、質量に基づく相対量よりも過大評価されていることを踏まえたうえでの参考値とし、凝集体の粒子径を規格値として設定する。凝集体の含量はサイズ排除クロマトグラフィーで測定された値を用いるといった規格試験法の設定を考慮する必要がある。

本研究で用いた各種ストレスによる凝集体の誘導機構を以下に示す。攪拌と振とうによる凝集体の誘導は、せん断による疎水性領域の表面への曝露、静電的な相互作用による容器表面への吸着、空気との疎水的な相互作用による疎水性領域の表面への曝露により、タンパク質の立体構造が壊れることが原因により起こる。攪拌の場合はそれらに加えて溶液内に生じた空隙及び泡による衝撃波の発生が加わりやすい。凍結融解による凝集体の誘導は、低温により疎水性領域の溶解性の増加、氷と溶液の境界面及び容器表面に対する吸着の増加、凍結の間起こる溶液のpHの低下等によりタンパク質の立体構造が壊れることが原因により起こる。加熱による凝集体の誘導は、タンパク質の運動が激しくなり、折りたたみ構造に緩みが生じてほどけてしまい、複雑に絡み合うことが原因により起こる。

実験結果の中で特に興味深いものについて以下に考察する。市販ヒトIgGには凝集体が含まれていた。この原因として凍結乾燥により凝集体が誘導された可能性が考えられる。その相対光散乱強度は25℃1日の保存で変化はみられないが、粒子径は10倍以上増加した。なお、先に述べた理由から、粒子径が10倍以上増加した凝集体の質量に基づく相対量は保存前に観察された凝集体の相対量よりも低いことは留意すべき点である。このような大きな粒子への凝集は、先に述べたように免疫原性の懸念を増加させる可能性がある。したがって、免疫原性のリスクを低減する観点から、製造工程で誘導され精製工程で完全には除去されなかった凝集体あるいは凍結乾燥による製剤化の過程で誘導された凝集体を含有するタンパク質医薬品製剤は低温で保存する必要性が示された。

様々なストレスにより誘導された凝集体の相対光散乱強度について、同じストレス条件で分子量がほぼ同じと推定される市販IgGとヒト化モノクローナル抗体製剤を比較すると、定量的ではないもののヒト化モノクローナル抗体のほうが凝集体は誘導されにくい傾向が観察された。したがって、凝集体の誘導されやすさは各抗体により異なる。この原因については不明であるが、製造方法の違い、一次構造及び高次構造の違いの可能性等が考えられる。浸とうによるストレスでは、市販IgG及びヒト化モノクローナル抗体製剤の両方において、誘導された凝集体の含量は、ポリプロピレンチューブに比べガラスバイアルのほうが顕著に高かった。凝集体の誘導は容器との疎水的な相互作用により促進されることから¹⁰⁾、一般的にポリプロピレンチューブよりも疎水性の高いことが知られている未処理のガラスバイアルでは凝集体の誘導がより促進されたものと考えられる。したがって、抗体医薬品において凝集体の誘導を防ぐ観点から、特に輸送等において振とうが起きる可能性がある場合、疎水性の高い保存容器は避ける必要があることが再確認された。

謝辞

本研究は平成22年度厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究事業、研究課題名「抗体医薬品の製造方法、品質特性解析及び試験法の開発」、研究代表者川崎ナナの研究助成金によって実施された。凝集体の分析に際し、Malvern社のZetasizer Nano-ZSを使用させて頂いた薬品部第四室加藤くみ子室長に感謝します。

参考文献

- 1) Rosenberg, A. S.: *AAPS J*, **8**, (3), E501-507 (2006)
- 2) Schellekens, H.: *Nephrol Dial Transplant*, **20 Suppl 6**, vi3-9 (2005)
- 3) Shukla, A. A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S. and Low, D.: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **848**, (1), 28-39 (2007)
- 4) Treuheit, M. J., Kosky, A. A. and Brems, D. N.: *Pharm Res*, **19**, (4), 511-516 (2002)
- 5) den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O. and Jiskoot, W.: *Pharm Res*, **28**, (4), 920-933 (2011)
- 6) Rescic, J., Vlachy, V., Jamnik, A. and Glatter, O.: *J Colloid Interface Sci*, **239**, (1), 49-57 (2001)
- 7) Mahler, H. C., Friess, W., Grauschopf, U. and Kiese, S.: *J Pharm Sci*, **98**, (9), 2909-2934 (2009)
- 8) Carpenter, J. F., Randolph, T. W., Jiskoot, W., Crommelin, D. J., Middaugh, C. R., Winter, G., Fan, Y. X., Kirshner, S., Verthelyi, D., Kozlowski, S.,

- Clouse, K. A., Swann, P. G., Rosenberg, A. and Cherney, B.: *J Pharm Sci*, **98**, (4), 1201-1205(2009)
- 9) Singh, S. K., Afonina, N., Awwad, M., Bechtold-Peters, K., Blue, J. T., Chou, D., Cromwell, M., Krause, H. J., Mahler, H. C., Meyer, B. K., Narhi, L., Nesta, D. P. and Spitznagel, T.: *J Pharm Sci*, **99**, (8), 3302-3321 (2010)
- 10) Sharma, B.: *Biotechnol Adv*, **25**, (3), 318-324(2007)