博士学位論文

サブクラスチェンジによる
抗体物性の変化

（Effects of subclass changes on the conformation,
stability, and aggregation of antibodies:
The case of chimeric, humanized, and human antibodies.）

東京大学大学院　新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻
生命分子解析学分野

伊藤　剛彦

目次

第 1 章　序論

1-1 緒言

1-2 研究背景

1-2-1 抗体の構造と特徴

1-2-2 Fc 領域とエフェクター機能

1-2-3 抗体医薬の歴史

1-2-4 抗体医薬が持つ多様な作用とサブクラス選択の重要性

1-2-5 血清中の IgG サブクラスの安定性およびアミノ酸改変体

1-2-6 抗体の安定化および製剤開発

1-3 研究の目的

1-4 参考文献

第 2 章　抗体各サブクラスの保存安定性評価

2-1 緒言

2-2 実験方法

2-3 結果および考察

2-3-1　目視（Visual Inspection）

2-3-2　サイズ排除クロマトグラフィー（SEC：Size Exclusion Chromatography）

2-3-3　ドデシル硫酸ナトリウムアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE：Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoreisis）

2-3-4　IgG4 ハーフ抗体の評価

2-4 結言

2-5 参考文献

第 3 章　抗体各サブクラスの構造安定性評価

3-1 緒言

3-2 実験方法

3-3 結果および考察

3-3-1　示差走査型熱量測定（DSC：Differential Scanning Calorimetry）

3-3-2　円偏光二色性スペクトル（CD：Circular Dichroism Spectrometer）

3-3-3　示差走査型蛍光測定（DSF：Differential Scanning Fluorescence）

3-4 結言

3-5 参考文献

第 4 章　総括

4-1 総括

4-2 参考文献

謝辞

第 1 章　序論

1-1. 緒論

近年の著しい分子生物学やバイオテクノロジーの進展により、サイトカインや抗体を始めとしたバイオ医薬品が盛んに開発されている。中でも抗体医薬は腫瘍や自己免疫疾患の治療を目的とした分子標的薬として世界中で数多く承認されており、既承認抗体医薬の中には顕著な有効性を示しているものも多く、今現在最も研究および開発が行われている医薬品のひとつである。

1-2. 研究背景

抗体の構造と特徴

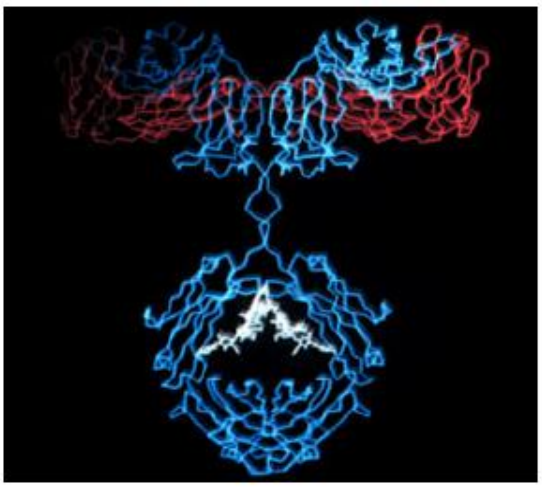
抗体は生物の体内に侵入した、あるいは発生した異物（抗原）の刺激により B 細胞で作られ、その抗原に対して特異的に結合、攻撃することで生体を守る免疫反応を担うタンパク質である。

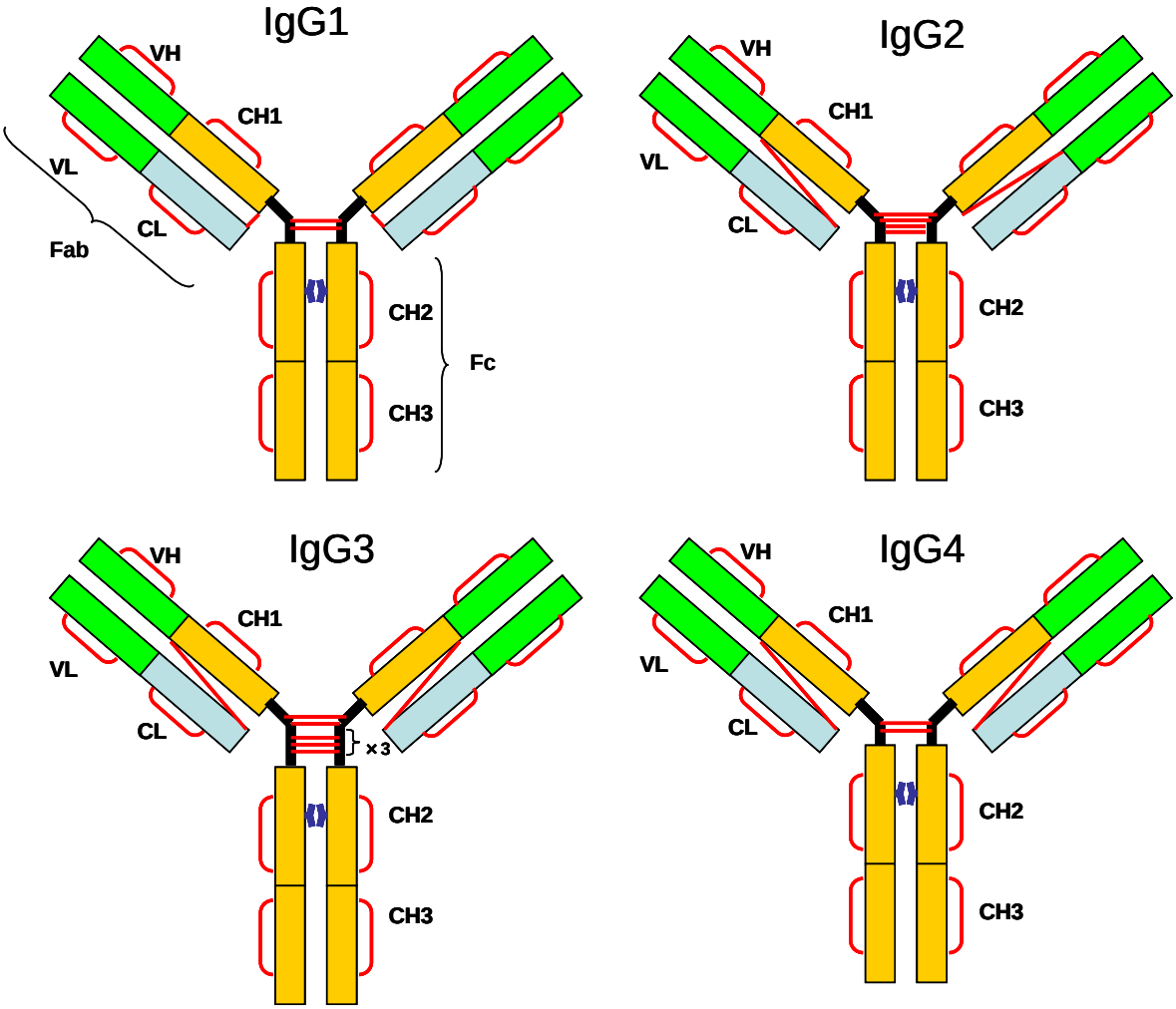
全ての抗体分子は 4 本のポリペプチド鎖から構成されており、そのタンパク質は Immnogloblin（Ig）と呼ばれる。抗体は定常領域と可変領域と呼ばれる 2 つの領域に分けられる。可変領域は N 末端側の 110 アミノ酸残基の領域であり、個々の抗体によって多様性を持ち、抗原への結合の特異性に関与している。一方、定常領域はヒトでは 5 種類のクラス（IgG、IgM、IgA、IgD および IgE）に分けられ、クリアランスや輸送の機構を活性化するリガンドとの相互作用部位を有しており、クラスによって生化学的、機能的にも異なることが知られている。血中に最も多く存在する IgG は単量体で存在するが、IgM や IgA は通常それぞれ五量体および二量体で存在していることが明らかとなっている [1-5]。

抗体医薬に最も利用されている IgG は 4 本のポリペプチド鎖から構成され、2 本の重鎖（それぞれ 50kDa）と 2 本の軽鎖（それぞれ 25kDa）がジスルフィド結合により共有結合して 1 分子を形成している。IgG は可変領域および定常領域からなり、Fab 領域（fragment, antigen binding）と Fc 領域（Fragment, Crystallizable）に分けられる。Fab 領域には相補性決定領域（Complementarity-determining regions;CDR）が存在し、CDR のアミノ酸配列には多様な抗原に結合できるように、アミノ酸配列に多彩な変化が見られる。この Fab 領域の先端に近い半分を可変領域（V 領域）といい、軽鎖の可変領域を VL 領域、重鎖の可変領域を VH 領域と呼ぶ。V 領域以外の Fab 領域と Fc 領域は、比較的変化の少ない領域であり、定常領域（C 領域）と呼ばれる。軽鎖の定常領域を CL 領域と呼び、重鎖の定常領域を CH 領域と呼ぶが、CH 領域はさらに CH1～CH3 の３つに分けられる。重鎖の Fab 領域は VH 領域と CH1 からなり、重鎖の Fc 領域は CH2

と CH3 からなり、ヒンジ部は CH1 と CH2 の間に位置する。Fc 領域は、ヒンジ領域における重鎖間ジスルフィド結合と CH3 ドメイン同士の非共有結合によって形成されたホモ二量体を形成する。数少ないが IgG の結晶構造解析により、IgG の高次構造が明らかにされている。抗体の二次構造は主に逆平行 β シートを形成するポリペプチドで形成され、約 70%の β シートを含有している。各ドメインが同じ β バレル構造（イムノグロブリンフォールド）を有し、互いにジスルフィド結合や疎水性相互作用により安定化されている。2 つの Fab 領域が 1 つの Fc 領域と比較的フレキシブルなヒンジ領域で結合し、その形状は特徴的な Y 字構造もしくは T 字構造をとっている [6,7]。また CH2 ドメインはアスパラギン 297 番（Asn-297）に糖鎖が共有結合で連結することによって修飾されている。X 線結晶構造解析により、糖鎖が CH2 領域間の内壁表面と多くの非共有結合により相互作用していることが示されている [6,8]。

IgG はさらに 4 種類のサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4）が存在し、正常な血清中の濃度は IgG1（～60%）、IgG2（～25%）、IgG3（～10%）、IgG4（～5%）の順である [9]。Fig.1-1-1 に各 IgG サブクラスの構造、Fig.1-1-2 に定常領域の配列を示した。Fc 領域のアミノ酸配列では 95%以上相同であるが、ヒンジ領域のアミノ酸組成およびその構造には大きな違いが見られ、各サブクラスの特性の違いに大きく寄与している。4 つのサブクラスで重鎖および軽鎖の分子内ドメイン間のジスルフィド結合はほぼ同じであるが、分子間ジスルフィド結合には違いが認められる。重鎖間のジスルフィド結合の違いはヒンジのアミノ酸配列とその中にあるシステイン（Cys）残基の位置によってもたらされる。ヒンジのアミノ酸数は IgG1 が 15 個、IgG2 が 12 個、IgG4 が 13 個なのに対し、IgG3 は 62 個と他のサブクラスに比べ非常に長く、21 個のプロリン、11 個のシステインを含む独特な配列である。重鎖間のジスルフィド結合数は IgG1 および IgG2 で 2 つなのに対し IgG2 では 4 つ、IgG3 では 11 つである。このためヒンジの長さと含有するグリシンの数、ジスルフィド結合数より、ヒンジ領域のフレキシビリティーは IgG1 で最も高く、IgG4、IgG2、IgG3 の順で低くなる。また重鎖と軽鎖間のジスルフィド結合の位置に違いが認められる。IgG1 では軽鎖 C 末端のシステインとコアヒンジにある 1 番目（N 末端側から）のシステインとジスルフィド結合を形成している。これに対し、IgG2、IgG3、IgG4 では軽鎖 C 末端のシステインと Fab 領域にある CH1 ドメインにある 1 番目（N 末端側から）のシステインとジスルフィド結合を形成している [10-19]。





Subclass	Core hinge region sequence
IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP
IgG2	ERKCCVECPPC
IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCP.....(EPKSCDTPPCPRCP)x3
IgG4	ESKYGPPCCPSCP

Fig1-1-1. 抗体 IgG の構造（黒：ヒンジ、赤：ジスルフィド結合、青：糖鎖）と

ヒンジ領域のアミノ酸配列（文献 [20, 21] より引用）

EU			118			151
IgG1			/ / / A S T K	G P S V F P L A P S	S K S T S G G T A A	L G C L V K D Y F P
IgG2			/ / / A S T K	G P S V F P L A P S	S R S T S E S T A A	L G C L V K D Y F P
IgG4			/ / / A S T K	G P S V F P L A P S	S R S T S E S T A A	L G C L V K D Y F P
			← CH1			
EU	152					211
IgG1	E P V T V S W N S G	A L T S G V H T F P	A V L Q S S G L Y S	L S S V V T V P S S	S L G T Q T Y I C N	V N H K P S N T K V
IgG2	E P V T V S W N S G	A L T S G V H T F P	A V L Q S S G L Y S	L S S V V T V T S S	N F G T Q T Y I C N	V D H K P S N T K V
IgG4	E P V T V S W N S G	A L T S G V H T F P	A V L Q S S G L Y S	L S S V V T V P S S	S L G T K T Y I C N	V D H K P S N T K V
EU	212					271
IgG1	D K K A E P K S C D	K T H T C P P C P A	P E L L G G P S V F	L F P P K P K D T L	M I S R T P E V T C	V V V D V S H E D P
IgG2	D K T V E P K C C –	– – V E C P P C P A	P P – V A G P S V F	L F P P K P K D T L	M I S R T P E V T C	V V V D V S H E D P
IgG4	D K R V E P K Y G P	– – – P C P S C P A	P E F L G G P S V F	L F P P K P K D T L	M I S R T P E V T C	V V V D V S Q E D P
	→ ←Hinge	→ ← CH2				
EU	272					331
IgG1	E V K F N W Y V D G	V E V H N A K T K P	R E E Q Y N S T Y R	V V S V L T V L H Q	D W L N G K E Y K C	K V S N K A L P A P
IgG2	E V Q F N W Y V D G	V E V H N A K T K P	R E E Q F N S T F R	V V S V L T V V H Q	D W L N G K E Y K C	K V S N K G L P A P
IgG4	E V Q F N W Y V D G	V E V H N A K T K P	R E E Q F N S T Y R	V V S V L T V L H Q	D W L N G K E Y K C	K V S N K G L P S S
EU	332					391
IgG1	I E K T I S K A K G	Q P R E P Q V Y T L	P P S R D E L T K N	Q V S L T C L V K G	F Y P S D I A V E W	E S N G Q P E N N Y
IgG2	I E K T I S K T K G	Q P R E P Q V Y T L	P P S R E E M T K N	Q V S L T C L V K G	F Y P S D I A V E W	E S N G Q P E N N Y
IgG4	I E K T I S K A K G	Q P R E P Q V Y T L	P P S Q E E M T K N	Q V S L T C L V K G	F Y P S D I A V E W	E S N G Q P E N N Y
	→	← CH3				
EU	392					447
IgG1	K T T P P V L D S D	G S F F L Y S K L T	V D K S R W Q Q G N	V F S C S V M H E A	L H N H Y T Q K S L	S L S P G K
IgG2	K T T P P M L D S D	G S F F L Y S K L T	V D K S R W Q Q G N	V F S C S V M H E A	L H N H Y T Q K S L	S L S P G K
IgG4	K T T P P V L D S D	G S F F L Y S R L T	V D K S R W Q E G N	V F S C S V M H E A	L H N H Y T Q K S L	S L S L G K

Fig.1-1-2　定常領域のアミノ酸配列（アミノ酸番号は EU ナンバリング参照 [22]）

Fc 領域とエフェクター機能

Fc 領域は、特定のタンパク質に結合し、オプソニン化や細胞溶解などの免疫応答の誘導、抗体依存性細胞障害活性（ADCC：Antibody Dependent Cell Cytotoxicity）および補体依存性細胞障害活性（CDC：Complement Dependent Cytotoxicity）などのエフェクター機能を担っている [23]。ADCC は、抗体の Fc 領域が NK 細胞、マクロファージなどの免疫エフェクター細胞表面上の Fc 受容体（Fcγ Rs）に結合し、標的細胞の貪食作用や細胞溶解を誘導する。CDC は、補体成分（Cq1）と結合し、抗体が細胞表面で補体カスケードを活性化して細胞を死滅させる。Fcγ受容体や補体成分と Fc 領域の結合能はサブクラスによって異なり、サブクラスによって多様なレベルのエフェクター機能を発揮することになる [24-27]。特に IgG1 および IgG3 は全ての Fcγ Rs や Cq1 に強く結合し、高いエフェクター機能（ADCC/CDC）を発揮する。この結合能の違いはヒンジ領域および CH2 ドメインのアミノ酸残基の違いに由来することがこれまでに報告されている [9,28,29]。
また Fc 領域は新生児の Fc 受容体（FcRn）と結合することで IgG の分解抑制による血中濃度維持および細胞内での輸送に大きく関与していることが明らかとなっている [30-32]。Table1-1-1 に各サブクラスの Key パラメータをまとめた。

Table.1-1-1 各サブクラスの Key パラメータ（文献 [33] より引用）

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Functional form *in vivo*	**Monomeric bivalent**	**Dimeric tetravalent**	**Monomeric bivalent**	**Half-Ig monovalent**
Biological role in host response	**Protein antigens**	**Carbohydrate antigens**	**Protein antigens**	**Responde to chronic Stimulation, Anti-inflammatory**
Percentage of all IgG in humans	**60%**	**25%**	**10%**	**5%**
Half-life	**36.3±9.2**	**37.1±13.9**	**28.6±10.4**	**15.6±4.5**
Effector functions				
C1	**++**	**-**	**+++**	**-**
FcgR I	**+++**	**-**	**+++**	**++**
FcgR II	**+**	**±**	**+**	**?**
FcgR IIIa/b	**+**	**-**	**+**	**±**

抗体医薬の歴史

抗体の特徴として、多様性、標的に対する高い特異性と強い親和性の 3 つが挙げられる。これらの特性を医薬品から捉えると、多様性は創薬に対して応用範囲が広いこと、高い特異性からは標的以外のところに影響を与えない、つまり副作用につながりにくいこと、強い親和性からは疾患原因タンパク質の働きを中和できることを意味する。また抗体はもともと血中に安定に存在する分子のため、長い期間薬効を発揮でき、非常に医薬品として魅力のある分子である。

1975 年に Kohler と Milstein によりハイブリドーマを利用したマウスモノクローナル抗体を人工的に生産できる方法が確立され [34]、『魔法の弾丸』として当初ミサイル療法が現実のものになると多くの期待が寄せられた。しかしながら、初期の抗体はマウスに免疫し、得られたマウス抗体をそのままヒトに投与したため、マウス抗体自身が抗原と認識され、アナフィラキシーショックが高頻度で起り、繰り返し投与が困難となった。またヒト生体内 IgG の半減期が約 20 日であるのに対して、ヒトに投与されたマウス抗体の半減期は数時間から 3 日程度であり、半減期が短いことも障壁となり、多くの開発が失敗に終わった [35]。1986 年、米国においてマウス抗体 Orthclone OKT3 が腎臓移植後の急性拒絶反応の治療薬として初めての抗体医薬品として上市されたが、抗原性などの問題は解決されなかった。

しかし、1990 年代に入り、分子生物学とバイオテクノロジーの進展により、キメラ抗体 [36,37] やヒト化抗体 [38,39] の作製技術が確立され、ヒト IgG 骨格を持った抗体を遺伝子組み換えにより作製・製造することが可能となり、医薬品化に向けて大きな一歩を踏み出した。また当時国際的に取り組まれていたヒトゲノム解析プロジェクトの進展によりゲノム創薬がブームとなり、その中で抗体医薬のターゲットとなる疾患・病態に関する分子（抗原）の同定が進んだことも寄与し、1990 年代後半になると抗体医薬の商品化が次々と成功し、2000 年代に入り血液がん治療薬のリツキサン、乳がん治療薬のハーセプチン、関節リウマチ治療薬のレミケードなどが 10 億ドルを超えるブロックバスターになるまでに成長した。その後も続々とキメラ抗体やヒト化抗体が製品化され、さらにファージディスプレイ・ライブラリー法 [40,41] やトランスジェニックマウスを用いた完全ヒト抗体作製技術 [42] が確立され、より抗原性の低い完全ヒト抗体の開発も進んだ。2002 年には完全ヒト抗体ヒュミラが関節リウマチ治療薬として米国で認可された。2000 年代に入っても抗体医薬開発の勢いは止むことなく、現在までに世界で 25 種類以上が許可され、数兆円規模の市場を形成するに至っている。また世界で 150 以上の抗体医薬品の臨床開発が進行中といわれており、現在最も活発に研究および開発が行われている品目の一つと言える。

現在までに日欧米で許可された抗体医薬を Table.1-1-2 にまとめた（文献 [43,44] より改変。承認年度らは米国食品医薬品局（FDA）、ヨーロッパ医薬品庁（EMEA）、厚生労働省ホームページを参照した）。対象疾患は様々であるが、大別すると主に抗腫瘍薬および免疫調節薬に分類される。抗腫瘍薬として代表的な抗体医薬としては、リツキシマブ、トラスツマブ、ゲムツズマブ、オゾガマシシン、ベバシズマブ等が挙げられ、現在標準的治療に使用される医薬品として評価を得ている。また免疫調節薬としてはインフリキシマブ、アダリムマブなど関節リウマチ治療薬が挙げられる。

また近年、抗体に類似した特徴を持つ医薬品として、標的分子特異的結合能を持つ受容タンパク質やペプチド等を抗体の Fc 領域と融合させた Fc 融合タンパク質医薬品の開発も盛んに行われている [(45)]。例えば、エタネルセプトはヒト型遺伝子組み換え可溶性 TNFα受容体－Fc 融合タンパク質医薬品であり、TNF を中和する作用を持ち、関節リウマチ治療薬として用いられている [(46)]。こられは標的分子結合部位のみでは医薬品として開発することが難しいタンパク質やペプチドを Fc 領域と融合することで血中安定化を図り、臨床応用を可能にした医薬品である。

以上のように、抗体医薬はすでに数多くの製品が承認されているが、既承認抗体医薬は融合タンパク質以外の製品では、いずれも構造的には IgG のサブクラスに属し、中でも IgG1 が大多数を占め、IgG2 および IgG4 を用いた抗体医薬は少ない。最近は細胞表面受容体（例えばエリスロポエチン受容体、CD20、CD28）に結合し、アゴニストとして細胞内情報伝達を引き起こすことを目指したアゴニスト抗体の開発などが盛んに行われている。

Table1-1-2　日欧米における既承認抗体医（文献[43,44]より改変）

名称	商品名	種類	標的	主な適応疾患	承認を受けた年度		
					米国	欧州	日本
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	マウス抗体　IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	1987	1991
Abciximab	ReoPro	キメラ抗体　IgG1（Fab)	GPⅡb/Ⅲa	心筋虚血	1994	NA[1)]	NA
Rituximab	Rituxan, MabThera	キメラ抗体　IgG1κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001
Daclizumab	Zenapax	ヒト化抗体　IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA
Basiliximab	Simulect	キメラ抗体　IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002
Palivizumab	Synagis	ヒト化抗体　IgG1κ	RSVFProtein	RSウィルス感染	1998	1999	2002
Infliximab	Remicade	キメラ抗体　IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	1998	1999	2002
Trastuzumab	Herceptin	ヒト化抗体　IgG1κ	HER2	転移性乳ガン	1998	2000	2001
Gemtuzumab ozogamici	Mylotarg	ヒト化抗体　IgG4κ (カリケアマイシン結合	CD33	急性骨髄性白血球	2000	NA	2005
Alemtuzumab	Campath, MabCampath	ヒト化抗体　IgG1κ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	NA
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	マウス抗体　IgG1κ (^{90}Y標識）	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	2008
Adalimumab	Humira	ヒト化抗体　IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2002	2002	2008
Omalizumab	Xolair	ヒト化抗体　IgG1κ	IgGE	喘息	2003	2003	2009
Iodine 131 Tositumomab	Bexxar	マウス抗体　IgG2aλ (^{131}I標識）	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA
Efalizumab	Raptiva	ヒト化抗体　IgG1κ	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA
Cetuximab	Erbitux	キメラ抗体　IgG1κ	EGFR	頭頸部癌, 結腸・直腸癌	2004	2004	2008
Bevacizumab	Avastin	ヒト化抗体　IgG1κ	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007
Natalizumab	Tysabri	ヒト化抗体　IgG4κ	α4integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA
Tocilizumab	Actemra	ヒト化抗体　IgG1κ	IL6R	キャッスルマン病	2010	2008	2005
Panitumumab	Vectibix	ヒト抗体　IgG2κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	2007	2010
Ranibizumab	Lucentis	ヒト化抗体　IgG1κ(Fab）	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	2009
Eculizumab	Soliris	ヒト化抗体　IgG2/4κ	C5a	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	NA
Cetolilizumab pegol	Cimzia	ヒト化抗体　IgG1κ(PEG化 Fab）	TNFα	関節リウマチ	2008	2009	NA
Golimumab	Simponi	ヒト抗体　IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2009	2009	NA
Canakinumab	Ilaris	ヒト抗体　IgG1κ	IL-1β	クリオピリン関連周期性症候群	2009	2009	NA
Ustekinumab	Stelara	ヒト抗体　IgG1κ	IL-12/23 p40	乾癬	2009	2008	NA
Ofatumumab	Arzerra	ヒト抗体　IgG1κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2009	2010	NA
Denosumab	Prolia	ヒト抗体　IgG2κ	RANK ligand	骨粗鬆症	2010	2010	NA

1）未承認

Fc融合タンパク質

名称	商品名	種類	標的	主な適応疾患	米国	欧州	日本
Etanercept	Enbrel	TNFαR + Fc	TNFα	関節リウマチ関節リウマチ	1998	2000	2005
Alefacept	Amevive	LFA3 + Fc	CD2	尋常性乾癬	2003	NA	NA
Abatacept	Orencia	CTLA4 + Fc	CD80/CD86	関節リウマチ	2005	2007	2010
Rilonacept	Arcalyst	Binding domain of IL-R + Fc	IL-1	クリオピリン関連周期性症候群	2008	2009	NA
Romiplostim	Nplate	analog of thrombopoetin + Fc	TPOR	血小板減少性紫斑病	2008	2009	NA

1）未承認

抗体医薬が持つ多様な作用とサブクラス選択の重要性

抗体医薬の作用機序は大きく 4 つに分けられる。1）リガンドまたは受容体に結合しシグナル伝達を遮断するブロッキング抗体、2）標的分子と結合し抗体依存性細胞障害活性（ADCC）や補体依存性細胞障害活性（CDC）等のエフェクター機能を誘導する抗体、3）標的分子に結合しシグナル伝達を上昇させるアゴニスト抗体、4）薬剤や放射性物質を結合し特異的に細胞障害を誘導するミサイル型抗体などが挙げられる [47]。抗腫瘍効果を目的とした抗体医薬には、より大きいエフェクター機能が重要となり強いエフェクター機能を有する IgG1 および IgG3 の利用が好ましい。しかしながら IgG3 はこれまで上市された抗体医薬品には使用されていない。これは IgG3 の半減期が短いこと、長いヒンジを有するために非酵素消化を受けやすいこと、IgG の精製工程で使用されている Protein A に結合しないことなどが理由として挙げられる [33, 48]。このように抗腫瘍効果を狙ったより大きいエフェクター機能への要望がある中、いくつかの抗体医薬品のためには、エフェクター機能が低減または排除する方が好ましい場合がある。抗原の生物学的作用を中和することが目的の抗体医薬においては、Fc 領域の ADCC 活性等のエフェクター機能に重要な Fcγ 受容体への結合は不要な副作用を惹起する可能性がある [49]。さらに、Fcγ 受容体は抗原提示細胞に発現していることから、Fcγ 受容体に結合する分子は抗原提示されやすくなり、IgG1 の Fc 部分にタンパク質やペプチドを結合することによって免疫原性が増強することが報告されている [50]。また TGN1412 の Phase Ⅰ臨床試験で見られた重大な副作用の原因の一つとして、抗体の Fc 部分と Fcγ 受容体の相互作用が考えられている [51]。このように Fc 領域によってもたらされるエフェクター機能は抗体医薬の作用機序に非常に大きな役割を持つ一方で、安全性にも非常に重要な意味を持つ。このように中和抗体やアゴニスト抗体、アンタゴニスト抗体を目的とした抗体医薬品においてはその作用機序から ADCC や CDC 等のエフェクター機能に重要な Fcγ 受容体への結合は不必要であり、副作用の点から考えると Fcγ 受容体への結合はむしろ好ましくない可能性も考えられる。エフェクター機能を低減および排除するには IgG2、IgG4 のサブクラスでの開発やアミノ酸改変や糖鎖工学等の技術を用いた Fc 改変体の利用が考えられる [9,47,52-56]。すでに IgG4 サブクラスを用いた多発性硬化症治療薬のナタリズマブ [57] や IgG2 の CH1 とヒンジおよび IgG4 の CH2 と CH3 から構成される IgG2/IgG4 ハイブリッド型の発生性夜間血色素尿症治療薬のエクリズマブが上市されている [58,59]。このように医薬品の安全性に対する意識が高まる中で、抗体開発において、どのような標的分子に対する抗体かによってその作用機序を考慮し、サブクラスを選択することが重要である [9,20,33,47,48,53,60]。

血清中の IgG サブクラスの安定性

最近になり血清中での IgG サブクラスの特性および安定性についていくつかの報告がされている[20]。IgG2 はジスルフィドシャッフリングによる二量体化（Fig.1-1-3）およびアイソフォーム形成（Fig.1-1-4）によるヘテロジェネイティーの増加が挙げられる。IgG2 は血清中でヒンジのジスルフィド結合を解し、二量体化する[61]。この二量体化は同一および異なる IgG2 同士で起こりうえ、結合能の変化に影響する可能性がある。また重鎖間および重鎖軽鎖のジスルフィド結合の交換により 3 種のアイソフォームを形成する。これらのアイソフォーム間では安定性や結合活性に違いが認められる[62-65]。

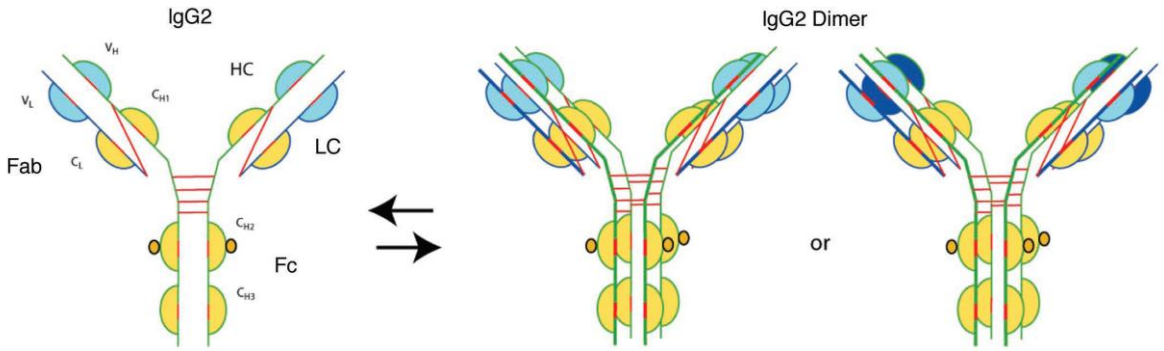


Fig.1-1-3　IgG2 の二量体化（文献 20 より引用）

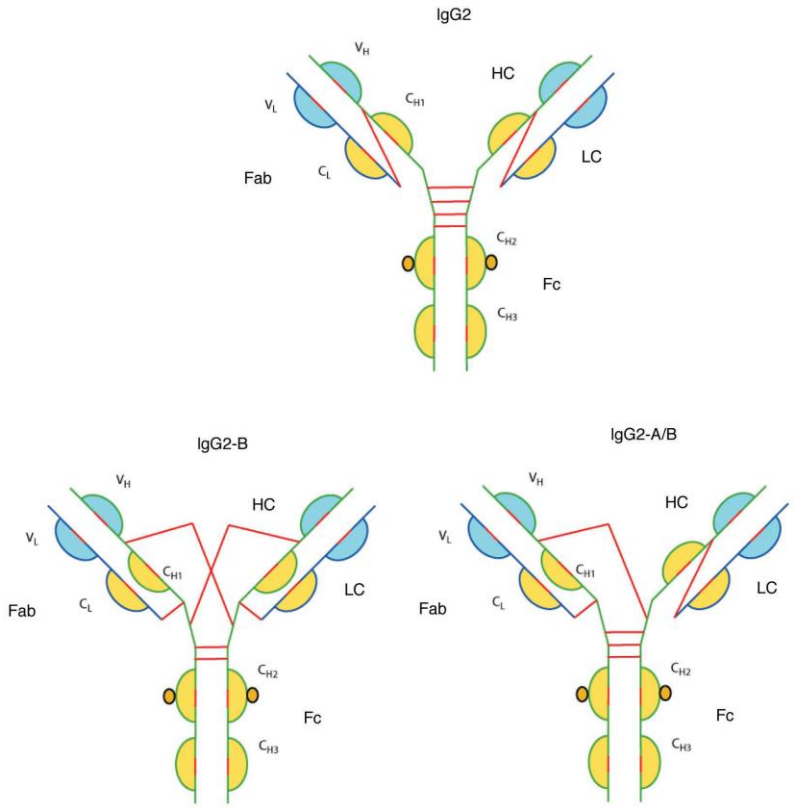


Fig.1-1-4　IgG2 ヒンジ領域のジスルフィド結合によるアイソフォームの形成（文献[20]より引用）

上記アイソフォーム形成の問題に関しては、分子間ジスルフィド結合に関与するシステイン（Cys）へのアミノ酸改変により、結合活性やエフェクター機能を保持しつつアイソフォーム形成を低減できることが報告されている[66,67]。

IgG4 は分子間ジスルフィド結合の切断による Half Antibody（ハーフ抗体：HL）の形成と Fab Arm Exchange による二重特異性抗体の産生（Fig.1-1-5）が挙げられる[68-70]。IgG4 の重鎖間のジスルフィド結合を形成しているコアヒンジのアミノ酸配列は CPSCP であり、IgG1 等の CPPCP と異なる（Fig.1-1-2 参照）。この 1 アミノ酸残基の違いが、構造的に分子間ジスルフィド結合の形成を拒み、分子内ジスルフィドを形成することで重鎖軽鎖 1 本ずつからなる Half Antibody 形成を促進する。また異なる可変領域を持つ Half Antibody 同士が分子間ジスルフィド結合を形成することで Fab Arm Exchange が生じ二重特異性抗体が産生される[71-74]。これらの現象は予期しない作用の誘発や薬物動態（PK）、薬物学（PD）を変化させる可能性がある。

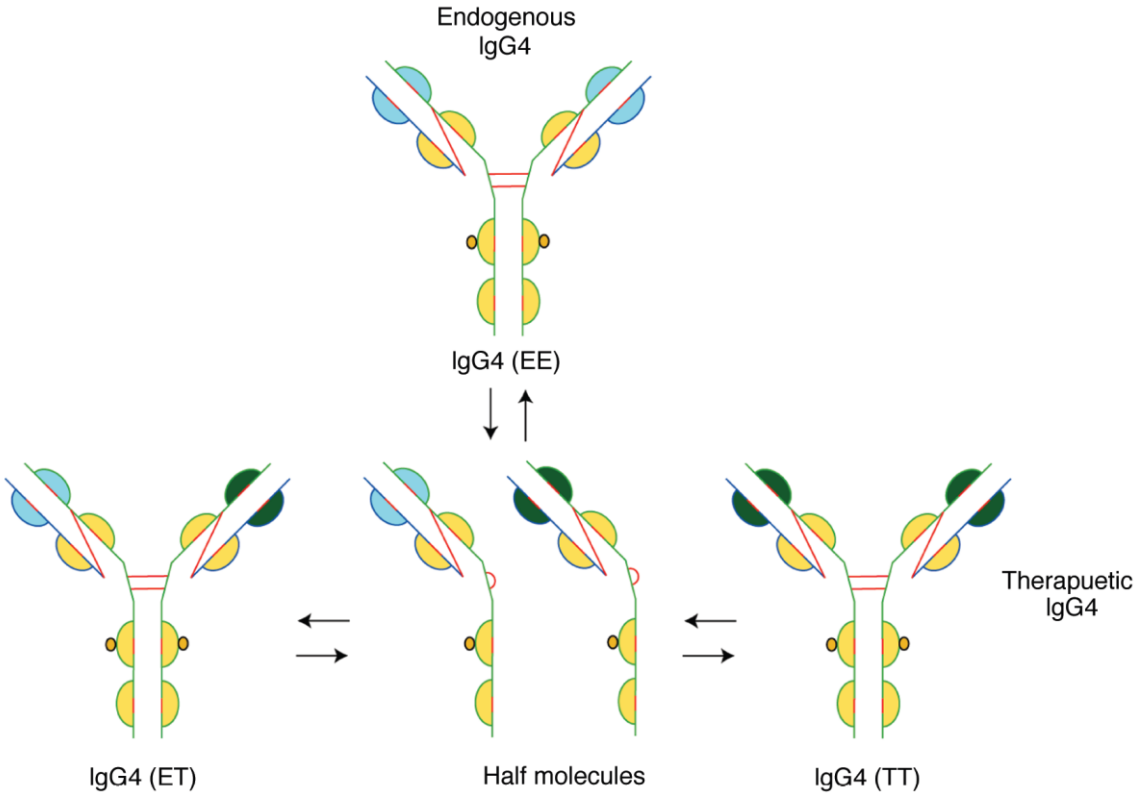


Fig.1-1-5　IgG4 のハーフ抗体産生および二重特性抗体の生成（文献[20]より引用）

IgG4 のコアヒンジのアミノ酸配列に位置する 228 位のセリン（Ser）を IgG1 型のプロリン（Pro）にアミノ酸改変を導入した改変体『IgG4-P』では、野生型の IgG4 に比べハーフ抗体を劇的に抑制する。また CH2 の 235 位に位置するロイシン（Leu）をグルタミン酸（Glu）にアミノ酸改変

することでエフェクター機能を更に低減できる。この 2 つのアミノ酸改変を導入した『IgG4-PE』は野生型に比べ安定性が高く、in vivo での半減期も延長されており、IgG4 サブクラスのフォーマットのスタンダードとして臨床開発に応用されている [71,74-76]。

このように現在 IgG2 および IgG4 のヒンジ領域等にアミノ酸改変を加えることで、問題となる現象を抑制可能な改変体が開発されつつあり、IgG2 および IgG4 サブクラスを選択する際にはこれらの物性を十分に考慮し、均一性の高い分子種として開発することが求められる。

抗体の安定性および製剤開発

抗体を始めとしたタンパク質を医薬品として開発するにあたり、そのタンパク質の物性の理解、処方開発、安定性評価は極めて重要である [21,77]。抗体のみならずタンパク質は溶液中において、様々な化学的変性および物理的変性を受け、凝集、分解、不溶性異物の生成を通じて、活性低下といった問題を生じやすい。化学的な変性には脱アミドや異性化 [78,79]、酸化 [80]、加水分解などが挙げられ、その速度・度合いはアミノ酸の一次配列や立体構造、溶液条件（pH、緩衝剤種、イオン強度、添加剤種等）、環境要因（温度、光照射等）に依存すると言われている [81,82]。特に抗体では重鎖 N 末端グルタミン酸の自発的な縮合によるピログルタミン酸化 [83]、重鎖 C 末端リジン（Lys）残基のカルボキシペプチターゼによる部分的なプロセシング [84]、メチオニン（Met）残基の酸化 [85,86]、アスパラギンの脱アミド化あるいはアスパラギン酸の異性化 [87,88] がこれまでに報告されている。グルタミン酸やアスパラギン酸の導入、リジンの欠失は、分子の等電点を変化させ、最適化された処方条件が適用できなくなる。また保存性の高いメチオニン残基である CH2 にある Met252 と CH3 にある Met428 の酸化によって CH2-CH3 間相互作用が弱められ、Fc 領域の構造が不安定になる [89]。このような化学的変性に加え、培養、精製、製剤化における製造プロセスにおいては、攪拌によるせん断や擦り、表面吸着、ピストン充てんによる擦りや金属との接触など様々な物理ストレスを受けることになる [90,91]。流通や保存時においても温度変化、光、振動、凍結などの種々のストレスを受ける可能性があり、容器からの溶出物、気泡、投与時における希釈や点滴バックなどの素材との接触が境界ストレスとなり、会合・凝集を促進する [92]。また抗体医薬品はインシュリンやエリスロポエチン（EPO）等の生態ホルモン系やインターフェロン等のサイトカイン系のバイオ医薬品に比べ、投与量が格段に大きいことから、高濃度製剤が必要とされている [93]。一般的にタンパク質溶液はそのタンパク質濃度が高くなるに従って、会合・凝集化が促進される。これまでもタンパク質の凝集・会合のメカニズム解明を目指した研究

が盛んに行われてきた。会合・凝集形成の要因になるものとして保存中に起こるタンパク質の部分変性が挙げられる。部分変性状態にある分子種がしばしば会合したり、すでに存在する不純物と会合体を形成したりして、凝集形成の核となり、結果としてより大きな会合凝集となる。また温度上昇や表面吸着、振動など各種物理的ストレスが部分変性状態を導くことも多い。さらに天然状態にあるタンパク質の可逆的自己会合がオリゴマーを形成させる場合がある。これはタンパク質濃度に強く依存するほか、イオン強度や pH 等の溶液組成によって変化する。さらに抗体は複数のドメインからなる巨大タンパク質であること、糖鎖を有し不均一性を併せ持つことから、その分析、解釈を難しくし、今もなお多くの研究がなされている。また近年、バイオ医薬品のコンフォメーション変化等による変性を通じた不活性化や会合凝集に伴う不溶性微粒子および重合体の形成は、免疫原性の発現に関与している可能性が明らかになり、安全性の観点から重合体の抑制がバイオ医薬品の開発において非常に重要な課題となっている[94-97]。

上記を踏まえ抗体医薬品開発という観点からみると、製造から実薬の投与まで、抗体の安定性を維持し、品質を保つことが極めて重要である。このためには①タンパク質の安定性に影響を及ぼす因子を十分に理解すること、②抗体そのものの物性を十分に理解すること、③製造から保存を考慮に入れた優れた製剤処方を開発することが必須となる。これは抗体製剤処方開発を行うにあたり、開発初期段階での抗体のキャラクタリゼーションを十分に行うことが非常に重要であることを意味している。例えば、抗体がどれほどの物理化学的安定性や構造安定性を有しているのか、またどのような劣化・変性が起こりやすいのかを把握することは、開発に耐えうる安定性（Drugbility)を持っているかの判断になる。また様々な処方因子が抗体の安定性にどのように影響を与えるかを把握することは劣化メカニズムの解明に繋がり、添加剤の選択という点で論理的な処方設計をすることができるからである。

抗体医薬品の製剤処方を構成する一般的成分は緩衝剤および pH、等張化剤、界面活性剤であり、いずれも安定性に重要であり、それぞれを適切に選択することで最適な処方が構築される。上述した化学的変性は処方 pH によりその速度・度合いが大きく異なることが知られており、抗体の安定性に最も影響を及ぼすことから、処方 pH およびその緩衝能を担う緩衝剤の選択は非常に重要である。また抗体医薬品は非経口投与（注射剤）であるため、等張に近いことが望ましく、糖、糖ポリオール、アミノ酸および塩などが用いられている。また容器への吸着防止や凝集抑制を目的とし、界面活性剤が添加されていることが多い。これに加え、場合によって安定化を狙った添加剤として抗酸化剤や凝集抑制剤などの添加が挙げられる[21,98]。

最適な製剤処方開発には、処方成分と安定性との関連性を様々なストレス負荷条件において種々の分析系を用いて、多面的に評価を行うことで決定することが必要である。

1-3. 研究の目的と概要

これまで述べてきたように抗体医薬品の開発が盛んに行われ、これまでの多数を占めてきていた IgG1 以外のサブクラスである IgG2 および IgG4（およびその改変体）の開発が増えてきた。今後より良い抗体医薬品の開発には、作用機序を十分に考慮しエフェクター機能の必要性から適切なサブクラスを選択することが重要であるが、サブクラスチェンジが薬物動態や物性・安定性に大きく影響を与える可能性があり、その選択は極めて慎重に行う必要があると言える。

これまでに個々の抗体およびサブクラスについての物性に関する報告はされているものの、同じ可変領域を持つサブクラス間で比較検討した例は少ない。例えば、個々のサブクラスの物性に関して IgG1 のヒンジ領域での切断 [99]、IgG2 の二量体化（dimerization）[61]、ジスルフィドシャッフリングによるアイソフォーム形成 [62-64]、IgG4 の酸性暴露による不安定化 [100]、ハーフ抗体の生成 [68-70] などが報告されている。また同じ可変領域を持つ抗体でのサブクラス間での比較では、Franey 等により、中性領域での保存時に IgG2 が IgG1 に比べ凝集・重合形成しやすいことが報告されている [101]。しかしながら IgG4 を含めた報告はなく、製造の立場から精製や保存時の劣化挙動を始めとした物性の違いは十分に明らかにされていないのが現状である。

そこで本研究では同じ可変領域を持つ抗体においてサブクラスチェンジが抗体の物性に及ぼす影響を評価することを目的とし研究を行った。4 つの異なる可変領域を持つ抗体（Mab-A（ヒト抗体）、Mab-B（ヒト抗体）、Mab-C（キメラ抗体）、Mab-D（ヒト化抗体））をモデルにそれぞれの抗体について IgG1、IgG2、IgG4 のサブクラスを有する抗体を調製し、その物性を比較した。

第 2 章では抗体各サブクラスの保存安定性評価についてまとめた。具体的にはサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）およびドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いて、熱ストレスによる会合・凝集形成による重合体および分解物の評価を行い、サブクラス間での劣化傾向の違いを比較した。

第 3 章では抗体各サブクラスの構造安定性についてまとめた。具体的には示差走査型熱量測定（DSC）によるドメイン構造変化、遠紫外円偏光性スペクトル（CD）による二次構造の変化、示差走査型蛍光測定（DSF）による疎水表面の露出の評価を行い、サブクラス間での構造安定性の

違いを比較した。

第 4 章では以上を総括した。

1-4. 参考文献

1. Niles MJ, Matsuuchi L, Koshaland ME. Polymer IgM assembly and secretion in lymphid and nonlympfoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2884-2888（1995）
2. Davies DR, Metzger H. Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol* 1:87-117（1983）
3. DeFranco AL, Blum JH, Stevens TL, *et al*. Structure and function of B-Cell antigen receptor. *Chem Immunol* 59: 156-172（1994）
4. Cambier JC, Bedzyk W, Campbell K, *et al*. The B-Cell antigen receptor: structure and function o primary, secondary, tertiary and quaternary components. *Immunol Rev* 132: 85-106（1993）
5. Janeway CA, Travers PA, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunology*. New York: Garland .（2001）
6. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol* 275: 861-872（1998）
7. Furtado PB, Whitty PW, Robertson A, Eaton JT, *et al*. Solution sturucture determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: A comparison with monomeric human IgA1. *J Mol Biol* 338: 921-941（2004）
8. Wright A, Morrison SL. Effect of glycosylation on antibody function: Implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* 15: 26-32（1997）
9. Jefferis R. Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opin Biol Ther* 7: 1401-1413（2007）
10. Pink JR, Milstein C. Inter heavy-light chain disluphide bridge in immuno globulins. *Nature* 214: 92-94（1967）
11. Milstein C, Pink JR. Structure and evolution of immunogloblins. *Prog Biophys Mol Biol* 21: 209-263（1970）
12. Milstein C, Frangione B. Dislphide bridges of the heavy chain of human immunogloblin G2. *Biochem J* 121: 217-225（1971）

13. Frangione B, Milstein C, Pink JR. Structural studies of immunogloblin G. *Nature* 221: 149-151（1969）
14. Frangione B, Milstein C, Franklin EC. Interchain dislphide bridges in immunoglobulin G heavy chains. The Fc fragment. *Biochem J* 106: 15-21（1968）
15. Frangione B, Milstein C. Variation in the S-S bridges of immunoglobulin G : interchain disulphide bridges of gamma G3 myeloma proteins. *J Mol Biol* 33: 893-906（1968）
16. Coleman PM. Structure of the human Ab molecule Kol（IgG1）: an electron density map at 5.0 Å resolution. *J Mol Biol* 100: 257（1976）
17. Pumphrey R. Computer models of the human Igs:Shape and segmental flexibility. *Immunol. Today* 7: 174（1986）
18. Saluk PH, Clem LW. The unique molecular weight of the heavy chain from human IgG3 proteins due to an extended hinge region. *J Immunol* 107: 298（1971）
19. Hamilton RG. The human IgG subclass. *CalibioChem*
20. Ivan RC. Stability of IgG isotypes in serum. *Mabs* 2:3: 1-12（2010）
21. Wang W, Singh S, Zeng DL, *et al*. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *J Pharm Sci* 96: 1-26（2007）
22. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, *et al*. In *Sequence of proteins of immunological interest*. U.S. Public Health Services, National Institutes of Health, 1991 Bethesda MD.
23. Janeway CA, Travers P, Walport M, *et al*. *Immunobiology* 5th Edition, Garland Publishing（2001）
24. Clark MR. IgG effector mechanism. *Chem Immunol* 7: 715-725（1997）
25. Daeron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15: 203-234（1997）
26. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8: 34-47（2008）
27. Bindon CI, Hale G, Bruggemann M, *et al*. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the levels of C4 as well as C1q. *J Exp Med* 168: 127-174（1998）

28. Bell E. Antibodies: IgG effector function: a question of balance. *Nat Rev Immunology* 6: 4-5（2006）
29. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, *et al*. High resolution mapping of the bimding site on human IgG1 for FcγRⅠ, FcγRⅡ, FcγRⅢ, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem* 276: 6591-6604（2001）
30. Claypool SM, Dickinson BL, Yoshida M, *et al*. Functional reconstitution of human FcRn in Madin-Darby canine kidney cells requies co-expressed human beta 2-microgloblin. *J Biol Chem* 277: 28038-28050（2002）
31. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7: 715-725（2007）
32. Suzuki T, Ishii-Watanabe A, Tada M, *et al*. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. *J Immunol* 184: 1968-1976（2010）
33. Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol* 25: 1369-1372（2007）
34. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497（1975）
35. Lobo ED, Soda DM, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 93: 2645-2668（2004）
36. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, *et al*. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domasins. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6851-6855（1984）
37. Shin SU, Morrison SL. Production and properties of chimeric antibody molecules. *Methods Enzymol* 178: 459-476（1989）
38. Jones PT, Dear PH, Foote J, *et al*. Replacing the complementarity-determing regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522-525（1986）
39. Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, *et al*. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 969-973（1994）

40. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, *et al*. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12: 433-455（1994）
41. Burton DR, Barbas CF. Human antibodies from combinatorial libraries. *Adv Immunol* 57: 191-280（1994）
42. 石田　功. ヒト抗体作製の最新技術, 実験医学, 20: 846-851（2002）
43. 川西　徹. 抗体医薬の現状と展望, *Folia Pharmacol. Jpn.* 131: 102-108（2008）
44. Zhiqiang An. Monoclonal antibodies- a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein Cell* 1: 319-330（2010）
45. Teillaud JL. Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion protein: Successes and challenge. *Expert Opin. Biol*. Ther 5: S15-S27（2005）
46. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, *et al*. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor（p75）-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 337: 141-147（1997）
47. Labrijn AF, Aalberse RC, Schuurman J. When binding is enough: nonactivating antibody formats. *Curr Opin Immunol* 20: 479-485（2008）
48. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6: 343-357（2006）
49. Roddy VP, Kinney CA, Chaikin VA, *et al*. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol* 164: 1925-1933（2000）
50. Guyre PM, Graziano RF, Goldstein J, *et al*. Increased potency of Fc-receptor-targeted antigen. *Cancer Immunol Immunother* 45: 146-148（1997）
51. Stand V, Kimberly R, Isaacs JD, *et al*. Biologics therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov* 6: 75-92（2007）
52. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, *et al*. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* 76: 231-248（1998）
53. Jiang XR, Song A, Bergelson S, *et al*. Advances in the assessment and control of the effector functions of thrapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Descov* 10: 101-109（2011）
54. Bolt S, Routledge E, Lloyd I, *et al*. The generation of a humanized, non-mitogenic CD3

monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. *Eur J Immunol* 23: 403-411（1993）

55. Oganesyan V, Gao C, Shirinian L, *et al*. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64: 700-704（2008）
56. Dall'Acqua WF, Cook KE, Damschroder MM, *et al*. Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region. *J Immunol* 177: 1129-1138（2006）
57. Ransohoff RM. Natalizumab for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 356: 2622-2629（2007）
58. Mueller JP, Giannoni MA, Hartman SL, *et al.* Humanized porcine VCAM specific monoclonal antibodies with chimeric IgG2/IgG4 constant regions block human leukocyte binding to porcine endothelial cells. *Mol Immunol* 34: 441-452（1997）
59. Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, *et al*. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol* 25: 1256-1264（2007）
60. Swann PG, Tolnay M, Muthukkumar S, *et al*. Considerations for the development of thrapeutic monoclonal antibodies. *Curr Opin Immunol* 20: 493-499（2008）
61. Yoo EM, Wims LA, Chan LA, *et al*. Human IgG2 can form covalent dimers. *J Immunol* 170: 3134-3138（2003）
62. Wypych J, Li M, Guo A, *et al*. Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. *J Biol Chem* 283: 16194-16205（2008）
63. Dillon TM, Ricci MS, Vezina C, *et al*. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem* 283: 16206-16215（2008）
64. Liu YD, Chen X, Enk JZ, *et al*. Human IgG2 antibody disulfide rearrangement in vivo. *J Biol Chem* 283: 29266-29272（2008）
65. Martinez T, Guo A, Allen MJ, *et al*. Disulfide connectivity of human immunoglobilin G2 structural isoforms. *Biochmistry* 47: 7496-7508（2008）
66. Lightle S, Aykent S, Lacher N, *et al*. Mutations within a human IgG2 antibody form distinct and homogeneous disulfide isomers but do not affect Fc gamma rceptor or C1q binding. *Protein*

Sci 19: 753-762（2010）

67. Allen MJ, Guo A, Martinez T, *et al*. Interchain Disulfide Bonding in Human IgG2 Antibodies Probed by Site-Directed Mutagenesis. *Biochmistry* 48: 3755-3766（2009）
68. Van der Neut Kolfxchoten M, Schuurman J, Losen M, *et al*. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 317: 1554-1557（2007）
69. Van der Zee JS, van Swieten P, Aalberse RC. Serologic aspects of IgG4 antibodies Ⅱ. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J Immunol* 137: 3566-3571（1986）
70. Schuurman J, Van Ree R, Perdok GJ, *et al*. Normal human immunogloblin G4 is bispecific : it has two different antigen-combining sites. *Immunology* 97: 693-698（1997）
71. Schuurman J, Perdok GJ, Gorter AD, *et al*. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol Immunol* 38: 1-8（2001）
72. Bloom JW, Madanat MS, Marriott D, *et al*. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 6: 407-415（1997）
73. Angal S, King DJ, Bodmer MW, *et al*. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human（IgG4）antibody. *Mol Immunol* 30: 105-108（1993）
74. Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105: 9-19（2002）
75. Reddy MP, Kinney CAS, Chaikin MA, *et al*. Elimination of Fc Receptor-Dependent Effector Functions of a Modified IgG4 Monoclonal Antibody to Human CD4. *J Immunol* 164: 1925-1933（2000）
76. Newman R, Hariharan K, Reff M, *et al*. Modification of the Fc Region of a Primatized IgG Antibody to Human CD4 Retains Its Ability to Modulate CD4 Receptors but Dose Not Deplete CD4+ T Cells in Chimpanzees. *Clinical Immunol* 98: 164-174（2001）
77. Shire SJ. Formulation and manufacturability of biologics. *Curr Opin Biotechnol* 20: 708-714（2009）
78. Wright HT. Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 1-52（1991）
79. Geiger T, Clarke S. Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and

Aspartyl Residues in peptide: Succinimide-Linked Reactions That Contribute to Protein Degradation. *J Biol Chem* 262: 785-794（1987）

80. Li S, Schoneich C, Borchardt RT. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanism of Oxidation and Strategy for Stabilization. *Biotechnol Bioeng* 48: 490-450（1995）
81. Wang W. Instability, Stabilization, and Formulation of Liquid Protein Pharmaceuticals. *Int J Pharmacut* 185: 129-188（1999）
82. Chi EY, Krishanan S, Randolph TW, *et al*. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res* 20: 1325-1336（2003）
83. Chelius D, Jing K, Lueras A, *et al*. Formation of pyroglutamic acid from N-terminal glutamic acid in immunoglobulin gamma antibodies. *Anal chme* 78: 2370-2376（2006）
84. Harris RJ. Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture. *J Chromatogr A Analyt Technol Biomed Life Sci* 705: 129-134（1995）
85. Chumsae C, Gaza-Bulseco G, Sun J, *et al*. Comparison of methionin oxidation in thermal stability and chemically stressed sample of a fully human monoclonal antibody. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850: 285-294（2007）
86. Liu D, Ren D, Huang H, *et al*. Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochmistry* 47: 5088-5100（2008）
87. Liu YD, van Enk JZ, Flynn GC. Human antibody Fc deamidation in vivo. *Biologicals* 37: 313-322（2009）
88. Chelius D, Rehder DS, Bondarenko PV. Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies. *Anal Chem* 77: 6004-6011（2005）
89. Wang S, Ionescu R, Peekhus N, *et al*. Separation of post-translational modifications in the Fc fragment of monoclonal antibodies by exploiting subtle conformational changes under mildly acidic conditions. *J Chromatogr A* 1217: 6496-6502（2010）

90. Tyagi AK, Randolph TW, Dong A, *et al*. IgG particle formation during filling pump operation: a case study of heterogeneous nucleation on stainless steel nanoparticles. *J Pharm Sci* 98: 94-104（2009）

91. Chi EY, Weickmann J, Carpenter JF, *et al*. Heterogeneous Nucleation-controlled Particulate formation of recombinant Human platelet-activating Factor Acetylhydrolase in pharmaceutical formulation. *J Pharm Sci* 94: 256-274（2005）

92. Vermeer AW, Giacomelli CE, Norde W. Adsorption of IgG onto hydrophobic teflon. Differences between the Fab and Fc domains. *Biochem Biophs Acta* 1526: 61-69（2001）

93. Daugherty AL, Mrsny RJ. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 686-706（2006）

94. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenecity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 1: 457-462（2002）

95. Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, *et al*. Strucuture-immunogenecity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res* 21: 897-903（2004）

96. Kessler M, Goldsmith D, Schellekens H. Immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nephrol Dial Transplant* 5: 9-12（2006）

97. Rosenberg AS. Effects of Protein Aggregates: Immunologic prespective. *AAPS J* 8: E501-E507（2006）

98. Daugherty AL, Mrsny RJ. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Adv Drug Delivery Rev* 58: 686-706（2006）

99. Cordoba AJ, Shyong BJ, Breen D, *et al*. Non Enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 818: 115-121（2005）

100. Ejima D, Tsumoto K, Fukuda H, *et al*. Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins* 66: 954-962（2007）

101. Franey H, Brych SR, Kolvenbach CG, *et al*. Increased aggregation propencity of IgG2 subclass over IgG1: role of conformational changes and covalent chracter in isolated aggregates. *Protein Sci* 19: 1601-1615（2010）

第 2 章　抗体各サブクラスの保存安定性評価

2-1. 緒言

抗体医薬品の開発において第 1 章で凝集・会合による重合体抑制の重要性について前述した。これまでにさまざまな抗体に対して特定のストレスによる重合体形成やそのメカニズム解明について多く報告されている [1-13]。しかしながら同じ可変領域を持つ抗体においてサブクラス間でその安定性を評価し、サブクラスが異なることによる安定性の類似点および相違点の評価を行った例は少ない。そこで本章では、IgG のサブクラスの違いによる熱ストレスに対する重合体および分解物の保存安定性への影響を評価した。なお、サブクラス間の違いをより明確にするために、物性に最も影響を与えることが知られている pH の幅を 4.0 から 7.0 とし評価した。検討には可変領域に共通のアミノ酸配列を有し、定常領域がそれぞれのサブクラスに対応する抗体を用いた。また可変領域の配列も 4 種類（そのうち 2 種がヒト抗体、1 種がキメラ抗体、1 種がヒト化抗体）用意し、可変領域の影響も考察した。

2-2. 実験方法

2-2-1 使用抗体

本研究において使用した抗体は全て協和発酵キリン株式会社によってチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）を用いて発現させ、その培養液を回収後、Protein A 親和性クロマトグラフィー等を使用して精製を行った。

本研究で用いた抗体を Table 2-1-1 に示した。アルファベット A から D はそれぞれ抗原を示している。Mab-A G1 は抗原 A に対する IgG1 抗体を表している。Mab-A、Mab-B はヒト抗体、Mab-C はキメラ抗体、Mab-D はヒト化抗体を用いた。IgG2 においては Mab-A および Mab-B は野生型、Mab-C および Mab-D の IgG2 はエフェクター機能低減を目的とした

Table 2-1-1　使用抗体一覧

Mab	Subclass	type	pI
Mab-A G1	IgG1	human	8.91
Mab-A G2	IgG2		8.58
Mab-A G4PE	IgG4PE		8.10
Mab-B G1	IgG1		8.91
Mab-B G2	IgG2		8.54
Mab-B G4PE	IgG4PE		8.05
Mab-C G1	IgG1	mouse-human chimera	9.34
Mab-C G2AAAS	IgG2AAAS		8.92
Mab-C G4	IgG4		8.65
Mab-C G4PE	IgG4PE		8.49
Mab-D G1	IgG1	humanized	8.91
Mab-D G2AAAS	IgG2AAAS		8.06
Mab-D G4	IgG4		7.49
Mab-D G4PE	IgG4PE		7.30

改変体 IgG2AAAS（V234A、G237A、P331S）を用いた。また IgG4 においては全ての抗体でハーフ抗体産生抑制および ADCC 活性低減を目的とした改変体 IgG4PE（S228P、L235E）をスタンダードとし、Mab-C および Mab-D では野生型も比較した。また Mab-A から Mab-D の全ての抗体の軽鎖はκ鎖を用いた。

2-2-2. 検体調製

検討に用いた抗体は NAP-25 カラム（GE ヘルスケア　バイオサイエンス株式会社）を用い、バッファー交換を行い、所定の製剤処方とした。今回用いた製剤処方は 10mM グルタミン酸ナトリウム、262 mM D-ソルビトール、0.05 mg/mL ポリソルベート 80、pH4.0、5.0、5.5、6.0、7.0 である。吸光度を測定することにより、抗体濃度を算出し、全ての検体で抗体濃度を 5 mg/mL に調整した。処方溶液中に含まれる溶質および注射用水は全て日本薬局方（JP）などの公定書、United States Pharmacopeia/National Formulary（USP）、European Pharmacopeia（EP）のいずれか、あるいはその複数に準拠したものを使用した。このように調製した検体を 0.2μm pore の無菌ろ過膜（PVDF 膜；ミリポア株式会社）を用い、無菌用溶液とした。本溶液を 5mL 容ガラスバイアル（不二硝子株会社）に 1mL ずつ無菌的に充てん、フッ素樹脂でラミネートされたゴム栓をし、アルミキャップ（石田プレス工業株株式界）で巻き締め、密封したものを試験に供した。

2-2-3. 熱ストレスによる保存

調製した検体を紙製の白箱に詰め、正置状態（バイアルのゴム栓が上になる条件）で 25℃あるいは 40℃に調節されたインキュベータ内に保存した。インキュベータ内で 1 箇月あるいは 3 箇月保存したものを分析に供した。インキュベート期間終了後、分析までの期間は 4℃保存とした。

2-2-4. 目視（Visiual Inspection）

可視性不溶性凝集体や濁りを評価するために目視試験を実施した。黒色背景、白色光源下で検体中に含まれる不溶性凝集体の有無を判断した。判定は以下の基準で行った。

＜判定基準＞

異物ランク『－』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、異物を認めない。

異物ランク『±』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、微小な異物と判断される少数の浮

遊物をかすかに認める。

異物ランク『＋』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、微小な異物をと判断される少数の浮遊物をわずかに認める。

異物ランク『2＋』: 約 5000 ルクスの明るさで観察した時、容易に検出される異物を認めるが、約 1000 ルクスの明るさでたやすく検出される異物を認めない。

異物ランク『3＋』：約 1000 ルクスの明るさで観察した時。たやすく検出される異物を認めない。

また、濁りについても黒色背景、白色光源下で検体の濁りを判断した。判定は以下の基準で行った。

＜判定基準＞

濁りランク『－』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、濁りを認めない。

濁りランク『±』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、ごくわずかに濁りを認める。

濁りランク『＋』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、わずかに濁りを認める。

濁りランク『2＋』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、容易に濁りを認める。

濁りランク『3＋』：約 5000 ルクスの明るさで観察した時、容易に濁りを認め、約 200 ルクス（室内散光下）で観察した時、濁りを認める。

2-2-5. サイズ排除クロマトグラフィー（Size Exclusion Chromatography：SEC）

SEC はバイオ医薬品中のペプチド/タンパク質凝集体・会合体の定量的手法の一つである。SEC は実験操作、試料調製が簡便な点、また再現性が高い点等の利点により最も汎用されている。分析カラムには TSKgel G3000SWXL（30cm x 7.8 mm ID；東ソー株式会社）を分析に用いた。Mab-A、Mab-B の分析には 1 本、Mab-C、Mab-D の分析には 2 本を直列に連結して分析した。移動相には 20mM リン酸ナトリウムおよび 500mM 塩化ナトリウムを含む溶液を pH 7.0 に調整し、0.45μm pore フィルターを用いてろ過し、脱気した後、使用した。たんぱく質を 20μg インジェクトし、カラム温度は室温、流量 0.5 mL/ min、検出波長 215nm、分析時間 30 分（Mab-A,Mab-B）、60 分（Mab-C、Mab-D）で分析を行った。

全てのサブクラスで Mab-A、Mab-B については約 16 分、Mab-C、Mab-D については約 31.5 分に単量体（Monomer）の主ピークが認められた。主ピークより保持時間が短いものを可溶性重

合体（HMWS）、長いものを分解物（LMWS）とした。

2-2-6. ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoreisis：SDS-PAGE）

SDS-APGE はポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法であり、タンパク質の分子量を推定する手法の一つである。また還元、非還元条件で評価することで重合体の共有結合の有無、分解物、クリッピングなどの分子サイズの変化を検出できる。

Mab-A および Mab-B の泳動に用いる検体は以下の手順に従い処理を行った。

非還元条件の検体は、0.2 mg/mL に調製した検体を SDS 含有処理液（トリス SDS サンプル処理液: コスモ・バイオ株式会社）と等量混合したものを泳動に供した。還元条件の検体は 0.2 mg/mL に調製した検体に SDS とβ-メルカプトエタノールを含む処理液（トリス SDS-βMe サンプル処理液：コスモ・バイオ株式会社）と等量混合し、65℃で 15 分間加熱処理することによって還元反応を促進したものを泳動に供した。SDS-PAGE ゲルにはマルチゲルⅡミニ 4/20（コスモ・バイオ株式会社）を用いた。タンパク質量として 5μg をアプライし、Tris/Glycine/SDS 緩衝液（コスモ・バイオ株式会社）中で、ゲル 1 枚あたり 20mA 定電流で泳動した。染色には 2D-銀染色試薬Ⅱ（コスモ・バイオ株式会社）を用いた。

また Mab-C および Mab-D の泳動に用いる検体は以下の手順に従い処理を行った。

非還元条件の検体は、1.0 mg/mL および 0.1 mg/mL に調製した検体 5μL を 25μL の SDS 含有処理液（Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer（2x）：Invitrogen 社）、20μL のミリ Q 水と混合した。還元条件の検体には 1.0 mg/mL および 0.1 mg/mL に調製した検体 5μL を 25μL の SDS 含有処理液（Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer（2x）：Invitrogen 社）、5μL の還元試薬（NuPAGE Sample Reducing Agent（10x）：Invitrogen 社）、15μL のミリ Q 水と混合した。これら混合溶液を 65℃で 15 分間加熱処理したものを泳動に供した。SDS-PAGE ゲルには NuPAGE 8-16% Tris-Glycine Gel 1.0mm 15well（Invitrogen 社）を用いた。1 ウェルあたりタンパク量としては 1μg および 0.1μg をアプライし、Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer（Invitrogen 社）中で、125V 定電圧で泳動した。染色には 2D-銀染色試薬Ⅱ（コスモ・バイオ株式会社）を用いた。

2-2-7 レーザー励起蛍光検出キャピラリーゲル電気泳動（Capillary electrophoreisis-Sodium Dodecyl Sulfate with Laser-Induced Fluorescence Detection：CE-SDS-LIF）

CE-SDS-LIF はタンパク質の純度測定に用いられる手法の一つであり、高い定量性が特徴である[24]。IgG4 のハーフ抗体の定量を目的とし、CE-SDS-LIF を実施した。測定にはベックマン社製のキャピラリー電気泳動システム Proteome Lab PA800 を用いて分析した。抗体濃度を 1mg/mL に希釈後、NAP-5 カラムにより 0.1 mol/L 重炭酸ナトリウム（pH8.3）にバッファー交換し、5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester（5-TAMRA-SE）にて蛍光標識を行い、再度 NAP-5 カラムにより、85 mmol/L クエン酸-リン酸緩衝液（pH6.5）にバッファー交換を行った。その後、非還元条件下で SDS 処理を行い、泳動に供した。サンプルをキャピラリー電気泳動で分離し、レーザー励起蛍光検出にて検出を行った。

2-3 結果および考察

2-3-1 目視（Visual Inspection）

目視試験における不溶性凝集体（異物）および濁りの結果を Table2-3-1,2,3,4 に示した。目視試験により不溶性凝集体として認識される大きさは 50～100μm であると言われている[14]。

Mab-A

IgG4PE pH7 の 40℃3 箇月保存検体（40℃3M：M は Month）で異物ランクが『＋』を示した以外は概ね、全ての検体で異物ランクは『±』であり、各検体 Initial から経時的に大きな差は認められなかった。また濁りについて比較すると、Initial 時、IgG1 および IgG2 のほとんどの検体が濁りランク『±』に対し、IgG4PE では pH5.0 および pH6.0 検体で『＋』、pH7.0 検体で『2＋』と pH の増加に伴い濁りが濃くなる傾向が認められた。これらの濁りは Initial より熱ストレスによる経時的な変化は認められなかった。

Mab-B

Initial 時、各サブクラスで pH 増加に伴い、わずかに異物量が増加する傾向が認められ、その傾向は IgG4PE で顕著であった。熱ストレスによる経時的な増加は各サブクラス高 pH 側で顕著であり、pH7.0・40℃1M 検体では異物ランクが IgG1 および IgG2 では『2＋』、IgG4PE では『3＋』と比較的大きな不溶性凝集体が確認された。また pH6.0 検体において IgG1 および IgG2 では Initial より大きな変化は認められなかったのに対し、IgG4PE では 25℃および 40℃保存検体で異物ランク『2＋』に増加しており、IgG4PE で幅広い pH で異物が生じやすい傾向が示唆された。濁りは Mab-A 同様、Initial から IgG1 および IgG2 に比べ、IgG4PE の pH7.0 検体で濁りが濃い傾向が認められた。

Mab-C

Initial 時は全ての検体で異物ランクが『±』であり、検体間で差はなかった。熱ストレスによる経時的な増加は各サブクラス高 pH 側で顕著であり、pH7.0・40℃3M 検体では異物ランクが IgG1 では『2＋』、IgG2AAAS および IgG4 では『＋』、IgG4PE では『3＋』と比較的大きな不溶性凝

集体が確認された。濁りに関しては各サブクラスとも pH の増加と共に濁りが濃くなる傾向が認められた。また Initial から熱ストレスにより経時的に若干濁りが濃くなり、その傾向は IgG1 に比べて IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE で大きかった。

Mab-D

Initial 時は全ての検体で異物ランクが『±』であり、検体間で差はなかった。熱ストレスにより経時的に異物ランクの増加が認められ、各サブクラスとも pH の増加に伴い顕著であった。また各サブクラスの 25℃1M 高 pH 検体で『2＋』から『3＋』の不溶性凝集体が確認されるなど、4 つの抗体の中で最も不溶性凝集体を形成しやすかった。SEC 分析の項で詳細については後述するが、Mab-D は Initial 時から可溶性重合体（HMWS）の割合が他の抗体に比べ多かった。これら可溶性重合体の一部が凝集核となり不溶性凝集体の形成を促進した可能性が考えられる。濁りに関しては Mab-C 同様、各サブクラスとも pH の増加と共に濁りが濃くなる傾向が認められた。また Initial から熱ストレスにより経時的に若干に濁りが濃くなり、その傾向は IgG1 に比べて IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE で大きかった。

4 つの抗体の結果を比較すると、熱ストレスにより高 pH 側で不溶性凝集体を形成しやすく、濁りが濃くなる共通の傾向が認められた。また、IgG4 および IgG4PE は IgG1 に比べ広範囲の pH で不溶性凝集体を形成しやすいことも示唆された。これらは colloidal stability と大きく関与していると考えられる。一般的にタンパク質溶液は等電点 pI 付近ではネットチャージが小さくなり、分子間相互作用が増し凝集・会合しやすくなる。各サブクラスの pI はおよそ 8.0～9.0 の範囲にあり、IgG4＜IgG2＜IgG1 の序列であった。このため pH7.0 は抗体の pI に最も近く、抗体分子表面のネットチャージが弱く、全ての抗体で凝集しやすく、pI からの幅（絶対値）が最も小さい IgG4 で顕著であった。逆に pH4.0 ではネットチャージが高く、抗体分子間で反発が優位に働くことで溶解度が増加し、不溶性凝集が抑制されたと考えられる。しかしながらその異物レベル、その度合いは抗体によって大きく異なっていた。これは可変領域の影響を大きく受けており、おそらく表面に露出しているアミノ酸の疎水性などに起因し、個々の抗体で colloidal stability が変化することに大きく依存すると考えられる。

近年、バイオ医薬品に含まれる不溶性凝集体が生体の免疫反応を惹起し、アナフィラキシーな

どの副作用を発症させる可能性についてや不溶性微粒子（特に Subvisible particle）についての考え方について、Carpenter JF 等を始めとした各製薬企業の製剤処方研究者が報告している[15, 16]。今回の目視結果のように、サブクラスの違いが不溶性凝集体の形成しやすさに影響を与える可能性が示唆され、不溶性凝集体を形成しやすい IgG4 のサブクラスを用いた医薬品開発には十分なケアが必要である。

Table.2-3-1 Mab-A の目視結果　A）不溶性微粒子（異物）、B）濁り

A）

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	－	±	±	±	±
	5.0	－	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	±	±	±	±	±
IgG2	4.0	－	±	±	±	±
	5.0	－	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	±	±	±	±	±
IgG4PE	4.0	－	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	±	±	±	±	＋

B）

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	濃－	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	＋	＋	濃±	＋	＋
IgG2	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	＋	＋	濃±	＋	＋
IgG4PE	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	濃±	±	±
	5.5	＋	＋	＋	＋	＋
	6.0	濃＋	濃＋	濃＋	濃＋	2＋
	7.0	2＋	濃2＋	濃2＋	濃2＋	濃2＋

Table.2-3-2 Mab-B の目視結果　A）不溶性凝集体（異物）、B）濁り

A)

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	－	±	±	±	±
	5.0	－	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	－	±	2＋	3＋	3＋
IgG2	4.0	－	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	±	3＋	2＋	3＋	3＋
IgG4PE	4.0	－	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	－	3＋	2＋	3＋	＋
	7.0	－	3＋	2＋	3＋	3＋

B）

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	－	－	±	－	－
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	±	±	±	±	＋
IgG2	4.0	－	－	±	－	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	±	±	±	±	±
IgG4PE	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	±
	7.0	＋	＋	＋	＋	＋

Table.2-3-3 Mab-C の目視結果　A）不溶性凝集体（異物）、B）濁り

A）

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	＋	±	±	±
	6.0	±	＋	＋	＋	＋
	7.0	±	＋	＋	＋	2＋
IgG2 AAAS	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	＋	＋	＋	±
	7.0	±	＋	±	＋	＋
IgG4	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	＋	＋	±	±
	6.0	±	＋	＋	＋	±
	7.0	±	＋	＋	＋	＋
IgG4PE	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	±	±	＋
	7.0	±	±	＋	＋	2＋

B）

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	±	±	±
	5.5	±	±	±	±	±
	6.0	±	±	濃±	±	濃±
	7.0	濃±	濃±	濃±	濃±	濃±
IgG2	4.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	5.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	5.5	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	6.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	7.0	濃±	濃±	濃±	濃±	濃±
IgG4	4.0	±	±	±	濃±	濃±
	5.0	±	±	±	濃±	濃±
	5.5	±	±	濃±	濃±	濃±
	6.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	7.0	濃±	濃±	濃±	濃±	濃±
IgG4PE	4.0	±	±	±	濃±	濃±
	5.0	±	±	±	濃±	濃±
	5.5	±	±	濃±	濃±	濃±
	6.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	7.0	濃±	濃±	濃±	濃±	濃±

Table.2-3-4 Mab-D の目視結果　A）不溶性凝集体（異物）、B）濁り

A）

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	＋	±	＋
	5.5	±	±	3＋	±	2＋
	6.0	±	2＋	3＋	3＋	2＋
	7.0	±	2＋	3＋	3＋	3＋
IgG2 AAAS	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	＋	2＋	＋	＋
	5.5	±	3＋	2＋	2＋	2＋
	6.0	±	3＋	3＋	2＋	3＋
	7.0	±	3＋	3＋	3＋	3＋
IgG4	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	2＋	±	2＋
	5.5	±	3＋	3＋	3＋	3＋
	6.0	±	3＋	3＋	2＋	3＋
	7.0	±	3＋	3＋	3＋	3＋
IgG4PE	4.0	±	±	±	±	±
	5.0	±	±	2＋	±	2＋
	5.5	±	3＋	3＋	3＋	3＋
	6.0	±	3＋	3＋	2＋	3＋
	7.0	±	3＋	3＋	3＋	3＋

B）

Subclass	pH	Initial	25℃1M	25℃3M	40℃1M	40℃3M
IgG1	4.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	5.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	5.5	±	濃±	＋	濃±	＋
	6.0	±	濃±	＋	濃±	＋
	7.0	±	濃±	濃＋	濃±	＋
IgG2	4.0	±	濃±	濃±	濃±	濃±
	5.0	±	濃±	＋	濃±	＋
	5.5	±	濃±	＋	濃±	＋
	6.0	±	濃±	＋	濃±	＋
	7.0	±	濃±	＋	濃±	＋
IgG4	4.0	濃±	濃±	濃±	濃±	濃±
	5.0	濃±	濃±	＋	濃±	濃±
	5.5	濃±	濃±	＋	濃±	＋
	6.0	濃±	濃±	＋	濃±	＋
	7.0	＋	＋	濃＋	＋	濃＋
IgG4PE	4.0	濃±	濃±	濃±	濃±	濃±
	5.0	濃±	濃±	＋	濃±	濃±
	5.5	濃±	濃±	＋	濃±	＋
	6.0	濃±	濃±	＋	濃±	＋
	7.0	＋	＋	濃＋	＋	濃＋

2-3-2 SEC（HMWS ＆ LMWS）

Mab-A

各サブクラスで熱ストレスにより増加する分子種および増加量に違いが認められた。IgG1、IgG2 において約 13 分のピーク（dimer）は pH 増加に伴い増加傾向が認められ、pH7.0 で顕著であった。IgG4PE は pH5.0 から 7.0 の領域で IgG1、IgG2 同様に pH 増加に伴い増加傾向が認められたが、pH4.0 でも顕著な増加が認められた。また 13 分のピーク（dimer）より大きい分子量ピークの増加が IgG4 で顕著であった。特に約 11 分のボイドピーク増加は IgG4 で顕著であり、IgG1、IgG2 は pH7.0 のみで確認されたが、IgG4 では pH5.0 から 7.0 で認められ、IgG4 は IgG1、IgG2 に比べ分子量の大きい可溶性重合体を形成しやすいことが示唆された。また、IgG1 では主ピーク直後の 17 分および 19 分にピークが認められ、特に pH4.0 で増加が顕著であり、IgG2 および IgG4PE に比べ分解されやすいことが示唆された。Fig.2-3-2-1～2-3-2-4 に 40℃3M 検体および各サブクラスの SEC クロマトグラムの変化、Fig.2-3-2-5 に重合体量（HMWS）および分解物量（LMWS）を示し、サブクラスごとに各 pH の詳細を以下にまとめる。

【IgG1】

分析開始時（Initial）、全ての pH でほぼ同じクロマトグラムを示し、重合体量は約 0.5%、分解物は約 0.8%であった。

各分析ポイントにおいて重合体量（HMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められ、pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められた。クロマトグラムの変化としては、約 13 分のピーク（おそらく dimer と推定される）の増加が確認され、特に pH7.0 で顕著であった。また pH7.0 では約 11 分のボイドピークの増加も確認され、高 pH 領域の 40℃保存では、かなり分子量の大きい可溶性重合体の増加が示唆された。

分解物（LMWS）はメインピーク直後である 17 分のピークおよび約 19 分のピークが全ての pH で経時的な増加が確認された。特に pH4 で顕著であり、40℃1 箇月（40℃1M）では約 5%、40℃3 箇月（40℃3M）では約 13%の増加が確認され、他のサブクラスには認められない傾向であった。その増加量において pH の傾向は pH4＞＞pH5＞pH5.5≒pH6.0＜pH7.0 であり、pH6.0 付近で最小であった。

【IgG2】

分析開始時（Initial）、全ての pH でほぼ同じクロマトグラムを示し、重合体量は約 1%、分解

物は約 0.7%であった。

各分析ポイントにおいて重合体量（HMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められ、pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められた。特に pH7 において顕著であり、クロマトグラムの変化としては、約 13 分のピーク（おそらく dimer と推定される）の増加が確認された。また約 11 分のボイドピークの増加も確認され、高 pH 領域の 40℃保存では、かなり分子量の大きい可溶性重合体の増加が示唆された。

分解物量（LMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められた。クロマトグラムの変化は経時的にメインピーク直後のショルダーピークがよりブロードになり、また約 19 分にピークの増加が確認された。その増加量において pH の傾向は pH4＞＞pH5≧pH5.5≒pH6.0＜pH7.0 であり、pH6.0 付近で最小であった。

【IgG4PE】

分析開始時（Initial）、ほぼ同じクロマトグラムを示したが、重合体量は約 4～5.5%と pH 依存的に高くなる傾向を示し、分解物は pH 間で差はなく約 0.4%であった。

各分析ポイントにおいて重合体量（HMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められ、pH5.0～7.0 の領域では pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められた。また IgG1、IgG2 の傾向とは異なり、pH4 でも重合体の増加が顕著に認められ、その増加量における pH の傾向は pH4＞＞pH5.0＜pH5.5＜pH6.0＜pH7.0 であった。クロマトグラムの変化としては、約 13 分のピーク（おそらく dimer と推定される）の増加が確認された。また dimer よりも大きい分子ピークおよび約 11 分のボイドピークの増加が、IgG1 や IgG2 で認められなかった pH5.0～6.0 でも顕著であった。また IgG1、IgG2 においては 25℃保存検体では Initial から大きな変化は認められなかったのに対し、IgG4 では経時的に増加が確認された。これらのことを考慮すると IgG4 は同じ条件下でも IgG1 や IgG2 に比べ非常に凝集しやすい傾向を有していることが示唆された。

分解物量（LMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められた。クロマトグラムの変化は経時的にメインピーク直後のショルダーピークがよりブロードになり、また約 19 分にピークの増加が確認された。その増加量において pH の傾向は pH4＞pH5≧pH5.5≒pH6.0＜pH7.0 であり、pH6.0 付近で最小であった。

Mab-B

クロマトグラムの変化および pH に対する劣化は Mab-A と同様の傾向を示した。Fig.2-3-2-6 に重合体量（HMWS）および分解物量（LMWS）を示し、サブクラスごとに各 pH の詳細を以下にまとめる。

【IgG1】

分析開始時（Initial）、全ての pH でほぼ同じクロマトグラムを示し、重合体量は約 2.2%、分解物は約 1.5%であった。

各分析ポイントにおいて重合体量（HMWS）を比較すると、pH4.0 から pH5.5 の領域では 25℃、40℃検体共に分析開始時から大きな変化は認められなかった。pH6.0 および 7.0 では経時的かつ温度依存的な増加が認められた。クロマトグラムの変化としては、約 13 分のピーク（おそらく dimer と推定される）の増加が確認され、特に pH7.0 で顕著であった。また pH7.0 では約 11 分のボイドピークの増加も確認され、高 pH 領域の 40℃保存では、かなり分子量の大きい可溶性重合体の増加が示唆された。

分解物（LMWS）はメインピーク直後である 17 分のピークおよび約 19 分のピークが全ての pH で経時的な増加が確認された。特に pH4 で顕著であり、40℃1 箇月では約 6%、40℃3 箇月では約 15%の増加が確認され、他のサブクラスには認められない傾向であった。その増加量において pH の傾向は pH4＞＞pH5＞pH5.5＜pH6.0≦pH7.0 であり、pH5.5 付近で最小であった。

【IgG2】

分析開始時（Initial）、全ての pH でほぼ同じクロマトグラムを示し、重合体量は約 2.5%、分解物は約 0.25%であった。

各分析ポイントにおいて重合体量（HMWS）を比較すると、pH5.0 から pH6.0 の領域では 25℃、40℃検体共に分析開始時から大きな変化は認められなかった。pH7.0 では経時的かつ温度依存的な増加が認められた。40℃3M において pH4.0 の検体では若干増加する傾向が認められた。クロマトグラムの変化としては、約 13 分のピーク（おそらく dimer と推定される）の増加が確認された。また約 11 分のボイドピークの増加も確認され、高 pH 領域の 40℃保存では、かなり分子量の大きい可溶性重合体の増加が示唆された。

分解物量（LMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められた。クロマトグラムの変化は経時的にメインピーク直後のショルダーピークがよりブロードになり、また約 19 分にピークの増加が確認された。その増加量において pH の傾向は pH4.0＞＞

pH5.0≧pH5.5≒pH6.0＜pH7.0 であり、pH6.0 付近で最小であった。

【IgG4PE】

分析開始時（Initial）、ほぼ同じクロマトグラムを示したが、重合体量は約 1～1.4%と pH 依存的に高くなる傾向を示し、分解物は pH 間で差はなく約 0.5%であった。

各分析ポイントにおいて重合体量（HMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められ、pH5.0～7.0 の領域では pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められた。また IgG1、IgG2 の傾向とは異なり、pH4 でも重合体の増加が顕著に認められ、その増加量における pH の傾向は pH4＞＞pH5.0＞pH5.5＜pH6.0＜pH7.0 であった。クロマトグラムの変化としては、約 13 分のピーク（おそらく dimer と推定される）の増加が増加量の大きかった pH4.0 および pH7.0 で確認された。また dimer よりも大きい分子ピークおよび約 11 分のボイドピークの増加が、IgG1 や IgG2 で認められなかった pH5.0～6.0 でも顕著であり、IgG4 は同じ条件下でも IgG1 や IgG2 に比べ非常に凝集しやすい傾向を有していることが示唆された。

分解物量（LMWS）を比較すると、全ての pH で経時的かつ温度依存的な増加が認められた。クロマトグラムの変化は経時的にメインピーク直後のショルダーピークがよりブロードになり、また約 19 分にピークの増加が確認された。その増加量において pH の傾向は pH4.0＞pH5.0≧pH5.5≒pH6.0＜pH7.0 であり、pH6.0 付近で最小であった

<u>50℃2 週間（50℃2W）の熱ストレスによる保存安定性</u>

Mab-A および Mab-B の各サブクラスについて、40℃1 箇月より苛酷な 50℃2 週間（50℃2W）の熱ストレスを負荷し、SEC により抗体の分子サイズの変化を評価した。検体に用いた処方は基本処方（10mM グルタミン酸ナトリウム、262mM D-ソルビトール、0.05mg/mL ポリソルベート 80、pH5.5）である。Fig.2-3-2-7 に Mab-A の 50℃2W 検体の SEC クロマトグラムの変化を示した。

クロマトグラムの比較をすると熱ストレスを負荷した 50℃2W 検体で大きく重合体の増加が確認されたが、それぞれサブクラスで増加する分子種が異なることがわかった。IgG1 は dimer ピークとメインピークの間のピーク、IgG2 はボイドピークから dimer ピークにかけてのピーク、IgG4PE は圧倒的なボイドピークの増加が認められた。その増加量は IgG1 で 0.5%、IgG2 で 1.8%、IgG4PE で 17%であり、IgG4PE で顕著であった。

Mab-B でも同様の結果を示し、重合体量の増加は IgG1 で 0.3%、IgG2 で 0.2%、IgG4PE で 7.0%

であった。2 つの抗体で増加量に違いは認められたが、IgG4PE が IgG1 や IgG2 に比較して熱ストレスによる重合体を形成しやすい傾向は、同じであった。この結果よりこれらの傾向はサブクラスに起因する物性であり、IgG4PE は IgG1、IgG2 に比べて重合体形成しやすいことが示唆された。

Mab-C

クロマトグラムの変化および pH に対する劣化において細かい違いは認められたが、概ね Mab-A および Mab-B と同様の傾向を示した。Fig.2-3-2-8～2-3-2-11 に各サブクラスの SEC クロマトグラムの変化、Fig.2-3-2-12 に重合体量（HMWS）および分解物量（LMWS）を示し、サブクラスごとに各 pH の詳細を以下にまとめる。

【IgG1】

HMWS

25℃保存検体では各 pH ともに保存開始からほとんど増加は認められなかった。40℃保存検体では、わずかな量であるが pH 増加に伴いボイド付近約 22 分にピークの増加が認められ、高分子量の可溶性重合体の増加が示唆された。この増加は pH が高くなるにつれて、その増加量は大きくなる傾向が認められた。また pH4、40℃保存検体においてはモノマーピークが高分子量側にわずかながらブロードになる傾向が認められた。各分析ポイントにおいて全体の重合体量（HMWS）を比較すると、僅かであるが pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められた。

LMWS

25℃、40℃保存検体共に、保存開始から約 33.5 分、39 分に LMWS のピークの経時的かつ温度依存的な増加が認められた。その傾向は pH4.0 で顕著であり、40℃1 箇月検体で約 5%、40℃3 箇月検体で約 15%の増加が認められた。これらピークはそれぞれ、desFab および Fab 断片と推察され、その増加量において pH の傾向は pH4.0＞＞pH5.0＞pH5.5＞pH6.0≦pH7.0 と低 pH 領域で顕著であり、pH6.0 付近で最小であった。

【IgG2AAAS】

HMWS

IgG1 同様、25℃保存検体では各 pH ともに保存開始からほとんど増加は認められなかった。pH4.0、40℃保存検体では約 27 分のピークを中心に HMWS の経時的な増加が認められた。これら HMWS は pH4.0 で顕著な増加を示したが、pH が高くなるにつれて低下傾向を示した。また IgG1

同様、40℃保存検体で pH 増加に伴い約 22 分にピークの増加が認められ、高 pH ほど増加が多い傾向が認められた。しかもこの増加量は IgG1 に比較して大きかった。

LMWS

25℃保存検体では各 pH 共に保存開始から増加は認められなかった。40℃保存検体では各 pH ともにモノマーピークの低分子量側がブロードになり約 33 分から 40 分にかけて低分子劣化物と推察されるピークが確認された。その傾向は pH4.0＞＞pH5.0≧pH5.5≧pH6.0≧pH7.0 で pH4.0 で最も強く、pH が高くなるにつれて減少傾向を示した。

【IgG4】

HMWS

25℃保存検体では各 pH 共に他のサブクラス同様、保存開始からほとんど増加は認められなかった。40℃保存検体では約 26、27、28.5 分にピークを持つ HMWS の増加が認められ、pH によって増加するピーク種に違いが認められた。特に pH4.0 は全ての検体の中で最も増加量が大きく、40℃1 箇月検体で約 2.0%、40℃3 箇月検体で約 11%の増加が認められた。また IgG1、IgG2AAAS 同様、約 22 分にピークの増加が認められ、高 pH ほど増加が多い傾向が認められた。このピークの増加量は IgG1 と同レベルであった。40℃3 箇月検体の HMWS 増加量を他のサブクラスと比較すると、IgG1 や IgG2AAAS に比べ IgG4 の HMWS 増加量が最も大きい傾向が認められた。

LMWS

25℃保存検体では pH5.0 から 7.0 の検体については保存開始からほとんど増加は認められなかった。40℃保存検体では各 pH 共に約 34、38.5 分にピークを持つ LMWS の経時的な増加が認められた。その増加量は pH4.0 で 40℃1 箇月検体では約 3.3%、40℃3 箇月検体では約 6.9%と顕著であり、pH 増加に伴い減少する傾向を示した。また pH4.0 検体では上記 33.7 分付近のピークが複雑に別れる傾向が認められ、他の pH とは異なる分解が生じていることが示唆された。

【IgG4PE】

HMWS

25℃保存検体では各 pH 共に他のサブクラス同様、保存開始からほとんど増加は認められなかった。40℃保存検体では約 26、27、28.5 分にピークを持つ HMWS の増加が認められ、pH によって増加するピーク種に違いが認められた。特に pH4.0 は全ての検体の中で最も増加量が大きく、40℃1 箇月検体で約 1.7%、40℃3 箇月検体で約 11%の増加が認められた。また IgG1、IgG2AAAS、IgG4 同様、約 22 分にピークの増加が認められ、高 pH ほど増加が多い傾向が認められた。IgG4

同様、このピークの増加量は IgG1 と同レベルであった。各 pH に対するトレンド、重合体増加量ともに IgG4 と同様の傾向を示した。

LMWS

25℃保存検体では pH4.0 から 7.0 の検体については保存開始からほとんど増加は認められなかった。IgG4 では pH4.0 で経時的な増加が認められたが、IgG4PE では抑制されていた。40℃保存検体では各 pH 共に約 34、38.5 分にピークを持つ LMWS の経時的な増加が認められた。その増加量は pH4.0 で 40℃1 箇月検体では約 0.7%、40℃3 箇月検体では約 2.0%と大きく、pH 増加に伴い減少する傾向を示した。pH に対する LMWS の増加量は IgG4 と同様の傾向を示したが、その増加量は IgG4 と比較して少なかった。

Mab-D

Fig.2-3-2-13 に重合体量（HMWS）および分解物量（LMWS）を示し、サブクラスごとに各 pH の詳細を以下にまとめる。分析開始時（Initial, T=0）、IgG1 で約 6.5%、IgG2AAAS で約 10%、IgG4 および IgG4PE で約 4%の重合体が存在しており、Mab-C の初期重合体量（全てのサブクラスで約 2%）に比べて多かった。Mab-D の形成している重合体が実施した精製プロセスで十分に除去できなかったためと推察される。また保存検体の分析を行ったところ、IgG1、IgG2AAAS において 40℃検体で重合体量が初期重合体量より低下する傾向が認められた。25℃でも 3 箇月検体で初期重合体量より低下が認められた。そのため初期値からの増加量を比較することでは正確な増加傾向は判断できない可能性が高い。そのため、pH の傾向を捕らえるために同ポイントでの傾向も記した。

【IgG1】

HMWS

分析開始時（Initial, T=0）の重合体量は pH4.0～6.0 で約 6.5%、pH7.0 で 7.4%と pH7 のみ他の pH と比較して高かった。　重合体ピークはボイド付近の約 22 分から 29.5 分まで広く認められ、かなり多くの分子種が存在した。ボイド付近の高分子量の可溶性重合体は分析開始時から pH 増加に伴い含有量が多い傾向が認められた。また pH4.0 および pH5.0 の弱酸性領域で 22～25 分の重合体量が経時的に減少する傾向が認められた。26～28 分のピークは（trimer, dimer と推察される）全ての pH で Initial から大きな変化は認められなかった。また pH4.0、40℃保存検体においてはモノマーピークが高分子量側にわずかながらブロードになる傾向が認められた。

各分析ポイントにおいて全体の重合体量（HMWS）を比較すると、pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められ、pH4.0＜pH5.0＜pH5.5＜pH6.0＜pH7.0 であった。

LMWS

25℃、40℃保存検体共に、保存開始から約 33.5 分、38.5 分に LMWS のピークの経時的かつ温度依存的な増加が認められた。その傾向は pH4.0 で顕著であり、25℃1 箇月で約 1%、25℃3 箇月で約 2%、40℃1 箇月検体で約 5%、40℃3 箇月検体で約 14%の増加が認められた。これらピークはそれぞれ、desFab および Fab 断片と推察され、その増加量において pH の傾向は pH4.0＞＞pH5.0＞pH5.5＞pH6.0≦pH7.0 と低 pH 領域で顕著であり、pH6 付近で最小であった。

【IgG2AAAS】

HMWS

分析開始時（Initial, T=0）の重合体量は pH4.0～6.0 で約 10%、pH7.0 で 11%と pH7 のみ他の pH と比較して高かった。重合体ピークはボイド付近の約 22 分から 29.5 分まで広く認められ、かなり多くの分子種が存在した。ボイド付近の高分子量の可溶性重合体は分析開始時から pH 増加に伴い含有量が多い傾向が認められた。25℃、40℃ともにピーク形状については、大きな経時変化は認められなかった。また pH4.0、40℃保存検体においてはモノマーピークが高分子量側にわずかながらブロードになる傾向が認められた。

各分析ポイントにおいて全体の重合体量（HMWS）を比較すると、25℃では pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められ、pH4.0≦pH5.0＜pH5.5＜pH6.0＜pH7.0 であった。これに対し 40℃では pH5.0 を最小とし pH の低下および pH の増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められ、pH4.0＞pH5.0＜pH5.5＜pH6.0＜pH7.0 であった。

LMWS

25℃保存検体では各 pH 共に保存開始から増加は認められなかった。40℃保存検体では各 pH ともにモノマーピークの低分子量側がブロードになり約 33 分から 40 分にかけて低分子劣化物と推察されるピークが確認された。その傾向は pH4.0＞＞pH5.0≧pH5.5≧pH6.0≧pH7.0 の pH4.0 で最も顕著であり、pH が高くなるにつれて減少傾向を示した。

【IgG4】

HMWS

分析開始時（Initial, T=0）の重合体量は pH4.0～6.0 で約 4%、pH7.0 で 6%と pH7.0 のみ他の pH と比較して高かった。重合体ピークはボイド付近の約 22 分から 29.5 分まで広く認められ、か

なり多くの分子種が存在した。ボイド付近の高分子量の可溶性重合体は分析開始時から pH 増加に伴い含有量が多い傾向が認められ、また経時的にも増加が確認された。25℃保存検体では全ての pH で、保存開始からほとんど増加は認められなかった。40℃保存検体では約 26、27、28.5 分にピークを持つ重合体の増加が認められ、pH によって増加するピーク種に違いが認められた。特に 40℃3 箇月 pH4.0 は他のサブクラスと比較して分析開始時からの増加量が顕著に大きく、2.78%の増加が認められた。また 40℃保存検体においてはモノマーピークが高分子量側にわずかながらブロードになる傾向が認められた。

各分析ポイントにおいて全体の重合体量（HMWS）を比較すると、25℃では pH 増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められた。これに対し 40℃では pH5.0～5.5 を最小とし pH の低下および pH の増加に伴い重合体量が増加する傾向が認められ、pH4.0 ＞＞ pH5.0 = pH5.5≦pH6.0≦pH7.0 であった。

LMWS

pH5.0～7.0 の検体については 25℃では、保存開始時からほとんど増加は認められなかったが、40℃保存検体では約 33.5、38.5 分にピークを持つ LMWS の経時的な増加が認められ、その傾向は低い pH ほど顕著であった。pH4.0 検体では 25℃保存でも上述の傾向が認められ、40℃3 箇月検体では上記 33.5 分付近のピークが複雑に別れる傾向が認められ、他の pH とは異なる分解が生じていることが示唆された。その増加量は pH4.0 で 40℃1 箇月検体では 4.76%、40℃3 箇月検体では 9.24%と顕著であり、pH の傾向は pH4.0＞＞pH5.0＞pH5.5＞pH6.0＞pH7.0 と低 pH 領域で顕著であり、pH が高くなるにつれて減少傾向を示した。

【IgG4PE】

HMWS

25℃保存検体では各 pH 共に他のサブクラス同様、保存開始からほとんど増加は認められなかった。40℃保存検体では約 25、27、28.5 分にピークを持つ HMWS の増加が認められ、pH によって増加するピーク種に違いが認められた。特に 40℃3 箇月 pH4.0 は他のサブクラスと比較して分析開始時からの増加量が顕著に大きく、5.27％の増加が認められた。また IgG1、IgG2AAAS、IgG4 同様、約 22 分にピークの増加が認められ、高 pH ほど増加が多い傾向が認められた。各 pH に対するトレンド、重合体増加量ともに IgG4 と同様の傾向を示した。

LMWS

25℃保存検体では pH4.0 から 7.0 の検体については保存開始からほとんど増加は認められなか

った。IgG4 では pH4.0 検体で増加が認められたが、IgG4PE では抑制されていた。40℃保存検体では各 pH 共に約 34、38.5 分にピークを持つ LMWS の経時的な増加が認められた。その増加量は pH4.0 で 40℃1 箇月検体では 1.47%、40℃3 箇月検体では 4.32%と大きく、pH 増加に伴い減少する傾向を示した。pH に対する LMWS の増加量は IgG4 と同様の傾向を示したが、その増加量は IgG4 と比較して少なかった。

4 つの抗体の比較

本検討では 4 つの各抗体サブクラスの各 pH において、重合体および分解物の経時変化を比較した。その結果、全ての抗体で各サブクラスの経時変化は概ね同様の傾向を示した。最も Initial（分析開始時）から変化の大きかった 40℃3 箇月保存検体（40℃3M）の Mab-A、Mab-B、Mab-C、Mab-D の重合体および分解物の増加率（40℃3M の値－Initial の値）を Fig.2-3-2-16 および Fig.2-3-2-17 に示した。

重合体増加率を比較すると、全ての抗体において IgG4 および IgG4PE の増加率が、今回検討を行った全ての pH 範囲で IgG1、IgG2（IgG2AAAS）に比べて大きいことが確認された。また pH4.0 において各サブクラスで顕著な傾向の違いが認められた。IgG1 は 4 つの抗体全てにおいて、Initial から増加が認められなかったのに対し、IgG2 および IgG2AAAS では微増、IgG4 および IgG4PE では大きく増加する傾向が認められた。これまでに IgG2 や IgG4 は酸性暴露に対して IgG1 に比べ不安定であることが報告されており[17-18]、今回の保存安定性の結果も同様の結果を示した。また全てのサブクラスで pH の増加に伴い、重合体増加率が高くなる傾向が認められた。抗体の等電点（pI）は 8.0～9.0 付近に存在し、処方 pH が pI に近づくことで抗体表面の電荷（Net Charge）が小さくなり、colloidal Stability が低下したことに起因すると推察される。また各抗体で各 pH に対する増加率に差が認められた。各抗体の可変領域のアミノ酸配列は異なっており、抗体によっては脱アミドや酸化などの化学的な変性を受けている可能性がある。このような変性による構造変化などが重合形成を促進している可能性が考えられる。

分解物増加率を比較すると、IgG1 が非常に分解されやすく、IgG2（IgG2AAAS）は最も分解されにくい傾向を示した。またハーフ抗体抑制を目的とした変異体 IgG4PE は IgG4 に比べ分解を抑制していた。また pH に対する傾向（pH プロファイル）も 4 つの抗体でほぼ一致し、特に pH4.0 で顕著であった。IgG1 の低 pH での分解はヒンジ領域（upper hinge：EPKSC**DK**THT）の非酵素切断による des Fab と Fab への分解が報告されており[19-22]、その pH に対する傾向も今回の保

存安定性の結果と一致する。IgG2 で分解されにくい傾向を示したのは、切断されやすい IgG1 に比べヒンジが短く、4 つのジスルフィド結合により非常に硬い（rigid）な構造であること、また切断部位である DKTHT のアミノ酸配列を持たないためと推察される。

4 つの可変領域の異なる抗体（Mab-A、Mab-B、Mab-C、Mab-D）に対し、IgG1、IgG2、IgG4（一部改変体を含む）の定常領域を持つ抗体を調製し、サブクラスの違いによる保存安定性の評価を行った。これらはそれぞれ同一の可変領域を持ち、純粋にサブクラスの違いのみを評価でき、これまでに報告された例は少ない。保存安定性および抗体の製造過程で最も懸念される劣化の重合体（HMWS）および分解物（LMWS）を SEC 分析により評価した。

Mab-A、Mab-B を用いた SEC 分析はカラム 1 本での分析、Mab-C、Mab-D を用いた SEC 分析はカラム 2 本での分析であったが、得られた結果は概ね同じ傾向を示し、相対的な比較が可能と判断した。

今回、抗体の物性に大きく影響を与えることが知られている pH を pH4.0 から pH7.0 の範囲で評価を行った。この範囲を選択した理由として、これまでに上市されている抗体医薬製剤の処方 pH は pH5.0 から pH7.0 であり、この pH 領域で抗体の安定性が高いと考えられる。また pH4.0 の酸性領域については一般的に精製過程において使用される Protein A 精製の溶出やウイルスクリアランスに使用され、培養から精製、製剤化までの抗体製造工程おいておおよそ pH4.0 から pH7.0 の pH に曝されることになり、この pH 領域での物性を理解することが重要であると考えた。

４つの抗体を用いた結果、重合体（HMWS）形成および分解物（LMWS）形成において、サブクラスの違いが大きく影響することがわかった。

pH4.0 から 7.0 の領域において、重合体形成のしやすさは IgG4＞IgG2＞IgG1 であり、IgG4 が最も重合体形成しやすい傾向が認められた。全てのサブクラスで pH 増加に伴い重合体形成しやすくなる pH 依存性があり、その影響は IgG4 が最も受けやすい。また IgG2 および IgG4 では pH5.0 以下の低 pH 領域（酸性領域）でも重合体形成が顕著であり、IgG1 には認められない IgG2 および IgG4 特有の性質である。その影響の受けやすさは IgG4 で顕著であった。

分解のしやすさは IgG1＞IgG4＞IgG2 であり IgG1 が最も分解されやすい。特に低 pH 領域でその傾向は顕著であった。

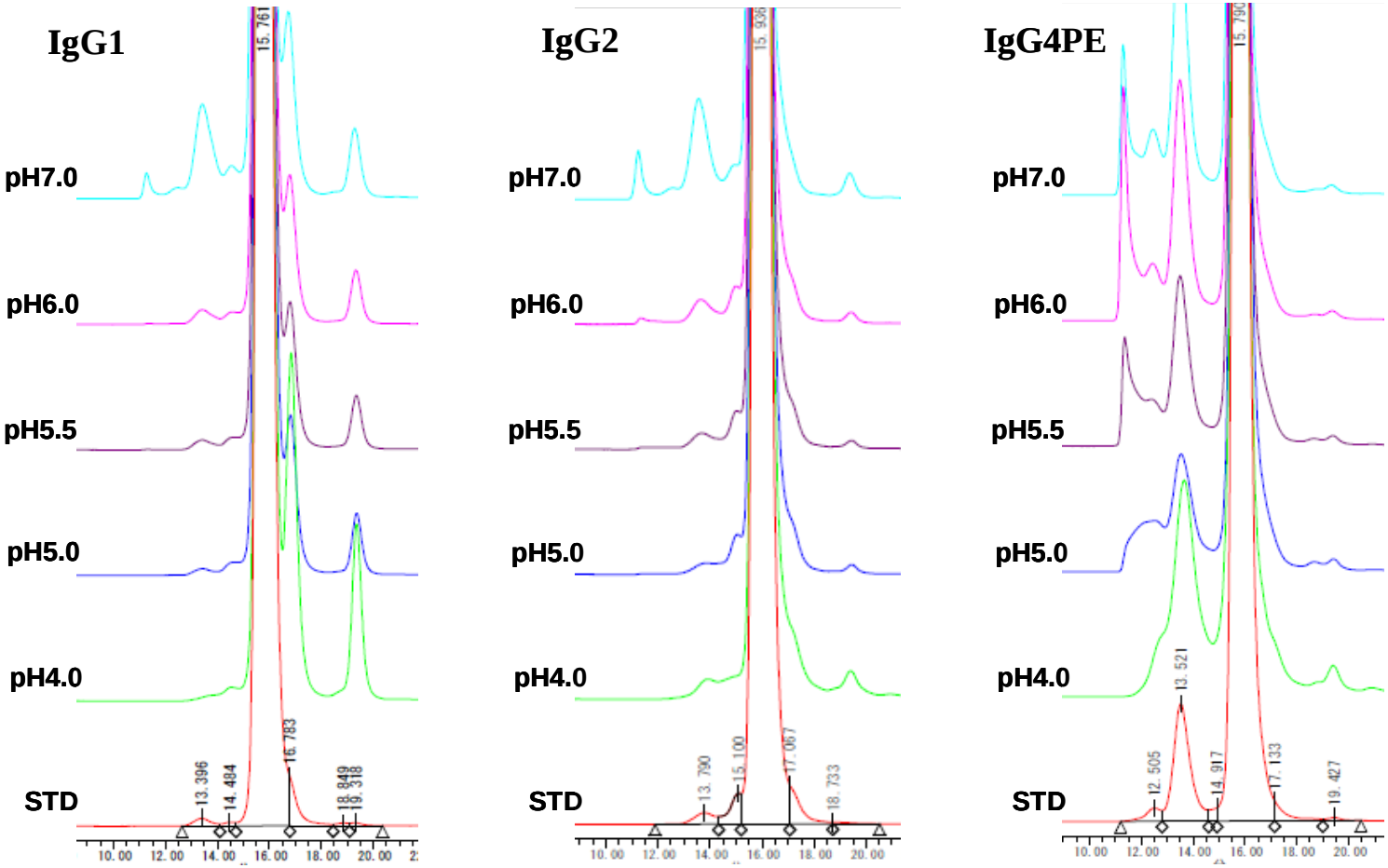


Fig.2-3-2-1　Mab-A Size Exclusion Chromatography　40℃3M（STD：-80℃保管分析標準品）

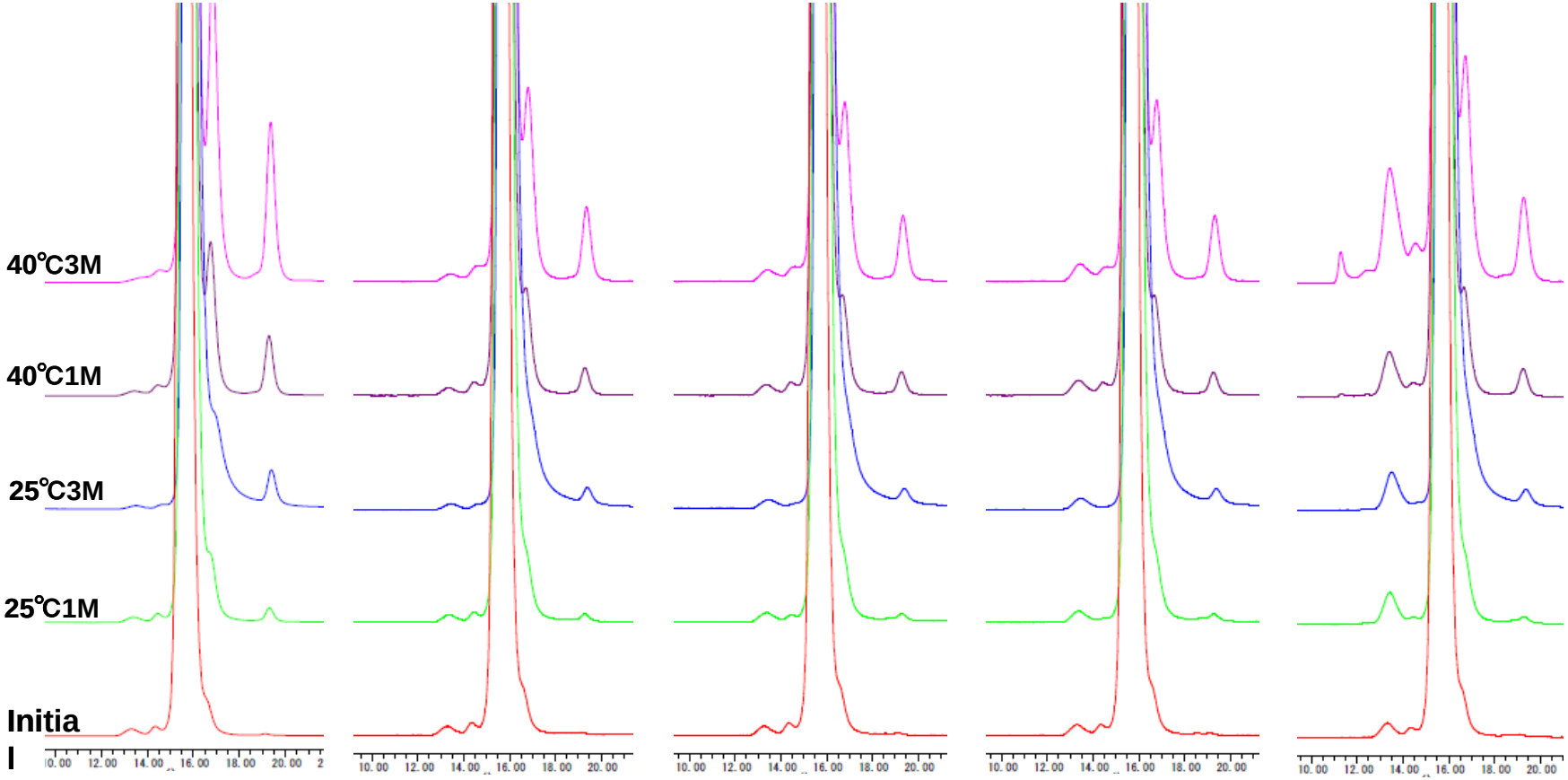


Fig.2-3-2-2　Mab-A IgG1 Size Exclusion Chromatography

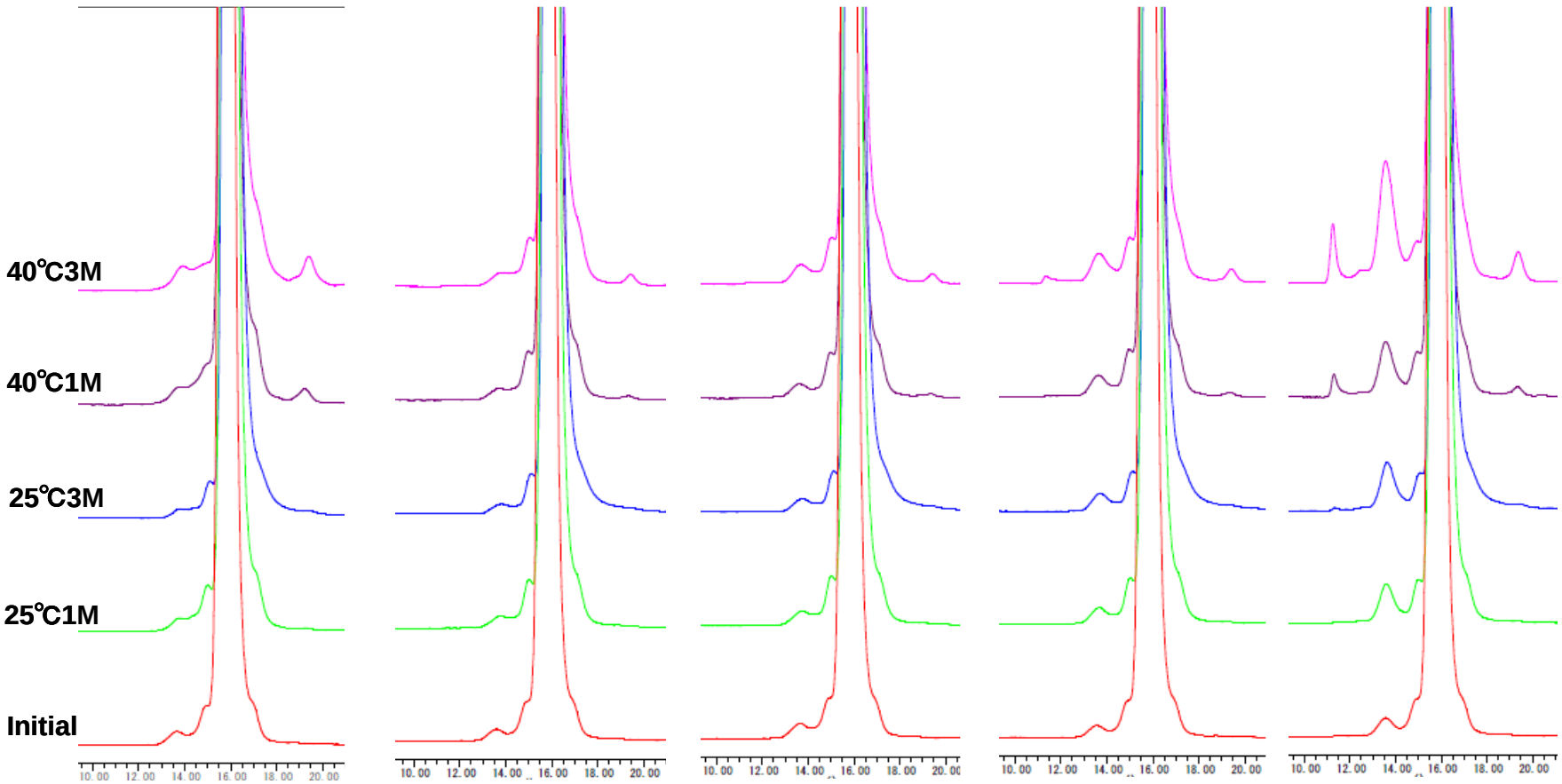


Fig.2-3-2-3　Mab-A IgG2 Size Exclusion Chromatography

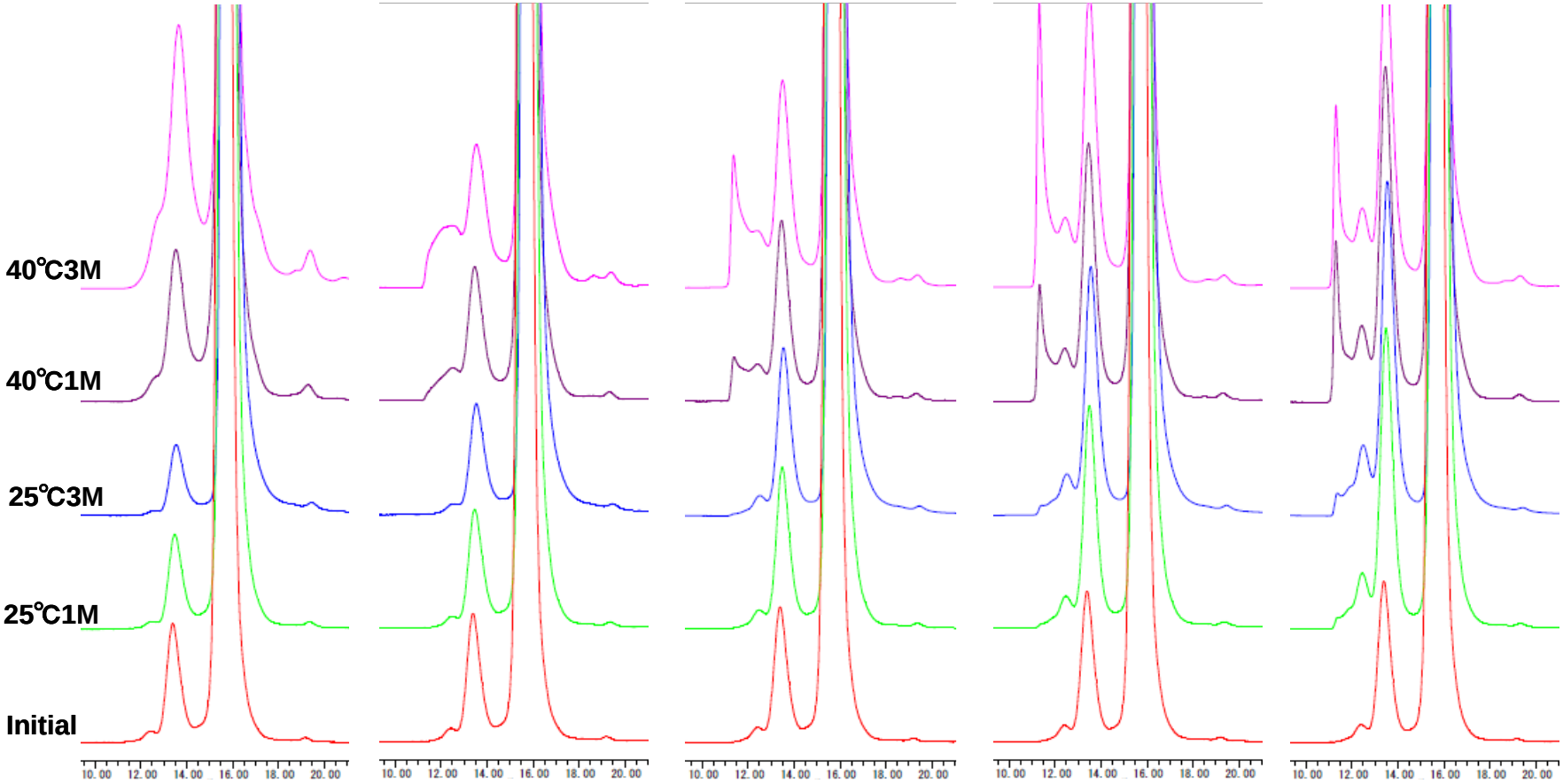
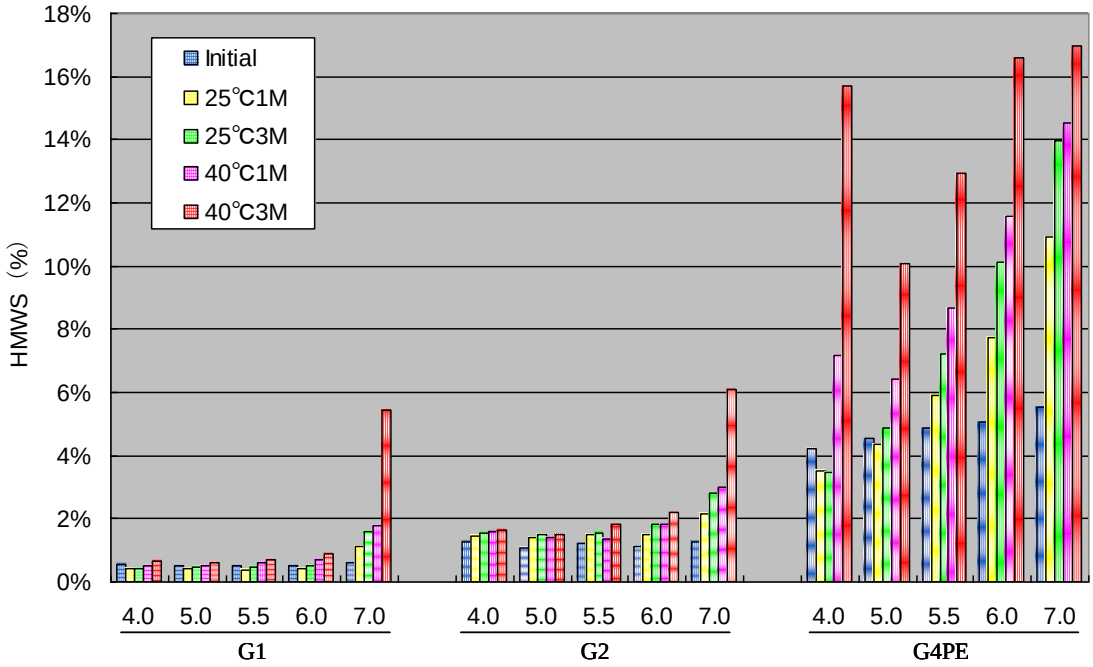


Fig.2-3-2-4　Mab-A IgG4PE Size Exclusion Chromatography



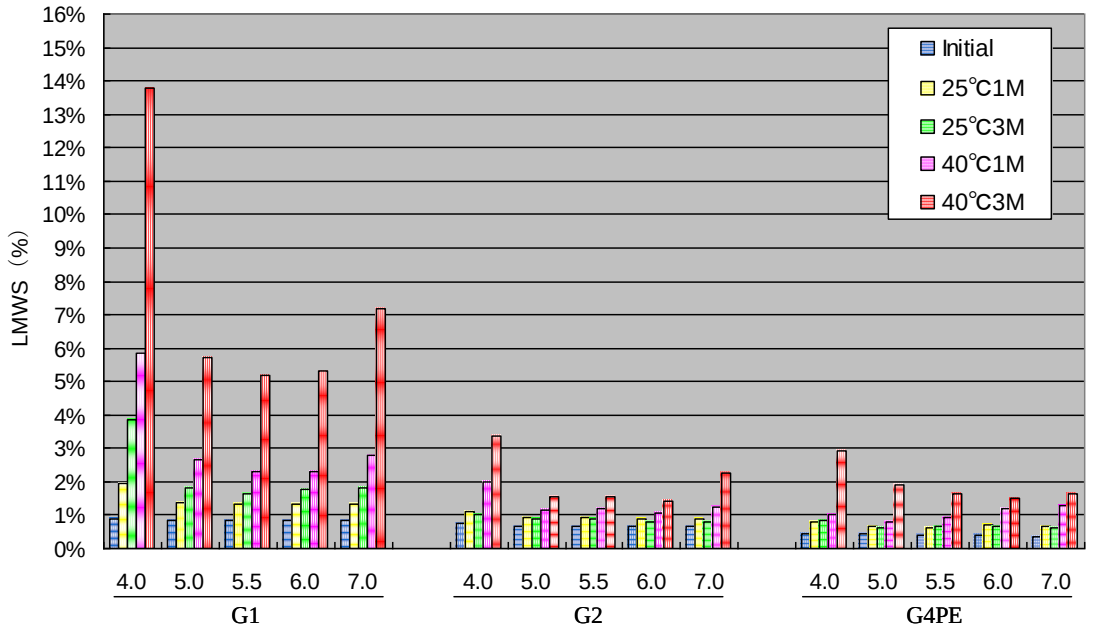
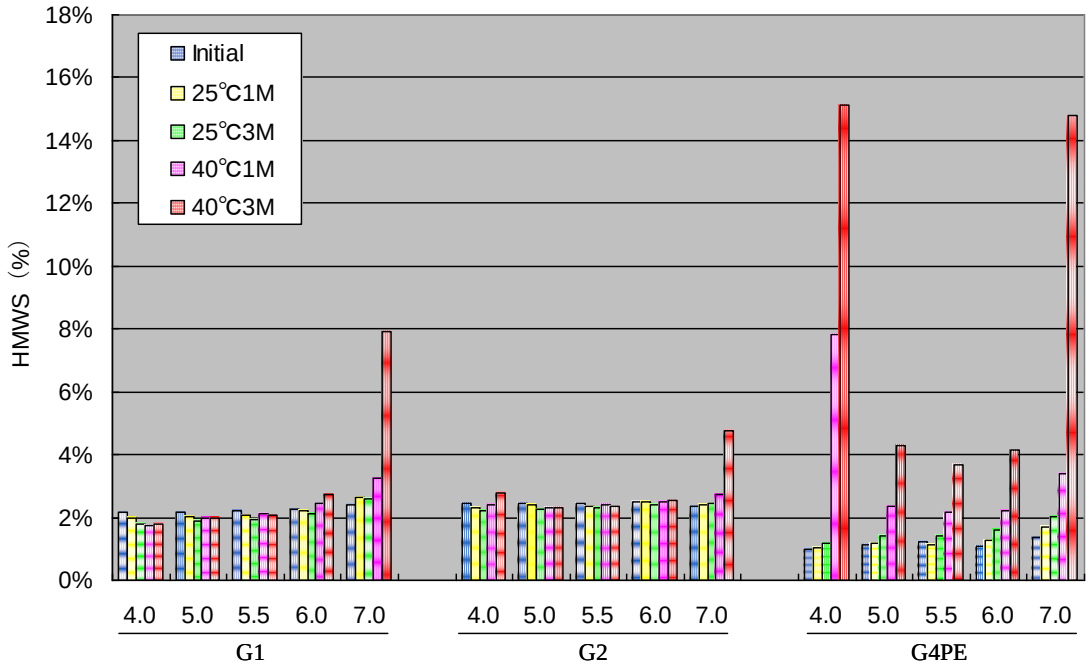


Fig.2-3-2-5　Mab-A　上）HMWS 経時変化、下）LMWS 経時変化



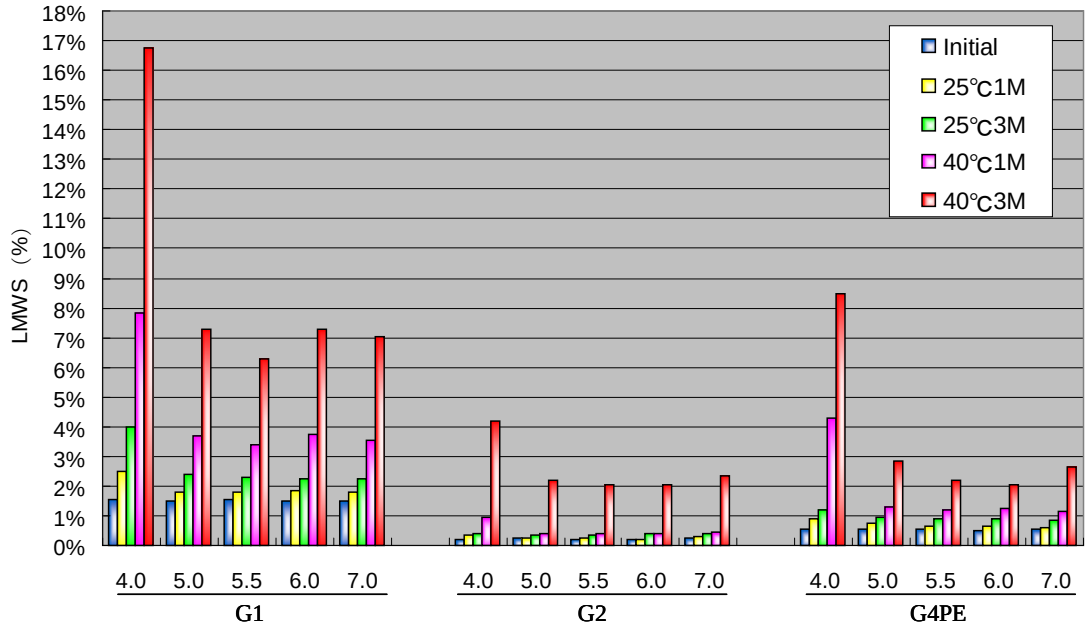


Fig.2-3-2-6　Mab-B 上）HMWS 経時変化、下）LMWS 経時変化

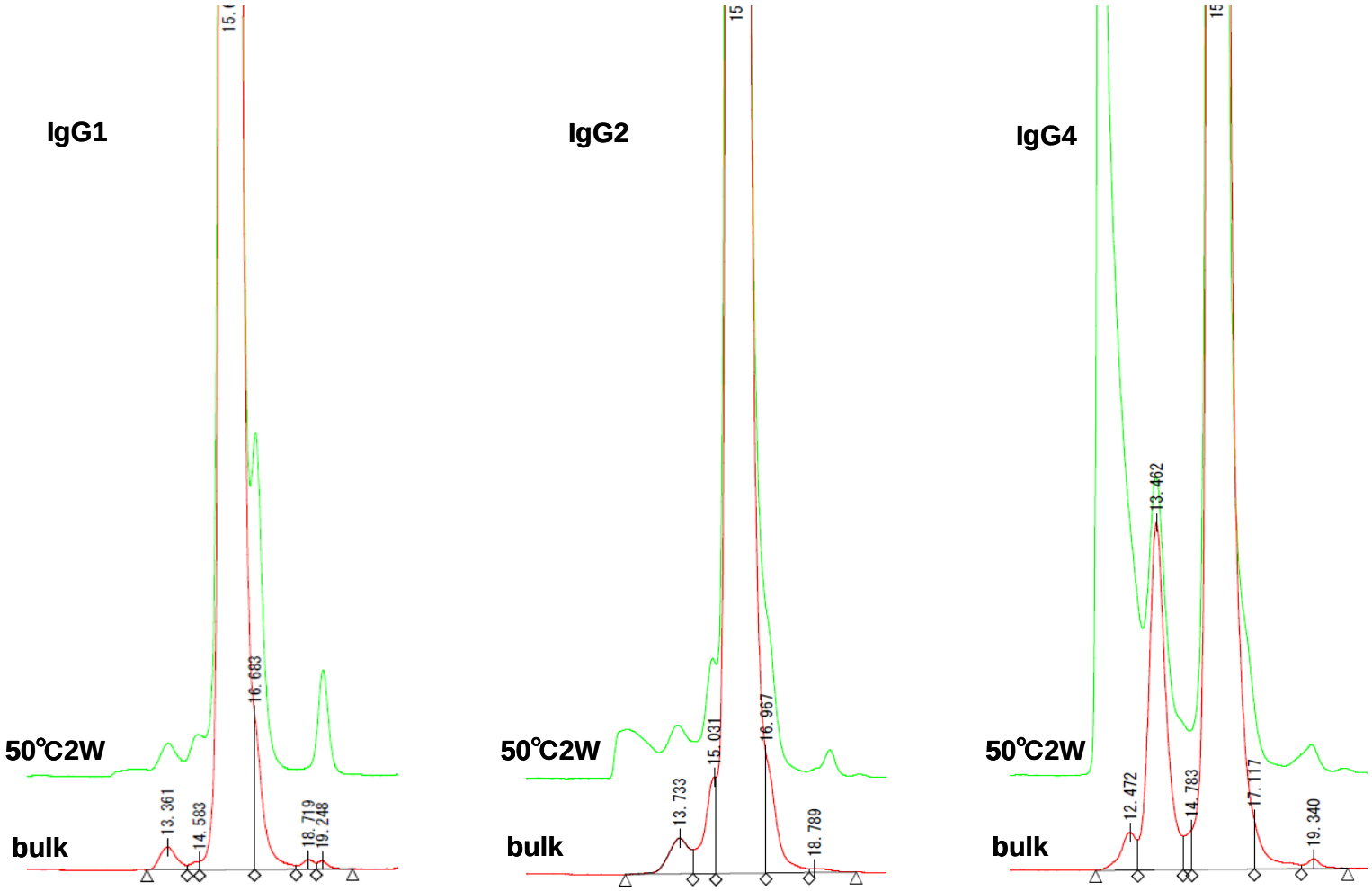


Fig.2-3-2-7　Mab-A Size Exclusion Chromatography 50℃2W

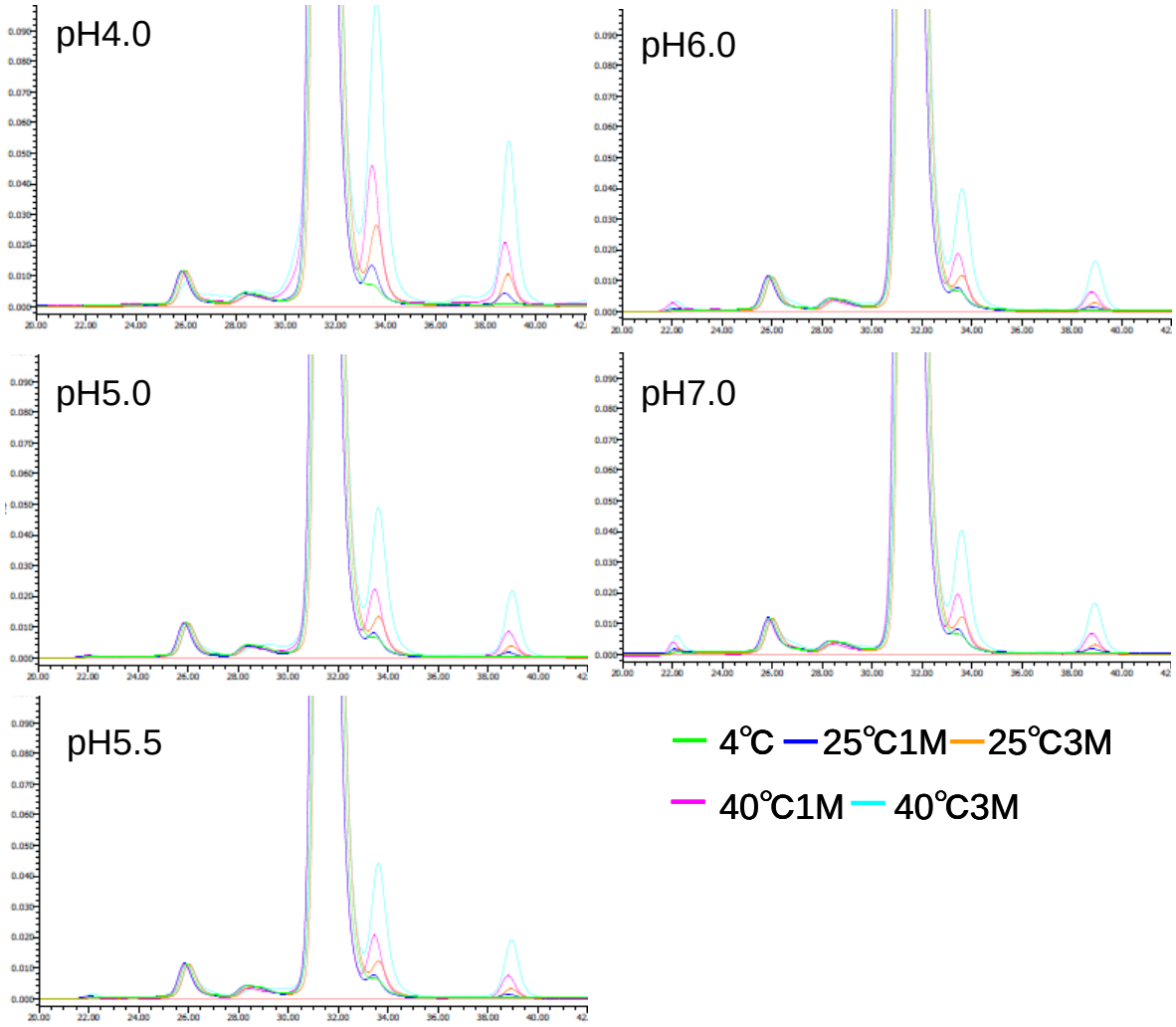


Fig.2-3-2-8　Mab-C IgG1 Size Exclusion Chromatography

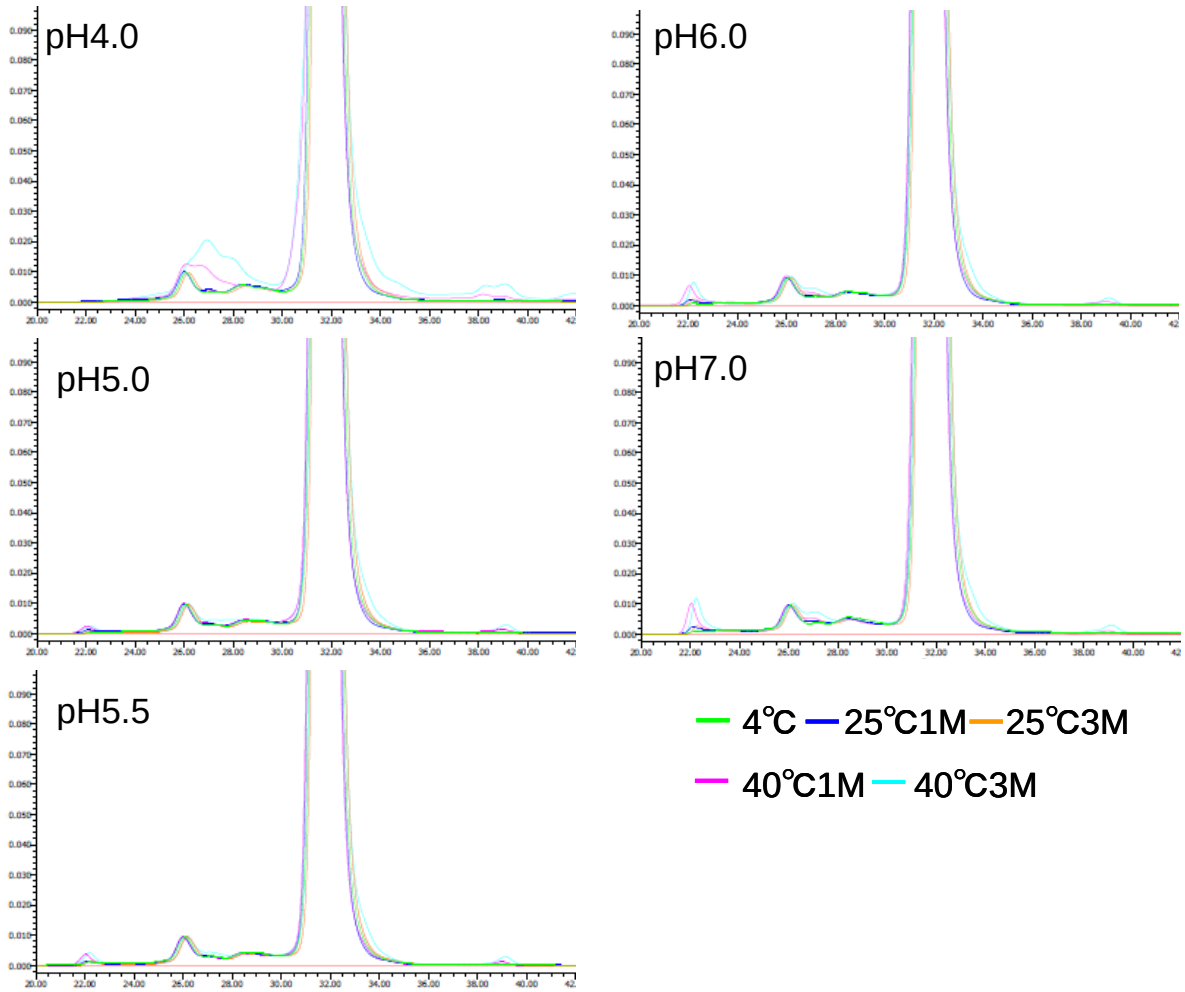


Fig.2-3-2-9　Mab-C IgG2AAAS Size Exclusion Chromatography

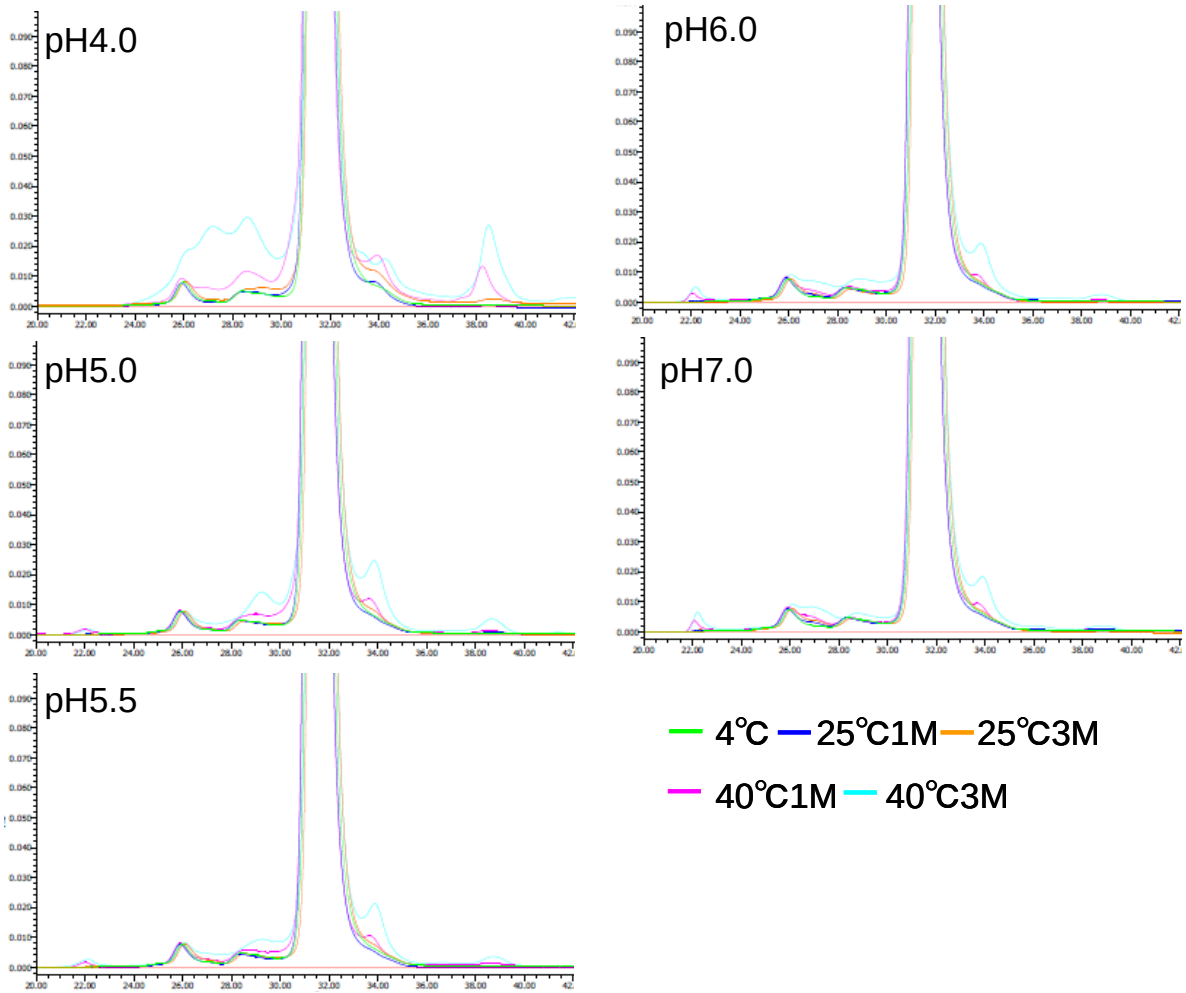


Fig.2-3-2-10　Mab-C IgG4 Size Exclusion Chromatography

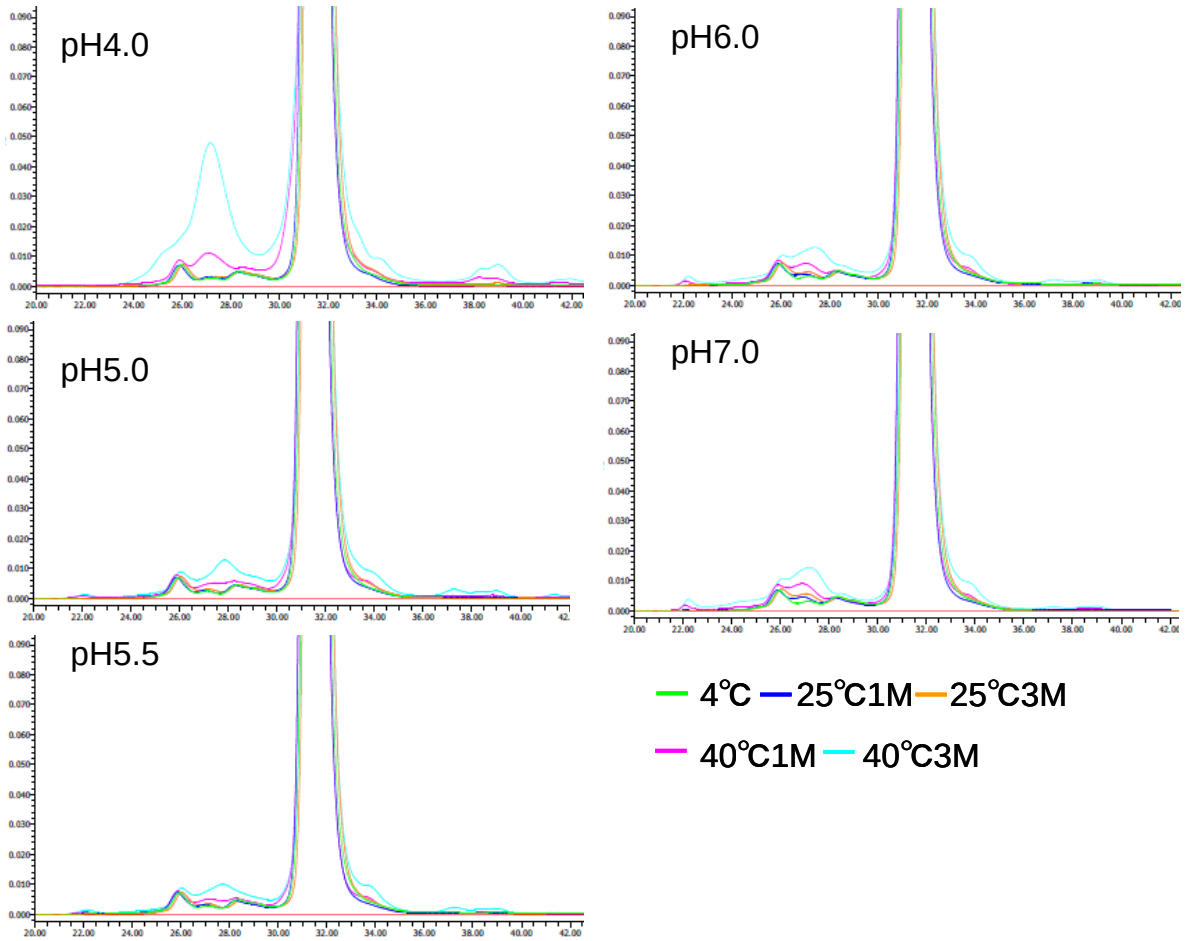
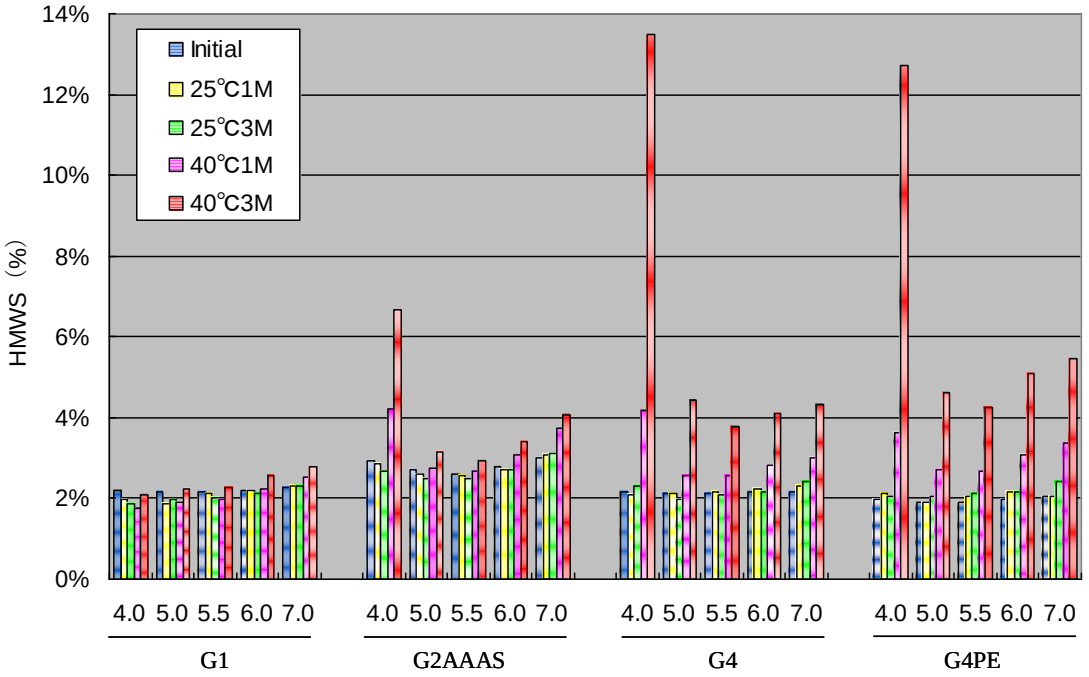


Fig.2-3-2-11　Mab-C IgG4PE Size Exclusion Chromatography



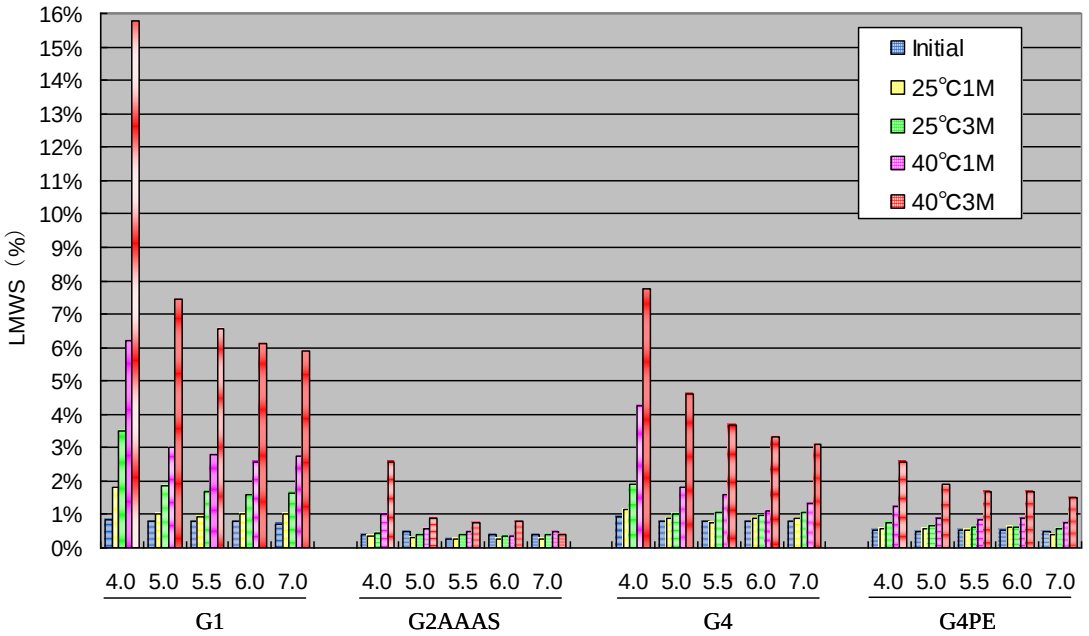
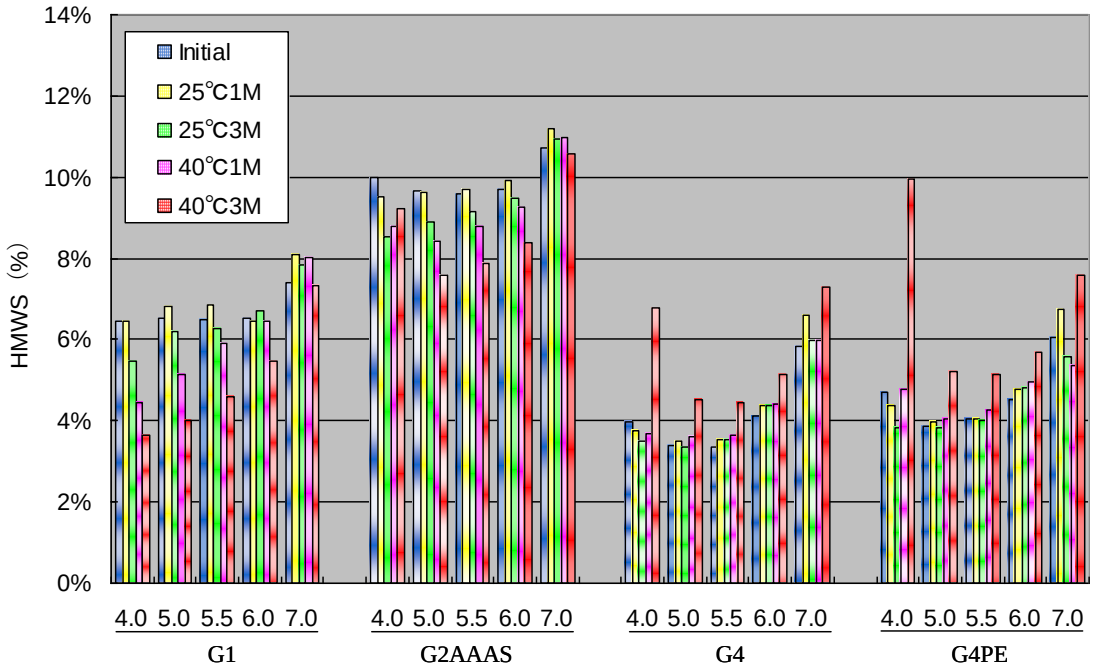


Fig.2-3-2-12　Mab-C 上）HMWS 経時変化、下）LMWS 経時変化



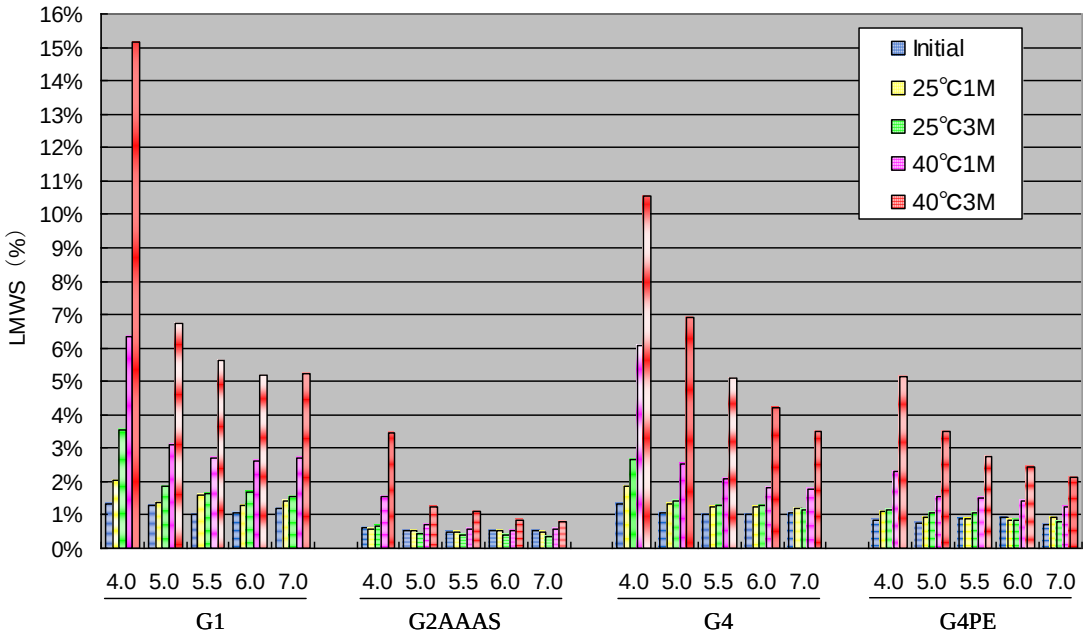


Fig.2-3-2-13　Mab-D 上）HMWS 経時変化、下）LMWS 経時変化

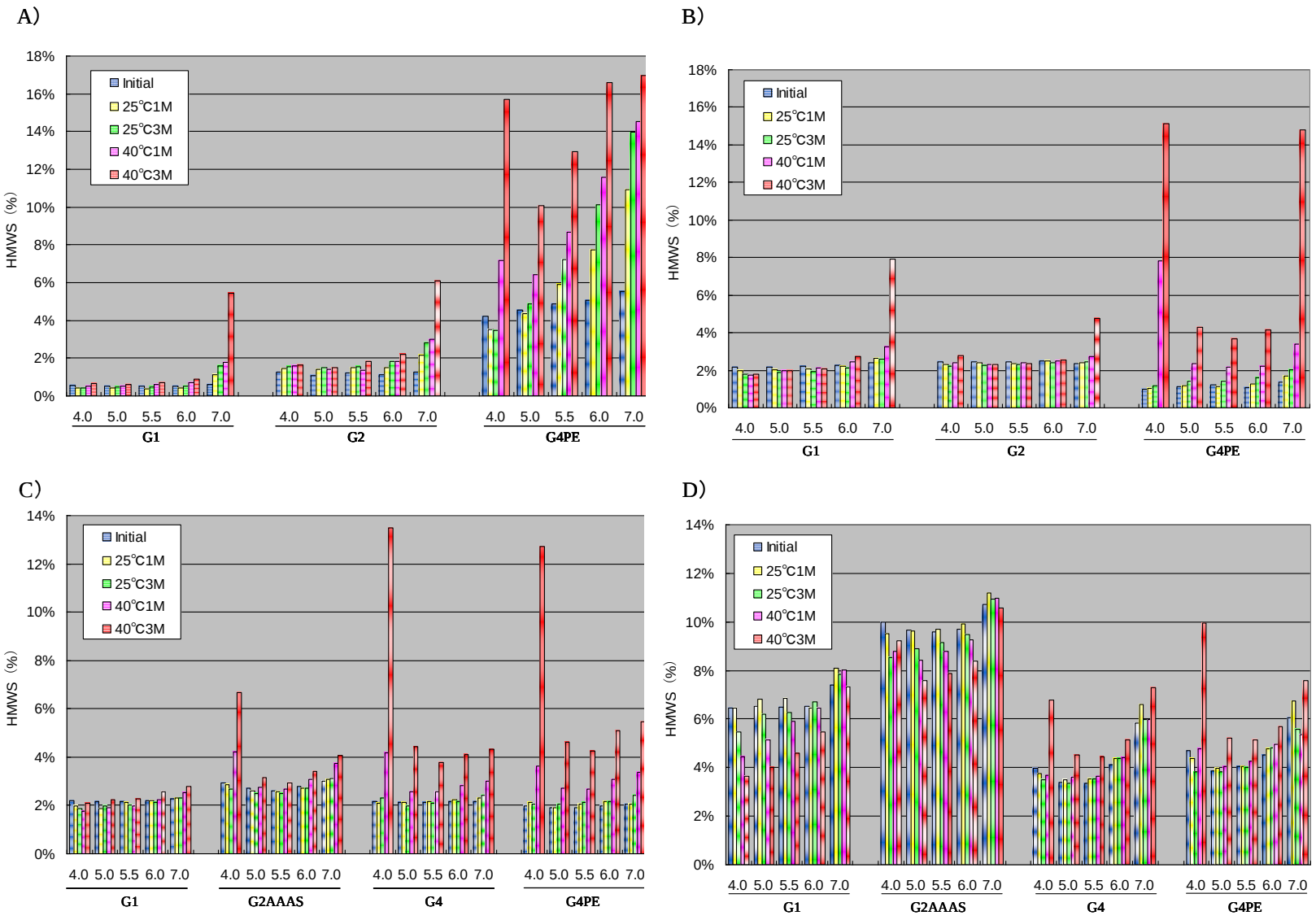


Fig.2-3-2-14　重合体（HMWS）経時変化まとめ　A）Mab-A、B）Mab-B、C）Mab-C、D）Mab-D

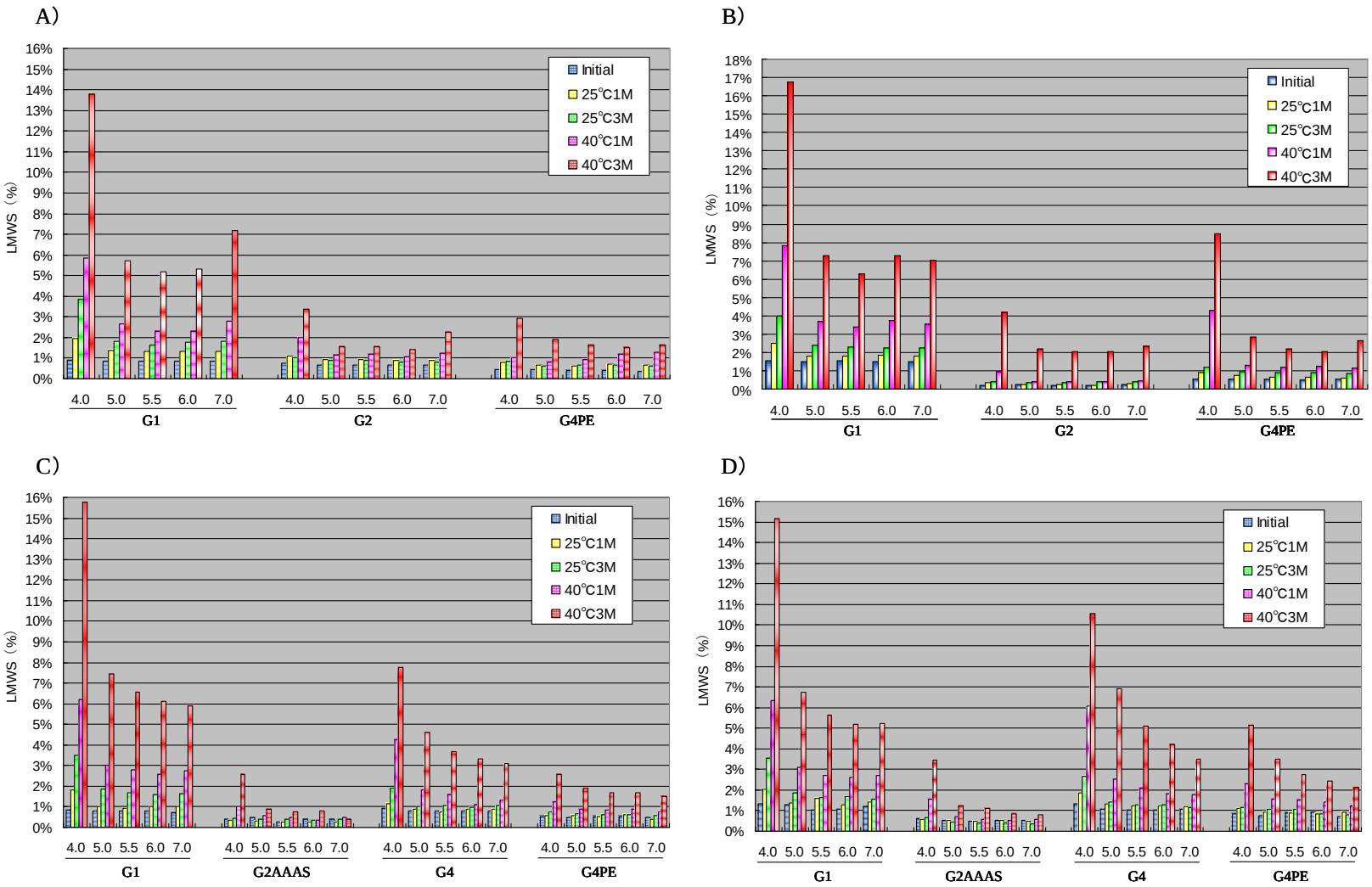


Fig.2-3-2-15　分解物（LMWS）経時変化まとめ　A）Mab-A、B）Mab-B、C）Mab-C、D）Mab-D

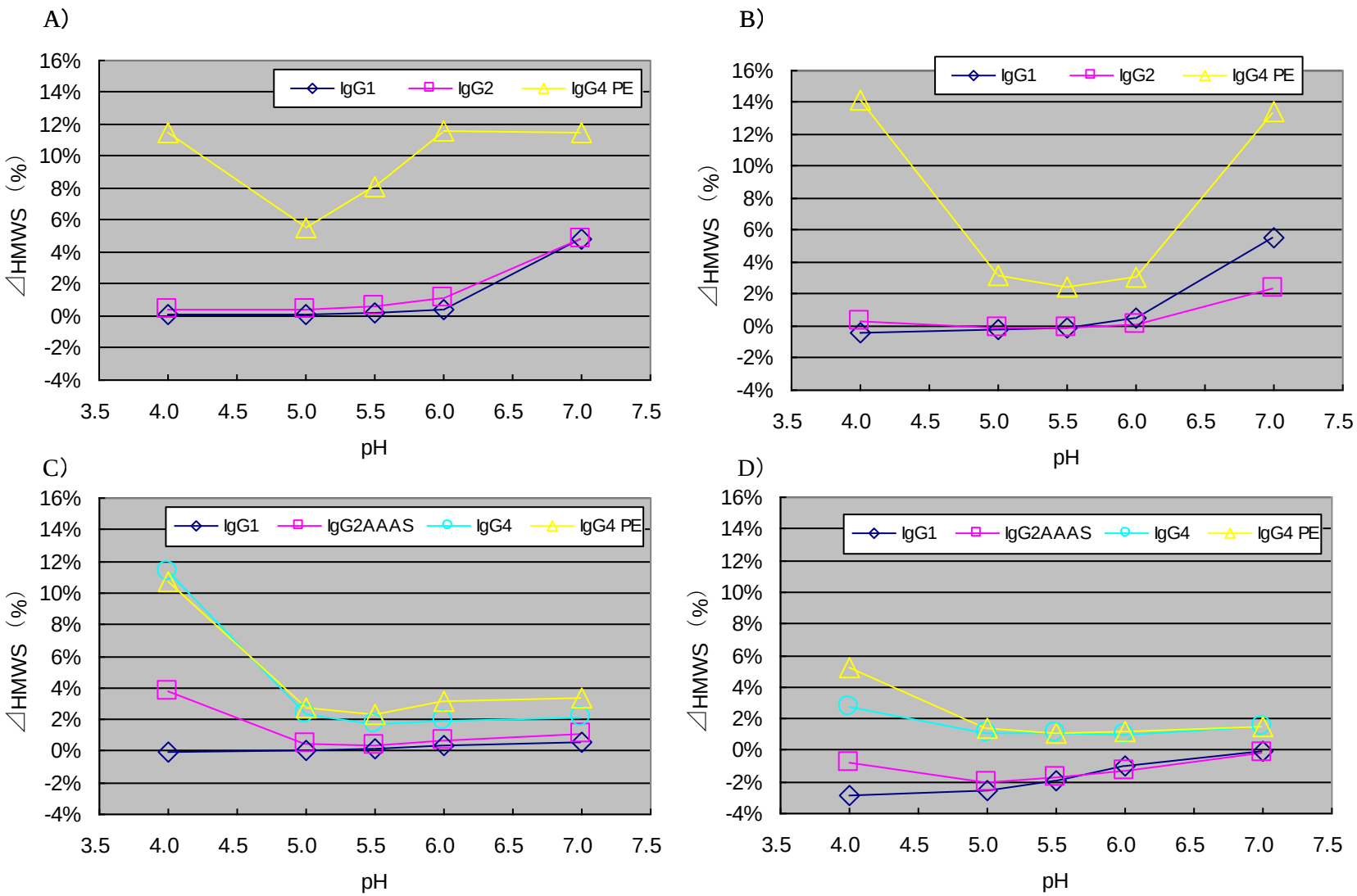


Fig.2-3-2-16　40℃3M における Initial からの重合体（HMWS）の増加量　A）Mab-A、B）Mab-B、C）Mab-C、D）Mab-D

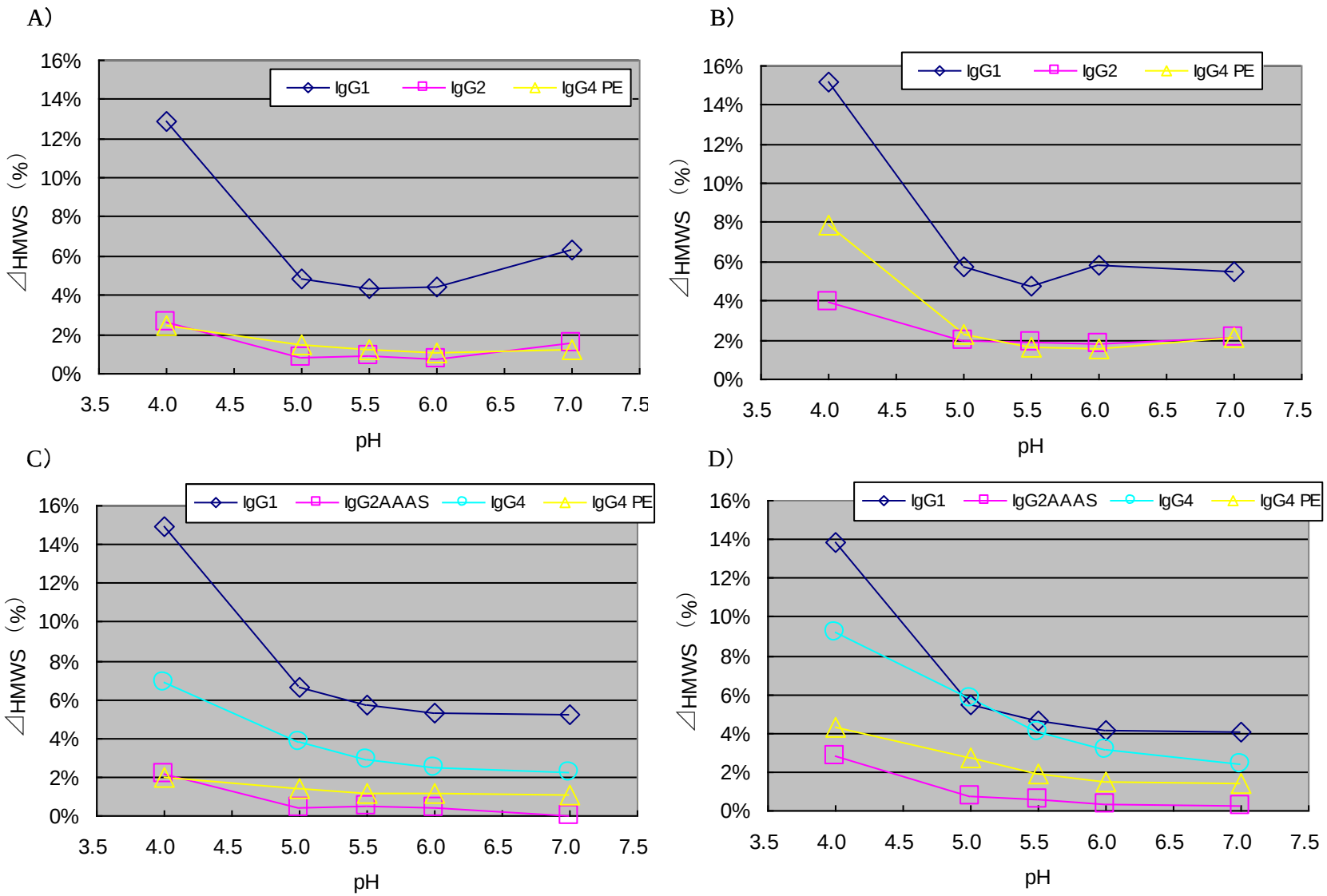


Fig.2-3-2-17　40℃3M における Initial からの分解物（LMWS）の増加量　A）Mab-A、B）Mab-B、C）Mab-C、D）Mab-D

2-3-3. SDS-PAGE

Mab-A

非還元、還元状態共に、Initial 時各サブクラスにおいて pH の違いによる泳動像に差は認められなかった。40℃1M 検体の SDS-PAGE の結果を Fig.2-3-3-1 に示した。

非還元状態において、サブクラス間の比較では Initial 時より IgG4PE は IgG1 および IgG2 に比べ 200KDa 以上のバンドが濃く、共有結合を介した可溶性重合体の含有量が多いことが示唆された。40℃1M 検体の比較をすると、全てのサブクラスで pH6.0 および pH7.0 の高 pH 領域でバンドが濃くなる傾向が認められた。特に IgG4PE は IgG1 および IgG2 に比べ、より高分子量のバンドも認められ、共有結合を介した高分子量の可溶性重合体の形成が示唆された。SEC 分析でも高 pH 側で可溶性重合体が増加する傾向を示しており、高 pH 領域で増加する可溶性重合体には、共有結合を介したものが多いと推察された。一方、SEC 分析で IgG4PE の pH4.0 で可溶性重合体の増加が認められたが、SDS-PAGE ではその増加は小さかった。pH4.0 で増加した可溶性重合体の多くは疎水性相互作用によって形成されていると推察され、SDS 存在下で解離したと考えられた。

還元状態において、全てのサブクラス、メインバンドとして重鎖（約 50KDa）および軽鎖（約 25KDa）のバンドが確認された。また全てのサブクラスで約 97KDa 以上に 2 つのバンドが確認された。これら高分子劣化物バンドも Initial から経時的に増加し、pH の増加に伴いバンドが濃くなる傾向が認められた。一方、低分子劣化物バンドは低 pH 領域で顕著であった。このように SEC で認められた可溶性重合体（HMWS）は処方 pH によりその形態が大きく違うことが示唆された。

Mab-B

非還元状態において Initial 時より IgG1 で若干 IgG2 および IgG4PE に比べ 200KDa 以上の高分子劣化物バンドが濃く、共有結合を介した可溶性重合体の含有量が多いことが示唆された。40℃1M 検体の比較をすると、全てのサブクラスで pH6.0 および pH7.0 の高 pH 領域でバンドが濃くなる傾向が認められ、その増加は IgG4PE で顕著であった。

還元状態において、全てのサブクラス、メインバンドとして重鎖（約 50KDa）および軽鎖（約 25KDa）のバンドが確認された。また全てのサブクラスで約 97KDa 以上に 2 つのバンドが確認された。これら高分子劣化物バンドも Initial から経時的に増加し、pH の増加に伴いバンドが濃くなる傾向が認められた。一方、低分子劣化物バンドは低 pH 領域で顕著であった。このように非還

元、還元状態共に泳動像の変化は概ね Mab-A と同様な傾向を示した。

Mab-C

各サブクラスの Initial 検体および 40℃3M 検体の非還元および還元条件での泳動像を Fig2-3-3-2～2-3-3-5 に示した。

非還元および還元状態において、Initial 時、それぞれのサブクラスで各 pH において泳動像に差は認められなかった。非還元状態の約 75KDa のバンドは Half Antibody と推測され、IgG4 で他のサブクラスに比べ、バンドが濃かった。

40℃3M の泳動像を Initial 時と比較すると非還元、還元状態共に高分子劣化物（HMWS）および低分子劣化物（LMWS）の顕著な増加が確認された。非還元状態では各サブクラスにおいて 200KDa 以上に高分子劣化物（HMWS）のバンドが確認された。これは HMWS に共有結合を介する重合体の存在を示唆するものである。またこのバンドは全てのサブクラスにおいて高 pH 側で顕著な傾向を示した。また還元状態でも重鎖より高分子量側に各種高分子劣化物（HMWS）のバンドが確認され、その増加は高 pH 側で顕著な傾向が認められた。

低分子劣化物（LMWS）の増加については各サブクラスで増加するバンドに違いが認められた。また pH によっても増加するバンドに違いが認められた。全てのサブクラスにおいて、特に低分子劣化物の増加は pH4.0 で顕著であった。これらの結果から重合体および分解物の形成は pH によってその形成メカニズムが大きく異なることが推察された。

SEC の結果から最も変化の大きかった pH4.0 検体および最も安定性が高かった pH5.5 検体において各サブクラスの非還元条件および還元条件の泳動像を Fig.2-3-3-6、2-3-3-7 に示した。

＜非還元 SDS-APGE＞

pH4.0 検体泳動像を比較すると 200KDa 以上にバンドが認められ高分子劣化物の存在が確認された。IgG1 は Initial より大きな経時変化は認められなかったが、IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE では経時的にバンドが濃くスメアになり、高分子劣化物（HMWS）の増加が確認された。SDS 存在下でバンドの増加が確認されることから、増加が認められた重合体には共有結合を介した重合体の形成が示唆された。また低分子劣化物の泳動像の比較から各サブクラスで経時変化で増加してくるバンドに違いが認められ、pH5.5 に比べ pH4.0 でその増加は顕著であった。この傾向は SEC

の低分子劣化物（LMWS）の増加傾向と相関が認められた。また IgG4PE は IgG4 に比べ低分子劣化物の増加が抑制されていることが確認された。

＜還元 SDS-PAGE＞

全てのサブクラス、メインバンドとして重鎖（約 50KDa）および軽鎖（約 25KDa）のバンドが確認された。Initial から経時的に低分子劣化物（LMWS）の増加が認められ、サブクラス間で増加傾向のバンドに違いが認められた。特に pH4.0 の 40℃検体でバンドの増加が顕著であった。また 50KDa 以上に高分子劣化物バンドが Initial 時から存在し、経時的に増加が認められた。この結果から増加している高分子劣化物の中にジスルフィド結合以外の共有結合を形成していることが示唆された

Mab-D

Mab-C 同様、各サブクラスの Initial 検体および 40℃3M 検体の非還元および還元条件での泳動像を Fig.2-3-3-8～2-3-3-11 に示した。

非還元および還元状態において Initial 時の泳動像はそれぞれのサブクラスで各 pH において泳動像に差はなく、IgG4 でハーフ抗体が顕著であり、Mab-C と同様の傾向が認められた。また非還元および還元状態ともに全てのサブクラスで Mab-C に比べ高分子劣化物（HMWS）のバンドが顕著に認められた。Mab-D は Mab-C に比べ初期可溶性重合体量、特に高分子の重合体が多い結果が SEC 分析で得られており、これら重合体には共有結合を介して形成された多量体が含まれていることが示唆された。この傾向は特に IgG2AAAS で顕著であった。

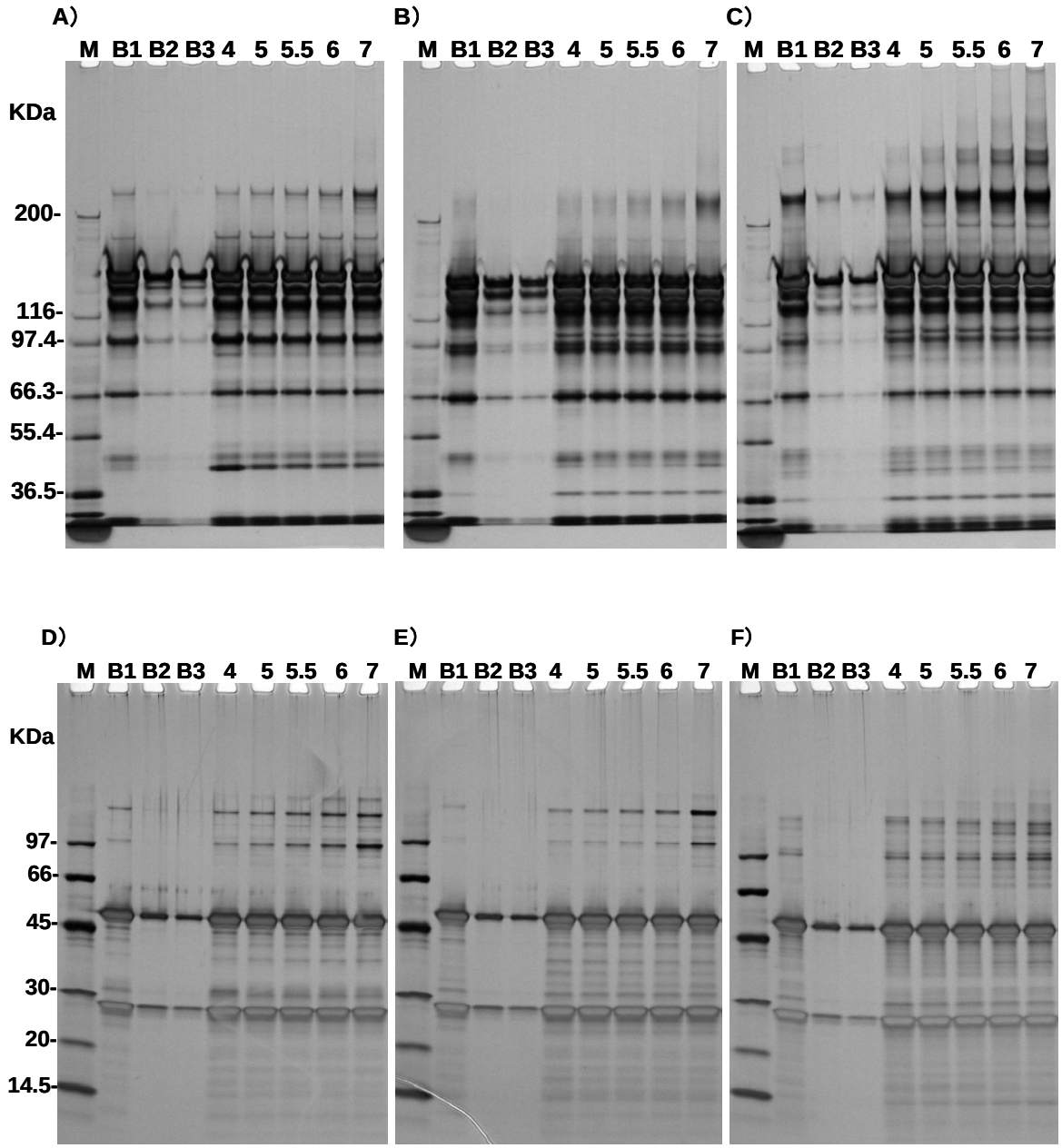
40℃3M 検体の泳動像を Mab-C の泳動像と比較すると、Initial から増加しているバンドの種類および pH に対する傾向はほぼ一致した。これは Mab-C および Mab-D がほぼ同じ劣化傾向を示していることを示唆している。

4 つの抗体の SDS-PAGE の結果から、以下の傾向が認められた。各抗体において Initial 時より可溶性重合体（HMWS）の中にジスルフィド結合を介した重合体が存在した。しかしながらその含有量は抗体ごとおよびサブクラスごとで異なり、共通性は認められなかった。非還元 SDS-PAGE の結果から、全てのサブクラスで 200KDa 以上にモノマーより高分子量のバンドが認められ、ダイマー以上の多量体の形成が示唆された。またこれらバンドは Initial から経時的に濃

くなる傾向を示し、熱ストレスによる多量体形成が促進されることを示した。特に処方 pH の増加に伴いバンドが濃くなる傾向が認められた。これは高 pH 領域でジスルフィド結合を主とする共有結合を介した多量体の形成を示唆するものである。またこの傾向は IgG1 に比べ IgG2 および IgG4 で顕著であった。一方 SEC 分析で IgG4 および IgG4PE の pH4.0 で可溶性重合体の増加が認められたが、非還元 SDS-PAGE では 200KDa 以上のバンドの増加は小さかった。pH4.0 の低 pH で増加した可溶性重合体の多くは疎水性相互作用によって形成されていると推察され、SDS 存在下で解離したと考えられた。またモノマーより分子量の小さい低分子劣化物の増加は低 pH（pH4.0、5.0）で顕著であった。

還元 SDS-PAGE の結果から、主に約 50KDa に H 鎖、約 25KDa に L 鎖のメインバンドに加え劣化物のバンドが多数認められた。約 50KDa の重鎖に比べ分子量の大きい高分子劣化物のバンドが全てのサブクラスで確認された。これらバンドは Initial から存在し、熱ストレスにより経時的に増加し、高 pH ほどバンドが濃くなる傾向が認められた。これらバンドはジスルフィド結合以外の共有結合を介した分子種であると考えられる。また重鎖より分子量が小さい低分子劣化物バンドが 25～50KDa に認められ、サブクラスで異なる傾向を示し、Initial から経時的に増加し、特に低 pH で顕著であった。

これらの結果から重合体および分解物の形成は pH によってその形成メカニズムが大きく異なることが推察された。可溶性重合体の形成については高 pH 領域ではジスルフィド結合を主とした共有結合を介した重合体を形成しやすい。これに対し低 pH 領域では疎水性相互作用、分解などを伴った構造変化による重合体を形成しやすいことが示唆された。

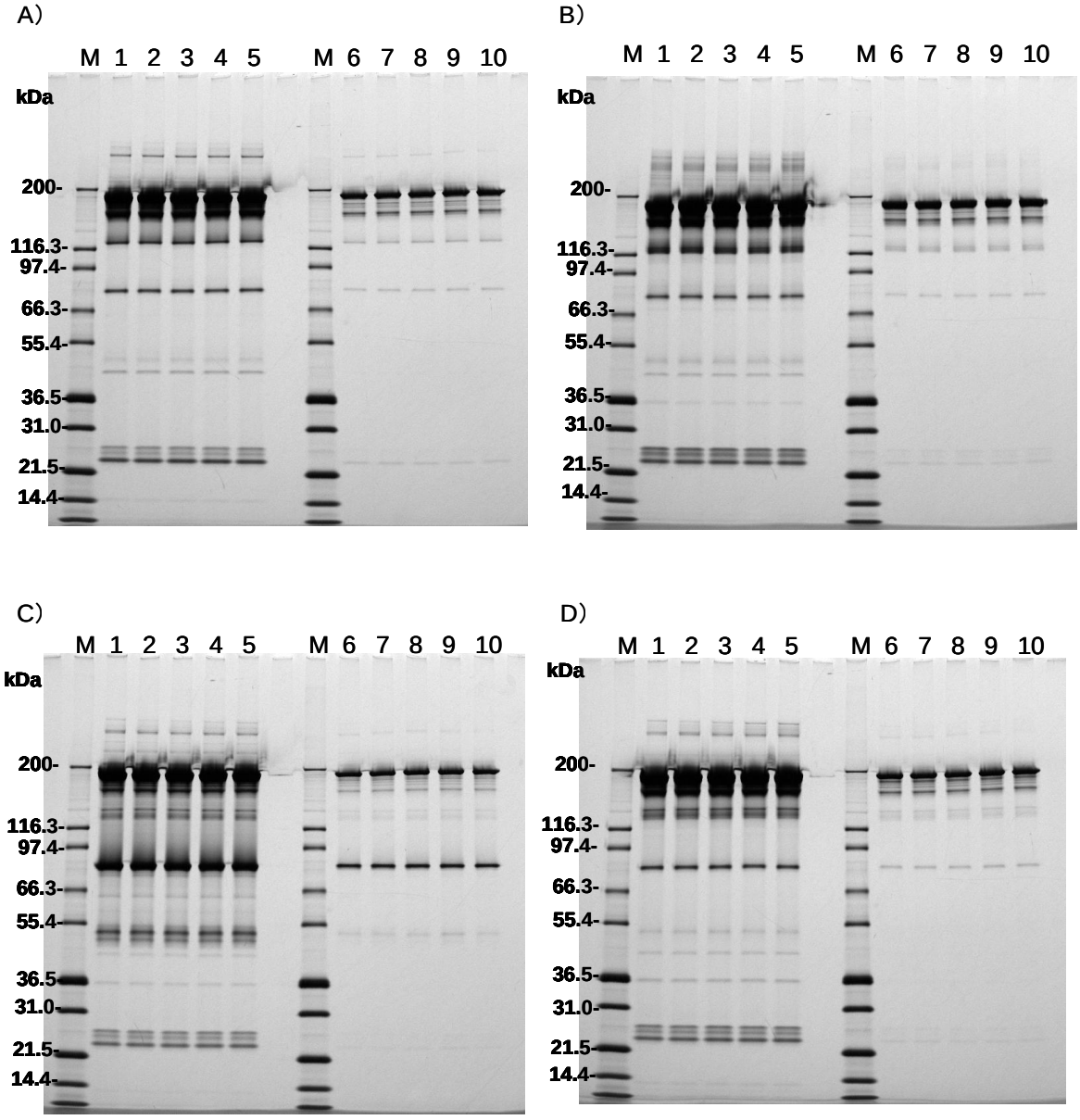


M:Marker, B1:分析標準品100%, B2:分析標準品10%, B3:分析標準品5%
pH:4, 5, 5.5, 6, 7

Fig.2-3-3-1　Mab-A 40℃1M 検体の SDS-PAGE 泳動像

Non Reduced SDS-PAGE　A）IgG1、B）IgG2、C）IgG4PE

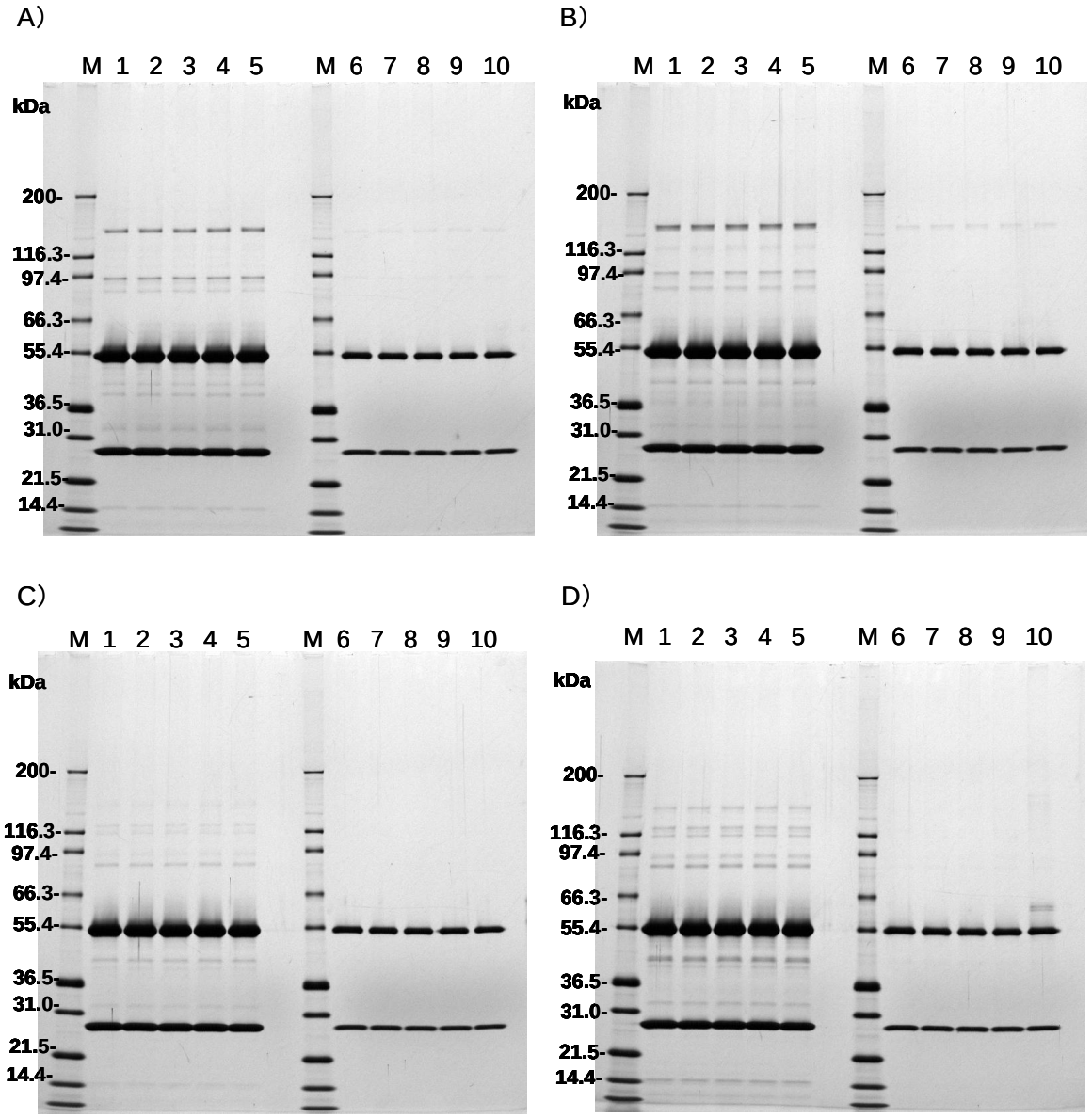
Reduced SDS-PAGE D）IgG1、E）IgG2、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-2 Mab-C Initial 検体　Non Reduced SDS-PAGE

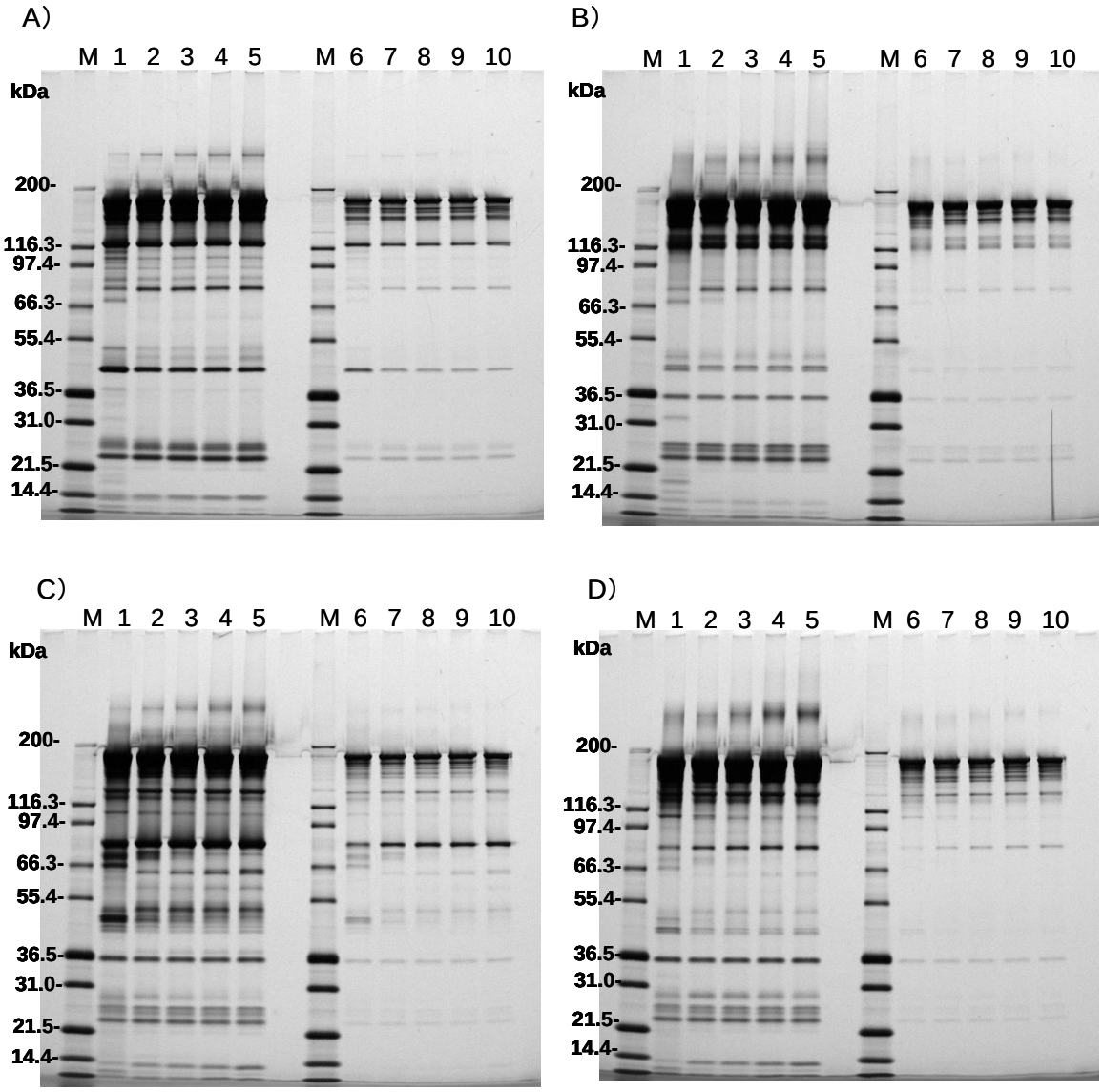
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-3 Mab-C Initial 検体 Reduced SDS-PAGE

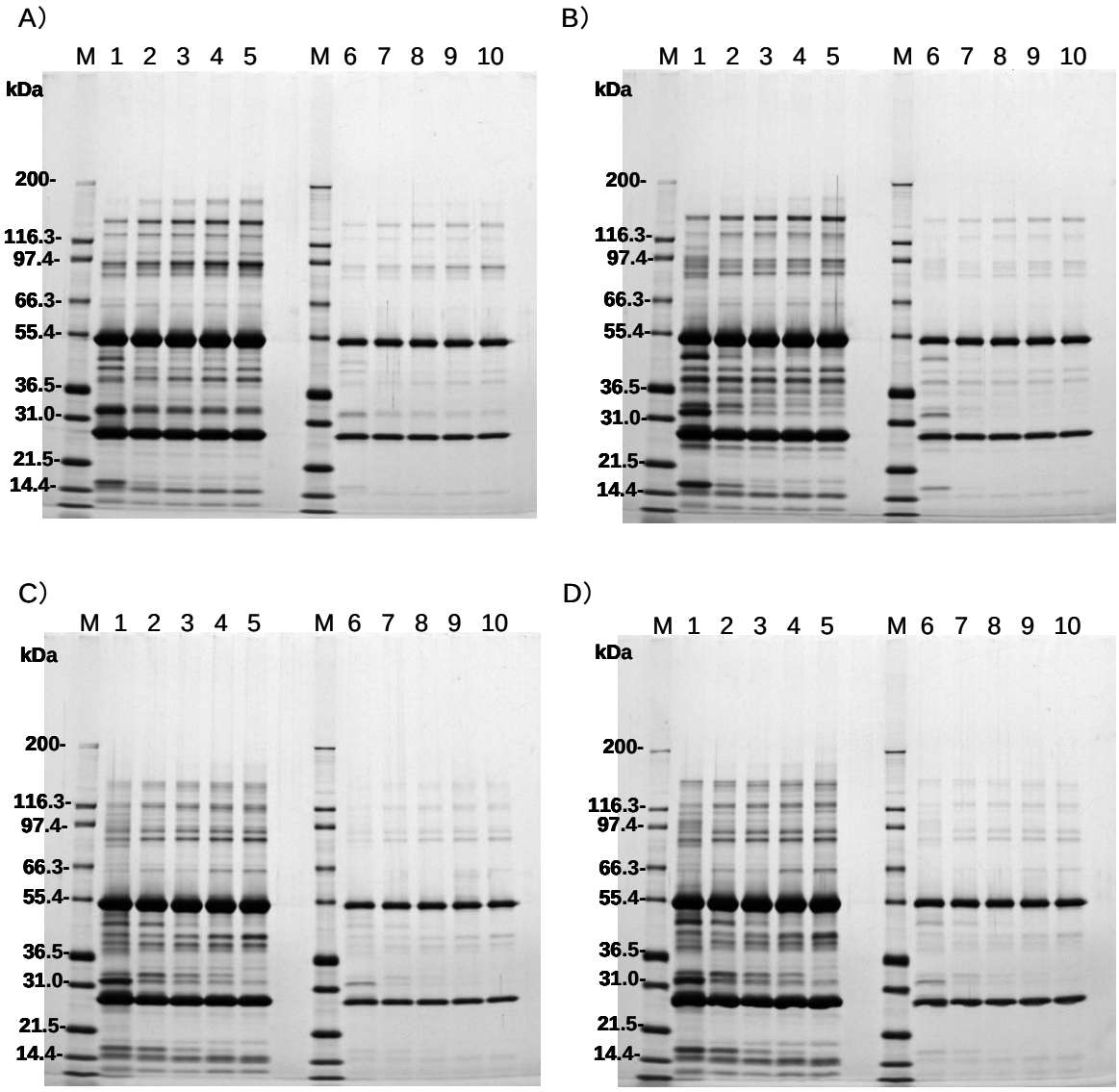
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-4　Mab-C 40℃3M 検体　Non Reduced SDS-PAGE

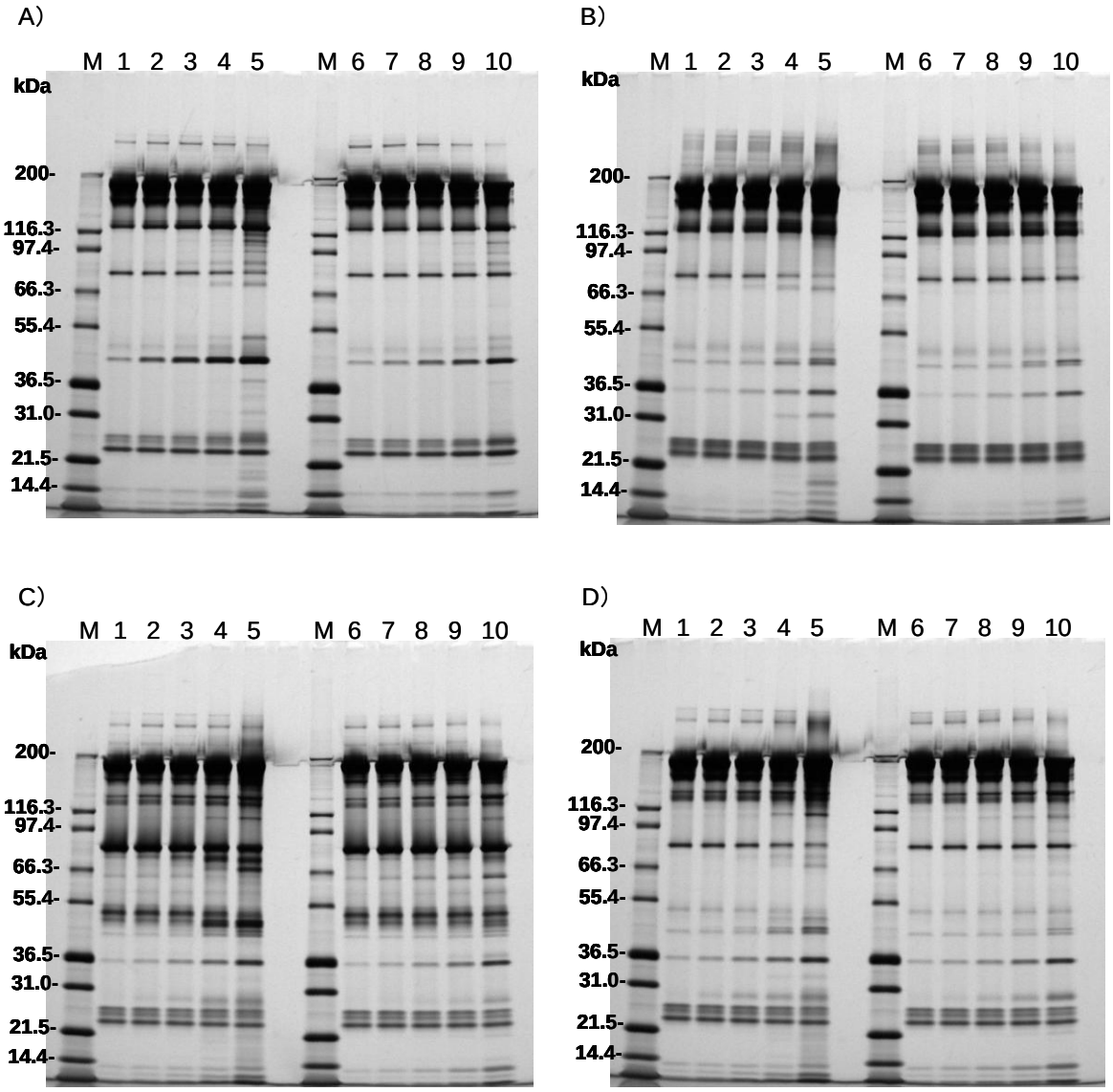
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-5　Mab-C 40℃3M 検体 Reduced SDS-PAGE

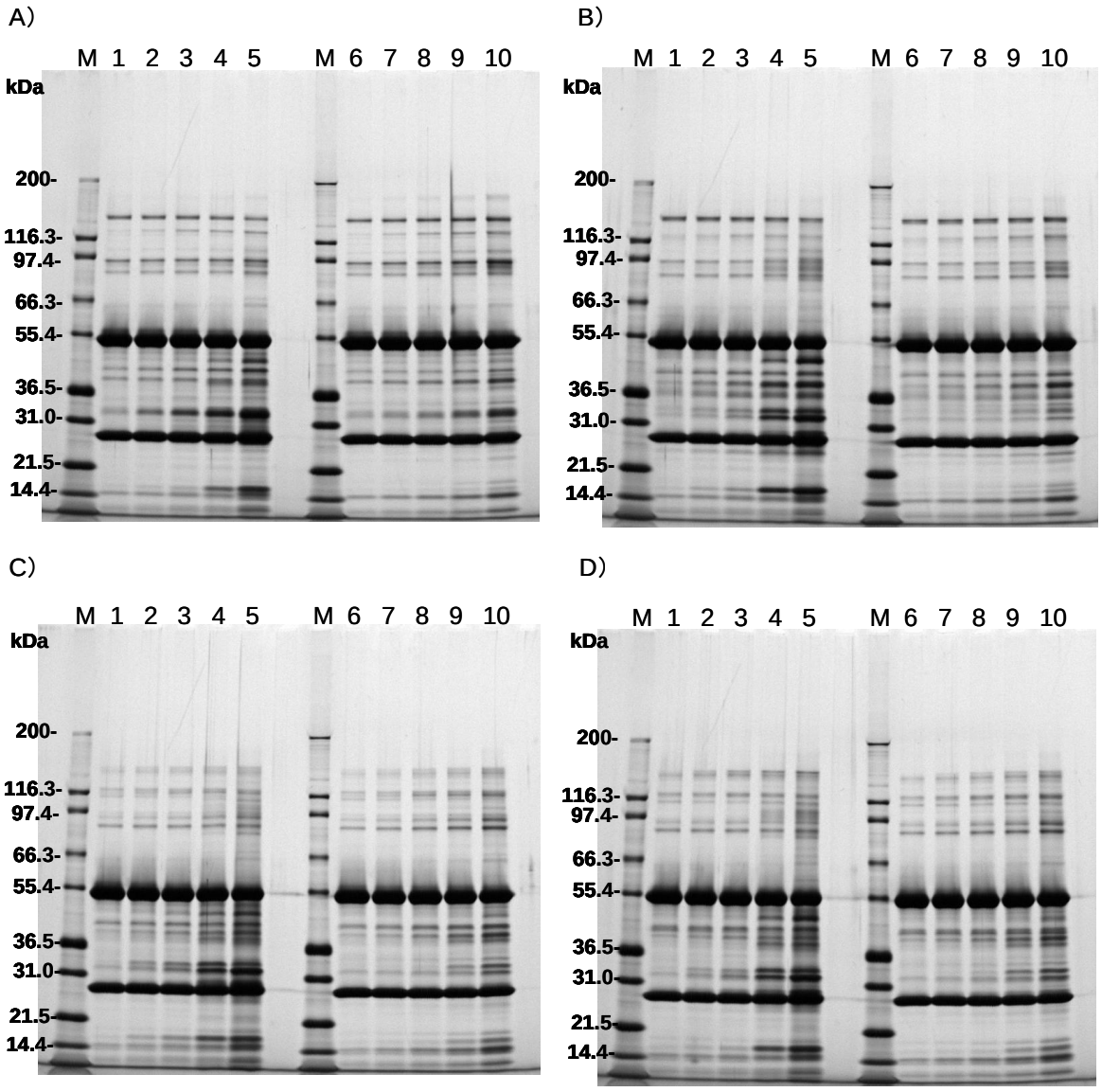
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：Initial、2,7：25℃1M、3,8：25℃3M、4,9：40℃1M、5,10：40℃3M
1-5：pH4.0検体、6-10：pH5.5検体

Fig.2-3-3-6　Mab-C pH4.0 および pH5.5 検体 Non-Reduced SDS-PAGE

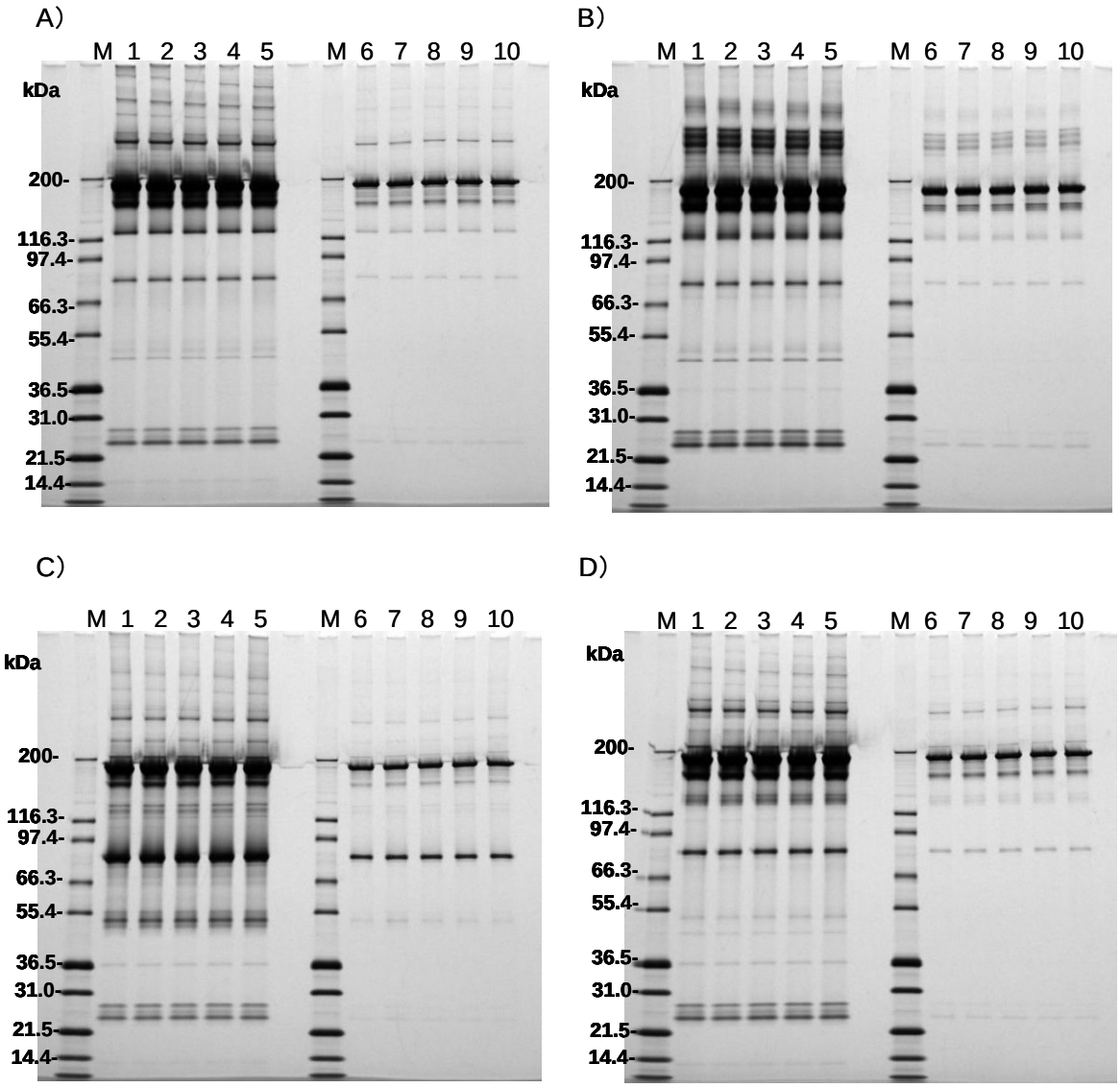
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：Initial、2,7：25℃1M、3,8：25℃3M、4,9：40℃1M、5,10：40℃3M
1-5：pH4.0検体、6-10：pH5.5検体

Fig.2-3-3-7　Mab-C pH4.0 および pH5.5 検体　Reduced SDS-PAGE

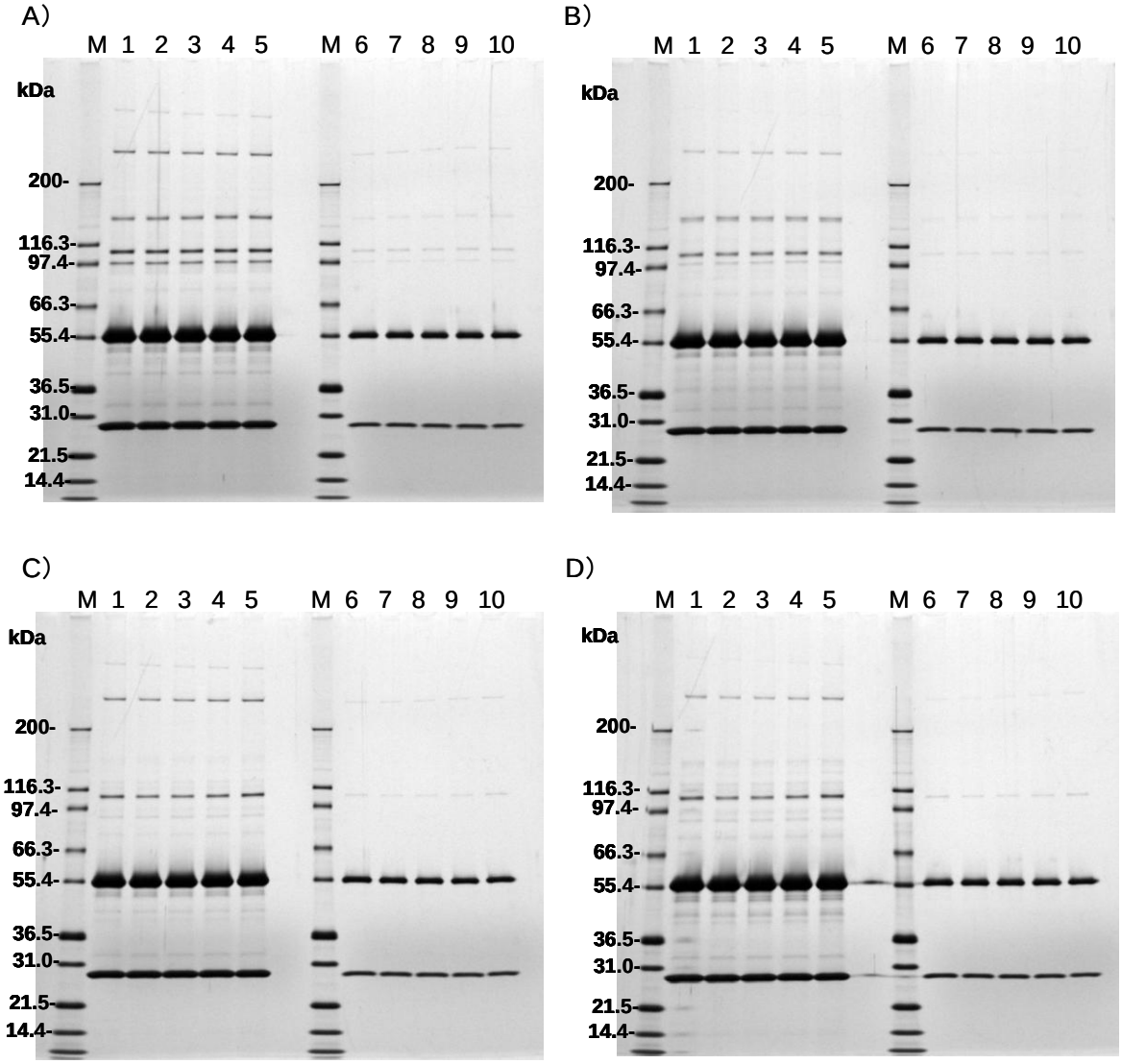
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-8 Mab-D Initial 検体　Non Reduced SDS-PAGE

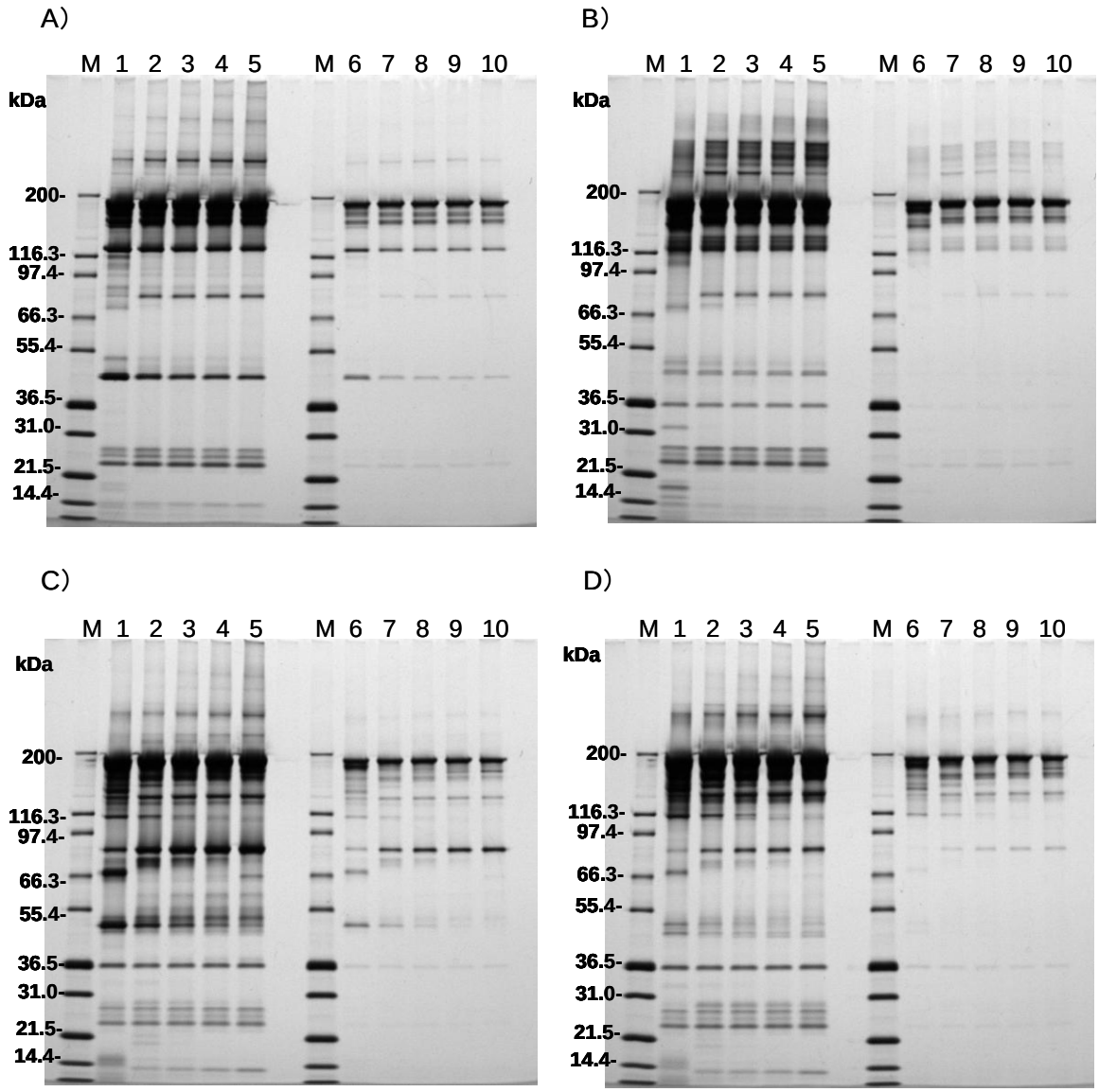
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-9 Mab-D Initial 検体 Reduced SDS-PAGE

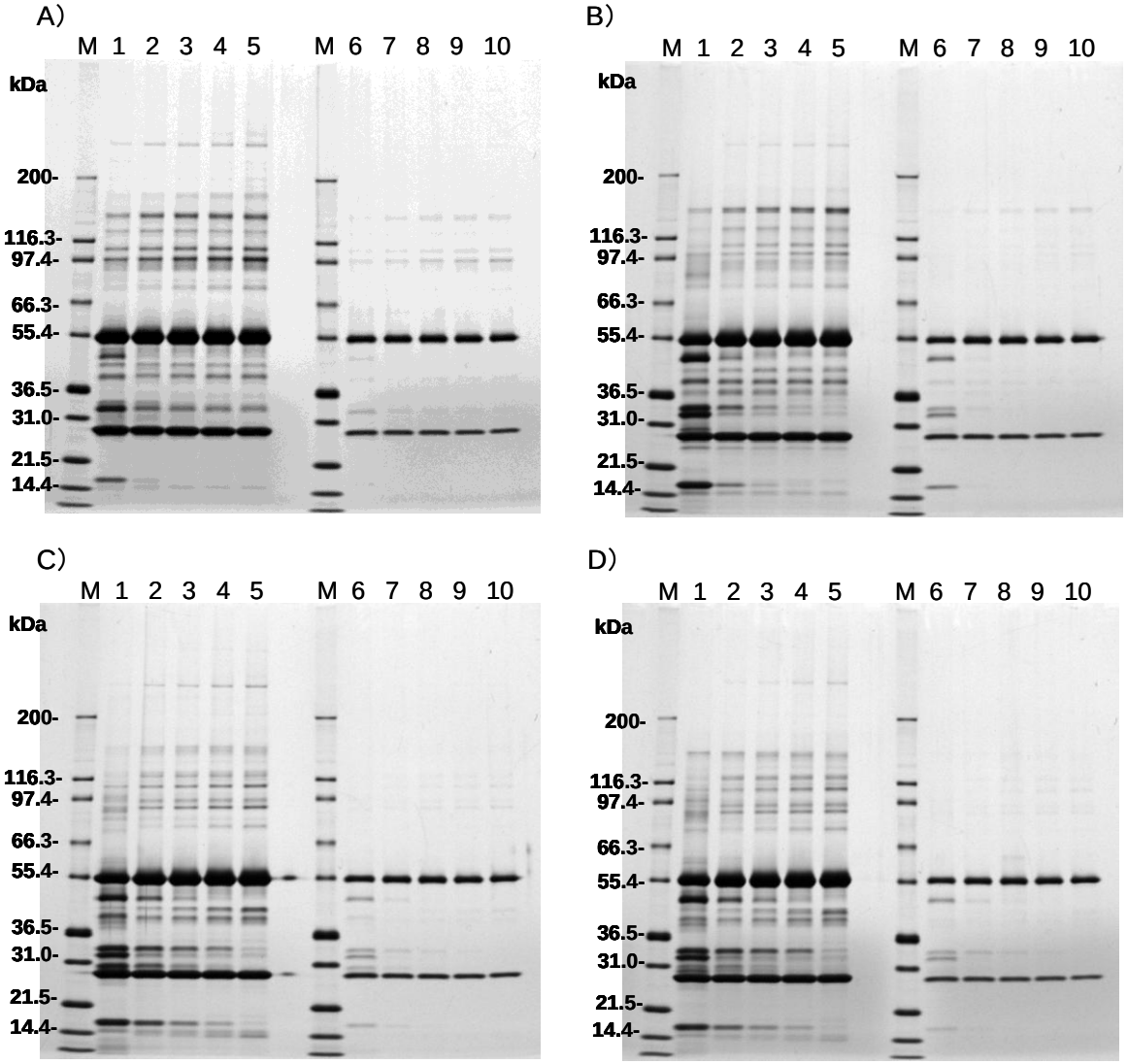
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-10　Mab-D 40℃3M 検体　Non Reduced SDS-PAGE

A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE



M：Marker、1,6：pH4.0、2,7：pH5.0、3,8：pH5.5、4,9：pH6.0、5,10：pH7.0
Road volume 1-5：1μ g、6-10：0.1μ g

Fig.2-3-3-11 Mab-D 40℃3M 検体 Reduced SDS-PAGE

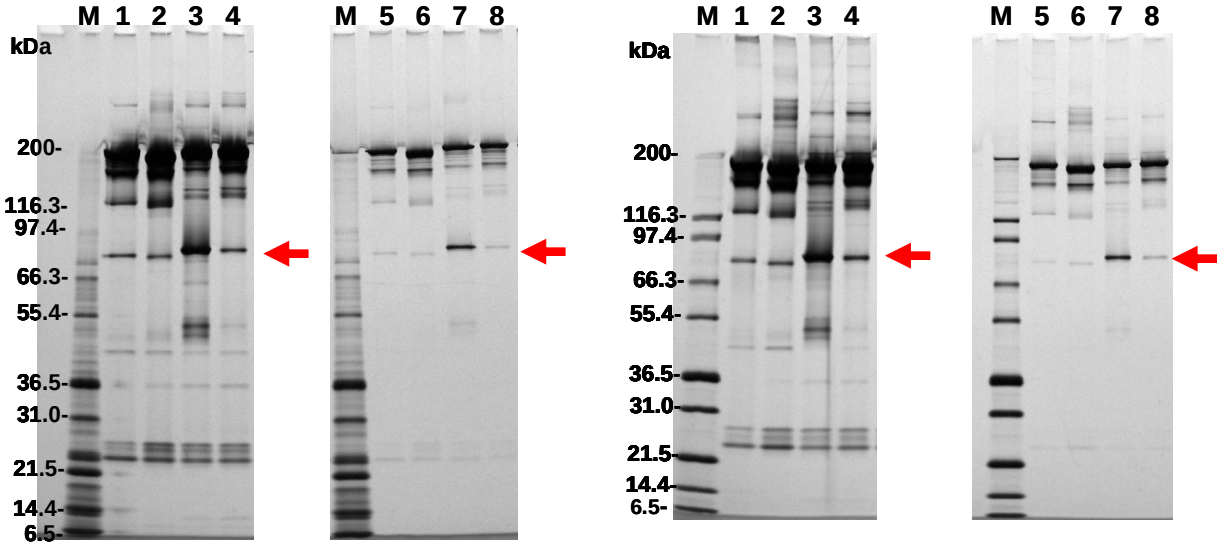
A）IgG1、B）IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE

2-3-4　IgG4　ハーフ抗体の評価

Mab-C、Mab-D については IgG4 と IgG4PE の比較を行った。IgG4 はハーフ抗体を形成しやすく、IgG4PE はハーフ抗体生成の抑制を目的としてアミノ酸改変を実施している。そこで Initial 検体を用いて非還元状態ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）およびレーザー励起蛍光検出キャピラリー電気泳動法（CE-SDS-LIF）でハーフ抗体含有量を評価した。

SDS-PAGE

Mab-C および Mab-D において分析開始時（Initial）検体の非還元条件の泳動像を Fig.2-3-4-1 に示した。IgG4 のみ 75KDa 付近に顕著なバンド（赤矢印）が認められた。分子量からこのバンドはハーフ抗体（hAb）と推察された。また IgG4PE は IgG1、IgG2AAAS と同レベルであり、IgG4 に比べて顕著に抑制していることが示唆された。しかしながら銀染色でゲルの染色を実施したため、定量性は低い。



A）　　B）

Fig.2-3-4-1　Non Reduced SDS-PAGE　A）Mab-C、B）Mab-D

M：Marker、1,5：IgG1、2,6：IgG2AAAS、3,7：IgG4、4,8：IgG4PE、

Road volume 1-4：1.0μg, 5-8：0.1μg

CE-SDS-LIF

上記に示した SDS-PAGE（銀染色）では各バンドの定性評価には十分であるが、定量性に乏しい。そこで定量性が高く、各種バイオ医薬品の純度試験などに用いられている CE-SDS-LIF を用いてハーフ抗体の定量を実施した。抗体を 5-TAMARA-SE により蛍光標識後 SDS 処理（非還元条件）を行い、CE-SDS-LIF により重合体（HMWS）、分解物（LMWS）およびハーフ抗体（hAb）を評価した [24]。

Mab-C の各サブクラスの Initial 検体の非還元条件でのエレクトロフェログラムを Fig.2-3-4-2 に示した。各サブクラス、約 15 分に IgG ピークを認め、その前方に分解物ピーク（LMWS）、後方に重合体ピーク（HMWS）を認めた。IgG4 のみ約 11.5 分にピークが認められ、分子量からハーフ抗体と同定した。Table.2-3-4-1 に Mab-C および Mab-D の非還元条件での Initial 検体の結果をまとめた。両抗体とも IgG4 で 9.25%（Mab-C）、7.13%（Mab-D）とハーフ抗体の含有が顕著であった。ハーフ抗体抑制を目的とした IgG4PE は両抗体とも 0.54%（Mab-C）、0.91%（Mab-D）と IgG1,IgG2AAAS と同レベルであり、ハーフ抗体生成を抑制していることが確認できた。また IgG2AAAS の IgG ピークは他のサブクラスに比べブロードであった。これまでの報告でもあるとおり、ヒンジ部位のジスルフィドシャッフリングによるヘテロジェネイティーと推察された。

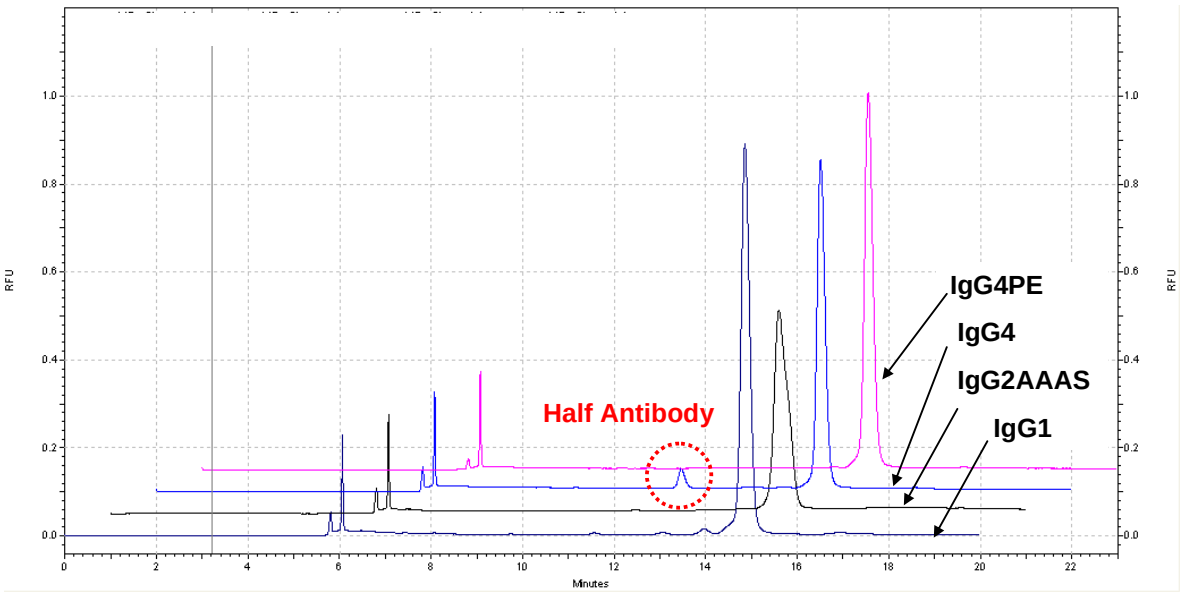


Fig.2-3-4-2　Mab-C CE-SDS-LIF Electrophelogram

Table.2-3-4-1　Results of CE-SDS-LIF（Non Reduced）

Mab-C

Subclass	HMWS（%）	Half Ab（%）	LMWS（%）	Monomer（%）
G1	0.21	0.4	3.46	95.92
G2AAAS	0.29	0.52	2.01	97.16
G4	0.27	9.25	1.61	88.85
G4PE	0.28	0.54	1.7	97.47

Mab-D

Subclass	HMWS（%）	Half Ab（%）	LMWS（%）	Monomer（%）
G1	1.15	0.28	2.61	95.94
G2AAAS	3.65	0.49	1.84	94
G4	0.38	7.13	1.07	91.39
G4PE	0.74	0.91	1.51	96.82

2-4 結言

本章ではサブクラスの違いが抗体の保存安定性に与える影響を評価した。本検討で用いた抗体は同一の可変領域を持ち、定常領域のみを各サブクラスに変換したことにより、純粋にサブクラスの違いのみを評価できる。このように純粋にサブクラスの違いによる安定性を評価したものは、これまでにほとんど報告されていない。特に全てのサブクラスを比較したものはなく、Hari SB 等 [18] や Franey H 等 [23] の IgG1 と IgG2 の比較に留まっている。本検討ではその可変領域についても 4 種類用意し、2 つのヒト抗体、1 つのマウス - ヒトキメラ抗体、1 つのヒト化抗体とこれまで上市されている全てのタイプの抗体についてサブクラスの影響を評価することができた。このような抗体のタイプ間での比較という観点からも新しく、意義深いものである。

目視、SEC、SDS-PAGE を用いて抗体の熱ストレスに対する保存安定性を評価した結果、サブクラスによって劣化傾向および安定性の類似点および相違点が明らかとなった。

目視評価では全てのサブクラスで熱ストレスによって高 pH 領域（pH6.0, 7.0）で不溶性凝集体（異物）を形成しやすく、濁りが濃くなる共通の傾向を示した。特に IgG4 および IgG4PE は IgG1、IgG2 に比べ広範囲の pH で不溶性凝集体（異物）を形成しやすいことが示唆された。

SEC および SDS-PAGE 分析ではサブクラスによってモノマー低下の原因となる主の劣化メカニズムがサブクラスによって異なることが明らかとなった。熱ストレスに対し、IgG1 は非常に分解されやすく、IgG4 は重合しやすい傾向が認められた。IgG2 は IgG1 と IgG4 の中間の重合しやすさを有し、また分解されにくい傾向を示した。今回検討した pH 領域（pH4.0～7.0）において重合体の形成しやすさを総合的に比較すると IgG4＞IgG2＞IgG1 であり、IgG4 で最も重合体を形成しやすい傾向が認められた。また全てのサブクラスで pH 増加に伴い重合体が増加する pH 依存性が認められ、IgG4 で特に顕著であった。また IgG2 および IgG4 では pH5.0 以下の低 pH 領域（酸性領域）でも重合体形成が顕著であり、IgG1 では認められない IgG2 および IgG4 特有の傾向を示した。特にこの傾向は IgG4 で顕著であり、酸性 pH に対して IgG4 は非常に不安定であることが示唆された。SDS-PAGE の結果と合わせて考察すると低 pH 領域では疎水性相互作用、分解などを伴った構造変化による重合体の形成、高 pH 領域ではジスルフィド結合を介した重合体の形成が示唆された。また分解のしやすさは IgG1＞IgG4＞IgG2 であり、IgG1 が最も分解されやすかった。特に低 pH でその傾向は顕著であった。

4 つの抗体を用いた結果、重合体の形成および分解物の形成においてサブクラスの違いが大きく影響することがわかった。また pH に対する劣化傾向、保存安定性の傾向は可変領域の異なる 4 つの抗体で、概ね同じ傾向を示した。このことからサブクラスつまり定常領域の物性は可変領域を変化させても保存されることが明らかとなった。

2-5 参考文献

1. Brych SR, Gokarn YR, Hultgen H, *et al.* Characterization of antibody aggregation: Role of buried, unpaired cysteines in particle formation. *J pharm Sci* 99(2):764-781, （2010）
2. Cordoba-Rodriguezs. Aggregates in mAb and recombinant therapeutic proteins: A regulatory prespective FDA prespectives on specifications and effective control strategies. *Biopharm Int* 21(11):44-53, （2008）
3. Fesinmeyer RM, Hogan S, Saluja A, *et al*. Effect of ions on agitation- and temperature-induced aggregation reaction of monoclonal antibodies. *Pharm Res* 26(4):903-913,（2009）
4. Hawe A, Kasper JC, Friess W, *et al*. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freez-thawing and thermal stress. *Eur J Pharm Sci* 38, 79-87（2009）
5. Kameoka D, Masuzaki E, Ueda T, *et al*. Effect of buffer species on the unfolding and the aggregation of humanized IgG. *J Biochem* 142(3):383-391,（2007）
6. Kiese S, Pappenberger A, Friess W, *et al*. Shaken, not strred: Mechanical strees testing of an IgG1 antibody. *J Pharm Sci* 97(10): 4347-4366,（2008）
7. Kueltzo LA, Wang W, Randolph TW, *et al*. Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *J Pharm Sci* 97(5):1801-1812,（2008）
8. Mahler HC, Muller R, Friess W, et al. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. Eur J Pharm Biopharm 59(3):407-417,（2005）
9. Remmele JR, Callahan WJ, Krishnan S, *et al*. Active dimer of Epratuzumab provides insight into the complex nature of antibody aggregates. *J Pharm Sci* 95(1):126-145,（2006）
10. Moore JM, Patapoff TW, Cromwell ME, et al. Kinetics and thermodynamics of dimer formation and dissociation for a recombinat humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor. Biochmistry 38(42):13960-13967,（1999）
11. Vermeer AW, Norder W. The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J* 78:394-404（2000）

12. Andersen CB, Manno M, Rischel C, *et al*. Aggregation of multidomain protein: a coagulation mechanism governs aggregation of a model IgG1 antibody under weak thermal stress. *Protein Sci* 19, 279-290（2010）
13. Sahin E, Grillo AO, Perkins MD, et al. Comparative effects of pH and ionic strength on protein-protein interactions, and aggregation for IgG1 antibodies. J Pharm Sci 99(12):4830-4848,（2010）
14. Philo JS. Is any measurerment method optimal for all aggregate size and types ? *AAPS J* 8:E564-E571,（2006）
15. Carpenter JF, Randolph TW, Jiskoot W, *et al*. Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: Gaps that may compromise product quality. *J Pharm Sci* 98:1202-1205,（2009）
16. Singh SK, Afonina N, Awwad M, *et al.* An Industry Prespective on the Monitoring of Subvisible Particles as a Quality Attribute for Protein Therapeutics. *J Pharm Sci* 99:3302-3321,（2009）
17. Ejima D, Tsumoto K, Fukuda H, *et al*. Effect of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins* 66:954-962,（2007）
18. Hari SB, Lau H, Razinkov VI, *et al*. Acid-induced aggregation of human monoclonal IgG1 and IgG2: Molecular mechanism and the effect of solution composition. *Biochemistry* 49:9328-9338,（2010）
19. Cohen SL, Price C, Vlasak J. Beta-elimination and peptide bond hydrolysis: two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon strage. *J Am Chem Soc* 129(22):6976-6977,（2007）
20. Xiang T, Lundell E, Sun Z, *et al*. Structural effect of a recombinant monoclonal antibody on hinge region peptide bond hydrolysis. *J Chromatogr* 858(1-2):254-262,（2007）
21. Cordoba AJ, Shyong BJ, Breen D, *et al*. Non-Enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J Chromatogr* 818(2):115-121,（2005）
22. Gaza-Bulseco G, Liu H. Fragmentation of a recombinant monoclonal antibody at various pH. *Pharm Res* 25(8):1881-1890,（2008）
23. Franey H, Brych SR, Kolvenbach CG, *et al.* Increased aggregation propensity of IgG2

subclass over IgG1: role of conformational changes and covalent character in isolated aggregates. *Protein Sci* 19: 1601-1615,（2010）

24. Salas-Solano O, Tomlinson B, Du S, *et al*. Optimization and validation of a quantitative capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate method for quality control and stability monitoring of mooclonal antibodies. *Anal Chem* 78:6583-6594,（2006）

第 3 章　抗体各サブクラスの構造安定性評価

3-1 緒言

第 2 章で IgG のサブクラスの違いによる熱ストレスに対する重合体および分解物の保存安定性への影響を評価したところ、サブクラス間で違いが認められた。特に抗体医薬品の開発で免疫原性の惹起や製造プロセスや医薬品の保存で大きな問題となりうる重合体の形成しやすさは IgG1 で最も安定であり、IgG2 および IgG4 で不安定な傾向が認められた。

これまでに抗体の重合体形成メカニズム解明を目指し、様々な研究が実施されてきた。　凝集体（重合体）形成は構造安定性（conformation stability）とコロイド安定性（colloidal stability）に大きく影響を受け、凝集速度やその程度は溶媒条件やタンパク質表面の特性に依存する [1-5]。抗体の構造安定性、天然状態の構造･フォールディングの維持は pH、イオン強度、添加剤およびタンパク質濃度に影響される [6]。タンパク質凝集モデルとして、部分変性状態にある分子種がしばしば会合したり、すでに存在する不純物と会合を形成したりして、凝集の核となり、結果としてより大きな会合凝集体を形成すると提案されている [4, 7]。また抗体が酸性条件下で天然とは明らかに異なる安定な構造（コンフォメーション）を持ち、それが会合凝集形成のトリガーになりうることを明らかにしている [8]。それゆえに凝集体形成を抑制するためには高い構造安定性を有することが重要となる。

タンパク質の熱安定性を評価する方法として熱ストレスに対する構造変化（conformation change）を熱力学的手法もしくは分光学的手法で測定する方法がある。これまでにも様々な手法を用いて抗体の熱安定性評価の報告がされている。たとえば示差走査型熱量測定（Differential Scanning calolimetry : DSC）[9-11]、偏光円二色性スペクトル分析（Circular dichroism : CD）[12]、フーリエ変換赤外分光法（Fourier transform infrared : FTIR）[13]、内部（自家）蛍光スペクトル分析（intrinsic fluorescence spectroscopy）[12]、タンパク質表面の疎水性環境に感受性の高いプローブを用いた外部蛍光スペクトル分析（extrinsic fluorescence spectroscopy）[14] や示差走査型蛍光測定（Differential Scanning Fluorimetry : DSF）[15,16] などがあり、保存長期安定性との相関が議論され、処方検討にも利用されている。しかしながら、保存安定性同様、同じ可変領域を持つ抗体において系統的にサブクラス間での安定性を評価した例は少ない。そこで本章では DSC、CD、DSF を用いて IgG のサブクラスの違いによる構造安定性を評価した。また得られた結果から保存安定性との関連も考察した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 示差走査型熱量測定（DSC）

DSC は、温度を一定速度で変化させた時に、試料の温度転移（タンパク質の熱変性など）に伴う微小な熱変化を測定し、生体高分子の熱安定性を評価する方法の一つである。測定には Microcal 社の VP Capillary DSC を用いて分析した。抗体濃度は 1 mg/mL の検体をサンプルプレートに入れ、媒体（ブランク）をリファレンスとして測定を行った。走査温度範囲は 20～100℃で行い、走査速度は 1 ℃/min とした。最終データはサンプル測定データから媒体データを引き、サンプル濃度による補正を行い、サンプル分子 1 モルあたりの比熱を計算した。これら解析には OriginLab 社の Origin ソフト（versio.7.0）を使用した。各熱変性ピークの Tm 値は、比熱容量の極大値を与える温度とした。

3-2-2. 円偏光二色性スペクトル（CD）

遠紫外円偏光二色性（CD）スペクトルの測定により簡便にタンパク質の二次構造の有無や種類を推定することができる分析の一つである。測定には日本分光株式会社製のペルチェ式恒温キュベットホルダーPTC-423L を備えた円二色分散計 J-820 を用いた。抗体の二次構造の評価には、遠紫外 CD スペクトル測定（Far-UV CD）を実施した。各検体について抗体濃度を 0.25 mg/mL に各対応する媒体で希釈し、試験に供した。光路長 0.1cm の石英セルを用い、測定波長は 260～200 nm、測定温度は 25℃とした。また温度に対する構造変化（unfolding profiles）評価には遠紫外 CD スペクトルによる昇温スペクトル測定を実施した。二次構造評価同様、光路長 0.1cm の石英セルを用い、抗体濃度は 0.25 mg/mL、測定温度範囲は 25～100℃、昇温速度は 1℃/min とした。温度はペルチェ式恒温キュベットホルダーPTC-423L により制御した。昇温後、二次構造の変化を確認するために、25℃で 15 分保持後、遠紫外 CD スペクトル測定を実施し、昇温後スペクトルとした。各分析の詳細パラメータを Table.3-2-1 に示した。

Table.3-2-1 Far-UV CD スペクトルおよび昇温分析の測定条件

各パラメータ	Far-UV CD	Far-UV 昇温
バンド幅	1.0 nm	1.0 nm
レスポンス	2 sec	2 sec
感度	Standard	Standard
データ取り込み間隔	0.1 nm	0.1 ℃
測定波長領域	200 ～ 260 nm	－
測定波長	－	217 nm
スキャンスピード	10 nm/min	1 ℃/min
積算回数	3 times	－
セル長	1 mm	1 mm
測定温度	25℃	－
測定温度範囲	－	25 ～ 100 ℃

3-2-3. 示差走査型蛍光測定（DSF）

示差走査型傾向測定（DSF）はタンパク質中のトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンの内部蛍光に由来する蛍光スペクトル分析のような直接法とは異なり、環境変化に感受性の高い色素を用いその色素の蛍光強度を測定する間接法の一つである。これまでにも Sypro Orange や ANS 等、蛍光色素を用いたタンパク質のアンフォールディング（unfolding）に関する研究報告が多数存在する[17-19]。これら蛍光色素は水溶液中および親水性環境で蛍光強度が弱く、水溶液中のタンパク質がアンフォールドすると露出した疎水表面に結合しタンパク質が最終的に凝集するまで蛍光強度の増加を示す。その後タンパク質の凝集に伴い、疎水性表面の減少により蛍光強度も減少していく。この特性を利用しタンパク質のアンフォールド状態のモニターを可能とする。また PCR（polymerase chain reaction）装置を用いることで、多検体分析を可能としたハイスループット化、分析に必要な検体量の少量化から、最近、バイオ医薬品の処方開発などに利用が期待されるハイスループットな分析法の一つとして報告されている[16,20,21]。

各検体について抗体濃度を0.5 mg/mLに各対応する媒体で希釈し、試験に供した。Sypro Orangeはストックに対し、最終的に1000倍に希釈される様に分析直前に検体と混合した。Sypro Orangeと混合した各検体溶液をPCRプレートの各ウェルに20μLずつ分注し、バイオラッド社のサーマルサイクラーを用いて測定した。走査範囲は35～95℃で0.5℃ずつ上昇させ、10秒間保持した。励起波長、蛍光波長はそれぞれ473nm、570nmを用いた。得られたMelt Curveの解析にはバイオラッド社のCFX Mangerソフト（Version.1.6）を用いた。

3-3　結果および考察

3-3-1.　走査型熱量測定（DSC：Differential Scanning Calorimetry）

これまでに IgG の DSC プロファイルは多数報告されており、測定条件によって違いが認められるが一般的に 3 つの変性ピークが認められ、メインピークが Fab の変性ピーク、残りのピークが低温側から定常領域の CH2 ドメイン、CH3 ドメインの変性ピークである。また Fab の Tm（安定性）は抗体によって異なるので、場合によって定常領域の変性ピークと重なり、変性ピーク数に違いが認められることが知られている [22-26]。

各抗体の pH5.5 検体についてサブクラスごとに DSC プロファイルを Fig.3-3-1-1 に示した。全ての検体において典型的な IgG の DSC プロファイルを示し、1 つから 3 つの変性ピークが認められた。IgG1 の DSC プロファイルをみると、メインピークは Fab の変性ピークであり、Mab-A で最も低く、Mab-D で最も高い Tm を示し、約 76℃から 83℃の範囲であった。約 71.5℃に Mab-D で明確なピークが認められ、他の抗体でも一致する位置にショルダーピークが存在し、これは定常領域の CH2 ドメインの変性ピークと考えられる。また Mab-D 以外の抗体では約 83.8℃に明確なピークの重なりが認められ、これは定常領域の CH3 ドメインの変性ピークと考えられた。このように Fab の Tm によってメインピークがシフトするため、他の変性ピークが重なり、明確なピークとして確認できない場合があるが、可変領域が異なる抗体でも同条件下では定常領域の変性ピークは一致することが示唆された。この傾向は他のサブクラスにおいても同様であった。

サブクラス間で DSC プロファイルを比較するために、各抗体の pH5.5 の DSC プロファイルを Fig.3-3-1-2 に示した。各ドメインの変性ピークに重なりが少なく、各ドメインの変性が良くモニターできた Mab-C を例に挙げてプロファイルを比較すると、定常領域の変性が IgG1 に比べて IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE で低温側にシフトしていることが確認された。より低温で変性しやすい CH2 ドメインのピークを比較すると、IgG2AAAS、IgG4、IgG4PE ではそのアンフォールディング開始温度は IgG1 に比べて 5℃以上低下した。また IgG1 では約 83.8℃に CH3 の変性ピークが認められたが、IgG2AAAS ではメインピーク後のショルダー部分に、IgG4 および IgG4E ではメインピーク前の低温側にシフトした。これらの結果から CH2 および CH3 ドメインの定常領域は IgG1 で最も安定性が高く、IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE で安定性が低下することが示唆された。また Fab の Tm 比較では同じ可変領域を有しているものの、IgG4 および IgG4PE で IgG1 に比べ若干の低温シフトが確認された。サブクラスの違いにより CH1 のアミノ酸配列およ

び重鎖軽鎖間の分子間ジスルフィド結合の違いがあり、これら要因が安定性の違いに影響を与えていると推測される。これら傾向は全ての抗体で確認された。

各 pH（pH4.0～7.0）における各ドメインの Tm を算出し、Table.3-3-1-1 にまとめた。一部の抗体では Fab のメインピークとの重なりにより CH2、CH3 の Tm が算出できなかった。しかし上述したように、各抗体間で定常領域の DSC プロファイルはほぼ一致する結果が得られており、確認できた Tm については 4 つの抗体でほぼ一致する結果が得られた。以下に 3 つのドメインごとに考察した。

Fab ドメイン

Fab 断片を含むメインの熱変性ピークの Tm を比較すると、いずれの抗体も pH5.0 から pH6.0 付近で最も高い温度を示し、pH4.0 で最も低い温度を示す傾向が認められた。pH5.0 から pH7.0 の領域では各抗体概ね Fab 断片の Tm の変化は最大 3℃程度と大きな差はなかったが、pH4.0 では pH5.0～7.0 の Tm に対し 5～10℃近く低下が認められた。また、いずれの抗体でも今回試験した pH4.0 から pH7.0 の範囲では概ね IgG1≧IgG2＞IgG4 の順で高い Tm を有する傾向を示した。同抗体間では各 pH において IgG1 と IgG2（IgG2AAAS）でほぼ同じ Tm を示したのに対し、IgG4 および IgG4PE は IgG1、IgG2（IgG2AAAS）に比べメインピーク Tm の低温シフトが認められた。また抗体種によっては pH による不安定化に差が認められた。これは可変領域のアミノ酸配列の違いおよび H 鎖（VH-CH1）と L 鎖（VL-CL）の相互作用の違いおよびヒンジ領域の自由度（フレキシビリティー）の違いに由来する Fab 断片と CH2 ドメインの相互作用の違いが影響していると考えられる。

CH2 ドメイン

CH2 ドメインは抗体を構成するドメインの中で最も安定性が低く、pH の影響を受けやすいことが知られており[22]、安定性に大きな影響を与えると推測されている。CH2 ドメインの変性が最も良くモニターできた Mab-D の pH に対する Tm 値を各サブクラスで比較した結果を Fig.3-3-1-3 に示した。全てのサブクラスで中性 pH から酸性 pH に向けて Tm が低下するという pH 依存性が認められ、全てのサブクラスで共通の特徴であることがわかった。特に pH4.0 の酸性 pH における低温へのシフトが顕著であった。今回試験した pH5.0 から pH7.0 では Mab-C および Mab-D で IgG1＞IgG2AAAS＞IgG4＞IgG4PE の順で高い Tm を示した。しかしながら興味深い

ことにpH4.0においてはIgG2AAASで最も低いTmを示した。Mab-AおよびMab-BはIgG2AAASではなく、IgG2野生型（WT）で評価をしている。Fabのピークとの重なりで明確なCH2のTmはpH4.0およびpH5.0の一部でしか算出できなかったが、IgG2WTとIgG2AAASのDSCプロファイルを比較するとCH2ドメインの安定性はIgG2WTの方が高い結果を示した。またIgG4とIgG4PEの比較でも全てのpHでCH2ドメインの安定性はIgG4WTの方が高い結果を示した。この結果からアミノ酸改変導入が定常領域を不安定化する可能性が示唆された。

4つの抗体で得られたCH2のTmについて各サブクラスで平均値を求め、pHに対するTm値の比較をFig.3-3-1-4に示した。上述した通り、全てのpHにおいてIgG1で最も高いTmを示し、中性pHから酸性pHに向けてTmが低下する傾向が認められた。IgG2のpH5.5からpH7.0はFabの変性ピークとの重なりより算出できなかったが、おそらくIgG1とIgG2AAASの間、しかもIgG1にかなり近い側にTmを持つと予測される。これより全てのサブクラス間で比較すると、各pHでのTmを比較すると、IgG4PE＜IgG4≦gG2AAAS＜IgG2≦gG1の序列で安定性が高い傾向が認められた。この結果から野生型でのCH2ドメインの安定性はIgG4＜IgG2≦gG1の序列でIgG1が最も安定性が高かった。しかしながらpH4.0ではIgG2AAASがIgG4PEよりも低いTmを示した。そこで最もpH間での温度低下が大きかったpH5.0とpH4.0間での温度差を比較すると、IgG1、IgG4およびIgG4PEが約9℃だったのに対し、IgG2およびIgG2AAASが約11.5℃と他のサブクラスに比べて大きいことが明らかとなった。これはIgG2のCH2がpH5.0以下の酸性領域ではIgG1およびIgG4のCH2に比べ、構造不安定化を受けやすい可能性を示唆するものである。

<u>CH3ドメイン</u>

IgG1のCH3ドメインは非常に安定性が高いことが報告されている[22]。Fig.3-3-1-2に示したMab-CのpH5.5における各サブクラスのDSCプロファイルを比較すると、IgG1では約84℃に明確な変性ピークが認められたが、IgG2AAASではメインピーク後のショルダー部分に、IgG4およびIgG4PEではメインピーク前の低温側にシフトしていた。これは以前、Ellen Garber等が報告した結果[25]と同様であり、IgG1に比べ、IgG2およびIgG4で安定性が低くなる傾向が認められた。またサブクラスごとに比較しても4つの抗体間でCH2同様にCH3の変性ピークも一致（保存）していた。IgG2とIgG2AAASまたはIgG4とIgG4PEの改変体のプロファイルもほぼ一致しており、CH3の変性にはアミノ酸改変が影響しなかった。アミノ酸改変は全てヒンジ領域およびCH2ドメインに位置しており、CH3に影響しなかったのは妥当な結果である。IgG2およびIgG4

においてはCH3の変性ピークがFabの変性ピークと重なり、明確にTmを算出できなかったが、DSCプロファイルから予想するとIgG2はIgG1のCH3のTm値から2～4℃低下したあたりにTmを有すると考えられ、比較的IgG1に近い安定性を有していると考えられる。これに対しMab-DのIgG4およびIgG4PEのプロファイルからCH2の変性ピークとFabの変性ピークの間に他のサブクラスでは認められない変性ピークが認められた。おそらくこれがIgG4のCH3ドメインの変性ピークと考えられ、IgG1およびIgG2に比べて10℃以上低温側にシフトしていた。CH3のTmはpH5.0からpH7.0では大きな差は認められなかったが、pH4.0では全てのサブクラスで大きく低下しており、IgG4で顕著であった。

これらCH2、CH3ドメインの結果から、CH2およびCH3から構成されるFcの安定性はサブクラスで大きく異なり、その安定性はIgG1＞IgG2＞IgG4の順でIgG1が最も高い安定性を示した。

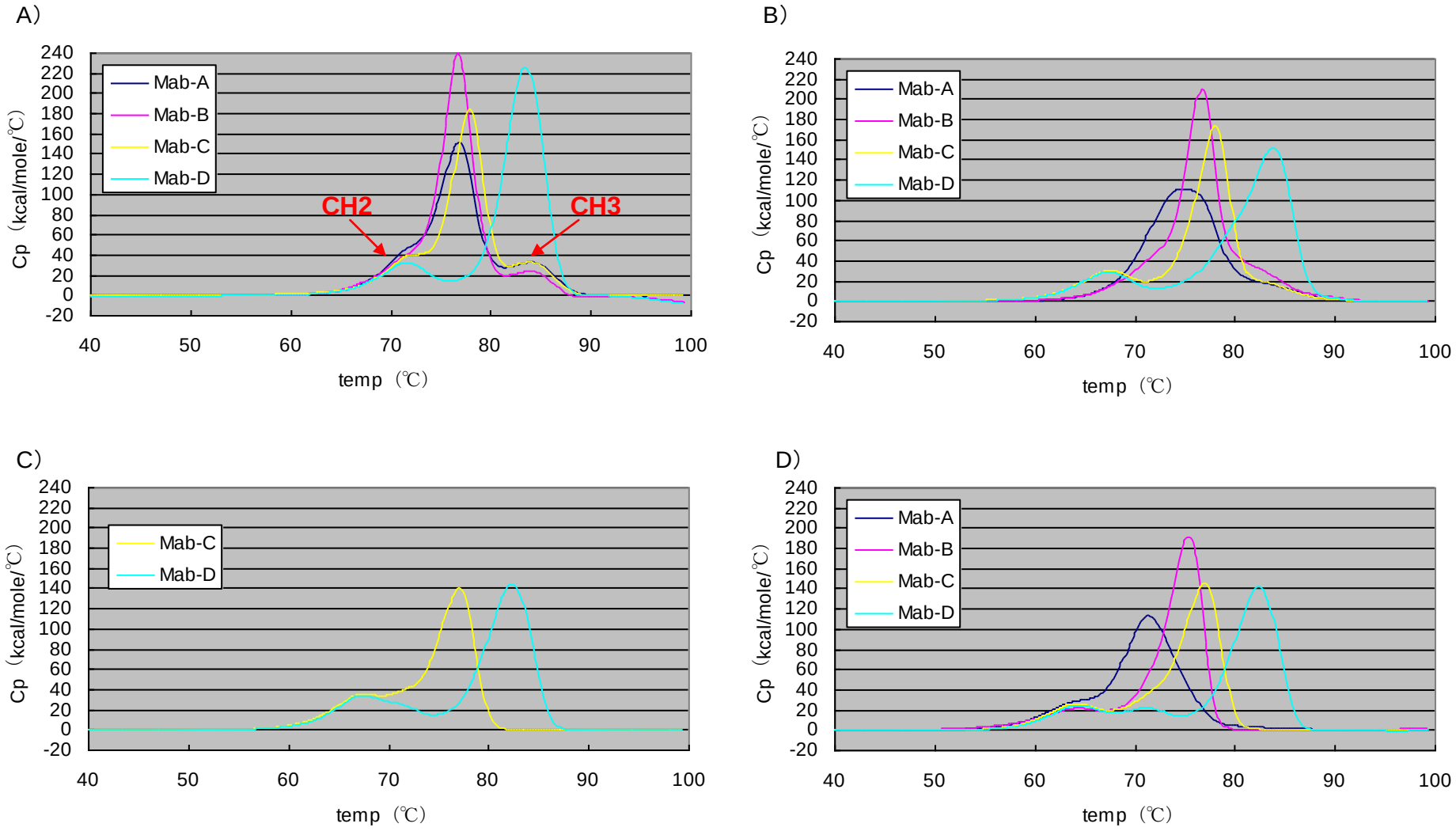


Fig.3-3-1-1　pH5.5 検体の DSC プロファイル　A）IgG1、B）IgG2/IgG2AAAS、C）IgG4、D）IgG4PE

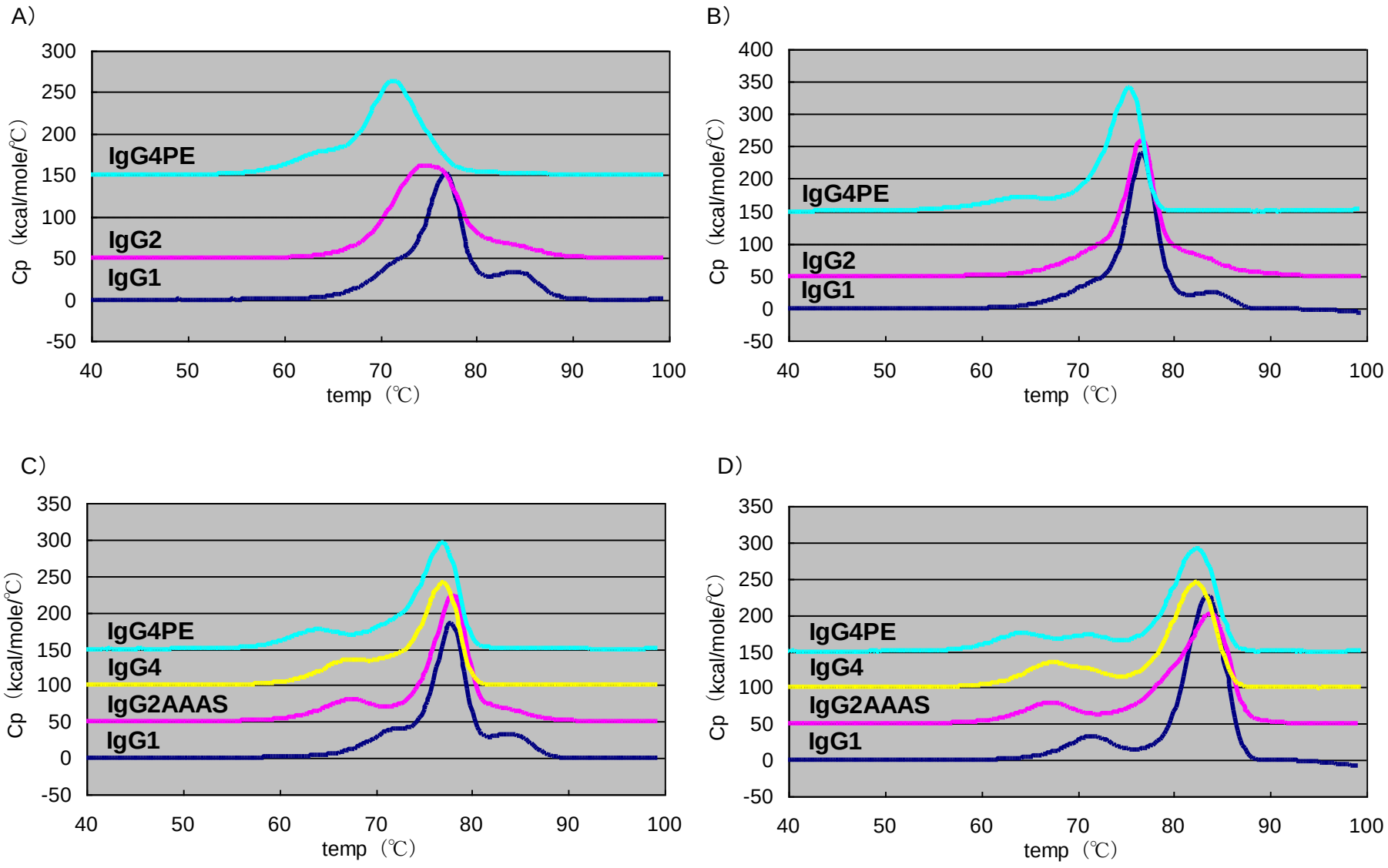


Fig.3-3-1-2　pH5.5 検体 DSC プロファイルのサブクラス比較　A）Mab-A、B）Mab-B、C）Mab-C、D）Mab-D

Table.3-3-1-1　各抗体の Tm

Mab-A

Subclass	domain	Tm (°C)				
		pH 4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	CH2	59.27	69.10	nd	nd	nd
	Fab	71.38	76.01	76.51	76.31	75.49
	CH3	nd	82.98	83.90	83.95	83.89
G2						
	CH2	57.37	nd	nd	nd	nd
	Fab	69.32	75.08	74.73	73.68	74.89
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd
G4PE						
	CH2	51.88	61.19	nd	nd	nd
	Fab	65.75	70.68	71.08	70.94	70.30
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd

nd: Fabピークとの重なりによって検出されなかった。

Mab-B

Subclass	domain	Tm (°C)				
		pH 4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	CH2	59.77	nd	nd	nd	nd
	Fab	73.08	76.76	76.76	76.44	75.92
	CH3	nd	83.92	84.94	84.10	84.07
G2						
	CH2	57.89	68.86	nd	nd	nd
	Fab	72.70	76.50	76.69	76.33	75.71
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd
G4PE						
	CH2	53.35	61.69	64.44	67.31	nd
	Fab	71.82	75.84	75.42	74.30	73.10
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd

nd: Fabピークとの重なりによって検出されなかった。

Mab-C

Subclass	domain	Tm (°C)				
		pH 4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	CH2	60.10	69.41	72.55	73.23	73.72
	Fab	73.91	77.23	77.87	78.05	78.06
	CH3	79.07	83.55	83.88	84.05	84.02
G2AAAS						
	CH2	52.78	64.55	67.73	69.24	70.50
	Fab	72.58	77.19	78.04	77.58	77.99
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd
G4						
	CH2	54.76	64.07	67.40	69.04	69.90
	Fab	71.07	76.55	77.05	76.36	76.06
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd
G4PE						
	CH2	53.77	61.42	64.08	65.79	67.74
	Fab	71.25	76.55	76.90	76.27	75.56
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd

nd: Fabピークとの重なりによって検出されなかった。

Mab-D

Subclass	domain	Tm (°C)				
		pH 4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	CH2	59.86	69.07	71.54	72.85	73.39
	Fab	79.17	83.04	83.51	83.65	83.70
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd
G2AAAS						
	CH2	52.58	64.26	67.38	69.13	70.02
	Fab	80.03	83.23	83.85	83.93	83.67
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd
G4						
	CH2	54.08	64.08	67.39	69.68	70.89
	Fab	74.38	81.55	82.36	82.49	82.20
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd
G4PE						
	CH2	53.26	61.71	64.39	66.27	68.00
	Fab	74.39	81.68	82.35	82.57	82.18
	CH3	nd	nd	nd	nd	nd

nd: Fabピークとの重なりによって検出されなかった。

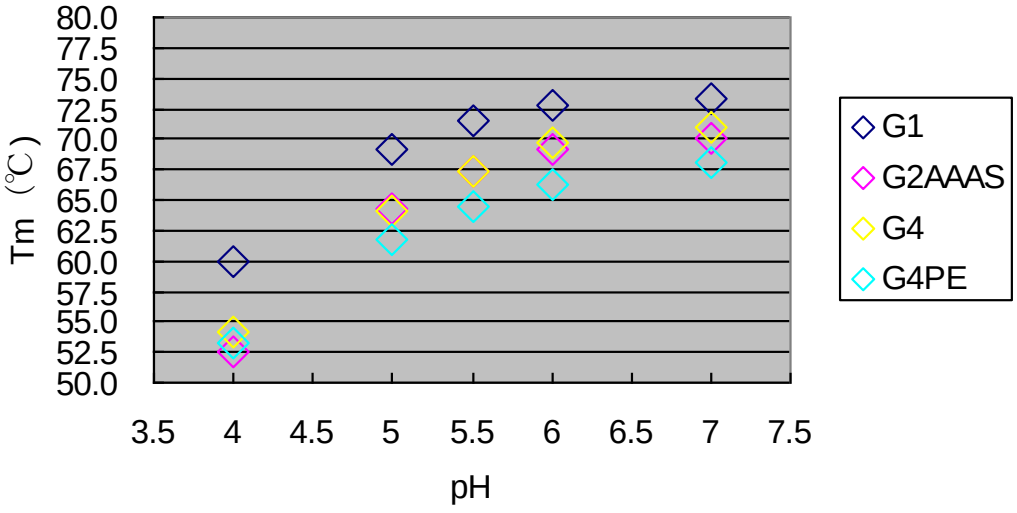


Fig.3-3-1-3　Mab-D の CH2 Tm

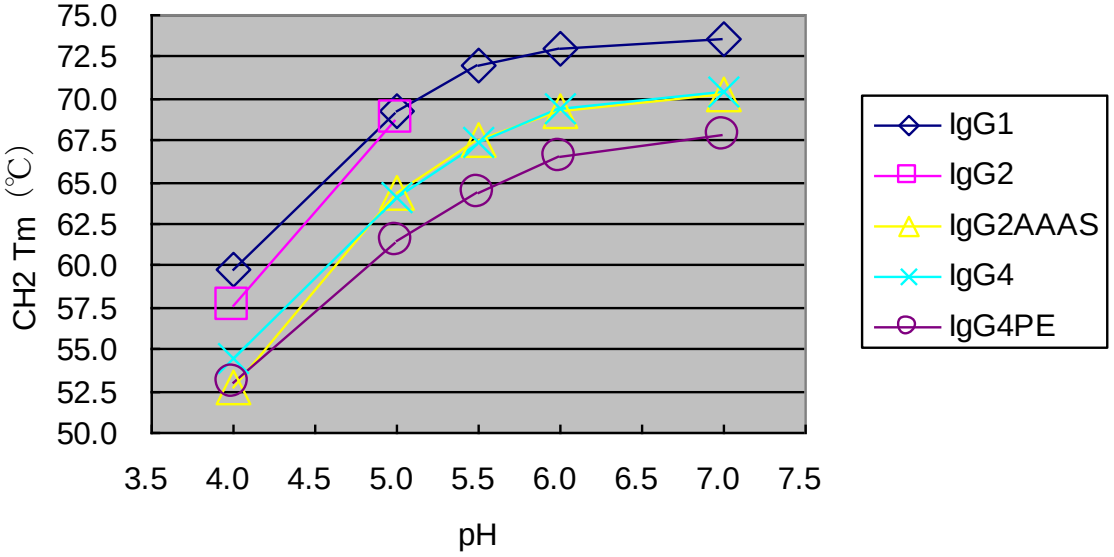


Fig.3-3-1-4　各サブクラス CH2 Tm 平均値

3-3-2.　円偏光二色性スペクトル（CD：Circular Dichroism Spectrometer）

これまでにマウス抗体やヒト化抗体を用いた円偏光二色性（CD）スペクトルの報告[4, 27]はあるが、その多くは IgG1 である。本研究では完全ヒト抗体である Mab-A、マウス - ヒトキメラ抗体である Mab-C およびヒト化抗体である Mab-D について円偏光二色性スペクトル（CD）を用い、Far-UV CD スペクトル、昇温スペクトル分析を実施し、各サブクラスの二次構造および熱による構造変化（unfolding）を評価した。

＜Mab-A の場合＞

Mab-A の全てのサブクラスについて、pH4.0、5.0、6.0 検体の 25℃から 100℃までの昇温スペクトル、昇温前後の Far-UV スペクトルを比較した。

＜Mab-A Far-UV CD スペクトル（昇温前）＞

各サブクラス検体の Far-UV スペクトルを測定した結果を Fig.3-3-2-1 に示した。全ての pH において、全てのスペクトルで 217 nm 付近に負の極大を持つスペクトルが得られ、サブクラスごとに二次構造に差異は認められなかった。この極大波長はβ-sheet を反映しており、全てのサブクラス検体でβ-sheet rich な構造を有していることが確認された。この結果はこれまでの抗体の CD スペクトルの報告と同様の結果である[4, 27]。また pH4.0、5.0、6.0 の違いは二次構造には影響はなかった。

＜Mab-A　Far 昇温スペクトル＞

Mab-A の各サブクラスは 217nm 付近に極大波長を持つことが明らかとなったため、昇温分析では 217nm のシグナルを指標として二次構造変化を追跡した。また昇温前後で Far-UV スペクトルを測定し、昇温分析前後の二次構造の変化も評価した。

各 pH 検体で得られた昇温スペクトルを Fig.3-3-2-2 に示した。

昇温スペクトルを比較すると、pH ごとにサブクラス間で違いが認められた。全ての pH で各サブクラスとも 50℃以降でシグナルの変化が認められ、温度上昇に伴い負のシグナル上昇が確認され、これまでに報告されている抗体の昇温スペクトルと概ね同様の傾向を示した[4, 27]。以下に

各 pH で認められた変化の詳細を記す。

○pH4.0

各サブクラスとも 25℃から 50℃付近まではシグナルに変化が認められなかった。約 50℃付近よりモル楕円率の減少が開始され、その開始温度は IgG4PE＜IgG2＜IgG1 の順序であり、IgG4PE で低温での変化度合いが大きかった。また IgG1 では 50～70℃と 70～80℃、IgG2 では 50℃～65℃と 65～80℃、IgG4PE は 50～60℃と 60～75℃の 2 ステップの変性曲線が得られた。構造の崩れは IgG4PE で IgG1、IgG2 に比べ、早い傾向が認められた。モル楕円率の変化率についても違いが認められた。すべてのサブクラス、きれいなシグモイド型の変性スペクトルを示し、IgG1 は約 82℃付近で－7000（deg/M/cm/res）、IgG2 は約 82℃付近で－7500（deg/M/cm/res）IgG4PE は約 75℃付近でそれぞれ－8000,（deg/M/cm/res）の極小を示した後、温度上昇に伴い増加し、最終的に－6000（deg/M/cm/res）に達した。

昇温後のスペクトルを Fig.3-3-2-3 に示した。スペクトルを比較すると、全てのサブクラスで同等のスペクトルを示し、200～240nm で昇温前のスペクトルに比べて分子楕円率の減少が認められた。また昇温前では極小値が 217nm に認められていたのが昇温後は低波長側にシフトしており、可溶性重合体（Soluble Aggregation）形成による見かけの二次構造の増加が示唆された。また 206.5nm のモル楕円率の減少はランダムコイルの増加に起因すると考えられる [28]。更に 230nm の分子楕円率の減少も認められ、これはトリプトファン残基（Trp）の露出を示唆するものであり、四次構造が変化していると考えられた [29]。

○pH5.0

概ね pH4.0 と同様の傾向を示した。各サブクラスとも 25℃から 55℃付近まではシグナルに変化が認められなかった。約 60℃付近よりモル楕円率の減少が開始され、その開始温度は IgG4PE＜IgG2＜IgG1 の順序であり、IgG4PE で低温での変化度合いが大きかった。また全てのサブクラスで 60～78℃と 78～85℃の 2 ステップの変性曲線が得られた。その様子は IgG4PE で IgG1、IgG2 に比べ、早い傾向が認められた。モル楕円率の変化率についても違いが認められた。 IgG1 は約－9000（deg/M/cm/res）で極小に達したのに対し、IgG2 および IgG4PE は－9500（deg/M/cm/res）の極小を示し、その変化率は若干であるが IgG1 に比べ大きかった。

昇温後のスペクトルを比較すると、200～240nm で昇温前のスペクトルに比べて分子楕円率の

減少が認められ、その変化率は IgG1 に比べ IgG2 および IgG4PE で大きかった。pH4.0 の時と同様、極小値が低波長側にシフトしており、分子楕円率の減少が大きいほど低波長側へのシフトの大きさも大きかった。

○pH6.0

全てのサブクラスで約 60～70℃の範囲でモル楕円率の減少が開始され、温度上昇に伴い負のシグナル増加が促進された。シグナル変化を比較すると IgG4PE は、IgG1 や IgG2 に比べ低い温度での構造変化の度合いが大きく、約 73℃付近から急激な正のシグナル上昇が確認され、85℃以降では約－3000（deg/M/cm/res）で一定値を示した。IgG2 も IgG4 同様、約 82℃付近から急激な正のシグナル上昇が確認された。一方、IgG1 はシグモイド曲線に似た曲線を示して約－9500（deg/M/cm/res）平衡に達した。分析終了後、セルを確認すると IgG2 および IgG4PE 検体では白色の沈殿が溶液中に認められたが、IgG1 では全く沈殿は認められなかった。またホトマル電圧もシグナルと呼応するように上昇しており、これらシグナルの上昇は昇温分析中に凝集形成を起こし沈殿が生じたためと推察された。

昇温後のスペクトルを比較すると、IgG1 では 200～240nm で昇温前のスペクトルに比べ分子楕円率の減少が認められた。IgG1 は約 210nm に極小値がシフトし、pH4.0、5.0 に比べ分子楕円率の低下は大きかった。これに対し IgG2 および IgG4PE は抗体のスペクトルがほとんど消失した。これは上述の通り、IgG2 および IgG4PE は昇温途中での凝集形成により溶液中の抗体がほとんど沈殿したためと考えられた。

＜Mab-C の場合＞

Mab-C の全てのサブクラスについて、Mab-A 同様、pH4.0、5.0、6.0 検体の 25℃から 100℃までの昇温スペクトル、昇温前後の Far-UV スペクトルを比較した。

＜Mab-C Far-UV CD スペクトル（昇温前）＞

各サブクラス検体の Far-UV スペクトルを測定した結果を Fig.3-3-2-4 に示した。Mab-A 同様、全ての pH において、全てのスペクトルで 217 nm 付近に負の極大を持つスペクトルが得られ、サブクラスごとに二次構造に差異は認められなかった。この極大波長はβ-sheet を反映しており、全てのサブクラス検体でβ-sheet rich な構造を有していることが確認された。また改変体でも野

生型と同等のスペクトルを示したことから、導入したアミノ酸改変は二次構造に大きな影響を与えていないことも示唆された。また pH4.0、5.0、6.0 の違いは二次構造には影響はなかった。

＜Mab-C Far 昇温スペクトル＞

Mab-C の各サブクラスは 217nm 付近に極大波長を持つことが明らかとなったため、昇温分析では 217nm のシグナルを指標として二次構造変化を追跡した。また昇温前後で Far-UV スペクトルを測定し、昇温分析前後の二次構造の変化も評価した。各 pH 検体で得られた昇温スペクトルを Fig.3-3-2-5 に示した。

昇温スペクトルを比較すると、pH ごとにサブクラス間で違いが認められた。また IgG4 と IgG4PE の野生型と改変体のスペクトルは概ね一致しており、二次構造の変化は同じであると推測された。全ての pH で各サブクラスとも 50℃以降でシグナルの変化が認められ、温度上昇に伴い負のシグナル上昇が確認された。以下に各 pH で認められた変化の詳細を記す。

○pH4.0

各サブクラスとも 25℃から 50℃付近まではシグナルに変化が認められなかった。約 55℃付近よりモル楕円率の減少が開始され、その開始温度は IgG4（IgG4PE）＜IgG2AAAS＜IgG1 の順序であり、IgG4 および IgG4PE で低温での変化度合いが大きかった。また全てのサブクラスで 55～65℃と 65～80℃の 2 ステップの変性曲線が得られた。その様子は IgG4 および IgG4PE で IgG1、IgG2AAAS に比べ、顕著であった。モル楕円率の変化率についても違いが認められた。IgG1 はきれいなシグモイド型の変性スペクトルを示し、約－6000（deg/M/cm/res）で平衡に達したのに対し、IgG2AAAS および IgG4（IgG4PE）は約 77℃付近でそれぞれ－7000,－7500（deg/M/cm/res）の極小を示した後、温度上昇に伴い最終的に－6000（deg/M/cm/res）に達した。

昇温後のスペクトルを Fig.3-3-2-6 に示した。スペクトルを比較すると、全てのサブクラスで同等のスペクトルを示し、200～240nm で昇温前のスペクトルに比べて分子楕円率の減少が認められた。また昇温前では極小値が 217nm に認められていたのが昇温後は低波長側にシフトしており、可溶性重合体（Soluble Aggregation）形成による見かけの二次構造の増加が示唆された。また 230nm の分子楕円率の減少はトリプトファン残基（Trp）の露出を示唆するものであった。

○pH5.0

概ね pH4.0 と同様の傾向を示した。各サブクラスとも 25℃から 50℃付近まではシグナルに変化が認められなかった。約 55℃付近よりモル楕円率の減少が開始され、その開始温度は IgG4（IgG4PE）＜IgG2AAAS＜IgG1 の順序であり、IgG4 および IgG4PE で低温での変化度合いが大きかった。また全てのサブクラスで 55～70℃と 70～85℃の 2 ステップの変性曲線が得られた。その様子は IgG4 および IgG4PE で IgG1、IgG2AAAS に比べ、顕著であった。モル楕円率の変化率についても違いが認められた。IgG1 は約－8000（deg/M/cm/res）で平衡に達したのに対し、IgG2AAAS および IgG4（IgG4PE）はそれぞれ－9000,－10000（deg/M/cm/res）の極小を示し、その変化率は IgG1 に比べ大きかった。

昇温後のスペクトルを比較すると、200～240nm で昇温前のスペクトルに比べて分子楕円率の減少が認められ、その変化率は IgG1 に比べ IgG2AAAS および IgG4（IgG4PE）で大きかった。pH4.0 の時と同様、極小値が低波長側にシフトしており、分子楕円率の減少が大きいほど低波長側へのシフトの大きさも大きかった。

○pH6.0

各サブクラスとも 60 から 70℃の範囲でモル楕円率の減少が開始され、温度上昇に伴い負のシグナル増加が促進された。シグナル変化を比較すると IgG4 は、IgG1 や IgG2AAAS に比べ低い温度での構造変化の度合いが大きかった。IgG1、IgG2AAAS はシグモイド曲線に似た曲線を示して約－9000（deg/M/cm/res）平衡に達したのに対し、IgG4 および IgG4PE は 70℃後半付近で急激な正のシグナル上昇が確認された。分析終了後、セルを確認すると IgG4 および IgG4PE 検体では白色の沈殿が溶液中に認められた。IgG2AAAS も僅かであるが白色の沈殿が認められたが、IgG1 では全く沈殿は認められなかった。またホトマル電圧もシグナルと呼応するように上昇しており、これらシグナルの上昇は昇温分析中に凝集形成を起こし沈殿が生じたためと推察された。

昇温後のスペクトルを比較すると、IgG1 および IgG2AAAS では 200～240nm で昇温前のスペクトルに比べ分子楕円率の減少が認められた。IgG1 は約 210nm に極小値がシフトし、pH4.0、5.0 に比べ分子楕円率の低下は大きかった。これに対し IgG4 および IgG4PE は抗体のスペクトルがほとんど消失した。これは上述の通り、IgG4 および IgG4PE は昇温途中での凝集形成により溶液中の抗体がほとんど沈殿したためと考えられた。

＜Mab-D の場合＞

Mab-D の全てのサブクラスについて、Mab-A、Mab-C 同様、pH4.0、pH5.0、pH6.0 検体の 25℃から 100℃までの昇温スペクトル、昇温前後の Far-UV スペクトルを比較した。

＜Mab-D Far-UV CD スペクトル（昇温前）＞

各サブクラス検体の Far-UV スペクトルを測定した結果を Fig.3-3-2-7 に示した。昇温前の CD スペクトルは全ての pH において、全てのスペクトルで 217 nm 付近に負の極大を持つスペクトルが得られ、サブクラスごとに二次構造に差異は認められず、Mab-A、Mab-C の結果と同じであった。

<Mab-D Far-UV 昇温スペクトル＞

Mab-A、Mab-C 同様に 217nm のシグナルを指標として二次構造変化を追跡し、昇温前後の二次構造変化も評価した。各 pH 検体で得られた昇温スペクトルを Fig.3-3-2-8 に示した。昇温スペクトルを比較すると、Mab-A、Mab-D 同様に pH ごとでサブクラスに違いが認められたが、その傾向は他の抗体と同じであった。以下に各 pH で認められた変化の詳細を記した。

<u>○pH4.0</u>

各サブクラスとも 25℃から 50℃付近まではシグナルに変化が認められなかった。約 55℃付近よりモル楕円率の減少が開始され、その開始温度は IgG4（IgG4PE）＜IgG2AAAS＜IgG1 の順序であり、IgG4 および IgG4PE で低温での変化度合いが大きかった。また全てのサブクラスで 55～65℃と 65～80℃の 2 ステップの変性曲線が得られた。その様子は IgG4 および IgG4PE で IgG1、IgG2AAAS に比べ、顕著であった。モル楕円率の変化率についても違いが認められた。IgG1 はきれいなシグモイド型の変性スペクトルを示し、約－6000（deg/M/cm/res）で平衡に達したのに対し、IgG2AAAS および IgG4（IgG4PE）は約 80℃付近でそれぞれ－6000、－7500（deg/M/cm/res）の極小を示した後、温度上昇に伴い最終的に－6000（deg/M/cm/res）に達した。

昇温後のスペクトルを Fig.3-3-2-9 に示した。スペクトルを比較すると、全てのサブクラスで同様のスペクトルを示し、200～240nm で昇温前のスペクトルに比べて分子楕円率の減少が認められた。しかしながら IgG1 は他のサブクラスに比べて減少率が小さかった。また昇温前では極小値が 217nm に認められていたのが昇温後は低波長側にシフトしており、可溶性重合体（Soluble

Aggregation）形成による見かけの二次構造の増加が示唆された。また 230nm の分子楕円率の減少はトリプトファン残基（Trp）の露出を示唆するものであった。

○pH5.0

概ね pH4.0 と同様の傾向を示した。各サブクラスとも 25℃から 50℃付近まではシグナルに変化が認められなかった。約 55℃付近よりモル楕円率の減少が開始され、その開始温度は IgG4（IgG4PE）＜IgG2AAAS＜IgG1 の順序であり、IgG4 および IgG4PE で低温での変化度合いが大きかった。また全てのサブクラスで 55～77℃と 77～90℃の 2 ステップの変性曲線が得られた。その様子は IgG4 および IgG4PE で IgG1、IgG2AAAS に比べ、顕著であった。モル楕円率の変化率についても違いが認められた。IgG1 は約－7000（deg/M/cm/res）で平衡に達したのに対し、IgG2AAAS および IgG4（IgG4PE）はそれぞれ 90℃付近で－8000,－8500（deg/M/cm/res）の極小を示し、その変化率は IgG1 に比べ大きかった。

昇温後のスペクトルを比較すると、200～240nm で昇温前のスペクトルに比べて分子楕円率の減少が認められ、その変化率は IgG1 に比べ IgG2AAAS および IgG4（IgG4PE）で大きかった。pH4.0 の時と同様、極小値が低波長側にシフトしており、分子楕円率の減少が大きいほど低波長側へのシフトの大きさも大きかった。

○pH6.0

各サブクラスとも 60 から 70℃の範囲でモル楕円率の減少が開始され、温度上昇に伴い負のシグナル増加が促進された。シグナル変化を比較すると IgG4 は、IgG1 や IgG2AAAS に比べ低い温度での構造変化の度合いが大きかった。IgG1 はシグモイド曲線に似た曲線を示して約－6500（deg/M/cm/res）平衡に達したのに対し、IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE は 80～85℃付近で急激な正のシグナル上昇が確認された。上述の通り、昇温途中で凝集形成を起こし沈殿が生じたためであり、凝集開始温度は IgG2AAAS に比べ IgG4 および IgG4PE で早かった。IgG4 と IgG4PE で差は認められなかった。

昇温後のスペクトルを比較すると、IgG1 および IgG2AAAS では 200～240nm で昇温前のスペクトルに比べ分子楕円率の減少が認められた。IgG1 は約 210nm に極小値がシフトし、pH4.0、5.0 に比べ分子楕円率の低下は大きかった。これに対し IgG4 および IgG4PE は抗体のスペクトルがほとんど消失した。これは上述の通り、IgG4 および IgG4PE は昇温途中での凝集形成により溶

液中の抗体がほとんど沈殿したためと考えられた。

3 つの抗体の測定結果を比較すると、シグナルの変化は 3 つの抗体で概ね同じ傾向を示した。1 ステップ目の昇温スペクトルは各 pH において 3 つの抗体で概ね一致しており、IgG4（IgG4PE）は IgG1 や IgG2（IgG2AAAS）に比べ低い温度での構造変化の度合いが大きかった。この構造変化は定常領域の構造変化と考えられ、可変領域の違いに関わらず同様の構造変化が起きていることが確認できた。その後の 2 ステップ目の構造変化は Mab-A および Mab-C に比べて Mab-D で高温側にシフトした。2 ステップ目の構造変化は Fab の構造変化に起因しており、Mab-D の Fab Tm（3-3-1. DSC 結果参照）が Mab-A や Mab-C の Fab Tm に比べて高いため、構造変化が高温側にシフトしたと考えられ妥当な結果であった。pH6.0 検体において、Mab-C では確認されなかったが、Mab-A および Mab-D では IgG2（IgG2AAAS）でも凝集形成による沈殿が確認された。凝集開始は DSC プロファイルとの比較から Fab の構造変化終了と共に開始している。Mab-A、Mab-C、Mab-D で同じサブクラスにおける凝集開始温度には違いが認められることから、可変領域の構造（アミノ酸配列）、ドメイン間相互作用が大きく影響していることが示唆された。上記の結果より、昇温前は全ての pH において、各サブクラス全て一致するスペクトルを示したが、昇温後では各サブクラスでその特徴は異なる傾向を示した。昇温スペクトルの比較より全ての pH で CD スペクトルが IgG4（IgG4PE）＜IgG2（IgG2AAAS）＜IgG1 の順に低温へシフトしており、構造の変化は IgG4（IgG4PE）＜IgG2（IgG2AAAS）＜IgG1 の順で早く、IgG4 および IgG4PE の構造の崩れやすさが顕著であった。また pH4.0 や pH5.0 での分子楕円率の変化量が IgG1 に比べて IgG2 および IgG2AAAS や IgG4 および IgG4PE で大きいこと、pH6.0 では IgG2 および IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE では昇温途中で凝集形成による沈殿が確認されたことから、同条件下における構造安定性は IgG1 で最も高く、IgG4 で最も悪いことが示唆された。

<u>DSC の結果との考察</u>

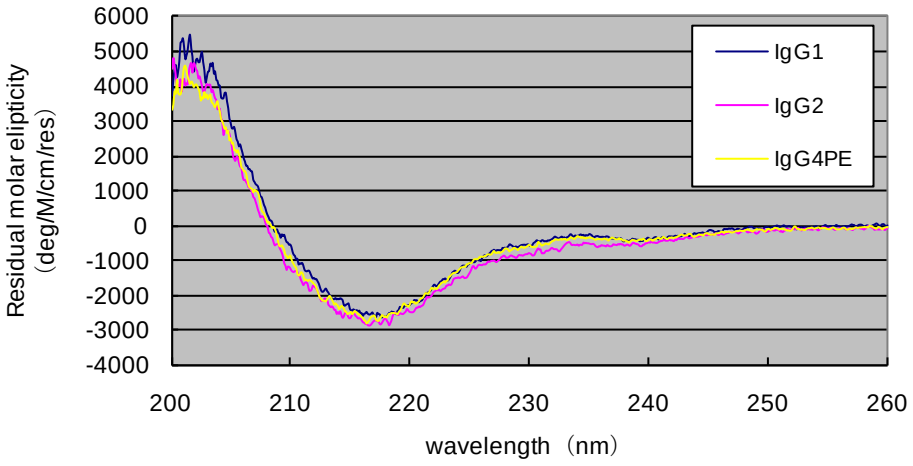
Mab-C および Mab-D の pH4.0、5.0、6.0 の検体について DSC で得られたプロファイルと比較した。その結果を Fig.3-3-2-10～15 に示した。CD で得られた二次構造変化の曲線は DSC プロファイルと重ね合わせると、構造変化の度合いが、DSC で認められた各ドメインの変性ピークと概ね一致しており、二次構造の変化がどのドメインに帰属するものか予想することができた。

pH4.0 において 40～65℃の CD 昇温スペクトルを比較すると IgG1 および IgG2AAAS では僅か

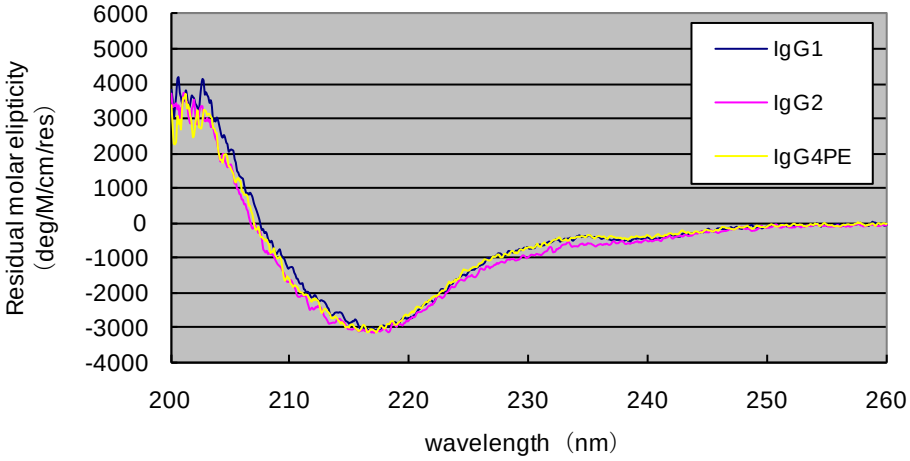
に変化するに留まるのに対し、IgG4 および IgG4PE ではその構造変化は大きかった。DSC のプロファイルから IgG1 および IgG2AAAS ではこの温度領域で CH2 ドメインの変性ピークしか確認されないのに対し、IgG4 および IgG4PE では CH2 に加え CH3 ドメインの変性ピークも確認され、すでに Fc 領域全体がアンフォールディング（熱変性）していると考えられる。このため、IgG4 および IgG4PE では二次構造の変化が IgG1 や IgG2AAA に比べ、大きく、低温度で生じたと推察される。また 2 ステップ目の構造変化も IgG1 および IgG2AAAS では Fab および CH3 ドメインの構造変化、IgG4 および IgG4PE は Fab の構造変化と一致した。IgG2AAAS、IgG4 および IgG4PE では Fab のアンフォールディング後、DSC では可溶性重合形成（凝集形成）の傾向が認められた。CD でも 2 ステップ目の構造変化後、分子楕円率の緩やかな上昇が確認され、二次構造が変化していると考えられ、可溶性重合形成に起因するものと推察された。また昇温途中で凝集形成が認められた IgG4 および IgG4PE の pH6.0 検体の比較では、DSC プロファイルの Fab を含むメインピークの変性が終了した温度からシグナル上昇が開始された。これより IgG4 および IgG4PE で認められた凝集形成は、Fab 断片の二次構造変化が終了し、露出した疎水性表面による疎水性相互などにより促進されたと考えられる。

全体を通して、CH2 ドメインの変性における二次構造の変化は小さく、二次構造の変化は Fab 断片および CH3 の変性で大きいことが示唆された。また DSC プロファイルと比較すると、構造変化の変性曲線の温度プロファイルは良く一致しており、2 状態変移の最初の変化はおそらく Fc の CH2 ドメインに起因する構造変化と推察され、各サブクラスの構造安定性は CH2 ドメインの構造安定性に大きく関与していると考えられる。

A）



B）



C）

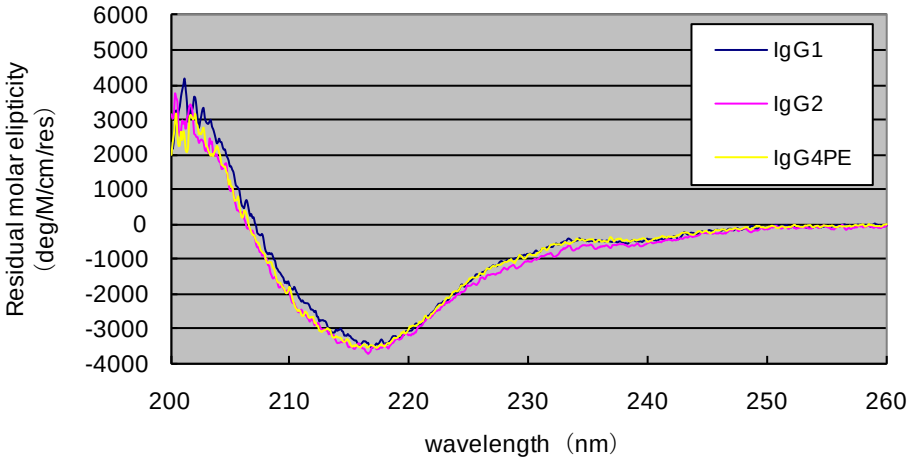
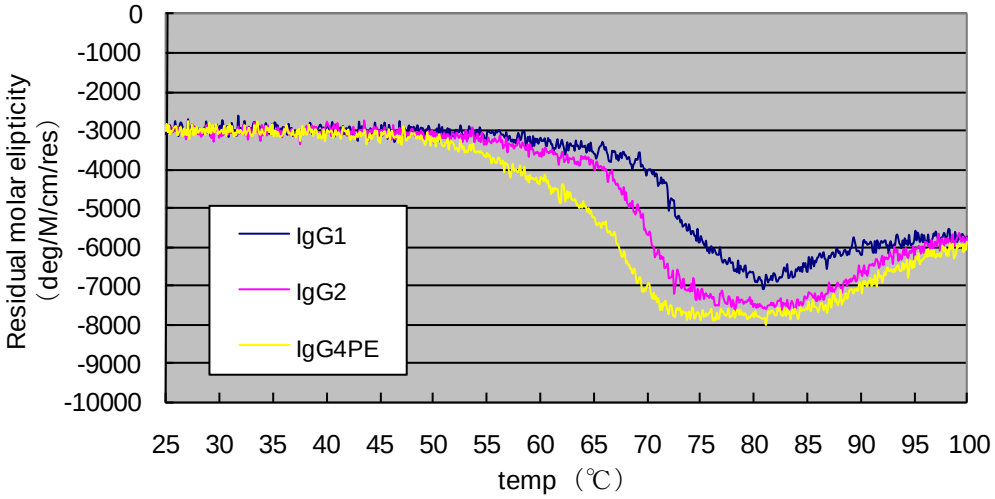
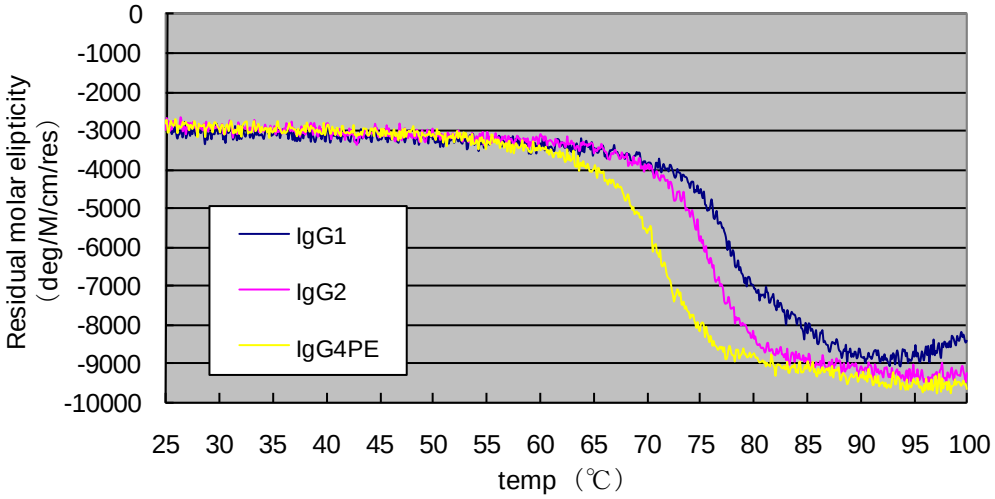


Fig.3-3-2-1　Mab-A Far UV CD スペクトル（昇温前）A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

A）



B）



C）

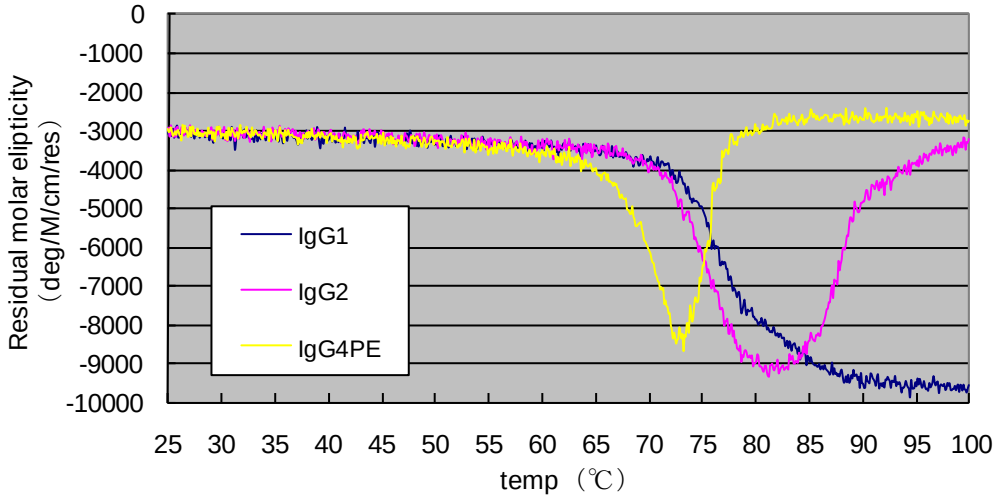


Fig.3-3-2-2　Mab-A 昇温スペクトル　A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

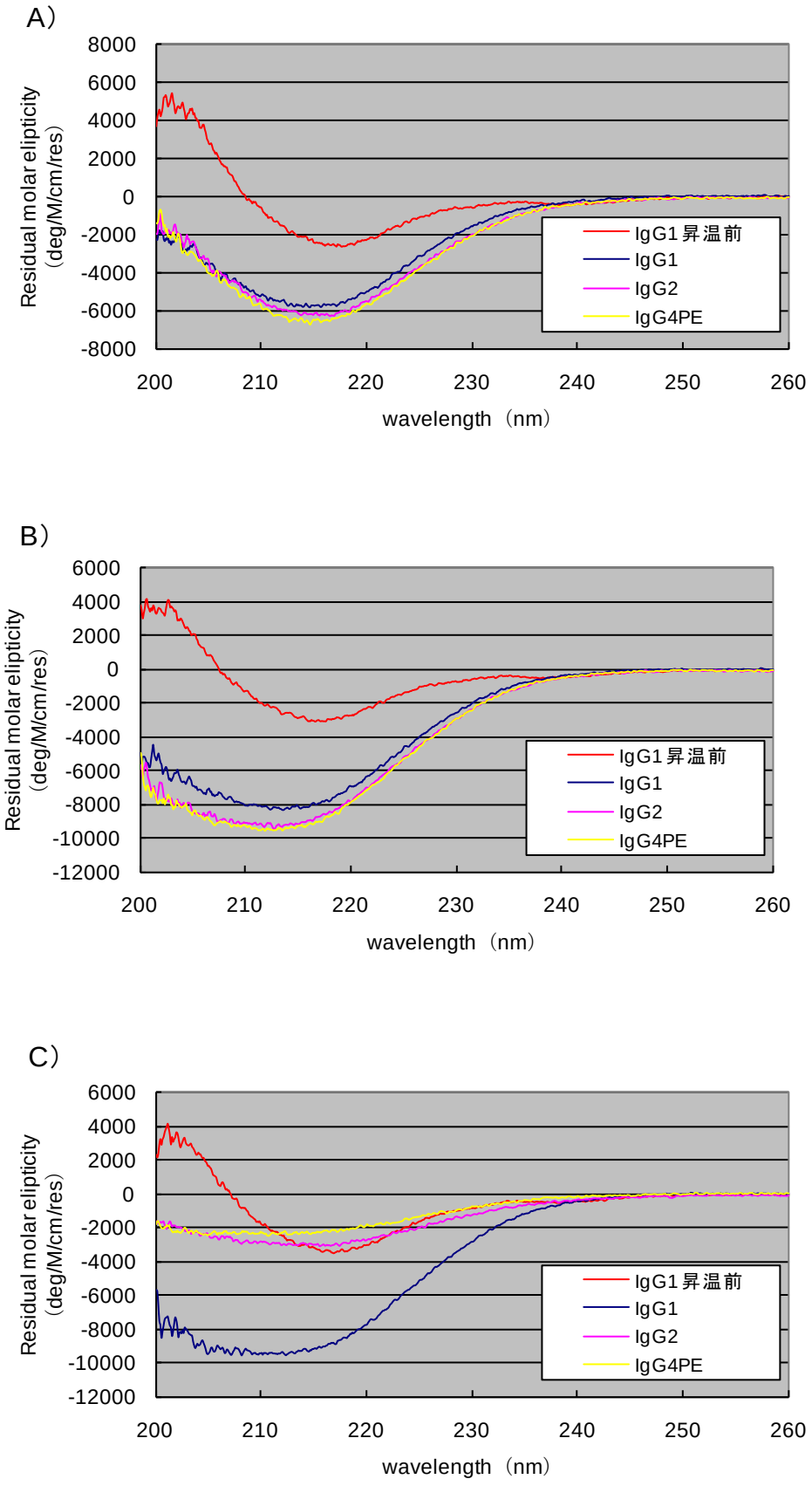
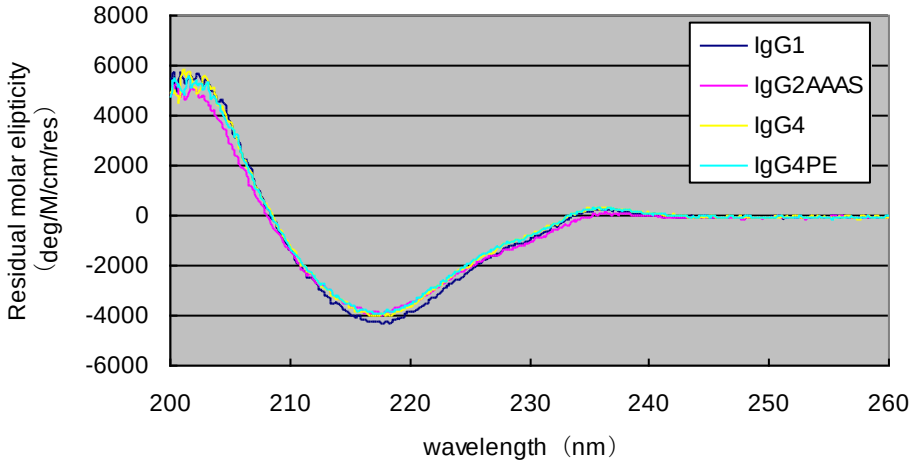
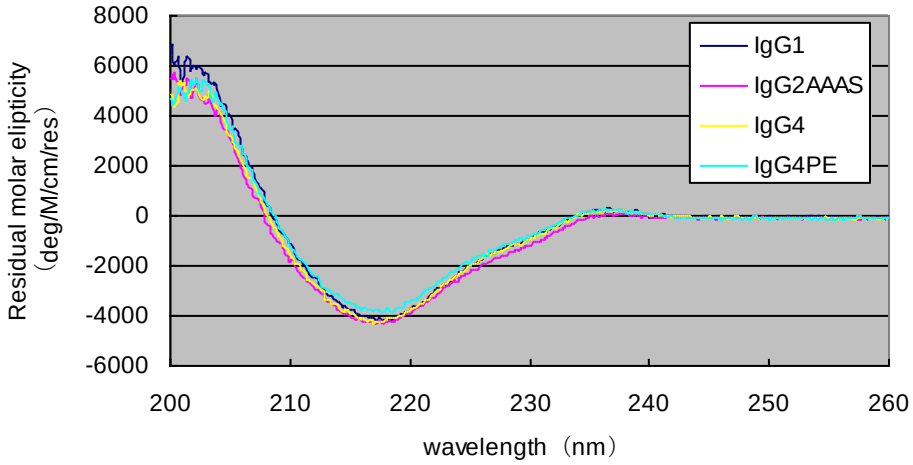


Fig.3-3-2-3　Mab-A Far UV CD スペクトル（昇温後）　A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

A）



B）



C）

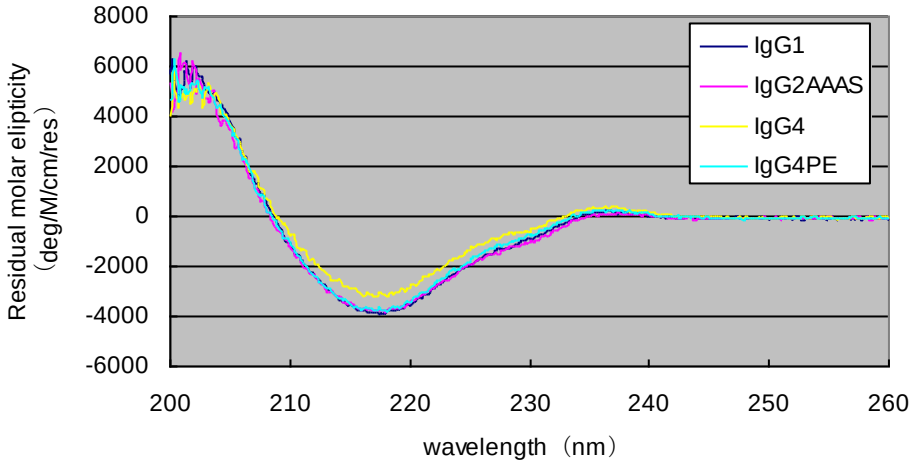


Fig.3-3-2-4　Mab-C Far CD スペクトル（昇温前）　A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

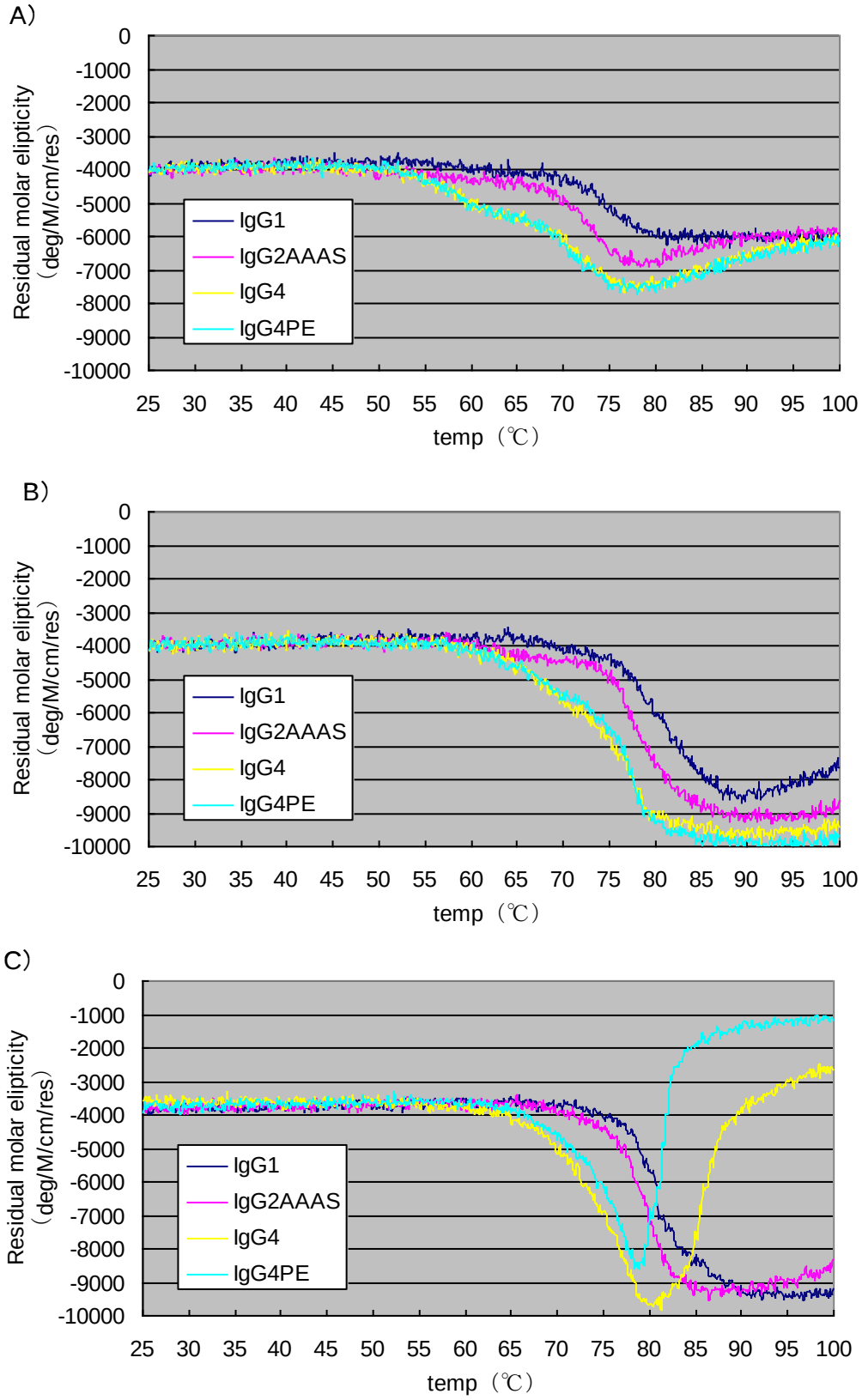
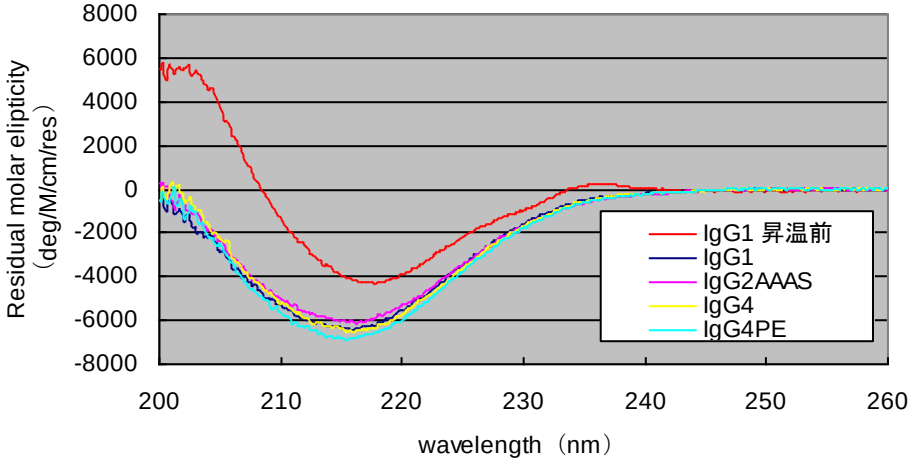
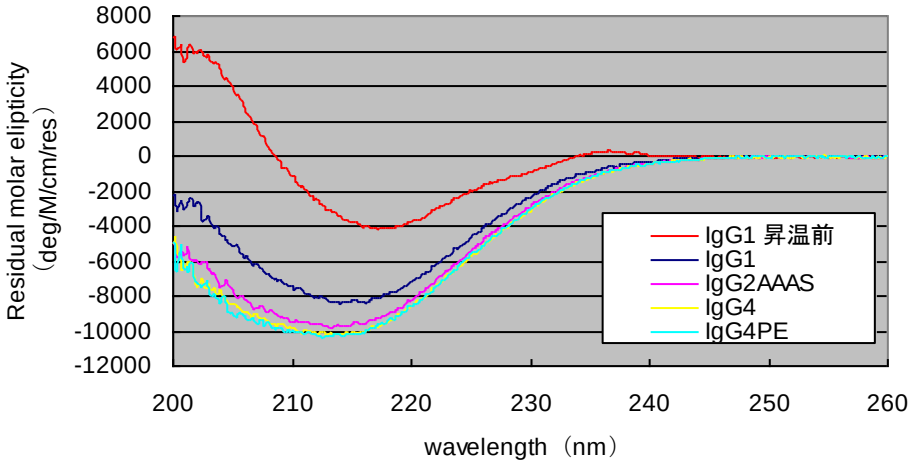


Fig.3-3-2-5　Mab-C 昇温スペクトル　A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

A）



B）



C）

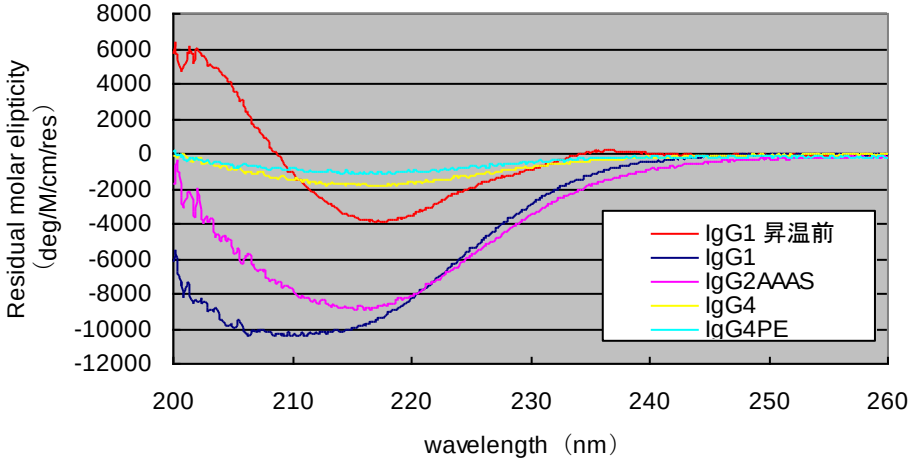
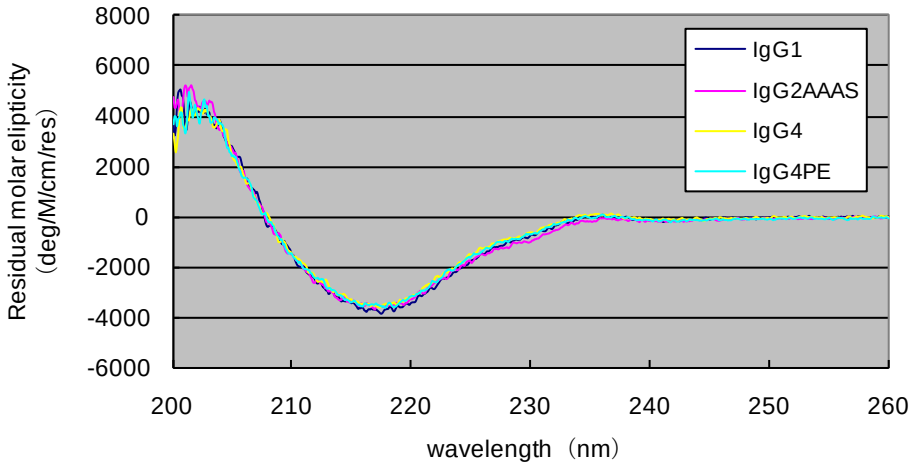
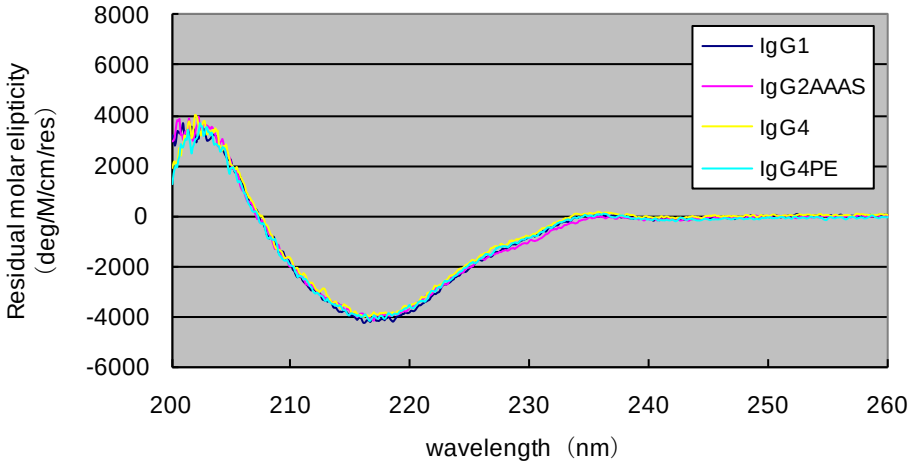


Fig.3-3-2-6　Mab-C Far UV CD スペクトル（昇温後）

A）



B）



C）

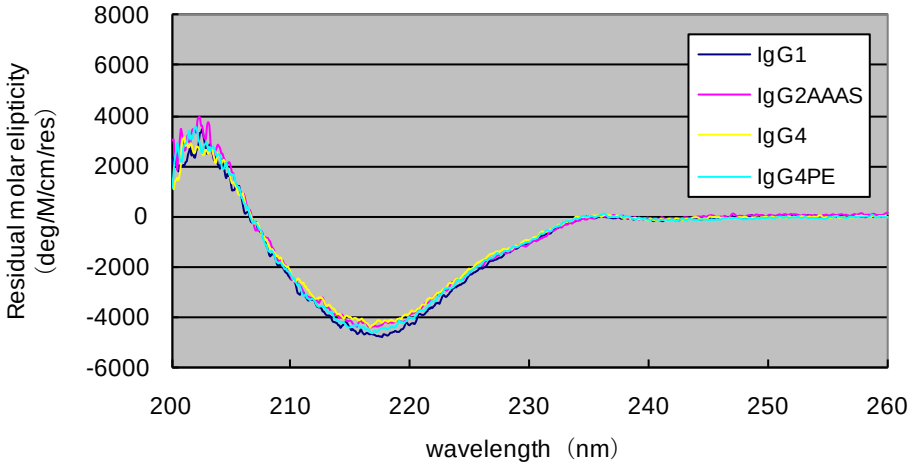
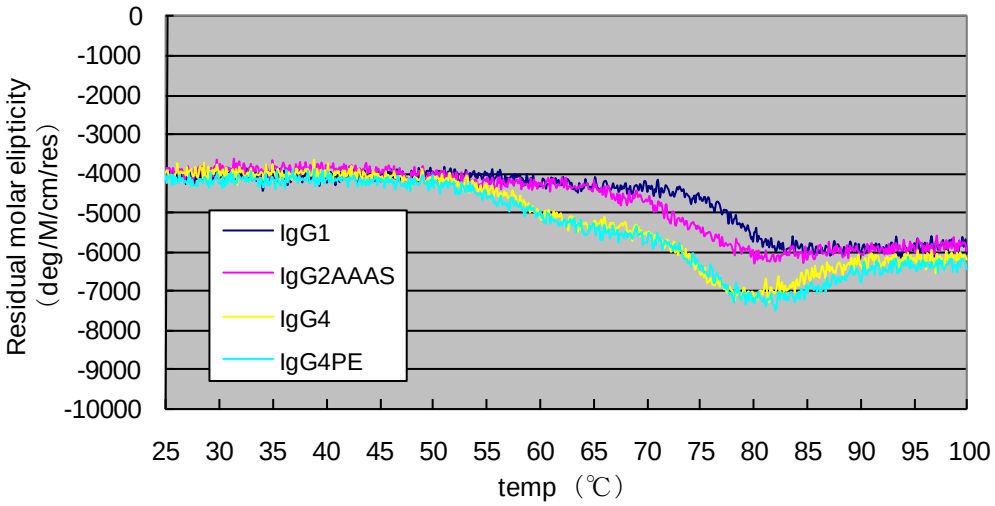
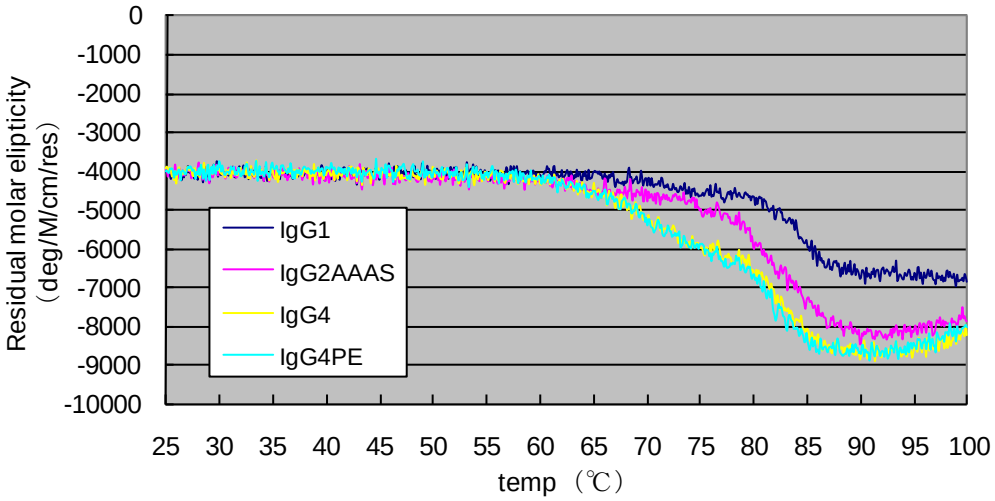


Fig.3-3-2-7 Mab-D Far UV CD スペクトル（昇温前）　A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

A）



B）



C）

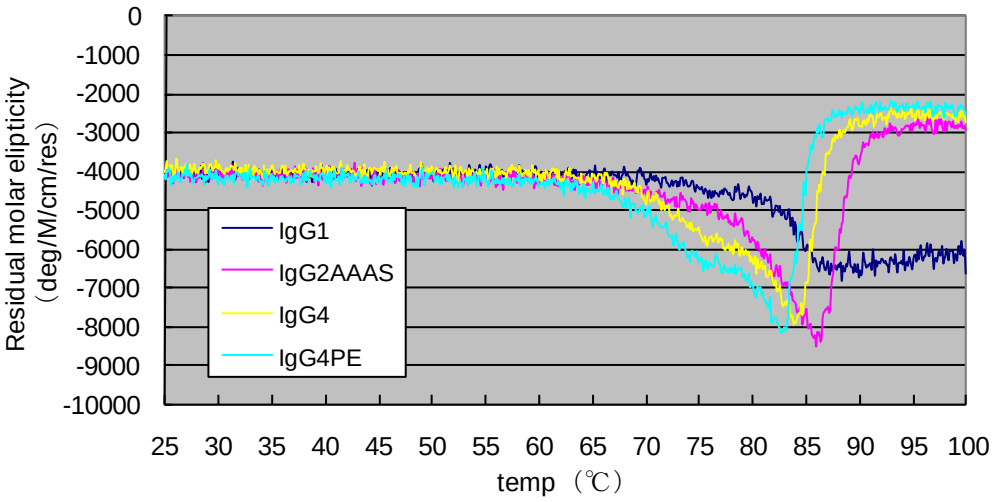
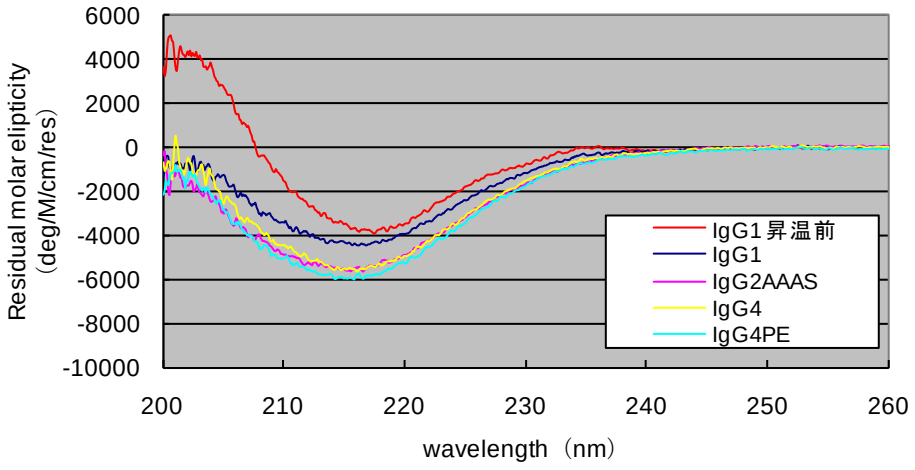
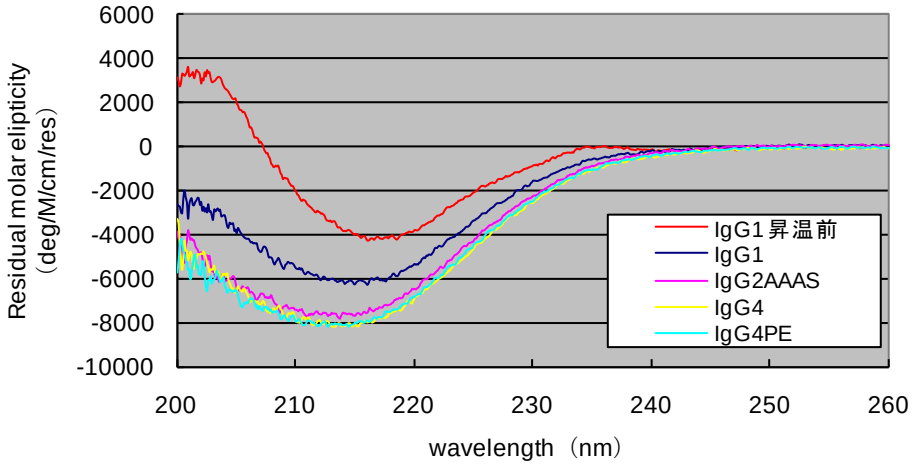


Fig.3-3-2-8 Mab-D 昇温スペクトル　A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

A）



B）



C）

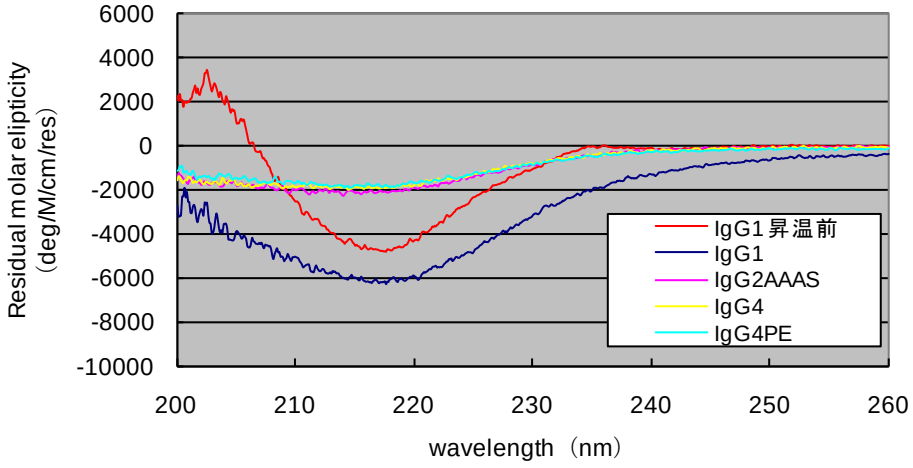


Fig.3-3-2-9 Mab-D　Far UV CD スペクトル（昇温後）A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH6.0

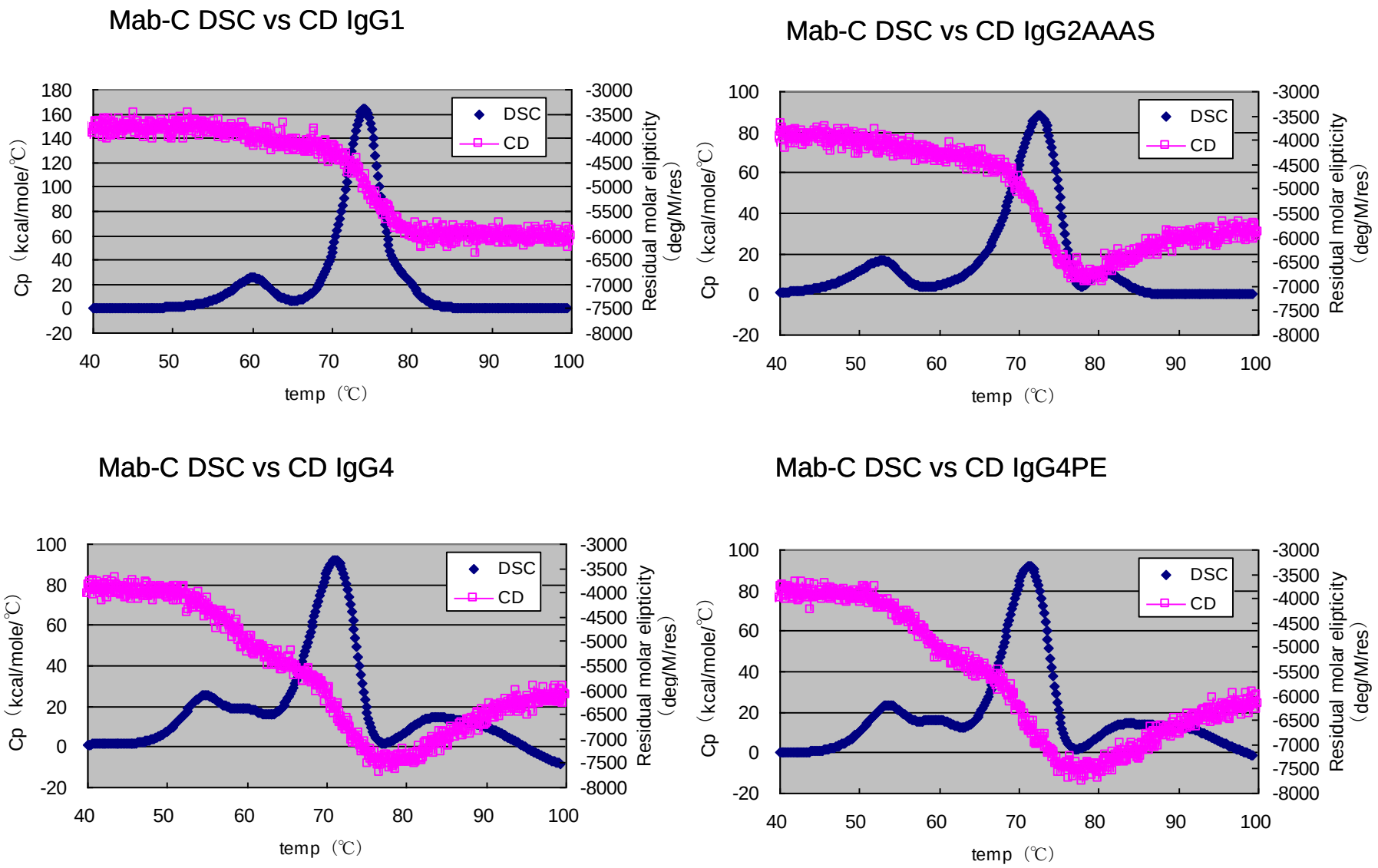


Fig.3-3-2-10　Mab-C pH4.0 DSC と CD プロファイル比較

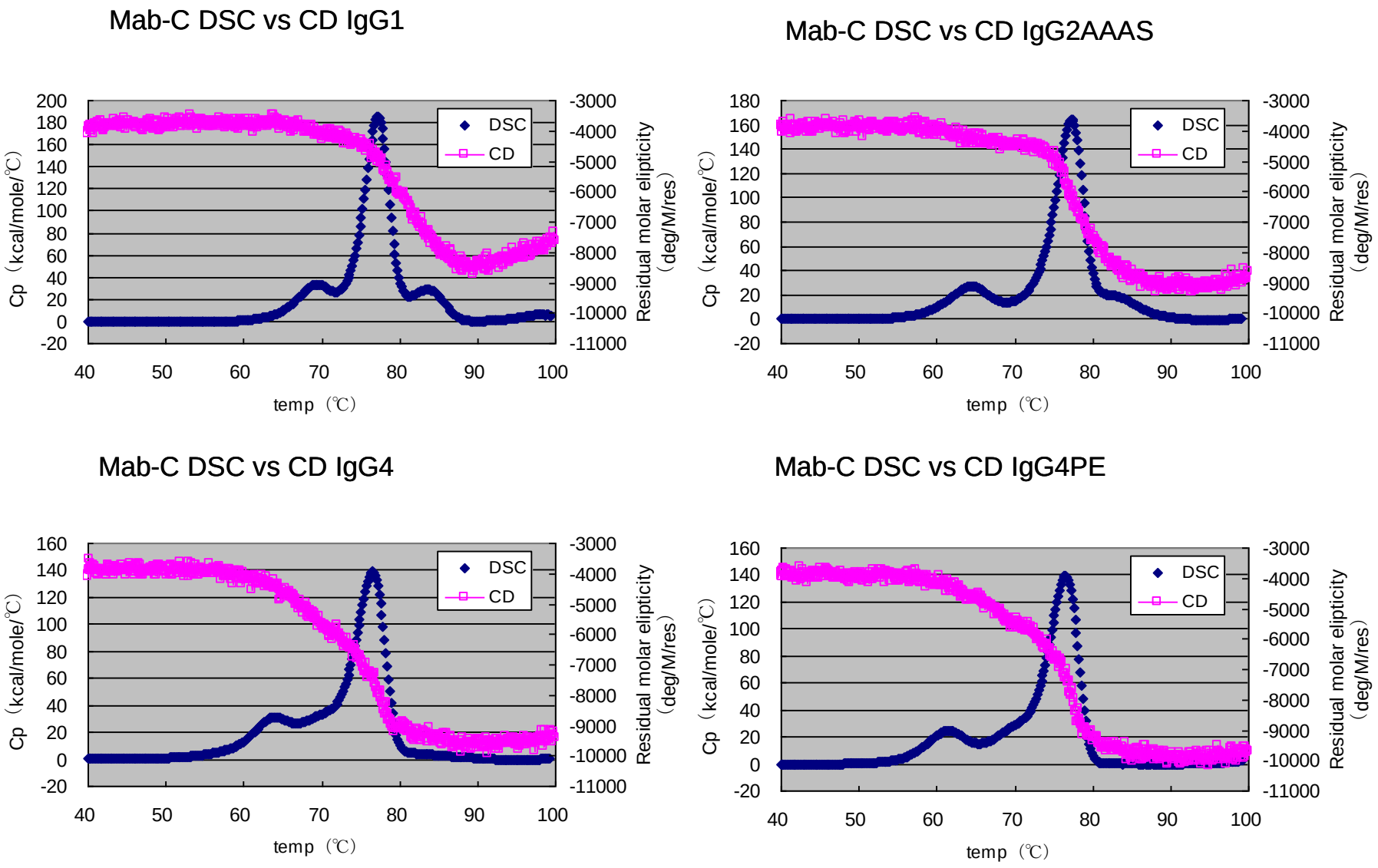


Fig.3-3-2-11　Mab-C pH5.0 DSC と CD プロファイル比較

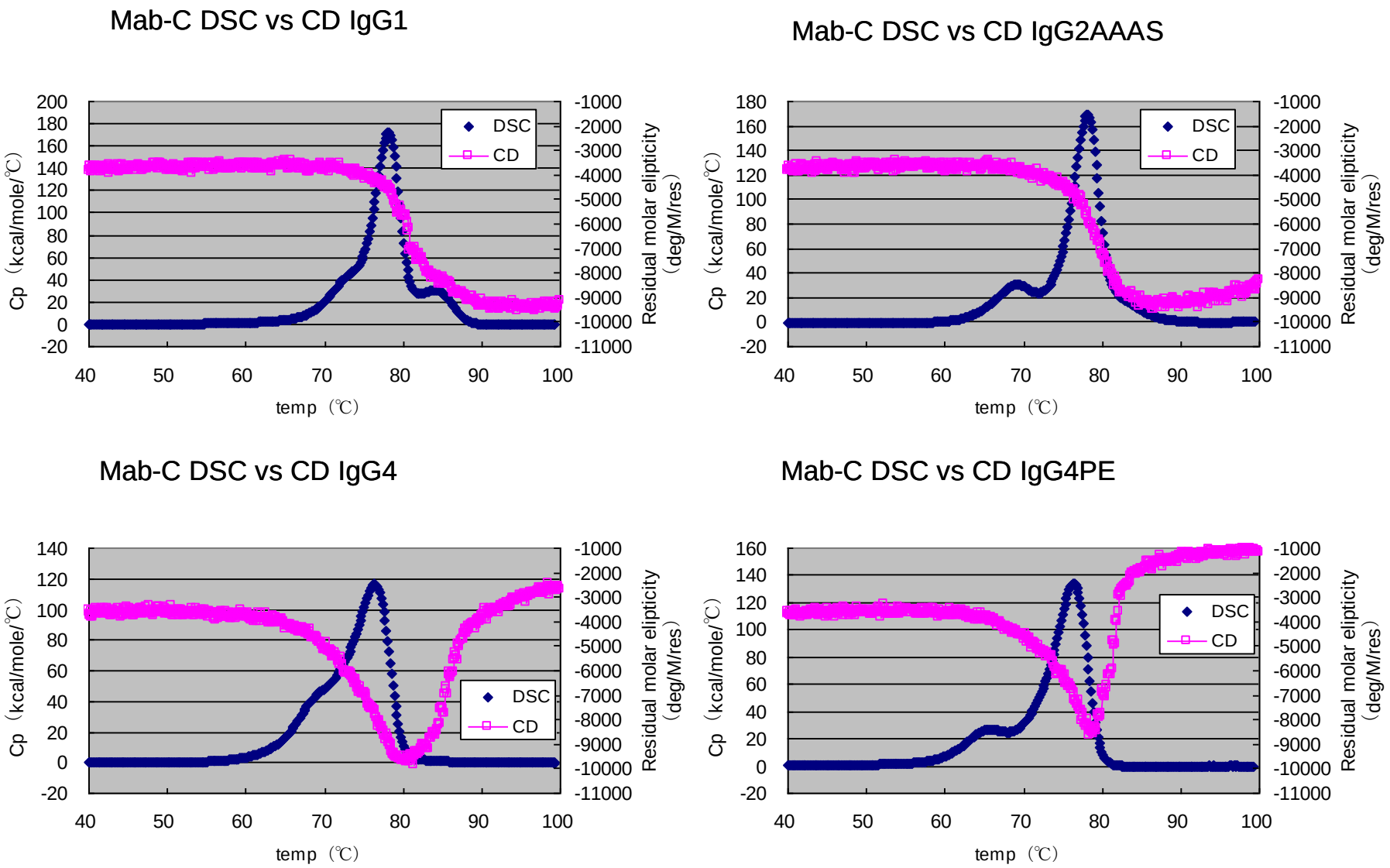


Fig.3-3-2-12　Mab-C pH6.0 DSC と CD プロファイル比較

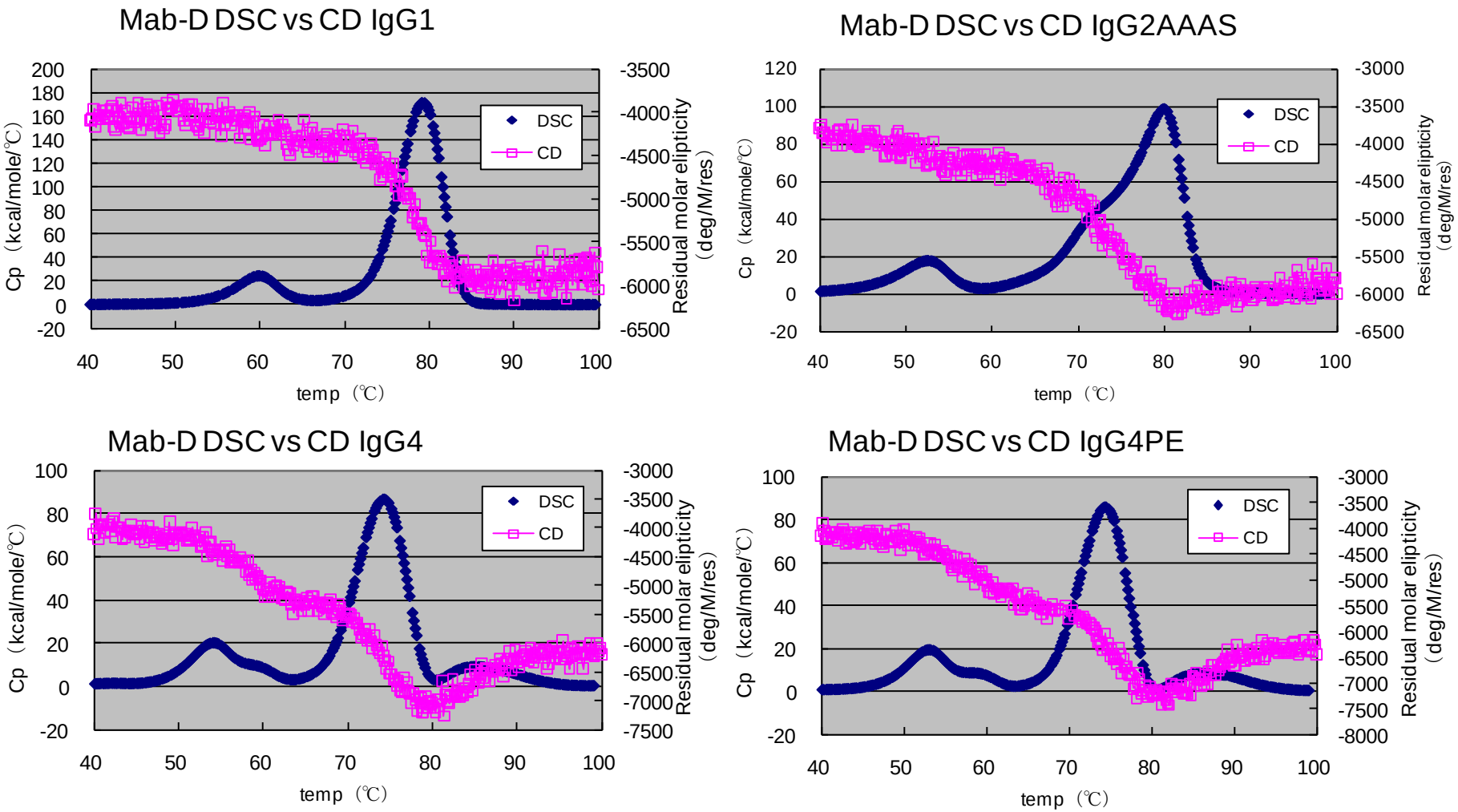
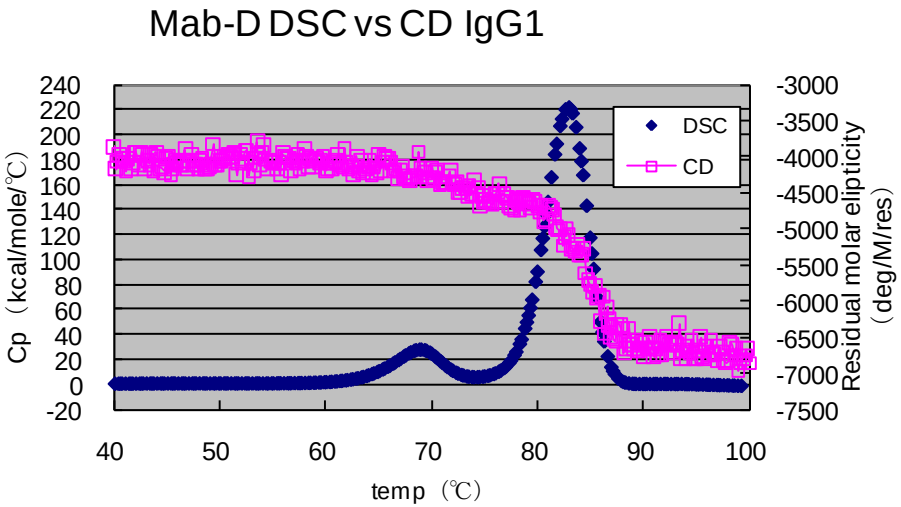
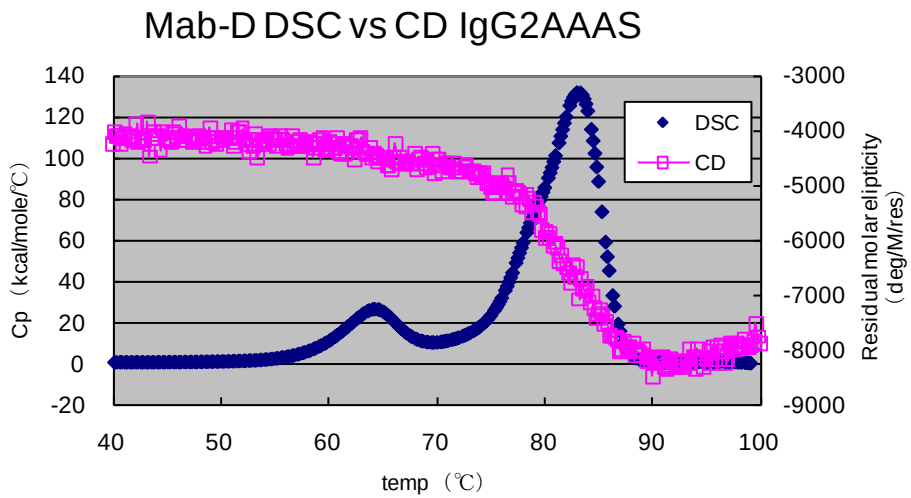
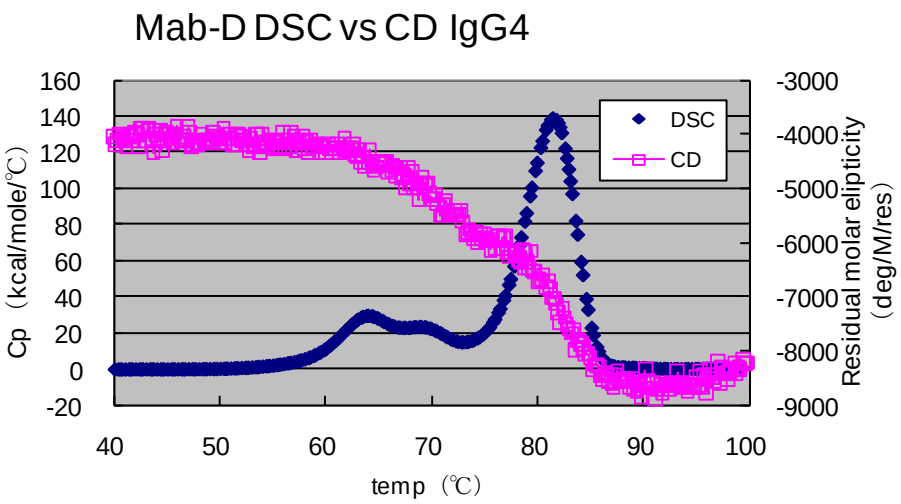


Fig.3-3-2-13　Mab-D pH4.0　DSC と CD プロファイル比較


Mab-D DSC vs CD IgG1
Cp（kcal/mole/℃）
Residual molar elipticity（deg/M/res）
temp（℃）
DSC
CD


Mab-D DSC vs CD IgG2AAAS
Cp（kcal/mole/℃）
Residual molar elipticity（deg/M/res）
temp（℃）
DSC
CD


Mab-D DSC vs CD IgG4
Cp（kcal/mole/℃）
Residual molar elipticity（deg/M/res）
temp（℃）
DSC
CD

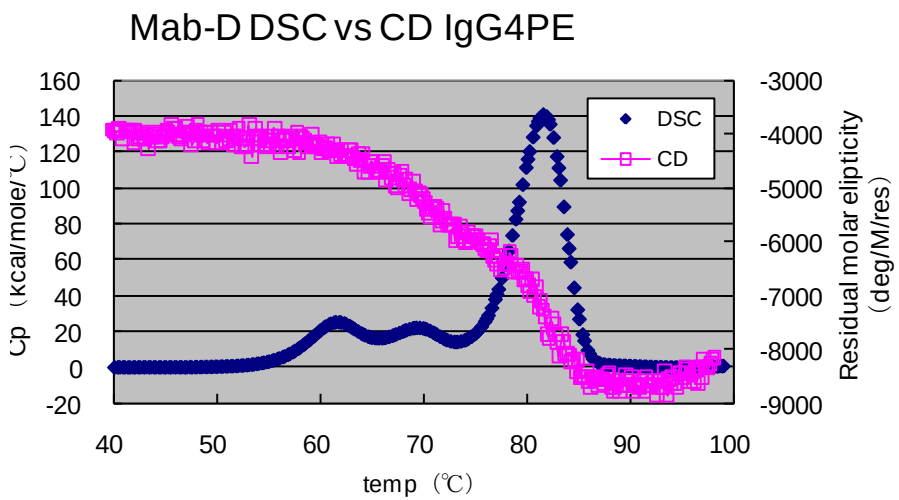

Mab-D DSC vs CD IgG4PE
Cp（kcal/mole/℃）
Residual molar elipticity（deg/M/res）
temp（℃）
DSC
CD

Fig.3-3-2-14　Mab-D pH5.0 DSC と CD プロファイル比較

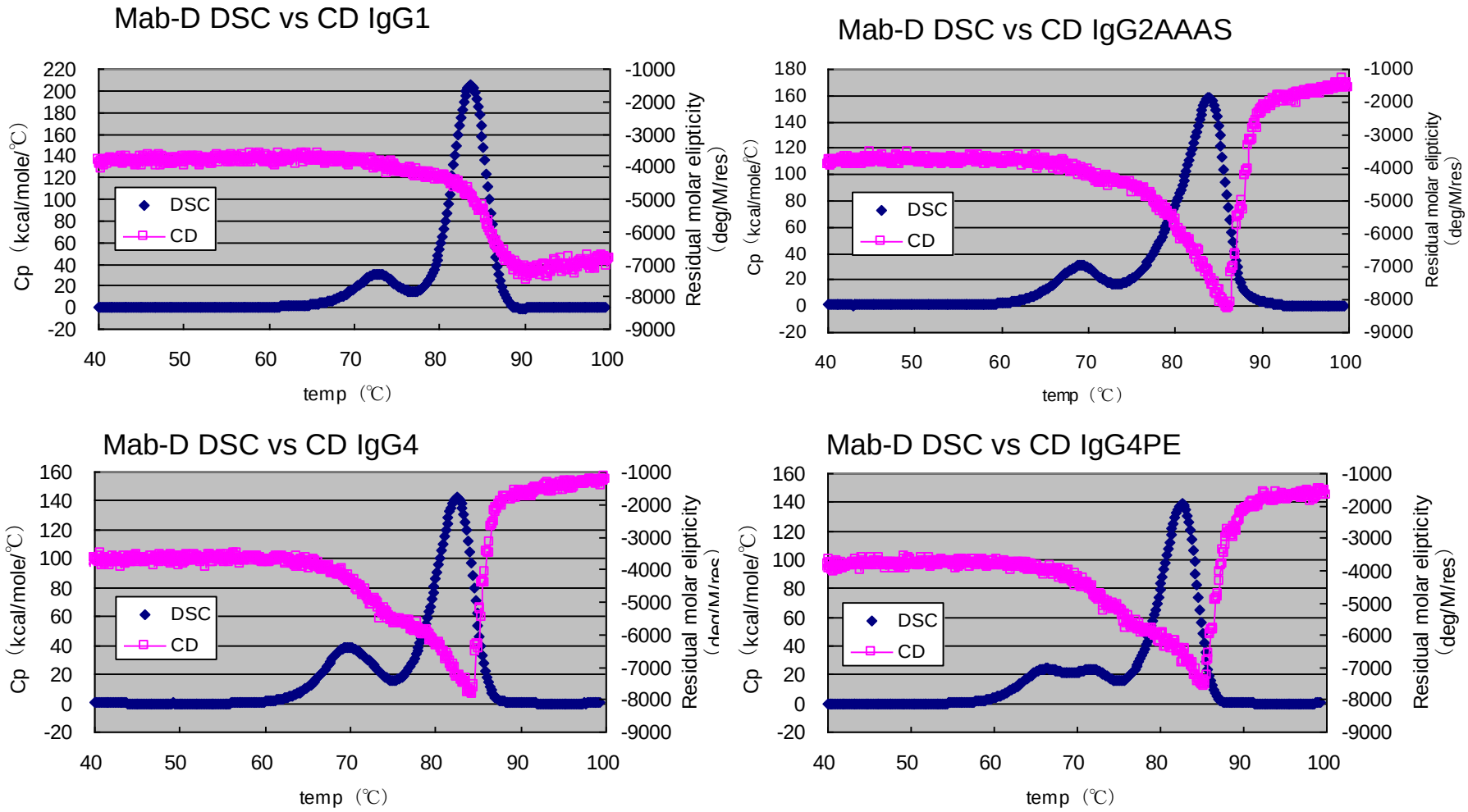


Fig.3-3-2-15　Mab-D pH6.0 DSC と CD プロファイル比較

3-3-3.　示差走査型蛍光分析（DSF：Differential scanning fluorescence）

各サブクラス、概ね 2 段階の変性曲線が得られ、熱変性による疎水面の露出に関する構造変化は 2 段階であることが示唆され、これまで報告されている抗体の DSF の結果と同様の結果を示した [16, 20]。全ての抗体で 50℃から 60℃の間で蛍光強度の増加が始まり、70℃から 80℃で最大の蛍光強度を示し、その後、蛍光強度の低下（クエンチング）が認められた。DSC の結果から熱変性による各ドメインの構造変化に呼応していると考えられ、条件によっては構造変化が同時に起こり、プロファイルが重なって 1 段階のピークになったと考えられる。得られたプロファイルを解析ソフト（Bio-Rad CFX Manager, Ver.1.6）を用い変性温度を算出した。1 段階目の変性温度を Tm1、2 段階目の変性温度を Tm2 とし、Table.3-3-3-1 にまとめた。各抗体について詳細を以下にまとめた。

<u>Mab-A</u>

Mab-A 各サブクラス（IgG1, IgG2, IgG4PE）の各 pH（4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0）の検体について評価を行った。Fig.3-3-3-1（A）に pH5.5 検体の蛍光プロファイルを示した。全てのサブクラスで概ね 2 段階変移の曲線が得られたが、IgG1、IgG2 の pH5.0～7.0 は 1 段階変移を示しており、1 段階および 2 段階の変移が重なったためと推察される。IgG1 と IgG2 の蛍光プロファイルは全ての pH で概ね一致したが、IgG4PE は IgG1 および IgG2 に比べプロファイル自身が大きく低温側にシフトし、より低温側で構造変化が開始していることが示唆された。pH5.5 検体では IgG1 および IgG2 は 77℃付近、IgG4PE は約 73℃付近より蛍光強度の低下（クエンチング）が認められた。1 段階目の構造変化を比較すると IgG1、IgG2 で約 60℃、IgG4PE で約 50℃から変化し始め、IgG1、IgG2 で IgG4PE に比較して高かった。変性温度の比較では、Tm1 は IgG1 と IgG2 が同じ 69.5℃であり、IgG4PE は 61.0℃と IgG1、IgG2 に比べて大きく低下した。

また各サブクラス、pH の影響を評価したところ全てのサブクラスで Tm1 において、中性 pH で最も高く、pH 低下に伴い変性温度の低下傾向が認められた。特に pH4.0 では全てのサブクラスで pH5.0 から pH7.0 のプロファイルに比べて大きく低下した。また Tm2 は IgG1 および IgG2 の pH6.0 および 7.0 検体については算出できなかった。得られた Tm2 は Tm1 同様、pH 低下に伴い変性温度の低下傾向が認められた。

Mab-B

Mab-B 各サブクラス（IgG1, IgG2, IgG4PE）の各 pH（4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0）の検体について評価を行った。Fig.3-3-3-1（B）に pH5.5 検体の蛍光プロファイルを示した。IgG1、IgG2 は 1 段階変移（わずかながらショルダーが認められ 2 段階ともいえる）、IgG4 は 2 段階変移曲線が得られ、77℃付近より蛍光強度の低下（クエンチング）が認められた。蛍光プロファイルを比較すると Mab-A 同様、IgG1、IgG2 の蛍光プロファイルはほぼ一致し、IgG4PE で大きく低温へのシフトが確認された。1 段階目の構造変化を比較すると IgG1、IgG2 で約 60℃、IgG4PE で約 50℃と IgG1、IgG2 で IgG4PE に比較して高かった。変性温度の比較では、Tm1 は IgG1 と IgG2 が同じ 69℃であり、IgG4PE は 60.5℃と IgG1、IgG2 に比べて大きく低下し、Mab-A の値とほぼ一致する傾向が認められた。

また各サブクラス、pH の影響を評価したところ全てのサブクラスで Tm1 において、中性 pH で最も高く、pH 低下に伴い変性温度の低下傾向が認められた。また全てのサブクラスで Tm1 の値はほぼ Mab-A と一致した。また Tm2 は全てのサブクラスにおいて pH5.0～5.5 で最も高い傾向を示した。

Mab-C

Mab-C 各サブクラス（IgG1, IgG2AAAS, IgG4, IgG4PE）の各 pH（4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0）の検体について評価を行った。Fig.3-3-3-1（C）に pH5.5 検体の蛍光プロファイルを示した。pH5.5 の検体の蛍光プロファイルを比較したところ、全てのサブクラスで 50℃付近より蛍光強度の増加が始まり、2 段階変移の曲線を描き、80℃付近より蛍光強度の低下（クエンチング）が認められた。蛍光プロファイルを比較すると、構造変化の開始は IgG4PE で最も早く、IgG4、IgG2AAAS、IgG1 と続く傾向が認められ、サブクラス間の差は 1 段階目の構造変化で大きかった。Tm1 は IgG1 で最も高く、IgG1＞IgG2AAAS＞IgG4＞IgG4PE の序列を示した。Tm2 も Tm1 の序列と同様の傾向を示した。Mab-A、Mab-B では IgG1 と IgG2 の 1 段階目の蛍光プロファイル大きな差は認められなかったが、Mab-C では IgG2AAAS で明確に低温側へのシフトが確認された。また Mab-C では IgG4WT の分析も実施しており、その 1 段階目の蛍光プロファイルは IgG4PE に比べ高温側にシフトが確認された。

また各サブクラス、pH の影響を評価したところ全てのサブクラスで Tm1、Tm2 ともに中性 pH で最も高く、pH 低下に伴い変性温度の低下傾向が認められ、その度合いは Tm1 の方が Tm2 に比

べ大きかった。DSF の分析結果からも、IgG2 および IgG4 の改変体で Tm の低下が認められたこと、pH4.0 において IgG２AAAS の Tm1 が IgG4 の Tm1 と逆転したことなど、DSC で認められた結果と同様の結果が認められた。

Mab-D

Mab-D 各サブクラス（IgG1, IgG2AAAS, IgG4, IgG4PE）の各 pH（4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0）の検体について評価を行った。Fig.3-3-3-1（D）に pH5.5 検体の蛍光プロファイルを示した。pH5.5 の検体の蛍光プロファイルを比較したところ、全てのサブクラスで 50℃付近より蛍光強度の増加が始まり、2 段階変移の曲線を描き、85℃付近より蛍光強度の低下（クエンチング）が認められた。蛍光プロファイルを比較すると、Mab-C 同様、構造変化の開始は IgG4PE で最も早く、IgG4、IgG2AAAS、IgG1 と続く傾向が認められ、サブクラス間の差は 1 段階目の構造変化で大きかった。Tm1 は IgG1 で最も高く、IgG1＞IgG2AAAS＞IgG4＞IgG4PE の序列を示した。

また各サブクラス、pH の影響を評価したところ全てのサブクラスで Tm1、Tm2 ともに中性 pH で最も高く、pH 低下に伴い変性温度の低下傾向が認められ、その度合いは Tm1 の方が Tm2 に比べ大きかった。

4 つの抗体の比較

Tm1 について各抗体で得られた Tm1 を pH に対しプロットした結果を Fig.3-3-3-2 に示した。その結果、可変領域の違いに関わらず、同じサブクラスにおいてほぼ一致する結果が得られた。これは 1 段階目の構造変化がサブクラスに起因することを示唆した。サブクラスごとに Tm1 の平均値を求め pH に対しプロットした結果を Fig.3-3-3-3 に示した。（IgG1 および IgG4PE は Mab-A, B, C, D の 4 つの平均値、IgG2 は Mab-A, B の 2 つの平均値、IgG2AAAS は Mab-C, D の 2 つの平均値、IgG4 は Mab-C,D の２つの平均値とした。）各サブクラス pH に対して同様の傾向を示し、pH7.0 で最も Tm が高く、pH の低下に伴い Tm の減少が認められ、pH4.0 では特に低下が顕著であった。この傾向は DSC の CH2 の Tm の傾向に非常に良く一致する結果であった。また同じ pH 条件下で各サブクラスの Tm を比較すると、IgG1≧IgG2＞IgG2AAAS≧IgG4＞IgG4PE の傾向が認められた。純粋にサブクラスの比較をすると IgG1、IgG2 に比べ、IgG4 の Tm は約 5℃程度の低下が認められ、熱ストレスに対して構造変化しやすい不安定性が示唆された。またそれぞれ変異を導入した IgG2AAAS および IgG4PE は WT に比べて Tm の低下が認められた。Goldberg 等

によって、IgG1 の DSF 評価においてこれまでに DSC のデータと比較した報告があり、DSF で得られる Tm1 は DSC の CH2 の Tm と相関が認められた [20]。そこで、Mab-C、Mab-D において DSF の Tm1 と DSC の CH2 の Tm を比較した。Mab-A および Mab-B は CH2 と Fab の構造変化が重なり、DSC において CH2 の Tm を算出できなかったため、使用できなかった。Fig.3-3-3-4 に両手法により得られた Tm を比較した結果を示した。Mab-C、Mab-D 共に各サブクラスとも DFS で評価した Tm1 と DSC で評価した CH2 の Tm と高い相関（R^2=0.99）が得られた。また DSC と DSF のプロファイルを重ね合わせると、1 段目の構造変化は DSC における CH2 の変性ピークと一致する結果が確認された。この結果より DSF における評価において 1 段階目の構造変化は CH2 ドメインの構造変化を捉えていることが示唆された。

Tm2 についても同様に評価した。各抗体で得られた Tm2 を pH に対しプロットした結果を Fig.3-3-3-5 に示した。その結果、Tm1 ほど明確な相関は認められなかった。サブクラスに起因するというより、同じ可変領域を持つ抗体ごとにまとまっている傾向が認められた。このことから第 2 段階の構造変化はおそらく各抗体の可変領域を含む Fab 断片の構造変化に起因する可能性が推察された。また同じ可変領域を持つ抗体において同じ pH 条件下のサブクラス間で Tm に差が認めるのは、Fab 断片の構造変化する温度域に Fc 領域の構造変化も重なっており、純粋に Fab 断片のみの構造変化を示していないと推察される。

DSF の Tm1 と DSC の CH2 の Tm で相関が認められたが、温度には若干の違いが認められた。おそらく DSF は構造変化に伴う疎水表面の露出を蛍光物質の結合度合いで評価しているのに対し、DSC は構造変化による熱量で評価しており、互いに構造変化を捉えているもののその評価対象が異なることに起因すると考えられる。

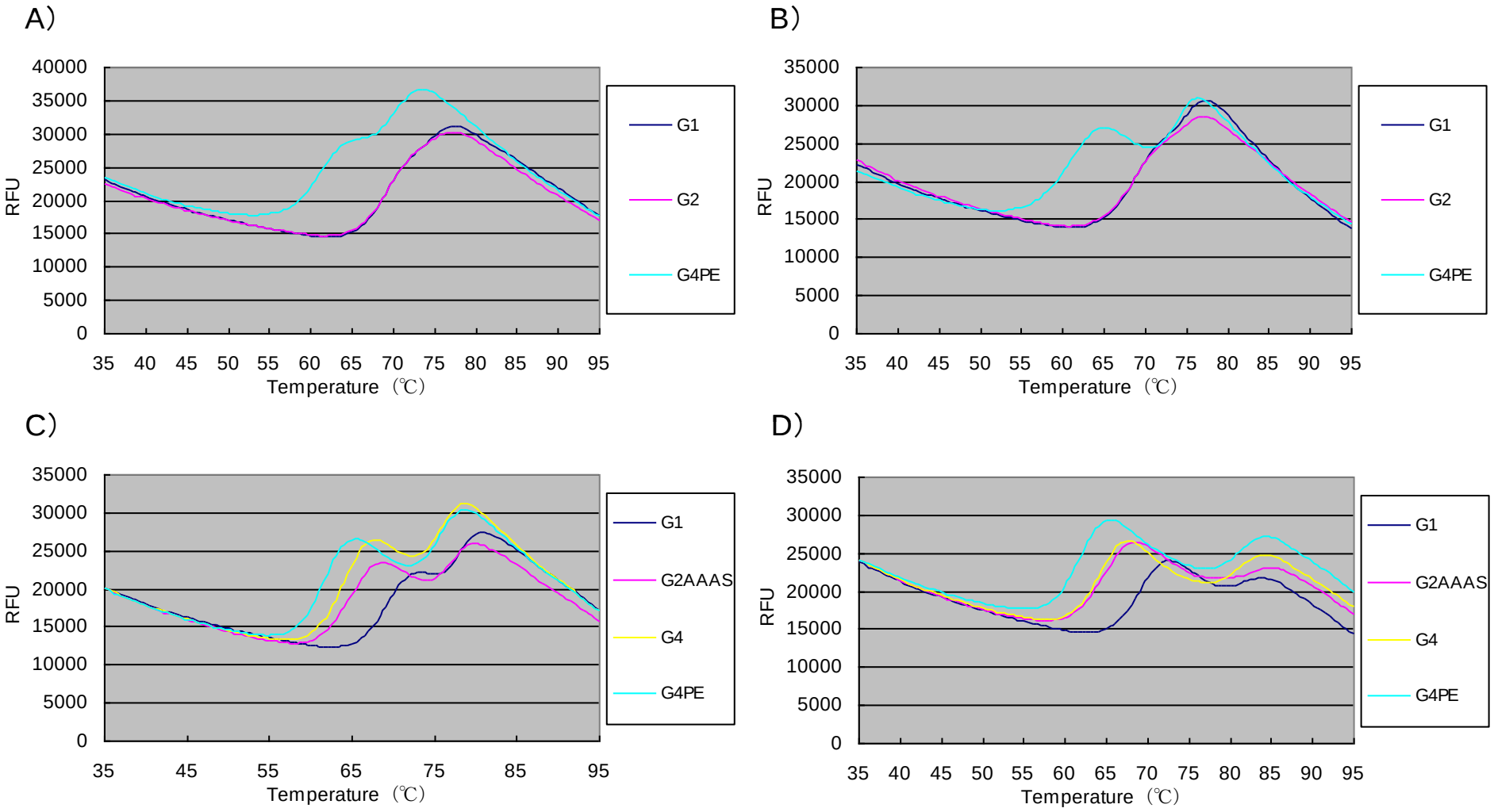


Fig.3-3-3-1　DSF プロファイル（各抗体 pH5.5 検体）A）Mab-A、B）Mab-B、C）Mab-C、D）Mab-D

Table.3-3-3-1　DSF 各抗体の Tm

Mab-A

subclass		Tm (°C)				
	pH	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	Tm1	63.0	68.0	69.5	70.0	70.5
	Tm2	73.0	74.5	74.5	N.D.	N.D.
G2						
	Tm1	62.5	68.0	69.5	70.0	70.5
	Tm2	71.5	73.0	N.D.	N.D.	N.D.
G4PE						
	Tm1	56.5	60.0	61.0	61.5	62.0
	Tm2	67.5	69.5	70.0	70.0	70.0

nd: ピークの重なりによって検出されなかった。

Mab-B

subclass		Tm (°C)				
	pH	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	Tm1	62.5	67.5	69.0	69.5	70.0
	Tm2	74.0	75.0	75.0	74.5	74.0
G2						
	Tm1	61.5	67.0	69.0	70.0	70.5
	Tm2	73.5	74.5	74.5	74.5	N.D
G4PE						
	Tm1	56.5	60.0	60.5	61.0	62.0
	Tm2	73.0	74.0	74.0	73.5	73.5

nd: ピークの重なりによって検出されなかった。

Mab-C

subclass		Tm (°C)				
	pH	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	Tm1	63.5	68.0	69.5	70.0	70.5
	Tm2	76.5	78.0	78.0	78.0	78.0
G2AAAS						
	Tm1	58.5	63.5	65.0	66.0	66.0
	Tm2	74.5	76.5	77.0	77.5	77.5
G4						
	Tm1	59.0	62.5	64.0	65.0	65.5
	Tm2	74.0	75.5	76.0	76.0	75.5
G4PE						
	Tm1	56.5	60.5	61.5	62.0	62.5
	Tm2	74.0	75.5	75.5	75.5	75.5

nd: ピークの重なりによって検出されなかった。

Mab-D

subclass		Tm (°C)				
	pH	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
G1						
	Tm1	63.0	68.0	69.0	70.0	70.0
	Tm2	79.0	81.0	81.5	82.0	82.5
G2AAAS						
	Tm1	58.0	63.0	65.0	65.5	66.0
	Tm2	75.0	82.5	82.5	83.0	83.0
G4						
	Tm1	58.0	62.5	64.5	65.5	65.5
	Tm2	78.0	81.0	81.0	81.5	81.5
G4PE						
	Tm1	56.5	60.5	61.5	62.5	63.0
	Tm2	78.5	81.0	81.5	81.5	81.5

nd: ピークの重なりによって検出されなかった。

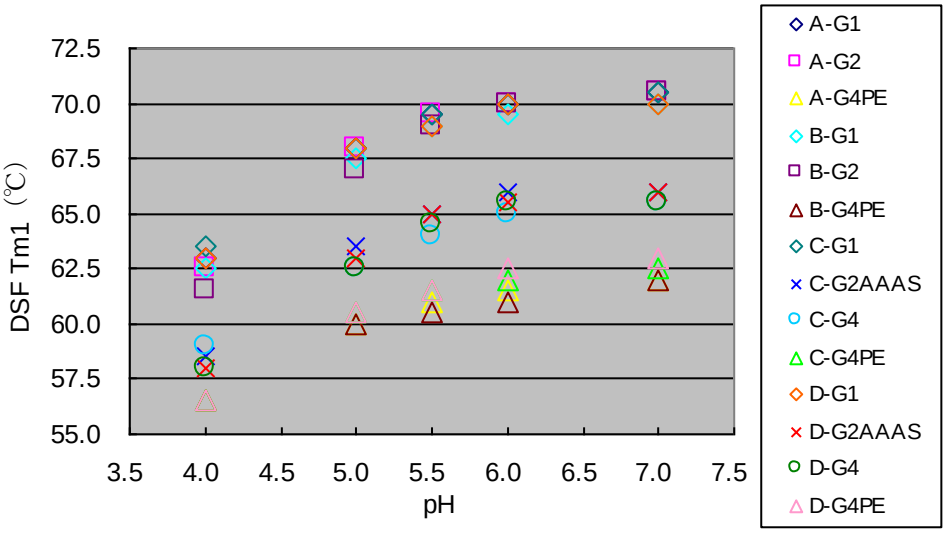


Fig.3-3-3-2　各抗体の Tm1 のプロット

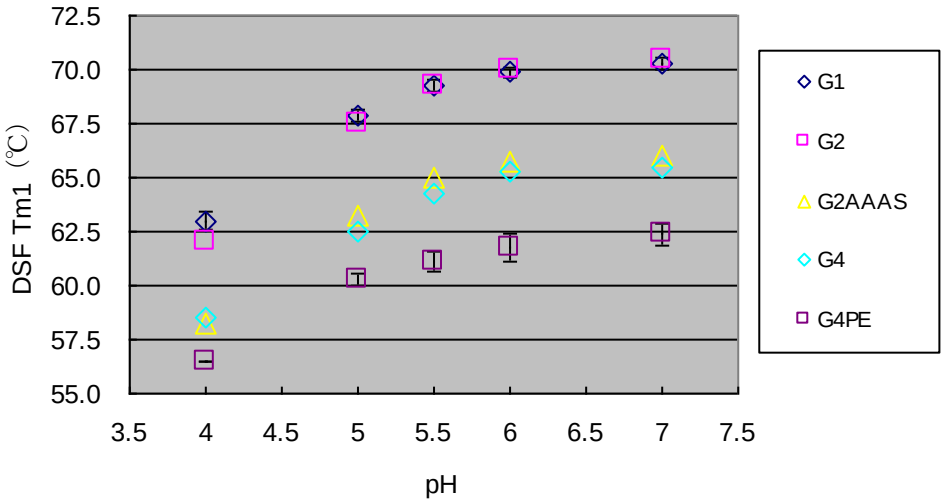


Fig.3-3-3-3　各サブクラスの Tm1 平均値のプロット

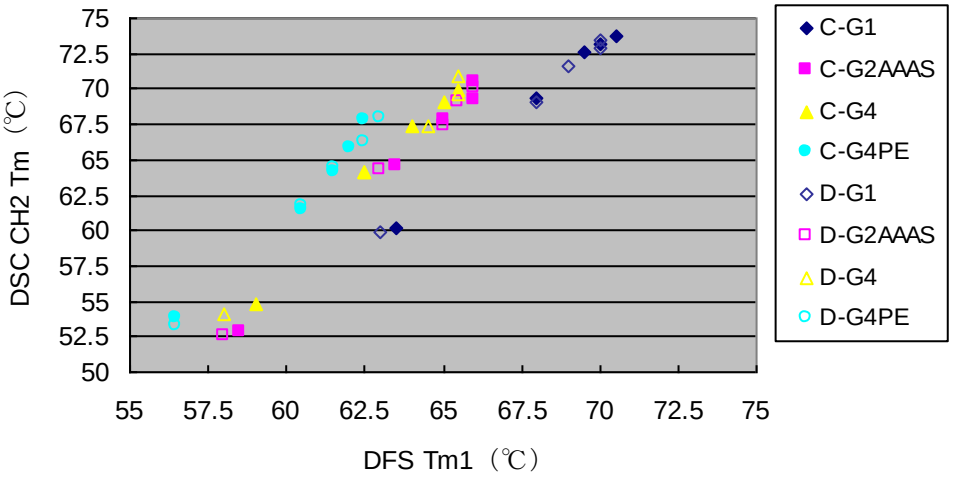


Fig.3-3-3-4　Mab-C および Mab-D における DSF Tm1 と DSC CH2 Tm の比較

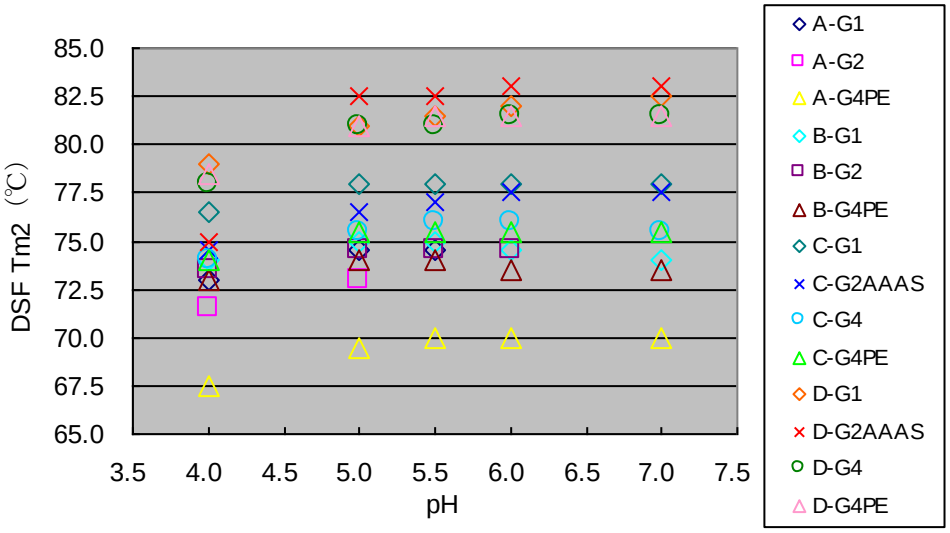


Fig.3-3-3-5　各抗体の Tm2 のプロット

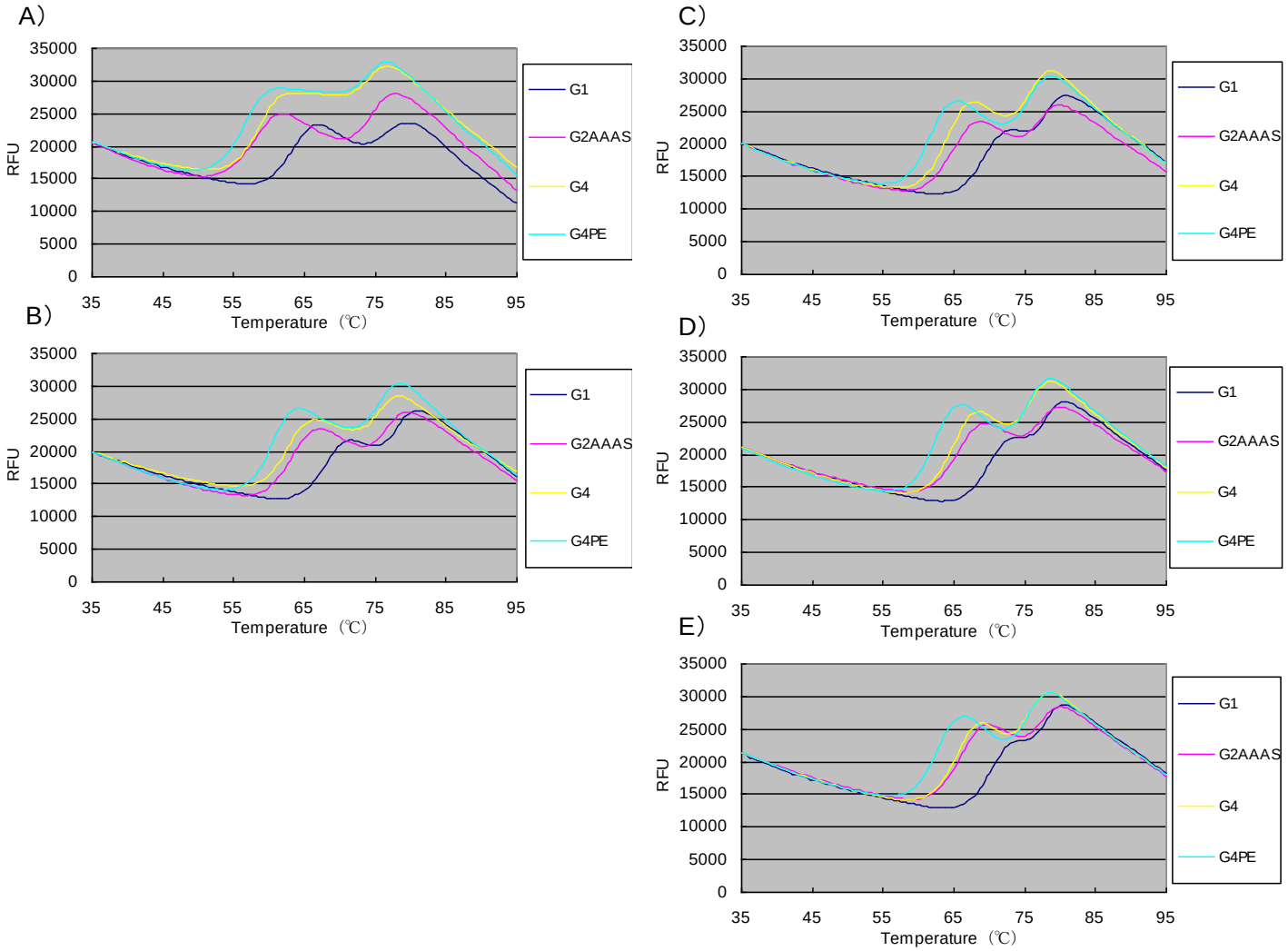


Fig.3-3-3-6　Mab-C DSF プロファイル　A）pH4.0、B）pH5.0、C）pH5.5、D）pH6.0、E）pH7.0（参考データ）

3-4. 結言

本章ではサブクラスの違いが抗体の構造安定性に与える影響を評価した。DSC、CD、DSF を用いて抗体の構造安定性を評価した結果、可変領域の違いに関わらず、各分析共にサブクラスに特徴的な傾向を示した。特に抗体を構成するドメインの中で最も不安定な CH2 の安定性にサブクラス間で大きな違いが認められ、保存安定性との関わりが示唆された。

DSC では各抗体の可変領域である Fab の安定性に依存するが、CH2、CH3 ドメインの結果から CH2 および CH3 から構成される Fc の安定性はサブクラスで大きく異なり、その安定性は IgG1＞IgG2＞IgG4 の序列で、IgG1 が最も高い安定性を示した。特に最も変性しやすい CH2 ドメインが、サブクラス間で安定性の差が大きく、特に pH4.0 の酸性領域で顕著であった。

CD における二次構造の比較では昇温前、全ての検体で一致するスペクトルを示し、サブクラスの違いに関わらず β-sheet リッチな共通の二次構造を有していることが明らかとなった。しかしながら昇温スペクトルによる構造変化（unfolding profile）の比較では、IgG4＜IgG2＜IgG1 の序列で構造が崩れやすい（unfolding のしやすい）傾向が認められた。また同じ溶媒条件で IgG2、IgG4 では昇温途中で凝集形成による沈殿が認められたことから、サブクラスの違いが構造変化のしやすさに大きく影響していることが示唆された。

DSF でも他の分析で認められた傾向と同様、Tm1 の比較で IgG1＞IgG2＞IgG4 の序列を示し、DSC の CH2 の Tm と高い相関が認められた。

全ての分析を実施した Mab-C の DSC、CD、DSF の結果を比較し、各分析結果から構造変化メカニズムに関する考察を行った。それぞれ測定原理が異なり、モニターしている現象は違うが、それぞれから得られた結果を組み合わせることで構造変化の詳細が明らかとなる。DSC は個々のドメインの熱による構造変化の熱量変化を捉えており、変性ピークの帰属（CH2, Fab, CH3）が明らかとなっている。CD 昇温スペクトルでは 217nm をモニターしたことから抗体に特徴的な構造である β-sheet の構造変化を、DSF では疎水性表面に結合する疎水性蛍光プローブ Sypro Orange を用いることで疎水性表面の露出度の変化を捉えた。今回、Mab-C 各サブクラスの pH4.0、5.0、6.0 検体において得られた 3 つの分析プロファイルを重ね合わせて比較すると、その構造変化は他の分析で捕らえた変化と良く一致する結果が認められた。

Mab-C の G4PE pH5.0 検体の DSF と DSC および CD の比較を Fig.3-3-4-1 に示した。DSF、CD ともに 2 step の構造変化が確認され、低温側の構造変化から StepⅠ、StepⅡと定義する。DSF

と DSC の比較をすると、Step Ⅰの構造変化は DSC の CH2 ドメインの変化に一致し、Step Ⅱの構造変化は DSC の Fab 由来のドメイン変化に一致した。DSF の Step Ⅰの構造変化は全てのサブクラスで pH に依存性が高いこと、IgG1 で構造変化の温度が高く、IgG2 および IgG4 で低温側にシフトする結果が得られており、DSC で確認された CH2 の Tm 変化と完全に一致した。CD の構造変化を詳しく観察すると、CH2 の構造変化では二次構造の崩れは僅かであるが、Fab の構造変化で大きく変化していることが明らかとなった。また DSF の構造変化を詳しく観察すると始めに生じる CH2 の構造変化で疎水面の露出はかなり大きかった。CH2 の二次構造の変化は僅かであるが、疎水面の露出はかなり大きく、CH2 の構造変化はその後引き起こると予測される凝集体形成や沈殿などに大きく関与していると考えられる。また CD による二次構造の変化および DSF の疎水面の露出は DSC の Fab 断片の変性終了温度と一致しており、溶媒条件によっては凝集を開始する温度であることが示唆された。このように抗体の熱ストレスによる構造変化は大きく 2Step と考えられた。

今回サブクラス間で最も差が認められた CH2 の Tm（DSC）について各サブクラス間で比較した結果を Fig.3-3-4-1 に示した。CH2 の Tm は全てのサブクラスで pH 依存性があり、pH 低下に伴い Tm の低下が確認された。また Tm は IgG1 に比べ IgG2、IgG4 で低い傾向が認められた。特に酸性領域下での重合体形成のしやすさなどのサブクラスによる安定性の違いは CH2 の安定性が大きく寄与していることが示唆された。

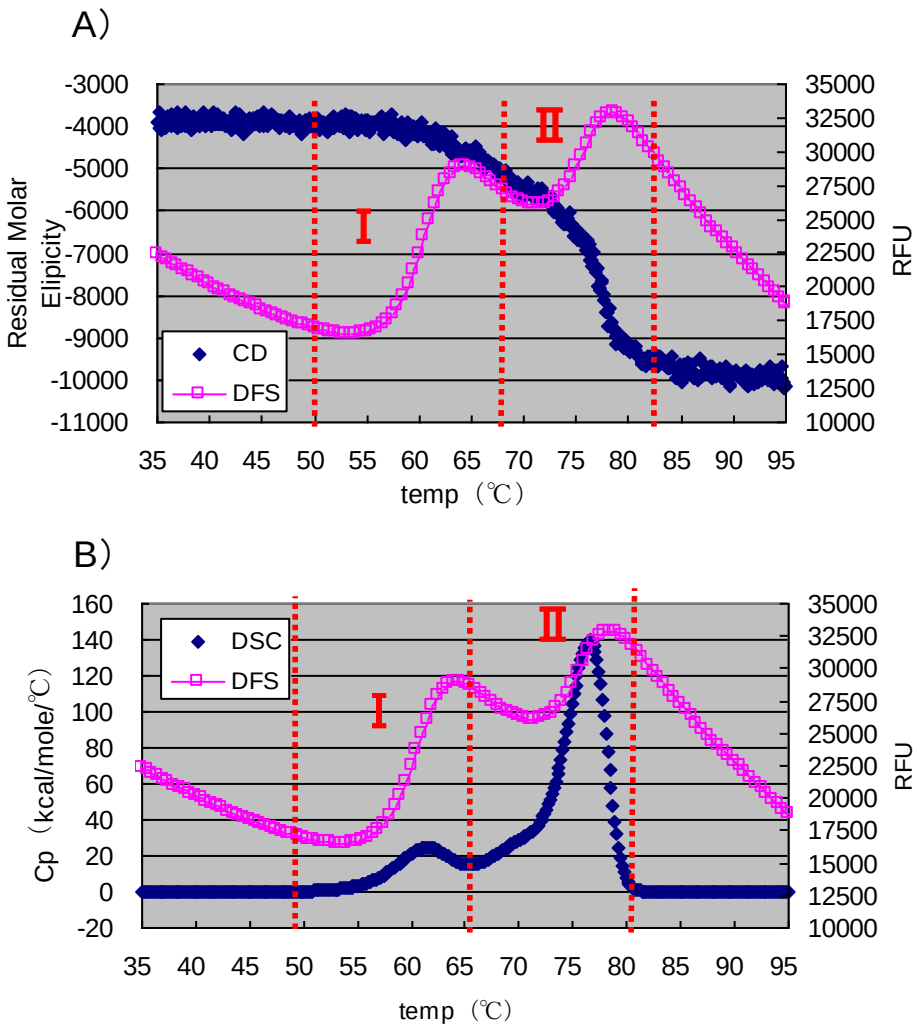


Fig. 3-3-4-1　Mab-C G4PE pH5.0 検体の DSF と DSC および CD のプロファイル比較

A）DSF vs CD、B）DSF vs DSC

3-5 参考文献

1. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res* 20(9): 1325-1336（2003）
2. Middaugh CR, Edwards KL. Recent advances in our understanding of protein conformational stability from a pharmaceutical perspective. *Expert opin Investig Drugs* 7(9):1493-1500（1998）
3. Grillo AO, Edwards KL, Kashi RS, Shipley KM, Hu L, Besman MJ, Middaugh CR. Conformatinal origin of the agregation of recombinant human factor VⅢ. *Biochemistry* 40(2): 586-595（2001）
4. Andersen CB, Manno M, Rischel C, *et al*. Aggregation of multidomain protein: a coagulation mechanism governs aggregation of a model IgG1 antibody under weak thermal stress. *Protein Sci* 19, 279-290（2010）
5. Hawe A, Kasper JC, Friess W, *et al*. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freez-thawing and thermal stress. *Eur J Pharm Sci* 38, 79-87（2009）
6. Wang W. Protein Aggregation and its inhibition in bio pharmaceutics. *Int J Pharm* 289(1-2): 1-30（2005）
7. Baynes BM, Trout BL. Rational design of solution additives for the prevention of protein aggregation. *Biophys J* 87(3):1631-1639（2004）
8. Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, *et al*. Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins* 66(4): 954-962（2007）
9. Kamerzell TJ, Ramsey JD, Middaugh CR. Immunoglobulin dynamics, conformational fluctuations, and nonlinear elasticity and their effects on stability. *J Phys Chem B* 112: 3240-3250（2008）
10. Brandau DT, Lawson EQ, Trautman PA, *et al*. Thermodynamics of monoclonal and mixed cryoimmunoglobin solubilization. *Immunol Invest* 16: 21-32（1987）
11. Wen J, Jiang Y, Narhi LO. Applications of DSC for Antibodies and Fc-Conjugated Proteins. *Am Pharm Rev* 10: 10-15（2007）

12. Harn N, Allan C, Oliver C, *et al*. Highly coneentrated monoclonal antibody solutions: Direct analysis of physical structure and thermal stability. *J Pharm Sci* 96: 532-546（2007）
13. Kamerzell TJ, Middaugh CR. Two-dimensional correlation spectroscopy reveals coupled immnoglobulin regions of differential flexibility that influence stability. *Biochemistry* 46: 9762-9773（2007）
14. Taves CJ, Kusumi A, Winkelhake JL. Human aglycosyl-IgG exhibits increased hydrophobicity. Binding/fluorescence studies with 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid（ANS）. *Biochm Biophys Res Commun* 124: 605-613（1984）
15. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2: 2212-2221（2007）
16. He F, Hogan S, Latypov RF, Narhi LO, Razinkov VI. High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. *J Pahrm Sci*. 99: 1707-1720（2010）
17. Bhattracharjee C, Das KP. Thermal unfolding and refolding of beta-lactoglobulin. An intrisic andextrinsic fluorescence study. *Eur J Biochem* 267(13): 3957-3964（2000）
18. Hawa A, Sutter M, Jiskoot W. Extrinsic fluoresent dyes as tools for protein characterization. *Pharm Res* 25(7): 1487-1499（2008）
19. Cummings MD, Farnum MA, Nelen MI. Universal screening methods and applications of ThermoFluor. *J Biomol Screen* 11(7): 854-863（2006）
20. GoldberG DS, Bisop SM, Shah AU, *et al*. Formulation Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies Using High-Throughput Fluorecence and Static Light Scattering Techniques: Role of Conformational and Colloidal Stability. *J Pahrm Sci* 100: 1306-1315（2010）
21. Ericsson UB, Hallberg BM, Detitta GT, *et al*. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem* 357(2):289-298（2006）
22. Vermeer AW, Norder W. The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J* 78:394-404（2000）
23. Vermeer AW, Norder W, van Amerongen A. The unfolding / denaturation of immunogammaglobulin of isotype 2b and its F(ab) and F(c) fragments. *Biophys J* 79:

2150-2154（2000）

24. Welfle K, Misselwitz R, Hausdorf G, *et al*. Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti p24（HIV-1）monoclonal antibody CB 4-1 and its Fab and Fc fragments. *Biochim Biophys Acta* 1431: 120-131（1999）
25. Garber E, Demarest JD. A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 751-757（2007）
26. Ionescu RM, Vlasak J, Proce C, *et al*. Contribution of Variable Domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 97:1414-1426（2008）
27. Vermeer AWP. Norde W. The Thermal Stability of Immunogloblin: Unforlding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. *Biophys J* 78: 394-404（2000）
28. Vermeer AWP. Bremer MGEG, Norde W. Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studies by circlar dichroism spectroscopy. *Biochm Biophys Acta* 1425: 1-12（1998）
29. Manning MC, Woody RW. Theoretical study of the contribution of aromatic side chains to the circular dichroism of basic bovine pancreatic trpsin inhibitor. *Biochmistry* 28: 8609-8613（1989）

第 4 章　総括

4-1 総括

抗体医薬品はその誕生から 20 年以上が経ち、約 30 の抗体医薬品が上市されてきた。多くの臨床データおよび研究結果から抗体の持つエフェクター機能と作用機序との関係が明らかになりつつあり、抗体医薬開発において標的に対する作用機序を考慮したサブクラス選択の重要性が増している。また臨床試験における安全性への注目と同様に、品質面における安全性も注目されるようになってきた。特に抗体においては、多量の投与量から患者の QOL（Quality Of Life）を考慮した高濃度シリンジ製剤の開発が求められ、初期開発の段階から高濃度製剤開発を予想し、物性の良い抗体を候補抗体として開発することが成功の鍵を握っている。さらに分析手法の発展により、変性メカニズムの解明や副作用との関連について研究が進むにつれて、製造プロセス開発や製剤設計などの CMC 開発においても様々な変性に対する影響を総合的に評価し、より品質の良い抗体医薬品の開発が求められてきている。このために抗体の物性研究は今後益々重要な意味を持つことになる。これまでの上市抗体や開発抗体の多くは IgG1 であり、IgG1 以外のサブクラスや機能付加を目指したアミノ酸改変抗体の物性についての知見はまだまだ少ないのが現状である。

本研究では、同じ可変領域を持つ抗体においてサブクラスチェンジが抗体の物性に及ぼす影響を評価することを目的とし、4 つの異なる可変領域を持つ抗体をモデルにそれぞれの抗体について IgG1、IgG2、IgG4 のサブクラスを調製し、熱ストレスに対する保存安定性および構造安定性を比較した。

第 2 章では、各サブクラスの熱ストレスに対する保存安定性を評価し、重合体および分解物の形成においてサブクラスの違いが大きく影響することが明らかとなった。また pH に対する劣化傾向（pH トレンド）、保存安定性の傾向は可変領域の異なる 4 つの抗体間で、概ね同じ傾向を示した。今回得られた結果は、これまで個々の抗体で報告されている IgG1 の酸性領域での顕著な切断、IgG2 および IgG4 の酸性領域での顕著な重合体形成を反映するものであった。

第 3 章では、各サブクラスの構造安定性を評価し、抗体を構成するドメインの中で最も不安定な CH2 の安定性にサブクラス間で大きな違いが認められ、この違いが各サブクラスの保存安定性や物性に大きく寄与していることが明らかとなった。

これまでに抗体の構造安定性、保存安定性、folding 状態に関して多くの研究が実施されているが、同一の可変領域を有しながら異なるサブクラス間で比較した報告はほとんどない。各サブク

ラスで認められた劣化傾向、保存安定性および構造安定性は、可変領域の違いに因らず同じであった。このことはサブクラスつまり定常領域の物性は可変領域を変化させても保存されることが明らかとなった。このようなサブクラスの物性の違いは生体内で行われているサブクラス選択の理解へも繋がるものである。また抗体医薬品開発においては、物性的に適切な Fab 分子を用意すれば、物性変化をある程度予測した上でサブクラス変換を実施できることを意味し、抗体をデザインする上で非常に有用な知見である。またサブクラスによって物性・特性の違いを明らかにしたことから、原薬・製剤プロセス開発において各サブクラスの注意すべき点を考慮に入れ、プラットフォーム技術を最適化することで、開発における時間と労力およびコストの削減につながり、産業上も非常に意義深い。たとえば、酸性領域での凝集しやすさがサブクラスで大きく異なることから、抗体の精製プロセスの Protein A 工程における低 pH での溶出及びウイルスクリアランス工程では、そのサブクラスに適した pH の最適化を考慮する必要があるだろう。また製剤開発においては各サブクラスの劣化挙動を考慮した添加剤の選択など rational な処方開発を行うことができる。

また開発上、大きな問題となりうる重合体の形成をはじめとした物性の不安定さに CH2 の安定性が大きく寄与していることが明らかとなったことは、多数のドメインからなる抗体において重合体形成のメカニズム解明およびアミノ酸改変などによる物性向上に向けた研究に非常に有用な情報である。高濃度製剤の開発が望まれる抗体医薬において、凝集・重合体抑制は克服しなければならない大きな挑戦であり、様々な研究が実施されている。MIT の Trout 等のグループによって凝集形成に寄与すると思われる疎水的 patch 領域（Aggregation prone motif）を見出す新規なアルゴリズムが報告されている [1, 2]。これは、対象とするアミノ酸の疎水性度、タンパク質表面の露出度、設定した半径内にあるアミノ酸の疎水的な寄与の合計、そしてシミュレーションから求めたダイナミクスの寄与の合計から対象としたアミノ酸残基の Spatial Aggregation Propensity（SAP）値を求め、疎水的 patch を見出す手法であり、疎水的 patch の親水性アミノ酸への改変により安定性の改良に成功している。このような Aggregation Prone Motif はヒト IgG の共通配列に存在し、定常領域においてサブクラス間で保存されているものも多く、これを基にした CH2 へのアミノ酸改変により安定性の改良が可能と推察される。

いまだ有用な治療薬の存在しない疾患に対する新規ターゲットに対する抗体や、バイオシミラー、バイオベターを目指した抗体など、今後益々抗体医薬品の開発は加速すると考えられる。新

規のターゲット探索が難航する中、同じ標的、同じ適応疾患を有する抗体医薬との差別化、競争力を持つという観点からも薬効のみならず、サブクラスの選択、安全性、生産性、品質に影響を与える物性評価の重要性は益々大きくなるであろう。本研究で得られた知見がサブクラス変換やFc改変技術の適応促進、また抗体の重合体形成メカニズムの解明に貢献できれば幸いである。

4-2 参考文献

1. Chennamsetty N, Helk B, Voynov, *et al*. Aggregation-prone motifs in human immunogloblin G. *J Mol Biol* 391（2）:2050-2058（2009）
2. Chennamsetty N, Voynov V, Kayser V, *et al*. Design of therapeutic proteins with enhanced stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(29):11937-11942（2009）

謝辞

研究の遂行ならびに本論文の執筆するにあたり、多大なるご指導とご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所　津本　浩平　教授に心より感謝申し上げます。タンパク質工学の基礎からその応用に加え、国内外のアカデミアならびに民間企業の最新の動向を常に更新し続け、得られた知識・技術を駆使して社会へと貢献する職業人として生きることの重要さをご教授いただけましたことに切に感謝致します。また公使に亘るさりげないお心遣いのお陰様をもちまして、社会人として勤務先に籍をおきつつの大学院生生活を円滑に送ることができました。誠にありがとうございました。

本論文を執筆するにあたり、大変有益なご助言とご教示を賜りました、東京大学大学院新領域創成科学研究科　和田　猛　准教授、伊藤　耕一　准教授、　富田　野乃　准教授、産業技術総合研究所　本田　真也　研究グループ長、東京大学・先端科学技術研究センター　浜窪　隆雄　教授に心より感謝申し上げます。

東京大学大学院博士後期課程の入学にあたり、ご配慮いただき、その後もご協力頂きました協和発酵キリン株式会社　塚原　正義　主任研究員、森田　真弘　主任研究員、上野　哲寛　主任研究員を始め皆様に深く感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、実験業務への積極的なご参画ならびに数多くの有益なご助言を頂きました協和発酵キリン株式会社バイオ生産技術研究所　石川　智世至　主任研究員、山本　理恵　研究員、鈴木　千種　研究員、佐々木　和枝　研究員、丸山　希　研究員、吉岡　文子　研究員をはじめ皆様に感謝申し上げます。

東北大学での学士号も同じ研究室で同期取得し、今回の博士課程へ同期進学した学友　石井　大輔　君に感謝致します。

津本研究室への変則的な出席を寛大に見守り下さり多岐に亘るご支援ご協力を賜りました津本研究室の皆様に深くお礼申しあげます。

また研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力をいただきながら、ここにお名前を記すことのできなかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後に、これまで自分の思う道を進むことに対し、温かく見守り支援してくれた両親に感謝致します。