

201407017A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

人工血小板／H12(ADP)リポソーム：
臨床研究への移行を目指した品質管理と薬物試験

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

人工血小板／H12(ADP)リポソーム：
臨床研究への移行を目指した品質管理と薬物試験

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

人工血小板／H12 (ADP) リポソーム：臨床研究への移行を
目指した品質管理と薬物試験

(H24-創薬総合-一般-008)

平成 26 年度

総括・分担研究報告書

平成 27 年 3 月

・・・・・・・・・・・・・・・・ 研 究 組 織 ・・・・・・・・・・・・・・・・

(研究代表者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

池田康夫 早稲田大学理工学術院 教授

木下学 防衛医科大学校 准教授

丸山徹 熊本大学薬学部 教授

鈴木英紀 日本医科大学 准教授

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

目 次

人工血小板／H12 (ADP) リポソーム：臨床研究への移行を目指した 品質管理と薬物試験

平成 26 年度研究報告

I. 総括研究報告書

半田 誠 1

II. 分担研究報告

1. H12-(ADP) リポソームの品質管理体制の確立

武岡 真司 11

2. 大量出血合併急性血小板減少家兎モデルにおける H12 (ADP) リポソームの投与効果 —臓器出血後の H12 (ADP) リポソーム事後投与の救命効果、赤血球輸血を併用した より重篤な易出血病態での検討—

木下 学 18

3. H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

丸山 徹 35

4. H12 (ADP) リポソームの超微細形態解析

鈴木 英紀 46

5. α II β β 3 インテグリンと H12 担持リポソームの結合解析

—可溶性 α II β β 3 の作成—

鎌田 徹治 52

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 61

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総括研究報告

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業)

人工血小板/H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を目指した
品質管理と薬物試験

総括研究報告書

研究代表者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

研究要旨

【研究目的】 人工血小板/H12(ADP)リポソーム (LP) の臨床研究への移行を目標として、本試験物の製造・品質管理体制を確立し、薬物試験 (薬理試験、薬物動態試験、毒物試験) について非臨床データの集積を行う。

【研究方法】 集積された LP ロットデータに基づき、新たに導入した製造工程のスケールアップ化に対応した製造工程及び品質管理の標準化に向けて、標準手順書 (SOP) 等を整備した。より重症化させた希釈性血小板減少症ウサギモデルを用いて肝臓損傷に伴う致死性の出血性ショックへの適応を赤血球輸血併用プロトコルで評価した。健常および希釈性血小板減少ラットを用いて、標識 LP の体内動態、抗 LP 抗体の発現及び反復投与による ABC 現象を検討した。表面プラズモン共鳴法による *in vitro* 性能評価系の確立に向けて、LP との結合活性を有し、センサー表面に固相化できる α IIb β 3 複合体の精製法を検討した。

【研究結果】 試験物の標準仕様、品質管理及び製造工程管理に関する SOP とチェックリストが作成され、研究施設内での GMP 準拠製造・品質管理体制が確立された。止血能や貧血はあるレベルまで補正されたにもかかわらず、LP の救命効果は洗浄赤血球の併用で改善しなかった。希釈性血小板減少モデルでの LP (単回投与) の体内動態は健常動物と変わりなかった。しかし、健常動物と同様に、抗 LP 抗体 (Ig M) が惹起され、ABC 現象により追加投与の LP は速やかに血中から消失した。組替え遺伝子導入動物細胞の培養上清より可溶性活性化複合体タンパクを、アフィニティーカラムを用いて精製することができた。

【考察・結論】 臨床研究への移行を目標として、ラボスケールにて、品質保証、製造体制の確立へのステップを順調に踏み、H12(ADP)リポソームの人工血小板として次なる開発ステップに向けた基礎資料に資するデータが集積された。

(研究分担者)

武岡真司	早稲田大学理工学術院	教授
池田康夫	早稲田大学理工学術院	教授
木下学	防衛医科大学校	准教授
丸山徹	熊本大学薬学部	教授
鈴木英紀	日本医科大学	准教授
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部	講師

A. 研究目的

人工血液の開発は、医療の高度化と患者の高齢化に伴う需要の増加および少子化による献血人口の減少に対応した血液製剤の安定供給の確保等に関する法律（血液法）に基づき、官民学が取り組むべき重要な課題とされてきた。とりわけ、保存期間が短く、厳密な保存条件を要し、緊急使用が困難なヒト血小板（献血製剤や iPS 細胞大量培養由来物）に代わる人工物の開発は、欧米においても精力的に行われてきたが、未だに実用化はされていない。我々は、平成 9 年度より現在まで、厚労科研費の支援及び大学・企業の連携プログラムの協力を得て人工血小板の開発研究を継続し、多くの候補ナノ粒子の中から絞り込まれた H12(ADP)リポソームが、その効力と安全性の面からの前臨床評価により、創薬化が十分可能であると判断するに至った。

本微粒子は、粒子径が 250nm でポリエチレングリコール鎖による表面修飾により十分な血中滞留性と体内排泄性を備え、かつ認識分子としてヒトフィブリノゲンペプチド（H12）を表面に担持させることで止血局所（活性化血小板）特異性を有し、内包化したアデノシン 5' 二リン酸（ADP）を血小板凝集依存性に止血局所で放出すること、が特徴である。実際、3つの異なった機能を有する有機分子（脂質類、合成ペプチド H12、リボヌクレオチド ADP）で構成された今迄に世界に類を見ない独創的な薬剤であり、かつ本来の人工血液の趣旨に即して生体材料を一切用いないことが特長である（基礎特許：薬物運搬体）。

当該 3 カ年研究（今回は 3 年目）は、民間企業あるいは大型開発研究費による公的機関との連携を前提に、外傷等による大量出血での使用を対象とした臨床研究への移行を目的として、本試験物の製造工程・品質管理と薬物試験（薬理試験、薬物動態試験等）についてデータの集積を行い、次の開発ステップへの移行の適格性を最終的に検証する。

B. 研究方法

1. H12(ADP)リポソームの製造および品質管理の確立 (武岡、池田)

本リポソーム製剤の調製工程は、H12 結合 PEG 脂質の有機合成、混合脂質の調製、ADP 内包リポソームの調製ならびに未内包 ADP の除去と濃度の調整、の大きく 3 工程からなる。負荷量スケールアップが可能なクロスフロー限外ろ過による未内包 ADP 除去法を組み込んだラージスケールでの製造工程及び品質を、暫定仕様表に照らして評価し、生じた問題点について種々の対策を講じることで、工程や品質検査の標準手順書(SOP)を作成してアカデミアのラボレベルでの GMP 準拠体制の構築を試みた。

2. 薬効薬理試験及び形態的観察 (木下、鈴木)

外傷等に伴う予期しない危機的出血に対して、実臨床で用いられる対応法に即して、脱血返血量を従来(循環血液量に相当: 100ml/kg)の2倍(200ml/kg)に増やしてより重症化させた希釈性血小板減少症(5万/ μ l $>$)ウサギモデル(Nishikawa K et al: J Thromb Haemost 10: 2137, 2012)を用いて、赤血球輸血を併用した改定プロトコルでの H12(ADP)リポソーム(20 mg/kg)の止血や救命効果を検討した。また、他の研究でリポソームの効果が期待されている衝撃波惹起肺損傷マウスモデルにおいて(萩沢康介ら: Shock 29:1, 2014)、出血局所への当該試験物の集積性について電子顕微鏡による形態観察を行った。また、鉄磁性体を内包させたリポソームについても超微形態観察を行った。

3. 薬物動態試験 (丸山)

既に確立したウサギモデルに準じて、希釈性血小板減少症のラットモデルを構築し、脂質コレステロール及び包含 ADP をそれぞれ ^3H と ^{14}C で標識した H12(ADP)リポソーム(10 mg/kg)を投与して、その体内動態を解析した。また、14日まで経時的に、ラット血漿中のリポソーム結合性 IgG 及び IgM を、リポソーム固相化プレートを用いて測定した。さらに、非標識リポソームを初回投与し、その5日後に標識リポソーム追加投与し、その体内動態を測定して、ABC現象(Accelerated Blood Clearance Phenomenon)を評価した。

4. 無細胞系による機能評価系の確立 (鎌田)

表面プラスモン共鳴法により、活性化血小板へのリポソーム結合活性を *in vitro* で評価するために最適な、センサーチップ表面に固相化する可溶性の活性型 α IIb β 3 インテグリンを、組換え遺伝子を導入した培養細胞を用いて検討した。

C. 研究結果及び考察

1. H12(ADP)リポソームの製造および品質管理の確立 (武岡、池田)

昨年度、試験的に導入した製造工程のラージスケール化の本格稼働を年度始めから計画していたが、フィルターによる製造物の無菌化処理工程の不備などが原因で、暫定仕様（粒径、ADP内包量など）からの逸脱状態が長期間持続した。かねてより指摘されてきた研究室レベルでの試験物の製造の限界が顕在化したと考えられる。そのような背景のもと、1) H12結合PEG脂質の合成に関するSOP及びチェックリストの作成、2) リポソームの調製に関するSOP及びチェックリストの作成（H26武岡分担研究報告、図5、8）、3) リポソームの物性（品質）評価に関するSOP及びチェックリストの作成（図9、10）、4) 大学内でのSOPの運用やデータ管理の体制の構築、がなされた。これらの成果は、当該試験物の臨床試験へのステップアップを目指して、基礎資料として製造体制のGMP準拠施設への移行に十分資するものとする。

2. 薬効薬理試験及び形態的観察 (木下、鈴木)

従来の2倍量の血液交換によって作成されたモデルでは（H26木下分担研究報告、Fig. 1）、予期されたように血圧や血液パラメータの低下はより高度となり、病態もより重篤化した（Table 1）。肝臓損傷後のH12(ADP)リポソーム（20 mg/kg）事後投与に引き続き、止血を確認後に赤血球輸血を追加するプロトコルでの救命効果を検討した（Fig. 1）。陰性対照群（乏血小板血漿：PPP）では出血性ショックで全例（4例）が死亡した。一方、陽性対照群（PPP+多血小板血漿：PRP；20例）では、投与後に血小板数の有意な増加とソノクロットによる凝固パラメータの改善が認められ、H12(ADP)リポソーム群（8例）では、血小板数に変化はないものの、PRP群と同様の効果を認めた（Table 2）。一旦の肝臓からの止血が確認された動物（PRP群及びリポソーム群）を対象として、赤血球輸血の効果を検討したところ、その90%が出血性ショックで死亡した5%アルブミン投与動物（10例）に比較して、赤血球輸血を行ったPRP群（10例）とリポソーム群（3例）では、その70%が生存し、血圧の更なる低下や貧血の進行、凝固パラメータの改善が認められた（Table 3）。

H12(ADP)リポソームを前投与することで、致死性の衝撃波肺損傷マウスモデルの救命率を著明に上げることが別の研究によって報告されている。実際、超微形態的検討により、リポソームは肺出血部位の肺胞血管内腔および肺胞に形成された血小板凝集塊に巻き込まれており、当該試験物の出血局所への特異的

な集積を示唆する結果が新たなモデルでも確認された (H26 鈴木分担研究報告、図 8)。

当該試験物の想定している適応は、外傷や手術に伴う大量出血・大量輸血に合併する急性血小板減少症である。既に我々は、血液希釈による急性血小板減少症ウサギモデルにおいて、肝臓損傷による致死性出血性ショックに対応して、H12(ADP)リポソームが血小板輸血に匹敵する救命効果を来すことを明らかにしてきた (Hagisawa K et al:Transfusion 55: 314, 2015)。しかしながら、その救命率は 50%程度と十分とはいえなかった。モデルの重症度や治療プロトコルを変更することで、より実臨床に即した試験プロトコルの作成につながるとして、昨年度はフィブリノゲンの補充を追加したが、救命率の改善には至らなかった。今年度に検討した赤血球輸血の併用は、救命率の改善につながる可能性が指摘できた。実臨床では、外傷による出血性ショックの効果的な補充療法として、赤血球：血漿：血小板の 1：1：1 (単位) の輸血が用いられている。今回の検討により、H12(ADP)リポソームは、現場での供給が事実上不可能な血小板の代替として、外傷等の救急事例において人工血小板としての役割を果たすことが大いに期待できるであろう。

3. 薬物動態試験/ABC 現象 (丸山)

今回新たに確立した希釈性血小板減少症ラットモデルにおいて、標識 H12(ADP)リポソームは投与 3 時間後までは ADP を内封した状態で血中を滞留すること、健常ラットに比して肝臓と脾臓への早期 (投与 2 時間後) 集積が起こること、そして通常の良い体外排泄性を示すことがわかった (H26 丸山分担研究報告、Fig 2、3、4)。当該ラットモデルでの抗リポソーム抗体のリポソーム投与後の経時的検討で、IgM 抗体が投与後 2 日で検出され、4 日をピークとして 10 日程度まで持続した (Fig. 5)。一方、IgG 抗体は検出されなかった。初回投与 5 日後の追加投与では、標識リポソームは速やかに血中から消失し、ABC 現象が示唆された (Fig. 6)。当該試験物の適応は単回使用を前提としているため、ABC 現象を考慮に入れる必要性はないと考えられるが、さらなる検討が必要かもしれない。

4. 無細胞系による機能評価系の確立 (鎌田)

前回の検討で、安定発現細胞よりアフィニティ精製した活性型変異 α IIb β 3 の質的問題で、センサー表面へのリポソーム結合は測定できなかった。その原因は、膜からの可溶化条件に伴う変性が強く疑われた。そこで、今回は、両鎖

の膜貫通ドメイン以降を欠損した可溶性活性型複合体の cDNA を作製し動物細胞に導入した。培養上清中に分泌された可溶性タンパクを、アフィニティーカラムを用いて精製することに成功した (H26 鎌田分担研究報告、図 6)。無細胞系による機能評価系の確立は、本製造物の臨床試験ステップへの移行に不可欠の要件であることは疑いようがない。今回の検討により、可溶性タンパクを固相化した表面プラズモン共鳴法への道が開けたと考えられる。

D. 結論

臨床研究への移行を目標として、ラボスケールにて、品質保証、製造体制の確立へのステップを順調に踏み、H12(ADP)リポソームの人工血小板としての適格性を示唆するデータが集積できた。薬効薬理試験により、外傷や手術に伴う大量出血／危機的出血を適応症とすることを強く支持する成果が示された。薬物動態試験では、当該試験物の安全性（組織蓄積性がなく）や良好な血中滞留性を示すデータが集積され、想定される用法・用量が単回投与であることから、リポソーム製剤に共通して備わる欠点である ABC 現象は、考慮に入れる必要はないことが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

(1) Taguchi K, Hashimoto M, Ogaki S, Watanabe H, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T. Effect of repeated injections of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with a fibrinogen γ -chain dodecapeptide developed as a synthetic platelet substitute on accelerated blood clearance in a healthy and an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. J Pharm Sci. 2015 Mar 9. doi: 10. 1002/ jps. 24418(in press).

(2) Hagisawa K, Nishikawa K, Yanagawa R, Kinoshita M, Doi M, Suzuki H, Iwaya K, Saitoh D, Seki S, Takeoka S, Handa M, Nishida Y. Treatment with

fibrinogen γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes as an infusible haemostatic agent against active liver bleeding in acute thrombocytopenic rabbits. *Transfusion* 55; 314-325, 2015.

(総説)

(1) 木下 学, 人工赤血球、人工血小板の臨床応用, 2014, *Anet*, 18: 14-17

(2) 西山靖将, 木下 学, 染田英利, 軍事史に学ぶ輸血用血液の重要性と人工血液への期待, 2014, *防衛衛生*, 61: 45-56

(3) 萩沢康介, 木下 学, 宮脇博基, 佐藤俊一, 鈴木英紀, 土井麻実, 武岡真司, 小野聡, 齋藤大蔵, 西田育弘, 衝撃波による致死肺出血マウスに対する人工血小板(H12(ADP) liposome)の救命効果, 2014, *Shock*, 29, 1-8.

2. 学会発表

(1) 武岡真司, 「人工血小板/H12(ADP)リポソームの製造工程・品質の管理」, 第21回日本血液代替物学会年次大会 (2014. 12., 東京).

(2) Hiroshi Watanabe, Yohei Miyamoto, Yuki Enoki, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri and Toru Maruyama. Molecular Pharmacokinetic Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Tissue Damage In Chronic Kidney Disease For Medical Development And Therapeutic Application. (19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA)

(3) 橋本 麻衣、田口 和明、大柿 滋、異島 優、渡邊 博志、西川 可穂子、木下 学、武岡 真司、池田 康夫、半田 誠、小田切 優樹、丸山 徹. 血小板減少状態における血小板代替物 H12 (ADP) リポソームの体内動態解析. (第21回 日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9)

(4) Shigeru Ogaki, Hitoshi Maeda, Kazuaki Taguchi, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri and Toru Maruyama. Carbon Monoxide Bound Red Blood Cells Protect The Function Of Hepatic Cytochrome P450 After Resuscitation From Hemorrhagic Shock Via Supression Of Toll-Like Receptor-4 Expression On The Kupffer Cells. (19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA)

(5) 橋本 麻衣、田口 和明、大柿 滋、渡邊 博志、藤山 淳史、土井 麻美、武岡 真司、半田 誠、小田切 優樹、丸山 徹. 血小板代替物 H12(ADP) リポソームの頻回投与時における体内動態特性 (日本薬剤学会 第29年会)

2014/5/20-22)

(6) 木下 学, (特別講演) 超極薄膜ナノシートの外科手術用創傷被覆剤としての応用, 2014. 1, 第1回結核予防会新山手病院定期講演会

(7) 萩沢康介, 木下 学, 西川可穂子, 柳川錬平, 多喜川真人, 土井麻実, 武岡真司, 半田誠, 齋藤大蔵, 関修司, 西田育弘: 出血性ショック時の蘇生輸血(赤血球: 血小板: 血漿の1: 1: 1輸血)と血液代替物使用の可能性. 第21回日本血液代替物学会(シンポジウム3)2014, 東京.

(8) 鈴木英紀, 萩沢康介, 木下 学, 武岡真司, 半田誠. 人工血小板/H12(ADP)リポゾームの超微形態的検討—in vitro および in vivo における人工血小板の挙動に関する電顕的観察—. 第21回日本血液代替物学会(シンポジウム3)2014, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No. 7, 887, 837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

Ⅱ. 分担研究報告

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業総合研究事業)
分担研究報告書

H12-(ADP)リポソームの品質管理体制の確立

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院 教授)
池田 康夫 (早稲田大学 特命教授)
研究協力者 大澤 史佳 (早稲田大学 先進理工学部)
多喜川 真人 (早稲田大学 先進理工学部)
本間 啓太郎 (早稲田大学 先進理工学部)

【研究要旨】

H12-(ADP)リポソームは、その表面にフィブリノーゲン γ 鎖C末端ドデカペプチド(H12)を結合させ、内水相に血小板凝集惹起物質である adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた血小板代替物であり、活性化血小板間を GPIIb/IIIa を介して架橋させ血小板凝集塊中で放出された ADP が血小板を活性化させて血小板凝集形成を促進する効果を有する。

本分担研究者は、研究協力者と共に H12-(ADP)リポソーム試験物の製造を行い、本厚労科研の分担研究者への提供を担当している。本年度は最終年度であるので、本リポソーム試験物の製造工程・品質を GMP 準拠レベルで管理をするための体制を構築し、それを何度か運用しながらその実効性を検討することを目的とした。具体的には、H12-PEG-Glu2C18 脂質の合成、H12-(ADP)リポソームの調製、諸物性評価、ならびにエンドトキシン試験の標準操作手順書(SOP)とチェックリストを作成し、何度かの改訂を経て完成させた。また、専用のエクセルデータシートに機器分析データをトランスファーして検量線作成と計算結果ならびにスペック表に反映させるプログラムを作り、クラウド上で管理するシステムを構築した。これにより、試験物製造工程・品質管理に関して連携企業への技術移転の準備を完了させた。

A. 研究目的

合成ペプチド(H12)を表面に担持しアデノシン 2-リン酸(ADP)を内包させた H12(ADP)リポソームを、止血能を有する血小板代替物として開発してきた。本リポソームは、異なる機能を有する 6 種類の脂質類縁体分子が自己集合して特定の集合構造を形成することによって成る製剤である。

そのため定められた方法によって得られたリポソームの構造の確認や成分の定量を厳密に行い、それらが規格の範囲内にあることを確認した上で種々の試験に一定量が安定に供されなければならない。

本年度は、大学の限られた条件の中でリポソーム製剤の製造工程・品質の管理をするための体制の構築を行い、連携企業ある

いは GMP 受託製造会社へ技術導入するために、限定した規模ではあるが、GMP 準拠を意識した製造体制を研究室内に整える。

B. 研究方法

本リポソーム製剤の調製工程は、H12結合PEG脂質の有機合成、混合脂質の調製、ADP内包リポソームの調製ならびに未内包ADPの除去と濃度の調整、の大きく3工程からなる。スケールアップを鑑みて、大型エクストルーダーと限界ろ過膜によるクロスフロー法を導入した。各工程は標準操作手順書(SOP)として文書化し、更にこれを実施する際のチェックリストを整備した。

本リポソーム製剤の仕様は、粒子径とその分布(動的光散乱法)、ゼータ電位(ゼータサイザー)、脂質組成(NMR)、H12の定量(蛍光)、内包ADP/未内包ADPの定量(HLPC)によって求め暫定仕様として定めた。各測定においてもSOPを定め、チェックリストならびに生データをエクセル上にて管理し、各項目が自動計算によって仕様表に反映される様にした。これらのSOPやチェックリスト、エクセルデータはクラウド上で管理され、複数によるチェックならびに確定するプロセスを整えた。

C. 結果および考察

1) H12結合PEG脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成に関するSOP、チェックリストの作成

図1, 2, 3に合成SOPの目次、本文の抜粋、合成スキームをそれぞれ示す。スキームにある様にH12-PEG-Glu2C18の合成は、グルタミン酸の2個のカルボキシル基にオクタデシルアルコールを結合させてGlu2C18を合成するプロセス1、Glu2C18に

MAL-PEG-NHSを結合してMAL-PEG-Glu2C18を合成するプロセス2、そしてMAL-PEG-Glu2C18にH12-Cysを結合してH12-PEG-Glu2C18を合成するプロセス3からなる。これらのSOPに基づいた合成の状況であるが、既に、Glu2C18は大量に当研究室に保有されており、類縁体であるGlu2C16はある試薬会社に技術移転し大量製造されているので、プロセス1に関するSOPの実用性は証明されていると考えている。プロセス2ではほぼ80~90%程度の収率で得られているが、原料のMAL-PEG-NHSが不安定なために購入時ならびに保管使用時の¹H-NMRによるマレイミド基のチェックが必要である。プロセス3における原料であるH12-Cysは、ペプチド受託合成会社にて大量合成済みであり、プロセス2で合成したMAL-PEG-Glu2C18と結合させるだけであるので操作は簡単である。しかし、精製においてはMAL-PEG-Glu2C18、H12-PEG-Glu2C18、H12は全て分子量が大きいためテーリングする傾向にあり、生成物H12-PEG-Glu2C18は、両原料の中間の極性を有するために困難であり、更にカラムに吸着する傾向があるために収率は15~20%程度とかなり低い。今後は、H12を水洗で除去する、あるいは逆相クロマトグラフィーにて精製するなどの工夫が必要と思われ、それに対応したSOPにする必要もある。合成物の同定は、MS、¹H-NMR、FT-IRにて行われ、5回の合成実績により再現性も確認された。本検討の中でH12-PEG-Glu2C18の合成SOPならびにチェックリストを作成、4度の改訂を経て完成した。特に、TLCによる合成、精製過程のチェックは厳密に行い、写真の添付により履歴を残すこととした。同様に同定に用いたMS、NMR、

FT-IRについてもスペクトルの番号管理ならびに添付により参照できるようにした。

H12 結合脂質
H12-PEG-Glu2C18 の合成手順

1. 範囲	1
2. 目的	1
3. 責任	1
4. 関係する SOP	2
5. 定義	2
6. 手順	2
7. 図表	5
8. 不測の事態	8
9. 改訂履歴	8

図 1. 合成 SOP の抜粋 (1)

H12-PEG-Glu2C18 の合成 SOP の抜粋

- 6.3 MAL-PEG-Glu2C18 の合成
- 6.3.1 MAL-PEG-NHS の職入日と MAL が失活していないことを NMR にて確認する。
- 6.3.2 30 mL ナスフラスコにスターワーバー (14 mm) を入れ、クロロホルム (特級) を 10 mL 添加し、6.2 で合成した Glu2C18 を 401.0 mg (368.9 μmol) 秤量し、30 mL ナスフラスコに徐々に加える。
- 6.3.3 10 mL バイアルに MAL-PEG-NHS を 1029.8 mg (307.4 μmol) 秤量し、6.3.1 のナスフラスコに添加していく。
- 6.3.4 添加後、温度を 25 °C にし、フラスコ内を室温で置換し、攪拌する (12 h, N₂, 25 °C)。
- 6.3.5 12 時間経過後、TLC (展開剤: クロロホルム/メタノール=3/1) により反応の進行具合を確認し、Rf=0.6 のスポットが確認できなければ、反応を続ける。
- 6.3.6 反応の進行を確認できたら、反応液を 300 mL のエーテル溶液中に滴下し、15 分間攪拌する。
- 6.3.7 攪拌後、白濁したエーテル溶液をガラスフィルターに注ぎ、自然に濾過ポンプで吸引はしないように濾過物を得る。
- 6.3.8 ガラスフィルター上の沈殿物をクロロホルムに溶解させ、抽出液を 100 mL ナスフラスコに戻す。TLC にてスポットを確認する。
- 6.3.9 6.3.8 の抽出液をエバポレーターで減圧蒸留した後、真空乾燥機で、2 時間乾燥させる。
- 6.3.10 乾燥した生成物をエタノール (99.5%) で再結晶精製する (昼夜 4 °C で冷却する)。
- 6.3.11 再結晶で析出した固体を、ガラスフィルターを用いて、ろ過回収する。
- 6.3.12 ガラスフィルター上の結晶を最小収率専用クロロホルムに溶かし、50 mL ナスフラスコに戻し、エバポレーターにて乾燥させる。
- 6.3.13 乾燥後、2 時間真空乾燥し、白色固体として MAL-PEG-Glu2C18 が得られる。
- 6.3.14 白色粉末の秤量する。
- 6.3.15 Glu2C18 の TLC を測定すると共に、MS、¹H-NMR、IR にて同定を行う。

図 2. 合成 SOP の抜粋 (2)

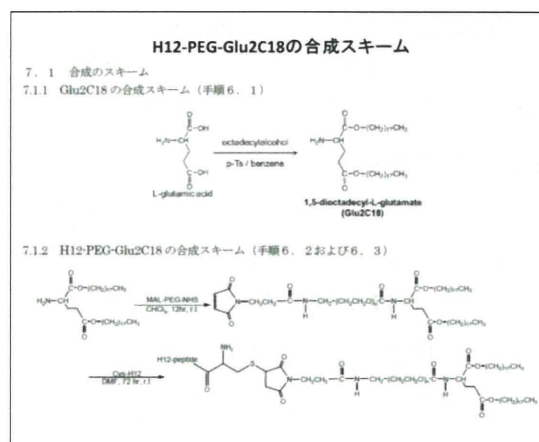


図 3. 合成 SOP の抜粋 (3)

18	抽出方法	清うす(その他)	1
19	染色剤	200倍(その他)	1
20	検体		

TLC写真を添付

H12-PEG-Glu2C18 の合成 (担当者:) 日付:)

項目	確認内容	確認日時
1	合成開始日	年 月 日
2	専用バイアルの準備	滅菌済粉末包装
3	原料の秤量値およびLot	MAL-PEG-Glu2C18 mg (Lot) Glu-H12 mg (Lot) 3243.4mg
4	溶媒の量およびLot	DMP 10 mL (Lot) その他 mL (Lot)
5	反応液の色	異常(その他)
6	反応開始時刻	月 日
7	反応終了時刻	月 日
8	反応条件	1. 温度 25°C, 2. 攪拌機
9	反応終了後のTLCにおける生成物(H12-PEG-Glu2C18)の有無	1. 有(明確) 2. 無
10	継続反応の時刻	1. 反応の終了, 2. 反応を継続
11	継続反応開始時刻	月 日
12	継続反応終了時刻	月 日
13	継続反応終了後のTLCにおける生成物(H12-PEG-Glu2C18)の有無	1. 有(明確) 2. 無
14	エーテル中に滴下して15分間攪拌	1. 自撮り 2. 無
15	ガラスフィルターに結晶した結晶のエーテル洗浄	1. 操作者 2. その他

反応終了を判断したTLC写真を添付
反応終了を判断したTLC写真を添付

図 4. 合成 SOP に対するチェックリストの抜粋

2) H12-(ADP) リポソームの調製に関する SOP、チェックリストの作成

リポソーム調製に関する SOP を図 5, 6, 7 に示す。図 5 は目次、図 6 は SOP の抜粋、図 7 は写真による説明の抜粋である。H12-(ADP) リポソームの調製は、混合脂質粉末を調製するプロセス1、混合脂質粉末を ADP 水溶液中で水和して、エクストルージョン法にて造粒するプロセス2、未内包の ADP を除去して濃度調整するプロセス3 から構成される。特に、プロセス1では秤量した各脂質を混合するが、秤量誤差が最も大きいので、混合脂質溶液をサンプリングして ¹H-NMR にて測定し、規格から外れる場合には足りない脂質を追加することによって微調整を行った後に凍結乾燥粉末を得ることを特徴としている。プロセス2においては、エクストルージョンにおいて孔径の異なるフィルターと通過回数をコントロールすることによって得られる粒子径を規格内に収めている。また、定圧条件でエクストルージョンするよりは定速条件でエクストルージョンを行う方法を採用している。プロセス3においては、従前の超遠心分離・ゲルろ過法の組み合わせではスケールアップは困難

であることから、限外ろ過を原理とするクロスフロー法にて未内包ADPを除去して濃縮し、濃度定量の後に所定濃度に濃度調整する方法を用いることによってスケールアップを可能とした。クロスフロー法の洗浄不十分によるコンタミやADPの除去不十分や内包ADP濃度が不安定となる課題を克服することができ、調製SOPならびにチェックリストの作成(図8)、5度の改訂を経て完成することができた。特に装置を用いる操作が多いので、写真や図を用いて操作を分かりやすく掲載した。

人工血小板 H12-(ADP)リボソームの調製SOP	
1 H12-(ADP)リボソームの調製	
1-1 オートクレーブ	4
1-2 水栓	6
1-3 エクストルーダー	9
1-4 クロスフロー	12
1-5 濃度の測定	15
2 H12-(ADP)リボソームの物理化学的評価	
2-1 粒子径測定	18
2-2 ゼータ電位測定	22
2-3 ADP内包量測定	27
2-4 外水相ADP濃度測定	33
2-5 脂質組成の測定	37
2-6 H12-ベクターの定量	40
2-7 Endotoxinの定量	43

図5. 調製SOPの抜粋(1)

H12-(ADP)リボソームの調製SOPの抜粋	
6.4.14	使用器具をADP溶液で洗う。
6.4.15	$\phi=0.2\mu\text{m}$ フィルターをピンセットを用いてセットし、エクストルーダーを組み立てる。
6.4.16	6.4.6から6.4.9の操作を行う。
6.4.17	時間に余裕があれば、次の6.5.3の作業まで一気に進めると、すぐに超遠心を始めることができる。
6.5	クロスフローによる洗浄
6.5.1	500mL三角フラスコ1個と1000mLビーカー3個を中性洗剤で洗浄し、オートクレーブする。
6.5.2	リボソーム溶液を50mLチューブに入れる。
6.5.3	Vivaflow200と1000mLのビーカー2個を図7.2.3のように接続する。(但本のチューブがつかないビーカーを①、1本のチューブがつかないビーカーを②とする。)なお、ビーカー等とチューブを接続する際は、接続口が漏出しにくいようにアルミホイルでふたをする。(これは以降の全ての操作に共通する。)
6.5.4	1000mLの純水を①の1000mLビーカーに入れた後、ダイヤル1に合わせ装置を稼働させ、200-400mL/minの速度で②のビーカーに400mL溜まるまで流す。
6.5.5	6.5.4と同様にして50mLチューブに50mLのDPBSを入れ、25-50mLのDPBSを流し出し、Vivaflow200の流路をDPBSで置換する。
6.5.6	①のビーカーをリボソームサンプルが入っている50mLチューブに変更する。
6.5.7	ダイヤルを2に合わせ、リボソーム溶液の濾過を行う。
6.5.8	①の50mLチューブ内のリボソーム溶液が10mL減少した時、新たに10mLのDPBSを加える。

図6. 調製SOPの抜粋(2)

7.2.2 エクストルーダーと窒素ポンプ接続



図7. 調製SOPの抜粋(3)

H12-(ADP)リボソームの調製チェックリストの抜粋

Extrusion (担当者:)		日付:)	
順序	項目	確認内容	確認
1	Extruderの準備	1mL ADP溶液を量取し、注ぎ込む	○
2	フィルターの接続	1mL ADP溶液を量取し、注ぎ込む	○
3	窒素ポンプの接続	圧力が安定するまで接続	○
4	調整完了	OK	○
5	フィルターの洗浄	可	○
6	リボソーム溶液の注ぎ	可	○

Crossflow (担当者:)		日付:)	
順序	項目	確認内容	確認
1	装置を組み立て	確認済	○
2	洗浄	確認済	○
3	調整	確認済	○
4	サンプルの注ぎ	1. チューブの接続を確認する 2. チューブの接続を確認する	○
5	注ぎ完了	圧力、濃度、温度を確認し、リボソーム溶液の注ぎ完了	○
6	注ぎ完了	OK	○
7	注ぎの濃度測定	OK	○
8	注ぎの濃度測定	OK	○
9	注ぎ完了	OK	○
10	洗浄	圧力が安定するまで接続	○

図8. 調製SOPの対するチェックリストの抜粋

3) H12-(ADP)リボソームの物性評価に関するSOP、チェックリストの作成

物性評価の項目は、粒径、ゼータ電位、ADP内包量とADP漏出量、H12担時量とH12漏出量、脂質組成比、エンドトキシン値であり、分子集合体の製剤(リボソーム製剤)ならではの項目が殆どである。図9にそれらのSOPの抜粋を示した。特に、リボソームに内包、担持されている物質はリボソームと共に分離できるが、そこからの物質の定量においてはリボソームを界面活性剤と加熱によって完全に可溶化することが必要で

ある。また、可溶化剤添加が測定値に及ぼす影響も考慮しなければならない。エンドトキシンもリボソーム膜に取り込まれるので可溶化操作ならびに影響考慮が必要である。機器分析が殆どであるために、測定データは装置に接続されたPCに取り込まれ、エクセルファイルとして取り出せる場合、専用のソフトで処理され接続PC内あるいはプリントアウトしないと取り出せない場合がある。前者は画面コピーし、後者はプリントアウトされたものをスキャナーで取り込む作業が必要である。これらのデータを専用の図11の様にエクセルデータシートに取り込み、数値データを入力すると自動的に検量線を描いたり、定量値を算出してスペックシートに反映されるプログラムを構築した。そして、そこに入力するサンプル名、ファイル名の付け方も明確なルール付けを行った。この様に測定データをきちんと記録した上で、スペック表を作成することで適及可能なシステムとした。スペックから外れた場合には赤字で示され、全ての研究者にも共有されると共に、チェックリストよりSOPからの逸脱があったのか、SOP自体に問題があったのかを検討する。

H12-(ADP)リボソームの物性評価SOP	
6.3	ADP内包量と外水相ADP量の測定
6.3.1	ゲル透過クロマトグラフィーのカラムを4回5mLのDPBSで洗浄する。
6.3.2	H12(ADP)リボソーム1mLをカラムに注入し、1mL DPBSが流出するのを確認する。
6.3.3	DPBSをカラムに注入し続け、1mLごとにフラクションに分けて分画する。1-4番フラクションをリボソーム分画、5-11番フラクションを外水相ADP分画とする。
6.3.4	使用するメスリンダー、1Lビーカー、3Lガロン瓶、シリンジ、50mL、バイエル瓶、ガラス瓶は中性洗剤を用いて洗浄をし、純水に置換して完全に乾燥させる。
6.3.5	ガラス瓶にメスリンダーを用いて純水270mLとメタノール30mLを入れる。
6.3.6	1Lビーカーに、リン酸水素ナトリウム12水 21.305g、リン酸二水素ナトリウム 4.536gを秤量し、入れる。
6.3.7	1Lビーカーにスターラーと蒸留水を970mL入れる。
6.3.8	トランプ内でシリンジを用い、トリエチルアミン 4.13mL、ずつを1Lビーカーに入れる。
6.3.9	アルミホイルで1Lビーカーにふたをし、試薬が完全に溶解するまで攪拌する。
6.3.10	膜透過フィルター(φ=0.45μm)を減圧ポンプにつなぎ、6.3.6の溶液をすべて濾過させ、洗浄、乾燥後の3Lガロン瓶に移す。また、50mL、バイエル瓶にアセトン30mL程度入れる。
6.3.11	HPLCカラム(TSKgel ODS-100V 5μm, 4.6mmID, 25.0cm)を装着し、HPLCとUVランプの電源を入れる。次に、接続されたPCを立ち上げ、解析アプリ「Millennium 3.2」をひらく。
6.3.12	送液Aに純水メタノール991の混合溶液をセットし、HPLCのStatus画面から「Direct Function」, 「Dry Prime」を選択し、実行する。
6.3.13	HPLCのStatus画面から「Direct Function」, 「Wet Prime」を選択する。条件は「7.5mL、2min」で実行する。

図9. 物性評価SOPの抜粋

H12-(ADP)リボソームの電位とADP定量のチェックリスト

電位の測定(組換え)		日付:	
項目	標準	検出値	単位
1	電位測定(組換え)	1.000	mV
2	電位測定(組換え)	1.000	mV
3	電位測定(組換え)	1.000	mV
4	電位測定(組換え)	1.000	mV
5	電位測定(組換え)	1.000	mV
6	電位測定(組換え)	1.000	mV
7	電位測定(組換え)	1.000	mV
8	電位測定(組換え)	1.000	mV
9	電位測定(組換え)	1.000	mV
10	電位測定(組換え)	1.000	mV
11	電位測定(組換え)	1.000	mV
12	電位測定(組換え)	1.000	mV
13	電位測定(組換え)	1.000	mV
14	電位測定(組換え)	1.000	mV
15	電位測定(組換え)	1.000	mV
16	電位測定(組換え)	1.000	mV
17	電位測定(組換え)	1.000	mV
18	電位測定(組換え)	1.000	mV
19	電位測定(組換え)	1.000	mV
20	電位測定(組換え)	1.000	mV

ADPの定量(組換え)		日付:	
項目	標準	検出値	単位
1	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
2	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
3	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
4	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
5	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
6	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
7	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
8	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
9	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
10	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
11	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
12	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
13	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
14	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
15	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
16	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
17	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
18	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
19	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL
20	ADPの定量(組換え)	0.000	mg/mL

図10. 物性評価SOPに対するチェックリストの抜粋

H12-(ADP)リボソームのADP定量データシート抜粋

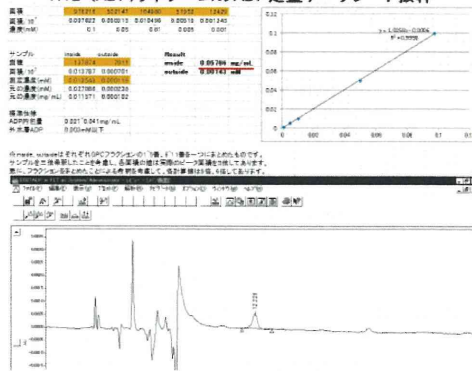


図11. 物性評価SOPに対するエクセルデータシートの抜粋(1)

H12-(ADP)リボソームの測定データシート抜粋

Sample Lot#	Diameter (nm)	DPotential (mV)	Lipid composition (mg/mL) DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG Lipids	ADP conc. (mg/mL)			Endotoxin conc. (EU/mL)
				2014/9/16	2014/9/24	2014/9/2	
F-HOK 14917	224.6±67.4	8.49±1.16	11.33/5.74/2.27/1.02	0.058	0.6	2.66	

図12. 物性評価SOPに対するエクセルデータシートの抜粋(2)