

ヒト化モノクローナル抗体製剤の攪拌により誘導された凝集体の 相対光散乱強度の動的光散乱による測定

遠藤素子, 新見伸吾[#]

Determination of the relative light scattering intensity of aggregates induced by stirring of humanized monoclonal antibody product using dynamic light scattering

Motoko Endo and Shingo Niimi[#]

To evaluate the usefulness of dynamic light scattering for estimation of the relative level of aggregates in the manufacturing process of monoclonal antibody substance and its final product, the particle sizes and relative light scattering intensities of monomer and aggregates induced by stirring of humanized monoclonal antibody product were determined by dynamic light scattering. The particle sizes of monomer and aggregates were approximately 5 and 500 nm, respectively. When aggregates and monomer were mixed at the ratio of 1 to 6, the relative light scattering intensity of aggregates was approximately 50%. These findings indicate the relative light scattering intensity of aggregates is approximately 7 times higher than that of monomer. Furthermore, these findings suggest that dynamic light scattering may be useful for the estimation of relative content of aggregates in the case that the relationship between the particle sizes of monomer and aggregates, and their relative light scattering intensities has been already examined.

Keywords: aggregates, monoclonal antibody product, 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)}。例えば、IFN- β 製剤では凝集体が通常のマウス及びトランスジェニックマウスにおいて抗体産生を誘導することが知られている³⁻⁵⁾。また、臨床における抗体の産生頻度と凝集体の割合が相関することも示唆されている^{6, 7)}。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。

しかしながら、高濃度で抗体医薬品を産生すると、小胞体に存在しフォールディングに関与する分子シャペロンに対する抗体医薬品の割合が過剰になり、フォールディングされない抗体医薬品が生じる。その結果、フォールディングされない抗体医薬品より凝集体が誘導され、その割合は最大30%に達する場合がある^{8, 9)}。抗体医薬

品の精製工程には、プロテインAクロマトグラフィーで酸性溶液 (pH約3) による溶出工程が含まれる。このような極端なpHに抗体医薬品が曝露されると、抗体医薬品の表面及び内部の荷電性極性基 (グルタミン酸, アスパラギン酸, リシン, アルギニン, ヒスチジン) の荷電状態が変化する。これによりクーロン相互作用 (荷電粒子間に働く力) によるストレスがかかり、抗体医薬品が変性する。変性した抗体医薬品は凝集体が誘導されやすい¹⁰⁾。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、保存状況下で凝集体がさらに増加する可能性がある¹¹⁾。

凝集体の測定には、サイズ排除クロマトグラフィー、超遠心分析法、場流動分画、動的光散乱法、SDS-PAGE、マイクロ・フロー・イメージング等が用いられている^{12, 13)}。その中で、動的光散乱は不溶性の凝集体も含め最大約5 μ mの粒子径を有する凝集体を、吸光度の測定と同様な簡単な操作で測定可能であり、用いるサンプルの容量も約30 μ Lと微量で測定時間も約数分と短い。ダイナミックレンジは他の測定法に比べて広く、希釈せずに測定できるので、凝集体の解離を回避することができる。また、相対光散乱強度は粒子径の6乗に比例して増大するため¹⁴⁾、高感度の測定が可能である。しかし、

[#]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: +81-3-3700-9347 Fax: +81-3-3700-9084; E-mail: niimi@nihs.go.jp

定量的な関係が成り立つのは球状の場合でのみあり、形状が異なれば相対光散乱強度は異なるため定量的な測定はできない。

我々は抗体医薬品製剤をガラスバイアル中で攪拌することにより、大きな粒子径の凝集体を効果的に誘導できることを見出している¹⁵⁾。そこで同じ濃度の抗体医薬品製剤の単量体とこの方法で作製した凝集体の溶液を任意の比率で混合して動的光散乱で測定し、凝集体の含量と相対光散乱強度との関係について解析を行なった。

2. 方法

(1) サンプルの調製

ヒト化モノクローナル抗体製剤溶液を4度で保存した。実験開始時に25mMクエン酸ナトリウム (pH 6.0)、125mM塩化ナトリウムで0.1mg/mLに希釈した。

(2) 凝集体の誘導

直径1.4cmのガラスバイアルにサンプル1.2mLを入れ攪拌子を用いて250rpm、室温で2.5時間攪拌した。コントロールとして攪拌しないサンプルを同様に調製した。

(3) 単量体、凝集体、単量体と凝集体の混合物の測定

単量体、凝集体、単量体と凝集体の様々な比の混合物の粒子径 (nm) 及び相対光散乱強度 (%) はMalvern社のZetasizer Nano-ZSにより測定した。

(4) 統計解析

データはStudent's t-testを用いて解析した。P値が0.05以下の場合は統計的に有意と考えた。

3. 結果と考察

Fig. 1に単量体、凝集体及び凝集体と単量体の1対4の混合物の粒子径及び相対光散乱強度を示す。単量体は粒子径約5nmの位置に単一のピークを示した。一方、凝集体は粒子径約500nmの位置に単一のピークを示した。凝集体と単量体の1対4の混合物における凝集体及び単量体の相対光散乱強度はそれぞれ61%及び39%であった。

Fig. 2に様々な比率の凝集体と単量体混合液における単量体の相対光散乱強度を示す。凝集体に対する単量体の比率を増加させると、凝集体の相対光散乱強度は低下し、1対6の比率で約50%に低下した。

凝集体が球状と仮定して算出された粒子径に基づく、凝集体の相対光散乱強度は単量体に比べて約100⁶高い値が計算される¹⁴⁾。しかし、結果は約7倍であったことから、凝集体は球状ではないことが示唆された。攪拌により誘導されるモノクローナル抗体の凝集体の形状のマイクロ・フロー・イメージングによる解析では、細長い形状が観察されている¹⁶⁾。本実験で同様な攪拌により誘導された凝集体も細長い形状をしているため、相対光散乱強度が弱いのもかもしれない。

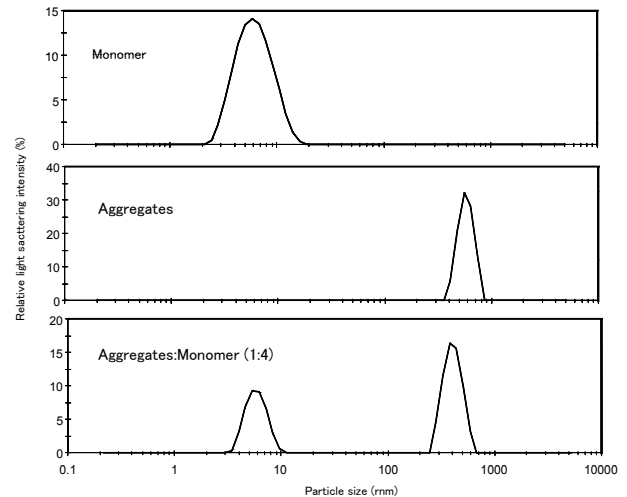


Fig. 1 Particle sizes and relative light scattering intensities of monomer, aggregates and mixture of aggregates and monomer (1:4) of humanized monoclonal antibody product

Humanized monoclonal product solution was transferred to glass vial and stirred at 250 rpm and ordinary temperature for 2.5 h. The solution containing aggregates was mixed with the solution containing monomer at the ratio of 1:4. The particle sizes and relative light scattering intensities of monomer, aggregates and mixture of aggregates and monomer were measured by dynamic light scattering. The data are representatives of 6 experiments.

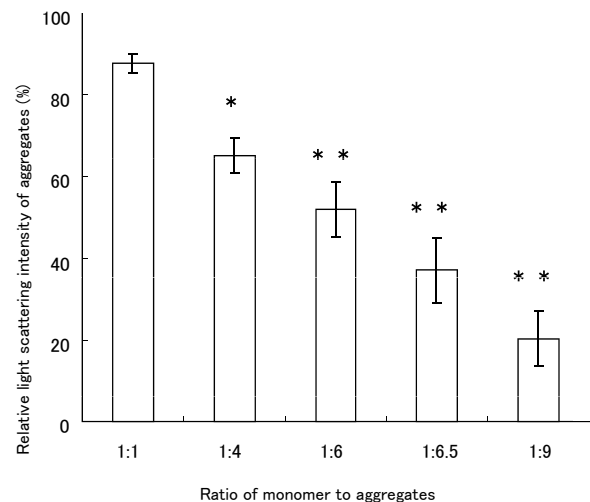


Fig. 2 Relative light scattering intensities of aggregates in the mixture of aggregates and monomer

The solution containing aggregates was mixed with the solution containing monomer at the different ratios. The relative light scattering intensities of aggregates were measured by dynamic light scattering. The data are expressed as the mean \pm S.D. of 6 experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, compared with the immediate left value.

したがって、球状である場合を除き、濃度が未知の単量体と凝集体のタンパク質混合溶液において、動的光散乱により求めた粒子径と相対光散乱強度から凝集体の含量を推定することはできないことが再確認された。

本研究で検討を行なった濃度範囲で単量体と凝集体の比率を変えて調製した混合溶液における凝集体の相対光散乱強度の検量線は、1種類の粒子径の凝集体しか存在しない場合、凝集体含量の推定への活用が考えられる。今後、抗体医薬品の工程内管理試験及び最終製品における凝集体含量の推定において、このような観点からの動的散乱の活用が期待される。

謝 辞

本研究は平成23年度厚生労働科学研究費補助金、研究課題名「医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応した日本薬局方の改正のための研究」、研究代表者川西徹の研究助成金によって実施された。

引用文献

- 1) Rosenberg, A.S.: *AAPS J*, **8** (3), E501-507 (2006)
- 2) Schellekens, H.: *Nephrol Dial Transplant*, **20**, Suppl 6, vi3-9 (2005)
- 3) van Beers, M.M., Sauerborn, M., Gilli, F., Brinks, V., Schellekens, H., Jiskoot, W.: *Pharm Res*, **27** (9) 1812-1824 (2010)
- 4) Rifkin, R.A. Maggio, E.T. Dike, S. Kerr, D.A. Levy, M.: *J Neuroimmune Pharmacol*, **6** (1), 158-162 (2011)
- 5) Seefeldt, M.B. Rosendahl, M.S. Cleland, J.L. Hesterberg, L.K.: *Curr Pharm Biotechnol*, **10** (4), 447-455 (2009)
- 6) van Beers, M.M., Sauerborn, M., Gilli, F., Hermeling, S., Brinks, V., Schellekens, H., Jiskoot, W.: *J Immunol Methods*, **352** (1-2), 32-37 (2010)
- 7) Bertolotto, A., Deisenhammer, F., Gallo, P., Solberg Sorensen, P.: *J Neurol*, **251** Suppl 2, II15-II24 (2004)
- 8) Kramarczyk, J.F., Kelley, B.D., Coffman, J.L.: *Biotechnol Bioeng*, **100** (4), 707-720 (2008)
- 9) Mahler, H.C., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S.: *J Pharm Sci*, **98** (10), 2909-2934 (2009)
- 10) Shukla, A.A. Hubbard, B. Tressel, T. Guhan, S. Low, D.: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **848** (1), 28-39 (2007)
- 11) Treuheit, M.J., Kosky, A.A., Brems, D.N.: *Pharm Res*, **19** (4), 511-516 (2002)
- 12) den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., Jiskoot, W.: *Pharm Res*, **28** (4), 920-933
- 13) Narhi, L.O., Jiang, Y., Cao, S., Benedek, K., Shnek, D.: *Curr Pharm Biotechnol*, **10** (4), 373-381 (2009)
- 14) Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes <http://www.malvern.com/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>
- 15) Niimi, S.: *Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, **129**, 55-60 (2011)
- 16) Joubert, M.K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J., Narhi, L.O.: *J Biol Chem*, **286** (28), 25118-25133 (2011)