

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

(様式 9 - 3)

氏 名	亀岡 大介				
論 文 名	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 -				
論文調査委員	主 査	九州大学大学院	薬学府	教授	植田 正
	副 査	東京大学大学院	工学系研究科	教授	津本 浩平
	副 査	九州大学大学院	薬学府	准教授	浜瀬 健司
	副 査	九州大学大学院	薬学府	准教授	阿部 義人

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

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。そこで申請者は、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、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サイズ排除クロマトグラフィー（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、2-(N-morpholino)ethanesulfonate（MES）、3-(N-morpholino)propanesulfonate（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、示差走査熱量分析（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。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 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。これらの結果から、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。

次に、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。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、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。一方、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。

さらに、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。これらの化学変化では、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。

申請者は本論文で、MES等の緩衝剤がmMオーダーで存在することでヒト化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、ヒト化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残基のデアミデーショ部位を検出可能な手法を確立した。実際 Ohkuri らは本方法を用いて、ヒト化Fabの定常部において加熱によってデアミデーションしやすいアミノ酸残基を同定することに成功している(J.Biochem.2013)。従って、本方法は特に抗体医薬品の品質管理において重要であることが確認された。これらの結果は、抗体医薬品をインタクトのまま使用するために必要な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される。また、本研究が、抗体医薬品に関する学術的報告が散見される抗体医薬品開発の黎明期に実施されている点も学術的価値が高い。以上のことから、申請者に博士(創薬科学)の学位を授与することが適当である。