

FTIR による先発品およびバイオシミラー 治療用タンパク質の凝集分析

Agilent Cary 630 FTIR を用いた濃縮サンプル中の
リツキシマブ凝集体の測定

著者

Aveline Neo, Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.



概要

タンパク質の凝集体は、モノクローナル抗体（mAb）などのバイオ医薬品の製造または保管中に発生する可能性があり、抗体の有効性や効力、安全性に影響を与える可能性があります。したがって、mAbの製造プロセス全体を通してタンパク質凝集体をモニタリングすることが重要です。フーリエ変換赤外（FTIR）分光法は、他の技術では困難な高濃度サンプルでも、mAbの凝集を迅速にモニタリングできる非破壊分析技術です。このアプリケーションノートでは、Agilent Cary 630 FTIR を用いて、熱によるタンパク質の凝集を測定しました。本研究から、製剤緩衝液中の高濃度 mAb サンプルの安定性に関する知見が得られます。また Cary 630 FTIR を用いて、先発品またはバイオシミラー製品の品質管理と製造プロセスの最適化を行う方法についても説明します。

はじめに

mAb の凝集体は生命を脅かす免疫応答に寄与する可能性があるため、その開発・製造において重要な問題と見なされています。mAb は、低 pH、高温、高濃度などのストレスの多い条件にさらされると凝集することがあります。治療用 mAb は通常高濃度で投与されるため、重要品質管理特性として mAb 凝集体をモニタリングすることが重要です。¹

バイオシミラーは、参照製品とほぼ同じ品質、安全性、効能の指標を持つ先発品（元の）治療製剤のコピーです。バイオシミラーが規制機関の承認を受けるには、先発品とバイオシミラー製品の物理化学的類似性を確立する必要があります。²

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、タンパク質凝集体を研究するための標準分析法です。しかし、分析中に行う希釈によって、サンプル内の凝集体の組成が変化する可能性があるため、高濃度 mAb サンプルのモニタリングには適さない場合があります。対照的に FTIR は、製薬ラボや製造作業で広く使用されている確立された手法であり、高濃度タンパク質サンプルの凝集研究に適しています。

本研究では、Agilent Cary 630 FTIR により、リツキシマブ（mAb 薬）を用いてタンパク質凝集を観察しました。モデルシステムとして、先発品とバイオシミラーのリツキシマブを熱ストレスにさらし、アミドバンドのシフトを介して FTIR で凝集を観察しました。



図 1. ベンチトップの Agilent Cary 630 FTIR は、用途が広く、革新的かつ直感的であり、固体、液体、気体の分析で定量情報と定性情報が得られます。

Cary 630 FTIR は、その堅牢性や柔軟性、高い性能、使いやすさ、超コンパクトな設計により、多くの製薬ラボで FTIR 分析に用いられています（図 1）。代表的なアプリケーションには、医薬品、入荷品、包装材料の識別や、医薬品成分の濃度などの定量測定があります。Cary 630 FTIR は、アプリケーションによっては、最適化されたサンプルモジュールを用いて、ユーザーによる調整なしで迅速に再構成できます。

さらに使いやすくなるよう、Agilent MicroLab ソフトウェアには、わかりやすい画像付きでステップごとのガイダンスが用意されており、分析ワークフロー全体で直感的に操作できます（図2）。アジレントは高度な FTIR 分光分析ソフトウェアである MicroLab Expert も提供しています。このソフトウェアは一般的なソフトウェアと比べて、分析の柔軟性とスペクトルの視覚化に優れています。MicroLab Expert を使用すると、データ収集中にスペクトル情報を見ることができるので、凝集の研究に役立ちます。



図 2. Agilent Cary 630 FTIR の直感的な Agilent MicroLab ソフトウェアは、分析ワークフローを通してユーザーをガイドし、トレーニングの必要性を低減して、オペレータのミスのリスクを最小限に抑えます。

実験方法

装置構成

Cary 630 FTIR に、1 回反射ダイヤモンド減衰全反射 (ATR) モジュールを取り付けました。表 1 に示すパラメータを使用して、MicroLab Expert ソフトウェアによりデータの取り込みを行いました。

表 1. Agilent Cary 630 FTIR の実験パラメータ

パラメータ	設定値
スペクトル範囲	4,000 ~ 650 cm^{-1}
バックグラウンドのスキャン回数	140
サンプルのスキャン回数	140
分解能	4 cm^{-1}
ゼロフィル係数	なし
アポダイゼーション	三角形
位相補正	Mertz
サンプリング技術	ATR

試料調製

- 先発品とバイオシミラーのリツキシマブは、シンガポールの地元の販売業者から購入しました。mAb サンプルはどちらも、Vivaspin 500 遠心濃縮スピナラム (10 kDa MWCO、Sartorius) を使用して濃縮しました。

- 超純水は、0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジを装着した Milli-Q Integral システム (Merck Millipore) で精製しました。
- 製剤緩衝液の組成は、5.35 mg/mL クエン酸一塩基、無水 pH 6.5 (CAS 18996-35-5)、9 mg/mL 塩化ナトリウム (CAS 7647-14-5)、0.7 mg/mL ポリソルベート 80 (CAS 9005-56-6) としました。試薬はすべて、Sigma-Aldrich (セントルイス) から購入しました。

ワークフロー

先発品とバイオシミラーのリツキシマブの凝集を Cary 630 FTIR を使用して分析するワークフローを図 3 に示します。

まず 2 つのスピナラム濃縮リツキシマブサンプルの濃度を、Cary 60 UV-Vis 分光光度計を使用して UV 吸光度で測定しました。1.7 $\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光係数を使用して、各サンプルのタンパク質濃度を計算しました。先発品とバイオシミラーのリツキシマブの濃度は 50 mg/mL と推定されました。



図 3. Agilent Cary 630 FTIR を使用した先発品およびバイオシミラーのリツキシマブの凝集分析用ワークフロー

凝集の検討では、濃縮リツキシマブ 10 μL を等量の水で希釈し、高温で 15 分間インキュベートしてから、Cary 630 FTIR で測定しました。インキュベーション温度は 20、25、35、45、55、65、75、85、90 $^{\circ}\text{C}$ としました。

凝集速度に関する実験では、濃縮リツキシマブ 75 μL を等量の水または製剤緩衝液で希釈しました。次に各溶液を 60 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートしました。FTIR 測定のために 0.5、1、2、3、4 時間後に各サンプル 10 μL を収集しました。

各実験条件下で得られたサンプルを、Cary 630 FTIR を使用して 3 回測定しました。

データ解析

データ解析には、Agilent MicroLab Expert (バージョン 1.1.0.1) を使用しました。(3 回の測定を) 平均化したスペクトルをデータ処理に使用しました。[Mathematics] (演算) タブの [Spectrum Arithmetic] (スペクトル演算) の [Subtract Spectra] (スペクトルの減算) 機能を使用して、平均化したスペクトルからブランクのスペクトル (水や製剤緩衝液など) を差し引きました。ブランク減算されたスペクトルは、[2D View] (2D ビュー) タブの [Merge View] (ビューの結合) を使用して結合しました。正規化、ピーク面積によるスペクトルの正規化、[Mathematics] (演算) タブの平滑化ウィンドウ 9 と多項式次数 3 を使用した平滑化を使用して、追加の処理とデータ解析を行いました。二次微分スペクトルには、[Mathematics] (演算) タブの下の平滑化ウィンドウ 9 の Savitzky Golay 二次導関数を適用しました。

凝集の検討では、グラフは次の方程式で示される一次反応速度式に従います。

$$\text{速度} = -d[A]/dt = k[A]$$

$$d[A]/[A] = -kdt$$

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt$$

[A] を解くために式を変形し、速度式を次の形で表します。

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$$

$$\ln[A] = -kt + \ln[A]_0$$

ここで、

[A] は時刻 t における濃度、

[A]₀ は時刻 0 における濃度、

k は一次速度定数です。

したがって、時間に対する $\ln[A]$ の曲線の傾きが $-k$ に等しくなります。

一次反応速度の半減期は次のように計算できます。

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

結果と考察

温度による凝集

先発品とバイオシミラーの両方の mAb の二次構造への温度依存性変化を FTIR 分光分析で調べました。図 4 に示すように、タンパク質の特性解析に一般的に使用されるアミドのスペクトルバンドは、アミド I とアミド II³ です。図 4A は、25 $^{\circ}\text{C}$ および 75 $^{\circ}\text{C}$ における先発品リツキシマブの FTIR スペクトルです。25 $^{\circ}\text{C}$ では、アミド I バンドが 1,638 cm^{-1} にあり、これは分子内 β -シートの二次構造に起因したものです。X 線解析から明らかのように、mAb は β -シートに富むタンパク質です。⁴

75 $^{\circ}\text{C}$ では、アミド I バンドは 1,616 cm^{-1} にシフトします。これは、凝集中の分子間 β -シート二次構造の形成に起因します。^{5,6} 25 $^{\circ}\text{C}$ および 75 $^{\circ}\text{C}$ での先発品リツキシマブの二次微分 IR スペクトル (図 4B) は、リツキシマブのアミド I バンドが凝集により 1,638 から 1,616 cm^{-1} へシフトすることを明確に示しています。

図 5 は、先発品とバイオシミラーの両方について、温度の上昇に伴う 1,616 および 1,638 cm^{-1} での吸光度比の変化を示しています。1,616 cm^{-1} での吸光度が 1,638 cm^{-1} を超えるクロスオーバーポイントを考慮すると、先発品とバイオシミラーの融解温度 (T_m) はそれぞれ 70.2 と 71.8 $^{\circ}\text{C}$ と見積もることができません。これらの温度は、示差走査熱量測定で報告されている 71.6 $^{\circ}\text{C}$ というリツキシマブの T_m と一致します。⁷ この結果は、mAb の熱変性の観察が Cary 630 FTIR により適切に行われたことを示しています。

凝集速度に対する製剤緩衝液の効果

熱変性研究では、熱安定性に対する緩衝液の影響を明確に特定できなかったため、詳細な速度論的研究を実施しました。凝集速度に対する製剤緩衝液の影響を明らかにするために、実験中温度を 60 $^{\circ}\text{C}$ (T_m 未満) 一定に保ちました。図 6 は、製剤緩衝液を使用した場合と使用しない場合の先発品およびバイオシミラー mAb の溶液について、60 $^{\circ}\text{C}$ における波長 1,638 cm^{-1} の吸光度の自然対数と時間との関係を示しています。凝集プロセスは一次反応で支配されると仮定しました。⁸ 線の傾きから、一次反応の速度定数 k_1 と $t_{1/2}$ を推定しました。表 2 は、先発品とバイオシミラーの速度パラメータです。

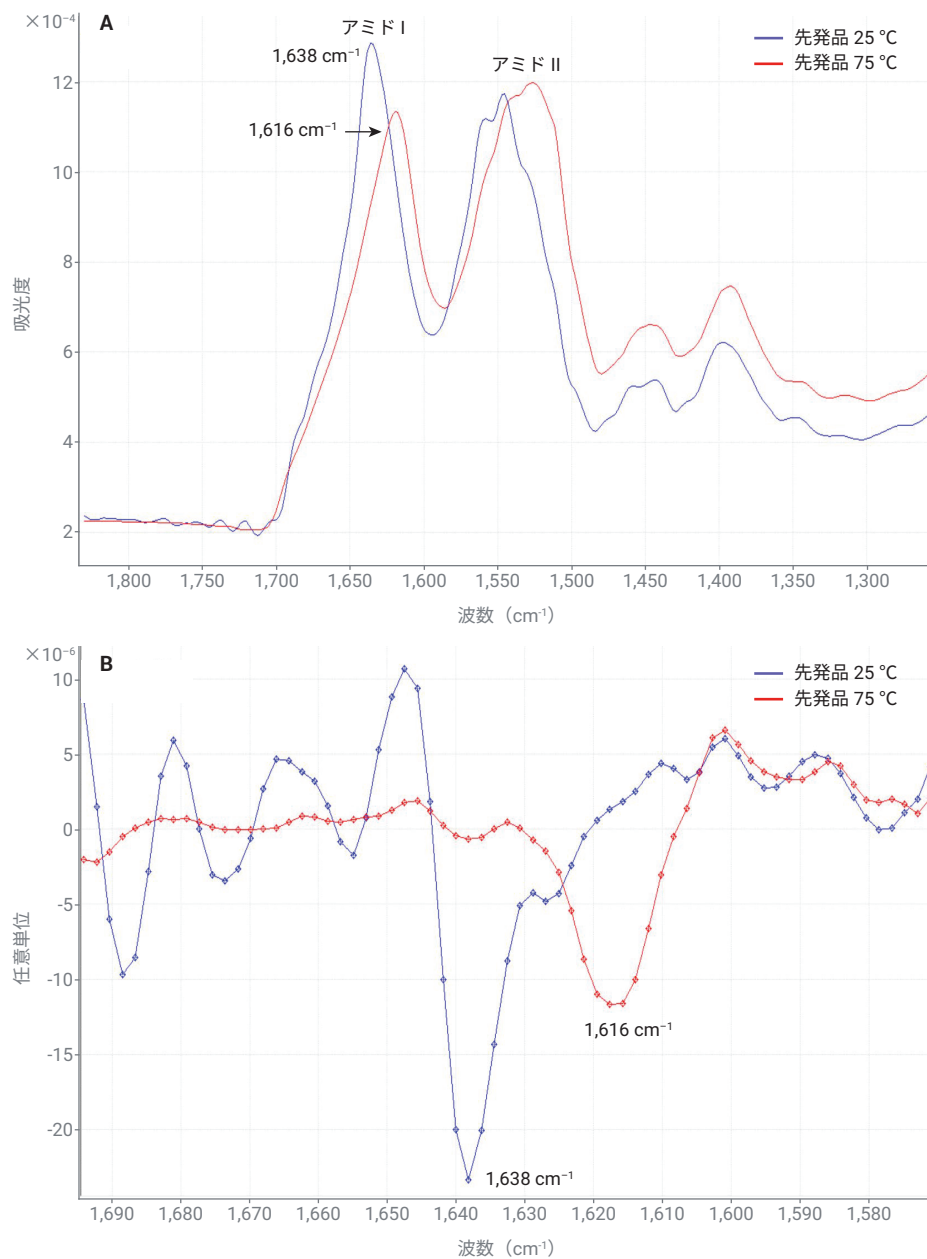


図 4. (A) 25 °C および 75 °C での先発品リツキシマブの FTIR スペクトル。(B) 25 °C および 75 °C での先発品リツキシマブの二次微分 IR スペクトル

両方のタンパク質とも、製剤緩衝液がない場合と比較して速度定数は遅くなり、 $t_{1/2}$ が長くなっていることから、製剤緩衝液が原因で安定性が増していることがわかります。すなわち、製剤緩衝液が熱ストレスに対する保護として機能することを示唆しています。先発品とバイオシミラーの mAb の k_1 は、製剤化されていない条件下で同程度であることがわかりま

した。製剤緩衝液を使用した場合、バイオシミラーは先発品よりも安定していました (k_1 が小さく $t_{1/2}$ が長い)。製剤と賦形剤が、抗体の安定性に大きく影響する可能性があります。pH を維持する賦形剤 (例えば、トリス、酢酸、ヒスチジン、クエン酸緩衝液) は安定性を高めることができます。⁹

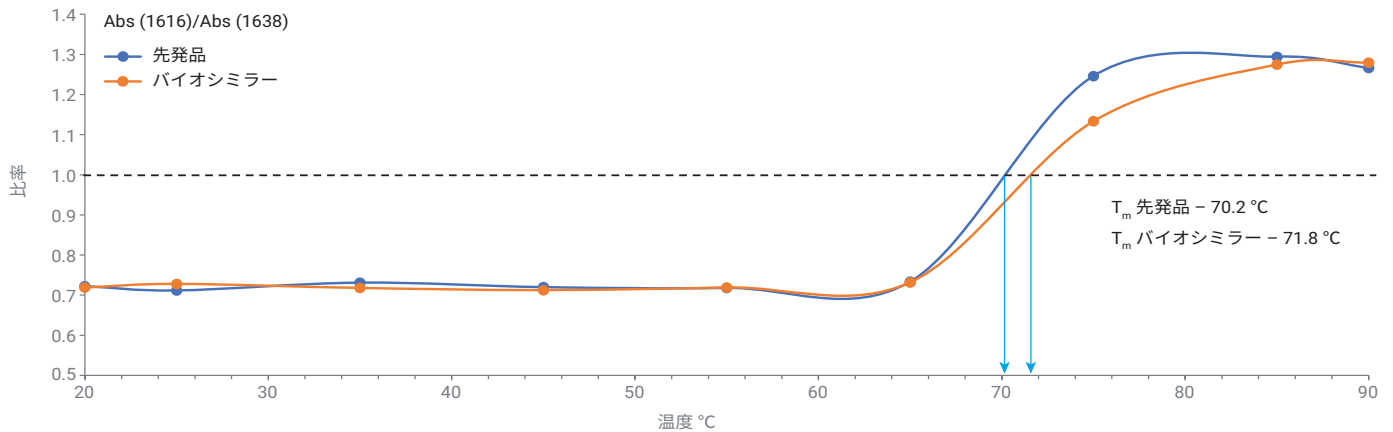


図 5. 温度の上昇に伴う、先発品とバイオシミラーの両方のリツキシマブの波長 $1,616\text{ cm}^{-1}$ と $1,638\text{ cm}^{-1}$ の吸光度比の変化

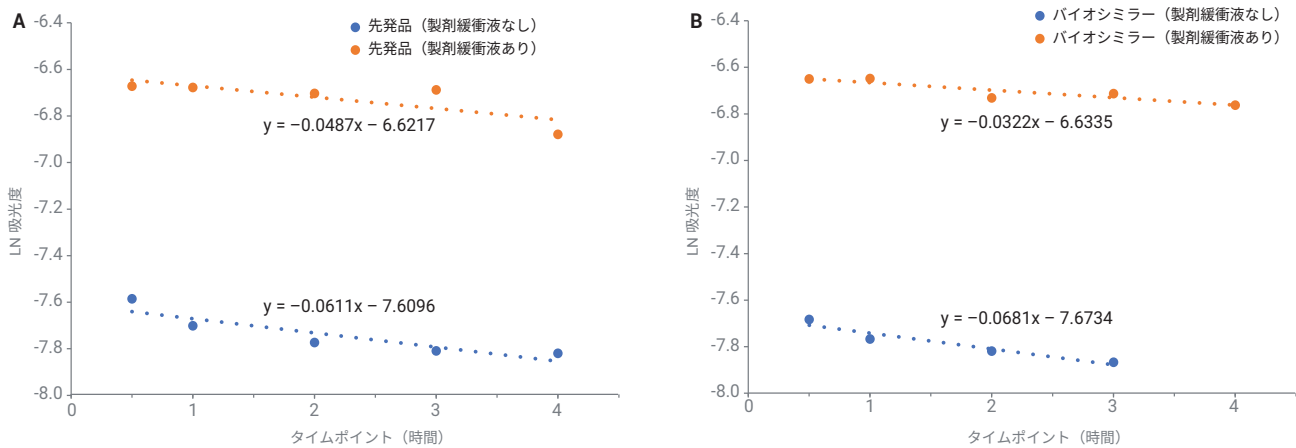


図 6. 先発品 (A) およびバイオシミラー (B) の溶液の $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ における吸光度 ($1,638\text{ cm}^{-1}$) の自然対数の時間変化 (製剤緩衝液ありの場合となしの場合を含む)。4 時間後の製剤緩衝液なしのバイオシミラーの測定値には大きなばらつきがあったため、データポイントを結果から除外しました。

表 2. 先発品とバイオシミラーの凝集速度 (製剤緩衝液ありの場合となしの場合)。

	製剤緩衝液なし		製剤緩衝液あり	
	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
先発品	0.0611	11.34	0.0487	14.34
バイオシミラー	0.0681	10.17	0.0322	21.52

結論

Agilent Cary 630 FTIR は、サンプル前処理手順をほぼ必要とせずに、バイオ医薬品のタンパク質凝集を分析することができるシンプルで使いやすい機器です。mAb の製造プロセス全体にわたって使用可能なメソッドを用いて、高濃度サンプルの凝集を迅速に測定しました。FTIR で決定されたリツキシマブの熱変性温度と文献値との間で一致が見られ、このメソッドの有効性が確認されました。

また、Agilent MicroLab Expert ソフトウェアを搭載した Cary 630 FTIR を使用して、mAb の凝集速度に対する製剤緩衝液の安定化効果を調べました。タンパク質凝集のメカニズムを理解するには研究がさらに必要ですが、この初期的な研究では、Cary 630 FTIR を用いてタンパク質の折りたたみに関するオーソゴナルな情報が得られることが示されています。

Cary 630 FTIR は使いやすく、サンプル前処理が不要で、先発品やバイオシミラータンパク質ベースの治療薬の凝集の品質管理など、バイオ医薬品業界で広く使用できます。

参考文献

1. Carpenter, J. F. *et al.* Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*(4), 201–5.
2. Biologics vs Biosimilars: Understanding the Differences. 入手先：https://www.pfizer.com/news/articles/biologics_vs_biosimilars_understanding_the_differences.
3. Tiernan, H.; Byrne, B.; Kazarian, S. G. ART-FTIR Spectroscopy And Spectroscopic Imaging for the Analysis of Biopharmaceuticals. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *241*, 118636.
4. Costantino, H. R. *et al.* Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Analysis of the Secondary Structure of Recombinant Humanized Immunoglobulin G. *Pharmacy and Pharmacology Comm.* **1997**, *3*(3), 121-128.
5. Sathya Devi, V.; Coleman, D. R.; Truntzer, J. Thermal Unfolding Curves of High Concentration Bovine IgG Measured by FTIR Spectroscopy. *Protein J.* **2011**, *30*(6), 395–403.
6. Baird, G. *et al.* FTIR Spectroscopy Detects Intermolecular β -Sheet Formation Above the High Temperature T_m for Two Monoclonal Antibodies. *Protein J.* **2020**, *39*(4), 318–327.
7. Flores-Ortiz, L. F. *et al.* Physicochemical Properties of Rituximab. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2014**, *37*(10), 1438–1452.
8. Byler, D. M. *et al.* Effect of Sucrose on the Thermal Denaturation of a Protein: an FTIR Spectroscopic Study of a Monoclonal Antibody. AIP Conference Proceedings, *American Institute of Physics* **1998**, *430*(1), 332–335.
9. Ma, H.; Ó' Fágáin, C.; O' Kennedy, R. Antibody Stability: a Key to Performance-Analysis, Influences and Improvement. *Biochimie* **2020**, *177*, 213–225.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE95285922

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, May 31, 2022

5994-4944JAJP