

# 学 位 論 文 の 要 旨

相補性決定領域に切断を有するモノクローナル抗体バリエーション: 非変性条件下における単離方法の確立及び網羅的特性解析

(Monoclonal antibody variant having a clip in its complementarity determining region: establishment of purification under non-denaturing conditions and comprehensive characterization)

氏 名 渥美 由梨子

治療用モノクローナル抗体 (monoclonal antibody; mAb) に含まれる切断体は、モニタリングが必要とされる重要品質特性 (critical quality attribute; CQA) の 1 つであり、有効性及び安全性のために管理する必要がある。抗体分子においては、ヒンジ領域におけるペプチド結合の切断に加え、相補性決定領域 (Complementarity Determining Region; CDR) におけるペプチド結合の切断もいくつか報告されている。しかしながら、CDR にペプチド結合の切断 (クリップ) を有する抗体分子 (CDR クリップ抗体と称する) は、ペプチド結合の切断を有さない抗体分子 (インタクト抗体と称する) とのサイズの違いが限定的であり、非変性条件下でインタクト抗体から分離することが難しく、その特性はこれまでにほとんど理解されていなかった。

本研究では、非変性条件下で CDR クリップ抗体を高純度で単離/回収可能な方法を、適切なサイズ排除クロマトグラフィーカラム (Yarra SEC-300) を選定することによって、まず確立した。また、CDR クリップ抗体では重鎖の Ser105-Ser106 間のペプチド結合 (CDR H3 に存在する) が切断されていること、切断後も残基 1-105 の断片と残基 1-105 を欠く抗体分子は非共有結合的に会合している事を示した。CDR クリップ抗体は Yarra SEC-300 カラムでインタクト抗体よりも短い時間で溶出されるが、クリップの有無にかかわらず流体力学半径に大差はないと考えられるので、溶出時間の差は固定相との相互作用 (特に疎水性相互作用) の違いに起因すると予想された。実際に、エタノール (疎水性相互作用を弱める) の移動相への 5% 添加が溶出時間の短縮に及ぼす効果はインタクト抗体の方が CDR クリップ抗体よりも約 2 倍大きかった。

次に、この方法により単離/回収した CDR クリップ抗体を用いて、CDR におけるクリップ形成が抗体分子の機能・性質に与える影響を解析した。その結果、CDR クリップ抗体では、各種機能の低下が観測された。具体的には、クリップ形成により抗原 (VEGF) への親和性が 2/3 に低下し、胎児性 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor, FcRn; 抗体の血中半減期を延長させる) への親和性も 2/3 に低下していることが Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) で明らかになった。更に、Fc $\gamma$  受容体 (B リンパ球・マクロファージ・好中球など多種の細胞表面に存在し、免疫系による保護機能に寄与する) への親和性がクリップ形成により低下していることが Fc $\gamma$ RIIIa アフィニティークロマトグラフィーによって明らかとなった。また、CDR クリップ抗体では、タンパク質としての安定性の低下も観測された。クリップ形成により、モノマー安定性の低下を反映するダイマー化が 10 倍以上高まったほか、Fab (antigen binding fragment) ドメインの熱転移温度が 6 °C も低下した。そのうえ、各種性

質の変化 [Fab ドメインの疎水性低下、メチオニン酸化体・脱アミド体・シアロ糖鎖・ガラクトシル糖鎖・酸性電荷異性体の増加 (等電点の低下)] が観測された。

FcRn 及び Fcγ 受容体への親和性低下は、CDR におけるクリップ形成が CH2 領域まで伝達され得る可能性を示唆している。そこで、抗体分子の高次構造が CDR のクリップ形成で変化するのかを水素-重水素交換質量分析 (HDX-MS) を用いて解析した。その結果、CDR のクリップ形成により重鎖及び軽鎖の可変領域 (VH/VL) 及び CH2 ドメインの一部に高次構造変化が認められた。すなわち、CDR H3 でのクリップ形成が VH ドメインの高次構造を変化させるだけでなく、VL ドメイン、更には CH2 ドメインの高次構造まで変化させて、FcRn 結合や Fcγ 受容体結合という活性にまで影響し得ることが明らかとなった。さらに、その変化が抗体分子に様々な影響を与えている可能性が示唆された。

CDR でのクリップ形成が抗体分子の機能・性質にどのような影響を与えるかは今まで解析出来なかった。そのため、抗体医薬品において CDR クリップ抗体を管理する必要があるか否かは不明確であった。本研究は、CDR のクリップ形成が、抗体医薬品としての活性・有効性・安全性・免疫原性・薬物動態、その他各種性質という広い範囲に渡って影響を及ぼすことを示した。従って、抗体医薬品において、CDR クリップ抗体の含量を制御し、適切に管理する必要があることが明らかとなった。以上のことから、本研究の成果は、抗体医薬品の品質管理において重要な知見となり、抗体医薬品の有効性・安全性の向上に寄与すると考えられる。

# 学 位 論 文 の 要 旨

相補性決定領域に切断を有するモノクローナル抗体バリエント：非変性条件下における単離方法の確立及び網羅的特性解析

(Monoclonal antibody variant having a clip in its complementarity determining region: establishment of purification under non-denaturing conditions and comprehensive characterization)

氏 名 渥美 由梨子

Fragments in pharmaceutical monoclonal antibody (mAb) products are one of critical quality attributes (CQAs) and are required to be controlled for efficacy and safety. Several mAb fragments derived from clip formation in the complementarity determining regions (CDRs), as well as from cleavage in the hinge region, have been reported. The properties of CDR-clipped mAbs are, however, not fully understood because of difficulties in separating them from intact mAbs under native conditions due to similarities in molecular sizes.

First, I succeeded in isolating CDR-clipped mAb at a high purity under native conditions by selecting an appropriate size exclusion chromatography (SEC) column (Yarra SEC-300), by taking advantage of the phenomena that the separation of CDR-clipped mAb from the intact mAb by SEC varied from column to column. Then I demonstrated that the peptide bond between Ser105 and Ser106, located in the CDR H3, is cleaved in the clipped mAb and that the fragment of residues 1–105 and residual mAb are associated non-covalently in the clipped mAb. The clipped mAb elutes earlier than does the intact mAb on the Yarra SEC-300 column. This difference in the elution times was expected to be ascribable to the different intermolecular (hydrophobic) interactions between mAbs and the stationary phase of the column. In fact, the effect of the addition of 5% ethanol in the mobile phase, which weakens the hydrophobic interactions, on the shortening of the elution time, was larger for the intact mAb than for the clipped mAb by about a factor of two.

Second, by comparing the CDR-clipped mAb thus prepared with the intact one, I carried out a comprehensive characterization for physicochemical and biological properties of a CDR-clipped mAb. The clip formation was found to decrease various activities of the mAb. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) demonstrated that the clip formation decreased the affinity of the mAb to the antigen VEGF by about 1/3. ELISA also showed that the clip formation decreased the affinity of the mAb to neonatal Fc receptor, FcRn, which serves to elongate the half-life of antibody in blood stream, by about 1/3. FcγRIIIa affinity chromatography demonstrated that the clip formation lowers the affinity of the mAb to FcγR, which is expressed on the surface of various cells such as B lymphocytes, macrophages, and neutrophils, and contribute to various protective functions by immune system. In addition, the clip formation results in the lower protein stability of the mAb: the clipped mAb exhibited higher tendency to

form dimers by a factor of ten or more, the phenomenon reflecting the lowered monomer stability. The thermal transition temperature of the antigen binding fragment (Fab) was lowered by 6 °C by the clip formation. Furthermore, the clip formation was found to change various properties of mAb: lowered hydrophobicity of the Fab domain, the increase in oxidized species, deamidated species, sialylated N-glycan, galactosylated N-glycan, and the acidic charge variants. Because FcRn (FcγR) binds IgG by its CH2-CH3 (CH2) domain, the clip formation in CDR is considered to change the structure of the CH2-CH3 (CH2) domain to decrease the affinity for the FcRn (FcγR). To investigate whether the clip formation in the CDR is propagated to the CH2 domain over a 60-Å distance, we compared the higher order structures of the CDR-clipped molecule and the intact molecule by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS). I observed changes in the structures of the variable regions of heavy chain and light chain (VH/VL) and the CH2 domain. This observation reveals that the structural changes in CDR propagate to the binding interface of IgG to FcRn (FcγR) in the CH2 domain.

My study has demonstrated the clip formation in CDR can influence the efficacy, safety, immunogenicity, pharmacokinetics, and other properties of pharmaceutical mAbs. Therefore, the monitoring of the fragments produced by clipping in CDR region would be critical to control the quality of pharmaceutical products.