バイオ医薬品に含まれる凝集体の適切な分析に向けて

内山 進^{a,b}

Toward the Proper Biophysical Characterization of Aggregates in Biopharmaceuticals

Susumu Uchiyama^{a,b}

^aGraduate School of Engineering, Osaka University; GSE East 7F, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan;
and ^bExploratory Research Center on Life and Living Systems, National Institute of Natural Sciences;
5-1 Higashiyama, Myodaiji-cho, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan.

(Received February 26, 2018)

Biopharmaceuticals are often formulated as liquid dosage forms. During manufacturing and storage, protein molecules and active pharmaceutical ingredients form aggregates due to various stresses, including shaking and agitation, as well as by contact with silicone oils coated on pre-fillable syringes. The diameter of protein aggregates ranges from 15–20 nm, and that of dimers comprising a large number of antibody molecules can be up to 100 μm . Among these aggregates, those with a diameter of <100 nm are called nanometer aggregates, while those ranging between 100 nm and 1 μm are called sub-micron aggregates, and those ranging between 1 and 100 μm are called micron aggregates. In the last ten years, aggregates have been studied to determine their physical characteristics and their impact on immunogenicity. As a result, novel analytical methods and instruments for such characterizations have been established for a majority of aggregates, including those that are difficult to evaluate. Here, the biophysical features of protein aggregates are explained, followed by an introduction to the different methods for aggregate characterization, including their advantages and actual results. Finally, future perspectives and expectations regarding the characterization of protein aggregates are proposed.

Key words—therapeutic protein; antibody; aggregate; counting; insoluble particulate matter

はじめに

バイオ医薬品の有効性は十分に認識されているが、一方でその副作用については十分な研究がなされておらず、特に、副作用のうちすべてのバイオ医薬品に共通となる「免疫原性」については不明点が多い。10年ほど前からバイオ医薬品に含まれるタンパク質性の凝集体が免疫原性を発揮する可能性が指摘されるようになり、欧米の研究者を中心として精力的に研究が進められてきた。¹⁾併せて、凝集体の分析方法の発展も著しい。²⁾日本においては、現在、同様の懸念から凝集体の評価法の研究が進められている。³⁻⁶⁾本稿では、バイオ医薬品に含まれるタンパク質性の凝集体（タンパク質凝集体）に焦点

をしぼり、その研究背景や規制動向も含めながら、キャラクタリゼーションの現状と展望について紹介する。

1. バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体についての背景

2006年頃、バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体について、免疫原性との関係に懸念を示した論文が米国食品医薬品局（Food and Drug Administration; FDA）のRosenbergにより発表された。⁷⁾バイオ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、投与しても効果が低下する、さらに、場合によってはショック症状を引き起こすことから、免疫原性は抑制する必要がある。免疫原性の抑制のためタンパク質配列のヒト化が行われるが、完全にヒトの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。タンパク質の免疫原性には依然として不明点が多いが、上記のRosenbergの論文が発表さ

^a大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 GSE イースト 7F）、^b自然科学研究機構生命創成探究センター（〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1）

e-mail: suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第137年会シンポジウム S58 で発表した内容を中心に記述したものである。

Classification by Size		Morphology	
Size	Classification	Number of monomeric subunits	
<100nm	Nanometer	Aspect ratio	
100nm~1 μ m	Sub-micrometer	Surface roughness	
1 μ m~100 μ m	Micrometer	Internal morphology	
100 μ m<	Visible	Optical properties	
		Heterogeneous (e.g., protein-silicone oil)	
Reversibility		Covalent modification	
Reversible		Cross-linked (reducible and nonreducible)	
Irreversible		Intramolecular modification	
Dissociable under physiological conditions		Oxidation	
Dissociable under defined conditions		Deamidation	
Secondary/tertiary structure		Fragmentation	
Native/Fold		No modification	
Partially denatured/unfolded			
Denatured/Unfolded			
Intrinsically disordered			
Ordered (e.g., : Amyloid)			

Fig. 1. The Categories of Protein Aggregates

Protein aggregates are classified according to their properties such as size, morphology, reversibility, structures, and covalent modifications. Representative classifications presented by Narhi¹⁶⁾ are indicated.

れた 2006 年, 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の研究の必要性を発表した 2008 年以降の世界中の様々な研究の成果に基づいて,⁸⁻¹⁰⁾ 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る, と認識されつつある。2014 年には FDA より Guidance for Industry として Immunogenicity assessment for therapeutic protein products が発表され, バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体の適切なモニタリングと低減の必要性が記載されている。¹¹⁾ なお, 血液製剤であるイムノグロブリン製剤では, 3 量体以上の重合体の含量を一定以下に抑える必要があることが生物学的製剤基準に記載されている。¹²⁾ イムノグロブリン重合体の投与が免疫系に与える影響については, 1960 年代には報告があり,¹³⁾ 3 量体以上の重合体は補体タンパク質 C1q との結合能が強いことが示されている。^{14,15)} すなわち, イムノグロブリンの 3 量体以上の重合体は, 抗原分子に結合していなくても古典経路を活性化する可能性があり, したがって, こうした基準があるのは納得のできる場所である。

2. バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体の分類と分析

バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体については, Narhi らにより複数の性質に基づく分類が提案されている (Fig. 1)。¹⁶⁾ 凝集体はそれぞれの分類法において, いずれかのクラスに分類される。凝集体の分析を実施する際に実践的に重要となるのは可逆性による分類である。凝集体が可逆的な性質を持つ場合, 分析の際に溶液の希釈を行うと凝集体が解

離するために, 希釈率によって凝集体の濃度が異なる結果となる。すなわち, 希釈に伴い凝集体含量が減少することから, 希釈が必要な分析法の場合, 希釈率と凝集体含量の関係を実験的に確認する必要がある。ほかに分析を行う際に特に留意すべき事項として, タンパク質凝集体には標準品が存在しないため絶対定量が難しいことが挙げられる。そのため, FDA の上述の Guidance では, 測定原理が異なる複数の手法 (Orthogonal Methods) を用いて, 結果の比較を行いながら, 各分析結果の妥当性を判断することが奨められている。¹¹⁾

凝集体の分類のうち頻用されるのはサイズによる分類である。Figure 2 にサイズに応じた分析法をまとめた。100 nm–100 μ m の粒子は, subvisible particles (SVP) とよばれることが多いが, Narhi らはサイズを反映した名称の使用を奨めており, その場合, 100 nm–1 μ m はサブミクロン粒子, 1–100 μ m はミクロン粒子, と区別することとなる。¹⁶⁾ 以下, タンパク質凝集体の分析法についてサイズ毎に詳述する。

2-1. 100 nm (0.1 μ m) 以下のナノメートル粒子

可溶性でありほとんど光を散乱しないため粒子数が多く (粒子濃度が高く) ても見た目は透明である。そのため, 分離さえできれば, 吸光度測定と吸光係数に基づいた定量が可能である。このサイズ領域の定量にはサイズ排除クロマトグラフィー (size-exclusion chromatography; SEC) が中心的に利用される。ただし, SEC では 40 nm 程度より大きい凝集体はカラムを通過することが難しく, さらに, 凝集体の性質によってはカラム担体への吸着も無視できないため, 凝集体含量を少なく見積もる結果とな

Fig. 2. The Methodologies for Protein Aggregates Characterization

Protein aggregates have wide range in particle size and are classified according to the size. Since no single method can cover quantification of particles with wide range of sizes, assessment of protein aggregates requires the combination of different analytical methods, deepening on the size distribution. A value obtained from a method should be confirmed using an orthogonal method covering similar size ranges.

ることが多い。^{17,18)} SECでの分析の妥当性は、回収率によりある程度は判断できる。例えば、カラム担体への吸着が起こると回収率が100%を大きく下回ることとなる。SECの溶離液のイオン強度変更などにより吸着の低減や分離の改善の可能性もあるが、そもそも凝集体量既知の標準品がない状況でSECの結果の妥当性をSECの条件変更から判断することは原理的に不可能である。そこで、このサイズ域の凝集体の定量に、超遠心分析沈降速度法 (sedimentation velocity-analytical ultracentrifugation; SV-AUC) が用いられるようになってきた。SV-AUCは、超遠心分離とは異なり、超遠心力場での粒子の沈降パターンをリアルタイムで取得する。得られた沈降パターンを解析することで、タンパク質など溶媒中に分散した微粒子の分散状態を定量的に求めることが可能である。¹⁹⁾ SV-AUCでは、密度勾配を作製する必要はなく、樹脂マトリックスを用いないため、幅広い溶媒組成条件での凝集体定量が可能である。ただし、得られる結果は、実験及び解析における条件の違いを受け易いことから、信頼性が高い実験プロトコルを用いることが望ましい。例えば、安定化剤である糖を含んだ組成の場合には、その条件に応じた解析パラメータの利用が必要となる。¹⁹⁾

2-2. 0.1–1 μm のサブミクロン粒子 このサイズ領域の粒子の分析法として、共振式質量測定法

(resonant mass measurement; RMM)、粒子トラッキング解析法 (particle tracking analysis; PTA 又は nano tracking analysis; NTA)、定量的レーザー回折法 (quantitative laser diffraction; qLD) 法、などが利用できる。RMMは溶媒と粒子の密度差に基づいた測定法であるため、水溶液よりも密度が大きいタンパク質凝集体と密度が小さいシリコンオイルドロップなどを区別してカウントすることが可能である。なお、フローイメージング法 (flow imaging; FI、又はデジタル動的イメージング法, digital imaging analysis; DIA、とも呼ばれる) やラマン顕微鏡ではこのサイズ領域の測定は難しく、したがって、RMMはタンパク質凝集体とシリコンオイルドロップの区別が可能な唯一の手法である。qLDは、0.15–10 μm 程度の粒子を一度に測定可能な手法であり、時間や攪拌回数の変化に伴う凝集体のサイズ分布変化を観測する際に有用である。このサイズ領域の粒子の絶対数 (絶対濃度) の定量は難しく、相対的な比較のために利用されている。

2-3. 1–10 μm のミクロン粒子 このサイズ領域の分析は装置開発と測定方法の面から近年最も研究が行われてきた。特に、従来から利用されてきた光遮蔽法 (light obscuration; LO) に代わる手法として FI による報告例が増えてきた。FIでは、LOよりも確実に粒子をカウント可能であり、さらに、粒子の画像情報が得られることから、粒子形状やコント

ラストに基づいた粒子の分類に利用されている。²⁰⁻²²⁾

2-4. 10 μm 以上のミクロン粒子 このサイズ領域の測定については、米国薬局方 (United States Pharmacopeia; USP) や日本薬局方における「不溶性微粒子試験」に記載があり、注射剤に含まれる粒子の数を LO により評価し、一定数以下とする必要があることが定められている。また、従来から用いられてきた LO について、0.2 mL 程度の少量での測定が許容されるようになってきた。さらに、1-10 μm のミクロン粒子と同様に、FI での解析の必要性が認識されるようになってきた。

3. バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体のガイドラインや局方との関係

既に記載したが 2014 年に FDA よりガイダンスが発表されている。タンパク質医薬品に含まれる不溶性微粒子の試験法として、USP (米国薬局方) 〈787〉規格が制定され、対応して日本薬局方でも、6.17 タンパク質医薬品注射剤の不溶性微粒子試験法の案に関する意見募集が、平成 29 年 9 月に行われている。また、タンパク質凝集体の分析方法については、USP (米国薬局方) 〈1787〉に記載がある。

2016 年には FDA の研究者が著者となってタンパク質凝集体の評価に関する重要な論文が *Journal of Pharmaceutical Science* 誌に発表されている。²³⁾ ここでは、現在の局方に規格がある LO による不溶性微粒子だけでは、タンパク質凝集体の定量としては不十分で、NTA や FI などの新しい分析手法による評価の必要性が示唆されている。こうした背景から、現在、国立医薬品食品衛生研究所と製薬企業を中心として、タンパク質凝集体の適切な評価に向けた研究が実施されている。³⁾

4. 摩損度試験器を利用したバイオ医薬品の凝集性の評価

バイアルやシリンジに充填されたバイオ医薬品は輸送、保管、患者への投与、までの間に様々な物理的ストレスを受けるが、物理的ストレスは、タンパク質の凝集へとつながる可能性がある。例えば、輸送時の振とうによるタンパク質の凝集は以前より指摘されてきた。²⁴⁾ さらに、2015 年には、Randolph らにより、バイアルの落下時にキャビテーションが発生しタンパク質凝集体が発生する、あるいは、酸化が起こる、可能性が指摘されていた。²⁵⁾ 衝撃と振とうは、輸送やハンドリング時にバイオ医薬品が受

け得るストレスである。そこで、近年、筆者らは、バイアルやシリンジの落下による衝撃と振とうの複合ストレスがバイオ医薬品の凝集を引き起こす影響を研究している。²⁶⁾ ただし、衝撃や振とうによる凝集は、不可逆であることが多く、したがって、凝集の定量を行ってもバラツキが大きいことから、まずは、再現性高く実験結果を得るためのセットアップを最初に行った。具体的には、筆者らは、錠剤の衝撃に対する摩損性やもろさの試験に使用される摩損度試験器を利用し、抗体医薬溶液を充填したバイアルに対して、一定周期で落下と振とうを繰り返すことで、再現よく、複合ストレスを与えることが可能となった。複合ストレスが凝集に与える影響は予想外に大きく、バイアルのヘッドスペースの大きさに依存した凝集体発生が確認された。重要な点として、振とうストレスだけでは凝集体が発生しない抗体医薬でも複合ストレスでは凝集体が発生したことから、複合ストレスが凝集の原因であると言える。次に、複合ストレスによる凝集体発生の原因を解明するための実験を行った。一定回数複合ストレスを与えた後に溶液を取り出し、同じバイアルに新しい抗体溶液を充填し振とうストレスのみを与えたところ凝集体の発生が観測された。一方で、取り出した溶液を新しいバイアルに充填し振とうストレスのみを与えたところ凝集体の発生は確認されなかった。また、今回の筆者らの研究では、複合ストレス後の抗体の構造に化学変化は観測されなかった。これらの結果は、衝撃時に発生したキャビテーションにより抗体分子に何かしらの高次構造変化が引き起こされ、バイアル壁面に吸着、吸着した分子が振とうにより溶液中に凝集体として放出された可能性を示唆している。このように、複数の物理的ストレスが組み合わさると、相乗的にバイオ医薬品の品質を低下させる可能性があることから、加速試験や過酷試験などにおいては、実際の現場でバイオ医薬品にかかり得る複数のストレスを想定した試験デザインが必要となると言える。

おわりに

以上、バイオ医薬品に含まれるタンパク質凝集体の分析及び物理ストレスとの関係に関する新しい知見について概説した。今後、凝集体の分析方法の更なる発展と科学的根拠に基づいた製剤に含まれる凝集体の低減がすすむことが期待される。

謝辞 本研究は、武田薬品工業株式会社、ユーメディコ株式会社の研究者の方々のご支援を受けて推進したものです。ここに深く御礼申し上げます。

利益相反 内山 進（武田薬品工業株式会社及びユーメディコ株式会社から共同研究費を受領）。

REFERENCES

- 1) Moussa E. M., Panchal J. P., Moorthy B. S., Blum J. S., Joubert M. K., Narhi L. O., Topp E. M., *J. Pharm. Sci.*, **105**, 417–430 (2016).
- 2) Volkin D., Hersenson S., Ho R., Uchiyama S., Winter G., Carpenter J., *J. Pharm. Sci.*, **104**, 290–300 (2015).
- 3) Ishii-Watabe A., Shibata H., Harazono A., Hyuga M., Kiyoshi M., Saitoh S., Iwura T., Torisu T., Goda Y., Uchiyama S., *J. Pharm. Sci.*, **106**, 3431–3437 (2017).
- 4) Uchiyama S., Krayukhina E., Noda M., *Yakuzaigaku*, **74**, 12–18 (2014).
- 5) Uchiyama S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 2041–2052 (2014).
- 6) Uchiyama S., *Yakugaku Zasshi*, **136**, 443–448 (2016).
- 7) Rosenberg A. S., *AAPS J.*, **8**, E501–E507 (2006).
- 8) Carpenter J. F., Randolph T. W., Jiskoot W., Crommelin D. J., Middaugh C. R., Winter G., Fan Y. X., Kirshner S., Verthelyi D., Kozlowski S., Clouse K. A., Swann P. G., Rosenberg A., Cherney B., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1201–1205 (2009).
- 9) Singh S. K., Afonina N., Awwad M., Bechtold-Peters K., Blue J. T., Chou D., Cromwell M., Krause H. J., Mahler H. C., Meyer B. K., Narhi L., Nesta D. P., Spitznagel T., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 3302–3321 (2010).
- 10) Joubert M. K., Hokom M., Eakin C., Zhou L., Deshpande M., Baker M. P., Goletz T. J., Kerwin B. A., Chirmule N., Narhi L. O., Jawa V., *J. Biol. Chem.*, **287**, 25266–25279 (2012).
- 11) U.S. Food and Drug Administration (FDA), “Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products.”: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM338856.pdf>, cited 25 April, 2018.
- 12) National Institute of Infectious Diseases (NIID), “Minimum Requirements for Biological Products.”: https://www.niid.go.jp/niid/images/qa/seibutuki/MRBP_english/mrbp_2006.pdf, cited 25 April, 2018.
- 13) Christian C. L., *J. Immunol.*, **84**, 117–121 (1960).
- 14) Christian C. L., *J. Immunol.*, **84**, 112–116 (1960).
- 15) Wright J. K., Tschopp J., Jatton J. C., Engel J., *Biochem. J.*, **187**, 775–780 (1980).
- 16) Narhi L. O., Schmit J., Bechtold-Peters K., Sharma D., *J. Pharm. Sci.*, **101**, 493–498 (2012).
- 17) Thirumangalathu R., Krishnan S., Ricci M. S., Brems D. N., Randolph T. W., Carpenter J. F., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3167–3181 (2009).
- 18) Krayukhina E., Tsumoto K., Uchiyama S., Fukui K., *J. Pharm. Sci.*, **104**, 527–535 (2015).
- 19) Uchiyama S., Noda M., Krayukhina E., *Biophys. Rev.*, **10**, 259–269 (2018).
- 20) Zölls S., Weinbuch D., Wiggenhorn M., Winter G., Friess W., Jiskoot W., Hawe A., *AAPS J.*, **15**, 1200–1211 (2013).
- 21) Torisu T., Maruno T., Yoneda S., Hamaji Y., Honda S., Ohkubo T., Uchiyama S., *J. Pharm. Sci.*, **106**, 2966–2978 (2017).
- 22) Maruno T., Watanabe H., Yoneda S., Uchihashi T., Adachi S., Arai K., Sawaguchi T., Uchiyama S., *J. Pharm. Sci.*, **107**, 1521–1529 (2018).
- 23) Kotarek J., Stuart C., De Paoli S. H., Sima J., Lin T. L., Gao Y., Ovanesov M., Liang Y., Scott D., Brown J., Bai Y., Metcalfe D. D., Marszal E., Ragheb J. A., *J. Pharm. Sci.*, **105**, 1023–1027 (2016).
- 24) Kiese S., Pappenger A., Friess W., Mahler H. C., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 4347–4366 (2008).
- 25) Randolph T. W., Schiltz E., Sederstrom D., Steinmann D., Mozziconacci O., Schöneich C., Freund E., Ricci M. S., Carpenter J. F., Lengsfeld C. S., *J. Pharm. Sci.*, **104**, 602–611 (2015).
- 26) Torisu T., Maruno T., Hamaji Y., Ohkubo T., Uchiyama S., *J. Pharm. Sci.*, **106**, 521–529 (2017).