

論文の内容の要旨

論文題目 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.)

氏 名 伊藤 剛彦

【緒言】

抗体医薬品は現在、最も活発に開発が行われている医薬品の一つである。その多くは抗腫瘍作用あるいは免疫調節作用を持つ医薬品であり、2010年9月までに日欧米で29品目のモノクローナル抗体医薬品が承認されている。現在臨床開発段階にある抗体医薬品は150品目に上り、今後さらに承認品目数が増加する可能性は高い。これまでに上市されている抗体医薬品のほとんどはIgG型であり、中でもIgG1が大多数を占め、IgG2およびIgG4を用いた抗体医薬品はわずかである。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、抗体依存細胞障害活性(ADCC)等のエフェクター機能に重要なFc γ レセプターへの結合は不必要であり、副作用の点から考えるとFc γ レセプターへの結合はむしろ好ましくない可能性も考えられる。Fc γ レセプターへの結合を低減させる方法として、IgG抗体のサブクラスをIgG1からIgG2あるいはIgG4に変えるサブクラスチェンジやFc改変技術の適用が考えられる。しかしながらサブクラスチェンジはその定常領域のエフェクター機能だけではなく、薬物動態や物性・安定性に大きく影響を与えるため極めて慎重に行う必要がある。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。本研究では、サブクラスチェンジが抗体の物性に及ぼす影響を考察するため、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。抗体によってIgG2はエフェクター機能低減を目的とした改変体IgG2AAAS(V234A,G237A,P331S)、IgG4はハーフ抗体産生抑

制および ADCC 活性抑制を目的とした改変体 IgG4PE (S228P,L235E) を用いた。

【実験】

本研究において使用した抗体は全てチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いて発現させ、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。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 を指標に安定性を評価した。各抗体、抗体濃度を 5 mg/mL、10 mM 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、pH を 4.0、5.0、5.5、6.0、7.0 に調整し、試験に用いた。各検体を 25℃および 40℃に 1 箇月、3 箇月インキュベーションし、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および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 (SDS-PAGE) を用いて保存安定性 (重合体、分解物) を評価した。また熱による構造変化および熱変性を示差走査型熱量測定 (DSC)、円偏光二色性スペクトル (CD)、示差走査型蛍光測定 (DSF) を用いて評価した。以下に Mab-C の実験結果を中心に記載する。

保存安定性

各サブクラス pH4.0 検体の SEC クロマトグラムを比較したところ、各サブクラスで劣化傾向に違いがあり IgG1 で分解、IgG2 (IgG2AAAS を含む)、IgG4 (IgG4PE を含む) で重合形成が認められた。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 に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 で顕著であった。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ったのに対し、IgG1 では確認されなかった。

分解のしやすさは IgG1>IgG4>IgG2 であり IgG1 で最も分解されやすい傾向が認められた。特に低 pH 領域でその傾向は顕著であった。IgG1 の分解は主にヒンジの非酵素切断による des Fab および Fab への分解、IgG4 では Half Antibody への分解が主のメカニズムと推察される。また IgG2 は他のサブクラスに比べ分解されにくい傾向が認められた。

DSC

示差走査型熱量測定 (DSC) を用いて各検体の熱変性を評価した。Mab-C の pH5.5 の DSC プロファイルと比較したところ、IgG1、IgG2AAAS に 3 つの変性ピーク、IgG4 に 2 つの変性ピークが認められ、サブクラスの違いにより DSC プロファイルに違いが認められた。全てのサブクラスで約 77℃付近にメインピークが認められ、Mab-C の Fab 断片由来の熱変性ピークと考えられた。得られた DSC プロファイルはこれまでに報告されている IgG の DSC プロファイルと一致しており、低温側から CH2 ドメイン、Fab 断片、CH3 ドメインに由来する熱変性ピークであった。各 pH での T_m (Table.1) を比較すると、共通の可変領域を持つ抗体にも関わらず、Fab に由来すると考えられる T_m は僅かながら差が認められ、IgG4 で低下する傾向が認められ、特に pH4.0 で顕著であった。CH2 について比較すると、全てのサブクラスにおいて中性 pH (7.0) で最も高く、pH 低下に伴い T_m が低下する pH 依存性が確認された。また同条件下で CH2 の T_m を比較すると IgG1 に比べて IgG2 および IgG4 は低

い T_m を示し、IgG1 に比べて CH2 の構造安定性が低いことが示唆された。CH3 の変性ピークは IgG1 のみで明確に確認できたものの、IgG2、IgG4 では確認できなかった。これは Fab の熱変性ピークの領域と重なっているためと推測される。このことから IgG2 および IgG4 の CH3 も IgG1 に比べて構造安定性が低いと考えられる。また IgG4 の CH2 に改変導入した G4PE は G4 に比べて CH2 の T_m に低下が認められ、改変により構造安定性が低下したものと推察された。

CD

円偏光二色性スペクトル (CD) を用いて熱による構造変化 (unfolding) を評価した。Mab-C の全てのサブクラスについて pH4.0、5.0、6.0 について 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。昇温前の Far-UV スペクトルは全ての検体で 217nm 付近に負の極大を持つスペクトルが得られ、サブクラス間、pH 間で差は認められず、 β -sheet rich な構造を有していることが示唆された。217nm をモニターした昇温スペクトルを比較すると、全ての pH で約 50℃まではシグナルに変化が認められなかったが、50℃以降でモル楕円率の減少が認められ、55℃から 85℃に掛けて 2 ステップの変性曲線が得られた。その変性開始温度は IgG4<IgG2<IgG1 の順で早く、また低 pH ほど早く、サブクラス間の差が顕著であった。また pH4.0 および pH5.0 での分子楕円率の変化量が IgG1 に比べて IgG2 や IgG4 で大きいこと、pH6.0 では IgG2 および IgG4 で昇温途中に凝集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。

DFS

疎水性表面結合蛍光プローブである Sypro Orange を用いた示差走査型蛍光分析を用いて熱による構造変化 (疎水表面の露出) を評価した。35℃から 95℃までの昇温スペクトルを比較したところ全ての検体で 2 ステップの変性曲線が得られた。全てのサブクラスで低 pH ほど構造変化が早い温度で開始し、その様子は IgG4 で IgG1、IgG2 と比較して顕著であった。DFS の昇温スペクトルを DSC プロファイル、CD の昇温スペクトルと重ね合わせ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 (Fig.5)。これより CD および DFS で認められる 1 ステップ目の構造変化は DSC で認められた CH2 ドメインの構造変化であり、どのサブクラスでも pH 依存性が非常に高いことが示唆された。CH2 の構造変化は CD では二次構造の変化は僅かに見えるが、疎水面の露出はかなり大きいことが示唆された。また 2 ステップ目の構造変化は Fab 断片の構造変化であることがわかった。また CD による二次構造の変化および DFS 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、溶媒の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。

異なる可変領域を持つ Mab-A、Mab-B、Mab-D においても上記に示した pH に対する重合体および分解物のしやすさ、熱変性、構造安定性等の物性は概ね同様の傾向が得られ、可変領域 (Fab) が異なってもサブクラスによる物性は保存されていることが示唆された。

【結言】

4 つの抗体をモデルにサブクラスの違いが物性におよぼす影響を評価した。その結果、サブクラス間で重合体および分解物のできやすさ、熱ストレスによる構造安定性に違いが認められた。抗体医薬品の開発で免疫原性等最も大きな問題となりうる重合体のできやすさに関しては、IgG4>IgG2>IgG1 の序列を示し、IgG4 で最も大きく、IgG1 で最も小さいことが明らかとなった。特にその増加量は pH4 以下の酸性領域で顕著であった。DSC 等の結果を考慮すると、各サブクラスで CH2 ドメイン構造が pH に依存して不安定になることから、酸性領域での重合体形成は CH2 ドメインの安定性の違いに大きく起因していることが示唆された。また IgG1 は他のサブクラスに比べて分解しやすい傾向が認められたが、これは、これまでに報告されているヒンジの非酵素切断による des Fab (Fab + Fc) および Fab への分解と一致し、重合体形成以上に IgG1 のモノマー含量低下の主要因であった。これらの傾向は可変領域が異なっても同じ傾向を示したことから、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。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、抗体デザインや原薬・製剤製造において非常に有益な知見であると考えられる。本研究で得られた知見は近年盛んに実施されているサブクラス変換や Fc 改変技術の適用促進、または抗体の重合体形成メカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。