

# 次世代型抗体医薬品の合理的安定性予測法の開発

生物工学専攻 生物工学コース  
高分子バイオテクノロジー領域  
内山研究室 岡田 梨櫻

## 1. 研究背景

治療用抗体は、その高い安全性と有効性から、近年のバイオ医薬品開発において脚光を浴びている。治療用抗体は低分子医薬品に比べ、分子量が大きく構造も複雑である。そのため、抗体の安定性は適切な品質評価において重要であり、凝集傾向をモニターすることが求められている。この凝集体は患者の免疫反応に影響を与えると知られている[1]。これまでの品質評価では、静置試験や攪拌試験を行い、条件ごとに凝集傾向を個別に評価するという経験的なアプローチがとられてきた。

一方、これまでの研究により、凝集を引き起こす個々の現象に

ついての理解が進んできた。凝集原因としては、分子の分散性低下、構造変化、界面での変性が挙げられる。それぞれは物理化学的パラメータで示される安定性に関連し、第2ビリアル係数  $B_{22}$  で示されるバルク溶液中の抗体の分散性を反映する「コロイド安定性」、変性中点温度  $T_m$  三次で示される構造の安定性を反映する「構造安定性」、吸着量  $S$  で示される容器などの表面と接触したときの安定性を反映する「界面安定性」の3つが想定されている[2-4]。特に界面安定性は、固体表面への抗体の吸着量で評価できることが示唆されており、本研究室で凝集発生の原因の1つとして注目している[4]。しかしながら、吸着量と凝集発生傾向の定量的な相関解析は未だ明らかになっていない。さらに、これらの3つの因子が凝集傾向にどのように、またどの程度寄与しているのかについては、包括的な理解が得られていない。

本研究では、凝集因子として構造安定性・コロイド安定性に加え、本研究室で凝集発生の原因の1つとして注目している界面安定性の3つに着目し、これらの凝集傾向性への寄与度を明らかにした。本研究は異なる抗体の凝集傾向の違いを物理化学的パラメータに基づいて解釈できる可能性を示唆しており、安定性試験を行うことなく製剤の最適化を行える可能性がある。今後、新たな処方条件の検討・提案アプローチに繋がることを期待される。

## 2. 実験方法

ペプチドリンカーを含まない抗体 Ab-1 と含む抗体 Ab-2 を、pH、塩濃度の組み合わせで製剤化した。製剤化条件下での2つの抗体の物理化学的パラメータは、動的光散乱法（コロイド安定性）、ナノ示差走査蛍光光度測定（構造安定性）、および本研究で確立した吸着定量法（界面安定性）によって評価した。一方、凝集傾向も評価した。振とうストレスを2種類の異なる製剤下で2つの抗体に加え、ストレスによって減少するモノマーの残存率をサイズ排除クロマトグラフィーで評価した。最後に、物理化学的パラメータを入力変数、凝集傾向を出力変数として相関分析および予測モデルの作成を行った。

## 3. 物理化学的パラメータの取得

コロイド安定性については、pHが高いほど低い  $B_{22}$  値を示したことから、コロイド安定性は高pHの方が高いといえる。また、いずれの製剤条件においても、より高い  $B_{22}$  値を示す傾向にあった Ab-1 は Ab-2 よりもコロイド安定性が高いといえる。一方、Ab-1 も Ab-2 も pHが高いほど高い  $T_m$  値を示したことから、両者

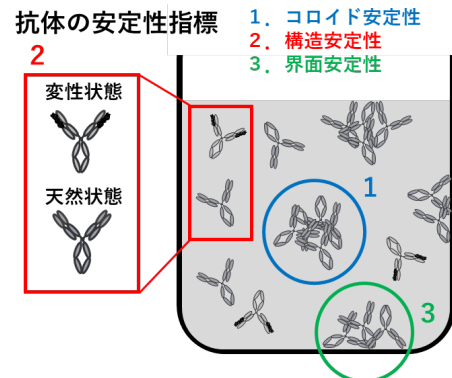


図1: 3つの安定性指標

の構造安定性はpHが高いほど高いといえる。すべてのpHおよび塩濃度条件において、より高い $T_m$ 値を示したAb-2の方が高い構造安定性を持つことが示唆される。界面安定性に関しては、pH、塩濃度が高いほど吸着量は増加する傾向にあり、さらにAb-2はAb-1よりも吸着量が多かった。モノマー回収率はpH依存的に増加し、塩濃度が高くなるとわずかに低下する傾向がみられた。モノマー回収率はAb-1の方がAb-2より高いので、Ab-2は攪拌ストレスに対してより不安定であるといえる。

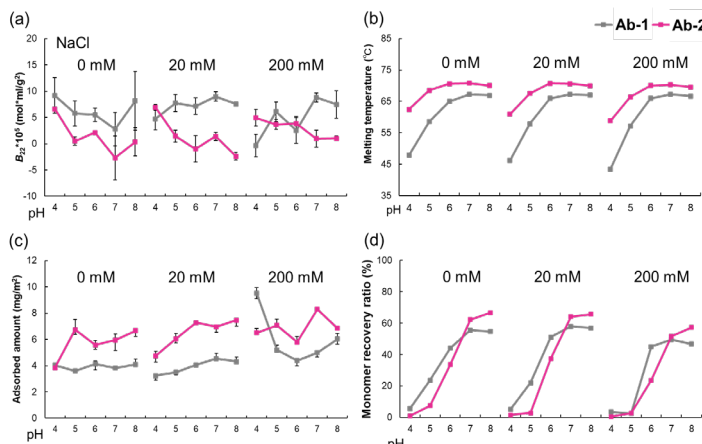


図2：(a)第2ピリアル係数【コロイド安定性】、(b)変性中点温度【構造安定性】、(c)吸着量【界面安定性】、(d)振とう条件におけるモノマー残存率【凝集傾向性】

以上より、モノマー回収率の良い処方条件を1つの物理化学的パラメータの評価結果から導くことは難しい。凝集を抑える処方条件決定のために、1つの安定性に注目して最適化するだけでは不十分であるといえる。各物理化学的パラメータが組み合わさって凝集形成に寄与している可能性が示唆された。

#### 4. 凝集傾向性に対する物理化学的パラメータの寄与度解析のための予測モデル作成

凝集傾向と物理化学パラメータの関係を定量的に確認するために、多変量解析を行った。最小二乗モデル分析を行ったところ図3の結果が得られ、3つの物理化学的パラメータで振とうによるモノマー回収率を予測できることが示唆された。各パラメータの寄与度を比較すると、いずれの抗体においても $T_m > S \geq B_{22}$ の順であり、構造安定性が凝集傾向に最も寄与していることを示唆している。Ab-1の各パラメータの寄与率は、表aの通りであった。このことは、 $B_{22}$ が高く、 $T_m$ が高く、吸着が低い条件では凝集が起りにくいことを示している。これは、 $B_{22}$ が高いと分子間の分散性が高く、 $T_m$ が高いと構造安定性が高く、吸着が低いと界面変性が起りにくいいため凝集が起りにくいという説明と一致する。一方、Ab-2の場合の寄与は、表bの通りであった。これは、 $B_{22}$ 値が低く、 $T_m$ 値が高く、吸着が高い条件下では凝集が起りにくいことを示している。この結果は一般的に説明される凝集抑制とは逆の働きを示しており、凝集が抑制される具体的な状況を説明する結果にはなっていない。以上のことから、pHによらず高い $T_m$ を維持していたAb-2の凝集傾向は、コロイド安定性の増大と界面安定性の不安定化により悪化したと考えられる。

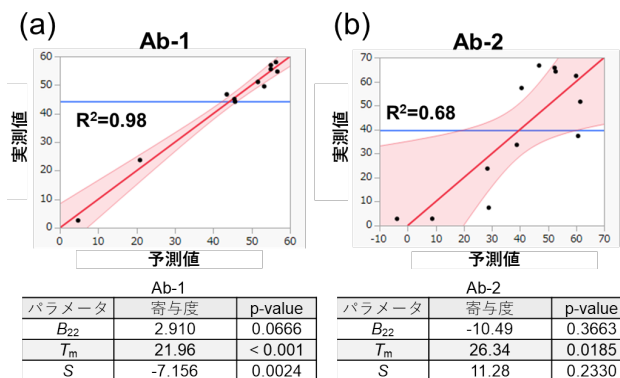


図3：(a)Ab-1と(b)Ab-2の予測可能性および凝集傾向に対する各パラメータの寄与度

Ab-1			Ab-2		
パラメータ	寄与度	p-value	パラメータ	寄与度	p-value
$B_{22}$	2.910	0.0666	$B_{22}$	-10.49	0.3663
$T_m$	21.96	< 0.001	$T_m$	26.34	0.0185
S	-7.156	0.0024	S	11.28	0.2330

#### 5. まとめと展望

本研究では、各抗体の物理化学的パラメータを用いて凝集傾向を予測することに成功し、界面安定性を含めた3つの安定性パラメータを総合的に評価することが重要であることが示された。いずれの抗体においても、凝集傾向に対して主な影響力を持つパラメータは構造安定性であった。一方で、パラメータの寄与は抗体の種類によって異なっていた。振とうストレスによる凝集傾向の違いを物理化学的パラメータに基づいて解釈できることを示唆しており、安定性試験を行うことなく製剤条件を最適化する戦略に可能性を与える。

[1] Moussa *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 2016. [2] Kim *et al.*, *J. Pharm. Investig.*, 2022. [3] Oyama H, *et al.*, *J Pharm Sci.*, 2020. [4] Yoneda S, Okada R *et al.*, *J Pharm Sci.*, 2021.