



Title	輸送時の振動周波数と加速度に着目したタンパク質医薬品凝集の解析
Author(s)	城, 慎二
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91903
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

輸送時の振動周波数と加速度に着目した
タンパク質医薬品凝集の解析

2023 年 1 月

大阪大学 大学院工学研究科

生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域

内山研究室

城 慎二

目次

第 1 章	序論	1
1.1	タンパク質凝集体のサイズと免疫原性との関係.....	2
1.2	溶液中におけるタンパク質凝集体生成経路と低減方法.....	2
1.2.1	気液界面を介した凝集体生成のモデル.....	4
1.2.2	固液界面を介した凝集体生成のモデル.....	5
1.3	界面活性剤添加による、物理的な力に由来する凝集体の低減方法.....	6
1.4	タンパク質医薬品の製造から使用時までにおいて生じる物理的な力.....	8
1.5	輸送時におけるタンパク質医薬品の凝集に関する研究の現状と課題.....	8
1.6	凝集体の分析について.....	10
1.7	本研究の目的と構成.....	11
第 2 章	輸送時に加わる凝集を引き起こす物理的な力の特定	13
2.1	背景.....	13
2.2	試料及び方法.....	14
2.2.1	試料.....	14
2.2.2	輸送試験システムを用いた振とう試験.....	15
2.2.3	SE-HPLC によるモノマー及びナノメートル凝集体評価... ..	17
2.2.4	FIM によるミクロン凝集体濃度の分析.....	18
2.2.5	qLD 法によるサブマイクロメートル凝集体濃度の分析... ..	18
2.2.6	サポートベクターマシン (SVM) を用いたミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線の設定と適用.....	19
2.2.7	バイアル製剤のパラメーターを変動させた場合の振とう試験.....	20
2.2.8	統計解析.....	21
2.3	結果.....	21
2.3.1	輸送試験システムを用いた IgG in HB NaCl の振とう試験.....	21
2.3.2	輸送試験システムを用いた IgG in HB 及び CTLA4-Ig in PB の振とう試験.....	29
2.3.3	IgG in HB NaCl, IgG in HB 及び CTLA4-Ig in PB におけるミクロン凝集体生成の境界線.....	36
2.3.4	ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に影響を与える要因.....	37

2.4	考察	41
2.4.1	振とうの周波数, 加速度と凝集体生成の関係	42
2.4.2	ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に影響を与える因子	44
2.4.3	輸送時の振動に対する安定性評価	45
第 3 章	低 g 力による凝集体生成メカニズム解明	48
3.1	背景	48
3.2	試料及び方法	49
3.2.1	試料	49
3.2.2	輸送試験システムを用いた振とう試験	49
3.2.3	SE-HPLC によるモノマー及びナノメートル凝集体評価	49
3.2.4	FIM によるミクロン凝集体濃度の分析	49
3.2.5	統計解析	49
3.2.6	振とうによる, バイアルに吸着したタンパク質の剥離	50
3.2.7	振とうによる, バイアルに吸着したシリコンオイルの剥離	50
3.2.8	振とう時の溶液挙動の観察	51
3.3	結果	51
3.3.1	AAB 及び ABB による凝集体生成における固液界面および気液界面の寄与の有無	51
3.3.2	AAB によるミクロン凝集体生成における固液界面の寄与	55
3.3.3	固液界面からのタンパク質フィルムの剥離に与える振とうの影響	56
3.3.4	AAB 及び ABB を加えた際の溶液の動き	59
3.4	考察	61
3.4.1	振とうによる界面を介したミクロン凝集体生成	62
3.4.2	振とうによる自発的なナノメートル凝集体生成の加速	65
3.4.3	振とうと凝集体生成のまとめ	66
3.4.4	ミクロン凝集体生成の境界線は何に起因するか	66
3.4.5	輸送時の振動による凝集体生成を抑制するための提案	68
第 4 章	総括	70
	略語リスト	73
	付録	75
	謝辞	79
	発表論文	81

参考文献.....	82
-----------	----

第1章 序論

1980年代に遺伝子組換え技術が開発されて以来、タンパク質などを有効成分とするバイオ医薬品開発が加速し¹、低分子化合物が中心であった医薬品の治療法が拡大した。その中でも、抗体医薬品やFc融合タンパク質は標的分子への特異性が高く、副作用の程度も低いと認識されており、バイオ医薬品の中でも特に開発が盛んである²。実際に抗体医薬品の市場は拡大し続けており、2002年には約6000億円だった世界市場が、2018年には約13兆円となり、2025年には約34兆円に到達する予想である²。

しかし、抗体医薬品を含むタンパク質医薬品全体に共通し、「免疫原性」が開発上の課題となっている。タンパク質医薬品が免疫原性を持つと、投与した医薬品に含まれるタンパク質が異物として認識されるようになり、薬効の低下や、場合によってはショック症状を引き起こすことから、免疫原性の抑制はタンパク質医薬品の開発において重要である。そのため、免疫原性の低減を目的に構成タンパク質のアミノ酸配列のヒト化が進められてきたが、完全にヒトのアミノ酸配列を持つタンパク質であっても、繰り返し投与するうちに一定の確率で異物として認識されるようになる³。タンパク質の免疫原性には、依然として不明な点が多いが、バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体と免疫原性との関係に懸念を示した論文が、2006年にRosenbergにより発表された⁴。さらに、Carpenterらがバイオ医薬品に含まれる特定のサイズの凝集体研究の必要性を発表した2008年以降⁵、世界中で様々な研究が行われ、バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体は投与したタンパク質の免疫原性を高め得ることが示されている⁶。したがって、免疫原性を抑制するために、タンパク質凝集体を低減させることが、タンパク質医薬品の開発に必要となっている。

1.1 タンパク質凝集体のサイズと免疫原性との関係

代表的なバイオ医薬品の一つであるモノクローナル抗体 (mAb) のモノマーの流体力学的直径は、水和層の算定の程度によって異なるが、約 5~12 nm である⁷。タンパク質凝集体は、二量体や三量体といった、100 nm 以下の可溶性のものから、数百 μm に至る不溶性の凝集体まで、広いサイズ分布を有する。本博士論文では過去に提案された名称を参考に⁸、二量体 (数十 nm 以下) から 100 nm 未満の凝集体をナノメートル凝集体、100-2000 nm の凝集体をサブマイクロメートル凝集体、2-100 μm の凝集体をミクロン凝集体と呼ぶこととする。

これらの異なるサイズのタンパク質凝集体のうち、いずれのサイズの凝集体が免疫原性に影響しているかについては、研究が進められてきたが、サイズと免疫原性に明確な関連は見出されていない。例えば、ナノメートル凝集体⁹や、モノクローナル抗体—シリコンオイルの複合体¹⁰は免疫原性を高めないとする報告がある一方で、ナノメートル凝集体¹¹、サブマイクロメートル凝集体¹²及びミクロン凝集体が高い免疫原性を示した例¹³もある。したがって、タンパク質凝集体による免疫原性への影響を抑えるためには、ある特定のサイズの凝集体だけではなく、広い範囲の凝集体を低減することが重要である。

1.2 溶液中におけるタンパク質凝集体生成経路と低減方法

溶液製剤におけるタンパク質凝集体発生の抑制は容易ではなく、しばしばタンパク質医薬品の製剤化における、容器への充填、保管、輸送及び患者への投与時に凝集体が生成する^{14,15,16}。この原因として、製造や保管に関連する様々な要因が凝集を引き起こし得ること、凝集メカニズムが要因によって異なること^{17,18,19}、そのため複数の凝集抑制法を組み合わせる必要があること、が挙げられる。溶液中で凝集体が生成する経

路として、バルク溶液（界面に触れていない溶液）中でタンパク質同士が相互作用する現象に加え、界面（固液界面や気液界面）を介する経路が考えられる（図 1）。

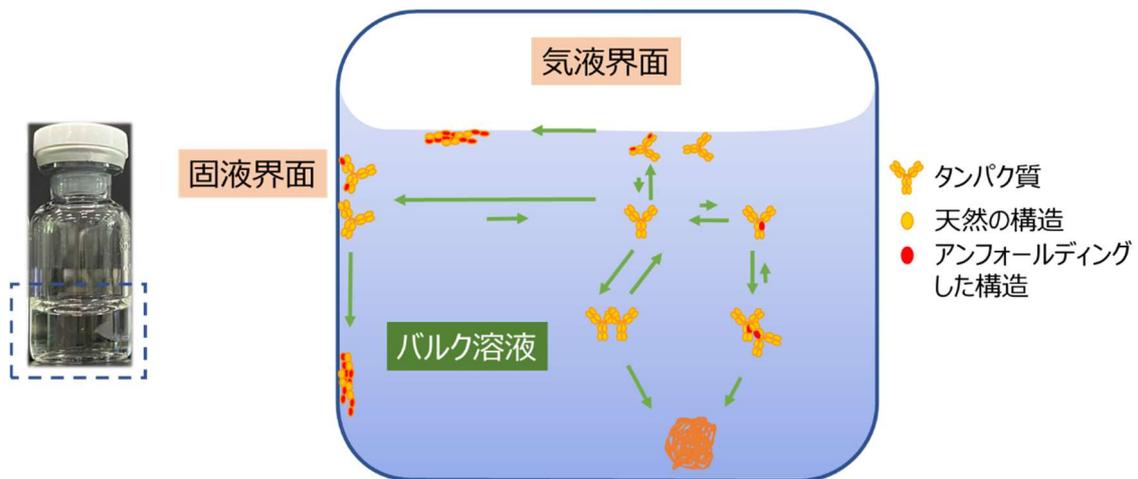


図 1 溶液製剤における主なタンパク質の凝集経路。

バルク溶液中におけるタンパク質凝集体の生成には、2つの経路が提唱されている²⁰。1つ目の凝集経路は、天然状態のタンパク質に構造変化が起こり、構造変化した分子同士が凝集する経路である。この経路の場合、天然状態（N）と変性状態（D）の自由エネルギー差（ Δ_{ND} ）が大きい場合には、この経路での凝集は起こりにくくなることから、構造安定性を向上させることが抑制につながる。2つ目の凝集経路では、タンパク質が構造変化を伴わずに分子が会合し、さらに会合を繰り返し大きな凝集体へと成長する。この経路での凝集では、タンパク質分子同士が分散する度合いを示す、コロイド安定性が重要となる。構造安定性は、糖の添加により上昇させることも可能だが、タンパク質の配列に依存する傾向が強いことから²¹、タンパク質配列の最適化が有効である。コロイド安定性を高めるには、タンパク質分子の電荷による反発を考慮する必要がある。溶液の pH をタンパク質の等電点から 1 以上離れた値に設定することで、タンパク質分子間に、電荷による反発が生じる状態にすることが一つの方法である。抗体医薬品の場合、等電点は 7 以上であることが多く、市販の抗体医薬品の

113 品目中、111 品目が pH 5-7 の範囲で処方されているのは²²、化学的安定性のみならず、コロイド安定性も考慮されたものと考えられる。また、多くの場合、塩を添加すると電荷が遮蔽され、電荷による反発は低下することから、塩濃度を低くすることでコロイド安定性が上昇することが多い。以上のとおり、バルク溶液中での凝集経路については、構造安定性とコロイド安定性を高めることの重要性、また、その方法が提唱されており、それらに基づいてタンパク質医薬品を安定化させることが求められる。

一方、バルク溶液のみならず、界面（気液界面や固液界面）を介してタンパク質が凝集体を生成することが知られており、その凝集は、振とう、落下、製剤化工程における容器への充填などによって、溶液および界面に物理的な力が作用することにより生成すると考えられている。以下に、気液界面と固液界面それぞれにおける凝集体生成のモデルを記載した。

1.2.1 気液界面を介した凝集体生成のモデル

バイアル製剤やプレフィルドシリンジ（PFS）等の溶液製剤では、一次包装容器内にタンパク質溶液と共に空気が含まれており、気液界面が存在する。両親媒性であるタンパク質は、疎水性界面に吸着し、アンフォールディングを経て、タンパク質同士が相互作用してフィルムを形成することが複数の研究で示されている^{23,24}。輸送時や使用時における振とうや容器の転倒などにより気液界面の面積は変化し、気液界面の面積が狭くなる際にはフィルムが圧縮されて凝集が促進され、面積が広がる際にその凝集体がバルク溶液に放出されると考えられている。この気液界面の面積変化を繰り返すことでバルク溶液中に多くのタンパク質凝集体が生じる（図 2）^{25,26,27,28}。

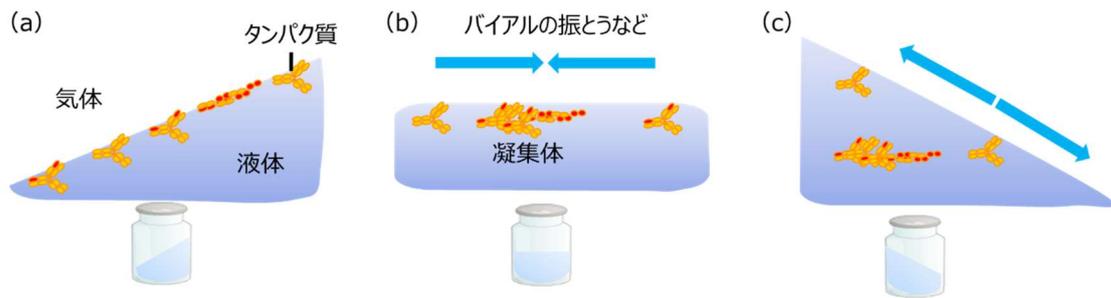


図 2 振とう時を例とした，気液界面を介したタンパク質凝集体生成のモデル図。

(a) 気液界面へのタンパク質の吸着，(b) 吸着したタンパク質のアンフォールディング及び振とう等により気液界面の面積が狭くなる（圧縮される）ことによるフィルム形成，(c) 再び気液界面の面積が広くなる（膨張する）ことによる，界面からバルク溶液中へのタンパク質フィルムの移動．図中の矢印は，気液界面の面積の膨張や圧縮を示した．

1.2.2 固液界面を介した凝集体生成のモデル

バイオ医薬品製造において，製剤化工程における溶液充填操作や²⁹，シリンジ押し出し時における摩擦³⁰は，タンパク質の凝集体を増加させることが知られている．

1.2.1 項の気液界面を介した凝集体生成と同様に，疎水性の固液界面にタンパク質は吸着し，フィルムを形成する．溶液の流れやシリンジプランジャーによる押し出し時に発生するせん断応力や摩擦力が固液界面に加わると，このフィルムが界面から剥がれ，サブマイクロメートル以上のサイズの凝集体が生成する^{31,32}．その後，タンパク質が剥離した界面に新たにタンパク質が吸着し，上記のサイクルを繰り返すことで凝集体が増加する（図 3）．

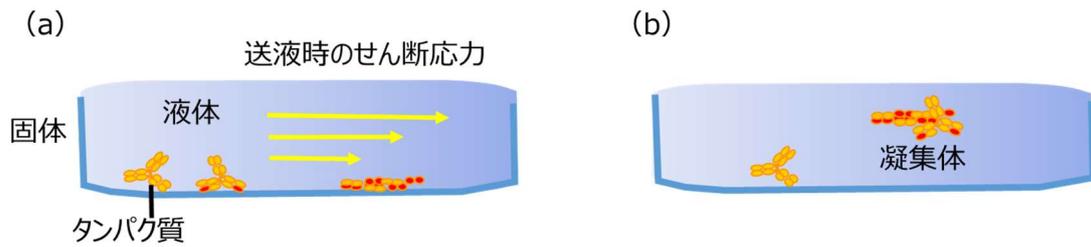


図 3 せん断応力が加わる場合を例とした、固液界面を介したタンパク質凝集体生成のモデル図。(a) 固液界面へのタンパク質の吸着及び吸着したタンパク質のアンフォールディングを伴うフィルム形成、(b) 界面からのタンパク質フィルムの剥離によるバルク溶液中へのタンパク質フィルムの移動。

この凝集メカニズムから想定されるとおり、固体表面の素材は、生じる凝集体量に影響を与える。例えば、シリンジを用いて溶液を押し出す際、ガラスよりもポリプロピレン素材の方が凝集体の生成が少なかったこと³³、シリンジからの溶液押し出し時において、シクロオレフィンポリマー (COP) を用いた PFS が、ホウケイ酸ガラスの PFS よりも凝集体生成量が少なかったこと³⁴等が報告されている。ロータリーピストンポンプに使用する表面の素材も凝集体量に影響し、セラミックに比べてステンレスの方が多くの凝集体が生じたとの報告もある³⁵。また、この研究では、表面に不可逆的に吸着したタンパク質量と、凝集体量に相関が確認されており、先述のメカニズムが支持されている。このように、製剤化工程の充填時にかかるせん断力などは、界面がタンパク質凝集に影響を与える。

1.3 界面活性剤添加による、物理的な力に由来する凝集体の低減方法

上記のとおり、製造、輸送等において発生する物理的な力は、界面を介したタンパク質の凝集体形成を促進することから、界面への吸着を抑制する手法が物理的な力による凝集を抑制するのに効果的である。代表的な手法の一つは、処方に非イオン界面活性剤を添加することであり、ポリソルベート 20 (PS20)、ポリソルベート 80

(PS80) 及びポロキサマー188 (P188) の3種類の界面活性剤が市販製剤で利用されている。界面活性剤はタンパク質と競合して界面を覆うことや^{36,37}、タンパク質と相互作用することにより³⁸、タンパク質が界面に吸着することを抑制し、界面に由来する凝集を抑制する。その効果の高さや使用実績の多さから、抗体医薬品にいずれかの界面活性剤を添加することが主流であり、市販化された131の抗体処方に対し、119(91%)もの処方がいずれかの界面活性剤を含んでいる²²。

一方で、界面活性剤の添加によるタンパク質医薬品の品質の低下も懸念されている。界面活性剤として最も広く使われているのはポリソルベートであり、PS20及びPS80を合わせると、界面活性剤を含む119の処方のうち、114処方を占める²²。ポリソルベートは界面由来の凝集体を低減する一方で、詳細なメカニズムは不明であるものの、長期保管(静置)時においてタンパク質の凝集を促進する可能性があることが報告されている^{39,40}。また、脂肪酸エステルであるポリソルベートは、保存中に酸化やエステル部の加水分解を受けるが、PS20の分解物がコロイド安定性を低下させ、タンパク質の長期保管時における凝集を促進することも報告されている⁴⁰。さらに、タンパク質が主に静電的相互作用によって固液界面に吸着する場合は、界面を介した凝集を十分に抑制できないことも報告されている¹⁵。

ポリソルベートとは骨格構造が異なる非イオン界面活性剤であるP188は、分子内にエステル結合が無いため、ポリソルベートに比べて加水分解を受けにくく、安定性が高いと考えられている。しかし、ヒスチジン緩衝液を用いた場合にP188が酸化されることが示唆されている⁴¹。また、バイアル製剤に用いるゴム栓にシリコンコートが施されている場合、P188と相互作用し、凝集体を生成した報告もある⁴²。

上記のとおり、界面活性剤による界面を介した凝集抑制は効果的である一方、分解物がタンパク質の長期保管時の凝集を促進する可能性や、界面以外の経路で生成する凝集を促進する可能性が懸念されることから、界面活性剤を添加しないまたは添加す

る量を減少させることが望ましい。そのためには、界面を介した凝集を引き起こす物理的な力を特定し、凝集メカニズムを正しく理解することが重要である。タンパク質医薬品の製造から使用時に至るまでに発生する物理的な力と、これまでに報告されている界面を介した凝集メカニズムを次項に記載した。

1.4 タンパク質医薬品の製造から使用時までにおいて生じる物理的な力

界面を介した凝集を引き起こす物理的な力は、タンパク質医薬品の製剤化工程におけるバイアルへの充填時や輸送といった過程で生じる。輸送時の界面を介した凝集は、充填時における凝集に比べてより複雑である。まず、物理的な力について、充填時には一定の流量で送液することから、一定の力が加わることに對して、輸送時には低加速度力（低 g 力）及び高加速度力（高 g 力）の 2 種類が加わる。さらに、凝集が生じる界面も、充填時は固液界面が主であるが、輸送時には気液界面と固液界面のどちらも影響する。このような背景から、輸送時の凝集については、現在も不明な点が多い。

1.5 輸送時におけるタンパク質医薬品の凝集に関する研究の現状と課題

タンパク質溶液の輸送時には、トラック走行時に発生する振動のように、強度は低いですが、継続的にかかる低 g 力と、荷役時にかかる落下時の衝撃のように、一過性であるが、強い力が加わる高 g 力の 2 種類の物理的な力を受ける。なお、過去の文献を参考に⁴³、低 g 力とは概ね 10 G 未満のことを意味し、10 G 以上を高 g 力と表現することとした。これらのうち、高 g 力はキャビテーションの発生を通して顕著な凝集を引き起こすことが知られている⁴⁴。高 g 力を緩和する包装形態により凝集体の生成が減少した例も報告されており^{43,45,46}、高 g 力が輸送中のタンパク質凝集の主要な原因であるとの報告もある^{31,47}。しかし、近年の研究から、輸送時の凝集体生成における低 g 力

の重要性も認識され始めている。ミクロン凝集体の形状は、発生する要因によって特徴が異なることが知られている⁴⁸。Witeofらは、実輸送後に生成したミクロン凝集体の形状を、高g力と低g力で生成したミクロン凝集体の形状と比較し、実輸送後に生成したミクロン凝集体の形状が低g力で生成したミクロン凝集体と類似していたことを示した⁴³。この結果から、実輸送時の凝集の主要な原因が低g力であることが示唆された。また、高g力のみでは、実輸送時の凝集体濃度を再現できないことも報告されている⁴⁶。加えて、バイアルおよびPFSに充填された複数のmAbについて、加速度6G未満の低g力を含むランダム波振動試験（米国材料試験協会規格（ASTM）D4169（2014年版）準拠）により生成した凝集体濃度が、実輸送で生成したミクロン凝集体濃度と良く相関したことも報告されている⁴⁹。以上から、低g力が輸送時の凝集に大きく影響すると考えられる。

しかしながら、具体的に凝集を引き起こす低g力の特徴は十分に分かっていない。ここで低g力を周波数と加速度、振幅によって表すと、これらの3つのパラメーターは関連しており、2つのパラメーターを決めると残りのパラメーターも決まる。このうち周波数に注目した研究は過去に存在する。例えば、周波数について、水平方向の振とうを加えた場合、2.5 Hzでは不溶性凝集体が生じなかったが、3.3 Hzを超えると凝集した事例がある⁵⁰。一方で、オービタルシェイカーを用いた研究において、0.8～1.7 Hzでは不溶性凝集体が生じなかったのに対し、2.5 Hzの振とうでは凝集体濃度が上昇したという報告もあり²⁵、水平方向の振とうと比べ、凝集が生じ始める周波数が異なっていた。また、別の研究では、マイクロプレート用のオービタルシェイカーを用いて、0～50 Hzにおける液面の高さ及びモノマーのリカバリー率（振とう開始前のモノマー含量に対する残存率。凝集体が生成すると低下することから、凝集の一つの指標となる）を評価している⁵¹。その結果、11.7 Hz程度の振とうから液面の高さが上がり始め、気液界面が広くなること、その後、周波数の増加とともに液面が高くな

り、16.7 Hz を超えた後にモノマーのリカバリー率が低下し始めることが示されている。これらの結果から、振とうの周波数が上がると凝集体が生成することは共通しているものの、凝集が生じ始める周波数は様々であり、周波数だけでは、振とうと凝集の関係を説明できないことが分かる。これはある意味当然で、g 力は周波数と加速度の両方によって規定されるパラメーターであるため、それぞれの機器で、同じ周波数でも加速度が異なるとタンパク質溶液に加わる力が異なるはずである。そのため、過去の研究からは周波数による統一的な説明が困難であったと推測している。そこで、本研究では周波数と加速度の2つのパラメーターを明確にして低 g 力による凝集体生成の研究を行うことを起案した。本研究により、周波数と加速度の2つのパラメーターから凝集体生成へとつながる低 g 力が判明すれば、低 g 力による凝集メカニズムの推定が可能となり、適切な低 g 力による凝集評価方法の設定、さらに低 g 力の低減につながる二次包装の開発等が可能となると期待される。

1.6 凝集体の分析について

2010 年頃からの多くの研究により、タンパク質凝集体のサイズ範囲は数十 nm から数百 μm と幅広く、すべてのサイズ範囲の粒子を網羅的に定量できる単一の分析法は存在しないことが分かっている。そのため、凝集体のサイズに応じて複数の分析法を組み合わせて凝集体の定量を行う必要がある。図 4 に代表的な凝集体分析法を示した。本博士論文では、これらの分析法の中から、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー (SE-HPLC)、定量的レーザー回折法 (qLD 法)、及びフローイメージング顕微鏡 (FIM) を用いて、それぞれナノメートル凝集体、サブマイクロメートル凝集体、ミクロン凝集体を評価することとした。

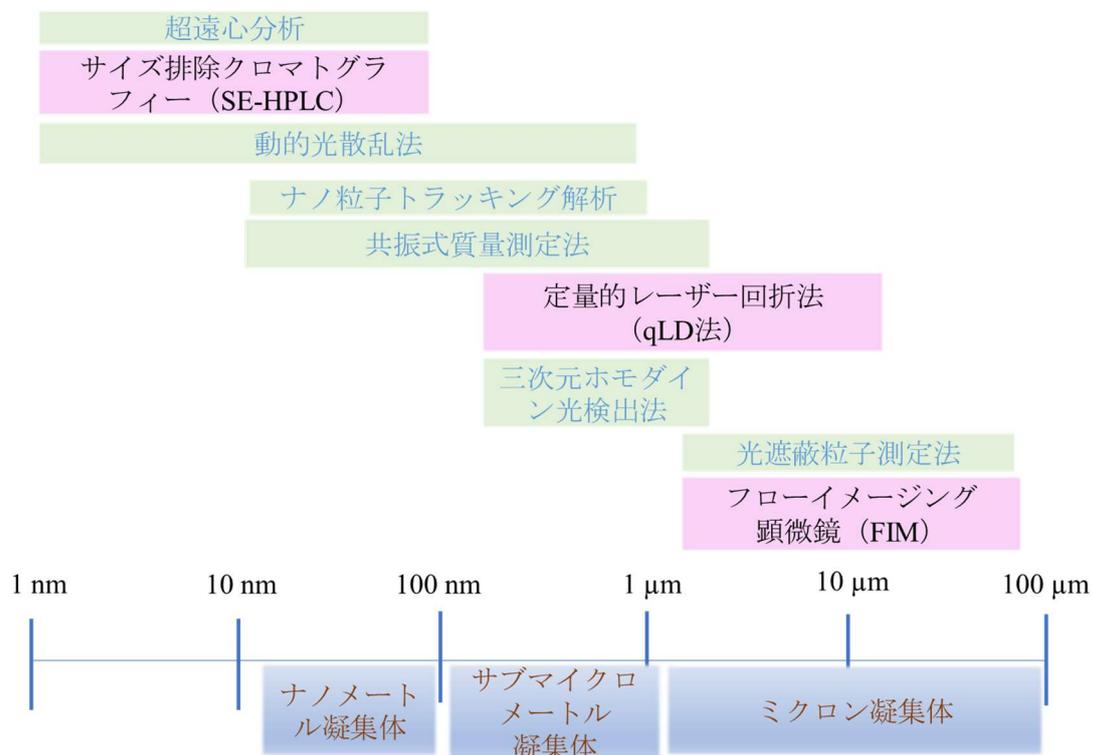


図 4 凝集体のサイズに対する代表的な分析方法. 本研究で使用した分析法をピンクで示した. また, 凝集体のサイズごとの呼称を, 各サイズの下に記載した.

1.7 本研究の目的と構成

本研究の目的は, 輸送時の低 g 力に着目し, 低 g 力を周波数と加速度により規定し, 凝集を引き起こす低 g 力を特定した上で, 低 g 力による凝集メカニズムを明らかにすることである. 目的達成にあたり, モデルとして用いた 2 種類のタンパク質医薬品に, 様々な周波数と加速度の 3 軸方向の振とうを加え, 生じた凝集体を分析し, 得られた結果から, 凝集を引き起こす周波数と加速度の範囲を明らかにした. さらに, 凝集を引き起こす周波数と加速度の範囲が何に起因するのか, 特定の範囲内の低 g 力が凝集を引き起こすメカニズムは何なのか, を考察した.

第 1 章では, タンパク質医薬品の凝集における, 輸送時における研究の現状と課題, 本研究の意義を述べた.

第2章では、輸送時の低g力のうち、タンパク質の凝集を引き起こす周波数と加速度の特定を目的とし、実際の医薬品を想定した条件で、周波数と加速度を変化させながら3軸方向の振とうを加え、生じた凝集体濃度を測定した。その結果、ある周波数と加速度の境界線を超えるとミクロン凝集体が急激に上昇することを明らかにした。さらに、タンパク質の種類、濃度、液量、粘度や、容器の大きさ、向き、温度などを変化させた実験を行うことで、タンパク質医薬品製剤が持つ性質の中でも凝集を引き起こす周波数と加速度に大きく寄与する性質を検討した結果、この境界線は溶液中でのタンパク質の特性の影響をほとんど受けず、タンパク質溶液の動きにより定まることを明らかにした。一方、この境界線に関わらず、自発的なナノメートル凝集体の生成は、低g力により加速することを示した。

第3章では、第2章で特定された、ミクロン凝集体生成を引き起こす周波数と加速度の境界線が何に起因するかを、界面の寄与の有無及び溶液の動きに着目して解析した。まず、ミクロン凝集体生成に関係する溶液の動きを、ハイスピードカメラを用いて観察し、溶液の動きと界面を介した凝集との関係を議論した。さらに、気液界面を除去した条件等での実験により界面の寄与を評価し、ミクロン凝集体生成の境界線と、溶液の動き、界面の関係を総合的に議論した。また、自発的なナノメートル凝集体生成の加速についても、界面との関係を中心に議論した。

第4章では、総括として第2章及び第3章で得られた結果をまとめ、これらの結果から明らかとなった輸送時の凝集を引き起こす振動の特徴とメカニズムを述べた。最後に、本博士論文で見出した現象とその理解を活用したタンパク質医薬品の凝集抑制及び評価について述べた。

第 2 章 輸送時に加わる凝集を引き起こす物理的な力の特定

2.1 背景

1.5 項で述べたとおり，輸送時に加わる物理的な力のうち，低 g 力の凝集体の生成における重要性が認識されてきた．しかし，周波数の観点のみからの研究例は報告されていたものの，周波数と加速度の両方を考慮した研究は無かったことから，どのような低 g 力が凝集体を生成させるか，周波数と加速度の点から検証した．

試料には，タンパク質医薬品の中で盛んに開発されている，免疫グロブリン G のリツキシマブ及び組み換え IgG Fc ドメインと T 細胞受容体の可溶性部分からなる融合タンパク質（以下，CTLA4-Ig）の 2 種類を選択した．これらのタンパク質溶液を，医薬品で広く用いられるホウケイ酸ガラスバイアルに充填し，検討に用いた．振とうの条件は，実際にトラック等を走行させることが輸送時の状況を最もよく反映するが，実輸送時には様々な周波数や加速度の振動が発生し，その中のどういったパラメーターが凝集に影響したかを把握できない．また，製剤の開発段階での凝集安定性試験にトラックを利用するのは現実的ではない．一方，先行研究の多くで用いられている，オービタルシェイカーなどの試験機では，周波数とともに加速度も変動すること，また，2次元方向のみの振とうで，かつ実輸送とは振とうの種類が異なる懸念があった．そこで，本研究では，実輸送時に近い，X, Y 及び Z 軸の 3 軸方向への同時振とうを行うことが可能で⁵²，周波数及び加速度を任意に変化させることも可能な輸送試験システムを用いて，様々な周波数と加速度における凝集体生成及びタンパク質のモノマー消失速度を評価した．輸送試験システムで生成した凝集体は，～100 nm 程度の可溶性凝集体を SE-HPLC で，サブマイクロメートル凝集体（300 nm～2 μm）を qLD 法で，ミクロン凝集体（2 μm～100 μm）を FIM で分析した．

2.2 試料及び方法

2.2.1 試料

ブチルゴム栓, 2 mL ホウケイ酸ガラスバイアル (16×33 mm) は, 大和特殊硝子株式会社から購入した. シリコンで化学的にコーティングされたゴム栓及びバイアルを超純水 (18.2 M Ω フィルター) で 3 回洗浄し, 121°C で 20 分間, オートクレーブで滅菌した. 10 mg/mL のリツキシマブ溶液を全薬工業株式会社から購入し, 免疫グロブリン G のバイアル製剤のモデルとして使用した.

界面活性剤を添加しない条件での凝集について検証するため, はじめに製剤に含まれる界面活性剤を除去した. リツキシマブ溶液を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で透析した後, 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) とともに SP セファロースカラム (Cytiva) に流し, リツキシマブをカラムに吸着させ, 50 mL 以上送液を続けることで, 界面活性剤を除去した. その後, 400 mM 塩化ナトリウム (NaCl) 含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) によりリツキシマブを溶出させた. このリツキシマブを含む溶液を, 150 mM NaCl を含む 20 mM ヒスチジン緩衝液 (pH 6.0) (以下, HB NaCl) または 20 mM ヒスチジン緩衝液 (pH 6.0) (以下, HB) で透析した.

また, 過去の検討を参考に, 比較的安定性が低い⁵³ タンパク質のモデルとして CTLA4-Ig を選択した. 125 mg/mL の CTLA4-Ig 溶液は小野薬品工業株式会社から購入し, 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した後, Q Sepharose カラム (Cytiva) に流し, CTLA4-Ig をカラムに吸着させ, 50 mL 以上送液を続けた. その後, 400 mM NaCl を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) により CTLA4-Ig を溶出させた. この溶液を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析した. 試験には 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0) (以下, PB) 中に希釈した CTLA4-Ig を用いたが, この処方では凝集体に対する安定性が低く, 冷蔵庫内でも数日でナノメートル凝集体が増加することから, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に保管し, 試験前日から PB に対して透析した.

上記の透析及びイオン交換クロマトグラフィーや、溶液の保管は、試験前の溶液状態が変化しないように、すべて 2-8°C で実施した。透析液は、振とう試験開始直前に 0.22 μm のポリエーテルスルホンフィルターでろ過し、実験前に各緩衝液で 0.5 mg/mL に希釈した。各バイアルに溶液 1 mL を充填し、振とう試験を行った。

アミノ酸配列を用いたタンパク質の等電点の計算は、SEDNTERP ソフトウェアを用いて確認した。タンパク質のアミノ酸配列を入力し、システイン残基はジスルフィド結合を形成していると仮定して等電点を算出した。

2.2.2 輸送試験システムを用いた振とう試験

輸送試験システム TRE-200 (ESPEC CORP.) を用いて、各条件につき 3 本ずつ、室温 (20~25°C) でバイアルを振とうした。10 Hz で 1 G, 20 Hz で 2 G を超える加速度で試験を行う場合は、より高い加速度を発生するように改造した TRE-200 を使用した。バイアルは、容器や界面の影響を受けやすいと想定される条件として、溶液がゴム栓に接触し、バイアル内の気液界面が垂直方向に比べて広くなる水平方向に固定した (図 5a, b)。輸送試験システムの振動ユニット上部に固定されたポリエチレン製の固定具にバイアルを直接固定したことから、振とうはバイアルに直接伝わると考えられた。輸送試験システムの振動ユニットの動作は、図 5c に示すように 3 軸同時振動を含む。振とう時の加速度は、バイアル固定装置の上部に固定した三次元無線振動記録計 MVP-RF8-HC-IDEX (アイデックス株式会社) に外付けセンサー (MA3-20AD) を接続して測定した。外付けセンサーの加速度の検出範囲は 10.2 G までであり、実験台上にセンサーを静置した状態で水平方向の補正をした後に使用した。本振動記録計は、3 軸振動の各次元の加速度を記録し、本研究では、代表値として Z 軸方向の加速度 (G) を報告した。X : Y : Z の加速度の比率は、およそ 4 : 1 : 5 であった。垂直 (Z 軸) 方向の G は 3 次元の中で最も強く、実際のトラック輸送時において

も、複数の研究で Z 軸方向の加速度が最も強いことが報告されており、本システムの振動ユニットの振とうは、実輸送時の振動を反映していると考えられた^{52,54}。

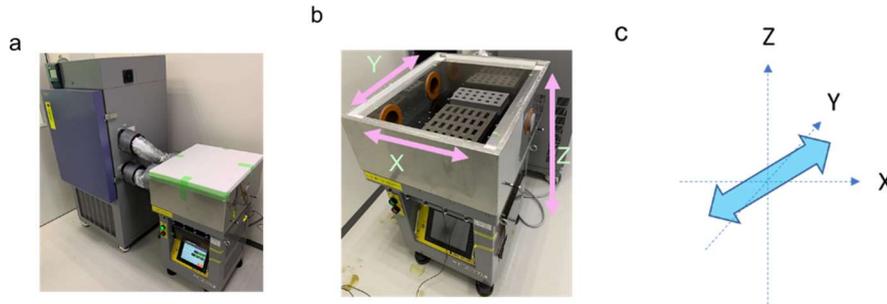


図 5 a: 輸送試験システム TRE-200 の写真. 左側のチャンバーは温度制御ユニット, 右側のチャンバーは振動ユニットである. b: 振とう方向の定義, c: TRE-200 による振とう方向のイメージ図

検討する周波数と加速度の範囲は、先行研究におけるトラック実輸送時の値と、本振とう試験機で設定可能な周波数及び加速度の上限と下限を考慮して設定した。周波数については本システムで適用可能な最低、最高周波数である 10~55 Hz で研究を実施した。トラック輸送のパワースペクトル密度解析において、周波数が 1~80 Hz の振動は 80~200 Hz の振動よりも高いパワー (G^2/Hz) を示すことが先行研究により報告されている^{49,55}。また、振とうに対する安定性試験の多くは 50 Hz 以下の周波数で実施されていた^{25,51}。これらの点から、10~55 Hz での検討がトラック輸送を想定した振とう試験として妥当であると考えられる。

また、先行研究における、トラック輸送時の垂直軸の加速度につき、連続して加わる加速度は、5 G 以下であった^{43,55}。本研究では、周波数と加速度の関係を広い範囲で把握するために、垂直軸の加速度を 0.7~9.7 G に設定した。また、振とうに対する対照試料として、静置したものを使用した。振とうまたは静置は、バイアル間のばらつきを考慮し、3 本のバイアルを用いて行った。振とうまたは静置後、分析に十分な試

料溶液を得るために3本のバイアルに入れた試料を混合し、分析を行った。再現性の確認を目的とし、30 Hz 2.7 G の振とう条件で振とう試験を3回繰り返して行った。

2.2.3 SE-HPLC によるモノマー及びナノメートル凝集体評価

試料のモノマーとナノメートル凝集体の定量には、SE-HPLC を使用した。リツキシマブ（以下、IgG）の分析では、100 μ L の試料をとり、25,200 \times g、5°C で30分間遠心後、上清をとることで、SE-HPLC で詰まりを引き起こす可能性のある大きな凝集体を除去した。この試料 10 μ L を、Acquity UPLC H-Class system（Waters）に、内径 7.8 mm、長さ 300 mm、粒子径 2.7 μ m の分析用カラム（Advance Bio SEC 300Å）（Agilent Technologies）を接続したシステムに注入した。150 mM の NaCl を含む、50 mM リン酸緩衝液を移動相に用い、アイソクラティック溶出条件で分析した（ $n=3$ ）。移動相を 0.7 mL/min で送液し、カラムからの溶出液の吸光度（280 nm）を測定し、得られたクロマトグラムを Empower 3 Software（Waters）により解析した。CTLA4-Ig の分析では、IgG と同様に試料を遠心し、上清 20 μ L を、Acquity UPLC H-Class system に、Tosoh TSK gel G3000SWXL のカラム（Tosoh）を接続したシステムに注入した。200 mM の NaCl を含む、133 mM リン酸緩衝液を移動相に用い、アイソクラティック溶出条件で分析した（ $n=3$ ）。移動相を 0.25 mL/min で送液し、カラムからの溶出液の吸光度（280 nm）を測定し、得られたクロマトグラムを Empower 3 Software により解析した。モノマー由来のピークより先に溶出したピークは、ナノメートル凝集体とした。ナノメートル凝集体のピーク面積を各時点における全ピーク面積で割ることにより、振とう試験後に形成された可溶性タンパク質の含量に対するナノメートル凝集体の相対的な含量（%）を算出した。モノマーおよび可溶性タンパク質（モノマーおよびナノメートル凝集体）のリカバリー率（R）は、以下の式に示すように、各ピーク的面積を初期値の面積で割ることによって決定した。

$$R_{\text{monomer}}(t) = \frac{A_{\text{monomer}}(t)}{A_{\text{monomer}}(0)}$$

$$R_{\text{monomer+nanometer aggregates}}(t) = \frac{A_{\text{nanometer aggregates}}(t) + A_{\text{monomer}}(t)}{A_{\text{nanometer aggregates}}(0) + A_{\text{monomer}}(0)}$$

ここで、 $A_{\text{monomer}}(0)$ 及び $A_{\text{monomer}}(t)$ は初期値及び各試験時間後の時点のモノマーのピーク面積を示し、 $A_{\text{nanometer aggregates}}(0)$ 及び $A_{\text{nanometer aggregates}}(t)$ は初期値及び各試験時間後のナノメートル凝集体のピーク面積を示す。

2.2.4 FIM によるミクロン凝集体濃度の分析

カラー電荷結合デバイス (CCD) 及び 10 倍レンズを備えた FlowCam 8100™ (Yokogawa Fluid Imaging Technologies, Inc.) を用いて、2~100 μm (equivalent spherical diameter) のミクロン凝集体濃度を測定した ($n=3$)。サンプル分析量は 0.15 mL、流量は 0.05 mL/min とした。データ解析には VisualSpreadsheet (Yokogawa Fluid Imaging Technologies, Inc.) を使用し、2 μm 以上の粒子を解析の対象とした。粒子識別の設定は、最近傍までの距離を 1 μm 、close holes を 0 とした。また、本測定システムでは背景のピクセル強度に対する測定物のピクセル強度を比較し、閾値を上回るか否かで粒子の有無を判定している。その閾値について、Dark (閾値以上の暗さで粒子とカウントする) 及び Light (閾値以上の明るさで粒子とカウントする) とともに 15.00 をソフトウェア上で設定した。

2.2.5 qLD 法によるサブマイクロメートル凝集体濃度の分析

Aggregates Sizer (株式会社島津製作所) を用いて、qLD 法により試料中のサブマイクロメートル凝集体 (0.3~2 μm) 濃度を測定した。qLD 法では、Mie 散乱理論に基づ

き、150 μL の試料をマイクロセルに充填し、Aggregates Sizer で回折・散乱光の光強度分布を測定した。測定結果を、解析ソフトウェアである WingSALD Bio を用いて、デコンボリューション解析することにより、粒度分布を算出した⁵⁶。解析において必要なタンパク質の屈折率および密度はそれぞれ 1.46 g/cm^3 （ソフトウェアのデフォルト設定）および 1.32 g/cm^3 （純粋なタンパク質の密度）⁵⁷ とした。また、タンパク質以外の物質に由来するノイズの除去に関わるカットオフレベルは、ソフトウェア上で 100 と設定した。カットオフレベルを 100 とすることで、タンパク質以外に起因する 0.3 μm 以下のノイズの影響を低減させることが過去の研究より確認されている⁵⁸。

2.2.6 サポートベクターマシン (SVM) を用いたミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線の設定と適用

SVM は、教師有り機械学習の 2 クラス分類で活用されるアルゴリズムであり⁵⁹、最も近い点（サポートベクター）までの距離が遠くなるように決定境界と呼ばれる境界線を決めることに用いられる。振とう時の周波数と加速度について、線形 SVM を用いてミクロン凝集体増加の有無の 2 クラスに対する境界線を求めた。

まず、HB NaCl にリツキシマブ（以下、IgG）を希釈した溶液（以下、IgG in HB NaCl）のデータに対して、ミクロン凝集体濃度が上昇する振とう条件と上昇しない振とう条件の周波数と加速度を入力データとして、コストパラメーターと呼ばれる SVM の決定境界に関わるパラメーターを 0.01 から 100 の範囲で変動させて分類誤差を 1000 回計算し、誤分類が最も少なくなるコストパラメーターを用いて線形 SVM により境界線を得た。得られた境界線を 20 mM HB にリツキシマブを希釈した溶液（IgG in HB）および PB に希釈した CTLA4-Ig（以下、CTLA4-Ig in PB）に適用し、分類の正確さを算出した。

2.2.7 バイアル製剤のパラメーターを変動させた場合の振とう試験

溶液量, バイアル方向, バイアルサイズ, 粘度, タンパク質濃度及び温度を表 1 のとおり変化させ, ミクロン凝集体の生成に及ぼすパラメーターを検討した. 一回の振とう試験で変化させるパラメーターは 1 条件のみとした. その他のパラメーターは 2.2.2 項に記載した条件とした. このうち, 粘度を高めた溶液は, IgG in HB NaCl にスクロースを 54% (IgG54suc) 及び 66% (IgG66suc) 加えて調製した. VROC Initium 粘度計 (RheoSense) を用いて, 23°C で測定した IgG in HB NaCl, IgG54suc および IgG66suc の粘度は, それぞれ 0.9, 8.9 および 18.9 cP であった.

各条件のタンパク質溶液を充填した 3 本のバイアルを, TRE-200 を用いて 50 Hz 3.5 G, 4.1 G 及び 4.5 G で 24.0 時間振とうした (周波数及び加速度の設定は 2.2.2 項参照). 分析に十分な試料溶液を得るために, 分析前にこれら 3 本のバイアルを混合した. 振とう後のミクロン凝集体濃度を FIM で測定し ($n=3$), これらのパラメーター変動がミクロン凝集体生成の境界線に与える影響を評価した.

表 1 ミクロン凝集体生成の境界線に対して調査したパラメーター

Parameter	Condition
Quantity of solution	1 mL* and 2 mL
Vial orientation	Horizontal* and vertical
Vial size	16 x 33 mm* and 18 x 40 mm
Viscosity	0.9 cP*: IgG in HB NaCl 8.9 cP: IgG54suc 18.9 cP: IgG66suc
Protein concentration	0.5*, 5, and 10 mg/mL
Temperature	Room temperature (20-25°C)* and 5°C

*: 2.2.2 項に示した試験条件

2.2.8 統計解析

得られたデータは平均値をグラフにし、エラーバーとして標準偏差（以下、SD）を表示した。ミクロン凝集体生成の振とうによる増加の有無は、振とうを加える前の初期値の測定結果より平均値+3×SDを上回るか否かで判定した。3群以上のデータ間の有意差検定はTukey-kramer法により行い、有意水準1%または5%で検定を行った。

2.3 結果

2.3.1 輸送試験システムを用いた IgG in HB NaCl の振とう試験

トラック輸送中の振動がタンパク質凝集体生成に及ぼす影響を、実輸送時のトラックによる振動と同様な、3軸方向への振とうを加えて評価した⁵²。輸送試験システムを用いて、周波数と加速度をさまざまに組み合わせ、24.0時間までのIgG in HB NaClのモノマー及び可溶性タンパク質の初期値に対する残存率（リカバリー率）、振とう試験後に形成された可溶性タンパク質の含量に対するナノメートル凝集体の相対的な含量（%）（以下、ナノメートル凝集体（%））、サブマイクロメートル凝集体及びミクロン凝集体の濃度を評価した。

24.0時間まで振とうした際の、モノマー及び可溶性タンパク質（モノマーとナノメートル凝集体の合計量）のリカバリー率と、最小二乗法により求めた回帰直線を図6及び図7に示した。SE-HPLCの3回測定におけるリカバリー率のSDは、いずれの振とう条件においても1%未満と低い値であった。24.0時間の振とうにより、初期値の平均-3×SDを下回るモノマーのリカバリー率を示した条件について、初期値からリカバリー率が低下したと判断し、リカバリー率が低下しなかった条件（図6）と、リカバリー率が初期値より低下した条件（図7）に分けて示した。この基準は、リカバリー率が正規分布すると仮定した場合、平均±3×SDの範囲に99.7%のデータが収まる

ことを考慮して設定し、この範囲を超えるリカバリー率については、初期値から変化があったと判断した。リカバリー率が低下した条件については、初期値を含めて3ポイント以上のポイント数で試験を行い、リカバリー率が低下しなかった条件についても、24.0時間値を全条件で取得した。

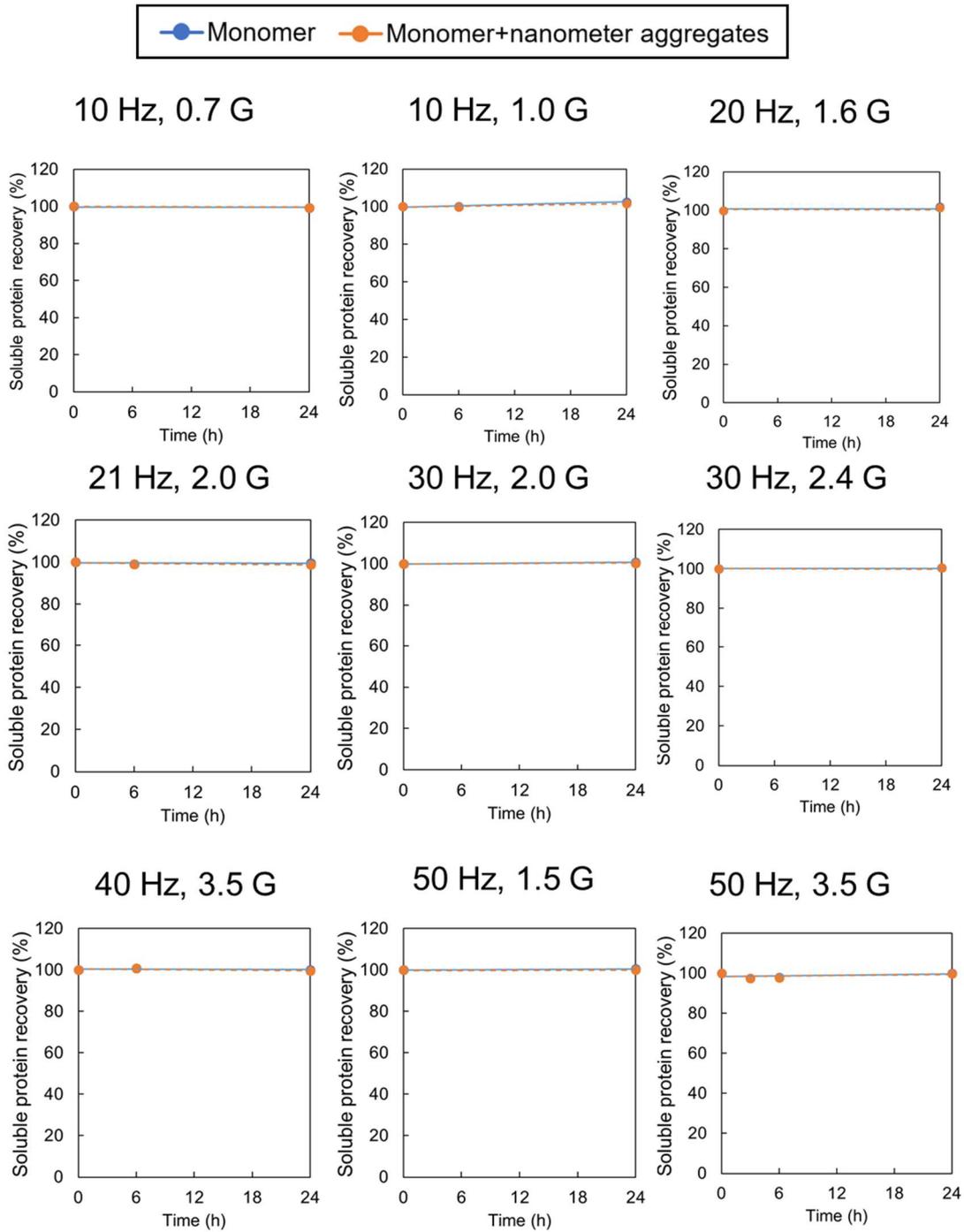


図 6 輸送試験システムで IgG in HB NaCl を振とう後のモノマーと可溶性タンパク質（モノマーとナノメートル凝集体の合計）のリカバリー率。SE-HPLC の 3 回注入における SD をエラーバーとした。振とう後のリカバリー率が、24.0 時間の振とうにおいても、初期値の平均 $-3SD$ を上回るモノマーのリカバリー率を示した条件の結果のみを示した。青：モノマー，橙：モノマー及びナノメートル凝集体の合計。

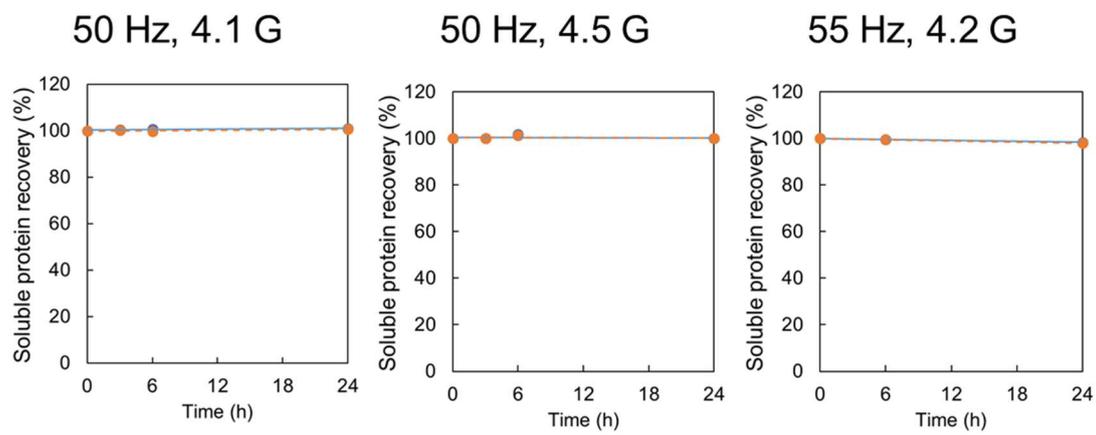


図 6 続き

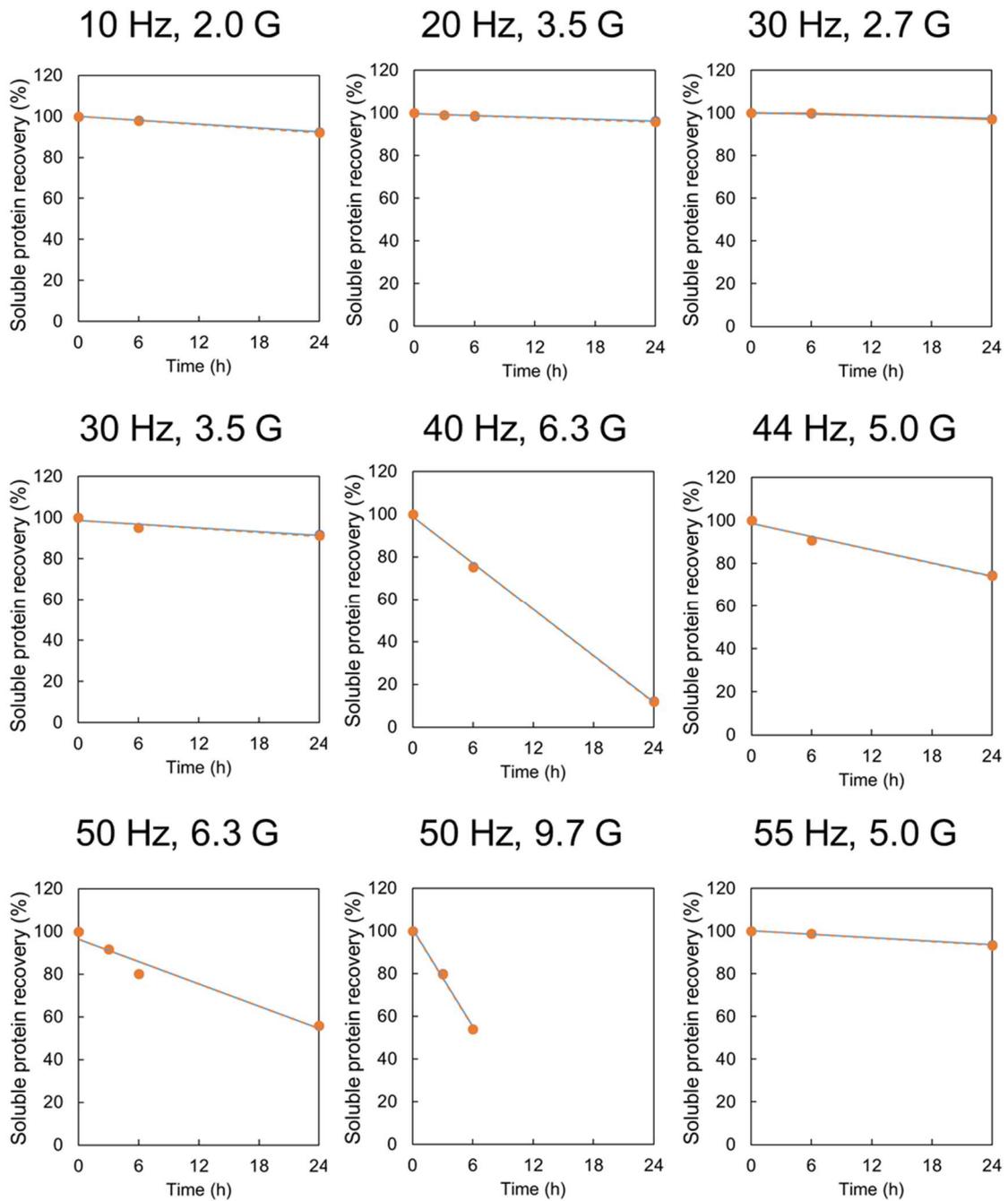


図 7 輸送試験システムで IgG in HB NaCl を振とう後のモノマーと可溶性タンパク質（モノマーとナノメートル凝集体の合計）のリカバリー率。SE-HPLC の 3 回注入における SD をエラーバーとした。24.0 時間の振とうにより、初期値の平均 $-3SD$ を下回るモノマーのリカバリー率を示した条件の結果のみを示した。青：モノマー，橙：モノマー及びナノメートル凝集体の合計。青：モノマー，橙：モノマー及びナノメートル凝集体の合計。

モノマーの消失速度（凝集や吸着の速度の指標となる）と、周波数、加速度の関係を把握するため、時間変化に対するリカバリー率の回帰直線の傾きを、モノマー消失速度係数、 k_{obs} と定義し、周波数及び加速度との関係を示すこととした。 k_{obs} を推定するための回帰直線は、直線関係が成立する時間範囲で得た（相関係数の二乗値 ≥ 0.85 ）。図 6 及び図 7 において、モノマーのリカバリー率と可溶性タンパク質（モノマーとナノメートル凝集体の合計量）のリカバリー率はグラフ上で重なった。もしモノマーの減少分が可溶性のナノメートル凝集体に変化しているのであれば、モノマーのみリカバリー率が低下し、可溶性タンパク質のリカバリー率は変化しないはずである。このことを考慮すると、この結果は、消失したモノマー及びナノメートル凝集体が、SE-HPLC で分析可能なナノメートル凝集体に取り込まれたのではなく、SE-HPLC では分析できない、より大きなサブマイクロメートル以上の不溶性凝集体となった結果と考えられた。

振とう後に生成したサブマイクロメートル凝集体濃度（0.3-2 μm ）を qLD 法で^{56,58}測定し（図 8）、ミクロン凝集体（ $\geq 2 \mu\text{m}$ ）濃度を FIM で測定した（図 9a）。また、 k_{obs} を図 9d に示した。ミクロン凝集体について、初期値として測定されたミクロン凝集体濃度（ $\geq 2 \mu\text{m}$ ）の平均に $3 \times \text{SD}$ を加えた値（1332 #/mL）（表 S 1）を基準として、ミクロン凝集体濃度が初期値から上昇した振とう条件（ $>1332 \text{ \#/mL}$ ）を赤色、ミクロン凝集体濃度が上昇しなかった条件（ $<1332 \text{ \#/mL}$ ）を青色で示した。この基準は、ミクロン凝集体濃度が正規分布すると仮定した場合、平均 $\pm 3 \times \text{SD}$ の範囲に 99.7%のデータが収まることを考慮して設定し、この範囲を超えるミクロン凝集体濃度については、初期値から増加したと判断した。

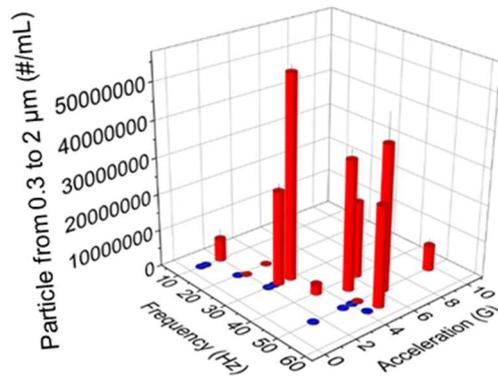


図 8 IgG in HB NaCl 中のサブマイクロメートル凝集体濃度 (0.3-2 μm , #は粒子数を示す). 輸送試験システムを用いて, 周波数と加速度の組み合わせを変えて 24.0 時間振とうした後の測定値. qLD 法の 3 回測定における SD をエラーバーとした. 赤: FIM でミクロン凝集体濃度が初期値より上昇した, 青: FIM でミクロン凝集体濃度が上昇しなかった.

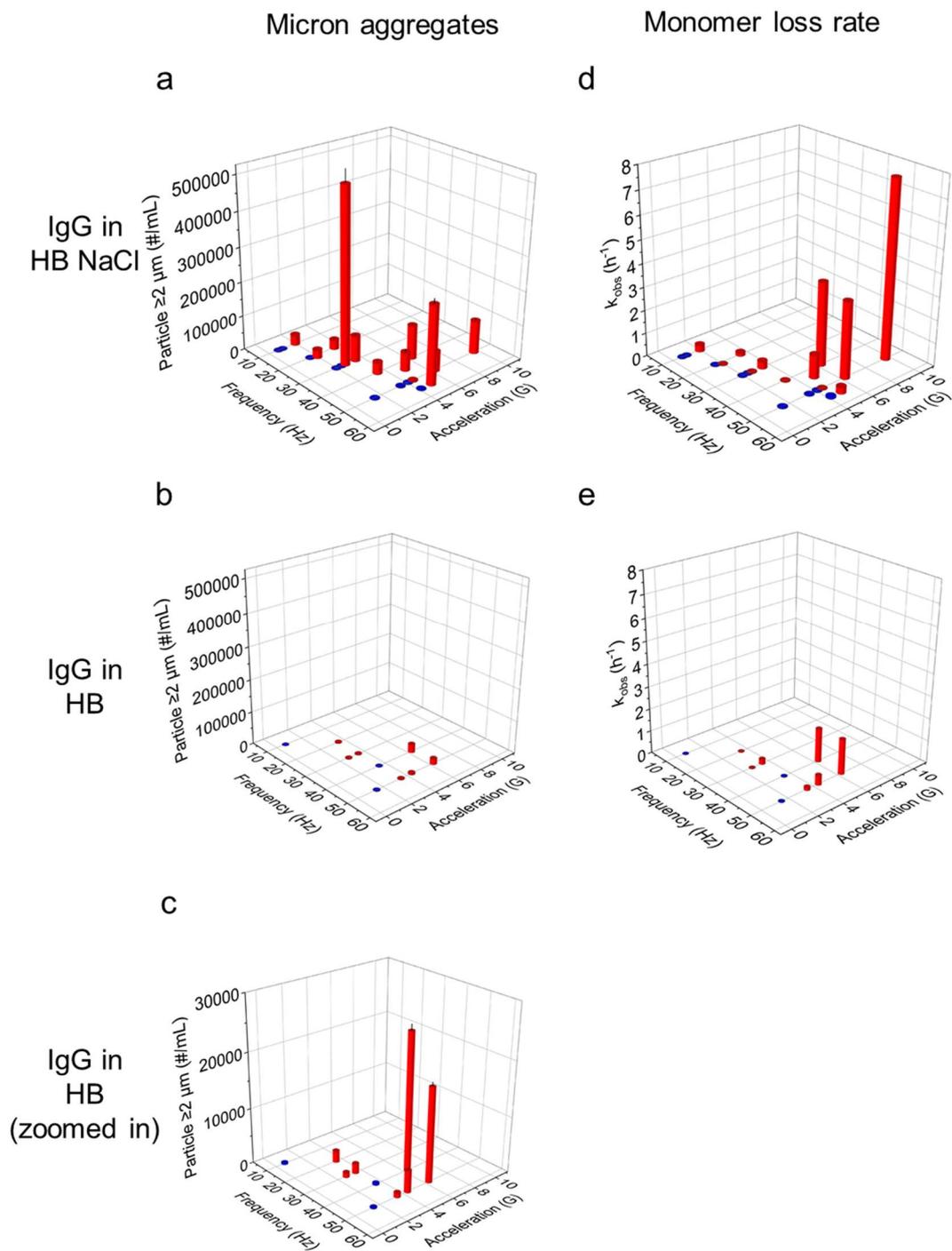


図 9 IgG in HB NaCl および IgG in HB のミクロン凝集体濃度 (#は粒子数を示す) とモノマー消失速度係数 (k_{obs}). 輸送試験システムを用いて, 周波数と加速度の組み合わせを変えて 24.0 時間振とうした後の IgG in HB NaCl 中のミクロン凝集体濃度 ($\geq 2 \mu\text{m}$) (a), IgG in HB 中のミクロン凝集体濃度 (b) 及び (b) の拡大図 (c). FIM の 3 回測定における SD をエラーバーとした. IgG in HB NaCl (d) と IgG in HB (e) における k_{obs} . 赤: ミクロン凝集体濃度が初期値より上昇した, 青: ミクロン凝集体濃度及

び可溶性タンパク質の含量に対するナノメートル凝集体の相対的な含量 (%) のいずれも上昇しなかった。

これらの結果から、10-55 Hz の周波数において、低い加速度ではミクロン凝集体及び k_{obs} に変化が認められなかったが、加速度の上昇とともにサブマイクロメートル凝集体濃度及びミクロン凝集体濃度が急激に上昇することが示唆された。なお、30 Hz 2.7 G の振とう条件では、他の条件と比較して高いミクロン凝集体濃度を示したため (図 9a)、3 回の繰り返し実験により再現性を確認した。その結果、ミクロン凝集体濃度にはばらつきが見られたものの、振とうによるミクロン凝集体濃度の増加及びモノマーの経時的な減少 (3 回測定時の k_{obs} の平均値 \pm SD は、 $0.1 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) は一貫して観察された (図 S 1)。

2.3.2 輸送試験システムを用いた IgG in HB 及び CTLA4-Ig in PB の振とう試験

IgG in HB NaCl で認められたミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線が、他の処方や別のタンパク質でも存在するか、次に検討した。

処方の影響については IgG in HB を、タンパク質の影響については、CTLA4-Ig in PB を用いることとし、各処方の凝集に対する安定性を比較するため、同じ振とう条件 (50 Hz 6.3 G) における振とう後のミクロン凝集体濃度を図 10 に示した。IgG in HB NaCl を基準にすると、IgG in HB は 0.14 倍、CTLA4-Ig in PB は 97 倍であり、CTLA4-Ig in PB と他の処方とは有意差が認められた。したがって、CTLA4-Ig in PB の凝集に対する安定性は他の処方よりも低いことが確認された。また、振とう時間については、CTLA4-Ig in PB の 6.0 時間後のモノマーリカバリー率が 30% 程度であり、24.0 時間より短い時間でモノマーが消失する可能性が考えられたことから、CTLA4-Ig in PB は 6.0 時間後のミクロン

凝集体濃度を用いた。

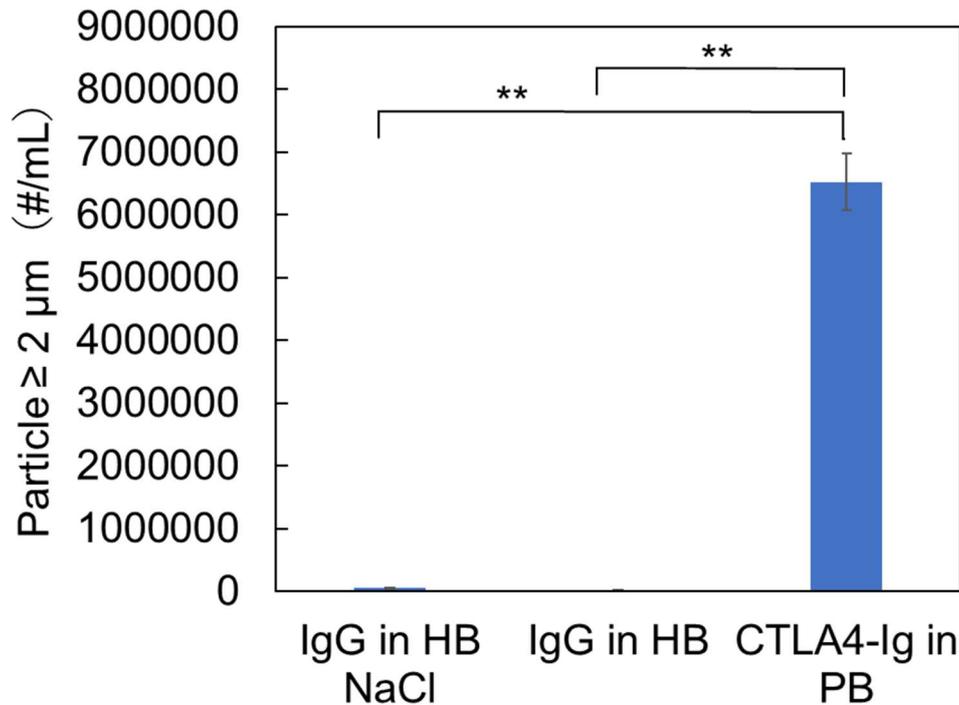


図 10 振とう試験 (50 Hz, 6.3 G) における 6.0 時間振とう後のミクロン凝集体濃度の比較 (#は粒子数を示す). FIM の 3 回測定における SD をエラーバーとした. **: Tukey-kramer 法の検定, $p < 0.01$.

処方の影響については, IgG in HB (IgG in HB NaCl から NaCl を除いた処方) を用いて, 凝集体生成に対する処方の影響を評価した結果を図 9b, 図 9c 及び図 9e に示した. IgG in HB NaCl と同様に, ミクロン凝集体濃度が上昇する条件としない条件を, 初期値の平均値 + $3 \times \text{SD}$ 値 (767 #/mL) (表 S 1) に基づいて判定した. その結果, IgG in HB NaCl と同様に, 10-55 Hz の周波数において, 加速度を高めていくと, ミクロン凝集体濃度及び k_{obs} が急激に上昇する現象が認められた.

次に, 別のタンパク質溶液の振とうに対する安定性を, CTLA4-Ig in PB を用いて評価した. 各振とう条件で振とうした際のモノマー及び可溶性タンパク質のリカバリー率を図 11 に示した. その結果, IgG in HB NaCl と同様に, 加速度を高めると, ミクロ

ン凝集体濃度が急激に上昇する現象が認められた。CTLA4-Ig in PB においては、①モノマーのリカバリー率のみが低下し、可溶性タンパク質のリカバリー率が低下しない条件と（図 11）、②IgG in HB NaCl と同様に（図 7）、モノマーと可溶性タンパク質のリカバリー率の両方が同様に低下する条件（図 12）の 2 種類が確認された。なお、モノマーのリカバリー率低下の有無は、初期値の平均値 $-3SD$ の値を基準に判定した。

①の振とう条件の代表的なクロマトグラムを図 13 に示した。この図から、モノマーのピーク面積が経時的に減少するにつれて、可溶性のナノメートル凝集体のピーク面積が上昇していることがわかる。その結果、可溶性タンパク質のリカバリー率は低下していないことから、①の条件では、モノマーがナノメートル凝集体に変化しており、それ以上大きな不溶性凝集体にはなっていないことが示唆された。

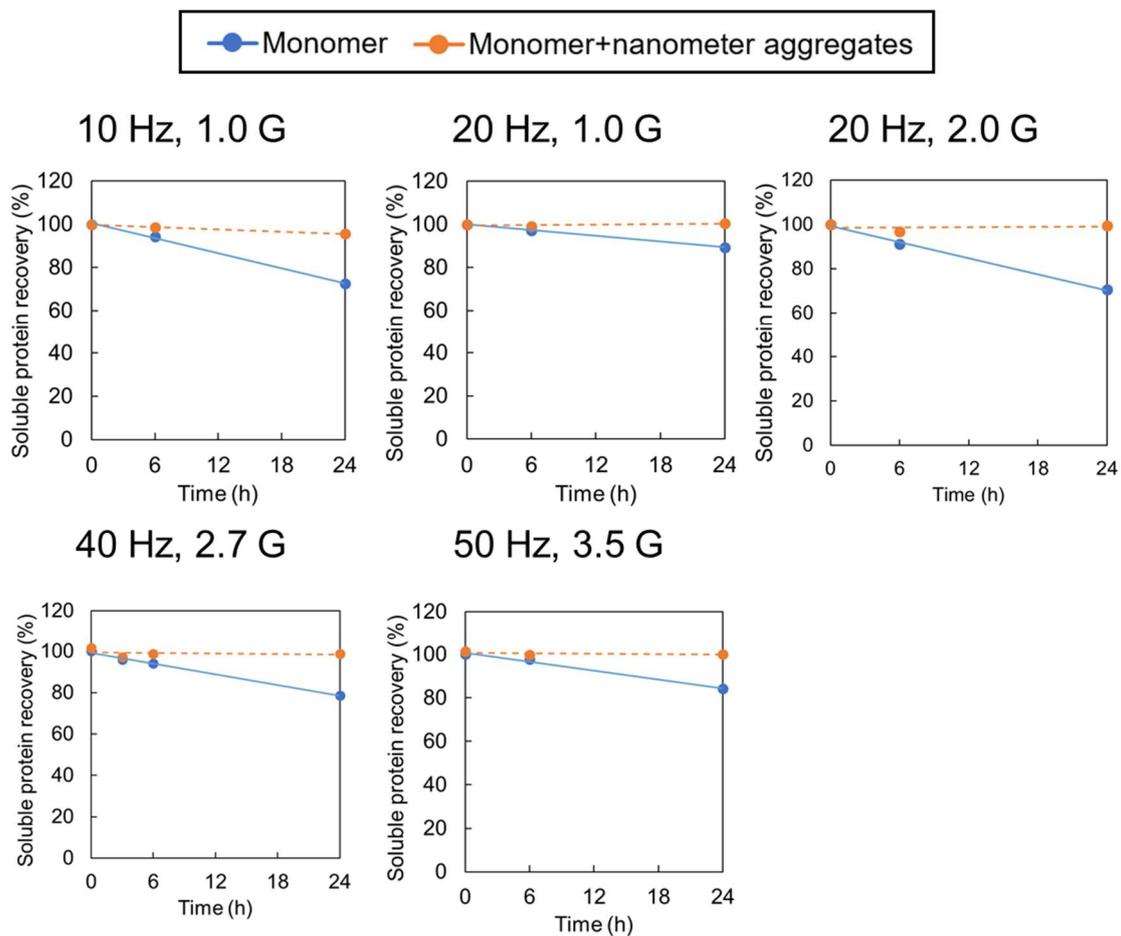


図 11 輸送試験システムで CTLA4-Ig in PB を振とうした後のモノマーと可溶性タンパク質（モノマーとナノメートル凝集体の合計）のリカバリー率. モノマーのリカバリー率のみが低下する条件を示した. SE-HPLC の 3 回注入における SD をエラーバーとした. 青：モノマー，橙：モノマー及びナノメートル凝集体の合計.

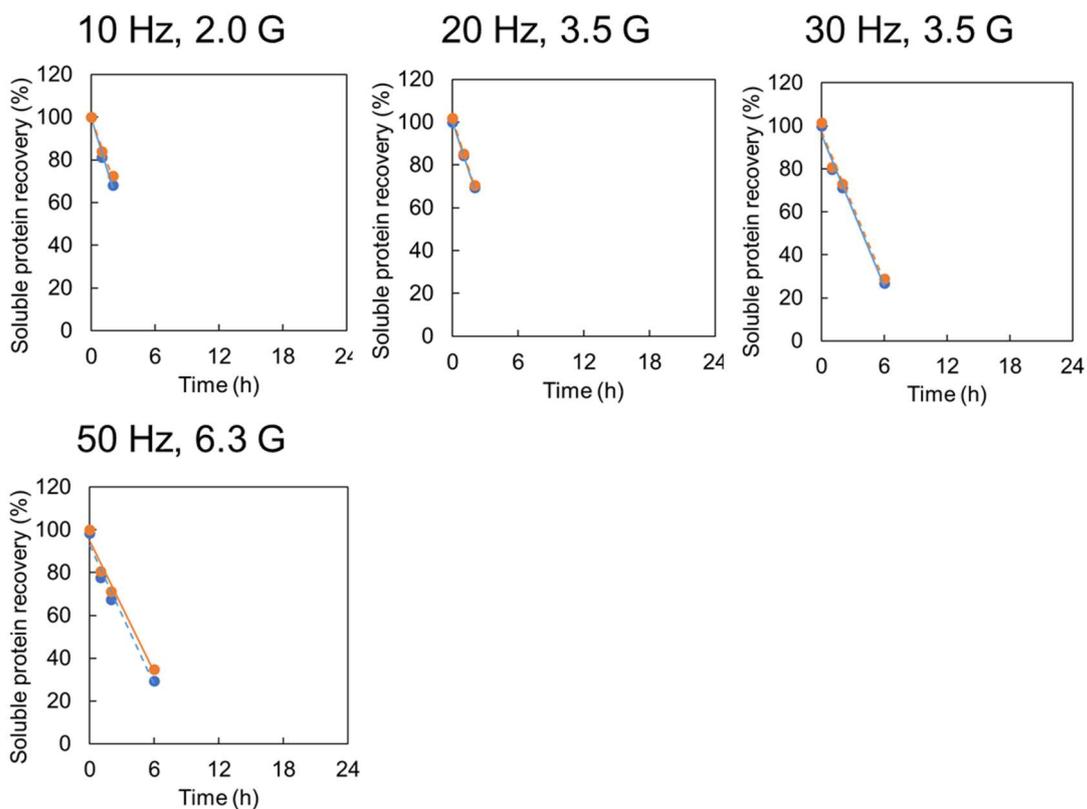


図 12 輸送試験システムで CTLA4-Ig in PB を振とうした後のモノマーと可溶性タンパク質（モノマーとナノメートル凝集体の合計）のリカバリー率. モノマーと可溶性タンパク質のリカバリー率がいずれも低下する条件を示した. SE-HPLC の 3 回注入における SD をエラーバーとした. 青：モノマー，橙：モノマー及びナノメートル凝集体の合計.

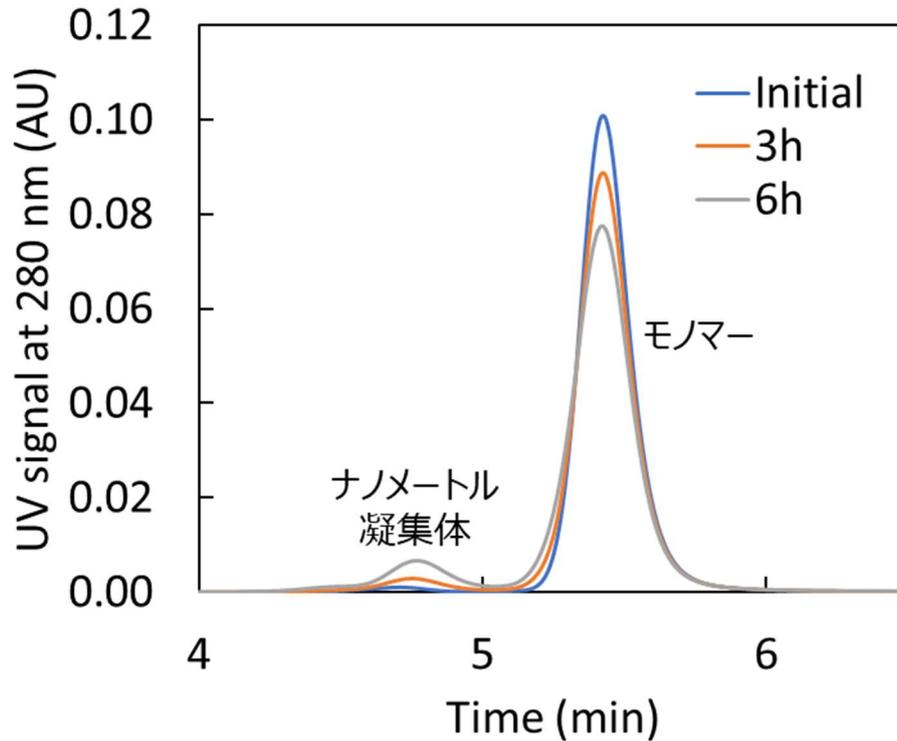


図 13 輸送試験システムで CTLA4-Ig in PB を 40 Hz 2.7 G で振とうした際のサイズ排除クロマトグラム. 青：振とう前，橙：振とう後 3.0 時間，グレー：振とう後 6.0 時間の結果を示した.

周波数，加速度と凝集の関係を評価するため，6.0 時間振とうした CTLA4-Ig in PB につき，ミクロン凝集体及び k_{obs} を図 14a 及び図 14b に示した. ミクロン凝集体濃度の上昇の有無は，初期値のミクロン凝集体濃度の平均値 + 3 × SD 値 (20,673 #/mL) (表 S 1) に基づいて判定した.

ナノメートル凝集体 (%) については，IgG と CTLA4-Ig の試料間で異なる挙動が観察された. ナノメートル凝集体 (%) は，IgG in HB NaCl では振とうの有無に関わらず，経時的に増加しなかった一方 (表 S 2)，CTLA4-Ig in PB では振とう，静置いずれの条件でもナノメートル凝集体の比率が増加した. さらに，ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に関わらず，振とうによりナノメートル凝集体の量が静置条件に比べて増加したことから，振とうにより，ナノメートル凝集体の生成が加速されたと考えられた (図 14c および図 14d).

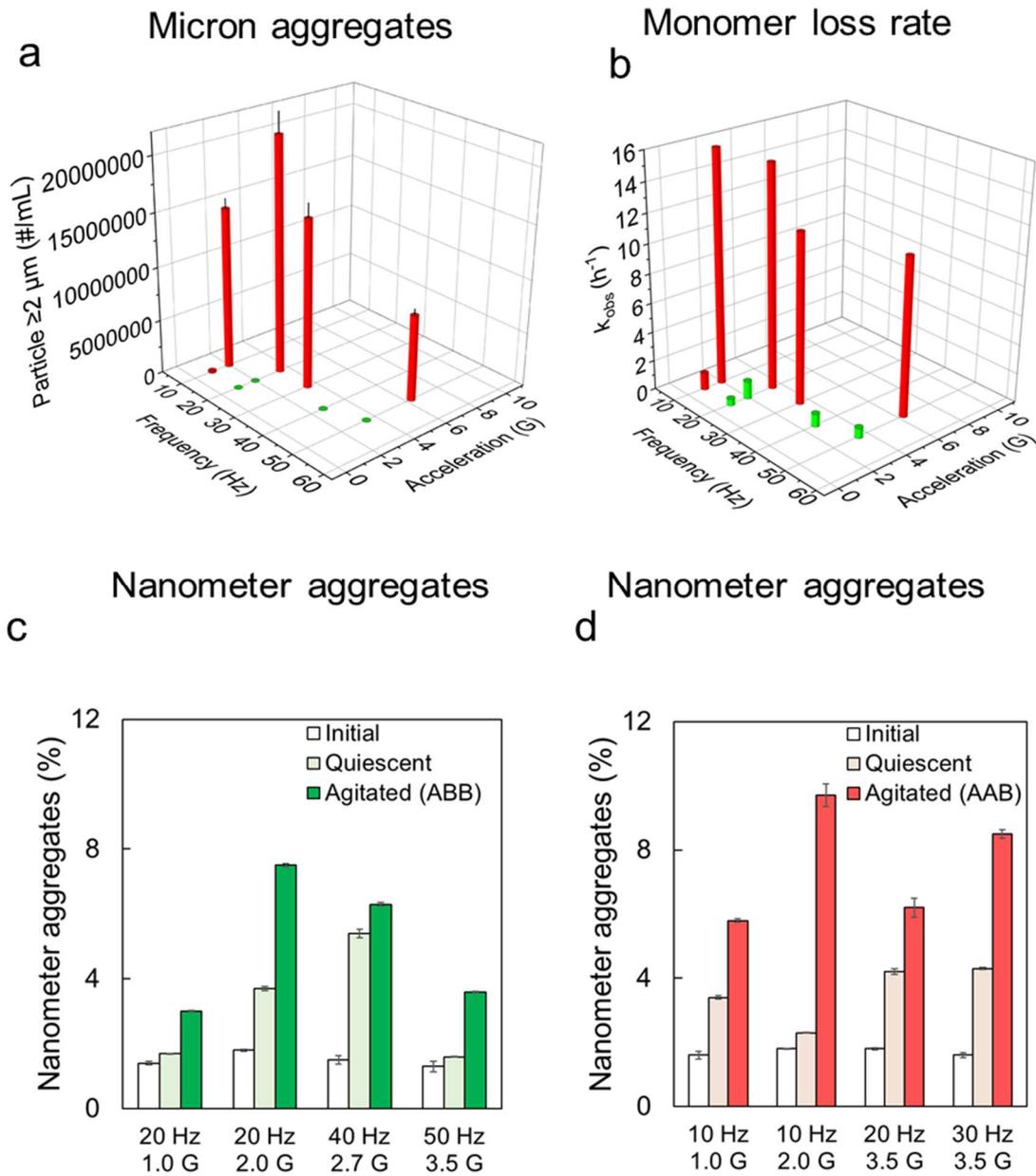


図 14 輸送試験システムを用いて、周波数と加速度の組み合わせを変えて振とうした CTLA4-Ig in PB のミクロン凝集体濃度 (#は粒子数を示す)、モノマー消失速度係数 (k_{obs}) 及びナノメートル凝集体比率. (a) 6.0 時間振とう後のミクロン凝集体 ($\geq 2 \mu\text{m}$) 濃度. FIM の 3 回測定における SD をエラーバーとした. (b) モノマー消失速度係数, k_{obs} . 赤: ミクロン凝集体濃度が初期値より上昇した. 緑: ミクロン凝集体濃度は上昇しなかったが、自発的にナノメートル凝集体濃度が上昇した. ミクロン凝集体濃度が上昇しなかった振とう (ABB) (c) またはミクロン凝集体濃度が上昇した振とう (AAB) (d) を加えた CTLA4-Ig in PB 中のナノメートル凝集体の可溶性タンパク質に対する相対比率.

2.3.3 IgG in HB NaCl, IgG in HB 及び CTLA4-Ig in PB におけるミクロン凝集体生成の境界線

図 9a, 図 9c, 図 14a に示すように, 各周波数において, 加速度を上げていくと, 急激にミクロン凝集体濃度が上昇した. これは, ミクロン凝集体生成が加速度に伴って徐々に増加するわけではなく, ある境界をもって, 変化する反応であると考えた. そこで, ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を各処方と比較するため, 教師あり機械学習による 2 種類の異なるクラス間のギャップを最大化する境界線を決定するアルゴリズムである⁵⁹, 線形 SVM を用いて, ミクロン凝集体生成の有無を分ける境界線を推定した.

まず, IgG in HB NaCl のデータに対して, ミクロン凝集体濃度が上昇する振とう条件と増加しない振とう条件の周波数と加速度を入力データとして, 誤分類が最も少なくなるパラメーターを用いて (コストパラメーター: 67.14), 線形 SVM により境界線を得た (図 15a). その後, IgG in HB 及び CTLA4-Ig in PB に適用し (図 15b 及び図 15c), 分類の正確さを算出したところ, 79.0%であった. 誤分類された条件は, IgG in HB の 50 Hz 3.5 G の条件を除いては, 境界線の加速度からの差が 0.1 G, 0.2 G, 及び 0.2 G であり, 境界線に近い条件であったことを考慮すると, ミクロン凝集体生成の境界線は処方にかかわらず, 同様の境界線であることが示唆された.

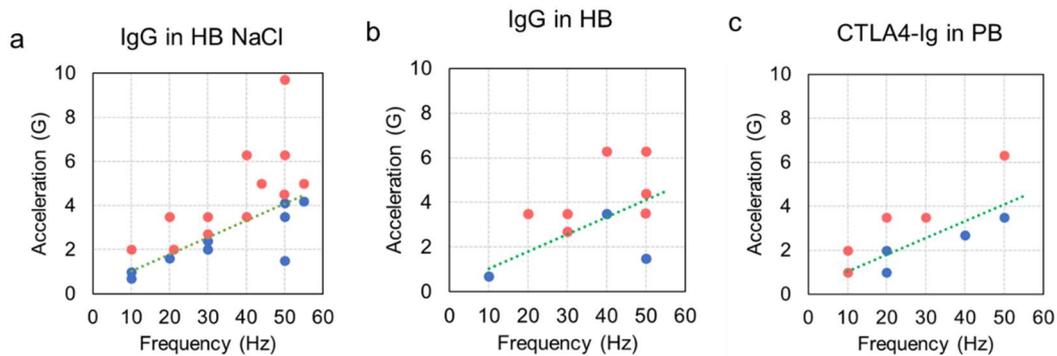


図 15 ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線. (a) IgG in HB NaCl のデータを学習データとして SVM により求めた境界線, (a) で得られた境界線を IgG in HB (b) 及び CTLA4-Ig in PB に適用した(c). 赤: ミクロン凝集体濃度が初期値より上昇した振とう条件, 青: ミクロン凝集体濃度が上昇しなかった振とう条件.

2.3.4 ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に影響を与える要因

上記の検討は、バイアルを横向きで固定し、液量、バイアルサイズ、タンパク質濃度、溶液粘度及び温度を固定した条件で実施した。一方、実際のタンパク質医薬品は、様々な条件で輸送されることから、条件を変更した際にミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線がどのように変化をするかを理解することは、輸送時の凝集体の抑制や評価法確立において重要である。そこで、溶液充填量、バイアルの向き、バイアルサイズ、粘度、温度及びタンパク質濃度を表 1 に示した条件で変化させて振とう試験を実施し、IgG in HB NaCl 中のミクロン凝集体濃度を FIM で評価した。2.2.2 項で検討した条件においては、50 Hz 4.1 G ではミクロン凝集体濃度に変化が認められなかった一方で、50 Hz 4.5 G 以上の加速度ではミクロン凝集体濃度が上昇したことから、50 Hz においては 4.1~4.5 G にミクロン凝集体生成に関する振とうの加速度の境界線が存在すると考えられた。そこで、本検討では、50 Hz 3.5 G, 4.1 G 及び 4.5 G の 3 条件で振とう試験を実施した。

各条件で 24.0 時間振とうした後のミクロン凝集体濃度を図 16 に、変動させた製剤の各パラメーターが、周波数 50 Hz でのミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に及ぼす影響を表 2 にまとめた。初期値からミクロン凝集体濃度が上昇した振とう条件をピンク色で、ミクロン凝集体濃度に変化が無かった条件を青色で示した。ミクロン凝集体濃度は、初期値の平均値+3SD を上回った場合に上昇したと判断した。製剤の変動要因がミクロン凝集体生成に関する振とうの加速度の境界線に与える影響は、2.2.2 項で用いた条件における加速度の境界線が含まれる範囲 (4.1~4.5 G) を基準とし、その条件から変動するミクロン凝集体生成の加速度の境界線を基準に評価した。溶液の充填量が多い場合、バイアルを垂直方向に固定した場合に、基準の条件と比較して、より低い加速度でミクロン凝集体が増加した。したがって、溶液の充填量を増やすこと、バイアルの向きを横から縦に変更することは、ミクロン凝集体生成に関する振とうの加速度の境界線の加速度を低下させたと判断した。一方、バイアル瓶が大きい場合 (18 × 40 mm)、基準の条件よりも高い加速度である 4.5 G で振とうしてもミクロン凝集体濃度は変化しなかった。したがって、バイアル瓶が大きい場合、ミクロン凝集体生成に関する振とうの加速度の境界線は上昇したと考えられた。溶液の粘度、温度及びタンパク質濃度は、本検討で評価した範囲内ではミクロン凝集体生成の境界線に影響を与えなかった。

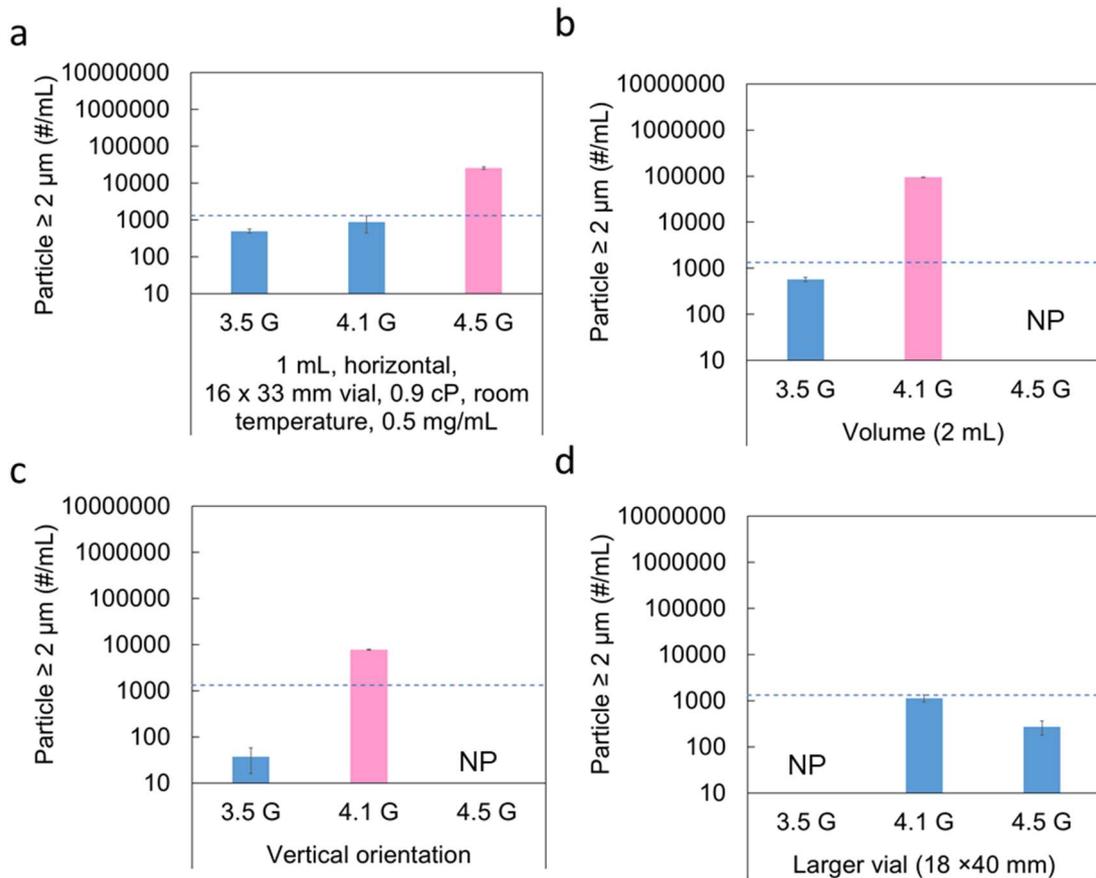


図 16 バイアル製剤に関する各種パラメーターの変化がミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線の加速度に与える影響. 50 Hz, 各加速度における振とう後, FIM で 3 回測定した平均のミクロン凝集体濃度. a: 2.2.2 項の条件, b: 溶液量: 1 mL から 2 mL に変更, c: バイアルの向き: 横から縦に変更, d: バイアルサイズ: 16 x 33 mm から 18 x 40 mm に変更, e, f: 粘度: 0.9 cP から 8.9 cP (e) 及び 18.9 cP (f) に変更, g: 温度: 室温から 5°C に変更, h, i: タンパク質濃度: 0.5 mg/mL から 5 mg/mL (h) 及び 10 mg/mL (i) に変更. ミクロン凝集体濃度の上昇の有無を初期値の平均値+3 SD (図中の点線) を基準に判定し, ミクロン凝集体濃度が上昇した結果をピンク, 上昇しなかった結果を青で示した. 実施しなかった振とう条件を NP で示した.

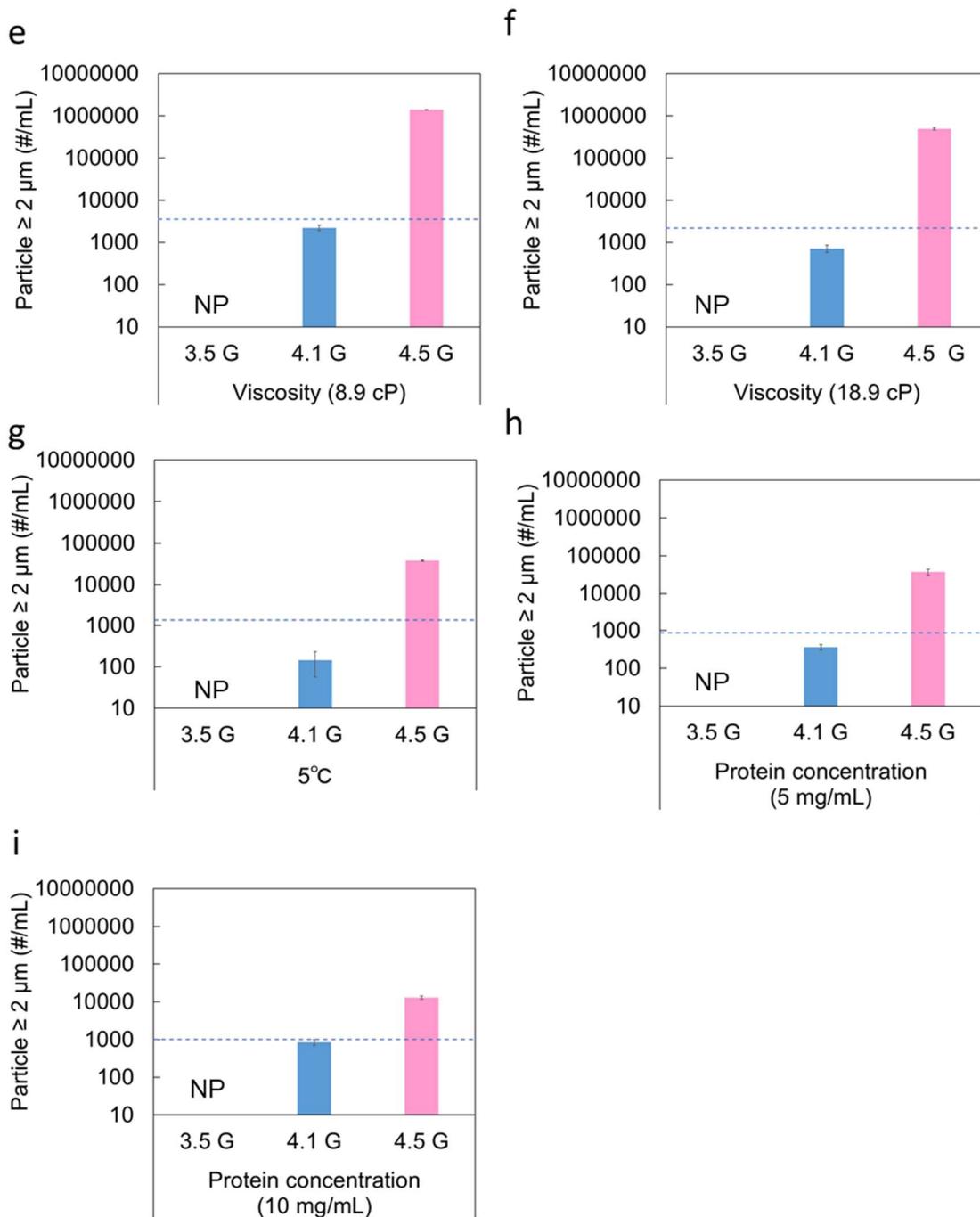


図 16 続き

表 2 各パラメーターがミクロン凝集体生成の境界線の加速度に及ぼす影響のまとめ

パラメーター	ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線の加速度の変化
溶液量 1 → 2 mL	低下
バイアルの向き 横→縦	低下
バイアルサイズ 16 x 33 mm→18 x 40 mm	上昇
粘度 0.9 cP→8.9 cP, 18.9 cP	変化無し
温度 室温→5°C	変化無し
タンパク質濃度 0.5 mg/mL→5 mg/mL, 10 mg/mL	変化無し

2.4 考察

輸送中のタンパク質溶液の凝集における低 g 力の重要性は認識されてきたが⁴³, 振動の周波数や加速度と凝集の関係については, これまで詳細な評価がされていなかった. 本研究では, 凝集体生成に対する安定性が異なる 3 種類のタンパク質処方に対して, 輸送試験システムを用いて, 低 g 力に着目した実験を行った. IgG in HB NaCl 及び IgG in HB は, タンパク質医薬品として広く用いられている IgG 製剤のモデルとして使用した. 本検討で使用した IgG の等電点は約 8.7 であり (SEDNTERP による計算値), IgG in HB 及び IgG in HB NaCl はいずれも pH 6.0 となるように調製した. この pH では, タンパク質の正味電荷は正に荷電しており, 正電荷同士の反発により, コロイド安定性が維持されている. これに対して, 溶液中に NaCl を追加すると, 電荷が遮蔽されることにより IgG のコロイド安定性が低下し, IgG in HB より IgG in HB NaCl の方が, 凝集体が生成しやすくなることを期待し, 2 種類の処方を選定した^{60,61}. また, 異なるタンパク質溶液として, CTLA4-Ig in PB も用いた. この処方の pH は, CTLA4-Ig の等電点 (pH 5.1, 実験値) に近く⁶², コロイド安定性が低いことから, IgG 製剤よりも凝集に対する安定性が低いことが過去の研究で示されている⁶².

2.4.1 振とうの周波数、加速度と凝集体生成の関係

IgG in HB, IgG in HB NaCl 及び CTLA4-Ig in PB のそれぞれのタンパク質溶液に対して、10~55 Hz の周波数及び 0.7~9.7 G までの加速度の範囲で周波数と加速度を変動させて振とう実験を行った結果、2.3.3 項に示したミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を超えるまでは変化が無かったことに対し、加速度の境界線を超えると、ミクロン凝集体濃度の急激な上昇が認められた。より小さな凝集体である、ナノメートル凝集体は、IgG in HB NaCl 及び IgG in HB のいずれの条件においても増加しなかった。一方、CTLA4-Ig in PB においては、周波数と加速度におけるミクロン凝集体生成の境界線に関わらず、振とうを加えることで、静置時に比べてナノメートル凝集体濃度が上昇した。これらの結果の概要を図 17 にまとめた。

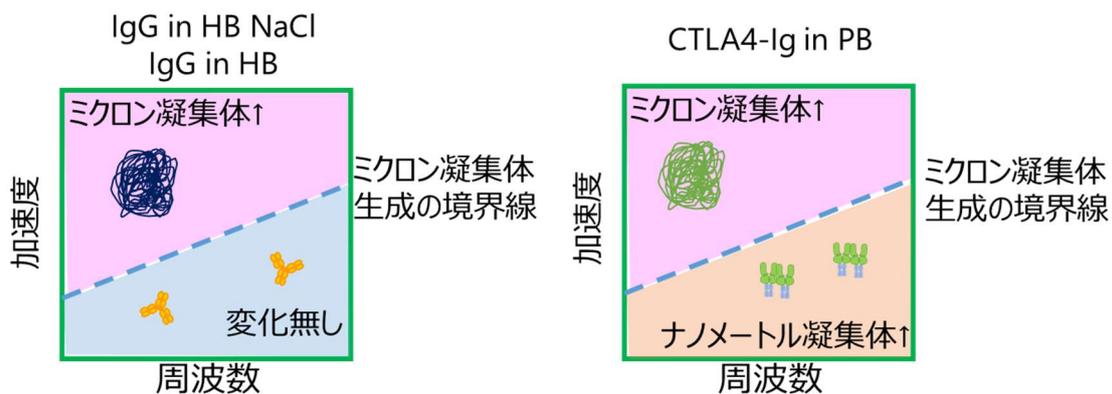


図 17 輸送試験システムによる各種振とう条件とミクロン凝集体およびナノメートル凝集体の振とう後の変化の関係。

興味深いことに、振とうによって生じるミクロン凝集体濃度は、IgG in HB NaCl 及び IgG in HB と比較して、CTLA4-Ig in PB の方が高く、凝集に対する安定性は各処方異なることが示唆されたのに対し、ミクロン凝集体生成の境界線は 3 種類のタンパク質処方共通であると考えられた。このことから、低 g 力によるミクロン凝集体生成の境界線には、タンパク質の特性ではなく、マクロな溶液の動きが影響することが示唆された。

ミクロン凝集体生成の境界線を下回る加速度の振とうであっても、CTLA4-Ig in PB ではナノメートル凝集体が低 g 力により増加した。CTLA4-Ig in PB では、室温で数時間静置した場合にも自発的にナノメートル凝集体が増加する条件であった点が IgG 処方との違いであった。したがって、自発的にナノメートル凝集体が生成する場合、境界線を下回る、弱い振とうであってもその凝集生成が促進されたと考えられた。

なお、IgG in HB NaCl の検討において、サブマイクロメートル凝集体及びミクロン凝集体濃度の上昇は、いずれもミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を超えた値で認められたことから、以後の検討は、ミクロン凝集体濃度を中心に評価することとした。また、ミクロン凝集体濃度の上昇と比べると、モノマー減少速度が上昇するのは、より高い加速度を加えた場合であった。このような現象は先行研究でも認められており²⁵、1%に満たないモノマー減少であっても、ミクロン凝集体濃度が上昇するため、ミクロン凝集体濃度の変化がより細かい変化を捉えたと考えられた。

また、サブマイクロメートル凝集体やミクロン凝集体のように不溶性凝集体の場合は、一般に、不可逆的な凝集であることが多いと考えられている²⁸。したがって、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を上回る振とう実験では、凝集体からモノマーに戻る反応は無いものと考えて解析した。その結果、図 7 では、境界線を上回る振とうにより、モノマーのリカバリー率は、時間とともに直線的に減少しており、直線の回帰直線で良好な相関係数が得られた。さらに、40 Hz 6.3 G の条件では 10% 程度のリカバリー率まで直線状の減少が続いていることなども考慮すると、ミクロン凝集体の生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を上回る振とうでは、凝集体への反応が不可逆的に進むことが支持された。一方、ナノメートル凝集体は可逆的な反応を示すこともあり¹⁷、可逆的な凝集が生じている可能性がある。本研究ではナノメートル凝集体の可逆性を評価する実験を実施しておらず、詳細な考察にはさらなる研究が必要である。

2.4.2 ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に影響を与える因子

ミクロン凝集体生成における周波数と加速度の境界線を超えると急激にミクロン凝集体濃度が上昇する現象が、溶液量やバイアルサイズなどが変わっても生じるか否かを確認するため、IgG in HB NaCl の製剤に関する様々なパラメーターを、実際の製剤で生じ得る範囲で変動させた(表 1)。このパラメーターについては、タンパク質濃度は IgG の市販製剤の濃度 (10 mg/mL) を上限に設定した。粘度が 20 cP 以上の溶液は充填時の押し出しが難しくなるとされているため⁶³, 20 cP を上限に粘度を設定した。その結果、溶液量、バイアルの向き、バイアルサイズ、溶液粘度、温度及びタンパク質濃度を変化させても、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を境に急激なミクロン凝集体濃度の上昇が認められたことから、周波数と加速度の境界線を越えるとミクロン凝集体が上昇する現象は、溶液量やバイアルの向きなどといった製剤の条件によらずに、発生する現象と考えられた。

さらに、このミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線と、各種製剤パラメーターとの関係を確認したところ、本研究で評価した変動範囲では、タンパク質濃度、溶液粘度、温度は境界線に影響を与えなかった。一方、溶液の充填量を増やした場合、バイアルの固定方法を横向きから縦向きにした場合は境界線の加速度が低くなり(つまり、より低い加速度でミクロン凝集体が生成した)、一方、バイアルサイズが大きい場合は境界線の加速度が高くなることがわかった。したがって、このミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線は、製剤条件により変動すると考えられた。なお、PFS など別の容器を用いた場合、ミクロン凝集体生成の境界線は異なると考えられるが、本研究はバイアル製剤に着目した研究であり、他の容器については今後の検討課題である。

2.4.3 輸送時の振動に対する安定性評価

本研究は、輸送時の凝集体を評価する方法の点からも重要である。Fleischman らは、輸送試験システムを用いて ASTM D4169 に準拠したランダム波振動試験を実施し、実輸送時に生成するミクロン凝集体濃度を再現することに成功した²⁵。著者らは、他にもボルテックスミキサー、オービタルシェイカー等も検討したが、実輸送時のミクロン凝集体濃度を複数の処方、容器のいずれに対しても再現した方法はランダム波振動試験のみであった。このように、輸送試験システムを用いたランダム波振動試験は、実輸送時のミクロン凝集体生成を予測する上で有用な評価手法と言える。

このランダム波振動試験は、貨物への損傷の再現を考慮して開発されており、振動の強度（加速度）を高くすることで、振動の負荷を高め、試験時間を短縮して実施される（加速試験）こともある⁶⁴。一方、タンパク質医薬品においては、加速試験と実輸送時の結果が一致しなかったことを理由に、経験的に加速条件を採用しない製薬会社もあるが⁶⁵、なぜ加速試験が実輸送を再現しなかったかは不明なままであり、何に留意してランダム波振動試験を実施すべきかは分かっていなかった。この理由についても、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線が影響している可能性が考えられた。例えば、実輸送時の振動加速度がミクロン凝集体生成の境界線未満であった場合、時間短縮のために振動の加速度を高めることにより、ミクロン凝集体生成の加速度の境界線を超え、ミクロン凝集体の生成リスクを正確に評価できない可能性があるためである。これを避けるための最も確実な方法は、実輸送レベルの加速度を与え、試験時間短縮を避けることである。加速条件を設定する場合にも、実輸送の加速度の場合と、時間短縮時の加速度で事前に比較するといった評価が必要という情報が、本研究から提案できる。

輸送時に生成する凝集体濃度を予測するという目的では、上記のランダム波振動試験が有用であるが、特殊な輸送試験システムが必要であり、一般的に用いられる機器では

ない。そこで、製剤化検討段階で振とうに対する凝集体生成リスクを評価する一般的な手法としては、二次元方向に振とうするシェイカーやオービタルシェイカーを用いた強制劣化試験が広く行われている^{66,67,68}。これらの試験器と、本研究で得られた輸送試験システムを用いた試験結果との関係について、周波数や加速度と、ミクロン凝集体生成の境界線の比較に基づいて以下のとおり考察した。

先行研究における水平振とう^{50,69,70}およびオービタルシェイカー^{25,40}の振とうにつき、その周波数と振幅に基づいて周波数と加速度を算出したところ、いずれの振とうも2G以下の加速度であり、低g力を発生させていると考えられた⁴³。これらの先行研究において、不溶性凝集体（ミクロン凝集体が含まれる）の生成の有無を、周波数と加速度のグラフにプロットした。このグラフに、本研究で得られたミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線（2.3.3項）を1Hzまで外挿した直線を重ねたところ、先行研究において不溶性凝集体濃度が上昇した条件としなかった条件の近傍を通過することが確認された（図18）。これらの結果から、本研究では三次元方向の振とうを加えたが、その研究で得られたミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線は、二次元方向の振とうにおける境界線と近いものであることが示唆された。先行研究で強制分解試験として実施されているオービタルシェイカーの振とうレベルは、この境界線を上回る条件である^{67,68}ことから、オービタルシェイカーを用いた振とう試験は、境界線を上回る加速度で生成する、ミクロン凝集体生成のリスクを評価するには有用であると考えられた。一方で、包装や輸送方法等の改善により、溶液にかかる振動レベルを下げることで、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線よりも低い加速度に抑えることを目的とする場合は、輸送試験システムを用いたランダム波振動試験等が有用であると考えられ、目的に応じた評価方法の使い分けが重要である。なお、本研究で得られたミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を下回る条件でも、Epplerら⁵⁰やMahlerら⁶⁹の先行研究で不溶性の凝

集体濃度が上昇したのは (図 18), 溶液の充填量やバイアルサイズなどといった, 周波数と加速度の境界線に影響する因子が統一されていないことに起因した可能性がある.

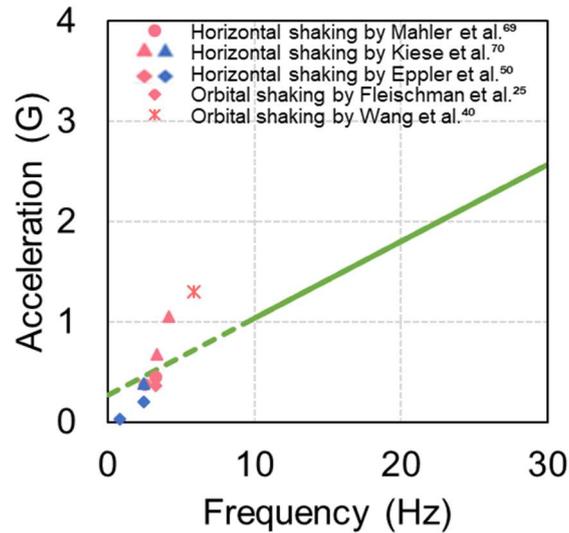


図 18 先行研究における水平シェーカー及びオービタルシェーカーを用いた場合の周波数及び加速度と不溶性凝集体生成の有無. 緑色の実線: 本研究で得られたミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線. 緑色の破線: ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線の外挿線. 赤色: 不溶性凝集体濃度が上昇した, 青色: 不溶性凝集体濃度が上昇しなかった.

第3章 低g力による凝集体生成メカニズム解明

3.1 背景

第2章では、周波数と加速度が一定の範囲内の時、振とうによりミクロン凝集体濃度が急激に上昇すること、また、自発的にナノメートル凝集体が増加する処方においては、加速度に関わらず、振とうがナノメートル凝集体の生成を促進することが確認された。ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線は、3種類の異なるタンパク質溶液で共通であったこと、また、溶液量、バイアルサイズ、バイアルの向きで変化したことから、タンパク質溶液の物性というより、マクロな液体の動きに起因する可能性が示唆された。そこで次に、具体的にどのような溶液の動きがミクロン凝集体生成を引き起こすのか、どういった経路で凝集体を増加させるかについて検討した。凝集体生成に至る要因を明らかにすることで、原因に基づく凝集体抑制方法や、原因を考慮した評価法の提言につながると期待されたことから、第3章ではミクロン凝集体生成及びナノメートル凝集体の生成促進のメカニズムを検討した。

第1章で記載したとおり、先行研究において、低g力による、界面を介したミクロン凝集体の生成が報告されていることから、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を越える条件での振とうによるミクロン凝集体濃度の上昇にも界面が関与している可能性を考えた。一方で、この境界線に関わらずナノメートル凝集体の生成を促進増加させるメカニズムについては、先行研究が無く、不明であったため、界面が寄与した可能性から評価した。

3.2 試料及び方法

3.2.1 試料

2 mL COP バイアルは、大和特殊硝子株式会社から購入した（以下、特に記載しない場合、バイアルはホウケイ酸ガラスバイアルを示す）。COP バイアルを超純水（18.2 M Ω フィルター）で3回洗浄し、121°Cで20分間、オートクレーブで滅菌した。PS80 は日本油脂から、シリコンオイル（MED-360）は、Avantor, Inc.から購入した。P188（Kolliphor® P 188 Bio）はBASF社から提供された。

PS80 を含む IgG in HB NaCl や P188 を含む CTLA4-Ig in PB は、2 倍の濃度で界面活性剤を含む溶液を、緩衝液で2倍希釈して調製した。例えば、1.6%P188 PB を PB で2倍希釈し、0.8%P188 PB を得た。その他の試薬は、2.2.1 項を参照した。

3.2.2 輸送試験システムを用いた振とう試験

2.2.2 項と同様に実施した。

3.2.3 SE-HPLC によるモノマー及びナノメートル凝集体評価

2.2.3 項と同様に実施した。

3.2.4 FIM によるミクロン凝集体濃度の分析

2.2.4 項と同様に実施した。

3.2.5 統計解析

得られたデータは平均値をグラフにし、エラーバーとしてSDを表示した。Welch's t-test をデータ間の有意差を決定するために用い、有意水準5%で検定した。

3.2.6 振とうによる、バイアルに吸着したタンパク質の剥離

IgG in HB NaCl を充填した 3 本のバイアルを、輸送試験システムを用いて 50 Hz 9.7 G で 24.0 時間振とうし、バイアル表面にタンパク質を吸着させた。溶液を除き、バイアルを超純水 (18.2M Ω 濾過) で 7 回以上洗浄し、吸着していないタンパク質を除去した。その後、HB NaCl をバイアルに 1 mL 添加した。バイアルを静置した条件、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を上回る加速度の振とう (AAB) (50 Hz 6.3 G) 及び境界線未満の加速度の振とう (ABB) (50 Hz 3.5 G) を加えた条件のそれぞれについて 3 バイアルを用意し、24.0 時間処理を行った。分析前に 3 本のバイアルの溶液を混合して試料溶液とし、FIM によりミクロン凝集体の濃度を測定した ($n = 3$)。

3.2.7 振とうによる、バイアルに吸着したシリコンオイルの剥離

先行研究を参考に²³、トルエンに溶解させたシリコンオイル (3% w/w) 2 g をバイアルに入れ、室温で一晩インキュベートし、バイアル表面の固体部分をシリコンオイルでコーティングした。その後、中のシリコンオイルを捨て、完全に乾燥させたバイアルを、タンパク質がフィルム形成したバイアルの代用品として使用した。このバイアルに、HB NaCl を 1 mL 添加した。各条件につき 3 本のバイアルを静置、AAB (50 Hz 6.3 G) 及び ABB (50 Hz 3.5 G) の 3 条件で保管した試料を調製した。また、気液界面の存在が、固相からのフィルムの剥離に与える影響を評価する目的で、バイアル内から空気を無くすように HB NaCl で満たした後、空気が入らないようにゴム栓及びアルミキャップで打栓し、AAB (50 Hz 6.3 G) を加えた。振とうまたは静置後のサンプルは、分析前に 3 本のバイアル内の試料を混合して試料溶液とし、剥離したシリコンオイル液滴の濃度を FIM でカウントした ($n = 3$)。

3.2.8 振とう時の溶液挙動の観察

タンパク質溶液を含むバイアルを、周波数と加速度の組み合わせを変更させて振とうさせ（10 Hz 0.7 G, 10 Hz 2.0 G, 50 Hz 3.5 G, 50 Hz 6.3 G）、約 5 秒経過した後にハイスピードカメラ（Fastcam Mini AX200; Photron）を用いて 10,000 フレーム/秒（fps）で溶液の動きを記録した。さらに、表 1 に示した振とう条件について、1000 fps で動画を撮影した。いずれの撮影時にも光源を用いて試料を照らした。記録された動画は、Photron FASTCAM Viewer 4 ソフトウェアを使用して解析した。

3.3 結果

3.3.1 AAB 及び ABB による凝集体生成における固液界面および気液界面の寄与の有無

低 g 力による凝集体生成への固液界面（バイアル内表面）および気液界面の寄与を調べるため、界面を介した凝集体を効果的に防止することが知られている非イオン界面活性剤を、2.3.1 項及び 2.3.2 項で振とうによるミクロン凝集体濃度の上昇が確認された、IgG in HB NaCl 及び CTLA4-Ig in PB にそれぞれ添加し、振とう試験を実施した。2.3.1 項の検討で、凝集体の生成を低い加速度から検出した、ミクロン凝集体濃度を FIM で測定し、凝集体の指標とした。IgG in HB NaCl には IgG の市販製剤で用いられている 0.07% w/v の PS80 を、CTLA4-Ig in PB には、CTLA4-Ig の市販製剤で用いられている 0.8% w/v の P188 に加え、濃度依存性を評価するため、0.008% w/v 及び 0.08% w/v の P188 を加えて評価した。なお、PS80 の CMC は 0.0015% w/v⁷¹、P188 の CMC は 0.105% w/v⁷² と報告されている。

0.07% w/v の PS80 を含む IgG in HB NaCl に、AAB を含む複数条件の振とうを加えたが、いずれの条件においてもミクロン凝集体濃度の上昇は認められなかった（図 19）。

0.08%及び0.8% P188 を含む CTLA4-Ig in PB を用いて AAB を加えた場合にも, CTLA4-Ig のミクロン凝集体濃度は上昇しなかった (図 20a). 0.008% P188 を含む CTLA4-Ig in PB ではミクロン凝集体濃度はわずかに上昇したが, これは P188 を含まない製剤の 157 分の 1 のミクロン凝集体濃度であった. このように, 界面活性剤によりミクロン凝集体生成が抑制されたことから, AAB は気液界面または固液界面を介した経路でミクロン凝集体濃度を上昇させると考えられた.

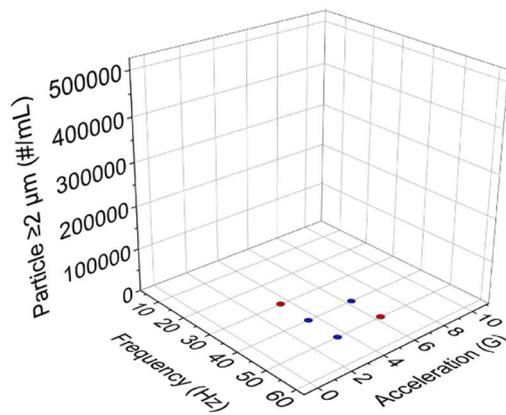


図 19 0.07% PS80 を含む IgG in HB NaCl のミクロン凝集体濃度. 輸送試験システムを用いて, 周波数と加速度の組み合わせを変えて 24.0 時間振とうした際の濃度. IgG in HB NaCl の結果と比較するため, 図 9 と同じスケールで表示した. 赤: IgG in HB NaCl において, ミクロン凝集体濃度が初期値より上昇した振とう条件, 青: IgG in HB NaCl において, ミクロン凝集体濃度が初期値より上昇しなかった振とう条件.

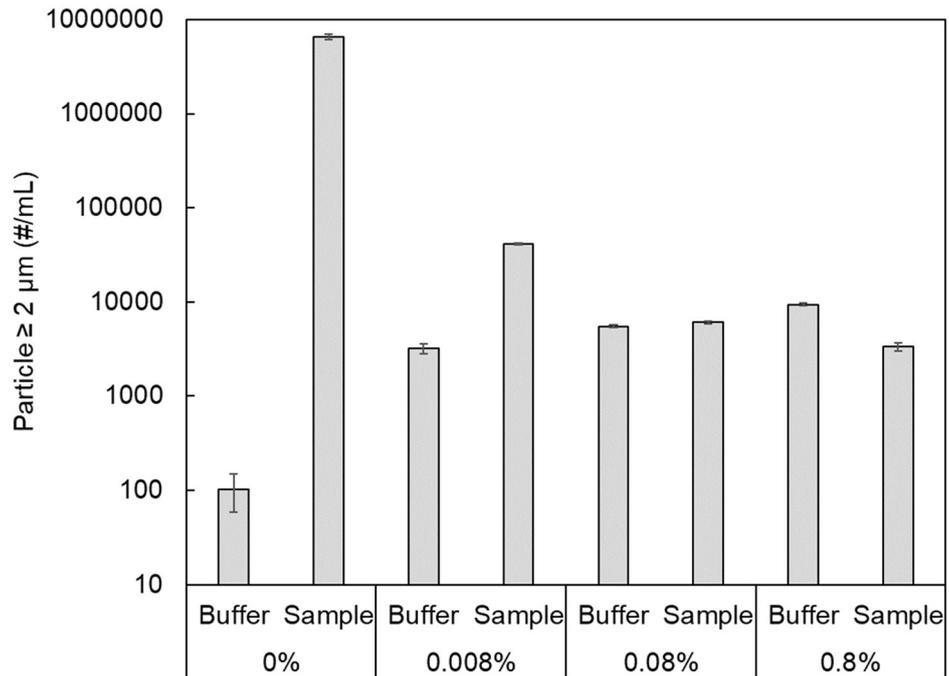


図 20 6.0 時間の AAB (50 Hz 6.3 G) 後の 0%, 0.008%, 0.08% 及び 0.8% P188 を含む CTLA4-Ig in PB 及び CTLA4-Ig を含まない溶液のミクロン凝集体濃度. FIM の 3 回測定における SD をエラーバーとした.

次に, CTLA4-Ig in PB に対して, 0.008%, 0.08% 及び 0.8% の P188 を添加し, AAB 及び ABB 後のナノメートル凝集体 (%) を評価し, ナノメートル凝集体生成に界面が与える影響を評価した. その結果, P188 の有無, また, その濃度に関わらず, AAB (図 21a) 及び ABB (図 21b) のいずれもナノメートル凝集体を増加させた.

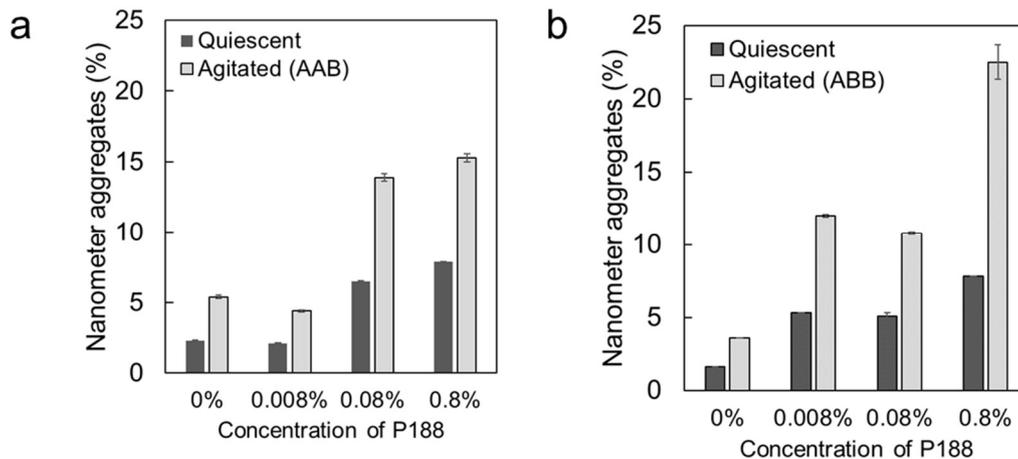


図 21 6.0 時間の振とう後の 0%, 0.008%, 0.08%及び 0.8% P188 含有 CTLA4-Ig in PB のナノメートル凝集体の可溶性タンパク質に対する相対量 (a: AAB, b: ABB). SE-HPLC の 3 回測定における SD をエラーバーとした。

さらに、気液界面がナノメートル凝集体に与える影響を調べるため、0.8%P188 を含む CTLA4-Ig in PB を、気液界面の有無の 2 条件で、ABB (50 Hz 3.5 G) で 6.0 時間振とうした。その結果、振とうによりナノメートル凝集体 (%) の生成量が増加したが、気液界面の有無でナノメートル凝集体 (%) 比較すると、静置条件では気液界面無しで 7.7%, 気液界面有りで 7.3%であり、振とうの条件において気液界面無しで 8.9%, 気液界面有りで 8.9%であり、気液界面の存在によるナノメートル凝集体 (%) の増加が認められなかった (図 22a)。次に、固液界面がナノメートル凝集体に与える影響を調べるため、過去の研究で、バイアルの素材によって吸着量に差があることが確認されている⁶², COP またはホウケイ酸ガラスバイアルに 0.1% w/v の P188 を含む CTLA4-Ig in PB を入れて ABB (50 Hz 3.5 G) で 6.0 時間振とうし、生成したナノメートル凝集体 (%) を SE-HPLC で測定した。図 22b に示すように、振とうによりナノメートル凝集体 (%) は増加したが、COP とホウケイ酸ガラス間でナノメートル凝集体 (%) を比較すると、静置条件では COP で 3.4%, ホウケイ酸ガラスで 3.3%であり、振とうの条件においては COP で 4.8%, ホウケイ酸ガラスで 4.7%と、同様の値を示した。したがって、ナノメートル

凝集体生成は界面ではなく、バルク溶液中で生じた現象と考えられた。

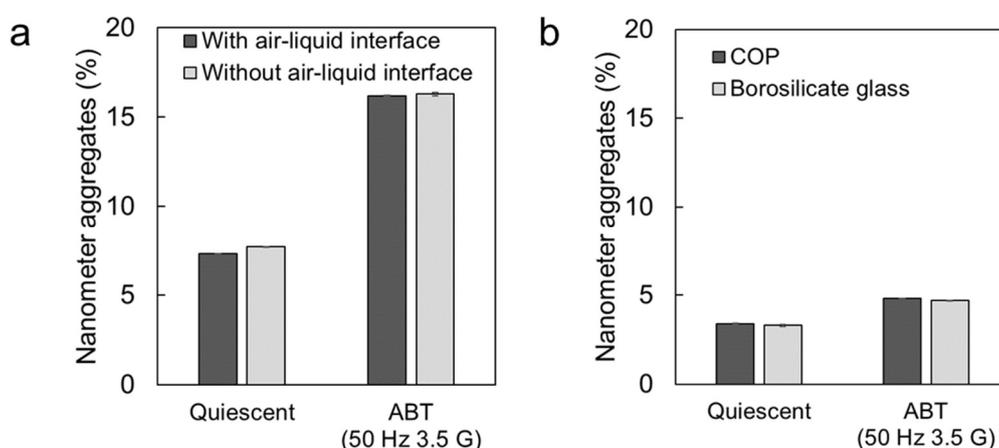


図 22 a: 0.8% P188 を含む CTLA4-Ig in PB を，気液界面の有無の 2 条件で調製し，ABB (50 Hz 3.5G) で 6.0 時間振とうした後の可溶性タンパク質あたりのナノメートル凝集体の相対量，b: 0.1% P188 を含む CTLA4-Ig in PB を COP またはホウケイ酸ガラスバイアルに充填し，ABB (50 Hz 3.5 G) で 6.0 時間振とうした後の可溶性タンパク質あたりのナノメートル凝集体の相対量. SE-HPLC の 3 回測定における SD をエラーバーとした。

3.3.2 AAB によるミクロン凝集体生成における固液界面の寄与

AAB によるミクロン凝集体生成における固液界面の寄与を確認するため，バイアル表面へのタンパク質吸着量が異なる，ホウケイ酸ガラス及び COP からなる 2 種類のバイアルを用いて，AAB (50 Hz 6.3 G) を 24.0 時間加えた際の k_{obs} 及びミクロン凝集体濃度を比較した。なお，AAB によるミクロン凝集体生成は IgG in HB NaCl 及び CTLA4-Ig in PB のいずれにおいても生じる現象であること，また，CTLA4-Ig in PB を用いると，経時的にナノメートル凝集体量が増加することで議論が複雑になる可能性を考慮し，以後のミクロン凝集体生成のメカニズムは IgG in HB NaCl を用いて検証した。その結果，ホウケイ酸ガラスバイアル中の IgG in HB NaCl の k_{obs} は，COP バイアル中の試料の 1.7 倍であることが確認された (COP バイアル中の k_{obs} は 1.93，ホウケ

イ酸ガラスバイアル中の k_{obs} は 3.28)。また、振とう後 3.0 時間後のミクロン凝集体濃度は、COP バイアルよりもホウケイ酸ガラスバイアルの方が 2.2 倍高く、6.0 時間においても 3.2 倍高かった (図 S 2)。したがって、AAB により、固液界面を介してミクロン凝集体濃度が上昇したことが示唆された。

3.3.3 固液界面からのタンパク質フィルムの剥離に与える振とうの影響

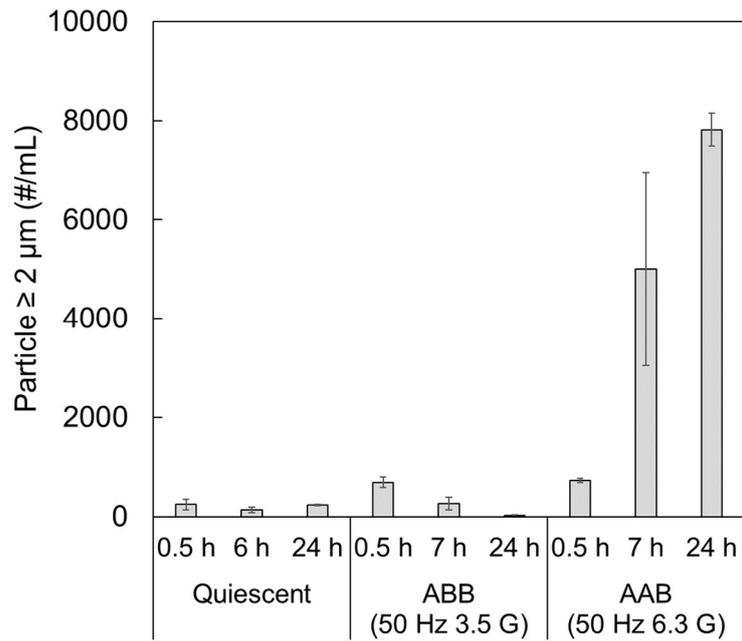
AAB によるミクロン凝集体濃度の上昇に固液界面が関与していることが示唆された。固液界面を介した凝集に振とうが及ぼす可能性として、タンパク質の界面への吸着や、界面からのタンパク質フィルムの剥離の 2 種類の過程が考えられたが、そのうち、剥離の可能性を評価した。IgG in HB NaCl を用いて、AAB 及び ABB により固液界面から剥離したタンパク質に起因するミクロン凝集体濃度を測定した。まず、IgG in HB NaCl に AAB (50 Hz 9.7 G) を加えて、固液界面に IgG を吸着させた後、バイアルを超純水で洗浄し、固液界面に結合していない IgG を除去した。その後、HB NaCl を 1 mL 加え、静置、AAB または ABB のいずれかの条件を 24.0 時間維持し、FIM を用いてミクロン凝集体濃度を測定した。

その結果、静置した場合と、ABB を加えた場合のいずれも、ミクロン凝集体濃度は上昇しなかった (図 23a)。一方、AAB を加えた場合、経時的にミクロン凝集体濃度が上昇した。

次に、タンパク質のように、固液界面にフィルムを形成し、さらに、振とうによる変性等の可能性を排除できるモデルとして、シリコンオイルを塗布したバイアルを用い、AAB による剥離への影響を評価した。この実験では、振とうを加える前に、シリコンオイルを塗布したバイアルに、HB NaCl を 1 mL 加え、静置状態、ABB、AAB の各条件を 24.0 時間維持した後、FIM を用いてシリコンオイル滴の濃度を測定した。その結果、AAB を加えた後のシリコンオイル滴の濃度は ABB を加えた場合の約 18 倍であり (図

23b), AAB によりシリコンオイルのフィルムが効率的に剥離されたことが確認された。さらに, AAB によるシリコンオイルフィルムの剥離に気液界面が与える寄与を調べるために, ヘッドスペースが無い(気液界面が無い)状態で, AAB を加えた。その結果, シリコンオイル滴の濃度は, AAB を加えたにも関わらず, 増加しなかった(図 23b)。このことから, 固液界面からの剥離には気液界面が動くことが重要な役割を担っていることがわかった。

a



b

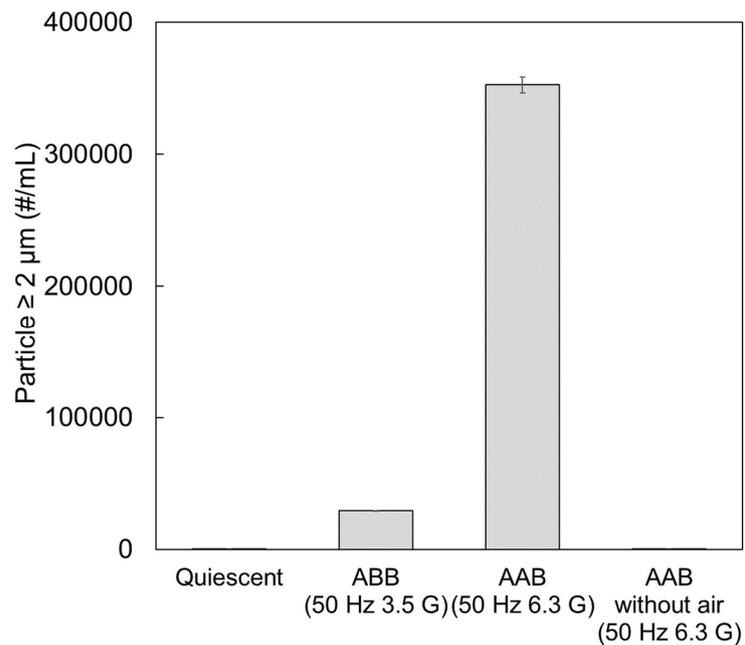


図 23 固体表面に IgG またはシリコンオイルを吸着させた後、HB NaCl をバイアルに添加し、バイアルを静置、または振とうさせ、固体表面から剥離したミクロン粒子濃度. (a) 静置状態で 0.5、6.0 及び 24.0 時間後、ABB (50 Hz 3.5 G) または AAB (50 Hz 6.3 G) 適用後 0.5、7.0 及び 24.0 時間後に固液界面から剥離した IgG に由来したミクロン凝集体濃度、(b) シリコンオイルを吸着させたバイアルを静置状態、ABB (50

Hz 3.5 G) または AAB (50 Hz 6.3 G) 適用 7.0 時間後, また, 気液界面を除去したバイアルに AAB を適用し, 7.0 時間後のミクロン粒子濃度. FIM の 3 回測定における SD をエラーバーとした.

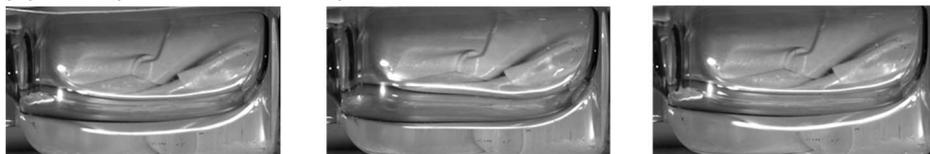
3.3.4 AAB 及び ABB を加えた際の溶液の動き

AAB と ABB で生じたミクロン凝集体の生成に対する違いが, 界面を介した凝集体の生成に起因することが示唆された. AAB が界面を介した凝集体を引き起こす理由を考察する目的で, IgG in HB NaCl を入れたバイアルに, AAB 及び ABB を加えながら, 10,000 fps で波の様子を記録した. その結果, AAB の映像では不規則なパターンと波の乱れが見られたが (図 24a, c), ABB のバイアルでは比較的規則正しく繰り返される波が観察された (図 24b, d). AAB による大きな波の動きは, ABB よりも高い膨張/圧縮比を生み出すと考えられる. また, 落下などにより, 溶液中に局所的な圧力低下を生じさせることで, キャビテーションが発生する. このキャビテーションの泡は固液界面から遠い面が早くつぶれ, 球形から変形していき, マイクロジェットが発生することで崩壊し, 多数の泡に分散する⁴⁷⁾. この際に固液界面で発生する高いせん断応力が, 固液界面に吸着したタンパク質フィルムを剥離させる可能性が示唆されている. 本研究におけるミクロン凝集体生成に関する周波数と加速度の境界線を上回る強い振とうでは, このキャビテーションの泡が発生している可能性も考えられた. しかし, キャビテーションの泡 (発生から消滅までの時間は 400 μ s 程度⁴⁷⁾) が発生すれば検出可能な 10,000 fps の条件 (100 μ s ごとに写真を撮影) で観察したが, いずれの振とう条件でもキャビテーションは認められなかった. したがって, 振とうによる剥離は, キャビテーションには起因しないと結論づけた.

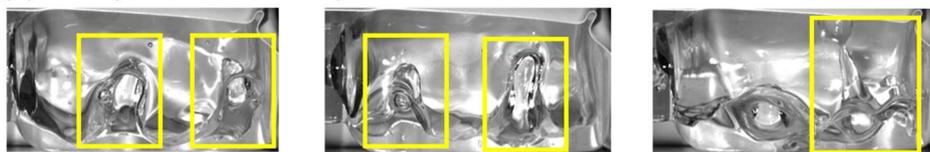
(a) AAB (10 Hz and 2.0 G)



(b) ABB (10 Hz and 0.7 G)



(c) AAB (50 Hz and 6.3 G)



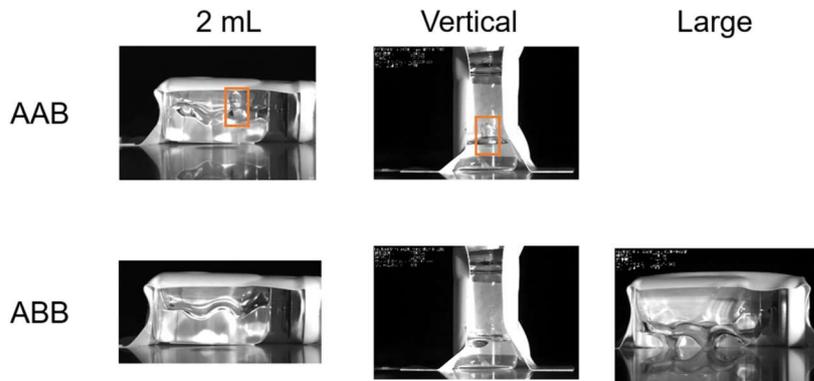
(d) ABB (50 Hz and 3.5 G)



図 24 0.5 mg/mL IgG in HB NaCl 1 mL を含むバイアルを, AAB (2.0 G) (a) 及び ABB (0.7 G) (b) で 10 Hz で振とうしたハイスピードカメラ画像, 同じバイアルを AAB (6.3 G) (c) 及び ABB (3.5 G) (d) で 50 Hz で振とうしたハイスピードカメラ画像. 振とう開始から約 5 秒後に撮影した. 波の乱れを黄色で囲んだ.

さらに, 2.3.4 項で変動させたバイアル条件の変更に対して, 50 Hz 3.5 G, 4.1 G 及び 4.5 G の加速度で振とう中のバイアルをハイスピードカメラで撮影した. その結果, ミクロン凝集体濃度が上昇する条件でのみ, 不規則で, 乱れた波の動きが認められた (図 25).

a



b

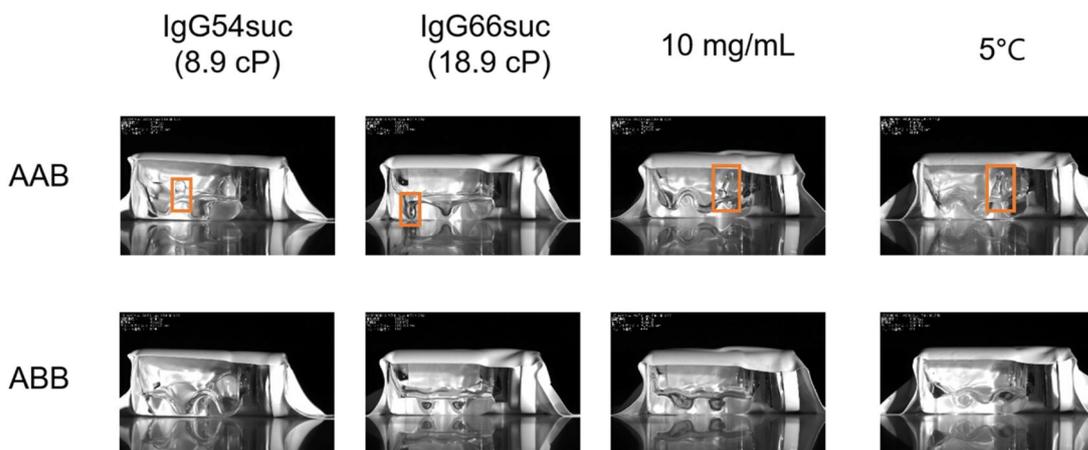


図 25 表 1 に示すパラメーターを変動させ、AAB (a : 50 Hz 4.1 G, b : 50 Hz 4.5 G) または ABB (50 Hz 3.5 G) を加えた際のハイスピードカメラ画像。約 5 秒間振とうした後に撮影した。波の乱れを橙色で囲んだ。(a): 溶液量 : 1 mL から 2 mL に変更, バイアルの向き : 横から縦に変更, バイアルサイズ : 16 x 33 mm から 18 x 40 mm に変更, b : 粘度 : 0.9 cP から 8.9 及び 18.9 cP に変更, タンパク質濃度 : 0.5 から 10 mg/mL に変更, 温度 : 室温 (20-25°C) から 5°C に変更した。

3.4 考察

第 2 章までに述べたとおり、輸送試験システムを用いた低 g 力 (振とう) において、ミクロン凝集体生成に関する周波数及び加速度の境界線の加速度を上回る振とう (AAB) と下回る振とう (ABB) で、凝集体生成が異なった。この理由について、界面の影響に

着目して 3.4.1 項及び 3.4.2 項のとおり詳細な考察を行った。

3.4.1 振とうによる界面を介したミクロン凝集体生成

輸送時の振動や落下などによる力は界面を介した凝集を誘発すると考えられており、タンパク質の界面への吸着を防ぐことで界面変性を防ぐ非イオン界面活性剤は、タンパク質凝集体の生成を緩和することができる^{26,33,38,62}。これまでの研究と同様に、AAB によるミクロン凝集体濃度の上昇は、PS80 や P188 の添加により効率的に抑制された。最近の研究では、PS80 の CMC (0.0015% w/v) より低い 0.0001% w/v の PS80 を mAb と共存させて、気液界面を崩壊させ、その後のタンパク質の吸着を評価した。この研究では、界面の崩壊により、mAb や PS80 が界面から剥離したが、PS80 が選択的に吸着することで、mAb がそれ以降気液界面に吸着しなくなることが確認された⁷¹。本研究においては、IgG in HB NaCl には CMC 以上の PS80 を含んだ溶液を用いており、AAB によって界面が崩壊した後のタンパク質の界面への吸着を、PS80 が防いだと考えられた。CTLA4-Ig in PB では異なる界面活性剤 (P188) を用いたが、CMC 以上の濃度においては凝集が抑制され、PS80 と同様に、タンパク質の界面への吸着を防いだと考えられた。なお、PS80 や P188 が、タンパク質の疎水性部分と相互作用することで、タンパク質同士の相互作用を抑制し、バルク溶液中でのミクロン凝集体の生成を抑制した可能性も否定はできない³⁸。しかし、CTLA4-Ig in PB のナノメートル凝集体においては、P188 の有無に関わらず、AAB と ABB の両方でナノメートル凝集体が増加した。この結果から、P188 によってバルク溶液中のタンパク質同士の相互作用を弱めた可能性は低いと考えられた。したがって、AAB によるミクロン凝集体濃度の上昇は、主に界面を介した経路で生じたと考えられた。

次に、本実験中では固液界面 (バイアル表面と溶液の界面) 及び気液界面 (気体と溶液の界面) の 2 種類の界面が存在することから、各界面の寄与を評価した。まず、バイ

アルへのタンパク質吸着量が異なることが先行研究で示された⁶²、2種類の素材からなるバイアルそれぞれを用いた振とう実験における、 k_{obs} 及びミクロン凝集体濃度を比較し、固液界面が凝集に与える寄与を評価した。その結果、バイアル材質の違い（COP とホウケイ酸ガラス）は、AAB によるモノマー消失速度係数 k_{obs} に影響した。凝集体生成経路が固液界面を介する場合、固体表面の材質が凝集体の生成、それに伴うモノマー減少速度に影響を与えることから、本研究においても、AAB によるミクロン凝集体生成への固液界面の寄与が示唆された^{33,35}。固液界面を介した凝集には、(a) 固液界面への吸着、(b) 固液界面でのアンフォールディングを伴うフィルム形成及び (c) 固液界面からバルク溶液への放出のステップが考えられる。振とうが (a) に影響した可能性も考えられたが、ABB と AAB で境界線を伴う違いが生じたこと、(c) は一定以上の力がなければタンパク質がバルク溶液中に放出される可能性が低いと考えられたこと、この剥離ステップが促進されることが固液界面を介した凝集を引き起こす事例が報告されていることを考慮し^{34,73}、(c) に着目し、AAB による固液界面を介したミクロン凝集体生成増加の理由を検討した。

剥離を評価する実験では、バイアル内にタンパク質またはシリコンオイルのフィルムが形成されたバイアルに、タンパク質を含まない HB NaCl を加えて、AAB と ABB を加えた。その結果、AAB の方が ABB よりも多くのミクロン凝集体やシリコンオイル滴を生成した。したがって、AAB による固液界面からの剥離効率が高いことが、AAB がミクロン凝集体を多く生成する理由の1つであると考えられた。

過去の研究と本研究に基づいて、AAB による剥離の効率が高い原因について、以下のとおり考察した。Gerhardt らは、シリコンオイルが塗布されたシリンジ内にタンパク質溶液を入れた状態で振とうすると、タンパク質とシリコンオイルからなるミクロン粒子が増加することを示した²³。その際、Gerhardt らは、振とうによる3つの界面（シリコンオイルでコーティングされた固体表面—液体—空気）の移動によって界面張力に由

来する力が発生し、固液界面のシリコンオイルやタンパク質のフィルムを引っ張ることで崩壊させると考察している。本研究でも、AABにより、気体—液体—固体の界面が大きく動くことで生じるせん断応力や界面張力に由来する力が、固相表面に吸着したタンパク質フィルムを剥離させ、固液界面を介したマイクロ凝集体を生成させたと結論づけられた（図 24 a-d）。この3つの界面が移動することの重要性は、バイアル内のヘッドスペースを除去する（つまり気液界面が無くなる）ことで、AAB下でもシリコンオイルは剥離しなくなったことから支持された。

固液界面のみならず、気液界面も振とうなどによるマイクロ凝集体生成に関与していることが報告されていることから（凝集メカニズムは1.2.1項参照）、輸送時の振動における気液界面の寄与について、以下のとおり考察した。気液界面の膨張圧縮比はマイクロ凝集体生成の重要な因子であることが報告されている²⁷。Beeらは、凝集体生成において臨界膨張圧縮比が存在し、この値が5を超えると（膨張時と圧縮時の面積の比が5倍以上）、気液界面が介在する凝集体が顕著に増加することを示した²⁸。本研究のハイスピードカメラを用いた解析から、AABによる波は不規則で、その形状は尖った形となった一方で、ABBは規則的で、半円に近い形の波を発生させた。この違いにより、AABにより生成した波の方が気液界面の膨張圧縮比が高くなったと考えられた。また、膨張圧縮の繰り返し数も、気液界面を介したマイクロ凝集体が生成するための重要な因子である。Ghazviniらは、膨張圧縮を750~1000回繰り返したmAbのバルク溶液中で、凝集体が増加したことを報告した²⁶。一方、膨張圧縮の繰り返しが50回では、気液界面に凝集体が生成したものの、バルク溶液中の凝集体は増加しなかった。AABの振とう条件（周波数と時間）を考慮すると、膨張圧縮の繰り返し回数は1000を超える。上記の考察から、AABで発生する波は、圧縮/膨張比とサイクル数の両方の基準を満たしており、AABは固液界面のみならず、気液界面を介しても凝集体生成を引き起こしたと考えられる。

3.4.2 振とうによる自発的なナノメートル凝集体生成の加速

IgG in HB 及び IgG in HB NaCl では、静置、ABB 及び AAB のいずれの条件でもナノメートル凝集体は増加しなかった。一方、CTLA4-Ig in PB 中では静置条件でも自発的にナノメートル凝集体が生成され、AAB と ABB はミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に関わらず、いずれもその生成を加速した。また、0.008%、0.08%及び 0.8%の P188 を添加しても、自発的なナノメートル凝集体の生成を抑制できなかった。0.8% P188 は CMC (0.105%) よりも高濃度であり、固液界面及び気液界面のほとんどが界面活性剤で覆われていることから⁷⁴、ナノメートル凝集体の生成及び振とうによる加速は、バルク溶液を介した（つまり界面を介したものではない）経路によるものと考えられた。また、0.8% P188 を含む CTLA4-Ig in PB のナノメートル凝集体は、ヘッドスペース（気液界面）の除去によって影響を受けなかった。バイアル表面の材質は、固相へのタンパク質の吸着に影響を与えるが⁶²、ホウケイ酸ガラスバイアル及び COP バイアルの 2 種類のバイアルで、ナノメートル凝集体の増加には影響がなかった。これらの結果からも、ナノメートル凝集体が振とうにより増加するのは、気液界面や固液界面を介した凝集ではなく、バルク溶液中での凝集と考えられた。振とうによりバルク溶液中の凝集が加速する詳細なメカニズムは不明であるが、振とうにより溶液の攪拌効率が上がり、タンパク質分子の衝突頻度が高くなったのではないかと推測される。

なお、緩衝液に P188 を含む場合、界面活性剤を含まない結果と比較して、より多くのナノメートル凝集体が生成する傾向が確認された。先行研究においても、緩衝液にポリソルベートを添加すると、ナノメートル凝集体が増加したという報告がある⁴⁰。その著者らは、ポリソルベートとタンパク質の相互作用の結果、タンパク質の構造が変化し、疎水性部位が表面に露出した結果、タンパク質同士の会合が促進された可能性を述べている。P188 も同様に、CTLA4-Ig と相互作用し、ナノメートル凝集体を増加させた可能性があるが、この点については今後さらなる研究が必要である。

3.4.3 振とうと凝集体生成のまとめ

ミクロン凝集体生成に関する周波数及び加速度の境界線の加速度より強い振とうの場合、固液界面及び気液界面を介したサブマイクロメートル及びミクロン凝集体が生成することが明らかとなった (3.4.1 項)。また、ミクロン凝集体生成に関する周波数及び加速度の境界線に関わらず、振とう及び境界線の加速度より弱い振とうを加えた場合には界面を介さず、バルク溶液中で自発的なナノメートル凝集体生成が加速されることが示された (3.4.2 項)。これらの凝集体生成を図 26 のモデル図に示した。

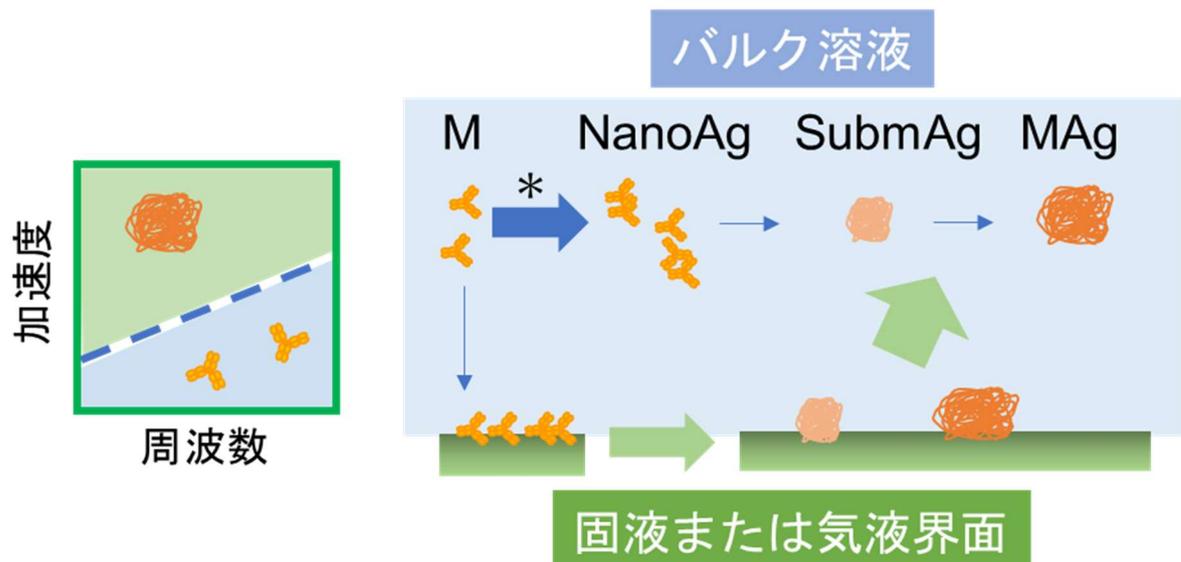


図 26 ミクロン凝集体及びナノメートル凝集体生成のモデル図。青矢印 (太)：ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に関わらず、振とうが加速すると考えられるステップ (*：自発的にナノメートル凝集体の生成が進む処方の場合)。緑矢印 (太)：ミクロン凝集体生成の境界線を上回る加速度の振とうが加速すると考えられるステップ。M：モノマー，NanoAg：ナノメートル凝集体，SubmAg：サブマイクロメートル凝集体，MAg：ミクロン凝集体

3.4.4 ミクロン凝集体生成の境界線は何に起因するか

AAB 及び ABB による溶液の動きの違いがミクロン凝集体生成に関する周波数及び

加速度の境界線に与える影響は、3.4.1 項で述べたとおりである。この加速度の境界線が、周波数が増加するにつれ増加した理由について、溶液の動きの点から考察した。

橋本らの研究では、溶液を含む円筒容器を垂直方向に振動させた際、振動の加速度を高めると、周波数と加速度の境界線を越えた時点で波が不安定になり、波面の崩壊と液滴の分裂が観察された⁷⁵。この先行研究では、10~60 Hz の範囲では、周波数の増加に伴い、液面が崩壊する加速度の境界線が直線的に増加することが示されている。この関係は、本研究のミクロン凝集体生成に関する境界線の周波数と加速度の関係（図 15）と一致している。このことから、本研究で認められたミクロン凝集体生成の境界線における周波数と加速度の関係は、波が崩壊する境界線と一致していると推察された。実際に、10 Hz と 50 Hz のいずれにおいても、AAB でのみ液面の崩壊が生じていることも、この関係を支持するものである。なお、周波数が高いほど液面の崩壊が生じる加速度が高くなる理由は、振とうの振幅と関係していると考えられた。加速度が一定であれば、周波数が高くなるほど振とうの振幅は小さくなる。振とうの振幅が小さいと、波面の崩壊を生じない低振幅の波が誘起されることになる。このような理由から、振幅を大きくして波面の崩壊を生じるためには、高い周波数になるほど、高い加速度が必要になると考えられた。

さらに、液量、バイアルの向き及びバイアルサイズによって、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線が影響を受けたことも（2.3.4 項）、ミクロン凝集体生成の境界線と波面の崩壊の関係を支持する結果であった。橋本らの研究において、溶液の高さと底面積比である、 H/D 比が高くなると、より小さな振幅の振動で波面が崩壊したことが報告されている。これは、言い換えると、 H/D 比が高いほど、同じ振動の強さでも波面が崩壊しやすくなることを意味している。この知見を本研究に当てはめると、 H/D 比を高めることは（充填量が多い、バイアルを横向きから縦向きに変更した）、より低加速度で波面の崩壊を引き起こし、一方、 H/D 比を低下させることは

(バイアルサイズを大きくした)、波面の崩壊に、より高い加速度を必要とした。さらに、これらの波面の崩壊は、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線の変化とも一致した。

以上の結果を考慮し、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線は溶液の波の崩壊に関連して発生していること、波の崩壊には溶液の H/D 比が影響していることが考えられた。

3.4.5 輸送時の振動による凝集体生成を抑制するための提案

ポリソルベートや P188 などの非イオン界面活性剤は、界面を介した凝集体生成を防ぐために有効であり、多くの製薬会社で標準的に用いられている。しかし、1.3 項でも述べたとおり、界面活性剤は必ずしも万能ではなく、バルク溶液中での凝集体生成を促進するという報告もある。したがって、他の抑制方法との併用により除去または濃度を最小限に抑えることで、長期保管時においてもより安定な製剤につながる可能性がある。

本研究結果は、包装および輸送プロセスの最適化（例：エアライドサスペンショントラック）により、振動の加速度をミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線の加速度未満に抑えれば、製剤中の界面活性剤の必要性を下げ、濃度を低下または処方から除くことができる可能性を示唆している。また、AAB によるミクロン凝集体生成には固液界面が関与するため、タンパク質の吸着・剥離を抑えるために容器や栓の素材を最適化することも凝集を抑制する 1 つの有効な方法である。さらに、H/D 比を下げることでミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を高めることも新たな抑制方法となる。

一方で、自発的なナノメートル凝集体生成の振とうによる加速は、バルク溶液中で生じる現象であり、非イオン界面活性剤の添加やバイアル素材の工夫等では防ぐことができない。したがって、適切なタンパク質配列や処方検討によって、自発的なナノメー

ル凝集体の生成を防ぐことが重要である.

第4章 総括

従来、周波数の違いだけでは低 g 力と凝集体生成の関係の解釈が困難であったが、本研究において、輸送時の低 g 力について、低 g 力を加速度と周波数の組み合わせとして検討したところ、凝集体生成へとつながる低 g 力には加速度と周波数からなる境界線が存在することが明らかとなった。

具体的には、第2章では、バイアルに充填した3種類のタンパク質溶液に、周波数と加速度を変化させながら、実輸送に近い3軸方向の振とうを加え、輸送時の低 g 力の何が凝集を引き起こしているかを検討した。その結果、2.3.3 項に示したミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を超えるまでは振とうに伴う変化が無かったことに対し、加速度の境界線を超えると、ミクロン凝集体濃度の急激な上昇が認められた。興味深いことに、この境界線は、凝集に対する安定性が異なる3種類のタンパク質溶液で共通であったこと、溶液充填量、バイアルの向き及びバイアルサイズといった、 H/D 比を変化させる要因に影響を受けたことから、タンパク質の特性というより、溶液の動きに影響を受けると考えられた。また、ABB でも、自発的なナノメートル凝集体の生成を加速させることが明らかとなった。

輸送時の凝集体を評価する方法を考察するため、輸送時における凝集リスク評価に、広く用いられるオービタルシェイカーを利用した強制分解試験の先行研究結果について、ミクロン凝集体生成の境界線としての観点から、本輸送試験システムの三次元方向の振とうと比較した。その結果、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線については大きな乖離が無いことが示唆された。したがって、オービタルシェイカーを用いた振とう試験は、二次元方向の振とうであるが、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を上回る振とうで生成する、ミクロン凝集体生成のリスクを評価するには十分に有用であると考えられた。

第3章では、第2章で特定された、振とうによるミクロン凝集体生成及びナノメートル

ル凝集体生成の加速のメカニズムを検討した。AAB によるミクロン凝集体生成については、界面活性剤の添加によりミクロン凝集体の生成が抑制されたことから、AAB は主に界面を介した経路でミクロン凝集体を増加させることが示唆された。凝集に寄与し得る界面は、固液界面及び気液界面の 2 種類であるが、AAB を加えることで生じる、波面の崩壊を伴う大きな溶液の動きが、2つの界面の双方を介してミクロン凝集体を生成したと考えられた。具体的には、AAB に伴う大きな溶液の動きで固体—液体—気体の 3つの界面が広範囲で速く移動することにより、界面張力に由来する力や、せん断応力が界面に働く。この力により、固液界面に吸着したタンパク質のフィルムが剥離し、ミクロン凝集体が生じたと考えられた。また、気液界面を介した凝集も、波面の崩壊に起因し、以下のメカニズムで生成したと考えられた。波面の崩壊を伴う大きな液の動きは、気液界面の表面積を大きく変化させ、気液界面の面積を高い膨張圧縮比で変化させることで、気液界面を介した凝集を引き起こす。この膨張圧縮を十分な回数繰り返すことで、界面からバルク溶液中にミクロン凝集体が放出されたと考えられた。このメカニズムは、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線が、波面の崩壊と相関したことから、また、タンパク質の種類ではなく、波面の崩壊に寄与する H/D 比によって加速度の境界線が増減したことから支持された。

一方、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に関わらず、振とうによって生じた自発的なナノメートル凝集体の生成促進は、界面活性剤を添加しても防ぐことができず、気液界面や固液界面の影響を評価した実験でも、界面の影響は認められなかった。これらの結果から、自発的なナノメートル凝集体の振とうによる加速は、界面ではなく、バルク溶液中で生じた反応と考えられた。

上記の研究結果より、輸送時に発生する低 g 力のうち、ミクロン凝集体を生成させる周波数や加速度の振とう、またその振とうが凝集を引き起こすメカニズムが示された。

これらの結果から、以下のような凝集体抑制方法を提案した。まず、ミクロン凝集体

の生成を、界面活性剤以外のアプローチで抑制する方法である。AAB によるミクロン凝集体生成には固液界面が関与するため、タンパク質の吸着を抑える容器や栓を選択することで、界面活性剤の濃度を低減することが可能と考えられた。また、界面を介した凝集には加速度の境界線が確認されたことから、二次包装や輸送プロセスの最適化により振動の加速度を境界線未満に抑えるアプローチが有効である。さらに、バイアル内の溶液の H/D 比を下げることで、ミクロン凝集体生成の境界線を高めることも有効なアプローチと言える。これらの工夫により、振動の加速度をミクロン凝集体生成の境界線未満に抑えることができれば、界面活性剤の必要性は下がり、界面活性剤の除去または低減につながり得る。

一方で、自発的なナノメートル凝集体生成の加速は、界面ではなくバルク溶液中で生じることから、界面活性剤では抑制できない。さらに、ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線に関わらず、弱い振とうでも促進されることから振動加速度の低減による抑制が難しい。これらを考慮すると、根本的な解決のためには自発的なナノメートル凝集体の生成を防ぐための、アミノ酸配列や製剤処方最適化、具体的には分子の分散の安定性を示す、コロイド安定性を高める処方の選定等が有効な手段と考えられた。

以上のおり、凝集を引き起こす輸送時の低 g 力及びそのメカニズムが解明されたことで、より適切な凝集体抑制方法及び目的に応じた評価方法を提唱した。この研究が、輸送時に生じる凝集体生成リスクの正しい理解と対応につながると考えられ、タンパク質医薬品の品質確保に貢献することが期待される。

略語リスト

略号

AAB: ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を上回る加速度の振とう

ABB: ミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数及び加速度の境界線を下回る加速度の振とう

ASTM: 米国材料試験協会規格

COP: シクロオレフィンポリマー

CTLA4-Ig: 組み換え IgG Fc ドメインと T 細胞受容体の可溶性部分からなる融合タンパク質

CTLA4-Ig in PB: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0) 中に希釈した CTLA4-Ig 溶液

FIM: フローイメージング顕微鏡

HB: 20 mM ヒスチジン緩衝液 (pH 6.0)

HB NaCl: 150 mM NaCl を含む 20 mM ヒスチジン緩衝液 (pH 6.0)

IgG: リツキシマブ

IgG in HB: 20 mM ヒスチジン緩衝液 (pH 6.0) 中に希釈したリツキシマブ溶液

IgG in HB NaCl: 150 mM NaCl を含む 20 mM ヒスチジン緩衝液 (pH 6.0) 中に希釈したリツキシマブ溶液

IgG54suc: IgG in HB NaCl にスクロースを 54%加えた溶液

IgG66suc: IgG in HB NaCl にスクロースを 54%加えた溶液

NaCl: 塩化ナトリウム

PS20: ポリソルベート 20

PS80: ポリソルベート 80

P188: ポロキサマー188

PB : 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0)

PFS : プレフィルドシリンジ

qLD 法 : 定量的レーザー回折法

SE-HPLC : サイズ排除高速液体クロマトグラフィー

SVM : サポートベクターマシン

サブマイクロメートル凝集体 : 100-2000 nm の凝集体

ナノメートル凝集体 : 二量体 (数十 nm 以下) から 100 nm 未満の凝集体

SD : 標準偏差

ミクロン凝集体 : 2-100 μm の凝集体

指標

k_{obs} : モノマー消失速度係数 (h^{-1})

付録

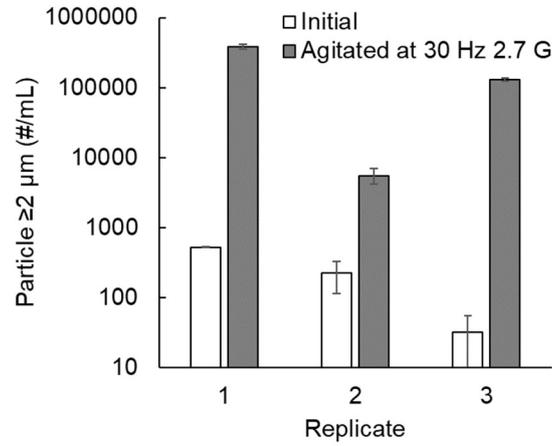
表 S 1 FIM による初期値測定時のミクロン凝集体 ($\geq 2 \mu\text{m}$) 濃度の平均, SD 及び平均+3SD

	Particle $\geq 2 \mu\text{m}$ (#/mL)		
	IgG in HB NaCl (n=21)	IgG in HB (n=10)	CTLA4-Ig in PB (n=9)
Mean	524	282	11308
SD	269.2	161.5	3121.6
Mean + 3 SD	1331.6	766.5	20672.8

表 S 2 周波数と加速度を変動させ、24.0 時間振とうまたは静置した後の IgG in HB NaCl 及び IgG in HB 中の可溶性タンパク質に対するナノメートル凝集体の相対的な含量.

Agitating parameter (Frequency and acceleration)	Relative content of nanometer aggregates after 24 h (%) (Mean \pm SD)	
	IgG in HB NaCl	IgG in HB
Quiescent	0.5 \pm 0.04	0.8 \pm 0.14
10 Hz 0.7 G	0.9 \pm 0.04	0.9 \pm 0.07
10 Hz 1.0 G	0.5 \pm 0.10	-
10 Hz 2.0 G	0.4 \pm 0.09	-
20 Hz 1.6 G	1.0 \pm 0.03	-
20 Hz 3.5 G	0.1 \pm 0.09	1.0 \pm 0.02
21 Hz 2.0 G	0.4 \pm 0.15	-
30 Hz 2.0 G	1.1 \pm 0.13	-
20 Hz 2.4 G	0.7 \pm 0.05	-
30 Hz 2.7 G	0.5 \pm 0.10	0.4 \pm 0.20
30 Hz 3.5 G	0.6 \pm 0.19	0.7 \pm 0.02
40 Hz 3.5 G	1.2 \pm 0.02	0.8 \pm 0.07
40 Hz 6.3 G	Not detectable	0.8 \pm 0.15
44 Hz 5.0 G	0.6 \pm 0.17	-
50 Hz 1.5 G	0.4 \pm 0.15	0.2 \pm 0.00
50 Hz 3.5 G	1.0 \pm 0.08	0.6 \pm 0.02
50 Hz 4.1 G	0.9 \pm 0.04	-
50 Hz 4.4 G	-	0.5 \pm 0.08
50 Hz 4.5 G	0.7 \pm 0.16	-
50 Hz 6.3 G	1.0 \pm 0.18	0.5 \pm 0.04
50 Hz 9.7 G	Not detectable	-
55 Hz 4.2 G	0.6 \pm 0.10	-
55 Hz 5.0 G	0.8 \pm 0.12	-

a



b

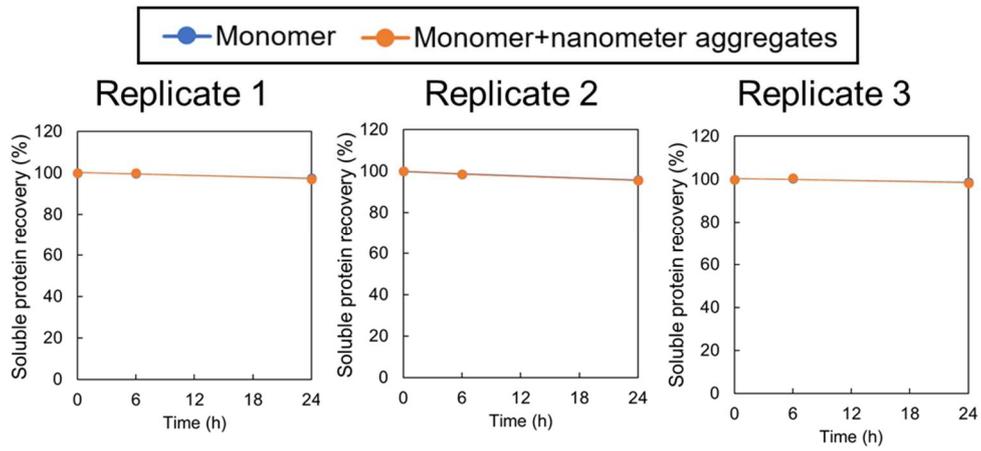


図 S 1 30 Hz 2.7 G で 24.0 時間振とうした IgG in HB NaCl 中のミクロン凝集体濃度 (a), モノマー及び可溶性タンパク質のリカバリーの再現性 (b). 繰り返し 3 回の独立した実験結果を示した. FIM (a) 及び SE-HPLC (b) 3 回測定における SD をエラーバーとした.

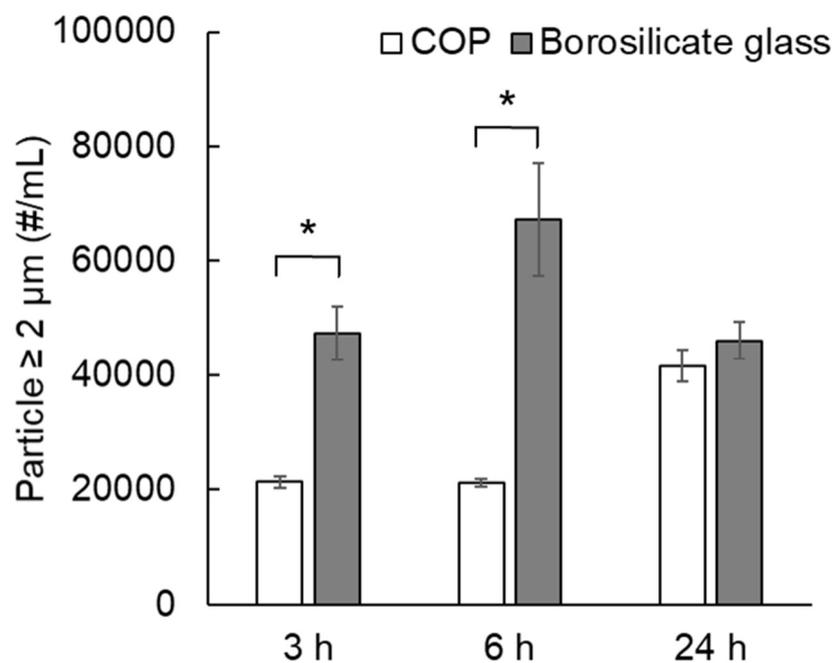


図 S2 異なる素材のバイアル (COP 及びホウケイ酸ガラス) を用いた, AAB (50 Hz, 6.3 G) による振とう試験後の IgG in HB NaCl のミクロン凝集体濃度. FIM の 3 回測定における平均値を示し, SD をエラーバーとした. *: Welch's t-test, $p < 0.05$.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、厚いご指導を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域 内山 進 教授に謹んで感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始、直接のご指導、種々の有益なご助言を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域、鳥巢 哲生 准教授に深く感謝致します。

本博士学位論文を審査して頂き、貴重なご指導及びご高閲を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 大政 健史 教授、ならびに大阪大学工学研究科生物工学専攻 生物プロセスシステム工学領域 紀ノ岡 正博 教授に厚く感謝申し上げます。

流体力学に関する考察につき、ご指導及びご助言を頂きました、大阪大学大学院工学研究科機械工学専攻 熱流動態学系 梶島 岳夫 教授、竹内 伸太郎 准教授、秋田県立大学システム科学技術学部 須藤 誠一 名誉教授に厚く感謝申し上げます。

本研究で用いた輸送試験システムの利用、使用方法のご指導、また、実輸送時のデータを提供頂きましたエスペック株式会社 東迫 正通 氏、岡田 俊介氏、山内 悟留氏にお礼申し上げます。本研究で使用した輸送試験システムの改造やご指導頂きました、アイデックス株式会社 上原 雅史 氏にお礼申し上げます。

論文リバイス対応の実験や図表の作成など、論文全般でお世話になった Zekun Wang 氏、凝集体分析方法や結果の考察について教えて頂いた丸野 孝浩 特任研究員、米田 早紀 氏、凝集体分析についての議論や研究室生活を支えてくださった榎本 敢太 氏、中野 紫帆 氏、伊藤 修平 氏、水口 潤哉 氏、田之上 凌佑 氏、前田 彩友子 氏、岡田 梨櫻 氏、さらに、研究室の先生、学生諸氏、研究員、事務補佐の方々に心から感謝いたします。

テーマ業務や承認申請業務が多忙な中、会社業務を離れて大学で研究に集中する環境を与えてくださり、ご助言も頂きました、大鵬薬品工業(株) 仁木 達也 氏、馬場 一

彦 氏，川真田 秀樹 氏，福岡 正哲 氏，大西 敬人 氏，岡田 慎治 氏，時光
義徳 氏，小島 章代 氏，楠本 憲司 氏，さらに，製剤研究所員の皆様に，心より
感謝申し上げます。

最後に，育児，仕事を抱えながら，2年3カ月間の単身での研究生活，その後も博士
論文作成に向けた休日の対応に理解を示し，いつも支えてくれた妻，母に深い感謝の意
を表します。ありがとうございました。

発表論文

- **Shinji Kizuki**, Zekun Wang, Tetsuo Torisu, Satoru Yamauchi, Susumu Uchiyama.

Relationship between aggregation of therapeutic proteins and agitation parameters:

Acceleration and frequency. *J Pharm Sci.* 2022;000:1-14. doi:10.1016/j.xphs.2022.09.022

※本学位論文第2章及び第3章に關与する原著論文

参考文献

1. Fekete S, Veuthey JL, Guillarme D. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;69:9-27. doi:10.1016/j.jpba.2012.03.024
2. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1-30. doi:10.1186/s12929-019-0592-z
3. Bender NK, Heilig CE, Dröll B, Wohlgemuth J, Armbruster F, Bernhard H. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int.* 2007;27:269-274. doi:10.1007/s00296-006-0183-7
4. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: An Immunologic perspective. *AAPS J.* 2006;8(3):501-507. doi:10.1208/aapsj080359
5. Carpenter J, Randolph TW, Jiskoot W, Crommelin DJA, Middaugh CR. Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. *J Pharm Sci.* 2009;98(4):1201-1205. doi:10.1002/jps
6. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, et al. Immunogenicity of therapeutic protein aggregates. *J Pharm Sci.* 2016;105(2):417-430. doi:10.1016/j.xphs.2015.11.002
7. Hawe A, Hulse WL, Jiskoot W, Forbes RT. Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates. *Pharm Res.* 2011;28(9):2302-2310. doi:10.1007/s11095-011-0460-3
8. Narhi LO, Schmit J, Bechtold-Peters K, Sharma D. Classification of protein aggregates. *J Pharm Sci.* 2012;101(2):493-498. doi:10.1002/jps.22790
9. Kijanka G, Bee JS, Schenerman MA, et al. Monoclonal antibody dimers induced by low pH, heat, or light exposure are not immunogenic upon subcutaneous administration in a mouse model. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):730-738. doi:10.1016/j.xphs.2019.04.021
10. Joh NH, Thomas L, Christian TR, et al. Silicone oil particles in prefilled syringes with human monoclonal antibody, representative of real-world drug products, did not increase immunogenicity in in vivo and in vitro model systems. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):845-853. doi:10.1016/j.xphs.2019.09.026
11. 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. doi:10.1002/jps.24592
12. Kijanka G, Bee JS, Korman SA, et al. Submicron size particles of a murine monoclonal antibody are more immunogenic than soluble oligomers or micron size particles upon subcutaneous administration in mice. *J Pharm Sci.* 2018;107(11):2847-2859. doi:10.1016/j.xphs.2018.06.029

13. Telikepalli S, Shinogle HE, Thapa PS, et al. Physical characterization and in vitro biological impact of highly aggregated antibodies separated into size-enriched populations by fluorescence-activated cell sorting. *J Pharm Sci.* 2015;104(5):1575-1591. doi:10.1002/jps.24379
14. Wang W, Roberts CJ. Protein aggregation – Mechanisms, detection, and control. *Int J Pharm.* 2018;550(1-2):251-268. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.08.043
15. Wu H, Randolph TW. Aggregation and particle formation during pumping of an antibody formulation are controlled by electrostatic interactions between pump surfaces and protein molecules. *J Pharm Sci.* 2020;109(4):1473-1482. doi:10.1016/j.xphs.2020.01.023
16. Movafaghi S, Wu H, Francino Urdániz IM, et al. The effect of container surface passivation on aggregation of intravenous immunoglobulin induced by mechanical shock. *Biotechnol J.* 2020;2000096:1-9. doi:10.1002/biot.202000096
17. Christopher J. Roberts. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol.* 2014;32(7):372-380. doi:10.1016/j.tibtech.2014.05.005.
18. Amin S, Barnett G V., Pathak JA, Roberts CJ, Sarangapani PS. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2014;19(5):438-449. doi:10.1016/j.cocis.2014.10.002
19. Arosio P, Rima S, Morbidelli M. Aggregation mechanism of an IgG2 and two IgG1 monoclonal antibodies at low pH: From oligomers to larger aggregates. *Pharm Res.* 2013;30(3):641-654. doi:10.1007/s11095-012-0885-3
20. Uchiyama S. Liquid formulation for antibody drugs. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2014;1844(11):2041-2052. doi:10.1016/j.bbapap.2014.07.016
21. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, Kishi N, Uchiyama S, Fukui K. Behavior of Monoclonal Antibodies: Relation between the Second Virial Coefficient (B_2) at Low Concentrations and Aggregation Propensity and Viscosity at High Concentrations. *Pharm Res.* 2012;29(2):397-410. doi:10.1007/s11095-011-0563-x
22. Strickley RG, Lambert WJ. A review of formulations of commercially available antibodies. *J Pharm Sci.* Published online 2021. doi:10.1016/j.xphs.2021.03.017
23. 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. doi:10.1002/jps.23973
24. 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. doi:10.1002/jps.24184
25. Fleischman ML, Chung J, Paul EP, Lewus RA. Shipping-induced aggregation in

- therapeutic antibodies: utilization of a scale-down model to assess degradation in monoclonal antibodies. *J Pharm Sci.* 2017;106(4):994-1000.
doi:10.1016/j.xphs.2016.11.021
26. 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.
doi:10.1016/j.xphs.2016.02.027
 27. Lin GL, Pathak JA, Kim DH, et al. Interfacial dilatational deformation accelerates particle formation in monoclonal antibody solutions. *Soft Matter.* 2016;12(14):3293-3302. doi:10.1039/c5sm02830b
 28. Bee JS, Schwartz DK, Trabelsi S, et al. Production of particles of therapeutic proteins at the air-water interface during compression/dilation cycles. *Soft Matter.* 2012;8(40):10329-10335. doi:10.1039/c2sm26184g
 29. Li J, Krause ME, Chen X, et al. Interfacial stress in the development of biologics: fundamental understanding, current practice, and future perspective. *AAPS J.* 2019;21(3). doi:10.1208/s12248-019-0312-3
 30. 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. doi:10.1016/j.xphs.2015.10.003
 31. 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.
doi:10.1016/j.xphs.2016.10.015
 32. 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.
doi:10.1002/jps.24429
 33. Grigolato F, Arosio P. Synergistic effects of flow and interfaces on antibody aggregation. *Biotechnol Bioeng.* 2020;117(2):417-428. doi:10.1002/bit.27212
 34. Maruno T, Watanabe H, Yoneda S, et al. Sweeping of adsorbed therapeutic protein on prefillable syringes promotes micron aggregate generation. *J Pharm Sci.* 2018;107(6):1521-1529. doi:10.1016/j.xphs.2018.01.021
 35. Defante AP, Kalonia CK, Keegan E, et al. The impact of the metal interface on the stability and quality of a therapeutic fusion protein. *Mol Pharm.* 2020;17(2):569-578.
doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b01000
 36. Joshi O, Chu L, Joseph M, D.Q. W. Adsorption and function of recombinant factor VIII at the air-water interface in the presence of tween 80. *J Pharm Sci.* 2009;98(9):3099-3107. doi:10.1002/jps

37. Joshi O, Joseph M, D.Q. W. Adsorption and function of recombinant factor VIII at solid–water interfaces in the presence of tween-80. *J Pharm Sci.* 2008;97(11):4741-4755. doi:10.1002/jps
38. Kim HL, McAuley A, Livesay B, Gray WD, McGuire J. Modulation of protein adsorption by poloxamer 188 in relation to polysorbates 80 and 20 at solid surfaces. *J Pharm Sci.* 2014;103(4):1043-1049. doi:10.1002/jps.23907
39. Treuheit MJ, Kosky AA, Brems DN. Inverse relationship of protein concentration and aggregation. *Pharm Res.* 2002;19(4):511-516. doi:10.1023/A:1015108115452
40. Wang W, Wang YJ, Wang DQ. Dual effects of Tween 80 on protein stability. *Int J Pharm.* 2008;347(1-2):31-38. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.042
41. Wang T, Markham A, Thomas SJ, et al. Solution stability of poloxamer 188 under stress conditions. *J Pharm Sci.* 2019;108(3):1264-1271. doi:10.1016/j.xphs.2018.10.057
42. Grapentin C, Müller C, Kishore RSK, et al. Protein-polydimethylsiloxane particles in liquid vial monoclonal antibody formulations containing poloxamer 188. *J Pharm Sci.* 2020;109(8):2393-2404. doi:10.1016/j.xphs.2020.03.010
43. Witeof AE, Daniels AL, Rea LT, et al. Machine learning and accelerated stress approaches to differentiate potential causes of aggregation in polyclonal antibody formulations during shipping. *J Pharm Sci.* 2021;000:1-10. doi:10.1016/j.xphs.2021.02.029
44. 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. doi:10.1002/jps.24259
45. Dill S, Brees K, Stahly A, Cheng E, Carpenter J, Caplan L. Mechanical shock during shipping of medications: the roles of packaging and transportation vendors. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):670-676. doi:10.1016/j.xphs.2019.10.050
46. Siska C, Harber P, Kerwin BA. Shocking data on parcel shipments of protein solutions. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):690-695. doi:10.1016/j.xphs.2019.10.064
47. Wu H, Chisholm CF, Puryear M, et al. Container surfaces control initiation of cavitation and resulting particle formation in protein formulations after application of mechanical shock. *J Pharm Sci.* 2020;109(3):1270-1280. doi:10.1016/j.xphs.2019.11.015
48. 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. doi:10.1074/jbc.M110.160457
49. Standard practice for performance testing of shipping containers and systems. *ASTM D4169.* Published online 2014.
50. Eppler A, Weigandt M, Hanefeld A, Bunjes H. Relevant shaking stress conditions for

- antibody preformulation development. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;74(2):139-147. doi:10.1016/j.ejpb.2009.11.005
51. Johann F, Wöll S, Winzer M, Snell J, Valldorf B, Gieseler H. Miniaturized forced degradation of therapeutic proteins and ADCs by agitation-induced aggregation using orbital shaking of microplates. *J Pharm Sci.* 2022;111(5):1401-1413. doi:10.1016/j.xphs.2021.09.027
 52. Lu F, Ishikawa Y, Shiina T, Satake T. Analysis of shock and vibration in truck transport in Japan. *Packag Technol Sci.* 2008;21(8):479-489. doi:10.1002/pts.841
 53. Fast JL, Cordes AA, Carpenter JF, Randolph TW. Physical instability of a therapeutic Fc fusion protein: domain contributions to conformational and colloidal stability. *Biochemistry.* 2009;48(49)(1):11724-11736. doi:10.1038/jid.2014.371
 54. Grzesica D. Measurement and analysis of truck vibrations during off-road transportation. *MATEC Web Conf.* 2018;211(June 2016):1-6. doi:10.1051/mateconf/201821113003
 55. Lu F, Ishikawa Y, Kitazawa H, Satake T. Effect of Vehicle Speed on Shock and Vibration Levels in Truck Transport By. *Packag Technol Sci.* 2010;23:101-109. doi:10.1002/pts.882
 56. Totoki S, Yamamoto G, Tsumoto K, Uchiyama S, Fukui K. Quantitative laser diffraction method for the assessment of protein subvisible particles. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):618-626. doi:10.1002/jps.24288
 57. 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. doi:10.1002/jps.23552
 58. Yoneda S, Niederleitner B, Wiggenhorn M, et al. Quantitative laser diffraction for quantification of protein aggregates: comparison with resonant mass measurement, nanoparticle tracking analysis, flow imaging, and light obscuration. *J Pharm Sci.* 2019;108(1):755-762. doi:10.1016/j.xphs.2018.09.004
 59. Farhat NH. Photonit neural networks and learning mathines the role of electron-trapping materials. *IEEE Expert Syst their Appl.* 1992;7(5):63-72. doi:10.1109/64.163674
 60. Basu P, Krishnan S, Thirumangalathu R, Randolph TW, Carpenter JF. IgG1 aggregation and particle formation induced by silicone-water interfaces on siliconized borosilicate glass beads: A model for siliconized primary containers. *J Pharm Sci.* 2013;102(3):852-865. doi:10.1002/jps.23434
 61. Koepf E, Schroeder R, Brezesinski G, Friess W. The missing piece in the puzzle: Prediction of aggregation via the protein-protein interaction parameter A^* . *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;128(October 2017):200-209. doi:10.1016/j.ejpb.2018.04.024

62. Yoneda S, Maruno T, Mori A, et al. Influence of protein adsorption on aggregation in prefilled syringes. *J Pharm Sci.* 2021;110(11):3568-3579. doi:10.1016/j.xphs.2021.07.007
63. Li L, Kumar S, Buck PM, et al. Concentration dependent viscosity of monoclonal antibody solutions: Explaining experimental behavior in terms of molecular properties. *Pharm Res.* 2014;31(11):3161-3178. doi:10.1007/s11095-014-1409-0
64. Kipp WI. Vibration testing equivalence: How many hours of testing equals how many miles of transport? *ISTA Conf 2000.* 2000;.:1-7.
65. Wallin B. Developing a random vibration profile standard. *Proc 2007 IAPRI Symp Wind UK.* 2007;.:42-54.
66. Hawe A, Wiggenhorn M, Weert M Van De, Garbe JHO, Mahler H-C, Jiskoot W. Forced degradation of therapeutic proteins. *J Pharm Sci.* 2012;101(3):895-912. doi:10.1002/jps
67. Nowak C, K. Cheung J, M. Dellatore S, et al. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide. *MAbs.* 2017;9(8):1217-1230. doi:10.1080/19420862.2017.1368602
68. Halley J, Chou YR, Cicchino C, et al. An industry perspective on forced degradation studies of biopharmaceuticals: survey outcome and recommendations. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):6-21. doi:10.1016/j.xphs.2019.09.018
69. Mahler H-C, Müller R, Frieß W, Delille A, Matheus S. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;59(3):407-417. doi:10.1016/j.ejpb.2004.12.004
70. Kiese S, Pappenberger A, Friess W, Mahler H-C. Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody. *J Pharm Sci.* 2008;97(10):4347-4366. doi:10.1002/jps.21328
71. Žuntar T, Ličen M, Kuzman D, Osterman O. Real-time imaging of monoclonal antibody film reconstitution after mechanical stress at the air- liquid interface by Brewster angle microscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2022;in press. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112757
72. Maskarinec SA, Hannig J, Lee RC, Lee KYC. Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys J.* 2002;82(3):1453-1459. doi:10.1016/S0006-3495(02)75499-4
73. Wu H, Randolph TW. Aggregation and Particle Formation During Pumping of an Antibody Formulation Are Controlled by Electrostatic Interactions Between Pump Surfaces and Protein Molecules. *J Pharm Sci.* 2020;109(4):1473-1482. doi:10.1016/j.xphs.2020.01.023
74. Kanthe AD, Krause M, Zheng S, et al. Armoring the interface with surfactants to prevent

- the adsorption of monoclonal antibodies. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(8):9977-9988. doi:10.1021/acsami.9b21979
75. Hashimoto H, Sudo S. Dynamic behavior of liquid free surface in a cylindrical container subject to vertical vibration. *Bull JSME*. 1984;27(227):923-930. doi:<https://doi.org/10.1299/jsme1958.27.923>