

C.2 プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残留するHCPに関する検討

C.2.1 精製トラスツズマブに残留するHCPの同定の試み

精製トラスツズマブに残留するHCPをショットガン解析で同定する試みとして、プロテインAカラムクロマトグラフィー工程後のトラスツズマブ及び陽イオン交換クロマトグラフィー後のトラスツズマブを用いて解析した。

ELISAで測定されたHCP残留量は、プロテインAカラムクロマトグラフィー工程後のトラスツズマブで約1000 ppm、陽イオン交換クロマトグラフィー後のトラスツズマブで約10 ppm未満であった。ショットガン解析で、少なくとも100 ppm程度の検出感度が期待されたが、トラスツズマブ由来ペプチドのみが検出され、HCPと思われるペプチドは検出されなかった。

本実験に用いた質量分析装置は、量的に主要なペプチドを優先して検出するため、量的順位が低いHCPが検出されなかったものと考えられた。したがって、残留するHCPのみを分離し、同定する方策を取ることにした。

C.2.2 プロテインA精製トラスツズマブに吸着して残留するHCP量の評価

原薬に残留するHCPは、目的物質と類似した物理化学的性質を有する、あるいは、精製基材に結合しやすい性質を有すると考えられてきた。このような考えから、欧州薬局方では、部分精製で残留するHCPを免疫学的検出のための抗体作製の抗原として用いることを推奨している。

本研究においても予備的な検討として、抗体との結合特異性の観点から抗体医薬品の初期の精製工程に多用されているプロテインAカラムクロマトグラフィー工程に着目し、トラスツズマブを発現していないCHO-DG44細胞の培養上清を出発材料として、実験的製造と同条件でプロテインAカラムクロマトグラフィー工程を実施した。その結果、トラスツズマブの残留HCP量に比べ、HCPのみで行った精製工程後の残留HCP量は、少ない傾向を示した。また、ある種の抗体医薬品では、抗体医薬品にHCPが吸着

することを示唆する報告があった (*Biotechnol. Prog.*, 24, 1115-21, 2008)。したがって、トラスツズマブにおいてもHCPが吸着し、プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残留するHCPの一部となっていることが予想された。そこで、本研究では、トラスツズマブに吸着するHCPの存在を検証するために、トラスツズマブのスパイクによるHCPの挙動を解析した。

CHO-DG44細胞の馴化培地濃縮液に精製トラスツズマブを添加したスパイクサンプルとコントロールサンプルをプロテインAカラムにアプライし、トラスツズマブ製造システムで確立した条件に従って溶出し、それぞれHCP濃度を測定した結果、コントロールサンプルと比較して、スパイクサンプルの溶出画分のHCP濃度は、約2倍高かった (図7)。

本実験で用いた精製トラスツズマブは、高度に精製されており、残留するHCP量は極めて微量(10 ppm未満)である。したがって、精製トラスツズマブの添加により観察されたHCP量の増加は、トラスツズマブの添加後に吸着したHCPが、トラスツズマブとともに回収されたものと考えられる。

以上の結果より、部分精製で残留するHCPを漏れなく回収するためには、目的物質である抗体医薬品に吸着するHCPに留意する必要があると考えられる。今後、トラスツズマブに吸着するHCPも含め、部分精製したHCPを回収するとともに、同定を進める予定である。

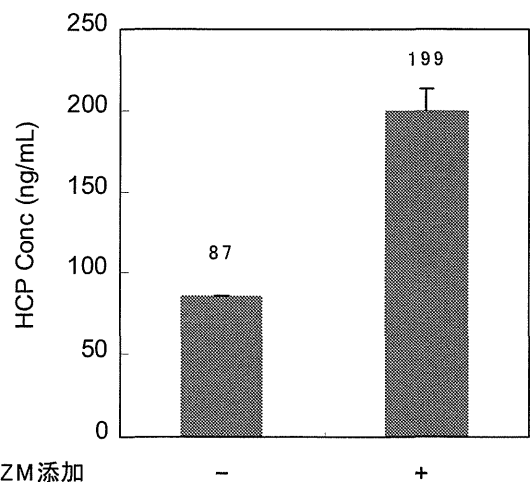


図7 トラスツズマブのスパイクによる残留HCP量の影響

D. 結 論

- 1) 抗体医薬品結合性ペプチドアフィニティーカラムを用いることで、血中の抗体医薬品をグリコフォームの違いに関わらず高収率且つ特異的に回収することができることが確認され、グリコフォームごとの体内動態解析手法としての応用が期待された。
- 2) プロテインAカラムクロマトグラフィー工程において、部分精製で残留HCPを回収する際には、目的物質である抗体医薬品に吸着するHCPに留意する必要がある。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryosuke Kuribayashi, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Nana Kawasaki: Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/ mass spectrometry with a column-switching system. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 67-68, 1-9 (2012)
- 2) Shiori Nakazawa, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Nana Kawasaki: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 420 (1), 61-7 (2012)

2. 学会発表

- 1) 栗林亮佑, 橋井則貴, 原園景, 川崎ナナ: カラムスイッチング法と液体クロマトグラフィー/

質量分析法を用いた抗体医薬品の不均一性迅速解析法. BMSシンポジウム (2012, 11, 19) 東京

- 2) 中澤志織, 橋井則貴, Joomi Ahn, 廣瀬賢治, 川崎ナナ: 水素/重水素交換質量分析によるヒトインスリンアナログの多量体安定性解析. BMSシンポジウム (2012, 11, 19) 東京
- 3) 川崎ナナ: バイオ医薬品の新しい品質管理戦略と展望. BMSシンポジウム (2012, 11, 19) 東京
- 4) 川崎ナナ: バイオ医薬品のFIH試験の課題. レギュラトリーサイエンス学会第1回学術大会シンポジウム. (2012, 9, 2-3) 東京
- 5) Hashii, N., Kuribayashi, R., Kawasaki, N.: Alteration of glycan profile during early-stage of mesenchymal stem cell differentiation. 19th International Mass Spectrometry Conference, (2012, 9, 15-21) Kyoto
- 6) Shiori Nakazawa, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki: Analysis of interaction between TNF-alpha and anti-TNF-alpha agents by hydrogen deuterium exchange/mass spectrometry. 19th International Mass Spectrometry Conference, (2012, 9, 15-21) Kyoto
- 7) Shiori Nakazawa, Joomi Ahn, Noritaka Hashii, Kenji Hirose, Nana Kawasaki: Local dynamics analysis of human insulin and a rapid-acting insulin analog by hydrogen deuterium exchange/mass spectrometry. ASMA

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成24年度分担研究報告書

ーバイオ医薬品の目的物質由来不純物が免疫原性に及ぼす作用に関する研究ー

研究分担者：新見 伸吾（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

研究要旨

バイオ医薬品の目的物質由来不純物である凝集体は免疫原性を誘導する可能性が問題となっている。そこで凝集体の形成、除去及び凝集体と免疫原性との関連について研究を行い以下の点を明らかにした。

①凝集体の生成機構は5種類に分けられる。②バイオ医薬品の製造から保存までには凝集体が形成されやすい様々な工程がある。③バイオ医薬品において凝集しやすい領域を*in silico*により予測することができる。④正常マウス、バイオ医薬品等のトランスジェニックマウスにおいて、バイオ医薬品の様々な物理的ストレスあるいは化学的処理により誘導された凝集体が免疫原性を誘導することが示されている。⑤T細胞のエピトープの予測法であるT細胞アッセイにより、バイオ医薬品の凝集体がT細胞の活性化を促進することが示されている。⑥ヒトにおいてバイオ医薬品に対する抗体が産生された例で、その原因として凝集体が推測されている。⑦バイオ医薬品の凝集体は精製工程により除去することが可能である。⑧バイオ医薬品の製剤設計において、適切なpH、緩衝液、イオン強度、賦形剤及び添加物を使用することにより凝集体の形成を抑制できる。⑨バイオ医薬品のコンフォメーション変化に基づき凝集体形成を予測することができる。

キーワード：バイオ医薬品、凝集体、免疫原性

A. 研究目的

これまでに多くのバイオ医薬品が医療の現場に提供され患者が恩恵を受けているが、有効性と安全性の観点から最も問題となっているのが免疫原性である。最近、バイオ医薬品の免疫原性の主なリスク因子として懸念されているものが目的物質由来不純物に分類される凝集体である。そこで、本研究においては、凝集体の生成機構、生成されやすい製造工程、生成されやすい領域の*in silico*による予測、免疫原性について作用機構も含め動物モデル、T細胞を用いたアッセイ、臨床において問題となった実例、精製工程における除去、生成を低減させるための製剤設計とその評価について明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

凝集体と免疫原性に関する文献及び海外のコンファレンスの資料等を基に調査及び研究を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 凝集体

バイオ医薬品の凝集体は以下に述べる様々な知見から免疫原性の原因となる可能性が高いことが明らかになっている。凝集体はその繰り返し配列がウイルス粒子のように直接B細胞に認識され、T細胞非依存的に免疫原性を増加させる可能性が示されていた。最近では、T細胞依存的な機構を介する可能性を示す知見が増加している。

凝集体はその粒子径によりsubmicron (0.1～1 μm)、

subvisible (1~100 μm)、visible ($\geq 100\mu\text{m}$) に大きく分けられる。日本薬局方の注射剤の不溶性微粒子試験では、10 μm 及び25 μm 以上の凝集体については限度試験が設定されている。また、通常原薬及び製剤においてsize exclusion chromatography、SECによる試験が設定されている。しかしながら、SECの排除限界は約40nmであり、それ以上の凝集体の測定は困難である。したがって、約40nmから10 μm の凝集体については事実上規定されていないことになる。下記に示すようにこの範囲の大きさの凝集体が免疫原性を起こす知見が増大している。したがって、現状では凝集体が免疫原性に及ぼすリスクを適切には評価できていないことになり、その対処が世界的な検討課題となっている。

1.1 凝集体の生成機構

凝集体は以下の5種類の機構を介して生成される¹⁾。

1番目は、タンパク質はnativeな構造をとっているが、可逆的に会合する傾向が強く、粘着部位あるいは構造的に相補的な部位を介してオリゴマーを形成する場合である。最終的にジスルフィド結合のような共有結合を介してより大きなオリゴマーに非可逆的に変換される場合がある。

2番目は、タンパク質は可逆的に会合する傾向は低く、一過性にコンフォメーション変化あるいはアンフォールディングの状態になると、オリゴマーが形成される場合である。最終的により大きなオリゴマーに不可逆的に変換される。この機構は熱及びせん断により促進される。

3番目は、メチオニンの酸化、脱アミド化、タンパク質分解により化学的にタンパク質が改変され、その結果、粘着面の形成、あるいは単量体の電気反発の低下により、凝集体が形成される場合である。

4番目は、単量体はオリゴマーを形成しにくい、凝集体そのものあるいは混入物が臨界核として作用しその表面に単量体が付加し、多くの場合形態変化を起こし、肉眼で観察できるあるいは沈殿するほど大きなオリゴマーが形成される場合である。混入物としては製造工程のチューブあるいは製剤バイアルから遊離したシリコン粒子、バイアルの充填に用い

たピストンポンプに用いた鉄粒子、シリンジの潤滑剤が含まれる。

5番目は、タンパク質が空気及び容器との接触による疎水的な相互作用または静電的な相互作用によりアンフォールディングし、単量体が凝集する。攪拌及び振とうにより促進されるが、攪拌の場合は泡の発生によるラジカルの形成、攪拌子との相互作用、またせん断も加わる。

1.2 バイオ医薬品の製造から保存までの工程で凝集体が生成されやすい工程

凝集体は部分的あるいは一過性のアンフォールディングにより起こる疎水性領域の分子間相互作用により主に形成される²⁻⁴⁾。高い温度でのインキュベーション、疎水性表面の接触、極端なpHへの曝露、タンパク質のアンフォールディングの誘導及びタンパク質間の相互作用を促進するせん断力への曝露が凝集体の量を増加させる可能性がある¹⁾。

1.2.1 抗体医薬品

10g/Lのように高濃度で抗体医薬品を産生すると、小胞体に存在しフォールディングに関与する分子シャペロンに対するバイオ医薬品の割合が過剰になり、フォールディングされていない組換えタンパク質が生じる。その結果、フォールディングされないバイオ医薬品から凝集体の形成が誘導され、その割合は最大約30%に達する場合がある⁵⁾。

抗体医薬品の主な精製工程であるプロテインAクロマトグラフィーにおける酸性での溶出工程では以下のように凝集体が形成されやすい⁶⁾。モノクローナルマウスIgG及びモノクローナルキメラIgGでは、低pHで不安定になると共に疎水性表面の曝露が増大しネイティブとは異なる構造をとる⁷⁻¹⁰⁾。低pHにより誘導される立体構造の変化はpHを中性に戻しても部分的にしか元に戻らない¹⁰⁻¹²⁾。低pHでインキュベーションした抗体及び低pHでインキュベーション後中性に戻した抗体は凝集体を形成しやすい^{7-9、13)}。pH 3及び4で37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 3で4 $^{\circ}\text{C}$ において二つのマウスモノクローナル抗体をインキュベーションすると、不溶性の凝集体が形成される¹³⁾。室温pH2.5でインキュベーション後、pHを中性に戻すとヒト化モノクローナル抗体で顕著に凝集体の量が増

加する¹⁴⁾。他方、4℃pH2.7及び3.5で組換えヒト化IgG₄をインキュベーションしても凝集体の顕著な増加が起きない場合もあるが¹⁵⁾、一般的に、抗体医薬品は低pHで凝集体が形成されやすい。

その他に様々な種類のモノクローナル抗体で、凍結乾燥¹⁶⁾、凍結/融解¹⁷⁾、振とう、攪拌¹⁷⁻²¹⁾により凝集体が増加することが報告されている。

1.2.2 その他のバイオ医薬品

第Ⅷ因子、成長ホルモン、インスリンを含む多くのバイオ医薬品は、振動あるいはせん断により容易に凝集する²²⁻²⁹⁾。最近の報告によると、アバタセプトのシリンジを25℃で保存すると、凝集の生成は、親水性の高いBD-42コートしたシリンジよりも疎水性の高いシリコンコートしたシリンジのほうが多い³⁰⁾。

1.3 *In silico*による凝集しやすい領域の予測

タンパク質のミスフォールディング及び凝集はアルツハイマー及びパーキンソン病のような様々な神経変性病の原因である³¹⁻³³⁾。これらの疾患の顕著な特徴は繊維状アミロイド沈着の形成である。幅広い研究によりこの病態を形成する配列モチーフが同定された。コンピューターの手法が開発され、タンパク質配列を解析し凝集しやすさを予測できるようになった。二つの配列に基づいた手法がTANGO³⁴⁾とPAGE³⁵⁾である。

1.3.1 TANGO

TANGOは α -ヘリックス、 β -ストランド、ランダムコイル、 β -凝集体のような異なったコンフォメーション状態に存在する配列部分の相対確率に基づいて凝集しやすさを予測する³⁶⁾。本法で予測された179個のペプチドのうち67個が β -凝集体を形成することが知られている。また、真陽性と真陰性を合計した数の91%が正確である。抗体のVL3 λ 鎖のFR2/L2領域においてTANGOにより予測された凝集しやすい領域の破壊により溶解性が改善された。また、IgG1モノクローナル抗体においてL305K変異は凝集体の生成を低下させた³⁷⁾。

1.3.2 PAGE

PAGEは芳香族性、 β -ストランドの形成しやすさ、荷電、溶解性、平均の極性/非極性の近づきやすい各残基の表面積に基づいて凝集しやすさと速度を予

測する³⁶⁾。本法では、16種類のタンパク質からの90以上のデータで凝集体の予測と実験結果が95%相関する。凝集しやすいことが強く予測された多くのタンパク質の領域でも凝集が実験的に示されている。

1.3.3 PAGE及びTANGOによる抗体医薬品及びIFN- β における凝集しやすい領域の予測

市販の21種類の抗体医薬品の可変領域において凝集しやすい領域が予測された³⁸⁾。可変領域における凝集しやすい領域は主にCDRのループに位置する。凝集しやすい領域のほとんどは疎水性あるいは芳香族残基リッチである。セリン及びスレオニンを含むヒドロキシル基を含む残基も凝集しやすい領域に見つかっている。軽鎖のCDR3の領域で見つかった凝集しやすい領域はグルタミン/アスパラギンリッチである。このような疎水性あるいは芳香族残基はプリオンあるいはアミロイドタンパク質の凝集に関与している。IFN- β において凝集しやすい領域が3箇所予測されており、これらの領域はT細胞エピートープあるいは生物活性に関与する領域と重なっている³⁶⁾。

1.4 凝集体が免疫原性に及ぼす影響

凝集体が免疫原性に及ぼす作用については、正常マウス、バイオ医薬品等のトランスジェニックマウス、T細胞アッセイにより検討が行なわれている。なお、T細胞を用いたアッセイとは、ヒト由来の抗原提示細胞とT細胞存在下において、バイオ医薬品あるいはそのペプチドを添加し、増殖あるいはサイトカインの遊離等のT細胞の反応を測定し免疫原性を予測する方法である。以下に、IFN- α 、IFN- β 、エポエチン、抗体医薬品に関する比較的最近の検討結果について述べる。

1.4.1 IFN- β トランスジェニックマウスを用いた検討

IFN- β トランスジェニックマウスでは様々な方法で作成したIFN- β 1aの凝集体を投与し、抗体産生に及ぼす検討がなされている。

抗体産生の誘導に用いたIFN- β 1aは、バルクIFN- β 1a、バルクをろ過後透析し安定化剤を加えて再処方し凝集体を低下させたIFN- β 1a、バルクIFN- β 1aに1M NaClを加えてpH2.1でストレス処理した後可

溶性の凝集体をSECに分画したものである³⁹⁾。バルクIFN- β 1aには二量体から数 μm の粒子径までの非共有結合及び共有結合のインタクトなエピトープを有する凝集体を約31%含んでいた。再処方したIFN- β 1aには二量体の共有結合の凝集体が13%含まれていた。ストレス処理したサンプルには二量体から数ミクロンまでのインタクトなエピトープを含まない凝集体が81%含まれていた。これらのIFN- β を用いて抗体産生を測定した結果、抗体の出現頻度は、バルクのIFN- β 1aで40%、再処方したIFN- β 1aで0%、ストレス処理したIFN- β 1aでは30%であった。この結果から、数 μm の粒子径の凝集体が抗体を産生しやすく、インタクトなエピトープの有無は影響を及ぼさないことが示唆された。さらに、二量体の凝集体は抗体を産生しにくいことが示唆された。

酸化及びグアニジン処理することにより凝集体を形成させたIFN- β 1aで検討が行なわれている⁴⁰⁾。金属あるいは過酸化水素による酸化、グアニジン処理したIFN- β 1aにおいてRP-HPLCにより検出可能な凝集体は、それぞれ0%、0%、62%であった。一方、金属による酸化、過酸化水素による酸化、グアニジン処理したIFN- β 1aにおいてRP-HPLCにより回収されなかった凝集体は、98%、37%、31%であった。そのうち共有結合を介して形成された凝集体は、金属の酸化によるものであり、その他は非共有結合を介して形成されたものであった。これらのIFN- β 1aを用いて抗体産生を測定した結果、抗体の出現頻度は、金属による酸化で100%、過酸化水素による酸化で90%、グアニジン処理で20%であった。これらの結果から、酸化により生成した凝集体は抗体を産生しやすく、共有結合の有無は影響を及ぼさないことが示された。グアニジン処理では2次微分分光法で芳香族アミノ酸の微小環境が疎水性に変化していた。したがって、変性によりエピトープが認識されにくかったため、抗体産生が低かった可能性が考えられる。

IFN- β 1aを吸着させたガラス（粒子径1.1 μm ）、ポリスチレン（粒子径209nm）あるいは金属（粒子径14 μm ）で、抗体産生が検討されている⁴¹⁾。この場合、ガラス、ポリスチレンあるいは金属に吸着された

IFN- β 1aの割合は、それぞれ78%、71%、46%であった。これらのIFN- β 1aを吸着させた粒子における抗体出現頻度は、ガラス、金属、ポリスチレンでそれぞれ、40%、90%、40%であった。本結果から、粒子径約200nm以上の凝集体は、抗体を産生しやすく、粒子径14 μm ではさらに高いことが示された。

抗CD4抗体によりT細胞の機能を低下させたマウスでは、T細胞が正常なマウスに比べて、凝集体を含むIFN- β 1aにより産生された抗体のタイターが約1/10に低下した⁴²⁾。したがって、凝集体は主にT細胞依存的に抗体産生を誘導することが示された。

1.4.2 IFN- α トランスジェニックマウスを用いた検討

一方、IFN- α トランスジェニックマウスでも様々な方法で作成したIFN- α 2bの凝集体を投与し、抗体産生の誘導に及ぼす検討がなされている。

金属による酸化、グルタルアルデヒドによる架橋、100 $^{\circ}\text{C}$ 処理により形成されたIFN- α 2bの凝集体で検討が行なわれた⁴³⁾。金属による酸化で生成された凝集体は、二量体が16%、三量体が6%、それ以上の大きさのSECで検出可能なオリゴマーは17%、不溶性画分が19%であった。グルタルアルデヒドによる架橋により生成された凝集体は、二量体が20%、三量体が15%、それ以上の大きさのSECで検出可能なオリゴマーは33%、不溶性画分は5%であった。100 $^{\circ}\text{C}$ 処理により形成された凝集体は全て不溶性画分であった。変性の程度は100 $^{\circ}\text{C}$ 処理により形成された凝集体が最も顕著であり、グルタルアルデヒドによる架橋、100 $^{\circ}\text{C}$ 処理により形成された凝集体でエピトープの消失が顕著であった。これらのIFN- α 2bにおける抗体の出現頻度は、金属による酸化で80%であり、その他の処理では検出されなかった。IFN- β 1aの結果と一致して酸化により生成された凝集体は抗体を産生しやすいことが示された。グルタルアルデヒドによる架橋、100 $^{\circ}\text{C}$ 処理により形成された凝集体で抗体が産生されなかったのは、エピトープの消失が顕著だったためかもしれない。

pH4.0、7.2、9.0での50 $^{\circ}\text{C}$ におけるインキュベーション及びポジティブコントロールとして酸化により形成されたIFN- α 2bの凝集体は、それぞれ86%、49%、

98%、34%であり、いずれもSECでは回収されなかった⁴⁴⁾。これらのIFN- α 2b製剤における抗体の出現頻度は、pH4.0で80%、pH7.2で100%、pH9.0で40%、酸化で100%であり、抗体価は酸化によるものが他より約500倍高かった。本検討においては温度及びpHにより誘導されたIFN- α 2bのアンフォールディングによる凝集体の生成が抗体産生に関与していると思われる。蛍光色素の結合により調べたコンフォメーションの変化は、pH4.0及びpH9.0がpH7.2に比べて大きかった。ELISAにより測定したnativeなエピトープの割合は、pH4.0で41%、pH7.0で90%、pH9.0で1.4%であった。したがって、コンフォメーションの変化を受けにくくnativeなエピトープを多く含む凝集体において抗体産生が高いことが示された。

1.4.3 野生型マウスを用いた凝集体生成の低減化が抗体産生に関する検討

IFN- β で2種類の手法による凝集体生成の低減化が抗体産生に及ぼす影響について野生型マウスを用いて検討が行なわれている。

5分間ボルテックスをかけることにより生成されたマウスIFN- β の凝集体は、7%が可溶性、53%が不溶性であった⁴⁵⁾。不溶性の凝集体を分取し25°Cで16時間2000バールの静水圧を加えると単量体に変換された。マウスIFN- β について単量体と本品、ボルテックスにより作成した凝集体で抗体価を比較すると、ボルテックスにより作成した凝集体で2.1倍増加し、本品で0.4倍に低下した。

n-Dodecyl- β -D-Maltose (DDM) が凝集体の生成及びそれに伴う抗体産生に及ぼす影響が検討されている⁴⁶⁾。DDMは非イオン性のアルキルサッカリドの界面活性剤であり、凝集に対してバイオ医薬品を安定化させ、凍結乾燥後及びその後の製剤化において安定性を増加させる⁴⁷⁾。DDMは非毒性、非変異原性、非刺激性で⁴⁷⁾ 投与後糖と脂肪酸に代謝される⁴⁸⁾。IFN- β 1bをDDM存在下及び非存在下で37°C20日間振とうした。500nmにおける濁度に基づいて凝集体を測定した結果、DDM非存在下では凝集体の生成が約13倍増加したのに対し、存在下では6倍しか増加しなかった。静注及び皮下注で抗体価を比較すると、DDM未処理のIFN- β 1bに比べDDM処理したIFN- β 1b

では約20%に低下した。

これらの凝集体の低減化に向けた手法のうち、DDMは製剤設計に、高い静水圧は精製工程及び原薬調製の前段階として今後有用となるかもしれない。

1.4.4 T細胞及アッセイ及びヒトIgGトランスジェニックマウスを用いた検討

T細胞アッセイ及びヒトIgGトランスジェニックマウスを用いてヒト抗体の凝集体が免疫原性に及ぼす影響について検討されている。

Amgen社がT細胞アッセイ及びヒトIgGトランスジェニックマウスを用いてヒト抗体の凝集体が免疫原性に及ぼす影響について検討を行なっている^{49, 50)}。精製した3種類のヒトIgG2モノクローナル抗体を攪拌、シリンジでのポンピング、65°C 1時間の熱処理、ポリスチレンビーズ (粒子径 5 μ m) への吸着により凝集体が生成された。全ての抗体で20時間の攪拌が各種免疫促進性サイトカインの遊離を指標としたT細胞の反応性が最も高かった。T細胞反応性は、2種類の抗体において、3日間の攪拌、65°C 1時間の熱処理、シリンジにおけるポンピングでは同じであり、1種類の抗体において3日間の攪拌が高く、続いて65°C 1時間の熱処理、シリンジにおけるポンピングの順番であった。1種類の抗体で、ポリスチレンビーズ (粒子径 5 μ m) への吸着により生成された凝集体で検討が行なわれ、20時間の攪拌よりT細胞の反応性は高かった。凝集体の特性解析の結果とT細胞の反応性を比較すると、T細胞の反応性は2~10 μ mの粒子径を有する凝集体の相対含量及び部分的にフォールディングされている二次構造の含量 (約30~40%) と相関した。各種Fc γ 受容体及びTLRに対する抗体を用いた解析により、凝集体によるT細胞の反応の促進には、Fc γ RIII、TLR-2、TLR-4が関与していることが示された。また、C3bの不活化により、凝集体によるT細胞の反応性が低下することから、C3bの関与も示された。凝集体は単球におけるHLA-DR及びCD80の発現を増加させることから抗原提示細胞の成熟化に関与していることが示された。ヒトIgGトランスジェニックマウスを用いた検討では単量体のヒトIgGに比べて1日の攪拌により凝集体を生成されたヒトIgGでは、産生され抗体

のタイターが約10倍増加した。

Antitope社も同様に抗体及びインスリンの凝集体が免疫原性に及ぼす作用についてT細胞アッセイを用いて解析を行なっている⁵¹⁾。IgG1について凍結融解を5回行なうかあるいは振とう（500rpmで1日）により凝集体を形成させると増殖及びIL-2の遊離の全体的な評価によるT細胞刺激はそれぞれ4倍及び2倍増加した。インスリンをグルタルアルデヒド処理するかあるいは熱処理により凝集体を形成させると増殖及びIL-2の遊離の全体的な評価によるT細胞刺激はそれぞれ8倍及び2倍増加した。キラーT細胞をアッセイではIgG1において7種類のサイトカインの遊離は金属による酸化あるいは振とうにより最も増加し、その次が熱処理であり、凍結融解ではほとんど増加がみられなかった。IgG1の凝集体が樹状細胞の活性化に及ぼす影響をCD80、CD40、CD86の発現、IL-1b、IL-12、IL-6の遊離により調べた結果、振とうにより形成された凝集体が最も誘導し、その次が熱処理及び凍結融解により形成された凝集体であり両者による誘導レベルはほぼ同じであった。また、振とうあるいは金属による酸化により形成されたIgG1の凝集体は樹状細胞への取りこみが増加した。これらの結果は先のAmgen社の結果とほぼ同じであり、凝集体が免疫原性を増加させる可能性を示すものである。

1.4.5 ヒトにおいてバイオ医薬品の凝集体が免疫原性を起こす可能性を示す例

各種文献等に基づき、IFN製剤について凝集体の含量と患者における抗体産生の関係について考察する。

酸化体の含量の異なったIFN- α 2a製剤が投与された患者の抗体価の平均は、酸化体含量の高いIFN- α 2a製剤で顕著に高い^{52, 53)}。しかし、IFN- α 2a製剤で凝集体の生成が起きない酸化体では、IFN- α トランスジェニックマウスで免疫原性の増加は見られない⁴³⁾。したがって、上記のIFN- α 2a製剤の場合でも酸化体そのものではなく酸化に伴い形成された凝集体が免疫原性を増加しているものと考えられる。凝集体生成の原因として、賦形剤として添加されたヒト血清アルブミン（human serum albumin、HSA）と

IFN- α 2aの複合体形成の可能性が示されている⁵⁴⁾。

同様な可能性がHSAを賦形剤として含むIFN- β 製剤でも以下のように示されている。ウエスタンブロットによる解析において、HSAを含むIFN- β 製剤ほど特に高分子に凝集体が観察される⁵⁵⁾。IFN- β 1a製剤であるRebifにおいて賦形剤がD-マンニトール及びHSAからRNF1（ポロキサマー188及びリシン）あるいはRNF2（D-マンニトール、ベンジルアルコール、L-メチオニンおよびポロキサマー188）に変更された⁵⁶⁾。その結果、臨床第Ⅲ相試験における24週及び48週での患者における中和抗体陽性率は旧処方では24.4%であったのに対し新処方では2.5%であった⁵⁷⁾。また、48週での1000 NU/mL以上の中和抗体陽性率は、旧処方では19.5%、新処方では11.1%であった。

同じ皮下投与で賦形剤としてHSAを含むIFN- β 1a製剤であるBetaferonとHSAを含まないRebifで臨床試験及びIFN- β トランスジェニックマウスで結合抗体及び中和抗体陽性率が比較された³⁹⁾。なお、Betaferonには600 kDa以上の高分子物質が60%含まれている⁵⁸⁾。臨床試験において結合抗体陽性患者の割合は、Betaferonで81~97%、Rebifで25~89%であった。また、中和抗体の割合は、Betaferonで28~47%、Rebifで5~38%であった。IFN- β トランスジェニックマウスにおける結合抗体は、Betaferonで100%、Rebifで0%であった。なお、どちらも中和抗体は形成されなかった。なお、Betaferonについては大腸菌で産生させるため、安定性及び免疫原性の低下に関与する可能性のある糖鎖が欠損していること、ヒトのIFN- β と比較して17位のセリンのシステインへの置換及びN末端のメチオニンの欠損によりアミノ酸配列が異なることから、抗体産生が高い可能性も否定できない。

バイオシミラーエポエチン（HX575）の臨床試験において中和抗体が2例報告された⁵⁹⁾。その臨床試験に用いられた二つの製剤の少数のシリンジに高レベルの凝集体が含まれていた⁶⁰⁾。その製剤からシリンジの製造に用いるピンに由来するタングステンが見つかった。タングステンを製剤に意図的に混入させると、凝集体が形成された。従って、シリンジに混入したタングステンを核として凝集体が形成され、

それにより中和抗体が産生された可能性が示された。

特にIFN- β で免疫原性が高い理由については不明の点が多いが、免疫細胞を活性化する性質を有していること、*in silico*の予測方法により高い免疫原性スコアと凝集体が生成されやすい領域の存在が示唆されていることも原因かもしれない^{36, 61)}。

1.5 バイオ医薬品の原薬調製までの過程における凝集体の除去

凝集体は単量体と比べて荷電および疎水性のような物理化学的性状が異なる。したがって、各種クロマトグラフィーにおいて挙動は異なることが予想される。例えば、抗体医薬品の場合、陽イオン交換クロマトグラフィー及び疎水性相互作用クロマトグラフィーにおいて単量体と凝集体は不完全ながら分離可能である^{5, 62)}。したがって、収量は低下することができるだけ凝集体を含まない単量体の溶出画分を分取することにより凝集体を低減できる。CHO細胞で産生させた6種類のヒト型モノクローナル抗体の培養上清を、プロテインAクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーの連続した工程で精製した場合、SECにより測定した凝集体の単量体に対する割合は0.5~2.7%であった⁶³⁾。

さらに、動物細胞で産生させるバイオ医薬品には精製の最終段階としてウイルス除去フィルターが含まれる。通常ウイルス除去フィルターは孔径として15 nm、20 nmあるいは35 nmのものを用いる場合が多く⁶⁴⁾、それ以上の粒子径の凝集体は除去が可能と思われる。さらに原薬調製時に0.22あるいは0.45 μm の滅菌フィルターで滅菌ろ過する。したがって、上記のような精製及びろ過滅菌工程で凝集体の除去は可能と思われる。

1.6 凝集体の形成抑制に留意した製剤設計とその評価方法

バイオ医薬品の製剤における凝集体の形成は、適切な緩衝液、イオン強度、賦形剤等を選択することにより低下させることが可能と思われる。本稿ではこれらの因子が凝集体の形成抑制に及ぼす作用及び凝集体の形成をタンパク質のコンフォメーション変化により予測する方法について述べる。

1.6.1 製剤処方における凝集体形成の抑制因子

バイオ医薬品の製剤設計においては凝集体の形成が抑制されるように、様々な観点から配慮する必要がある。以下に、その中で特に重要と思われる、pH、緩衝液、イオン強度、賦形剤と添加物について述べる。

1.6.1.1 pH

溶液のpHはタンパク質の表面荷電のタイプと分布の変化を介して、分子内フォールディングだけでなくタンパク質の分子間相互作用に影響を与える。したがって、溶液のpHはタンパク質の凝集の速度を決定するうえで重要なパラメーターである。極端なpHではタンパク質は過剰に荷電する。タンパク質表面の高密度の荷電は分子内及び分子間の相互作用を増加させ、部分的にタンパク質がアンフォールディングし凝集する可能性がある。さらに、タンパク質は分散力などの分子間に働く引力と電気的な反発力に依存して凝集する可能性がある。理論的には、等電点付近ではタンパク質の荷電-荷電反発力が最小になるためタンパク質の溶解度は最も低くなる。一方、等電点付近でも方向性の異なる荷電が多量に存在するため⁶⁵⁾、多くのタンパク質において等電点における凝集は少ないという報告もある⁶⁶⁾。したがって、タンパク質の等電点と離れた溶液のpHを選択しても、タンパク質の凝集抑制にあまり有効でない場合もあるかもしれない。なお、抗体医薬品はpH5.0~5.5で凝集体の形成が低いようである^{67, 68)}。

1.6.1.2 緩衝液

緩衝液はpHを安定に維持するために用いられるが、その種類及び濃度が異なるとタンパク質の安定性及び凝集体の形成しやすさも異なる。

1.6.1.3 イオン強度

一般に、適当なイオン強度では、タンパク質の構造安定性は上昇する。これは、タンパク質を構成するアミノ酸の側鎖がもつ解離基とイオンが相互作用し、タンパク質内の静電的な反発力が低下することによる。一方、ある一定以上のイオン強度では逆に静電的な反発が低下しすぎることにより、タンパク質が不安定になると共に疎水性領域が表面に曝露され、タンパク質が凝集する可能性がある。しかし、

タンパク質の凝集とイオン強度との関係は単純なものではなく⁶⁹⁾、溶液のpH及びタンパク質に結合した糖鎖によっても影響を受ける^{70, 71)}。なお、特定の条件における抗体医薬品の凝集体形成は、陰イオンの大きさ及びイオン強度に依存して増加するようである^{68, 72)}。

1.6.1.4 賦形剤と添加物

賦形剤／添加物は主にタンパク質を選択的に水和させることにより安定化させる。他の安定化機構として、フォールディングしたタンパク質の割合の増加、溶媒の接近とコンフォメーションの流動性の低下、溶液の粘性の増加がある。また、添加物はタンパク質の凝集体の中間体との結合により小さな凝集体を安定化させる⁷³⁾。典型的な賦形剤／添加物として、糖、ポリオールのような低分子中性添加物、アミノ酸、アミン、ポリマー、界面活性剤、保存剤があげられる。

糖／ポリオールのような低分子の中性化合物はオスモライトあるいは化学シャペロンと呼ばれ、タンパク質の正確なコンフォメーションの維持及び凝集体形成の抑制に顕著な効果を持つ⁷⁴⁾。なお、オスモライトとはほとんどがイオンではないが水に良く溶ける化合物であり、その多くは中性アミノ酸である。これらの化合物の中には化学シャペロンのように挙動するものがある。特に、正に荷電したアミノ酸はタンパク質間の相互作用／会合を弱めタンパク質の凝集阻害に非常に効果的である。そのようなアミノ酸には、ヒスチジン、アルギニン、プロリン、ヒドロキシプロリン、グリシン、リシン等が含まれる。その凝集阻害効果の典型的な例がオマリズマブである^{75, 76)}。オマリズマブは緩衝液のみでは可逆的に会合しゲル状になっているため粘性が高く投与に長時間かかる。この緩衝液に150mM程度のアルギニンを加えると粘性が下がり、投与時間が短縮できた。

界面活性剤は例えば攪拌／せん断そして熱処理においてタンパク質の凝集を阻害する。この効果はタンパク質に弱く結合しタンパク質表面の凝集体を形成しやすい疎水性部位をブロックすることによる。

1.6.2 コンフォメーションの変化に基づく凝集体形成の予測

バイオ医薬品は、上記のような様々な因子の影響を考慮し、凝集体形成の抑制を含めたより安定な製剤設計が考案される。処方された剤形における凝集体の形成は、通常よりも高い保存温度でインキュベーションし直接的にあるいは間接的に評価する。直接的に凝集体を測定する場合は、凝集体の形成に約6ヶ月あるいはそれ以上の時間がかかる場合がある。一方、凝集体形成の原因となるコンフォメーション変化は比較的短期間で起こりやすいため、凝集体を直接測定する場合に比べて短期間で評価が可能であり、高感度で測定できる。

コンフォメーション変化の評価方法としては、Thioflavin Tあるいは1-anilino-8-naphthalenesulfateのような蛍光色素と疎水性領域との結合に伴う蛍光強度の増加⁷⁷⁻⁷⁹⁾、蛍光法を用いたトリプトファン⁷⁹⁻⁸¹⁾の極大吸収の高波長側へのシフト⁷⁹⁻⁸¹⁾、CDスペクトラム^{79, 82)}、示差走査型カロリメーター^{80, 81, 83)}等がある。示差走査型カロリメーターとは、温度を一定速度で変化させた時に、タンパク質の変性に伴う微小な熱変化を測定する方法である。

D. 結論

バイオ医薬品の凝集体が免疫原性に及ぼす影響は全体的から個別的に評価されるようになってきていると思われる。

凝集体については、日本薬局方の注射剤の不溶性微粒子試験及び通常原薬及び製剤においてSECによる試験で測定されない約40nmから10 μ mの粒子径の凝集体が、IFN- α 及び β のトランスジェニックマウス及びT細胞アッセイにおいて特に免疫原性を誘導することが示されている。この範囲の粒子径の凝集体はこれまでは問題とされていなかったが、今後も考慮しなくても良いとはならないと思われる。FDAも免疫原性のリスク評価のため、この範囲の粒子径の凝集体の測定をmandateではないが強くrecommendしており⁸⁴⁾、筆者も同じ考えである。患者において凝集体の抗体産生への関与が示唆されているバイオ医薬品の例は少ない。これは逆に凝集体の含量が低

いバイオ医薬品が提供されていることを示唆しているのかもしれない。しかし、特に、抗体医薬品の場合は凝集体を形成しやすい領域が予測されており、何らかのストレスにより凝集体を形成する可能性は考慮する必要がある。

今後、凝集体の形成を抑制する戦略及び免疫原性と凝集体との関連についての個別の研究がさらに進み、リスクに対する理解とそれに基づく適切な評価により、リスクの低減が図られることを期待する。

E. 参考文献

- 1) J. S. Philo and T. Arakawa Mechanisms of protein aggregation. *Curr Pharm Biotechnol*, **10**. 348-51 (2009)
- 2) K. W. Minton P. Karmin *et al.* Nonspecific stabilization of stress-susceptible proteins by stress-resistant proteins: a model for the biological role of heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**. 7107-11 (1982)
- 3) B. S. Kendrick J. F. Carpenter *et al.* A transient expansion of the native state precedes aggregation of recombinant human interferon-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**. 14142-6 (1998)
- 4) J. F. Carpenter B. S. Kendrick *et al.* Inhibition of stress-induced aggregation of protein therapeutics. *Methods Enzymol*, **309**. 236-55 (1999)
- 5) J. F. Kramarczyk B. D. Kelley *et al.* High-throughput screening of chromatographic separations: II. Hydrophobic interaction. *Biotechnol Bioeng*, **100**. 707-20 (2008)
- 6) A. A. Shukla B. Hubbard *et al.* Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **848**. 28-39 (2007)
- 7) W. Jiskoot M. Bloemendal *et al.* Non-random conformation of a mouse IgG2a monoclonal antibody at low pH. *Eur J Biochem*, **201**. 223-32 (1991)
- 8) J. Buchner M. Renner *et al.* Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry*, **30**. 6922-9 (1991)
- 9) K. Welfle R. Misselwitz *et al.* Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody CB4-1 and its Fab and Fc fragments. *Biochim Biophys Acta*, **1431**. 120-31 (1999)
- 10) M. Kats P. C. Richberg *et al.* pH-dependent isoform transitions of a monoclonal antibody monitored by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal Chem*, **69**. 338-43 (1997)
- 11) S. P. Martsev Z. I. Kravchuk *et al.* Large increase in thermal stability of the CH2 domain of rabbit IgG after acid treatment as evidenced by differential scanning calorimetry. *Immunol Lett*, **43**. 149-52 (1994)
- 12) S. P. Martsev Z. I. Kravchuk *et al.* Thermodynamic and functional characterization of a stable IgG conformer obtained by renaturation from a partially structured low pH-induced state. *FEBS Lett*, **361**. 173-5 (1995)
- 13) W. Jiskoot E. C. Beuvery *et al.* Analytical approaches to the study of monoclonal antibody stability. *Pharm Res*, **7**. 1234-41 (1990)
- 14) J. P. Gabrielson M. L. Brader *et al.* Quantitation of aggregate levels in a recombinant humanized monoclonal antibody formulation by size-exclusion chromatography, asymmetrical flow field flow fractionation, and sedimentation velocity. *J Pharm Sci*, **96**. 268-79 (2007)
- 15) D. Ejima K. Tsumoto *et al.* Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins*, **66**. 954-62 (2007)
- 16) J. L. Cleland X. Lam *et al.* A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *J Pharm Sci*, **90**. 310-21 (2001)
- 17) M. Paborji N. L. Pochopin *et al.* Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse-human monoclonal antibody. *Pharm Res*, **11**. 764-71 (1994)
- 18) H. C. Mahler R. Muller *et al.* Induction and analysis

- of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *Eur J Pharm Biopharm*, **59**. 407-17 (2005)
- 19) J. G. Biddlecombe G. Smith *et al.* Factors influencing antibody stability at solid-liquid interfaces in a high shear environment. *Biotechnol Prog*, **25**. 1499-507 (2009)
 - 20) A. Lahlou B. Blanchet *et al.* Mechanically-induced aggregation of the monoclonal antibody cetuximab. *Ann Pharm Fr*, **67**. 340-52 (2009)
 - 21) S. Kiese A. Pappenger *et al.* Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody. *J Pharm Sci*, **97**. 4347-66 (2008)
 - 22) B. Sharma Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 2: impact of container closures. *Biotechnol Adv*, **25**. 318-24 (2007)
 - 23) S. Frokjaer and D. E. Otzen Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov*, **4**. 298-306 (2005)
 - 24) L. Kreilgaard L. S. Jones *et al.* Effect of Tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII. *J Pharm Sci*, **87**. 1597-603 (1998)
 - 25) M. Katakam L. N. Bell *et al.* Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone. *J Pharm Sci*, **84**. 713-6 (1995)
 - 26) M. Katakam and A. K. Banga Use of poloxamer polymers to stabilize recombinant human growth hormone against various processing stresses. *Pharm Dev Technol*, **2**. 143-9 (1997)
 - 27) N. B. Bam J. L. Cleland *et al.* Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *J Pharm Sci*, **87**. 1554-9 (1998)
 - 28) J. Brange L. Andersen *et al.* Toward understanding insulin fibrillation. *J Pharm Sci*, **86**. 517-25 (1997)
 - 29) Y. M. Kwon M. Baudys *et al.* In situ study of insulin aggregation induced by water-organic solvent interface. *Pharm Res*, **18**. 1754-9 (2001)
 - 30) S. Majumdar B. M. Ford *et al.* Evaluation of the effect of syringe surfaces on protein formulations. *J Pharm Sci*, **100**. 2563-73 (2011)
 - 31) J. W. Kelly Attacking amyloid. *N Engl J Med*, **352**. 722-3 (2005)
 - 32) J. D. Sipe and A. S. Cohen Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol*, **130**. 88-98 (2000)
 - 33) J. W. Kelly Amyloid fibril formation and protein misassembly: a structural quest for insights into amyloid and prion diseases. *Structure*, **5**. 595-600 (1997)
 - 34) A. M. Fernandez-Escamilla F. Rousseau *et al.* Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol*, **22**. 1302-6 (2004)
 - 35) G. G. Tartaglia A. Cavalli *et al.* Prediction of aggregation rate and aggregation-prone segments in polypeptide sequences. *Protein Sci*, **14**. 2723-34 (2005)
 - 36) S. Kumar, "Aggregation-immunogenicity coupling: Implications for design of biotherapeutics" Immunogenicity Summit 2011
 - 37) N. Chennamsetty V. Voynov *et al.* Design of therapeutic proteins with enhanced stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**. 11937-42 (2009)
 - 38) X. Wang T. K. Das *et al.* Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. *MABs*, **1**. 254-67 (2009)
 - 39) M. M. van Beer, "Impact of Aggregates on Immunogenicity in Immune Tolerant Mice" Immunogenicity Summit 2011
 - 40) M. M. van Beers M. Sauerborn *et al.* Oxidized and aggregated recombinant human interferon beta is immunogenic in human interferon beta transgenic mice. *Pharm Res*, **28**. 2393-402 (2011)
 - 41) M. M. Van Beers F. Gilli *et al.* Immunogenicity of recombinant human interferon beta interacting with particles of glass, metal, and polystyrene. *J Pharm Sci*, **101**. 187-99 (2012)
 - 42) W. Jiskoot, "On the Role of Aggregates and Particles in Protein Immunogenicity"

- Immunogenicity part of the Eight PEGS Summit. 2012
- 43) S. Hermeling L. Aranha *et al.* Structural characterization and immunogenicity in wild-type and immune tolerant mice of degraded recombinant human interferon alpha2b. *Pharm Res*, **22**. 1997-2006 (2005)
 - 44) S. Hermeling H. Schellekens *et al.* Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation. *J Pharm Sci*, **95**. 1084-96 (2006)
 - 45) M. B. Seefeldt M. S. Rosendahl *et al.* Application of high hydrostatic pressure to dissociate aggregates and refold proteins. *Curr Pharm Biotechnol*, **10**. 447-55 (2009)
 - 46) R. A. Rifkin E. T. Maggio *et al.* n-Dodecyl-beta-D-maltoside inhibits aggregation of human interferon-beta-1b and reduces its immunogenicity. *J Neuroimmune Pharmacol*, **6**. 158-62 (2011)
 - 47) E. T. Maggio Stabilizing alkylglycosides compositions and methods thereof. US Patent 7,522,542, 16 Sept 2008
 - 48) N. Weber and H. Benning Metabolism of orally administered alkyl beta-glycosides in the mouse. *J Nutr*, **114**. 247-54 (1984)
 - 49) M. K. Joubert M. Hokom *et al.* Highly Aggregated Antibody Therapeutics Can Enhance the *in Vitro* Innate and Late-stage T-cell Immune Responses. *J Biol Chem*, **287**. 25266-79 (2012)
 - 50) V. Jawa, "Aggregates of Monoclonal Antibody-Based Biotherapeutics are Associated with Enhanced Innate and T-Cell Response" Aggregates and Stability part of the Eight Annual PEGS Summit 2012
 - 51) M. Baker, "Aggregates, Epitopes and Immunogenicity: Innate and Adaptive Immune Response to Protein Therapeutics" Immunogenicity part of the Eight Annual PEGS Summit 2012
 - 52) E. Hochuli Interferon immunogenicity: technical evaluation of interferon-alpha 2a. *J Interferon Cytokine Res*, **17 Suppl 1**. S15-21 (1997)
 - 53) J. C. Ryff Clinical investigation of the immunogenicity of interferon-alpha 2a. *J Interferon Cytokine Res*, **17 Suppl 1**. S29-33 (1997)
 - 54) A. Braun L. Kwee *et al.* Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. *Pharm Res*, **14**. 1472-8 (1997)
 - 55) R. Thorpe, "Unwanted immunogenicity of biosimilars and non-innovator biologicals" Immunogenicity Summit 2011
 - 56) A. Jaber and M. Baker Assessment of the immunogenicity of different interferon beta-1a formulations using *ex vivo* T-cell assays. *J Pharm Biomed Anal*, **43**. 1256-61 (2007)
 - 57) G. Giovannoni O. Barbarash *et al.* Immunogenicity and tolerability of an investigational formulation of interferon-beta1a: 24- and 48-week interim analyses of a 2-year, single-arm, historically controlled, phase IIIb study in adults with multiple sclerosis. *Clin Ther*, **29**. 1128-45 (2007)
 - 58) L. Runkel W. Meier *et al.* Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res*, **15**. 641-9 (1998)
 - 59) M. Haag-Weber K. U. Eckardt *et al.* Safety, immunogenicity and efficacy of subcutaneous biosimilar epoetin-alpha (HX575) in non-dialysis patients with renal anemia: a multi-center, randomized, double-blind study. *Clin Nephrol*, **77**. 8-17 (2012)
 - 60) J. den Engelsman P. Garidel *et al.* Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res*, **28**. 920-33 (2012)
 - 61) A. S. De Groot and L. Moise Prediction of

- immunogenicity for therapeutic proteins: state of the art. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **10**. 332-40 (2007)
- 62) Y. Yigzaw P. Hinckley *et al.* Ion exchange chromatography of proteins and clearance of aggregates. *Curr Pharm Biotechnol*, **10**. 421-6 (2009)
- 63) T. Ishihara and T. Kadoya Accelerated purification process development of monoclonal antibodies for shortening time to clinic. Design and case study of chromatography processes. *J Chromatogr A*, **1176**. 149-56 (2007)
- 64) H. F. Liu J. Ma *et al.* Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs*, **2**. 480-99 (2010)
- 65) K. Giger R. P. Vanam *et al.* Suppression of insulin aggregation by heparin. *Biomacromolecules*, **9**. 2338-44 (2008)
- 66) P. R. Majhi R. R. Ganta *et al.* Electrostatically driven protein aggregation: beta-lactoglobulin at low ionic strength. *Langmuir*, **22**. 9150-9 (2006)
- 67) T. Ishikawa T. Ito *et al.* Influence of pH on heat-induced aggregation and degradation of therapeutic monoclonal antibodies. *Biol Pharm Bull*, **33**. 1413-7 (2010)
- 68) P. Arosio G. Barolo *et al.* Aggregation stability of a monoclonal antibody during downstream processing. *Pharm Res*, **28**. 1884-94 (2011)
- 69) A. Saluja and D. S. Kalonia Nature and consequences of protein-protein interactions in high protein concentration solutions. *Int J Pharm*, **358**. 1-15 (2008)
- 70) A. Saluja A. V. Badkar *et al.* Ultrasonic rheology of a monoclonal antibody (IgG2) solution: implications for physical stability of proteins in high concentration formulations. *J Pharm Sci*, **96**. 3181-95 (2007)
- 71) R. Hoiberg-Nielsen C. C. Fuglsang *et al.* Interrelationships of glycosylation and aggregation kinetics for *Peniophora lycii* phytase. *Biochemistry*, **45**. 5057-66 (2006)
- 72) R. M. Fesinmeyer S. Hogan *et al.* Effect of ions on agitation- and temperature-induced aggregation reactions of antibodies. *Pharm Res*, **26**. 903-13 (2009)
- 73) M. Necula R. Kayed *et al.* Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J Biol Chem*, **282**. 10311-24 (2007)
- 74) H. Hamada T. Arakawa *et al.* Effect of additives on protein aggregation. *Curr Pharm Biotechnol*, **10**. 400-7 (2009)
- 75) T. Arakawa [Role of arginine in development of biopharmaceuticals]. *Yakugaku Zasshi*, **130**. 793-800 (2010)
- 76) S. J. Shire Formulation and manufacturability of biologics. *Curr Opin Biotechnol*, **20**. 708-14 (2009)
- 77) V. Kayser N. Chennamsetty *et al.* A screening tool for therapeutic monoclonal antibodies: Identifying the most stable protein and its best formulation based on thioflavin T binding. *Biotechnol J*, **7**. 127-32 (2012)
- 78) V. Kayser N. Chennamsetty *et al.* Conformational stability and aggregation of therapeutic monoclonal antibodies studied with ANS and Thioflavin T binding. *MAbs*, **3**. 408-11 (2011)
- 79) A. Bhambhani J. M. Kissmann *et al.* Formulation design and high-throughput excipient selection based on structural integrity and conformational stability of dilute and highly concentrated IgG1 monoclonal antibody solutions. *J Pharm Sci*, **101**. 1120-35 (2012)
- 80) W. Cheng S. B. Joshi *et al.* Comparison of high-throughput biophysical methods to identify stabilizing excipients for a model IgG2 monoclonal antibody: conformational stability and kinetic aggregation measurements. *J Pharm Sci*, **101**. 1701-20 (2012)
- 81) S. V. Thakkar S. B. Joshi *et al.* Excipients

differentially influence the conformational stability and pretransition dynamics of two IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Sci*, **101**. 3062-77 (2012)

- 82) S. Yadav S. J. Shire *et al.* Viscosity behavior of high-concentration monoclonal antibody solutions: correlation with interaction parameter and electroviscous effects. *J Pharm Sci*, **101**. 998-1011 (2012)
- 83) F. He S. Hogan *et al.* High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. *J Pharm Sci*, **99**. 1707-20 (2010)
- 84) B. Cherry Presentation at WCBP CMC Strategy Forum, January 9, 2011

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文

1. 新見伸吾 バイオ医薬品の免疫原性予測方法
医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス
Vol.44 26-35 (2013)
 2. 新見伸吾 バイオ医薬品の免疫原性が薬物動態,
有効性, 安全性に及ぼす影響とその軽減戦略
医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス
Vol.44 114-122 (2013)
- ##### 2. 単行本
1. 新見伸吾 第10章 バイオ医薬品の凝集体と
HCPの免疫原性 バイオ (抗体) 医薬品における

不純物/凝集の評価・試験と免疫原性, ウイルス安全性への対応 サイエンス&テクノロジー pp.245-269

3. 講演

1. 新見伸吾 バイオ医薬品の免疫原性のリスク因子の予測・評価方法, 有効性及び安全性に及ぼす影響, リスクを低下させるための実践的開発・市販後調査を探る 薬事エキスパート研修会 第6回 品質/科学技術特別研修 平成24年9月19, 20日 (大阪, 東京)
2. Shingo Niimi Risk factors, clinical consequence and mitigation of immunogenicity Immunogenicity for Biopharmaceuticals & Biosimilars Asia (16 October 2012 Singapore)
3. Shingo Niimi Requirement for Approval of Biotechnology-derived Pharmaceuticals in the Clinical trials from the Perspective of Immunogenicity-consideration Based on the Examination Reports 2nd Novel Immunotherapeutics Summit Immunogenicity & Immunotoxicity (1 February 2013 San Diego)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成24年度分担研究報告書

－バイオ後続品の評価に関する研究－

研究分担者：石井 明子（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長）

研究要旨

国内外で開発が活発化し、承認品目も増加しつつあるバイオ後続品に関して、日本および諸外国におけるガイドライン整備の状況と記載内容を調査し、各国の規制要件の特色を考察した。2003年以降、欧州が先行して規制環境整備を進めてきたが、現在までに、日本、カナダ、韓国、インド、及びWHOではガイドラインが公表され、米国でもガイダンス案が公表されている。各国におけるバイオ後続品の呼称は異なっているが定義は類似しており、ガイドラインの記載内容にも共通点が多かった。一方、参照品の要件、先行品との互換性のある製品の指定、一般的名称、臨床試験における非劣性試験の考え方等に関しては、各国ガイドラインでの扱いに違いがあった。自国以外での承認製品を参照品として利用することを認める動きが広がっており、バイオ後続品の開発についても、新薬開発と同様にグローバル化が進むと考えられた。同等性／同質性評価における重要項目の一つとなる生物活性の試験法についても考察を加えた。

キーワード：バイオ後続品、ガイドライン、国際的動向

A. 研究目的

バイオ後続品は、先行品の独占的販売期間終了後に、先行品と同等／同質の品質・有効性・安全性を有する医薬品であることを示すデータに基づき、承認される。バイオ後続品の承認申請に求められる要件は、化学合成医薬品の後発品（ジェネリック医薬品）とは異なると考えられたため、その承認には、申請・審査のための新たな枠組みの検討が必要であった。また、バイオ後続品として承認申請が可能な製品群や、承認申請に求められる要件に関するガイドライン作成が求められた。

これまで、欧州医薬品庁（EMA）が先導的にガイドライン整備を進めており、総論的ガイドラインに加えて、非臨床・臨床試験に関する製品群別のガイドラインも公表されている。我が国では2009年に発出された通知「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」において「国内で既に新有効

成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等／同質の品質、安全性、有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」としてバイオ後続品が定義され、わが国におけるバイオ後続品に対する考え方が示されるとともに、新有効成分含有医薬品やジェネリック医薬品とは区分して取り扱われることとなった。

また、2009年にはWHO、2010年にはカナダ及び韓国、2012年にはインドでもガイドラインが公表されている。米国では2010年にバイオ後続品の規制に関する法案（BPCI法）が成立したことを受け、2012年にその運用のためのガイダンス案が米国医薬食品局（FDA）から公表された。

バイオ医薬品の承認申請に関しては、各種のICHガイドラインが整備されているが、バイオ後続品は新しいカテゴリーに属する医薬品であり、各局で独

立してガイドライン作成が進められている段階である。本研究では、これらの国や地域におけるバイオ後続品の位置づけとガイドラインの記載内容を比較検討し、日本の規制環境の特徴や、今後の課題を考察した。

なお、バイオ後続品の呼称は各国で異なっているため、本報告書ではバイオ後続品に統一して称することとする。

B. 研究方法

日本、欧州、米国、韓国、カナダ、WHO、インドにおけるバイオ後続品に関するガイドラインを入手し、記載内容を比較して、それぞれの特徴を検討した。

C. 研究結果

C.1. バイオ後続品の開発および評価の特徴

図1に示すように、バイオ後続品の開発過程は、新有効成分含有医薬品や化学薬品後発品（ジェネリック医薬品）とは異なっている。バイオ後続品の開発では、原則として、①新薬と同様に、原薬及び製剤の製造方法を開発すること、②新薬と同様の品質特性解析に加えて、参照品との品質比較試験により、バイオ後続品と参照品の品質特性が高い類似性を持つことを示すこと、③非臨床・臨床試験により、バイオ後続品が参照品と同等／同質の有効性・安全性を有することを示すこと、が必要である。

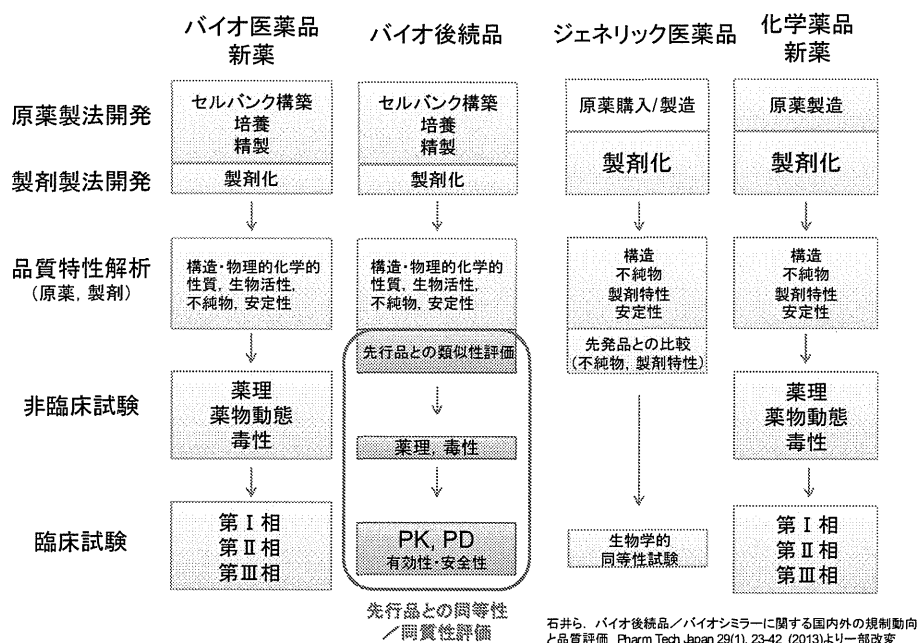


図1 医薬品の開発過程（典型的な例）

新有効成分含有医薬品の開発と比較すると、バイオ後続品の開発では、品質特性解析において、参照品との比較試験が必要となる一方、臨床での有効性・安全性が確立された参照品と品質特性に関して高い類似性を持つことを根拠として、必要とされる非臨床・臨床試験は限定的となる。臨床試験の内容は、その時点までの同等性／同質性の評価結果に依存し、品質特性の比較試験、非臨床試験、ならびに、薬物動態 (PK)、薬力学 (PD)、及びPK/PDに関する

臨床試験の結果から、バイオ後続品が参照品と同等／同質の有効性・安全性を有することが十分説明できる場合は、有効性を比較するための臨床試験を省略できることがある。

ジェネリック医薬品の開発と対比して考えると、バイオ後続品の開発では、通例、非臨床試験、ならびに、薬物動態 (PK)、薬力学 (PD) 等に関する臨床試験が必要とされる点が特徴である。ジェネリッ

ク医薬品では、品質特性解析により、有効成分が先発品と化学的に同一であることが確認され、生物学的同等性試験により、先発品と同一の用法用量において有効成分の血中濃度推移が先発品と同等であることが確認できれば、臨床において先発品と同じ作用が期待できると考えられる。これに対して、有効成分が不均一性に富む複雑な高分子であるバイオ医薬品では、先行品と有効成分が同一であることを証明することは現実的ではないので、品質特性の相違が臨床的に意味のある差を生じるものではないことについての検証が必要となる。不純物に関しても、バイオ医薬品では、目的物質由来不純物や宿主細胞由来タンパク質のように、製法に依存した不均一性を持つ分子の集団が含まれることから、特性解析結果及び比較試験結果のみから安全性への影響を評価することは現状では困難である。さらに、免疫原性のように、品質特性解析や非臨床試験では、先行品と違いを十分に検証できないと考えられている安全性上の懸念があることも、臨床試験が必要とされる一因である。

このような特徴を踏まえ、バイオ後続品の開発を考える上で重要な点として、以下の2点が挙げられる。一つは、参照品との「同等性／同質性」(注：参照)を検証する方策である。バイオ後続品に関する各極のガイドラインでは、申請製品が参照品と同等／同質の医薬品であるための前提や、同等／同質であることを示すために必要なデータについて、それぞれの規制当局が議論を重ねた結果が記載されている。二つ目は、品質管理戦略の構築である。製造工程と品質の理解・管理に関しては、新有効成分含有医薬品と同じレベルの内容が求められるため、バイオ後続品の製造販売企業には、組換えタンパク質生産・品質管理に関する高い技術力が必要である。バイオ後続品の開発においても、新薬開発と同様に、頑健性のある製造工程を構築し、独自に実施する非臨床・臨床試験が限られた中においても、有効性・安全性と品質特性及び工程パラメータの関連に関する理解に基づき、適切な品質管理戦略を構築する必要がある。

注：

「同等性／同質性」は、バイオ医薬品の製法変更に関して確立された考え方である。同等性／同質性は、comparabilityの日本語訳であり、量的／質的に同じという意味を持つ。バイオ医薬品の品質特性は製造方法により変動し得るため、開発過程あるいは市販開始後に製造方法の変更が行われる場合、品質・有効性・安全性への影響を評価する必要が生じる。バイオ医薬品の製法変更に関するICH Q5Eガイドラインでは、「同等性／同質性とは、必ずしも変更前および変更後の製品の品質特性が全く同じであるということの意味するものではなく、変更前後の製品の類似性が高いこと、ならびに、品質特性に何らかの差異があったとしても、既存の知識から最終製品の安全性や有効性には影響を及ぼさないであろうことが十分に保証できることを意味する。」と定義されている。

バイオ後続品に関する指針では、「同等性／同質性とは、先行バイオ医薬品に対して、バイオ後続品の品質特性がまったく同一であることを意味するのではなく、品質特性において類似性が高く、かつ、品質特性に何らかの差異があったとしても、最終製品の安全性や有効性に有害な影響を及ぼさないと科学的に判断できることを意味する。」と述べられている。バイオ後続品は、参照品とは異なるセルバンクを出発点とし、参照品とは独立して開発された製造工程により生産されるため、製法変更前後で製品の比較をする場合と比べて、同等／同質であることを示すためには、より多くのデータが求められると考えられる。しかし、品質特性に高い類似性があり、有効性・安全性には悪影響が生じないことを示す、という考え方は、製法変更前後での評価とバイオ後続品の評価で共通しているため、「同等性／同質性」の評価が、バイオ後続品の評価に関する考え方の基本とされてきた。

C.2. バイオ後続品に対する各国の規制要件

C.2.1 日本

(1) 法律およびガイドラインの整備

日本では、バイオ後続品の規制環境整備に際して

薬事法の改正は行われず、厚生労働省からの通知(平成21年3月4日 薬食審査発第0304007号「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」)により、バイオ後続品の承認申請区分が新設された(図2)。バイオ後続品の規制要件を示したこの指針の内容は、既に公表されていた欧州のガイドラインに類似しており、国際的な整合性も考慮されたものとな

っている。欧州ガイドラインとの相違点は、安定性試験、および、非臨床毒性試験において、参照品との比較が必須とされていない点である。また、他国にない日本の特徴は、バイオ後続品の一般的名称および販売名に関する通知が発出され、命名ルールが定められていることである。

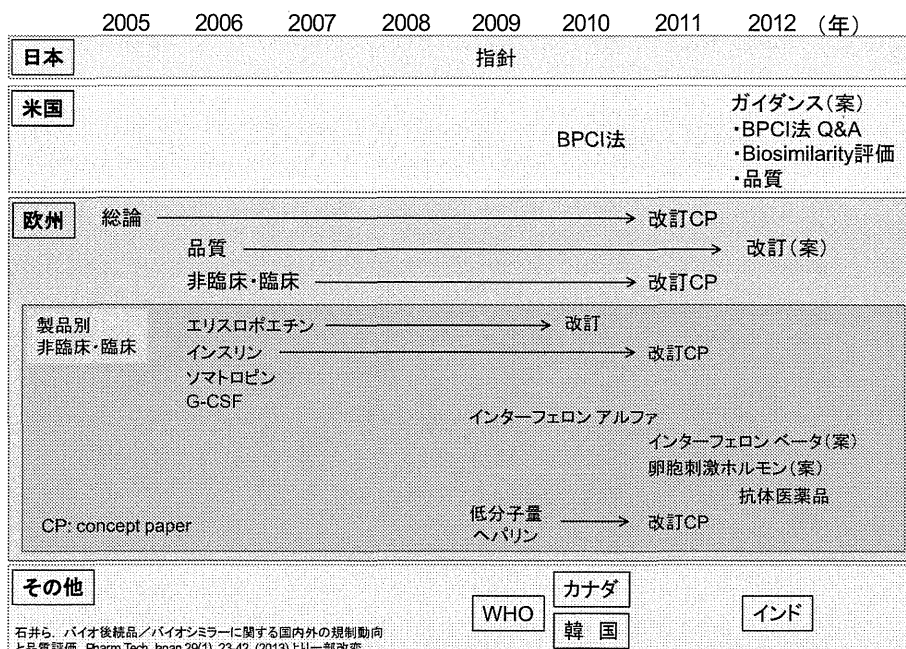


図2 バイオ後続品/バイオシミラーに関するガイドラインの整備状況

(2) 指針の適用対象

指針の適用範囲は、「微生物や培養細胞を用いて生産され、高度に精製され、一連の適切な分析方法により特性解析ができる遺伝子組換えタンパク質（単純タンパク質及び糖タンパク質を含む）、ポリペプチド及びそれらの誘導体並びにそれらを構成成分とする医薬品（例えば、抱合体）」とされ、組換えタンパク質医薬品が主な対象となっている。この適用範囲は、バイオ医薬品の規格及び試験方法に関するICH Q6Bガイドラインの適用対象を参考に定められており、十分な品質特性解析が可能で、品質面での類似性評価が可能なものが対象となっている。指針の適用対象外のものに関しても、指針の考え方を適用し、バイオ後続品として開発できる可能性が記されており、組換えタンパク質以外のバイオ後続品の開発も可能である。

(3) 先行バイオ医薬品（参照品）の要件

バイオ後続品の開発に際して比較対象となる参照品は、日本で承認された製品に限定されている。これまで、日本と欧州において、参照品を国内承認製品に限定していたが、後述するように、欧州では海外承認製品の使用も認めるとするガイドラインの改訂が予定されており、自国承認製品に限るのは、日本の特徴と言えるだろう。

同じ一般名の複数の先行バイオ医薬品がある場合、比較の対照とするのは、その中の一つの製品である。

(4) 剤形・投与経路・製剤成分

バイオ後続品の剤形と投与経路は、原則的に先行バイオ医薬品と同一である。製剤中の添加物などバイオ後続品の製剤処方については、有効性・安全性に影響がないことが確認できれば、先行バイオ医薬

品と異なってもよい。

(5) バイオ後続品の評価

<品質>

新有効成分開発と同様に、特性（構造、物理的・化学的性質、生物学的性質及び不純物）解析を行った上で、さらに、参照品とする先行バイオ医薬品との品質の比較試験を実施する。比較試験の際、先行バイオ医薬品についても、複数ロットについて解析することが推奨されている。先行バイオ医薬品の原薬が入手困難で、製剤から目的物質を抽出して試験に用いる場合は、抽出・精製方法の妥当性を示すことが求められる。

構造・物理的・化学的性質の解析により、目的物質において、一次構造上の違いがあった場合は、バイオ後続品とは判断されない。N末端やC末端アミノ酸にプロセッシング等による差異が認められる場合には、その際が有効性・安全性に有害な影響を与えないことを担保する必要がある。臨床投与量が重量単位で設定されている場合には特に、比活性の比較が重要である。安定性の評価は、参照品との比較によらず、独自に実施することでよいとされており、貯法や有効期間は、独自に設定することになる。

<非臨床試験>

薬理作用の比較試験、及び毒性試験を実施する。薬理作用の比較試験については、*in vitro*の生物活性試験で十分な評価が可能な場合は、必ずしも*in vivo*の比較試験は求められない。毒性試験については、反復投与毒性試験が推奨されている。毒性試験は、先行バイオ医薬品との比較試験である必要は必ずしもなく、独立した試験であってもよいとされ、この点は欧州のガイドラインと異なる点である。安全性薬理試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験等、その他の非臨床安全性試験の必要性は低いとされている。

<臨床試験>

臨床薬物動態（PK）試験、薬力学（PD）試験、PK/PD、有効性・安全性の比較試験により同等性／

同質性を検証する。PKの比較は、原則として、クロスオーバー試験によることが推奨されている。承認を得ようとする効能効果と同じ投与経路で試験を行う必要があり、複数の投与経路がある場合には、原則的にはそれぞれについて検討する。可能であれば、臨床有効性を反映するPDマーカーを選択し、PDを指標にした比較を行うこと、さらに、PK/PD関係の解析により同等性／同質性の検討を行うことが推奨されている。PD、PK、PK/PD、及び有効性に関する臨床試験では、いずれも、あらかじめ同等性／同質性の許容域を設定することが求められているが、具体的な数値は示されていない。

PD試験、PK試験、又はPK/PD試験により、目的とする臨床エンドポイントにおける同等性／同質性を保証できる十分なデータが得られた場合には、有効性に関する臨床試験を省略できる場合がある。臨床安全性の確認は、有効性を比較するための臨床試験を実施する際に、同時に検討する試験計画としても差し支えない。有効性を比較するための臨床試験を実施しない場合は、必要に応じて、免疫原性の検討を含む安全性に関する臨床試験の実施を検討する必要がある。

(6) 規格及び試験方法の設定

規格及び試験方法は、新薬の場合と同様、特性解析結果、製造工程の評価結果、非臨床・臨床試験結果、安定性試験結果、ならびに、先行バイオ医薬品との同等性／同質性評価の結果を考慮して設定する。設定された規格及び試験方法は、先行バイオ医薬品と同一とは限らない。先行バイオ医薬品が日本薬局方収載品目であっても、各条規格とバイオ後続品の規格が一致しないことがある。

(7) 効能効果の外挿

先行バイオ医薬品が複数の効能・効果を有する場合、ある効能・効果において先行バイオ医薬品と有効性が同等／同質であり、他の効能・効果においても薬理的に同様の作用が期待できることが説明できるのであれば、対照薬として用いた先行バイオ医薬品が承認を取得している他の効能・効果をバイオ