

Title	PEG化蛋白質の品質評価・保証に関する基礎研究
Author(s)	中島, 崇樹
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87992
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

## 2021年度(令和3年度) 博士論文

# PEG 化蛋白質の品質評価・保証 に関する基礎研究

大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻 毒性学分野

博士後期課程 中島 崇樹

目次

略語一覧	Ī		2
緒論			3
本論			
第一	一節	PEG の修飾数・大きさの異なる PEG-OVA の作製と評価	5
第二	二節	落下ストレスによる各種 PEG-OVA の物性変化の評価	9
第三	三節	落下ストレスによる各種 PEG-OVA の生体応答変化の評価	12
第四	四節	抗 PEG 抗体産生と排泄促進の機序に関する基礎的検討	16
総括			19
結論			22
謝辞			23
実験方法	ŧ		24
参考文献	ť		28

## 略語一覧

ABC	• • •	accelerated blood clearance				
BSA	• • •	Bovine serum albumin				
CO <sub>2</sub>	•••	Carbon dioxide				
D-MEM	•••	Dulbecco's modified Eagle's medium				
ELISA	• • •	Enzyme-linked immunosorbent assay				
FBS	• • •	Fetal bovine serum				
FITC	•••	Fluorescein isothiocyanate				
FPKM	• • •	Fragments per kilobase of exon per million reads mapped				
G-CSF	•••	Granulocyte colony stimulating factor				
HPLC	•••	High-performance liquid chromatography				
HRP	•••	Horseradish peroxidase				
IgM	•••	Immunoglobulin M				
kDa	•••	kilodalton				
NHS	•••	<i>N</i> -hydroxysuccinimide				
OVA	•••	Ovalbumin				
PBS	•••	Phosphate buffer saline				
PEG	•••	Polyethylene glycol				
PEG-OVA	•••	PEGylated OVA				
SCID	•••	Severe combined immunodeficiency				
SDS-PAGE	•••	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis				
SEC	•••	Size exclusion chromatography				
TNF	• • •	Tumor necrosis factor				

## 緒論

肝炎治療において、インターフェロン製剤の開発がブレイクスルーとなったように、 切れ味鋭い活性を有する蛋白質医薬が台頭したことで、肝炎以外にも、がんや自己免疫 疾患といった難治性疾患の治療効果が向上している<sup>1-4</sup>。開発の初期には、蛋白質医薬 の生体内安定性の乏しさが懸念されていたものの、ポリエチレングリコール (PEG) に よるバイオコンジュゲーションが契機となり、現在では、数多くの蛋白質医薬が臨床応 用されている<sup>5,6</sup>。

その一方で、蛋白質医薬自体は、バイオコンジュゲーションの有無にかかわらず、低 分子医薬と比較して、熱や落下といった物理化学的ストレスに不安定であることが知ら れている<sup>7</sup>。特に、アンプルやバイアルといった従来の容器に加えて、最近ではプレフ ィルドシリンジ製剤も汎用されている現在、これら製剤中の蛋白質医薬は、溶液状態で 輸送されるため、落下や振動といったストレスを受けやすく、蛋白質由来の凝集体や、 シリンジ内壁に塗布されているシリコンオイル由来の微粒子が容器中で形成される可 能性が報告されている<sup>8,9</sup>。さらに、シリコンオイルと抗体の複合体として形成された 微粒子は、炎症性サイトカインの産生の促進<sup>10</sup>や Fcy受容体の活性化<sup>11</sup>などの応答を引 き起こすことが報告されており、蛋白質の物理的特性の変化が生体応答の変化につなが る可能性があることを示している。そのうえで、PEG で修飾されたエリスロポエチン受 容体作動性ペプチド(ペギネサチド)製剤では、実際に、アナフィラキシーが発現し、 製品の回収に至っている。その後の解析から、バイアル中で多くの微粒子が検出され、 それらがアナフィラキシー誘発に関与した可能性も提示されている<sup>12</sup>。したがって、こ れまで以上に、蛋白質医薬中の微粒子の管理の重要性が高まっており、微粒子形成の要 因の一つとして、輸送時の品質管理が重要となっている。

しかしながら、PEG による蛋白質のバイオコンジュゲーションに関する研究はこれ まで、被修飾体の抗原性や免疫原性の低減など<sup>13</sup>、PEG の有用性追求を目的とした解 析がほとんどで、PEG の長さや修飾数などを変化させた際の血中半減期の変動などが 評価されてきたに過ぎない<sup>14,15</sup>。本観点から、蛋白質医薬の輸送時の品質担保を目指し、 PEG 化蛋白質医薬の活性が損なわれることなく、患者に有害反応も引き起こさないた めには、落下ストレス下における PEG 化蛋白質の物性や動態、生体応答に関する体系 的理解が求められている。特に、次頁の市販および臨床開発されている PEG 化蛋白質 医薬リスト (Table 1) に示されているように、現状、種々の生理活性蛋白質に対して、 様々な分子量および数の PEG が使用されているため、これら PEG 化の違いが与える影響も踏まえて評価する必要がある。

その点、当研究室はこれまでに、様々な蛋白質(TNF やインターフェロン、抗体など)の PEG 化の最適化に加え<sup>16,17</sup>、先端素材として活用されているナノ粒子の有用性・安全性確保を目指し、独自の"物性"-"動態"-"生体応答"の多角的な連関解析により、数多くの興味深い知見を収集してきた<sup>18-21</sup>。

そこで本研究では、OVA をモデルに、PEG の長さや修飾数の異なる PEG 化 OVA (PEG-OVA)を作製し、落下ストレスを与えた際の"物性"、"動態"、"生体応答"の変化 を追求することで、高品質な PEG 化蛋白質医薬の開発や、輸送法の提言に向けた情報 の収集を試みた。

その結果、PEG 化蛋白質の品質評価・保証に関して、薬学的観点から興味深い基礎的 知見を得たため、ここに博士論文として纏めた次第である。

Dreduct		Molecular Weight		Number		
Product	Protein	(kDa)		of PEG	Use (Indication)	Formulation
Name		Protein	PEG	attached		
Adagen®	Adenosine deaminase	40	5	11 - 17	SCID	Liquid (vial)
Oncaspar®	L-Asparaginase	35	5	69 - 82	Leukemia	Liquid (vial)
PegIntron <sup>®</sup>	Interferon-a-2b	19.2	12	1	Hepatitis C	Lyophilized powder (vial)
Pegasys <sup>®</sup>	Interferon-a-2a	19.2	40	1	Hepatitis C	Liquid (vial)
Neulasta®	G-CSF	18.8	20	1	Neutropenia	Liquid (pre-filled syringe)
Somavert®	Human growth hormone	22	5	5	Acromegaly	Lyophilized powder (vial)
Mircera®	Erythropoietin	30	30	1	Anemia	Liquid (pre-filled syringe)
Cimzia®	Anti-TNF a Fab'	51	40	1	Rheumatoid arthritis,	Liquid (pre-filled syringe)
					Crohn's disease	
Krystexxa®	Urate oxidase	34	10	9 - 10	Gout	Liquid (vial)
Omontys®	Erythropoiesis stimulating	4.9	40	1	Anemia in chronic	Liquid (vial)
	agent				kidney disease	
Plegridy®	Interform Q 12	24	20	1	relapsing forms of	Liquid (pre-filled syringe)
	Interferon-p-1a				Multiple Sclerosis	
Adynovate®	Coagulation factor VII	280	20	2 - 3	Hemophilia A	Lyophilized powder (vial)
Rebinyn®	Coagulation factor IX	56	40	1 - 2	Hemophilia B	Lyophilized powder (vial)
TBD	Arginine deiminase	75	20	5	Melanoma, Liver cancer	TBD
TBD		35	5	12	Hepatocellular	TBD
	numali di yilidse				carcinoma	

Table 1. PEGylated protein drugs on the market and in clinical development

## 第一節 PEGの修飾数・大きさの異なる PEG-OVA の作製と評価

緒論で述べたように、市販されている PEG 化蛋白質医薬には、様々な分子量および 数の PEG が使用されている。したがって、落下ストレス下における PEG 化蛋白質の物 性や動態、生体応答に関して、PEG 化の違いによる影響も含めて体系的に理解するため には、まず、PEG の分子量や数が異なる PEG 化蛋白質を作製する必要がある。

そこで本節では、5 kDa と 20 kDa の PEG をそれぞれ、異なる比率で OVA と反応 させ、PEG の修飾数・大きさの異なる PEG-OVA を作製した。また、適切に PEG 修飾 されていることを動態学的観点から検証するため、マウスに尾静脈内投与し、各 PEG-OVA の半減期を比較した。

### 【結果と考察】

修飾数の異なる PEG-OVA を作製するにあたって、OVA と PEG-NHS の反応条件を 決める必要があったため、その反応性に寄与するパラメーターを検証した。既存の報告 を参考にして<sup>22</sup>、OVA と 5 kDa の PEG-NHS を混合し、①反応温度、②反応時間、③ モル比の条件をふって反応させ、SDS-PAGE によって、その反応性を比較した。まず、 ①反応温度(25 ℃(Figure 1aのlane 2-4)と4 ℃(Figure 1aのlane 7-9)) を比較すると、両者に大きな違いは認められなかった。次に、②反応時間を比較すると、 25℃で、1 時間反応させた場合(**Figure 1b の lane 2 など**)も、4 時間反応させた場 合(Figure 1aの lane 8 など) も生成物のプロファイルに大きな違いは認められなか った。その一方で、③モル比(1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20)では、PEG の混合比が 高くなるにしたがって、OVA のバンドが高分子量にシフトし、モル比の影響がもっと も大きいことが示された(**Figure 1b**)。以上から、修飾数の異なる PEG-OVA の作製に あたって、修飾数の少ない PEG-OVA の作製には、OVA と PEG のモル比を1:10と し、修飾数の多い PEG-OVA の作製には、OVA と PEG のモル比を 1:20 と設定した。 条件が決まったため、5 kDa と 20 kDa の PEG-NHS を OVA にそれぞれ、モル比1: 10 と1: 20 で 25 ℃で1時間反応させ、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)で分 離・分取することで精製した。そこで各精製画分の純度や分子量を評価するため、SEC と SDS-PAGE で解析した。



#### Figure 1. Preparation of various kinds of PEG-OVAs.

(a) PEGylation reaction was conducted at a molar ratio of OVA:5 kDa PEG = 1:5 for 4 h at 25  $^{\circ}$  or 4  $^{\circ}$ . Each reaction mixture was prepared in triplicate. Lanes 1, 6: Marker; Lanes 2–4: reaction mixtures at 25  $^{\circ}$ ; Lane 5: OVA; Lane 7–9: reaction mixtures at 4  $^{\circ}$ C.

(b) PEGylation reaction was conducted at 25  $^{\circ}$ C for 1 h or 4 h, at various molar ratio of OVA:5 kDa PEG. Lanes 1, 7: Marker; Lanes 2–5: reaction mixtures at a molar ratio of OVA:5 kDa PEG = 1:2.5, 1:5, 1:10 and 1:20, respectively, for 1 h; Lane 6: OVA; Lanes 8–11: reaction mixtures at a molar ratio of OVA:5 kDa PEG = 1:2.5, 1:5, 1:10 and 1:20, respectively, for 4 h.

まず、SEC で分析したところ、いずれの画分もシングルピークで、OVA よりも保持 時間が短く、PEG が修飾された分だけ、大きな分子量になっていることが示唆された (**Figure 2a**)。次に、SDS-PAGE で分析した結果、5 kDa の PEG-NHS を 1 : 20 のモ ル比で反応させたピーク 2 は、5 kDa の PEG-NHS を 1 : 10 のモル比で反応させたピ ーク 1 より分子量が大きく、より多くの PEG が修飾されたことが示唆された。また、 20 kDa の PEG-NHS でも同様に、1 : 20 のモル比で反応させたピーク 4 は、5 kDa の PEG-NHS を 1 : 10 のモル比で反応させたピーク 3 より分子量が大きく、より多くの PEG が修飾されたことが示唆された(**Figure 2b**)。以上から、5 kDa と 20 kDa の PEG の修飾頻度がそれぞれ異なる PEG-OVA を作製することができ、以降、以下のように記 載する。

・5 kDaのPEGが、低頻度で修飾されたOVA(ピーク1)を5 kDa PEG-OVA (S)

・5 kDaの PEG が、高頻度で修飾された OVA (ピーク 2) を 5 kDa PEG-OVA (L)

・20 kDa の PEG が、低頻度で修飾された OVA (ピーク 3) を 20 kDa PEG-OVA (S)

・20 kDaの PEG が、高頻度で修飾された OVA (ピーク 4)を 20 kDa PEG-OVA (L)



## Figure 2. Preparation and evaluation of various kinds of PEG-OVA with different lengths and numbers of PEGs.

After the reactions of OVA and 5 kDa or 20 kDa PEG, the degree of purification and molecular weight were analyzed by (a) SEC and (b) SDS-PAGE. Peaks 1, 2, 3, and 4 in SEC correspond to lanes 1, 2, 3, and 4 in SDS-PAGE, respectively. Peaks 1 and 2 represent OVA modified with small and large numbers of 5 kDa PEG, which are referred to as 5 kDa PEG-OVA (S) and 5 kDa PEG-OVA (L), respectively. Peaks 3 and 4 represent OVA modified with small and large numbers of 20 kDa PEG, which are referred to as 20 kDa PEG-OVA (S) and 20 kDa PEG-OVA (L), respectively.

これまでの PEG 化研究から、PEG の分子量が大きく、修飾数が多い蛋白質の半減期 は、長いことが報告されている<sup>14,15</sup>。そこで、各 PEG-OVA の PEG が適切に修飾され ていることを動態学的観点からも評価するため、それぞれの PEG-OVA をマウスに尾静 脈内投与し、経時的に血中濃度を測定することで、各 PEG-OVA の残存量を解析した。 その結果、いずれの PEG-OVA も OVA より長い血中滞留性を示した(**Figure 3**)。特に、 同一分子量の PEG で比較すると、5 kDa PEG-OVA (L)と 20 kDa PEG-OVA (L)はそ れぞれ、5 kDa PEG-OVA (S)と 20 kDa PEG-OVA (S)よりも長い血中滞留性を示し、 修飾の頻度が高いほど半減期が長いことが示唆された。また、同程度の修飾頻度で比較 すると、20 kDa PEG-OVA (L)と 20 kDa PEG-OVA (S)はそれぞれ、5 kDa PEG-OVA (L)は 5 kDa PEG-OVA (L)と 20 kDa PEG-OVA (S)はそれぞれ、5 kDa PEG-OVA (L)は 5 kDa PEG-OVA (S)よりも長い血中滞留性を示し、分子量が大きいほど半減期 が長いことが示唆された。これらの結果は、既存の報告と一致しており、PEG の分子量 および修飾頻度が異なる PEG-OVA を適切に作製できていることが示唆された。なお、 本試験におけるドットブロット法では抗 OVA 抗体を使用したため、理論的には PEG-OVA だけでなく未修飾の OVA も検出される可能性が考えられる。一方で、**Figure 2a**  の SEC の結果より、それぞれの PEG-OVA 溶液で PEG-OVA はシングルピークとして 検出されており、OVA はほとんど観察されていない。したがって、**Figure 3** における 血中濃度は、PEG-OVA を測定したものであることが考えられる。





それぞれの PEG-OVA (S)および(L)における PEG の修飾数は、重要事項ながら、 Adagen<sup>®</sup>や Somavert<sup>®</sup>といったいくつかの市販の PEG 化蛋白質医薬品では、蛋白質に修 飾された PEG 分子の数は平均値や範囲として示されているものの、正確な数は決定されて おらず、異なる PEG 修飾頻度の PEG 化蛋白質を含む混合物として臨床応用されていること を踏まえ、本研究においても、まず PEG 修飾の頻度の異なる PEG 化蛋白質 (PEG-OVA) を作製し、PEG 修飾頻度の違いが物性変化や生体応答変化に与える影響を評価することと した。なお、本研究の PEG-OVA は、蛋白質の Lys 残基に結合するスクシンイミド基を 結合した PEG (PEG-NHS)を用いて作製した。OVA の X 線結晶構造解析データより、 OVA 分子中に存在する 20 箇所の Lys 残基のうち、少なくとも 8 つが OVA 分子表面に 存在する可能性があると考えられること、また詳細は検討が必要であるものの、**Figure 2b** の SDS-PAGE の結果から、OVA 分子に結合している PEG の数は、PEG-OVA (S) では 2~3 程度、PEG-OVA (L)では 8 前後と推定される。

## 第二節 落下ストレスによる各種 PEG-OVA の物性変化の評価

Plesner B.らなど、複数の研究グループは、蛋白質を PEG 化することで、その物理 的安定性を高め、蛋白質凝集が起きにくくなることを報告している<sup>23,24</sup>。その一方で、 最近になって、Torisu T.らは、抗体とシリンジ内壁に塗布されているシリコンオイル が、落下ストレスによって複合体化し、溶液中で微粒子が形成されることを報告してい る<sup>9</sup>。しかし、PEG 化された蛋白質がシリンジ内で落下ストレスを受けたときの影響は 明らかではないうえ、PEG の分子量や修飾頻度が異なる場合の比較などは皆無である。

そこで本節では、PEG の分子量や修飾頻度の異なる PEG-OVA が、シリンジ内で落 下ストレスを受けた時の物性変化を解析するため、微粒子形成をフローイメージング法 により評価した。

#### 【結果と考察】

医薬品の輸送時の品質担保を目的とした落下ストレス試験は、現状、明確なガイドラ インなどは定められていない。そこで著者は、日本・米国・欧州の薬局方に準じた錠剤 の摩損度試験機を利用して、バイアルまたはプレフィルドシリンジ製剤の落下ストレス 試験を実施した先行研究の条件(落下高さおよそ 16 cm から、毎分 50 回転で 1 分間

(落下回数として約 50 回) など)<sup>9</sup>を総合的に考慮し、実験台上の高さ 20 cm から、 各種 PEG-OVA 溶液を充填したシリンジを 20 回落下させて検証した。OVA と、5 kDa PEG-OVA (S)、5 kDa PEG-OVA (L)、20 kDa PEG-OVA (S)および 20 kDa PEG-OVA (L)にそれぞれ落下ストレスを負荷して、フローイメージング法により、溶液中の微粒 子数を定量した結果、いずれの PEG-OVA においても、OVA と比較して微粒子数が有 意に増加していた(**Figure 4**)。特に、20 kDa PEG-OVA (S)と 20 kDa PEG-OVA (L) は顕著で、OVA と比較して、約 3 倍の数の微粒子(直径 2-25  $\mu$ m)が観察された。そ の一方で、落下ストレスを負荷する前の試料ではいずれも、2  $\mu$ m 以上の微粒子数は 100 個/mL 以下と、落下ストレスを負荷した場合と比較して微粒子数は少なかった

(Figure 5)。以上から、OVA・PEG-OVA に落下ストレスを負荷することで、微粒子が形成し、PEGの分子量が大きくなるほど、微粒子数が多くなることが示唆された。





Four kinds of PEG-OVAs and OVA (control) were exposed to dropping stress, as described in the experimental section. Subvisible particles in PEG-OVA and OVA solutions were counted using flow imaging. Particles larger than 2  $\mu$ m were counted. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*\*\*\*, p<0.0001. n.d.: not detected.



Figure 5. Subvisible particle counts in unstressed PEG-OVA solutions.

Subvisible particles in four kinds of PEG-OVA solutions and OVA solution (control) were counted using flow imaging. Particles larger than 2  $\mu$ m were counted. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3).

また、微粒子の性状をより詳細に解析するため、20 kDa PEG-OVA (S)内の代表的 な微粒子像を Figure 6 に示した。落下ストレスを受けた 20 kDa PEG-OVA (S)で観 察された微粒子は、細長く伸びた形状から(Figure 6a 赤枠)、円形に近い形状まで

(Figure 6a 青枠)、様々であった。先行研究の報告を参照すると<sup>11</sup>、細長く歪な微 粒子は蛋白質由来で、円形の微粒子はシリコンオイル由来と考えられる。本節の冒頭で は、PEG 化によって蛋白質凝集が起きにくいことが報告されていることを記載したも のの<sup>23,24</sup>、蛋白質やシリコンオイル由来の微粒子が形成されていることを踏まえると、 落下ストレスにおいては、PEG 化蛋白質同士のみならず、PEG 化蛋白質とシリンジ内 壁に塗布された成分(シリコンオイルなど)との相互作用を考慮する必要が考えられる。



# Figure 6. Characteristic analyses of subvisible particles in PEG-OVA solution under dropping stress.

Representative images of the particles in a 20 kDa PEG-OVA (S) solution (**a**) under dropping stress, and (**b**) unstressed 20 kDa PEG-OVA (S) solution. The numbers below each image represent the diameters. Scale bar : 10  $\mu$ m

なお、医薬品としての PEG 化蛋白質溶液には、pH 調整剤 (緩衝剤) や等張化剤のほか、 安定剤などの添加物も含んでいる。本研究では、PBS で、pH を中性に調整して等張に しかしていないため、今後、安定剤などの添加物の影響も含めて評価する必要はあるも のの、本研究から、PEG 化蛋白質が輸送中の落下ストレスにより、シリンジ内に微粒子 を生じる可能性を提示した。

## 第三節 落下ストレスによる各種 PEG-OVA の生体応答変化の評価

蛋白質が凝集し、微粒子を形成すると、様々な生体応答を引き起こすことが知られている。例えば、ヒト免疫グロブリンを熱処理によって凝集化させ、凝集体を含まない免疫グロブリン製剤と混合してマウスに投与すると、抗ヒト免疫グロブリン抗体が産生されるまでの時間が用量依存的に短縮され、抗体価も上昇することが報告されている<sup>25</sup>。 また、PEG 化蛋白質の抗体産生に関わる生体応答としては、PEG 化蛋白質を複数回投与すると、初回投与後に誘導された抗 PEG 抗体によって、その排泄が促進されるAccelerated Blood Clearance (ABC)現象も報告されている<sup>26</sup>。したがって、PEG 化 蛋白質の凝集体は、抗 PEG 抗体の産生と排泄を亢進させる可能性が考えられるものの、落下ストレスで形成する微粒子の関与や、PEG の分子量や修飾頻度が異なる場合の比較などは明らかでない。

そこで本節では、落下ストレスを受けた PEG 化蛋白質が生体に投与されたときに引き起こされる生体応答変化を解析するため、微粒子形成が促進された 20 kDa PEG-OVA (S)および(L)に焦点を絞り、マウス体内における抗 PEG 抗体産生と、排泄の変化を評価した。

## 【結果と考察】

落下ストレスで形成する微粒子が、抗体産生に与える影響を評価するため、5 週齢の 雄性の BALB/c マウスに、以下の①~④の PEG-OVA をそれぞれ 500 μg/kg で尾静脈 内投与した。投与 1、4、7、10 および 21 日後に血液を採取し、血清中の抗 PEG IgM 抗体量を ELISA により定量した。

- ③ 落下ストレスを負荷した 20 kDa PEG-OVA (S)
   (Figure 7 で、20 kDa PEG-OVA (S) [+]と記載)
- ② 落下ストレスを負荷していない 20 kDa PEG-OVA (S)
   (Figure 7 で、20 kDa PEG-OVA (S) [-]と記載)
- ③ 落下ストレスを負荷した 20 kDa PEG-OVA (L)
   (Figure 7 で、20 kDa PEG-OVA (L) [+]と記載)
- ④ 落下ストレスを負荷していない 20 kDa PEG-OVA (L)
   (Figure 7 で、20 kDa PEG-OVA (L) [-]と記載)





Anti-PEG IgM production profile in mouse sera after administration of PEG-OVA with or without dropping stress. Each PEG-OVA was intravenously administered to mice at 500  $\mu$ g/kg. Sera were collected 1, 4, 7, 10, and 21 days after administration. Anti-PEG IgM concentration was determined by ELISA. Data are expressed as the mean  $\pm$  SE (n=3).

まず、①と②の 20 kDa PEG-OVA (S)について、落下ストレスを負荷していない群では、抗 PEG IgM 抗体量がほとんど増加しなかったのに対し、落下ストレスを負荷した群では、投与 7 日後に抗 PEG IgM 抗体量が増加した(Figure 7)。次に、③と④の 20 kDa PEG-OVA (L)についても同様で、落下ストレスを負荷することで、落下ストレスを負荷していない群と比較して、抗 PEG IgM 抗体量が増加した(Figure 7)。したがって、落下ストレスを負荷した 20 kDa PEG-OVA を投与することで、蛋白質の凝集体を含む PEG-OVA 溶液中の微粒子により抗 PEG IgM 抗体の産生が促進されることが示唆された。

落下ストレスを受けることで形成した微粒子が、実際に、抗体産生を誘導していたことから、次に、20 kDa PEG-OVA (S)および (L)の ABC 現象に与える影響の解析を試みた。以下の①~④のように、マウスに 20 kDa PEG-OVA (S)および(L)を反復投与し、初回投与時に誘導される抗 PEG IgM 抗体量の違いが、2 回目投与時の排泄に与える影響を血清中 PEG-OVA の残存量から評価した。

① 1回目:落下なし 20 kDa PEG-OVA (S) → 2回目:落下なし 20 kDa PEG-OVA (S)
② 1回目:落下あり 20 kDa PEG-OVA (S) → 2回目:落下なし 20 kDa PEG-OVA (S)
③ 1回目:落下なし 20 kDa PEG-OVA (L) → 2回目:落下なし 20 kDa PEG-OVA (L)
④ 1回目:落下あり 20 kDa PEG-OVA (L) → 2回目:落下なし 20 kDa PEG-OVA (L)

なお、落下ストレスを負荷していない 20 kDa PEG-OVA (S)および(L)を1回だけ投与した単回投与群を対照とした。

まず、①と②の 20 kDa PEG-OVA (S)について、1 回目に落下ストレスを負荷して いない 20 kDa PEG-OVA (S)を投与した群では、2 回目投与後の血清中 20 kDa PEG-OVA (S)濃度は、単回投与群と比較して変化は認められなかった。その一方で、1 回目 に落下ストレスを負荷した 20 kDa PEG-OVA (S)を投与した群では、2 回目投与後の 血清中 20 kDa PEG-OVA (S)濃度は、単回投与群と比較して有意に低下した(**Figure 8**)。次に、③と④の 20 kDa PEG-OVA (L)については、1 回目に落下ストレスを負荷 した 20 kDa PEG-OVA (L)の投与群のみならず、1 回目に落下ストレスを負荷 した 20 kDa PEG-OVA (L)の投与群においても、2 回目投与後の血清中 20 kDa PEG-OVA (L)濃度は、本実験系では検出できないほど低下した(**Figure 8**)。1 回目に落下ス





The ratio of residual PEG-OVA in mice sera after administration of each PEG-OVA. Each PEG-OVA with/without dropping stress was intravenously administered to mice at 500  $\mu$ g/kg. The PEG-OVA without dropping stress was administered after 7 days of the first dose. As a control, mice were administered the PEG-OVA without dropping stress one time (single administration). Residual PEG-OVA concentrations in mice at 3 minutes and 2 hours after administration were determined by dot-blot analysis. % dose was expressed with respect to the PEG-OVA concentrations at 3 minutes after administration. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. Data are expressed as the mean  $\pm$  SE (n=3-4). \*\*, p<0.01. n.d.: not detected.

トレスを負荷していない 20 kDa PEG-OVA (S)と 20 kDa PEG-OVA (L)の投与群で違 いが認められた点については、**Figure 7** において、落下ストレスを負荷していない 20 kDa PEG-OVA (S)投与群では抗 PEG IgM 抗体がほとんど誘導されなかったのに対し、 落下ストレスを負荷していない 20 kDa PEG-OVA (L)投与群では抗 PEG IgM 抗体の 産生が誘導されていることから、落下ストレスを負荷していなくても、20 kDa PEG-OVA (L)投与群では ABC 現象が誘導されてしまったためと考えられる。今後、落下ス トレスを負荷していない 20 kDa PEG-OVA (L)投与群において、ABC 現象が認められ ない程度の投与量を設定するなど、詳細な検証は必要なものの、落下ストレスによって 微粒子が形成し、誘導された抗 PEG IgM 抗体量依存的に ABC 現象が誘導された可能 性が考えられる。

## 第四節 抗 PEG 抗体産生と排泄促進の機序に関する基礎的検討

PEG 修飾リポソームによる ABC 現象の誘導には、肝臓のマクロファージによる取り 込みが寄与していることが報告されている<sup>27</sup>。したがって、前節で示した抗 PEG 抗体 産生と排泄の促進にも、マクロファージによる取り込みが寄与している可能性が考えら れる。

そこで本節では、機序を明らかにする一環として、マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7)を用いて、落下ストレスを負荷した 20 kDa PEG-OVA (L)の細胞内取 り込み量をフローサイトメトリーで比較評価した。

#### 【結果と考察】

RAW264.7 細胞内への 20 kDa PEG-OVA (L)の取り込みを定量的に解析するにあた って、先行研究を参考にしつつ<sup>28</sup>、緑色蛍光色素: FITC で標識した 20 kDa PEG-OVA (L)を作製した。FITC 標識-20 kDa PEG-OVA (L)に落下ストレス負荷後、RAW264.7 細胞に添加し、6 時間後にフローサイトメトリーで取り込み量を解析した。 なお、 本評 価にあたって、ポジティブコントロールとして、強熱処理した FITC 標識-20 kDa PEG-OVA (L)の添加群を設定した。また、感度よく取り込み量を解析するため、落下ストレ スに加え、攪拌ストレス(先行研究において、抗体とシリコンオイルによる微粒子形成 を加速度的に促進させるモデルとして報告<sup>11</sup>)を負荷した FITC 標識-20 kDa PEG-OVA (L)の添加群も設定した。その結果、まず、ポジティブコントロールでは、未処理 群やストレスを負荷していないコントロール群と比較して、平均蛍光強度が有意に上昇 し、評価可能な系であることが示された。本条件下で、落下ストレスを負荷した FITC 標識-20 kDa PEG-OVA (L)の添加群を観察すると、ストレスを負荷していないコント ロール群と比較して、取り込み量が増加する傾向は認められたものの、有意な差ではな かった。一方で、微粒子形成促進モデルである攪拌ストレスを負荷した FITC 標識-20 kDa PEG-OVA (L)の添加群では、ストレスを負荷していないコントロール群と比較し て、取り込み量が有意に増加した(Figure 9)。このように、攪拌ストレスを負荷した群 で細胞内取り込みの有意な増加が認められたものの、落下ストレスを負荷した群では細 胞内取り込みの有意な増加は認めず、いずれの群も物性変化や生体応答変化ほどの違い は観察されなかった。したがって、今後、さらなる機序解析が必要なものの、各種 PEG-OVA は凝集・微粒子形成することでマクロファージに取り込まれやすくなり、一部分 的に、抗体産生などに寄与した可能性も考えられる。また、本研究の成果を起点として、

今後、20 kDa PEG-OVA (S)、さらには 5 kDa PEG-OVA (S)および (L)についても落 下ストレスとマクロファージ細胞株への取り込みとの相関の解明が期待される。



# Figure 9. Uptake analysis of PEG-OVAs exposed to dropping stress into mouse macrophage RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were subjected to FITC-labelled 20 kDa PEG-OVA (L) exposed to various kinds of stresses at a concentration of 0.1 mg/mL, incubated for 6 h, and analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity of FITC-labeled PEG-OVA taken up into RAW264.7 cells was obtained, and statistical analyses were performed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001.

各種 PEG-OVA がマクロファージに取り込まれた後、抗体産生を促進するまでの機序 としては、先行研究を組み合わせて考えると、以下が仮説の1つとして設定できる。即 ち、1)マクロファージは異物である PEG-OVA の凝集体を取り込むことで活性化し、 2)活性化したマクロファージは、T細胞を誘引するケモカインなどのサイトカインを 分泌し、T細胞に対して、抗原提示する<sup>29</sup>。3)T細胞は、提示された抗原をもとに、B 細胞受容体を介して B細胞と相互作用・活性化させることで、抗体産生につながる<sup>30</sup>。 この仮説に対して、プレリミナリーデータ(n=1)ではあるものの、20 kDa PEG-OVA (L)を RAW264.7 に添加し、落下ストレスの有無で比較した RNA-seq 解析を試みた。 取り込み量自体が低いため、詳細は言及できないものの、マクロファージの活性化マー カーである Cd80<sup>31</sup>や、マクロファージから分泌されて T 細胞などを遊走させるケモカ インである Ccl5<sup>32,33</sup> といった遺伝子の mRNA の発現が、落下ストレスを負荷すること により微増(Cd80、Ccl5 ともに約 1.2 倍)していることを確認している。今後、繰り 返し実験により再現性を確認する必要があるものの、本知見が起点となり、分子機序の 解明が期待される。

## 総括

本研究では、PEG 化蛋白質医薬が既にプレフィルドシリンジ製剤として輸送されて いることに着目し、PEG の分子量や修飾頻度が異なる PEG-OVA に落下ストレスを負 荷するモデルで、その品質評価・保証に関する基礎研究を実施した。本研究で用いたス トレス条件は、医薬品が輸送中などに偶発的に曝されるおそれのある外的刺激を模した、 苛酷試験に該当するものであると考えられる。こうした苛酷試験の実施意義は、ICH Q5C ガイドラインによると、①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、②どのよう な特異的試験パラメーターが製品の安定性指標として最適かを評価することなどであ る。したがって、本研究では落下ストレスを PEG 化蛋白質に負荷することによって、 PEG 化蛋白質の品質への影響を評価するとともに、管理戦略として必要な安定性指標 となる試験パラメーターを設定するための基盤となる知見を得ることを試みた。

本研究は OVA を用いたモデルでの検証であったものの、これらの知見が基盤となっ て、実用化されている蛋白質を含めて、様々な蛋白質に適用されることで、その汎用性 が期待される。特に、実用化されている蛋白質の中でも、PEG-Asparaginase<sup>34</sup>や、PEG-Uricase<sup>35,36</sup>などは、臨床試験において初回投与後に誘導された抗 PEG 抗体量と血中の 薬物活性の低下が密接に相関しており、反復投与時に治療効果が低減するといったこと が懸念されている。 特に PEG-Uricase については抗 PEG 抗体の発生率が高く、 臨床試 験では 2 週間ごとの投与を受けた患者の約 40%に抗 PEG 抗体が検出されたことが報 告されている<sup>37</sup>。抗 PEG 抗体を保有する患者では治療効果が消失するとともにインフ ュージョンリアクションの発生率が高いことも報告されており、インフュージョンリア クションのリスクを低減するために、使用上の注意として「抗ヒスタミン剤、副腎皮質 ホルモン剤などを事前投与し、KRYSTEXXAの投与終了後適切な時間、アナフィラキシ ーを含む重篤な過敏性反応を示唆する副作用の発現を注意深く観察すること」という安 全対策がとられている。上述の PEG-Asparaginase や PEG-Uricase はいずれもバイア ル製剤(液剤)であることから、本研究と同様に、PEG化によって微粒子が形成し、抗 PEG 抗体が産生されて排泄が促進していることも考えられる。さらに、PEG は、蛋白 質修飾のみならず、リポソームなどの修飾や、医薬品添加物としても利用されている。 とりわけ、PEG 修飾エマルションを用いた研究では、より分子量の大きい PEG で修飾 したエマルションが、分子量の小さい PEG で修飾したエマルションよりも強く ABC 現 象を誘導したことが報告されている<sup>38</sup>。また、PEG 修飾リポソームを用いた研究では、

表面の PEG 修飾密度の高いリポソームのほうが、PEG 修飾密度の低いリポソームより 強く ABC 現象を誘導し、このような PEG 修飾リポソームは IgM 抗体による中和作用 を受けやすいことが示されている<sup>39</sup>。さらに、近年 PEG 修飾脂質をキャリアとした mRNA ワクチンが開発され、2021 年現在、日本国内では 2 製品が新型コロナウィル ス感染症に対して実用化されている。これらのワクチンの接種時の副反応として報告さ れているアナフィラキシーの一部は、抗 PEG IgE 抗体を介した即時型のアレルギー反 応であると考えられており<sup>40</sup>、これは抗 PEG IgM 抗体を介した ABC 現象とは異なる 機序の現象ではあるものの、ABC 現象と同様に、一因として化粧品などの日用品に含 まれる PEG に曝露されることおよびその量や頻度が発現に寄与していると推察されて いる<sup>41</sup>。したがって、PEG の分子量や修飾頻度・含有量と抗 PEG 抗体の産生や、その 後の生体応答との関連が明らかになれば、ヒトの健康確保に重要な知見になることが期 待される。

また、諸論でも前述したとおり、注射剤の容器として、アンプルやバイアルといった 従来の容器に加えて、プレフィルドシリンジが広く利用されるようになっている<sup>42</sup>。プ レフィルドシリンジ製剤の主な利点は、無菌性の維持により感染リスクを低減できるこ と、薬剤の調製が簡便化されるため正確な量の薬剤を迅速に投与できることなどがある <sup>42</sup>。しかしながら、先行研究や本研究成果も踏まえて考えると、プレフィルドシリンジ 製剤は、落下ストレスによる PEG 化蛋白質同士の凝集の他にも、シリンジ内壁に潤滑 剤として塗布されたシリコンオイルと相互作用し、凝集体を形成する可能性も考えられ る<sup>9,11</sup>。したがって、高品質なプレフィルドシリンジ製剤の開発には、今後、シリンジ 内壁に塗布する材質の種類や蛋白質との相互作用を考慮することが、医薬品の品質管 理・保証の観点から重要と言える。もしくは、上記の研究成果を積み重ねつつ、今一度、 凍結乾燥製剤の利用を考えることもできよう。その場合、薬剤の調製・取り扱いにおい て、医薬品の専門家としての薬剤師の役割がより重要になることが想定される。したが って、本研究を含めて、医薬品の品質評価・保証研究は、薬学が主体となって推進して いくことが求められる。

最後に、PEG 化蛋白質医薬に限らず、医薬品の品質管理・保証といった観点では、 ①製薬企業による医薬品製造や、②病院・薬局などでの保管については、医薬品の承認 審査や添付文書などにもとづいて担保されている。本研究が着目した「医薬品の輸送中 の品質管理・保証」については、温度管理を主眼とした医薬品の適正流通(GDP)ガイ ドライン<sup>43</sup>があるほか、ICH Q5C ガイドラインにおいて、苛酷試験として輸送中の条 件が製品に及ぼす影響を評価することが提案されている<sup>44</sup>。しかし、具体的にどのよう な試験パラメーターを安定性指標とするかは明示されていない。この点、本研究により 落下ストレスによる凝集体などの微粒子形成が PEG 化蛋白質医薬の品質に影響を与え ることが明らかになったことから、今後、PEG 化蛋白質医薬を含む蛋白質医薬の輸送中 の条件を模した苛酷試験においては、微粒子数の評価の重要性が高まることが考えられ る。したがって、本研究が起点となって、将来的に「医薬品の輸送中の品質管理・保証」 が、規制やガイドラインなどによって担保され、製造から患者に投与されるまでの過程 がシームレスに品質管理・保証されることで、医薬品の安全性もより高まることが期待 される。

## 結論

本研究では、PEG 化蛋白質の輸送中の品質管理・保証を目指し、医薬品の輸送時に 負荷される落下ストレスが、PEG の分子量や修飾頻度が異なる PEG-OVA に与える影響について、物性変化(微粒子形成)と動態・生体応答変化(抗 PEG 抗体の産生と排 泄)の観点から解析した。その結果、以下の薬学的に貴重な知見を得た。

- 1. OVA・PEG-OVA に落下ストレスを負荷することで、微粒子が形成され、PEG の分 子量が大きくなるほど、その微粒子数は多くなることが示唆された。
- 2. 微粒子が多く形成された 20 kDa PEG-OVA (S)と(L)では、落下ストレスによって、 修飾頻度が高いほど抗 PEG 抗体が産生され、20 kDa PEG-OVA の排泄が促進され た。
- 3. 抗 PEG 抗体の産生や 20 kDa PEG-OVA の排泄の促進には、落下ストレスによっ て形成された微粒子をマクロファージが取り込みやすかったことが一因である可 能性を示した。

以上の成果は、PEG 化蛋白質の開発や輸送における品質評価・保証に関する基礎的 知見ではあるものの、本研究が基盤となることで、将来的には、PEG 化蛋白質の適切な PEG 修飾の理解や、PEG 化蛋白質医薬品の輸送条件の設定など、適切な品質管理・保 証につながることが期待される。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野教授の堤 康央先生に は、懇切なる御指導、御鞭撻を賜ると共に、終始温かい御配慮を賜りました。ここに衷 心より深甚なる感謝の意を表します。

本研究の全般にわたり、終始熱心な御指導、御助言ならびに叱咤激励を頂戴しました、 和歌山県立医科大学薬学部病態解析学研究室教授の長野一也先生に謹んで感謝申し上 げます。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御指導と御助言を賜るとともに、実験において多 大な御助力をいただきました、徳島大学大学院医歯薬学研究部薬物動態制御学分野教授 の石田竜弘先生、同准教授の異島優先生、大学院生の福田悠花さん、国立医薬品食品衛 生研究所生物薬品部部長の石井明子先生、同第2室長の柴田寛子先生に心より御礼を 申し上げます。

また、本稿への貴重な御指導、御助言を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授 の近藤昌夫先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、温かい御指導と種々貴重な御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研 究科准教授の東阪和馬先生、同准教授の辻野博文先生、同助教の芳賀優弥先生に心より 御礼申し上げます。

さらに、本研究を進めるにあたり、多大な御協力を頂きました、井阪 亮さん、張 天 斉さんを始めとする大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の大学院生・学生の皆さまに 謹んで感謝申し上げます。

最後に、長い間、温かく支え励ましてくれた妻と子どもたちに、心から感謝いたしま す。

## 実験方法

### PEG-OVA の作製

PEG 修飾反応に使用する OVA は Sigma-Aldrich(MO, USA)より購入した。また、 分子量 5 kDa および 20 kDa の PEG の N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)誘導体試 薬は油化産業(Tokyo, Japan)より購入した。FITC 標識した 20 kDa PEG-OVA (L)の作 成に使用した FITC-I は同仁化学研究所(Kumamoto, Japan)より購入した。

OVA と各 PEG のモル比を 1:10 または 1:20 とし、50 mmol/L のホウ酸塩緩衝 液(pH8.5)中で、25 ℃で 1 時間反応させた。反応後、0.2 mol/L グリシン水溶液を加 えて反応を停止させた。

FITC 標識した 20 kDa PEG-OVA (L)は次のとおり作製した。OVA と FITC-I をモル 比1:20で25 ℃で1時間反応させた。次に、この反応液中の OVA と 20 kDa PEG をモル比が1:20 となるように混合し、25 ℃で1時間反応させた。反応後、0.2 mol/L グリシン水溶液を加えて反応を停止させた。

反応停止後の液は PD-10 カラム(GE healthcare Japan, Tokyo, Japan)により脱塩 した後、PBS に置換した。

### サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

PEG-OVAの反応溶液はSECにより分離し目的とする PEG-OVA を単離した。

内径 7.8 mm、長さ 30 cm、充填剤の粒子径 5 μm の SEC 用カラム(Biosep s-3000) は Phenomenex(Torrance, CA, USA)より購入した。HPLC(Waters Alliance e2695) に上記カラムを接続し、リン酸塩緩衝液(100 mmol/L 塩化ナトリウムおよび 100 mmol/L リン酸水素二ナトリウムを含み、リン酸を用いて pH 7.0 に調整した液)を移 動相とし、毎分 0.8 mLの流量で分析を行った。PEG-OVAの検出は、紫外可視吸光光 度計により波長 280 nm に設定して行った。

#### SDS-PAGE

SEC により単離した PEG-OVA の溶液に、等量の液量の 10%の 2-メルカプトエタ ノールを含む Laemmli sample buffer (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)を加えて混合し、95 ℃で 5 分間ボイルし、ポリアクリルアミド電気泳動用の 5 - 12%プレキャストゲル(FUJIFILM Wako Pure Chemical)に添加した。ゲルに対し て 200 V の定電圧で約 1.5 時間泳動し、Coomassie Brilliant Blue R-250 を含む染色 液(Quick CBB; FUJIFILM Wako Pure Chemical) で染色した。なお、蛋白質分子量 マーカーとして、WIDE-VIEW<sup>™</sup> Prestained Protein Size Marker Ⅲ(FUJIFILM Wako Pure Chemical)を用いた。

#### 実験動物

5 週齢の雄性のマウス(BALB/c)は日本エスエルシー(Shizuoka, Japan)より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は徳島大学大学院医歯薬学研究部の実験動物施設において行い、徳島大学動物実験規定に準じた。未処理群では、投与前に0.2 µm フィルターによりろ過済みの PEG-OVA サンプルを使用した。落下ストレス群では、落下ストレスを負荷した PEG-OVA サンプルを使用し、500 µg/kg をマウスに尾静脈内投与した。

投与後、規定時間経過後にマウス尾静脈に 27G×3/4 (Terumo, Tokyo, Japan)の注 射針を使用して傷をつけ、出血した血液を 20 µL ピペットマンで採取し、エッペンチ ューブに分注した。室温条件下で 1 時間静置後、遠心分離 (1000 g、15 min、4 ℃) し、得られた血清を PBS で 40 倍希釈 (ドットブロットの場合) またはブロッキング溶 液で 2000 倍希釈 (ELISA の場合) した。

#### 血清中の PEG-OVA 量の測定(ドットブロット法)

希釈済み血清サンプルをニトロセルロース膜(GE Healthcare Bio Science, NJ, USA)に2µLずつ滴下し、室温条件下で十分に乾燥させた後、3% skim milk in 0.05% Tween20-PBS を添加し、室温で1 時間反応してブロッキングを行った。0.05% Tween20-PBS を用いて5分間洗浄する操作を3回行った後、抗OVAポリクローナル IgG 抗体(Thermo Scientific, Tokyo, Japan)を1% BSA in PBS を用いて2000 倍希 釈し、これを添加して4℃条件下で一晩浸透した。0.05% Tween20-PBS を用いて5 分間洗浄する操作を3回行った後、HRP 結合抗マウス IgM 抗体(Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)を1% BSA in PBS を用いて10000 倍希釈し、これを添加 して室温条件下で1時間浸透した。0.05% Tween20-PBS を用いて5 分間た浄する操作を3回行った後、ECL Prime (GE Healthcare Bio Science)を添加し、暗所で5分 間反応させ、Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) によりドットを検出し、ImageJ ソフトウェアを用いて定量した。

### ストレス試験

1. 落下ストレス

OVA または PEG-OVA 溶液を 1 mL のシリンジに入れ、実験台上で高さ 20 cm から 20 回落下させた。その後 1 時間室温で静置した。

2. 熱ストレス

PEG-OVA 溶液を 2 mL の遠心チューブに入れ、95 ℃で 15 分間加熱し、室温に戻るまで静置した。

 3. 攪拌ストレス
 PEG-OVA 溶液を 2 mL の遠心チューブに入れ、室温下で 800 rpm で 15 分間攪 拌した。

## フローイメージング法

フローイメージングには FlowCam 8100 (Fluid Imaging Technologies, Inc., Scarborough, ME, USA)を使用した。流速、サンプル量、オートイメージレート、サ ンプリング効率およびセグメンテーションの閾値はそれぞれ、0.1 mL/min, 0.2 mL, 16 frames/s,約 70%および 10/10 に設定した。フローセル内に粒子が存在しないこ とを保証するため、装置は蒸留水および必要ならば 1% Tergazyme (Alconox Inc., White Plains, NY, USA) で流速 5 mL/min で洗浄した。

装置パラメーターの設定後、それぞれの装置の適格性を評価するため、700~1000 µLの蒸留水を送液し、液体1 mL 中に直径2 µm を超える粒子が100 個未満であり、 直径10 µm を超える粒子が存在しないことを確認した。1 回の分析につき350 µLの サンプルを装置に注入し、繰り返し3回測定した。落下ストレス試験では、サンプルは 気泡を除去するため、測定前に2時間常圧下で静置した。直径2~100 µm の範囲の粒 子を計数し、粒子数を得た。

#### 血清中の抗 PEG IgM 量の測定(ELISA 法)

ELISA 用 96 ウェルプレート (Costar<sup>®</sup>, Corning, NY, USA) に mPEG2000-DSPE (油化産業)の 99.5%エタノール溶液 (0.57 mg/mL) を 50 µL 加えて室温で 8 時間以 上静置し、PEG を固相化した <sup>45</sup>。溶液を取り除いた後、ブロッキング溶液を加えて 25 ℃ で 1 時間インキュベートした。次に洗浄液で 3 回洗浄した後、ブロッキング溶液で 200 倍に希釈した血清サンプルを添加し、HRP 結合抗マウス IgM 抗体(100 ng/mL)を加え て室温で 1 時間インキュベートした。洗浄液で 5 回洗浄した後、酵素基質を加えて 10 ~15 分インキュベートした。2 mol/L 硫酸溶液を加えて酵素反応を停止させ、マイク ロプレートリーダーを用いて波長 492 nm の吸光度を測定した。

## 培養細胞

マウスマクロファージ細胞株(RAW264.7 細胞)は、American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA)より購入した。RAW264.7 細胞の維持培養には、 10% FBS (Biosera, Nuaille, France)、1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension (FUJIFILM Wako Pure Chemical)を含む D-MEM を用い、37 ℃、飽和 蒸気圧、5% CO2条件下で培養した。

## フローサイトメトリー

RAW264.7 細胞を 24 ウェルプレートに 1.0×10<sup>5</sup> cells/well となるように播種し、 FITC 標識-20 kDa PEG-OVA (L)を 0.1 mg/mL の濃度で培地に添加した。6 時間後に 培地を除去し、PBS で 3 回洗浄した後、トリプシン処理により細胞を回収し、FACS buffer (2% FBS + 0.05%アジ化ナトリウムを含む PBS)に懸濁し、MACSQuant<sup>®</sup> X Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて測定した。

## 統計解析

試験結果は、別に規定する場合を除き平均±標準偏差で表した。統計解析は、GraphPad Prism Mac version 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA; www.graphpad.com) を用いて、t 検定もしくは一元配置分散分析および Tukey または Dunnett の多重比較 検定により行った。有意水準は\*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; \*\*\*\*, p < 0.0001 とした。

## 参考文献

- Modjtahedi H, Ali S, Essapen S. Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges. Br Med Bull. 2012;104:41-59.
- Udalova I, Monaco C, Nanchahal J, Feldmann M. Anti-TNF Therapy. Microbiol Spectr. 2016;4(4).
- 3. Yasunaga M. Antibody therapeutics and immunoregulation in cancer and autoimmune disease. Semin Cancer Biol. 2020;64:1-12.
- Vezali E, Aghemo A, Colombo M. Interferon in the treatment of chronic hepatitis C: a drug caught between past and future. Expert Opin Biol Ther. 2011;11(3):301-313.
- 5. Jevsevar S, Kunstelj M and Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins. Biotechnol J. 2010;5:113-128.
- 6. Dozier JK, Distefano MD. Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. Int J Mol Sci. 2015;16:25831-25864.
- Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. J Pharm Sci. 2020;109(1):169-190.
- Torisu T, Maruno T, Hamaji Y, Ohkubo T, Uchiyama S. Synergistic Effect of Cavitation and Agitation on Protein Aggregation. J Pharm Sci. 2017;106:521-529.
- 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;106:2966-2978.
- Krayukhina E, Yokoyama M, Hayashihara KK, Maruno T, Noda M, Watanabe H, Uchihashi T, Uchiyama S. An Assessment of the Ability of Submicron- and Micron-Size Silicone Oil Droplets in Dropped Prefillable Syringes to Invoke Early- and Late-Stage Immune Responses. J Pharm Sci. 2019;108(7):2278-2287.

- Kiyoshi M, Tada M, Shibata H, Aoyama M, Ishii-Watabe A. Characterization of Aggregated Antibody-Silicone Oil Complexes: From Perspectives of Morphology, 3D Image, and Fcγ Receptor Activation. J Pharm Sci. 2021;110:1189-1196.
- 12. Kotarek J, Stuart C, De Paoli SH, Simak J, Lin TL, Gao Y, Ovanesov M, Liang Y, Scott D, Brown J, Bai Y, Metcalfe DD, Marszal E, Ragheb JA. Subvisible Particle Content, Formulation, and Dose of an Erythropoietin Peptide Mimetic Product Are Associated With Severe Adverse Postmarketing Events. J Pharm Sci. 2016;105:1023-1027.
- Inada Y, Furukawa M, Sasaki H, Kodera Y, Hiroto M, Nishimura H, Matsushima A. Biomedical and biotechnological applications of PEGand PM-modified proteins. Trends Biotechnol. 1995 Mar;13(3):86-91.
- Zhai Y, Zhao Y, Lei J, Sua Z, Maa G. Enhanced circulation half-life of site-specific PEGylated rhG-CSF: Optimization of PEG molecular weight. J Biotechnol. 2009;142:259-266.
- Podobnik B, Helk B, Smilovic V, Skrajnar S, Fidler K, Jevsevar S, Godwin A, Williams P. Conjugation of PolyPEG to Interferon Alpha Extends Serum Half-Life while Maintaining Low Viscosity of the Conjugate. Bioconjugate Chem. 2015;26(3):452-459.
- Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Ikemizu S, Yamamoto Y, Shibata H, Nishibata T, Mukai Y, Okamoto T, Taniai M, Kawamura M, Abe Y, Nakagawa S, Nagata S, Yamagata Y, Mayumi T. Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF-alpha improves its antitumor potency. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Mar 19;315(4):808-14.
- 17. Shibata H, Yoshioka Y, Ikemizu S, Kobayashi K, Yamamoto Y, Mukai Y, Okamoto T, Taniai M, Kawamura M, Abe Y, Nakagawa S, Hayakawa T, Nagata S, Yamagata Y, Mayumi T, Kamada H, Tsutsumi Y. Functionalization of tumor necrosis factor-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. Clin Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8293-300.

- Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S, Tsutsumi Y. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nat Nanotechnol. 2011 May;6(5):321-8.
- 19. Hirai T, Yoshioka Y, Izumi N, Ichihashi K, Handa T, Nishijima N, Uemura E, Sagami K, Takahashi H, Yamaguchi M, Nagano K, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Ishii KJ, Higashisaka K, Tsutsumi Y. Metal nanoparticles in the presence of lipopolysaccharides trigger the onset of metal allergy in mice. Nat Nanotechnol. 2016 Sep;11(9):808-16.
- 20. Morishita Y, Yoshioka Y, Takimura Y, Shimizu Y, Namba Y, Nojiri N, Ishizaka T, Takao K, Yamashita F, Takuma K, Ago Y, Nagano K, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Saito S, Matsuda T, Hashida M, Miyakawa T, Higashisaka K, Tsutsumi Y. Distribution of Silver Nanoparticles to Breast Milk and Their Biological Effects on Breast-Fed Offspring Mice. ACS Nano. 2016 Sep 27;10(9):8180-91.
- 21. Tao H, Nagano K, Tasaki I, Zhang TQ, Ishizaka T, Gao JQ, Harada K, Hirata K, Tsujino H, Higashisaka K, Tsutsumi Y. Development and Evaluation of a System for the Semi-Quantitative Determination of the Physical Properties of Skin After Exposure to Silver Nanoparticles. Nanoscale Res Lett. 2020 Sep 29;15(1):187.
- Anna Mero, Chiara Clementi, Francesco M. Veronese, and Gianfranco Pasut. Covalent Conjugation of Poly(Ethylene Glycol) to Proteins and Peptides: Strategies and Methods. In: Sonny S. Mark ed. Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods; Methods in Molecular Biology, vol. 751; Humana Press; 2011:95-129.
- Plesner B, Fee CJ, Westh P, Nielsen AD. Effects of PEG size on structure, function and stability of PEGylated BSA. Eur J Pharm Biopharm. 2011;79(2):399-405.

- Natalello A, Ami D, Collini M, D'Alfonso L, Chirico G, Tonon G, Scaramuzza S, Schrepfer R, Doglia SM. Biophysical characterization of Met-G-CSF: effects of different site-specific mono-pegylations on protein stability and aggregation. PLoS One. 2012;7(8):e42511.
- 25. Gamble CN. The role of soluble aggregates in the primary immune response of mice to human gamma globulin. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1966;30(5):446-55.
- 26. Mima Y, Hashimoto Y, Shimizu T, Kiwada H, Ishida T. Anti-PEG IgM is a major contributor to the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-conjugated protein. Mol Pharm. 2015 Jul 6;12(7):2429-35.
- Ishida T, Kashima S, Kiwada H. The contribution of phagocytic activity of liver macrophages to the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon of PEGylated liposomes in rats. J Control Release. 2008;126:162-165.
- Paramonov SE, Bachelder EM, Beaudette TT, Standley SM, Lee CC, Dashe J, Fréchet JM. Fully acid-degradable biocompatible polyacetal microparticles for drug delivery. Bioconjug Chem. 2008;19(4):911-9.
- 29. Bock FJ, Chang P. Macrophage activation: on par with LPS. Chem Biol.2015 Apr 23;22(4):432-433.
- Mitchison NA. T-cell-B-cell cooperation. Nat Rev Immunol. 2004 Apr;4(4):308-312.
- 31. Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. Immunol Cell Biol. 1999;77(4):304-311.
- Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. Trends Immunol. 2001;22(2)83-87.
- 33. Chan O, Burke JD, Gao DF, Fish EN. The chemokine CCL5 regulates glucose uptake and AMP kinase signaling in activated T cells to facilitate chemotaxis. J Biol Chem. 2012;287(35):29406-29416.
- Armstrong JK, Hempel G, Koling S, Chan LS, Fisher T, Meiselman HJ,
   Garratty G. Antibody Against Poly(Ethylene Glycol) Adversely Affects

PEG-Asparaginase Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. Cancer. 2007;110(1):103-111.

- 35. Hershfield MS, Ganson NJ, Kelly SJ, Scarlett EL, Jaggers DA, Sundy JS. Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients. Arthritis Res Ther. 2014:7;16(2):R63.
- 36. Ganson NJ, Kelly SJ, Scarlett E, Sundy JS, Hershfield MS. Control of hyperuricemia in subjects with refractory gout, and induction of antibody against poly(ethylene glycol) (PEG), in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase. Arthritis Res Ther. 2006;8(1):R12.
- Lipsky PE, Calabrese LH, Kavanaugh A, Sundy JS, Wright D, Wolfson M, Becker MA. Pegloticase immunogenicity: the relationship between efficacy and antibody development in patients treated for refractory chronic gout. Arthritis Res Ther. 2014 Mar 4;16(2):R60.
- 38. Jiao J, Jiao X, Wang C, Wei L, Wang G, Deng Y, Song Y. The Contribution of PEG Molecular Weights in PEGylated Emulsions to the Various Phases in the Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon in Rats. AAPS PharmSciTech. 2020 Nov 2;21(8):300.
- 39. Li C, Cao J, Wang Y, Zhao X, Deng C, Wei N, Yang J, Cui J. Accelerated blood clearance of pegylated liposomal topotecan: influence of polyethylene glycol grafting density and animal species. J Pharm Sci. 2012 Oct;101(10):3864-3876.
- 40. Castells MC, Philips EJ. Maintaining safety with SARS-CoV-2 vaccines.N Engl J Med 2021; 384: 643-9.
- 41. Wenande E, Garvey LH. Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. Clin Exp Allergy 2016; 46: 907-22.

- Jezek J, Darton NJ, Derham BK, Royle N, Simpson I.
   Biopharmaceutical formulations for pre-filled delivery devices. Expert
   Opin Drug Deliv. 2013 Jun;10(6):811-28.
- 43. 医薬品の適正流通(GDP)ガイドライン 平成 30 年 12 月 28 日
   平成 30 年度厚生労働行政推進調査事業「GMP、QMS 及び GCTP のガイド
   ラインの国際整合化に関する研究」
   分担研究「医薬品流通にかかるガイドラインの国際整合性に関する研究」
- 44. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.
- 45. Ishida T, Ichihara M, Wang XY, Kiwada H. Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. J Control Release. 2006;115(3):243-250.