

ハイスループット CD システムを用いた抗体医薬品の 同一性確認試験および強制分解試験



企業レポート

鈴木 仁子*

Comparability assessment and forced degradation study of therapeutic antibodies
using high-throughput CD spectrometer

Key Words : Circular dichroism, therapeutic antibody, HOS (Higher order structure),
Comparability assessment, FDS (Forced degradation studies)

1. はじめに

近年、抗体医薬品の開発・製造・上市が盛んに行われている。抗体医薬品は、抗体の特徴である高親和性及び高特異性を利用して目的細胞に発現した抗原のみに結合することにより悪性腫瘍細胞の増殖や免疫細胞の活性を抑制するなどの治療効果を示す。このような抗体医薬品は癌などの未だ完全な治療ができない疾患に対し、有効な治療薬として期待されている。

多くの抗体医薬品が世界的に利用されており、イノベーターと呼ばれる先行抗体医薬品と共に、イノベーターと同じアミノ酸配列を有しながら、異なる発現細胞を利用して作製されたバイオシミラーと呼ばれる抗体医薬品も現在数多く利用され始めている。バイオシミラーは、イノベーターと同一アミノ酸配列のため、機能や構造も同一であると考えられる傾向にあるが、抗体はその作製工程において種々の刺激や修飾を受け、その結果機能が著しく損なわれる可能性がある。主なものとして、作製工程時の熱刺激やプロテアーゼによる断片化などが挙げられる。そのため、刺激や修飾による抗体構造の変化を簡便に測定することは、抗体医薬品の研究開発や品質管理において必須な工程である。ICH Q5E [1] では抗体医薬品の品質に関するガイドラインとして、製造工程変更前後での高次構造 (HOS) の同等性/同質

性を客観的に評価することが示されている。また、FDA [2]、EMA [3] を含む世界各国のガイダンス [4, 5] においても、イノベーターとバイオシミラーの HOS の比較や二次構造組成比を評価すべきであると記載されている。

また、抗体は共有結合および非共有結合を駆動力として高次構造を形成することで活性を発現するため、作製工程過程における抗体医薬品の分解メカニズムの知見を得ることは、品質、安全性、薬効に対するリスク、製造性の理解につながる。そのため、候補分子の選定から承認後までの各プロセスにおいて、強制分解試験が頻繁に実施されている [6, 7]。ICH Q5C [8] には生物薬品を対象とした安定性試験のガイドラインが示されており、加速・過酷条件における試験の重要性が述べられている。強制分解試験の主な刺激として、熱、凍結融解、攪拌、pH、光照射、酸化/還元、糖化があり、これらの刺激による抗体の物理化学的特性の変化を迅速に検出することは、抗体医薬品の研究開発や品質管理において極めて重要である。

円二色性 (CD) 分光法は、簡便に抗体の HOS の情報を取得できる手法であり、ICH Q6B において HOS を評価する手法として記載されていることから、抗体の品質を管理する測定法の一つとして幅広く利用されている [9]。これらのガイドラインの施行に伴い、抗体医薬品の CD スペクトルの同一性や有意差を客観的かつ高感度に評価できる手法が求められるようになってきた。

ここでは、多検体の CD スペクトルを連続測定できる HTCD Plus ハイスループット円二色性分散計と、スペクトル間の有意差を高感度に検出し、統計検定に基づいて判定することができる [qHOS] プログラム [10] を組み合わせて、Rituximab のイノベーターである MabThera (Roche 社製) とそのバイオ



* Satoko SUZUKI

1979年2月生まれ
大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻
博士前期課程修了 (2003年)
現在、日本分光株式会社 光分析ソリューション部 ソリューション技術課
課長代理 修士
専門/分光分析
TEL : 042-646-4109
FAX : 042-646-4126
E-mail : satoko.suzuki@jasco.co.jp

シミラーである RIABNI (Amgen 社製) について HOS の同一性確認試験を行った結果を報告する。さらに、MabThera に対して強制分解試験を行い、HOS 変化を統計的に判定した結果を報告する。

2. 測定・解析システム

2.1 HTCD Plus ハイスループット円二色性分散計

最大 192 試料 (96-well プレート使用時) を連続で測定できるシステムである。測定・流路洗浄・乾燥が全自動で行われ、抗体医薬品の同一性確認試験など、多検体の精密測定が要求される用途に有効である。



図 1. HTCD Plus ハイスループット円二色性分散計

2.2 [αHOS] プログラム

2つのスペクトルの違いを、重み付けユークリッド距離に変換し、スペクトルの差に化学的な意味があるかどうかを統計検定に基づいて判定し、同一性の確認を行うプログラムである。図2に本プログラムのスペクトル同一性検定スキームを示す。まず、イノベーターもしくは強制分解試験を行っていない標準試料のスペクトルと、バイオシミラーもしくはは

強制分解試験を行った試料のスペクトルを複数本取得する。そして図2のステップ1で試料スペクトル (U_i) と、標準試料の平均スペクトル (\bar{R}_i) の差の二乗を求め、なお、試料調製に由来する濃度のばらつきは HTCD Plus によって CD と同時に取得された吸光度を利用して自動補正される。次にステップ2で、ステップ1で得られたスペクトルに対し、装置に由来するノイズの大きさや、試料に刺激を与えることにより生じるスペクトル変化量の重み付けを行う。これにより、スペクトル間の差異を高感度に検出することができるようになる。そしてステップ3で、ステップ2で得られたスペクトルの平均値の平方根を求める。これを重み付けユークリッド距離と呼ぶ。この操作を試料のスペクトルの数だけ行うとともに、各標準試料スペクトルを U_i として同様の操作を行う。次に、得られた標準スペクトルと試料スペクトルの差異がノイズや試料の調製誤差によるものか、化学的な意味がある差かを統計検定を用いて判定し、同一性の確認を行う。図2には Welch の t 検定を用いた方法を記載している。

3. 測定結果

3.1 イノベーターとバイオシミラーの同一性確認試験

円二色性分散計を用いると、近紫外領域の CD スペクトルを測定することで三次構造の、遠紫外領域の CD スペクトルを測定することで二次構造の情報を得ることができる。ここでは、Rituximab のイノベーターである MabThera とそのバイオシミ

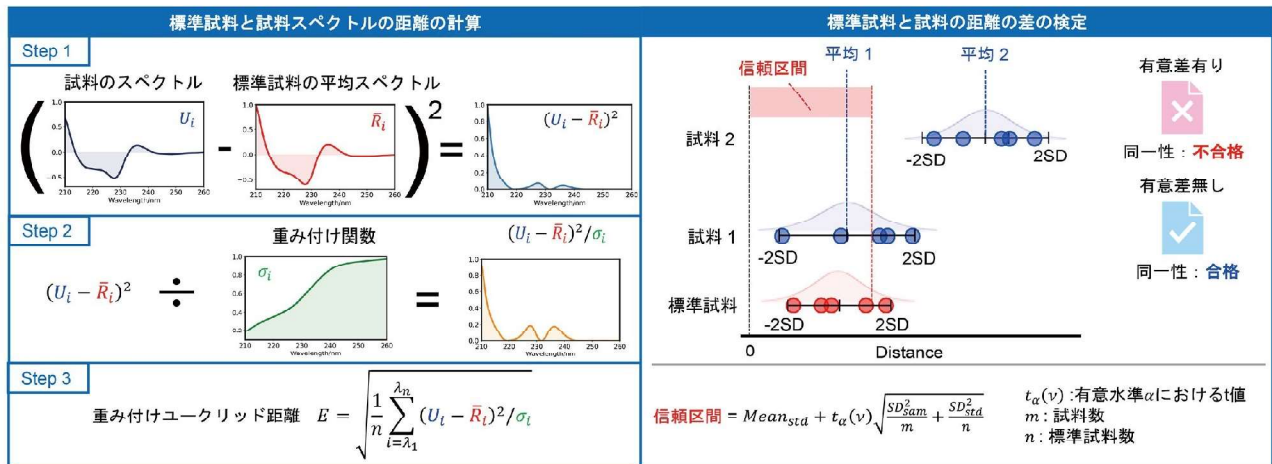


図 2. スペクトル同一性確認試験のスキーム

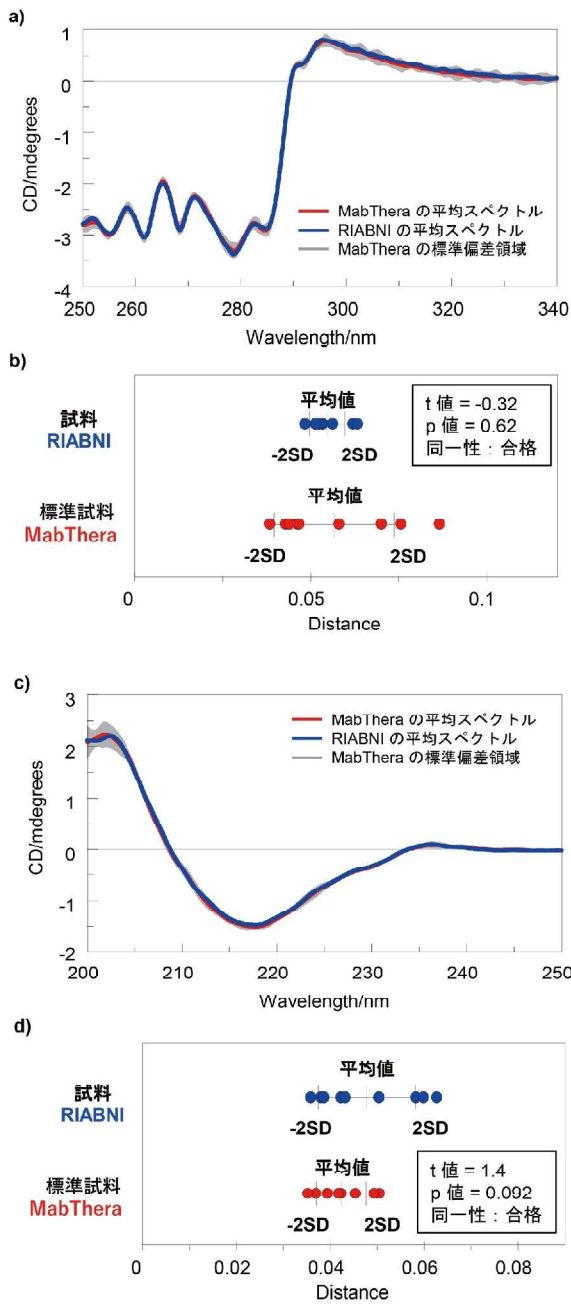


図 3. Rituximab のイノベーターとバイオシミラーの HOS 同一性確認結果
a), b): 近紫外領域の CD スペクトルと検定結果
c), d): 遠紫外領域の CD スペクトルと検定結果

ラーである RIABNI についてそれぞれ 9 試料測定を行い、同一性確認試験を行った。その結果、近紫外領域と遠紫外領域において、RIABNI の CD スペクトルと MabThera の CD スペクトルは極めて良く一致しており (図 3 a, c)、CD スペクトルから計算された両者の距離も近接していることがわかった (図 3 b, d)。t 検定の結果、p 値は有意水準として設定した 0.05 を上回り、RIABNI は MabThera に

対して同一の三次構造および二次構造を有していることを客観的に確認することができた。

3.2 抗体医薬品の強制分解試験

MabThera に対して光酸化処理および還元処理を実施し、強制分解処理前後の MabThera の遠紫外領域の CD スペクトルを 9 試料測定することで三次構造の同一性を判定した。強制分解処理を実施した CD スペクトルおよび同一性の検定結果を図 4 に示

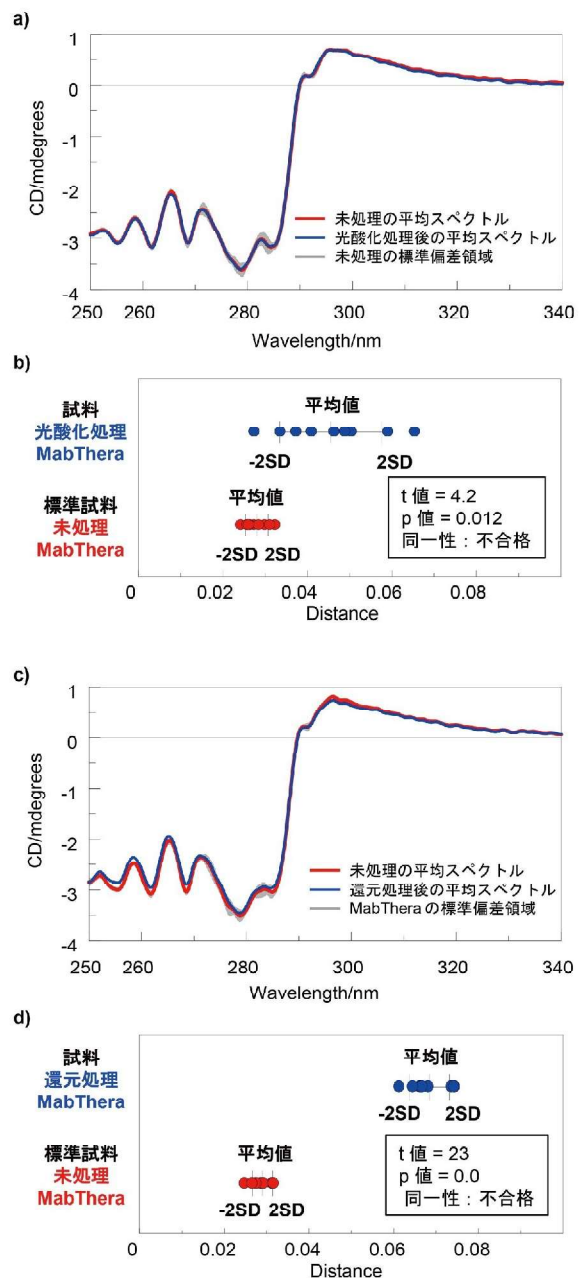


図 4. Rituximab のイノベーターに刺激を与えた試料の構造の同一性確認結果
a), b): 光酸化処理前後 CD スペクトルと検定結果
c), d): 還元処理前後の CD スペクトルと検定結果

す。光酸化処理および還元処理後のスペクトルは、標準試料とした未処理の **MabThera** のスペクトルに対して目視では大きな変化が確認されなかった (図 4 a, c)。しかし、標準試料と強制分解処理後の **CD** スペクトルから計算される両者の距離の分布は離れており、これらの距離に基づいた **Welch** の **t** 検定の結果、強制分解処理後の **CD** スペクトルは未処理の **CD** スペクトルに対して有意に差があり、同一性が認められないことを統計的に判定した。

4. おわりに

HTCD Plus と **[qHOS]** プログラムを用いることで、**Rituximab** のイノベーターである **MabThera** とそのバイオシミラーである **RIABNI** の **CD** スペクトルを自動測定し、三次構造および二次構造が同一であることを統計検定に基づき判定することができた。さらに、**MabThera** に光酸化および還元等の刺激を与えると、三次構造に有意な差が生じることを判定した。

このように **HTCD Plus** および **[qHOS]** を組み合わせることで、目視では判断することが出来なかった有意差を客観的に評価することができ、イノベーターに対するバイオシミラーの **HOS** の同一性の確認に加え、強制分解試験における抗体医薬品の **HOS** 変化の有無を正確かつ容易に評価できることを示した。

参考文献

- 1) International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH AUTHORIZED MANUFACTURING CHANGES FOR THERAPEUTIC MABS 833 Harmonised Tripartite Guideline Comparability of Biotechnological/ Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process Q5E, 2004
- 2) US Food and Drug Administration, Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations, 2019
- 3) European Medicines Agency, Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1), 2014
- 4) Department Biotechnol Govt. India, Guideline on similar biologics: Regulatory requirements for marketing authorization in India, 2012
- 5) Center for drug evaluation of China National Medical Product Administration, Technical guideline for development and evaluation of biosimilars, 2015
- 6) Christine Nowak, Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide, *mAbs*, 2017
- 7) Jennifer Halley, an Industry Perspective on Forced Degradation Studies of Biopharmaceuticals: Survey Outcome and Recommendations, *J. Pharm. Sci.*, 2020
- 8) International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH AUTHORIZED MANUFACTURING CHANGES FOR THERAPEUTIC MABS 833 Harmonised Tripartite Guideline Comparability of Biotechnological/ Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process Q5C, 1995
- 9) International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH AUTHORIZED MANUFACTURING CHANGES FOR THERAPEUTIC MABS 833 Harmonised Tripartite Guideline Comparability of Biotechnological/ Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process Q6B, 1999
papers/2011/06_barcelona_metro_innovation/06_barcelona_22_presentation.pdf
- 10) T. Oyama, S. Suzuki, Y. Horiguchi, A. Yamane, K. Akao, K. Nagamori and K. Tsumoto, *Appl. Spectrosc.*, 2022