

# 論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 剛彦

本研究は、同じ可変領域を有する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について、保存安定性・構造安定性の観点から評価した。

第 1 章は、抗体医薬品の現状と課題、創薬の進行状況について近年の動向をまとめ、本研究が取り扱うサブクラスチェンジにおける物性面の理解の重要性について述べている。さらに個々のサブクラスの物性研究の現状についてまとめ、本研究の目的と意義について述べている。

第 2 章において、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。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。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 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。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 でその傾向を顕著であった。上記に示した 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、サブクラスの物性は可変領域を変化させても保存されることが示唆された。

第 3 章において各サブクラスの構造安定性を評価した。DSC では各ドメインの熱変性を評価したところ CH2 および CH3 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 であった。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 の酸性領域で顕著であった。CD を用いた昇温スペクトルによる二次構造変化、DSF による構造変化による疎水表面の露出を比較したとこ

ろ、IgG1 に比べ IgG2、IgG4 で構造の崩れが早く、より低温で構造変化の開始が確認された。DSC、CD、DSF の 3 つの分析プロファイルから構造変化は 2 step で起こり、1 step は CH2 ドメインの構造変化、2 step は Fab ドメイン、CH3 ドメインの構造変化であることが同定された。CH2 ドメインの構造変化は二次構造の変化は僅かであるが、疎水表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想される凝集形成や沈殿形成に大きく関与していることが示唆された。

第 4 章においては以上のことを総括し、各サブクラスで保存安定性、構造安定性、劣化傾向に違いが認められること、その違いは CH2 ドメインの安定性の違いに起因することを提唱した。特に同一の可変領域を有する抗体を用いて系統的にサブクラスの違いを評価した点は新規性が高い。またサブクラスチェンジにより物性の変化は認められるが、その物性は可変領域の変化によらず保存される。このことは、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のサブクラスチェンジを可能にすることを意味し、薬理作用、副作用を考慮したより安全性の高い抗体医薬品開発に寄与するものである。またサブクラスによって物性・劣化傾向の違いを明らかにしたことから、原薬・製剤プロセス開発、製剤処方開発において、物性を考慮したプラットフォーム技術の最適化することで、近年問題になっている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、産業上でも非常に意義深い。またバイオベターや Fc 融合タンパク質などへの応用に向けた新しい Fc フォーマットへ知見を与えるものである。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。