

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

2022年

令和4年

学籍番号 T162A001

渥美 由梨子

By Yuriko Atsumi

Doctor Thesis

群馬大学 大学院理工学府

Gunma University

要旨

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 γ 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 γ RIIIa アフィニティ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 Fc γ 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 Fc γ 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。

Abstract

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. Fc γ RIIIa affinity chromatography demonstrated that the clip formation lowers the affinity of the mAb to Fc γ R, 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 (Fc γ R) 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 (Fc γ R). 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 (Fc γ R) 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.

目次

1	緒論	1
1.1	抗体医薬品の概要	1
1.2	抗体医薬品の切断体	3
1.3	本研究の内容・成果	9
2	抗体分子の CDR クリップ部位の同定及び CDR にクリップを有する抗体分子の非変性条件下における単離方法の確立	16
2.1	方法	17
2.1.1	熱処理サンプルの調製	17
2.1.2	キャピラリードデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動 (Capillary Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate; CE-SDS)	17
2.1.3	サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography; SEC)	17
2.1.4	インタクト質量分析	18
2.1.5	ペプチドマップ質量分析	18
2.2	結果及び考察	19
2.2.1	熱処理したベバシズマブの CE-SDS 分析	19
2.2.2	SEC カラムの選定	22
2.2.3	インタクト質量分析によるクリップを有する抗体分子の同定	25
2.2.4	ペプチドマップ質量分析によるクリップ箇所の同定	28
2.2.5	CDR クリップ抗体と重鎖 N 末端フラグメントの結合様式	30
2.2.6	CDR のクリップ形成による SEC 保持時間への影響	33
2.3	小括	36
3	CDR にクリップを有する抗体分子の網羅的特性解析	37
3.1	方法	37
3.1.1	サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)	37
3.1.2	示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry; DSC)	38
3.1.3	ペプチドマップ質量分析による各異性体・修飾体含量の算出	38
3.1.4	糖鎖プロファイル試験	38
3.1.5	疎水クロマトグラフィー (Hydrophobic Interaction Chromatography; HIC)	39
3.1.6	イメージキャピラリー等電点電気泳動 (Imaged Capillary Isoelectric Focusing; icIEF)	39
3.1.7	抗原アフィニティー-Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	39
3.1.8	胎児性 Fc 受容体 (FcRn) アフィニティー-ELISA	40
3.1.9	FcγRIIIa アフィニティー-クロマトグラフィー	40
3.1.10	水素-重水素交換質量分析 (Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry; HDX-MS)	41
3.2	結果及び考察	42
3.2.1	CDR クリップ形成によるダイマー形成の促進	42
3.2.2	CDR クリップ形成による Fab ドメインの熱安定性低下	44
3.2.3	CDR クリップ形成による翻訳後修飾の変化	44
3.2.3.1	N 末端異性化・C 末端異性化・メチオニン酸化・脱アミド化	45
3.2.3.2	N-結合型糖鎖多型	47
3.2.4	CDR クリップ形成による Fab ドメインの疎水性低下	48
3.2.5	CDR クリップ形成による酸性電荷異性体の増加 (等電点の低下)	48
3.2.6	CDR クリップ形成による抗原親和性の低下	50
3.2.7	CDR クリップ形成による FcRn 親和性の低下	51
3.2.8	CDR クリップ形成による Fcγ 受容体親和性の低下	52
3.2.9	CDR クリップ形成による抗体分子の高次構造への影響	54
3.2.10	CDR クリップ形成による構造変化と抗体分子の機能・性質への影響	66
3.3	小括	70

目次

4	結論	71
5	論文	73
6	謝辞	74
7	引用文献	75

1 緒論

1.1 抗体医薬品の概要

抗体は、2本の軽鎖（Light chain; LC）及び2本の重鎖（Heavy chain; HL）からなる計4本のポリペプチド鎖を基本構造とする質量約 150kDa の巨大なタンパク質である（図 1）。翻訳後修飾として、軽鎖及び重鎖の鎖内、重鎖-軽鎖の鎖間及び重鎖-重鎖の鎖間にはジスルフィド結合を有し、重鎖 N 末端から約 300 番目のアスパラギン残基には N-結合型糖鎖が結合している。4本のポリペプチド鎖には、アミノ酸配列が非常に高い相同性を示す定常領域（constant region: CH1, CH2, CH3/CL）及びアミノ酸配列の相同性が低い可変領域（variable region: VH/VL）が存在する。可変部位は抗原結合部位である相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）を含み（図 2）、CDR は重鎖及び軽鎖にそれぞれ3箇所ずつ存在する。また、パパインによりヒンジ領域の上部で切断した場合に生じる定常領域側を Fc（crystallizable fragment）ドメイン、抗原結合部位を含む領域側を Fab（antigen binding fragment）ドメインと称する。

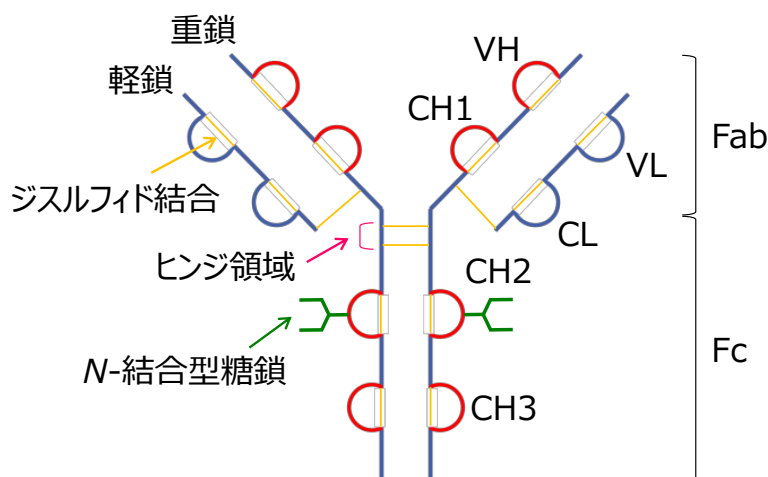


図 1 抗体の基本構造

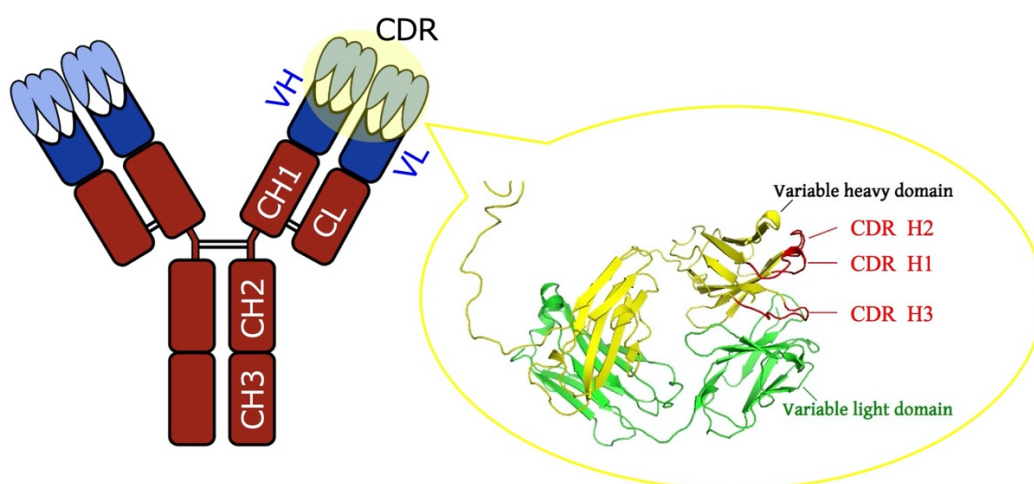


図 2 抗体の可変領域の位置及び重鎖 CDR の拡大図

出典：「相補性決定領域」『フリー百科事典 ウィキペディア日本語版』（<http://ja.wikipedia.org/>）。2022年5月25日15時（日本時間）現在での最新版より改変。

抗体は特定の分子を抗原として認識して結合する、細菌及びウイルス等の感染や増殖を防ぐ等の機能を有し、その抗体の性質を利用した医薬品が抗体医薬品である。治療用モノクローナル抗体 (monoclonal antibody; mAb) は、他の治療用タンパク質と同様に、CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞) 等に組み換え DNA 技術を適用することにより生産される非常に複雑な医薬品であり^(1,2)、がんや自己免疫疾患などの様々な治療に広く使用されている⁽³⁾。抗体は一般的に血中半減期が長く、特異性が高いため、抗体医薬品は低分子医薬品に比べ、臨床試験における予想外の安全性リスクは低い⁽⁴⁾。従って、その世界市場は成長し続けている^(3,5,6) (図 3)。

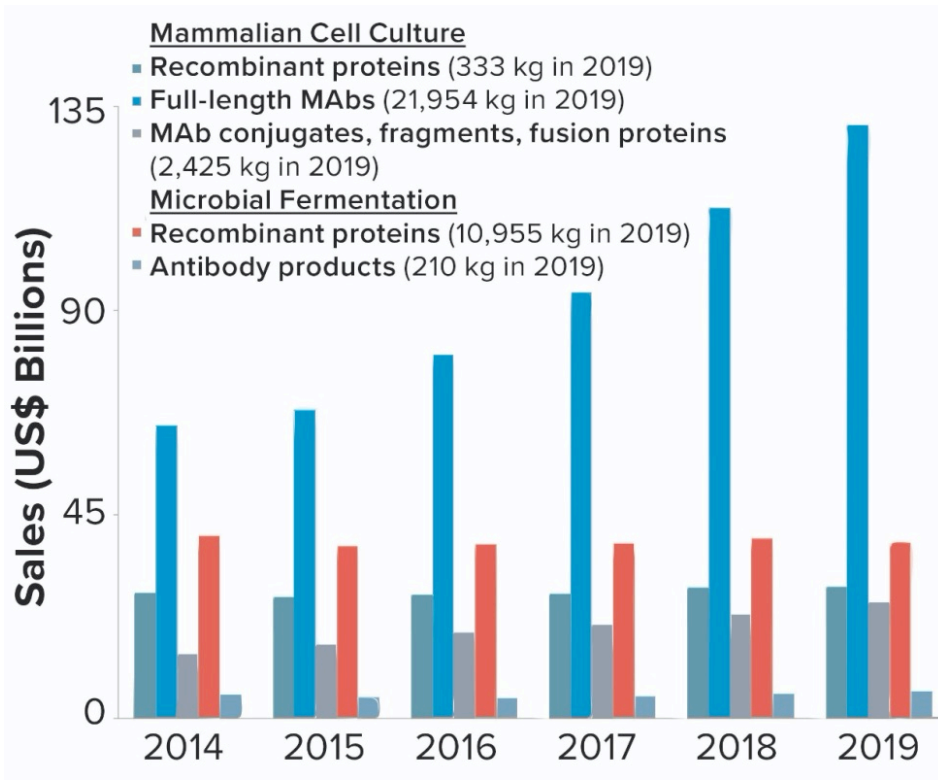


図 3 バイオ医薬品の年間総売上高

出典 : <https://bioprocessintl.com>

抗体医薬品は、低分子医薬品と比較して、巨大で複雑な分子であるため、多くの物理的及び化学的要因がその品質に影響する可能性があり、生産・精製・保存の間、及び投与後に生じる翻訳後修飾 (post-translational modification; PTM) の結果、不均一な物質となる^(7,8,9,10)。そのため、抗体医薬品は複数の品質特性 (Quality Attribute; QA) が規定されている (表 1)。品質特性の中でも、活性・有効性・安全性・免疫原性・薬物動態 (pharmacokinetics; PK) に影響を与える可能性がある特性は、重要品質特性 (Critical Quality Attribute; CQA) と呼ばれる。要求される製品品質を保証するため、CQA は適切な限度内・範囲内・分布内に収まっていることが求められる^(11,12)。CQA は、製造工程及び安定性の観点でのインパクトに基づいたリスクアセスメントにより、管理 (製品規格による管理) 及びモニタリングが必要とされる^(13,14)。個々の CQA を評価するには、適切な分析法が必要であり、各品質特性に対して、複数の分析法が用いられている⁽¹⁵⁾。抗体医薬品の各品質特性に対する代表的な分析法を表 2 に示す。

表 1 抗体医薬品の代表的な品質特性 (Quality Attribute; QA)

分類	品質特性 (QA)
サイズバリエーション	凝集体、切断体
電荷異性体	脱アミド体、異性化 (Asp→iso-Asp)、糖化体、C 末端異性体 (リジン欠損、アミド化プロリン)、N 末端異性体 (ピログルタミル化)
酸化体	メチオニン酸化体、トリプトファン酸化体
糖鎖バリエーション	N-糖鎖型糖鎖非結合体、糖鎖多型 (シアル化、ハイマンノース体、Afucosylation、Galactosylation)
システイン結合バリエーション	フリーチオール (-SH)、チオエーテル (-S-)、トリスルフィド (-S-S-S-)

表 2 抗体医薬品の代表的な分析方法

品質特性 (QA)	分析法
凝集体	サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、多角度光散乱法 (MALS)、超遠心分析 (AUC)、フィールドフローフラクショネーション (FFF)
切断体	サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、キャピラリー SDS ゲル電気泳動 (CE-SDS)、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)
電荷異性体	等電点電気泳動 (IEF)、イオン交換クロマトグラフィー (IEX)、ペプチドマップ質量分析
酸化体	疎水クロマトグラフィー (HIC)、逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC)、プロテイン A クロマトグラフィー、ペプチドマップ質量分析
N 末端・C 末端異性体	イオン交換クロマトグラフィー (IEX)、ペプチドマップ質量分析
糖化体	ボロネートアフィニティークロマトグラフィー (BAC)
糖鎖多型	親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)、逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC)
フリーチオール	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 法、4,4'-Dithiodipyridine (4-PDS)法

1.2 抗体医薬品の切断体

本研究では、抗体医薬品に含まれる切断体に着目した。以下に示すように、切断体は抗体医薬品において、その活性・有効性・安全性・免疫原性・薬物動態に影響する可能性があることから、重要品質特性 (CQA) の 1 つとされている。

- 活性・有効性：静注用免疫グロブリン製剤において、切断体含量の増加により活性が低下することが報告されている⁽¹⁶⁾。
- 安全性・免疫原性：切断体がエピトープとして認識されることにより抗原性を示す可能性が報告されている⁽¹⁷⁾。
- 薬物動態 (PK)：ヒンジ領域の分解で生じた Fab 断片は、PK プロファイルに影響を与えることが確認されており、血中半減期は切断部位に依存すると考察されている⁽¹⁸⁾。

タンパク質のペプチド結合は、生理的条件下では極めて安定であるが、アミノ酸配列 (切断を促進し得る特定の側鎖の存在)、局所構造の柔軟性、溶媒条件 (pH 及び温度)、金属やラジカルの存在により、特定の部位が切断されやすくなることがある。Liu らによる包括的な研究⁽¹⁹⁾や抗体の切断に関する他の報告^(17,20,21,22)によると、mAb のペプチド結合の切断のほとんどは、アスパラギン酸 (Asp)、グリシン (Gly)、セリン (Ser)、チロシン (Thr)、システイン (Cys) 及びアスパラギン酸 (Asn) 残基のいずれかで起こる。ペプチド結合の切断に関与する残基及び条件に関する文献の概要を表 3⁽²³⁾に示す。

表3 ペプチド結合の切断に関与する残基及び条件に関する文献の概要⁽²³⁾

残基	ペプチド結合	切断されやすい残基	解析対象	pH	温度	参考文献
Asp	Asp-Xaa	Xaa: Gly	hexapeptide	0.3-10	37 °C	24
		Xaa: Ser, Gly, Val	hexapeptide	1.0, 10.0	70 °C	25
		Xaa: Tyr, Ser, Phe	glucagon	1.0-2.4	60 °C	26
		Xaa: Pro	—	—	—	27
		Xaa: Gln, Pro, Lys, Leu	decapeptide	4.0-5.5	25 °C, 40 °C, 60 °C	28
		Xaa: Asp	IgG2	5.2	4 °C, 25 °C, 45 °C	22
	Xaa-Asp	Xaa: Pro, Gly	hexapeptide	1.0, 10.0	70 °C	25
Gly	Gly-Xaa	Xaa: Gly, Ala, Leu, Val	dipeptide	12.6	30 °C	29
	Xaa-Gly	Xaa: Ala, Leu, Ser				
Thr	Gly-Thr	—				
Ser	Xaa-Ser	Xaa: Gly, Ala, Leu				
	Xaa-Ser	—	—	alkaline	—	30
Cys-Cys	Xaa-Cys	—	IgG1	7-10	45 °C	21
Asn	Asn-Xaa	Xaa: Ser, Val, Leu, Pro	hexapeptide	7.5, 10	37 °C	31

IgG のペプチド結合の切断箇所について、ヒンジ領域、定常領域及び可変領域に分けて説明する。

1) ヒンジ領域

IgG のヒンジ領域のペプチド結合は非酵素的切断を受け、desFab 及び Fab フラグメントを生成する^(17,21,23,32,33) (図4)。多くの抗体医薬品の処方 pH である pH 5-7 では、切断はヒンジ上部の S₂₁₉C₂₂₀D₂₂₁K₂₂₂T₂₂₃H₂₂₄T₂₂₅C₂₂₆ 配列に均等に分布するが、一般的には D₂₂₁-K₂₂₂ 間及び H₂₂₄-T₂₂₅ 間でより強い切断が見られる^(17,19,34)。また、ヒンジ領域の切断は、著しい pH 依存性を示す^(19,21,32)。通常、pH 6 付近では切断は最小であるが、塩基性と酸性の両方において、切断は著しく増加する。

この切断の生成物である desFab 及び Fab は、非変性下でサイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography; SEC) によってインタクトな抗体分子から簡単に分離することが可能であり、これらの生成物の生物活性はそれぞれ低い又は全くないことが知られている⁽¹⁸⁾。従って、ヒンジ領域における抗体分子の切断については広く研究されており、抗体医薬品において、抗体分子の切断はそのタンパク質の純度及び均一性を評価するために、モニタリングが必要な重要品質特性 (CQA) とされている⁽²³⁾。

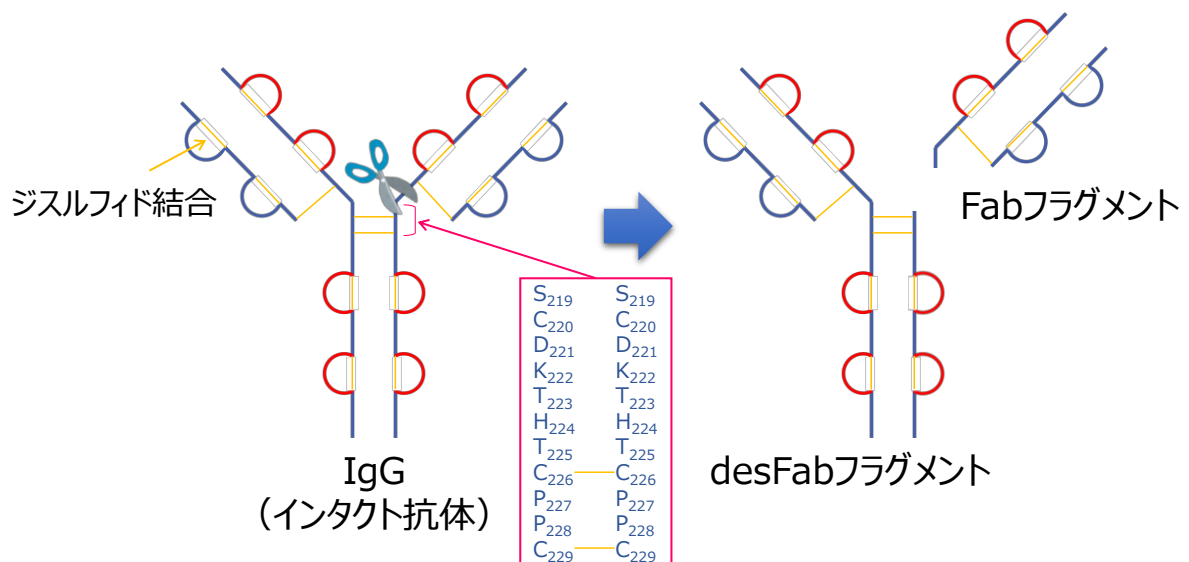


図4 desFab フラグメント及び Fab フラグメントの構造

2) 定常領域

ヒンジ領域における切断と比較すると、定常領域におけるペプチド結合の切断に関する情報は限られている。pH はヒンジ領域の切断と同様に定常領域の切断においても重要な因子である。pH 7 以上では、CH1 ドメインの K₁₃₃STSGGT が、ヒンジ領域を含む IgG で最も多く存在する切断部位となることが報告されている⁽¹⁹⁾。また、CH2 ドメイン内の G₂₃₆-G₂₃₇^(19,32)及び D₂₇₀-P₂₇₁^(35,36,37)の切断は、pH 5 で始まり、pH が下がると劇的に増加する。重鎖及び軽鎖の両方で他の多くの切断部位^(19,38,39,40)、特にドメイン-ドメイン界面が複数報告されている^(19,39)。

3) 可変領域

可変領域の中でも、特に相補性決定領域 (Complementarity Determining Region; CDR) は各抗体に固有であるため、ペプチド結合の加水分解に対する感受性も大きく異なることが予想される。IgG ではヒンジ領域での切断に加え、CDR での切断も報告されている^(22,41,42,43)。CDR に切断 (クリップ) を有する抗体分子 (CDR クリップ抗体) の活性は、クリップを持たないインタクトな抗体分子 (インタクト抗体) の活性よりも低いと予想されるが、その活性及び安定性についてはこれまでにほとんど解明されていない⁽²³⁾。これは、CDR クリップ抗体とインタクト抗体のサイズの違いが限定的であることから、非変性条件下で CDR クリップ抗体をインタクト抗体から分離することが困難なためである。

抗体分子の切断体は、一般的に、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)、キャピラリーSDS ゲル電気泳動 (Capillary Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate; CE-SDS)⁽⁴⁴⁾等により分析される (表 2)。

1) SEC

定量性が良いものの、分離可能な分子はダイマー等の凝集体や Fab・desFab などの分子サイズがインタクト抗体と大きく異なる切断体に限定されている (図 5)。そのため、切断体よりも凝集体の定量法として汎用されている。

2) SDS-PAGE

操作が煩雑であり、分離が悪く、ゲルの画像から定量を行うため定量性が乏しく、定量法としては適していない。

3) CE-SDS

SDS-PAGEと同様に分子ふるい効果を持つ SDS 含有ポリマーをキャピラリーに充填することでサンプルを分子サイズで分離する試験法であり、分離能及び定量性が高いことから、現在、抗体医薬品の切断体の定量法として広く用いられている⁽²³⁾ (図 6 及び図 7)。

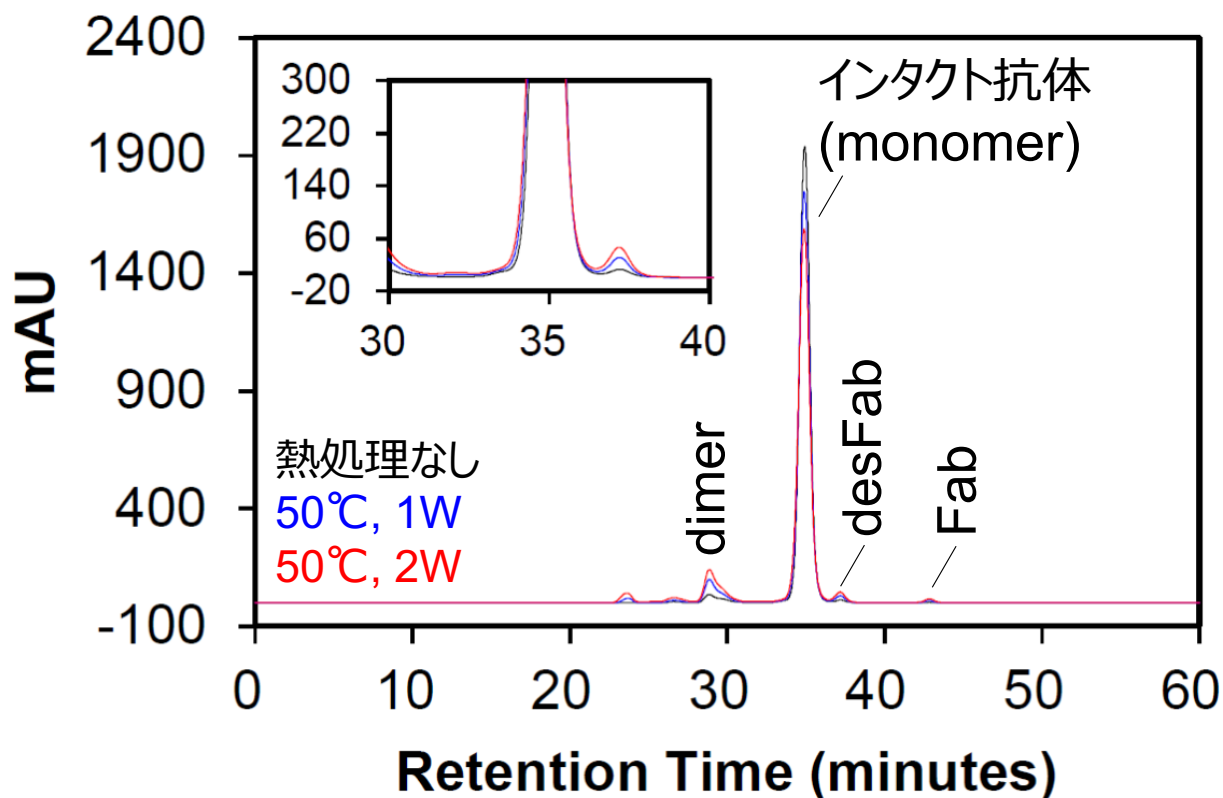


図 5 抗体分子の SEC のクロマトグラム (insert は拡大図)

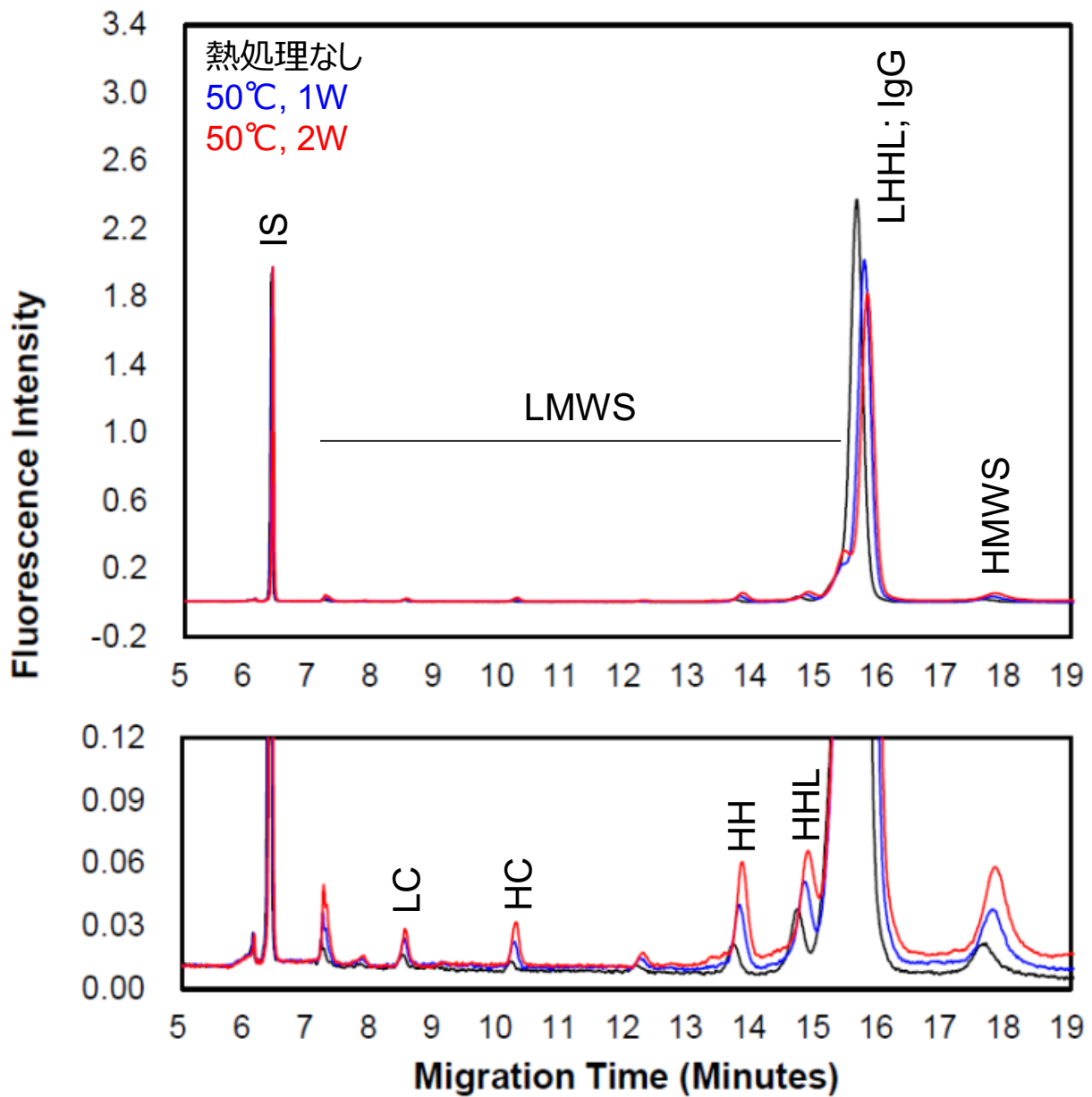


図6 抗体分子の非還元 CE-SDS のエレクトロフェログラム (下は拡大図)

IS : Internal Standard (内部標準), LMWS : Low Molecular Weight Species, LHHL : 重鎖 2 本+軽鎖 2 本, HMWS : High Molecular Weight Species, LC : 軽鎖, HC : 重鎖, HH : 重鎖 2 本, HHL : 重鎖 2 本+軽鎖

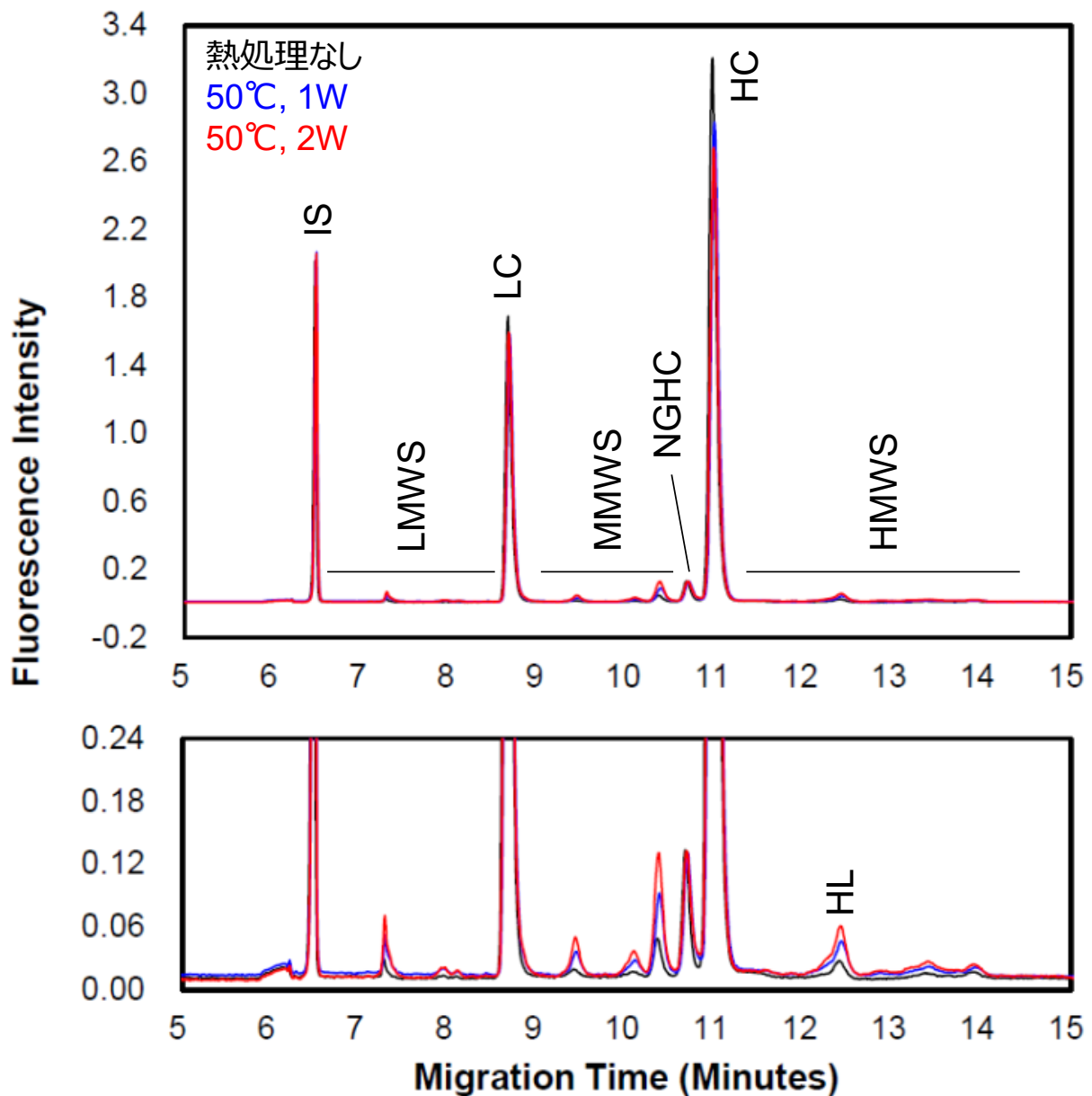


図7 抗体分子の還元 CE-SDS のエレクトロフェログラム (下は拡大図)

IS : Internal Standard (内部標準), LMWS : Low Molecular Weight Species, LC : 軽鎖, MMWS : Middle Molecular Weight Species, NGHC : Non-Glycosylated Heavy Chain (糖鎖非結合重鎖), HC : 重鎖, HMWS : High Molecular Weight Species, HL : 重鎖+軽鎖

抗体分子は、重鎖及び軽鎖のそれぞれの鎖内にジスルフィド結合を有する。そのため、鎖内ジスルフィド結合で結合したシステイン残基とシステイン残基の間のアミノ酸配列上で切断が生じていた場合、非還元条件では鎖内ジスルフィド結合で繋がっているため、切断体は検出されない(図8)。一方、還元条件では鎖内ジスルフィド結合が切断されているため、該当する切断体を検出することが可能となる。従って、抗体分子の CE-SDS 分析は非還元条件及び還元条件の両方を行うのが一般的である。

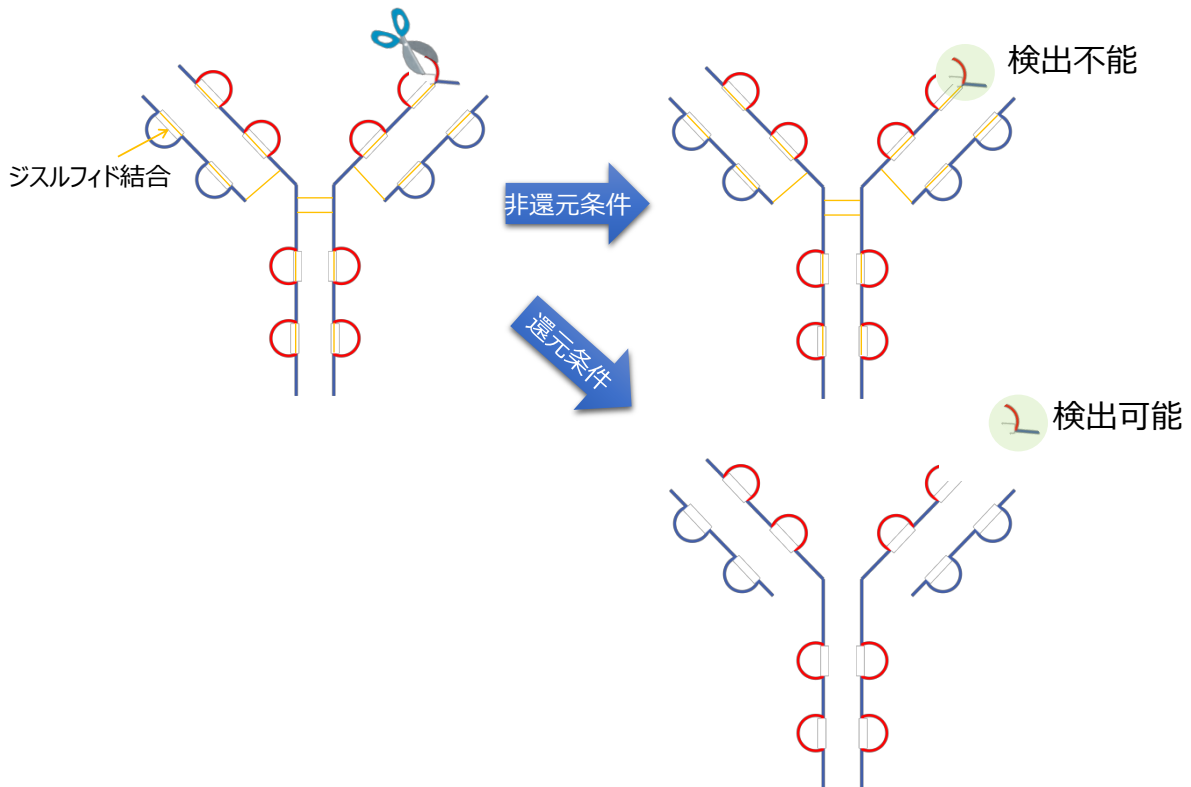


図8 鎖内ジスルフィド結合で結合した Cys 残基の間のアミノ酸配列上で切断が生じる場合

1.3 本研究の内容・成果

本研究では、抗体分子の切断体の中でも、非変性条件下での分離が困難であることからその特性がこれまで解明されていなかった可変領域の CDR に切断（クリップ）を有する抗体分子（CDR クリップ抗体）について着目した。サンプルには、ベバシズマブ（Avastin®）を用いた。ベバシズマブは、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）を阻害することで血管新生を遮断する組換え型ヒト化モノクローナル抗体である。ベバシズマブのパパイン消化は VH ドメインに 1 つ又は 2 つのクリップをもたらすことが報告されており⁽⁴⁵⁾、ベバシズマブの VH ドメインは熱及びストレスに弱いと予想される。従って、本研究のサンプルとして適していると判断した。

CDR クリップ抗体の特性を明らかにするためには、熱等のストレスに晒されていない抗体医薬品（本研究では市販のベバシズマブ）中にわずかに含まれる CDR クリップ抗体を、界面活性剤や変性剤を含まない非変性条件下で単離/回収する必要がある。しかしながら、前述したとおりこれまでそのような手法は報告されていない。熱処理により CDR クリップ抗体は増加するため（後述）、熱処理したベバシズマブを SEC で分析した。カラムには抗体の SEC 分析で最も一般的に使用される TSK G3000SW_{XL} カラムを用いた。図 9 に示すとおり一般的な SEC の方法ではクリップ体はインтакт抗体と分離されなかった。そこで、CDR クリップ抗体を単離/回収可能な手法の検討をまず実施した。

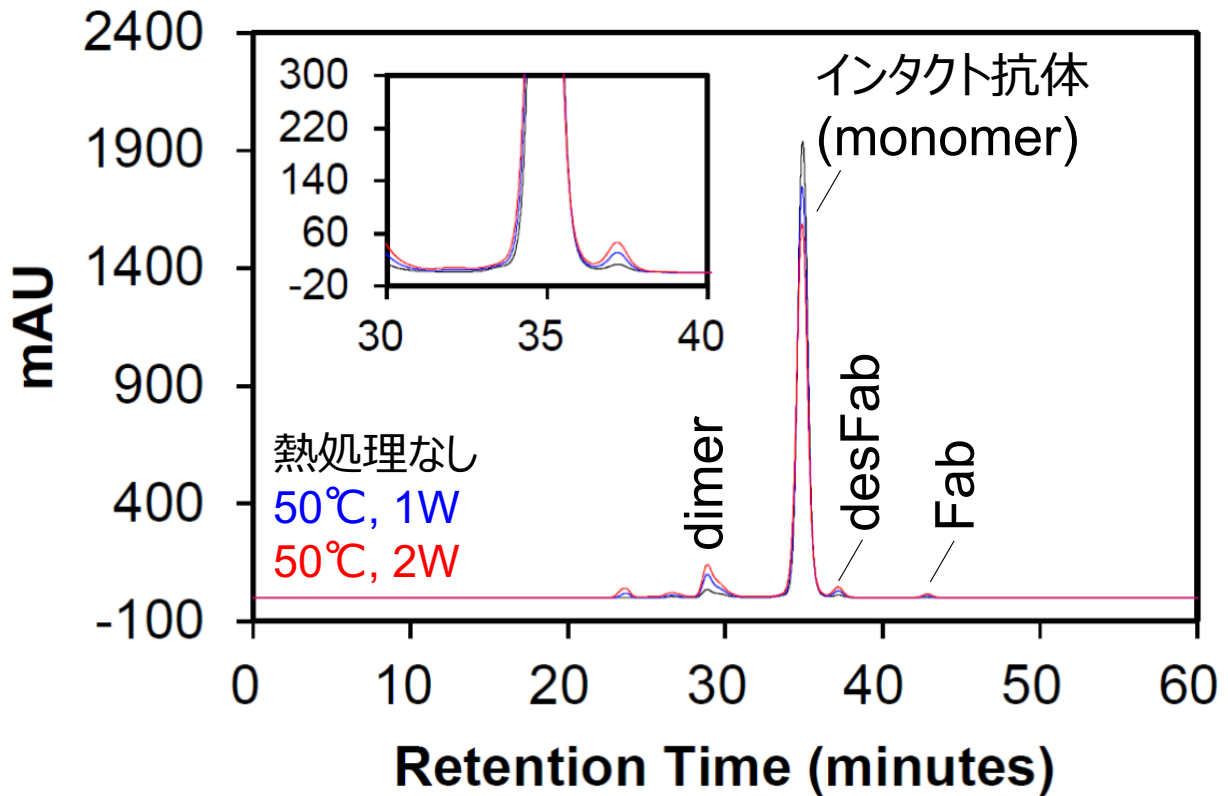


図9 TSK G3000SW_{XL} カラムを用いたベバシズマブの SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)

ベバシズマブにおけるクリップ形成を確認するために、ベバシズマブを熱処理し、CE-SDS により分析したところ、熱処理時間に依存して特定のピークが増加することを確認した。熱処理時間依存的に増加するピークには、CDR クリップ抗体に由来するものが含まれていると予想された。そこで、複数の SEC カラムを検討し、熱処理時間依存的に増加するピークと主ピーク（インタクト抗体、モノマー）が明瞭に分離されるカラムを選定した（Phenomenex 社 Yarra SEC-3000）（図 10）。

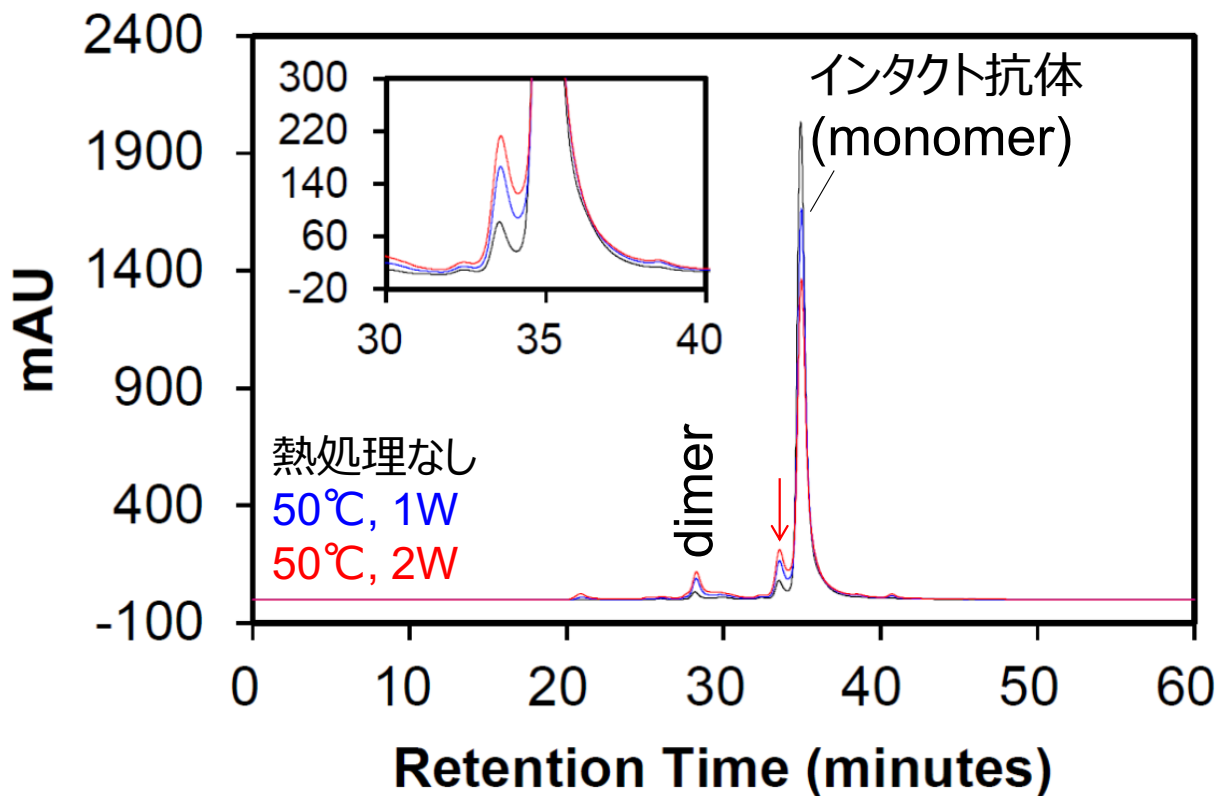


図 10 Yarra SEC-3000 カラムを用いたベバシズマブの SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)

赤矢印：熱処理時間依存的に増加するピーク

次に、熱処理依存的に増加するピークに含まれる分子種を質量分析により同定した。その結果、ベバシズマブの重鎖 VH ドメインに 3 箇所存在する 3 番目の CDR (CDR3) に位置する Ser105-Ser106 のペプチド結合が切断された抗体分子が含まれることを解明した。ベバシズマブの Fab ドメイン及び抗原である VEGF のダイマーの 3D モデルを図 11 に示す。図 11 中の「+」は水分子を示しており、Ser105-Ser106 の付近に加水分解に必要な水分子の存在が確認された。加えて、Ser105-Ser106 は抗体分子の表面上に存在しており、切断が生じやすい部位であることが確認された。

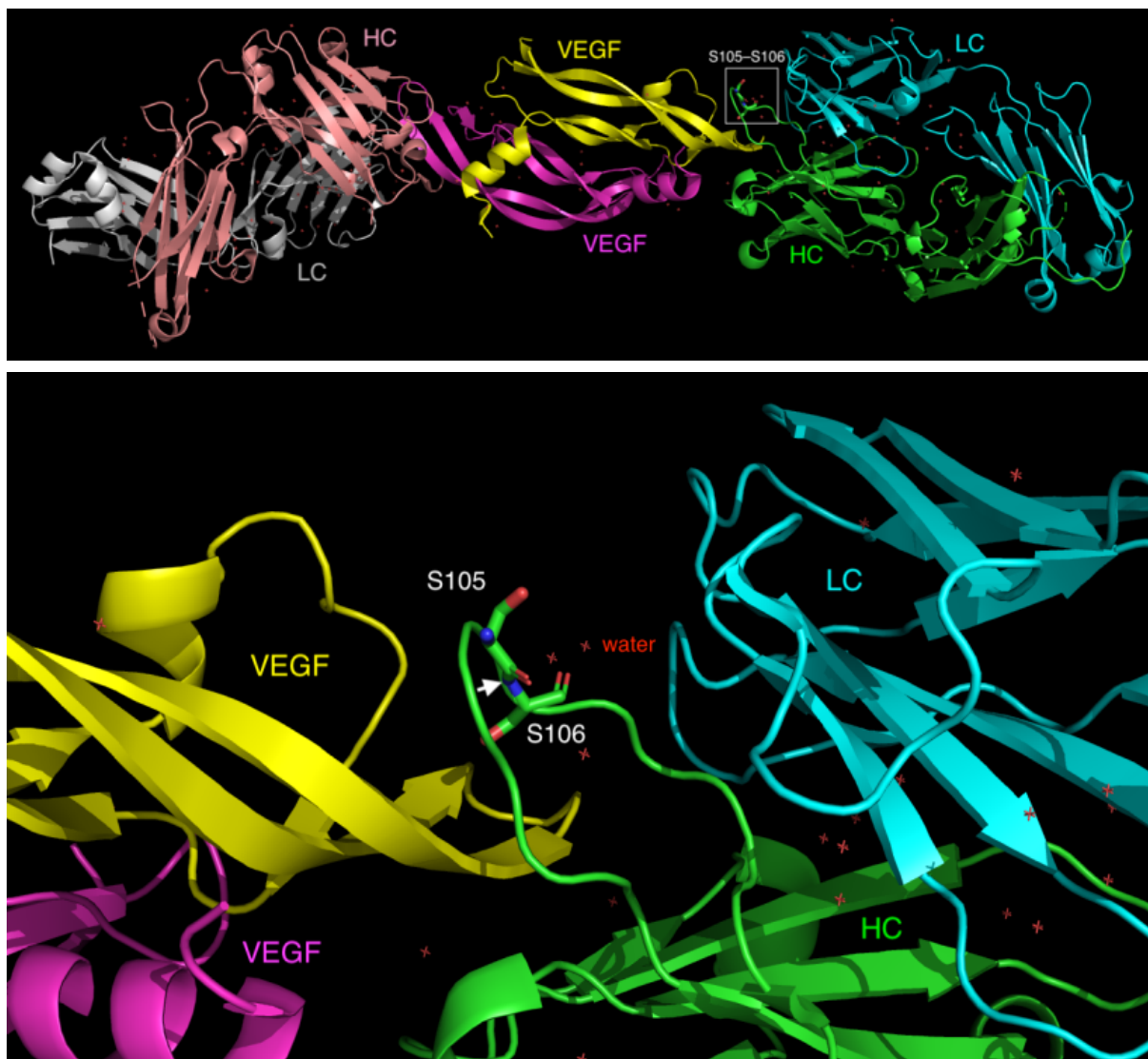


図 11 ベバシズマブの Fab ドメイン及び VEGF ダイマーの 3D モデル (PDB coordinate ID: 6BFT⁽⁴⁶⁾)

上段：全体図、下段：ベバシズマブ重鎖 Ser105-Ser106 付近の拡大図 (PyMOL⁽⁴⁷⁾により作成)

以上の結果から、Yarra SEC-3000 カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー法により、抗体医薬品にわずかに含まれる CDR クリップ抗体を、非変性条件下で、純度高く単離/回収することが可能となった。また、CDR クリップ抗体は、通常（非変性条件下）、重鎖 N 末端フラグメントと非共有結合的に会合しており（図 12）、SEC カラム固定相との相互作用が減少することで、SEC 分析時にインタクト抗体よりも早く溶出することが示唆された。

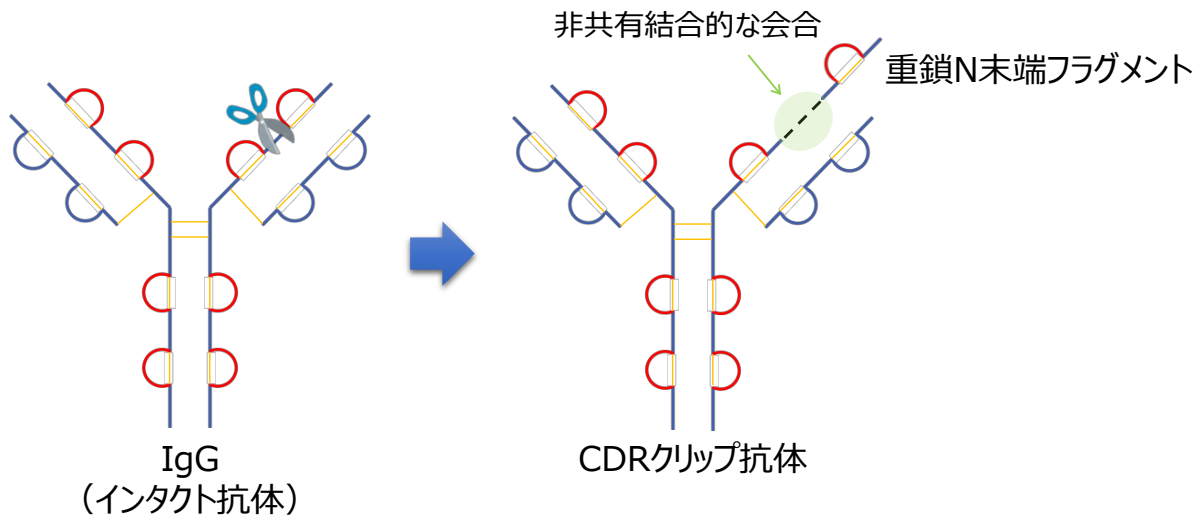


図 12 CDR クリップ抗体と重鎖 N 末端フラグメントの非共有結合的な会合

次に、確立した方法を用いて CDR クリップ抗体を単離/回収し、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、機能の低下（抗原・胎児性 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor; FcRn) ・ Fc γ 受容体への親和性低下）、安定性の低下（ダイマー形成促進、Fab ドメインの熱安定性の低下）、その他各種性質の変化（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 Fc γ 受容体との結合部位は IgG の重鎖の定常領域 CH2-CH3 及び CH2 ドメインに存在する事が知られている^(48,49,50,51)。従って、CDR クリップ抗体における FcRn (Fc γ 受容体) への親和性低下は、CDR の構造変化が CH2 領域まで伝達され得る可能性を示している（図 13）。CDR の切断部位と CH2 ドメインとは空間的に 60 Å 以上離れている（PDB coordinate ID: 1HZH⁽⁵²⁾の場合）（図 14）。この距離はヘモグロビンの直径（55 Å）よりも長いため、CDR の構造変化が CH2 領域まで伝達され得るかは興味深い。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（図 15）。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 Fc γ 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。

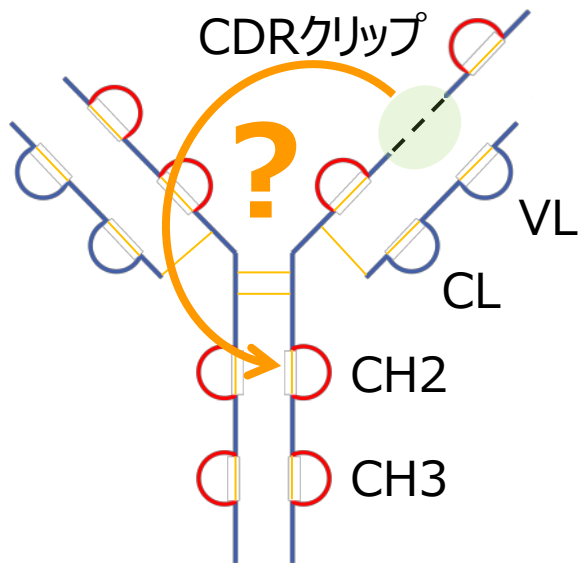


図 13 CDRでのクリップ形成がCH2ドメインへ影響を及ぼす可能性

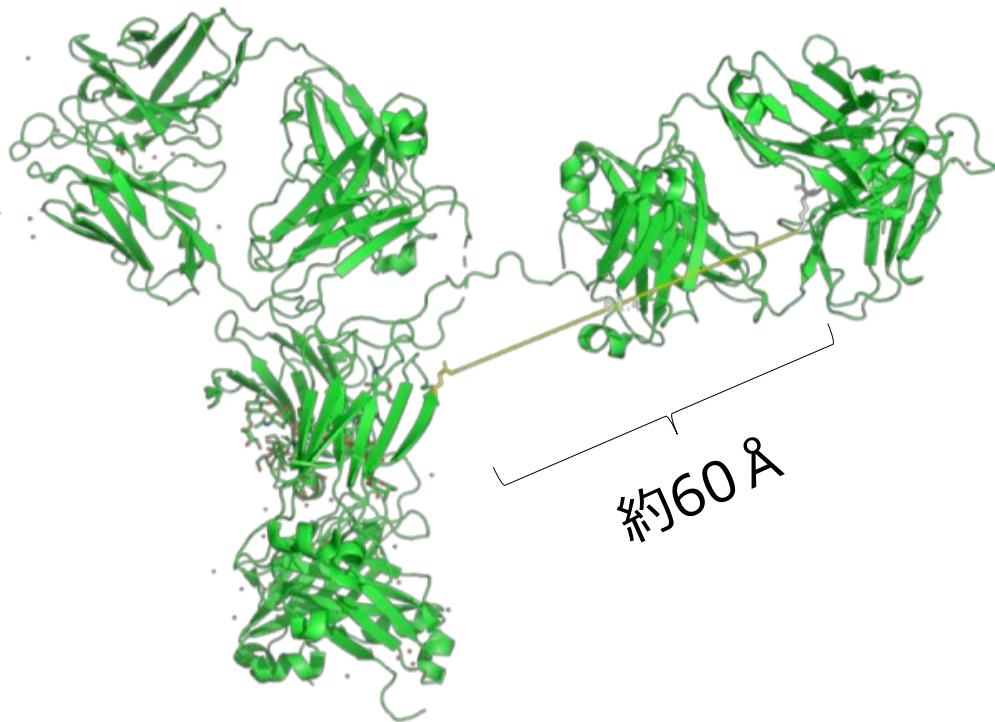


図 14 CDRとCH2ドメインの距離 (PDB coordinate ID: 1HZH⁽⁵²⁾)

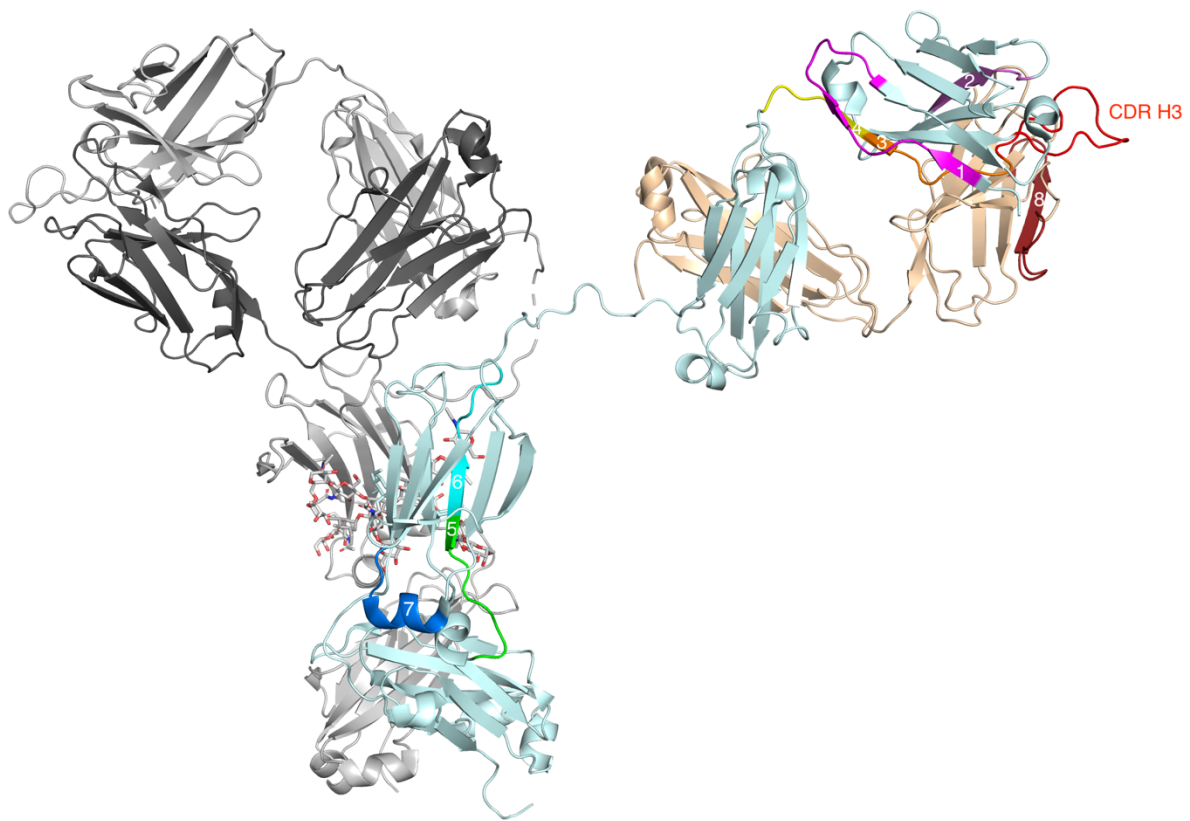


図 15 CDR H3 におけるクリップ形成により構造変化が認められたセグメントを intact human IgG b12 の結晶構造 (PDB coordinate ID: 1HZH⁽⁵²⁾) の上にマッピングした図
 マッピングした方の重鎖と軽鎖をそれぞれ palecyan と wheat で表示した。マッピングに用いなかった方の重鎖と軽鎖をそれぞれ、gray 80%と gray 40%で表示した。構造変化が認められたセグメントに色を付け、セグメント番号でラベルした: 1, magenta; 2, violet; 3, orange; 4, yellow; 5, green; 6, cyan; 7, marine; 8, firebrick。クリップ形成が起こる CDR H3 を赤で表示した (1HZH では残基 95-102)。詳細は「3.2.9 項 CDR クリップ形成による抗体分子の高次構造への影響」に記載。

2 抗体分子の CDR クリップ部位の同定及び CDR にクリップを有する抗体分子の非変性条件下における単離方法の確立

本研究では、CDR クリップ抗体に着目した。なぜならば、抗体医薬品の重要品質特性 (CQA) である切断体の中でも、非変性条件下での分離が困難であることからその特性がこれまで解明されていないためである。CDR クリップ抗体の特性を明らかにするためには、熱等のストレスに晒されていない抗体医薬品中にわずかに含まれる CDR クリップ抗体を、界面活性剤や変性剤を含まない非変性条件下で単離/回収する必要がある。しかしながら、そのような手法はこれまでに報告されていない。そこで、CDR クリップ抗体の単離可能な手法の構築を検討した。なお、サンプルには血管内皮増殖因子 (VEGF) を阻害することで血管新生を遮断する組換え型ヒト化モノクローナル抗体であるベバシズマブ (Avastin®) を使用した。ベバシズマブのパパイン消化は VH ドメインに 1 つ又は 2 つのクリップをもたらすことが報告されている⁽⁴⁵⁾。従って、その VH ドメインは熱及びストレスに弱いと予想されることから、本研究のサンプルとして適していると判断した。

ベバシズマブについて、50 °C にて 1 週間又は 2 週間インキュベートした熱処理サンプルを調製し、切断体の定量法として汎用されている CE-SDS により分析を行った。その結果、熱処理時間依存的に増加するピークが認められ、その泳動位置から CDR クリップ抗体に由来するピークであると推定された。目的とするピークに含まれる分子種を同定するには、ピークを回収し、質量分析での同定が必要である。しかしながら、CE-SDS は、原理上、ピークを分画し直接同定することができない。そこで、ピーク分画が可能な SEC について、CDR クリップ抗体を含むピークが単離可能かを 4 種の SEC カラムを用いて検討した。その結果、熱処理時間依存的に増加するピークと主ピーク (インタクト抗体、モノマー) が明瞭に分離され、純度高く回収可能なカラムを選定した (Phenomenex 社 Yarra SEC-3000)。次に、熱処理依存的に増加するピークに含まれる分子種を質量分析により同定し、ベバシズマブの重鎖 VH ドメインの CDR3 に位置する Ser105-Ser106 のペプチド結合が切断された抗体分子が含まれることを見出した。

これは、CDR クリップ抗体を、非変性条件下で、純度高く単離/回収することが可能な手法として初めての報告である。本試験法が構築されたことにより、これまで特性が明らかにされていなかった CDR クリップ抗体の特性評価を行うことが可能となった。

2.1 方法

2.1.1 熱処理サンプルの調製

ベバシズマブ (Roche Diagnostics より購入 : 25 mg/mL タンパク質、pH 6.2) を、50 °C、暗所で1週間及び2週間加温した後、-80 °Cにて凍結保管した。

2.1.2 キャピラリードデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動 (Capillary Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate; CE-SDS) ⁽⁴⁴⁾

CE-SDS は、Proteomelab PA800 plus システム及び Laser Induced Fluorescence (LIF) 検出器 (AB SCIEX, Inc.) を用い、光源として 488 nm アルゴンレーザー、キャピラリーとして 50 μm i.d.のフューズドシリカキャピラリー (AB SCIEX, Inc.) (全長 30 cm、有効長 10 cm) を用いて実施した。0.1 M 重炭酸ナトリウム水溶液 (pH 8.3) で平衡化した Bio-Spin 6 カラム (Bio-Rad Laboratories, Inc.) にサンプル 100 μg を通過させ、バッファー交換を実施した。バッファー交換したサンプル 266 μL に、DMSO に溶解した 0.16 M 5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (5-TAMRA, SE) 溶液 (蛍光標識試薬) 14 μL を添加し、30 °C で30分間加温した。NAP-5 カラム (Cytiva) を使用して過剰な蛍光標識試薬を除去し、バッファーを 85 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 6.5) に交換した。非還元用にはヨードアセトアミドを含む SDS 溶液、還元用にはジチオトレイトール (DTT) を含む SDS 溶液を用い、蛍光標識したサンプルとそれぞれ混合して、65 °C でそれぞれ 10 分間又は 5 分間加温した。SDS ゲルバッファー (AB SCIEX, Inc.) を、15 kV で10分間フューズドシリカキャピラリーに充填し、SDS 処理したサンプル溶液を 10 kV で10秒間動電学的に注入し、負極性モードにて 15 kV で20分間泳動した。

2.1.3 サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography; SEC) ⁽⁵³⁾

SEC は、直列に接続した2本のカラムを Agilent1100、1200 又は 1260 Infinity 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) システム (Agilent Technologies, Inc.) に接続して実施した。カラムは、TSK G3000SW_{XL} (7.8 \times 300 mm, 5 μm , 250 Å, Tosoh Biosciences)、XBridge Protein BEH (7.8 \times 300 mm, 3.5 μm , 200 Å, Waters)、Yarra SEC-3000 (7.8 \times 300 mm, 3 μm , 290 Å, Phenomenex Inc.) 及び AdvanceBio SEC (7.8 \times 300 mm, 2.7 μm , 300 Å, Agilent Technologies, Inc.) を使用した。移動相は 50 mM リン酸ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウム及び 5% (v/v)エタノールを含む水溶液 (pH 7)、又は 50 mM リン酸ナトリウム及び 500 mM 塩化ナトリウムを含む水溶液 (pH 7) を使用した。注入タンパク質量を 40 μg 、流速を 0.5 mL/分、カラム温度を 25 °C とし、溶出は 215 nm の紫外吸光でモニターした。ピーク分画時は、Yarra SEC-3000 カラムを用い、注入タンパク質量を 1 mg、流速を 1 mL/分とした。ピーク分画後、遠心フィルター装置 (Amicon-Ultra 30 K; Merck Millipore) を使用してサンプル濃縮及びバッファー交換を実施し、直ちに分析又は-80 °Cで凍結保管した。リクロマトグラフィーにおいては、注入タンパク質量を 20 μg 、流速を 1 mL/分とした。

2.1.4 インタクト質量分析⁽⁵⁴⁾

糖鎖を除去した抗体サンプルを調製するために、サンプル 50 μg に 1 ユニットの PNGase F (Peptide-N4-(N-acetyl- β -glucosaminyl)asparagine amidase F) を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間加温した。*N*-結合型糖鎖消化後のサンプル 0.5 μg について、MassPREP™オンライン脱塩カートリッジ (2.1 \times 5 mm, 20 μm , Waters) を用いて LC-MS 分析を実施した。移動相 A は 0.1% (v/v)ギ酸を含む水溶液、移動相 B は 0.1% (v/v)ギ酸を含むアセトニトリル溶液を使用し、表 4 に示すとおり混合比及び流速を変えて濃度勾配を制御した。カラム温度は 80 $^{\circ}\text{C}$ とした。質量分析は、SYNAPT G2-Si HDMS (Waters) を用い、ESI キャピラリー電圧を 3.2 kV、ソース温度を 120 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプルコーン電圧を 100 V とし、ポジティブモードで実施した。データは m/z 500–4500 の範囲で取得した。

表 4 インタクト質量分析の移動相混合比及び流速

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)	流速 (ml/分)
0~0.5	95	5	0.5
0.5~2.0	95→10	5→90	0.2

2.1.5 ペプチドマップ質量分析⁽⁵⁵⁾

2 mg/mL に希釈したサンプル 80 μL 、変性バッファー (7 M グアニジン塩酸塩及び 0.13 M Tris-HCl、pH 8.0) 320 μL 及び 0.26 M DTT 溶液 24 μL を混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間加温した。添加後濃度が 0.54 M となるようにヨードアセトアミド溶液を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間加温した。次に、消化バッファー (4 M 尿素, 0.05 M Tris-HCl、pH 8.0) であらかじめ平衡化した遠心フィルター装置 (Amicon-Ultra 10 K, Merck Millipore) にサンプルを通過させ、バッファー交換を実施した。リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) を酵素対タンパク質量比が 1:20 となるように添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間加温した。1M 塩酸を添加し分解反応をクエンチした。調製したサンプルについて、ZORBAX SB-C18 カラム (2.1 \times 100 mm, 3.5 μm , Agilent Technologies, Inc.) を用いて LC-MS 分析を実施した。移動相 A は 0.1% (v/v)トリフルオロ酢酸を含む水溶液、移動相 B は 0.1% (v/v)トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル溶液を使用し、表 5 に示すとおり混合比を変えて濃度勾配を制御した。注入タンパク質量を 15 μg 、流速を 0.2 mL/分、カラム温度を 50 $^{\circ}\text{C}$ とした。質量分析は、SYNAPT G2 HDMS (Waters) を用い、ESI キャピラリー電圧を 3 kV、ソース温度を 120 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプルコーン電圧を 40 V とし、ポジティブモードで実施した。データは m/z 100–2500 の範囲で取得した。

表 5 ペプチドマップ質量分析の移動相混合比

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~6	99	1
6~84	99→50	1→50

2.2 結果及び考察

2.2.1 熱処理したベバシズマブの CE-SDS 分析

ベバシズマブのクリップ形成を確認するために、熱処理したベバシズマブとコントロールとして熱処理をしていないベバシズマブを、CE-SDS により分析した。エレクトロフェログラムを図 16 及び図 17 に示す。CE-SDS は分子ふるい効果を持つ SDS 含有ポリマーをキャピラリーに充填することでサンプルを分子サイズで分離する試験法であり、小さい分子ほど早く、大きい分子ほど遅く検出される。一般的に、非還元 CE-SDS では、主ピーク（インタクトな IgG ピーク）より前に検出されるピーク群を Low Molecular Weight Species (LMWS)、後ろに検出されるピークを High Molecular Weight Species (HMWS) と称する。一方、還元 CE-SDS においては、軽鎖ピークより前に検出されるピーク群を LMWS、軽鎖と重鎖の間に検出されるピーク群を Middle Molecular Weight Species (MMWS)、重鎖より後ろに検出されるピークを HMWS と称する。また、重鎖の一部には N-結合型糖鎖が結合していない糖鎖非結合重鎖 Non-Glycosylated Heavy Chain (NGHC) が存在し、重鎖の直前に検出される。

非還元 CE-SDS で検出された多くのピークは、7.2 分 (①) 及び 15.4 分 (②) に検出されるピークを除き、軽鎖 (L) 及び/又は重鎖 (H) のモノマー又はマルチマーであると考えられた (軽鎖 : 8.5 分、重鎖 : 10.2 分、重鎖+重鎖 (HH) : 13.7 分、重鎖+重鎖+軽鎖 (HHL) : 14.7 分、インタクトな抗体分子 (LHHL; IgG) : 15.6 分)⁽⁴⁴⁾。還元 CE-SDS で検出された 4 つの主なピークは、軽鎖 (8.6 分)、NGHC (10.7 分)、重鎖 (11.0 分) 及び重鎖+軽鎖 (HL) (12.4 分) であると考えられ⁽⁵⁶⁾、7.3 分 (③)、9.4 分、10.1 分及び 10.3 分 (④) に検出されたピークは重鎖又は軽鎖由来のフラグメントと考えられた。

非還元 CE-SDS において 15.4 分に検出されたピーク (②) 及び還元 CE-SDS において 10.3 分に検出されたピーク (④) は、熱処理時間と共に著しい増加が認められた。ピーク④は軽鎖ピークと重鎖ピークの間に検出されたことから、重鎖由来のフラグメントと考えられた。さらに、主要なピークの検出位置とその質量及びピーク④の検出位置から、ピーク④の質量は 40.5 kDa であると推定された。グリコシル化された重鎖の質量は約 51.2 kDa であり、クリップ形成により 40.5 kDa のフラグメントが生成する場合、約 10.7 kDa のフラグメントが同時に生成すると考えられる。実際に、非還元 CE-SDS で 7.2 分 (①)、還元 CE-SDS で 7.3 分 (③) に検出される推定質量 10.7 kDa のピークについても熱処理時間と共に増加が認められた。これらの結果と一致して、非還元 CE-SDS で 15.4 分に検出される肩ピーク (②) の質量は、15.6 分検出される主ピーク (IgG ピーク) の質量より約 10.7 kDa 小さいと推定された。

なお、還元 CE-SDS において 9.4 分及び 10.1 分に検出されるピークも熱処理時間と共に増加したが、10.3 分に検出されるピーク (④) 程は顕著に増加しなかった。これらのピークの質量は 26.3 kDa 及び 37.1 kDa と推定され、対応するフラグメントはそれぞれ 9.3 分 (9.4 分に検出されるピークと重複) 及び 8.3 分に検出すると推定された。

ベバシズマブのパパイン消化は VH ドメインにおいて 1 つ又は 2 つのクリップを生成することが報告されているが⁽⁴⁵⁾、熱処理により VH ドメインではより多くのクリップを生成する可能性がある。非還元 CE-SDS において 15.4 分に検出されるピーク (②) 及び還元 CE-SDS において 10.3 分に検出されるピーク (④) の増加が最も顕著であった。従って、これらのピークと、それぞれに対応する 7.2 分 (非還元 CE-SDS、①) 及び 7.3 分 (還元 CE-SDS、③) に検出されるピークに CDR クリップ抗体が含まれる可能性が示唆された。総ピーク面積に対する各ピーク

クの面積%を表 6 に示す。①~④のピーク面積%は熱処理時間に依存して増加し、それに伴い、IgG 及び HC+LC の各ピーク面積%の低下が認められた。

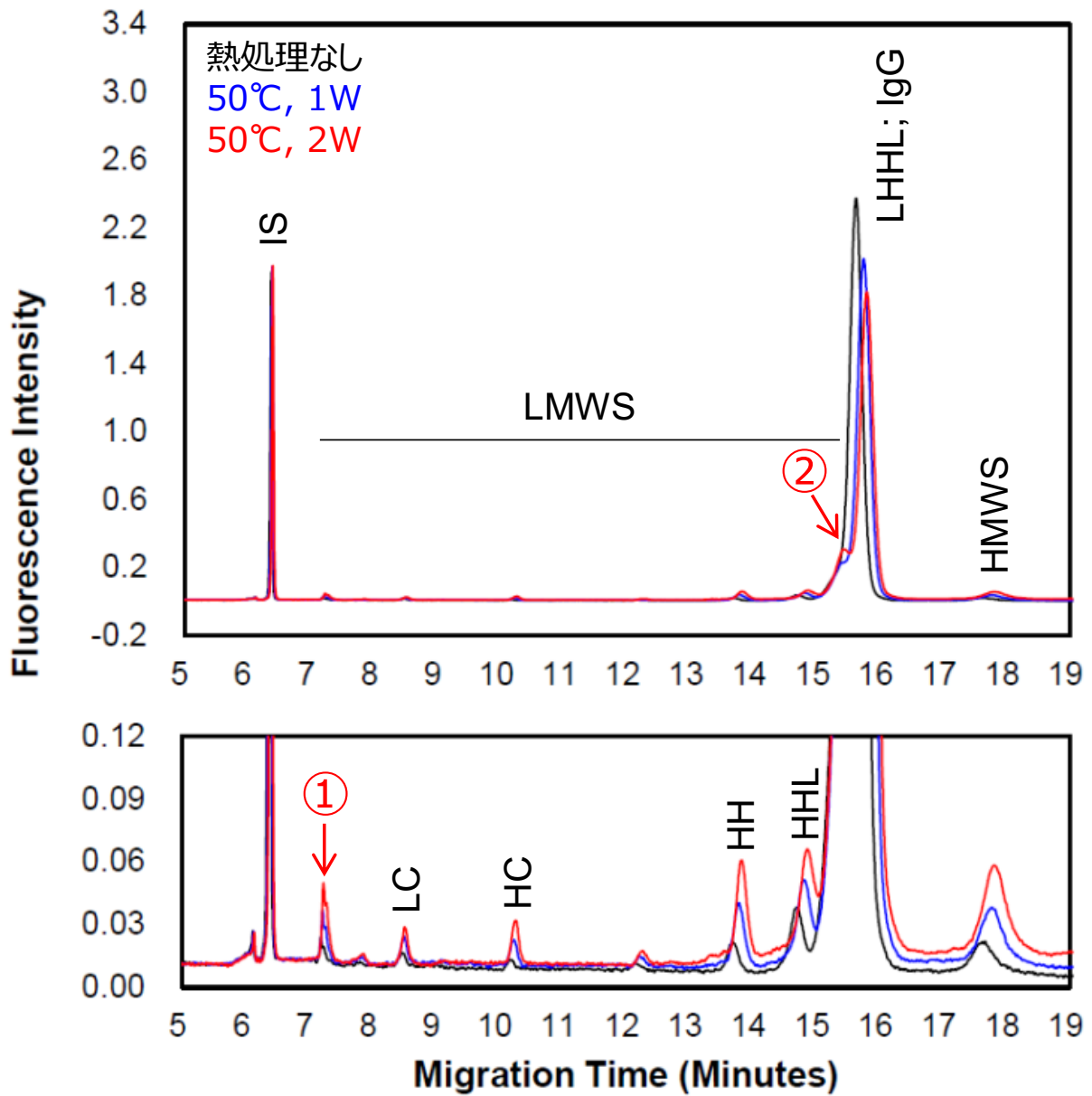


図 16 熱処理サンプルの非還元 CE-SDS のエレクトロフェログラム (下は拡大図)

IS : Internal Standard (内部標準), LMWS : Low Molecular Weight Species, LHHL : 重鎖 2 本+軽鎖 2 本, HMWS : High Molecular Weight Species, LC : 軽鎖, HC : 重鎖, HH : 重鎖 2 本, HHL : 重鎖 2 本+軽鎖

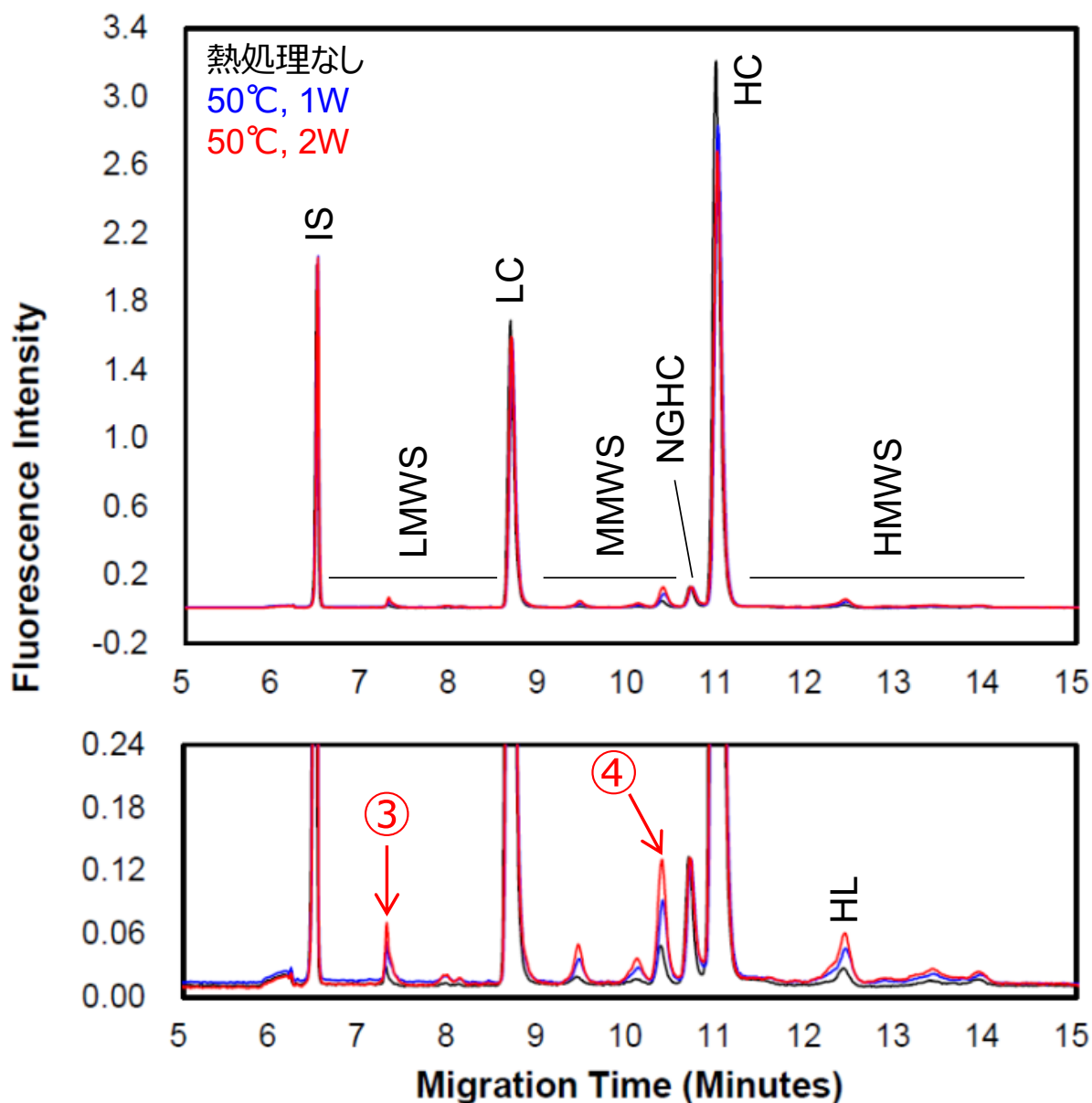


図 17 熱処理サンプルの還元 CE-SDS のエレクトロフェログラム（下は拡大図）

IS : Internal Standard (内部標準), LMWS : Low Molecular Weight Species, LC : 軽鎖, MMWS : Middle Molecular Weight Species, NGHC : Non-Glycosylated Heavy Chain (糖鎖非結合重鎖), HC : 重鎖, HMWS : High Molecular Weight Species, HL : 重鎖+軽鎖

表 6 熱処理サンプルの CE-SDS の各ピーク面積%

ピーク サンプル	非還元 CE-SDS			還元 CE-SDS		
	①7.2分	②15.4分	IgG	③7.3分	④10.3分	HC+LC
コントロール	0.3 ± 0.0	4.8 ± 0.1	91.1 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.0	94.2 ± 0.1
50°C, 1 週	0.8 ± 0.1	8.3 ± 0.1	84.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.0	90.6 ± 0.1
50°C, 2 週	1.4 ± 0.0	12.9 ± 0.0	75.7 ± 0.1	1.4 ± 0.0	2.9 ± 0.0	86.8 ± 0.1

繰り返し 3 回の測定値の平均値 ± 標準偏差

2.2.2 SEC カラムの選定

2.2.1 項で CE-SDS において熱処理条件依存的に増加したピークにどのような分子種が含まれるかを明らかにするためには、質量分析による同定が必要である。しかしながら、CE-SDS で検出されるピークは HPLC で検出されるピークと異なり分画が出来ないため、CE-SDS で検出されるピークを直接同定することは困難である。一方、抗体分子のサイズ不均一性を分析するために一般的に使用されている SEC は、ピークに分画が可能であることから、分画したピークの質量分析による同定が可能である。SEC による切断体の分離は一般的に不十分であるため、2.2.1 項の CE-SDS において認められた CDR クリップ抗体と推定されるピークとインタクトな抗体ピークを明確に分離することが出来る SEC カラムの選定を試みた。

抗体の凝集体の分析に最も頻繁に使用されているカラムは TSK G3000SW_{XL} (粒子径 5.0 μm 、細孔径 250 \AA) であるが、それ以外に、カラムサイズ (長さ、内径) が同じ XBridge Protein BEH (粒子径 3.5 μm 、細孔径 200 \AA)、Yarra SEC-3000 (粒子径 3.0 μm 、細孔径 290 \AA)、AdvanceBio SEC (粒子径 2.7 μm 、細孔径 300 \AA) の計 4 種の異なるカラムを用い、熱処理したベバシズマブと未処理のベバシズマブを分析した。クロマトグラムを図 18~図 21 に示す。TSK G3000SW_{XL} カラムは、ダイマー (29 分) 及び desFab フラグメント (37 分) のピークを示し⁽⁵⁷⁾、50°C における熱処理時間に依存して両ピークの増加が認められた (図 18)。しかし、クリップ抗体に由来すると思われるピークは観察されなかった。XBridge Protein BEH カラムは、TSK G3000SW_{XL} と同様のクロマトグラムを示した (図 19)。一方、Yarra SEC-3000 カラムでは、ダイマーピークとインタクトモノマーピークの間、TSK G3000SW_{XL} 及び XBridge Protein BEH カラムでは認められなかった新規ピーク (34 分) が認められた (図 20、赤矢印で示したピーク)。また、このピークは、熱処理時間と共に増加が認められ、2.2.1 項の CE-SDS 分析で認められた CDR クリップ抗体に由来するピークと同じ分子種を含むと推定された。また、AdvanceBio SEC カラムで得られたクロマトグラムは、Yarra SEC-3000 カラムで得られたものと同様であったが、ダイマーピークとインタクトモノマーピークの間を検出される新規ピークとインタクトモノマーのピークの分離は、Yarra SEC-3000 カラムを使用した場合に比べ顕著に悪かった (図 21、赤矢印で示したピーク)。

以上 4 種のカラムは、カラムサイズ (長さ、内径) は同じであるが、粒子径及び細孔径が異なる。各カラムの充填剤の詳細は公開されていないが、製造元が異なるためその性質は異なると推定される。従って、これらの違いが複合的にピークの分離に影響していると考えられ、本試験結果からカラム毎に分離可能な分子種が異なることが判明した。TSK G3000SW_{XL} カラム及び XBridge Protein BEH カラムについてはインタクト抗体 (モノマー) と desFab の分離には適しているが、本研究の対象物質である CDR クリップ抗体と推定されるピークの分離には向いていない。一方で、Yarra SEC-3000 カラムと AdvanceBio SEC カラムはインタクト抗体 (モノマー) と desFab の分離は不十分であるが、CDR クリップ抗体と推定されるピークをインタクト抗体 (モノマー) から分離可能であることが示唆された。さらに、Yarra SEC-3000 カラム及び AdvanceBio SEC カラムについては、カラムサイズ (長さ、内径) に加え粒子径及び細孔径もほぼ同じであるが、ピークの保持時間は AdvanceBio SEC カラムよりも Yarra SEC-3000 カラムの方が遅かった。これは、Yarra SEC-3000 カラムの方が AdvanceBio SEC カラムよりも、固定相の疎水性が高いためと考えられた。そのため、基質を保持する時間が長くなり、ピーク分離が向上したと考えられた。従って、CDR クリップ抗体をインタクト抗体から分離するためのカラムとして Yarra SEC-3000 カラムを選択した。なお、Yarra SEC-3000 カラムについて、

複数のロットを用いてベバシズマブを分析し、いずれの場合もピーク分離は良好であり、ロット間差がないことを確認した。

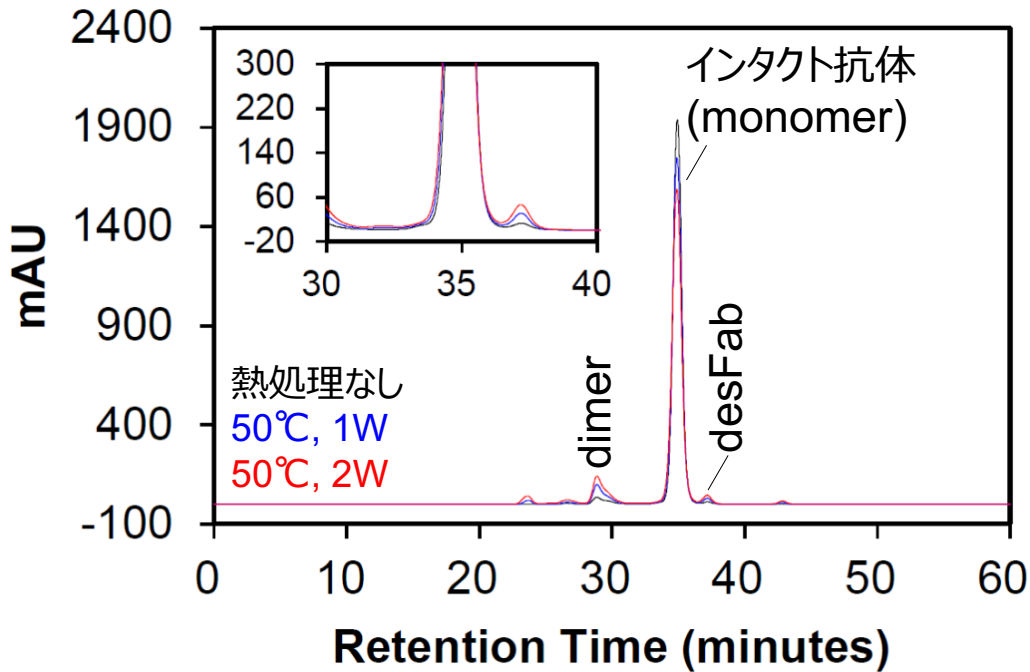


図 18 熱処理したベバシズマブの TSK G3000SW_{XL} カラムを用いた SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)

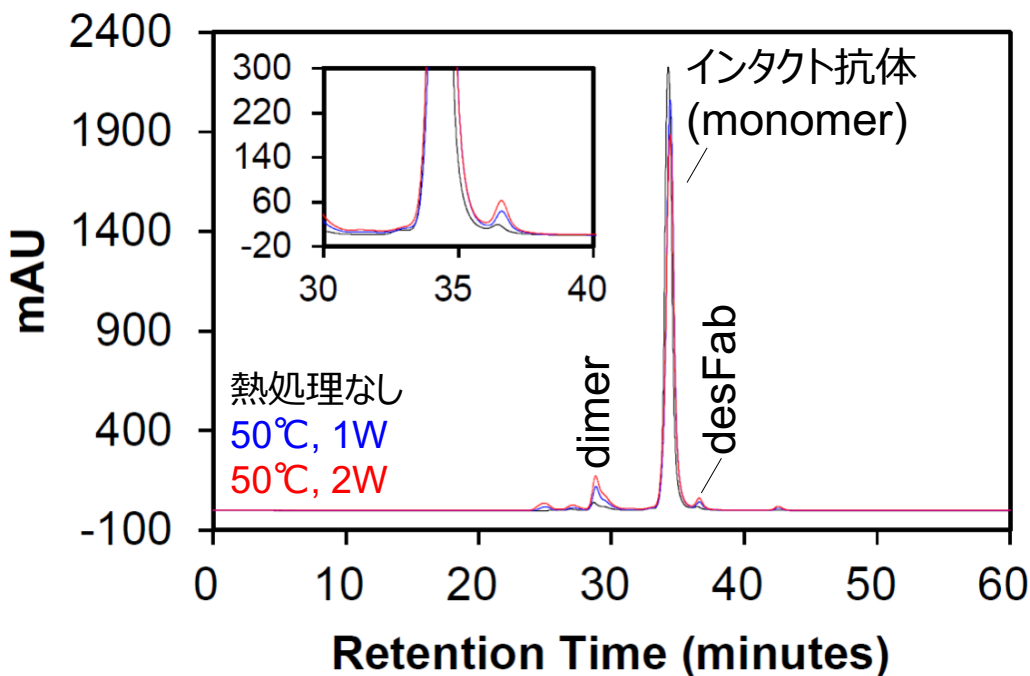


図 19 熱処理したベバシズマブの XBridge Protein BEH カラムを用いた SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)

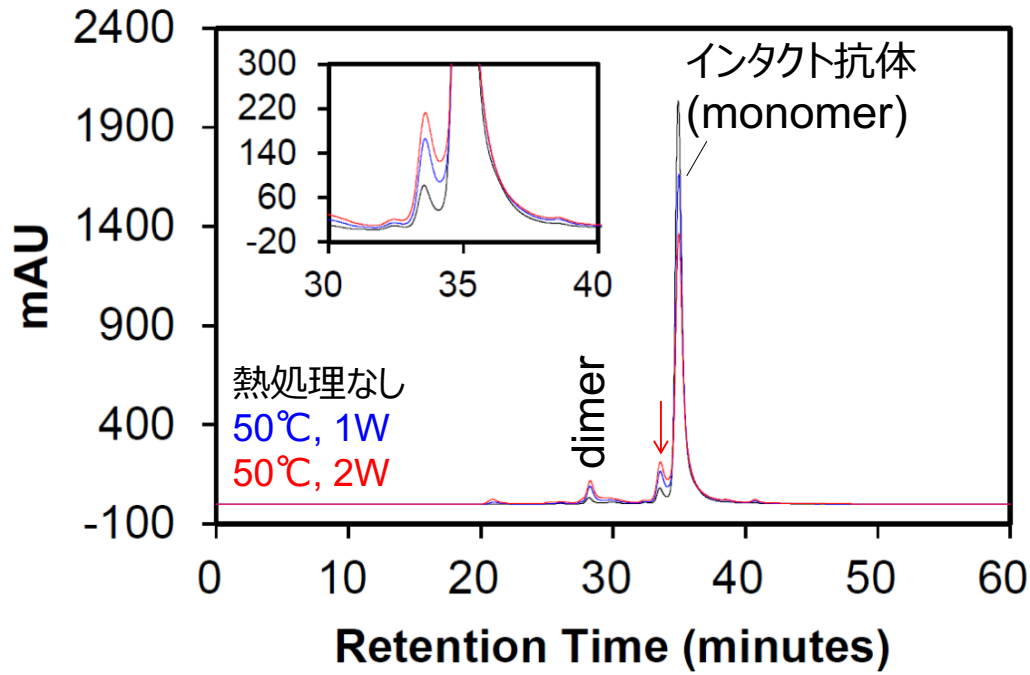


図 20 熱処理したベバシズマブの Yarra SEC-3000 カラムを用いた SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)
新規ピークを赤矢印で示す。

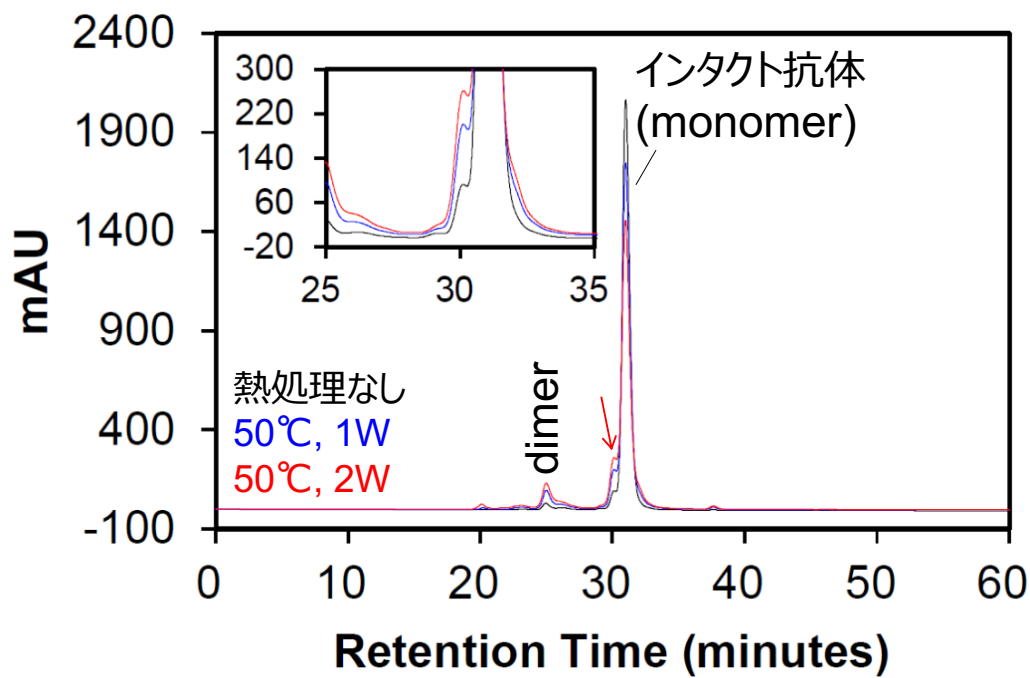


図 21 熱処理したベバシズマブの AdvanceBio SEC カラムを用いた SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)
新規ピークを赤矢印で示す。

SEC のクロマトグラムでは、一般的に高質量の分子は低質量の分子よりも早く溶出する。従って、クリップされた抗体分子は、インタクトな抗体分子よりも質量的に小さくなるため遅く溶出すると予想されるが、分子ふるい効果に加え、SEC カラムとタンパク質の疎水性相互及び静電相互作用などの他の相互作用が分離に寄与することが知られている⁽⁵⁸⁾。加えて、一般的に流体力学的半径が大きい分子は、小さい分子より早く溶出する。クリップによって生成されたフラグメントが抗体分子に結合している場合、クリップ形成により質量はほとんど変化しない。しかしながら、露出した CDR ループにおけるクリッピングが分子の構造的なフレキシビリティを高め、クリップされた抗体分子の流体力学的半径がわずかに増加し、SEC 分析時にインタクトな抗体よりも早く溶出する可能性がある（詳細は 2.2.6 項を参照）。

2.2.3 インタクト質量分析によるクリップを有する抗体分子の同定

Yarra SEC-3000 カラムを用いた際に、ダイマーピークとインタクトモノマーピークの間を検出された新規ピークに含まれる分子を同定するため、未処理の（熱処理をしていない）ベバシズマブについて、モノマーピーク（ピーク A）及びその直前に検出されるピーク（ピーク B）を分画した（図 22）。なお、分画時は注入タンパク質量を 1 mg（通常分析時は 40 µg）とした。得られた各ピーク画分について、再度 Yarra SEC-3000 カラムで分析し、目的のピークが純度 99%以上で含まれていることを確認した（図 23）。

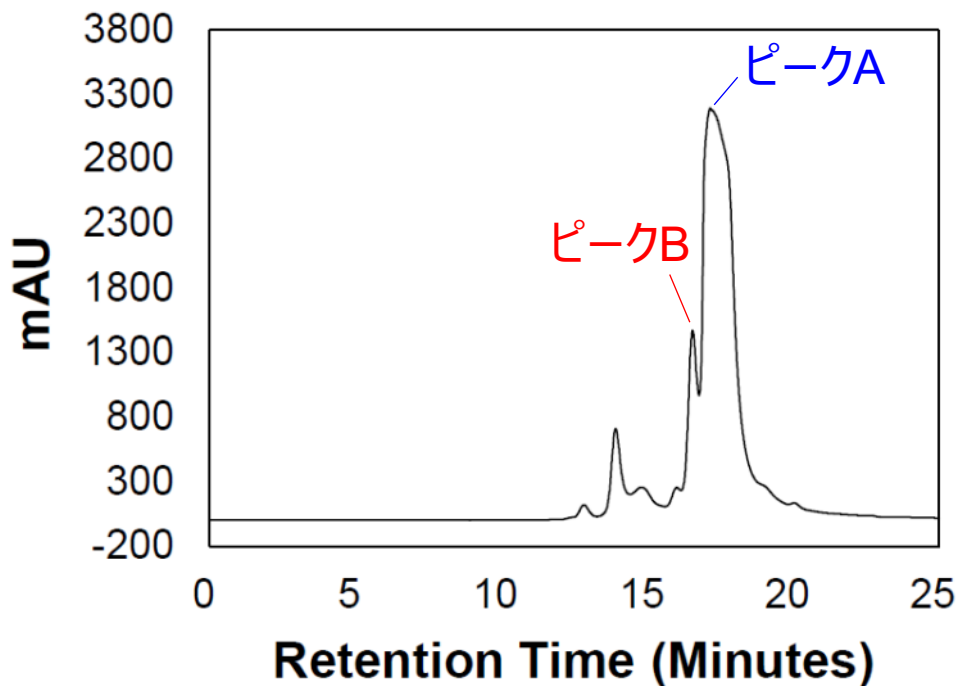


図 22 ベバシズマブ（熱処理なし）の YarraSEC-3000 カラムによる分画ピーク

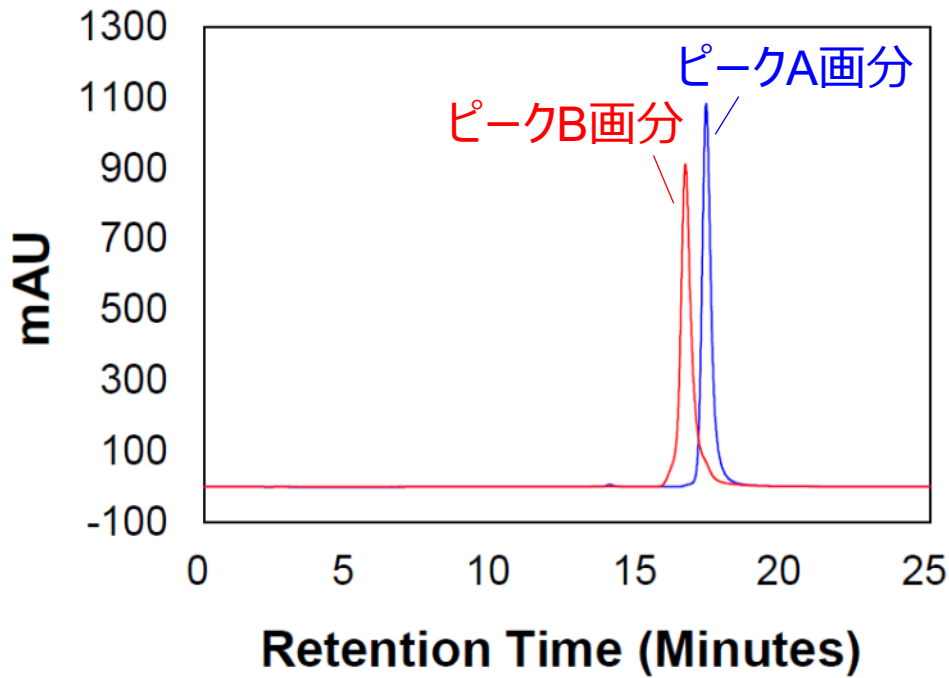


図 23 分画したピークのリクロマトグラム

糖鎖を除去した抗体サンプルを調製するために、各ピーク画分について PNGase F で *N*-結合型糖鎖を切断した後、インタクト質量分析を行った。ピーク A 画分のデコンボリューションされたマススペクトルは質量 146314 Da であり、ベバシズマブの脱グリコシル化されたインタクトモノマー（理論質量：146310 Da）と一致した（図 24）。一方、ピーク B 画分のマススペクトルは、質量 134662 及び 11674 Da を示し、それぞれ片側の重鎖 N 末端-105 残基を欠くクリップされた抗体分子のフラグメント（理論質量：134654 Da）及び重鎖 N 末端-105 残基（HC1-105）のフラグメント（理論質量：11674 Da）と一致した（図 25）。従って、ピーク B 画分に含まれるこれらのフラグメントは、ベバシズマブ重鎖の CDR3 における Ser105-Ser106 間のペプチド結合の切断によって生じたと考えられた⁽⁵⁹⁾。また、ピーク B 画分中には、インタクトモノマーの質量ピークはわずかにしか検出されなかった。これは、Yarra SEC-3000 カラムを用いた場合、未処理の（熱処理をしていない）ベバシズマブ中にわずかに含まれる CDR クリップ抗体を純度高く単離出来ることを示唆している。

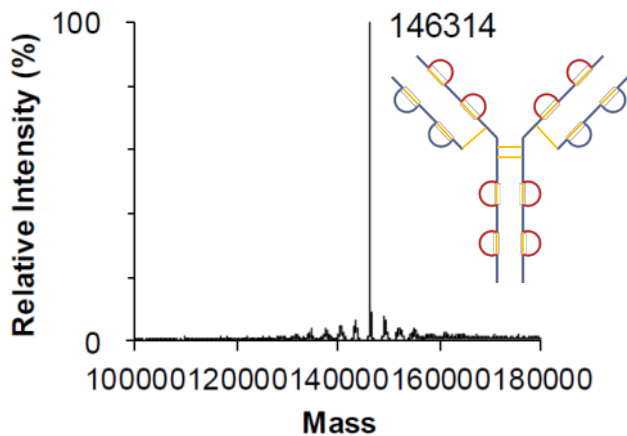


図 24 SEC ピーク A 画分のインタクト質量分析のマススペクトル

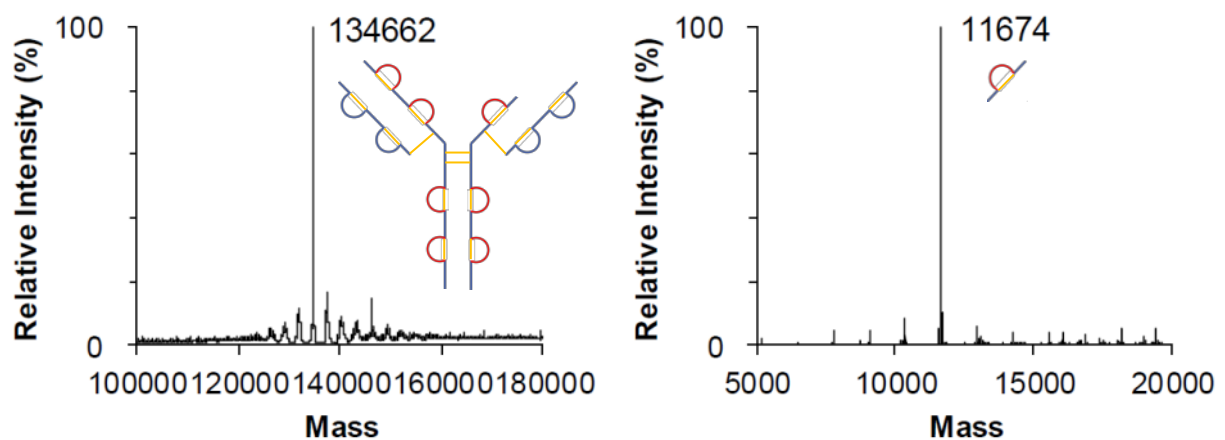


図 25 SEC ピーク B 画分のインタクト質量分析のマススペクトル

Ser 残基の側鎖は、pH 3-8 において Ser のヒドロキシル基 (OH 基) が隣接する N 末端ペプチド結合に求核付加してオキサゾリジン中間体を形成し、さらにエステル中間体に転位して、Xaa-Ser 間の切断 (加水分解) を促進することが報告されている (図 26) ⁽⁶⁰⁾。また、Li らにより、モノクローナル抗体 (プロダクト名非公開) の重鎖 Ser105-Ser106 において、熱処理依存的なペプチド結合の切断が報告されている⁽⁴²⁾。2.2.1 項の還元 CE-SDS のエレクトロフェログラムにおいて、熱処理時間と共に増加が認められたピークは、軽鎖、糖鎖非結合重鎖 (NGHC) 重鎖又は重鎖+軽鎖 (HL) には割り当てられなかった。従って、重鎖の CDR3 における Ser105-Ser106 間のペプチド結合の切断に由来するピークであると考えられる。さらに、Li ら及び Xaio らの報告ではクリップされた抗体分子は、TSKG3000SW_{XL} カラムを使用した非変性条件下の SEC では分離できておらず、2 つのフラグメントは逆相 HPLC 及び変性 SEC によって別々に分離された^(42,22)。従って、本試験結果は、Yarra SEC-3000 のような適切な SEC カラムを使用すると、インタクト抗体と同様の分子サイズを持つ抗体分子を、非変性条件で純度高く単離できる可能性があることを示唆している。

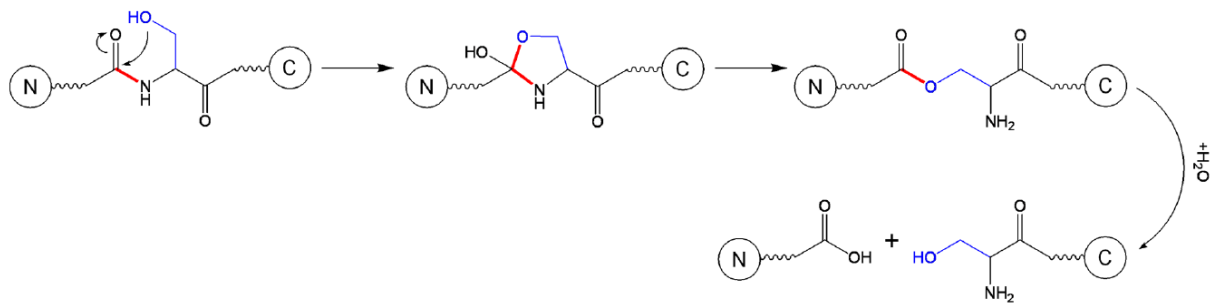


図 26 Xaa-Ser 間のペプチド結合切断のメカニズム⁽⁶⁰⁾

2.2.4 ペプチドマップ質量分析によるクリップ箇所の同定

抗体分子のような大きな分子において、インタクト質量分析により得られる質量データは、わずかな測定誤差及びばらつきを有する。そのため、正確なペプチド結合の切断部位は、より信頼性の高い試験法を用いて決定する必要がある。そこで、Yarra SEC-3000 カラムにより分画したピーク A 画分及びピーク B 画分をリシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) で消化し、ペプチドマップ質量分析を実施した。Lys-C は、リジン残基の C 末端のペプチド結合を特異的に加水分解するため、ベバシズマブを Lys-C 消化すると、重鎖 Ser105-Ser106 を含む HC99-127 ペプチド断片が生じる。各ピーク画分のクロマトグラム及びピーク B 画分のイオンクロマトグラムを図 27~図 29 に示す。ピーク A 画分及びピーク B 画分のクロマトグラムを比較すると、ピーク B 画分において 29.2 分及び 53.4 分に 2 つの新規ピークが認められた (図 28 中に赤矢印で示したピーク)。重鎖 Ser105-Ser106 のペプチド結合が切断された抗体分子が Lys-C 消化されると、HC99-127 ペプチド断片に由来する HC99-105 ペプチド断片 ($[M+H]^+$, 886.37) 及び HC106-127 ペプチド断片 ($[M+2H]^{2+}$, 1228.60) の 2 つのフラグメントが生じる。クロマトグラムにて 29.2 分に検出されたピークのイオンクロマトグラムの m/z は 886.38 であり、これは HC99-105 ペプチド断片の $[M+H]^+$ イオンと一致した。また、クロマトグラムにて 53.4 分に検出されたピークのイオンクロマトグラムの m/z は 1229.09 であり、これは HC106-127 ペプチド断片の $[M+2H]^{2+}$ イオンと一致した。従って、ペプチドマップ質量分析の結果から、Yarra SEC-3000 カラムにおいて主ピークの直前に検出されるピーク B には、ベバシズマブ重鎖 CDR3 における Ser105-Ser106 間のペプチド結合が切断された分子種が含まれることが証明された。

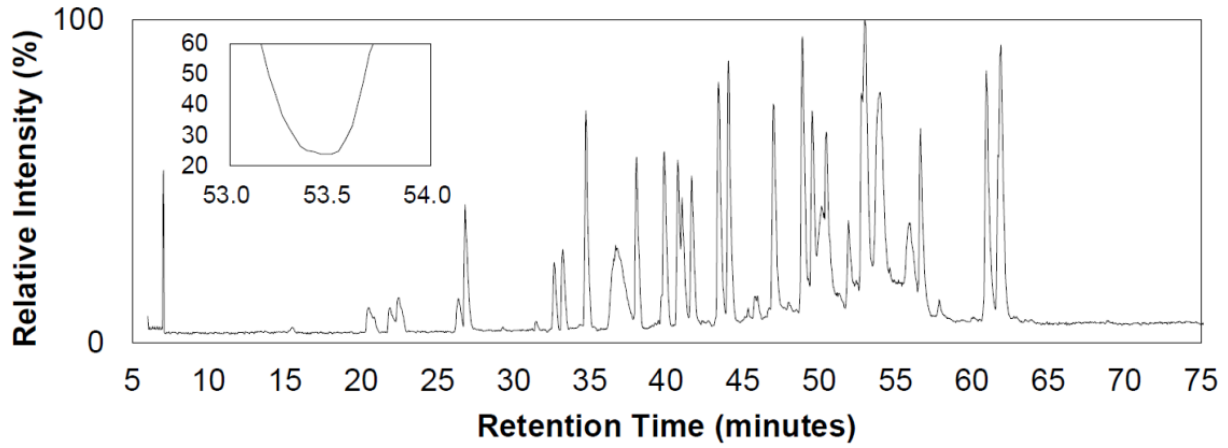


図 27 SEC ピーク A 画分のペプチドマップのクロマトグラム (inset は拡大図)

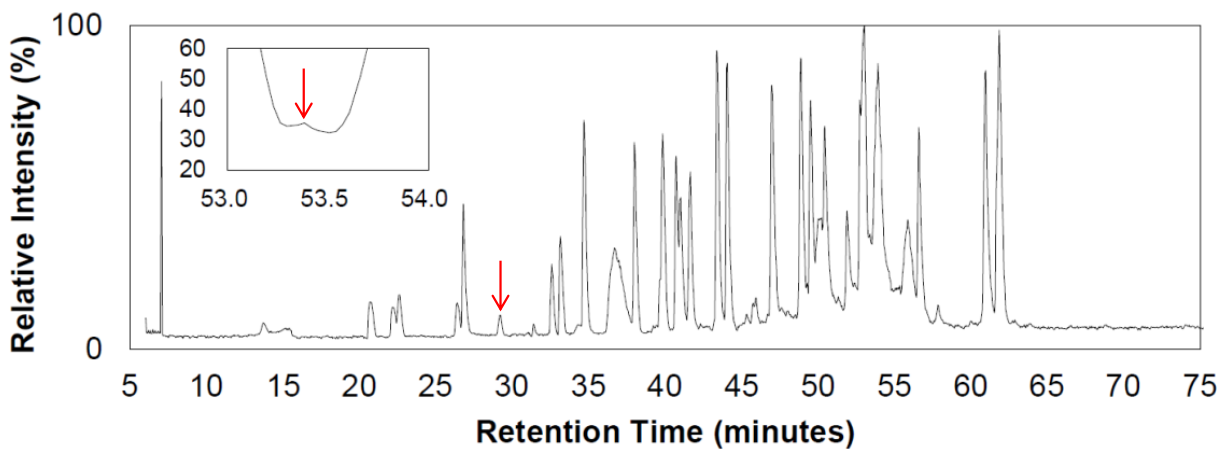


図 28 SEC ピーク B 画分のペプチドマップのクロマトグラム (inset は拡大図)

ピーク A 画分に含まれないピークを赤矢印で示す。

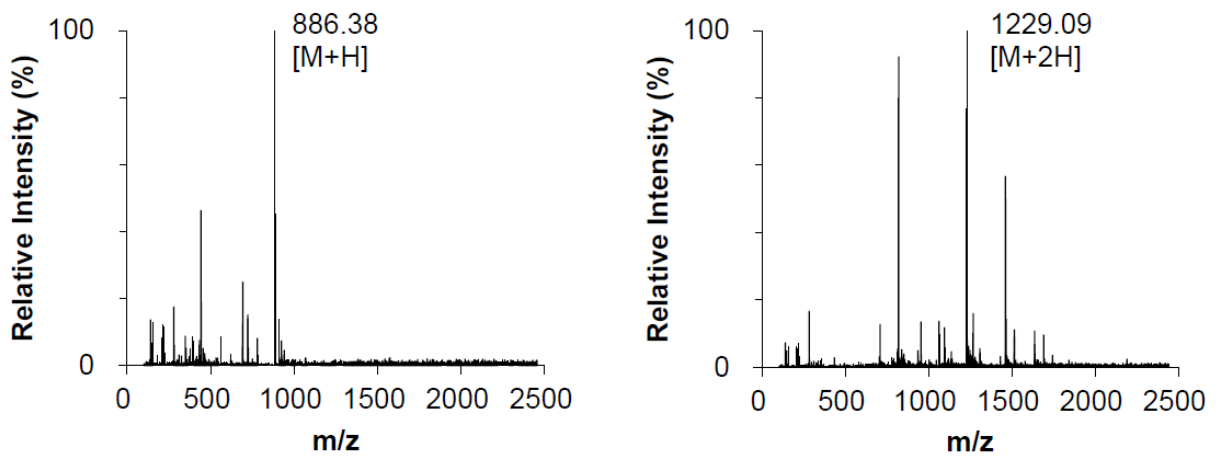


図 29 SEC ピーク B 画分のペプチドマップピークの tandem mass スペクトル

左：クロマトグラムの 29.2 分ピーク、右：クロマトグラム 53.4 分のピーク

ベバシズマブの Fab ドメイン及び抗原である VEGF のダイマーの 3D モデルを図 30 に示す。図 30 中の「+」は水分子を示しており、Ser105-Ser106 の付近に加水分解に必要な水分子の存在が確認された。加えて、Ser105-Ser106 は抗体分子の表面上に存在しており、切断が生じやすい部位であることが確認された。

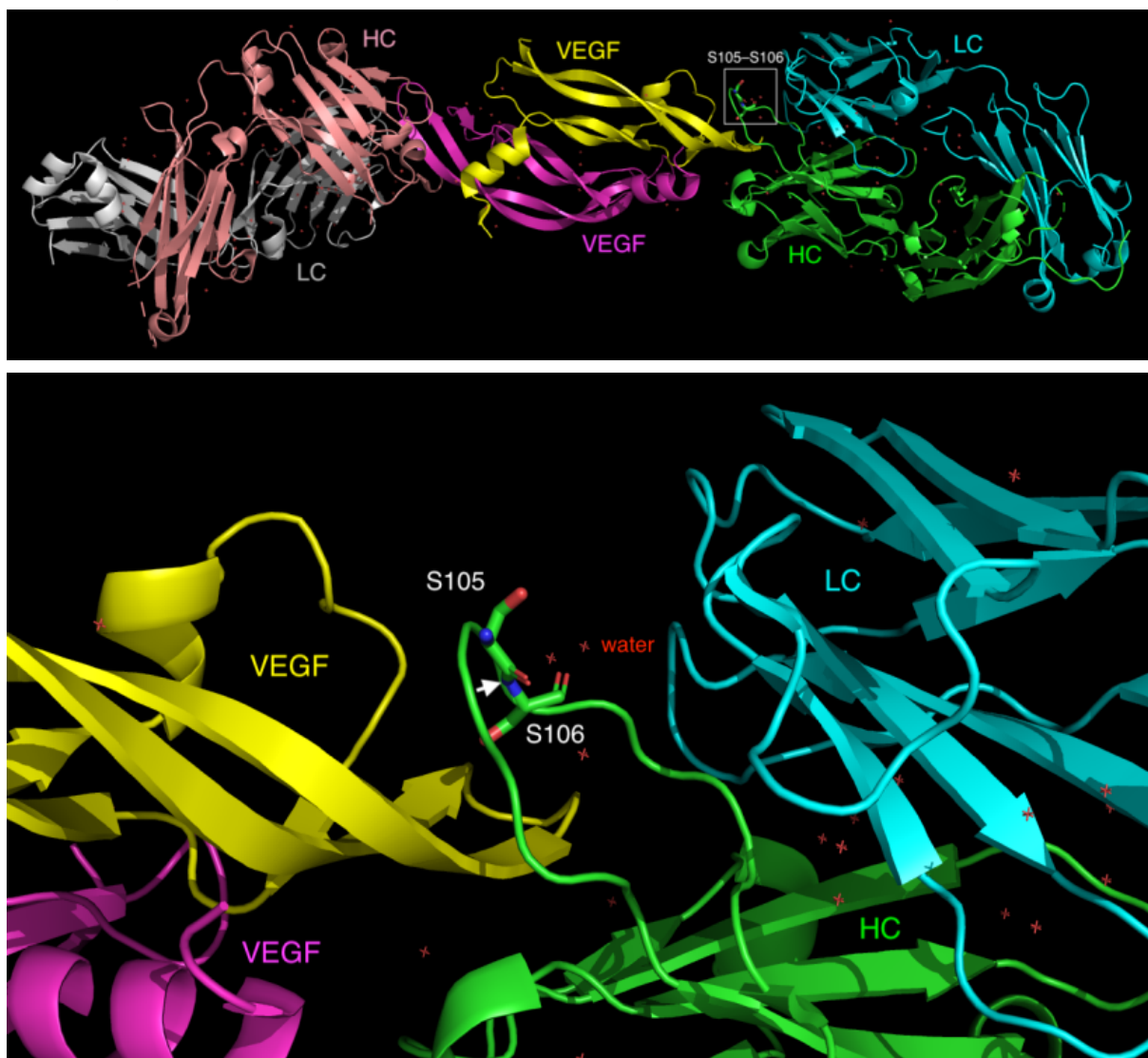


図 30 ベバシズマブの Fab ドメイン及び VEGF ダイマーの 3D モデル (PDB coordinate ID: 6BFT⁽⁴⁶⁾)

上段：全体図、下段：ベバシズマブ重鎖 Ser105-Ser106 付近の拡大図 (PyMOL⁽⁴⁷⁾により作成)

2.2.5 CDR クリップ抗体と重鎖 N 末端フラグメントの結合様式

2.2.1 項において、熱処理したベバシズマブと未処理のベバシズマブについて CE-SDS 分析を行い、クリップ抗体に由来するピークが増加していると推定された (図 16 及び図 17)。また、2.2.3 項及び 2.2.4 項において、Yarra SEC-3000 カラムを使用した SEC のクロマトグラムにおいて、主ピークの直前に検出されるピーク (図 22 のピーク B) には、重鎖 CDR3 にクリップを有する抗体分子が含まれていることを証明した (図 25 及び図 29)。そこで、2.2.1 項の CE-SDS 分析において熱処理により顕著な増加が認められたピーク (図 16 のピーク①②、図 17 のピーク③④) が、CDR クリップ抗体に由来するものであるかを確認した。Yarra SEC-3000 カラ

ムを用いた SEC によって分画したピーク A 画分及びピーク B 画分 (図 22) を、非還元 CE-SDS 及び還元 CE-SDS で分析した。コントロールとして未分画のベバシズマブを同時に分析した。エレクトロフェログラム及び総ピーク面積に対する各ピーク面積%を図 31、図 32 及び表 7 に示す。非還元 CE-SDS において 7.2 分 (①) 及び 15.4 分 (②) に検出されるピーク、及び還元 CE-SDS において 7.3 分 (③) 及び 10.3 分 (④) に検出されるピークは、コントロールサンプルではわずかに認められ、SEC ピーク A 画分ではほとんど検出されなかった。一方、SEC ピーク B 画分については、非還元 CE-SDS において 7.2 分 (①) 及び 15.4 分 (②) に検出されるピークが増加し、15.6 分に検出されるインタクトな抗体ピーク (IgG ピーク) は著しい減少が認められた。さらに、還元 CE-SDS において 7.3 分 (③) 及び 10.3 分 (④) に検出されるピークの増加及び 11.0 分に検出されるピーク (クリップされていない重鎖) の減少が認められた。

以上の結果から、非還元 CE-SDS において 7.2 分 (①) 及び 15.4 分 (②) に検出されるピークは、それぞれ重鎖 N 末端-105 残基 (HC1-105) のフラグメント及び片側の重鎖 N 末端-105 残基を欠くクリップされた抗体分子のフラグメントであると判断した。また、還元 CE-SDS において 7.3 分 (③) 及び 10.3 分 (④) に検出されるピークは、それぞれ HC1-105 のフラグメント及び重鎖 106-C 末端のフラグメントであると判断した。

抗体の可変ドメインの構造は β 鎖に囲まれた内部の疎水性コアによって安定化されており⁽⁶¹⁾、あるモノクローナル IgG2 抗体 (詳細は非公開) の重鎖 CDR3 の Asp-Asp 間のペプチド結合の切断によって形成された 11 kDa のペプチドフラグメントは残った抗体分子断片へ強く非共有結合的に会合していることが報告されている⁽²²⁾。2.2.3 項及び本項の CE-SDS の結果から、SEC 分析時は単一ピークに含まれていた HC1-105 のフラグメントと CDR クリップ抗体は、CE-SDS 分析により 2 つのピークに分離することが明らかとなった。これは、HC1-105 のフラグメントと CDR クリップ抗体は、通常 (非変性条件下) 非共有結合的に会合しているが、CE-SDS 分析時に SDS 処理することで解離したためと考えられる。以上のことから、HC1-105 のフラグメントと CDR クリップ抗体は、通常 (非変性条件下) 、非共有結合的に会合していることが示唆された。

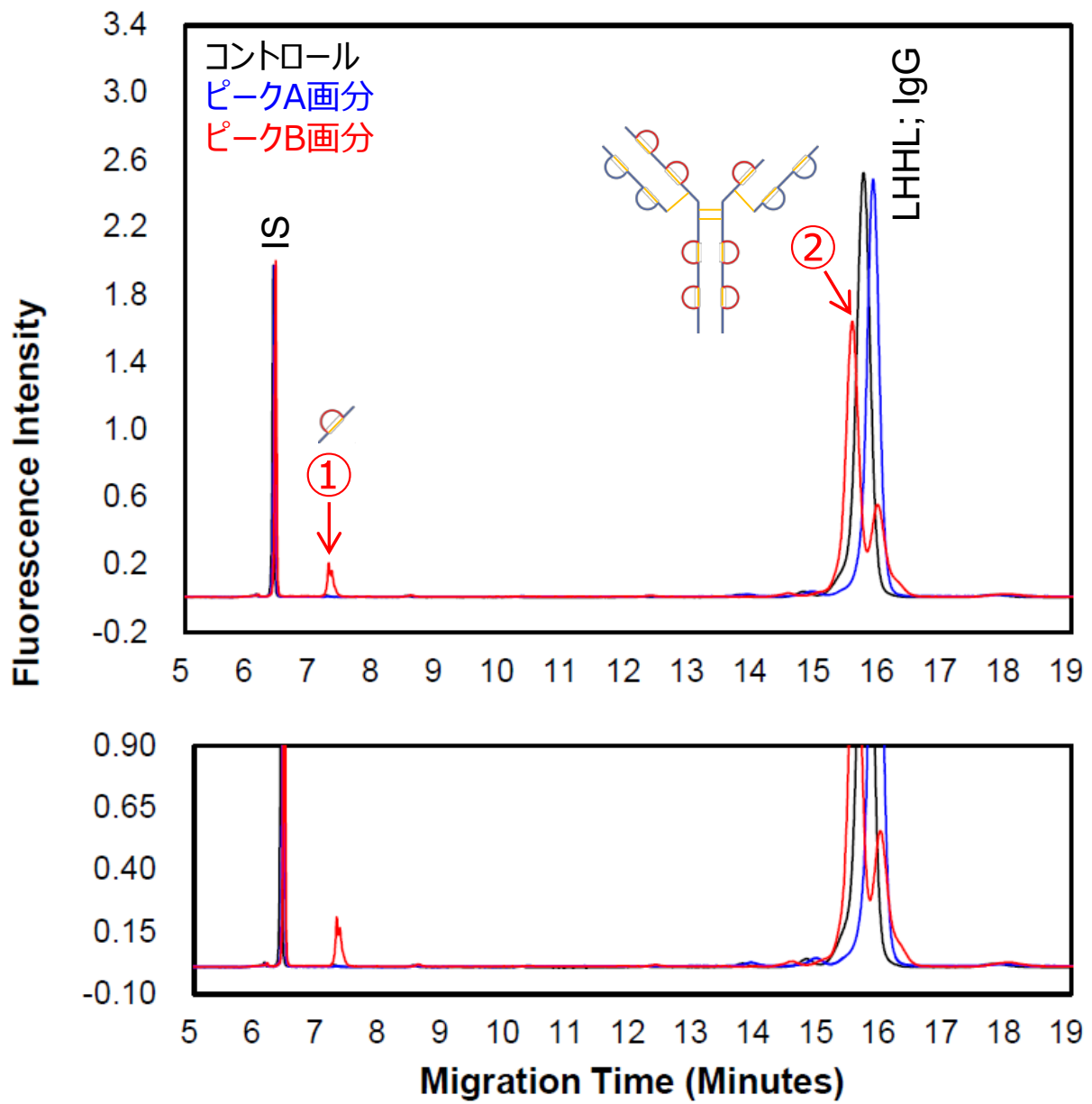


図 31 SEC ピーク画分の非還元 CE-SDS のエレクトロフェログラム (下は拡大図)

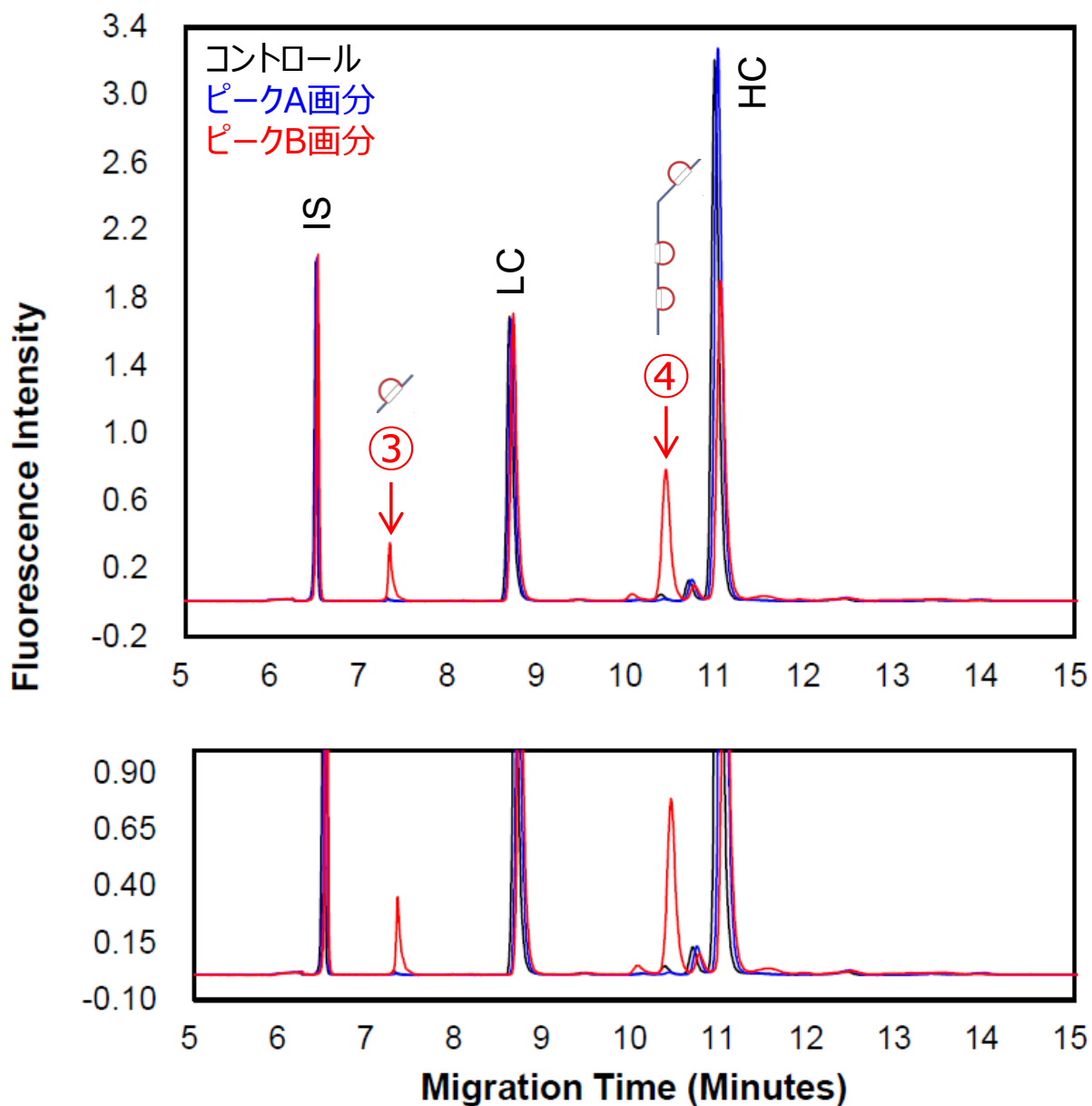


図 32 SEC ピーク画分の還元 CE-SDS のエレクトロフェログラム (下は拡大図)

表 7 SEC ピーク画分の CE-SDS の各ピーク面積%

サンプル	ピーク	非還元 CE-SDS			還元 CE-SDS		
		①7.2分	②15.4分	IgG	③7.3分	④10.3分	HC+LC
コントロール		0.3 ± 0.0	4.8 ± 0.1	91.1 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.0	94.2 ± 0.1
SEC ピーク A 画分		0.1 ± 0.0	1.5 ± 0.1	95.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	94.9 ± 0.1
SEC ピーク B 画分		6.5 ± 0.0	65.4 ± 0.1	24.7 ± 0.1	5.9 ± 0.0	17.1 ± 0.0	71.3 ± 0.2

繰り返し3回の測定値の平均値±標準偏差

2.2.6 CDR のクリップ形成による SEC 保持時間への影響

SEC のクロマトグラムでは一般的に高質量の分子は低質量の分子よりも早く溶出する。2.2.5 項で述べたとおり、通常 (非変性条件下)、HC1-105 のフラグメントと CDR クリップ抗体子は解離せずに非共有結合的に会合していることが示唆された。そのため、CDR クリップ抗体

とインタクト抗体の分子全体のサイズはほぼ変わらず、質量の差はペプチド結合の加水分解に由来する水 1 分子だけと考えられる。しかしながら、Yarra SEC-3000 カラムを用いた場合、CDR クリップ抗体を含むピークはインタクト抗体を含むピークと明瞭に分離され、インタクト抗体よりも早く溶出された (図 33)。その原因として、CDR のクリップ形成による抗体分子の流体力学的半径の増加及び SEC カラムの固定相と抗体分子間の相互作用の減弱が考えられた。CDR のクリップ形成により抗体分子の流体力学的半径が大きくなる場合、Yarra SEC-3000 カラム以外の SEC カラムを用いた場合も CDR クリップ抗体がインタクト抗体より早く溶出すると考えられる。しかしながら、2.2.2 項に示したとおり TSK G3000SW_{XL} カラム及び XBridge Protein BEH カラムについてそのような結果は認められなかった。従って、CDR のクリップ形成により SEC カラムの固定相と抗体分子間の相互作用が減弱し、保持時間が早くなった可能性が高いと考えられた。そこで、CDR のクリップ形成が、SEC カラムの固定相と抗体分子間の相互作用 (疎水性相互作用及び静電相互作用) に与える影響について以下に考察する。

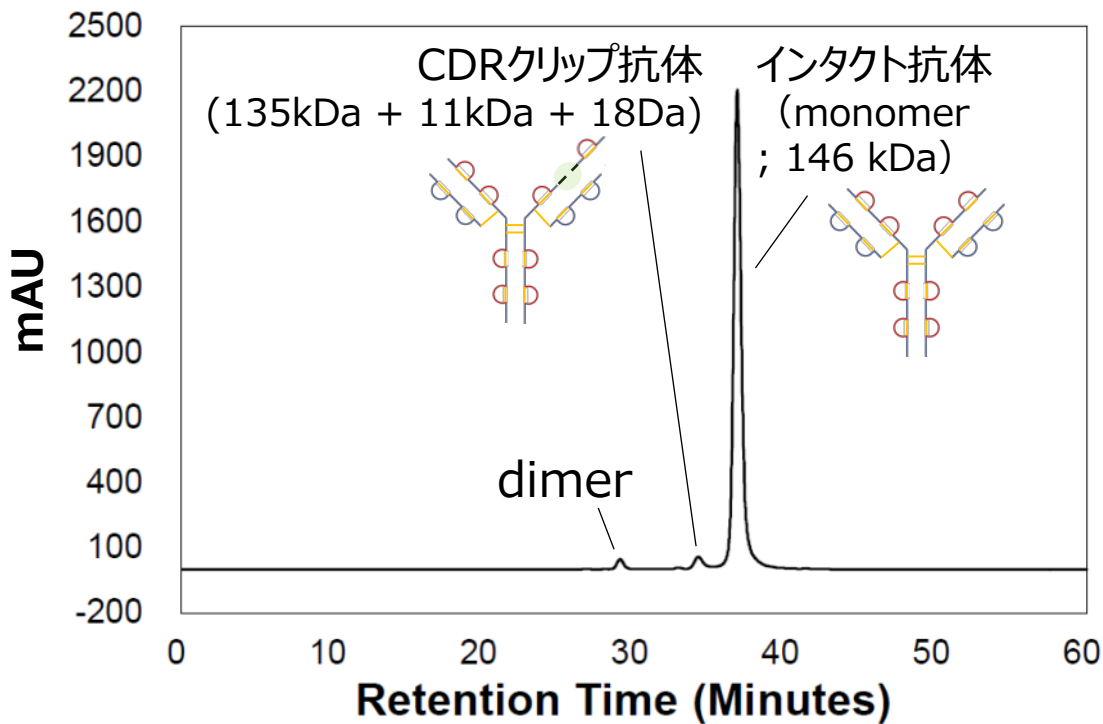


図 33 Yarra SEC-3000 カラムにおける CDR クリップ抗体とインタクト抗体の溶出位置

1) 疎水性相互作用

SEC 分析において、メタノールやエタノールなどの有機溶媒を移動相に添加すると、タンパク質とカラム固定相表面の疎水性相互作用を低減させることが可能である⁽⁶²⁾。そこで、ベバシズマブについて、エタノールを含む移動相及び含まない移動相を用いて SEC 分析を行った。カラムは Yarra SEC-3000 カラムを使用した。結果を図 34 及び表 8 に示す。エタノールを含まない移動相と比較して、エタノールを含む移動相を使用した場合、CDR クリップ抗体のピーク面積%は変化しなかったが、ダイマーピーク面積%については減少が認められた。ダイマー形成の一部は疎水性相互作用に由来するため、エタノールにより抗体分子間の界面での疎水性相互作用が減少したためと考えられた。さらに、エタノールを含まない移動相と比較して、エタノールを含む移動相を使用した場合、すべてのピークについて保持時間が早くなった。特に、

インタクト抗体は移動相へのエタノール添加により保持時間が 1.5 分早くなったのに対し、ダイマー及び CDR クリップ抗体のピークはわずかに 0.7 分早くなっただけであった。これはインタクト抗体がダイマー及び CDR クリップ抗体よりも SEC カラム固定相と強く疎水性相互作用しており、遅く溶出されることを示唆している。

以上の結果から、CDR のクリップ形成による抗体分子と SEC カラム固定相の疎水性相互作用の減少が、SEC 分析において CDR クリップ抗体の溶出がインタクト抗体よりも早くなることに影響を及ぼしていると考えられた。

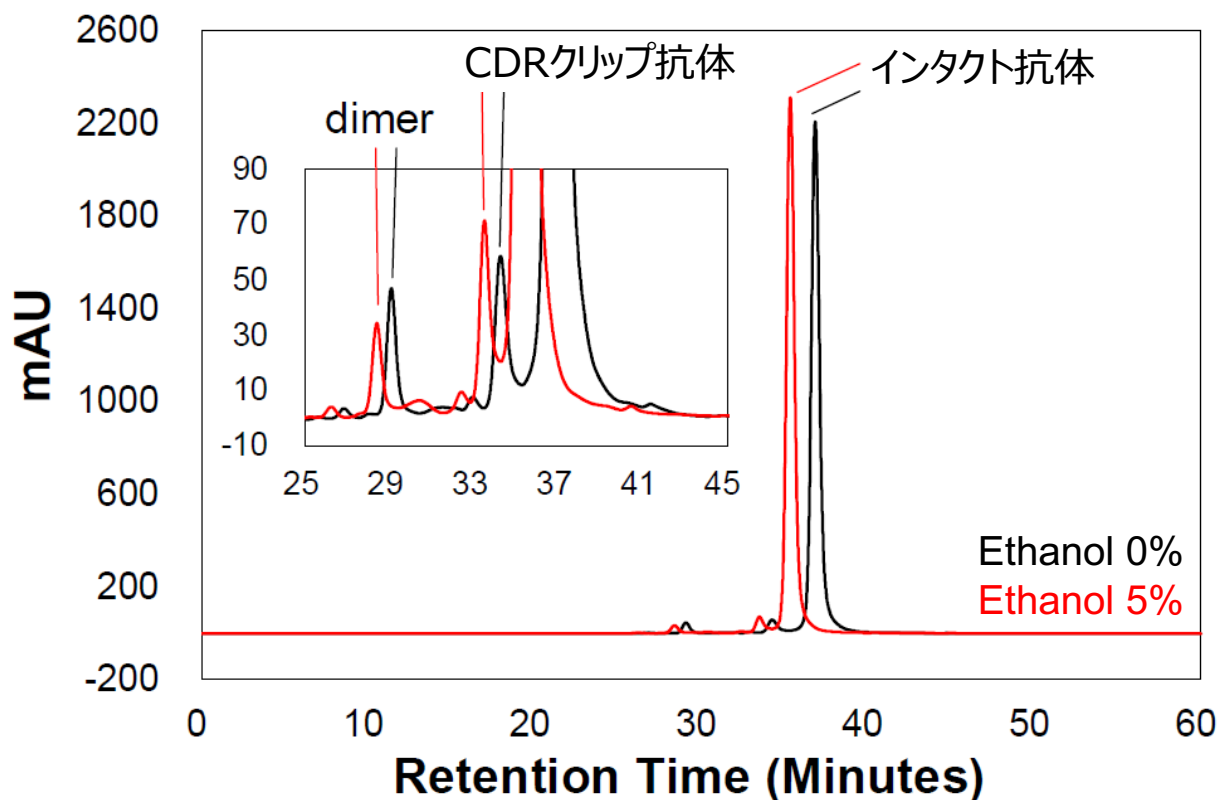


図 34 ベバシズマブ（熱処理なし）のサイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラム (inset は拡大図)

表 8 ベバシズマブ（熱処理なし）のサイズ排除クロマトグラフィーの各ピーク面積%

移動相 エタノール濃度 (%)	ダイマー		CDR クリップ抗体		インタクト抗体	
	保持時間 (分)	ピーク面 積%	保持時間 (分)	ピーク面 積%	保持時間 (分)	ピーク面 積%
0	29.1	1.9	34.2	3.1	36.8	93.3
5	28.4	1.4	33.5	3.2	35.3	93.7

2) 静電相互作用

ベバシズマブの等電点 (Isoelectric Point; pI) は 8.3 と報告されている⁽⁶³⁾。本研究で使用した SEC の移動相 pH は 7.0 であることから、SEC 分析 (pH 7.0) においてベバシズマブは正の電荷を帯びる。CDR のクリップにより仮に抗体分子の pI が酸性側にシフトした場合、pH 7.0 における抗体分子の正の電荷は減少する可能性がある。その場合、抗体分子と SEC カラム固定相の静電相互作用が減少し、SEC 分析時に CDR クリップ抗体がインタクト抗体よりも早く溶出される可能性が考えられる (電荷異性体の評価は 3.2.5 項で述べる)。

2.3 小括

本研究では、CDR クリップ抗体について着目した。なぜならば、抗体医薬品に含まれる切断体の中でも、非変性条件下での分離が困難であることからその特性がこれまで解明されていないためである。CDR クリップ抗体の特性を明らかにするためには、熱等のストレスに晒されていない抗体医薬品中にわずかに含まれる CDR クリップ抗体を、界面活性剤や変性剤を含まない非変性条件下で単離/回収する必要がある。しかしながら、これまでにそのような手法は報告されていない。そこで、CDR クリップ抗体の単離可能な手法の検討をまず実施した。

ベバシズマブを加熱処理し、CE-SDS で分析したところ、熱処理時間に依存して増加するピークを認め、CDR クリップ抗体に由来すると推察された。そこで、4 種の SEC カラムを検討し、熱処理時間依存的に増加するピークと主ピーク（インタクト抗体、モノマー）が明瞭に分離され、純度高く回収可能なカラム（Phenomenex 社 Yarra SEC-3000）を選定した。次に、熱処理依存的に増加するピークに含まれる分子種を、質量分析により同定した。その結果、ベバシズマブの VH ドメインの重鎖 CDR3 に位置する Ser105-Ser106 間のペプチド結合が切断された CDR クリップ抗体が含まれていることを確認した。また、CDR クリップ抗体は、通常（非変性条件下）、重鎖 N 末端フラグメントと非共有結合的な会合をしており、SEC カラム固定相との相互作用が減少することで、SEC 分析時にインタクト抗体よりも早く溶出することが示唆された。

本研究において構築した Yarra SEC-3000 カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーは、非変性条件下で、CDR クリップ抗体分子を単離/回収可能とした手法の初めての報告である。さらに、熱等のストレスを与えていない試料中にわずかに含まれる CDR クリップ抗体を、純度高く回収できることから、ストレス処理による CDR クリップ抗体以外の切断体やその他不純物を過剰に含まない、CDR クリップ抗体単独の詳細な特性解析が可能となった。

そこで、次章では、これまで解明されていなかった CDR クリップ抗体の特性評価を実施した。

3 CDR にクリップを有する抗体分子の網羅的特性解析

2章において、Yarra SEC-3000 カラムを用いて非変性条件下で CDR クリップ抗体を純度高く単離可能なサイズ排除クロマトグラフィー法を構築することが出来た。そこで、本章では、構築した試験法により単離/回収した CDR クリップ抗体を用い、CDR クリップが及ぼす以下の影響を解析した（詳細は「3.2 項 結果及び考察」に記載）。

- 1) 安定性への影響
 - 凝集性：免疫原性を誘発する可能性があり、抗体医薬品において厳密な管理が必要とされるため。
 - 熱安定性：抗体分子の安定性及び凝集形成に関わるため。
- 2) 機能への影響
 - 抗原親和性：抗体医薬品としての有効性全体に決定的に影響するため。
 - FcRn 親和性：抗体分子の血中寿命に関わるため。
 - Fcγ 受容体親和性：抗体分子を介した貪食など作用機序に関わる重要な機能であるため。
 - 高次構造：抗体機能の変化と密接に関連するため。
- 3) その他各種性質への影響
 - 翻訳後修飾
 - N 末端異性体・C 末端異性体：抗体分子の不均一性に与える影響を評価するため。
 - メチオニン酸化・脱アミド化：抗体分子の血中寿命に関わる FcRn との親和性に影響する可能性があるため。
 - N-結合型糖鎖：抗体の活性・有効性・安全性・薬物動態に影響する可能性があるため。
 - 疎水性：タンパク質の凝集性に関わる性質であるため。
 - 電荷分布：抗体分子の不均一性に与える影響を評価するため。

その結果、CDR クリップ抗体では、機能の低下、安定性の低下、その他各種性質の変化が観測された。本研究により、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 CDR のクリップ形成は影響を及ぼすことが明らかになった。

3.1 方法

3.1.1 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (53)

CDR のクリップ形成が抗体の凝集性に及ぼす影響を調べるために凝集体を SEC で解析した。SEC は、直列に接続した 2 本の Yarra SEC-3000 カラム (7.8×300 mm, 3 μm, Phenomenex Inc.) を Agilent 1100 又は 1200 HPLC システム (Agilent Technologies, Inc.) に接続して実施した。移動相は、50 mM リン酸ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウム及び 5% (v/v) エタノールを含む水溶液 (pH 7.0) を使用した。注入タンパク質量を 20 μg、流速を 1.0 mL/分、カラム温度を 25 °C とし、溶出は 215 nm の紫外吸光でモニターした。

3.1.2 示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry; DSC) ⁽⁴⁵⁾

CDR のクリップ形成が抗体の熱安定性に及ぼす影響を調べるために、DSC で解析した。ベバシズマブ (Avastin[®]) の処方媒体 (51 mM リン酸ナトリウム、60 mg/mL トレハロース二水和物及び 0.4 mg/mL ポリソルベート 20 を含む水溶液 (pH 6.2)) で 0.5 mg/mL に希釈した抗体を、マイクロカロリメーター (VP-Capillary, GE Healthcare Biosciences) を使用して 25~100 °C の温度範囲で 1 °C/分で加熱し、サーモグラムを取得した。得られたサーモグラムから媒体のサーモグラムを差し引いた後、ベバシズマブのモル濃度でデータをノーマライズした。

3.1.3 ペプチドマップ質量分析⁽⁵⁵⁾による各異性体・修飾体含量の算出

2.1.5 項で実施したペプチドマップ質量分析の結果から、インタクト抗体及び CDR クリップ抗体について、以下の式により各異性体・修飾体 (N 末端異性体・C 末端異性体・メチオニン酸化体・脱アミド体) の含量を算出した。

- N 末端異性体・C 末端異性体 :

各修飾体の含量 (%) = 修飾された修飾部位を含むペプチドの MS Intensity ÷ 修飾部位を含む全ペプチドの MS Intensity の合計 × 100

- メチオニン酸化体・脱アミド体 :

各異性体の含量 (%) = C 末端 (又は N 末端) が異性体 X であるペプチドの MS Intensity ÷ C 末端 (又は N 末端) を含む全ペプチドの MS Intensity の合計 × 100

3.1.4 糖鎖プロファイル試験⁽⁶⁴⁾

CDR のクリップ形成が抗体に結合した N-結合型糖鎖の組成に及ぼす影響を調べるために、糖鎖のプロファイルを解析した。始めに抗体を還元処理するため、236 µg のサンプルを 1 µL の 2-メルカプトエタノールと混合し、37 °C で 5 分間加温した。次に、N-結合型糖鎖を遊離させるため、20 ユニットの PNGase F を添加後、37 °C で 19 時間加温した。次に、遊離した糖鎖を蛍光標識するため、サンプル溶液を減圧下で乾固させた後、標識溶液 (2-AB 10 mg 及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム 10 mg を 70:30 (v/v) DMSO : 酢酸 100 µL に溶解したもの) 10 µL で溶解して、37 °C で 19 時間加温した。次に 20 µL の水を加え、1 mL の洗浄液 (95%アセトニトリル) を加えた。サンプル溶液をあらかじめ洗浄液で平衡化した Oasis HLB Vac カートリッジ (Waters) に通過させ、洗浄液による洗浄後、N-結合型糖鎖を 1 mL の溶出液 (20%アセトニトリル) で回収した。溶出液を減圧下で乾固させた後、100 µL の水で溶解した。調製した 20 µL のサンプルを、Hypersil ODS カラム (4×250 mm, 3 µm, Thermo Fisher Scientific) を接続した Agilent HPLC 1100 システム (Agilent Technologies, Inc.) で分析した。移動相 A は 0.1% (v/v) 酢酸を含む水溶液、移動相 B は 0.1% (v/v) 酢酸を含む 90%アセトニトリル溶液を使用し、表 9 に示すとおり混合比を変えて濃度勾配を制御した。流速を 0.2 mL/分、カラム温度を 25 °C とし、溶出は励起波長 330 nm 及び蛍光波長 420 nm でモニターした。

表 9 糖鎖プロファイル試験の移動相混合比

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~5	95	5
5~95	95→89.6	5→10.4

3.1.5 疎水クロマトグラフィー (Hydrophobic Interaction Chromatography; HIC) (65)

CDR のクリップ形成が抗体の疎水性に及ぼす影響を調べるために、HIC で解析した。一般的に Fab (antigen binding fragment) ドメイン及び Fc (crystallizable fragment) ドメインを得るために消化酵素としてパパインが使用されるが、ベバシズマブではパパインにより Fab ドメインでクリップが生成することが報告されている⁽⁴⁵⁾。従って、本研究においては、IgG1 のヒンジ領域の Lys-Thr 間のペプチド結合を特異的に切断することが報告されているリシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) を使用した⁽⁶⁶⁾。100 mM トリス緩衝液 (pH 7.75) で 5 mg/mL に希釈したサンプルに、Lys-C を酵素対タンパク質量比が 1:200 となるように添加し、37 °C で 30 分間加温した後、氷冷した。Lys-C 消化後のサンプル 19 µg について、PolyPROPYLA™カラム (4.6×100 mm, 3 µm, PolyLC Inc.) を接続した Agilent 1200 HPLC システム (Agilent Technologies, Inc.) で分析した。移動相 A は 20 mM リン酸二水素ナトリウム二水和物及び 2 M 硫酸アンモニウムを含む水溶液 (pH 6.0)、移動相 B は 20 mM リン酸二水素ナトリウム二水和物を含む水溶液 (pH 6.0) を使用し、表 10 に示すとおり混合比を変えて濃度勾配を制御した。流速を 1 mL/分、カラム温度を 30 °C とし、溶出は 215 nm の紫外吸光でモニターした。

表 10 疎水クロマトグラフィーの移動相混合比

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~5	90	10
5~45	90→0	10→100

3.1.6 イメージキャピラリー等電点電気泳動 (Imaged Capillary Isoelectric Focusing; icIEF) (67)

CDR のクリップ形成が抗体の電荷分布に及ぼす影響を調べるために、icIEF で解析した。水で 0.6 mg/mL に希釈した抗体 20 µL と 1% メチルセルロース、両性電解質 (pH 3-10 及び pH 8-10.5) 及び pI マーカー (7.05 及び 9.50) を含む溶液 80 µL を混合した。陽極液として 80 mM リン酸を含む 0.1% メチルセルロース溶液、陰極液として 0.1 M 水酸化ナトリウムを含む 0.1% メチルセルロース溶液を充填した Maurice icIEF カートリッジ (ProteinSimple) を Maurice システム (ProteinSimple) にセットし、前述のサンプルを分離して、280 nm の紫外吸光でモニターした。1500 V で 1 分間 プレフォーカシングを行った後、3000 V で 4.5 分間フォーカシングを実施した。

3.1.7 抗原アフィニティー-Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) (68)

CDR のクリップ形成が抗体の抗原結合能に及ぼす影響を調べるために、ELISA で解析した。10% (v/v) カゼインを含む PBS を用い、抗体濃度が 1800、600、200、67、22、7.4、2.5 及び 0.8 ng/mL になるように段階希釈した。これらの抗体溶液各 100 µL を、rhVEGF-A165 (vascular endothelial growth factor-A165, human, recombinant, 富士フィルム和光純薬) でプレコートした 96 ウェルマイクロプレートに添加し、約 25 °C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後のプレートを 0.05% (v/v) Tween 20 を含む PBS (PBST) で 2 回洗浄し、100 µL の検出抗体溶液 (西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish Peroxidase; HRP) 標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ フラグメント) (Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) を添加し、約 25 °C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後のプレートを PBST で 4 回洗浄し、100 µL のペルオキシダーゼ基質

(TMB Microwell Peroxidase Substrate System, SeraCare Life Sciences) を添加し、約 25 °C で 15 分間インキュベートした。50 μ L の停止溶液 (0.5 M 硫酸) を添加し、マイクロプレートリーダーを使用して、波長 450 nm における吸光度を測定した。試料タンパク質濃度 (ng/mL) の対数を横軸、得られたレスポンス (吸光度) を縦軸にプロットし、4-パラメーターロジスティック回帰式により検量線を作成した。検量線から算出された各試料の EC₅₀ を比較した。

$$y = (A - D) \div (1 + (x \div C)^B) + D$$

- y : レスポンス (吸光度)
- x : 試料濃度
- A : 下方漸近線
- B : 直線部分の傾き
- C : EC₅₀ (最大レスポンスの 50% に相当するレスポンスを与える試料濃度)
- D : 上方漸近線

3.1.8 胎児性 Fc 受容体 (FcRn) アフィニティー-ELISA⁽⁶⁸⁾

CDR のクリップ形成が抗体の FcRn 結合能に及ぼす影響を調べるために、ELISA で解析した。0.1% (v/v) カゼインを含むリン酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、抗体濃度が 60000、12000、2400、480、96、19.2、3.84 及び 0.77 ng/mL になるように段階希釈した。希釈した抗体溶液各 50 μ L を、抗 β 2 ミクログロブリン抗体 (β 2 microglobulin antibody, GeneTex, Inc.) でプレコートした 96 ウェルマイクロプレートに添加し、さらに FcRn タンパク質溶液 (北山ラベス) 及び検出抗体溶液 (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) の混合液 50 μ L を添加して、約 25 °C で 2 時間インキュベートした。FcRn は α 鎖及び β 2 ミクログロブリンのヘテロダイマーであるため、FcRn に結合したサンプル抗体は、抗 β 2 ミクログロブリン抗体を介してプレートに結合して、定量される。インキュベート後のプレートを 0.05% (v/v) Tween 20 を含むリン酸緩衝液 (pH 6.0) で 4 回洗浄し、100 μ L のペルオキシダーゼ基質 (1-Ste™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution, Thermo Fisher Scientific) を添加し、約 25 °C で 30 分インキュベートした。50 μ L の停止溶液 (0.5 M 硫酸) を添加し、マイクロプレートリーダーを使用して、波長 450 nm における吸光度を測定した。試料タンパク質濃度 (ng/mL) の対数を横軸、得られたレスポンス (吸光度) を縦軸にプロットし、4-パラメーターロジスティック回帰式により検量線を作成した。検量線から算出された各試料の EC₅₀ を比較した。

$$y = (A - D) \div (1 + (x \div C)^B) + D$$

- y : レスポンス (吸光度)
- x : 試料濃度
- A : 下方漸近線
- B : 直線部分の傾き
- C : EC₅₀ (最大レスポンスの 50% に相当するレスポンスを与える試料濃度)
- D : 上方漸近線

3.1.9 Fc γ RIIIa アフィニティークロマトグラフィー⁽⁶⁹⁾

CDR のクリップ形成が抗体の Fc γ 受容体結合能に及ぼす影響を調べるために、アフィニティークロマトグラフィーで解析した。Fc γ RIIIa アフィニティークロマトグラフィーは、TSKgelFcR-IIIa-NPR カラム (4.6 \times 75 mm, 5 μ m, Tosoh Biosciences) を Agilent 1100 HPLC シス

テム (Agilent Technologies, Inc.) に接続して実施した。移動相 A は 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5)、移動相 B は 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.5) を使用し、表 11 に示すとおり混合比を変えて濃度勾配を制御した。注入タンパク質量を 20 μg 、流速を 1 mL/分、カラム温度を 25 $^{\circ}\text{C}$ とし、溶出は 280 nm の紫外吸光でモニターした。

表 11 Fc γ R1IIa アフィニティークロマトグラフィーの移動相混合比

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~2	100	0
2~20	100→0	0→100

3.1.10 水素 - 重水素交換質量分析 (Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry; HDX-MS) ⁽⁷⁰⁾

CDR のクリップ形成が抗体分子全体の高次構造に及ぼす影響を調べるために、HDX-MS で解析した。ベバシズマブ (Avastin[®]) の処方で行われている媒体からポリソルベート 20 を除いたブランク溶液 (51 mM リン酸ナトリウム及び 60 mg/mL トレハロース二水和物を含む水溶液 (pH 6.2)) で 3 mg/mL に希釈したサンプルを、ブランク溶液又は重水素化溶液 (51 mM リン酸ナトリウム及び 60 mg/mL トレハロース二水和物を含む重水素溶液 (pH 6.2)) を用いてそれぞれ 20 倍希釈した。20 倍希釈したサンプルを 25 $^{\circ}\text{C}$ で 0 分 (重水素化なし)、0.5、2、12、60 及び 240 分間インキュベートして、水素-重水素交換反応を進行させた。その後、4 $^{\circ}\text{C}$ において等量のクエンチ溶液 (100 mM リン酸カリウム、2 M グアニジン塩酸塩、0.5 M トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩、pH 2.3) を添加し、クエンチした。クエンチしたサンプル 80 μL をペプシン固定化カラム (Enzymate BEH Pepsin Column, 2.1 \times 30 mm, 5 μm , Waters) に注入し、ペプシン消化を 20 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 2.5 で 4 分間行い、消化したペプチドを流速 250 μL /分で溶出した。消化したペプチドについて、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (1.0 \times 100 mm, 1.7 μm , Waters) を接続した UPLC システム (Waters) を用いて LC-MS を実施した。移動相 A は 0.1% (v/v) ギ酸を含む水溶液、移動相 B は 0.1% (v/v) ギ酸を含むアセトニトリル溶液を使用し、表 12 に示すとおり混合比を変えて濃度勾配を制御した。流速を 30 μL /分、カラム温度を 0 $^{\circ}\text{C}$ とした。質量分析は、SYNAPT G2 HDMS (Waters) を用い、ESI キャピラリー電圧を 3 kV、ソース温度を 90 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプルコーン電圧を 40 V とし、ポジティブモードで実施した。データは m/z 50–1950 の範囲で取得した。データ分析には、ソフトウェアパッケージ ProteinLynx Global SERVER バージョン 3.0 (Waters) 及び DynamX バージョン 2.0 (Waters) を使用した。3 つの独立した試験結果について、95%の信頼度で t 検定を行い、少なくとも 2 つの時点で 5% を超えるパーセント差を有意であると判定した。

表 12 HDX-MS の移動相混合比

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~6	92→60	8→40
6~6.5	60→10	40→90
6.5~8	10	90

3.2 結果及び考察

3.2.1 CDR クリップ形成によるダイマー形成の促進

抗体医薬品において、凝集体は切断体と同様に重要品質特性（CQA）の1つである⁽¹³⁾。凝集体は、治療用タンパク質製剤において免疫原性を誘発することが報告されており⁽⁷¹⁾、その存在は有害事象の可能性を高めるとされている⁽⁷²⁾。2014年には米国食品医薬品局（Food and Drug Administration; FDA）より Guidance for Industry Immunogenicity assessment for therapeutic protein products が発表され、治療用タンパク質製剤に含まれる凝集体の適切なモニタリングと低減の必要性が述べられている⁽⁷³⁾。

そこで、CDR にクリップが生じることで抗体分子の凝集体形成に影響があるか否かを評価した。Yarra SEC-3000 カラムで分画したインタクト抗体及び CDR クリップ抗体を 2-8 °C で 16 箇月又は 24 箇月保管した後、SEC で分析して、ダイマーピークの面積%を算出した。コントロールとして未分画のペバシズマブを同様に保管し、分析した。結果を図 35-図 37 及び表 13 に示す。コントロール及びインタクト抗体においては、24 箇月保管後のダイマーピークの増加はほとんど認められなかった。一方、CDR クリップ抗体においては、ダイマーピークが顕著に増加した。この結果は、CDR におけるクリップ形成によりダイマー形成が促進されることを示唆している。従って、CDR のクリップ形成は、ダイマー形成の促進を誘導し、免疫原性につながる可能性のある重要な品質変化をもたらすことが示唆された。IgG2 mAb の重鎖 CDR3 の切断は凝集を引き起こさない例が報告されており⁽²²⁾、本研究において得られた結果は、CDR クリップ抗体の凝集体形成に関する新たな知見である。

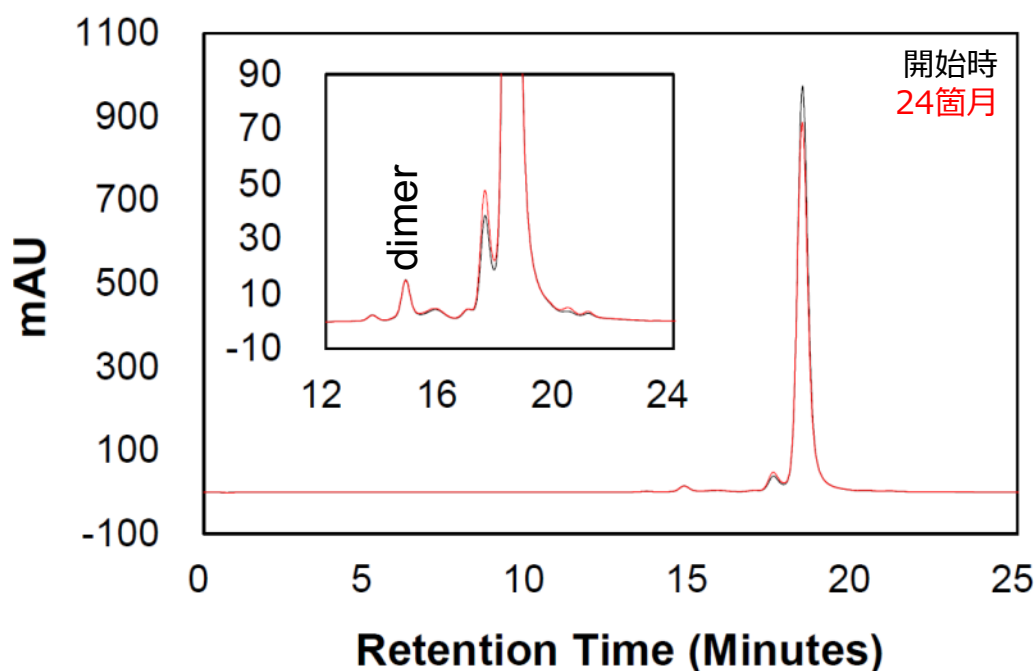


図 35 コントロールの 2-8°C 保管品の SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)

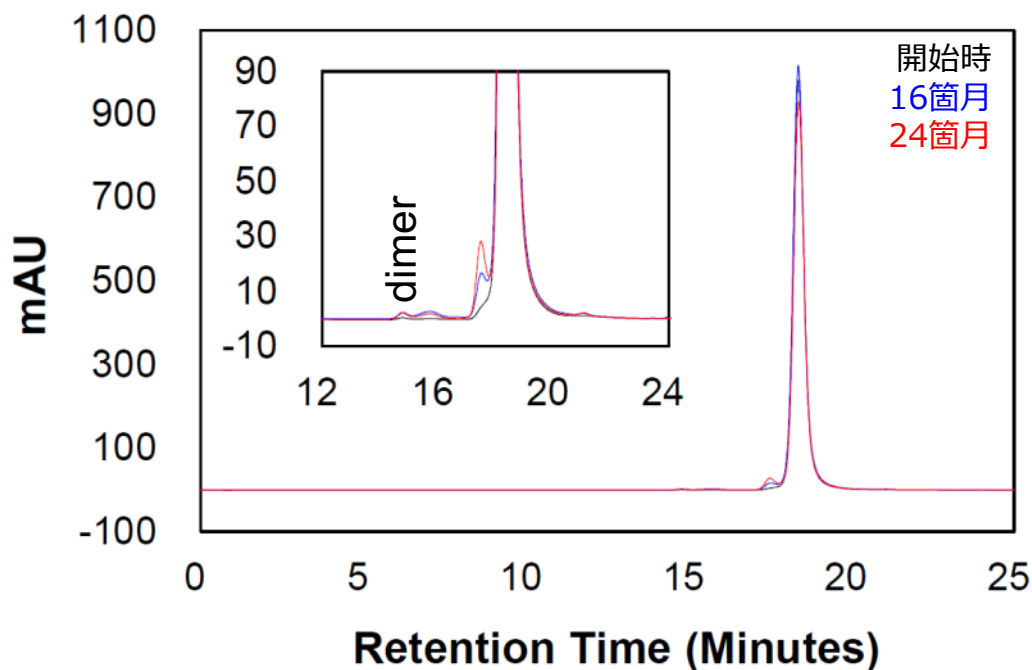


図 36 インタクト抗体の 2-8°C 保管品の SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)

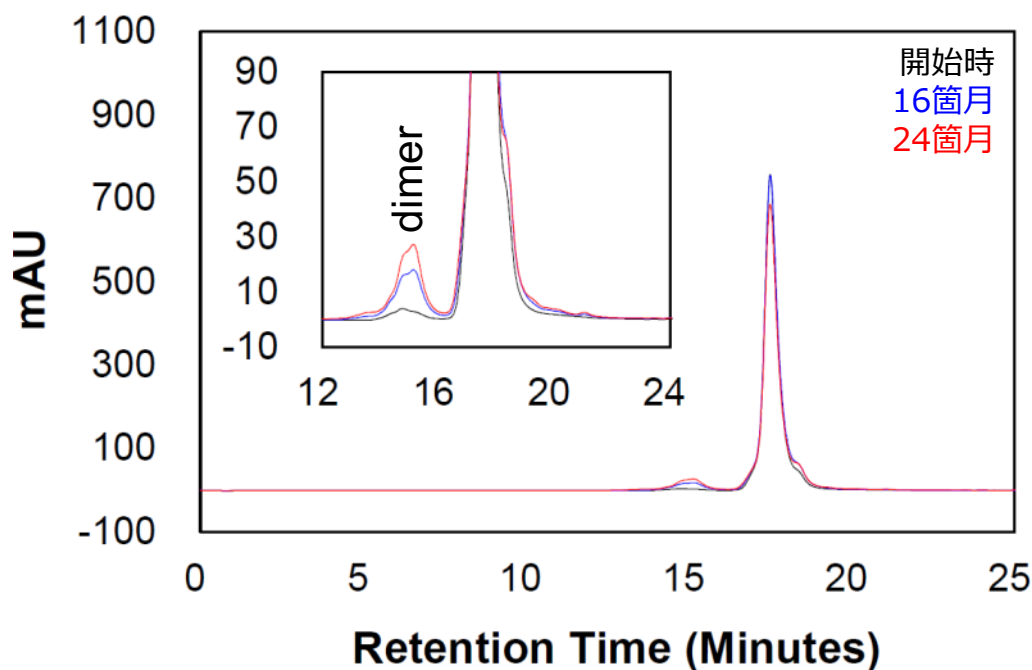


図 37 CDR クリップ抗体の 2-8°C 保管品の SEC のクロマトグラム (inset は拡大図)

表 13 2-8°C 保管品の SEC のダイマーピーク面積%

試料	開始時	16 箇月	24 箇月
コントロール	1.6 ± 0.0	No Data	1.7 ± 0.0
インタクト抗体	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
CDR クリップ抗体	1.2 ± 0.0	4.6 ± 0.0	7.0 ± 0.0

繰り返し 3 回の測定値の平均値 ± 標準偏差

3.2.2 CDR クリップ形成による Fab ドメインの熱安定性低下

CDR におけるクリップ形成が抗体分子の熱安定性に影響するか否かを評価するため、Yarra SEC-3000 カラムで分画したインタクト抗体及び CDR クリップ抗体を、示差走査熱量計 (DSC) により分析した。コントロールとして未分画のベバシズマブも同時に分析した。サーモグラムを図 38 に示す。コントロール及びインタクト抗体のサーモグラムにおいて、73 °C で大きな転移を、84 °C で小さな転移が認められた。73 °C における転移は、Fab 及び CH2 ドメイン、84 °C のピークは CH3 ドメインの融解に起因することが報告されている⁽⁴⁵⁾。一方、CDR クリップ抗体のサーモグラムにおいては、73 °C における転移のピーク高さがインタクト抗体の約 50%と小さく、67°C 付近に肩が認められた。

以上の結果から、CDR のクリップ形成により抗体分子の Fab ドメインの熱安定性が低下したことが示唆された。この結果は、パパイン消化により生じたインタクトな Fab とクリップされた Fab を含むベバシズマブの Fab フラグメントの DSC において、2つのピーク転移が認められた Ionescu らの報告と一致していた⁽⁴⁵⁾。また、タンパク質は熱安定性が低いと凝集しやすくなる傾向があるので、この DSC の結果は、3.2.1 項で示した CDR クリップ抗体におけるダイマー形成促進の結果と一致している。

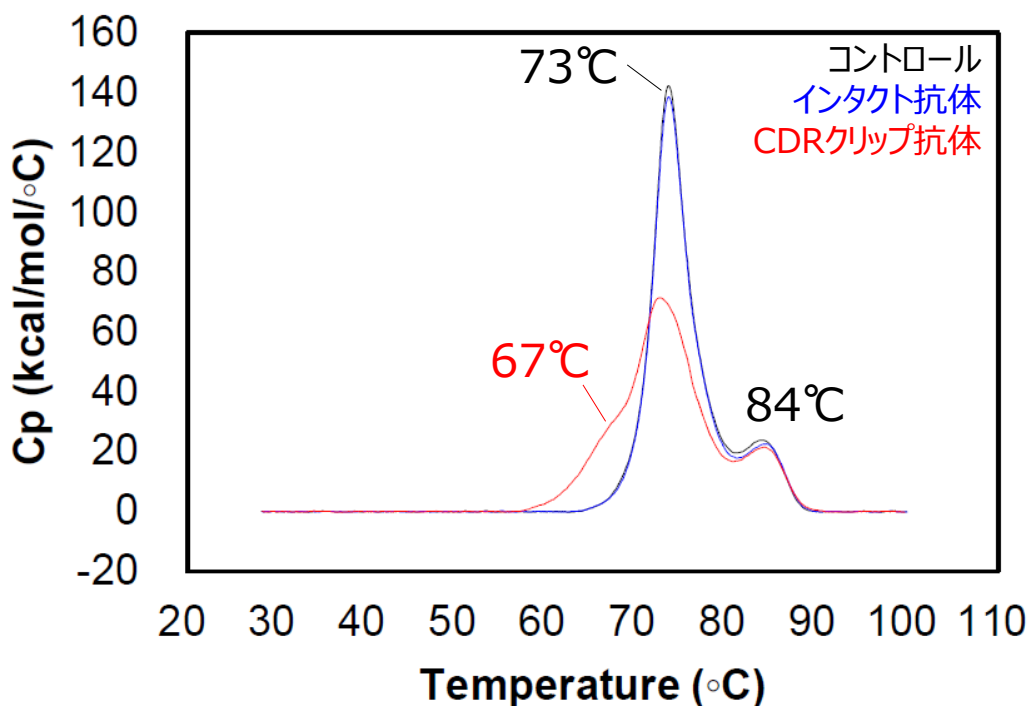


図 38 各抗体の DSC サーモグラム

3.2.3 CDR クリップ形成による翻訳後修飾の変化

CHO 細胞等に組み換え DNA 技術を適用することにより生産される治療用モノクローナル抗体は、生産・精製・保存の間、及び投与後に生じる翻訳後修飾 (post-translational modification; PTM) の結果、不均一な物質となる^(7,8,9,10)。そこで、代表的な翻訳後修飾である N 末端異性化、C 末端異性化、メチオニン酸化、脱アミド化及び N-結合型糖鎖多型について、CDR のクリップ形成による影響を評価した。

3.2.3.1 N末端異性化・C末端異性化・メチオニン酸化・脱アミド化

CDRにおけるクリップ形成が抗体分子のN末端異性化・C末端異性化・メチオニン酸化及び脱アミド化に影響するか否かを評価するため、2.2.4項で実施したペプチドマップ質量分析の結果を解析し、各異性体・修飾体の含量を算出した。なお、ペプチドマップ質量分析における重鎖及び軽鎖のカバレッジは、インタクト抗体及びCDRクリップ抗体共に100%であった。各修飾体の定量結果を表14に示す。N末端異性化（ピログルタミル化）及びC末端異性化（リジン欠損、アミド化プロリン）について違いは認められなかった。一方で、CH2ドメインに位置するMet258及びCH3ドメインに位置するMet434の酸化、並びにCH2ドメインに位置するAsn321の脱アミドについては、インタクト抗体に比べCDRクリップ抗体では増加が認められた。なお、定常領域のMet残基が酸化された場合、FcRnへの結合能の低下することが報告されており⁽⁷⁴⁾、CDRクリップ抗体ではFcRn親和性の低下が認められた（詳細は3.2.7項を参照）。

表 14 N末端異性体・C末端異性体・メチオニン酸化体・脱アミド体の含量 (%)

試料	N末端異性体		C末端異性体			メチオニン酸化体		脱アミド体	
	Glu1	pGlu ^a 1	Lys453	Gly452	aPro ^b 451	Met258	Met434	Asn321	Asn390/395/396
インタクト抗体	98.9	1.1	N.D.	100.0	N.D.	18.5	5.7	17.3	N.D.
CDR クリップ抗体	99.0	1.0	N.D.	100.0	N.D.	27.0	12.0	20.1	N.D.

N.D. =Not Detected
a: pyroglutamic acid
b: amidated proline

3.2.3.2 N-結合型糖鎖多型

CDR におけるクリップ形成が抗体分子の N-結合型糖鎖多型へ影響するか否かを評価するため、Yarra SEC-3000 カラムで分画した CDR クリップ抗体分子及びインタクト抗体について、糖鎖プロファイル試験法により N-結合型糖鎖を解析した。コントロールとして、未分画のペバンズマブも同様に分析した。結果を図 39 及び表 15 に示す。コントロール及びインタクト抗体と比べ、CDR クリップ抗体では、シアロ糖鎖 (SA) 及びガラクトシル糖鎖 (G2F、G1F) についてわずかな増加が認められた (それに伴い、G0F は減少した)。

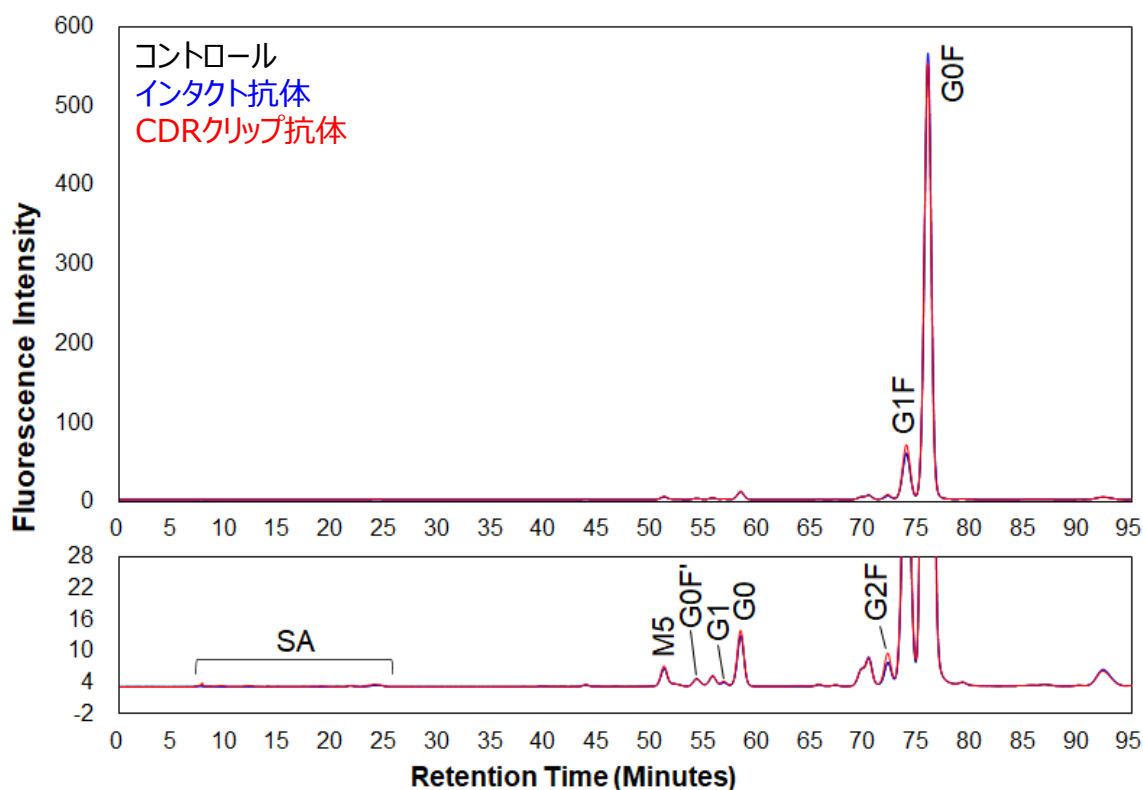


図 39 各抗体の糖鎖プロファイルのクロマトグラム (下は拡大図)

表 15 糖鎖プロファイルの各ピーク面積%

試料 \ ピーク	SA	M5	G1	G0	G2F	G1F	G0F ^a
コントロール	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	9.8 ± 0.0	84.3 ± 0.1
インタクト抗体	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	9.8 ± 0.0	84.2 ± 0.1
CDR クリップ抗体	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.0	11.3 ± 0.0	81.8 ± 0.1

繰り返し 3 回の測定値の平均値 ± 標準偏差

a: 図 39 における G0F' ピークを含む

SA: シアロ糖鎖、M5: マンノース 5、G0F': 試料調製時の蛍光標識により生じる G0F の異性体ピーク、G1: 非還元末端にガラクトースが 1 つ結合したデフコシル型糖鎖、G0: 非還元末端にガラクトースが結合していないデフコシル型糖鎖、G2F: 非還元末端にガラクトースが 2 個結合したフコシル型糖鎖、G1F: 非還元末端にガラクトースが 1 個結合したフコシル型糖鎖、G0F: 非還元末端にガラクトースが結合していないフコシル型糖鎖

3.2.4 CDR クリップ形成による Fab ドメインの疎水性低下

CDR におけるクリップ形成が抗体分子の疎水性に影響するか否かを評価するため、Yarra SEC-3000 カラムで分画したインタクト抗体及び CDR クリップ抗体について疎水性を評価した。また、コントロールとして未分画のベバシズマブを使用した。抗体をリシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) で消化し、ヒンジ領域の Lys-Thr 間の切断により生じた Fc ドメイン及び Fab ドメインを疎水クロマトグラフィー (HIC) により分離した。クロマトグラムを図 40 に示す。コントロール及びインタクト抗体では、Fc ピーク及び Fab ピークがそれぞれ 22.9 分及び 28.8 分に検出された。一方、CDR クリップ抗体ではインタクト抗体と比較して、28.8 分に検出された Fab ピークが減少し、22.1 分に検出されたピークが増加した。疎水クロマトグラフィーでは疎水性の低い分子が先に溶出される。そのため、本試験結果は、CDR のクリップ形成により、抗体分子の Fab ドメインの疎水性が低下したことを示している。この結果は、2.2.6 項 1) における CDR のクリップ形成による抗体分子と SEC カラム固定相の疎水性相互作用の低下と一致している。

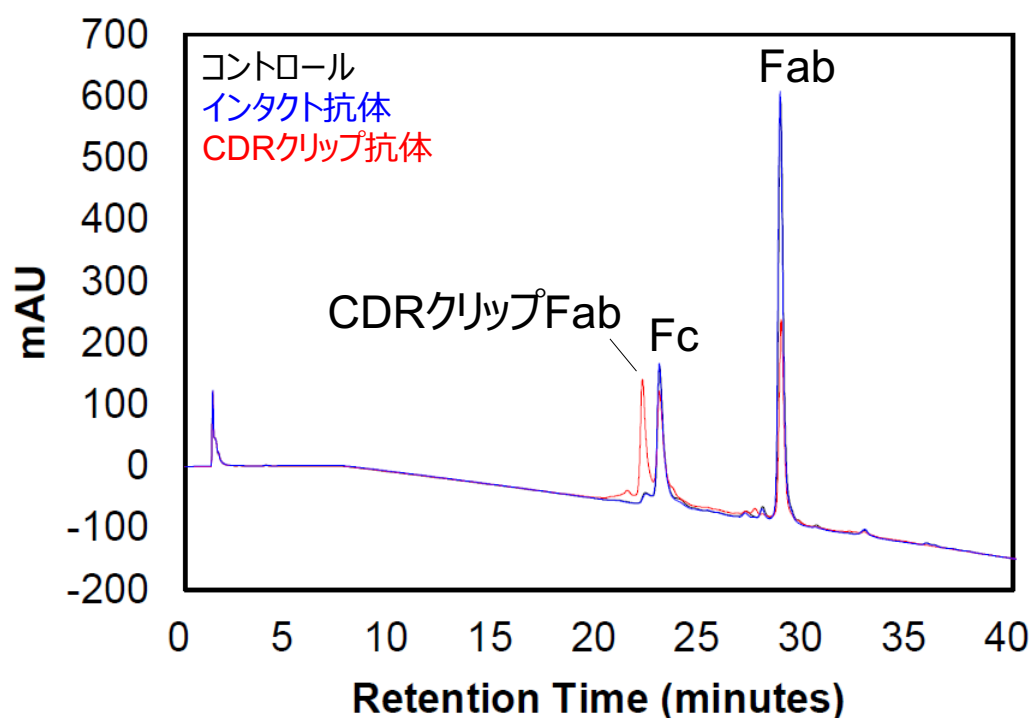


図 40 Fc 及び Fab ドメインの HIC クロマトグラム

3.2.5 CDR クリップ形成による酸性電荷異性体の増加 (等電点の低下)

抗体医薬品において、電荷異性体は重要品質特性 (CQA) になり得る潜在的な重要品質特性 (potential critical quality attribute; pCQA) とされている⁽¹³⁾。CDR におけるクリップ形成が抗体分子の電荷分布に影響するか否かを評価するため、Yarra SEC-3000 カラムで分画したインタクト抗体及び CDR クリップ抗体をイメージキャピラリー等電点電気泳動 (icIEF) で分析した。コントロールとして未分画のベバシズマブも同時に分析した。エレクトロフェログラム及び各ピーク面積%を図 41 及び表 16 に示す。その結果、コントロール及びインタクト抗体と比較し、CDR クリップ抗体では酸性電荷異性体の顕著な増加が認められた。また、エレクトロフェログラムの主ピークから得られた等電点 (Isoelectric Point; pI) を表 17 に示す。コントロール及

び intact 抗体の pI は、それぞれ 8.119 と 8.114 であった。一方、CDR クリップ抗体の pI は 7.955 であった。本試験結果より、CDR のクリップ形成により抗体分子の酸性電荷変異体が増加し、pI が酸性側にシフトすることが示された。

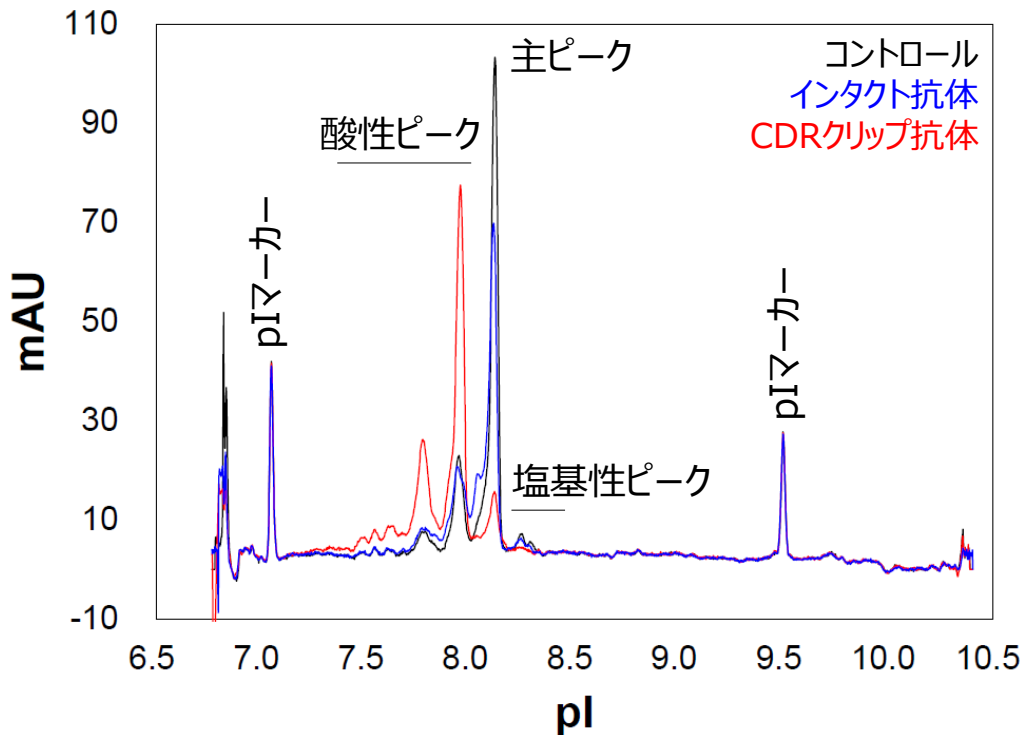


図 41 各抗体の icIEF エレクトロフェログラム

表 16 icIEF の各ピーク面積%

試料	酸性ピーク面積%	主ピーク面積%	塩基性ピーク面積%
コントロール	30.4	64.0	5.6
intact 抗体	38.0	57.7	4.3
CDR クリップ抗体	85.8	12.1	2.0

表 17 等電点 (pI)

試料	等電点 (pI)
コントロール	8.119
intact 抗体	8.114
CDR クリップ抗体	7.955

CDR のクリップ形成による酸性電荷変異体増加 (pI 低下) の原因として考えられる点を以下に挙げるが、いずれも寄与している可能性は低いと考えられる。

- 3.2.3.1 項におけるペプチドマップ質量分析の解析結果から、CDR クリップ抗体では脱アミド体がわずかに増加していた。脱アミド化により抗体に負電荷が誘導されると、陽イオン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動における酸性電荷異性体が生じることが報告されている⁽⁸⁾。しかしながら、CDR クリップ抗体における脱アミド体の増加は、ごくわずかであり、icIEF 分析時の酸性ピーク面積%の顕著な増加に寄与しているとは考えにくい。
- 3.2.3.2 項における糖鎖プロファイル試験の結果から、CDR クリップ抗体ではシアロ糖鎖のわずかな増加が認められた。シアロ酸の存在は、負電荷を導入するため、シアロ酸を持

つ抗体分子は陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて早く溶出し、等電点電気泳動では酸性方向への移動が速くなる^(75,76)。しかしながら、CDR クリップ抗体とインタクト抗体のシアロ糖鎖の差は、わずかに 0.3%であり、icIEF 分析時の酸性ピーク面積%の顕著な増加に寄与しているとは考えにくい。

CDR のクリップ形成による酸性電荷変異体増加 (pI 低下) が抗体分子に与える可能性について以下に考察する。

- タンパク質の等電点に近い pH では、タンパク質の正味電荷はゼロに近く、タンパク質の双極子モーメントによる静電引力がタンパク質間相互作用を支配する。これにより、分子が非特異的に凝集し、溶解度が低くなることがある⁽⁷⁷⁾。ベバシズマブの製剤処方媒体の pH は 6.2 であり、クリップ形成による塩基性から酸性側への等電点のわずかなシフトは、抗体分子間の静電反発力を低下させダイマー形成を促進させる可能性がある。3.2.1 項では、CDR クリップ抗体におけるダイマー形成の促進が認められている。しかしながら、CDR でのクリップ形成により、抗体分子の pI が変化したものの、ベバシズマブの処方 pH からは依然として 1.5 単位以上離れており、pI の変化はダイマー形成の促進に影響していないと考えられる。
- 2.2.6 項 2) で述べたとおり、CDR のクリップにより抗体分子の pI が酸性側にシフトする場合、SEC 分析時 (移動相 pH 7.0) における CDR クリップ抗体分子の正の電荷はインタクト抗体よりも減少する。今回 2.2.2 項で用いた 4 種類の SEC カラムは、耐圧性の要求から、シリカゲルをベースとする充填剤を用いている。シリカゲルはその表面に残存するシラノール基の解離 (pKa, 3.5–4.0) により部分的に負電荷を帯びる⁽⁷⁸⁾。CDR クリップ抗体の pI が酸性側にシフトした (抗体の正電荷が減少した) という icIEF の結果は、抗体分子とカラム固定相との静電引力が減少することを示唆する。従って、Yarra SEC-3000 カラムのクロマトグラムにおいて、CDR クリップ抗体がインタクト抗体よりも早く溶出した一因としてクリップ形成による pI 値の低下も考えられる。

3.2.6 CDR クリップ形成による抗原親和性の低下

CDR におけるクリップ形成が抗体分子と抗原の親和性に影響するか否かを評価するため、インタクト抗体及び CDR クリップ抗体について、抗原に対する親和性を ELISA により評価した。ベバシズマブの抗原である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を固相化したプレートに、段階希釈した抗体を添加し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体を添加後、吸光度を測定した。得られた吸光度から 4-パラメーター用量反応曲線を作成した (図 42)。インタクト抗体及び CDR クリップ抗体の EC₅₀ (最大レスポンスの 50%に相当するレスポンスを与える試料濃度) を表 18 に示す。その結果、CDR クリップ抗体の EC₅₀ は、インタクト抗体の EC₅₀ に比べ約 1.5 倍高く、これは CDR クリップ抗体の抗原親和性が、インタクト抗体に比べ約 3 分の 2 に低下したことを示す。従って、CDR におけるクリップ形成は、抗体の基本性能である抗原親和性を低下させることが確認された。なお、非変性条件下で HIC により分画された軽鎖 CDR1 にクリップを有する IgG2 において、標的分子への親和性が約 10%低下したことが以前に報告されている⁽⁴⁰⁾。

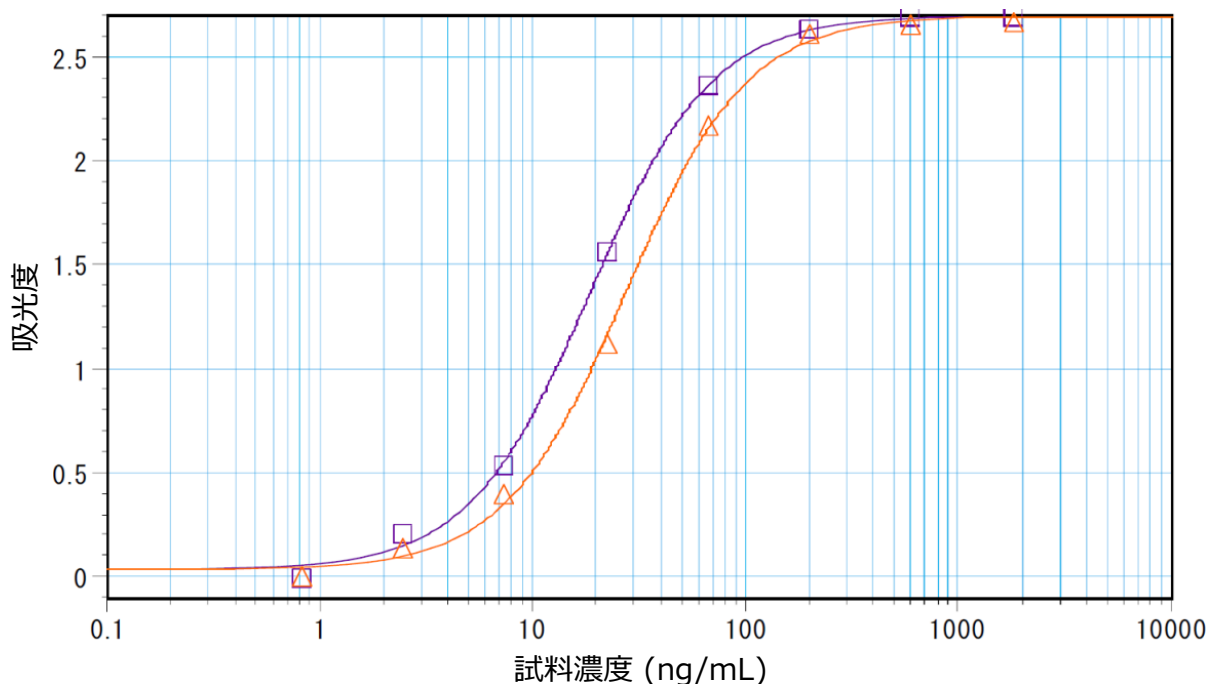


図 42 抗原アフィニティーELISA の用量反応曲線（繰り返し 1 回目）

紫色 (□) : インタクト抗体、橙色 (△) : CDR クリップ抗体

表 18 抗原親和性

試料	EC ₅₀ (ng/mL) ^a	EC ₅₀ (×10 ⁻¹⁰ M) ^a
インタクト抗体	19.8 ± 1.2	1.35 ± 0.08
CDR クリップ抗体	29.5 ± 1.9**	2.01 ± 0.13**

a: 繰り返し 3 回の測定値の平均値 ± 標準偏差

**p 値 < 0.01

3.2.7 CDR クリップ形成による FcRn 親和性の低下

胎児性 Fc 受容体 (FcRn) は、内皮細胞及び骨髄由来細胞のリソソームでの IgG の分解を減少させることにより、IgG の半減期を延長することが知られている^(79,80)。FcRn は α 鎖及び β2 ミクログロブリン (β2m) のヘテロダイマーであり、IgG の結合には β2m も関与している。そこで、CDR におけるクリップ形成が抗体分子の FcRn への親和性に影響するか否かを評価するため、インタクト抗体及び CDR クリップ抗体の FcRn に対する親和性を、抗 β2 ミクログロブリン抗体を用いて ELISA により評価した。抗 β2 ミクログロブリン抗体を固相化したプレートに FcRn、段階希釈した抗体、HRP 標識抗体を添加し、吸光度を測定した。得られた吸光度から 4-パラメーターの用量反応曲線を作成した (図 43)。インタクト抗体及び CDR クリップ抗体の EC₅₀ (最大レスポンスの 50%に相当するレスポンスを与える試料濃度) を表 19 に示す。その結果、CDR クリップ抗体の EC₅₀ は、インタクト抗体の EC₅₀ に比べ約 1.5 倍高く、これは CDR クリップ抗体の FcRn への親和性が、インタクト抗体の約 3 分の 2 に低下したことを示す。従って、CDR におけるクリップ形成は、FcRn に対する抗体の親和性を低下させることが確認された。

FcRn は CH2-CH3 ドメインの表面で IgG に結合するため^(48,49,50)、CDR におけるクリップ形成が CH2 及び/又は CH3 ドメインの構造を変化させ、その結果、抗体分子の FcRn への親和性を

低下させた可能性が考えられた。加えて、定常領域の Met 残基が酸化された場合、FcRn への結合能が低下することが報告されている⁽⁷⁴⁾。3.2.3.1 項において CDR クリップ形成により CH2 ドメインに位置する Met258 及び CH3 ドメインに位置する Met434 の酸化体の増加が認められていることから、酸化体の増加も FcRn 親和性に影響を与えていると考えられた（詳細は 3.2.10 項を参照）。

FcRn への親和性低下により、抗体の血中半減期が減少する可能性があることから、CDR のクリップ形成により抗体医薬品の薬物動態に影響を与える可能性が示唆された。

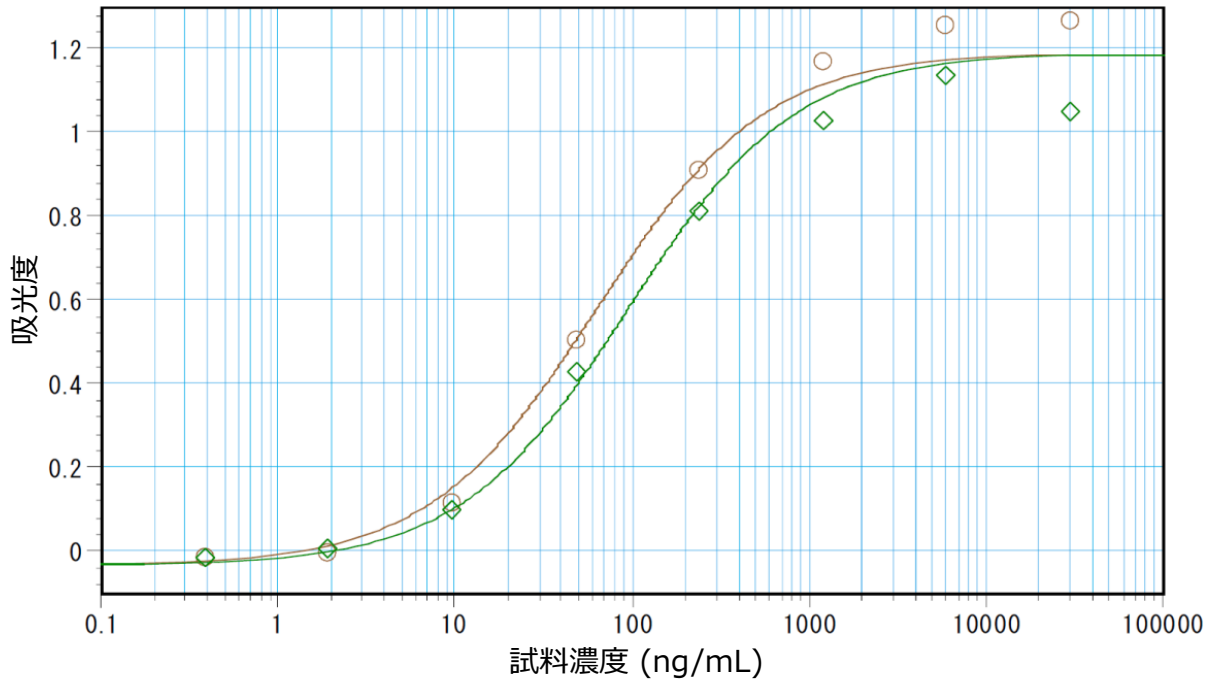


図 43 FcRn アフィニティーELISA の用量反応曲線（繰返し 1 回目）

茶色 (○) : インタクト抗体、緑色 (◇) : CDR クリップ抗体

表 19 FcRn 親和性

試料	EC ₅₀ (ng/mL) ^a	EC ₅₀ (×10 ⁻¹⁰ M) ^a
インタクト抗体	66.3 ± 2.9	4.52 ± 0.20
CDR クリップ抗体	97.1 ± 7.1 ^{**}	6.62 ± 0.48 ^{**}

a : 繰返し 3 回の測定値の平均値 ± 標準偏差

^{**} p 値 < 0.01

3.2.8 CDR クリップ形成による Fcγ 受容体親和性の低下

抗体は、抗原を結合する役割に加え、Fc 受容体 (FcR) と相互作用することによって免疫応答を制御している。IgG の Fc 受容体である Fcγ 受容体 (FcγR) は、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している。さらに、Fcγ 受容体は、IgG の Fc 部分に対する親和性の程度と、それが引き起こすシグナル伝達経路の種類、即ち活性型か阻害型かによってさらに分類される (活性化受容体 : FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIC、FcγRIIIA、FcγRIIIB ; 抑制受容体 : FcγRIIB)⁽⁸¹⁾。ベバシズマブは、VEGF 産生細胞又は標的細胞のいずれにおいても細胞又は補体を介した細胞毒性を示さないが、ヒト Fcγ 受容

体及び補体タンパク質 C1q に結合する能力を有しており⁽⁸²⁾、多くの抗体医薬品において Fcγ 受容体との親和性は作用機序 (Mechanism of action; MoA) に関わる重要な機能である。

そこで、CDR でのクリップ形成が抗体分子の Fcγ 受容体の親和性に影響を与えるか否かを評価した。インタクト抗体及び CDR クリップ抗体について、非多孔性の親水性ポリマー基材に、遺伝子組換えヒト FcγRIIIa をリガンドとして導入した TSKgel FcRIIIA NPR カラムを用いて、FcγRIIIa アフィニティークロマトグラフィーを行った。コントロールとして未分画のベバシズマブを同時に分析した。クロマトグラム及び主ピークの保持時間を図 44 及び表 20 に示す。TSKgel-FcR-IIIa-NPR カラムを用いた FcγRIIIa アフィニティークロマトグラフィーは、IgG の保持時間と FcγRIIIa 親和性に正の相関があることが報告されている⁽⁶⁹⁾。コントロール及びインタクト抗体と比較して、CDR クリップ抗体の主ピークは早く溶出した。従って、CDR におけるクリップ形成が抗体分子の FcγRIIIa への親和性を低下させることが示唆された。

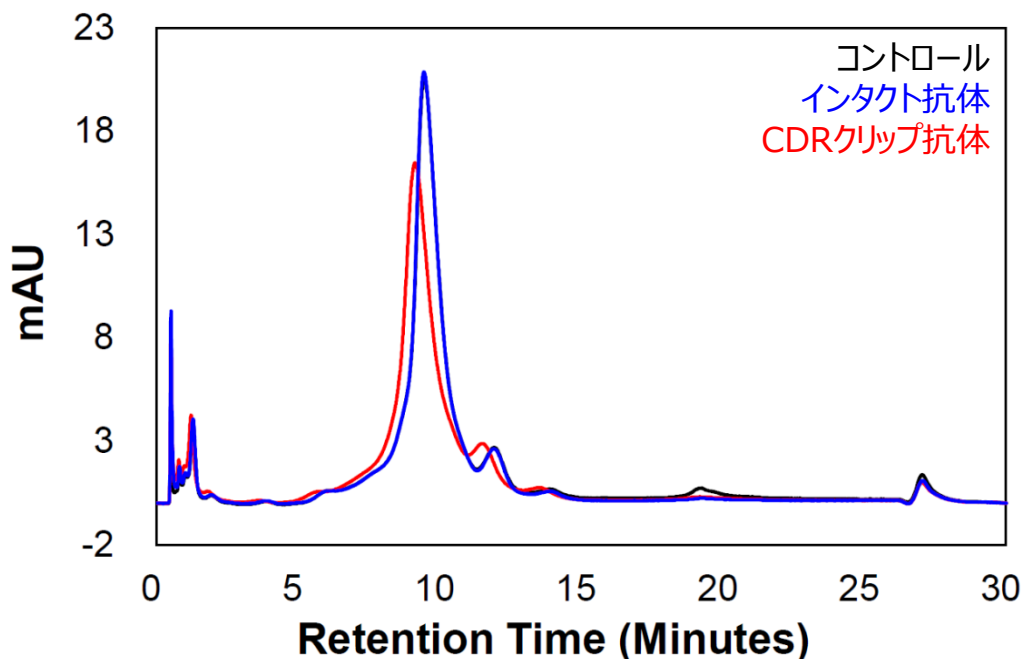


図 44 各抗体の FcγRIIIa アフィニティークロマトグラフィーのクロマトグラム

表 20 FcγRIIIa アフィニティークロマトグラフィーにおける主ピークの保持時間

試料	保持時間 (分)
コントロール	9.456
インタクト抗体	9.446
CDR クリップ抗体	9.132

また、IgG の N-結合型糖鎖の構成成分は、FcγRIIIa 親和性及び本アフィニティークラムにおける IgG の保持時間に影響を与えることが報告されている^(69,83)。3.2.3.2 項で実施した糖鎖プロファイル試験により、CDR クリップ抗体では、シアロ糖鎖及びガラクトシル糖鎖についてわずかな増加が認められた。しかしながら、CDR クリップ抗体において認められた Fcγ 受容体に対する親和性低下は、シアロ糖鎖及びガラクトシル糖鎖の増加には起因しないと、以下の理由より考えられる。

- CDR クリップ抗体のシアロ糖鎖の含有量はインタクト抗体より多いが、シアル化は FcγRIIIa に対する IgG 分子の親和性に影響を与えないことが報告されている⁽⁸³⁾。

- 非還元末端のガラクトース残基含有量は IgG の FcγRIIIa への親和性と正の相関があることが報告されているが⁽⁶⁹⁾、CDR クリップ抗体はインタクト抗体よりもガラクトース含有量が多い。

ヒト Fcγ 受容体は主に CH2 ドメインにより IgG に結合するため⁽⁵¹⁾、重鎖 CDR3 でのクリップ形成により、CH2 ドメインの構造が変化して、抗体分子の FcγRIIIa への親和性が低下したと考えられた。この結果は、Fcγ 受容体を介した抗体の各種機能が広く低下する可能性を示唆している。

3.2.9 CDR クリップ形成による抗体分子の高次構造への影響

FcRn との結合部位は IgG 重鎖の定常領域 CH2-CH3 ドメインに存在し、Fcγ 受容体との結合部位は CH2 ドメインに存在する事が知られている^(48,49,50,51)。従って、CDR クリップ抗体における FcRn や Fcγ 受容体への親和性低下は、CDR の構造変化が CH2 領域まで伝達され得る可能性を示唆している (図 45)。CDR の切断部位と CH2 ドメインとは空間的に 60 Å 以上離れている (PDB coordinate ID: 1HZH⁽⁵²⁾の場合) (図 46)。この距離はヘモグロビンの直径 (55 Å) よりも長いため、CDR の構造変化が CH2 領域まで伝達され得るかは検討する必要がある。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解析した。

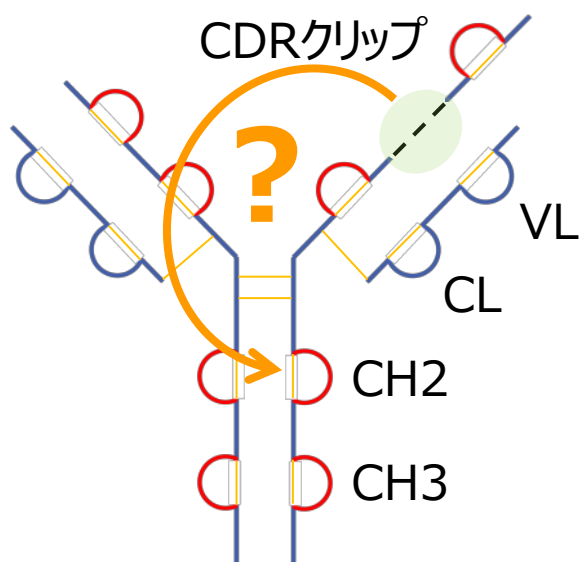


図 45 CDR でのクリップ形成が CH2 ドメインへ影響を及ぼす可能性

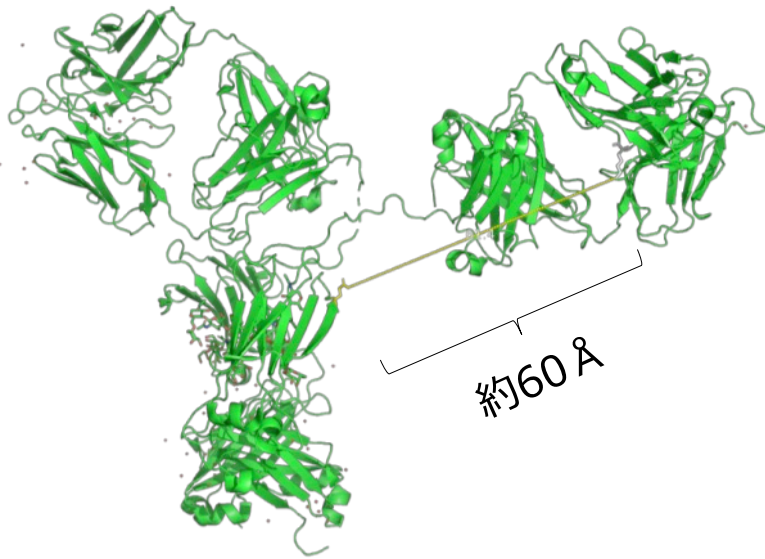


図 46 CDR と CH2 ドメインの距離 (PDB coordinate ID: 1HZH⁽⁵²⁾)

タンパク質の高次構造解析には、円偏光二色性 (circular dichroism; CD)、蛍光、フーリエ変換赤外分光 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FTIR)、DSC、等温熱量測定、超遠心法 (AUC)、SEC 等がある。これらの手法により得られるのは分子全体の構造情報に限定され、タンパク質構造のわずかな違いや部分的な違いを検出するには適していない。2.2.6 項において述べたとおり、CDR のクリップ形成により抗体分子の流体力学的半径が増加している可能性は低く、分子全体の構造変化は生じていない可能性が高い。従って、本研究における高次構造評価にこれらの手法を用いるのは適さないと考えられた。

高い分解能で高次構造を評価出来る方法に X 線結晶構造解析や核磁気共鳴 (NMR) がある。しかし、全長の抗体は結晶化が困難である。また、クリスタルパッキングの影響で溶液中の構造を反映しない可能性もある。一方、NMR は高濃度のサンプルが必要なだけでなく、サンプルを予め安定同位体でラベルしておく必要がある。そこで何れの方法も CDR クリップ抗体の高次構造解析には適用が困難である。

近年、タンパク質の高次構造を評価する手法として、水素/重水素交換-質量分析 (HDX-MS) が認識されてきた。水素交換法は、1950 年代初頭に Linderstrøm-Lang によって考案され、彼とその共同研究者たちによって研究が進められた。Lang は、水素-重水素交換を測定する全く新しい方法を開発し、研究所の同僚と共に、様々な溶液条件下で複数のタンパク質やペプチドの水素交換について研究を行った^(84,85,86)。しかしながら、この技術は非常に難しく、実験的なアーティファクトが起りやすかった。1960 年代には、放射性同位体であるトリチウムとその液体シンチレーション計数による測定が可能になり、アーティファクトがなく、正確なトリチウムゲルろ過 HX 法が Englander により報告され⁽⁸⁷⁾、その後 20 年間水素交換研究の主流となった。さらに、水素交換は質量分析を組み合わせた手法である HDX-MS を用いることで、質量以上に様々な情報を得ることが可能となる。例えば、フォールディング/アンフォールディング、コンフォメーション変化、構造の不均一性、結合及び凝集の影響などを調べるために用いられてきた⁽⁸⁸⁾。1993 年には、Zhang と Smith により、重水素標識の後にペプシン消化を行い、タンパク質を断片化することで分解能を上げ、局所的な情報を得ることが出来る方法が報告された⁽⁷⁰⁾。この手法はタンパク質の原子座標を与えることは出来ないが、ペプチドレベルの分解能で構造変化を捉えることが可能であることから、本研究では HDX-MS を用いて高次構

造の評価を行うこととした。HDX-MS は、特に他の手法に比べサンプル使用量が少ないこと、分子量の大きなタンパク質に適用できること、短時間で解析できること等が主な利点として挙げられる。現在、抗体については運動性評価⁽⁸⁹⁾、エピトープマッピング^(90,91)、凝集体の特性解析⁽⁹²⁾など、種々の応用が報告されている。

タンパク質における HDX-MS では、試料を重水で希釈することでペプチド結合のアミド軽水素が重水素に交換される。その交換速度はアミド水素の周辺環境に依存し、水素結合に関与せずタンパク質表面に位置しているアミド水素の交換速度は大きい。一方、水素結合しているアミド水素やタンパク質内部にあるアミド水素の交換速度は小さい。そこで、重水素化速度を評価することにより高次構造に関する情報を得ることが出来る。なお、アミノ酸側鎖の水酸基・チオール基・アミノ基などの水素も重水素化されるが、アミド水素に比べて交換速度は圧倒的に大きい。そこで、重水素化反応後のペプシン消化・HPLC 分離の過程で軽水素へ逆交換される。このように、HDX-MS はアミド水素の環境にフォーカスして解析出来る手法である。HDX-MS で解析した交換速度パターンと NMR で解析した交換速度パターンとの良い一致がカルモジュリンについて報告されている⁽⁹³⁾。

なお、HDX-MS は、溶液中のタンパク質の水素/重水素交換速度の変化について評価を行うという性質上、動的な構造変化の情報は得られるが、立体構造そのもの（すなわち、各原子の座標）を決定することはできない。そのため、HDX-MS のデータを「定量的」な議論に利用することは通常難しく、「定性的」な分析に留める傾向がある。しかしながら、本研究では、CDR クリップ形成による構造変化及びその部位を解析することが目的であることから、HDX-MS を適用した。なお、クライオ電子顕微鏡（cryo-EM）法は、構造多型を直接評価出来るため⁽⁹⁴⁾、CDR のクリップ形成により抗体分子のダイナミクスがそのように変化するのかを解析出来ると考えられる。2章で示したとおり、本研究により、適切な SEC カラムを選定することで CDR にクリップを持つ抗体分子を高純度で単離可能になったことから、今後 cryo-EM 法により抗体分子のダイナミクスへの影響を解析出来るようになることが期待される。

インタクト抗体及び CDR クリップ抗体を重水で調製した溶媒で希釈し、25 °C において 0 分（重水素化なし）、0.5、2、12、60 及び 240 分間、重水素化反応を行った。その後、サンプルを 4 °C に移しクエンチ溶液を添加して反応を停止した。次にペプシン固定化カラムを用いてサンプルをペプシン消化し、得られたペプチド断片を、逆相カラムを用いた LC-MS により分離し、各ペプチド断片の質量を求めた。分子の外側に位置する水素は重水への交換速度が速く、内側に位置する水素の交換速度は遅いため、インタクト抗体と CDR クリップ抗体について各ペプチド断片の重水への交換速度を比較することで、CDR におけるクリップ形成が抗体分子の局所的な高次構造に与える影響を確認することが可能となる。

各サンプルの重水素取り込み量を比較したバタフライプロットを図 47 及び図 48 に示す。横軸は検出されたペプチド断片、縦軸は各ペプチド断片の相対的な重水素取り込み量、灰色の棒グラフは 2 つのサンプル間の重水素化量の差の合計を示す。本試験においては、高いスコアのシーケンスカバレッジが達成され（重鎖：90.3%、軽鎖：94.9%）、重鎖及び軽鎖共に CDR を含むペプチド断片が検出された（図 49 及び図 50）。一方、ヒンジ領域のシーケンスカバレッジは低かった。この結果は、ベバシズマブの HDX-MS 分析に関する以前の報告と一致している^(92,95)。

インタクト抗体と CDR クリップ抗体の重水素取り込み量を比較し、違いが認められたペプチド断片を以下に、各ペプチド断片の重水素取り込み量を図 51 及び図 52 に示す。

- インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められたペプチド断片
 - 重鎖可変 (Variable Heavy Chain; VH) 領域 : Leu4–Leu18、Asp111–Leu118 及び Val119–Ala124
 - 重鎖定常領域 CH2 ドメイン : Ile259–Thr266 及び His316–Glu324
 - 軽鎖可変 (Variable Light Chain; VL) 領域 : His55–Asp70
- インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の減少が認められたペプチド断片
 - VH ドメイン : Trp47–Thr53
 - CH2 ドメイン : Cys267–His274

インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められたペプチド断片は、CDR のクリップ形成により、これらのペプチド付近の部位が相対的に外側に露出したことを示唆している。一方、インタクト抗体と比較して CDR クリップを抗体の重水素取り込み量の減少が認められたペプチド断片は、CDR のクリップ形成により、これらのペプチド付近の部位が相対的に内側に位置したことを示唆している。

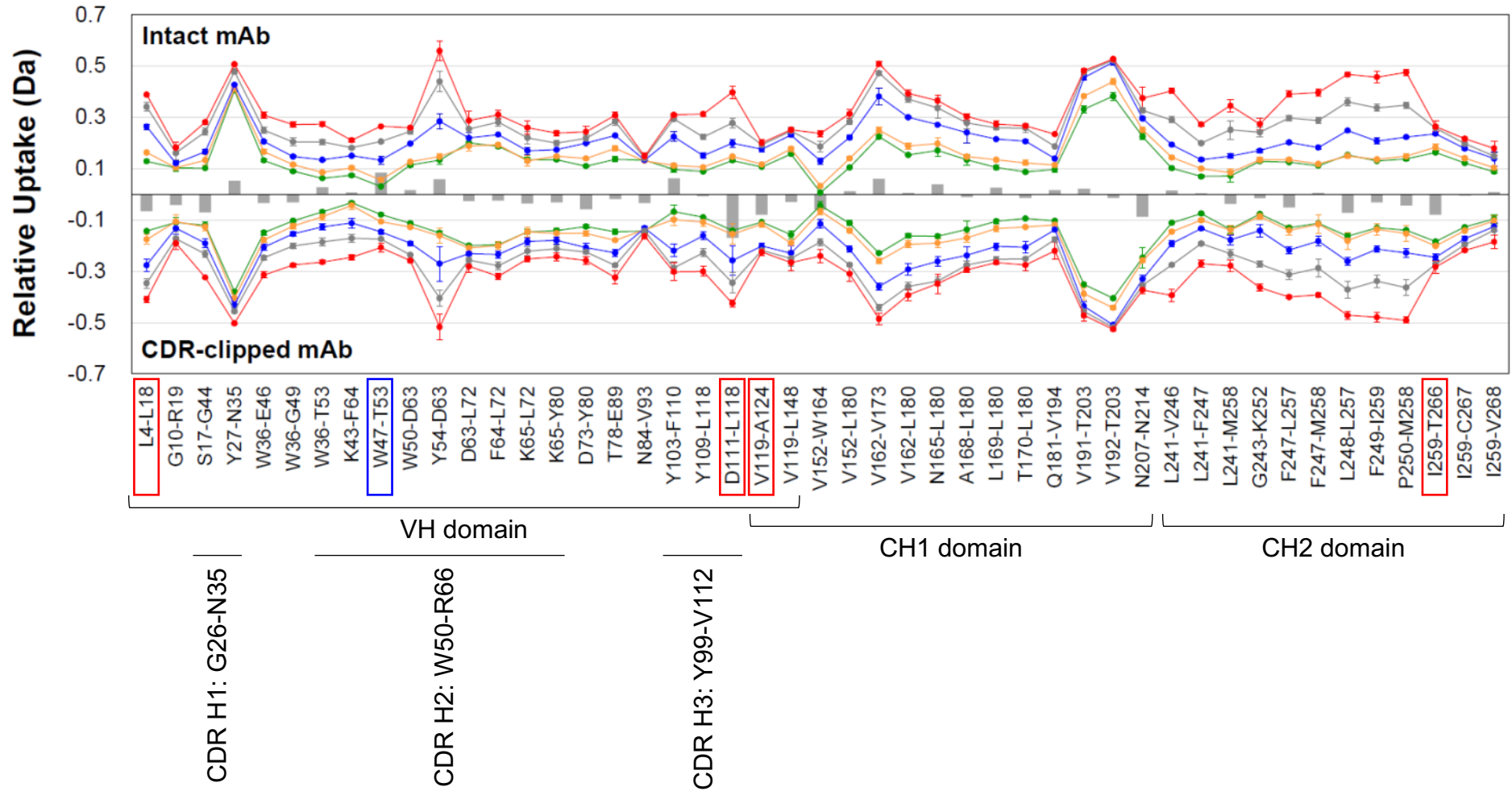


図 47 HDX-MS のバタフライプロット (重鎖)

緑：重水素取り込み時間 0.5 分、橙：重水素取り込み時間 2 分、青：重水素取り込み時間 12 分、灰：重水素取り込み時間 60 分、赤：重水素取り込み時間 240 分、灰色の棒：インタクト抗体と CDR クリップ抗体の重水素化量の差の合計
 赤棒：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められたペプチド断片、青棒：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の減少が認められたペプチド断片

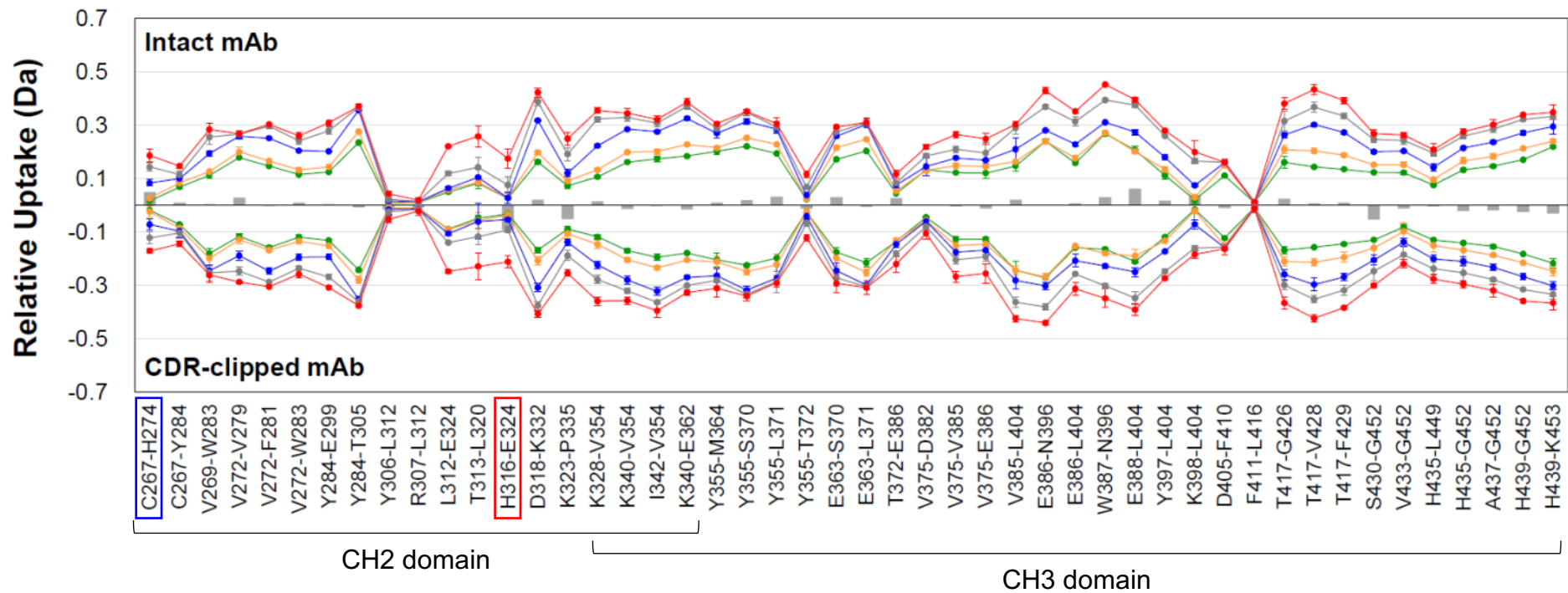


図 47 HDX-MS のバタフライプロット (重鎖) (続き)

緑：重水素取り込み時間 0.5 分、橙：重水素取り込み時間 2 分、青：重水素取り込み時間 12 分、灰：重水素取り込み時間 60 分、赤：重水素取り込み時間 240 分、灰色の棒：インタクト抗体と CDR クリップ抗体の重水素化量の差の合計
 赤棒：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められたペプチド断片、青棒：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の減少が認められたペプチド断片

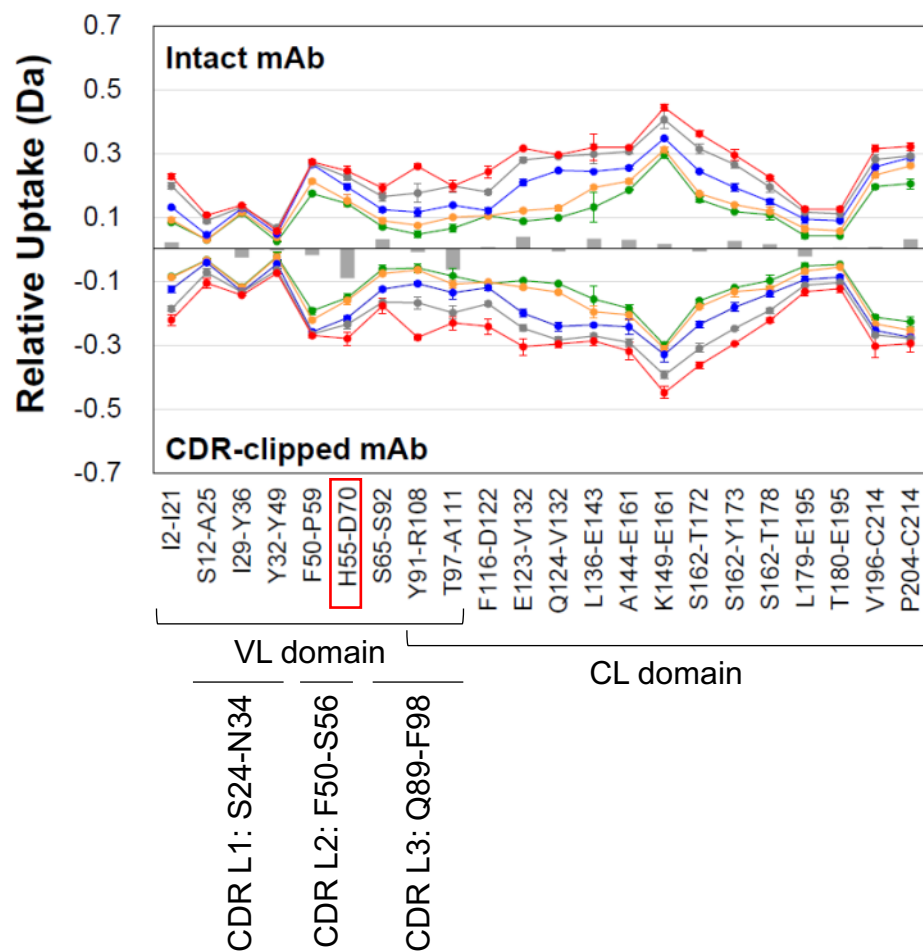


図 48 HDX-MS のバタフライプロット (軽鎖)

緑：重水素取り込み時間 0.5 分、橙：重水素取り込み時間 2 分、青：重水素取り込み時間 12 分、灰：重水素取り込み時間 60 分、赤：重水素取り込み時間 240 分、灰色の棒：インタクト抗体と CDR クリップ抗体の重水素化量の差の合計
赤棒：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められたペプチド断片

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	G	Y	T	F	T	N	Y	G	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W
VH domain	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
	I	N	T	Y	T	G	E	P	T	Y	A	A	D	F	K	R	R	F	T	F	S	L	D	T	S
	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
	K	S	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	Y	P
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	
H	Y	Y	G	S	S	H	W	Y	F	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
	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
	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T
	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
	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
	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S
Hinge region	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
	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
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275
	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
	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E
	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325
	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
	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R
	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
	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
	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T
	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425
	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
	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
	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
	451	452	453																						
	P	G	K																						

図 49 HDX-MS のカバレッジマップ (重鎖)

赤枠：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められたペプチド断片、青枠：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の減少が認められたペプチド断片

赤文字は CDR を示す。検出されなかったアミノ酸を無地で示す。太い青の縦線は重鎖 CDR3 の切断箇所を示す。各ドメインは以前報告されたレポートを参照した^(96,97)。

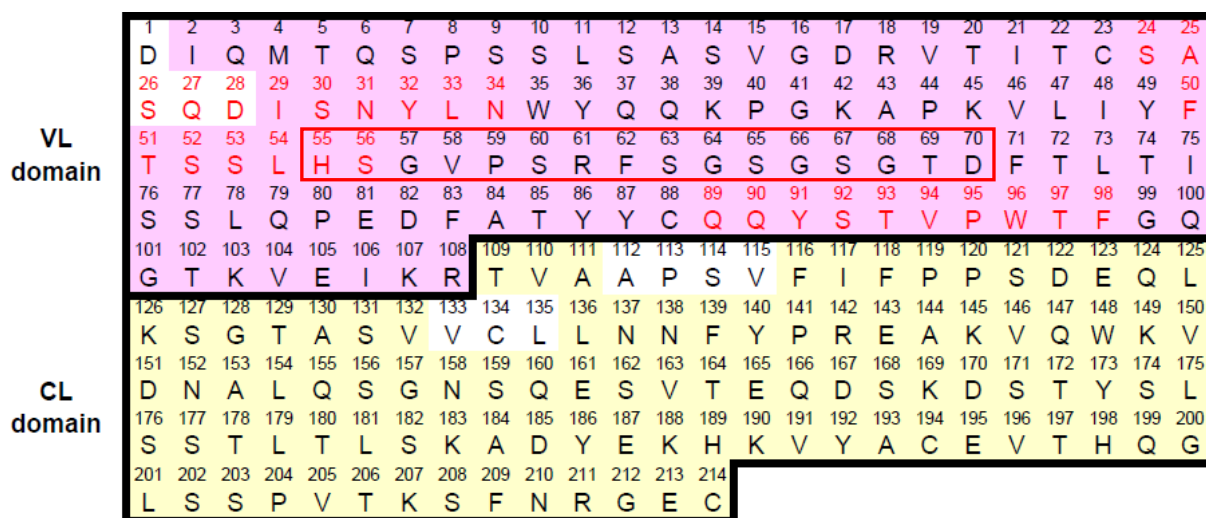


図 50 HDX-MS のカバレッジマップ (軽鎖)

赤枠：インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められたペプチド断片

赤文字は CDR を示す。検出されなかったアミノ酸を無地で示す。各ドメインは以前報告されたレポートを参照した^(96,97)。

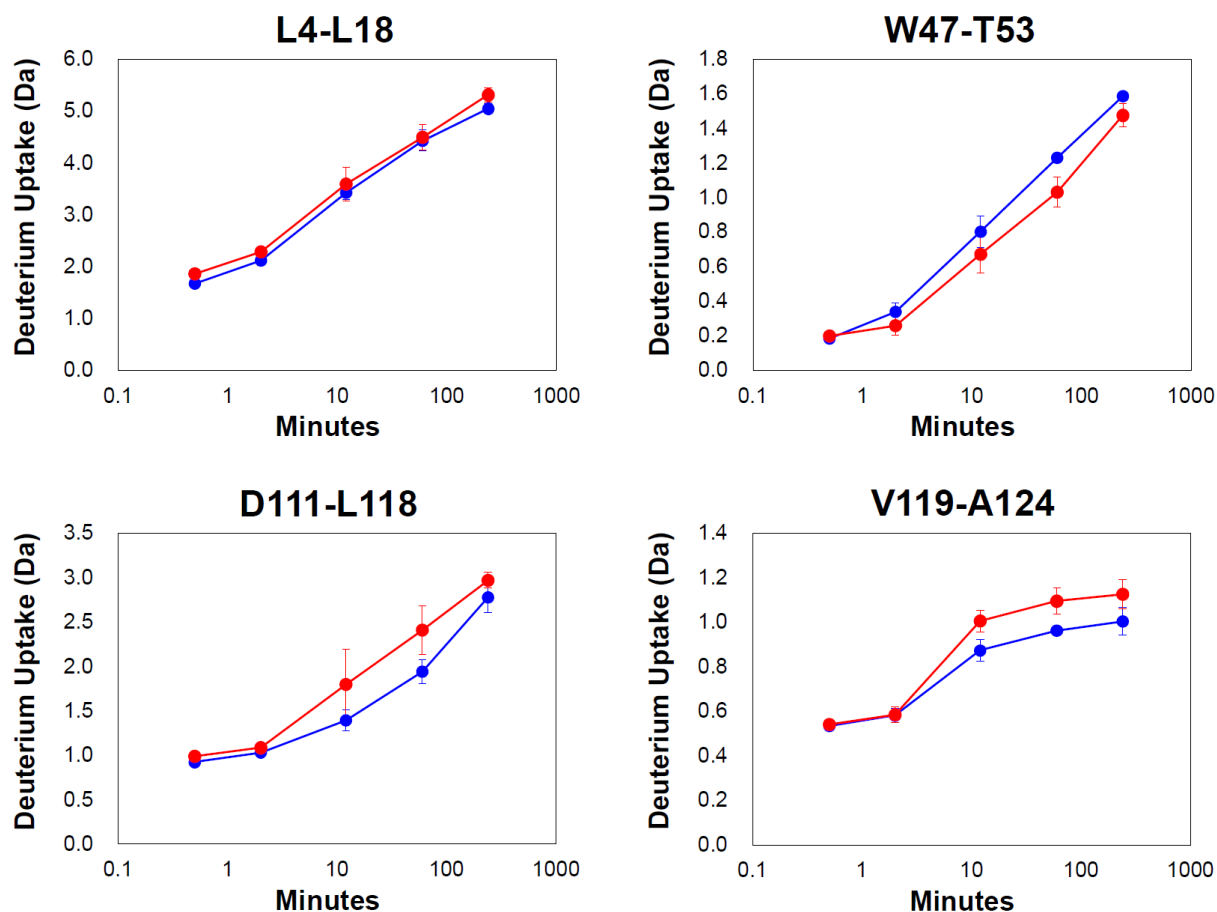


図 51 HDX-MS における各ペプチド断片の重水素取り込み量 (重鎖)

青：インタクト抗体、赤：CDR クリップ抗体

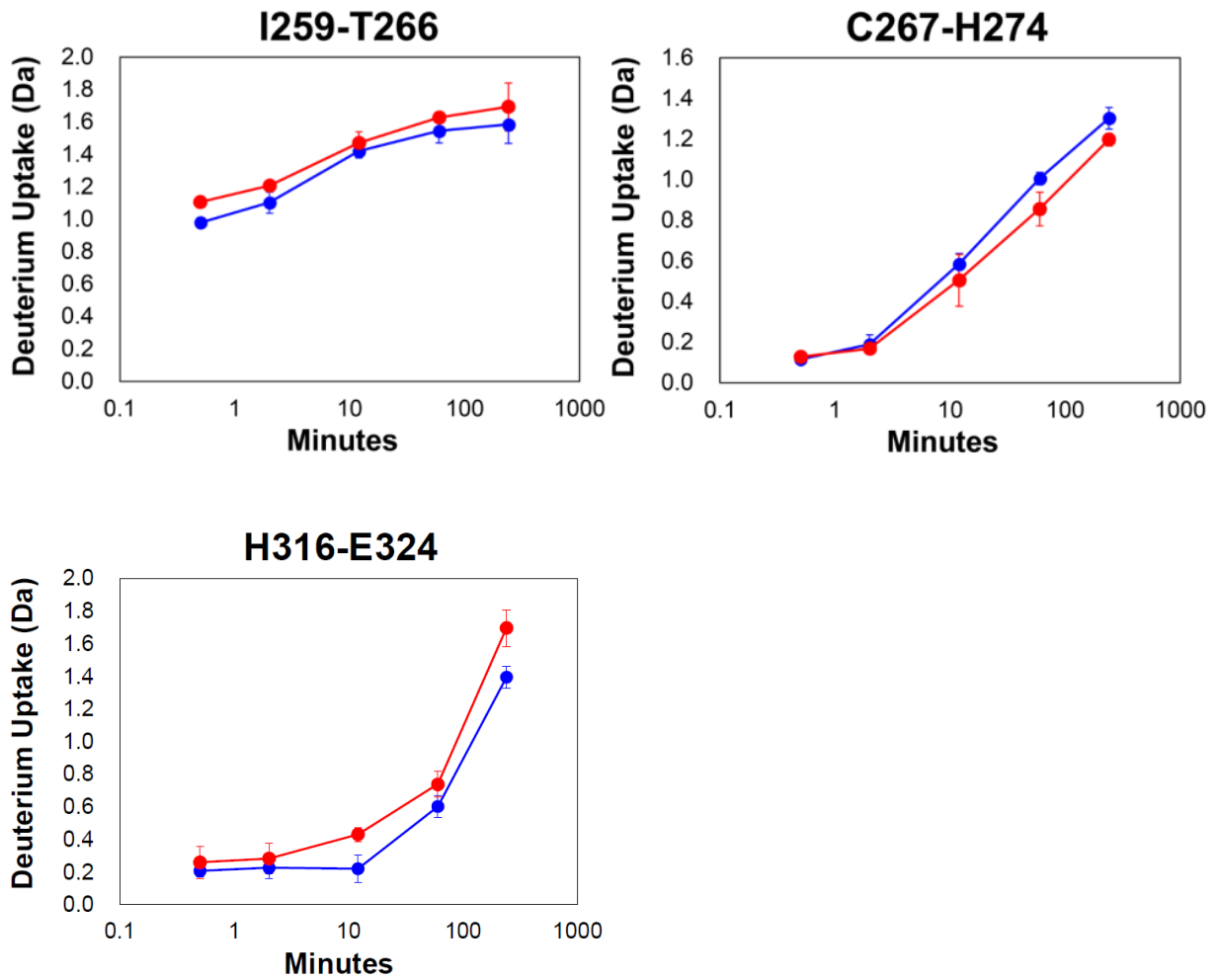


図 51 HDX-MS における各ペプチド断片の重水素取り込み量 (重鎖) (続き)
 青：インタクト抗体、赤：CDR クリップ抗体

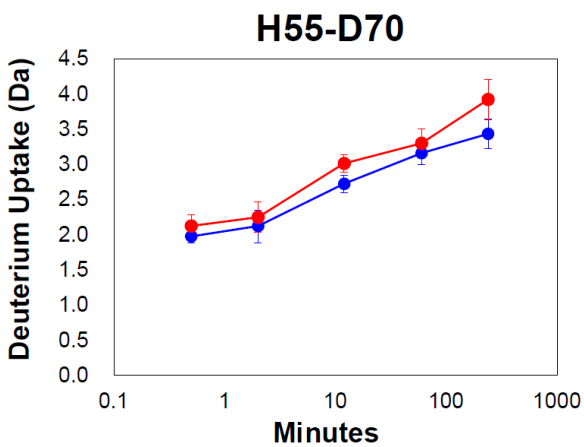


図 52 HDX-MS における各ペプチド断片の重水素取り込み量 (軽鎖)
 青：インタクト抗体、赤：CDR クリップ抗体

以上のとおり、HDX-MS の結果から、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 (図 53)。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。考察については 3.2.10 項にて述べる。

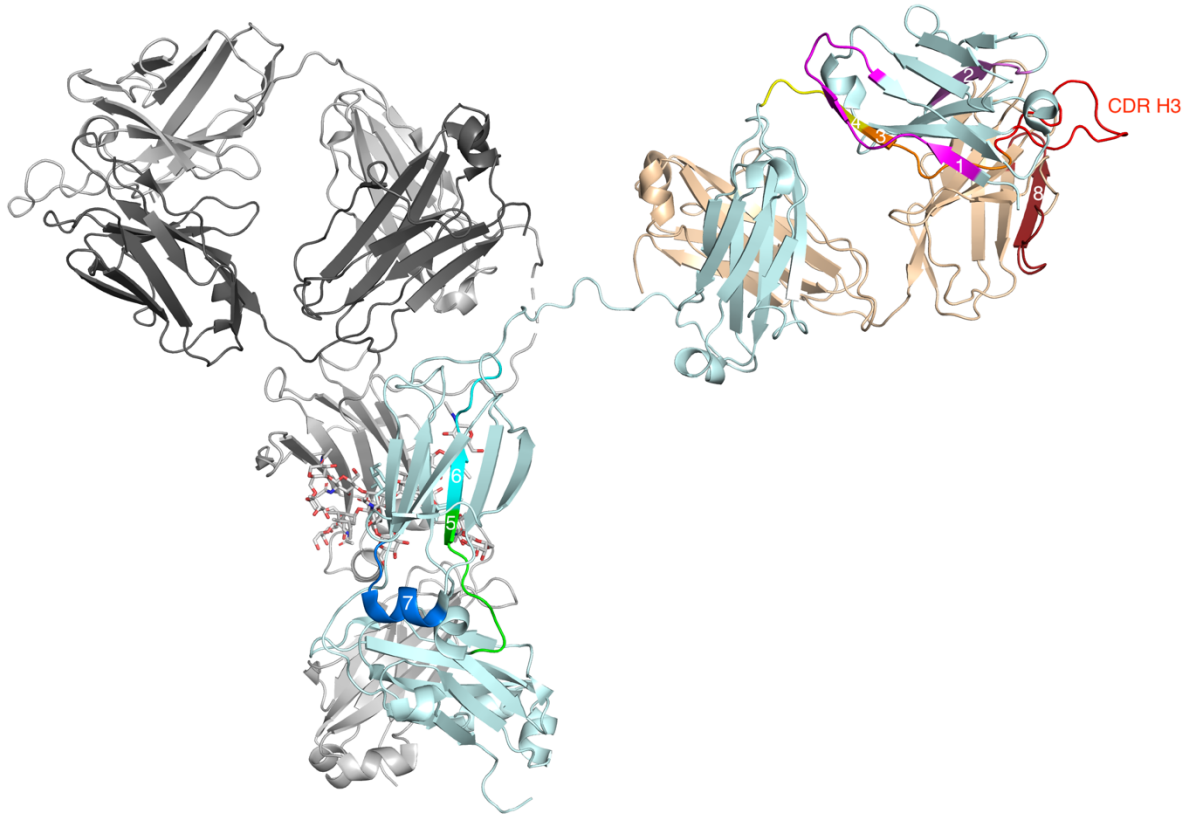


図 53 CDR H3 におけるクリップ形成により構造変化が認められたセグメントを intact human IgG b12 (PDB coordinate ID: 1HZH⁽⁵²⁾) の結晶構造の上にマッピングした図
マッピングした方の重鎖と軽鎖をそれぞれ palecyan と wheat で表示した。マッピングに用いなかった方の重鎖と軽鎖をそれぞれ、gray 80%と gray 40%で表示した。構造変化が認められたセグメントに色を付け、セグメント番号でラベルした。クリップ形成が起こる CDR H3 を赤で表示した (1HZH では残基 95–102)。各セグメントの残基番号、アミノ酸配列と色は表 21 を参照のこと。

表 21 CDR H3 のクリップ形成で高次構造が変化する bevacizumab のセグメントに対応する intact human IgG b12 (PDB coordinate ID: 1HZH⁽⁵²⁾) のセグメント

Segment#	domain	mAb	residues	amino acid sequence	color used (図 53)
1	VH	bevacizumab ^b	L4-L18	<u>LVESGGGLVQPGGSL</u>	–
		1HZH ^c	L4-V18	<u>LVQSGAEVKKPGASV</u>	magenta
2	VH	bevacizumab ^b	W47-T53	<u>WVGWINT</u>	–
		1HZH ^c	W47-P52A	<u>WMGWINP</u>	violet
3	VH	bevacizumab ^b	D111-L118	<u>DVWGQGTL</u>	–
		1HZH ^c	D101-T108	<u>DVWGKGT</u>	orange
4	VH	bevacizumab ^b	V119-A124	<u>VTVSSA</u>	–
		1HZH ^c	V109-A114	<u>VIVSSA</u>	yellow
5	CH2	bevacizumab ^b	I259-T266	<u>ISRTPEVT</u>	–
		1HZH ^c	I266-T273	<u>ISRTPEVT</u>	green
6	CH2	bevacizumab ^b	C267-H274	<u>CVVVDVSH</u>	–
		1HZH ^c	C274-H281	<u>CVVVDVSH</u>	cyan
7	CH2	bevacizumab ^b	H316-E324	<u>HQDWLNGKE</u>	–
		1HZH ^c	H329-E337	<u>HQDWLNGKE</u>	marine
8	VL	bevacizumab ^b	H55-D70	<u>HSGVPSRFSGSGGTD</u>	–
		1HZH ^c	A55-D70	<u>ASGISDRFSGSGGTD</u>	firebrick

a : 同一の残基に下線を付けた。

b : bevacizumab の残基番号に insertion code やギャップは存在しない。

c : Kabat numbering convention⁽⁹⁸⁾を採用している 1HZH の残基番号には、多くの insertion code やギャップが存在する。bevacizumab と human IgG b12 は同じ IgG1 サブクラスに属するが、この convention のために、1HZH の残基番号と bevacizumab の残基番号が異なることがある。アミノ酸配列のアラインメントは <https://www.uniprot.org/align> で実施した。

3.2.10 CDR クリップ形成による構造変化と抗体分子の機能・性質への影響

3.2.9 項における HDX-MS の結果から、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。表 22 に示す HDX-MS 及び 3.2.1~3.2.8 項で得られた結果から、CDR におけるクリップ形成が抗体分子にどのような影響を与えるかを本項にて考察する。

表 22 CDR クリップ形成による構造変化と抗体分子の機能・性質への影響

項目		CDR クリップ形成による影響	参照項	
機能の低下	抗原親和性	低下	3.2.6	
	FcRn 親和性	低下	3.2.7	
	Fcγ 受容体親和性	低下	3.2.8	
安定性の低下	ダイマー形成	促進	3.2.1	
	熱安定性	Fab ドメインの熱安定性：低下	3.2.2	
その他各種性質の変化	疎水性	Fab ドメインの疎水性：低下	3.2.4	
	翻訳後修飾	N 末端異性化・C 末端異性化・メチオニン酸化・脱アミド化	N 末端異性化及び C 末端異性化：変化なし メチオニン酸化及び脱アミド化：増加	3.2.3.1
		N-結合型糖鎖	シアロ糖鎖及びガラクトシル糖鎖：増加	3.2.3.2
	電荷異性体（等電点）	酸性電荷異性体：増加（等電点：低下）	3.2.5	
高次構造	重水素取り込みが増加したペプチド断片（相対的に外側に露出）： ・ VH ドメイン：Leu4-Leu18、Asp111-Leu118 及び Val119-Ala124 ・ CH2 ドメイン：Ile259-Thr266 及び His316-Glu324 ・ VL ドメイン：His55-Asp70 重水素取り込みが減少したペプチド断片（相対的に内側に位置）： ・ VH ドメイン：Trp47-Thr53 ・ CH2 ドメイン：Cys267-His274	3.2.9		

1) ダイマー形成の促進

Zhang らは、ベバシズマブの Fab フラグメントの CDR 内の 3 つのペプチド (CDR L2 を含む LC48-54、CDR H1 を含む HC27-35 及び CDR H2 を含む HC54-64) において、凝集後に溶媒保護が増加 (重水素取り込みが低下) すること、これが熱ストレスによる抗体分子の凝集の原因となる分子間相互作用に寄与する可能性があることを報告した⁽⁹²⁾。3.2.9 項における HDX-MS の結果から、CDR H2 を含む Trp47-Thr53 のペプチド断片において、インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の減少が認められた (図 51)。一方で、CDR L2 及び CDR H1 においては、有意な変化を示すペプチド断片は認められなかった。熱ストレスと CDR H3 のクリップ形成は何れも凝集を誘導するが、熱ストレスによる構造変化とクリップ形成によって引き起こされる構造変化は同じではないことを、この違いは示唆している (表 13 及び図 37)。他の抗体分子と直接的にダイマー形成に関与するセグメントは、HDX-MS 分析により溶媒保護の増加を示すと予想される。CDR H3 におけるクリップ形成により溶媒保護が増加したセグメントは、CDR H2 のみであったため、3.2.9 項における HDX-MS データの高いカバー率 (90%以上) を考慮すると、このセグメントがダイマー形成の部位

である可能性は十分にありと考えられる。従って、重鎖 CDR3 のクリップ形成により、CDR H2 を含む Trp47-Thr53 付近が内側に位置することで、溶媒へのアクセシビリティが低下し、抗体分子の凝集を誘発した可能性が高いと考えられた。

CDR のクリップ形成により Fab ドメインの熱安定性低下が確認されているが (3.2.2 項)、一般的に、熱安定性が低いタンパク質は凝集しやすい。

以上のように、重鎖 CDR3 のクリップ形成により、凝集に関わる CDR H2 の構造変化 (溶媒へのアクセシビリティ低下) 及び Fab ドメインの熱安定性低下が生じて、ダイマー形成が促進されたと考えられる。

2) メチオニン酸化の増加

3.2.3.1 項において、CDR クリップ抗体では、CH2 ドメインに位置する Met258 及び CH3 ドメインに位置する Met434 の酸化体の増加が認められた。これらのメチオニン残基が酸化を受けやすいのは、CH2-CH3 ドメインの表面に近く、露出しているからだと思われている⁽⁸⁾。3.2.9 項における HDX-MS の結果から、Met258 近傍の Ile259-Thr266 ペプチド断片において、インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められた (図 51)。このことは、重鎖 CDR3 のクリップ形成により CH2 ドメインの Ile259-Thr266 付近が相対的に外側に露出したことを示唆しており、その結果、Met258 における酸化が促進したと考えられた。

なお、メチオニン酸化増加による FcRn 親和性への影響は、本項 6) にて後述する。

3) シアロ糖鎖及びガラクトシル糖鎖の増加

3.2.3.2 項において、CDR クリップ抗体の N-結合型糖鎖は、インタクト抗体に比べ、シアロ糖鎖 (SA) 及びガラクトシル糖鎖 (G2F、G1F) についてわずかな増加が認められた (それに伴い、G0F は減少した)。ベバシズマブの N-結合型糖鎖の結合部位は、重鎖 Asn303 である。3.2.9 項における HDX-MS の結果から、Asn303 近傍の His316-Glu324 ペプチド断片において、インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められた (図 51)。これは、重鎖 CDR3 のクリップ形成により CH2 ドメインの His316-Glu324 付近が相対的に外側に露出したことを示唆している。その結果、シアル酸転移酵素やガラクトース転移酵素が抗体分子の N-結合型糖鎖にアクセスしやすくなり、シアロ糖鎖 (SA) 及びガラクトシル糖鎖 (G2F、G1F) がわずかに増加したと考えられた。

4) 酸性電荷異性体の増加 (等電点の低下)

3.2.5 項において、CDR クリップ抗体では酸性電荷異性体が増加 (等電点が低下) していることが確認された。3.2.9 項における HDX-MS の結果から、CDR クリップ抗体において重水素取り込み量の増加が認められた重鎖 Leu4-Leu18、Asp111-Leu118、Ile259-Thr266、His316-Glu324 及び軽鎖 His55-Asp70 のペプチド断片には、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれている。従って、重鎖 CDR3 のクリップ形成により酸性アミノ酸残基が相対的に外側に露出したことが酸性電荷の増加に寄与していると考えられた。なお、酸性電荷異性体の増加にはシアロ糖鎖や脱アミド体に関係すると思われるが^(8,75,76)、CDR でのクリップ形成によるシアロ糖鎖や脱アミド体の増加はわずかであり (3.2.3 項)、酸性電荷異性体の増加 (等電点の低下) には影響していないと思われた。

5) 抗原への親和性低下

ベバシズマブとその抗原である VEGF との結合には、重鎖 1 つ目の CDR (CDR H1) の Asn31 及び Tyr32、重鎖 2 つ目の CDR (CDR H2) の Trp50 及び Asn52、重鎖 3 つ目の CDR (CDR H3) の Tyr95, Ser100B 及び Trp100D、軽鎖 3 つ目の CDR (CDR L3) の Trp96 の寄与が大きい⁽⁹⁹⁾。3.2.9 項における HDX-MS の結果から、VH ドメインに位置する重鎖 CDR2 を含む Trp47-Thr53 のペプチド断片において、インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の減少が認められた (図 51)。この結果は、重鎖 CDR3 のクリップ形成により、VEGF との結合に関わる VH ドメインの Trp47-Thr53 付近が内側に位置することで、3.2.6 項に示す抗原に対する抗原親和性低下を誘発した可能性を示唆している。

6) FcRn への親和性低下

Ile253、His310 及び His435 に変異を有する組換え Fc フラグメントでは、マウスにおいて FcRn に対する親和性の低下及び FcRn を介した機能が低下することが報告されている^(48,49,50)。これらの残基は、それぞれベバシズマブ重鎖の Ile259、His316 及び His441 に相当する。3.2.9 項における HDX-MS の結果から、CH2 ドメインに存在する Ile259 を含む Ile259-Thr266 及び His316 を含む His316-Glu324 のペプチド断片において、インタクト抗体と比較して CDR クリップ抗体の重水素取り込み量の増加が認められた (図 51)。この結果は、重鎖 CDR3 のクリップ形成により、CH2 ドメインの局所的な高次構造変化 (Ile259-Thr266 及び His316-Glu324 付近が外側に露出) が生じ、3.2.7 項における抗体分子の FcRn への親和性の低下を誘発した可能性が高いことを強く示唆している。

また、定常領域の Met 残基が酸化された場合、FcRn への結合能の低下が報告されている⁽⁷⁴⁾。3.2.3.1 項において、CDR クリップ抗体では CH2 ドメインに位置する Met258 及び CH3 ドメインに位置する Met434 の酸化体の増加が認められた。これは、重鎖 CDR3 のクリップ形成により CH2 ドメインの Ile259-Thr266 付近が相対的に外側に露出し、Met258 における酸化が促進したためと考えられた。

以上の結果から、CDR クリップ形成により、CH2 ドメインの構造変化、及びそれに伴うメチオニン酸化の増加により FcRn 親和性が低下したと考えられた。

FcRn への親和性低下により、抗体の血中半減期が減少する可能性があることから、CDR のクリップ形成は抗体医薬品の薬物動態に影響を及ぼす可能性があることと示唆された。

7) Fcγ 受容体への親和性低下

各種 Fcγ 受容体との相互作用に関与するヒト IgG1 のアミノ酸残基を同定するため、Shields らはヒト IgG1 の点変異体 (主に Ala 変異体) を作成し、以下について報告している⁽⁵¹⁾。

- すべての Fcγ 受容体と直接相互作用する可能性のある IgG1 のアミノ酸残基 : Leu234-Pro238、Ala327 及び Pro329 (場合により Asp265 も)
- 影響を与える可能性がある部位 : Asp265 及び Asn297

- Ser239、Ser267（Gly 変異の場合のみ）、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338 及び Asp376 を Ala に置換することで、FcγRIIIa への結合が40%以上減少した。
- 対照的に、T256A、K290A、S298A、E333A、K334A 及び A339T の変異体では FcγRIIIa への結合が向上した。

ヒト化抗 IgE-E27 IgG1 の Thr256、Asp 265、Ser 267 及び His 268⁽⁵¹⁾は、それぞれベバシズマブ重鎖の Thr262、Asp 271、Ser 273 及び His274 に相当する。3.2.9 項における HDX-MS の結果から、CH2 ドメインに存在する Thr262 を含む Ile259–Thr266 のペプチド断片において、インタクト抗体に比較して CDR クリップ抗体では重水素取り込み量の増加が認められた（図 51）。一方、CH2 ドメインに存在する Asp 271、Ser 273 及び His 274 を含む Cys267–His274 のペプチド断片においては、インタクト抗体に比較して CDR クリップ抗体では重水素取り込み量の減少が認められた（図 51）。この結果は、重鎖 CDR3 のクリップ形成により、CH2 ドメインにおける局所的な高次構造変化（Ile259–Thr266 付近が外側に露出し、Cys267–His274 付近が内側に位置）を誘発し、3.2.8 項における FcγRIIIa への親和性低下が生じたと考えられた。これは CDR のクリップ形成により、Fcγ 受容体を介した抗体の各種機能が広く低下する可能性を示唆している。

3.3 小括

抗体医薬品に含まれる切断体の中でも、CDR に切断（クリップ）を有する抗体分子の存在は、これまでに複数報告されているが、その活性及び安定性についてはこれまでにほとんど解明されていない。これは、CDR クリップ抗体とインタクト抗体のサイズの違いが限定的であることから、非変性条件下で CDR クリップ抗体をインタクト抗体から分離することが困難なためである。2 章で示したとおり、Yarra SEC-3000 カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー法により、抗体医薬品にわずかに含まれる CDR クリップ抗体を、非変性条件下で、純度高く単離/回収することが可能となった。そこで、本章では、Yarra SEC-3000 カラムにより単離/回収した CDR クリップ抗体について、抗体分子の機能・安定性・その他各種性質について解析を行い、インタクト抗体と比較した。その結果、CDR のクリップ形成による以下の影響を観測した。

- 機能の低下：抗原・FcRn・Fcγ 受容体への親和性低下
- 安定性の低下：ダイマー形成促進、Fab ドメインの熱安定性の低下
- その他各種性質の変化：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）

FcRn 及び Fcγ 受容体との結合部位は IgG の重鎖の定常領域 CH2-CH3 及び CH2 ドメインに存在する事が知られている。従って、CDR クリップ抗体における 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。CDR の切断部位と CH2 ドメインとは空間的に 60 Å 以上離れているため、CDR の構造変化が CH2 領域まで伝達され得るかを検討する必要がある。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 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。本研究により、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。

4 結論

抗体医薬品において、切断体は、活性・有効性・安全性・免疫原性・薬物動態に影響する可能性があることから、重要品質特性（CQA）の1つとされている。IgGのヒンジ領域におけるペプチド結合は非酵素的切断を受け、desFab及びFabフラグメントを生成する^(17,21,23,32,33)。この切断の生成物であるdesFab及びFabは、非変性条件下でサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によってインタクトな抗体分子（インタクト抗体）から簡単に分離することが可能であり、これらの生成物の生物活性はそれぞれ低下又は全くないことが知られている⁽¹⁸⁾。IgGではヒンジ領域での切断に加え、相補性決定領域（CDR）での切断も報告されている^(22,41,42,43)。CDRに切断（クリップ）を有する抗体分子（CDRクリップ抗体）の活性はインタクトな抗体分子の活性よりも低いと予想されるが、その活性及び安定性についてはこれまでにほとんど解明されていなかった⁽²³⁾。その要因は、CDRクリップ抗体とインタクト抗体のサイズの違いが限定的であるため、非変性条件下でCDRクリップ抗体をインタクト抗体から分離することが困難なためである。そこで、本研究では、抗体分子の切断体の中でも、非変性条件下での分離が困難であることからその特性がこれまで解明されていなかったCDRクリップ抗体について着目した。

CDRクリップ抗体の特性を明らかにするためには、熱等のストレスに晒されていない抗体医薬品中にわずかに含まれるCDRクリップ抗体を、界面活性剤や変性剤を含まない非変性条件下で単離/回収する必要がある。しかしながら、これまでにそのような手法は報告されていない。そこで、まずCDRクリップ抗体を含む抗体医薬品（ベバシズマブ）を選定し、非変性条件下での単離/回収方法を、4種のSECカラムを検討して実施した。その結果、Yarra SEC-3000カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー法により、ベバシズマブの重鎖CDR3のSer105-Ser106間のペプチド結合が切断されたCDRクリップ抗体を非変性条件下で単離/回収する手法を確立することに成功した。なお、CDRクリップ抗体は、通常（非変性条件下）、重鎖N末端フラグメントと非共有結合的な会合をしており、SECカラム固定相との相互作用が減少することで、SEC分析時にインタクト抗体よりも早く溶出することが示唆された。本サイズ排除クロマトグラフィー法は、試料中にわずかに含まれるCDRクリップ抗体を、熱処理等で増加させることなく未処理のまま純度高く回収することが可能である。このことから、ストレス処理によるCDRクリップ抗体以外の切断体やその他不純物を過剰に含まない、CDRクリップ抗体単独の詳細な特性解析が可能となった。

確立したサイズ排除クロマトグラフィー法を用いてCDRクリップ抗体を単離/回収し、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、機能の低下（抗原・胎児性Fc受容体（neonatal Fc receptor; FcRn）・Fcγ受容体への親和性低下）、安定性の低下（ダイマー形成促進、Fab（antigen binding fragment）ドメインの熱安定性の低下）、その他各種性質の変化（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の構造変化がCH2領域まで伝達され得る可能性を示唆しており、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。即ち、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。本研究により見出された CDR クリップ形成による抗体分子への影響とそれらの相関を図 54 に示す。

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、これまで CDR クリップ抗体を単離/回収可能な手法がなく解析出来なかった。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見出した。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。

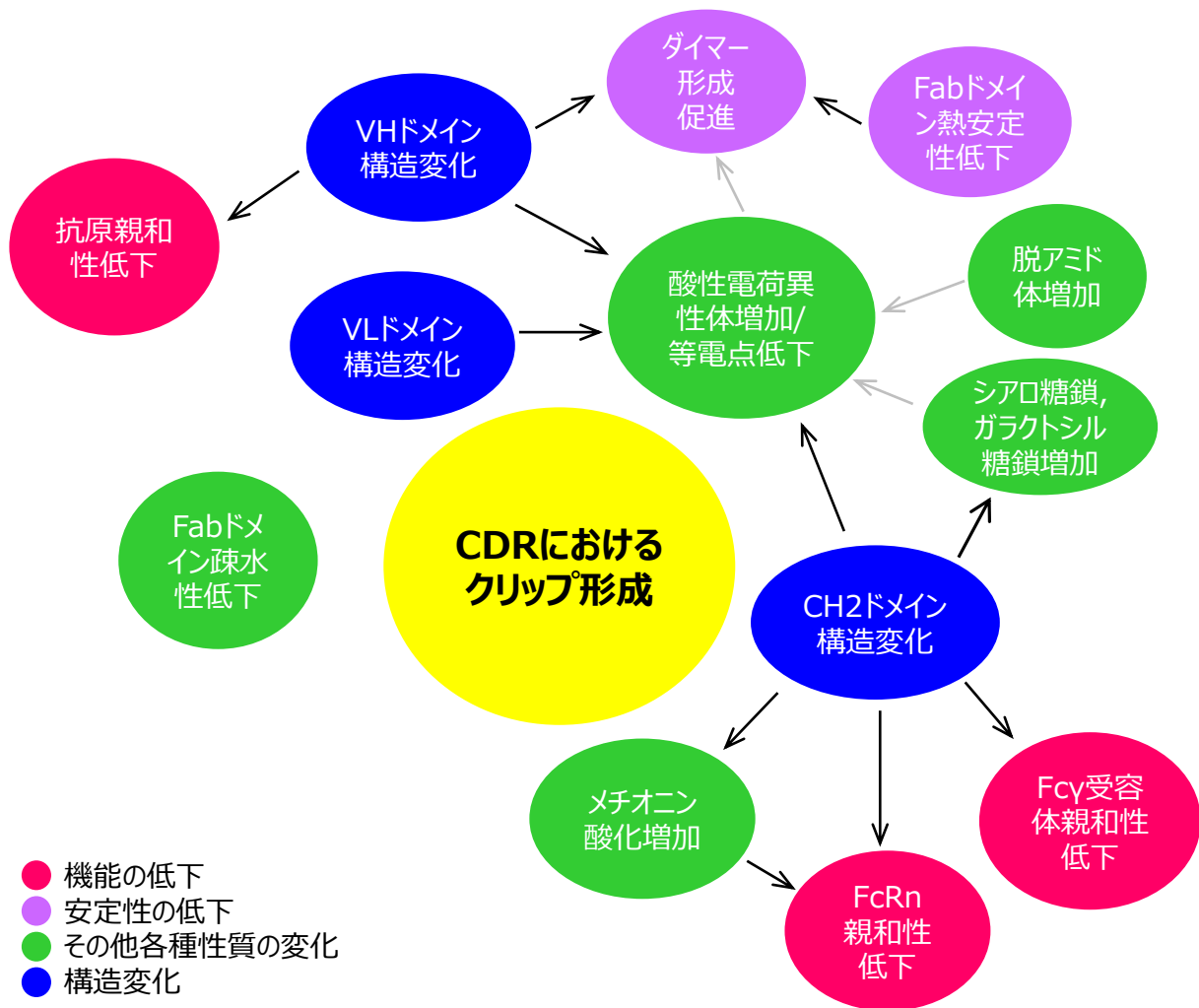


図 54 CDR クリップ形成による抗体分子への影響とそれらの相関

矢印（黒）：CDR クリップ形成により影響を与えていると考えられる相関

矢印（灰）：CDR クリップ形成による影響はない（又は可能性が低い）と考えられる相関

5 論文

関連論文

1. Atsumi Y, Sakurai N, Nishimura K, Yamazaki K, Wakamatsu K. Identification and Characterization of a Monoclonal Antibody Variant Species with a Clipping in the Complementarity Determining Region Isolated by Size Exclusion Chromatography Under Native Conditions. J Pharm Sci. 2021;110:3367-3374.
2. Atsumi Y, Yamada A, Kojima Y, Yagi Y, Nishimura K, Wakamatsu K. Clip Formation in the Complementarity Determining Region of Bevacizumab Lowers Monomer Stability and Affinity for both FcRn and FcγR: A Comprehensive Characterization of the Clipped Variant Including its Higher Order Structure. J Pharm Sci. (印刷中) .

6 謝辞

本研究全般に渡り、ご指導、ご鞭撻を賜りました群馬大学 大学院理工学府 物質・生命理工学領域 若松馨 教授に心より厚く御礼申し上げます。

論文の作成にあたり有益なご助言とご指導を頂きました園山正史教授、武田茂樹教授、松尾一郎教授、井上裕介教授に感謝申し上げます。

ご指導頂きました協和キリン株式会社 山崎勝由バイオ生産技術研究所所長、西村晃一郎主任研究員、八木有紀主任研究員、土田大介主任研究員をはじめ皆様に深く感謝申し上げます。

実験遂行及び論文作成にあたりご尽力頂いた、山田亜由美研究員、櫻井奈津子研究員、柳沢久実研究員、小島ゆか研究員をはじめ皆様にこの場を借りてお礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究を実施するにあたり私を支えてくれた家族に感謝します。

7 引用文献

1. Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:671–685.
2. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22:1393–1398.
3. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2021. *MAbs.* 2021;13:1860476.
4. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015;7:9–14.
5. Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends Biotechnol.* 2019;37:9–16.
6. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *MAbs.* 2020;12:1703531.
7. Kozlowski S, Swann P. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:707–722.
8. Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, Chumsae C, Sun J. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci.* 2008;97:2426–2447.
9. Goetze AM, Schenauer MR, Flynn GC. Assessing monoclonal antibody product quality attribute criticality through clinical studies. *MAbs.* 2010;2:500–507.
10. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci.* 2007;96:1–26.
11. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development Q8 (R2), August 2009.
12. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities) Q11, May 2012.

13. Alt N, Zhang TY, Motchnik P, et al. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals*. 2016;44:291–305.
14. Keperth JF, Cromwell M, Engler N, et al. Establishing a control system using QbD principles. *Biologicals*. 2016;44:319–331.
15. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Dorsselaer AV, Sanglier-Cianfèrani S. Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal Chem*. 2013;85:715–736.
16. Page M, Ling C, Dilger P, Bentley M, Forsey T, Longstaff C, Thorpe R. Fragmentation of therapeutic human immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 1995;69:183–194.
17. Cordoba AJ, Shyong BJ, Breen D, Harris RJ. Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;818:115–121.
18. Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnol Prog*. 2012;28:608–622.
19. Liu H, Gaza-Bulseco G, Lundell E. Assessment of antibody fragmentation by reversed-phase liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;876:13–23.
20. Dillon TM, Bondarenko PV, Rehder DS, Pipes GD, Kleemann GR, Ricci MS. Optimization of a reversed phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability. *J Chromatogr A*. 2006;1120:112–120.
21. Cohen SL, Price C, Vlasak J. Beta-elimination and peptide bond hydrolysis: two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon storage. *J Am Chem Soc*. 2007;129:6976–6977.
22. Xiao G, Bondarenko PV. Identification and quantification of degradations in the Asp-Asp motifs of a recombinant monoclonal antibody. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;47:23–30.
23. Vlasak J, Ionescu R. Fragmentation of monoclonal antibodies. *MAbs*. 2011;3:253–263.
24. Oliyai C, Borchardt RT. Chemical pathways of peptide degradation. IV. Pathways, kinetics and mechanism of degradation of an aspartyl residue in a model hexapeptide. *Pharm Res*. 1993;10:95–102.

25. Oliyai C, Borchardt RT. Chemical pathways of peptide degradation. VI. Effect of the primary sequence on the pathways of degradation of aspartyl residues in model hexapeptides. *Pharm Res.* 1994;11:751–758.
26. Joshi AB, Sawai M, Kearney WR, Kirsch LE. Studies on the mechanism of aspartic acid cleavage and glutamine deamidation in the acidic degradation of glucagon. *J Pharm Sci.* 2005;94:1912–1927.
27. Piszkiwicz D, Landon M, Smith EL. Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations. *Biochem Biophys Res Commun.* 1970;40:1173–1178.
28. Li N, Fort F, Kessler K, Wang W. Factors affecting cleavage at aspartic residues in model decapeptides. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;50:73–78.
29. Noll BW, Jarboe CJ, Hass LF. Kinetic studies on the alkali-catalyzed hydrolysis and epimerization of model alkyl and hydroxyalkyl di- and tripeptides. *Biochemistry.* 1974;13:5164–5169.
30. Correia JJ, Lipscomb LD, Lobert S. Nondisulfide crosslinking and chemical cleavage of tubulin subunits: pH and temperature dependence. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300:105–114.
31. Patel K, Borchardt RT. Chemical pathways of peptide degradation. III. Effect of primary sequence on the pathways of deamidation of asparaginyl residues in hexapeptides. *Pharm Res.* 1990;7:787–793.
32. Gaza-Bulseco G, Liu H. Fragmentation of a recombinant monoclonal antibody at various pH. *Pharm Res.* 2008;25:1881–1890.
33. Kamerzell TJ, Li M, Arora S, Ji JA, Wang YJ. The relative rate of immunoglobulin gamma 1 fragmentation. *J Pharm Sci.* 2011;100:1341–1349.
34. Xiang T, Lundell E, Sun Z, Liu H. Structural effect of a recombinant monoclonal antibody on hinge region peptide bond hydrolysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;858:254–262.
35. Davagnino J, Wong C, Shelton L, Mankarious S. Acid hydrolysis of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.* 1995;185:177–180.
36. Buren NV, Rehder D, Gadgil H, Matsumura M, Jacob J. Elucidation of two major aggregation pathways in an IgG2 antibody. *J Pharm Sci.* 2009;98:3013–3030.

37. Rehder DS, Dillon TM, Pipes GD, Bondarenko PV. Reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry analysis of reduced monoclonal antibodies in pharmaceuticals. *J Chromatogr A*. 2006;1102:164–175.
38. Rao PE, Kroon DJ. Orthoclone OKT3. Chemical mechanisms and functional effects of degradation of a therapeutic monoclonal antibody. *Pharm Biotechnol*. 1993;5:135–158.
39. Liu H, Gaza-Bulseco G, Sun J. Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006;837:35–43.
40. Valliere-Douglass J, Jones L, Shpektor D, et al. Separation and characterization of an IgG2 antibody containing a cyclic imide in CDR1 of light chain by hydrophobic interaction chromatography and mass spectrometry. *Anal Chem* 2008;80:3168–3174.
41. Zhao H, Graf O, Milovic N, et al. Formulation development of antibodies using robotic system and high-throughput laboratory (HTL). *J Pharm Sci*. 2010;99:2279–2294.
42. Li W, Yang B, Zhou D, Xu J, Li W, Suen WC. Identification and characterization of monoclonal antibody fragments cleaved at the complementarity determining region using orthogonal analytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017;1048:121–129.
43. Kubota K, Kobayashi N, Yabuta M, et al. Identification and characterization of a thermally cleaved fragment of monoclonal antibody-A detected by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;140:98–104.
44. Hunt G, Nashabeh W. Capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving analysis of a therapeutic recombinant monoclonal antibody: a biotechnology perspective. *Anal Chem*. 1999;71:2390–2397.
45. Ionescu RM, Vlasak J, Price C, Kirchmeier M. Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Sci*. 2008;97:1414–1426.
46. PDB coordinate ID: 6BFT (Christie M, Rouet R, Nevoltris D, Langley D, et al. Stable human IgG antibody therapeutics with native framework structure. To be published.)
<https://www.rcsb.org/structure/6BFT>
47. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

48. Medesan C, Matesoi D, Radu C, Ghetie V, Ward ES. Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. *J Immunol.* 1997;158:2211–2217.
49. Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES. Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor. *Eur J Immunol.* 1994;24:2429–2434.
50. Popov S, Hubbard JG, Kim JK, Ober B, Ghetie V, Ward ES. The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. *Mol Immunol.* 1996;33:521–530.
51. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem.* 2001;276:6591–6604.
52. Saphire EO, Parren PW, Pantophlet R, et al. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science.* 2001;293:1155–1159.
53. Hong P, Koza S, Bouvier E. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2012;35:2923–2950.
54. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989;246:64–71.
55. Houde D, Kauppinen P, Mhatre R, Lyubarskaya Y. Determination of protein oxidation by mass spectrometry and method transfer to quality control. *J Chromatogr A.* 2006;1123:189–198.
56. Fekete S, Gassner AL, Rudaz S, Schappler J, Guillaume D. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *Trends Anal Chem.* 2013;42:74–83.
57. Ishii Y, Imamoto Y, Yamamoto R, Tsukahara M, Wakamatsu K. Comparison of antibody molecules produced from two cell lines with contrasting productivities and aggregate contents. *Biol Pharm Bull.* 2015;38:306–316.
58. Arakawa T, Ejima D, Li T, Philo JS. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2010;99:1674–1692.

59. Magdelaine-Beuzelin C, Kaas Q, Wehbi V, et al. Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;64:210–225.
60. Strickley RG, Brandl M, Chan KW, Straub K, Gu L. High-performance liquid chromatographic (HPLC) and HPLC-mass spectrometric (MS) analysis of the degradation of the luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist RS-26306 in aqueous solution. *Pharm Res*. 1990;7:530–536.
61. Hsu HJ, Lee KH, Jian JW, et al. Antibody variable domain interface and framework sequence requirements for stability and function by high-throughput experiments. *Structure*. 2014;22:22–34.
62. Fekete S, Beck A, Veuthey JL, Guillaume D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:161–173.
63. Goyon A, Excoffier M, Janin-Bussat MC, Bobaly B, Fekete S, Guillaume D, Beck A. Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017;1065-1066:119–128.
64. Uçaktürk E. Analysis of glycoforms on the glycosylation site and the glycans in monoclonal antibody biopharmaceuticals. *J Sep Sci*. 2012;35:341–350.
65. Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JM. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol*. 2001;87:143–159.
66. Gadgil HS, Bondarenko PV, Pipes GD, et al. Identification of cysteinylated free cysteine in the Fab region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody using Lys-C limited proteolysis coupled with LC/MS analysis. *Anal Biochem*. 2006;355:165–174.
67. Zhang X, Chemmalil L, Ding J, Mussa N, Li Z. Imaged capillary isoelectric focusing in native condition: A novel and successful example. *Anal Biochem*. 2017;537:13–19.
68. Plested JS, Coull PA, Gidney MA. ELISA. *Methods Mol Med*. 2003;71:243–261.
69. Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Tada M, et al. Assessing the heterogeneity of the Fc-glycan of a therapeutic antibody using an engineered FcγReceptor IIIa-immobilized column. *Sci Rep*. 2018;8:3955.

70. Zhang Z, Smith DL. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci.* 1993;2:522–531.
71. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO, Topp EM. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci.* 2016;105:417–430.
72. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *AAPS J.* 2006;8:E501-E507.
73. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry_ Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. August 2014.
74. Bertolotti-Ciarlet A, Wang W, Lownes R, et al. Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to FcRn and Fcγ receptors. *Mol Immunol.* 2009;46:1878–1882.
75. Santora LC, Krull IS, Grant K. Characterization of recombinant human monoclonal tissue necrosis factor- α antibody using cation-exchange HPLC and capillary isoelectric focusing. *Anal Biochem.* 1999;275:98–108.
76. Lyubarskaya Y, Houde D, Woodard J, Murphy D, Mhatre R. Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity. *Anal Biochem.* 2006;348:24–39.
77. Wu SJ, Luo J, O’Neil KT, et al. Structure-based engineering of a monoclonal antibody for improved solubility. *Protein Eng Des Sel.* 2010;23:643–651.
78. Kopaciewicz W, Regnier FE. Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: Effects of pH at low ionic strength. *Anal Biochem.* 1982;126:8–16.
79. Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int Immunol.* 2003;15:187–195.
80. Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J Immunol.* 2007;179: 4580–4588.
81. Hulett MD, Hogarth PM. Molecular Basis of Fc Receptor Function. *Adv Immunol.* 1994;57:1–127.

82. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro*. *Angiogenesis*. 2004;7:335–345.
83. Li T, DiLillo DJ, Bournazos S, Giddens JP, Ravetch JV, Wang LX. Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:3485–3490.
84. Linderstrøm-Lang K. The pH-dependence of the deuterium exchange of insulin. *Biochim Biophys Acta*. 1955;18:308.
85. Berger A, Linderstrøm-Lang K. Deuterium exchange of poly-dl-alanine in aqueous solution. *Arch Biochem Biophys*. 1957;69:106–118.
86. Benson EE, Linderstrøm-Lang K. Deuterium exchange between myoglobin and water. *Biochim Biophys Acta*. 1959;32:579–581.
87. Englander SW. A Hydrogen Exchange Method Using Tritium and Sephadex: Its Application to Ribonuclease. *Biochemistry*. 1963;2:798–807.
88. Smith DL, Deng Y, Zhang Z. Probing the non-covalent structure of proteins by amide hydrogen exchange and mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1997;32:135–146.
89. Houde D, Arndt J, Domeier W, Berkowitz S, Engen JR. Characterization of IgG1 conformation and conformational dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81:2644–2651.
90. Zhang Q, Willison LN, Tripathi P, et al. Epitope Mapping of a 95 kDa Antigen in Complex with Antibody by Solution-Phase Amide Backbone Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2011;83:7129–7136.
91. Obungu VH, Gelfanova V, Rathnachalam R, Bailey A, Sloan-Lancaster J, Huang L. Determination of the mechanism of action of anti-FasL antibody by epitope mapping and homology modeling. *Biochemistry*. 2009;48:7251–7260.
92. Zhang A, Singh SK, Shirts MR, Kumar S, Fernandez EJ. Distinct aggregation mechanisms of monoclonal antibody under thermal and freeze-thaw stresses revealed by hydrogen exchange. *Pharm Res*. 2012;29:236–250.

93. Pan J, Zhang S, Parker CE, Borchers CH. Subzero temperature chromatography and top-down mass spectrometry for protein higher-order structure characterization: Method validation and application to therapeutic antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* 2014;136:13065–13071.
94. Kollmer M, Close W, Funk L, Rasmussen J, Bsoul A, Schierhorn A, Schmidt M, Sigurdson CJ, Jucker M, Fändrich M. Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. *Nat Commun.* 2019;10:4760.
95. Kerr RA, Keire DA, Ye H. The impact of standard accelerated stability conditions on antibody higher order structure as assessed by mass spectrometry. *MAbs.* 2019;11:930–941.
96. Jacobsen FW, Padaki R, Morris AE, et al. Molecular and functional characterization of cynomolgus monkey IgG subclasses. *J Immunol.* 2011;186:341–349.
97. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997;57:4593–4599.
98. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. (1991) in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., U.S. Public Health Service, NIH, Washington, DC.
99. Muller YA, Chen Y, Christinger HW, et al. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure.* 1998;6:1153–1167.