

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) PEG 化蛋白医薬の輸送/保管条件の最適化を目指した、
ストレス負荷下での各種 PEG 化蛋白質の品質評価
(英語) Quality evaluation of PEGylated proteins under various stress,
aiming for optimization of their transportation and storage conditions

研究開発実施期間: 平成 30 年 7 月 20 日から令和 3 年 12 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 長野 一也
(英語) Kazuya Nagano

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
(英語) Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

II 研究開発の概要

和文：

肝炎治療において、インターフェロン製剤の開発がブレイクスルーとなったように、切れ味鋭い活性を有する蛋白質医薬が台頭したことで、肝炎以外にも、がんや自己免疫疾患といった難治性疾患の治療効果が向上している。蛋白質医薬は、その開発の初期には生体内安定性の乏しさが懸念されていたものの、ポリエチレングリコール (PEG) によるバイオコンジュゲーションが契機となり、現在では数多くの蛋白質医薬が臨床応用されている。その一方で、蛋白質医薬自体は、バイオコンジュゲーションの有無にかかわらず、低分子医薬と比較して、熱や落下といった物理化学的ストレスに不安定であることが知られている。特に、アンプルやバイアルといった従来の容器に加えて、最近ではプレフィルドシリンジも汎用されている現在、これら製剤中の蛋白質医薬は、溶液状態で輸送されるため、落下や振動といったストレスを受けやすく、蛋白質由来の凝集体や、シリンジ内壁に塗布されているシリコンオイル由来の微粒子が容器中で形成される可能性が報告されている。さらに、シリコンオイルと抗体の複合体として形成された微粒子は、炎症性サイトカインの産生の促進や Fc γ 受容体の活性化などの応答を引き起こすことが報告されており、蛋白質の物理的特性の変化が生体応答の変化につながる可能性があることを示している。そのうえで、ペギネサチド (PEG 修飾エリスロポエチン受容体作動性ペプチド) 製剤では、実際にアナフィラキシーが発現し、製品の回収に至っている。その後の解析から、バイアル中で多くの微粒子が検出され、それらがアナフィラキシー誘発に関与した可能性も提示されている。したがって、これまで以上に、蛋白質医薬中に含まれる微粒子の管理が重要になっており、微粒子形成の要因の一つとして、輸送時の品質管理が挙げられる。しかしながら、PEG による蛋白質のバイオコンジュゲーションに関する研究はこれまで、被修飾体の抗原性や免疫原性の低減など、PEG の有用性追求を目的とした解析がほとんどで、PEG の長さや修飾数などを変化させた際の血中半減期の変動などが評価されてきたに過ぎない。本観点から、蛋白質医薬の輸送時の品質担保を目指し、PEG 化蛋白質医薬の活性が損なわれることなく、患者に有害反応も引き起こさないためには、落下ストレス下における PEG 化蛋白質の物性や動態、生体応答に関する体系的理解が求められている。特に、現状、市販および臨床開発されている PEG 化蛋白質医薬では、種々の生理活性蛋白質に対して、様々な分子量および数の PEG が使用されているため、これら PEG 化の違いが与える影響も踏まえて評価する必要がある。そこで本研究では、Ovalbumin (OVA) をモデルに、PEG の分子量や修飾数の異なる PEG 化 OVA (PEG-OVA) を作製し、落下ストレスを与えた際の「物性」、「動態」、「生体応答」の変化を追究することで、高品質な PEG 化蛋白質医薬の開発や、輸送法の提言に向けた情報の収集を試みた。具体的には、PEG の分子量や修飾数の異なる PEG-OVA に落下ストレスを负荷したうえで、物性変化の指標として、シリンジ内の微粒子形成を解析した。さらに、動態・生体応答変化の指標として、PEG-OVA をマウスに投与した際の抗 PEG 抗体の産生および PEG-OVA の血中滞留性を評価し、微粒子形成の程度と比較した。

まず、5 kDa と 20 kDa の PEG-NHS を異なるモル比で OVA と反応させ、PEG の分子量および修飾数の異なる 4 種の PEG-OVA を作製し、サイズ排除クロマトグラフィーで精製した。また、作製した PEG-OVA をマウスに尾静脈内投与したところ、既存の報告同様、PEG の分子量が大きく、修飾数が多い PEG-OVA で血中半減期が長かったことから、動態学的観点からも、PEG を適切に修飾できていることを確認した。そこで、各種 PEG-OVA に落下ストレスを负荷し、フローイメージング法により微粒子数を定量したところ、各 PEG-OVA 溶液中で蛋白質由来やシリコンオイル由来の微粒子が観察された。また、その微粒子数は、大きな PEG を修飾した OVA ほど、多くなることが示された。次に、微粒子形成が多く認められた 20 kDa PEG-OVA をマウスに尾静脈内投与し、抗体産生を評価した。その結果、まず、落下ストレス负荷の有無にかかわらず、PEG の修飾数が多い 20 kDa PEG-OVA 投与群では、修飾数が少ない PEG-OVA 投与群に比較して、血中の抗 PEG 抗体量が増加した。そのうえで、落下ストレスを负荷した群では、负荷していない群に比較して、抗 PEG 抗体の産生が顕著に高くなることが示された。抗 PEG 抗体の産生によって、次回投与時の血中滞留性が減少すること (Accelerated Blood Clearance : ABC 現象) が知られているため、最後に、20 kDa PEG-OVA をマウスに反復投与した際の PEG-OVA の血中滞留性を比較解析した。まず、

PEG の修飾数が少ない 20 kDa PEG-OVA 投与群について、1 回目に落下ストレスを負荷していない PEG-OVA を投与した場合、2 回目投与後の血清中 PEG-OVA 濃度は、単回投与群と比較して変化は認められなかった。その一方で、1 回目に落下ストレスを負荷した PEG-OVA を投与した群では、2 回目投与後の血清中 PEG-OVA 濃度は、単回投与群と比較して有意に低下し、落下ストレスを負荷することで血中滞留性が減少することが示唆された。また、PEG の修飾数が多い 20 kDa PEG-OVA 投与群については、1 回目に落下ストレスを負荷した PEG-OVA の投与群のみならず、1 回目に落下ストレスを負荷していない PEG-OVA の投与群においても、2 回目投与後の血清中 PEG-OVA 濃度は、本実験系で検出できないほど低下した。これらの成果は、抗 PEG 抗体産生のプロファイルと相関していることから、1 回目の投与で誘導された抗 PEG 抗体に依存して、PEG-OVA が排泄されている可能性が示された。以上、OVA をモデルとした基礎研究ではあるものの、PEG-OVA が落下ストレスを受けることにより、PEG の分子量や修飾数に応じて、微粒子形成・抗 PEG 抗体産生・ABC 現象が起こりうることを提起した。

さらに、物性評価のみではあるものの、実用化されている PEG 化 G-CSF 製剤（20kDa の PEG が 1 分子修飾）についても落下ストレスを負荷することで、微粒子数が増加することが観察された。今後、本研究が基盤となって、様々な実用化 PEG 蛋白質が投与された際の抗体産生や ABC 現象惹起などが解析され、体系的理解によって、PEG 化蛋白質の適切な PEG 修飾の理解や、PEG 化蛋白質医薬品の輸送条件の設定など、適切な品質管理・保証につながることを期待される。

英文：

As the development of interferon has become a breakthrough in the treatment of hepatitis, protein drugs with sharp activity have contributed to the improvement of treatment outcomes in refractory diseases such as cancer and autoimmune diseases as well as hepatitis. Although there is concern that protein drugs have a poor biological stability in the early stages of development, bioconjugation with polyethylene glycol (PEG) has improved the biological stability and enabled the clinical application of many protein drugs. On the other hand, protein drugs, either with or without bioconjugation, have a poor stability under stress, such as heat and dropping, compared with small molecule drugs. In the current situation where pre-filled syringe formulations have been widely used, protein drugs in solution are susceptible to dropping or vibrating stress during transportation, and these stress conditions may induce the formation of protein aggregates or subvisible particles, including silicone oil (SO) droplets in the container. Thus, it is especially important to control the quality of protein drugs during transportation. In fact, it has been reported that antibodies might aggregate by dropping or vibrating, and the complexes of SO droplets with antibodies might cause immune responses, suggesting that changes in the physical properties of proteins can lead to changes in biological responses. Furthermore, it has been implied that higher concentrations of subvisible particles in the vials of peginesatide (PEGylated peptides binding to the erythropoietin receptor) might be related to the occurrence of anaphylaxis upon its administration. Many bioconjugation studies using PEG have focused on the improvement of PEGylated drugs, such as the increase in the half-life of PEGylated proteins in the blood achieved by increasing the length of PEG or the number of conjugations. Thus, protein drugs comprising long PEG conjugates or many PEG moieties have been developed. However, changes in physical properties and unintended biological responses of PEGylated proteins under dropping stress have not been understood. For a properly produced PEGylated protein drug to be administered to patients without reduced activity and without causing an adverse reaction, it is necessary to understand the physical properties and biological responses of PEGylated proteins under dropping stress. Here, we prepared four PEGylated ovalbumin (PEG-OVA) molecules conjugated with different lengths (5 or 20 kDa) and numbers (large [L] or small [S]) of PEG and then analyzed the formation of subvisible particles regarding changes in physical properties and antibody production/clearance regarding changes in biological responses under dropping stress.

Under dropping stress, particle concentration analysis using flow imaging demonstrated that the particle concentration of PEG-OVA solutions was significantly higher than that of OVA solutions. In particular, the particle concentration was higher for the larger PEG modified OVAs (20 kDa PEG-OVA). It has been reported that protein aggregate is one of the product-related factors to induce immune responses, such as the production of anti-protein drug antibodies. In addition, it is known that the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon may be observed; that is, excretion of PEGylated proteins by their IgM antibodies induced at their first administration occurs rapidly upon the second administration, even without aggregate formation. Thus, PEGylated protein aggregates could conceivably promote antibody production and clearance. Anti-PEG IgM titer analysis after the intravenous administration of 20 kDa PEG-OVA (L) and (S) into mice, showed that the production of anti-PEG IgM was significantly enhanced in the groups treated with 20 kDa PEG-OVA (L) or (S) with dropping stress, compared to the groups without dropping stress. In particular, the titer of anti-PEG IgM antibodies was higher in the group treated with 20 kDa PEG-OVA (L) with dropping stress compared to the group treated with 20 kDa PEG-OVA (S). Finally, we investigated the effect of dropping stress on clearance of the second dose from the body. In the condition without dropping stress at the first dose, the PEG-OVA concentration in the 20 kDa PEG-OVA (S)-administration group was not significantly changed compared to that in the single administration group. On the other hand, the concentration in the 20 kDa PEG-OVA (L)-administered group was significantly lower than that in the single administration group. Under the condition of dropping stress at the first dose, both concentrations in the 20 kDa PEG-OVA (S)- and 20 kDa PEG-OVA (L)-administered groups were markedly decreased compared to those in the single administration group. These findings suggest that the ABC phenomenon might be induced more severely due to the production of anti-PEG IgM antibodies by the administration of 20 kDa PEG-OVA, containing more particles at the first dose.

These findings could provide insights into proper transportation conditions to ensure the quality of PEGylated protein drugs.