

Application  
News

No. Q117

粉粒体測定

Aggregates Sizer を用いたバイオ医薬品  
添加剤のタンパク質凝集抑制能の評価

バイオ医薬品に凝集物が生じるとアナフィラキシーなど人体に重篤な副作用を生じる可能性が示唆されており、製剤化検討時には凝集物が生成しにくい条件を検討する必要があります。条件のひとつに溶液組成がありますが、pH や添加剤の種類、濃度の組み合わせによりタンパク質の安定性が変わるため、多岐にわたる条件検討が必要となります。そのため、安定性の評価においては短時間で評価できることが望ましいと考えられます。

バイオ医薬品凝集性評価システム「Aggregates Sizer」(以下、Aggregates Sizer) は 1 測定にかかる時間が数秒程度で時間あたりに多くの検体を処理できるため、製剤化検討の効率化に有用と考えられます。そこで本報では、Aggregates Sizer を用いて、異なる添加剤を加えたタンパク質溶液に対し、凍結融解を繰り返した後、凝集体生成量を測定しました。その結果、添加剤ごとのタンパク質凝集抑制能の違いを確認できたため、ここに報告します。

H. Maeda

■ サンプル・測定手法

凍結乾燥品のヒト由来ガンマグロブリンを用いました。また溶液としては PBS (pH 7.4) およびその pH を 5.8、6.8、7.8 に変えた場合の 4 条件、並びに添加剤として PBS に対し 0.1% ポリソルベート 20、100 mM L-アルギニン、100 mM D-ソルビトールのいずれかを加えた場合の 3 条件の計 7 条件を検討しました。いずれかの溶液を用いて、タンパク質濃度を 1 mg/ml に調製したものを試料溶液としました。

凝集体生成のため、試料液を -80 °C の冷凍庫中での凍結と室温中での水浴による融解 (以下、FT サイクル) を 16 回繰り返しました。FT サイクルが 0 (FT サイクルなし)、1、2、4、8、16 回の際に凝集体生成量の測定を行いました。

粒子径分布及び定量値の測定は Aggregates Sizer を用いた qLD 法 (Quantitative Laser Diffraction Method、定量化レーザー回折・散乱法) により行いました。セルはマイクロセルを用いました (図 1)。計算パラメータとして屈折率には 1.46-0.10i を、密度には 1.37g/cm<sup>3</sup> を用いています。

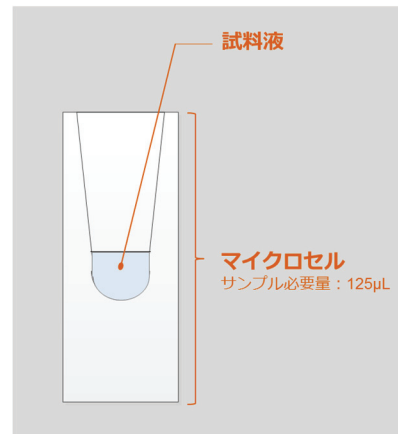


図 1 マイクロセル

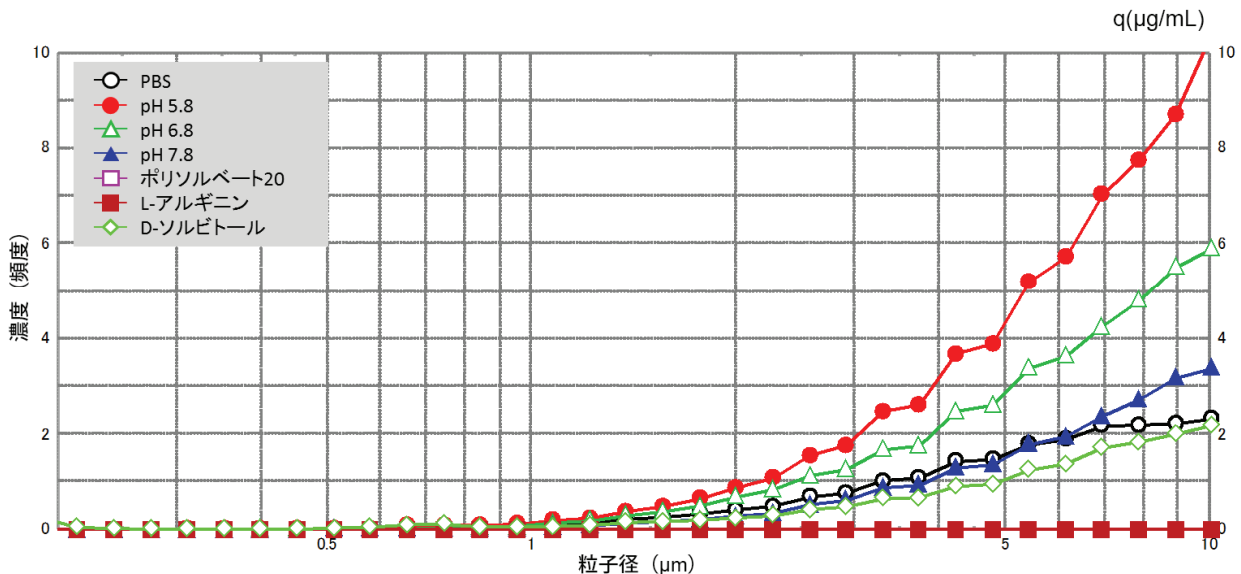


図 2 FT サイクル 16 回後の粒子径分布

## ■ 結果・考察

図2にFTサイクル16回後の各条件における凝集体の粒子径分布を示します。0.2 μm から 10 μm の領域に凝集体が生成していることがわかります。

図3、表1に各条件ごとの0.2-2 μm、2-10 μmにおける凝集体生成量を示します。pHに関しては、その値が小さい程凝集体量が多くっており、PBS から酸性側にした場合に凝集体が増すことがわかります。添加剤に関しては、ポリソルベート 20 およびL-アルギニンの場合には凝集体由来の散乱光強度は検出感度以下となっており、ほとんど凝集体は生じませんでした。D-ソルビトールについては凝集体の発生は見られましたが、PBS のみの場合と比較すると凝集体生成量は半分程度に抑えられています。

図4には、pH 5.8 の条件についてFTサイクルごとの凝集体生成量の推移を示しました。FTサイクルの回数が増えるにしたがって凝集体の生成量が増加していることが確認できます。

以上の結果から、Aggregates Sizer が溶液組成検討に有効であることがわかります。

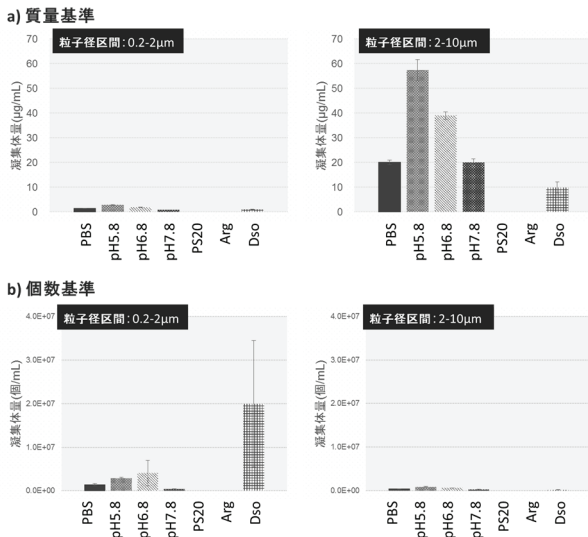


図3 各条件ごとのFT16回後の凝集体生成量

表1 各条件ごとのFT16回後の凝集体生成量

	凝集体生成量 (μg/mL)			
	0.2-2 μm		2-10 μm	
	平均	SE	平均	SE
PBS	1.44	0.04	20.10	0.95
pH5.8	2.85	0.20	57.40	4.25
pH6.8	1.89	0.10	38.99	1.49
pH7.8	0.82	0.01	20.07	1.37
PS20	-	-	-	-
Arg	-	-	-	-
Dso	1.07	0.12	9.93	2.26

\*\* n=3 で測定。

\*\* 表中の略語を以下に示す。

PBS：リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4)

pH 5.8 / pH 6.8 / pH 7.8：PBS の pH をそれぞれの値に変えた場合

PS20：ポリソルベート 20 Arg：L-アルギニン

Dso：D-ソルビトール

\*\* PS20、Arg については散乱光強度が定量下限以下となり、粒子が検出されなかった。

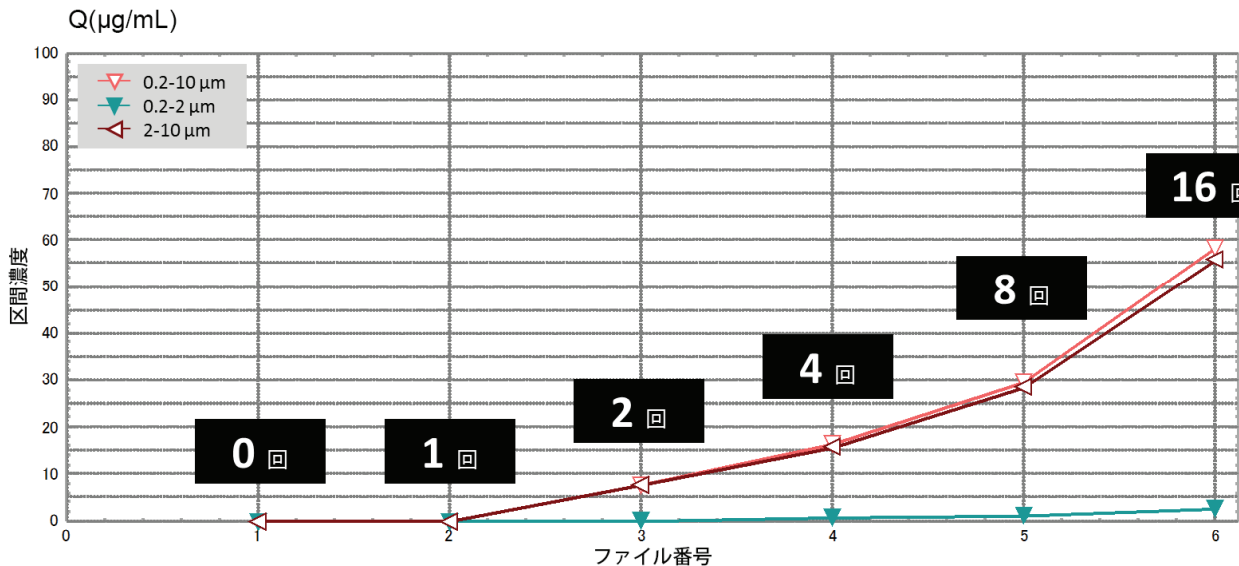


図4 pH 5.8 の場合の FT サイクル数による凝集体生成量の推移