

Title	落下・振とう複合ストレスによるバイオ医薬品の凝集に関する研究
Author(s)	鳥巢, 哲生
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69512
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士論文

落下・振とう複合ストレスによる
バイオ医薬品の凝集に関する研究

大阪大学大学院薬学研究科
創成薬学専攻 高分子化学分野

鳥巢 哲生

目次

略語一覧	2
序論	3
本論	8
第一章 バイアル中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成	8
第一節 背景	8
第二節 結果	9
第一項 落下・振とう複合ストレスによる凝集体の生成	9
第二項 非イオン界面活性剤存在下での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成	18
第三項 振とうストレスによる凝集体生成	20
第四項 振とうによるバイアル壁面からの抗体の剥離	21
第三節 考察	23
第一項 落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成の特徴	23
第二項 バイアル中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路	25
第三項 非イオン界面活性剤の凝集抑制	29
第二章 シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成	30
第一節 背景	30
第二節 結果	31
第一項 SO-シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成	31
第二項 SO+シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成	37
第三項 非イオン界面活性剤存在下における落下・振とうによる粒子生成	41
第四項 シリンジ内壁への抗体の吸着	44
第五項 抗体の構造安定性およびコロイド安定性	46
第三節 考察	48
第一項 SO-シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路	48
第二項 シリコンオイル塗布が落下・振とう複合ストレスによる粒子生成に与える影響	51
第三項 非イオン界面活性剤の凝集抑制作用機序	56
第四項 構造安定性・コロイド安定性と落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度との相関	57
結語	59
謝辞	60
実験の部	61
参考文献	70
主論文	77

略語一覽

CD	Circular Dichroism
COP	Cyclo Olefin Polymer
DLS	Dynamic Light Scattering
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DSF	Differential Scanning Fluorimetry
FDA	Food and Drug Administration
FI	Flow Imaging Analysis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Council for Harmonization
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
mAb	Monoclonal Antibody
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylene Glycol
PES	Polyethersulfone
pI	Isoelectric Point
RMM	Resonant Mass Measurement
rpm	Round Per Minute
RP-UPLC	Reverse Phase-Ultra Performance Liquid Chromatography
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEC	Size Exclusion Chromatography
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TFA	Trifluoroacetic Acid
UV	Ultraviolet

序論

近年、医薬品のモダリティが多様化している。モダリティとは、医薬品の物質的な種類または治療手段のことであり、低分子化合物、中分子(ペプチド)、高分子(タンパク質)、細胞医薬、再生医療といったものが挙げられる。科学技術の進歩により遺伝子組み換えタンパク質の製造が可能となり、タンパク質を有効成分とするバイオ医薬品が増加したことによって、低分子化合物中心であったモダリティが拡大した。1980年に組み替えインスリン製剤が承認されて以降、これまでに100を超えるバイオ医薬品が世界で承認されている。¹⁻³ 2016年の売上高についてみると、44製品のバイオ医薬品が売上高10億ドル以上のブロックバスターとなっており、売上高上位10品目のうち、7品目はバイオ医薬品となっている。抗体医薬品は、標的分子への特異性が高く、副作用が少ないなどの利点があることから、バイオ医薬品の中でも特に開発が盛んである。1998年に最初の抗体医薬品としてリツキシマブが開発されて以降、50を超える抗体医薬品が上市されている。⁴ 日本での抗体医薬品の状況について目を向けると、2016年4月現在で承認されている125品目のバイオ医薬品のうち、35品目が抗体医薬品となっており、³ バイオ医薬品の中でも抗体医薬品が台頭していることがうかがえる。さらに、最近では、糖鎖改変抗体、二重特異性抗体、三重特異抗体などのより革新的な抗体関連医薬品の開発が進んでおり、⁵⁻⁷ より有効性・安全性の高い医薬品やアンメットメディカルニーズの高い疾患に対する医薬品の創出が期待されている。また、特許切れのバイオ医薬品に対するバイオシミラーが利用され始めており、より安価なバイオ医薬品が今後普及していくと考えられる。このような状況から、抗体をはじめとするタンパク質は、医薬品のモダリティとして今後ますます重要になると考えられる。

バイオ医薬品の有効性や安全性、生産性などについては、これまでに多くの課題が解決されてきた。しかしながら、未だいくつかの課題があり、特にバイオ医薬品に含まれるタンパク質の凝集体は、喫緊に解決すべき課題の一つである。タンパク質は、元来、凝集しやすい性質を持っており、バイオ医薬品にはタンパク質の凝集体が不純物として含まれている。バイオ医薬品中のタンパク質凝集体は免疫原性を持つことが指摘されており、薬効成分に対する中和抗体産生を引き起こし、ひいては薬効の著しい低下を引き起こす可能性がある。^{8,9} また、薬効を低下させるだけでなく、アナフィラ

キシーショックのような重篤な副作用を引き起こすことも知られている。実際に、少量の凝集体が抗体医薬品の免疫原性を高めるとの実験結果や、重篤な副作用のため販売が中止となったポリエチレングリコール (Polyethylene Glycol、PEG) 化ペプチド製剤に凝集体の可能性のある微粒子が多く含まれていたことが報告されている。^{10,11} PEG 化ペプチド製剤に関する報告では、7 件の死亡事例を含む 49 件のアナフィラキシー症例が確認されており、安全なバイオ医薬品を開発するためには、タンパク質凝集体の量を最小限にすることが必須であると言える。

このような背景から、米国 Food and Drug Administration (FDA) は Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products を 2014 年に発行し、バイオ医薬品開発における免疫原性リスクの低減について方針を示している。¹² その中で、タンパク質凝集体を管理することの重要性を明記しており、バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体の量を最小限にするため、適切な凝集体分析法の設定な

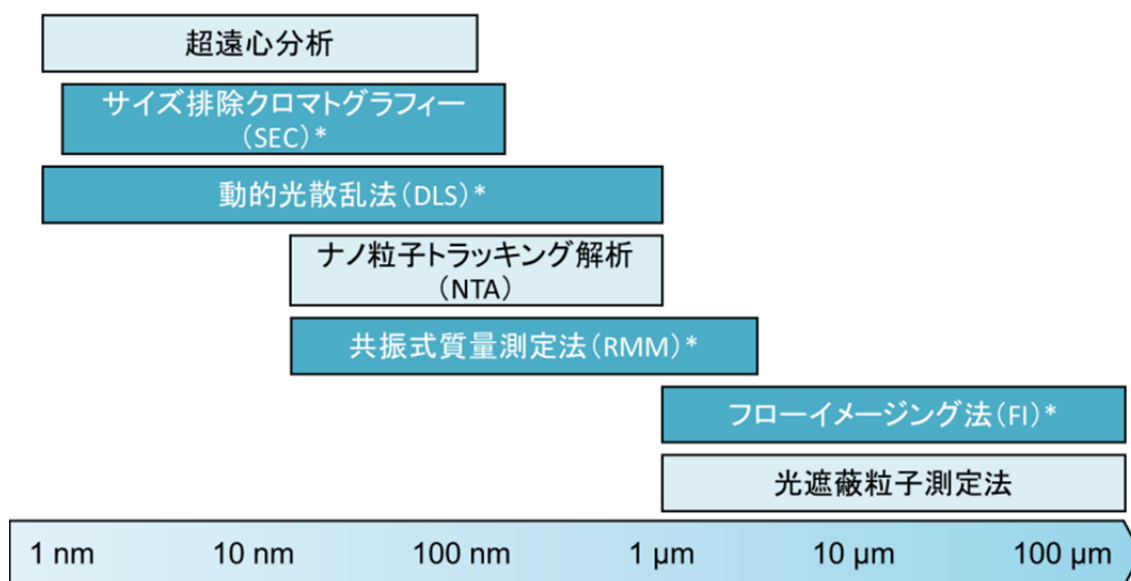


Figure 1. 凝集体のサイズに応じた分析法 (*:本研究に使用した分析法)

らびに細胞培養、精製工程、処方、容器及び施栓系の最適化が必要であると述べている。タンパク質凝集体は、数十 nm から数 mm まで幅広い分布を持つため、全範囲の凝集体を分析するためには複数の分析方法を組み合わせる必要がある。**Figure 1** の通り、バイオ医薬品の典型的な品質試験項目であるサイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography、SEC) と光遮蔽粒子計数法だけでは 0.1-1 μm の粒

子を分析することができない。0.1-10 μm の凝集体粒子が高い免疫原性を持つとの報告があることから、^{13,14} 品質試験で分析されない 0.1-1 μm の粒子の分析は、バイオ医薬品の分析における課題であった。0.1-1 μm の粒子については、これまで頑健な定量法がなかったが、近年開発された共振式質量測定 (Resonant Mass Measurement、RMM) やナノ粒子トラッキング解析 (Nanoparticle Tracking Analysis、NTA) といった分析法がバイオ医薬品中のタンパク質凝集体分析に活用され始めており、^{15,16} 凝集体の分析に関する課題は解決されつつある。

細胞培養と凝集体生成の関係についても様々な研究が行われており、培養中の pH、温度、溶存酸素や培地組成によって培養中に生成するタンパク質凝集体量が変化することが知られている。¹⁷ 精製工程については、Protein A 精製工程の Low pH ストレスや、充填工程でのポンプによる送液によってタンパク質凝集体が生成するとの報告がある。^{18,19} タンパク質の凝集を抑制するための添加剤についても積極的に検討が行われており、スクロース、アルギニンや非イオン界面活性剤などがタンパク質の凝集を抑制する効果を持つことが知られている。²⁰⁻²²

製剤開発における処方検討では、主に処方スクリーニングとストレス安定性試験の2種の検討が実施される (Figure 2)。処方スクリーニングでは、バッファーの組成や pH、添加剤の種類および濃度などの組み合わせについてスクリーニングを行う。そのため、多数の試料の評価を行う必要があり、96 穴プレートフォーマットで分析可能な示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry、DSC)、示差走査蛍光測定 (Differential Scanning Fluorimetry、DSF) または動的光散乱 (Dynamic Light Scattering、DLS) などのハイスループットな評価方法が利用される。これまでに、構造

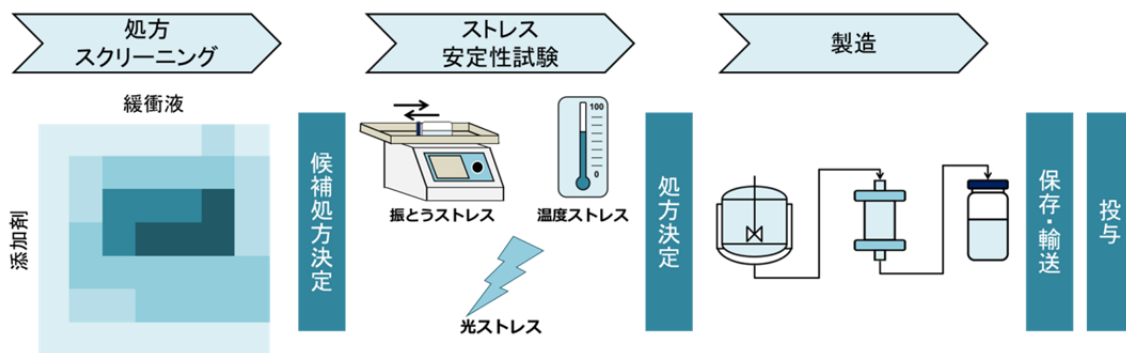


Figure 2. バイオ医薬品の処方開発から投与までの流れ。はじめに処方スクリーニングにより候補処方を選定し、その後のストレス安定性試験の結果から最終処方を決定する

安定性およびコロイド安定性からタンパク質の凝集安定性を予測できる可能性が示されており、^{23,24} DSC や DSF は構造安定性評価に、DLS はコロイド安定性評価に用いられる。処方スクリーニングによって選択された候補処方について、ストレス安定性試験を実施してストレス条件下での安定性を評価し、最も安定な処方を決定する。タンパク質の凝集は、バイオ医薬品の製造から投与までに起こりうる、熱、酸化、光、振とうなどの様々なストレスによって引き起こされる可能性がある。ストレス試験としては、簡便に実施できる、熱、凍結融解、光、振とうなどに対するものが一般的である。^{23,25,26} また、近年盛んに開発されている高濃度バイオ医薬製剤については、高濃度であること自体が凝集を引き起こす要因となるため、²⁷ 高濃度での安定性についても評価する必要がある。一般的なストレス試験は、様々なストレスの影響について簡便に評価できる利点があるが、それぞれのストレスについて個別に凝集安定性を評価するため、熱には安定でも振とうには不安定な処方などを選択する可能性があり、複数のストレス試験を組み合わせるなどの対策が必要である。また、バイオ医薬品は投与までに複数のストレスを複合的に受けると考えられる。ストレスごとにタンパク質に与える作用は異なっており、複数のストレスが組み合わさることで、相乗的にタンパク質の凝集を引き起こす可能性がある。複数のストレスの相乗的な作用が認められる場合は、個別の安定性試験の結果を組み合わせても、相乗作用に対する安定性は評価できないと考えられる。International Council for Harmonization (ICH) Q5C ガイドラインでは、ストレス安定性試験の実施を強く推奨しており、その意義の一つに「製品が申請する保存条件以外の条件に偶発的に曝された場合(例えば、輸送中)、製品に悪影響があるかどうかを判断すること」が挙げられている。²⁸ この点からも、医薬品が患者への投与までに複合的なストレスを受ける可能性があるのであれば、複合ストレスを反映するストレス試験が必要であると言える。

医薬品の輸送時には、熱、凍結融解、落下、振とうなどが組み合わさって起こる可能性がある。包装及び輸送条件が適切であれば、熱、凍結融解のストレスは避けることが可能であるが、輸送時の落下および振とうによる影響を避けることは困難である。これまでに、落下と振とうのそれぞれがタンパク質凝集体生成を引き起こすとの報告はあるが、²⁹⁻³¹ 落下と振とうの複合ストレスに対するバイオ医薬品の凝集安定性については報告がない。スターラー等を用いた振とうストレス試験では実際の輸送時の安定

性を評価できてないとの報告もあり、³² 輸送中に落下、振とうなどが複合的に作用したタンパク質の凝集が起こると考えられる。なお、落下と振とうそれぞれの凝集メカニズムとして、落下はキャビテーション発生による凝集誘発、振とうは気液界面での凝集誘発などが報告されている。^{33,34} そこで本研究では、落下・振とう複合ストレスによるバイオ医薬品の凝集に関して検討を行った。錠剤の衝撃に対する摩損性やもろさを評価するために使用される摩損度試験機³⁵⁻³⁷を応用し、バイオ医薬品の落下・振とう複合ストレス試験を実施した(**Figure 3**)。注射剤として使用されるバイオ医薬品には、凍結乾燥製剤と溶液製剤がある。凍結乾燥製剤の場合でも振とうストレスが安定性に影響を与えたとの報告があり、³⁸ 凍結乾燥製剤の落下・振とう複合ストレスに対する安定性も興味深い。本研究では、近年開発が盛んな溶液製剤の安定性について検討を行った。³⁹ 本学位論文第一章では、バイアルに充填した抗体溶液について、第二章ではプレフィルドシリンジに充填した抗体溶液について研究を行い、落下・振とう複合ストレスにより引き起こされる凝集体生成経路を明らかにした。加えて、落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成の予防や予測についても検討を行った。

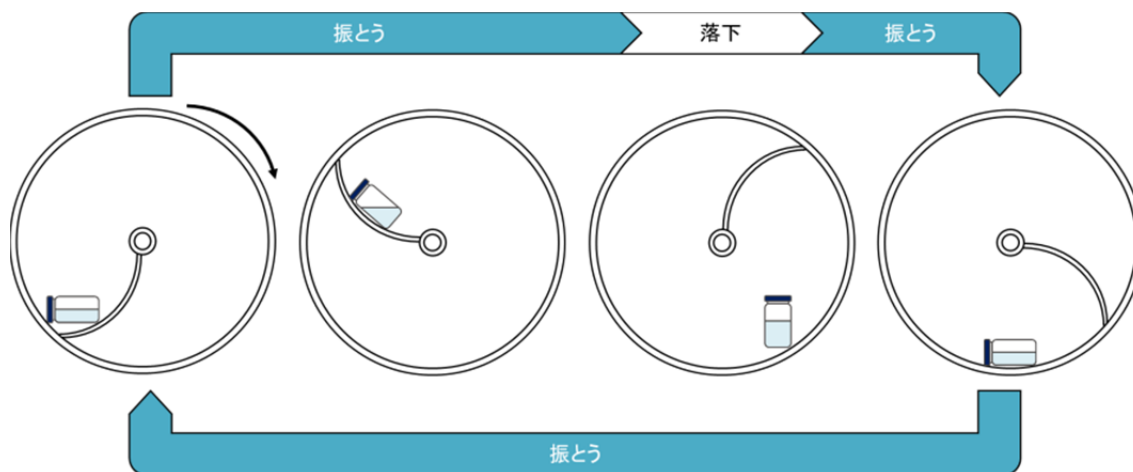


Figure 3. 摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験

本論

第一章 バイアル中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成

第一節 背景

序論に述べたように、タンパク質の凝集は、高温、低 pH、酸化などの様々なストレスによって引き起こされる。^{25,26} 落下もタンパク質の凝集を引き起こすストレスの一つとして知られている。タンパク質溶液が充填されたバイアルなどが落下し、床などの固い材質の面と衝突する際にキャビテーションバブルが生じる。⁴⁰ キャビテーションバブル崩壊時に、キャビテーションバブル周辺が局所的に高温・高圧となるため、タンパク質の凝集が引き起こされる。³³ また、キャビテーションバブル崩壊に伴う高温によって、水分子が分解され、水素とヒドロキシラジカルが生成することも知られており、ヒドロキシラジカルによって酸化が起き、凝集の要因となる可能性もある。²⁹ 振とうもタンパク質凝集体を増加させるストレスの一つである。タンパク質が気液界面に吸着すると核形成が起こる。³⁴ 振とうによる攪拌が気液界面で生じた核同士の衝突および核と核以外のタンパク質の衝突を促進し、タンパク質凝集体生成を引き起こすと考えられている。³⁰

落下と振とうはバイオ医薬品の製造、輸送、使用中などに起こる可能性がある。落下と振とうそれぞれによって引き起こされるタンパク質の凝集についてはこれまでに様々な報告があるが、²⁹⁻³¹ 落下と振とうの複合ストレスによるタンパク質の凝集については報告がない。そこで本研究では、落下・振とう複合ストレスに対するタンパク質の凝集安定性について検討を行った。

摩損度試験機は、錠剤が製造や輸送中に受ける振動や衝撃などの機械的ストレスに対する錠剤の物理的安定性を評価する機器として広く利用されている。剤形は異なるものの、バイオ医薬製剤も輸送中に錠剤と同様の機械的ストレスを受けると考えられるため、本研究では摩損度試験機を用いて落下・振とう複合ストレスに対する安定性試験を実施した。落下・振とう複合ストレス試験後、試料を SEC、DLS、フローイメージング分析(Flow Imaging Analysis, FI)を用いて分析し、落下・振とう複合ストレスによ

り生成したタンパク質凝集体を評価した。SEC および DLS では nm オーダーの凝集体を分析した。FI では、**Figure 4** の通り、フローセル内を流れる粒子の画像を撮影し、撮影した画像から μm オーダーの粒子数を計数した。落下・振とう複合ストレスによる抗体の立体構造の変化および化学的劣化については、それぞれ円二色性(Circular Dichroism、CD) スペクトル測定、液体クロマトグラフィー-質量分析(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry、LC-MS)により評価した。また、非イオン界面活性剤のタンパク質凝集抑制作用についても検討した。

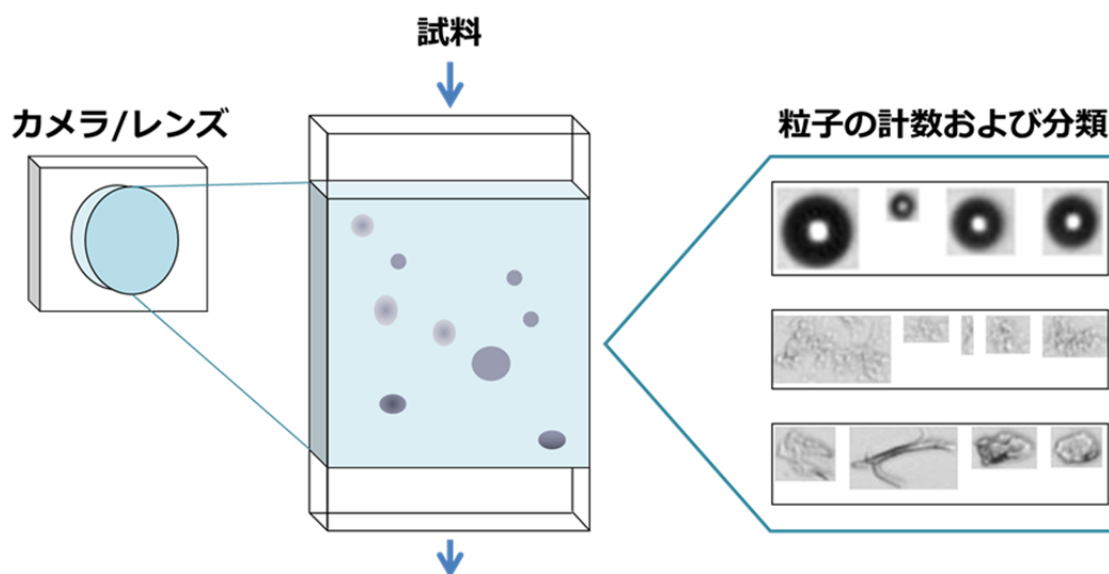


Figure 4. FI による μm オーダーの粒子の分析

第二節 結果

第一項 落下・振とう複合ストレスによる凝集体の生成

モノクローナル抗体-A (Monoclonal Antibody-A、mAb-A) 溶液を充填したバイアルを繰り返し落下・振とうした後、試料を種々の手法を用いて分析した(**Figure 5**)。

Figure 1の通り、SEC(分析範囲: $<200\text{ nm}$)、DLS(分析範囲: $1-1000\text{ nm}$)およびFI(分析範囲: $>1\ \mu\text{m}$)を組み合わせることによって、単量体から μm オーダーまでの凝集体

を分析した。SECによる分析では、単量体のピーク面積が著しく減少した(**Figure 6a**)。充填容量1.0 mLで落下および振とうを400分間行った場合、単量体のピーク面積は97%減少した。ピーク面積の減少速度は充填容量によって異なっており、充填容量が多くなるほどピーク面積の減少速度は遅かった。全ピーク面積に対する単量体ピーク面積の割合(ピーク面積%)については、落下・振とう複合ストレスにより僅かに増加する傾向が見られたが、顕著な変化は見られなかった(**Figure 6b**)。つまり、可溶性凝集体のピーク面積も単量体のピーク面積と同等の速度で減少した。DLSを用いてnmオーダーの粒子の平均粒子径(Z平均粒子径、Z-Ave)を測定したところ、充填容量が1.0 mLの場合を除いて、平均粒子径に落下・振とう複合ストレスによる顕著な変化は認められなかった(**Figure 6c**)。充填容量1.0 mLの試料については、400分間の落下・振とう複合ストレス試験後に平均粒子径が大きく変化した。しかしながら、測定時のカウントレートの値が低かったことから、nmオーダーの粒子濃度が400分間の落下・振とう複合ストレスによって低下しており、DLSでは平均粒子径を適切に分析できなかったと考えられたため、充填容量1.0 mLの試料の400分のデータは不採用とした。FIの結果から、 μm オーダーの粒子が落下・振とう複合ストレスによって経時的に増加することが明らかとなった(**Figure 6d**)。 μm オーダーの粒子数については、SECにおける単量体のピーク面積減少とは異なり、充填容量が1.5 mLのとき粒子数の増加が最も速く、充填容量1.0 mLのとき最も遅かった。しかしながら、粒子の分布に着目すると(**Figure 6e**)、充填容量が1.0 mLの試料と充填容量が1.5 mLおよび2.0 mLの試料で異なる傾向が見られた。充填容量1.0 mLで400分間落下・振とう複合ストレス試験を行った場合は、5-10 μm の粒子の割合が41%と最も多く、10 μm 以上の粒子の割合は19%であった。一方で、充填容量が1.5 mLと2.0 mLの試料については、5 μm 未満の粒子の割合が約70%と最も多く、10 μm 以上の粒子の割合は5%未満であった。

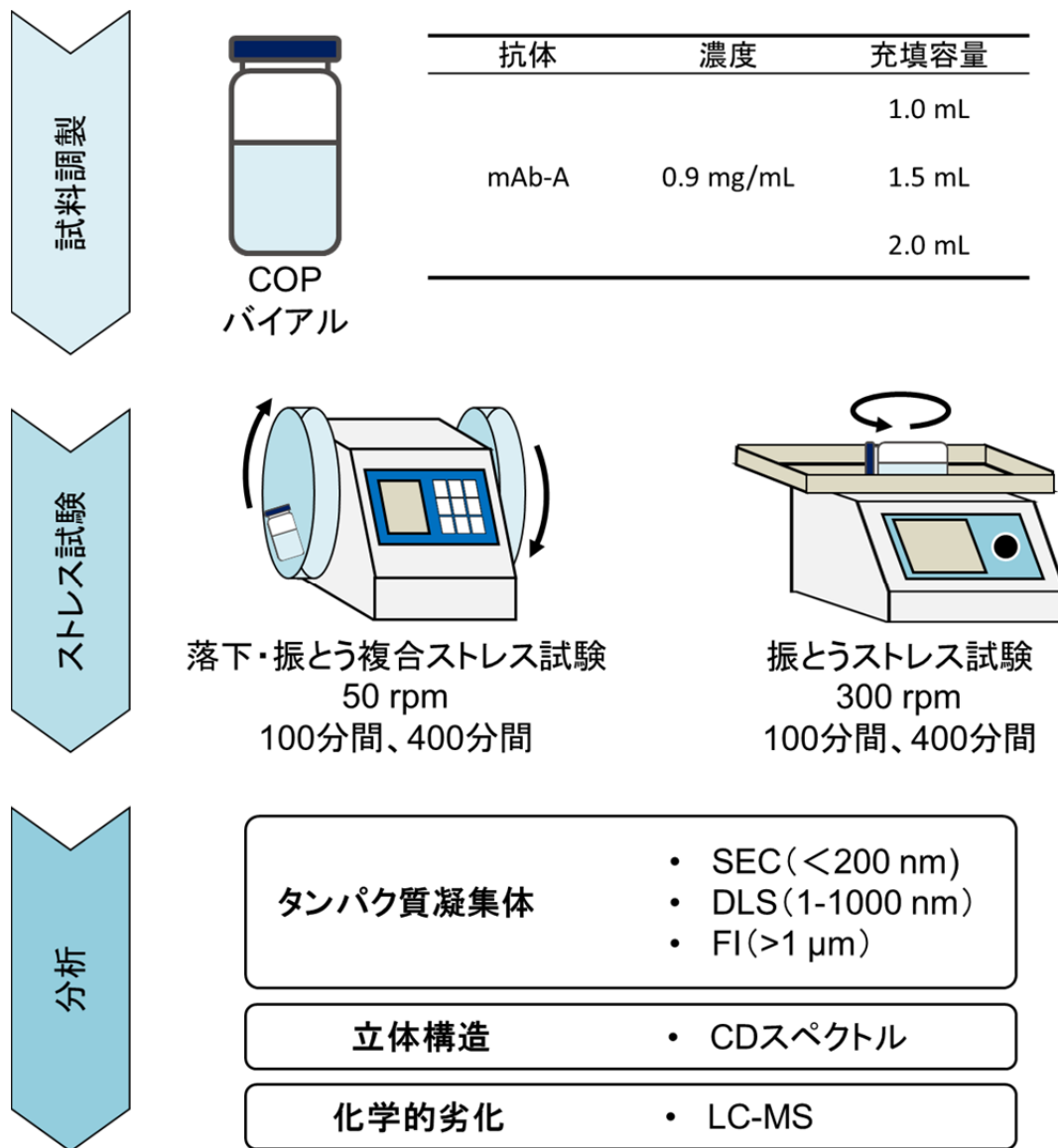


Figure 5. 第一章で実施したストレス試験の概要

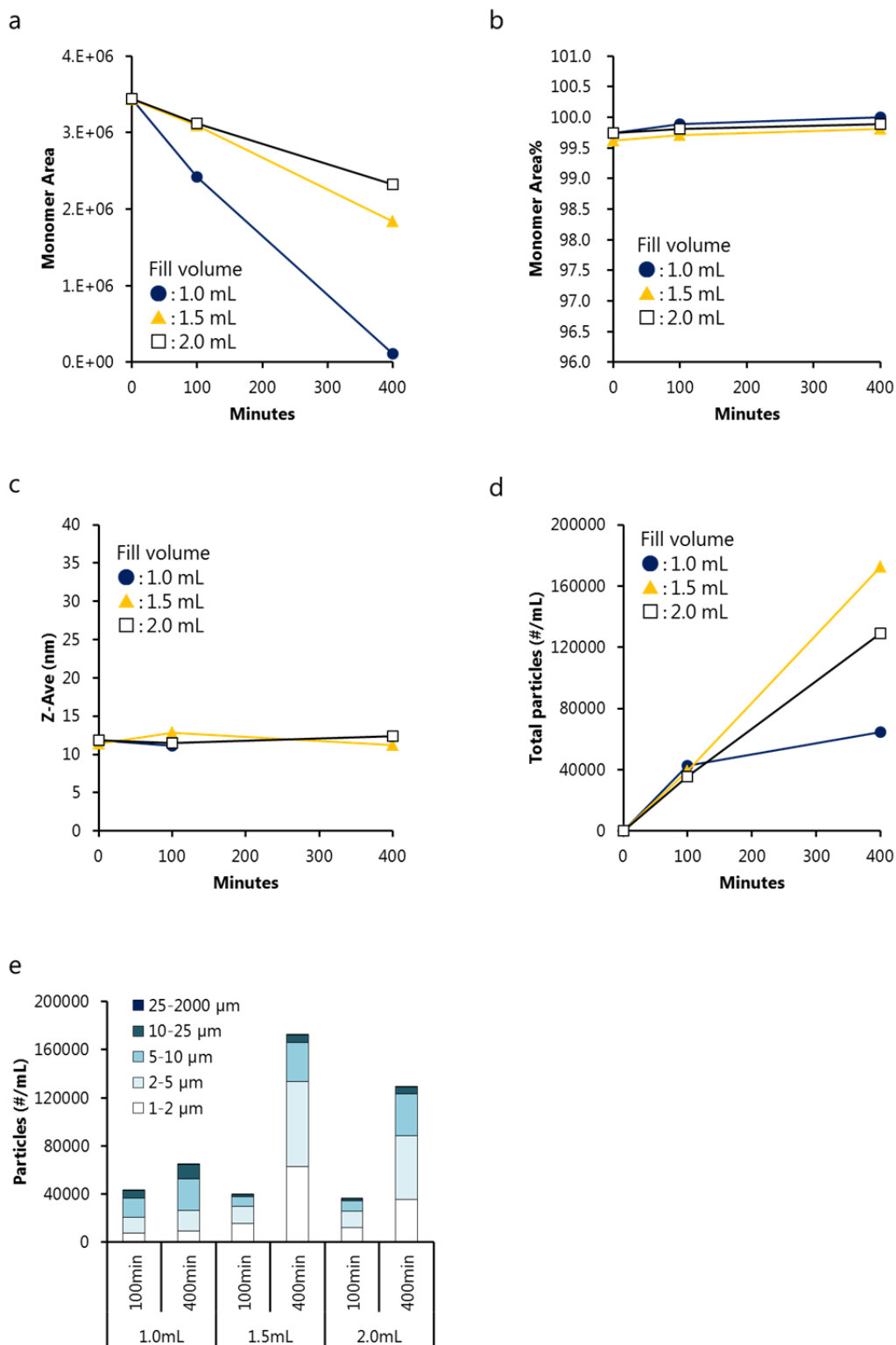


Figure 6. 落下・振とう複合ストレスによって生成した凝集体の分析結果。a: SEC の結果 (単量体ピーク面積)、b: SEC の結果(単量体ピーク面積%)、c: DLS の結果、d: FI の結果(総粒子数の経時変化)、e: FI の結果(粒子の分布)

落下・振とう複合ストレス試験後の二次構造および三次構造の変化は、それぞれ遠紫外CDスペクトル、近紫外CDスペクトルにより評価した。**Figure 7**の通り、遠紫外CDスペクトルでは、落下・振とう複合ストレスを受けた全ての試料について、ストレスを受けていない試料と同様に218 nmに負の極大ピークが見られた。このことから、落下・振とう複合ストレス試験後の可溶性画分に含まれるmAb-Aの二次構造は、落下・振とう複合ストレスを受けていないmAb-Aと同等であると考えられた。また、近紫外

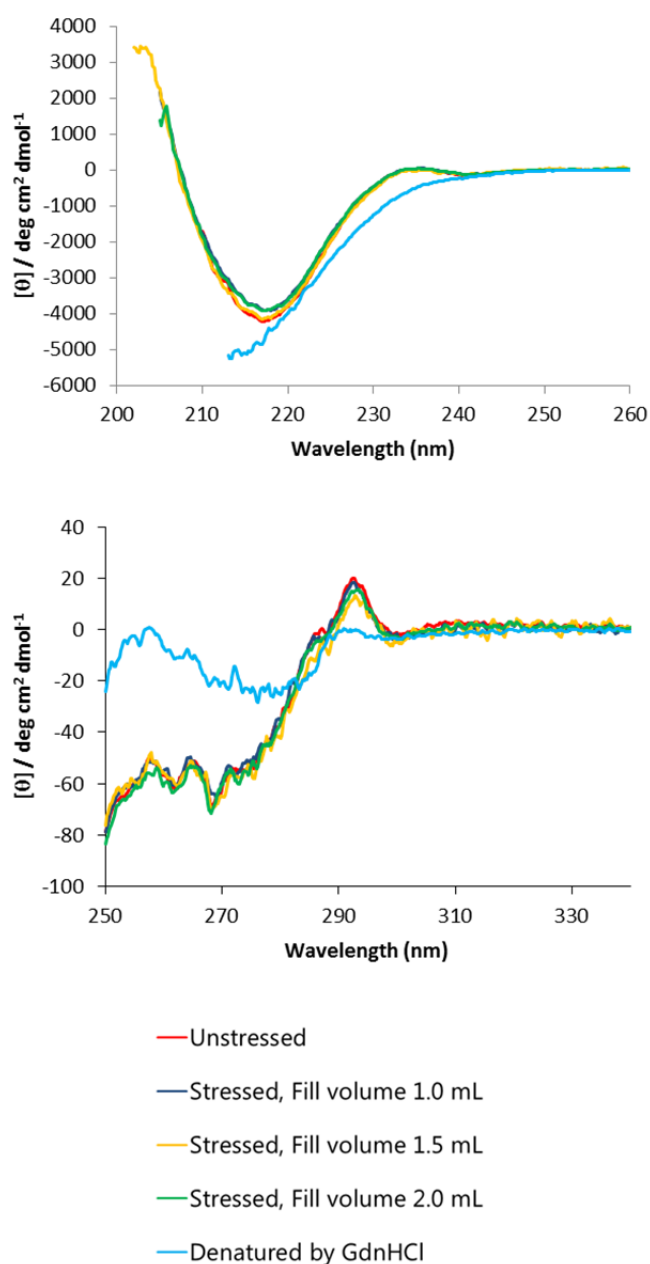


Figure 7. CD スペクトルの結果。上:近紫外 CD スペクトル、下:遠紫外 CD スペクトル

CDスペクトルの結果から、三次構造についても、落下・振とう複合ストレス試験後の試料とストレスを受けていない試料で差は認められなかった。

落下・振とう複合ストレスを受けた試料の可溶性画分および不溶性画分を回収し、Idesによる消化およびTris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)による還元を行った後 (Figure 8)、LC-MSを用いて化学的劣化の有無について検討を行った。その結果、可溶性画分および不溶性画分のいずれにおいても酸化等の化学的劣化は認められなかった (Figure 9-11)。

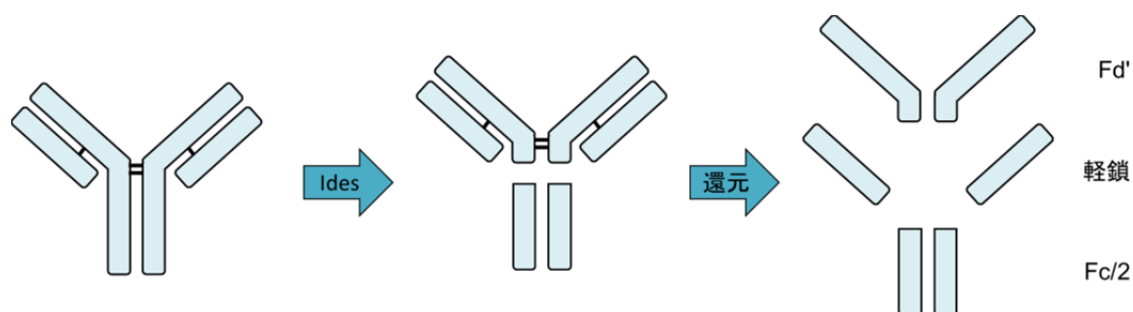


Figure 8. 抗体の Ides による消化と TCEP による還元

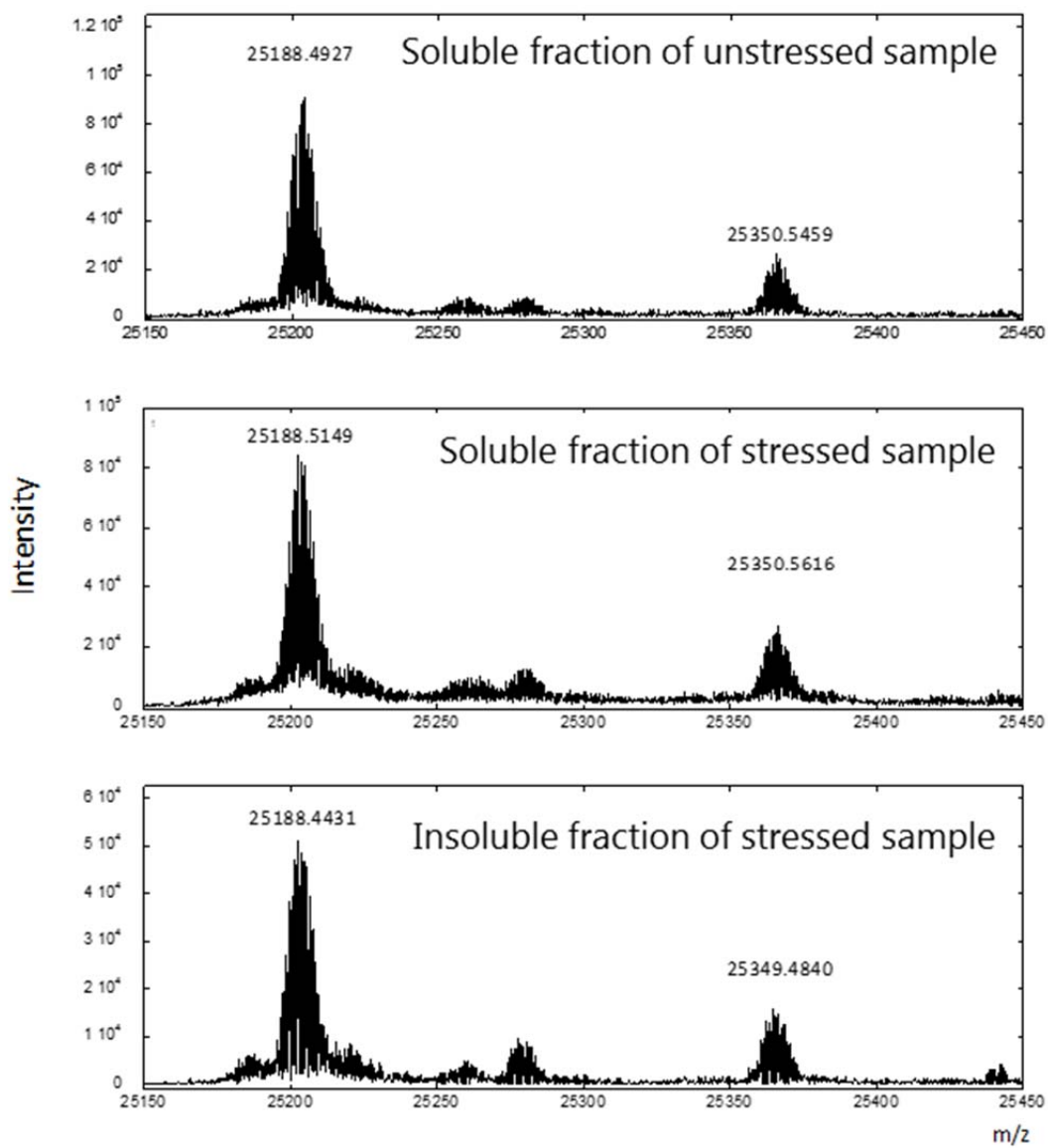


Figure 9. LC-MS の結果 (Fc/2)

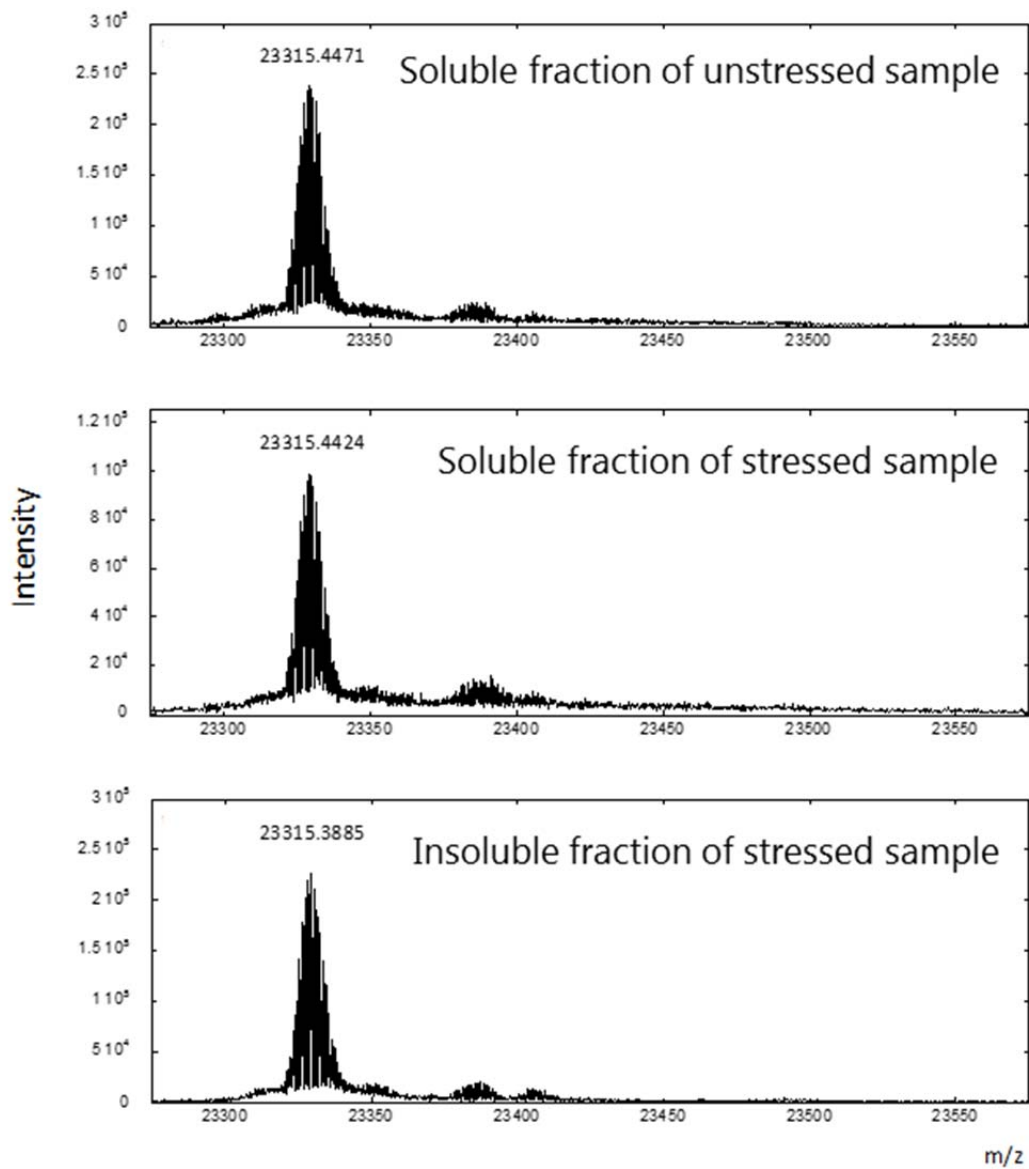


Figure 10. LC-MS の結果(軽鎖)

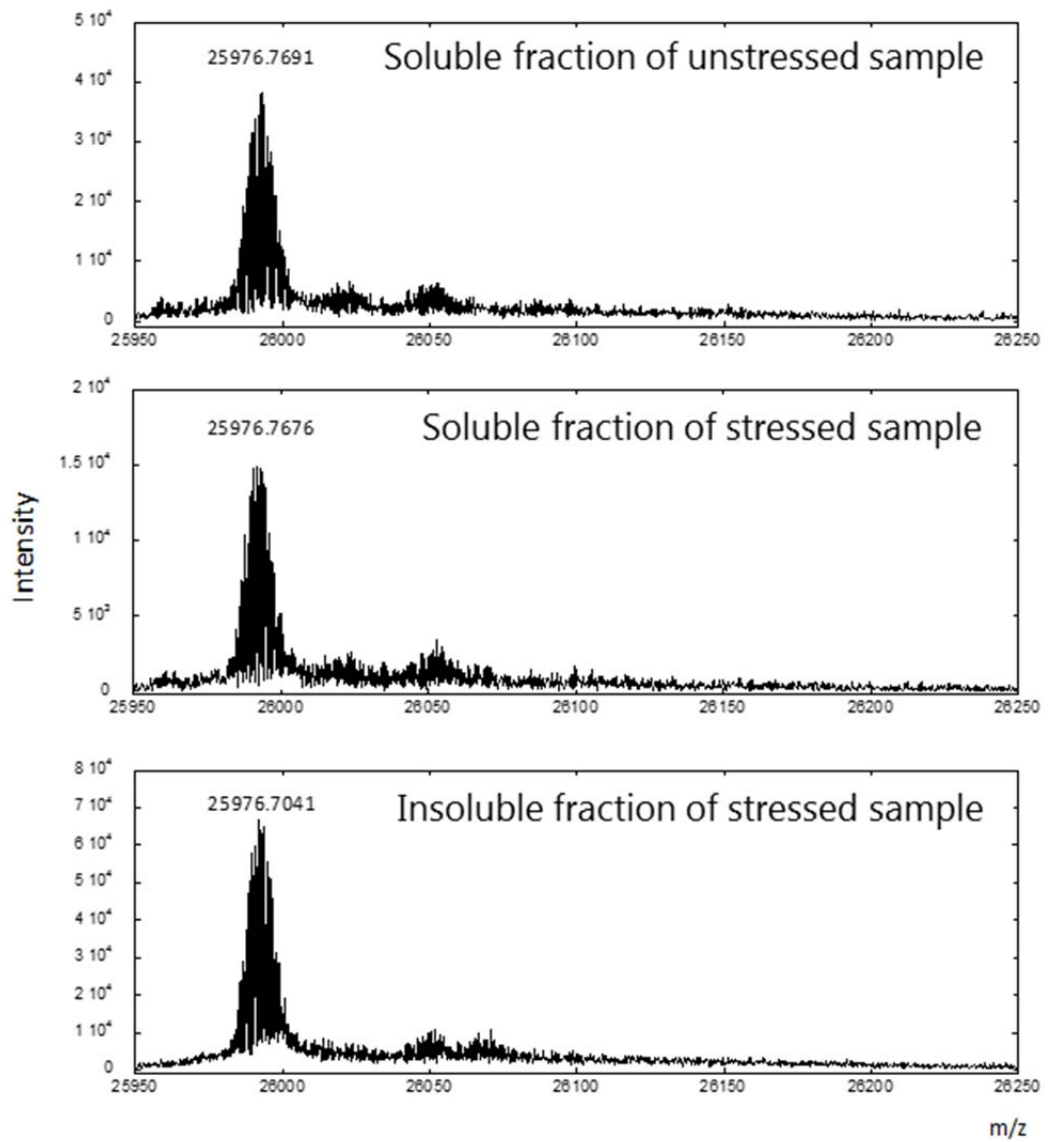


Figure 11. LC-MS の結果 (Fd')

第二項 非イオン界面活性剤存在下での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成

0.1%ポリソルベート80を含むリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline、PBS) でmAb-Aストック溶液を希釈した試料について、落下・振とう複合ストレス試験を実施した。落下・振とう複合ストレス試験後、SEC、DLSおよびFIを用いて分析したところ、第一項とは異なる傾向の結果が得られた。ポリソルベート80を添加しなかった第一項の結果では、SECでの単量体ピーク面積の減少およびFIでの μm オーダーの粒子の増加が見られたが、ポリソルベート80存在下ではいずれも認められなかった (**Figure 12a**および**12d**)。SECでの単量体ピーク面積%については、ポリソルベート80非存在下での結果と同様に、落下・振とうストレスによる顕著な変化は見られなかった (**Figure 12b**)。DLSでは、nmオーダーの粒子の平均粒子径が落下・振とう複合ストレスによって増加した (**Figure 12c**)。しかしながら、mAb-Aを含まない0.1%ポリソルベート含有PBSを落下・振とうした際にも、同様に粒子径の増大が見られたことから (**Figure 12e**)、mAb-A溶液を落下・振とうした際に見られた粒子径の増大は、mAb-Aの凝集によるものではなく、ポリソルベート80ミセルの粒子径が変化したためと考えられた。

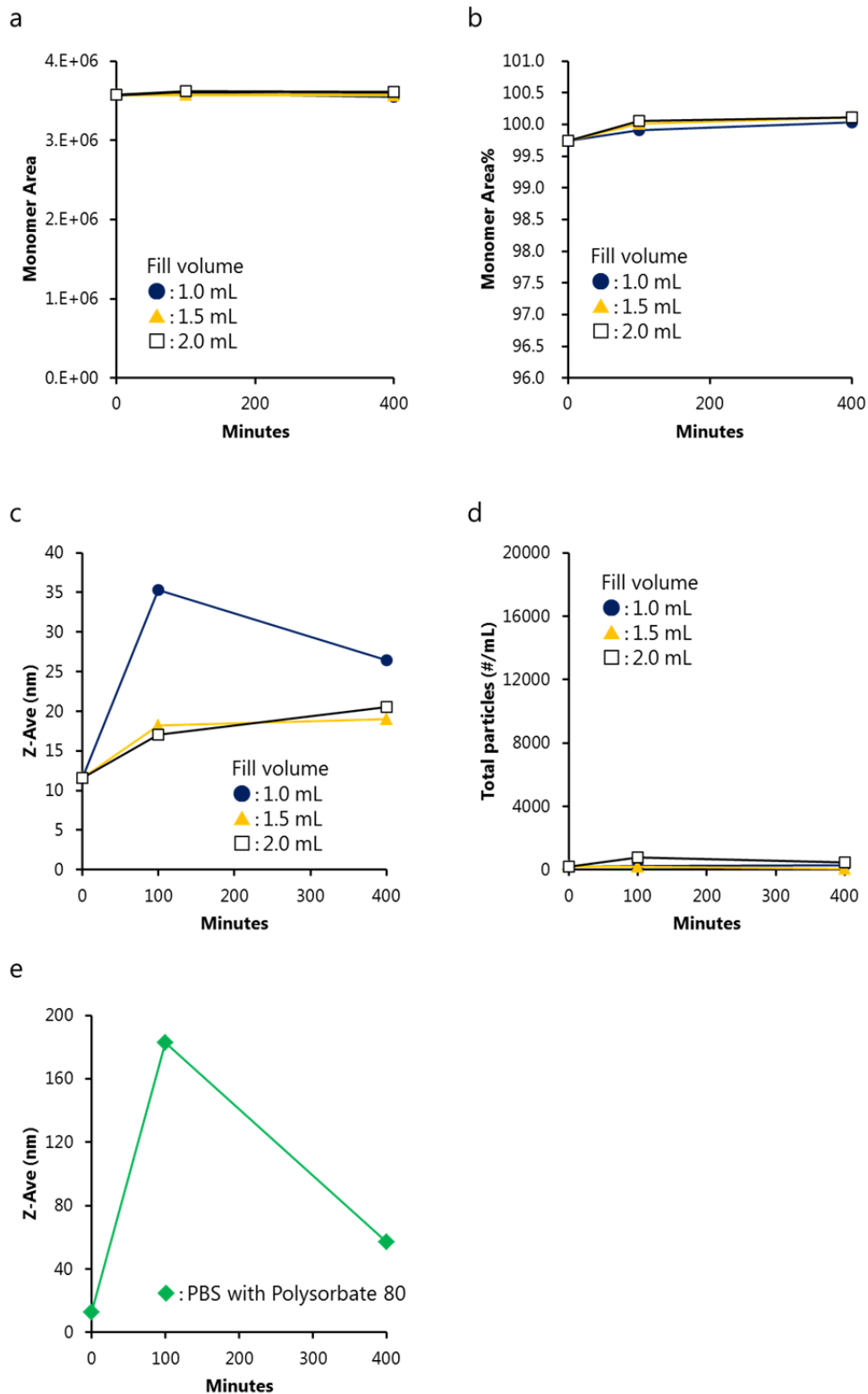


Figure 12. ポリソルベート 80 存在下で落下・振とう複合ストレスによって生成した凝集体の分析結果。a:SECの結果(単量体ピーク面積)、b:SECの結果(単量体ピーク面積%)、c:DLSの結果、d:FIの結果、e:0.1%ポリソルベート含有 PBSを落下・振とうした際の DLS の結果

第三項 振とうストレスによる凝集体生成

mAb-A溶液を入れたバイアルを、オービタルシェイカーを用いて300回転/分(Round Per Minute、rpm)で100分間または400分間振とうした。振とうストレス後の試料を、SEC、DLSおよびFIで分析したところ、いずれの分析でも振とうストレスによる変化は認められなかった(**Figure 13a-d**)。このことから、振とうストレスでは、nmから μm までの範囲において、mAb-Aの凝集体は生成しないと考えられる。

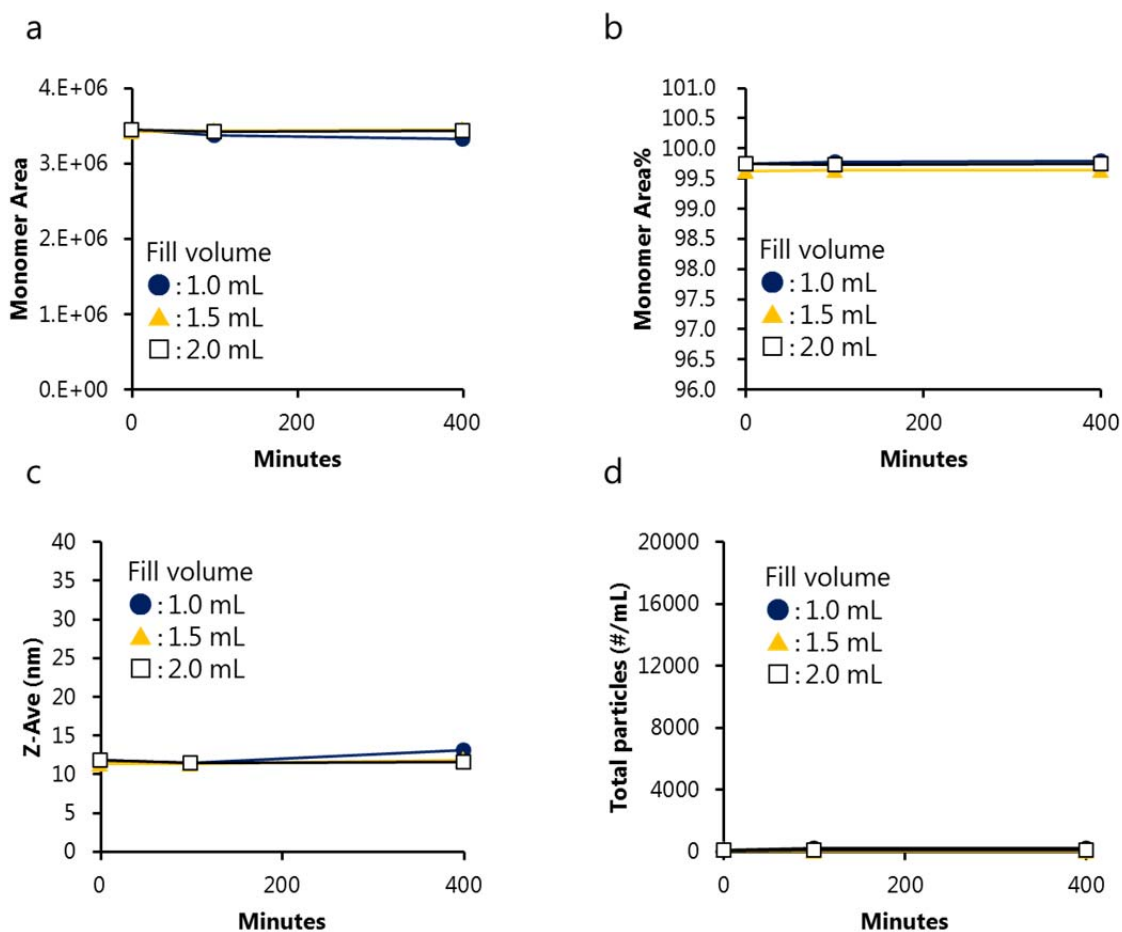


Figure 13. 振とうストレスによって生成した凝集体の分析結果。a:SECの結果(単量体ピーク面積)、b:SECの結果(単量体ピーク面積%)、c:DLSの結果、d:FIの結果

第四項 振とうによるバイアル壁面からの抗体の剥離

Figure 14の通り、2種の対照試料(Control A1およびControl A2)と3種の試料(SmampleA1B1、Sample A1B2およびSample A2B1)を調製した。各試料中の μm オーダーの粒子数および粒子径をFIで分析した(Figure 16a)。100分間振とうした後のSample A1B1およびSample A1B2の粒子濃度は、Control A1の粒子濃度よりもそれぞれ1550 particles/mL、429 particles/mL高かった。また、100分間振とうした後のSample A2B1の粒子濃度はControl A2の粒子濃度よりも781 particles/mL高かった。分析した3種の試料の比較では、SampleA1B1の粒子濃度が最も高かった。

また、Figure 15の通り、Sample NVを調製し、FIによる分析を行った(Figure 16b)。振とうによりSample NV中の粒子濃度は減少した。粒子の分布については、振とうによって5 μm 未満の粒子が減少し、10 μm 以上の粒子が増加した。

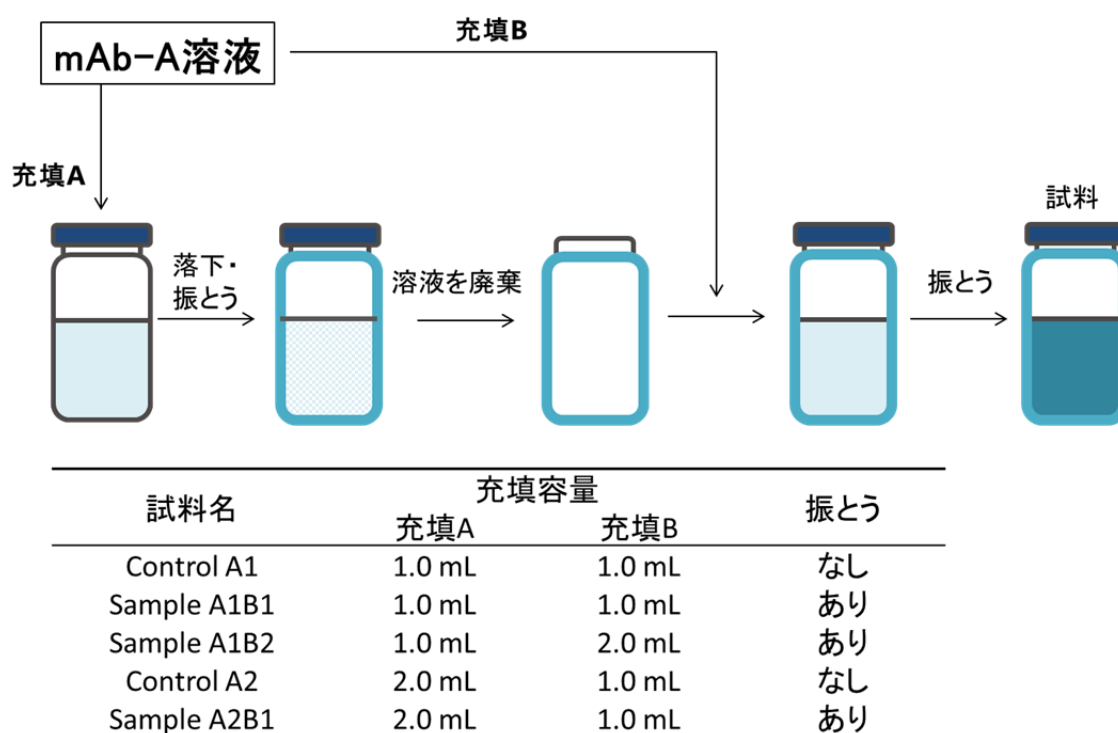


Figure 14. 対照試料(Control A1 および Control A2) および試料(SmampleA1B1、Sample A1B2 および Sample A2B1)の調製方法

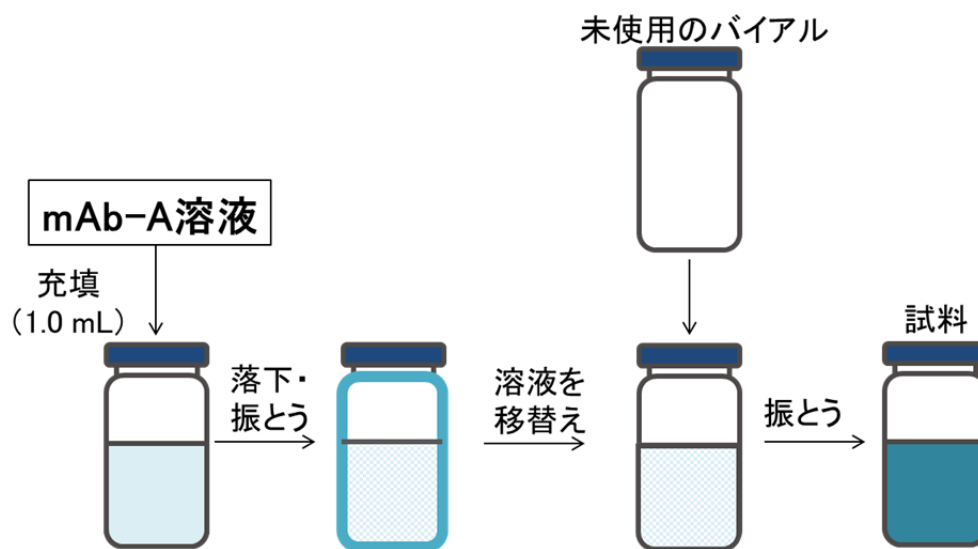


Figure 15. Sample NV の調製方法

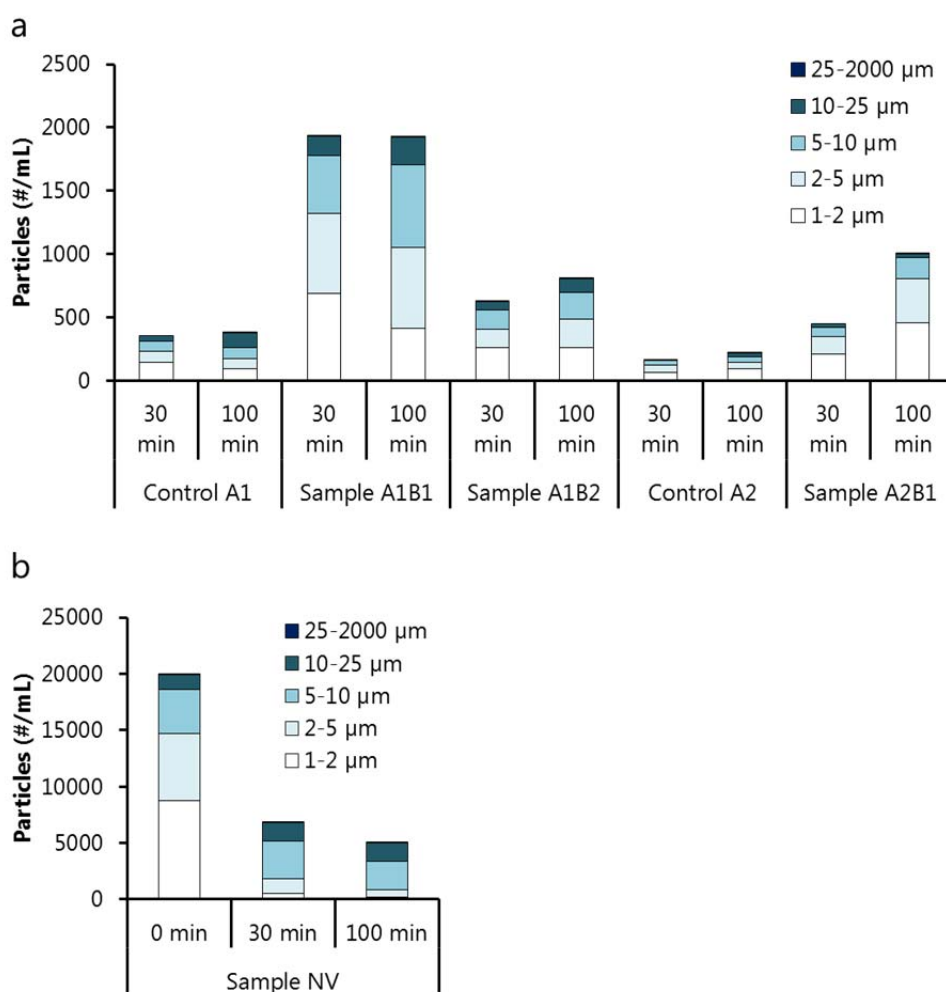


Figure 16. FI の結果。a: 対照試料 (Control A1 および Control A2) および試料 (Sample A1B1、Sample A1B2 および Sample A2B1) の結果、b: Sample NV の結果

第三節 考察

第一項 落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成の特徴

mAb-A溶液を充填したバイアルを、摩損度試験機を用いて繰り返し落下および振とうした。落下・振とう複合ストレスによって、 μm オーダーの凝集体が顕著に増加したが、SECやDLSで測定されるnmオーダーの凝集体の増加は見られなかった (**Figure 6**)。DLSでは、大きな粒子が存在すると安定した測定ができないため、遠心による前処理を行っており、前処理によって数百nmの粒子が除かれた可能性がある。そのため、落下・振とう複合ストレスによる数百nmの粒子の生成については、第二章で別の手法を用いて検討を行った。SECの分析では、単量体のピーク面積%が落下・振とう複合ストレスによって僅かに増加する傾向が見られた。この理由は明らかではないが、可溶性凝集体が落下・振とう複合ストレスによって解離した可能性がある。⁴¹ 落下・振とう複合ストレス試験後、抗体溶液の可溶性画分についてCDスペクトルを測定し、落下・振とう複合ストレスによる立体構造変化の有無について検討した。落下・振とう複合ストレス試験後の試料のCDスペクトルと落下・振とう複合ストレスを受けていない試料のCDスペクトルに差は認められなかったことから (**Figure 7**)、可溶性画分の立体構造は落下・振とう複合ストレスによって変化しない、あるいは変化しても可逆的であると考えられる。しかしながら、この結果は可溶性画分についての結果であり、遠心により容易に沈殿する凝集体粒子から成る不溶性画分の立体構造については、本結果からは明らかになっていない。また、落下時の衝突により生じるキャビテーションバブルが崩壊する際、キャビテーションバブル周辺が局所的に高温となり、水分子が分解されヒドロキシラジカルが生成する。²⁹ 生成したヒドロキシラジカルによって酸化等が起こり、凝集体生成を引き起こす可能性があることから、落下・振とう複合ストレスによる化学的劣化についてLC-MSを用いて検討を行った。その結果、落下・振とう複合ストレス試験後の可溶性画分および不溶性画分のいずれにおいても酸化等の化学的劣化は認められなかった (**Figure 9-11**)。このことから、化学的劣化は落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成の原因ではないと考えられる。

振とうストレスのみでも凝集体が生成することが知られているが、本研究では振とうストレスのみでは凝集体の増加は見られなかった (**Figure 13**)。この理由としては、

振とうストレスに対する安定性がタンパク質ごとに異なることや、振とうストレス条件（強度・時間）が過去の報告とは異なることが挙げられる。振とうストレスのみでは凝集体の増加は認められなかったが、本研究の振とうストレス条件は300 rpmで最大400分間であり、摩損度試験機による落下・振とう複合ストレス（50 rpm、最大400分間）における振とうと同等以上の振とう作用があると考えられる。したがって、オービタルシェイカーによる振とうストレスでは凝集体が生成せず、落下・振とう複合ストレスによって μm オーダーの凝集体が顕著に増加したことから、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において落下が重要な役割を果たしていることが示唆される。

異なる容量（1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL）のmAb-A溶液を充填したバイアルを落下および振とうし、充填容量が落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成へ与える影響について検討を行った。充填容量が多いほど振とうの作用が弱まり、振とうストレスによる凝集体生成速度が遅くなることが報告されている。³⁰ 一方で、充填容量が多いほど落下ストレスにより生成する粒子は多くなる。²⁹ したがって、充填容量1.0 mLの試料は、最も振とうストレスの効果が高く落下ストレスの効果が最も低い試料、充填容量2.0 mLの試料は振とうストレスの効果が最も低く落下ストレスの効果が最も高い試料と言える。SECでは、単量体のピーク面積の減少が、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mLの順に速かった（**Figure 6a**）。FIで測定した μm オーダーの粒子については、充填容量1.0 mLのとき、生成した粒子の数が最も少なかった（**Figure 6d**）。しかしながら、粒子の分布に着目すると、充填容量1.5 mLおよび2.0 mLの試料では5 μm 以上の粒子の割合が約20%であったのに対し、充填容量が1.0 mLの試料では5 μm 以上の粒子が μm オーダーの粒子全体の50%以上を占めていた（**Figure 6e**）。SECの結果を合わせて考えると、落下・振とう複合ストレスによって生成した μm オーダーの凝集体の質量は充填容量が1.0 mLのときに最も多かったと考えられる。充填容量が少ない、つまり振とうストレスの効果が高いほど落下・振とう複合ストレスによって多くの凝集体が生成したことから、振とうストレスが落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において重要であることが推察される。振とうによって、気液界面で生じた変性したタンパク質や凝集体の核が衝突し、タンパク質凝集体が増加することが知られている。³⁰ しかしながら、振とうストレスによる凝集体生成が見られなかったことを考慮すると、振とうは、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において、気液

界面で生成した変性タンパク質や核を混合する作用とは異なる作用で凝集体生成に寄与していると考えられる。

第二項 バイアル中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路

タンパク質溶液を充填したバイアルを落下させることによって、タンパク質がバイアル壁面へ吸着することが報告されている。²⁹ また、固体表面に吸着したタンパク質が固体表面上で凝集してフィルム状の層を形成し、フィルムの一部が振とうなどによって剥離することでタンパク質の凝集体が生成することも知られている。^{42,43} これらから、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において、抗体のバイアル壁面への吸着と剥離を介して凝集体が生成する可能性がある。

振とうは、気液界面で生成した変性タンパク質や核を混合し凝集を促進する作用だけでなく、固体表面に吸着したタンパク質のフィルムを剥がす効果があることが知られている。⁴² 本検討で振とうストレスのみではタンパク質凝集体が生成しなかったことを考慮すると、天然状態の抗体分子はバイアル内壁に吸着しないか、吸着しても凝集体ではなく単量体として剥離されることが考えられる。落下によって生成したキャビテーションバブルが崩壊する際に、バブル周辺が局所的に高温・高圧状態になることから、落下によって抗体が部分的または完全に変性すると考えられる。変性したタンパク質は、天然状態のタンパク質よりも疎水的であるため、バイアル内壁等の疎水性界面へより強く吸着することから、⁴⁴ 落下による抗体の変性が落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成のきっかけとなり、バイアル壁面への吸着と剥離を介した凝集体生成が引き起こされる可能性がある。CDスペクトル測定の結果から、可溶性画分については抗体の変性は起こっていないことが示された(**Figure 7**)。CDスペクトルは不溶性画分の立体構造を評価できないため、CDスペクトル以外の手法を用いて凝集体粒子を含む不溶性画分の立体構造の検討を行うことで、落下による抗体の変性について明らかになると考えられる。

以上より、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路について次の通りモデ

ルを立てた(**Figure 17**)。はじめに、落下によって抗体が部分的または完全に変性する。次いで立体構造が変化した抗体がバイアル内壁へ吸着し、フィルム状の層を形成する。壁面へ吸着した抗体分子が振とうストレスによって剥離される。剥離され



Figure 17. 落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路に関するモデル

る抗体は、フィルム状の層の一部であることから単量体ではなく凝集体となる。^{42,43}

このモデルのSTEP1については、前述の通り、CDスペクトル以外の手法を用いて検証を行う必要があるため、第二章でさらに検討を行った。STEP2およびSTEP3については、**Figure 14**に示した実験を行い検証した。はじめに、摩損度試験機を用いて、mAb-A溶液1.0 mLの入ったバイアルを50 rpmで10分間落下および振とうを行った。その後、バイアル内のmAb-A溶液を取り除き、新たにmAb-A溶液1.0 mLを加え再び密栓した。このバイアルをオービタルシェイカーを用いて300 rpmで30分間または100分間振とうしSample A1B1とした。また、オービタルシェイカーによる振とうを行わず静置したものをControl A1とした。Sample A1B1およびControl A1に含まれる粒子の濃度をFIにより分析したところ、Sample A1B1の粒子濃度はControl A1よりも高かった。未使用のバイアルにmAb-A溶液を充填した場合は、オービタルシェイカーによる振とうストレスでは μm オーダーの凝集体が生成しなかったことを考慮すると、この結果から、落下・振とう複合ストレスによって抗体がバイアル内壁に吸着すること(STEP2)、その後の振とうによって吸着した抗体分子が剥離し、 μm オーダーの凝集体が生成した(STEP3)と考えられる。また、摩損度試験機を用いて落下および振とうを行う際のmAb-Aの充填容量を1.0 mL、オービタルシェイカーによる振とう時の充填容量を2.0 mLとした試料をSample A1B2とし、Sample A1B1と比較した。Sample

A1B2は振とう時の充填容量が2.0 mLであるため、バイアル内壁からの剥離によって Sample A1B1と同じ数の μm オーダーの凝集体が生成する場合、Sample A1B2の粒子濃度はSample A1B1の1/2となる。そのため、Sample A1B1の粒子濃度とSample A1B2の粒子濃度を2倍の値を比較したところ、Sample A1B1の粒子濃度は、Sample A1B2の粒子濃度の2倍の値よりも高かった。これは、振とう時の充填容量が少ないほうが振とうの効果が高いことを示した過去の報告と一致しており、振とうによってバイアル壁面から抗体が剥離し凝集体粒子が生成すること(STEP3)が支持された。摩損度試験機を用いて落下および振とうを行う際の充填容量を2.0 mL、オービタルシェイカーによる振とう時の充填容量を1.0 mLとした試料をSample A2B1とした。

Sample A1B1とSample A2B1の比較では、Sample A1B1の粒子濃度のほうがSample A2B1よりも高かった。振とう時の充填容量はSample A1B1とSample A2B1で同じであり、振とうストレスによる剥離の効率は2つの試料で同等と考えられることから、生成した粒子濃度の差は、バイアル壁面へ吸着した抗体量の違いによるものと考えられる。充填容量が大きいほど溶液とバイアル壁面の接触面積は大きくなるが、充填容量と接触面積の比は小さくなる。Sample A1B1とSample A2B1の比較の結果から、バイアル壁面との接触面積が大きくなる条件よりも、充填容量と接触面積の比が大きくなる条件のほうが、タンパク質が効率的にバイアル壁面へ吸着できると考えられる。また、落下・振とう複合ストレス試験では、バイアルが繰り返し振とうされるため、バイアル内壁との接触している溶液が絶えず入れ替わる。充填容量が小さいほうが、振とうの効果が高いことから、バイアルと接触している溶液が効率的に入れ替わり、より多くのタンパク質分子がバイアル内壁と接触する機会を持つことができ、このことも充填容量が小さいほど吸着量が増える要因の一つと考えられる。本研究では、2.5 mL容バイアルを使用した。サイズの異なるバイアルにおいても、充填容量が少ないほうが接触面積と充填容量の比が大きくなる点や攪拌の効率が高い点は同じであるため、充填容量が少ないほうがバイアル壁面へ吸着するタンパク質の量は多くなると考えられる。一方で、充填容量が多いほど落下ストレスの効果は高いことから、充填容量が多いほうがより多くのタンパク質が変性すると考えられる。したがって、充填容量が大きいほど多くの変性したタンパク質が生じるが、バイアル壁面への吸着効率は低いと考えられ、バイアル内壁へ吸着していない変性した抗体が可溶性画

分に含まれている可能性がある。しかしながら、CDスペクトル測定では、充填容量 2.0 mLの場合でも、可溶性画分の二次構造および三次構造に変化は認められなかった。この結果から、落下による可溶性画分の変性は起こらないか、起こったとしても可逆的であると考えられる。

充填容量が少ないほど抗体のバイアル内壁への吸着が効率よく起こり、さらに振とう時の攪拌による吸着した抗体の剥離効果も高い。したがって、充填容量を少なくするほど落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度は速くなると考えられる。しかしながら、充填容量が少なくなると、重量が減り衝撃力は小さくなるため、落下によって変性する抗体の量は少なくなると考えられる。したがって、十分な量の抗体が落下によって変性する重量となる充填容量の中で、最も充填容量が少ない時、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度が最も速くなると考えられる。タンパク質ごとにコロイド安定性や構造安定性などの物理化学的性質が異なることから、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度最も速くなる充填容量の条件もタンパク質ごとに異なると考えられる。

Figure 17 の凝集体生成経路に加えて、落下・振とう複合ストレスにより生じた凝集体が、振とうストレスを受けることによって新たな凝集を引き起こす可能性も考えられた。そこで、摩損度試験機を用いて落下および振とうした mAb-A 溶液を、未使用の別のバイアルに移し替えて振とうを行った (**Figure 15**)。その結果、振とうによって粒子濃度は減少し、粒子径が増大した。 (**Figure 16b**)。このことから、落下・振とう複合ストレスによって生じた μm オーダーの凝集体が、振とうによって互いに衝突し、より大きな凝集体が生成すると考えられる。可溶性画分のタンパク質濃度は振とうの前後で変わらなかったことから、可溶性画分の抗体が、振とうにより μm オーダーの粒子と凝集する可能性は低いと考えられ、この結果からも、抗体の壁面への吸着と剥離が落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集の主要因であると考えられる。

本研究に使用したシクロオレフィンポリマー (Cyclo Olefin Polymer, COP) の他に、ガラス、ポリエーテルスルホン (Polyethersulfone, PES)、シリコン被膜面などにもタンパク質が吸着することが報告されている。^{44,45} したがって、他の材質の容器を使用する場合でも落下・振とう複合ストレスによって、**Figure 17** に示した経路を介して凝集体が生成すると考えられる。ただし、容器とタンパク質の相互作用の強さは、容器

の材質およびタンパク質の特性によって変わるため、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度は、使用する容器の材質とタンパク質、溶媒の条件などによって異なると考えられる。

第三項 非イオン界面活性剤の凝集抑制

非イオン界面活性剤の一種であるポリソルベート80の添加によって落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成が効果的に抑制された(**Figure 12**)。非イオン界面活性剤がタンパク質の凝集を防ぐメカニズムとしては次の2つが知られている。⁴⁶ 1つ目は、非イオン界面活性剤が気液界面や固液界面を覆うことで、タンパク質の界面への吸着を防ぎ、界面が関与するタンパク質の凝集を抑制する。2つ目は、非イオン界面活性剤がタンパク質と弱く結合することで、タンパク質同士の相互作用を弱め、凝集を抑制する。第二項で考察した通り、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成は、キャビテーションによる抗体の変性、変性した抗体のバイアル壁面への吸着、吸着した抗体の剥離という経路で起こる。このタンパク質凝集体生成経路を考慮すると、ポリソルベート80は、バイアル壁面と抗体溶液との固液界面を覆い、変性した抗体分子のバイアル壁面への吸着を防ぐことにより、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成を抑制すると推察される。また、キャビテーションバブルにタンパク質が吸着し、その後キャビテーションバブルが崩壊する際にキャビテーションバブルに吸着したタンパク質が凝集する。³³ そのため、落下のみでも凝集体が生成すると考えられるが、ポリソルベート80は、キャビテーションバブルとの界面を覆うことで、落下による抗体の凝集を防ぐ効果もあると考えられる。

第二章 シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成

第一節 背景

プレフィルドシリンジ製剤は、バイアル製剤よりも利便性などの面で優れており、バイオ医薬品の一次包装容器として汎用されている。しかしながら、バイオ医薬品の品質に関しては、プレフィルドシリンジを使用することで低下する可能性がある。^{47,48} ガラスシリンジにおいては、摺動性向上のためシリコンオイル等をシリンジ内壁に塗布するが、シリコンオイルを塗布したシリンジでは、シリコンオイルを塗布しないシリンジよりもタンパク質凝集体が多く生成するとの報告がある。そのため、近年、シリコンオイルを使用しないプレフィルドシリンジの開発が行われている。^{45,49} シリコンオイルを塗布したシリンジ中でのたんぱく質凝集メカニズムの一つとして、次のメカニズムが知られている。⁴² はじめに、シリコンオイルが塗布されたシリンジ内壁にタンパク質が吸着し、次いでシリンジ内壁上で吸着したタンパク質がフィルム状の層を形成する。振とうなどによって剥離したタンパク質フィルムの一部はタンパク質凝集粒子となる。

第二章では、シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成について検討した。第一章でのバイアルを用いた研究に加えプレフィルドシリンジでも研究を行った理由は、容器の素材や形状が異なれば安定性が異なるため、さらにプレフィルドシリンジの場合、ヘッドスペースをゼロとすることで振とうによる攪拌の影響がない状況での解析が可能となり、落下・振とう複合ストレスにおける落下の作用について検討できるためである。プレフィルドシリンジでは、上述の通り、シリコンオイルが塗布されるため、シリコンオイルを塗布した(SO+)シリンジとシリコンオイルを塗布しない(SO-)シリンジを使用し、シリコンオイルが落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集に与える影響について検討を行った。また、非イオン界面活性剤の落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集抑制作用についてより詳細に検討した。

落下・振とう複合ストレスにより生成した凝集体は、SEC、RMMおよびFIを用いて分析した。RMMでは、水より比重が大きい粒子と水より比重が小さい粒子それぞれについて粒子数および平均粒子径を測定した。シリンジ内壁に吸着したタンパク質量を逆相超高速液体クロマトグラフィー(Reverse Phase-Ultra Performance Liquid

Chromatography、RP-UPLC)により定量し、シリコンオイル塗布、ヘッドスペースの有無、落下・振とう複合ストレスがタンパク質の吸着量に与える影響について検討した。コロイド安定性および構造安定性を、それぞれDLS、DSCを用いて評価し、それら二つの物理化学的指標と落下・振とう複合ストレスにより生成したタンパク質凝集体量との相関についても考察した。

第二節 結果

第一項 SO-シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成

各抗体溶液を充填したSO-シリンジを摩損度試験機による落下・振とうストレス試験に供した(**Figure 18**)。ストレス試験後、試料を回収し、SEC(分析範囲:<200 nm)、RMM(分析範囲:0.35-1 μm)およびFI(分析範囲:>1 μm)で分析した。SECでは、落下・振とう複合ストレスによる単量体ピークの面積値の減少は見られなかった(**Table 1**)。また、凝集体および分解物ピーク的面積%の変化も認められなかった。RMMの結果は**Figure 19**の通りである。全ての抗体について落下・振とう複合ストレスによって水より比重が大きい粒子が増加した。一方で、水より比重が小さい粒子については、落下・振とう複合ストレスによる増加は認められなかった。ヘッドスペースがない条件でも、ヘッドスペースがある条件と同程度の数の水より比重が大きい粒子が生成した。また、ストレスを受けていない試料(シリンジに充填し静置した後、回収した試料)とコントロール(シリンジに充填する前の溶液)の粒子数に差が見られなかったことから、シリンジに充填し、回収する操作による0.35-1 μm の粒子の生成は起こらないと考えられる。 μm オーダーの粒子についても、落下・振とう複合ストレスによって増加した(**Figure 20**)。 μm オーダーの粒子の増加は、ヘッドスペースをなくすことで効果的に抑制されたが、ヘッドスペースがない場合でも μm オーダーの粒子は僅かに増加が認められた。PBSをSO-シリンジに充填し、落下・振とうを行った試料については、 μm オーダーの粒子の増加は認められなかった。0.35-1 μm の粒子と同様に、 μm オーダーの粒子についても、ストレスを受けていない試料とコントロールの比較から、シリンジに充填し、回収する操作による粒子生成は起こらないと考えられる。また、摩

損度試験機による落下・振とう複合ストレス試験の再現性について確認するために、3日に分けて3回の繰り返し測定を行った。μmオーダーの総粒子数について3回の平均値および標準偏差を計算した(**Figure 21**)。

ローテーターによる振とうストレス試験では、タンパク質凝集体の増加は認められなかった(**Table 1**、**Figure 19**および**20**)。

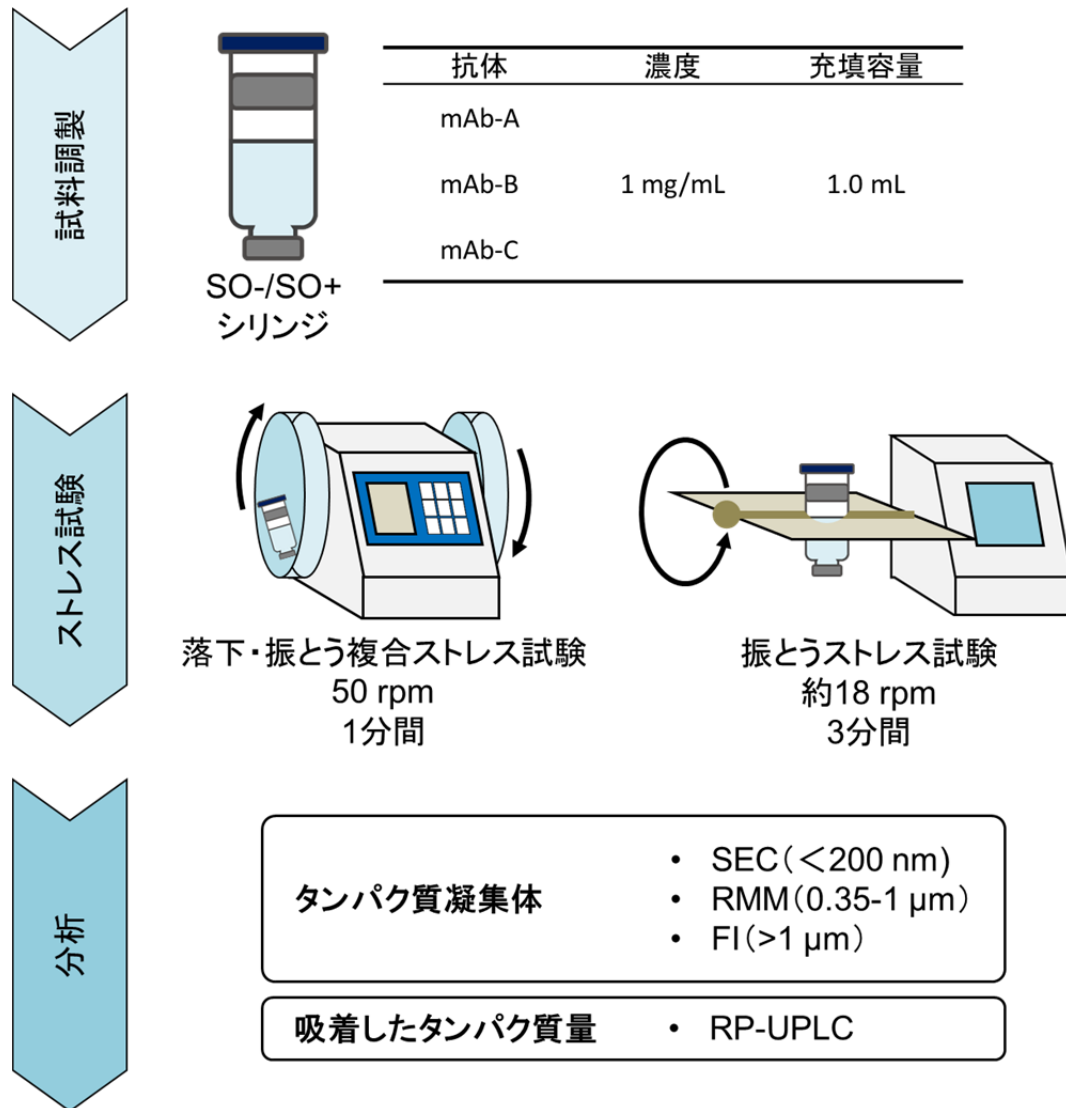


Figure 18. 第二章で実施したストレス試験の概要

Table 1. SEC の結果

抗体	シリコン オイル	ストレス	面積			面積%		
			凝集体	単量体	分解物	凝集体	単量体	分解物
mAb-A	NA*	コントロール	255,170	19,179,324	271,500	1.3	97.3	1.4
		ストレスなし	250,474	18,813,014	231,003	1.3	97.5	1.2
	SO+	落下・振とう	243,649	18,544,449	232,653	1.3	97.5	1.2
		振とう	247,277	18,871,347	241,705	1.3	97.5	1.2
	SO-	ストレスなし	243,293	18,771,385	233,266	1.3	97.5	1.2
		落下・振とう	238,502	18,810,870	232,621	1.2	97.6	1.2
		振とう	244,596	18,923,736	239,528	1.3	97.5	1.2
mAb-B	NA*	コントロール	108,175	21,398,891	198,141	0.5	98.6	0.9
		ストレスなし	105,322	21,232,558	192,760	0.5	98.6	0.9
	SO+	落下・振とう	105,028	21,181,473	185,171	0.5	98.6	0.9
		振とう	107,055	21,277,370	186,724	0.5	98.6	0.9
	SO-	ストレスなし	106,779	21,267,760	187,163	0.5	98.6	0.9
		落下・振とう	103,876	21,236,939	184,453	0.5	98.7	0.9
		振とう	105,071	21,386,578	186,754	0.5	98.7	0.9
mAb-C	NA*	コントロール	301,171	21,708,448	62,209	1.4	98.4	0.3
		ストレスなし	282,847	21,393,700	55,433	1.3	98.4	0.3
	SO+	落下・振とう	280,915	21,447,868	54,790	1.3	98.5	0.3
		振とう	287,411	21,458,730	58,837	1.3	98.4	0.3
	SO-	ストレスなし	277,727	21,456,815	52,866	1.2	98.5	0.2
		落下・振とう	276,733	21,506,857	57,294	1.3	98.5	0.3
		振とう	278,372	21,514,629	57,589	1.2	98.5	0.3

*NA: Not applicable (非該当)

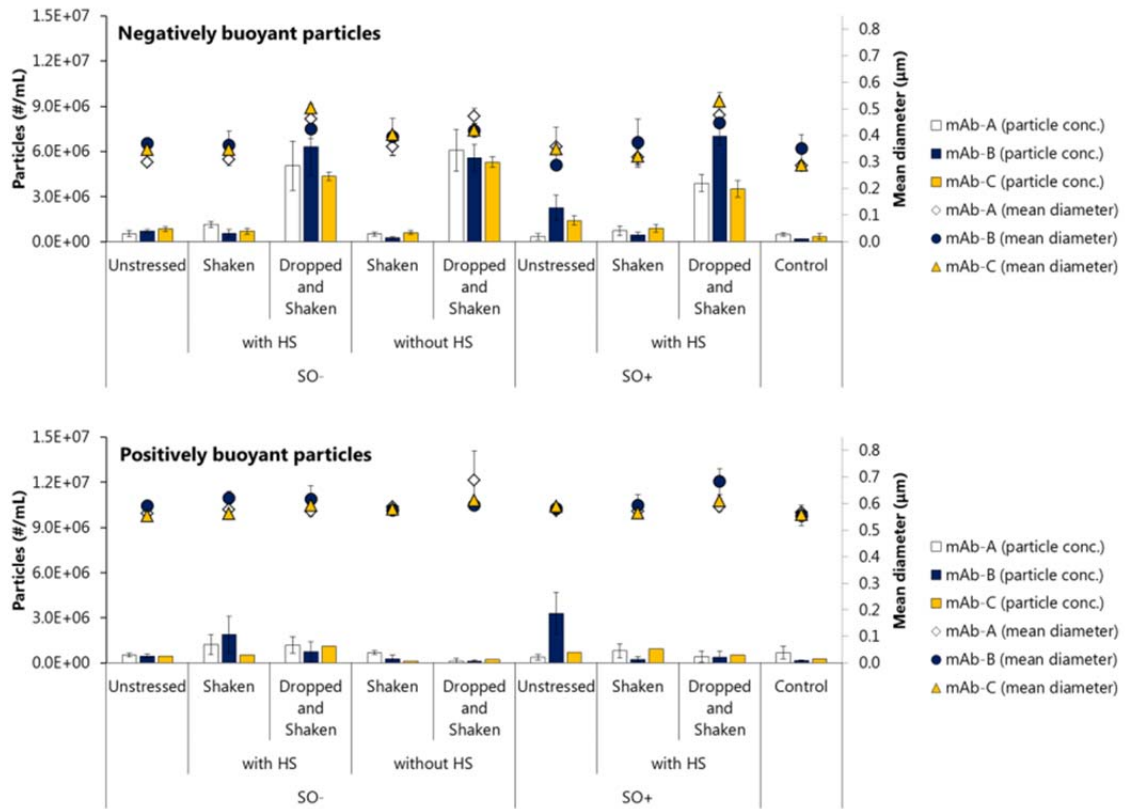


Figure 19. RMM の結果。上のグラフは水より比重の大きい粒子の粒子数および平均粒子径、下のグラフは水より比重が小さい粒子の粒子数および平均粒子径。HS:ヘッドスペース

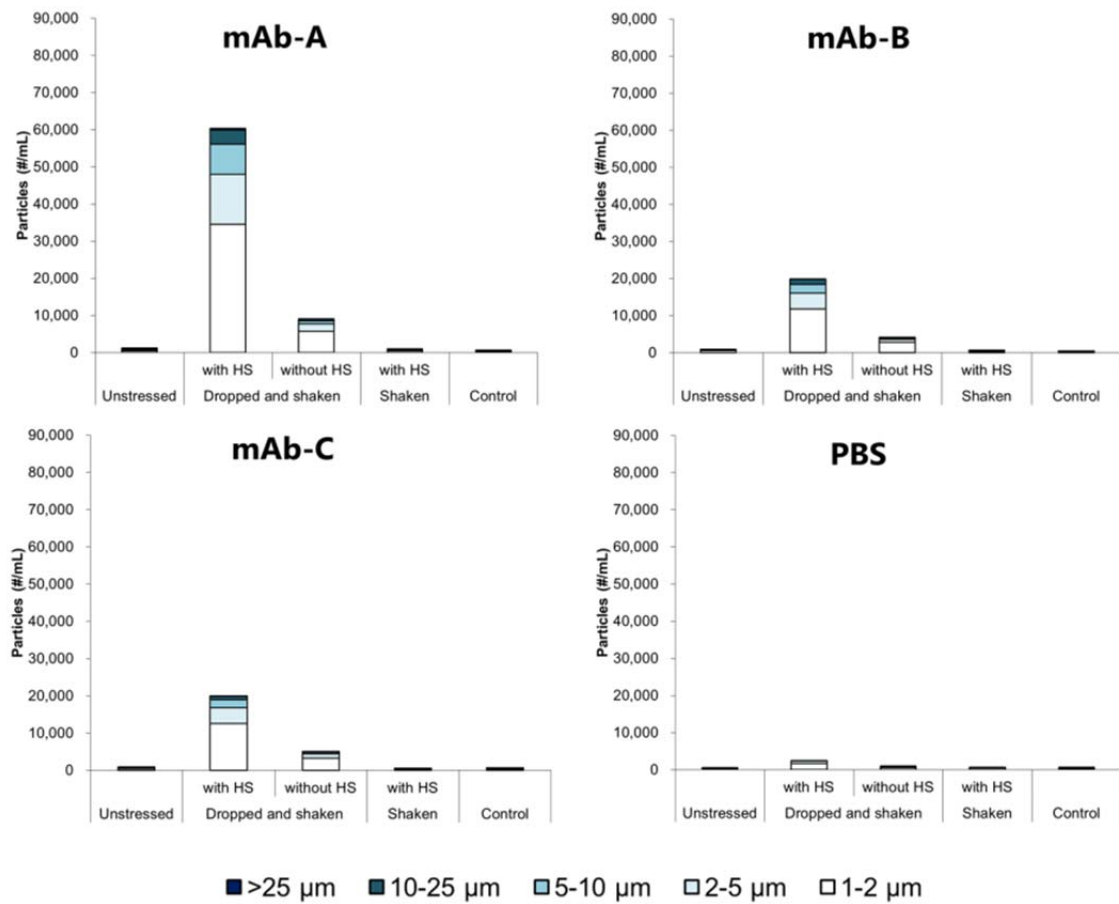


Figure 20. SO-シリンジ中で各ストレスにより生成した μm オーダーの粒子数。HS:ヘッドスペース

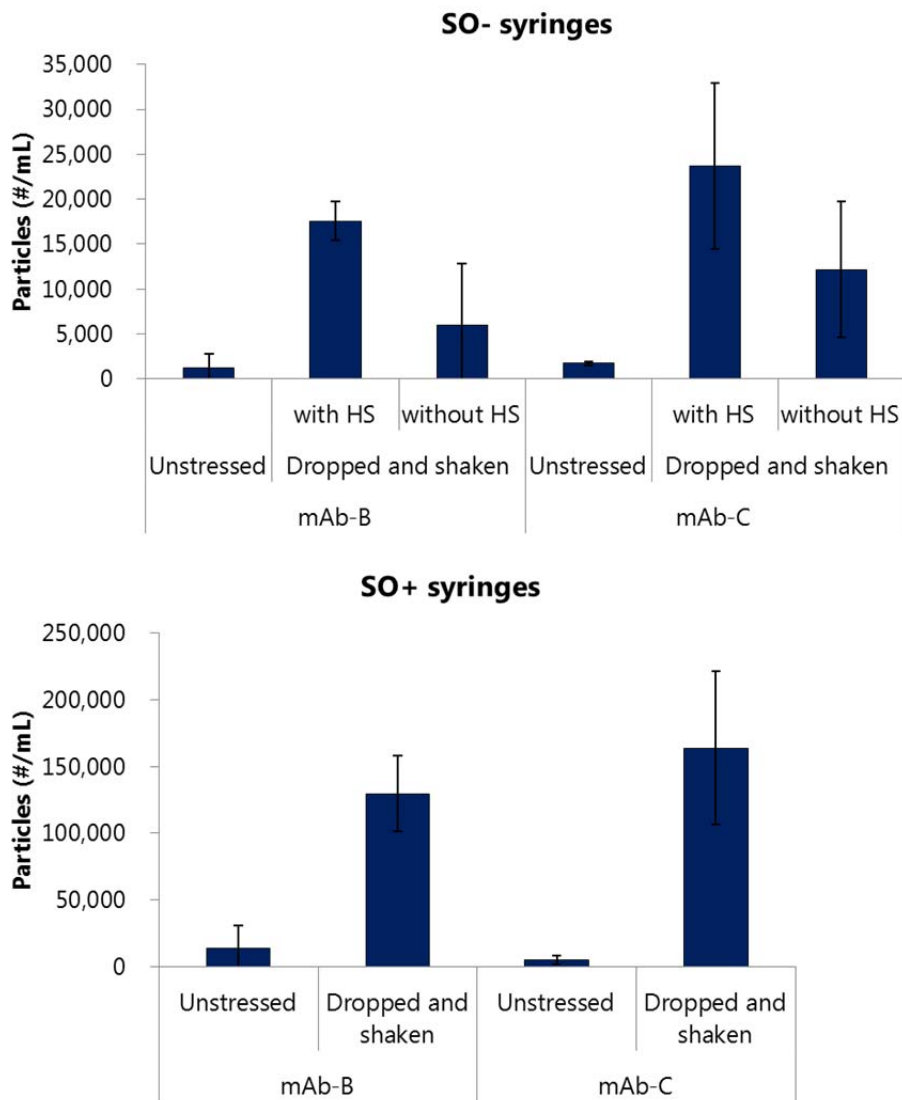


Figure 21. 落下・振とう複合ストレス試験の再現性に関する検討結果。3回の独立した落下・振とう複合ストレス試験から得られた μm 領域の粒子数の平均値。エラーバーは標準偏差。上のグラフはSO-シリンジを使用した際の結果、下のグラフはSO+シリンジを使用した際の結果

第二項 SO+シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成

SO+シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成についても検討を行った。SECでは、SO-シリンジの場合と同様に、各ピークの面積%および面積値に変化は見られなかった (**Table 1**)。RMMでは、水より比重の大きい粒子の増加が見られた。また、水より比重の大きい粒子の落下・振とう複合ストレスによる増加量は、SO-シリンジを用いた場合の増加量と同程度であった (**Figure 19**)。水より比重の小さい粒子については、落下・振とう複合ストレスによる増加は認められなかった。 μm オーダーの粒子については、SO+シリンジではSO-シリンジを用いた場合よりも多くの粒子が落下・振とう複合ストレスにより生成した (**Figure 22**)。また、本研究で使用

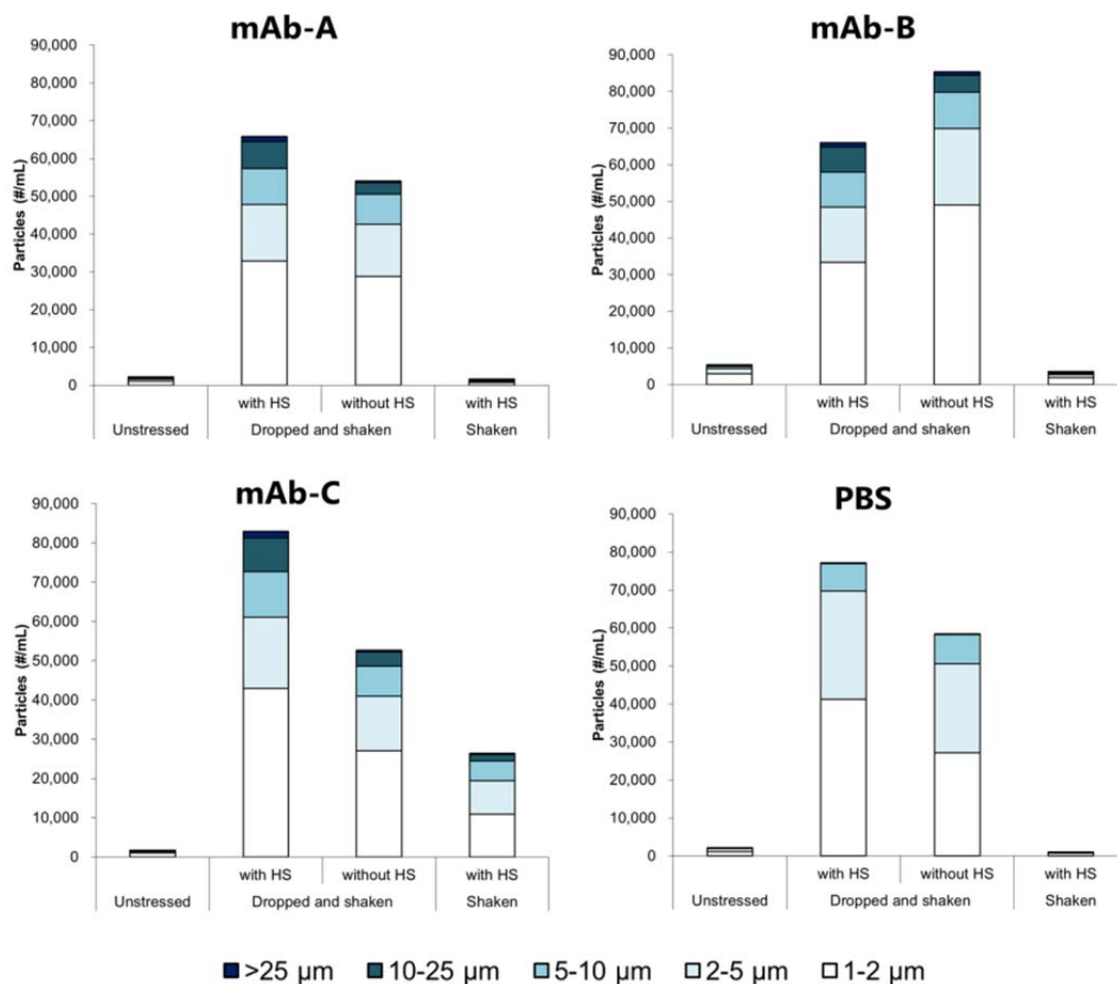


Figure 22. SO+シリンジ中で各ストレスにより生成した μm オーダーの粒子数。HS:ヘッドスペース

した3種の抗体全てにおいて、10 μm 以上の粒子濃度が6000個/mL以上であり、(Table 2)。1容器あたりの充填量が1 mL以上100 mL未満の製剤に適用される薬局方の規格(6000個/mL未満)を上回っていた。⁵⁰ mAb-Bを除き、ヘッドスペースをなくすことで落下・振とう複合ストレスによる μm オーダーの粒子生成が抑制された。摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験の再現性確認のため、SO-シリンジの場合と同様に独立した3回の繰り返し測定を行った。 μm オーダーの総粒子数について3回の平均値および標準偏差を計算した(Figure 21)。

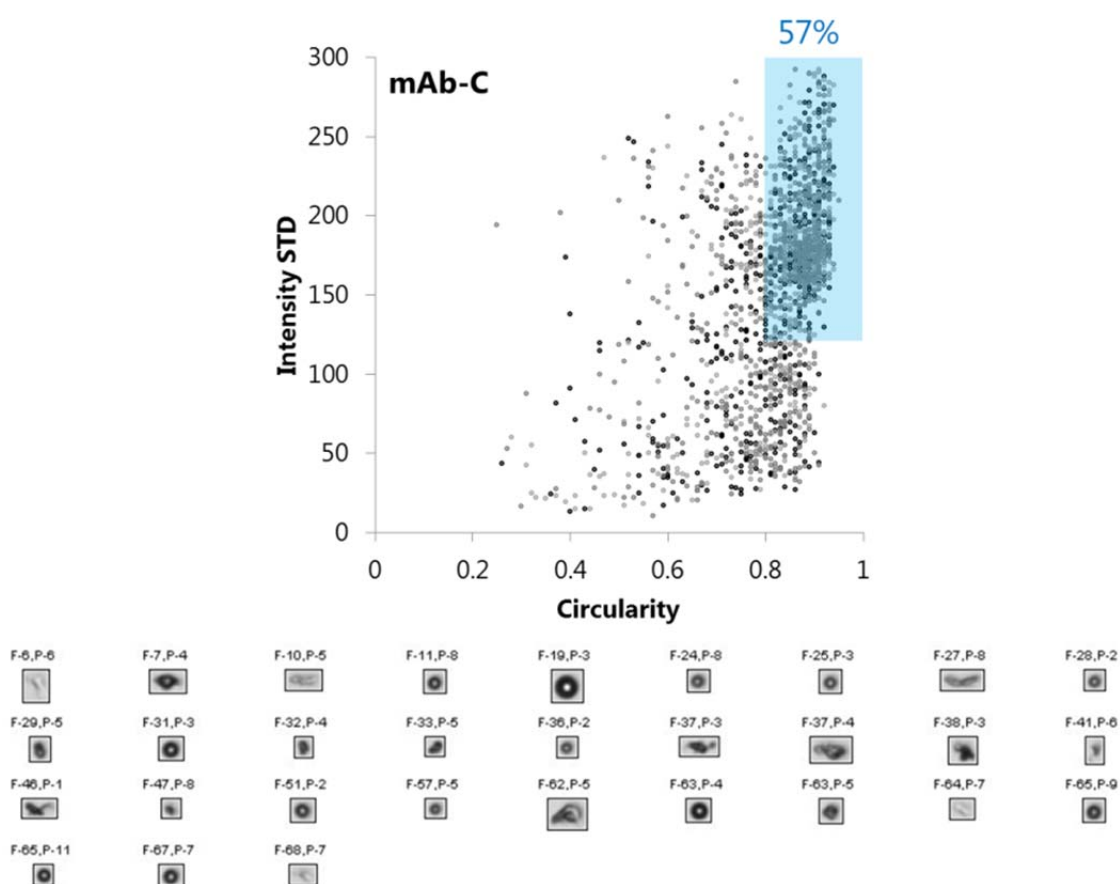


Figure 23. SO+シリンジ中で mAb-C を振とうした際に生成した粒子。上: 真円度と画像輝度の標準偏差による粒子の分類。青色部分がシリコンオイル油滴に分類された粒子、下: 代表的な粒子の画像

ローテーターを用いた振とうストレス試験では、mAb-Cを除き、顕著な μm オーダーの粒子の増加は認められなかった。mAb-Cについては、振とうストレスのみで約26,000個/mLの粒子が生成した。SO+シリンジ中でストレス試験を行う場合、タンパク質凝集体だけでなくシリコンオイル油滴も生成する可能性がある。⁴⁸ FIでは、取得した画像から、粒子の形状や画像輝度等に関するパラメータを得ることができるため、粒子の特徴に基づいた粒子の分類を行うことができる(**Figure 4**)。FIにおけるシリコンオイル油滴の典型的な画像は、円形で、中心が白く周辺部が黒いという特徴を有している。^{16,48,51,52} そこで本研究では、FIで得られる真円度と画像輝度の標準偏差の2つのパラメータを用いてシリコンオイル油滴を分類した。「円形である」という特徴について真円度0.8以上を、「中心が白く周辺部が黒い」という特徴については画像

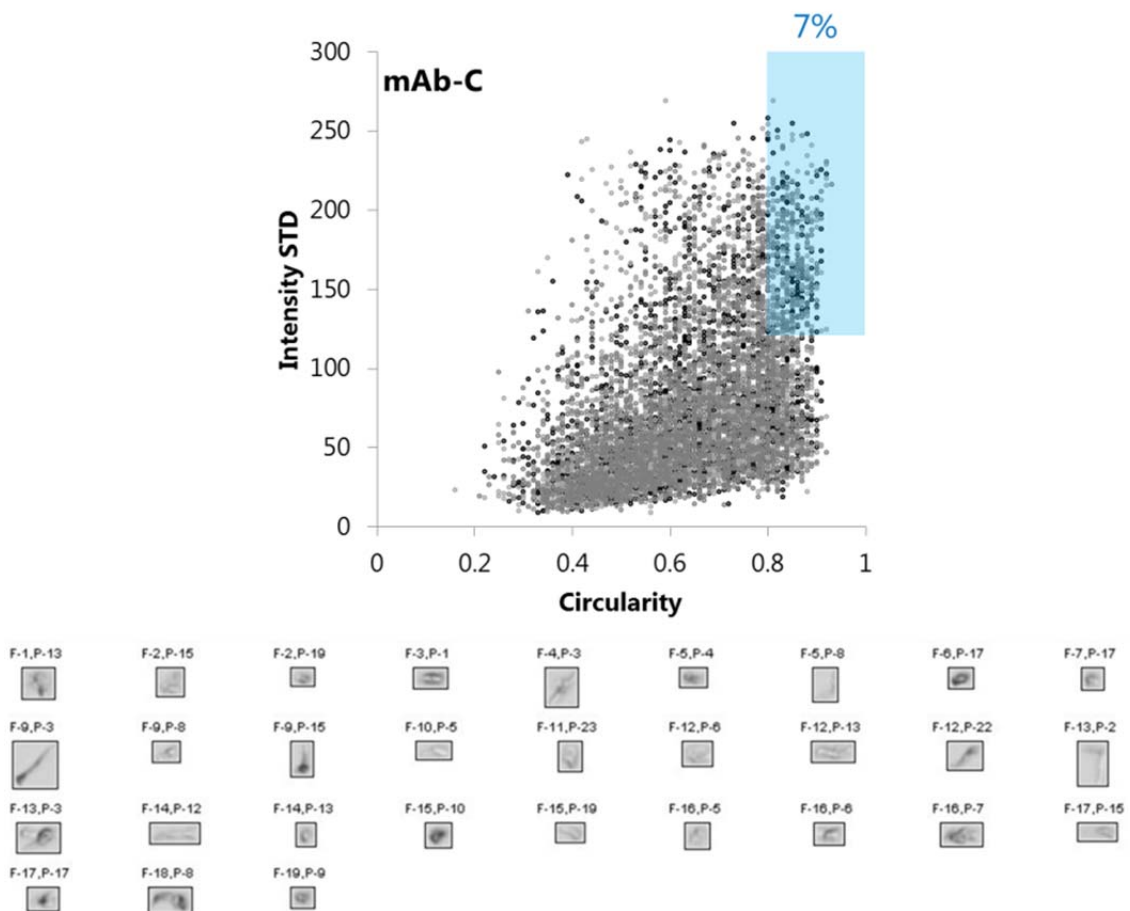


Figure 24. SO+シリンジ中で mAb-C を落下・振とうした際に生成した粒子。上:真円度と画像輝度の標準偏差による粒子の分類。青色部分がシリコンオイル油滴に分類された粒子、下:代表的な粒子の画像

輝度の標準偏差120以上を基準とした。また、画像による分類は、鮮明な画像が得られる7 μm 以上の粒子について実施した。画像パラメータによる分類を行った結果、mAb-Cを振とうした際に生成した粒子のうち、54%の粒子がシリコンオイル油滴に分類された(**Figure 23**)。一方、mAb-Cを落下・振とう複合ストレスに供した際に生成した粒子については、円形ではなく、全体的に透明な粒子が多く、シリコンオイル油滴と分類された粒子は7%であり(**Figure 24**)、落下・振とう複合ストレスにより生成した μm オーダーの粒子は主にタンパク質凝集体か、シリコンオイルとタンパク質が凝集した粒子と考えられた。SO+シリンジにPBSを充填し、落下・振とう複合ストレス試験を行ったところ、 μm オーダーの粒子が著しく増加した。生成した粒子について画像パラメータによる分類を行った結果、7 μm 以上の粒子の96%がシリコンオイルであると分類された(**Figure 25**)。また、代表的な粒子の画像の多くがシリコンオイル油滴の

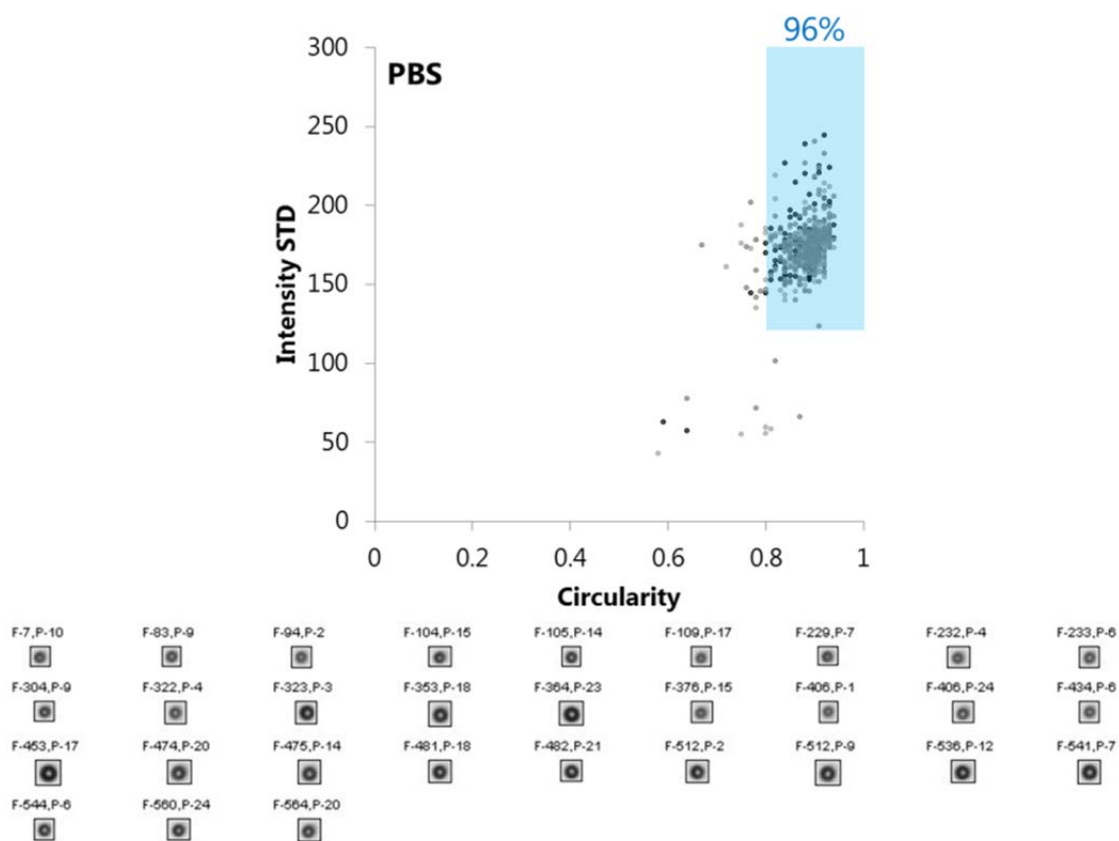


Figure 25. SO+シリンジ中で PBS を落下・振とうした際に生成した粒子。上:真円度と画像輝度の標準偏差による粒子の分類。青色部分がシリコンオイル油滴に分類された粒子、下:代表的な粒子の画像

特徴を有していることを目視でも確認した。PBSを充填したSO+シリンジをローテーターを用いて振とうした場合は、 μm オーダーの粒子の増加は認められなかった。

第三項 非イオン界面活性剤存在下における落下・振とうによる粒子生成

バイオ医薬品の添加剤として広く利用されているポリソルベート20を用いて、非イオン界面活性剤の落下・振とう複合ストレスによる凝集抑制効果について検討を行った。SO-シリンジを用いた場合は、ポリソルベート20の添加によって落下・振とう複合ストレスによる μm オーダーの粒子生成が効果的に抑制された (**Figure 26**)。SO+シリンジを用いた場合は、ポリソルベート20存在下で、ポリソルベート20を添加しない場合よりも多くの μm オーダーの粒子が生成した。ヘッドスペースをなくすことで、ポリソルベート20存在下での落下・振とう複合ストレスによる μm オーダーの粒子生成は抑制された。FIで得られた画像パラメータから、ポリソルベート20存在下で生成した7 μm 以上の粒子の80%以上はシリコンオイル油滴であると分類された (**Figure 27**)。

SO-シリンジにヘッドスペースがない状態で各抗体溶液を充填し、落下および振とうを行った試料について、RMMで水より比重の大きい粒子の粒子数および粒子径を測定した。**Figure 28**の通り、水より比重の大きい粒子の増加は、ポリソルベート20を添加することによって抑制された。

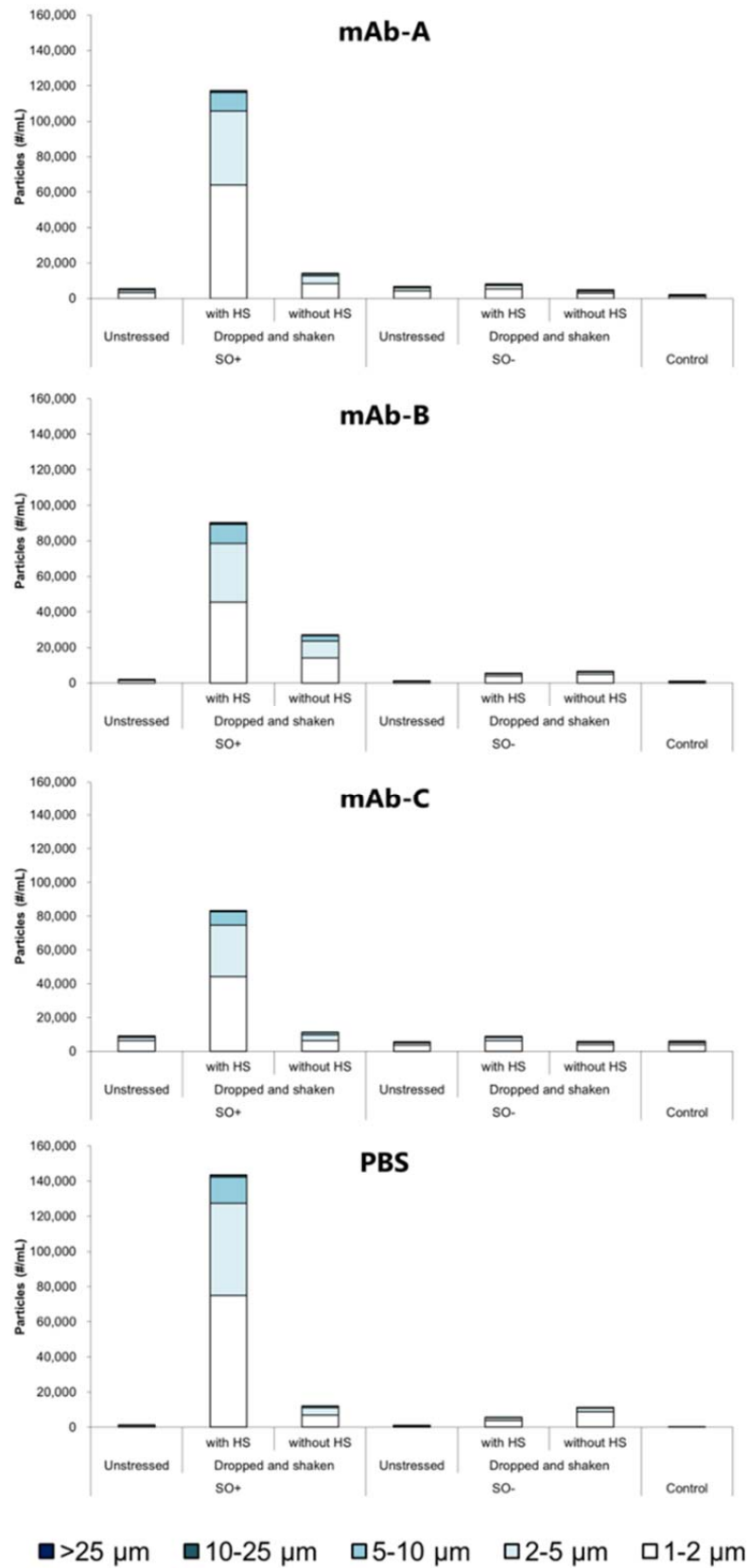


Figure 26. ポリソルベート20存在下、落下・振とう複合ストレスにより生成したμmオーダーの粒子数。HS:ヘッドスペース

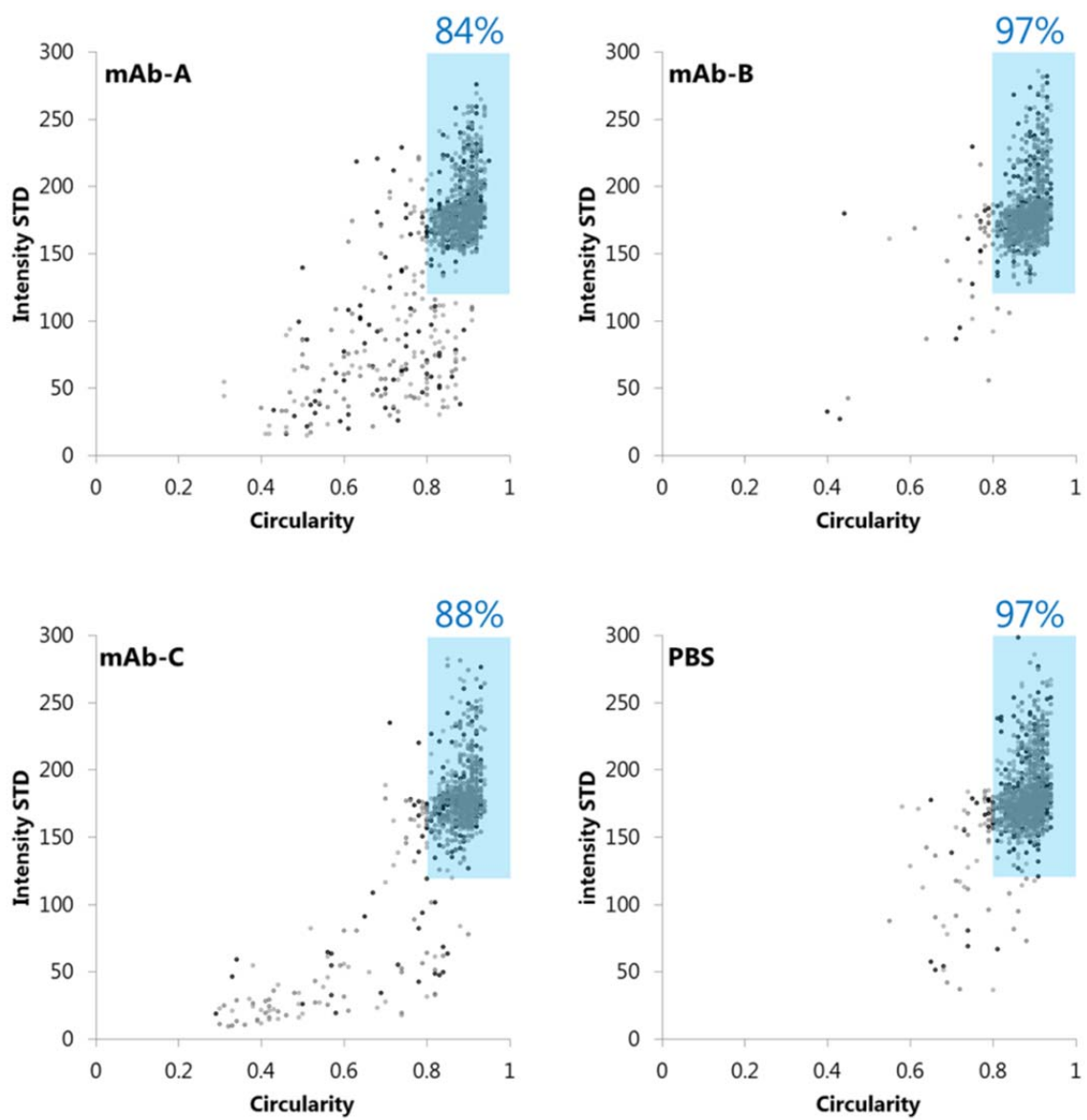


Figure 27. ポリソルベート存在下、SO+シリンジ中で各試料を落下・振とうした際に生成した粒子について、真円度と画像輝度の標準偏差によって粒子を分類した結果

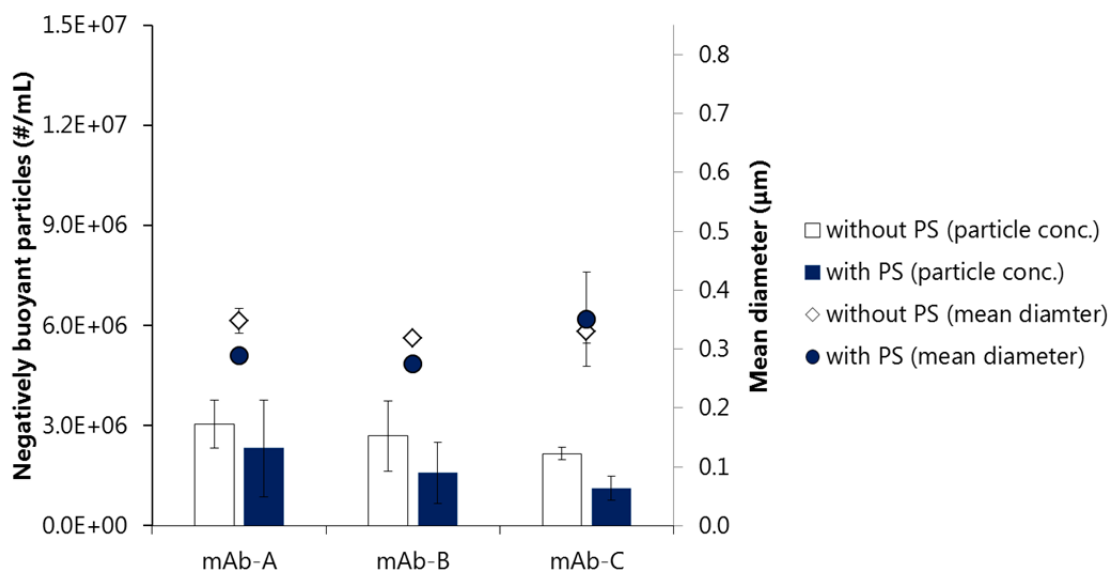


Figure 28. ポリソルベート 20 (PS) の存在下または非存在下における水より比重の大きい粒子の粒子数および粒子径。各試料を SO-シリンジにヘッドスペースができないよう充填し、落下・振とう複合ストレス試験を行った後、RMM により水より比重の大きい粒子の粒子数および粒子径を測定した

第四項 シリンジ内壁への抗体の吸着

落下・振とう複合ストレスによってシリンジ内壁に吸着した抗体の量を RP-UPLC を用いて定量した。Figure 29 の通り、シリコンオイルの有無およびポリソルベート 20 の有無によってシリンジ内壁に吸着した抗体の量に違いが見られた。シリコンオイルの塗布によって抗体の吸着量は増加した。一方、ポリソルベート 20 を添加することで抗体の吸着量は減少した。ヘッドスペースの有無は抗体の吸着量に影響を与えなかった。また、ストレスを受けていない試料のシリンジ内壁への抗体吸着量は、落下・振とう複合ストレス試験後および振とうストレス試験後の抗体吸着量と同等であった。

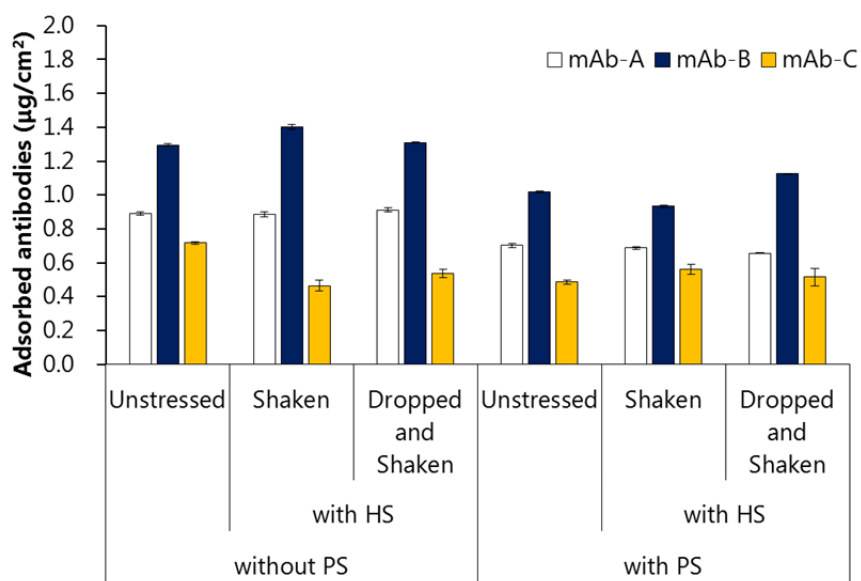
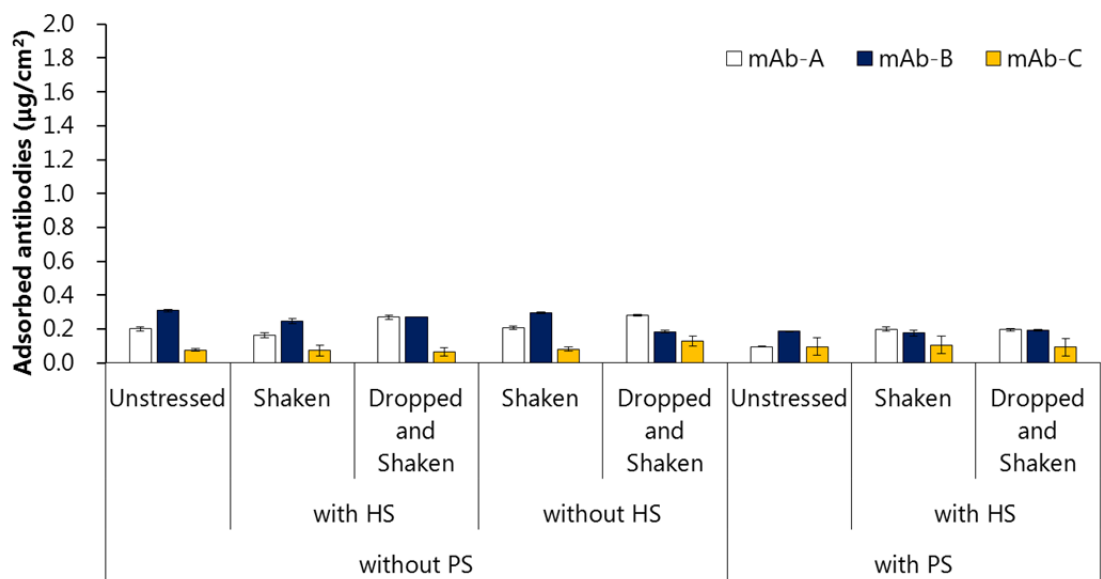


Figure 29. RP-UPLC を用いて定量したシリンジ内壁に吸着した抗体の量。上のグラフは SO-シリンジ内壁に吸着した抗体量、下のグラフは SO+シリンジ内壁に吸着した抗体量。HS: ヘッドスペース

第五項 抗体の構造安定性およびコロイド安定性

本研究で使用した3種の抗体について、DSC および DLS を用いて構造安定性とコロイド安定性を評価した。構造安定性は DSC を用いて得られた T_m 値を指標とした (Figure 30a)。 T_m の値は、mAb-C が最も高く、mAb-A が最も低かった (Table 2)。サーモグラムが上昇し始める温度 (T_{onset}) については、3種の抗体で明確な差は認められなかった。

DLS で得られた拡散係数の値 (D_m) および抗体濃度 (c) を用いて、相互作用パラメータである k_D を以下の式から算出した (Figure 30b, Table 2)。

$$D_m = D_s (1 + k_D c)$$

ここで、 D_s は無限希釈時の拡散係数に相当する。 k_D の値は、分子間相互作用の指標とされる第2ビリアル係数と相関することが知られており、 k_D 値から可溶性分子のコロイド安定性を評価することができる。⁵³ k_D は、mAb-A が最も低い値となった。

mAb-B と mAb-C では僅かに mAb-C のほうが低い k_D 値であった。この結果から、コロイド安定性については、mAb-A が最も不安定で、mAb-B が最も安定であると考えられる。

落下・振とう複合ストレス試験後の μm オーダーの総粒子数については (Table 2)、SO-シリンジでは、mAb-A が最も多く、mAb-C が最も少なかった。SO+シリンジを用いた場合は、mAb-C が最も生成した粒子数が多く、mAb-A と mAb-B の粒子数はどちらも約 66,000 個/mL であった。構造安定性およびコロイド安定性と生成した μm オーダーの総粒子数の相関については、SO-シリンジ中では、構造安定性およびコロイド安定性が低いほど多くの粒子が落下・振とう複合ストレスによって生成しており、相関が見られた。一方、SO+シリンジ中での粒子生成と構造安定性およびコロイド安定性には相関が見られなかった。

Table 2. 物理的パラメータ (T_m および k_D) ならびにストレス試験後の粒子数

抗体	T_m (°C)	k_D (mL/g)	総粒子数* (#/mL)					
			SO-			SO+		
			落下・ 振とう	落下・ 振とう (HS** なし)	振とう	落下・ 振とう	落下・ 振とう (HS** なし)	振とう
mAb_A	71.71	-11.87	60,308 (4,258)	9,006 (439)	961 (64)	65,821 (8,436)	54,004 (3,428)	1,655 (231)
mAb_B	74.72	-1.75	19,862 (1,451)	4,036 (109)	550 (11)	66,001 (8,056)	85,417 (5,631)	3,541 (442)
mAb_C	76.65	-3.89	19,898 (981)	4,926 (155)	439 (51)	82,935 (10,268)	52,607 (4,045)	26,381 (1,901)

* 括弧内の数は $\geq 10 \mu\text{m}$ の粒子数

** HS : ヘッドスペース

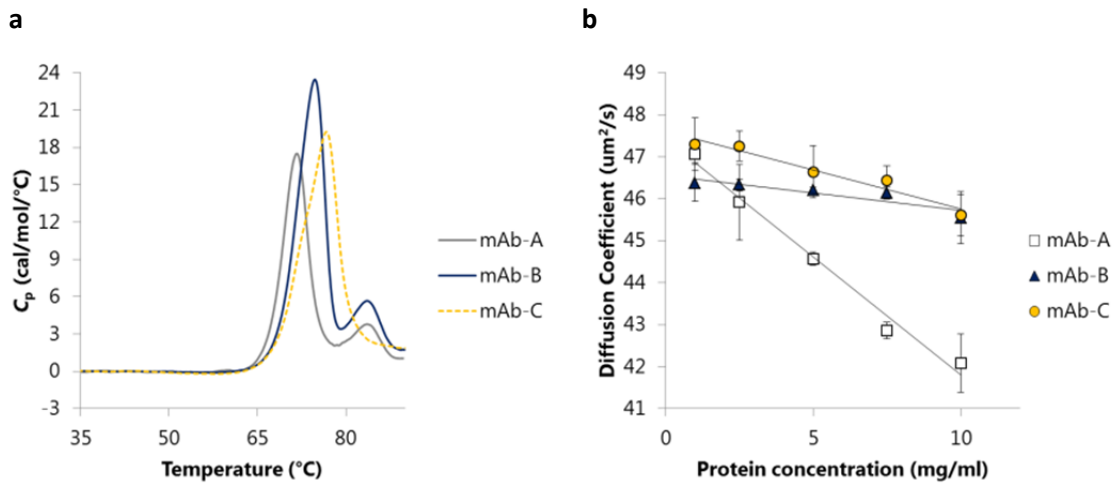


Figure 30. 構造安定性およびコロイド安定性の評価。左:DSC で得られたサーモグラム、右:DLS での拡散係数の濃度依存性

第三節 考察

第一項 SO-シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路

ヘッドスペース(気泡)が振とうによって移動する際に、シリコンオイル-溶液-気泡の界面において、表面張力によりシリンジ壁面上のタンパク質フィルムの一部が剥離し μm オーダーの粒子が増加することが知られているが、⁴² 本研究では、ローテーターを用いた振とうストレスでは、 μm オーダーの粒子の増加は認められなかった (**Figure 20**)。過去の報告では数日間振とうを行いタンパク質の凝集について検討しているのに対し、本研究では、摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験と回転数を同等にするため、振とうストレス条件を約 18 rpm で 3 分間とした。すなわち、振とう時間が短かったため、本研究の振とうストレス試験条件では、タンパク質凝集体の増加が認められなかったと推測される。また、過去の研究に使用されたタンパク質と本研究で用いた抗体の振とうに対する安定性が異なることも本研究で振とうによる凝集が見られなかったことの一因と考えられる。**Figure 31a** に示した通り、タンパク質がシリンジ内壁に吸着してフィルムを形成し、その後振とうによってタンパク質のフィルムの一部が剥離すると、タンパク質凝集体となる。天然状態の抗体はバイアル表面に吸着するが、変性した抗体よりも剥離しやすい。また、天然状態の抗体は、固体表面から剥離しても凝集体にはならないとの報告がある。⁵⁴ これらのことから、**Figure 31a** の吸着(I)は可逆的であると言える。吸着(I)が可逆的であるため、短時間の振とうストレスでは顕著な μm オーダーの粒子生成が見られなかったと考えられる。振とうストレス試験では μm オーダーの粒子は増加しなかったが、摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験では、 μm オーダーの粒子の増加が見られた (**Figure 20**)。このことから、落下が抗体分子のシリンジ内壁へ吸着を促進することで、 μm オーダーの粒子生成を加速することが示唆される。

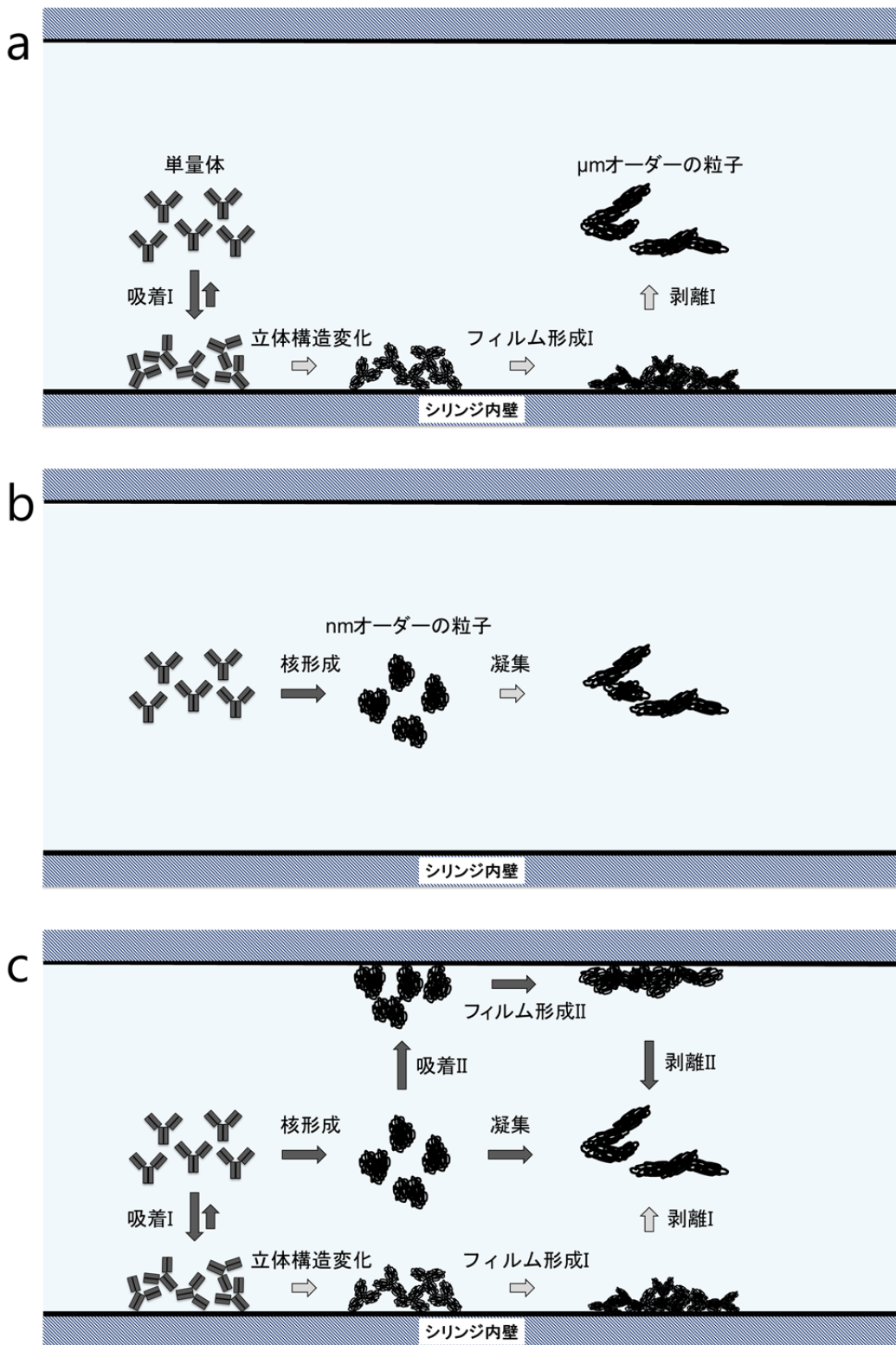


Figure 31. シリンジ中での凝集体生成経路。薄グレーの矢印は起りにくいステップ。a: 振とうストレスによる凝集体生成、b: 落下ストレスによる凝集体生成、c: 落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成

抗体溶液をヘッドスペース(気泡)ができないよう SO-シリンジに充填し、摩損度試験機による落下・振とう複合ストレス試験を行った結果、 μm オーダーの粒子の増加は抑制された(**Figure 20**)。第一章での推察した落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路モデルを考慮すると、ヘッドスペースがない状態では、振とうによる攪拌の効果がほとんど無く、壁面に吸着した抗体が剥離されにくいいため、 μm オーダーの粒子の増加が抑制されたと考えられる。一方で、 $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子については、ヘッドスペースの有無に関わらず同等の粒子数の増加および平均粒子径の増大が見られた(**Figure 19**)。この結果から、振とうによる攪拌の効果が無い条件でも、落下によって $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子が生成することが示された。シリンジの落下に伴って生じるキャビテーションバブルが崩壊する際に、タンパク質の立体構造変化および凝集(核形成)が起こることから、³³ 本研究で観察された $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子の増加は、キャビテーションバブル崩壊に伴う核形成によるものと推察される。キャビテーションによって生じた $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子同士が衝突することで μm オーダーの粒子が生成する可能性も考えられる(**Figure 31b**)。実際に、ヘッドスペースをなくすことによって、 μm オーダーの粒子生成は抑制されたが、ヘッドスペースがない条件でも、ストレスを受けていない試料よりも僅かに多い量の μm オーダーの粒子が見られた(**Figure 20**)。したがって、量は僅かであるが、落下ストレスのみでも μm オーダーの粒子が生成すると考えられる。また、第一章で、落下・振とう複合ストレス試験による可溶性画分の抗体の変性が見られなかった理由として、キャビテーションバブルが崩壊する際に変性と凝集が同時に起こるためと考えられる。

振とうおよび落下それぞれによる凝集体生成経路を考慮すると、シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成経路は次のように考えられる(**Figure 31c**)。はじめに落下により抗体の立体構造変化と $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子の生成(核形成)が引き起こされる。変性した抗体で構成される $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子は、天然状態の抗体よりも疎水性で、疎水性界面であるシリンジ内壁により強く吸着すると考えられる。吸着した $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子はシリンジ内壁上で凝集し、フィルム状になり、フィルムの一部が振とうストレスによって剥離することで μm オーダーの粒子が生成する(**Figure 31c**)。また、振とうによって $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子の衝突が促進され、 μm オーダーの粒子が増加する可能性もある。**Figure 29** の通り、SO-シリンジ内壁に吸着した抗体の

量については、落下・振とう複合ストレスによる変化は見られなかった。このことから、シリンジ内壁に吸着できる抗体の量は一定であり、シリンジの材質と抗体の性質、溶液の条件によって決まると考えられる。したがって、シリンジ内壁への抗体の吸着と剥離を介した μm オーダーの粒子生成が効率的に起こるためには、吸着した抗体を剥離し、落下により生成する核を効率的に壁面へ吸着させることが重要であると考えられる。また、ヘッドスペースの有無による抗体の吸着量に差が認められなかった。これは、バイアルと比較すると、シリンジの場合は充填容量に対する溶液とシリンジの接触面積の比が大きいため、振とう作用がない場合でも、抗体が十分にシリンジ壁面へアクセスできるためと推察される。これらから、SO-シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において、振とうは、抗体のシリンジ内壁への吸着促進ではなく、抗体の剥離の効率を高めることによって μm オーダーの凝集体生成を促進していると考えられる。

第二項 シリコンオイル塗布が落下・振とう複合ストレスによる粒子生成に与える影響

SO+シリンジに PBS を充填し、摩損度試験機を用いて落下・振とう複合ストレス試験を行ったところ、 μm オーダーの粒子が著しく増加した (**Figure 22**)。FI で得られた粒子の画像パラメータから粒子の分類を行ったところ、SO+シリンジ中で PBS を落下・振とうして生成した粒子の 96% はシリコンオイル油滴であると考えられた (**Figure 25**)。ヘッドスペースがないように PBS を充填した場合でも、落下・振とう複合ストレスによるシリコンオイル油滴の増加は認められた。一方で、ローテーターによる振とうストレスではシリコンオイル油滴の増加は認められなかった。これらの結果から、落下によってシリコンオイルの遊離が引き起こされると考えられる。これまでに、シリコンオイルが塗布されたシリンジを振とう、超音波処理または静置することでシリコンオイルが遊離することが報告されているが、^{48,55,56} 落下によりシリコンオイルが遊離するとの報告はない。キャビテーションバブルが崩壊する際に、容器内面が侵食されることが知られており、⁴⁰ キャビテーションの侵食効果によってシリコンオイルが SO+シリンジから遊離する可能性がある。SO+シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる粒

子生成において、落下は、シリコンオイルの遊離を促進し、シリコンオイル油滴やシリコンオイルとタンパク質の凝集体を増加させると考えられる。

SO+シリンジに抗体溶液を充填し、落下・振とう複合ストレス試験を行った際の0.35-1 μm の水より比重の大きい粒子の増加については、SO+シリンジを用いた場合とSO-シリンジを用いた場合で顕著な差は見られなかった (**Figure 19**)。前述の通り、0.35-1 μm の粒子生成は、キャビテーションバブルが崩壊する際にバブル周辺で局所的に起こると考えられるため、シリンジ表面のシリコンオイルの影響が見られなかったと考えられる。シリコンオイル油滴等の水より比重の小さい粒子については、落下・振とう複合ストレスによる増加は認められなかった。

SO+シリンジ中で抗体溶液を落下・振とうした際に生成した μm オーダーの粒子の

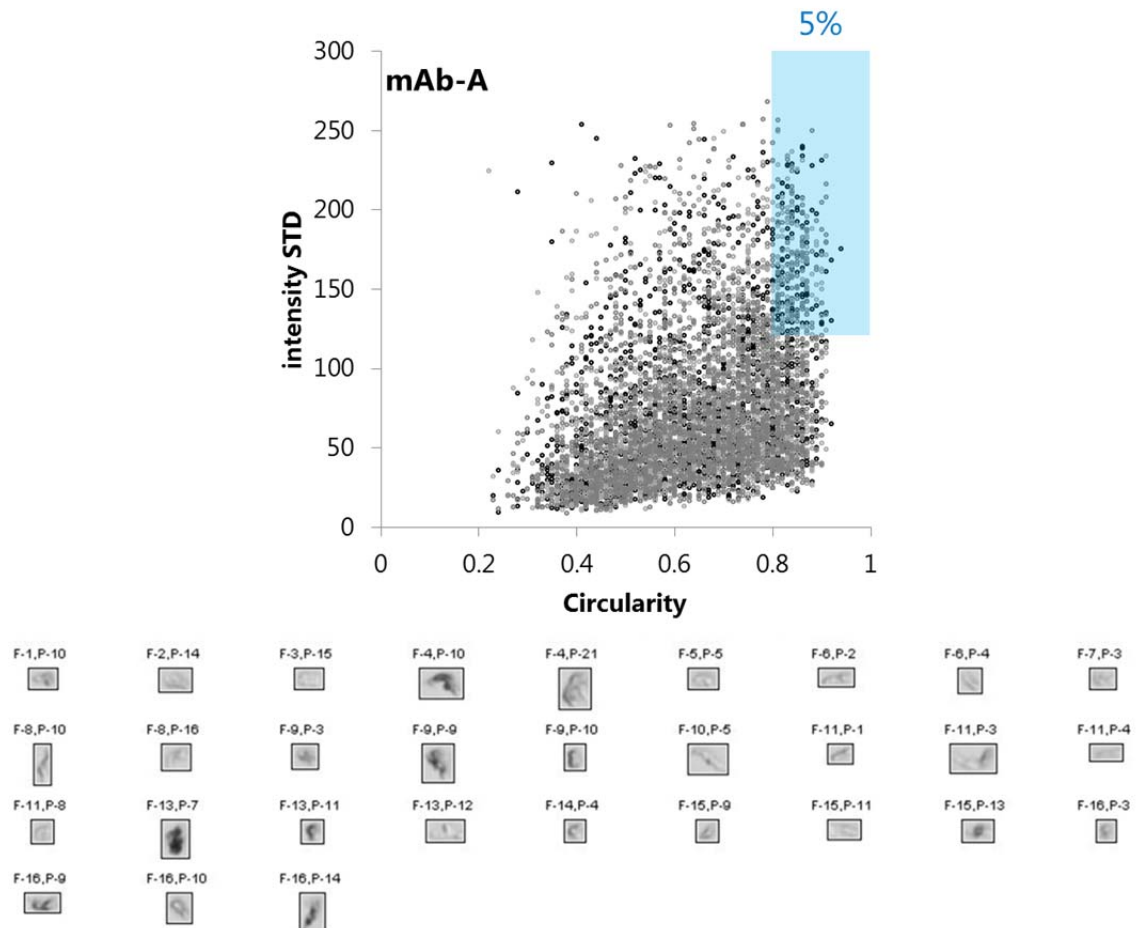


Figure 32. SO+シリンジ中で mAb-A を落下・振とうした際に生成した粒子。上:真円度と画像輝度の標準偏差による粒子の分類。青色部分がシリコンオイル油滴に分類された粒子、下:代表的な粒子の画像

多くは、画像輝度の標準偏差が低く、真円度も低い粒子であり、タンパク質凝集体であると考えられた。FIでの画像パラメータからSO+シリンジ中で抗体溶液を落下および振とうした際に生成した粒子の分類を行ったところ、シリコンオイル油滴の割合は5-7%であった(**Figure 24,32,33**)。したがって、SO+シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる μm オーダーの粒子の増加は主にたんぱく質凝集体の増加によるものであると考えられる。落下・振とう複合ストレスによって生成した μm オーダーの粒子数については、SO-シリンジよりもSO+シリンジを用いた場合のほうが多かったことから、シリンジ壁面の特性が μm オーダーのタンパク質凝集体生成に影響すると言える。また、シリンジ表面から遊離したシリコンオイルと抗体で構成される凝集体が生

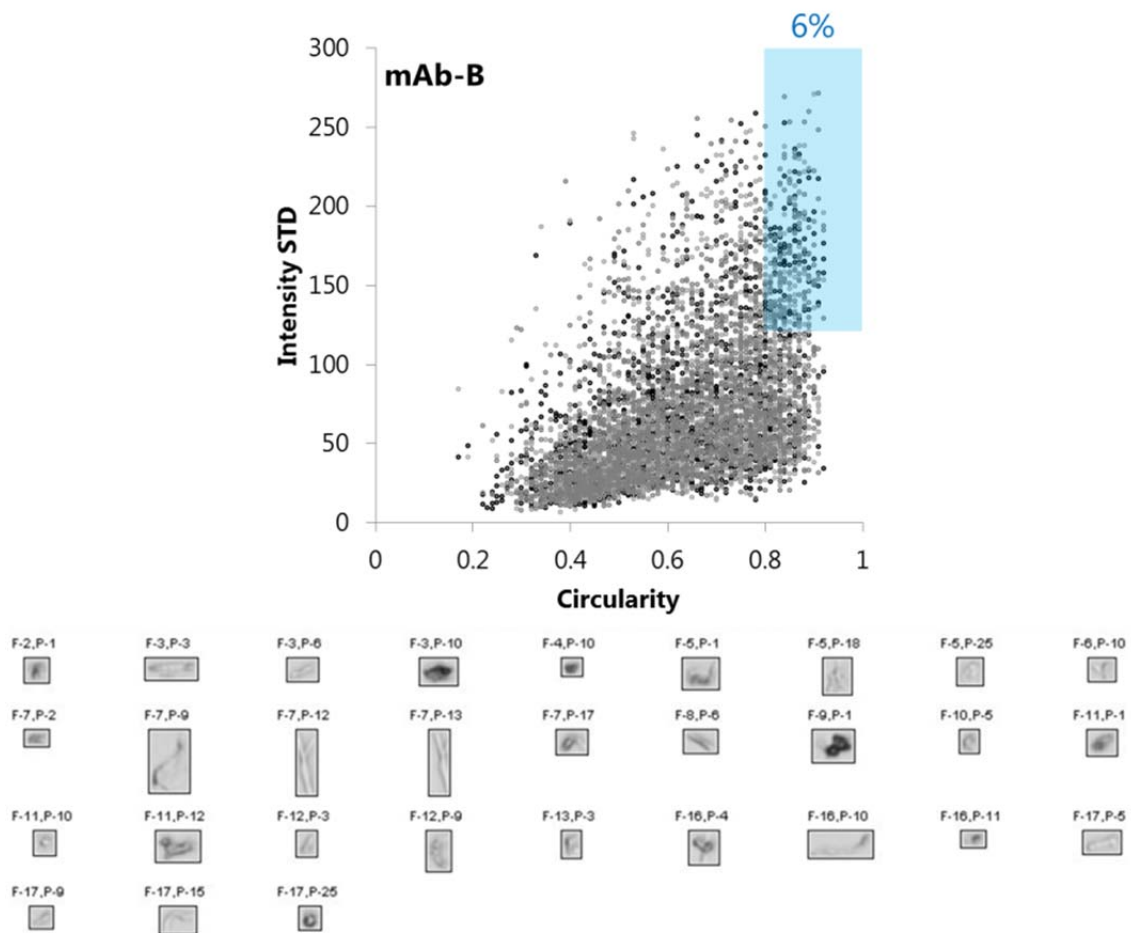


Figure 33. SO+シリンジ中で mAb-B を落下・振とうした際に生成した粒子。上:真円度と画像輝度の標準偏差による粒子の分類。青色部分がシリコンオイル油滴に分類された粒子、下:代表的な粒子の画像

成する可能性がある。⁵⁷ 実際には、シリコンオイル油滴の画像輝度の標準偏差が 120 以上という特徴と、タンパク質粒子の真円度 0.8 未満という特徴を持つ粒子が、落下・振とう複合ストレスにより増加しており (**Figure 24,32,33**)、シリコンオイル油滴とタンパク質の凝集体が生成したことが示唆される。しかしながら、画像輝度の標準偏差が 120 以上かつ真円度 0.8 未満の粒子の割合は限定的であり、シリコンオイル油滴を核とした凝集体生成は μm オーダーの粒子生成の主要因ではないと考えられる。シリンジ壁面へ吸着した抗体の量を RP-UPLC を用いて定量したところ、シリコンオイルを塗布することによってシリンジ壁面への抗体の吸着量が増えることが明らかとなった (**Figure 29**)。また、シリコンオイルを塗布したシリンジの表面は、シリコンオイルを塗布していないものよりも疎水的であり、変性した抗体から構成されることが考えられる。0.35-1 μm の粒子は、SO-シリンジよりも SO+シリンジにより強く吸着すると考えられる。したがって、シリコンオイルの塗布によって、シリンジ内壁へ吸着できる抗体の量が増えるとともに、落下により生じた粒子がシリンジ表面により強く吸着するため、SO-シリンジよりも SO+シリンジでより多くの μm オーダーのタンパク質凝集体が生成したと考えられる。

mAb-A および mAb-B については、ローテーターによる振とうストレスでは μm オーダーの粒子の著しい増加は認められなかった。mAb-C については振とうストレスで約 26,000 個/mL の μm オーダーの粒子が生成した (**Figure 22**)。mAb-C を振とうした際に生じた μm オーダーの粒子について、画像パラメータによる分類を行ったところ、57%がシリコンオイル油滴であると考えられた (**Figure 23**)。mAb-C を落下・振とう複合ストレス試験に供した際に生成した μm オーダーの粒子については、シリコンオイル油滴に分類されたものが 7%であったことを考慮すると (**Figure 24**)、振とうストレスは、シリコンオイルの遊離とタンパク質の凝集のどちらも引き起こすが、落下・振とう複合ストレスと比べるとタンパク質凝集体を生成する効果は低いと言える。したがって、以上の結果から、SO+シリンジ中でのタンパク質凝集体生成についても、落下と振とうが組み合わさることによって促進されることが考えられる。

抗体溶液を SO+シリンジに充填した場合、1 分間の落下・振とう複合ストレスによって 10 μm 以上の粒子濃度が 6000 個/mL よりも高くなった。これらの抗体が、充填容量が 1 mL より多いプレフィルドシリンジ製剤であれば、落下・振とう複合ストレス後の

10 μm 以上の粒子濃度は、薬局法に記載の規格上限を上回る。摩損度試験機は、錠剤が製造や輸送中に受けるストレスを模すように設計されており、⁵⁸ プレフィルドシリンジ製剤が輸送中に受けるストレスに対する安定性評価にも応用可能であると考えられる。陸上輸送時の衝撃値・加速度値から落下した高さを解析した研究では、陸上輸送時に起こる落下の平均高さは 22-25 cm であり、また衝撃が観測された回数は数十から百数十回であったと報告されており、⁵⁹ このことから、本研究の落下・振とう複合ストレス試験の条件(落下高さ 156 mm、回転数 50 回)が陸上輸送時の落下・振とう複合ストレスを評価するのに妥当であると言える。したがって、本研究で得られた結果は、輸送前は薬局方に記載の規格を満たした製剤であっても、輸送において適切に取り扱われなかった場合、輸送後に 10 μm 以上の粒子濃度が規格上限を上回る可能性があることを示している。輸送中に製剤が受ける落下・振とう複合ストレスの影響については、2 次包装容器(組箱など)によって変わると考えられることから、2 次包装した状態で摩損度試験機による落下・振とう複合ストレス試験を実施できる場合は、2 次包装したものを使用したほうが実際の輸送時の安定性をより正確に評価できると考えられる。一方、本研究のような 2 次包装しない状態での落下・振とう複合ストレス試験は、処方最適化検討など、包装容器の決定前に実施される検討に有用であると考えられる。

摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験の再現性について、3 回の独立した試験を行い評価を行った (**Figure 21**)。振とう、凍結融解、スターラーによる攪拌ストレス試験に関する過去の報告結果のうち、本研究と同程度の凝集体粒子が生成した結果について標準偏差を比較したところ、本研究での 3 回の繰り返し測定結果から得られた標準偏差は過去の報告での標準偏差と同等であった。このことから、摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験の再現性は、これまで実施された実績が多くある振とう、凍結融解、スターラーによる攪拌ストレス試験と同等であると考えられる。^{43,60} したがって、試験の再現性という点においても、摩損度試験機による落下・振とう複合ストレス試験はバイオ医薬品開発に適用可能であると考えられる。

mAb-A および mAb-C については、ヘッドスペースをなくすことにより落下・振とう複合ストレスによる μm オーダーの粒子生成が抑制されたが、mAb-B については、

ヘッドスペースがない条件でも μm オーダーの粒子の増加が見られた (**Figure 22**)。ヘッドスペースをなくすことで振とうの効果がなくなるため、吸着した抗体の剥離によって生成する μm オーダーの粒子数が減少すると考えられる。mAb-B について、ヘッドスペースがない場合において、 μm オーダーの粒子がヘッドスペースがある場合よりも多く生成した理由は明らかではないが、シリンジごとにシリコンオイル塗布の状態にばらつきがあり、ヘッドスペースの有無に関する mAb-B の検討結果が、mAb-A および mAb-C と異なる傾向を示した可能性がある。

第三項 非イオン界面活性剤の凝集抑制作用機序

非イオン界面活性剤の一種であるポリソルベート 20 を含む抗体溶液をシリンジに充填し、摩損度試験機を用いて落下および振とうを行った。SO-シリンジの場合は、ポリソルベート 20 の添加によって μm オーダーの粒子生成が効果的に抑制された。一方、SO+シリンジでは、ポリソルベート 20 存在下においても、 μm オーダーの粒子が顕著に増加した (**Figure 26**)。SO+シリンジ中で生成した粒子について、粒子の画像パラメータによる分類を行ったところ、ポリソルベート 20 存在下で生成した粒子の 80%以上はシリコンオイル油滴であると考えられた (**Figure 27**)。したがって、ポリソルベート 20 は SO-、SO+シリンジいずれの場合でも落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成を抑制する効果を持つと言える。第一章で考察した通り、非イオン界面活性剤がタンパク質の凝集を抑制する作用機序としては、界面活性剤がシリンジ壁面を覆いタンパク質のシリンジ壁面への吸着を抑制することと、落下時に生じるキャビテーションバブルを界面活性剤が覆うことで、キャビテーションバブル周辺での局所的なタンパク質の変性と核形成を抑制することが考えられる。前者については、シリンジ壁面への抗体の吸着量がポリソルベート 20 の添加によって減少したことから支持される。ただし、ポリソルベート 20 の添加によって減少した抗体の吸着量は最大でも 32%であり、ポリソルベート 20 の μm オーダーの粒子生成抑制効果と比較すると、後者の凝集抑制機序もポリソルベート 20 の凝集抑制作用に寄与していることが示唆される。**Figure 28** の通り、ポリソルベート 20 の添加によって落下・振とう複合ストレス試験後の水より比重が大きい $0.35\text{-}1\ \mu\text{m}$ の粒子数が減少したことか

ら、ポリソルベート 20 はキャビテーションバブルの崩壊に伴う抗体の変性と核形成を抑制する効果を持つと考えられる。また、抗体や抗体の凝集体が、SO+シリンジ表面から遊離したシリコンオイル油滴に吸着し、抗体とシリコンオイルから構成される μm オーダーの粒子が生成することについても、ポリソルベート 20 がシリコンオイル油滴の表面を覆うため抑制されると考えられる。

0.05%ポリソルベート 20 含有 PBS を SO+シリンジに充填し落下および振とうした際に生成した μm オーダーの粒子数は、ポリソルベートを含まない PBS を落下・振とうした場合よりも多かった。この結果から、ポリソルベート 20 は、タンパク質凝集体生成は抑制するが、落下・振とう複合ストレスによるシリコンオイルの遊離については促進すると考えられる。シリコンオイルはアジュバントとして作用し、免疫原性を高めるとの報告がある。⁵⁶ したがって、非イオン界面活性剤は、タンパク質凝集体の生成を抑制するためにバイオ医薬品の添加剤として広く使用されているが、SO+シリンジを容器として使用する場合は、非イオン界面活性剤の添加によるシリコンオイル油滴の増加に注意が必要である。ポリソルベート 20 存在下での落下・振とう複合ストレスによるシリコンオイル油滴の生成は、ヘッドスペースをなくすことによって抑制された。このことから、ポリソルベート 20 存在下では、主に振とう時の攪拌によってシリコンオイルが遊離すると考えられる。

第四項 構造安定性・コロイド安定性と落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度との相関

本研究で使用した 3 種の抗体の k_D 値は **Table 2** の通りである。各抗体でアミノ酸配列が異なるため、電気的特性、親水性または疎水性などの特性も各抗体で異なっており、その結果コロイド安定性も各抗体で差が見られたと考えられる。抗体溶液を SO-シリンジに充填し落下・振とう複合ストレス試験を行った場合は、 k_D の値が低い抗体でより多くの μm オーダーの粒子が生成した。 k_D の値が低いほうがコロイド安定性は低いと考えられることから、⁵³ コロイド安定性は SO-シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成速度と相関する可能性がある。コロイド安定性が低い条件では、タンパク質がシリンジ表面へ吸着しやすいことが知られてい

る。⁵⁴ しかしながら、本研究では天然状態のコロイド安定性を評価しており、**Figure 31a** 吸着 I の傾向は k_D の値から評価できるが、吸着 II については評価できない可能性がある。第一項での考察の通り、吸着 I を介した μm オーダーの凝集体生成は、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成においては寄与が小さいと考えられることから、コロイド安定性と落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成の相関について明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

構造安定性については、 T_m 値を用いて評価を行った (**Table 2**)。 T_m 値が最も低く構造安定性が最も低いと考えられる mAb-A を SO-シリンジ充填し、落下・振とう複合ストレス試験を実施したところ、mAb-B および mAb-C よりも多くの μm オーダーの凝集体が生成した。この結果から、構造安定性が SO-シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成と相関することが示唆された。落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成では、はじめに落下による変性および核形成が起こる。構造安定性が低い抗体では、落下による変性および核形成がより起こりやすいため、 μm オーダーの凝集体生成が起こりやすいと考えられる。

SO+シリンジ中での μm オーダーの粒子生成については、コロイド安定性および構造安定性のどちらも相関は見られなかった。SO+シリンジでは、落下・振とう複合ストレスによって、タンパク質凝集体だけでなくシリコンオイル油滴やシリコンオイル油滴とタンパク質の凝集体も生成するため、抗体の構造安定性、コロイド安定性と μm オーダーの総粒子数との相関が見られなかったと考えられる。

落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成は、落下による変性および核形成、シリンジへの吸着、フィルムの形成、シリンジからの剥離という複数の段階を経て起こる。それぞれの段階の反応速度については、コロイド安定性や構造安定性だけでなく、界面との吸着性など他の物理化学的特性が影響すると考えられる。したがって、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度を物理化学的特性から予測するためには、複数の物理化学的特性を総合的に検討する必要がある。

結語

本研究では、バイオ医薬品が輸送中に受ける落下・振とう複合ストレスに着目し、落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成経路、ならびに落下・振とう複合ストレスによる凝集を予防、予測する方法について研究を行った。

第一章において、バイアル中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成について検討した。落下・振とう複合ストレスによって、 μm オーダーのタンパク質凝集体が著しく増加した。落下・振とう複合ストレスによる μm オーダーの凝集体の増加は、抗体の立体構造の変化、変性した抗体の壁面への吸着、吸着した抗体の壁面からの剥離という経路で起こることが示唆された。落下ストレスはキャビテーション発生を通じた立体構造の変化を、振とうストレスは攪拌による壁面からの抗体の剥離をそれぞれ引き起こし、落下・振とう複合ストレスによる μm オーダーの凝集体生成を促進すると考えられる。

次に、第二章では、シリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成について検討を行った。落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において、落下ストレスは抗体の立体構造の変化だけでなく核形成を引き起こすことが示された。その他のタンパク質凝集体生成経路については、バイアルの場合と同様であると考えられた。シリコンオイルのガラスシリンジ内壁への塗布によって、シリンジ内壁へのタンパク質の吸着量が増加し、落下・振とう複合ストレスにより生成するタンパク質凝集体量も増加した。非イオン界面活性剤は、タンパク質のシリンジ内壁への吸着および落下ストレスによる核形成を抑制することで、落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成を抑制した。ただし、非イオン界面活性剤を添加すると、シリコンオイルの遊離が促進される点には注意が必要である。今後さらに検討を行うことで、構造安定性やコロイド安定性をはじめとする種々の物理化学的指標から落下・振とう複合ストレスに対する凝集安定性を予測できるようになる可能性がある。

本研究の結果から、バイオ医薬品が実際に受ける可能性のある複合的なストレスに対する安定性を評価することの重要性が示された。本研究で使用した摩損度試験機は、低分子医薬品開発において汎用されている機器であり、再現性のあるストレス試験を実施できることから、今後バイオ医薬品の分野でも活用され、より高品質のバイオ医薬品の開発に繋がることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導いただきました大阪大学大学院薬学研究科 高分子化学分野 大久保忠恭 教授、吉田卓也 准教授、河原一樹 助教に謹んで感謝いたします。また、貴重なご助言を多く頂きました大阪大学 小林祐次 名誉教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導・ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 内山進 教授に心より感謝いたします。

本論分を作成するにあたり、適切なお指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 薬品製造化学分野 赤井周司 教授、ならびに大阪大学大学院薬学研究科 情報・計量薬学分野 高木達也 教授に厚くお礼申し上げます。

実験にご協力いただきました大阪大学大学院工学研究科 丸野孝浩 氏、米田早紀 氏にお礼申し上げます。

多くの場面でご協力いただきました大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野の皆様、ならびに武田薬品工業株式会社ファーマシューティカル・サイエンス、グローバルワクチンビジネスユニットの皆様にも感謝申し上げます。

最後に、長い間応援してくれた両親、兄に感謝いたします。子育てで忙しい中、毎日支えてくれた妻に深く感謝いたします。ありがとうございました。

実験の部

第一章

材料

PBS (pH7.4) および 10× PBS (pH7.4) は Invitrogen 社から購入した。ポリソルベート 80 は J.T. Baker 社または日油株式会社から購入したものを使用した。その他の試薬は、特記しない限り、和光純薬社から購入した。

本実験には、大阪大学大学院工学研究科所有の IgG1 抗体 (mAb-A) を使用した。PBS 中で濃度が 10 mg/mL となるように調製された mAb-A ストック溶液を、PBS で 0.9 mg/mL に希釈した後、PES 製フィルター (孔径 0.22 μm) でろ過して以下の試験に使用した。

方法

落下・振とう複合ストレス試験

mAb-A 溶液 1.0 mL を 2.5 mL 容シクロオレフィンポリマー製バイアル (大協精工) にとり、フルオロポリマーコートされたゴム栓およびアルミニウムキャップで密栓した。摩損度試験機 (Copely 社、FRV2000) を用いて、回転速度 50 rpm で 100 分間または 400 分間、mAb-A 溶液の入ったバイアルを繰り返し落下および振とうした。摩損度試験機のドラムの内径が 287 ± 4.0 mm、回転軸部分の外径が 25.0 ± 0.5 mm であることから、摩損度試験機による落下の高さは 156 ± 2.0 mm である (**Figure 34**)。

ポリソルベート 80 の凝集抑制作用について検討するため、mAb-A ストック溶液を 0.1 % (w/v) ポリソルベート 80 を含む PBS で 0.9 mg/mL に希釈したものを同様に落下・振とう複合ストレス試験に用いた。

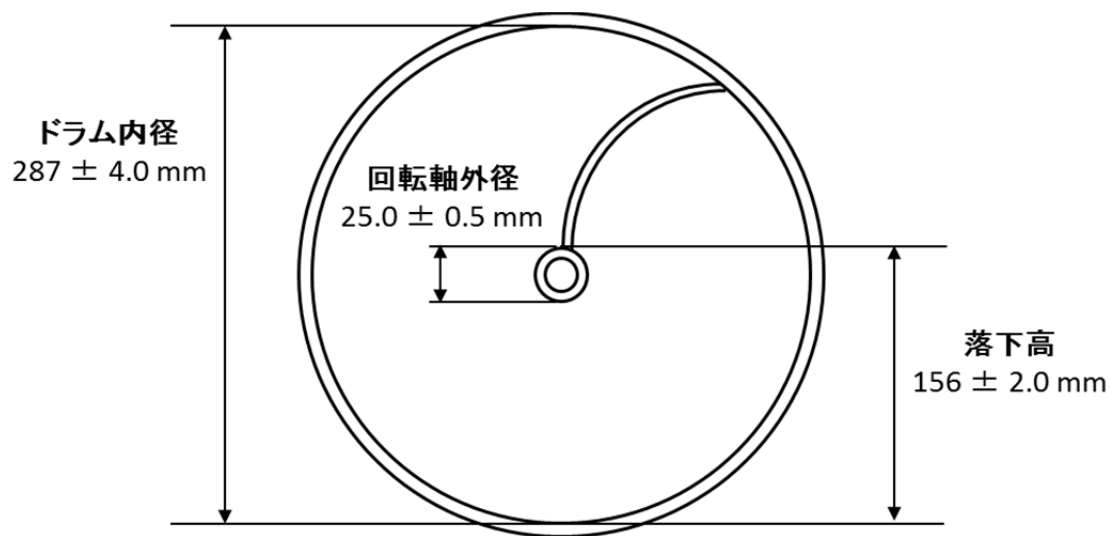


Figure 34. 摩損度試験の落下高

振とうストレス試験

落下・振とう複合ストレスとの比較を行うため、オービタルシェイカー (TAITEC、Mix-VR) を用いて振とうストレス試験を行った。mAb-A 溶液の入ったバイアルを水平に倒した状態でオービタルシェイカーに固定し、300 rpm で 100 分間または 400 分間振とうを行った。

落下・振とうの相乗作用に関する検討

はじめに、mAb-A 溶液の入ったバイアルを、摩損度試験機を用いて回転速度 50 rpm で 10 分間落下および振とうした。開栓して落下・振とう複合ストレスを受けた mAb-A 溶液をバイアルから取り除いた後、静置していた (ストレスを受けていない) mAb-A 溶液を新たにバイアルに入れ、再び密栓した。次いで、このバイアルを 300 rpm で 30 分間または 100 分間オービタルシェイカーを用いて振とうした。mAb-A 溶液の充填容量とタンパク質凝集体生成速度との関係について検討するため、充填容量の異なる 2 つの対照試料および 3 つの試料を調製した (Figure 14)。

また、Figure 15 の通り、摩損度試験機を用いて 50 rpm で 10 分間落下および振とうした mAb-A 溶液を、新しい別のバイアルに移し、オービタルシェイカーを用いて 300 rpm で 30 分間または 100 分間振とうを行った。振とう前後での μm オーダーの粒子濃度を比較した。

フローイメージング分析 (FI)

マイクロフローイメージング (Brightwell technologies, DPA-4200) を用いて μm オーダーの粒子を分析した。フローセルはシランコーティングされたものを使用した。各試料を PBS で 100 倍に希釈した後、室温で 2 分間以上静置し気泡を除去した。測定前に 0.5 mL 以上の試料溶液で流路を置換した。さらに 0.12 mL の試料溶液で測定直前にパージを行った後、流速 0.17 mL/min、測定容量 0.25 mL で三回繰り返して測定を行った。本論文では三回測定の平均値を結果として示した。測定範囲は 1 μm 以上の粒子とした。粒子の全域が測定画面内に入っていない粒子 (Edge particles) はソフトウェア (MVSS version 2) を用いて除外した。異なる試料を測定する前に、水および PBS による流路の洗浄を行った。ポリソルベート 80 を含む試料については、PBS ではなく 0.1% ポリソルベート 80 含有 PBS を希釈及び洗浄に使用した。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

単量体および可溶性凝集体については、SEC を用いて分析した。高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) システムは Waters Alliance 2695 システムを、カラムは東ソー TSL gel G3000SWXL (4.6 \times 300 mm) を用いた。2 \times PBS/アセトニトリル=9:1 を移動相として、流速 0.5 mL/min でアイソクラティック溶出を行った。検出は紫外 (Ultraviolet, UV) 検出器を用い、検出波長は 280 nm とした。カラムの詰まりを防止するため、各試料をあらかじめ 13,200 \times g で 10 分間遠心し、上清 20 μL を注入した。注入は 2 回行い、単量体および凝集体の面積および面積% (全ピーク面積に対する各ピーク面積の割合) について算出し、2 回の平均値を報告値とした。ポリソルベート 80 を含む試料については、ポリソルベート 80 由来のピークが凝集体ピークと重なったため (Figure 35)、ポリソルベート 80 のピーク面積を差し引いた値を凝集体ピーク面積値とした。

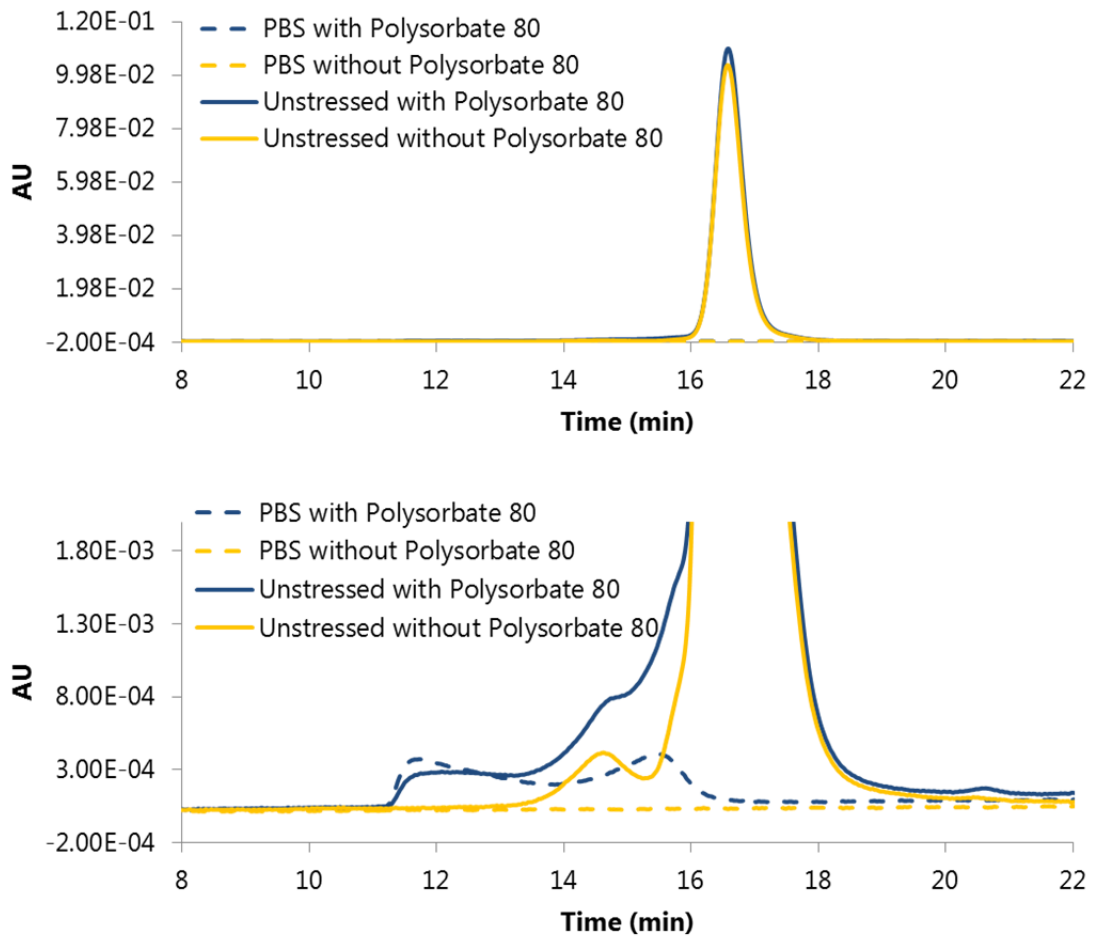


Figure 35. SEC の代表的なクロマトグラム。上:フルスケールクロマトグラム、下:拡大クロマトグラム

動的光散乱 (DLS)

動的光散乱測定には Zetasizer APS (Malvern) を用いた。各試料を $13,200 \times g$ で 10 分間遠心した後、上清 $60 \mu\text{L}$ を 384 穴プレートにとり、脱気のため $1,000 \times g$ で 5 分間遠心した。測定温度は 25°C とし、測定前に 120 秒間 25°C で試料の平衡化を行った。測定時間は Zetasizer software version 6.30 を用いて自動的に決定した。試料にレーザー光を照射した際の散乱光の時間ゆらぎから拡散係数 (D) を得た後、以下のストークス・アインシュタインの式を用いて平均粒子径 (Z 平均粒子径、Z-Ave) を算出した。

$$\text{Z-Ave} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

ただし、 k_B はボルツマン定数、 T は温度、 η は溶媒の粘度である。溶媒の粘度は、Zetasizer software version 6.30 中の分散媒定義ファイルの値を使用した。測定は3回繰り返して行い、3回の平均値を結果とした。

円二色性スペクトル(CD)

JASCO J720W 分光偏光計を用いて CD スペクトルを得た。各試料を $13,200 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を試料とした。試料のタンパク質の濃度は 0.3-0.6 mg/mL であった。遠紫外の測定には光路長 1 mm のセルを用い、近紫外の測定には光路長 10 mm のセルを用いた。測定温度 25°C で測定を行った。0.2 nm ステップで 8 回スキャンを行い、8 回の平均スペクトルを結果とした。

液体クロマトグラフィー—質量分析(LC-MS)

mAb-A 溶液 1.0 mL をバイアルにとり、摩損度試験機を用いて 400 分間落下・振とう複合ストレスを加えた後、 $15,000 \times g$ で 30 分間遠心した。上清を可溶性画分として回収した後、沈殿物を 100 μ L の 0.1M グアニジン塩酸塩により再溶解し不溶性画分とした。回収した可溶性画分および不溶性画分について、タンパク質 1 mg に対して FabRICATOR (IdeS) 酵素 (Genovis Inc.) を 1 ユニット加えた後、37°C で 30 分間インキュベートし、F(ab')₂ および Fc 部分へ分解した。さらに、5 M グアニジン塩酸塩および 50 mM TCEP を加えて室温で 30 分間静置することにより F(ab')₂ および Fc 部分を還元した。トリフルオロ酢酸を終濃度 10% (v/v) となるように添加して還元反応を停止し、LC-MS 用試料とした。

LC-MS 分析には、超高速液体クロマトグラフィー (島津、Nexera) および maXis II ETD 四重極-飛行時間型質量分析計 (Bruker Daltonics) を用いた。カラムは BEH300 C4 2.1 \times 100 mm (waters) を用いた。カラム温度は 60°C に設定した。注入量は、各試料について、タンパク質 1 mg が注入されるように設定した。移動相 A には 0.1%ギ酸含有の水を、移動相 B には 0.1%ギ酸含有の 2-プロパノール/アセトニトリル=40:60 (v/v) を用いた。溶出は移動相 B を 15%から 45%まで 30 分間で変化させるリニアグラジエントにより実施した。モノアイソトピック質量を SNAP II アルゴリズム (Bruker Daltonics) により決定した。

第二章

材料

PBS (pH7.4) は Invitrogen から購入した。ポリソルベート 20 は J.T. Baker 社から購入した。その他の試薬は、特記しない限り、和光純薬社から購入した。

第二章では、第一章でも使用した mAb-A (等電点 (Isoelectric point, pI): 8.90) に加えて、IgG1 抗体 (mAb-B, pI: 8.97) と IgG2 抗体 (mAb-C, pI: 7.83) を用いた。mAb-B については、ヒスチジン緩衝液中で濃度が 60 mg/mL となるように調製されたものを、mAb-C については、酢酸緩衝液中で濃度が 16 mg/mL となるように調製されたものそれぞれストック溶液とした。mAb-B および mAb-C は、はじめにストック溶液を限外ろ過により PBS ヘバッファー交換した。各抗体溶液を PBS で希釈し 1 mg/mL とした。0.05% ポリソルベート 20 含有試料については、0.1% ポリソルベート 20 含有 PBS と 2 mg/mL となるように PBS で希釈した各抗体溶液を 1:1 の割合で混合して調製した。各試料溶液は 0.22 μ m の PES 製フィルターでろ過した後、1 mL 容ガラスシリンジにとり、ラミネート処理したゴム栓で密栓した。ゴム栓の位置は、ヘッドスペースの高さが 5 mm となる位置またはヘッドスペースが完全になくなる位置とした。密栓した後、プランジャー部分は取り外した。また、本研究では、シリンジに塗布したシリコンオイルがタンパク質凝集に与える影響について検討するため、シリコンオイルを塗布した (SO+シリンジ) シリンジと塗布していないシリンジ (SO-シリンジ) を用いた。

方法

落下・振とう複合ストレス試験

摩損度試験機は第一章と同じものを使用した。第二章の実験では、抗体溶液の入ったシリンジを摩損度試験機のドラムに入れ、50 rpm で 1 分間繰り返し落下および振とうを行った。ストレス試験後、シリンジに太さ 27 ゲージ、長さ 1 インチの注射針を取り付け、プランジャーを押して針先から試料を回収した。ストレスを加えない試料は、抗体溶液をシリンジに充填し静置した後、溶液を針先から回収することにより得

た。また、シリンジに充填する前の溶液をコントロールとした。

試験の再現性について確認するため、mAb-B と mAb-C について、3 日にわけて 3 回の独立した落下・振とうストレス試験を行った。再現性の検討は、SO+シリンジと SO-シリンジについて、それぞれヘッドスペースありとなしの条件で実施した。

振とうストレス試験

振とうストレスには、ローテーター (Biosan、Bio RS-24) を用いた。ヘッドスペース (気泡) がシリンジの端から端まで移動するよう回転速度は約 18 rpm とした。落下・振とう複合ストレス試験における回転回数と同等になるよう回転時間は 3 分間とした。振とうストレス試験後、落下・振とう複合ストレス試験と同様の方法で試料を回収した。

フローイメージング分析 (FI)

装置およびフローセルは第一章と同じものを使用した。試料は希釈せずそのまま測定した。試料から気泡を除くため、測定前に 30 分間減圧下で静置し脱気した。0.2 mL の試料溶液でパージした後、三回繰り返して測定を行った。三回の平均値を結果とした。測定容量は 0.15 mL、流速は 0.17 mL/min に設定した。1 μm 以上の粒子を全て計数した。ただし、粒子の全域が測定画面内に入っていない粒子 (Edge particles) はソフトウェア (MVSS version 2) を用いて除外した。異なる試料を分析する前に水および PBS で洗浄を行った。ポリソルベート 20 を含む試料を分析する際は PBS ではなく 0.05 %ポリソルベート 20 含有 PBS を用いて洗浄を行った。試料の分析はストレス試験後 3 時間以内に実施した。ストレス試験後少なくとも 3 時間は、シリコンオイル油滴の数に変化はみられなかった。画像パラメータによる解析が可能と考えられる 7 μm 以上の粒子については、真円度と画像輝度の標準偏差からシリコンオイル油滴とタンパク質凝集体粒子に分類を行った。シリコンオイル油滴は、円形で、円の中心は白く周辺部分は黒く見えるという特徴があることから、本研究では、真円度 0.8 以上、画像輝度の標準偏差 120 以上のものをシリコンオイル油滴粒子とすることとした。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

Waters Aquity™ UPLC システムに Protein BEH SEC column 4.6 × 300 mm (Waters)を接続し SEC を実施した。133 mM リン酸緩衝液、200 mM 塩化カリウム/アセトニトリル=9:1 を移動相としてアイソクラティック溶出を行った。流速は 0.3 mL/min に設定した。検出は UV により行い、検出波長は 220 nm とした。各試料 7.5 μL をそのままを注入した。注入は 2 回行い、単量体および凝集体の面積および面積%について算出し、2 回の平均値を結果とした。

共振式質量測定 (RMM)

RMM にはアルキメデスシステム (Malvern Instrument Ltd.) を用いた。センサーは Hi-Q Micro センサー (測定範囲: 250-1000 nm) を使用した。各試料はそのまま RMM 分析に供した。測定前に、センサーを超純水で 60 秒間洗浄し、次いで試料溶液を 60 秒間ロードした。その後、測定時間 300 秒で測定を実施した。測定は 3 回繰り返して行い、結果は 3 回の平均値とした。粒子濃度および平均粒子径は機器に付属のソフトウェアにより計算した。

シリンジ内壁に吸着したタンパク質の定量

ストレス試験後、試料溶液を回収し、シリンジを 1 mL の溶媒 (PBS または 0.05% ポリソルベート 20 含有 PBS で) で 3 回洗浄した。その後 1.2 mL の 1% ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) 水溶液を加えて密栓した。40kHz の超音波を 15 分間照射し、壁面に吸着した抗体を回収した。回収した溶液をさらに 1% SDS 水溶液で希釈して吸着抗体試料溶液とした。希釈倍率は、SO-シリンジの場合は 5 倍、SO+シリンジの場合は 10 倍とした。

吸着抗体試料溶液中のタンパク質含量は逆相クロマトグラフィーにより定量した。逆相クロマトグラフィーには Waters Aquity™ UPLC に Protein BEH C4 1mm × 100 mm (担体粒子径 1.7 μm) を接続したシステムを使用した。移動相 A には 0.1% トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA) 含有の水を、移動相 B には 0.1% TFA 含有のアセトニトリルを用いた。移動相 B の割合を 30 分間で 15% から 98% まで変化させるリニアグラジエントにより溶出した。カラム温度は 80°C に設定した。検出は

UV210 nm とした。得られたピーク面積値から抗体含量を算出し、さらにシリンジの表面積あたりの吸着量を計算した。分析は 3 回行い、3 回の平均値を結果とした。

示差走査熱量測定 (DSC)

構造安定性を評価するため、VP capillary DSC (Malvern) を用いて DSC 測定を行った。各抗体溶液を PBS で 0.5 mg/mL に希釈し DSC 用試料溶液とした。PBS をリファレンスとして 35°C から 95°C までスキャンを行った。昇温速度は 1°C/分とした。PBS を試料としてスキャンしたものをベースラインサーモグラムとした。試料のサーモグラムからベースラインサーモグラムを差し引き、その後、タンパク質濃度についてノーマライズを行った。熱容量が最も大きくなる温度を変性中点温度 (T_m) とした。

動的光散乱法による拡散係数の濃度依存性 (k_D) の評価

mAb-A についてはストック溶液を、mAb-B および mAb-C についてはストック溶液を PBS にバッファー交換した溶液を k_D の評価に使用した。各抗体溶液を PBS で 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 mg/mL に希釈し、0.22 μm のフィルターでろ過した。ろ液 20 μL を 384 well プレートにとり、脱気のため 300 \times g で 3 分間遠心した。Dynapro Plate Reader II (Wyatt Technology Corporation) を用いて各抗体希釈液の拡散係数を測定した。測定は 25°C で実施した。得られた拡散係数の値 (D_m) を用いて、 k_D を以下の式から算出した。ただし、 D_s は無限希釈時の拡散係数、 c は抗体濃度である。

$$D_m = D_s(1 + k_D c)$$

参考文献

1. Zhou C, Cleland D, Snell J, Qi W, Randolph TW, Carpenter JF. Formation of Stable Nanobubbles on Reconstituting Lyophilized Formulations Containing Trehalose. *J Pharm Sci.* 2016;105(7):2249-2253.
2. Mitragotri S, Burke PA, Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat Publ Gr.* 2014;13(9):655-672.
3. Uchiyama S. Importance and necessity of biophysical characterization of biotherapeutics for the development of therapeutic proteins with increased safety and value. *Pharmtech Japan.* 2017;33(5):921-933.
4. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015;7(1):9-14.
5. Golay J, Da Roit F, Bologna L, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood.* 2013;122(20):3482-3491.
6. Wang J, Bardelli M, Espinosa DA, et al. A Human Bi-specific Antibody against Zika Virus with High Therapeutic Potential. *Cell.* 2017;171(1):229-241.e15.
7. Xu L, Pegu A, Rao E, et al. Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques. *Science (80-).* 2017;8630(September):eaan8630.
8. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, et al. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci.* 2016;105(2):417-430.
9. Fathallah AM, Chiang M, Mishra A, et al. The Effect of Small Oligomeric Protein Aggregates on the Immunogenicity of Intravenous and Subcutaneous Administered Antibodies. *J Pharm Sci.* 2015;104(11):3691-3702.
10. Ahmadi M, Bryson CJ, Cloake EA, et al. Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm Res.* 2015;32(4):1383-1394.
11. Kotarek J, Stuart C, De Paoli SH, et al. Subvisible Particle Content,

- Formulation, and Dose of an Erythropoietin Peptide Mimetic Product Are Associated with Severe Adverse Postmarketing Events. *J Pharm Sci.* 2016;105(3):1023-1027.
12. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: immunogenicity assessment for therapeutic protein products. 2014. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm338856.pdf>. Accessed December 27, 2017
 13. Roda B, Zattoni A, Reschiglian P, et al. Analytica Chimica Acta Field-flow fractionation in bioanalysis : A review of recent trends. *Anal Chim Acta.* 2009;635:132-143.
 14. Groß PC, Zeppezauer M. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Infrared spectroscopy for biopharmaceutical protein analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53:29-36.
 15. Weinbuch D, Zölls S, Wiggenhorn M, et al. Micro-flow imaging and resonant mass measurement (archimedes) - complementary methods to quantitatively differentiate protein particles and silicone oil droplets. *J Pharm Sci.* 2013;102(7):2152-2165.
 16. Zölls S, Tantipolphan R, Wiggenhorn M, et al. Particles in therapeutic protein formulations, Part 1: Overview of analytical methods. *J Pharm Sci.* 2012;101(3):914-935.
 17. Velugula-Yellela S, Williams A, Trunfio N, et al. Impact of media and antifoam selection on monoclonal antibody production and quality using a high throughput micro-bioreactor system. *Biotechnol Prog.* 2017. (in press)
 18. Imamura H, Honda S. Kinetics of Antibody Aggregation at Neutral pH and Ambient Temperatures Triggered by Temporal Exposure to Acid. *J Phys Chem B.* 2016;120(36):9581-9589.
 19. Corvari V, Narhi LO, Spitznagel TM, et al. Subvisible (2-100 μm) particle

- analysis during biotherapeutic drug product development: Part 2, experience with the application of subvisible particle analysis. *Biologicals*. 2015;43(6):457-473.
20. Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WLJ. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;114:288-295.
 21. Baynes BM, Wang DIC, Trout BL. Role of Arginine in the Stabilization of Proteins against Aggregation . *Biochemistry*. 2005:4919-4925.
 22. Agarkhed M, O'Dell C, Hsieh M-C, Zhang J, Goldstein J, Srivastava A. Effect of Polysorbate 80 Concentration on Thermal and Photostability of a Monoclonal Antibody. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(1):1-9.
 23. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, Kishi N, Uchiyama S, Fukui K. Behavior of Monoclonal Antibodies: Relation between the Second Virial Coefficient (B₂) at Low Concentrations and Aggregation Propensity and Viscosity at High Concentrations. *Pharm Res*. 2012;29(2):397-410.
 24. Yageta S, Lauer TM, Trout BL, Honda S. Conformational and Colloidal Stabilities of Isolated Constant Domains of Human Immunoglobulin G and Their Impact on Antibody Aggregation under Acidic Conditions. *Mol Pharm*. 2015.
 25. Telikepalli SN, Kumru OS, Kalonia C, et al. Structural characterization of IgG1 mAb aggregates and particles generated under various stress conditions. *J Pharm Sci*. 2014;103(3):796-809.
 26. Joubert MK, Luo Q, Nashed-Samuel Y, Wypych J, Narhi LO. Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates. *J Biol Chem*. 2011;286(28):25118-25133.
 27. Ghosh R, Calero-Rubio C, Saluja A, Roberts CJ. Relating Protein-Protein Interactions and Aggregation Rates from Low to High Concentrations. *J Pharm Sci*. 2016;105(3).

28. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products—Q5C. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 1998.
29. Randolph TW, Schiltz E, Sederstrom D, et al. Do not drop: Mechanical shock in vials causes cavitation, protein aggregation, and particle formation. *J Pharm Sci*. 2015;104(2):602-611.
30. Kiese S, Pappenberger A, Friess W, Mahler H-C. Shaken, Not Stirred: Mechanical Stress Testing of An IgG1 Antibody. *J Pharm Sci*. 2010;99(10):4215-4227.
31. Shieh IC, Patel AR. Predicting the Agitation-Induced Aggregation of Monoclonal Antibodies Using Surface Tensiometry. *Mol Pharm*. 2015;12(9):3184-3193.
32. Fleischman ML, Chung J, Paul EP, Lewus RA. Shipping induced aggregation in therapeutic antibodies: Utilization of a scale down model to assess degradation in mAbs. *J Pharm Sci*. 2016;106(4):994-1000.
33. Nakajima K, Ogi H, Adachi K, et al. Nucleus factory on cavitation bubble for amyloid β fibril. *Sci Rep*. 2016;6(October 2015):22015.
34. Ghazvini S, Kalonia C, Volkin DB, Dhar P. Evaluating the Role of the Air-Solution Interface on the Mechanism of Subvisible Particle Formation Caused by Mechanical Agitation for an IgG1 mAb. *J Pharm Sci*. 2016;105(5):1643-1656.
35. Japanese Pharmacopeia <G6> Drug formulation: Tablet friability test. JP 17th edition. 2016. Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. p 2453.
36. United States Pharmacopeia <1216> Tablet friability. USP39-NF34. 2016. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. p 1609.
37. European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopeia <2.9.7.>Friability of uncoated tablets. Ph. Eur. 8th edition. 2014. European Pharmacopoeia Commission, France. p 298-299.

38. Telikepalli S, Kumru OS, Kim JH, et al. Characterization of the Physical Stability of a Lyophilized IgG1 mAb after Accelerated Shipping-Like Stress. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):495-507.
39. Uchiyama S. Liquid formulation for antibody drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1844(11):2041-2052.
40. Field JE, Camus JJ, Tinguely M, Obreschkow D, Farhat M. Cavitation in impacted drops and jets and the effect on erosion damage thresholds. *Wear.* 2012;290-291:154-160.
41. Okumura H, Itoh SG. Amyloid fibril disruption by ultrasonic cavitation: Nonequilibrium molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc.* 2014;136(30):10549-10552.
42. Gerhardt A, McGraw NR, Schwartz DK, Bee JS, Carpenter JF, Randolph TW. Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes. *J Pharm Sci.* 2014;103(6):1601-1612.
43. Sediq AS, Van Duijvenvoorde RB, Jiskoot W, Nejadnik MR. No Touching! Abrasion of Adsorbed Protein Is the Root Cause of Subvisible Particle Formation during Stirring. *J Pharm Sci.* 2016;105(2):519-529.
44. Baszkin a, Boissonnade M, Kamyshny a, Magdassi S. Native and Hydrophobically Modified Human Immunoglobulin G at the Air/Water Interface. *J Colloid Interface Sci.* 2001;239(1):1-9.
45. Krayukhina E, Tsumoto K, Uchiyama S, Fukui K. Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):527-535.
46. Lee HJ, McAuley A, Schilke KF, McGuire J. Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(13):1160-1171.
47. Mehta SB, Lewus R, Bee JS, Randolph TW, Carpenter JF. Gelation of a Monoclonal Antibody at the Silicone Oil-Water Interface and Subsequent Rupture of the Interfacial Gel Results in Aggregation and Particle Formation. *J*

- Pharm Sci.* 2015;104(4):1282-1290.
48. Funke S, Matilainen J, Nalenz H, Bechtold-Peters K, Mahler H-C, Friess W. Silicone Migration From Baked-on Silicone Layers. Particle Characterization in Placebo and Protein Solutions. *J Pharm Sci.* 2016;105(12):3520-3531.
 49. Teska BM, Brake JM, Tronto GS, Carpenter JF. Aggregation and Particle Formation of Therapeutic Proteins in Contact With a Novel Fluoropolymer Surface Versus Siliconized Surfaces: Effects of Agitation in Vials and in Prefilled Syringes. *J Pharm Sci.* 2016;105(7):2053-2065.
 50. United States Pharmacopeia <788> Particulate matter in injections. USP39-NF34. 2016. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. p 608-611
 51. Sharma DK, King D, Oma P, Merchant C. Micro-Flow Imaging : Flow Microscopy Applied to Sub-visible Particulate Analysis in Protein Formulations. *AAPS J.* 2010;12(3). doi:10.1208/s12248-010-9205-1.
 52. Strehl R, Rombach-riegraf V, Diez M, et al. Discrimination Between Silicone Oil Droplets and Protein Aggregates in Biopharmaceuticals : A Novel Multiparametric Image Filter for Sub-visible Particles in Microflow Imaging Analysis. *Pharm Res.* 2012:594-602.
 53. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, Tomitsuka T, Uchiyama S, Fukui K. Effects of ionic strength and sugars on the aggregation propensity of monoclonal antibodies: Influence of colloidal and conformational stabilities. *Pharm Res.* 2013;30(5):1263-1280.
 54. Perevozchikova T, Nanda H, Nesta DP, Roberts CJ. Protein adsorption, desorption, and aggregation mediated by solid-liquid interfaces. *J Pharm Sci.* 2015;104(6):1946-1959.
 55. Badkar A, Wolf A, Bohack L, Kolhe P. Development of biotechnology products in pre-filled syringes: technical considerations and approaches. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(2):564-572.
 56. Chisholm CF, Nguyen BH, Soucie KR, Torres RM, Carpenter JF, Randolph

- TW. In Vivo Analysis of the Potency of Silicone Oil Microdroplets as Immunological Adjuvants in Protein Formulations. *J Pharm Sci.* 2015;104(11):3681-3690.
57. Ludwig DB, Carpenter JF, Hamel J, Randolph TW. Protein adsorption and excipient effects on kinetic stability of silicone oil emulsions. *J Pharm Sci.* 2010;99(4):1721-1733.
58. United States Pharmacopeia <1217> Tablet breaking force. USP39-NF34. 2016. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. p 1610-1612.
59. 平成 24 年度報告書 陸上輸送による衝撃値（加速度）の測定、早稲田大学理工学術院総合研究所、一般社団法人日本海事検定協会 検査第一サービスセンター Available at: https://www.nkkk.or.jp/pdf/public_business_report3-03-24.pdf. Accessed December 27, 2017
60. Cordes AA, Carpenter JF, Randolph TW. Accelerated stability studies of abatacept formulations: Comparison of freeze-thawing- and agitation-induced stresses. *J Pharm Sci.* 2012;101(7):2307-2315.

主論文

1. **Torisu T**, Maruno T, Hamaji Y, Ohkubo T, Uchiyama S. Synergistic Effect of Cavitation and Agitation on Protein Aggregation. *J Pharm Sci.* 2017;106(2):521-529.
2. **Torisu T**, Maruno T, Yoneda S, Hamaji Y, Honda S, Ohkubo T, Uchiyama S. Friability Testing as a New Stress-Stability Assay for Biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2017;106(10):2966-2978.

参考論文

1. Ishii-Watabe A, Shibata H, Harazono A, Hyuga M, Kiyoshi M, Saitoh S, Iwura T, **Torisu T**, Goda Y, and Uchiyama S. Recent Topics of Research in the Characterization and Quality Control of Biopharmaceuticals in Japan. *J Pharm Sci.* 2017;106(12):3431-3437.