



Title	蛋白質医薬品のマイクロフィルトレーションのろ過挙動予測
Author(s)	井上, 航太
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98764
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

蛋白質医薬品のマイクロフィルトレーションの
ろ過挙動予測

2024 年 7 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

井上 航太

目次

第1章 序論.....	4
1.1 蛋白質医薬品の製造プロセスとマイクロフィルトレーション (MF) 工程	6
1.2 蛋白質溶液の MF のスケールアップの現状と課題.....	7
1.3 蛋白質凝集体の計測技術について	11
1.4 本研究の目的と構成.....	13
第2章 MF 閉塞挙動の予測モデルの構築.....	14
2.1 背景	14
2.2 材料及び方法	14
2.2.1 材料.....	14
2.2.2 Side-by-side ろ過試験用のラボスケール UF/DF	14
2.2.3 ろ過試験及びゼータ電位測定のための蛋白質凝集体の調製.....	15
2.2.4 MF フィルターのろ過試験.....	16
2.2.5 qLD 法を用いた粒子プロファイルの測定	17
2.2.6 SE-HPLC によるモノマー回収率の評価	18
2.2.7 ゼータ電位測定.....	18
2.2.8 DLS を用いたサイズ分布の測定	18
2.3 結果と考察	18
2.3.1 6種類の抗体を用いた Side-by-side の MF フィルターろ過試験.....	18
2.3.2 モデルビーズを用いたろ過試験	23
2.3.3 モデルビーズ及び蛋白質凝集体のゼータ電位測定	40
2.3.4 qLD 法による粒子濃度算出方法の検討.....	47
2.3.5 ろ過速度低下プロファイルの予測モデルの構築	49
2.4 小括	71
第3章 MF ろ過初速度予測法の構築	72
3.1 背景	722
3.2 試料及び方法	755
3.2.1 材料.....	75
3.2.2 サンプルの粘度測定	755
3.2.3 MF フィルターのろ過試験.....	755
3.3 結果と考察	755
3.3.1 モデル水溶液のろ過初速度に対するハーゲン・ポアズイユの法則の適用確認 755	
3.3.2 ろ過初速度予測に対するモデルの適用可能性評価	799
3.4 小括	833
第4章 総括.....	84

略語・記号リスト	877
謝 辞	899
発表論文	900
参考文献	911

第 1 章 序論

1980 年代に遺伝子組換え技術が開発され、ヒトインスリンが医薬品として開発されて以来、遺伝子組換え技術や細胞培養技術などのバイオテクノロジーを応用して製造される、バイオテクノロジー応用医薬品（バイオ医薬品）の開発が加速している¹。中でも、1990 年代後半にリツキシサン（リツキシマブ）やハーセプチン（トラストズマブ）が、抗癌剤として上市されて以降、抗体医薬品の開発競争が激化した^{1,2}。また、近年では、抗体と低分子医薬を適切なリンカーを介して結合した抗体薬物複合体（ADC）^{1,3}や二重特異性抗体^{1,4}など、より複雑で多様な構造を有するバイオ医薬品が開発のトレンドとなっている。表 1 には、2023 年の世界の医薬品売上ランキングの上位 10 品目を記載した⁵。表を見ると、売上上位 10 品目の多くをバイオ医薬品、特に、抗体や Fc 融合蛋白質などの蛋白質医薬品が占めることがわかる。

表 1 2023 年の世界の医薬品売上ランキング（Top 10）

	Product	Company	2023 Sales (US\$ billions)
1	Keytruda	Merck & Co.	25.0
2	Humira	AbbVie	14.4
3	Ozempic	Novo Nordisk	13.9
4	Eliquis	Bristol Myers Squibb/ Pfizer	12.2
5	Biktarvy	Gilead Sciences	11.9
6	Dupixent	Sanofi/ Regeneron	11.6
7	Comirnaty	Pfizer/ BioNTech	11.2
8	Stelara	Johnson & Johnson	10.9
9	Darzalex	Johnson & Johnson	9.7
10	Opdivo	Bristol Myers Squibb/ Ono	9.0

この表は、参考文献⁵を基に作成した。
水色でハイライトしたものが、バイオ医薬品である。

1.1 蛋白質医薬品の製造プロセスとマイクロフィルトレーション（MF）工程

抗体をはじめとする蛋白質医薬品の発現には、多くの場合、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等の動物細胞が用いられている。大まかな製造プロセスとしては、抗体発現遺伝子を導入したセルバンクを起眠し、拡大培養、生産培養を行う。培養終了後は、デプスフィルターによるろ過や遠心によって、培養液から細胞を除去し、複数のクロマトグラフィー工程により、精製される。一般に、蛋白質医薬品の製造では、発現細胞の起眠から原薬の分注まで2か月程度の期間を要する エラー! 参照元が見つかりません。。

蛋白質医薬品の製造において、最も重要とされることの 하나가、微生物汚染を防止するための衛生管理である。微生物汚染は、医薬品を投与される患者の安全性に悪影響を及ぼす可能性がある。例えば、グラム陰性菌の細胞壁を構成するリポ多糖であるエンドトキシンは、発熱物質（体内に入ると体温上昇作用を引き起こす物質）であり、ヒトや動物の体内に入ると、マクロファージを強力に活性化する。また、医薬品に混入した微生物によっては、その他の毒素を生成する可能性がある。動物細胞培養は、栄養豊富な培地中で中性付近に pH が制御され、37°C 付近に温度コントロールされ行われるほか、一連の製造工程は室温の作業室内で実施されることから、蛋白質医薬品の製造プロセスには、微生物の生育に至適な条件が揃っているといえる。

マイクロフィルトレーション（MF）は、バイオ医薬品の製造において微生物の汚染リスクを軽減するための必須の工程の一つである。そのため、MF は製造バッチ内の複数の工程の後に行われる⁷。孔径 0.22 μm の MF は、ウイルスやマイコプラズマを除くほとんどの微生物を効果的に除去することが知られている^{8,9}。ここでは詳細は述べないが、ウイルスやマイコプラズマについては、別途、原材料の管理やウイルス不活化処理、ナノフィルターやクロマトグラフィーを用いた物理的除去が可能な工程を導入し、汚染リスクを低減している。

1.2 蛋白質溶液の MF のスケールアップの現状と課題

前述の通り、微生物汚染のリスク低減のために非常に重要な工程である MF 工程は、さまざまな蛋白質濃度、バッファー組成のサンプルに対して実施される。また、製造において、MF を行う溶液の蛋白質濃度は、成り行きで管理される場合が多く、ある程度変動することにも留意すべきである。

フィルターの閉塞メカニズムに関する研究は、対象を蛋白質溶液に限らず、廃水や油、気体などのさまざまなものを対象に進展しており、図 1 に示すような閉塞モデル式が考案されている¹⁰。

製造をスケールアップした際に、必要となる最小のフィルター面積を推定するために、 V_{max} 試験と呼ばれる方法が、一般に用いられている。 V_{max} 試験の方法の概要を図 2 に図示した。 V_{max} とは、単位フィルター面積あたりの最大ろ過液量 (L/m^2) のことである。この手法では、スケールアップした製造時と同等と考えられる品質のサンプルを準備し、小さなラボスケール用の MF フィルターで、実際に定圧ろ過試験を実施する。定圧ろ過試験で得られた結果に対して、standard blocking のメカニズムでのフィルター閉塞を仮定した (1) 式をフィッティングし、 V_{max} を外挿する^{11, 12, 13}。

$$\frac{t}{V} = \frac{1}{J_0} + \left(\frac{1}{V_{max}} \right) t \quad (1-1)$$

ここで、 V は単位面積当たりのろ過液量 (L/m^2)、 t は時間 (min)、 J_0 はろ過の初速度 ($L/m^2/min$) である。この方法で算出した V_{max} を基に、(2) 式から、スケールアップ時に必要な最小フィルター面積 A_{min} (m^2) を推定する。

$$A_{min} = \left(\frac{V_B}{V_{max}} + \frac{V_B}{J_0 \times t_B} \right) \times \text{Safety factor} \quad (1-2)$$

V_B は、スケールアップ時に想定される処理液量 (L)、 t_B は、想定される処理時間 (min) である。この V_{max} 試験は、実績のある MF のスケールアップ手法であるが、実製造では、依然として予期しないフィルター閉塞が起きることもある。製造における予期しないフィルター閉塞は、製造における作業の遅延や、微生物汚染のリスクの増加を引き起こすなどの可

能性がある。こうした予期しないフィルター閉塞に関する原因究明や対策の検討を実施したいところであるが、それにはサンプル量の確保の面で課題がある。 V_{max} 試験では、ラボスケールの小さなMFフィルターを用いてろ過試験を実施するが、通常100 mL程度のサンプルが必要となる。また、実製造のサンプルとろ過試験のサンプルで、蛋白質濃度や含まれる凝集体などの不純物含量を揃えるため、希釈したサンプルを用いることは、推奨されない。そのため、ろ過試験に必要なサンプル量を確保することは、特にプロセス開発の初期段階では、容易ではなく、さまざまな検討実験ができないことがある。したがって、予期しないMFフィルターの閉塞の原因を究明することは、依然として難しい状況にある。

蛋白質溶液のMF時に生じるフィルター閉塞について、ミクロンサイズの蛋白質凝集体の量との間に負の相関があることが報告されている^{14, 15, 16}。しかしながら、MFフィルターの閉塞挙動とサンプルに含まれる粒子サイズ・量との定量的な関係は、未だ明確にはなっていない。

蛋白質医薬品の製造では、さまざまな工程で、サンプルの混合操作が行われるが、その際の混合の機構によって、蛋白質凝集体生成の程度に影響を与えることが、明らかになっており、製造工程における蛋白質凝集体の生成量は、製造設備に依存する^{14, 16, 17, 18}。他にも、送液に用いるポンプの機構やチューブの材質によって、蛋白質凝集体の生成量に違いが出ることも報告されている^{19, 20, 21}。したがって、ラボスケールのプロセス開発で使用する装置と実際の製造設備で、MF工程に持ち込まれる蛋白質凝集体のサイズ・量のプロファイルには、差異があることが予想される。このため、製造に用いる攪拌機や送液ポンプの機構、及び接液部の材質の選定が、製造のスケールアップの成否に対して、重要な要素である。また、ラボスケールのプロセス開発の時点で、製造設備での凝集体生成のリスクを評価しておくことが、重要であると考えられる。

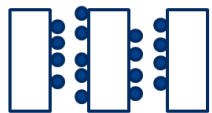

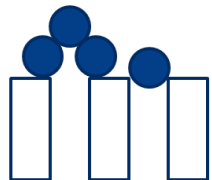
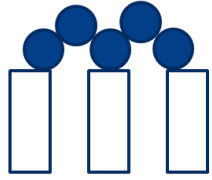
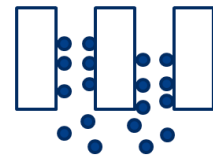
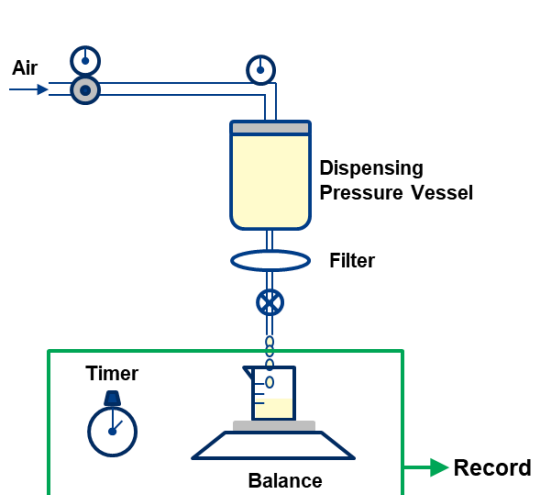
Standard blocking  $\frac{J}{J_0} = \left(1 - \frac{K_s V}{2}\right)^2$	Complete blocking  $\frac{J}{J_0} = 1 - \frac{K_b V}{J_0}$	Intermediate blocking  $\frac{J}{J_0} = e^{-K_i V}$
Cake filtration  $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 V + 1}$	Adsorption  $\frac{J}{J_0} = \left(1 - \frac{5K_a V}{J_0}\right)^{4/5}$	

図1 フィルター閉塞モデル.

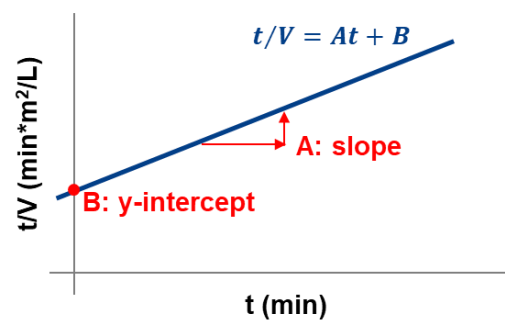
J : ろ過速度 (L/m²/min), J_0 : ろ過初速度 (L/m²/min), V : ろ過液量 (L/m²)

K_s , K_b , K_i , K_c , K_a : 各閉塞モデルの定数

この図は、参考文献¹⁰を基に作成した。



t - t/V plot



$$t/V = At + B \leftrightarrow V = \frac{1}{(A + (B/t))}$$

$$t \rightarrow \infty, \quad V_{max} = \frac{1}{A}$$

$$\frac{1}{B} : \text{Flow rate at } t=0 = J_0$$

$$A_{min} = \left(\frac{V_B}{V_{max}} + \frac{V_B}{J_0 \times t_B} \right) \times \text{Safety factor}$$

図 2 V_{max} 試験の概要.

t : 時間 (min), V : ろ過液量 (L/m^2), V_{max} : 単位フィルター面積当たりの最大ろ過液量 (L/m^2), J_0 : ろ過初速度 ($L/m^2/min$), A_{min} : スケールアップ時に必要な最小フィルター面積 (m^2), V_B : スケールアップ時に想定される処理液量 (L), t_B : 想定される処理時間 (min)

この図は、参考文献¹³を参考に作成した。

1.3 蛋白質凝集体の計測技術について

蛋白質、特に抗体の凝集体に関する分析は、盛んに行われており、特に、2010 年代以降、計測技術の開発で特に大きな進展があった。しかしながら、蛋白質凝集体のサイズ範囲は、数十 nm から数百 μm まで非常に幅広く、現時点では 1 つの測定原理で、これらすべて範囲をカバーすることはできない。そこで、計測対象のサイズに対して、適切な測定手法を選択し、適宜、使い分ける必要がある。図 3 には、代表的な蛋白質凝集体の計測技術について、それぞれ評価可能なサイズ範囲を記載した²²。

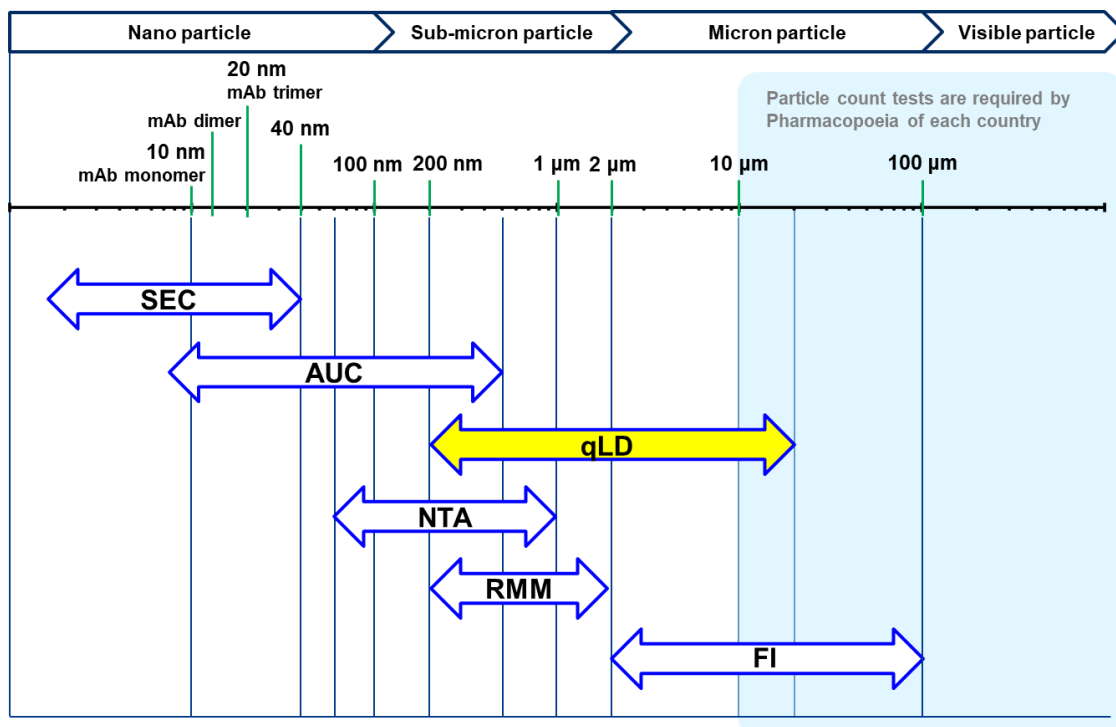


図3 蛋白質凝集体の計測技術と測定サイズ範囲。

SEC : サイズ排除クロマトグラフィー (Size exclusion chromatography), AUC : 超遠心分析 (Analytical ultracentrifugation), qLD : 定量レーザ回折・散乱法 (Quantitative laser diffraction), NTA : ナノ粒子追跡法 (Nano-particle tracking analysis), RMM : 共振質量測定法 (Resonant mass measurement), FI : フローイメージング法 (Flow imaging)

この図は、参考文献²²を参考に作成した。

1.4 本研究の目的と構成

本研究の目的は、MF フィルターのろ過性を決定づける重要な要素である負荷量依存的なろ過速度低下とろ過初速度に影響する要因を特定し、実際にサンプルをろ過せずに、そのサンプルの状態から予測する手法を構築することである。

第2章では、MF フィルター閉塞の原因となる粒子サイズと負荷量依存的なろ過速度低下の関係を特定し、ろ過の対象となるサンプル中に含まれる蛋白質凝集体の定量的なサイズ分布に基づいて、MF フィルターのろ過挙動を予測する方法を構築した。

また、第3章では、MF のろ過初速度とサンプルの粘度の関係が Hagen-Poiseuille の式に従うことを示し、ろ過初速度をサンプルの粘度から予測することに成功した。

最後に、第4章では、総括として、第2章及び第3章で得られた成果をまとめ、これらの予測手法が蛋白質医薬品のプロセス開発、及びスケールアップ検討でどのように活用できるか、また、蛋白質医薬品候補の選抜にどのように活用できるかなど、今後の展望を示した。

第2章 MF 閉塞挙動の予測モデルの構築

2.1 背景

抗体溶液の MF 時に生じるフィルター閉塞について、ミクロンサイズの抗体凝集体の量との間に負の相関があることが報告されている^{14, 15, 16}。しかしながら、MF フィルターの閉塞挙動とサンプルに含まれる粒子サイズ・量との定量的な関係は、未だ明確にはなっていない。本章では、MF フィルターの閉塞を引き起こす粒子のサイズと、フィルターに対する粒子負荷量依存的なろ過速度低下のプロファイルとの相関を評価し、予測対象のサンプル中の蛋白質凝集体の定量情報を基に、ろ過速度低下のプロファイルを予測可能なモデルの構築を目指した。

2.2 材料及び方法

2.2.1 材料

8 種類のモノクローナル抗体 (mAb1~mAb7)、及び 1 種類の Fc 融合蛋白質 (Fc-fusion1) については、CHO 細胞で発現させ、複数のクロマトグラフィー工程を経て高度に精製したものをを用いた。

直径 40, 100, 200, 500 nm, 1, 2, 4 μm のポリスチレンラテックス (PSL) 製の NIST Traceable Particle Size Standards は、Polysciences, Inc. から購入した。

表面未修飾シリカビーズ (直径 200, 500 nm ならびに 1.5, 4 μm)、及び表面にアミノ (NH_2) 基を導入した、表面修飾シリカビーズ (直径 200, 500 nm、ならびに 1, 1.5, 4 μm) は、micromod Partikeltechnologie GmbH から購入した。

2.2.2 Side-by-side ろ過試験用のラボスケール UF/DF

Side-by-side で MF フィルターのろ過試験を行うために、6 つの精製抗体 (mAb1~mAb6) をプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより処理し、pH 3.6 で溶出することでバッファー交換を行った。続いて、プロテイン A カラムの溶出液の pH を 1 M Tris で 5.0

に調整し、50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) で 2 倍に希釈した。次に、Masterflex®ペリスタリックポンプ (Avantor, Inc.) と UF 膜のマニフォールド、及びマグネティックスターラーを組み合わせたラボスケールの UF/DF システムを用いて、5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5) にバッファー交換した後、各抗体を 50 mg/mL に濃縮した。

2.2.3 ろ過試験及びゼータ電位測定のための蛋白質凝集体の調製

ここでは、抗体サンプルに対して、接触攪拌またはオービタルシェーカーを用いた回転振盪ストレスを加えて、蛋白質凝集体を意図的に生成させた。

接触攪拌ストレスは、4 mL の抗体サンプルを、5 mL 容の Nalgene™ PETG Diagnostic Bottles with Closure: Sterile (Thermo Fisher Scientific) に入れ、マグネティックスターラー HS-360 (AS ONE) を用いて、長さ 1 cm の攪拌子を室温下、最大の回転速度で攪拌した。

オービタルシェーカーを用いた回転振盪ストレスを加えるために、4 mL の抗体サンプルを、30 mL 容の Nalgene™ Square PETG Media Bottles with Closure (Thermo Fisher Scientific) に入れ、オービタルシェーカー PSU-10i (Biosan Ltd.) を用いて、室温条件下で、300 rpm で回転させた。

前述の接触攪拌または回転振盪ストレスを加えて意図的に生成させた蛋白質凝集体サンプルを MF フィルターのろ過試験に用いた。ろ過試験の実施方法の詳細は、2.2.4 に記載した。

また、蛋白質凝集体のゼータ電位を測定するために、以下の方法で、蛋白質凝集体を多量に含むサンプルを意図的に作製した。濃度 2 mg/mL の mAb2 に対して、接触攪拌または回転振盪ストレスを 24 時間加え、ストレスを加えたサンプルを、20°C において、15,000×g で 60 分間遠心した。遠心分離により得られた、上清、及び沈殿を再懸濁したサンプルについて、蛋白質凝集体の粒子プロファイルとゼータ電位を測定した。蛋白質凝集体の粒子プロファイルの測定方法については、2.2.5 に、ゼータ電位の測定方法については、2.2.7 に詳細を記載した。

2.2.4 MF フィルターのろ過試験

MF フィルターのろ過試験には、Merck KGaA 製の 0.5/0.2 μm ポリエーテルスルホン (PES) フィルター (フィルターA)、及び 0.22 μm ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) フィルター (フィルターB) を使用した。ろ過試験は、室温下、0.1 MPa の一定圧の条件で、フィルター面積 3.5 cm^2 のフィルターを用いて実施した。ろ過の透過液量を経時的に重量で記録し、密度 1.0 g/cm^3 仮定して、液量に換算した。各ろ過試験のデータを確認し、ろ過開始直後に観測した最大の流速をろ過初速度 J_0 として決定した。次いで、(1-1) 式を用いて単位フィルター面積あたりの最大ろ過液量である V_{\max} (L/m^2) を算出した^{11, 12}。

PSL、及びシリカビーズを用いたろ過試験では、(a) 5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5)、(b) 120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0)、及び (c) 0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) の 3 種類のバッファーにビーズの濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように懸濁した。

フィルターの閉塞メカニズムを解析するために、各ろ過試験の結果を以下に示した 5 種類のフィルター閉塞モデル¹⁰にフィッティングした。 K_s , K_b , K_i , K_c , K_a は、それぞれの閉塞モデルの定数である。

$$\text{Standard blocking:} \quad \frac{J}{J_0} = \left(1 - \frac{K_s V}{J_0}\right)^2 \quad (2-1)$$

$$\text{Complete blocking:} \quad \frac{J}{J_0} = 1 - \frac{K_b V}{J_0} \quad (2-2)$$

$$\text{Intermediate blocking:} \quad \frac{J}{J_0} = e^{-K_i V} \quad (2-3)$$

$$\text{Cake filtration:} \quad \frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 V + 1} \quad (2-4)$$

$$\text{Adsorption:} \quad \frac{J}{J_0} = \left(1 - \frac{5K_a V}{J_0}\right)^{4/5} \quad (2-5)$$

(2-1) ~ (2-5) 式に示したフィルター閉塞モデルでは、フィルターをこれらの均一な内径、長さを持った円管の束として仮定している。(2-1) 式の standard blocking は、フィルターに負荷した粒子が円管内壁に均一に捕捉されるというモデルである。この場合、粒子負荷

量に依存して、円管の内径が規則的に減少していく。(2-2) 式の **complete blocking** は、負荷した粒子が円管の入り口で捕捉され、円管を完全に塞ぐことで閉塞することを想定した閉塞モデルである。ここでは、開口円管の数は、粒子負荷量に比例して減少する。(2-3) 式に示した **intermediate blocking** は、フィルターに負荷された粒子が円管の入り口で円管を完全に塞ぐ、または円管上に捕捉された粒子の上に捕捉されることを想定したモデルである。その場合は、フィルターに負荷された粒子によって開口円管が塞がれる割合は、開口円管の数に比例して減少する。(2-4) 式の **cake filtration** は、フィルターに負荷された粒子が、円管を塞ぐことなく、円管の表面に堆積していくというモデルである。この場合、粒子負荷量に比例して、堆積した粒子により形成されるケーキ層の厚みが増していく。(2-6) 式の **adsorption** のモデルでは、**standard blocking** と同様にフィルターに負荷した粒子が円管内壁に捕捉されるが、その挙動が 0 次反応速度論に基づくと仮定している。

フィルター閉塞モデルのフィッティングには、**Gauss-Newton** 法を採用し、**JMP® 14.0.0** (SAS Institute Inc.) を用いた。各ろ過試験の結果に対して、最も当てはまりの良いモデルとして、二乗平均平方根誤差 (RMSE) の値が最も小さくものを選択した。

また、溶液の粘度が MF フィルターのろ過速度低下に与える影響を評価するため、直径 500 nm のアミノ基 (NH₂) 修飾シリカビーズをビーズの濃度が 100 µg/mL となるように、10%, 20%, 30%, 40% (w/w) となるように調製したトレハロース二水和物 (富士フィルム和光純薬) の水溶液に懸濁した。

2.2.5 qLD 法を用いた粒子プロファイルの測定

サブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体の粒子プロファイルを定量的に評価するために、qLD 法^{23, 24}を採用した。測定には **Aggregates Sizer** (島津製作所) を用いた。粒子の定量解析には、粒子の屈折率と密度の情報が必要であり、蛋白質サンプルでは、それぞれ 1.46 と 1.37 g/cm³、PSL ビーズは、1.62 と 1.05 g/cm³ を用いた。また、ノイズのカットレベルは 100 として解析を実施した。

2.2.6 SE-HPLC によるモノマー回収率の評価

抗体のモノマー回収率 (%) の評価のため、TSKgel UltraSW Aggregate カラム (7.8 mm I.D.×300 mm, 東ソー) を用いて、SE-HPLC の測定を実施した。カラムオーブンを 25°C に設定し、0.4 M NaCl を含む 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を移動相とし、流速 0.5 mL/min でアイソクラティック測定を行った。検出波長は 280 nm を用いた。

2.2.7 ゼータ電位測定

ゼータ電位は、Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical) を用いて、レーザードップラー電気泳動²⁵の原理で測定した。各サンプルを 3 回測定し、測定値の平均値、及び標準偏差 (SD) を算出した。

2.2.8 DLS を用いたサイズ分布の測定

各種バッファーに懸濁したビーズの分散性を評価するため、DLS を用いてビーズのサイズ分布を測定した。測定には Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical) を使用した。なお、測定時の温度は 20°C に設定した。

2.3 結果と考察

2.3.1 6 種類の抗体を用いた Side-by-side の MF フィルターろ過試験

2.2.2 に記載の通り、プロテイン A カラムでのバッファー交換とラボスケールの UF/DF で処理された 6 種類の抗体 (mAb1~mAb6) をフィルター A または B を用いてろ過した。図 4 には、これら 6 種類の抗体の UF/DF 前後、及びフィルター A または B でろ過した後の、qLD 法によるサブミクロンからミクロンサイズの凝集体の定量結果を示した。

UF/DF によって、6 種類いずれの抗体についても、200 nm から数十 μm の粒子が増加した。mAb1~mAb3 と比べて、mAb4~mAb6 では、特に 200 nm から数 μm の粒子が増加した。UF/DF により生成した蛋白質凝集体のほとんどは、フィルター A またはフィルター B を使用した MF によって除去されたが、直径 200 nm 未満の粒子は除去されなかった。

この Side-by-side のろ過試験において 6 種類の抗体のろ過性は、図 5 に示したように、フィルターA では、ろ過性の高いものから順に、mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5, mAb6 であり、フィルターB では、mAb2, mAb3, mAb1, mAb4, mAb5, mAb6 の順であり、抗体毎にろ過性の違いが見られた。

先行研究で、ミクロンサイズの蛋白質凝集体量と MF フィルターのろ過性に負の相関があることが報告されていた^{13, 15, 16}。図 6 に示したが、我々の結果でも、200 nm～2 μ m の粒子の総濃度は、 V_{max} と負の相関があり、近似曲線の決定係数 (R^2) は、フィルターA では $R^2=0.8527$ 、フィルターB では $R^2=0.5213$ であった。これらの結果から、200 nm～2 μ m の粒子の総濃度からは、これらのフィルターのろ過性、ここでは V_{max} を正確に予測するには不十分であると考えられた。このことから、特定のサイズ範囲（ここでは 200 nm～数 μ m）の単純な粒子の合計濃度ではなく、蛋白質凝集体のサイズ分布が、MF フィルターのろ過速度低下の挙動を予測するために重要であるのではないかと考え、次の実験に移った。

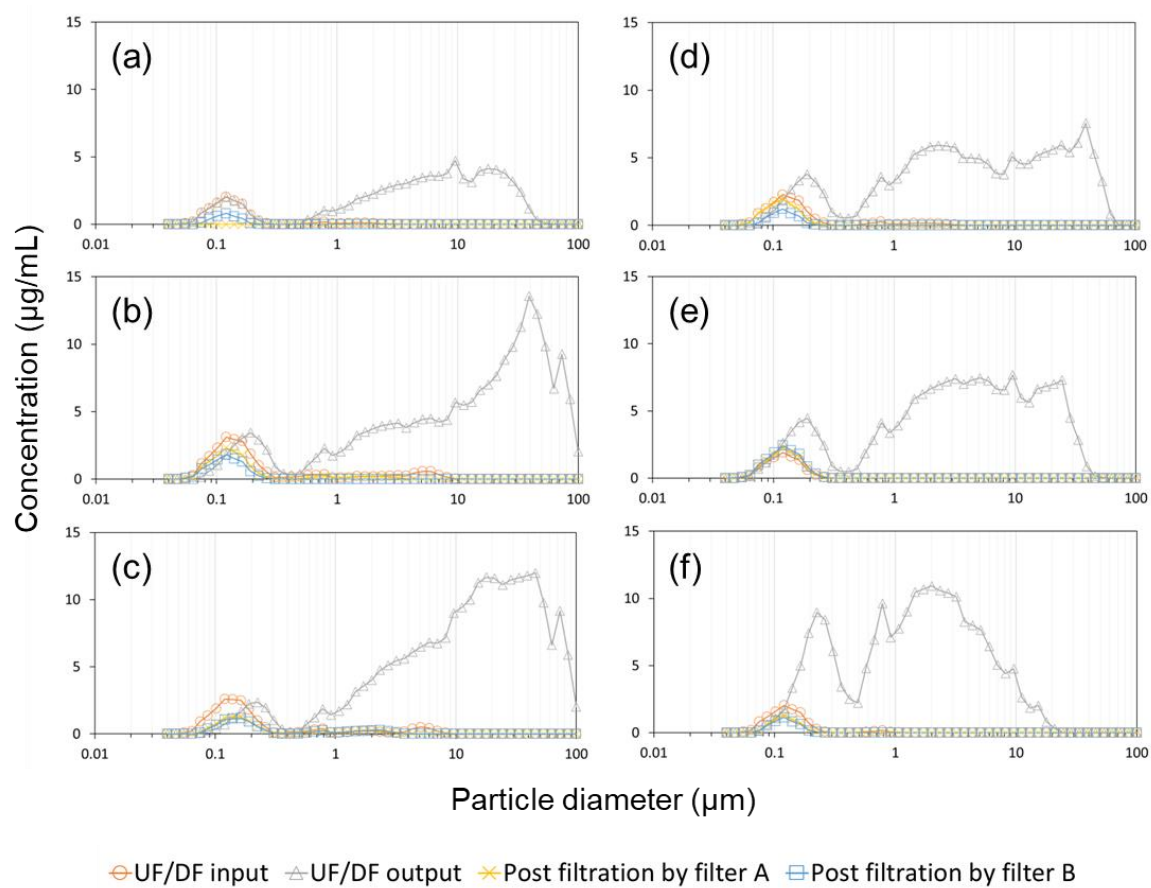
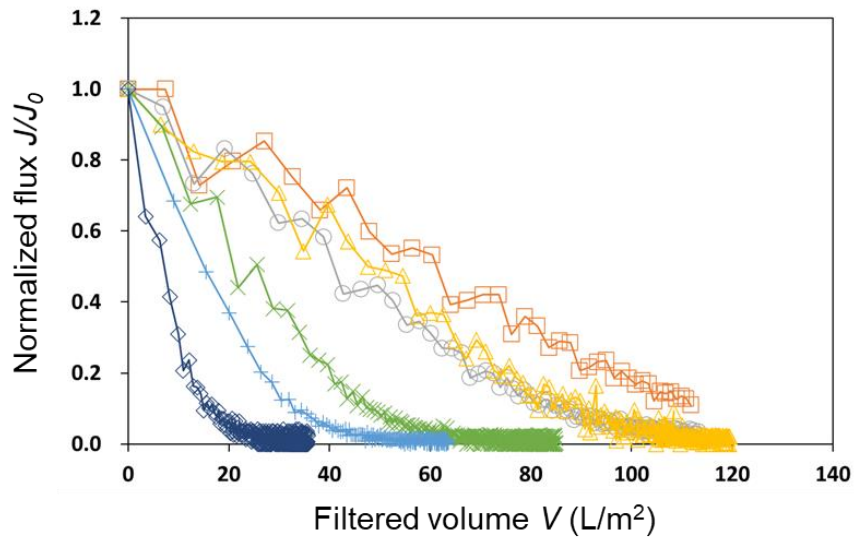


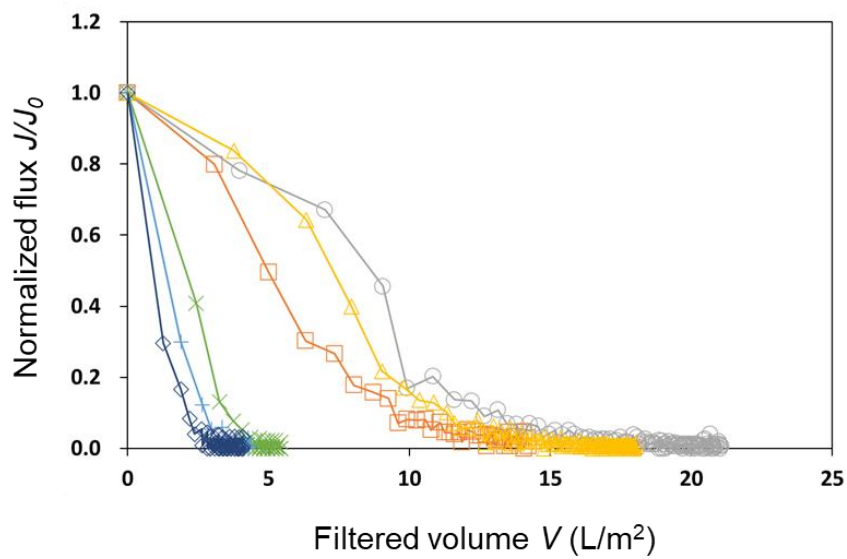
図4 qLD法を用いた6種類の抗体のサブミクロンからミクロンサイズの凝集体の定量結果.

サンプル：(a) mAb1, (b) mAb2, (c) mAb3, (d) mAb4, (e) mAb5, (f) mAb6

(a)



(b)

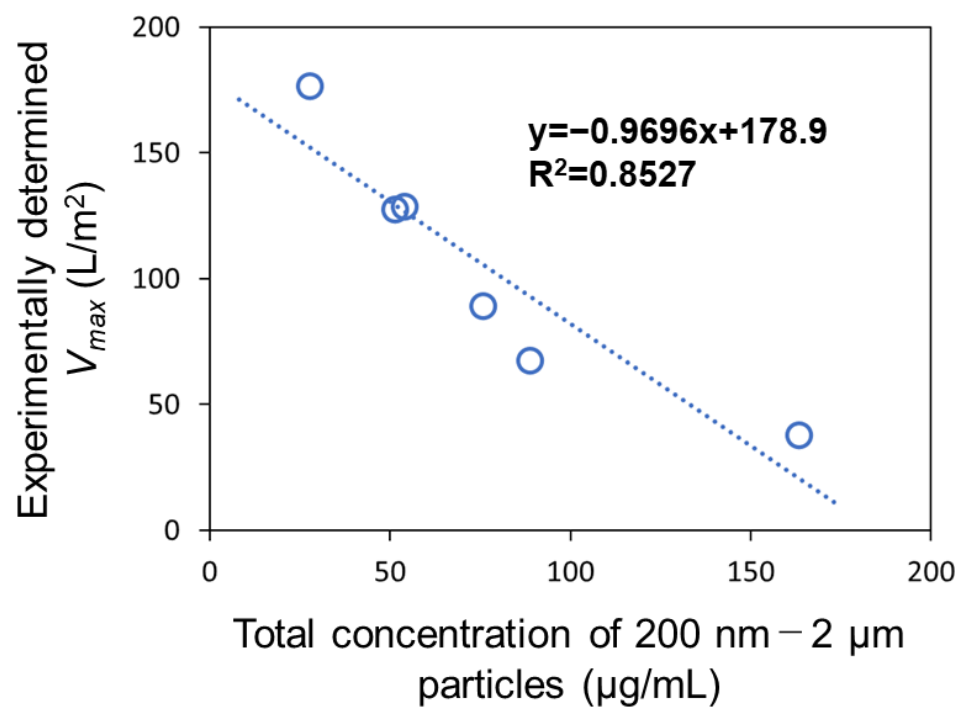


□ mAb 1 ○ mAb 2 △ mAb 3 × mAb 4 + mAb 5 ◇ mAb 6

図5 6種類の抗体のSide-by-sideのMFフィルターろ過試験の結果.

(a) フィルターA, (b) フィルターB

(a)



(b)

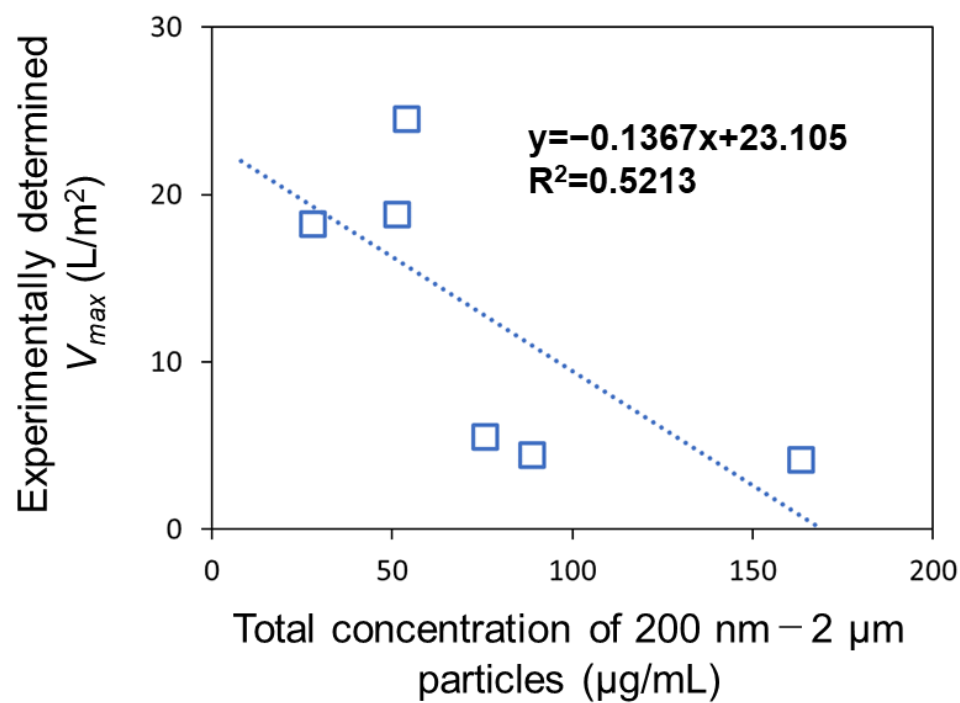


図6 6種類の抗体の200 nm～2 μmの凝集体量とろ過試験で得られた V_{max} との相関。

(a) フィルターA, (b) フィルターB

2.3.2 モデルビーズを用いたろ過試験

2.3.1 の結果を踏まえ、MF フィルターに負荷された蛋白質凝集体の量とろ過速度低下挙動の相関を評価することを試みた。この実験は、特定のサイズで単分散の蛋白質凝集体を用いて実施することが理想的であるが、蛋白質の凝集体は保存安定性が低いため、安定かつ再現性良くサイズが揃った標準物質を調製することは困難である。そこで、本研究では、直径 40, 100, 200, 500 nm, 1, 2, 4 μm の PSL ビーズ、及び直径 200, 500 nm, 1, 1.5, 4 μm のシリカビーズを用いて、ろ過プロファイルを評価した。

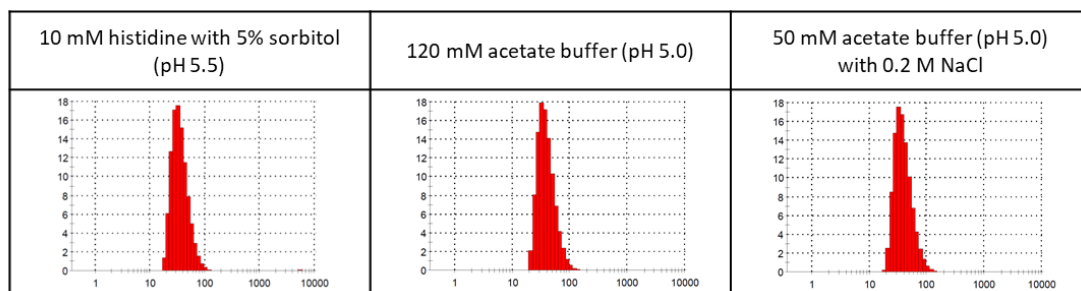
初めに、各ビーズを、(a) 5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5)、(b) 120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0)、及び (c) 0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) の 3 種類のバッファーにそれぞれ懸濁し、ビーズとバッファーの組み合わせ毎にビーズの分散状態を DLS で評価した (図 7)。ほとんどのビーズとバッファーの組み合わせでは、ビーズは意図したサイズで単分散のサイズ分布であったが、直径 200 nm の表面未修飾のシリカビーズと、直径 200 nm のアミノ基修飾のシリカビーズを 0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に懸濁したサンプルでは、いずれも平均粒子径が 200 nm よりもはるかに大きくなっており、懸濁液中でのビーズの凝集が疑われた。

次に、これらのビーズの懸濁液を用いて、フィルターA のろ過試験を実施した (図 8)。直径 4 μm 以上のビーズは、ビーズの材質や懸濁したバッファーに依らず、ビーズの負荷量依存的なろ過速度低下を引き起こさないことが示された。一方で、直径 2 μm 以下のビーズは、ビーズの負荷量依存的なろ過速度低下を引き起こしたが、中でも直径 500 nm~2 μm のビーズは、ビーズの材質や表面修飾の有無、懸濁したバッファーが異なる場合も、同じ直径のものであれば、ビーズの負荷量依存的なろ過速度低下のプロファイルは同等であった。これと対照的に、直径 200 nm 以下のビーズでは、ビーズの負荷量依存的なろ過速度低下のプロファイルは、ビーズの種類や懸濁したバッファーの違いによって影響を受けた。興味深いことに、同じ材質・直径のビーズでも、懸濁したバッファーが異なると、フィルターに捕捉されたり、素通りしたりすることが確認された。

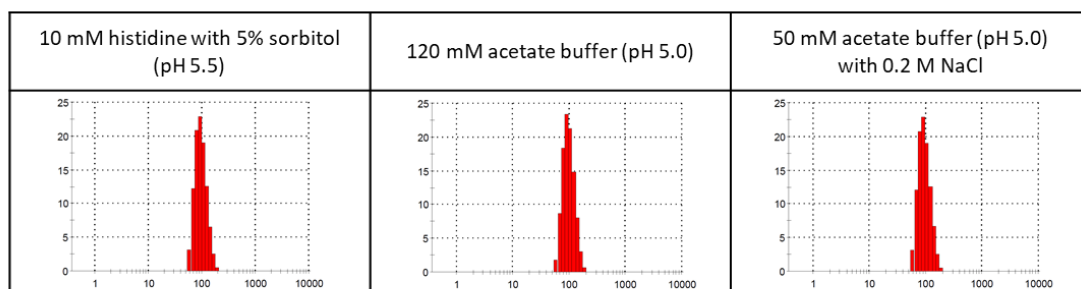
これらの知見から、直径 500 nm～200 nm のビーズでは、フィルターA のろ過速度低下プロファイルにビーズの表面特性が影響していないのに対し、直径 200 nm 以下のビーズでは、ビーズの種類や懸濁したバッファのの違いによるビーズの表面特性の違いが、ろ過速度低下プロファイルに大きく影響しているのではないかと考えられた。そこで、ろ過試験結果にフィルター閉塞モデルをフィッティングし、フィルター閉塞メカニズムの観点から考察することとした。

また、次の 2.3.3 では、モデルビーズのゼータ電位を測定し、その結果を踏まえ、各ビーズによるフィルターA のろ過速度低下プロファイルを考察した。

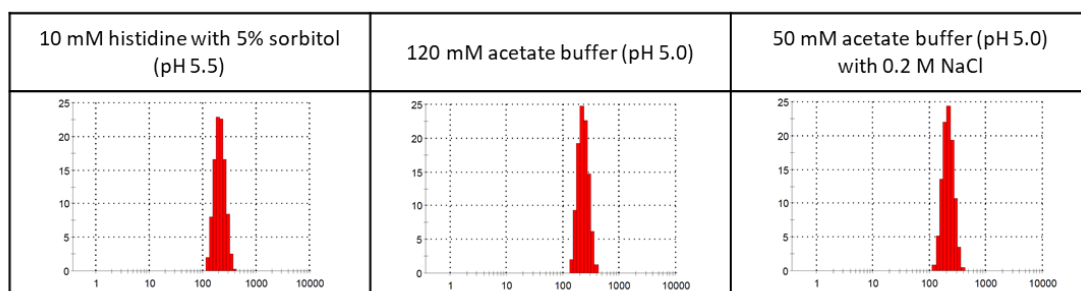
(a)



(b)



(c)



(d)

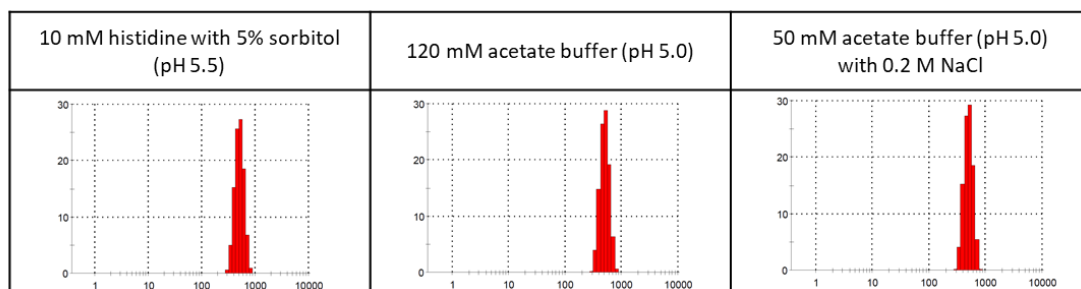
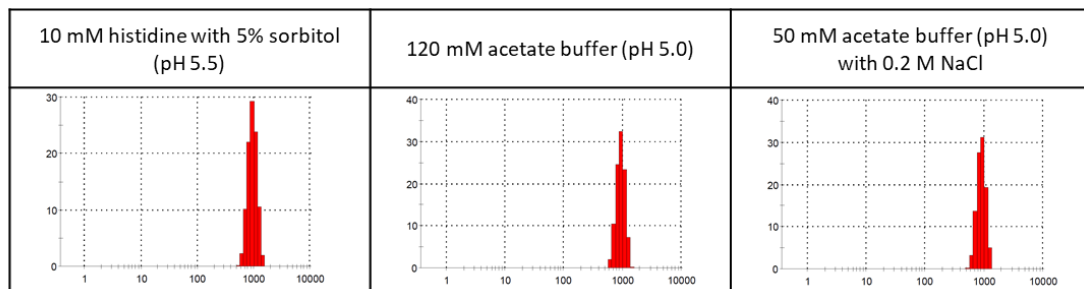


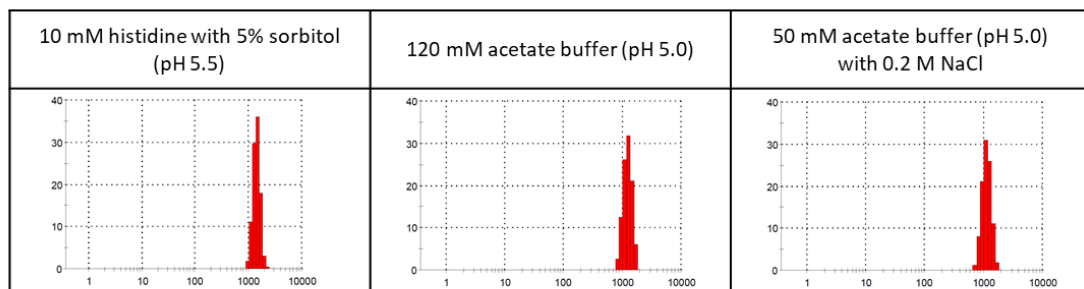
図 7 DLS を用いた懸濁液中のビーズの分散性の評価結果.

X 軸は、直径 (nm)、Y 軸は、体積百分率 (%) である。ビーズ: (a) 40 nm PSL, (b) 100 nm PSL, (c) 200 nm PSL, (d) 500 nm PSL, (e) 1 μ m PSL, (f) 2 μ m PSL, (g) 200 nm シリカ (表面非修飾), (h) 500 nm シリカ (表面非修飾), (i) 1 μ m シリカ (表面非修飾), (j) 200 nm シリカ (NH₂ 基修飾), (k) 500 nm シリカ (NH₂ 基修飾), (l) 1 μ m シリカ (NH₂ 基修飾)

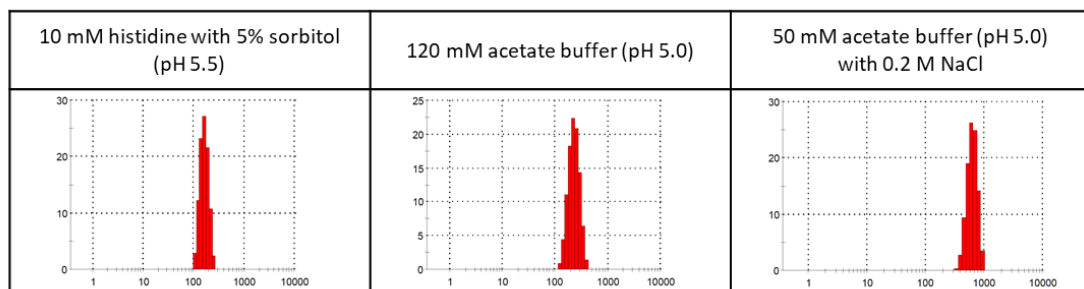
(e)



(f)



(g)



(h)

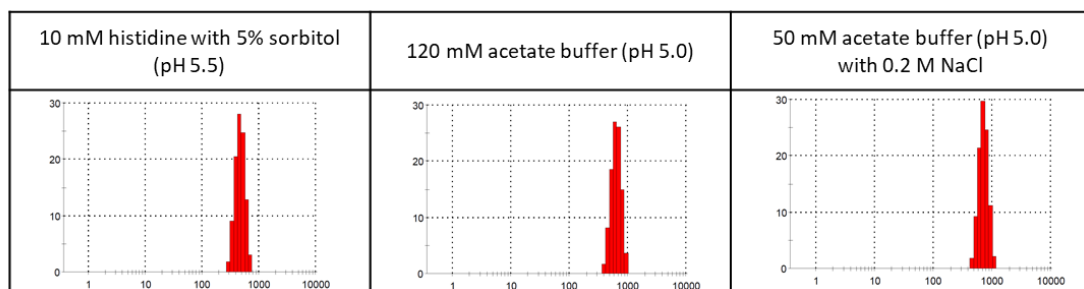
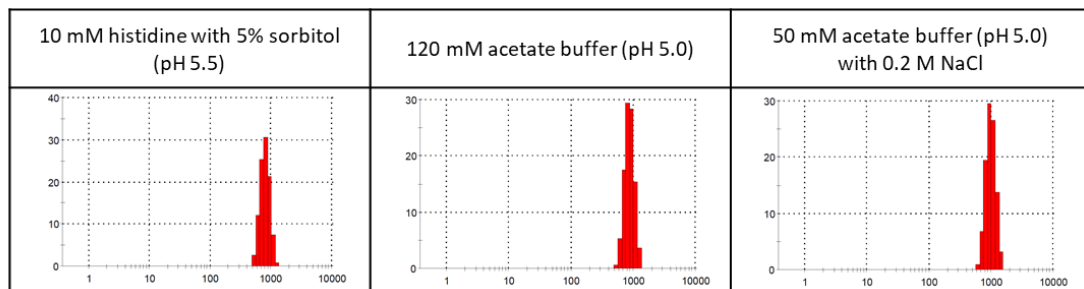
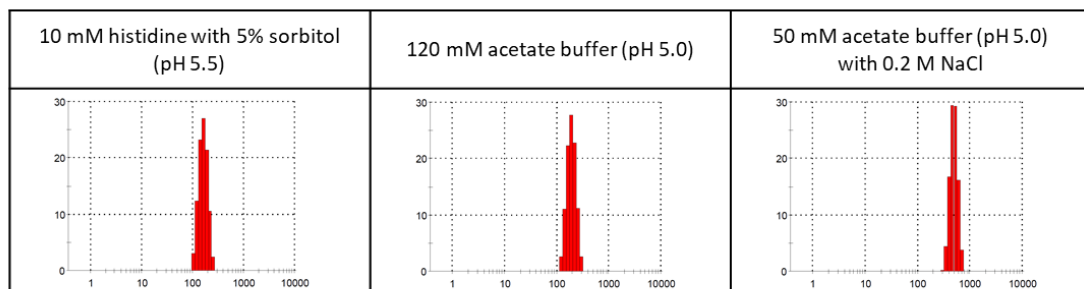


図 7 続き

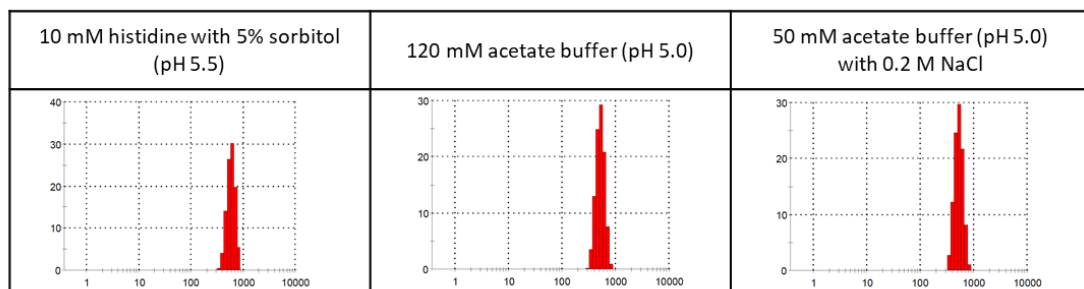
(i)



(j)



(k)



(l)

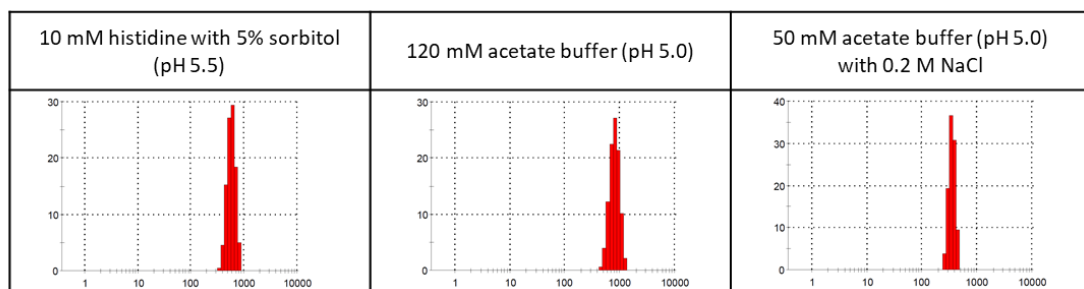


図 7 続き

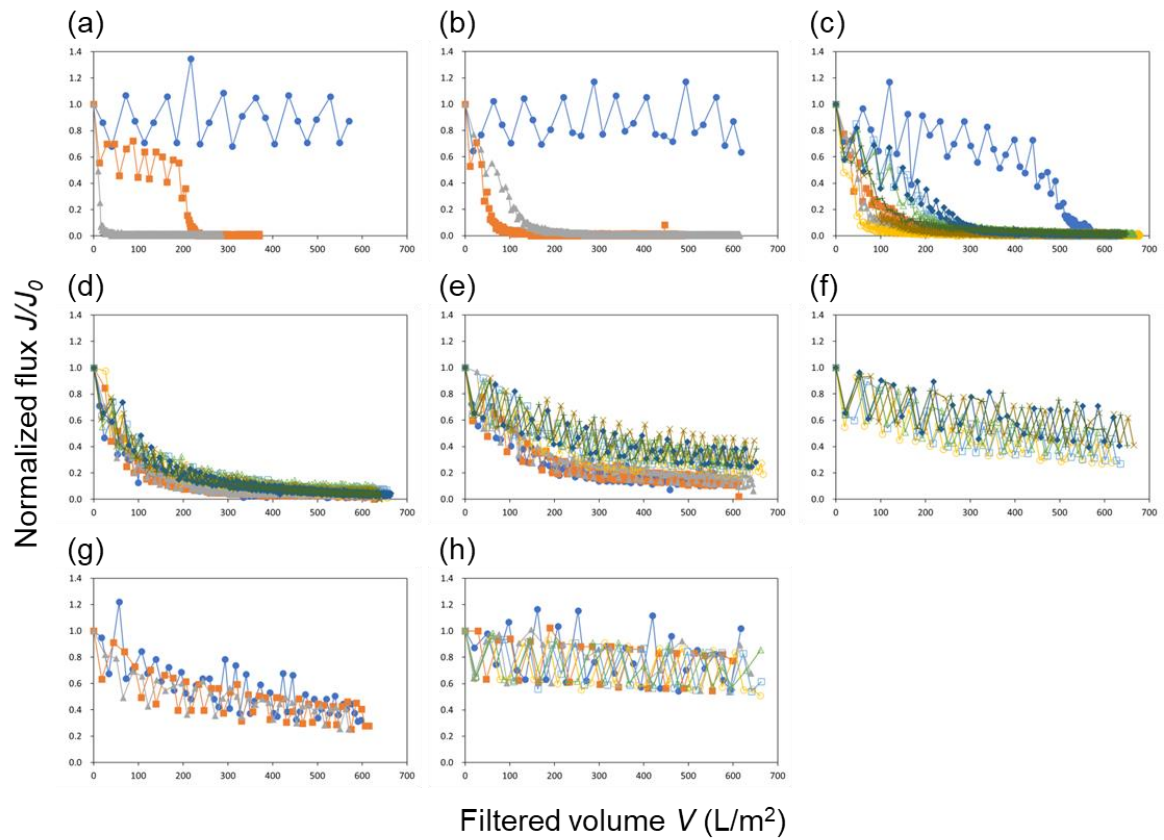


図8 フィルターAを用いたPSLビーズ及びシリカビーズ懸濁液のろ過試験結果。
 ビーズ直径：(a) 40 nm, (b) 100 nm, (c) 200 nm, (d) 500 nm, (e) 1 μ m,
 (f) 1.5 μ m, (g) 2 μ m, (h) 4 μ m

図 8 に示した、各モデルビーズろ過試験結果に対して、閉塞モデルのフィッティングを行った (図 9)。

直径 500 nm \sim 2 μ m のビーズでは、いずれのビーズとバッファの組み合わせでも、(2-4) 式の cake filtration の閉塞モデルの当てはまりが最も良かった。cake filtration の閉塞モデルでは、フィルター表面での粒子の堆積を仮定している。実際にフィルター A は 0.5 μ m と 0.2 μ m のフィルターを組み合わせた二層の構造になっており、ろ過の際には、サンプルはまず、0.5 μ m のフィルター層を透過することとなる。閉塞モデルの解析結果から、直径 500 nm \sim 2 μ m のビーズは、細孔径に対する粒子サイズを考慮すると、サイズ排除の原理により、0.5 μ m のフィルター層の表面で捕捉され、ケーキ層を形成しているのだと考えられた。直径 500 nm \sim 2 μ m では、懸濁したバッファの種類によるろ過速度低下プロファイルの違いは見られず、ろ過速度の低下は、粒子の負荷量依存的に起きているのだと考えられた。

一方、200 nm 以下のビーズに対しては、(2-1) 式の standard blocking や (2-5) 式の adsorption、さらには (2-3) 式の intermediate blocking の閉塞モデルの当てはまりが最も良かった。200 nm 以下のビーズは、細孔径に対する粒子サイズを考慮すると、フィルター A の 0.5 μ m のフィルター層を透過すると考えられる。しかしながら、0.2 μ m のフィルター層では、フィルター表面でサイズ排除の原理により intermediate blocking を引き起こしたり、フィルターの内部で standard blocking や adsorption の様式で、捕捉されたりするのだと考えられた。

詳細は、2.3.3 で議論するが、フィルター A の細孔径よりも大きい、直径 500 nm \sim 2 μ m の粒子は、ビーズとバッファの組み合わせに依らず、各サイズの粒子負荷量に応じて、一様な閉塞プロファイルを示したことから、粒子の表面特性の影響を受けず、閉塞しているのではないかと考えられた。対して、フィルター A の細孔径よりも小さい 200 nm 以下の粒子は、フィルターの内部で、閉塞し、ビーズとバッファの組み合わせによって、閉塞機構に

違いがあったため、粒子の表面特性が、閉塞挙動に影響するものと考えられた。

粒子の表面特性以外にも、閉塞挙動に影響する可能性のある要素がある。例えば、蛋白質濃度はその一つであるが、図 10 示したように、サンプルの総蛋白質濃度は、ろ過速度低下のプロファイルには影響せず、粒子負荷量に応じて、ろ過速度低下が起こることが明らかになった。この実験では、2.2.3 に記載した接触攪拌ストレスを mAb2 に与え、蛋白質凝集体を意図的に生成させ、このサンプルを、5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5) または、50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) で、20 倍及び 40 倍に希釈した。加えて、同じサンプルを、ストレスを与えていない 10 mg/mL の mAb2 の溶液 (バッファー：5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5)) で 40 倍希釈し、フィルター A でろ過試験を実施した。希釈した凝集体サンプルはすべてに共通であるため、希釈倍率が同じであれば、含まれる凝集体の量も同じである。図 10 (a) の結果では、フィルターの処理液量に応じて、ろ過速度の低下が観測されており、希釈倍率が同じサンプル同士は、ろ過プロファイルが一致した。また、図 10 (b) では、横軸のフィルターの処理液量を、粒子負荷量が一致するように希釈倍率に応じて補正すると、いずれのろ過試験結果もろ過プロファイルが一致した。また、これは、蛋白質濃度が異なるサンプル同士でも一致しており、このことから、蛋白質溶液のろ過プロファイルは、バッファー組成や蛋白質濃度の影響を受けず、フィルターに対する粒子の負荷量に依存することが示された。

他にも、図 11 に示した実験では、ろ過プロファイルに対する溶液粘度の影響を評価した。トレハロース水溶液の粘度は、トレハロースの濃度に応じて指数関数的に上昇することが知られている。ここでは、2.2.4 に記載した通り、10%, 20%, 30%, 40% (w/w) のトレハロース水溶液に、直径 500 nm のアミノ基修飾シリカビーズを終濃度 100 µg/mL となるように懸濁し、これらをフィルター A でろ過した。図 11 に示した通り、粘度の異なるこれらのサンプル間では、ろ過プロファイルが一致した。一方で、これらのサンプルには、ろ過初速度に違いがあり、粘度が低いほど、ろ過初速度は高かった (表 2)。

これらの知見を総合すると、MF フィルターの閉塞は、特定のサイズ域の粒子によって、フィルターへの負荷量依存的に引き起こされることが考えられた。

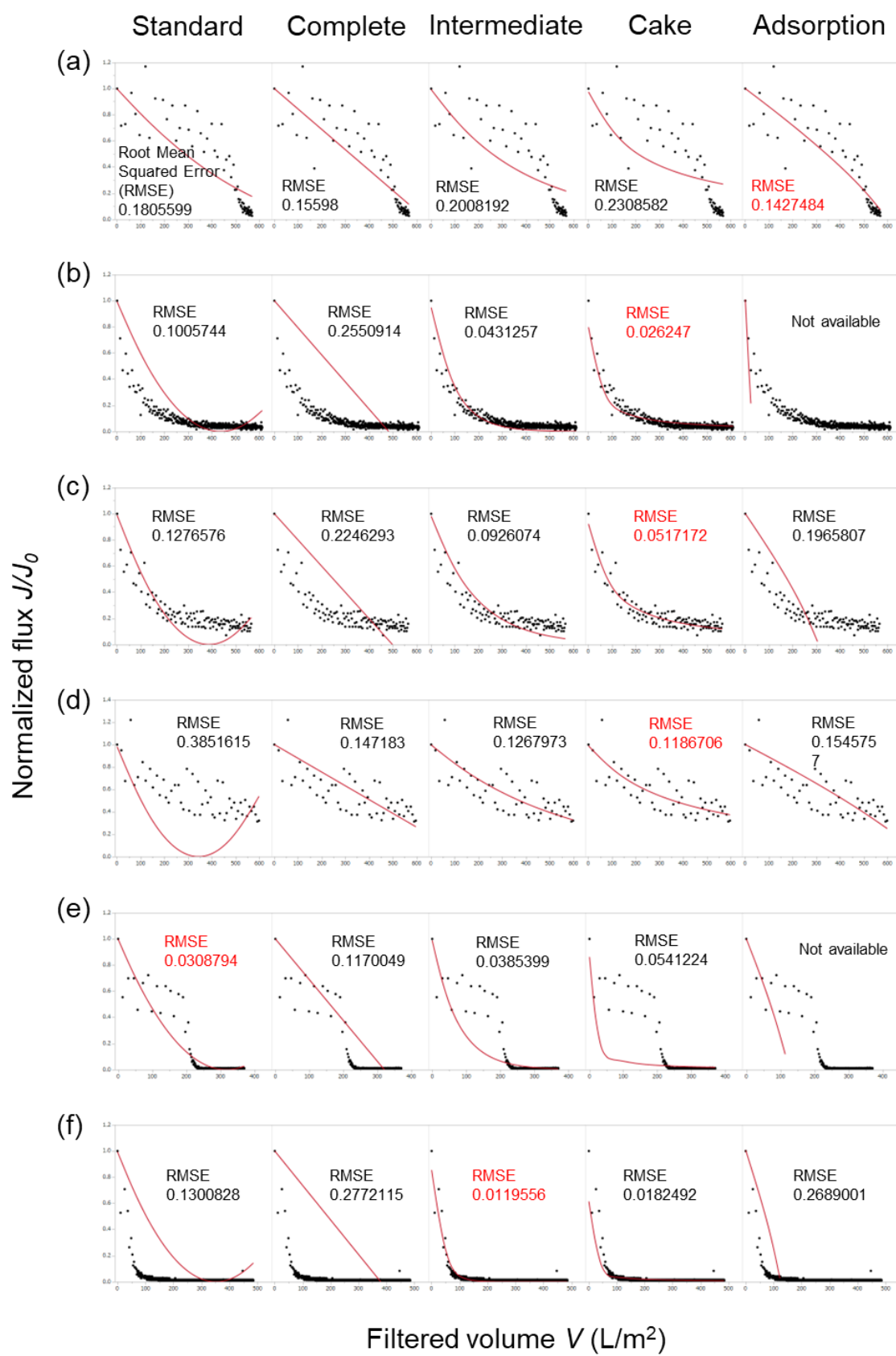


図9 フィルターAを用いたモデルビーズのろ過試験結果に対するフィルター閉塞モデルのフィッティング結果.

Standard blocking, Complete blocking, Intermediate blocking, Cake filtration, Adsorption の計5種類のフィルター閉塞モデルをフィッティングした。

赤色の実線は、フィッティングにより得られた近似曲線である。それぞれのグラフ中に二乗平均平方根誤差 (RMSE) を記載した。サンプル毎に、最も RMSE の値が小さくなった閉塞モデルについては、RMSE を赤字にした。

ビーズとバッファの組み合わせ：(a) 200 nm, (b) 500 nm, (c) 1 μ m, (d) 2 μ m の PSL ビーズを、5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5) に懸濁したもの。(e) 40 nm, (f) 100 nm, (g) 200 nm, (h) 500 nm, (i) 1 μ m, (j) 2 μ m の PSL ビーズを 120 mM 酢酸バッファ (pH 5.0) に懸濁したもの。(k) 40 nm, (l) 100 nm, (m) 200 nm, (n) 500 nm, (o) 1 μ m, (p) 2 μ m の PSL ビーズを 0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファ (pH 5.0) に懸濁したもの。(q) 200 nm, (r) 500 nm, (s) 1 μ m の表面未修飾シリカビーズを 120 mM 酢酸バッファ (pH 5.0) に懸濁したもの。(t) 200 nm, (u) 500 nm, (v) 1 μ m のアミノ基修飾シリカビーズを 120 mM 酢酸バッファ (pH 5.0) に懸濁したもの。いずれも粒子濃度が 100 μ g/mL となるように懸濁した。

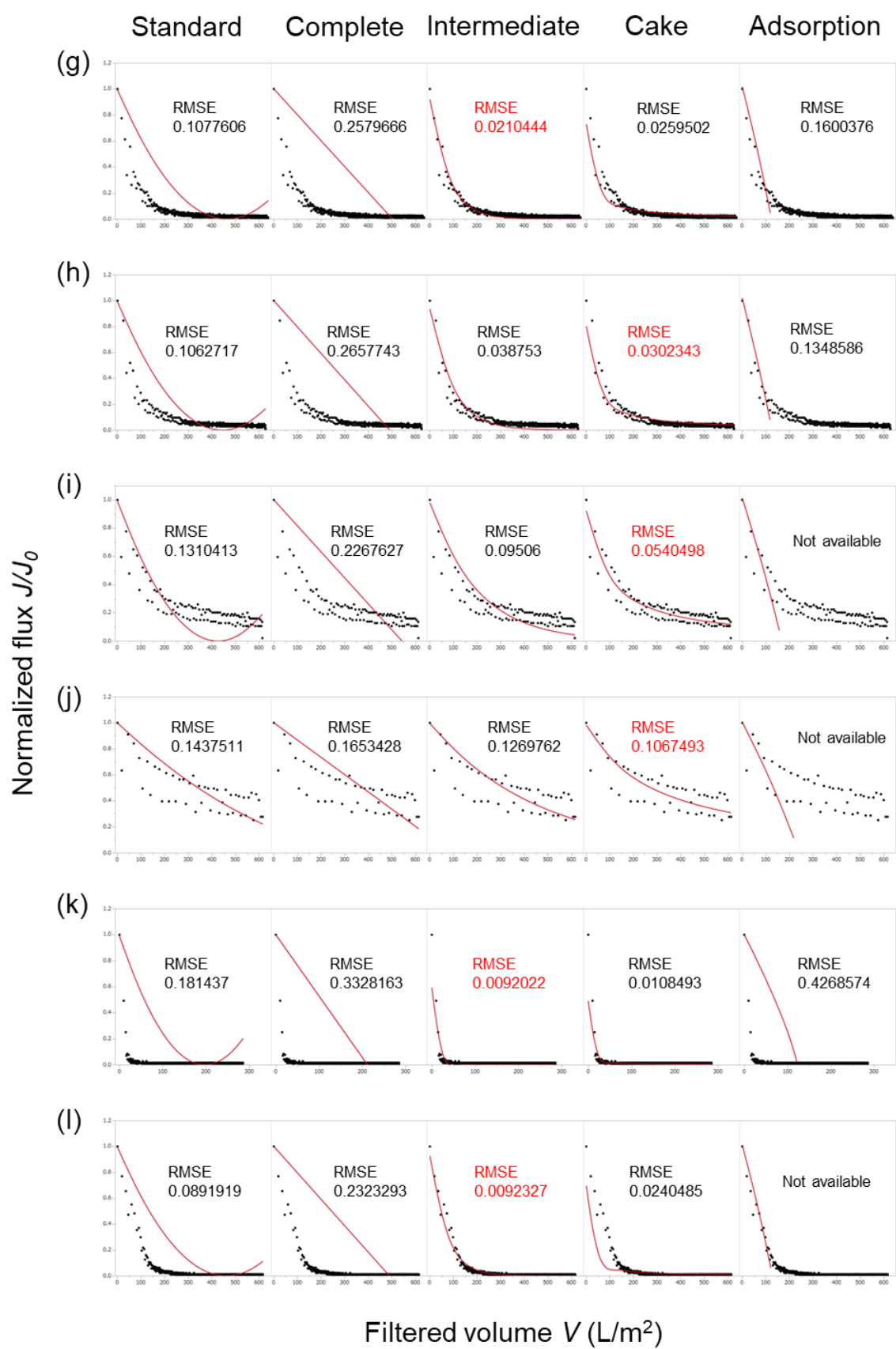


図 9 続き

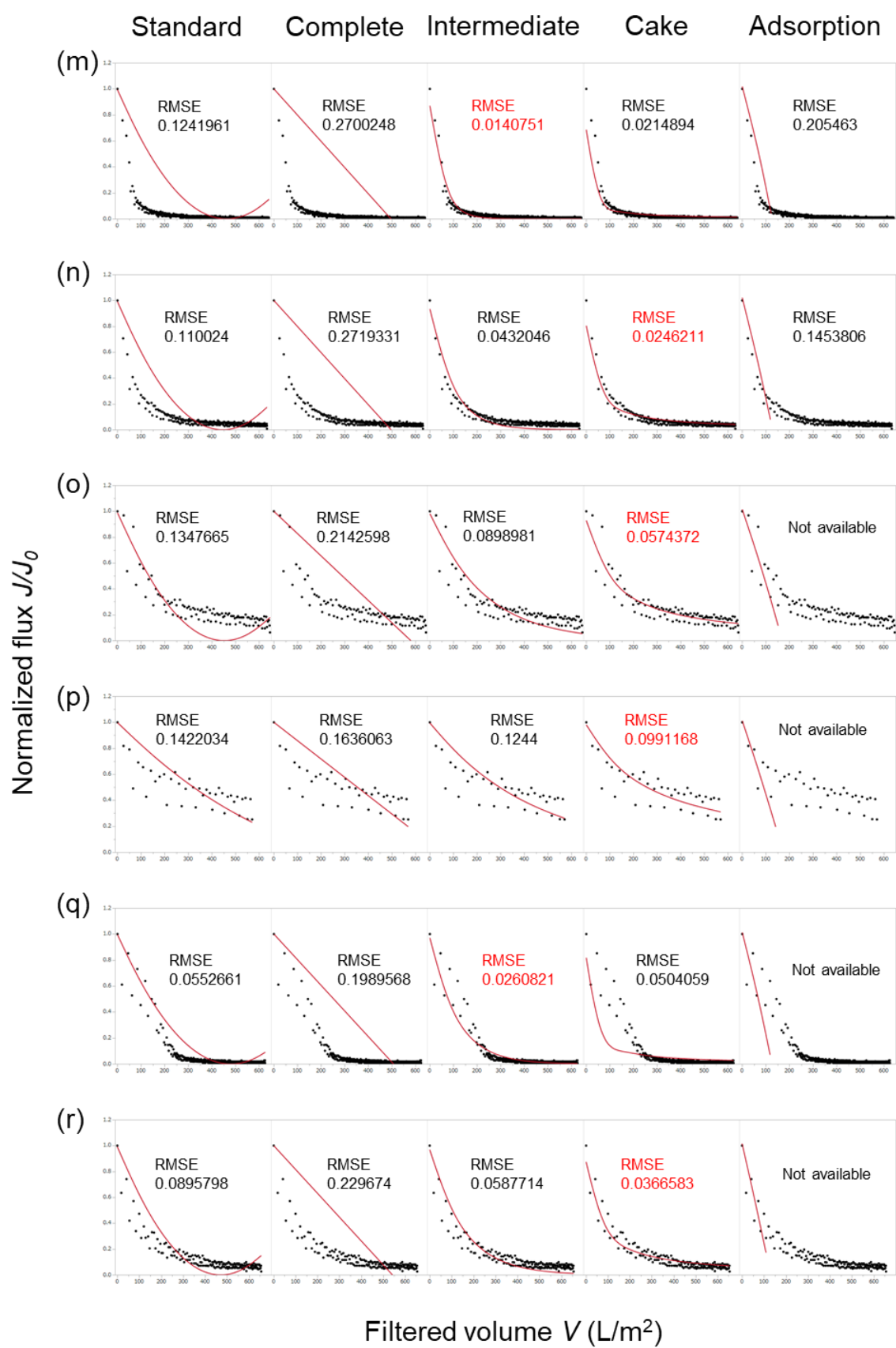


図 9 続き

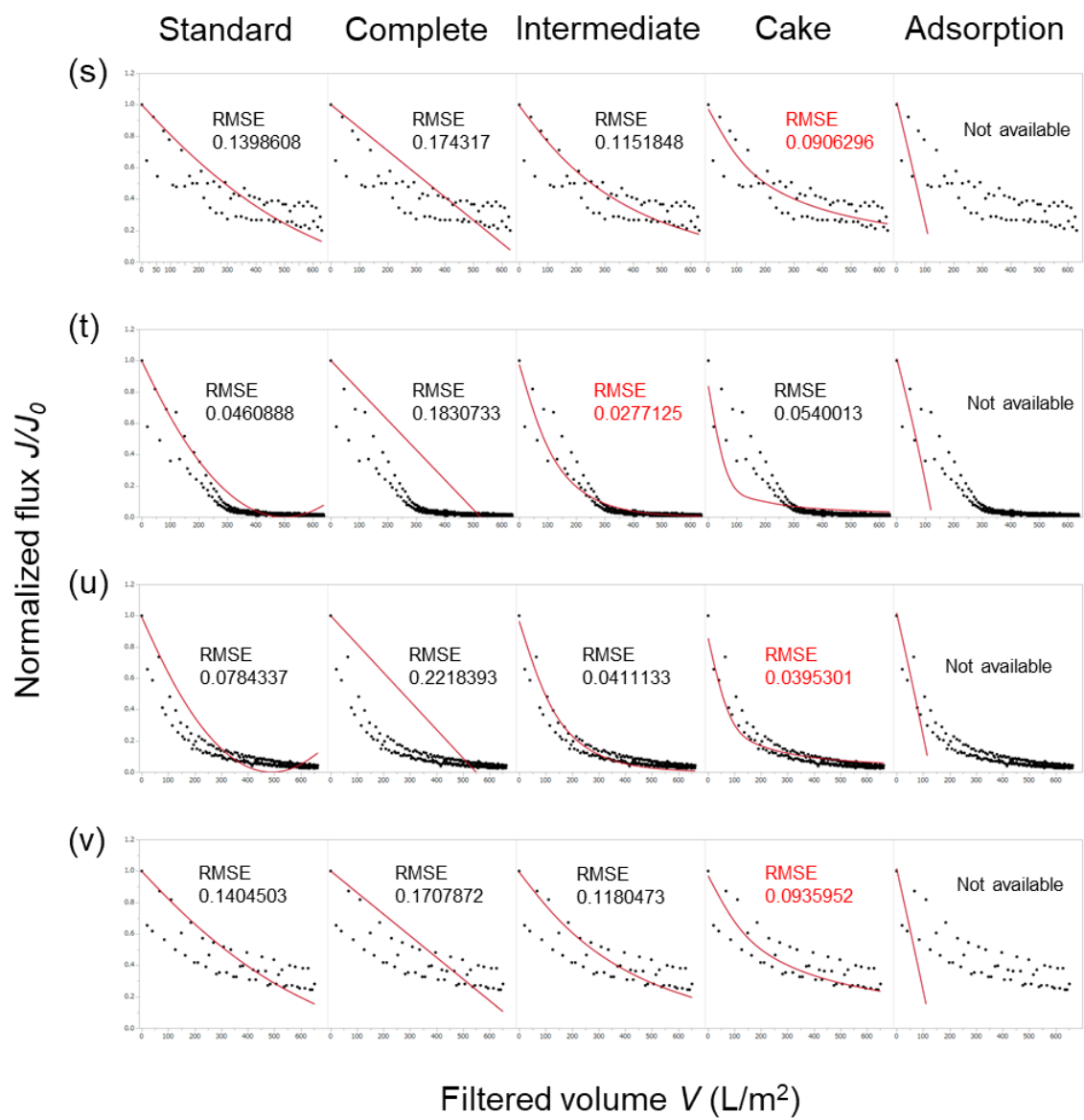
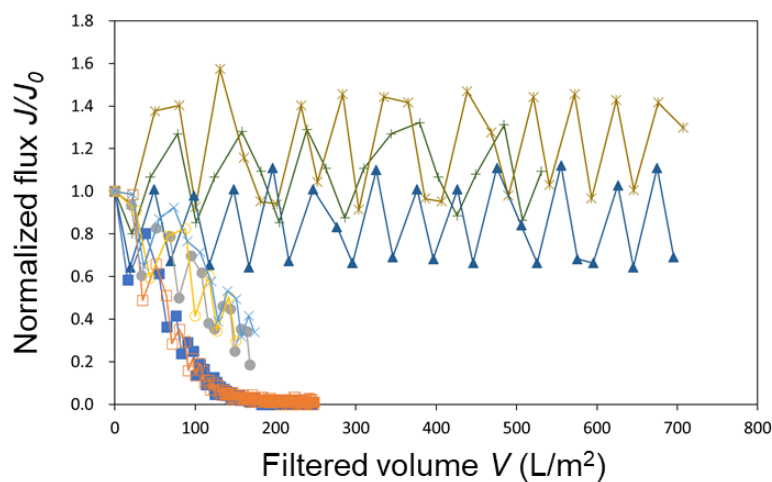
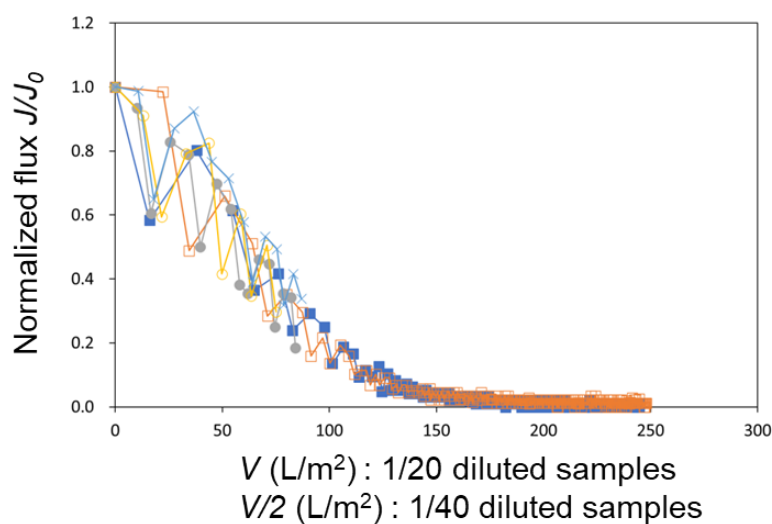


図 9 続き

(a)



(b)



- 20-fold dilution by 10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5)
- 20-fold dilution by 50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl
- 40-fold dilution by 10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5)
- 40-fold dilution by 50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl
- 40-fold dilution by 10 mg/mL mAb 2 in 10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5)
- 10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5)
- 50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl
- 120 mM acetate buffer (pH 5.0)

図 10 バッファー組成と蛋白質濃度がろ過プロファイルに与える影響.

10 mg/mL の mAb2 (バッファー: 0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0)) に対して、室温下で 24 時間、接触攪拌ストレスを加え、蛋白質凝集体を意図的に生成させた。それぞれ、凡例に記載のバッファーまたは蛋白質溶液で希釈し、フィルターA でろ過試験を実施した。

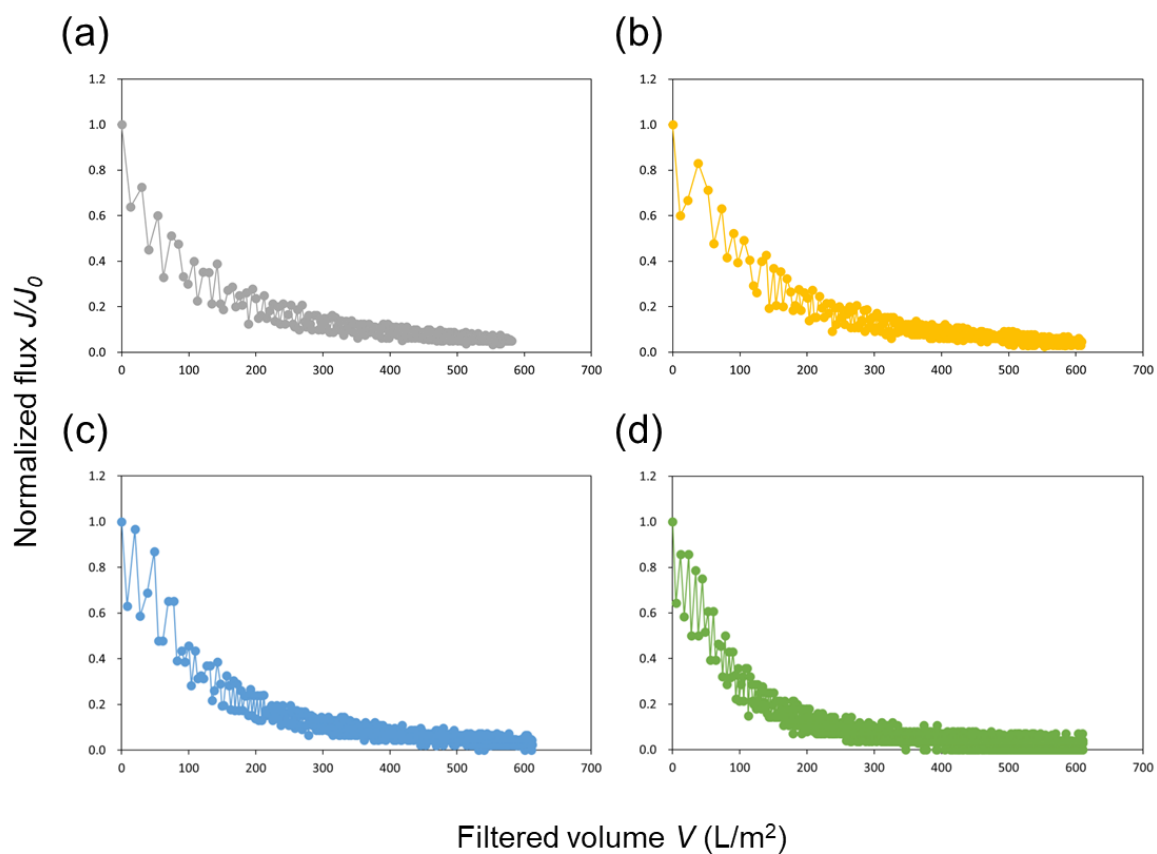


図 11 溶液の粘度がろ過プロファイルに与える影響.

直径 500 nm のアミノ基修飾シリカビーズを (a) 10%, (b) 20%, (c) 30%, (d) 40% (w/w) のトレハロース水溶液に懸濁し、フィルターA でろ過試験を実施した。

表 2 濃度の異なるトレハロース水溶液のろ過初速度.

Sample	Initial flux J_0 (L/m ² /min)
500 nm silica (NH ₂) spiked in 10% (w/w) trehalose	137.14
500 nm silica (NH ₂) spiked in 20% (w/w) trehalose	111.43
500 nm silica (NH ₂) spiked in 30% (w/w) trehalose	78.857
500 nm silica (NH ₂) spiked in 40% (w/w) trehalose	48.000

濃度の異なるトレハロース水溶液に直径 500 nm のアミノ基修飾シリカビーズを終濃度が 100 µg/mL となるように懸濁し、フィルターA でろ過試験を実施した。

2.3.3 モデルビーズ及び蛋白質凝集体のゼータ電位測定

2.3.2 で述べたように、フィルターA の内部で閉塞を引き起こす 200 nm 以下の粒子については、粒子の表面特性が重要であると考えられた。ビーズの場合は、ビーズの材質、及び懸濁したバッファー組成がビーズの表面特性に大きく影響を与える。先行研究では、フィルター閉塞の原因となる粒子の表面電荷が MF の内部閉塞のプロファイルに影響することが報告されている²⁶。さらに、フィルター閉塞の原因となる単分散の粒子の表面電荷が、フィルター表面におけるフィルター細孔の閉塞とケーキ層の形態に影響することも報告されている²⁷。これらを踏まえて、モデルビーズのろ過プロファイルをベースに、蛋白質溶液のろ過プロファイルを予測するモデルを構築するためには、モデルビーズと蛋白質凝集体の表面静電特性を理解することが重要であると考えられた。

初めに、それぞれのビーズとバッファーの組み合わせにおいて、モデルビーズのゼータ電位を測定した（表 3（a））。PSL 及び表面未修飾のシリカビーズは、負のゼータ電位を示した。アミノ基修飾された直径 500 nm, 1 μ m, 1.5 μ m のシリカビーズは、正のゼータ電位を示した一方、アミノ基修飾された直径 200 nm のシリカまたは PSL ビーズは、いずれも負のゼータ電位を持っていた。

次に、サブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体のゼータ電位の測定を試みた。Side-by-side のろ過試験に用いた UF/DF 後のサンプルは、SE-HPLC で評価したところ、モノマーが 95%以上含まれていた。そのため、サブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体のゼータ電位を測定するためには、この UF/DF よりもさらに過酷なストレスを加え、蛋白質凝集体を意図的に増やす必要があった。マグネティックスターラーによる接触攪拌は、蛋白質凝集体を生成することが知られており^{17,28}、これを利用してゼータ電位測定のための蛋白質凝集体を調製した。

mAb2 に対して、2.2.3 に記載した条件で、接触攪拌ストレスとオービタルシェーカーを用いた回転振盪ストレスを与えることで、サブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体を意図的に生成させた。表 4 に示したように、SE-HPLC の測定結果によると、24 時間の接

接触撹拌ストレスにより、3種類いずれのバッファーにおいても、モノマーが100%消失しており、すべての単量体が失われ、図12に示したように、サブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体が生成した。一方、表4に示したように、24時間の回転振盪ストレスでは、モノマーが残っていたが、そのサンプルを15,000×gで60分間遠心することで、モノマーとサブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体を分離することができた。回転振盪ストレスにより得られた蛋白質凝集体のサイズ分布を図13に示した。図12と図13を比較すると、接触撹拌ストレスによって生成される蛋白質凝集体のサイズは、オービタルシェーカーによる回転振盪ストレスによって生成するものよりも、流体力学径が小さいことがわかった。

表3(b)に示したように、接触撹拌及び回転振盪の両ストレスによって生成したmAb2の凝集体は、評価した3種類のバッファーいずれにおいても、ストレス処理前のモノマーリッチな抗体サンプルと同様に正のゼータ電位を持っていた。mAb1～mAb6の6つの抗体の等電点(pI)は6～9の範囲であり、これらの6つの抗体のpIとmAb2の凝集体のゼータ電位測定の際に用いた3種類のバッファーpHの関係を考慮すると、mAb2以外の抗体も正のゼータ電位を持つと予想された。モデルビーズのろ過試験の結果から、粒子の表面特性が重要であることが示唆された直径200 nm以下については、これらのサイズの蛋白質凝集体を特異的に接触撹拌及び回転振盪ストレスで生成させることはできなかった。しかしながら、図12及び図13に示したような、サブミクロンからミクロンサイズにかけて異なるプロファイルを持つ凝集体のサンプルが、いずれも非ストレス処理のモノマーリッチな抗体サンプルと同様に正のゼータ電位を持っていたため、直径200 nm以下の粒子についても、正のゼータ電位を持つものと仮定して、以降の検討を行うこととした。フィルターAの材質はPESであるが、PESはこれら3種類のバッファーのpHでは、負のゼータ電位を持つことが報告されており²⁹、フィルターAについても同様であると考えられる。これらを踏まえ、次に、モデルビーズと蛋白質凝集体の表面電荷特性の結果を考慮した上で、各サイズ

の粒子の負荷量依存的なろ過速度低下のプロファイルを基に、蛋白質溶液のろ過速度低下のプロファイルを予測するモデルの開発を試みることにした。蛋白質凝集体のゼータ電位は、ビーズほどは、バッファー組成の違いによる影響を受けなかった。このことから、図 10 にあるように、蛋白質凝集体の場合、希釈したバッファーが異なっても、ろ過プロファイルが一致したのだと考えられる。

蛋白質凝集体同士では、バッファーの違いによるゼータ電位の差を考慮する必要はないと考えられるが、ろ過速度低下のプロファイルを予測するモデルを構築するためには、蛋白質凝集体とビーズの間のゼータ電位の違いをサンプルに応じて、適切に補正する試みが必要であると考えた。詳細については、2.3.5 で議論する。

表 3 モデルビーズ及び蛋白質凝集体のゼータ電位の測定結果.

(a)

	Zeta potential (mV)											
	10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5)				120 mM acetate buffer (pH 5.0)				50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl			
	PSL		Silica		PSL		Silica		PSL		Silica	
	(unmodified)	(NH ₂)	(unmodified)	(NH ₂)	(unmodified)	(NH ₂)	(unmodified)	(NH ₂)	(unmodified)	(NH ₂)	(unmodified)	(NH ₂)
40 nm	-44.0±0.8				-33.9±0.7				-45.1±1.9			
100 nm	-49.6±1.1		Not tested	Not tested	-27.4±0.9		Not tested	-10.6±0.7	-32.0±1.1		Not tested	Not tested
200 nm	-59.5±1.1	-37.7±0.4	-31.1±0.6	-31.5±0.8	-33.5±0.4	-23.2±1.7	-11.2±0.3	-13.2±1.8	-37.3±0.6	-24.3±0.7	-6.92±1.2	-9.36±0.9
500 nm	-76.1±2.3		-20.5±0.2	49.6±0.9	-40.2±1.7		-8.42±1.0	20.2±1.7	-49.5±1.4		-4.33±0.6	22.4±0.5
1 μm	-84.2±1.4		-29.6±2.2	57.1±2.9	-43.3±0.1		-10.0±1.2	30.0±2.4	-51.7±1.0		-4.50±0.5	31.7±1.4
1.5 μm	Not tested		-33.6±0.7	8.35±0.5	Not tested		-8.42±0.7	24.4±1.0	Not tested		-1.86±4.5	24.8±0.9
2 μm	-76.0±1.0				-25.0±1.0				-22.6±0.6			
4 μm	Not tested		-9.33±1.5		Not tested		-5.51±0.3		Not tested		-2.29±0.4	

(b)

	Zeta potential (mV)						
	Initial	Contact	15,000 × g, 20°C,		Orbital	15,000 × g, 20°C,	
		agitation	60 min		shaking	60 min	
		24 hours	Pellet	Sup.	24 hours	Pellet	Sup.
10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5)	8.37±0.5	12.9±0.6	12.1±0.4	9.85±1.3	14.3±0.2	10.6±0.8	10.9±1.6
120 mM acetate buffer (pH 5.0)	4.49±0.7	6.82±0.1	5.30±0.4	4.00±0.9	5.98±0.6	5.26±0.8	4.07±0.7
50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl	2.92±1.3	3.72±0.2	0.972±1.7	2.03±1.1	3.64±0.4	2.19±0.7	2.03±1.8

(a) ポリスチレン (PSL) 及びシリカビーズ

(b) 蛋白質凝集体

ゼータ電位は、それぞれ n=3 で測定し、平均値と標準偏差 (SD) を算出した。

各結果は平均値±SD で示している。

表 4 SE-HPLC によるモノマーロス率 (%) の評価結果.

	Monomer loss (%)			
	Contact	Orbital	15,000 × g, 20°C, 60 min	
	agitation	shaking		
	24 h	24 h	Pellet	Sup.
10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5)	100	11	99	12
120 mM acetate buffer (pH 5.0)	100	28	99	29
50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl	100	63	100	74

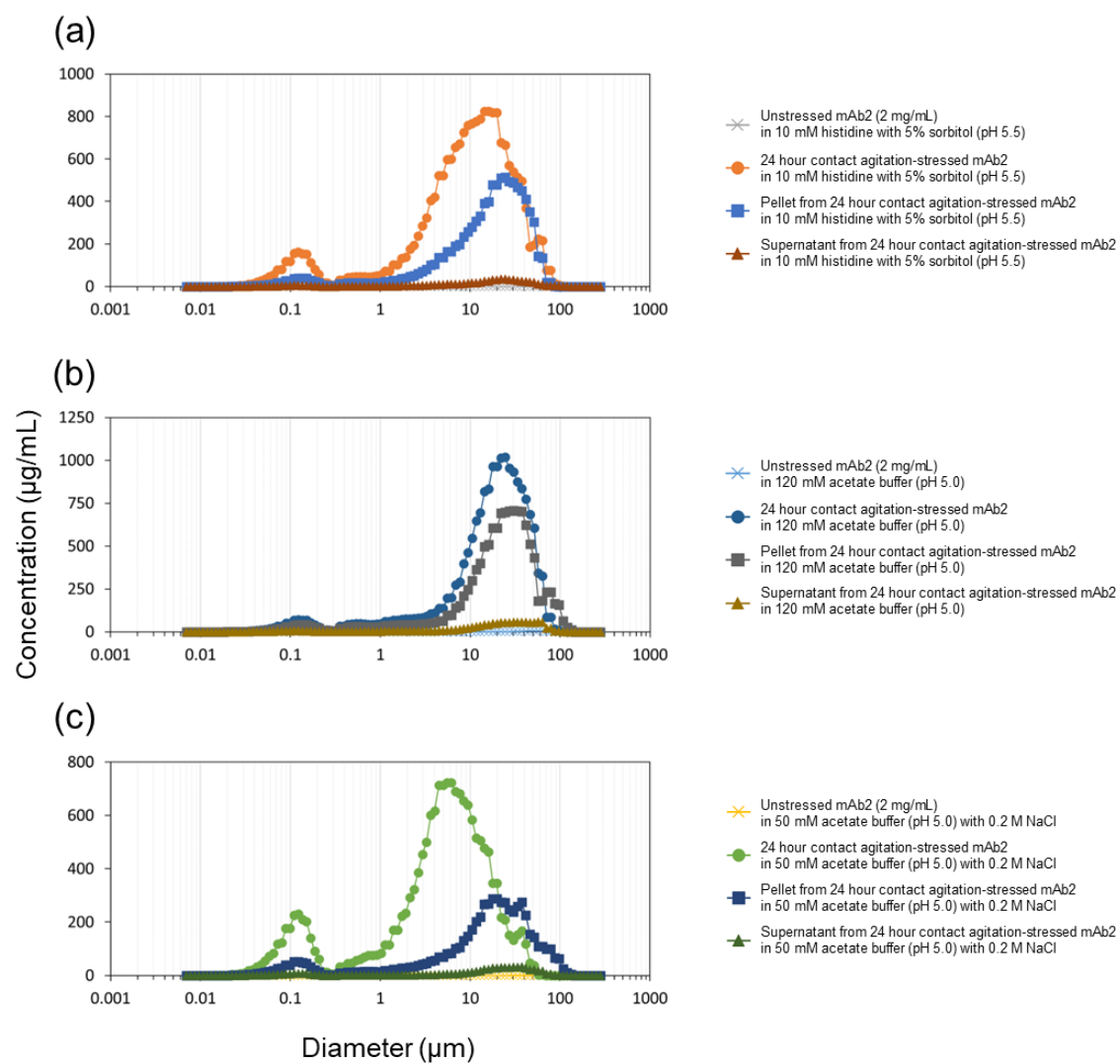


図 12 接触攪拌ストレスにより生成したサブミクロンからミクロンサイズの粒子の定量結果.

測定は qLD 法を用いて実施した。これらのサンプルはゼータ電位測定に使用した。

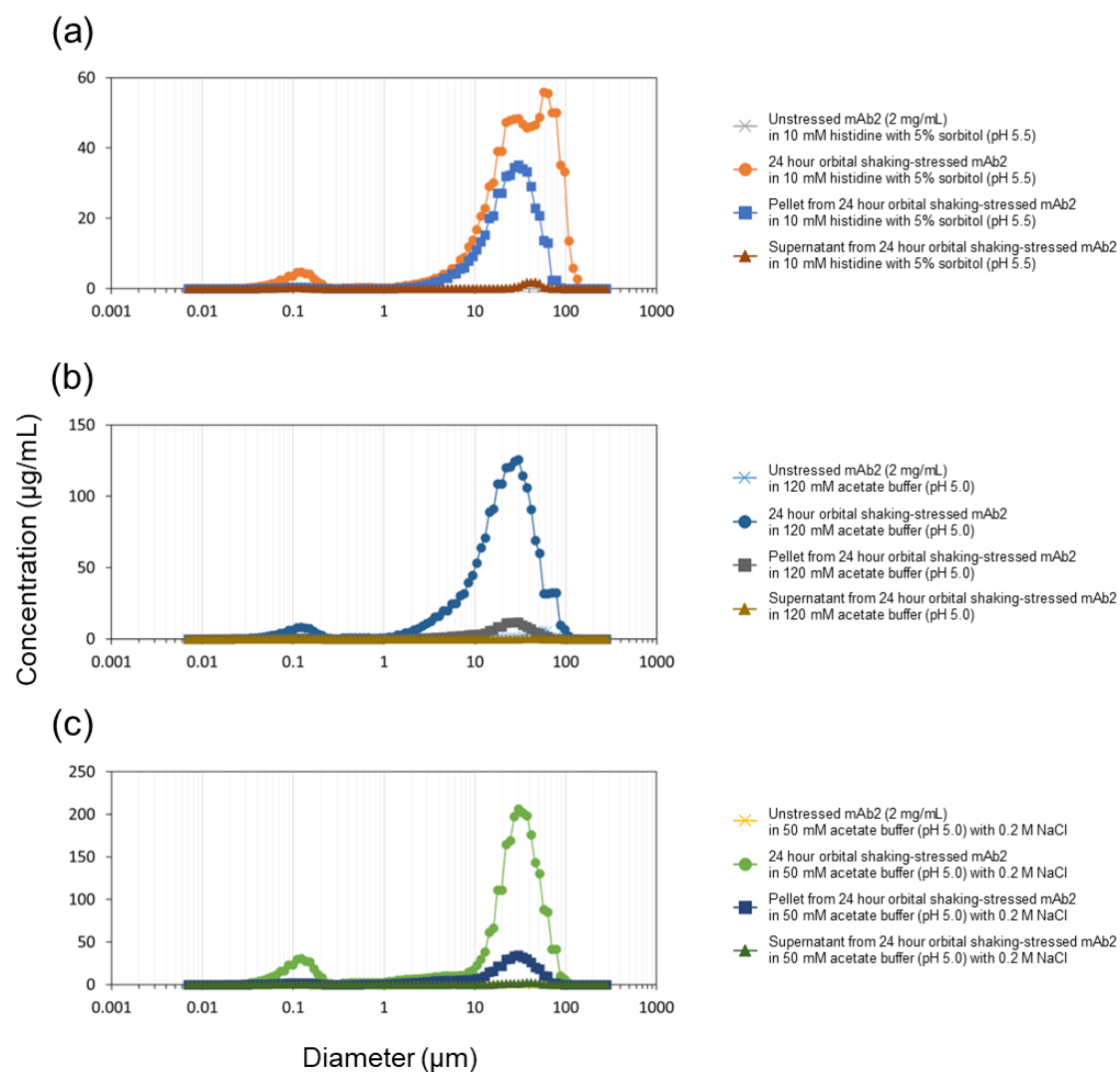


図 13 回転振盪ストレスにより生成したサブミクロンからミクロンサイズの粒子の定量結果。

測定は qLD 法を用いて実施した。これらのサンプルはゼータ電位測定に使用した。

2.3.4 qLD 法による粒子濃度算出方法の検討

2.3.2 に記載した通り、フィルターA において、200 nm～2 μ m の粒子が、ろ過速度低下に寄与することが明らかになった。実際にろ過挙動予測の対象となる蛋白質溶液は、さまざまなサイズの蛋白質凝集体の混合物であり、当研究では 2.2.5 に記載の qLD 法を用いて、粒子プロファイルを測定した。qLD 法の測定結果は、図 4 のような連続的なサイズ分布となるため、ろ過速度低下のプロファイルの予測モデルに用いる各単一のサイズの粒子濃度の算出方法を検討した。

ここでは、直径 200 nm、500 nm、1 μ m、及び 2 μ m の単分散の PSL ビーズそれぞれを、5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5) に粒子濃度 10 μ g/mL となるように懸濁し、qLD 法で測定を行った。測定結果は図 14 に示した。これらの結果から、各サイズの PSL ビーズのサイズ分布の重なりを考慮して、200 nm は 0.122～0.318 μ m、500 nm は 0.353～0.667 μ m、1 μ m は 0.741～1.259 μ m、2 μ m は 1.400～3.633 μ m の範囲の積算として粒子濃度を算出することとした。

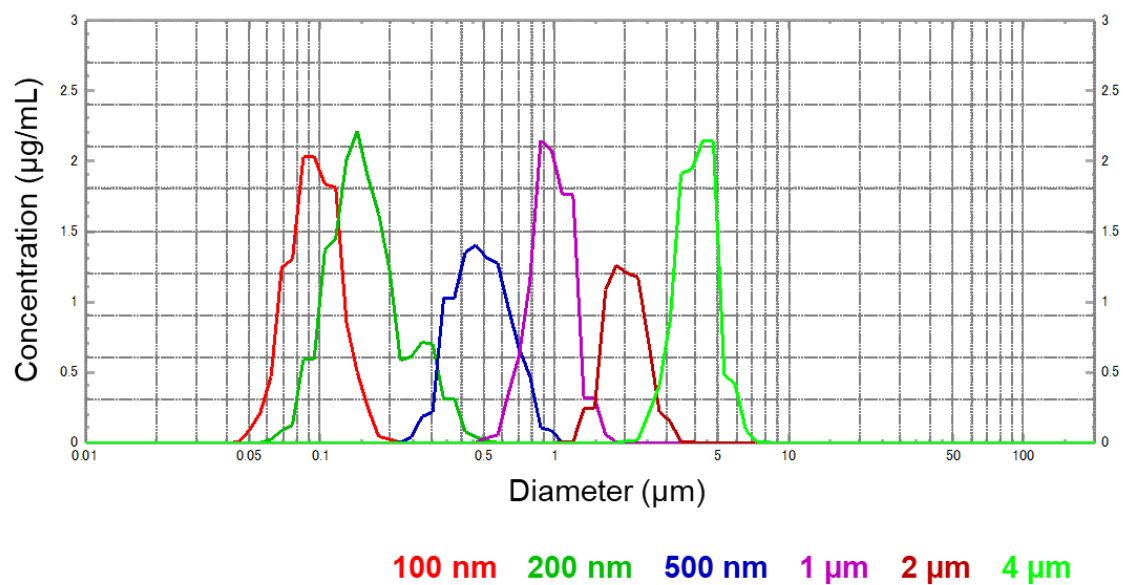


図 14 PSL ビーズ懸濁液のサイズ分布.

直径 200 nm、500 nm、1 μm、及び 2 μm の PSL ビーズそれぞれを、5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5) に粒子濃度が 10 μg/mL となるように懸濁し、Aggregates Sizer で測定した。

2.3.5 ろ過速度低下プロファイルの予測モデルの構築

2.3.1～2.3.4 までに得られた知見を基に、ろ過速度低下のプロファイルは各粒子サイズのろ過速度低下に対する寄与の合算として、分解して考えられると仮説を立てた。そこで、以下の (2-6) 式を、MF フィルターのろ過速度低下プロファイルの予測モデルとして提案する。

$$\left(\frac{J}{J_0}\right)_{Predicted} = \left(\frac{J}{J_0}\right)_{200\text{ nm}} \times \left(\frac{J}{J_0}\right)_{500\text{ nm}} \times \left(\frac{J}{J_0}\right)_{1\text{ }\mu\text{m}} \times \left(\frac{J}{J_0}\right)_{2\text{ }\mu\text{m}} \quad (2-6)$$

(2-6) 式は、各粒子サイズのノーマライズしたフラックスである J/J_0 の積の形になっている。 J/J_0 は無次元量であり、こうした比率・割合の合算を行う場合は、数学的な観点から、掛け合わせるのが妥当であると考えられる。粒子濃度の測定法の限界から、(2-6) 式では、直径 200 nm 以上の粒子を考慮に入れた。表 5 (a) には、2.3.2 のフィルターA のろ過試験において、それぞれのバッファーとモデルビーズの組み合わせにおいて、最も当てはまりの良かった閉塞モデルと、フィッティングにより決定された各種パラメーターを示した。予測モデルとして、(2-6) 式に、これらを組み込み、各サイズの粒子負荷量依存的なろ過速度低下を基に、溶液全体のろ過速度低下プロファイルを予測した。2.3.2 のモデルビーズのろ過試験は、粒子濃度が 100 $\mu\text{g/mL}$ のビーズ懸濁液を用いて実施した。表 5 の各サイズの閉塞モデルでは、体積 V を、それぞれの粒子濃度を用いて、粒子負荷量として補正している。直径 200 nm の粒子のろ過プロファイルについては、120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) 中に懸濁したアミノ基修飾シリカビーズのろ過データを採用した。表 3 (a) にあるように、直径 200 nm のビーズは、いずれのビーズとバッファーの組み合わせでも、蛋白質凝集体とは、逆の符号のゼータ電位を持っていた。先行研究で、フィルター基材と閉塞原因となる粒子が、同符号のゼータ電位を持つ場合にも、粒子のゼータ電位の絶対値が小さいと、顕著なフィルターの内部閉塞を引き起こすことが報告されている²⁶。そのため、最もゼータ電位の絶対値ができるだけ小さく、ビーズの分散性にも問題がないモデルビーズとバッファーの組み合わせを採用した。直径 500 nm 以上については、図 8 と表 3 (a) の結果を組み合わせる

と、モデルビーズのゼータ電位の違いが、直径 200 nm のビーズに比べて、フィルターの閉塞挙動に影響を与えなかったことがわかる。そこで、直径 500 nm と 1 μm については、蛋白質凝集体と同じ正のゼータ電位を持っていた、アミノ基修飾シリカビーズと 120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) の組み合わせを選択した。一方で、直径 2 μm については、シリカビーズの製品ラインナップがなかったため、表面非修飾の PSL ビーズと 120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) の組み合わせを採用した。

表 5 200 nm～2 μm の各サイズに対して最も当てはまりが良い閉塞モデル.

(a) フィルターA, (b) フィルターB

α と β は補正係数である。

これらの閉塞モデル式を (2-6) 式に代入し、ろ過速度低下プロファイルの予測モデル式として用いた。

(a)

Size	200 nm	500 nm	1 μm	2 μm
Beads, Buffer	Silica (NH ₂), 120 mM acetate buffer (pH 5.0)	Silica (NH ₂), 120 mM acetate buffer (pH 5.0)	Silica (NH ₂), 120 mM acetate buffer (pH 5.0)	PSL, 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
Best fit model	Intermediate blocking $\frac{J}{J_0} = e^{-K_c \frac{C_{200\text{ nm}}}{100} \alpha V}$	Cake filtration $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 \frac{C_{500\text{ nm}}}{100} V + 1}$	Cake filtration $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 \frac{C_{1\text{ μm}}}{100} V + 1}$	Cake filtration $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 \frac{C_{2\text{ μm}}}{100} V + 1}$
Parameters determined by filtration experiments	K_c : 8.1862×10 ⁻³ J_0 : 198.86	K_c : 1.6046×10 ⁻⁴ J_0 : 195.43	K_c : 2.9158×10 ⁻⁵ J_0 : 188.57	K_c : 2.4058×10 ⁻⁵ J_0 : 173.14

(b)

Size	200 nm	500 nm	1 μm	2 μm
Beads, Buffer	Silica (NH ₂), 120 mM acetate buffer (pH 5.0)	Silica (NH ₂), 120 mM acetate buffer (pH 5.0)	Silica (NH ₂), 120 mM acetate buffer (pH 5.0)	PSL, 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
Best fit model	Cake filtration $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 \frac{C_{200\text{ nm}}}{100} \beta V + 1}$	Cake filtration $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 \frac{C_{500\text{ nm}}}{100} \beta V + 1}$	Cake filtration $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 \frac{C_{1\text{ μm}}}{100} \beta V + 1}$	Cake filtration $\frac{J}{J_0} = \frac{1}{K_c J_0 \frac{C_{2\text{ μm}}}{100} \beta V + 1}$
Parameters determined by filtration experiments	K_c : 3.4247×10 ⁻⁴ J_0 : 70.286	K_c : 7.9839×10 ⁻⁵ J_0 : 118.10	K_c : 1.3402×10 ⁻⁵ J_0 : 108.00	K_c : 1.7105×10 ⁻⁵ J_0 : 121.90

初めに、モデルビーズのろ過速度低下のプロファイルを、モデル式を用いて予測できるか検証した。図 15 (a) は、500 nm と 1 μm のアミノ基修飾シリカビーズを各 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で 120 mM 酢酸バッファ（pH 5.0）に懸濁したサンプルである。このろ過速度低下のプロファイルについては、(2-6) 式で良好な予測結果が得られた。次に、図 15 (b) と (c) であるが、これらのサンプルには、200 nm のアミノ基修飾シリカビーズが含まれている。200 nm の粒子については、モデルビーズの種類とバッファの組み合わせによって、ろ過速度低下のプロファイルが影響を受けることがわかっているが、両サンプルとも、(2-6) 式に用いたものと同じモデルビーズとバッファの組み合わせであったため、ろ過速度低下のプロファイルを高い精度で予測することができた (RMSE < 0.006)。

次に、2.3.1 でフィルター A を用いて、mAb1～mAb6 のろ過試験を実施した際のろ過速度低下のプロファイルの予測を試みた。ろ過のインプットのサンプルの粒子プロファイルは、図 4 に示したように取得しているが、この結果を (2-6) 式に適用するために、2.3.4 で確立した方法で、予測対象サンプル中の 200 nm, 500 nm, 1 μm , 2 μm の粒子濃度を算出した。このように算出した粒子濃度を用いて、(2-6) 式でろ過速度低下のプロファイルを予測した結果を図 16 に示した。図 16 に示したろ過速度低下のプロファイルの予測結果と、図 5

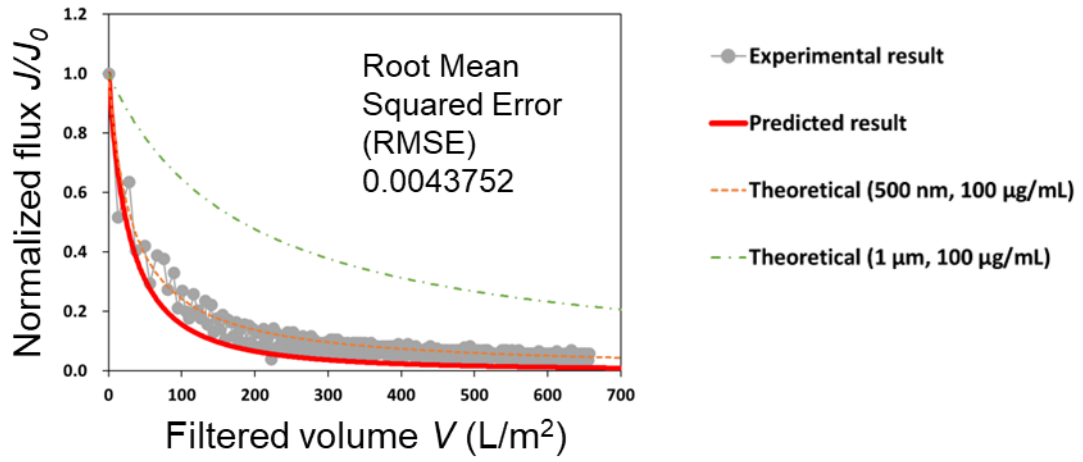
(a) に示した実際のろ過試験の結果を比較すると、mAb1～mAb6 の相対的なろ過プロファイルは、予測できているものの、X 軸方向の値には、約 10 倍程度の乖離があり、予測では、実際のろ過試験の結果よりも過大評価されていた。

そこで、表 5 (a) の式中に記載した補正係数 α を導入した。図 17 は、2.3.1 で取得したフィルター A での mAb1～mAb6 のろ過試験結果に対して、補正係数 α を導入した (2-6) 式をフィッティングした結果である。また、これら以外にも、図 18 に示したように、さまざまなサンプルのろ過試験結果に対して、 α を含む (2-6) 式をフィッティングした。この α を含む (2-6) 式では、実際にろ過試験で得られたろ過速度低下のプロファイルに対して、良好なフィッティング結果が得られた。したがって、サンプル毎に適切な補正係数 α の値を

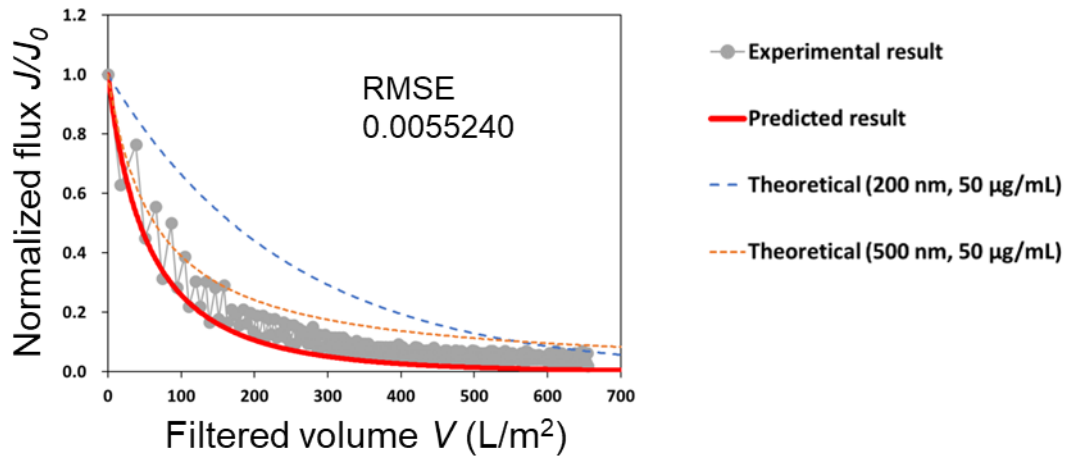
与えることで、ろ過速度低下のプロファイルが精度高く予測できるのではないかと考えた。補正係数 α は 200 nm の粒子のみに導入すると、他の粒子サイズにも α を導入する場合と比較して、より良いフィッティング結果が得られた。フィルターA の内部構造は、孔径 500 nm の上層と孔径 200 nm の下層の非対称な二層構造になっているが、図 9 に示したビーズのろ過試験結果に対する閉塞モデルのフィッティング結果から、直径 200 nm の粒子は、バッファー条件によって、上層と下層の境界部分で **intermediate blocking** を引き起こしていたり、フィルターの細孔の内部で、**adsorption** により閉塞が起きていたりするものと考えられた。ビーズと蛋白質凝集体とでは、粒子とフィルター基材との相互作用やフィルターの内部での粒子間の相互作用に違いがあるが、補正係数 α によって、それらの違いを相殺することができていると考察している。図 19 (a) には、200 nm の粒子濃度 $C_{200\text{ nm}}$ と $C_{200\text{ nm}}/100 \times \alpha$ 値の間の直線関係が示されており、これを図 19 (b) の形に変形すると、補正係数 α が 200 nm の粒子濃度に反比例していることがわかる。図 19 (b) に示した関係式を用いることで、サンプルに応じて、適切な補正係数 α を推定することが可能である。

mAb1～mAb7 と Fc-fusion1 について、実際のろ過試験の結果から、(1-1) 式を使って、 V_{max} の値を算出した。また、(2-6) 式を用いて予測したろ過速度低下のプロファイルにおいて、 $J/J_0=0.05$ となるときにの体積 V の値を V_{max} の予測値として算出した。図 20 に、 V_{max} の実験結果と予測結果のプロットを示した。 V_{max} の実測値と予測値は非常によく一致しており、この予測モデルは、幅広い導電率を有するバッファーにおいて、抗体だけでなく、Fc 融合蛋白質も含むさまざまな治療用蛋白質に対して、適用することができた。

(a)



(b)



(c)

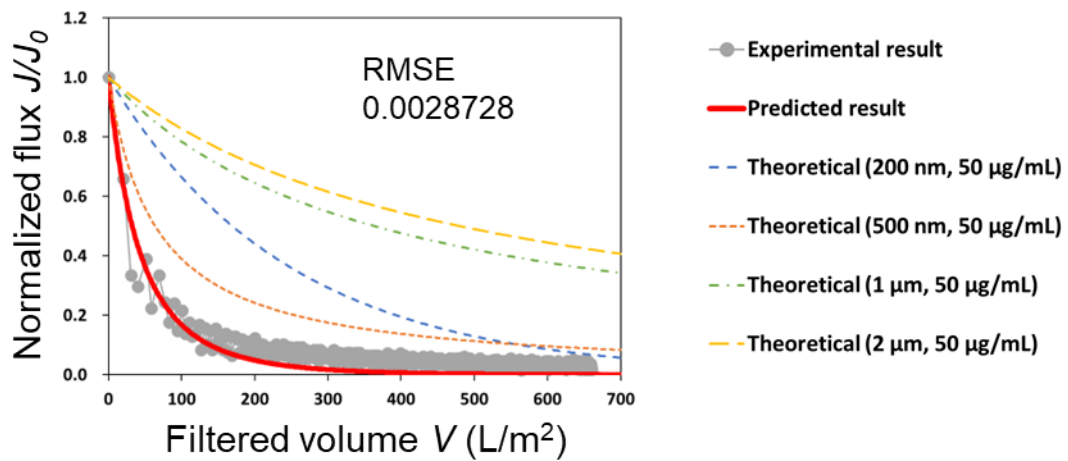
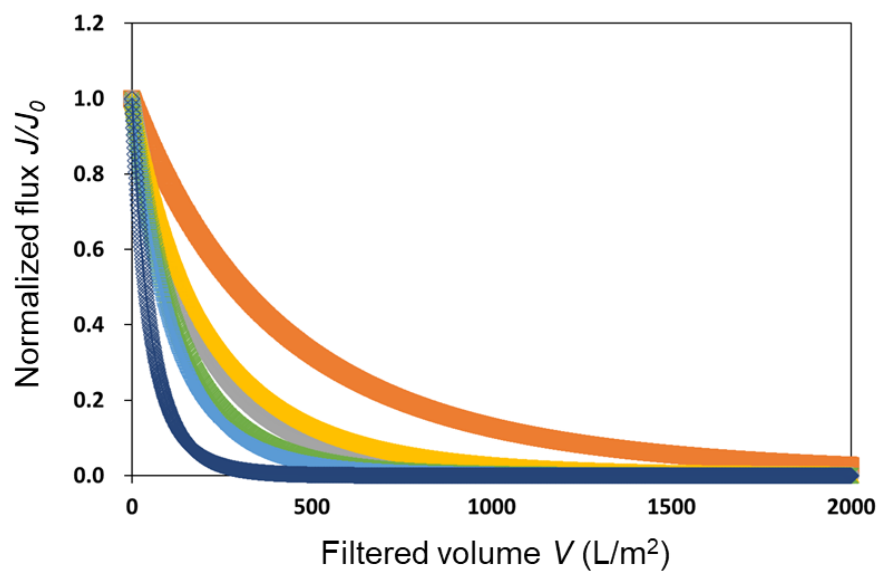


図 15 モデルビーズ混合液のろ過速度低下プロファイルの予測結果.

フィルターA を用いて、後述のモデルビーズの混合液についてろ過試験を実施した。ろ過試験に供したサンプルは、(a) 500 nm 及び 1 μm のアミノ基修飾シリカビーズ（各 100 $\mu\text{g/mL}$ ）の混合液、(b) 200 nm 及び 500 nm のアミノ基修飾シリカビーズ（各 50 $\mu\text{g/mL}$ ）の混合液、(c) 200 nm、500 nm、及び 1 μm のアミノ基修飾シリカビーズと 2 μm の PSL ビーズ（各 50 $\mu\text{g/mL}$ ）の混合液である。いずれのサンプルについても、120 mM の酢酸バッファー（pH 5.0）にモデルビーズを懸濁した。ろ過速度低下プロファイルの予測には、表 5（a）のモデル式を使用した。なお、ここでは、補正係数 α を使用しなかった（ $\alpha=1$ と同義）。



■ mAb 1
 ■ mAb 2
 ■ mAb 3
 ■ mAb 4
 ■ mAb 5
 ■ mAb 6

図 16 フィルターA でのろ過速度低下プロファイルの予測結果（補正係数なし）．
 ろ過速度低下プロファイルの予測には、表 5（a）のモデル式を使用した。など、ここでは、補正係数 α を使用しなかった（ $\alpha=1$ と同義）。

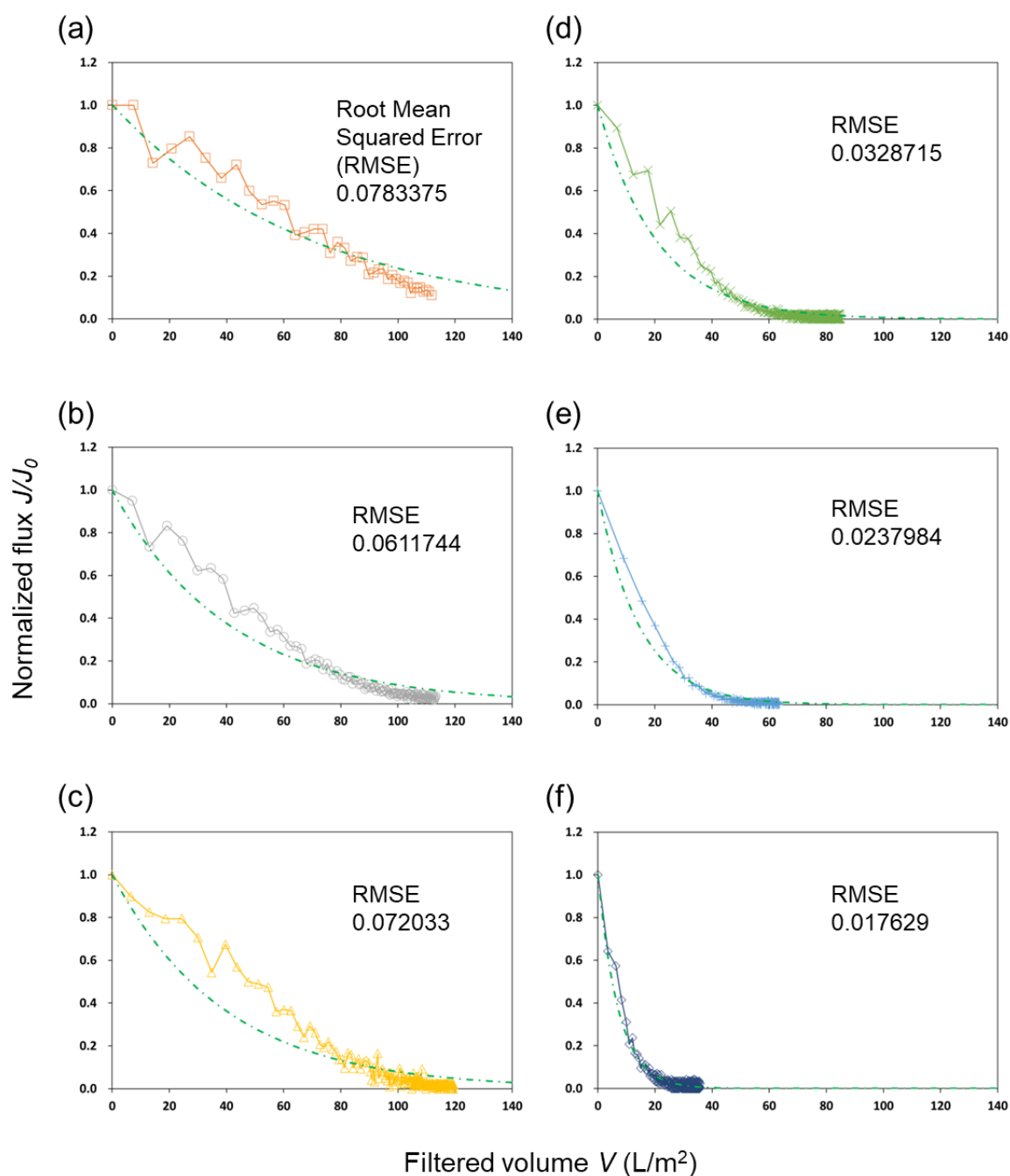


図 17 フィルターA でのろ過速度低下プロファイルの予測結果（補正係数 α あり）．ろ過試験の実測データを実線で、予測モデルのフィッティング結果を破線で示した．ろ過速度低下プロファイルの予測モデルには、表 5 (a) のモデル式を使用した．
 サンプル：(a) mAb1, (b) mAb2, (c) mAb3, (d) mAb4, (e) mAb5, (f) mAb6
 決定した補正係数 α ：(a) 20.022, (b) 11.068, (c) 17.057, (d) 20.883, (e) 25.740, (f) 25.614

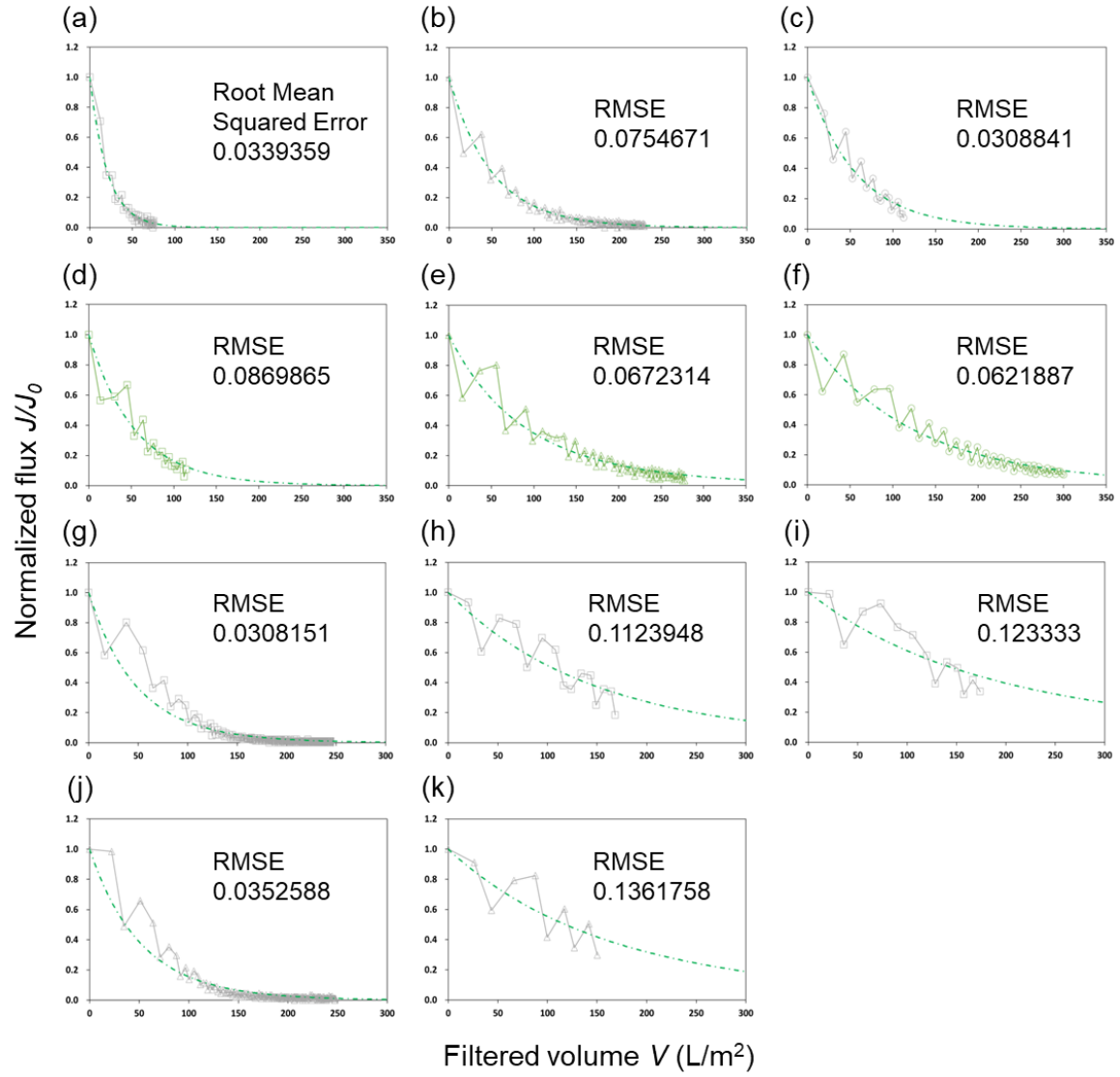
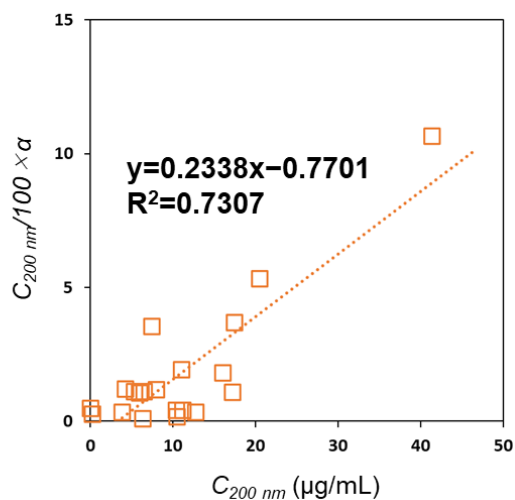


図 18 フィルターA でのろ過速度低下プロファイルの予測結果（補正係数 α あり）。
ろ過試験の実測データを実線で、予測モデルのフィッティング結果を破線で示した。
ろ過速度低下プロファイルの予測モデルには、表 5（a）のモデル式を使用した。
mAb2 及び mAb4 に対して、それぞれ（a, d）5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン（pH 5.5）、（b, e）0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー（pH 5.0）、
（c, f）120 mM 酢酸バッファー（pH 5.0）中で、接触攪拌ストレスを加えた。
（g-k）については、0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー中の 10 mg/mL の
mAb2 に対して、室温で 24 時間、接触攪拌ストレスを加えたものを、以下の通りに希釈して、ろ過試験に供した。5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン（pH 5.5）で
（g）20 倍希釈したもの、（h）40 倍希釈したもの、（i）5%ソルビトールを含む
10 mM ヒスチジン（pH 5.5）中の 10 mg/mL の mAb2 で 40 倍希釈したもの、0.2 M
NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー（pH 5.0）で（j）20 倍希釈したもの、（k）40 倍
希釈したもの。
決定した補正係数 α : （a）46.900, （b）16.298, （c）14.339, （d）26.954,
（e）345.893, （f）3.53191, （g）6.05658, （h）8.10837, （i）1.01141,
（j）17.237, （k）74.907

(a)



(b)

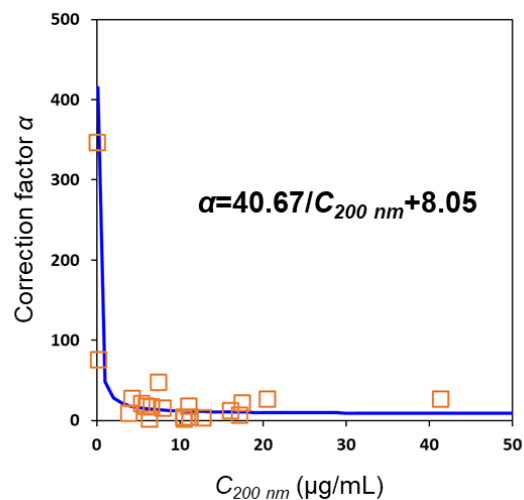


図 19 補正係数 α と粒子濃度の関係。

補正係数 α は、フィルターA の予測モデルにおいて使用したものである。

$C_{200 \text{ nm}}$ は、直径 200 nm の粒子濃度である。

(a) には、 $C_{200 \text{ nm}}$ と $C_{200 \text{ nm}}/100 \times \alpha$ の近似直線と決定係数 R^2 を示した。両者の間には、直線関係が見られた。このことから、 $C_{200 \text{ nm}}$ と α の間には、反比例の関係が成り立つ。(b) には、 $C_{200 \text{ nm}}$ と α の近似曲線を青色の実線で示した。

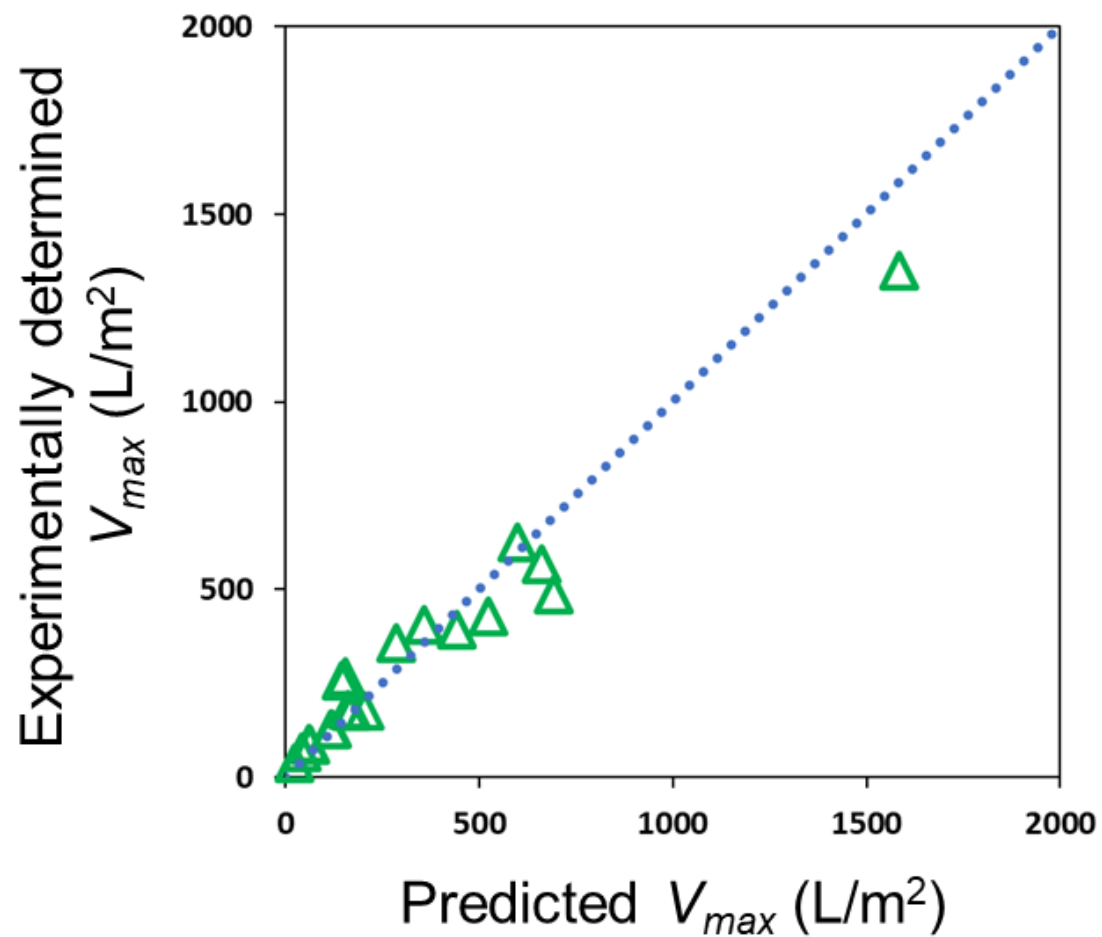


図 20 フィルターA での V_{max} の実測値 vs. 予測値のプロット.

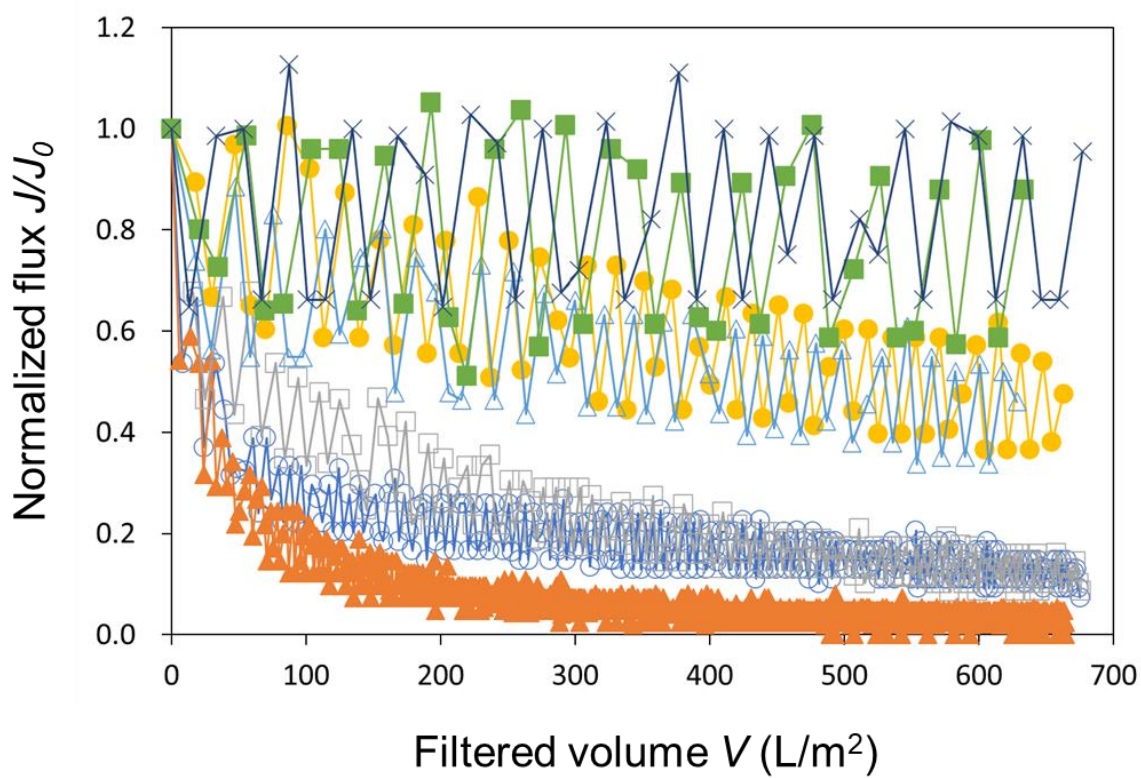
7 種類の抗体 (mAb1~mAb7) 及び 1 種類の Fc 融合蛋白質 (Fc-fusion1) について、フィルターA でろ過試験を実施して V_{max} を算出し、併せて、 V_{max} の予測を行った。

次に、ここで確立したろ過速度低下プロファイルの予測モデル構築のアプローチが、材質や構造の違うフィルターに対して、適用できるかを検証した。表 3 の結果を基に、100 nm ～4 μm のモデルビーズを 120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に、粒子濃度が 100 $\mu\text{g/mL}$ となるように懸濁し、フィルターB を用いてろ過試験を実施した。100 nm, 200 nm, 500 nm, 1 μm のモデルビーズには、入手したビーズの中で、ゼータ電位ができるだけ蛋白質凝集体と近かったアミノ基修飾シリカビーズを用いた。また、アミノ基修飾シリカビーズには、2 μm と 4 μm の製品ラインナップがなかったため、これらのサイズについては、表面修飾のない PSL ビーズを用いた。結果は、図 21 に示した通りである。フィルターB についても 2 μm 以下の粒子は、フィルター閉塞を引き起こしたが、4 μm 粒子は、フィルター閉塞を引き起こさなかった。ろ過試験で得られたデータに対して、図 22 に示したように、(2-1) ～ (2-5) 式として示した 5 種類の閉塞モデルをフィッティングし、最も当てはまりの良い閉塞モデルを、RMSE を基準に選択した。これらの結果を踏まえ、(2-6) 式に表 5 (b) に示した条件を導入した。図 21 にあるように、100 nm の粒子についても、フィルター閉塞への寄与が確認されたが、このサイズの粒子を定量的に検出・評価することが、現在の分析手法では難しいため、モデル式への考慮は見送った。200 nm, 500 nm, 1 μm , 2 μm のいずれの粒子についても、最も当てはまりの良かった閉塞モデルは、cake filtration であった。フィルターA の場合と同様に、補正係数なしでは、実測と予測のろ過速度低下のプロファイルには、X 軸方向の値に乖離があった。フィルターB では、表 5 (b) に示した通り、補正係数 β を 200 nm, 500 nm, 1 μm , 2 μm のすべての粒子サイズに均等に導入した。補正係数 β を導入したモデル式は、2.3.1 で取得した 6 抗体 (mAb1～mAb6) のフィルターB でのろ過試験結果に対して、図 23 に示した通り、良好なフィッティング結果が得られた。補正係数 β については、図 24 に示したように、200 nm, 500 nm, 1 μm , 2 μm の粒子濃度の総和である C_{Total} と $\{(C_{200\text{ nm}}/100) \times \beta\} \times \{(C_{500\text{ nm}}/100) \times \beta\} \times \{(C_{1\text{ }\mu\text{m}}/100) \times \beta\} \times \{(C_{2\text{ }\mu\text{m}}/100) \times \beta\}$ との間に直線関係があり、この関係式を基に、サンプルに応じた適切な補正係数 β の値を推定できると考えられ

る。また、 V_{max} の値については、図 25 に示したように、実際にろ過試験で得られた値と、予測した値とが、非常に良く一致した。モデルビーズを用いたフィルターB のろ過速度低下プロファイルの解析では、表 5 (b) に示したように、直径 200 nm~2 μ m のいずれのサイズについても、cake filtration の閉塞メカニズムの当てはまりが最も良かった。ただし、図 23 に示したように抗体のフィルターB でのろ過挙動を見ると、特に mAb1, mAb2, mAb3 については、ろ過の途中からは、cake filtration の閉塞モデル式に従うろ過速度低下のプロファイルが見られているが、ろ過開始直後は、放物線状に緩やかにろ過速度が低下していることから、フィルターB で蛋白質溶液をろ過した際には、ろ過の途中で、閉塞メカニズムが変化している可能性が示唆された。こうした閉塞メカニズムの変化は、本研究の予測モデルでは考慮できていないため、図 23 の mAb1, mAb2, mAb3 では、ろ過開始直後のろ過速度が、予測モデルでは低めの値に予測されることとなった。一方で、ろ過後半のプロファイルは実測と予測が非常に良く一致しており、 V_{max} の予測に用いている $J/J_0=0.05$ となる付近のろ過速度低下プロファイルが精度良く予測できているため、図 25 に示したように V_{max} の値も精度良く予測できている。

前述の通り、フィルターB において、直径 200 nm~2 μ m の粒子は、フィルター表面でケーキ層を形成することでろ過速度低下を引き起こす cake filtration のメカニズムでフィルター閉塞を引き起こしていることが、閉塞モデルのフィッティング解析の結果から、明らかになった。フィルターB のろ過速度低下プロファイルの予測モデルに導入した補正係数 β については、閉塞の原因となるケーキ層の密度の違いを、モデルビーズの場合と蛋白質凝集体の場合とで、補正していると考察している。さまざまなストレス条件において生成する蛋白質凝集体は、一般に、真球状の形状ではなく、楕円球やひも状の形状をしている可能性が高い³⁰。流体力学径が同じであると仮定した場合、蛋白質凝集体は、本研究に用いているような PSL やシリカビーズのような真球状、かつ剛体球の粒子と比較して、より密度の高いケーキ層を形成することができると考えられる³¹。

また、フィルターAでも、閉塞モデルのフィッティング解析の結果から、直径 500 nm、1 μm 、2 μm の粒子のフィルター閉塞メカニズムは、**cake filtration** であることがわかった。そこで、フィルターBのろ過速度低下プロファイルの予測モデルと同様に、500 nm、1 μm 、2 μm に対して、補正係数 β を導入することを試みた。しかしながら、補正係数 α と β の両方を導入したモデル式をフィッティングした場合の RMSE の値は、200 nm にのみ α を導入したモデル式をフィッティングした場合と、ほとんど違いがなかった。このことから、フィルターAについては、200 nm の粒子が、500 nm、1 μm 、2 μm の粒子よりも、フィルター閉塞に対する寄与が大きいものと考えられた。



- ⊕ 100 nm Silica (NH₂) in 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
- ▲ 200 nm Silica (NH₂) in 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
- ⊞ 500 nm Silica (NH₂) in 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
- 1 μm Silica (NH₂) in 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
- △ 2 μm PSL in 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
- 4 μm PSL in 120 mM acetate buffer (pH 5.0)
- ✕ 120 mM acetate buffer (pH 5.0)

図 21 フィルターB を用いたモデルビーズ懸濁液のろ過試験結果.

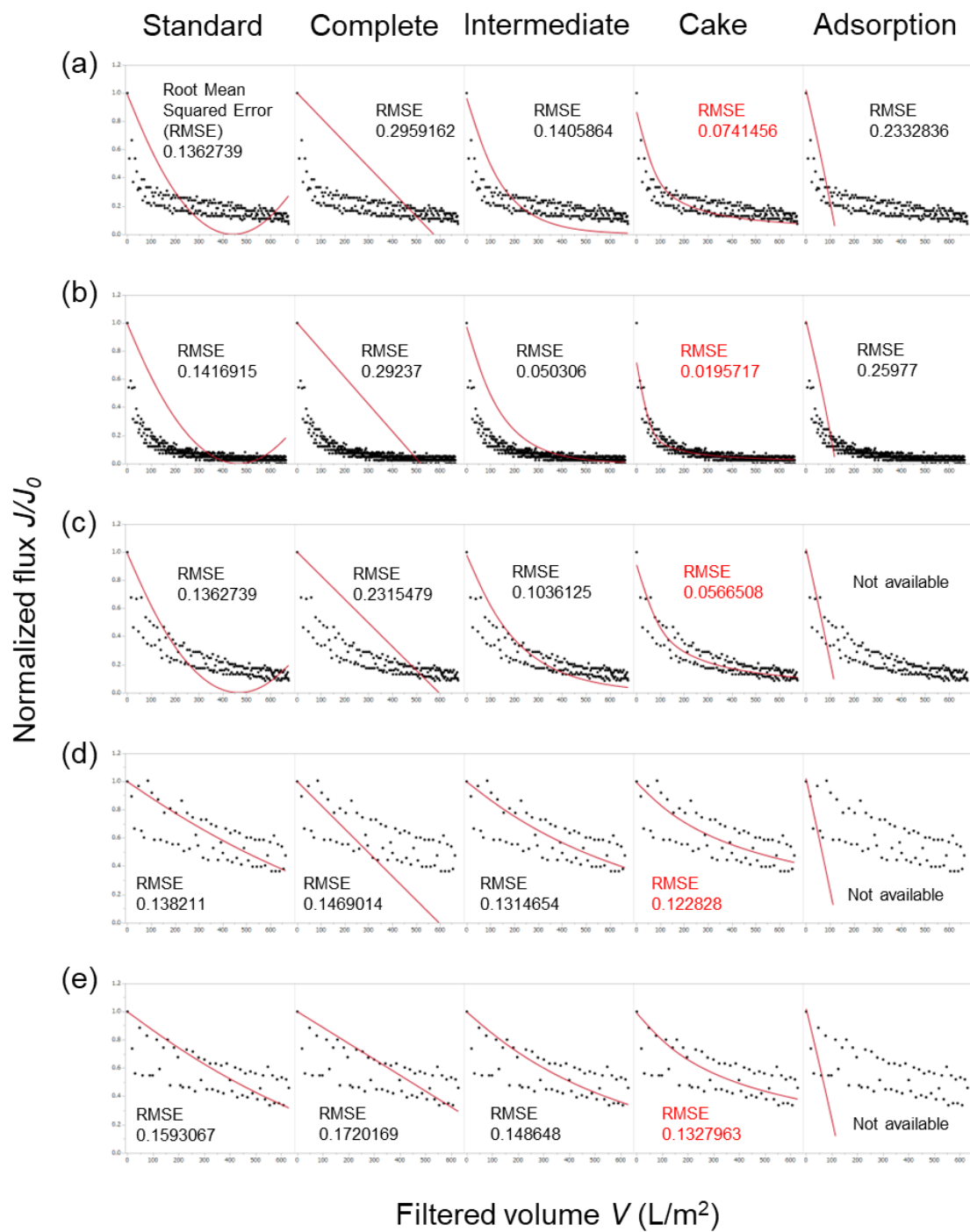


図 22 フィルターB を用いたモデルビーズのろ過試験結果に対するフィルター閉塞モデルのフィッティング結果.

Standard blocking, Complete blocking, Intermediate blocking, Cake filtration, Adsorption の計 5 種類のフィルター閉塞モデルをフィッティングした。

(a) 100 nm, (b) 200 nm, (c) 500 nm, (d) 1 μm のアミノ基修飾シリカビーズを、
(e) 2 μm の PSL ビーズを 120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に粒子濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ となるように懸濁したもの。

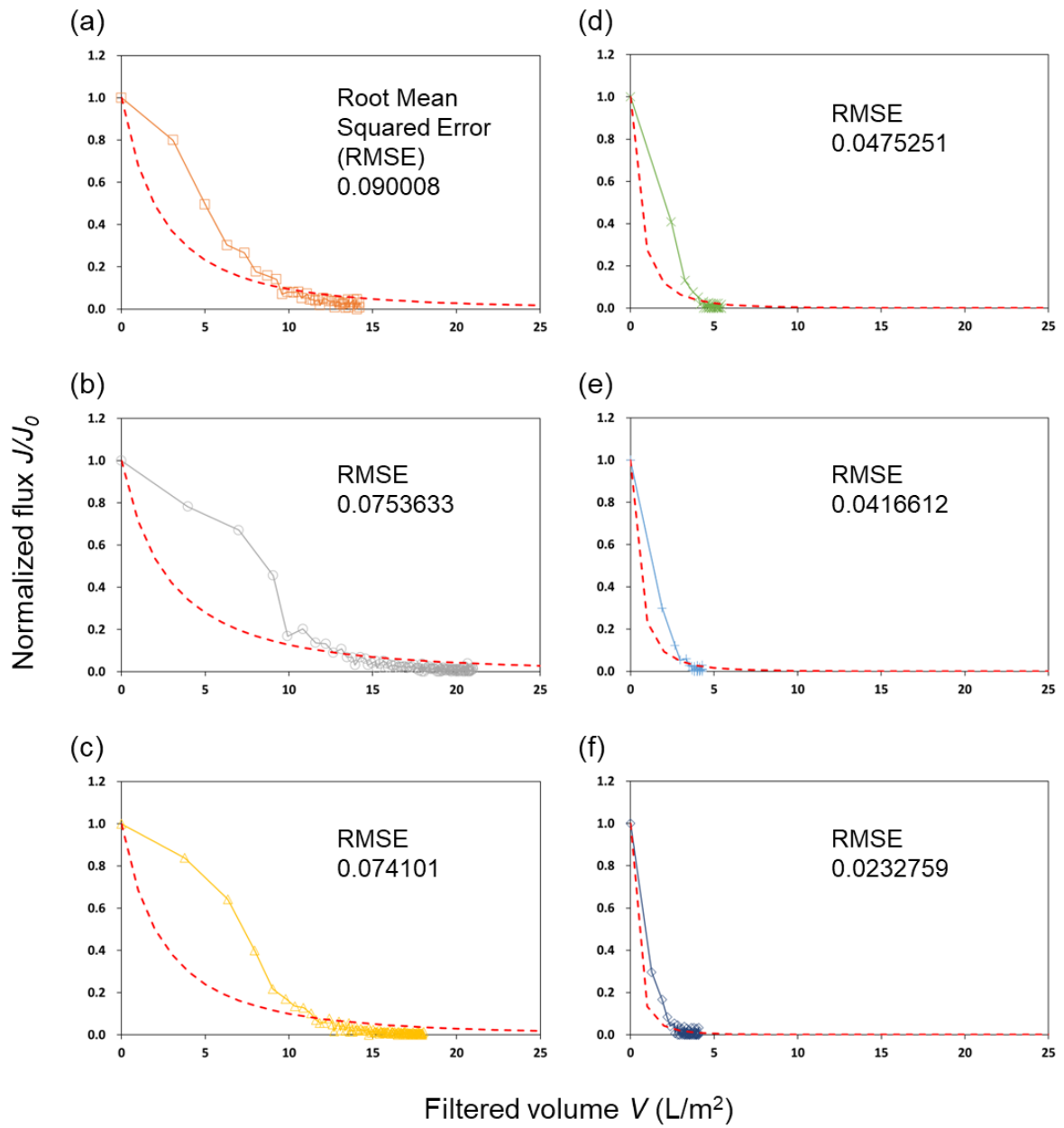


図 23 フィルターB でのろ過速度低下プロファイルの予測結果（補正係数 β あり）。
ろ過試験の実測データを実線で、予測モデルのフィッティング結果を破線で示した。
ろ過速度低下プロファイルの予測モデルには、表 5 (b) のモデル式を使用した。
サンプル：(a) mAb1, (b) mAb2, (c) mAb3, (d) mAb4, (e) mAb5, (f) mAb6
決定した補正係数 β ：(a) 160.62, (b) 52.926, (c) 78.805, (d) 214.95,
(e) 219.48, (f) 167.52

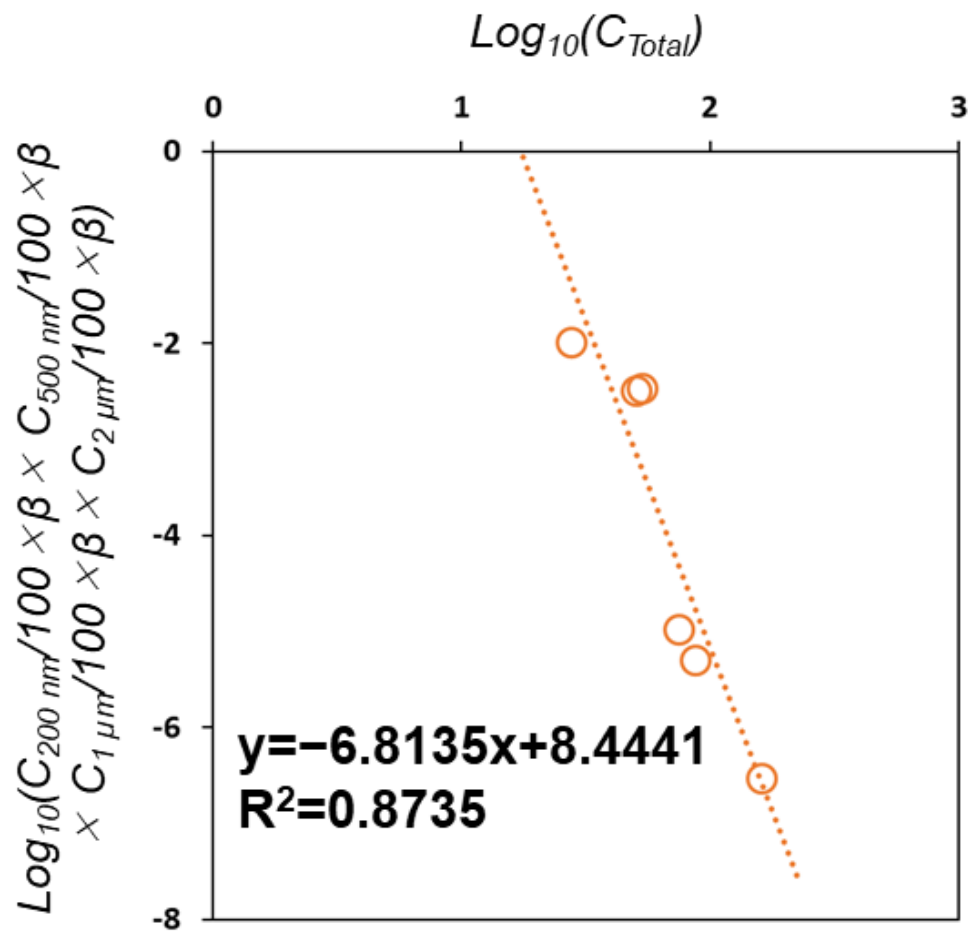


図 24 補正係数 β と粒子濃度の関係.

補正係数 β は、フィルターB の予測モデルにおいて使用したものである。

$C_{200 \text{ nm}}$, $C_{500 \text{ nm}}$, $C_{1 \mu\text{m}}$, $C_{2 \mu\text{m}}$ は、それぞれ直径 200 nm, 500 nm, 1 μm , 2 μm の粒子濃度である。また、 $C_{\text{Total}} = C_{200 \text{ nm}} + C_{500 \text{ nm}} + C_{1 \mu\text{m}} + C_{2 \mu\text{m}}$ である。

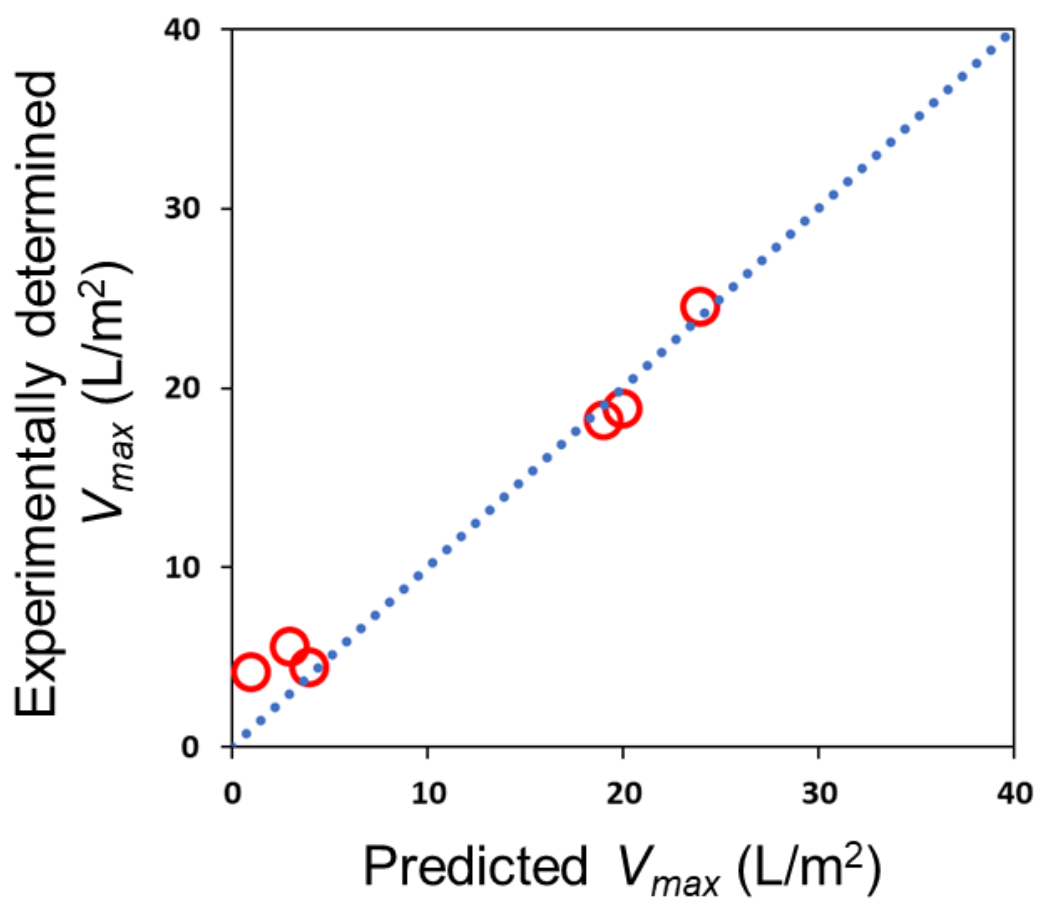


図 25 フィルターB での V_{max} の実測値 vs. 予測値のプロット.

6 種類の抗体 (mAb1~mAb6) について、フィルターB でろ過試験を実施して V_{max} を算出し、併せて、 V_{max} の予測を行った。

2.4 小括

本章では、異なる材質、及び内部構造を持つ2種類のMFフィルターに対して、治療用蛋白質の負荷量依存的なろ過挙動低下のプロファイルを予測可能なモデルを構築することに成功した。このアプローチは、さまざまな抗体やFc融合蛋白質のろ過挙動低下のプロファイルを予測することが可能であった。粒子のサイズによっては、ろ過挙動低下のプロファイルに粒子のゼータ電位が影響することが示唆されたが、構築した予測モデルは、粒子のゼータ電位に影響を与えると考えられるバッファの導電率が異なる複数のバッファ中のサンプルに対して、適用できたことから、さまざまな治療用蛋白質のサンプルについて、予測が行えると考えられた。また、異なる材質、及び内部構造を持つ2種類のMFフィルターに対して、それぞれ予測モデルを構築できたことから、同様のアプローチで、さまざまなMFフィルターに対して、予測モデルを構築することができると考えられる。このアプローチは、蛋白質溶液のろ過に一般的に用いられるような、蛋白質低吸着のMFフィルターに対しては、広く適用できるのではないかと考えている。デプスフィルターのように、フィルター基材のゼータ電位により、積極的に粒子を捕捉するようなフィルターの負荷量依存的なろ過速度低下プロファイルの予測に適用するには、個々に検討が必要になると考えられる。

第3章 MF ろ過初速度予測法の構築

3.1 背景

第2章で構築したろ過速度低下プロファイルの予測モデルは、正規化したろ過速度 (J/J_0) を予測しているため、MF のろ過挙動を完全に予測するためには、ろ過の初速度を、別途予測する必要がある。そこで、本研究では、ろ過をするサンプルの粘度から、ハーゲン・ポワズイユの法則に基づいて、ろ過の初速度を予測するアプローチを検証した。

1839年にドイツの水理工学者 Gotthilf Hagen (1797–1884 年) によって、続いて 1840 年にフランスの医師・物理学者 Jean L. M. Poiseuille (1799–1869 年) によって独立に実験的に見出されたハーゲン・ポアズイユの法則 (Hagen-Poiseuille law) がある。この法則によると、内径が一定の円管を流れる粘性をもつ流体が層流の場合、円管に単位時間あたりに流れる流量 Q は、次の式で表される。

$$Q = \pi r^4 \Delta p / 8 \mu L \quad (3-1)$$

図 26 に示すような半径 r 、長さ L の円管の両端の圧力を p_1 、及び p_2 とすると、両端の圧力差 $\Delta p = p_1 - p_2$ と表すことができる。ここで、 μ は流体の粘度である。

この (3-1) 式は、次の (3-2) 式のように変形できる。

$$Q \times \mu = \pi r^4 \Delta p / 8 L \quad (3-2)$$

MF フィルターを 1 本の半径 r 、長さ L の円管であると仮定する。なお、フィルターのロット間で、円管の半径や長さに個体差はないものとする。MF フィルターのサイジングのために V_{max} を算出する定圧ろ過試験では、 Δp の値が一定である。これらを踏まえると、(3-2) 式の右辺は、同じ内部構造をもつフィルター、すなわち同一の製品であれば、一定の値となる。そこで、以下に示す (3-3) 式により、MF フィルターでろ過するサンプルの粘度が分かれば、ろ過の初速度が予測できると考えた。

$$Q = a / \mu \quad (3-3)$$

なお、 a は比例定数である。

一般に、MF をはじめとするろ過操作では、フィルターへのサンプル負荷量依存的に閉塞が起こり、ろ過速度の低下が見られ、ろ過の開始直後にろ過速度が最大となる。閉塞の影響を受ける前である、ろ過開始直後に到達する最大のろ過速度をろ過初速度と定義すると、

(3-3) 式から、ろ過の初速度が予測可能ではないかと考えた。そこで、複数の粘度が異なる流体を MF フィルターで定圧ろ過し、その際の初速度を実験により算出し、その上で、

(3-3) 式の比例定数 a を決定することとした。

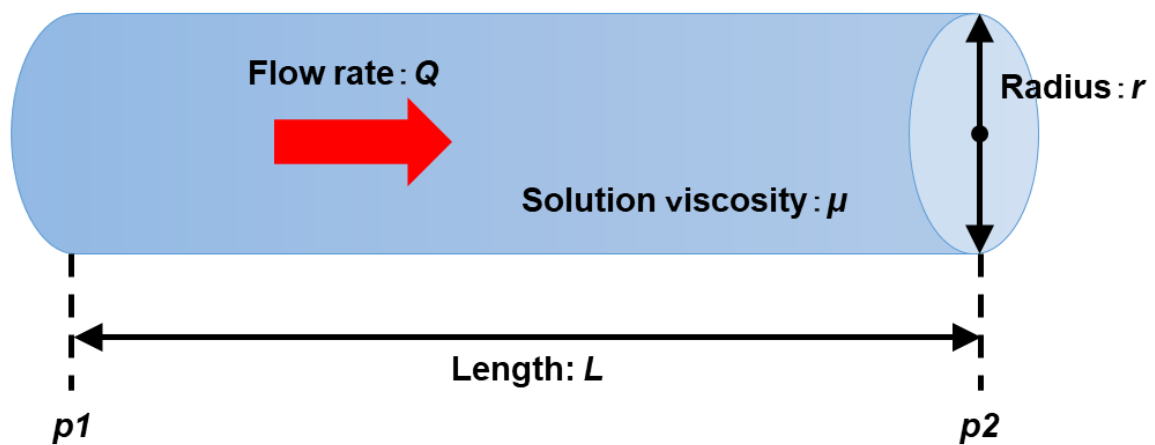


図 26 ハーゲン・ポアズイユの法則が適用される円管.

Q : 流量, r : 円管の半径, L : 円管の長さ, μ : 溶液の粘度, $p1$: 円管入口側における圧力, $p2$: 円管出口側における圧力

3.2 試料及び方法

3.2.1 材料

異なる粘度を持つモデル水溶液として、トレハロース水溶液を用いた。トレハロース二水和物（富士フイルム和光純薬株式会社）を 10, 20, 30 及び 40% (w/w) の濃度となるように、それぞれ水に溶解した。

モノクローナル抗体 (mAb8) は、CHO 細胞で発現させ、複数のクロマトグラフィー工程を経て高度に精製したものをを用いた。

3.2.2 サンプルの粘度測定

2016年にSolomonらによって、マイクロ流路内でのサンプルの移動度から、粘度を測定する方法が開発されている³²。この原理を用いた粘度計であるHoneybun (Unchained Labs) を用いて、サンプルの粘度測定を実施した。測定温度は20°Cに設定し、各サンプルについて、3回測定し、平均及びSDを算出した。

3.2.3 MF フィルターのろ過試験

MF フィルターのろ過試験は、2.2.4 に記載の方法で実施した。第2章と同様に、Merck KGaA 製の 0.5/0.2 μm の PES 製フィルター (フィルターA)、及び 0.22 μm の PVDF 製フィルター (フィルターB) を使用した。

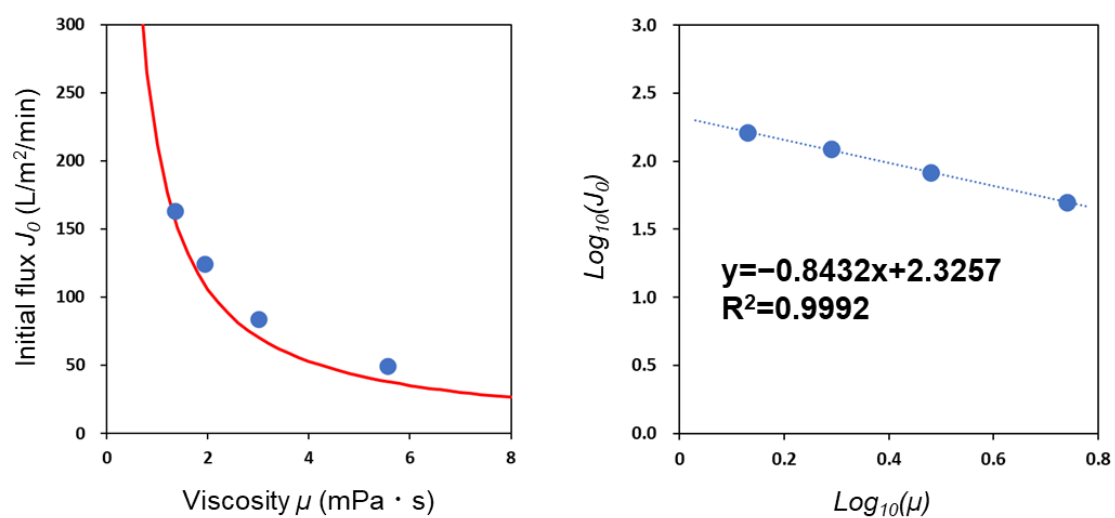
3.3 結果と考察

3.3.1 モデル水溶液のろ過初速度に対するハーゲン・ポアズイユの法則の適用確認

フィルターA と B を用いて、10%, 20%, 30%及び 40% (w/w) のトレハロース水溶液のろ過試験を実施した。図 27 の (a), (b) には、それぞれトレハロース水溶液の粘度とろ過試験で得られたろ過初速度との関係を示した。A, B いずれのフィルターについても、サンプルの粘度とろ過初速度の間には、(3-3) 式が良く当てはまっており、ハーゲン・ポアズイユ

ユの法則に適合することがわかった。なお、各トレハロース水溶液の粘度とろ過試験で取得したろ過初速度の実測値は、表 6 に記載した。

(a)



(b)

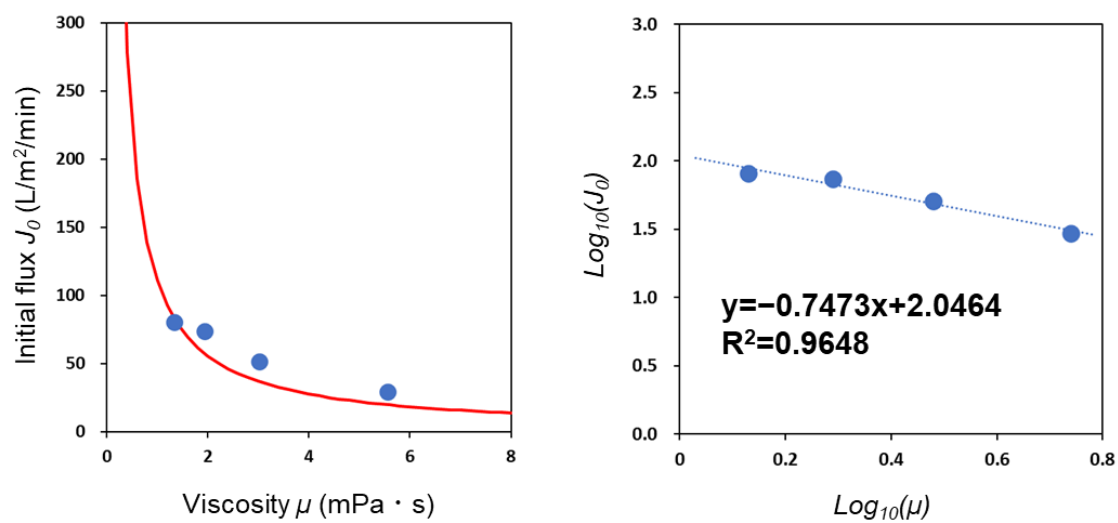


図 27 モデル水溶液の粘度とろ過初速度の関係.

(a) フィルターA, (b) フィルターB

表 6 トレハロース水溶液の粘度とろ過初速度の実測値.

(a)

	Viscosity at 20°C (mPa · s)	Initial Flux (L/m ² /min)
10% (w/w) trehalose solution	1.352±0.02	163.239
20% (w/w) trehalose solution	1.933±0.06	124.286
30% (w/w) trehalose solution	3.008±0.06	84.000
40% (w/w) trehalose solution	5.556±0.13	49.714

(b)

	Viscosity at 20°C (mPa · s)	Initial Flux (L/m ² /min)
10% (w/w) trehalose solution	1.342±0.02	80.574
20% (w/w) trehalose solution	1.939±0.02	73.714
30% (w/w) trehalose solution	3.013±0.04	51.429
40% (w/w) trehalose solution	5.557±0.10	29.610

(a) フィルターA

(b) フィルターB

粘度については、それぞれ n=3 で測定し、平均値と標準偏差 (SD) を算出した。

各結果は平均値±SD で示している。

3.3.2 ろ過初速度予測に対するモデルの適用可能性評価

そこで次に、図 27 に示したモデル水溶液の粘度とろ過初速度の関係式を用いて、蛋白質溶液のろ過初速度の予測を試みた。表 7 及び表 8 には、それぞれフィルターA, B を用いたろ過試験を行ったサンプル情報、ろ過初速度の実測値、及び予測値を示した。サンプルとして、複数条件の mAb8 と 5%ソルビトールを含む 10 mM ヒスチジン (pH 5.5)、120 mM 酢酸バッファー (pH 5.0)、0.2 M NaCl を含む 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0)、9%スクロースを含む 25 mM ヒスチジン (pH 5.7) の計 4 種類のバッファーを用いた。フィルターA, B それぞれにおけるろ過初速度の実測値、及び予測値を図 28 の (a), (b) に示した。フィルターA 及び B のいずれについても、ハーゲン・ポアズイユの法則を用いて、サンプルの粘度の情報からろ過初速度を高い精度で予測することができた。

表 7 フィルターA でのろ過初速度の実測値及び予測値.

#	Sample	Protein conc. (mg/mL)	Viscosity (mPa · s)	Initial flux (L/m ² /min)	
				Predicted	Experimental
1	Unstressed mAb8	101.84	3.557±0.10	59.516	55.238
2	MF reprocessing for #1	Not tested	3.467±0.07	61.061	64.286
3	mAb8, treated contact agitation (o/n), diluted two times with 25 mM histidine with 9% sucrose (pH 5.7)	51.00	1.994±0.05	106.169	102.857
4	MF reprocessing for #3	49.27	1.909±0.02	110.896	94.286
5	mAb8, treated contact agitation (o/n), diluted two times with unstressed mAb8	101.24	3.610±0.01	58.643	48.000
6	10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5); buffer only	—	1.176±0.02	180.017	160.714
7	120 mM acetate buffer (pH 5.0); buffer only	—	1.116±0.03	189.695	178.290
8	50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl; buffer only	—	1.053±0.00	201.045	181.714
9	25mM histidine with 9% sucrose (pH 5.7); buffer only	—	1.344±0.02	157.515	157.714

o/n: overnight

粘度については、それぞれ n=3 で測定し、平均値と標準偏差 (SD) を算出した。

各結果は平均値±SD で示している。

表 8 フィルターB でのろ過初速度の実測値及び予測値.

#	Sample	Protein conc. (mg/mL)	Viscosity (mPa · s)	Initial flux (L/m ² /min)	
				Predicted	Experimental
1	Unstressed mAb8	101.84	3.580±0.03	31.089	39.429
2	MF reprocessing for #1	Not tested	3.517±0.04	31.646	30.857
3	mAb8, treated contact agitation (o/n), diluted two times with 25 mM histidine with 9% sucrose (pH 5.7)	49.30	1.900±0.03	58.579	46.753
4	mAb8, treated contact agitation (o/n), diluted six times with 25 mM histidine, 9% sucrose (pH 5.7)	17.33	1.494±0.04	74.498	73.714
5	MF reprocessing for #3	16.53	1.471±0.02	75.663	83.810
6	mAb8, treated contact agitation (o/n), diluted six times with unstressed mAb8	101.71	3.545±0.11	31.396	25.714
7	10 mM histidine with 5% sorbitol (pH 5.5); buffer only	—	1.176±0.02	94.643	97.714
8	120 mM acetate buffer (pH 5.0); buffer only	—	1.116±0.03	99.731	113.143
9	50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0.2 M NaCl; buffer only	—	1.053±0.00	105.698	118.286
10	25 mM histidine with 9% sucrose (pH 5.7); buffer only	—	1.313±0.01	84.768	87.429

o/n: overnight

粘度については、それぞれ n=3 で測定し、平均値と標準偏差 (SD) を算出した。

各結果は平均値±SD で示している。

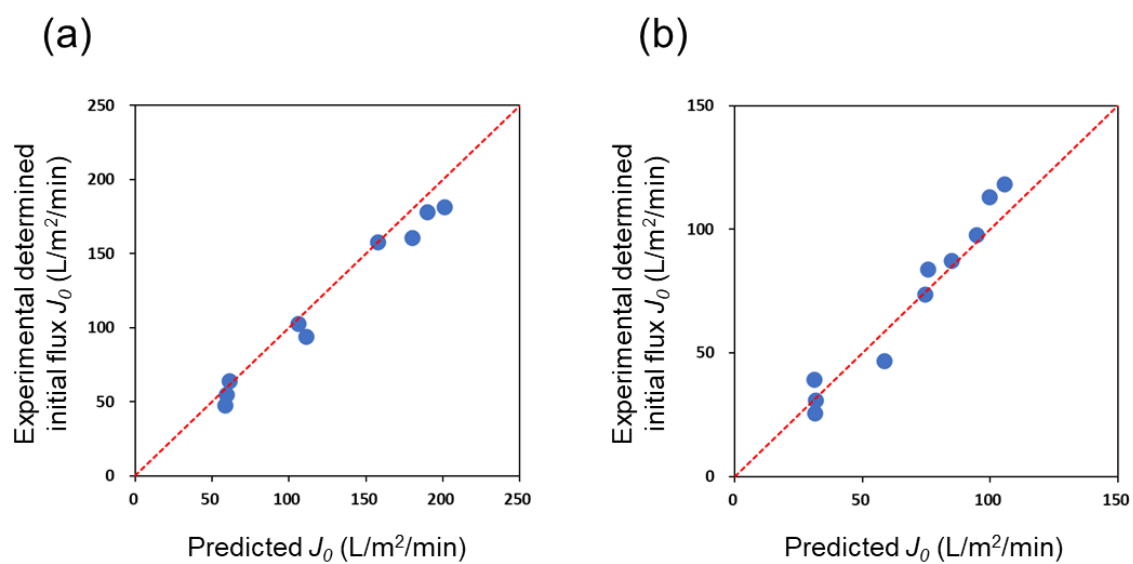


図 28 ろ過初速度の実測値 vs. サンプル粘度に基づくろ過初速度の予測値.

3.4 小括

本章では、ハーゲン・ポアズイユの法則を基に、サンプルの粘度を用いて、ろ過初速度を予測することができた。ろ過初速度の予測についても、材質、及び内部構造の異なる 2 種類の MF フィルターに適用することができており、広範なフィルターに本アプローチが適用できると考えられる。

第4章 総括

第2章では、異なる材質、及び内部構造を持つ2種類のMFフィルターに対して、治療用蛋白質の負荷量依存的なろ過速度低下のプロファイルを予測可能なモデルを構築することに成功した。このアプローチは、さまざまな抗体やFc融合蛋白質のろ過速度低下のプロファイルを予測することが可能であった。粒子のサイズによっては、ろ過速度低下のプロファイルに粒子のゼータ電位が影響することが示唆されたが、構築した予測モデルは、粒子のゼータ電位に影響を与えると考えられるバッファーの導電率が異なる複数のバッファー中のサンプルに対して、適用できたことから、さまざまな治療用蛋白質のサンプルについて、フィルターへの負荷液量依存的なろ過速度低下プロファイルの予測が行えると考えられた。また、異なる材質、及び内部構造を持つ2種類のMFフィルターに対して、それぞれ予測モデルを構築できたことから、同様のアプローチで、さまざまなMFフィルターに対して、予測モデルを構築することができると考えられる。このアプローチは、蛋白質溶液のろ過に一般的に用いられるような、蛋白質低吸着のMFフィルターに対しては、広く適用できるのではないかと考えている。デプスフィルターののように、フィルター基材のゼータ電位により、積極的に粒子を捕捉するようなフィルターの負荷量依存的なろ過速度低下プロファイルの予測に適用するには、個々に検討が必要になると考えられる。これまで、蛋白質医薬品の製造に限らず、さまざまな分野・用途において、MFフィルターのろ過性に関する研究が行われている。特にMFフィルターの閉塞メカニズムを数式化した閉塞モデル式の開発は、フィルターろ過性の研究において、重要な成果の一つである。また、単一の閉塞メカニズムでなく、複数の閉塞メカニズムを組み合わせた複合モデルも提案されている¹⁰。しかしながら、これらの閉塞モデル式は、実際のろ過データに、非常に良くフィッティングができる一方で、ろ過のサンプルの品質の変動のロット間差に対して、考慮されていなかった。先にも述べたが、抗体溶液のMF時に生じるフィルター閉塞について、ミクロンサイズの抗体凝集体の量との間に負の相関があるという知見が報告されている^{14, 15, 16}。ただし、これらの報告は、2010

年～2015 年にかけて発表されており、本研究で用いた qLD 法のような、サブミクロンサイズの凝集体の計測手法が十分に揃っていない時期でもあり、その当時では、サブミクロンサイズの蛋白質凝集体の定量評価が難しかったと考えられる。一方で、近年の凝集体計測技術の発展もあり、第 2 章に示した、新しい MF フィルターのろ過性予測モデルの構築が実現した。また、今後、新たな凝集体計測技術が進歩し、100 nm 付近の粒子の定量評価手法が開発されれば、本章で示した予測モデルに現時点では組み込めていない、直径 100 nm やそれ以下のサイズの粒子のフィルター閉塞に対する寄与を考慮した予測モデルを構築することが可能になり、予測精度の向上が期待できる。

次に、第 3 章では、ハーゲン・ポアズイユの法則を基に、サンプルの粘度を用いて、ろ過初速度を予測することができた。ろ過初速度の予測についても、材質、及び内部構造の異なる 2 種類の MF フィルターに適用することができており、広範なフィルターに本アプローチが適用できると考えられる。ハーゲン・ポアズイユの法則は、これまでに述べた、フィルター閉塞モデルのベースになっている法則であり、これを用いて、ろ過初速度の予測ができることは、想像に難くない。しかしながら、さまざまな粘度を持つモデル溶液を使って、ろ過初速度の予測式を作成し、実際に蛋白質溶液の粘度から、そのろ過初速度を予測できることを示した報告例はなかった。そこで、第 3 章で、材質や内部構造の異なる複数の MF フィルターに対して、ハーゲン・ポアズイユの法則を基に、ろ過初速度の予測式を構築できることを示した本研究で得られた知見は、大変有用であると考えられる。

第 2 章、第 3 章の結果を総合すると、MF フィルターのろ過挙動を理解する上で重要な、「ろ過初速度」と「ろ過操作の進行とともに低下していくろ過速度のプロファイル」の両方を予測することができた。これら进行评估するために、実際にろ過試験を実施するには、100 mL 程度のサンプルが必要であった。また、スケールアップ検討などの目的を考えると、蛋白質濃度や粒子濃度を揃えるために、サンプルを希釈せず、ろ過試験を実施する必要がある。本研究で構築したアプローチを適用すると、「ろ過初速度」については、サンプルの粘

度を基に、「ろ過操作の進行とともに低下していくろ過速度のプロファイル」については、サンプルに含まれるサブミクロンからミクロンサイズの、特定のサイズの粒子濃度を基に予測可能である。本研究で用いた装置を用いると、サンプルの粘度は、1 測定あたり 35 μL 、粒子濃度は、1 測定あたり 125 μL の液量で測定可能であり、フィルターA や B のように、一度予測モデルを構築してしまえば、評価サンプルの確保が難しいプロセス開発の初期段階においても、効果的な MF スケールアップ評価が可能になる。本研究で用いたフィルターA と B 以外の MF フィルターについても、同様のアプローチで、ろ過速度低下プロファイルの予測モデルを構築すれば、ろ過するサンプル中に含まれる蛋白質凝集体のサイズ分布に基づいて、複数の種類の MF フィルターにおけるろ過プロファイルをシミュレーションして、比較することで、そのサンプルに対して、最適なろ過のパフォーマンスが得られるフィルターを選定することも可能である。また、蛋白質凝集体の生成量に影響する可能性のあるプロセスパラメーター、例えば、バッファー組成や攪拌機などの条件を振って、各条件における蛋白質凝集体の定量的なプロファイルを取得することで、これらの各プロセスパラメーターが、凝集体生成と MF のろ過性にどのように影響するかを解明することができる。これにより、これまで予見できなかったフィルター閉塞に対して、使用するフィルターの面積を過剰にするなどの対処をするのではなく、フィルター閉塞の原因となる凝集体の生成を制御するなど、フィルター閉塞の根本原因に対応することができると考えられる。

また、図 4 の結果を見ると、6 種類の異なる抗体で、抗体毎に、同一のストレス条件で生じる凝集体のサイズ・量のプロファイルに違いがあることがわかる。すなわち、抗体によって、凝集体生成の観点で、こうしたストレスに対する感受性が異なるものと考えられる。この知見は、蛋白質医薬品の製造プロセス研究のみならず、創薬研究の段階においても有用であり、より製造可能性（Manufacturability）の高い蛋白質医薬品の開発候補品の選定の指標として、特定のストレス条件下におけるサブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体の生成傾向を設定できる可能性がある。

略語・記号リスト

略号

ADC : Antibody drug conjugate, 抗体薬物複合体

AUC : Analytical ultracentrifugation, 超遠心分析

CHO : Chinese hamster ovary, チャイニーズハムスター卵巣

DLS : Dynamic light scattering, 動的光散乱

FI : Flow imaging, フローイメージング法

MF : Microfiltration, マイクロフィルトレーション

NaCl : Sodium chloride, 塩化ナトリウム

NIST : National Institute of Standards and Technology, 米国立標準技術研究所

NTA : Nano-particle tracking analysis, ナノ粒子追跡法

o/n : Overnight, 終夜

PES : Polyether sulfone, ポリエーテルスルホン

pI : Isoelectric point, 等電点

PSL : Polystyrene latex, ポリスチレンラテックス

PVDF : Polyvinylidene difluoride, ポリフッ化ビニリデン

qLD : Quantitative laser diffraction, 定量レーザ回折・散乱法

RMM : Resonant mass measurement, 共振質量測定法

RMSE : Root mean squared error, 二乗平均平方根誤差

SEC : Size exclusion chromatography, サイズ排除クロマトグラフィー

SD : Standard deviation, 標準偏差

SE-HPLC : Size exclusion high performance liquid chromatography,

サイズ排除高速液体クロマトグラフィー

UF/DF : Ultrafiltration/Diafiltration, 限外ろ過／透析ろ過

記号

A_{min} : スケールアップ時に必要な最小フィルター面積 (m^2)

J : ろ過速度 ($\text{L}/\text{m}^2/\text{min}$)

J_0 : ろ過初速度 ($\text{L}/\text{m}^2/\text{min}$)

J/J_0 : 正規化したろ過速度

V_{max} : 単位フィルター面積あたりの最大ろ過液量 (L/m^2)

謝 辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、厚いご指導を賜りました、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 内山進 教授、鳥巢哲生 准教授に深く感謝いたします。

本博士学位論文を作成するにあたり、ご指導を賜りました、大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 生物化学工学研究室 大政健史 教授、ならびに大阪大学生物工学国際交流センター 分子微生物学研究室 本田孝祐 教授に厚く感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり、貴重な通学の機会をくださり、終始多大なご支援、ご配慮を賜りました第一三共株式会社 野中浩一 博士、戸田成洋 博士、馬場悟史 博士、中山麻紀子 博士、山口孝弘 博士に深謝いたします。

本研究の計画立案から、的確なご助言とご指導をいただきました、同社、増田由美子 博士、松岡達司 博士に心から感謝いたします。

本研究開始のきっかけとなりました、6種類の抗体を用いた Side-by-side の MF フィルターろ過試験の実施にご協力いただきました第一三共株式会社 泉健太 氏をはじめ、研究遂行のさまざまな場面で、多角的なご助言いただき、また、評価検体の確保にもご協力いただきました館林バイオ技術開発センターの旧バイオ医薬研究所の皆様に、心から感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、終始私を支えてくれた家族に心から感謝いたします。

発表論文

- **Kota Inoue**, Yumiko Masuda, Tetsuo Torisu, Koichi Nonaka, Susumu Uchiyama. (2024).
Prediction models for the flux decay profile and initial flux of microfiltration for therapeutic proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 121(6), 1889-1901.
<https://doi.org/10.1002/bit.28692>

※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. 石井 明子, 川西 徹, 長野 哲雄 編 (2020). バイオ医薬 基礎から開発まで, 東京化学同人
2. Lu, R. M., Hwang, Y. C., Lee, C. C., Tsai, H. Z., Li, H. J. & Wu, H. C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1).
<https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
3. Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C. & Zhang, Y. (2022). Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 93.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00947-7>
4. Klein, C., Brinkmann, U., Reichert, J. M. & Kontermann, R. E. (2024). The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23(4), 301-319.
<https://doi.org/10.1038/s41573-024-00896-6>
5. Verdin, P. (2024). Top companies and drugs by sales in 2023. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23 (4), 240. <https://doi.org/10.1038/d41573-024-00041-3>
6. Kelley, B. (2009). Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*, 1(5), 443-452. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9448>
7. Minow, B., Rogge, P. & Thompson, K. (2012). Implementing a fully disposable mAb manufacturing facility. *BioProcess International*, 10(6), 48-57.
8. Robertson, J. H., Wilson, J. D., Bing, F., Byrd, M., Feeser, T. M., Jornitz, M. W., Levy, R. V., Madsen, R. E., Martin, J. M., Meissner, L. S., Meltzer, T. H., Morris, G. M., Nordhauser, F. M., Pietro, J., Schroeder, H. G., Stinavage, P. S., Trotter, A. M., Waibel, P. J., Weber, B. L., Wikol, M. J., Wilder, J. & Wolber, P. (1998). Sterilizing filtration of liquids. Technical report no. 26. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 52 (Suppl 1), 1-31.
9. Nikfarjam, L & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in

- cell culture. *Cell Journal (Yakhteh)*, 13(4), 203-212.
10. Bolton, G. R., Boesch, A. W. & Lazzara, M. J. (2006). The effects of flow rate on membrane capacity: development and application of adsorptive membrane fouling models. *Journal of Membrane Science*, 279(1-2), 625-634. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.12.057>
 11. Zydney, A. L. & Ho, C. C. (2002). Scale-up of microfiltration systems: fouling phenomena and Vmax analysis. *Desalination*, 146(1-3), 75-81. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00492-7](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00492-7)
 12. Joseph, A., Kenty, B., Mollet, M., Hwang, K., Rose, S., Goldrick, S., Bender, J., Farid, S. S. & Titchener-Hooker, N. (2016). A scale-down mimic for mapping the process performance of centrifugation, depth and sterile filtration. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(9), 1934-1941. <https://doi.org/10.1002/bit.25967>
 13. Merck KGaA 技術資料 (2019) . Vmax™ Constant Pressure Test for Sizing Aseptic Filters.
 14. Ishikawa, T., Kobayashi, N., Osawa, C., Sawa, E. & Wakamatsu, K. (2010). Prevention of stirring-induced microparticle formation in monoclonal antibody solutions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(6), 1043-1046. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1043>
 15. Callahan, D. J., Stanley, B. & Li, Y. (2014). Control of protein particle formation during ultrafiltration/diafiltration through interfacial protection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(3), 862-869. <https://doi.org/10.1002/jps.23861>
 16. Gikanga, B., Chen, Y., Stauch, O. B. & Maa, Y. F. (2015). Mixing monoclonal antibody formulations using bottom-mounted mixers: impact of mechanism and design on drug product quality. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 69(2), 284-296. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2015.01031>
 17. Sediq, A. S., van Duijvenvoorde, R. B. V., Jiskoot, W. & Nejadnik, M. R. (2016). No touching! Abrasion of adsorbed protein is the root cause of subvisible particle formation

- during stirring. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(2), 519-529.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.10.003>
18. Gikanga, B., & Maa, Y. F. (2020). A review on mixing-induced protein particle formation: The puzzle of bottom-mounted mixers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(8), 2363–2374.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.03.024>
 19. Nayak, A., Colandene, J., Bradford, V., & Perkins, M. (2011). Characterization of subvisible particle formation during the filling pump operation of a monoclonal antibody solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(10), 4198–4204. <https://doi.org/10.1002/jps.22676>
 20. Her, C., & Carpenter, J. F. (2020). Effects of tubing type, formulation, and postpumping agitation on nanoparticle and microparticle formation in intravenous immunoglobulin solutions processed with a peristaltic filling pump. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.013>
 21. Wu, H., & Randolph, T. W. (2020). Aggregation and particle formation during pumping of an antibody formulation are controlled by electrostatic interactions between pump surfaces and protein molecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(4), 1473–1482.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.01.023>
 22. Gross-Rother, J., Blech, M., Preis, E., Bakowsky, U. & Garidel, P. (2020). Particle detection and characterization for biopharmaceutical applications: current principles of established and alternative techniques. *Pharmaceutics*, 12(11), 1112.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111112>
 23. Totoki, S., Yamamoto, G., Tsumoto, K., Uchiyama, S. & Fukui, K. (2015). Quantitative laser diffraction method for the assessment of protein subvisible particles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(2), 618-626. <https://doi.org/10.1002/jps.24288>
 24. Yoneda, S., Niederleitner, B., Wiggernhorn, M., Koga, H., Totoki, S., Krayukhina, E., Friess,

- W. & Uchiyama, S. (2019). Quantitative laser diffraction for quantification of protein aggregates: comparison with resonant mass measurement, nanoparticle tracking analysis, flow imaging, and light obscuration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(1), 755-762.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.09.004>
25. Tucker, I. M., Corbett, J. C. W., Fatkin, J., Jack, R. O., Kaszuba, M., MacCreath, B. & McNeil-Watson, F. (2015). Laser Doppler electrophoresis applied to colloids and surfaces. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 20(4), 215-226.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2015.07.001>
26. Trinh, T. A., Li, W. & Chew, J. W. (2020). Internal fouling during microfiltration with foulants of different surface charges. *Journal of Membrane Science*, 602, 117983.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.117983>
27. Han, Q., Li, W., Trinh, T. A., Fane, A. G. & Chew, J. W. (2018). Effect of the surface charge of monodisperse particulate foulants on cake formation. *Journal of Membrane Science*, 548, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.11.017>
28. Gikanga, B., Eisner, D. R., Ovadia, R., Day, E. S., Stauch, O. B. & Maa, Y. F. (2017). Processing impact on monoclonal antibody drug products: protein subvisible particulate formation induced by grinding stress. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 71(3), 172-188. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2016.006726>
29. Breite, D., Went, M., Prager, A., Kuehnert, M. & Schulze, A. (2019). Charge separating microfiltration membrane with pH-dependent selectivity. *Polymers*, 11(1), 3.
<https://doi.org/10.3390/polym11010003>
30. Gambe-Gilbuena, A., Shibano, Y., Krayukhina, E., Torisu, T. & Uchiyama, S. (2020). Automatic Identification of the stress sources of protein aggregates using flow imaging microscopy images. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 614-623.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.034>

31. Tanos-Kanbur, M. B., Tamilselvam, N. R., Lai, H. Y. & Chew, J. W. (2022). Impact of particle shape and surface group on membrane fouling. *Membranes*, 12(4), 403.

<https://doi.org/10.3390/membranes12040403>

32. Solomon, D. E., Abdel-Raziq, A. & Vanapalli, S. A. (2016). A stress-controlled microfluidic shear viscometer based on smartphone imaging. *Rheologica Acta*, 55(9), 727-738.

<https://doi.org/10.1007/s00397-016-0940-9>