

Stunner:ワンショットでタンパク質濃度とサイジング測定

はじめに

生物製剤の品質をよりよく把握でき、同時にサンプル使用量を少なくできるとしたらどうでしょうか？ Stunnerは、高速UV / Visスペクトル分析とDLS(ダイナミック・ライト・スカタリング)を組み合わせることにより、タンパク質のキャラクタリゼーションを次のレベルに引き上げます。微量量のStunner Plateを使用して、Stunnerはわずか1時間で96サンプルの濃度と品質の両方を測定します。Stunner Plateは2 μ Lのサンプルを使用し、コンタミネーションや蒸発のリスクがありません。高濃度サンプルをそのまま測定できるため、手動希釈によるエラーが発生しません。Stunner Plateにサンプルをピペットで移すか、ハイスルーブットが必要な場合は、お気に入りの自動化システムにつないでください。必要に応じて、21 CFR Part 11 コンプライアンスを追加してください。サンプルの数量と品質の測定値の同期方法を選択します。

このテクニカルノートでは、Stunnerを使用することにより、追加設定せずに単一の実験で、タンパク質の濃度と粒度分布を正確に測定する方法について説明します(図1)。

タンパク質定量と品質管理のマッシュアップ

UV / Vis定量とDLS分析を同時に行うことができる最初にして唯一のシステムで、生物製剤の全情報を取得できます。Stunnerは、生物製剤を0.03-275 ODで測定し、より正確な定量を可能にする波長特異的補正を行います。同時に、DLSを使用して流体力学的直径を測定し、溶液中の凝集物の存在を同定します。B22およびkDアプリケーションでサンプルの凝集傾向を決定することにより、最良候補または製剤を最適化します。Stunnerの性能を活用して、Homebrewで独自のカスタムアプリケーションを作成することさえ可能です。



Figure 1: Stunner: タンパク質の定量とサイジングのための最強コンビ

Stunnerアプリケーション

濃度、サイジング、多分散性

DLSは、溶液中のタンパク質および分子サイズを測定するための、高精度で広く使用されている方法です。Stunnerは、リゾチームのような小さなタンパク質でさえも0.1mg/mLで検出することができ、業界最高水準を満たしています。DLSを使用して、分子の予想されるサイズと多分散性を検証し、サンプルを汚染する可能性のある凝集物や不純物を発見できます。

多分散性は、サンプルサイズ分布の不均一性の尺度です。溶液中の粒子のサイズが不均一である場合、高い多分散指数が測定されます。低い多分散性値は、粒子サイズがより均一であることを示します。UV / Visでタンパク質濃度を測定すると同時に、サンプル品質の多分散性に関する詳細情報を取得できます。

方法:モノクローナル抗体(mAb 1)を、200mM NaCl(pH 5.0、14 mg/mL)を含む30mMクエン酸緩衝液中で調製した。治療用モノクローナル抗体(mAb 2)を、45mMクエン酸リン酸緩衝液(pH5.27、1mg / mL)中で調製した。2 μ Lの各サンプルを、Stunner Plateに三連ロードし、UV / VisおよびDLSで測定し、各5秒の4回のDLS取得を行った。

結果:mAb 1およびmAb 2のDLSデータおよび吸光度スペクトルを図2に示す。タンパク質mAb 1は、単量体モノクローナル抗体の予想サイズを示し、狭い多分散指数<0.1を有する(図2A)。mAb 2のDLSデータは、溶液中に小さい粒子サイズと大きい粒子サイズの両方の存在を示し、これは0.1~0.4の範囲の多分散サイズ分布と一致する(図2B)。DLSが測定されると同時に、各サンプルの正確なタンパク質濃度が報告される。

高濃度IgGの定量

バイオ医薬品は、サンプルの粘度および濁度の上昇により、高濃度で製剤されたときに定量が困難な場合があります。Stunnerは、高い再現性とハイスループットを維持しながら、こういった課題を克服できます。Stunner Plateは、独自機能により、ロックダウン時の精度と確度を備えています。Stunner Plateの各サンプルウェルには、パスの長さが0.1と0.7 mmの2つのマイクロキュベットが含まれています。これらの機能により、0.02~200 mg / mLのタンパク質からの大きなダイナミックレンジにわたる再現性のある測定が可能になります。高濃度のタンパク質溶液は、一般的には粘性です。Stunner Plateのマイクロ流体チャネルは、40cPの粘度までのサンプルと互換性があります。

高濃度タンパク質はまた、凝集による溶液濁度のために定量化において課題が現れることがあります。これを説明

するために、Stunnerに、波長(レイリー散乱)の関数としての光散乱プロファイルの差を説明する波長固有のバックグラウンド補正を適用します。このアプローチは、従来のUV / Vis測定で達成される単一波長バックグラウンド減算よりも優れています。

全UV / Visスペクトルは230~750 nmで計測され、タンパク質と核酸の定量的ためのアプリケーションが組み込まれています。280nmまたは260nmで標準測定を行うか、Unmixアプリケーションを使用して不純物のデコンボリューションを行います。方法:モノクローナル抗体を、pH6.0の10mMヒスチジン中で180mg / mLで調製した。このストックを容積分析で希釈して、特定範囲の濃度(180,150,120,90,60,30,10,3,1および0.3mg / mL)で調製した。2 μ Lの各サンプルを5回反復してStunner Plateにロードした。A280の古典的なタンパク質の適用は、E1%値15を用いて選択された。

結果:mAb希釈系列を図3に示す。測定されたOD値を、標的タンパク質濃度の関数としてプロットした。反復測定間の小さな誤差および線形相関は、Stunner(275 OD)の上限スペクトル限界においてさえ、良好な再現性を示す。

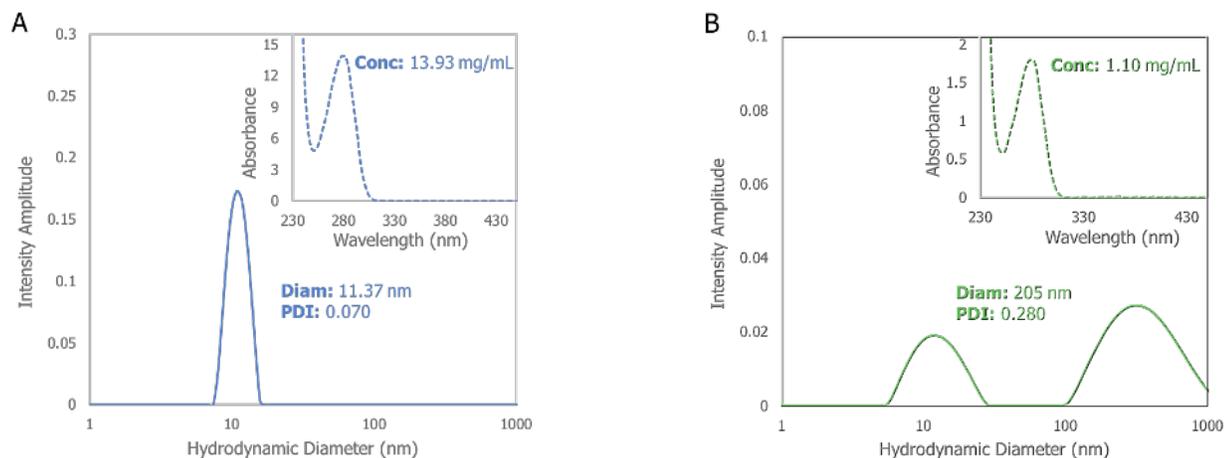


Figure 2: A: mAb1の強度分布および吸光度スペクトル(インセット)B:mAb2の強度分布および吸光度スペクトル(インセット)。各タンパク質の濃度、Z平均直径、PDIが報告されている。

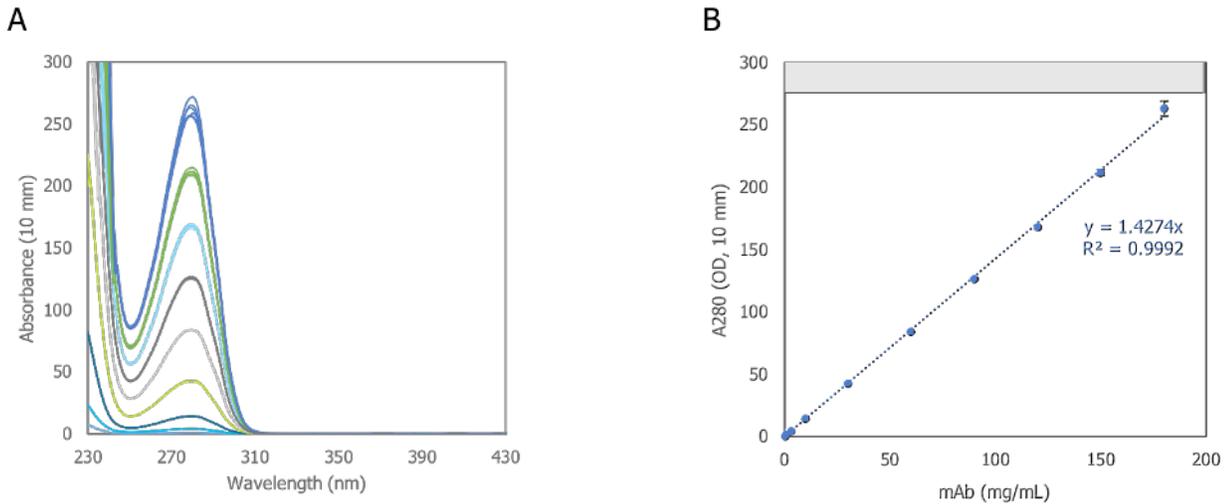


Figure 3: Stunnerで測定した0.3~180 mg / mLのモノクローナル抗体のスペクトル結果。A: オーバーレイされた各mAb濃度の全スペクトル。B: 標的タンパク質濃度の関数としてプロットした平均OD値。灰色の領域はStunnerの線形範囲の上限を示す。エラーバーは、5回の反復測定標準偏差を示す。

kD (拡散相互作用パラメーター)

弱い非特異的相互作用は、溶液中のタンパク質の溶解性および凝集傾向において重要な役割を果たすことが多いです。拡散相互作用パラメーター (kD) はこれらの相互作用を測定し、異なる製剤中のどのタンパク質が凝集する可能性が高いかを決定するのに役立ちます。一番上のコンストラクトや製剤を選択したら、このメソッドを使用してさらに精製できます。1回の実験で、正確なタンパク質濃度、kD、およびB22値を独立して測定することにより、コロイド安定性を確実に読み取ることができます。

方法: 治療用モノクローナル抗体アダリムマブを、異なる賦形剤 (150mM塩化ナトリウム、150mMアルギニン、または150mMスクロース) を含むpH6.0の10mMヒスチジン緩衝液中10mg / mLで調製した。希釈は、各条件について計8サンプル (10,8,6,4,3,2,1,0mg / mLタンパク質) を1mg / mLまで調製した。2 μ Lの各サンプルをStunner Plateで3連ロードし、B22 & kDアプリケーションを各5秒の4回のDLS取得を使用して選択した。各サンプルの流体力学的直径を測定した後、Stunner Analysisソフトウェアは、溶媒の既知の屈折率を用いて拡散係数を計算する。拡散係数は、280nmで測定されたタンパク質濃度の関数としてプロットされている。次に、プロットの傾きおよび切片を用いてkD値を計算する。

結果: 賦形剤を含まない製剤にkDの強い正の値が観察され、サンプル中のタンパク質分子間の正味の斥力相互作用を示した (図4)。スクロースを含む製剤はまた、水和促進機構による糖溶質の既知のタンパク質安定化効果と一

致する、同様の規模の正のkD値を示す。一方、塩化ナトリウムおよびアルギニンを含む製剤は、負のkD値をもたらす。負のkD値は、タンパク質分子間の正味の引力相互作用を示し、塩化ナトリウムはアダリムマブ系の凝集傾向に最も大きな影響を及ぼす。一般に、塩化ナトリウムはタンパク質の親水性表面上で優先的に相互作用し、タンパク質分子間の電荷反発を最小限にすると認識されている。これは、溶液中でのタンパク質の自己会合、特に高濃度での自己会合をもたらす可能性がある。調剤賦形剤として、アルギニンは、表面に露出したアミノ酸残基の性質によって、タンパク質を安定化または不安定化する。この場合、アルギニンは不安定化する賦形剤としての役割を果たし、アダリムマブの優先的な自己会合をもたらす。

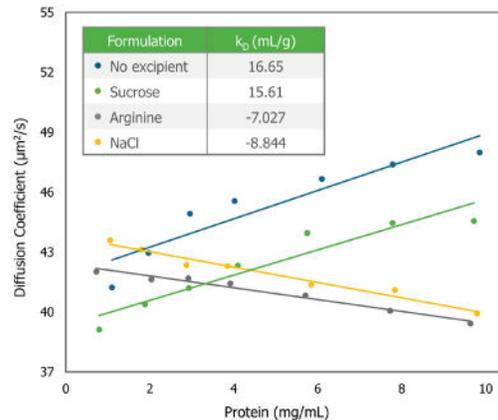


Figure 4: 異なる製剤における測定されたタンパク質濃度の関数としてプロットされた拡散係数。挿入表は、各条件について計算されたkD値を示す。

B22 (第2ビリアル係数)

第2のビリアル係数または自己相互作用パラメーターは、溶液中のタンパク質自己会合の熱力学的尺度です。単一の試験で同じサンプルを使用して、正確な濃度とともにkDとB22の両方の値を独立して測定し、サンプルの凝集傾向の詳細情報を取得します。正のB22値は、タンパク質分子間の正味の反発力を示す一方、負のB22値は、タンパク質間の正味の引力相互作用を示します。ゼロまたはほぼゼロのB22値は、中性相互作用を示します。

方法: B22値を測定するために、PEG40を参照標準として使用する。PEG40の平均散乱強度を、DLSを用いてStunner Plateで測定した。アダリムマブは、異なる賦形剤(150mM塩化ナトリウム、150mMアルギニン、または150mMスクロース)を含むpH6.0の10mMヒスチジン緩衝液中10mg / mLで調製した。希釈は、各条件について計8サンプル(10,8,6,4,3,2,1,0mg / mLタンパク質)を1mg / mLまで調製した。2 μ Lの各サンプルをStunner Plateに3連ロードし、B22 & kDアプリケーションを各5秒の4回のDLS取得を使用して選択した。Stunner Analysisソフトウェアは、各サンプルから測定された光散乱強度と共に参照標準の平均散乱強度を使用して、各タンパク質濃度のR θ 値を計算する。線形一致の傾きは、B22を計算するために使用する。UV / Visスペクトルは同時に測定されるので、正確なタンパク質濃度をプロットしているとの確信が得られる。

結果: 賦形剤を含まない製剤において観察されたB22の強い正の値は、タンパク質分子間の正味反発相互作用を示唆する(図5)。この結果は、同じ条件で独立して測定されたkD値と一致する(図4)。同様に、スクロースを含む製剤は、正のB22値を示し、測定されたkD値と同様の傾向を示す。アルギニンおよび塩化ナトリウムの両方を含む製

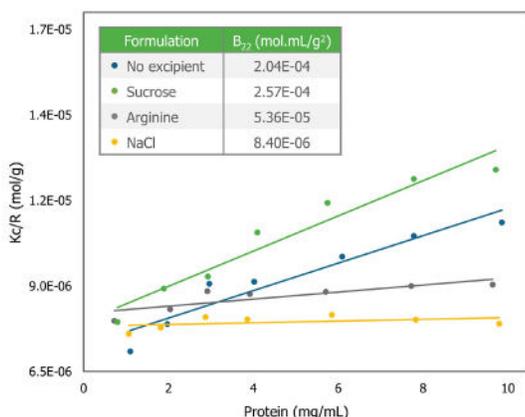


Figure 5: 異なる製剤における測定されたタンパク質濃度の関数としての散乱強度。挿入表は、各条件の計算されたB22値を示す。

剤は、ほぼ中性のB22値を示し、塩化ナトリウムのB22値は大きさが最も小さい。全体として、kD測定とB22測定との間の製剤シリーズのコロイド安定性の傾向は同様で、スクロースまたは賦形剤が最も安定した製剤であり、続いてアルギニン、次いで塩化ナトリウムである。

Homebrew

Homebrewアプリケーションで独自の試験をデザインできます。設定のカスタマイズは、サイジング & 多分散測定、モニターする特定の波長の選択、選択したバックグラウンド補正方法の組み込み、および消光係数分析の選択によって可能です。追加データ処理は、ユーザ定義の方程式を使用してHomebrew結果画面で可能です。Stunner Analysisは、反復平均濃度を計算することによって時間を短縮でき、またこれをさらに進め、吸光度データに対してあらゆる種類の数学的操作を実行できます。

方法: モノクローナル抗体を、0.1%ポリソルベート80 (PS 80)有りおよび無しで、pH 6.0の10mMヒスチジン緩衝液中10mg / mLで調製した。3.5mLのタンパク質溶液を含む別々のサンプルバイアルをVWR Analogボルテックスミキサーにロードした。サンプルを周囲温度で最高速(10)で混合し、サンプルバイアルを異なる時点(20,30,120,180分)で取り出した。ボルテックス混合によってストレスを受けない対照mAb溶液も調製した。サンプルを測定前に4°Cで保存した。2 μ Lの各サンプルをStunner Plateに3連ロードし、各溶液の吸光度スペクトルおよびDLSを、各5秒の4回の取得を用いて測定した。凝集指数は、以下の式を使用してHomebrewアプリケーションの各サンプルを計算した:2

$$\text{Aggregation Index} = \frac{A_{350}}{(A_{280} - A_{350})} \times 100$$

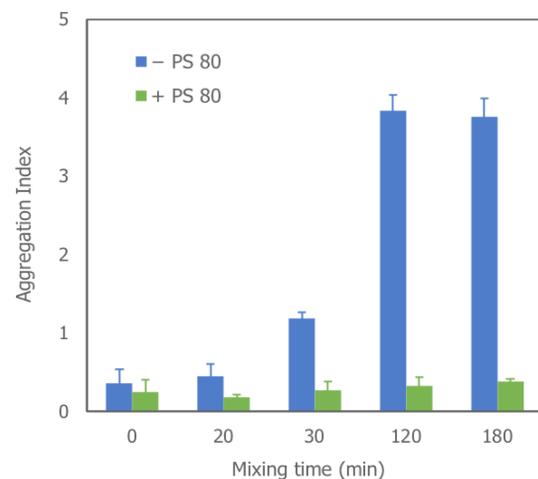


Figure 6: ボルテックス混合時間の関数としてプロットされたPS 80の有無にかかわらず、製剤に調製されたmAbの凝集指数。エラーバーは3連測定の標準偏差を示す。OD350の増加と相関する、PS 80なしの製剤については、より高い濁度が観察された。

Formulation	Conc (mg/mL)	Aggregation Index	Z. Ave. Diam (nm)	PDI
- PS 80 (0 min)	9.21	0.36	11.6	0.100
- PS 80 (180 min)	9.20	3.76	354.6	0.227
+ PS 80 (0 min)	9.78	0.25	11.1	0.067
+ PS 80 (180 min)	9.83	0.38	11.1	0.087

Table 1: ボルテックス混合ストレス後のPS 80を含むか含まない2つの製剤中のmAbの比較。タンパク質濃度、サイジング、および凝集指数測定に対する、3連反復の平均値を列挙する。

結果: 各製剤の凝集指数を図6に示す。界面活性剤を含まない製剤のタンパク質(-PS 80)は、ボルテックス混合ストレス下で有意に凝集する。0.1%PS 80の添加は、タンパク質の凝集を防ぎ、この製剤の凝集指数(+ PS 80)が無視できる程度に増加した。120分および180分間混合されたサンプルは、目に見えて濁って、直径が数百nmほどの溶液中に大きな粒子が存在することを示唆した。DLSと吸光度は同じサンプルセットで1回の実験で測定することができるため、吸光度から計算された凝集指数値はDLS粒子サイズ測定(表1)によって確認された。ボルテックス混合後の(-PS 80)製剤の大きな流体力学的直径および高いPDI値は、溶液中の大きな粒子の存在を意味する。

結論

Stunnerは、1つのプラットフォームで濃度と安定性の測定を定量化するために、UV / Visスペクトル分析とDLSを組み合わせています。Stunnerの独特な特徴は、わずか2 μ Lのサンプルを使用して、高濃度サンプルを測定し、ハイスループット、無希釈、かつ再現性のある方法で粒子品質を追跡できることです。B22およびkDのような他の測定値を、コロイド安定性を評価し、異なる候補または製剤の凝集リスクを比較するために、並行して取得できます。Stunnerは、低濃度から高濃度のサンプルと粒径分布の同時定量を可能にする最初かつ唯一のシステムであるため、より少ないサンプルでより多くの情報を取得できます。

References

1. Volkin DB, Middaugh CR, Joshi SB, Esfandiary R, Kamerzell TJ. 2011. Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63: 1118-1159.
2. Hawe A, Kasper JC, Friess W, Jiskoot W. 2009. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38 (2): 79-87.



Unchained Labs
 6870 Koll Center Parkway
 Pleasanton, CA 94566
 Phone: 1.925.587.9800
 Toll-free: 1.800.815.6384
 Email: info@unchainedlabs.com

© 2018 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Stunner the Stunner logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.