

非天然型立体構造抗体検出技術の開発

遠 藤 論*¹
大 江 正 剛*¹
小 林 秀 峰*¹

Development of an Assay System for Detection of Non-native Immunoglobulin G Utilizing the Artificial Peptide

Satoshi ENDO
Seigo OE
Hidetaka KOBAYASHI

Therapeutic immunoglobulin G (IgG) is unstable under various stresses in the manufacturing process, delivery and storage. When it is exposed to such stress factors, it becomes non-native IgG. If the molecules are present in the therapeutic IgG productions, they tend to associate with each other and form aggregates. Because such aggregates not only decrease the pharmacological effect but also become a potential risk for immunogenicity, therapeutic IgG should contain as small amount of them as possible and rapid analysis of aggregation is required for quality control.

We have developed a novel ELISA system for detection of non-native IgG using AF.2A1 peptide. AF.2A1 is a 25-residue artificial peptide which binds specifically to non-native IgG. We also established the same assay system using automated assay equipment. This assay is performed in a short period of time. Our results show that AF.2A1 ELISA can detect only non-native IgG generated under acid, heat and freeze/thaw conditions but not native IgG. Because AF.2A1 recognizes the non-native structure in the fragment crystallizable region (Fc region) of IgG, this assay can be used to evaluate the various types of IgG. We also found that AF.2A1 ELISA is available for the detection of much lower amount of aggregates and non-native IgG that could not be detected by previous analytical method. In addition, this technique is effective in monitoring of the early stages of the IgG aggregation process. These results indicate that AF.2A1 ELISA can be useful for various types of applications such as screening for high performance cell, process analytical technology, process monitoring and quality control of therapeutic IgG.

1. 緒 言

近年のバイオテクノロジー技術の進展に伴い、抗体医薬品を中心とするバイオ医薬品の売り上げが増加している。2016年度におけるブロックバスター上位10品目のうち抗体医薬品が7品目を占め、今後も抗体医薬品の売り上げの拡大が続くと予想されている¹⁾。

抗体医薬品は従来の低分子医薬品と比較して効果が高く、副作用が少ないことを特長とするが、分子量約15万の免疫グロブリンを主成分とするため、低分子

医薬品よりも安定性が低く、製造、運搬や保管時に様々なストレス（酸・アルカリ、凍結融解、加熱、攪拌など）を受けて抗体分子同士が会合し、凝集体を形成することが知られている²⁾。凝集体形成のメカニズムとして、コロイド安定性の低下により抗体分子同士が会合する場合や、ストレスにより部分的に抗体の立体構造が崩壊した非天然型立体構造抗体が核となり、抗体分子と会合して凝集体が生成する場合があると考えられている³⁾。抗体凝集体は医薬品としての薬効を低下させるのみならず、免疫原性などの副作用の発生が懸念されていることから⁴⁾、抗体医薬品への凝集体の混入は可能な限り少ないことが望ましく、抗体医薬品の品質評価

* 1 ライフサイエンス研究所 生物機能工学グループ

において、迅速に測定可能な凝集体の分析技術が必要とされている。

現行の凝集体分析技術として、サイズ排除クロマトグラフィー法 (SEC) やフィールド・フロー・フラクショネーション法 (FFF)、動的光散乱法 (DSL)、超遠心分離法 (AUC)、ナノ粒子トラッキング解析 (NTA)、共振式質量測定法 (RMM)、マイクロフローイメージング (MFI) などの多様な分析法がある⁵⁾。これらの分析法は、抗体分子がすでに会合凝集した二量体以上の凝集分子を検出する手法であり、抗体分子の凝集体の核となる非天然型立体構造抗体を検出する手法は未確立であった。

そこで我々は、産業総合技術研究所の本田らが開発した25個のアミノ酸から成るペプチド AF.2A1⁶⁾ の応用を試みた。AF.2A1 は物理的、化学的ストレスにより発生した非天然型立体構造抗体の定常 (Fc) 領域に特異的に結合するペプチドである (Fig. 1)。表面プラズモン共鳴法 (SPR) による結合性解析から、AF.2A1 はストレスを受けていない天然型立体構造抗体には結合しないのに対し、酸や加熱などのストレスにより発生した非天然型立体構造抗体に対して特異的に結合する性質を持つことが明らかとなっている⁶⁾。本稿では AF.2A1 を利用し、抗体凝集体だけではなく、その形成の核となると考えられている非天然型立体構造抗体を検出する特徴を有する、現行の分析技術とは異なる新規な非天然型立体構造抗体検出システムの開発および全自動測定装置での検出に成功したので報告する。

2. 実 験

[1] ストレス処理抗体の調製

非天然型立体構造抗体を含む抗体サンプルは、抗体溶液を次の a) から e) のストレス処理方法により調製した。

a) 酸・アルカリ処理抗体の調製

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を、酸性緩衝液 (0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 pH 2.0 ~ 3.5) により 0.5 mg/mL に調整後、37°C で 16 時間静置した。酸処理した抗体溶液に適当量の 1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を添加して中和し、酸処理抗体サンプルとした。また、同様の抗体をアルカリ性緩衝液 (0.1 M リン酸緩衝液 pH 8.0) により 0.5 mg/mL に調整後、酸処理抗体と同条件で処理し、アルカリ処理抗体サンプルとした。

b) 加熱処理抗体の調製

抗体を PBS (Phosphate buffer saline) (pH 7.4) により 0.5 mg/mL に調整後、恒温槽で 50°C または 55°C にて静置し、加熱処理抗体サンプルとした。

c) 凍結融解処理抗体の調製

抗体を PBS (pH 7.4) により 0.5 mg/mL に調整後、-30°C フリーザーまたは液体窒素中で完全に凍結した。続いて凍結した抗体溶液を室温 (25°C) に静置して完全に融解した。この凍結融解処理を 10 回繰り返し、凍結融解処理抗体サンプルとした。

d) 攪拌処理抗体の調製

抗体を PBS (pH 7.4) により 0.5 mg/mL に調整後、

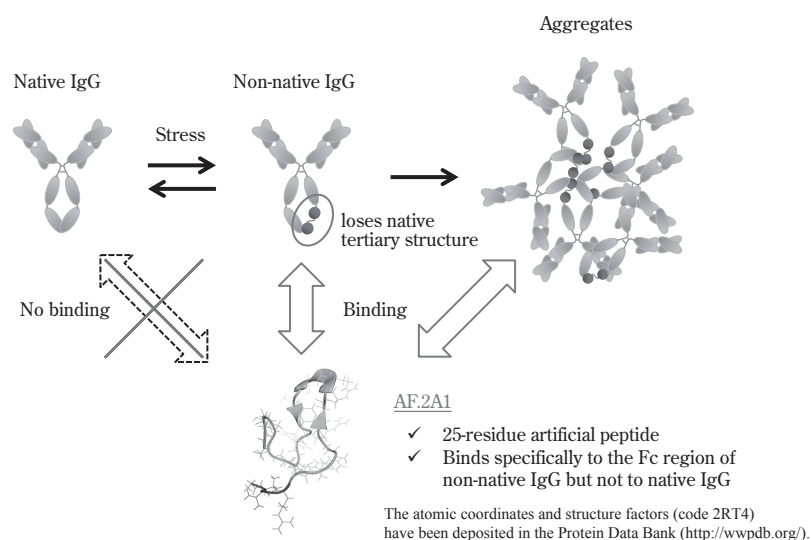


Fig. 1 Mechanism of IgG aggregation and AF.2A1 binding to non-native IgG

マグネチックスターラーを用いて25℃で16時間攪拌し、攪拌処理抗体サンプルとした。

e) 振とう処理抗体の調製

抗体をPBS (pH 7.4) により0.5 mg/mLに調整後、恒温振とう機により500 rpm、25℃で16時間振とうし、振とう処理抗体サンプルとした。

[2] ELISA法による非天然型立体構造抗体検出系の構築

ELISA (Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay) 法は、サンドイッチ法により構築した (Fig. 2)。AF.2A1 固定化プレートは、固相合成法により合成したAF.2A1をグルタルアルデヒドによりウェルに固定化した後、ブロッキングを施し作製した。

測定は、濃度を調整した抗体サンプルをウェルに添加し、サンプル中の非天然型立体構造抗体をAF.2A1に結合させた。続いて結合した非天然型立体構造抗体に対してアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG Fabフラグメント抗体、およびアルカリフォスファターゼ基質を用いて検出した。

[3] 磁性ビーズを用いた自動測定装置による検出系の構築

前述[2]で構築した非天然型立体構造抗体のELISA検出系を、当社が開発したエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法による自動測定装置に適用するため、AF.2A1を固定化した磁性ビーズを作製した。AF.2A1固定化磁性ビーズを測定に必要な試薬と混合した後、凍結乾燥処理を施し、試薬カップを調製した。

酸処理前後のCHO細胞由来ヒトモノクローナル抗

体サンプルを用いて希釈系列を作製し、自動測定装置により測定した。測定条件として、サンプル結合反応 (20分) と二次抗体結合反応 (20分) の2段階反応を行うプログラムを用いた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識された抗体を使用し、酵素反応により基質が発するシグナルを測定した。

また、既存技術との比較として、同じ抗体サンプルをTSKgel® G3000SW_{XL} (東ソー製) を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 法により測定し、非天然型立体構造抗体と凝集体の検出範囲および検出限界を比較した。

[4] 各種ストレス処理抗体を用いた評価

ヒトモノクローナル抗体に対して酸、アルカリ、加熱、凍結融解、攪拌および振とうによるストレス処理を施した抗体サンプルを用いて、ELISA法により非天然型立体構造抗体量を測定した。比較として同じ抗体サンプルを用いて、静的光散乱 (SLS) 測定を行った。

[5] 凝集体形成過程に対する検証

凝集体形成の核となる非天然型立体構造抗体を測定することで、将来の抗体の凝集発生予測が可能であるかを検証するため、ELISA法と凝集粒子を測定するコールターカウンター法 (Beckman coulter 製) との比較試験を行った。加熱処理 (55℃) および未処理 (4℃) のヒトモノクローナル抗体サンプルを用いて、加熱処理開始から4時間後、1日後、3日後、7日後、15日後に採取し、非天然型立体構造抗体および凝集体 (3 μm以上の粒子数) を検出、測定した。

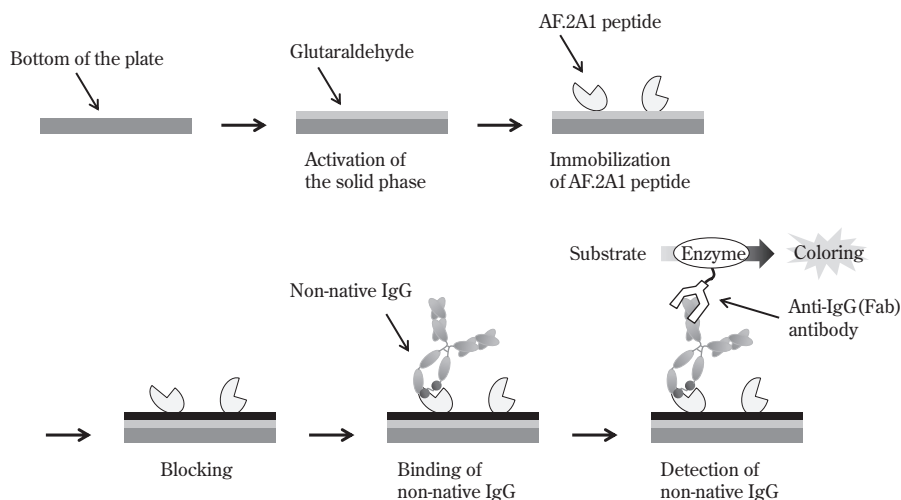


Fig. 2 Preparation of AF.2A1 immobilized plate and detection of non-native IgG

[6] 抗体医薬品分野への検討

(1) ヒトモノクローナル抗体の評価

加熱ストレス処理におけるモノクローナル抗体の安定性を評価した。0.5 mg/mL に調整した3種類の市販ヒトモノクローナル抗体 (mAb_A, B, C, いずれもサブクラス 1) に加熱処理 (50°C) を施し、処理開始から5時間後、24時間後、120時間後にELISA法で測定した。それぞれの抗体サンプルのシグナル変化から非天然型立体構造抗体が発生する様子を観察することで、熱に対する構造安定性を比較した。

(2) ヒト免疫グロブリン G (IgG) サブクラスの測定

ヒト免疫グロブリン G (IgG) のサブクラス 1, 2, 3 および 4 に対して ELISA 法による測定が可能であるかを検証した。酸処理および未処理の IgG の各サブクラスをサンプルとし、希釈系列を作製し ELISA 法で測定した。対照として AF.2A1 を固定化していないウェルで並行測定した。

(3) アフィニティクロマトグラフィーによる精製抗体の安定性評価

抗体産生 CHO 細胞培養液をプロテイン A 担体の充填カラムに通過させ、抗体を吸着させた。吸着させた抗体に対して、それぞれ pH の異なるリン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、グリシン-塩酸緩衝液、酢酸緩衝液を用いて溶出させ、中和処理を行った。各溶出液の抗体濃度を 0.1 mg/mL に調整し、溶出液中に含まれる非天然型立体構造抗体を ELISA 法により測定した。

3. 結果と考察

[1] 抗体サンプルの各種ストレス処理

ヒトモノクローナル抗体とポリクローナル抗体溶液に対して、酸、アルカリ、加熱、凍結融解、攪拌および振とうによるストレス処理を施した抗体サンプル

は、いずれも沈殿形成や白濁、あるいは着色することなく、目視で観察できる凝集体は生成しなかった。

[2] ELISA 法による非天然型立体構造抗体検出系の性能検証

AF.2A1 固定化プレートを用いた ELISA 法の結果から、添加した抗体濃度とシグナルの関係を Fig. 3 に示す。酸処理を施した抗体は 0.001 ~ 10 µg/mL の範囲において、抗体濃度依存的にシグナルが変化した。一方、酸処理しなかった抗体は、濃度によらずシグナルは低い値のまま一定であった。このことから、ELISA 法により酸処理抗体に含まれる非天然型立体構造抗体を特異的に検出できることを確認した。

[3] 自動測定装置による非天然型立体構造抗体検出系の性能検証

酸処理前後の抗体サンプルを、AF.2A1 を固定化した磁性ビーズを用いて自動測定装置により測定した (Fig. 4)。未処理抗体は抗体濃度によらずシグナルが低い値であったのに対し、酸処理抗体は抗体濃度依存的にシグナルが変化した。自動測定装置を用いた場合も ELISA プレートによる検出系と同様に、酸ストレスにより発生した非天然型立体構造抗体を特異的に検出可能であることを確認した。

また、未処理抗体に一定の割合で凝集体を混合したサンプルを、自動測定装置および SEC 法により測定した (Fig. 5)。SEC 法の結果では、サンプルに含まれる凝集体量が 1 ~ 1000 µg/mL の範囲において二量体以上の凝集体ピークが判別可能であり、検出限界は 1 µg/mL であった。一方、自動測定装置による結果では、凝集体量が 0.001 ~ 1 µg/mL の範囲において凝集体濃度とシグナルの相関が見られ、検出限界は 0.001 µg/mL 以下であった。このことから、AF.2A1 固定化磁性ビーズを用いた自動化装置による測定では、SEC 法の約 1000 倍の感度で凝集体および非天然

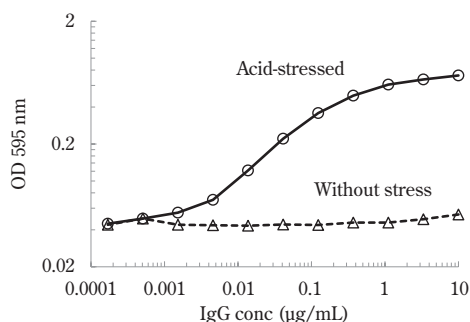


Fig. 3 AF.2A1 ELISA of IgG with and without stress treatment

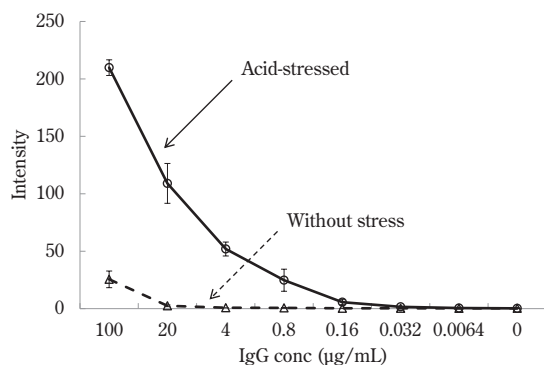


Fig. 4 EIA of IgG with and without acid treatment using automated equipment

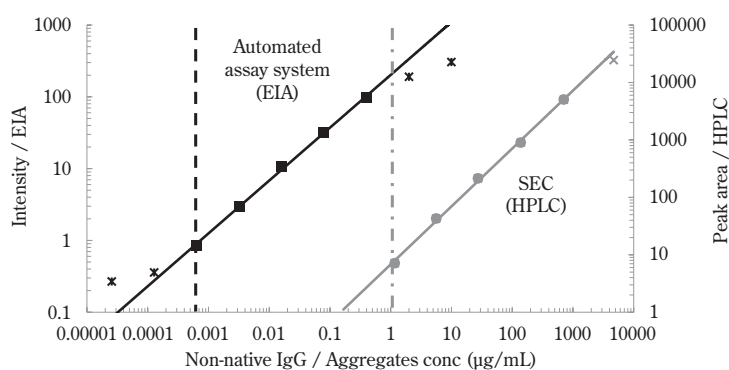


Fig. 5 Detection of non-native IgG and aggregates (EIA vs SEC)

型立体構造抗体を検出可能であることが示された。

[4] 各種ストレス処理抗体を用いた評価

測定の結果 (Fig. 6) から、ELISA 法では pH 4 以下のストレスを与えた場合、pH 5 以上の場合より高いシグナルを示し、また SLS 法においても pH 5 以上の場合より変性中点温度の低下が認められ、ELISA 法と SLS 法による結果に相関が見られた。一方、凍結融解や 50°C の熱ストレスを加えた場合は、ELISA 法

ではシグナルが増大したが、SLS 法では変性中点温度に変化がなかった。従って、SLS 法で測定できなかった微量の非天然型立体構造抗体を ELISA 法により検出できることが示された。

[5] 凝集体形成過程に対する検証

ヒトモノクローナル抗体を加熱処理 (55°C) および未処理 (4°C) 条件下で静置したときの、非天然型立体構造抗体および凝集体量 (3 µm 以上の粒子数) の

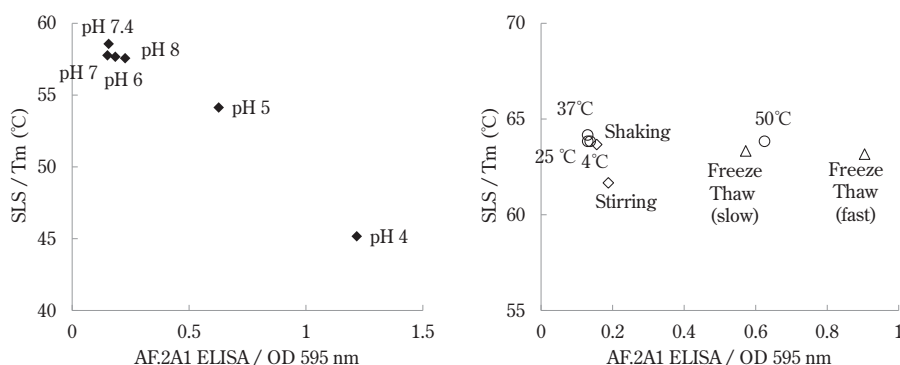


Fig. 6 Correlation between AF.2A1 ELISA and static light scattering

経時変化を、AF.2A1を用いたELISA法およびコールターカウンター法により測定した (Fig. 7)。ELISA法では、処理開始1日目から加熱処理抗体で高いシグナルとなり、非天然型立体構造抗体を検出した。一方、コールターカウンター法では、処理開始3日目まではほぼ凝集体が検出されなかったが、7日目以降、加熱処理抗体で凝集体が急激に増大した。また、未処理抗体をELISA法、コールターカウンター法で測定した場合、いずれの場合もシグナルが増加せず、非天然型立体構造抗体および凝集体は検出されなかった。以上の結果、ELISA法では、加熱処理後短時間で非天然型立体構造抗体が検出され、その後コールターカウンター法で凝集体が検出されたことから、凝集体の核となる非天然型立体構造抗体を検出することで、抗体凝集体形成の早期予測が可能であると考えられた。

[6] 抗体医薬品分野への検討

(1) ヒトモノクローナル抗体の評価

加熱処理 (50°C) および未処理 (4°C) 条件下で3種類のヒトモノクローナル抗体 (mAb_A, B, C) を静置し、継時的にAF.2A1を用いたELISA法で評価した (Fig. 8)。mAb_Bは、5時間後から120時間後までシグナルの変化が見られず、未処理抗体と同程度のシ

グナルであった。mAb_Cは、未処理抗体と比べてやや高いシグナルを示したが、処理時間の経過によるシグナルの変化は見られなかった。一方、mAb_Aは加熱処理開始5時間後の時点で未処理抗体よりも高いシグナルを示し、処理時間経過に伴い増大した。このことから、mAb_AはmAb_BとmAb_Cに比べて熱に対して構造が不安定であり、非天然型立体構造抗体が発生しやすいことが示された。ELISA法により、特定のストレス条件下における抗体の構造安定性を比較評価できると考えられた。

(2) ヒト免疫グロブリン G (IgG) サブクラスの測定

酸処理を施したヒトIgGサブクラス1, 2, 3および4のAF.2A1を用いたELISA法の結果を Fig. 9 に示す。AF.2A1を固定していないプレートでは抗体濃度によらずシグナルは低い値のまま変化しなかった。一方、AF.2A1固定化プレートではいずれのサブクラスも抗体濃度依存的にシグナルが変化し、非天然型立体構造抗体を検出できることが示された。同様に未処理のIgGサブクラスについても測定したが、抗体濃度によらずシグナルはほぼ一定であり非天然型立体構造抗体は検出されなかった (Data not shown)。サブクラスの種類によりシグナル変化に違いが見られたが、それ

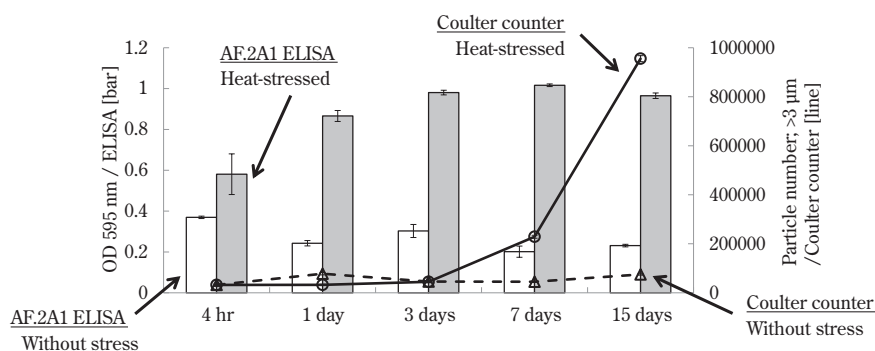


Fig. 7 Correlation between AF.2A1 ELISA and Coulter counter

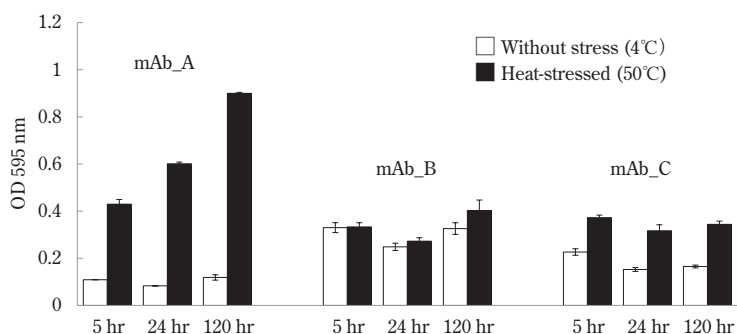


Fig. 8 Heat-stability of several types of monoclonal IgG

それぞれのサブクラスの酸ストレス条件下における非天然型立体構造抗体の発生しやすさが異なること、あるいはAF.2A1との結合性が異なることが影響していると推察された。

(3) アフィニティクロマトグラフィーによる精製抗体の安定性評価

抗体溶出時に用いた緩衝液のpHや種類によりELISA法のシグナル強度差があり、精製抗体溶液の非天然型立体構造抗体の含有比率が異なっていた(Fig.10)。pH 3.5の溶出液を用いた場合、グリシン塩酸緩衝液と酢酸緩衝液に比べてリン酸緩衝液とクエン酸緩衝液を用いた方が非天然型立体構造抗体の発生量が少なかった。このことから、pH 3.5で抗体を溶出する場合、ストレスが最も抑えられる緩衝液はリン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液である可能性が示された。抗体の凝集抑制を目的とした最適な緩衝液選択のための判断指標として、AF.2A1を用いたELISA法が

有用であると考えられた。

4. まとめ

凝集体形成の要因となる非天然型立体構造抗体に特異的に結合するペプチドAF.2A1を利用した抗体医薬品分析用のELISA法を開発した。AF.2A1を用いたELISA法により、酸や加熱などのストレス処理を施した抗体に含まれる非天然型立体構造抗体を特異的に検出可能であることを確認した。SEC法またはSLS法との比較により、開発したELISA法が既存の凝集体検出技術、抗体安定性評価技術と相関があり、さらに既存分析技術では検出限界以下の凝集体やその核となる非天然型立体構造抗体を高感度に検出できる点において優位であることを確認した。また、コールターカウンター法との比較試験の結果から、ELISA法により凝集体形成前の立体構造変化を検出することで、凝集体形成の早期段階をモニタリングでき、凝集予測に有

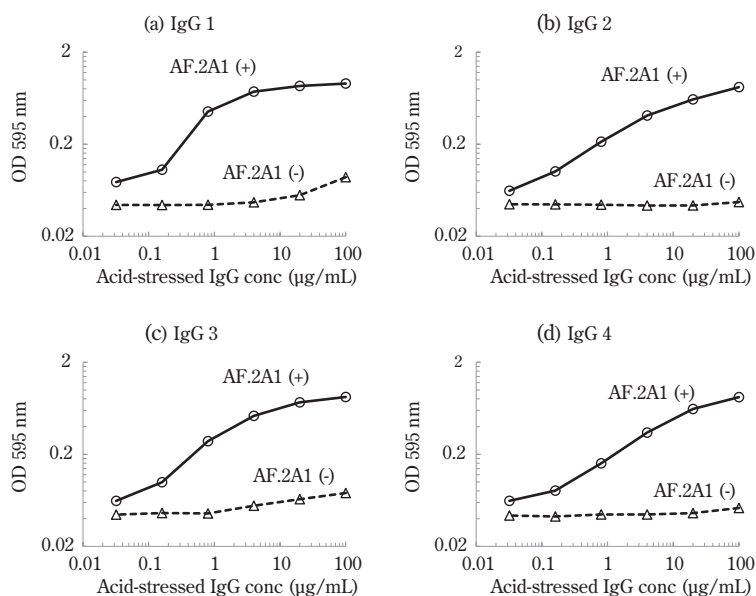


Fig. 9 Detection of human IgG subclass

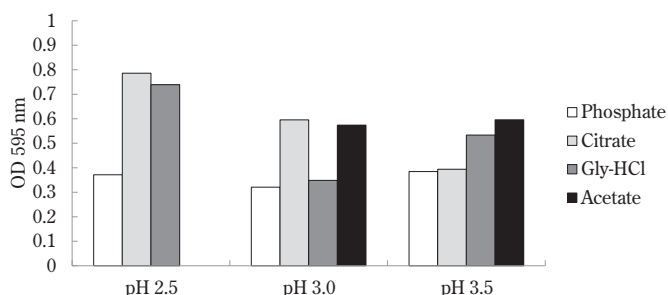


Fig.10 IgG stability in elution buffer of affinity chromatography

用であることを示した。

AF.2A1 を用いた ELISA 法により、抗体医薬品の創薬研究や製造プロセス開発における分析、製剤化へ向けた条件検討、製品の品質管理といった様々な場面への適用が可能である。創薬研究では、多数の候補抗体の中から高安定性抗体を選抜する、あるいは目的の抗体を最も安定した状態で産生できる細胞をスクリーニングするなどの利用法が考えられる。また、製造プロセス開発では構造安定性が高い抗体を得られるような培養パラメータや精製プロセスの最適化に、製剤化においては抗体濃度や保存溶液の種類などの条件最適化のために利用可能である。さらに、製造プロセスの工程管理や製剤の品質管理において凝集体形成リスクを評価するためにも利用できる。

5. 謝 辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成 25 年度産業技術実用化開発事業費補助金（個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び平成 26 年度産業技術実用化開発事業費補助金（次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われた。

また、本技術の開発にあたり、多数のご助言、ご協力を頂きました木津奈都子研究員および国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門の本田真也氏、渡邊秀樹氏、千賀由佳子氏、宮房孝光氏に大変感謝いたします。

6. 参考文献

- 1a) Volkin, D., Hershenson, S., Ho, R., Uchiyama, S., Winter, G. & Carpenter, J., *J. Pharm. Sci.*, 104 (2) , 290-300 (2014)
- 1b) 原園景, 橋井則貴, 川崎ナナ, 新見伸吾, 石井明子, 伊豆津健一, 有効性・安全性確保のためのバイオ医薬品の品質管理戦略, 7-56 (2015)
- 2a) Hari, SB., Lau, H., Razinkov, VI., Chen, S. & Latypov, RF., *Biochem*, 49, 9328-9338 (2010)
- 2b) Uchiyama, S., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1844, 2041-2052 (2014)
- 3a) Roberts, CJ., *Trends in Biotech.*, 32 (7) , 372-380 (2014)
- 3b) Roberts, CJ., *Current Opinion in Biotech.*, 30, 211-217 (2014)
- 4a) Rosenberg, AS., *AAPS J.*, 8 (3) , E501-E507 (2006)
- 4b) Singh, SK., *J. Pharm. Sci.*, 100(2) , 354-387 (2011)
- 5a) Mahler, HC, Friess, W, Grauschopf, U. & Kiese, S., *J. Pharm. Sci.*, 98 (9) , 2909-2934 (2009)
- 5b) Arakawa, T., Philo, JS., Ejima, D., Tsumoto, K. & Arisaka, F., *Bio Process International*, 4(10) , 42-43 (2006)
- 5c) Arakawa, T., Philo, JS., Ejima, D., Tsumoto, K. & Arisaka, F., *Bio Process International* (2007)
- 5c) Arakawa, T., Philo, JS., Ejima, D., Tsumoto, K. & Arisaka, F., *Bio Process International* (2007)
- 6a) Watanabe, H., Yamasaki, K. & Honda, S., *J. Biol. Chem.*, 289, 3394-3404 (2014)
- 6b) Watanabe, H., Yageta, S., Imamura, H. & Honda, S., *Anal. Chem.*, 88, 10095-10101 (2016)