

抗体医薬品の高次構造の健全性を評価する技術

本田 真也

筆者らが開発した人工タンパク質AF.2A1は、免疫グロブリンG (IgG) に結合する。ただし、天然型のIgGには親和性を示さない。物理的・化学的ストレスによって天然型高次構造が劣化したIgGに対してのみ特異的に結合する。このAF.2A1を人工リガンドとして利用した抗体医薬品の非天然型構造体の分析法を紹介する。

背 景

高次構造は医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドラインで推奨されているバイオ医薬品の品質試験項目の一つである¹⁾。しかし、同時にその技術的な限界も認識されている。たとえばICH Q6Bには、「高次構造を確定することはできないが、生物活性から高次構造が正しく形成されていることを推定できることが多い。このような場合には、生物学的試験を理化学的試験法に置き換えてもよい」と記されている¹⁾。高次構造に関しては適切な分析技術がないため間接的な手段により代替することを認める、という妥協に他ならない。無論、X線回折法や核磁気共鳴法など、タンパク質の詳細な立体構造情報を提供する分析技術は存在する。しかし、その解析には専門的スキルと長期間の検討を要する。バイオ医薬品の品質試験で常用するには、分解能や精度とともに簡便性や頑健性、迅速性も満足する必要がある。

高次構造が劣化した非天然型構造体は、バイオ医薬品の製造、保管、輸送などの際に生じうる目的物質由来不純物である¹⁾。これらは自発的に会合し種々のサイズの凝集体を形成することが知られている。凝集体は投薬障害などの物理的な支障のみならず、患者の免疫反応を惹起することに伴う奏効率低下や深刻な有害事象が懸念されている。凝集体と免疫原性の関係については、2006年のRosenbergの報告²⁾以降、重点的に研究が進められた。FDAは2014年のガイダンス³⁾で、それらを総括し以下を推奨している。

- ・製造者は凝集体の残留を可能な限り最小化する
- ・有効期限の設定では保管中の凝集体増加を考慮する
- ・種々のサイズ、様態に応じた複数の分析法を利用する
- ・凝集体の分析法は常に改良し進化させる
- ・日常的な出荷試験に適切なアッセイ法を確立する

不純物の分析では特異性と感度が重要である。共存する大量の目的物質の影響を受けずに、目的物質由来不純物のみを識別する能力が求められる。しかし、高次構造劣化の場合、組成も配列もまったく同一であるため、混入した微量の非天然型構造体を選択的に検出・定量することは非常に難しい。既存のタンパク質分析法では対処できない難問である。上述の簡便性、頑健性、迅速性に加えて特異性と感度も備わった新たな分析法の登場が望まれている。

着 想

筆者らは、基礎工学的関心から、進化分子工学の新しい方法論の研究を進めていた^{4,5)}。その過程で作出した人工タンパク質AF.2A1に上記に資する有望な性質があることを見いだした。そこで、この分子を抗体医薬品の高次構造評価技術に応用することを着想した。

AF.2A1は25アミノ酸残基で構成される人工タンパク質である。短鎖であるが水溶液中でフォールドし固有の立体構造を形成する。天然型高次構造を維持したIgGには親和性を示さないが、加熱や酸処理などの物理的・化学的ストレスを受けて天然型高次構造を部分的に失ったIgGに対して特異的に結合する^{4,6,7)}。

IgGの天然型高次構造 (すなわち正常型) に結合するタンパク質は複数知られている。しかし、非天然型高次構造 (すなわち異常型) を選択的に認識する分子はまれである。このAF.2A1の稀有な性質は、抗体の凝集化機構の解明、その鍵となるIgGの非天然型高次構造の特定にはもちろん、微量混入した不純物の分析にブレークスルーをもたらすに違いない、と筆者らは考えた。AF.2A1を利用すれば、簡便性、頑健性、迅速性、特異性、感度のすべてを満たすことができるのではないだろうか。

原 理

抗体の高次構造劣化メカニズムを分子レベル、原子レベルで明らかにすることは基礎応用両面に多大な寄与を与えられると思われる。しかし、個別事象の報告が多く、統一的理解はあまり進んでいない。IgGは分子量14万を超える巨大なマルチドメインタンパク質であるので、

* 著者紹介 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 (副研究部門長) E-mail: s.honda@aist.go.jp

複数の部位が独立に変化する可能性がある。結果的に複数のシナリオが並行して同時に進行しているのかもしれない。可変部位の配列は抗体ごとに異なる。その影響で抗体の高次構造の劣化は分子ごとに大きく変わるのかもしれない。一方、定常部位の配列保存性は高く、すべてのドメインはイムノグロブリン・フォールドという共通の主鎖骨格構造を形成している。共通の機序で劣化が進むステップがあるかもしれない。

AF.2A1はIgGの非天然型構造体に特異的に結合する(図1)。その結合様式の詳細は未だ不明だが、認識の汎用性は多角的な状況証拠で明らかになっている。AF.2A1は、複数の認可済み抗体医薬品に対して⁷⁾、ヒトIgGのすべてのサブクラスに対して、ヒトポリクローナルIgGに対して⁷⁾、ヒトを含む複数の種のIgGに対して結合する。また、加熱、攪拌、酸処理、還元剤処理、酵素消化などの多様な物理的・化学的ストレスを受けて生じた非天然型構造体に押しなべて結合する^{4,6,7)}。これらは、IgGの高次構造の劣化が共通のメカニズムを内包していることを示唆する。AF.2A1は、その共通の劣化部位を認識していると筆者らは考えている。これまでのところ、AF.2A1の認識部位はIgGのFc領域内にあることが分かっている^{4,6)}。今後、さらなる絞り込みを進める予定である。

AF.2A1は高次構造の劣化したIgGの単量体に対しても、それらが会合した多量体（凝集体）に対しても結合

する⁶⁾(図1)。これにより、劣化部位は単量体表面に局在していること、その部位が凝集体の内部にすべて埋没されない限りAF.2A1による凝集体認識が可能であることが推察される。実際、少なくとも直径1 μmまでの凝集体に結合することが明らかになっている⁸⁾。この粒子径は数千分子のIgGが会合したサイズに相当する。単量体を含む凝集前駆体⁸⁾(ナノオーダー)からサブミクロ凝集体(マイクロオーダー)まで、広い粒径範囲の被験物に適用できることは、本技術の際立つ特徴といえる。

AF.2A1による非天然型構造体の分析は、既存のリガンド結合アッセイ(LBA)法と組み合わせることで実現できる。筆者らは、これまでELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)、Alpha(amplified luminescent proximity homogeneous assay)、SPR(surface plasmon resonance)、BLI(bio-layer interferometry)と組み合わせた分析法を開発してきた^{6,7)}。これら以外にも、RIA(radio immunoassay)やフローサイトメトリーと組み合わせることで活用することが原理的に可能と思われる。

非天然型構造体に対するAF.2A1の親和性は解離定数 $K_D = 10^{-8}$ M程度である⁴⁾。これは1対1で結合させた際の値である。結合価数を増加させる工夫を施すと、たとえばAF.2A1を固定化した固相を用いて(固相表面に複数のAF.2A1が存在)、凝集体(粒子表面に複数の認識部位が存在)を処理した場合は、多対多の結合になり、見かけの親和性(アビディティ)は大きく向上し、実用上不可逆な結合を実現することができる。

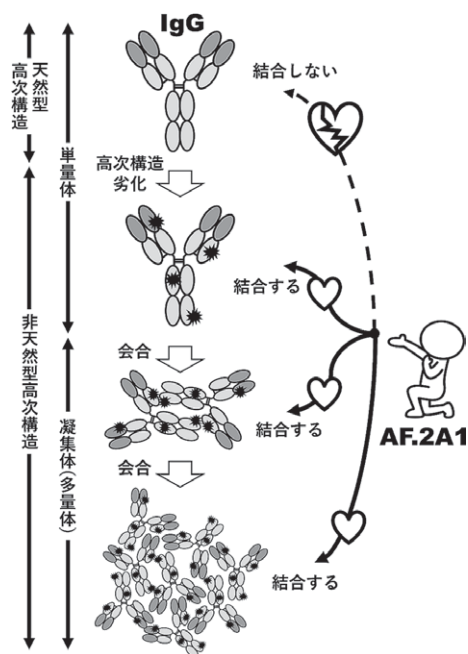


図1. 人工タンパク質AF.2A1の高次構造識別。IgGの非天然型構造体のみの特異的に結合する。粒子のサイズ(会合度)に関わらず結合することができる。

性能

特異性 本技術はヒトIgGの天然型高次構造体と非天然型構造体を識別する⁴⁾。ヒトIgGのすべてのサブクラスに適用できる。AF.2A1の認識部位は高次構造が劣化したFc領域である⁴⁾。

感度 本技術は天然型高次構造体に混入した微量の非天然型構造体を検出することができる。SPRでの検出限界は濃度0.1 μg/mL以下、相対比0.01% (w/w)以下⁶⁾。ELISAでの検出限界は濃度0.02 μg/mL以下、相対比0.01% (w/w)以下である。

定量性 純度100%の非天然型構造体標品の開発が未達のため、検量線を利用する絶対定量は今のところ困難である。ただし、現時点で以下の実施が可能である。一つはCFCA(calibration-free concentration analysis)の利用である。CFCAは、SPRのアプリケーションの一つで、検量線を用いずに定量することができる方法である^{10,11)}。ある治療用モノクローナル抗体1 mg/mLをCFCAで評価したところ、0.22 μg/mLの非天然型構造

体が含まれていることが示された⁶⁾。もう一つは非天然型構造体の含量が未知の試料を暫定的に標品として利用する方法である。凍結乾燥保存技術を活用することで純度未定ながら非天然型構造体含量が一定の標品を同一ロットで複数調製することが可能なので、標品の測定値で規格化すれば、被験物中の相対量評価ができる。

精度 1.5~200 µg/mLの濃度範囲の非天然型構造体をELISAで測定した際の変動係数は平均7.7%であった。

迅速性 SPRでは1検体当たり5分以内に測定できる。ELISAでは96検体当たり4時間程度で完了できる。洗浄工程が不要なAlphaScreen[®]を利用すると1時間あたり最大約1000検体の測定が可能である^{7,9)}。

簡便性 いずれかのLBA法を実施可能な設備環境が必要である。スキルに関しては、SPRまたはELISAの経験があれば問題なく実施できる。また、適切な指導があれば初心者も可能なレベルである。

頑健性 AF.2A1は物理的・化学的な安定性が高い。100°Cで煮沸しても室温に戻せば結合活性を復元する⁴⁾。200回程度のNaOH洗浄では結合活性は変化しない。抗体をリガンドとして利用するLBA法(すなわちイムノアッセイ)に比べて、リガンド失活に伴うリスクは低く、頑健性は良好である。

互換性 抗体医薬品の凝集体分析ではSEC(size-exclusion chromatography)が多用される。バイオ医薬品の安定性試験(加速試験)を模した実験系で、同一の被験物をSECと本技術(SPR)で比較測定し、ほぼ同様の結果を与えることを確認している⁶⁾。

優位性 タンパク質の立体構造情報を提供する分析技術は、前述のX線回折法や核磁気共鳴法に加えて、赤外吸収スペクトル法や円偏光二色性スペクトル法など複数あるが、いずれも混入した微量成分の分析は困難である。これに対し、本技術は相対比0.01%までの非天然型構造体の混入に対応できる。特異性と感度に優れている。

タンパク質凝集体の分析法としては、前述のSECに加えて、DLS(dynamic light scattering)、AUC(analytical ultracentrifugation)、FI(flow imaging)、LO(light obscuration)など、被験物の粒径に応じて利用できる技術が分かっている⁹⁾。これらはすべてサイズ分離、あるいはサイズ計測を前提とするのに対し、本技術は高次構造が劣化した部位を認識するという、まったく異なる原理に立脚している点が独特である。正常型IgGと粒径が変わらない非天然型構造体単量体を検出できるので、大きな凝集体が成長する前の早期分析が可能である。これは、安定性評価のための長期保存試験などに特に有効

である。さまざまなLBA法を活用できるので、迅速で簡便な分析が実現できる。特に、多検体並列測定が可能になるのでスループットの格段の向上が望める⁹⁾。LBA法は自動化対応も可能であるので、精度の向上や無人運転による省力化が期待できる。

用 途

特性解析 バイオ医薬品の開発段階では、広範かつ詳細な特性解析を行うことが求められている¹⁾。冒頭記したように、高次構造に関しては適切な分析技術が乏しい状況があり、本技術はその不足を補うものである。本技術の利用は、「新しい分析技術の開発や既存の技術の改良は日進月歩で進んでいるので、適時取り入れるべきである」というICH Q6Bの趣旨にも合致する。

安定性試験 バイオ医薬品の安定性試験における純度試験は、目的物質の分解物や変化物の分析に焦点を合わせるべきとされている¹¹⁾。高次構造が劣化した非天然型構造体は変化物に相当し純度試験の対象とすべきであろう。しかし、非天然型構造体の評価は、従来の分析法では困難であったためほとんど実施されていない。本技術の利用が望まれる。また、安定性試験(過酷試験)では、申請した保存条件から製品が逸脱した際に、その偶発的条件が与える悪影響をあらかじめ判断しておくことが求められている¹¹⁾。本技術を用いて、出荷後の輸送、保管、調剤、投薬などの過程で想定される物理的・化学的ストレスを模した試験を行い、その影響を評価することが可能である。

品質管理 本技術は迅速かつ簡便に実施することができることから、ルーチン化が可能である。これにより、原薬の品質管理における不純物試験に適している。専用の装置やトレーニングは不要で、LBA法の経験があれば速やかに構築できる。また、多検体並列測定が可能なので製品の出荷管理試験として実施することも想定される。既存の分析法に加え、orthogonal approach¹³⁾の一端として本技術を規格および試験方法の純度試験の項目に組み込むことが期待される。

工程管理 バイオ医薬品の品質保証において、原薬または製剤の製造工程が常に一定に保たれていることを確認することは重要である。各工程において有効成分である抗体はさまざまな物理的・化学的ストレスを受けるので、本技術を工程内管理試験に組み込んで、高次構造劣化をモニタリングすることは製造工程の恒常性を証明することにつながる。本技術における第三成分の影響(すなわちマトリクス効果)については検討の余地が残っているが、AlphaScreen[®]を利用した方法で、動物細胞の培

養上清あるいは細胞ライセートに混入させた非天然型構造体の特異的検出が可能であることは確認されている⁷⁾。

生産法開発 バイオ医薬品の製造では、製品の品質を保証するため多数のパラメータを最適化する必要がある。凝集体は重要品質特性（CQA）の一つであるので、これに対応する重要工程パラメータ（CPP）を特定して最適化することが求められる。凝集体の低減に向けて、本技術を種々の工程パラメータの最適化に活用することが期待できる。たとえば、精製工程における溶媒条件の検討、製剤工程における添加剤選択での利用が有望である。さらには、凝集化リスク低減を目的とした培地成分や培養条件の最適化、セル・バンク構築の際の細胞株スクリーニングなどへの応用も見込まれる。

提 案

高度な生産管理技術により、バイオ医薬品中の不純物含量は低く抑えられている。凝集体に関しては、数パーセント以下である。しかし、そのリスクは完全に解明されておらず、上述したようにFDAは「製造者は凝集体の残留を可能な限り最小化する」ことを求めている。非天然型構造体を相対比0.01%以下まで検出できる本技術はその実現に最適の分析法である。また、「有効期限の設定では保管中の凝集体増加を考慮する」ことを求めている。凝集体の発生と成長は時間依存であるので、出荷時に十分除去されていても、その後の輸送、保管などの間に再び増加するおそれがある。想定される物理的・化学的ストレスのリスク評価を本技術で行い、その結果を有効期限の設定に反映させることは有用であろう。本技術は、非天然型構造体単量体を含む凝集前駆体を分析できることが特徴である。「種々のサイズ、様態に応じた複数の分析法を利用する」という点にも合致する。医薬品の品質管理業務で実際に利用するには、実用的な側面の考慮も不可欠である。迅速で簡便なLBA法をベースとする本技術は、FDAの求める「日常的な出荷試験に適切なアッセイ法を確立する」に沿うものである。

展 望

本稿ではAF.2A1に焦点を絞って解説したが、筆者らは別の人工タンパク質AF.ab9も開発している¹⁴⁾。AF.2A1がFc領域に結合するのに対し、AF.ab9は非天然型構造体のFab領域に選択的に結合する。これには二つの意味がある。劣化部位を認識するという稀有な性質から、AF.2A1の利用はきわめて特殊な事例と見られるきらいがある。しかし、AF.ab9は、AF.2A1の成功に鑑み意図して開発されたものであり、非天然型構造体を選

択的な人工リガンドで抗体医薬品を分析するというコンセプトの一般性を強調するものである。もう一つは、IgGには「共通の劣化部位」が複数あるという示唆である。認識部位が異なる人工リガンドを多数利用することであれば、特異性や感度のさらなる向上はもちろん、高次構造劣化メカニズムに関するより多面的で複合的な解析が期待できる。抗体医薬品の高次構造の健全性を評価する技術として、より完成度の高いものとなるであろう。AF.2A1結合様式の解明や絶対定量の実現など残された課題もある。分析法は常に改良し進化させることが求められている。

謝 辞

共同研究者である産業技術総合研究所の渡邊秀樹博士、宮房孝光博士、千賀由佳子博士に感謝する。本稿で紹介した研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、および国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号（JP17ae0101003）の支援を受け行われた。

文 献

- 1) 厚生労働省「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定について」（ICHガイドラインQ6B）（平成13年5月1日、医薬審発第571号）
- 2) Rosenberg, A. S.: *AAPS J.*, **8**, E501 (2006).
- 3) U. S. Food and Drug Administration (FDA): Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, (2014 August).
- 4) Watanabe, H. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **289**, 3394 (2014).
- 5) Watanabe, H. and Honda, S.: *Chem. Biol.*, **22**, 1165 (2015).
- 6) Watanabe, H. *et al.*: *Anal. Chem.*, **88**, 10095 (2016).
- 7) Senga, Y. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 12466 (2017).
- 8) Senga, Y. and Honda, S.: *Bioconjugate Chem.*, **29**, 3250 (2018).
- 9) 今村比呂志ら：タンパク質のアモルファス凝集と溶解性—基礎研究からバイオ産業・創薬研究への応用まで—（黒田 裕, 有坂文雄 監修），p. 29, シーエムシー出版 (2019).
- 10) Karlsson, R. *et al.*: *J. Immunol. Methods*, **166**, 75 (1993).
- 11) Imamura, H. and Honda S.: *Anal. Biochem.*, **516**, 61 (2017).
- 12) 厚生労働省「生物薬品（バイオテクノロジー応用製品／生物起源由来製品）の安定性試験について」（ICHガイドラインQ5C）（平成10年1月6日、医薬審第6号）
- 13) den Engelsman, J. *et al.*: *Pharm. Res.*, **28**, 920 (2011).
- 14) 渡邊秀樹, 本田真也：特願2016-170867, 産業技術総合研究所 (2016).