

高品質で安全な抗体医薬のための高度分析



研究室紹介

内山 進*

Biophysical analysis of antibody drugs for high quality and safety product

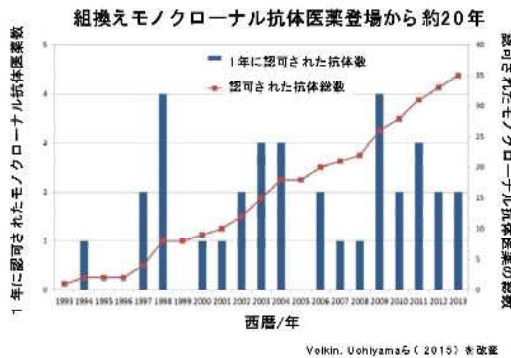
Key Words : Antibody, Biophysical characterization, Biopharmaceuticals Protein, Aggregation

1. はじめに

当研究室では、蛋白質の溶液物性をベースとしたバイオテクノロジー研究を進めているが、今回、特に抗体医薬の研究を中心に紹介を行う。

最近、抗体医薬の話題が再び増えているように思う。先日、2018年のノーベル賞受賞者が発表されたが、化学賞のスミス博士やウィンター博士は抗体の試験管内改変技術を生み出した研究者であり、医学生理学賞の本庶博士は抗体医薬の標的蛋白質を発見した研究者である。また、小野薬品工業がブリストルマイヤーズと開発したニボルマブ（オプジーボ）は、医療経済の観点からしばしば話題に上っている。最初に本格的な抗体医薬として登場したのは、血液の

がんであるリンパ腫の治療に効果を発揮するリツキシマブであり、米国では1997年に、日本では2001年に認可されている。したがって、抗体医薬の登場から約20年が経過したこととなる。この20年で40種類を超える抗体医薬が認可され（図1左）、売上額のランキングの上位を抗体医薬が占めるに至っている。さらに、抗体そのものの特許の有効期間が満了し、後発品であるバイオシミラーも登場しつつある。さらに、抗体が2種類の標的に結合可能な二重特異性抗体や、抗体に低分子薬物を共有結合させた薬物抗体複合体の開発も進められている。こうした状況から、抗体医薬の市場は今後も拡大すると見込まれている。抗体医薬は、標的への特異性が高く、



抗体医薬のメリットと懸念

メリット（作用）

- ホルモンなどの信号伝達
- ガン細胞の殺傷
- 炎症の抑制

懸念（副作用）

- 標的関連副作用
- 免疫の低下・混乱など

共通の課題

免疫原性

投与した薬剤が異物として認識される性質を持つこと

- ✓ 投与効果がなくなる
- ✓ 異物として認識されショック症状を誘発

図1 抗体医薬の認可数の推移（左）と品質における課題（右）



* Susumu UCHIYAMA

1971年2月生まれ
 大阪大学大学院薬学研究科分子薬化学専攻 (1999年)
 現在、大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 教授 博士(薬学)
 生物物理化学
 TEL : 06-6879-7441
 FAX : 06-6879-7442
 E-mail : suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

副作用の程度は低いと考えられており、そのため、開発が盛んに行われ、利用が進められてきた。実際、標的への特異性は高く、効果も高い。しかしながら、「免疫原性」と呼ばれる課題が抗体医薬に共通して存在することが、近年、認識されつつある（図1右）。抗体医薬は、バイオ医薬品の一種であり、その有効成分は蛋白質である。後に詳述するが、蛋白質の性質を長期間にわたって維持することは容易ではなく、

性質の変化が免疫原性へとつながる可能性が指摘されている。抗体医薬が免疫原性を持つと、患者に投与された抗体が異物として認識され、投与抗体の中和や排除のために、投与抗体に対する抗体が産生されるようになる。そうした状態になると、投与しても効果がなくなり、場合によっては、投与に伴いショック症状が引き起こされ、最悪の事態につながることもある。したがって、抗体医薬の高度分析による適切な管理と高品質化が求められている。

2. 抗体の分析

当研究室では、溶液状態の抗体医薬について高度分析法と安定化方法の開発に取り組んできた。蛋白質である抗体は、アミノ酸約1,320残基が共有結合した分子量が約150kDa、粒径は約15nmの生体高分子であり、糖鎖が付加された上で特有の立体構造を形成し機能を発揮する。抗体医薬は通常、2～3年の有効期限が設定されるが、蛋白質溶液をそれだけの期間、性質を変化させずに保存することは容易ではない。特に、製造、充填、輸送、保管の間に様々なストレスを受け、性質が変化する可能性がある(図2)。図3に示したように

蛋白質がストレスを受けると変性し凝集することは、卵白(蛋白質の語源)をお酢につける(酸変性)、攪拌する(界面変性)、加熱する(熱変性)、と白く濁ることから、容易に想像頂けると思う。また、溶液が入ったシリンジを落下させるとキャビテーションが発生し、蛋白質が凝集する(図3右)。このような従来は知られていなかった凝集経路も明らかとなりつつある[1]。当研究室では、抗体の性質について化学的性質と物理的性質の2つの側面から分析と安定化を行ってきた(図4)。化学的性質の分析では、一次構造の変化、すなわち構成アミノ酸の化学変化の定量的な解析が中心となる。抗体を構成するアミノ酸のうちアスパラギンとグルタミンは保存中に脱アミドを起こしやすく、また、メチオニンやトリプトファンが酸化することもよく知られている。特定の位置のアミノ酸の脱アミドや酸化は機能低下、

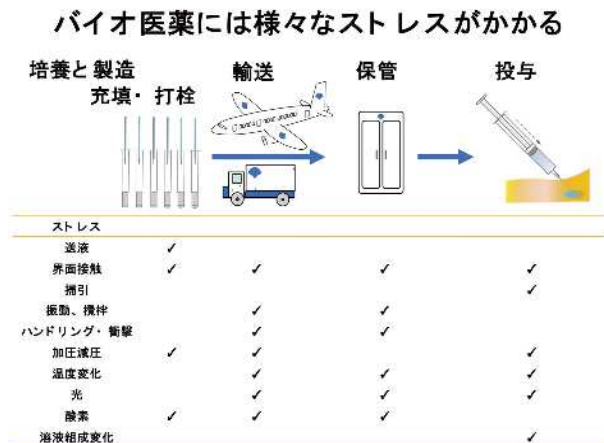


図2 製造から投与に至るまでに抗体医薬にかかる様々なストレス

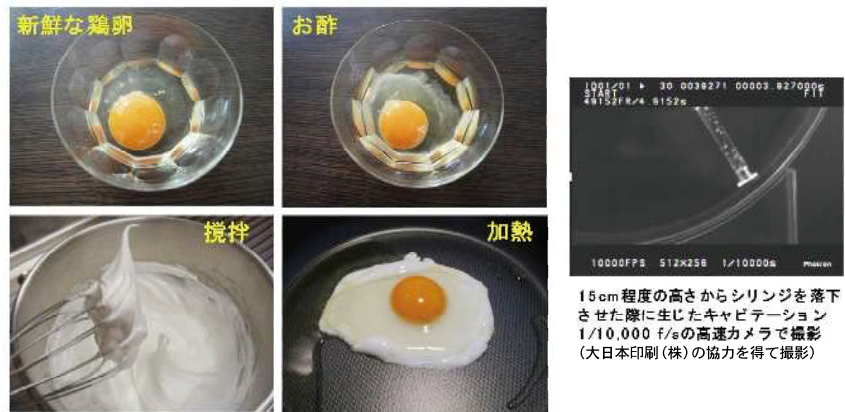


図3 ストレスによる蛋白質の変性の様子(左)とシリンジ落下時に生じるキャビテーション(右)

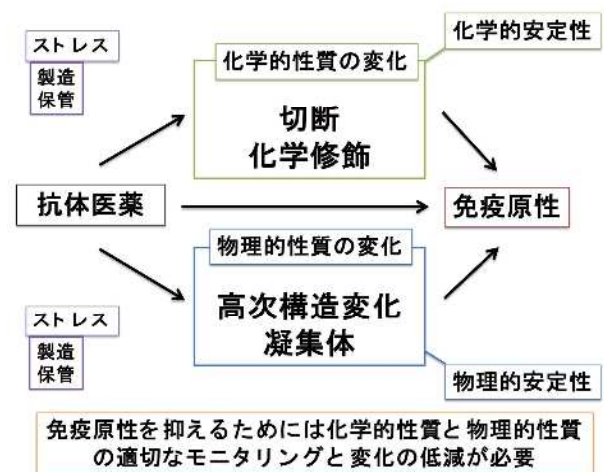


図4 化学的性質と物理的性質の両面からの抗体医薬の変化の解析

体内動態変化や免疫原性の原因となることから、化学変化を迅速かつ正確に特定し、抑制を行う必要が

ある。当研究室にて、加熱や露光時の一次構造変化について質量分析を用いて解析を行っていたところ、抗体医薬に2000ルクスの光を一定期間照射すると、特定の領域で32Daの質量増加を伴う化学変化が起こっていることが見出された [2]。質量分析を用いて詳細に解析を進めると、抗体の定常領域に存在するヒスチジン残基が2酸化されており、さらに、安定同位体 (H_2O^{18}) および複数の活性酸素産生条件での実験から、溶存酸素から酸素1分子、さらに、水分子から酸素1分子が付加されており、この反応には一重項酸素が関与していることが示された (図5)。ヒスチジン酸化はシトクロムにおいては報告されていたが、抗体では報告例はなく、さらに我々の研究から詳細な反応機構が初めて判明した。反応機構を考慮すると、溶存酸素量を減らせば酸化の抑制が可能である。他にも、pH8の弱塩基条件では定常領域のシステインのラセミ化が引き起こされること、そして、その反応には周囲のアミノ酸配列が寄与していることも世界で初めて見出し報告している [3]。このように正確かつ確実に抗体分子の化学変化について反応経路を含め明らかとすることは、機能低下の際の原因特定につながるばかりでなく、化学変化の抑制の実現にも寄与することとなる。

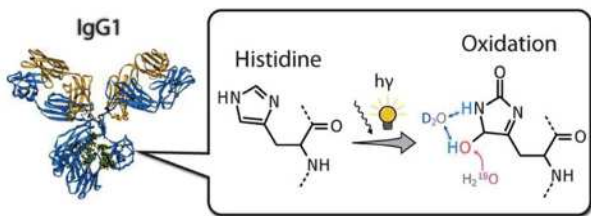


図5 光照射で起こる定常領域のヒスチジンの酸化 (Amano et al. 2014)

物理的性質の分析は、凝集体を含めた分散状態の定量解析と高次構造 (立体構造) 解析が中心となる。15nm程度の抗体が凝集すると数十nmから数十 μm の幅広いサイズの凝集体が生じる。現時点では、幅広いサイズの凝集体を一気に定量可能な方法は存在せず、サイズ毎に適した方法を複数種類使用する必要がある (図6)。100nm程度以下の可溶性の凝集体の定量については、超遠心分析が有効である。特に2005年頃から可能となった沈降挙動をあらわす2階微分方程式の数値解析を利用した超遠心沈降速度法 (SV-AUC) は非常に強力で、正確な凝集体定量が可能となっている [4]。また、創薬で必要となる細胞外受容体の多量体化解析や解離会合を伴う多量体化反応の解離定数決定でも当研究室ではSV-AUCを頻繁に利用しており [5, 6]、現在では、当研究室は超遠心分析で世界をリードしている存在となっている [7]。

100nm ~ 150nm を超えるサイズの蛋白質凝集体になると、ミー散乱を利用した定量的レーザー回折法 (qLD) が有効である。従来、qLDを蛋白質凝集体の解析に利用した例は皆無であったが、当研究室と島津製作所の共同研究により、実験的に求めた蛋白質凝集体の屈折率を解析に利用することで、150nm ~ 10 μm の幅広い範囲での分散状態解析が可能となっている [8]。また、1 μm 以上の凝集体はフローイメージング法 (FI) による定量解析が可能となっており、100万個/mL程度以下であれば、フローさせながら顕微鏡で凝集体を画像として捉え、コンピュータでイメージ解析を行うことで、定量的に濃度を決定し、同時に形態の分類を実現出来る。サブミクロンからミクロンサイズの凝集体が免疫原性

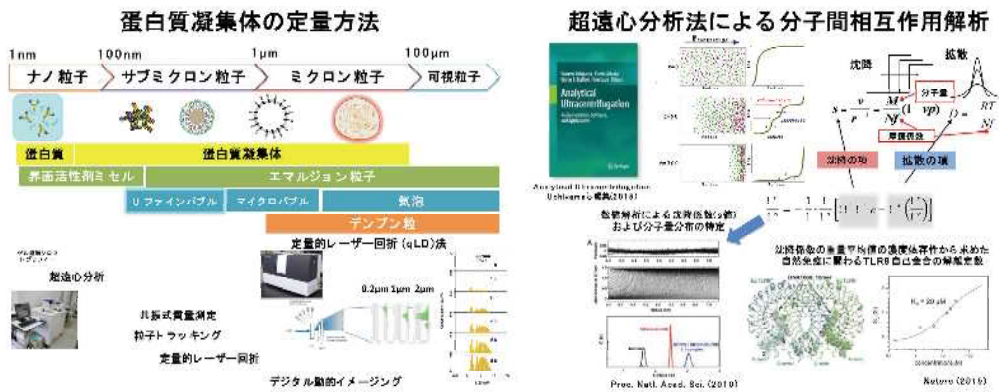


図6 サイズに応じた凝集体定量法 (左) と超遠心分析法の概要 (右)

のリスク要因として懸念されており、qLD や FI による定量解析が必須となりつつある。こうした凝集体の定量分析について、現在、国立衛生食品研究所や製薬企業とコンソーシアムを形成し、医薬品機構とも協力し、日本薬局方の改定を視野に入れながら、適切な手法の選択と方法開発に取り組んでいる [9]。

3. 凝集を防ぐための組成探索

抗体医薬が登場した当初は凍結乾燥剤が多くみられたが、近年はあらかじめ注射器に高濃度の抗体溶液を充填したプレフィルドシリンジ (PFS) が増えてきた。PFS は汚染リスクが少なく患者が自己注射できることから、患者および医療従事者の負担軽減へとつながる。しかしながら、高濃度溶液を準備して安定に保存可能な組成を探索するための合理的アプローチは知られておらず、これまでは経験に基づいた限られた条件での組成探索がもっぱら行われてきており、高濃度の蛋白質溶液の性質、特に凝集性や粘性、を予測する手法の開発が望まれていた。一方、当研究室では、高濃度で液液相分離を起こすような抗体溶液の場合、薄い濃度でも分子間に弱い引力が働いていることを見出ししていた。そこで、分子間に働く弱い相互作用を定量的に評価可能な第二ビリアル係数 (B_2) を低濃度溶液を用いて決定し、一方で高濃度溶液の凝集性および粘度を測定し、 B_2 との相関を求めることとした。その結果、 B_2 が大きく正の値を取る場合、すなわち分子間に強い斥力が働いている場合には凝集が起こりにくく、また、粘度上昇も抑えられることを見出した (図7) [10]。さらにイオン強度を変化させた際の B_{22} の変化から分子間に働く斥力の要因は、排除体積効果と静電相互

作用であり、特に、分子表面が均一に電荷を帯び静電相互作用による反発が生じた場合には分子間に強い斥力が働き凝集が起こりにくくなることが判明した [11]。逆に、たとえ総電荷としては電荷を帯びていても、不均一に電荷が分布している場合には引力が働き、その結果、高濃度の際に凝集しやすく、粘度が上昇しやすい傾向を持つことも分かった。こうして、コロイド安定性が高い溶液条件の選択が凝集を防ぐためには重要であり、また条件探索には B_2 が有効であり、闇雲に多数の溶媒条件を探索する必要が無いことが我々の研究から示された [10]。現在では、 B_2 を利用した溶媒探索は製薬企業において標準的な手法として利用されている。

4. 最適な投与デバイスの選択による高品質化

凝集経路が特定されるに伴い、溶液組成の最適化に加えて、適切な投与デバイスの選択も高品質な抗体医薬の創出に不可欠であることが分かってきた (図8)。例えば、PFS の場合、従来、ガラスシリンジが用いられてきたが、ガラスシリンジバレルの内側表面にはシリコンオイルが塗布されており、シリコンオイルを介した蛋白質の凝集が頻繁に起こる [13]。また、ガラスシリンジの場合、バレル表面に蛋白質が吸着しやすいため、プランジャーによる押出時に壁面に吸着した蛋白質が剥離され、凝集体として溶液に放出される。一方、シクロオレフィンポリマー (COP) のような樹脂製のバレルからなる PFS の場合、シリコンフリーであり、さらにガラスと比べ吸着量が少ないことから、凝集体の少ない抗体溶液を体内に投与できるというメリットがある。PFS における凝集体の発生要因は次第に明らかとなってきて

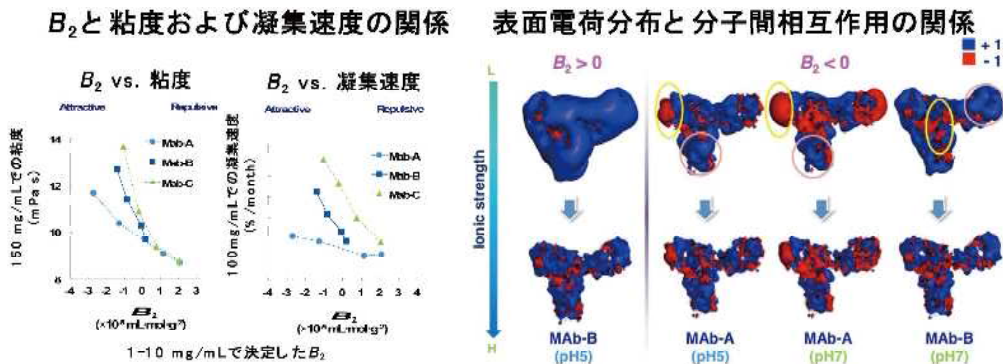


図7 B_2 と粘度および凝集速度の関係 (左) と表面電荷の均一度と B_2 の関係 (右)

おり (図9)、今後、更なる安全性の向上のためにPFSにはCOPシリンジが利用されるケースが増加すると考えている [13]。

抗体医薬の凝集経路と凝集予測パラメーター

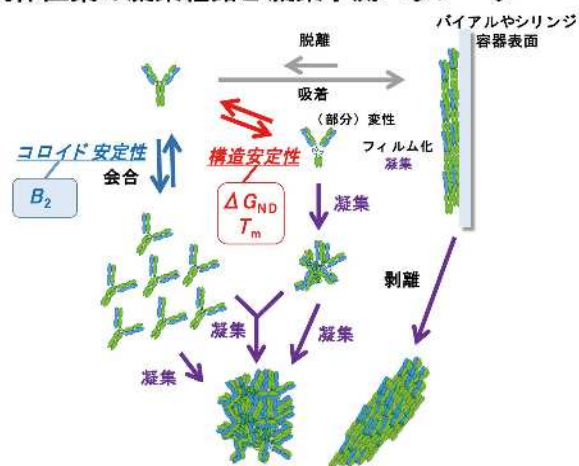


図8 抗体医薬の凝集に関連する3つの経路

抗体医薬 (PFS製剤) の凝集原因と抑制方法

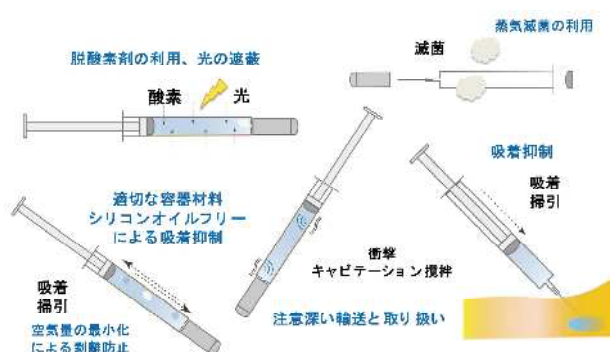


図9 プレフィルドシリンジにおける凝集体の発生要因と抑制方法

5. おわりに

以上、紹介したように、当研究室では抗体医薬の高度分析および高品質化を目指して、分析法の開発、さらに溶液組成の最適化から容器を含めた投与デバイスの開発に取り組んできた。今後、これまで開発した計測手法を食品にも適用し、食品工学分野への貢献も展開する予定である。

(参考文献)

1. Torisu, T., Maruno, T., Hamaji, Y., Ohkubo, T., Uchiyama, S. *J. Pharm. Sci.* **106**, 521-529 (2017).
2. Amano, M., Kobayashi, N., Yabuta, M., Uchiyama, S., Fukui, K., *Anal. Chem.* **286**, 7536-7543 (2014).
3. Amano, M., Hasegawa, J., Kobayashi, N., Kishi, N., Nakazawa, T., Uchiyama, S. and Fukui, K. *Anal. Chem.* **83**, 3857-3864 (2011).
4. Uchiyama S., Noda M., and Krayukhina E. *Biophys. Rev.* **10**, 259-269 (2018).
5. Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T. *Nature* **520**, 702-705 (2015).
6. Ohto, U., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Inoue, N., Shimizu, S. *Nature* **534**, 566-569 (2016).
7. Analytical Ultracentrifugation, Instrumentation, Software, and Applications, Uchiyama, S., Arisaka, F., Stafford, W.F., Laue, T. (Eds.), Springer (2016).
8. Yoneda, S., Niederleitner, B., Wiggenhorn, M., Koga, H., Totoki, S., Krayukhina, E., Friess, W., Uchiyama, S. *J. Pharm. Sci.* (2018).
9. Ishii-Watabe, A., Shibata, H., Harazono, A., Hyuga, M., Kiyoshi, M., Saitoh, S., Iwura, T., Torisu, T., Goda, Y., Uchiyama, S. *J. Pharm. Sci.* **106**, 3431-3437 (2017).
10. Uchiyama, S. *Biochim Biophys Acta.* **1844**, 2041-2052 (2014).
11. Saito, S., Hasegawa, J., Kobayashi, N., Tomitsuka, T., Uchiyama, S., Fukui, K. *Pharm Res.* **30**, 1263-1280 (2013).
12. Krayukhina, E., Tsumoto, K., Uchiyama, S., Fukui, K. *J. Pharm. Sci.* **104**, 527-535 (2015).
13. Maruno, T., Watanabe, H., Yoneda, S., Uchiyama, T., Adachi S., Arai, K., Sawaguchi, T., Uchiyama, S. *J. Pharm. Sci.* **107**, 1521-1529 (2018).