

Fundamental studies on deterioration of pharmaceutical humanized IgG - the effect of buffer, contribution of conformational stability and chemical cleavage in heavy chain constant region 2 domain, and detection of deamidated site of IgG -

亀岡, 大介

<https://doi.org/10.15017/1560387>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

Fundamental studies on deterioration of pharmaceutical humanized IgG – the effect of buffer, contribution of conformational stability and chemical cleavage in heavy chain constant region 2 domain, and detection of deamidated site of IgG –

医薬品ヒト化型 IgG の劣化に関する基礎的研究

—緩衝液の効果、構造安定性と重鎖定常領域ドメイン 2 の化学的切断の関係およびデアミド化部位の検出—

中外製薬株式会社 CMC 開発部 亀岡 大介

【目的】

ゲノム創薬研究の進展により多くの疾患関連分子が発見され、特定の分子と特異的に結合する抗原抗体反応という性質を有する蛋白質である抗体を用いた治療法が注目されている。抗体のヒト化技術は、抗体のほぼ全てのアミノ酸配列をヒトと同一にすることで、抗原性が大幅に低下させることから、副作用が少なく高い治療効果を得ることが可能となった¹⁾。また、抗体のヒト体内での動態を最適化するための抗体分子改変技術が確立され、これまでアプローチが難しかった抗原に対する改良型抗体の適用が進められている²⁾。その結果、抗体医薬品は 2015 年段階で世界の医薬品の総売り上げのトップ 10 のうち 5 品目を占めており、本邦においても慢性、難治性疾患の治療には欠かせない医薬品となりつつある。2005 年に国内発の抗体医薬品（トシリズマブ：インターロイキン 6 受容体の中和抗体）が製造承認を受け、その高い効果が実証されたことから、現在では多くの製薬企業が自社開発又は導入を実施している。

抗体を含む蛋白質を医薬品として応用する場合は、品質を安定に保持しうる製造及び保存条件の確立が重要となる。蛋白質医薬品の活性を保持するためには、低分子医薬品とは異なり、化学変化の抑制だけでなく、高次構造を native 状態に保持することが求められる。また、多くの抗体医薬品は 1 回当たりの投与量が 100 mg 以上となり高濃度溶液となることから、免疫原性等深刻な問題を引き起こす凝集体生成の抑制にも注意を払う必要がある。

そこで私は、抗体医薬品の劣化抑制手法を開発する観点から、溶液中におけるヒト化抗体の凝集及び分解を理解するための一連の研究を実施した。まず、緩衝液種が熱処理後（60°C 及び 80°C）におけるヒト化抗体の凝集及び分解に及ぼす影響を評価した。次に、安定性の異なる 2 種類の緩衝液にてヒト化抗体安定性に対する溶液 pH の影響を評価し、熱処理条件による安定性の pH プロファイルの違いを確認した。また、分光学的手法及び熱力学的手法を用いて、ヒト化抗体の構造安定性が凝集に及ぼす寄与を明らかにした。また、酸性下で起こるヒト化抗体の分解として重鎖定常領域ドメイン 2（C_{H2} ドメイン）に存在する Asp-Pro 配列切断反応の存在を示し、抗体の構造安定性が本反応の抑制に寄与することを明らかにした。さらに、蛋白質における主要な分解反応であるにもかかわらず、特異的な評価が困難であった Asn 残基脱アミド化及び Asp 残基異性化を検出するための分析法を確立し、抗体医薬品への応用の可能性を評価した。

【材料及び方法】

・本研究に用いた蛋白質

ヒト化抗体の安定性評価においては、中外製薬(株)より供与されたヒト化抗ヒト IL-6 レセプター抗体を用いた。また、Asn 残基脱アミド化及び Asp 残基異性化の検出技術開発においては、ニワトリ卵白リゾチーム（HEL）を用いた。

・ヒト化抗体の安定性評価用試料溶液の調製

抗体分子全体の安定性評価においては、各処方溶液にてヒト化抗体原液を希釈・透析し、タンパク質濃度 10 mg/ml の試料溶液を得た。断片化抗体である Fab 及び Fc の安定性評価においては、ヒト化抗体をパパイイン消化し、Protein A 及び陽イオン交換カラムを用いて精製し、各処方溶液にて透析することにより、タンパク質濃度 1 mg/ml の試料溶液を得た。緩衝剤種としては、リン酸、クエン酸、酢酸、イミダゾール、2-(N-Morpholino) ethane sulfonate（MES）、及び 3-(N-Morpholino) propane sulfonate（MOPS）を用い、緩衝剤濃度は 15 mM とした。溶液 pH は 4.0～9.0 の範囲となるよう調整した。

・ヒト化抗体の安定性評価

ヒト化抗体及び断片化抗体の溶液での安定性については、60°C-4週間もしくは80°C-2時間での熱加速試験により評価した。単量体残存率及び可溶性凝集体の生成量は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC-HPLC) により分析した。分解物の生成量は、還元系及び非還元系の SDS-PAGE により分析した。抗体分子の疎水性表面露出は、蛍光プローブである 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) の結合性を指標として評価した。具体的には、抗体とのモル比が 1:10 となるよう ANS を加え、励起波長 365nm における 470nm の蛍光強度を測定した。

・熱変性中間体の凝集性評価

ヒト化抗体溶液を 40°C から 90°C まで昇温することで得られる変性中間体の凝集性を、レイリー散乱に基づく散乱光強度を指標として評価した。タンパク質濃度が 500 µg/mL となるよう変性中間体を各緩衝液に添加し、340nm における散乱光強度を経時的にモニターした。

・Asp-Pro 配列切断速度の評価

ヒト化抗体の C_H2 ドメインに位置する Asp-Pro 配列切断速度を測定し、対応する一次配列をもつ 15 残基のペプチドと比較した。ヒト化抗体の切断速度は、SDS-PAGE 画像のデンストメトリー解析で得られる H 鎖残存率を指標とした。ペプチドのとして "VDVSHEDPEVKFNWY" からなる 15 残基を化学合成し、モル濃度及び緩衝液を抗体の評価時と揃えた条件で得られる未切断率を逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて評価し、切断速度を算出した。

・示差走査熱量分析 (DSC) による熱変性温度の評価

ヒト化抗体及び断片化抗体の熱変性温度は DSC により評価した。MicroCal 社製 VP-DSC を用い、試料のたんぱく質濃度は 0.5 mg/mL、40-105°C の温度範囲において昇温速度 0.5°C/min で測定した。

・HEL 強制劣化品の脱アミド、異性化部位の評価

脱アミド化もしくは異性化された HEL を多量に含む試料は、それぞれ 50 mM リン酸緩衝液 pH8.0 もしくは 50 mM 酢酸緩衝液 pH5.0 でインキュベートし、陽イオン交換クロマトグラフィーで精製することにより調製した。これらの試料は還元カルボキシメチル (CM) 化した後、同様に還元 CM 化した ¹⁵N 標識 HEL³⁾ を等モル量加え、Endoproteinase Asp-N (タカラバイオ) による酵素消化を行った。酵素消化後の試料について、Voyager Elite mass spectrometer (PerSeptive Biosystems) を用いて MALDI-TOF-Mass を測定した。

【結果及び考察】

1. ヒト化抗体の変性及び凝集に緩衝剤種が及ぼす影響⁴⁾

モル濃度を一定とした 6 種類の緩衝液についてヒト化抗体の熱処理後における凝集性に及ぼす影響を SEC-HPLC にて評価した。溶液 pH を揃えた条件での比較結果から、リン酸及びクエン酸緩衝液における高い凝集性が確認された。それに対して、MES、MOPS、酢酸及びイミダゾール緩衝液における凝集性は、先の 2 種類の緩衝液と比較して低かった。一方、DSC 測定における変性温度は何れの緩衝液でも差を認めなかった。また、散乱光を指標として熱変性中間体溶液の凝集性を経時的に評価したところ、MES 及び酢酸緩衝液における低い凝集性を確認できた (Fig.1)。これらの結果から、緩衝液種による凝集性の違いは変性温度ではなく、変性中間体の凝集しやすさに起因するものと考えられた。さらに、緩衝液間で凝集性が異なる原因をイオン強度で説明することはできなかったことから、緩衝剤と抗体分子の特異的な相互作用が凝集性に影響を及ぼしていることが示唆された。一方、抗体分子を

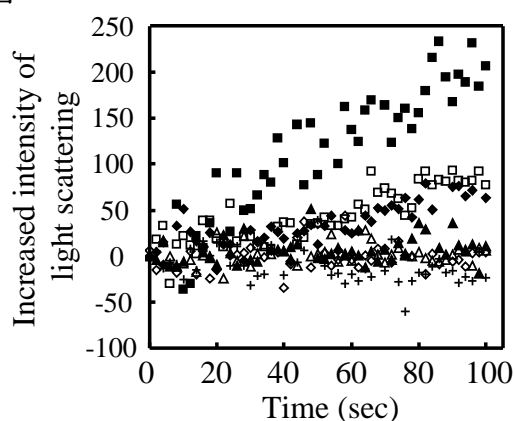


Fig. 1. Time courses of the light scattering intensity at 340nm after the heat-denatured intermediate addition in different buffer species: 15mM phosphate buffer, pH 6.5 (closed diamonds) and 5.5 (open diamonds), 15mM citrate buffer, pH 6.5 (closed squares) and 5.5 (open squares), 15mM MES buffer, pH 6.5 (closed triangles) and 5.5 (open triangles), and 15mM acetate buffers, pH 5.5 (crosses).

Fab 断片と Fc 断片にわけ、その変性過程及び凝集性について解析したところ、MES、酢酸及びリン酸緩衝液における Fc 断片の凝集性は抗体全体の場合と同様の傾向を示した。以上のことから、緩衝剤種が抗体の凝集性に及ぼす影響は、緩衝剤分子と抗体の Fc 領域間の特異的な相互作用が大きく寄与していることが示唆された。

2. ヒト化抗体の凝集に C_{H2} ドメインの構造安定性が及ぼす影響⁵⁾

pH4~9 の範囲におけるヒト化抗体の凝集性を SEC-HPLC にて評価した。緩衝液種として MES 及びリン酸を用い、熱処理は 60 及び 80°C の 2 条件で実施したところ、両熱処理条件間で異なる pH プロファイルが得られた。すなわち、80°C での単量体残存率は pH が低いほど高値を示した一方、60°C では pH6~7 にて最大値を示した (Fig.2)。これらの結果は、低 pH における C_{H2} ドメインの変性に起因する 1 段階目の変性温度の顕著な低下と、高 pH 側における変性中間体の高い凝集性に起因するものである。また、MES 緩衝液はリン酸緩衝液と比較して、80°C での pH4~5 及び 60°C での pH7 において、より低い凝集性を示した。また、pH5~6 の MES 緩衝液の 60°C 保存後においては、単量体残存量だけでなく可溶性凝集体量にも高値を示しており、リン酸緩衝液中で認められた不溶化が明らかに抑制された。

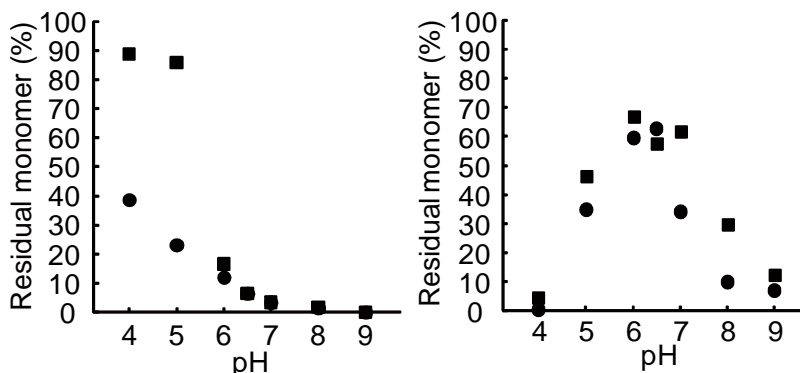


Fig. 2 The pH profiles of the residual percentage of monomer by SEC-HPLC after incubation of the humanized IgG1 in MES buffer (filled square) or phosphate buffer (filled circle) at 80°C for 2 h [left figure] and 60 °C for 4 weeks [right figure].

3. ヒト化抗体における断片化に C_{H2} ドメインの構造安定性が及ぼす影響⁵⁾

pH4~9 の範囲におけるヒト化抗体の低分子量分解物を SDS-PAGE にて評価した。緩衝液種として MES 及びリン酸を用い、熱処理は 60 及び 80°C の 2 条件で実施した。その結果、還元系 SDS-PAGE における H 鎖由来バンドの染色強度低下傾向と低分子側への新規バンド生成が 60°C 保存品において認められ、これらの傾向は酸性条件下において顕著であった。エドマン分解法で新規バンドの N 末端配列のシーケンスを行ったところ、C_{H2} ドメイン中の Asp272-Pro273 配列切断に起因することが分かった。そこで、抗体の Asp-Pro 配列の切断速度を相当する配列を有する 15 残基のペプチドと比較したところ 1/10 の値を示したことから、C_{H2} ドメインの高次構造安定性が Asp272-Pro273 配列切断の抑制に寄与していることが示唆された (Fig.3)。

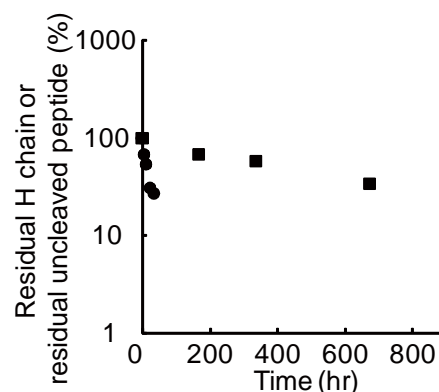


Fig.3 Time courses of the residual percentage of H chain (filled square) in an IgG1 solution and the residual percentage of uncleaved peptide (filled circle) in a solution of a peptide corresponding to the IgG1 H chain Asp-Pro sequence, during incubation at 60°C. Both solutions were prepared using 15 mM acetate buffer (pH 4.0)

4. Asn 脱アミド化及び Asp 異性化検出法の確立、及びヒト化抗体の化学分解評価に対する本検出法の有用性⁶⁾

MALDI/TOF-Mass を用いて、Asn 残基の脱アミド化及び Asp 残基の異性化の部位を簡便に検出する方法を確立した。これらの化学変化においては、分子量がほとんど変化しないことが問題となるが、

L- α -Asp 残基の N 末端側を特異的に切断する Endoproteinase Asp-N を用いることにより解決した。Asn 残基は脱アミド化されることにより Asp-N が切断する Asp に変化し、Asp 残基は異性化されることにより Asp-N が基質として認識できなくなる。即ち、Asp-N の切断部位数はこれらの化学変化により影響を受けることから、MALDI/TOF-Mass 分析において断片の分子量及び本数が変化することになる。ニワトリ卵白リゾチームの Asn 残基を Asp に置換した変異体を用いて本手法の適格性を評価したところ、消化部位の変化を確認できた。また、酸性条件下及び塩基性条件下で熱処理することにより生成する陽イオン交換 HPLC における未知ピークを評価したところ、各条件で起きる脱アミド化及び異性化についてその変化部位を同定できた。従って、抗体を含む蛋白質医薬品における主要な分解機構である Asn の脱アミド化及び Asp の異性化の検出に対する本手法の有用性を確認することができた。

【まとめ】

本研究では、MES 緩衝液が mM オーダーで存在することでヒト型抗体の凝集性が低下することを示した。この結果は抗体医薬品を培養、精製、保存することにおいて有益な知見であった。また、ヒト型抗体の定常部に存在する Asp-Pro 配列が、抗体医薬品の精製に用いられる弱酸性において、抗体の構造が壊れることによって速やかに切断されることを示した。さらに、抗体内に存在する Asn 残基のデアミドーション部位を検出可能な手法を確立した。これらの一連の研究結果より、抗体の保存中における劣化を抑制する溶液条件を探索する上で、高次構造安定性の寄与と特異的な分解反応評価の重要性を明らかにすることが出来た。これらの発見は、分子的視点からの抗体安定化メカニズムの理解につながるものであり、経験ベースで議論されることの多かった抗体医薬の分子設計及び製剤処方開発に対する理論的なアプローチへの応用が期待できる。

【引用文献】

- 1) Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. and Winter, G. *Nature*. (1988) 332, 323-327
- 2) Igawa, T., Ishii, S., Tachibana, T., Maeda, A., Higuchi, Y., Shimaoka, S., Moriyama, C., Watanabe, T., Takubo, R., Doi, Y., Wakabayashi, T., Hayasaka, A., Kadono, S., Miyazaki, T., Haraya, K., Sekimori, Y., Kojima, T., Nabuchi, Y., Aso, Y., Kawabe, Y. and Hattori, K. *Nat. Biotechnol.* (2010) 28, 1203-1207.
- 3) Mine, S., Ueda, T., Hashimoto, Y., Tanaka, T. and Imoto, T. *FEBS Lett.* (1999) 448, 33-37

【発表論文】

- 4) Kameoka, D., Masuzaki, E., Ueda, T. and Imoto, T. *J. Biochem.* (2007) 142, 383-391
- 5) Kameoka, D., Ueda, T. and Imoto, T. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2011) 164, 642-654
- 6) Kameoka, D., Ueda, T. and Imoto, T. *J. Biochem.* (2003) 134, 129-135

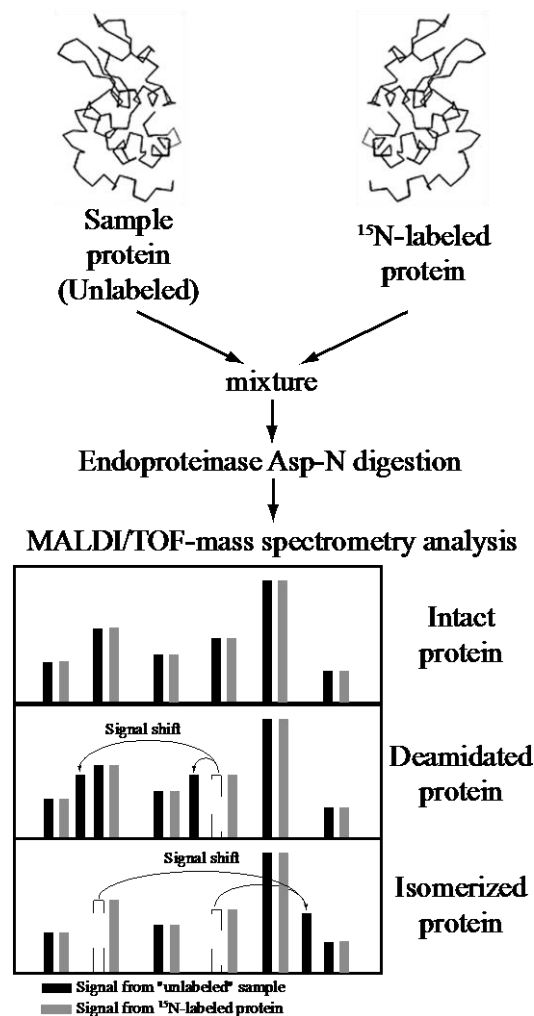


Fig.4 Outline for identifying position of deamidation and isomerization in sample protein, using endoproteinase Asp-N digestion, ^{15}N -labeled intact protein and MALDI/TOF-mass.