様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 ２５ 日現在

機関番号：８２６２６
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１９４１５

研究課題名（和文）製剤条件でバイオ医薬の立体構造を非侵襲的に評価する新規NMR技術の開発

研究課題名（英文）NMR method to obtain structural fingerprints of an intact monoclonal antibody acquired under formulated storage conditions

研究代表者
竹内　恒（Takeuchi, Koh）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：２０５８１２８４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多様な溶液状態でタンパク質の立体構造解析が可能なNMR法を用いて、完全に非破壊的なバイオ医薬品の立体構造的評価を可能にする新たな技術を確立することを目的とした。このことは、重水素標識を前提とした従来の高分子量タンパク質のNMR解析手法では、実現不可能である。そこで、本研究では、新たな解析手法15N観測CRINEPT法を開発・適用することでこの問題を解決した。15N観測CRINEPT法を、抗体医薬品と高いアミノ酸配列相同性を持つ医療抗体アナログに対して適用し、当該抗体の添付文書に記載の溶液条件かつ低温保存温度でのNMRスペクトルの取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では困難であった製剤・保存条件下での高分子バイオ医薬の高次構造評価を、独自のNMR技術：15N観測CRENEPT法の開発により可能にした。その際、代表的な高分子バイオ医薬である抗体について、完全に非破壊的な高次構造解析を低温かつ保存温度というNMR測定に不利な条件で実現することに成功した。本研究の成果は、バイオ医薬の高機能化を含む研究開発への貢献が期待されるが、本手法を用いることでNMR法により解析可能なタンパク質の数を飛躍的に向上させることが可能であるであるため、広く構造生命科学的研究に資するものである。

研究成果の概要（英文）：Non-invasive evaluation of tertiary structure is fundamental for the research, development, and use of the biologics. However, few methodologies are currently available for evaluating large molecular weight (MW) biologics, such as ther-apeutic monoclonal antibodies (mAbs; 150 kDa). Here, we have newly developed a 15N direct detection nuclear magnetic resonance (NMR) technique, the 15N direct detection CRINEPT, that allows the observation of the main chain amide reso-nances of a non-deuterated protein with MW 150 kDa. The technique not only substantially expands the range of pro-teins applicable to solution NMR studies, but also allows the non-invasive structural analyses of intact mAbs in a wide range of temperature and solvent conditions. As proof of principle, we successfully acquired the 15N-detected CRINEPT spectra of an intact mAb in its formulated solution at 4°C.

研究分野：創薬科学

キーワード：高分子バイオ医薬　NMR　創薬科学　高次構造解析

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

バイオ医薬品は、多くが抗体などの高分子量タンパク質であり、哺乳細胞を用いて発現され、精製を経て、高濃度の溶液として製剤化される。高分子量タンパク質は、発現、精製、溶液条件はもとより、保存状態など様々な環境要因によっても立体構造を変化させる。よって、バイオ医薬品の品質評価には、製剤化された条件において、非侵襲的に、立体構造を直接評価する技術が不可欠である。特にバイオ医薬品は、本来の立体構造が崩れると活性が低下し、場合によっては副作用が惹起されることから、立体構造に着目した評価法の確立は、バイオ医薬品の安全性を担保する観点からも、極めて重要である。

これまでもバイオ医薬品の立体構造的評価に関する多様な研究は行われてきたが、動的光散乱、示差走査熱量測定、質量分析、円二色性スペクトル、赤外分光法など、分子論的解析手法による間接的な検証が主であった(Berkowitz et al, Nat Rev Drug Disc, 2012 など)。これらの解析は立体構造という観点からは不十分であり、実験条件により性状が変化する可能性を否定できない。一方、立体構造を直接的に解析できる構造生物学的手法であっても、X 線結晶解析法や低温電子顕微鏡法は、その実験的な要請から、結晶中や極低温下で凍結した希釈溶液中での構造解析が必要となる。構造生物学的手法のうち、唯一、最終製剤と同じ高濃度の溶液条件での解析が可能なのは、溶液 NMR 法である。そこで、申請者は溶液 NMR 法を用い、バイオ医薬品の立体構造的評価を行う新たな技術を確立することが不可欠であると考えた。

２．研究の目的

そこで申請者は、多様な溶液状態でタンパク質の立体構造解析が可能な NMR 法を用い、バイオ医薬品の立体構造的評価を製剤条件で非侵襲的に実現する新たな技術の確立を目的とし、研究を行うこととした(図１)。

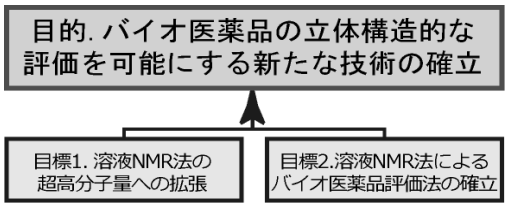

図 1:本研究の目的及び目標

高分子量タンパク質の NMR 解析は、従来、観測対象の重水素標識を前提とする。そのため、重水素標識が困難な哺乳動物細胞で発現される抗体などに、従来の NMR 手法を適用することは不可能である（図２）。さらに、保存条件を再現するために低温（4℃）での観測を行う場合、溶液中での見かけの分子量は本来の分子量の約 1.5 倍となり、200K を超える超高分子量領域に対応できる測定法が必要となる。そこで本研究では、新たな解析手法、^{15}N 観測 CRINEPT 法を開発・適用することでこの問題を克服する。本測定手法の開発に成功すれば、高分子量バイオ医薬品を立体構造的に評価し、その安全性を担保する唯一の技術となるとともに、高分子量タンパク質の構造生物学にも大きな寄与をもたらすことが期待される。

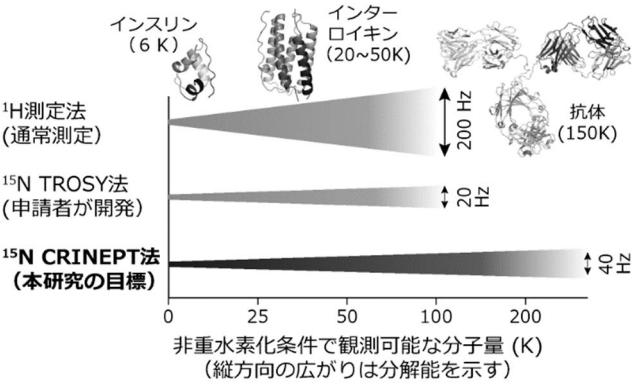

図 2:各種 NMR 測定と限界分子量

３．研究の方法

本研究では以下の目標を 2 年以内に達成することとした。

目標 1: ^{15}N 観測 CRINEPT 法の開発による超高分子量条件への対応

目標 2: ^{15}N 観測 CRINEPT 法を用いたバイオ医薬品評価法の確立

平成 30 年度は、目標１を達成する。本研究で目標とするのは抗体などの分子量 150K 以上の超高分子量タンパク質の低温での測定である。よって分子量 200K を超える分子量領域で、高分解能に測定できる必要がある。そこで、申請者は近年開発した、非重水素化条件での高分解能観測が可能な ^{15}N 観測 TROSY 法（Takeuchi et al, J Biomol NMR, 2015 & 2016）の利点を保持しながら、全く異なる磁化移動方式を取り入れることで超高分子量領域での感度を大幅に改善する ^{15}N 観測 CRINEPT 法を開発する。理論的計算によれば、新たに導入する交差分極方式の磁化移動と化学シフト標識との並列化などにより、非重水素化条件において超高分子量領域の感度が、一桁以上改善することが期待される。

平成 31 年度は、目標２を達成するため、平成 30 年度中に確立する ^{15}N 観測 CRINEPT 法を抗体医薬品とアミノ酸配列の相同性が高い抗体医薬アナログに適用する。抗体医薬アナログは医薬品と同様に CHO 細胞において発現し、添付文書に記載の処方条件に溶解する。^{15}N 観測法では溶媒由来のシグナルが全く観測されないため、製剤条件に左右されない均質な測定が可能である。そこで同様の条件で保存後、^{15}N 観測 CRINEPT 法による測定を行い、純度の低下を検知できるかを検証する。さらに、処方条件に溶解した抗体医薬アナログのＮＭＲシグナルを保存温度において測定可能かどうかを検証する。また、今後、低分子医薬品におけるジェネリックに相当する、バイオシミラーの開発が進むと、その素性を、立体構造的に明らかにする必要が生じる。

その際、発現条件などに左右される糖鎖修飾は、バイオ医薬品の指紋として活用できる。そこで、^{15}N 観測 CRINEPT 法の高分解能特性を生かして、特にバラエティーに富む糖鎖末端のガラクトース（Gal）の有無を区別する技術を開発する。

４．研究成果

平成 30 年度は ^{15}N 観測 CRINEPT 法を開発し、超高分子量条件での NMR 測定を可能にした。

バイオ医薬の多くは分子量が 150K の抗体であることから、これを低温で測定する場合、その見かけの分子量は 200K を超える。これは重水素化を行わない限り、従来の NMR 観測が不可能な分子量である。そこで、大腸菌における発現が良好な、α7 シングルリングプロテアソーム（α7-SRP;分子量 180K）を用いて、超高分子量タンパク質を非重水素化条件で、高分解能、高感度に測定できる新たな測定法である ^{15}N 観測 CRINEPT 法の開発を進めた。

申請者がこれまでに開発した ^{15}N 観測 TROSY 法は（Takeuchi et al, JBNMR 2015, 2016）、磁化移動を INEPT 方式で行っている。INEPT 方式の磁化移動は、分子量によらず決まった時間が必要であり、観測対象の分子量が大きくなり磁化の消失（緩和）速度が速まると、測定感度が著しく低下する（図３A 点線）。一方、今回提案する測定法は磁化移動に交差分極を用いる。交差分極による磁化移動は、分子量に比例して加速する性質を持つため、分子量の増大よる磁化の消失速度が速くなっても、磁化移動速度の加速により感度低下が相殺される。よって、他の測定法とは異なり、その測定感度は超高分子量領域においても維持される（図３A、実線）。さらに、CRINEPT 法では磁化移動中に化学シフト展開を並列的に行えるため、磁化移動効率を最大化しながら化学シフト展開を行うことができる（図３B）。これらの効果により ^{15}N 観測 CRINEPT 法は、超高分子量タンパク質に対して従来法（^{15}N 観測 TROSY 法）に比して 10 倍以上の感度増強を、分解能を犠牲にすることなく達成することが可能である（図３C）。

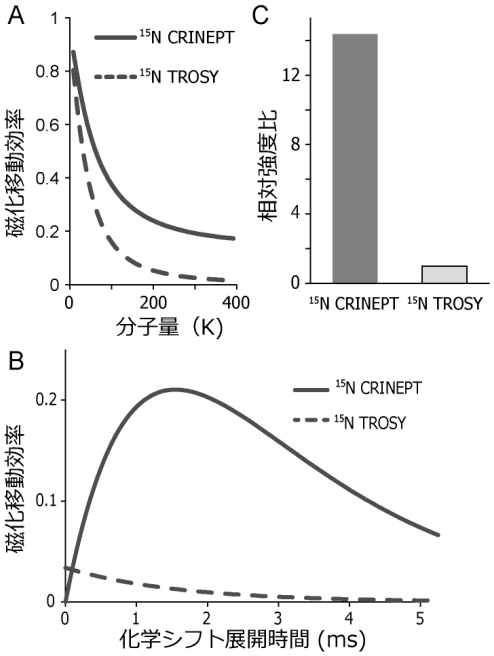

図 3: ^{15}N 観測 CRINEPT の感度的優位性

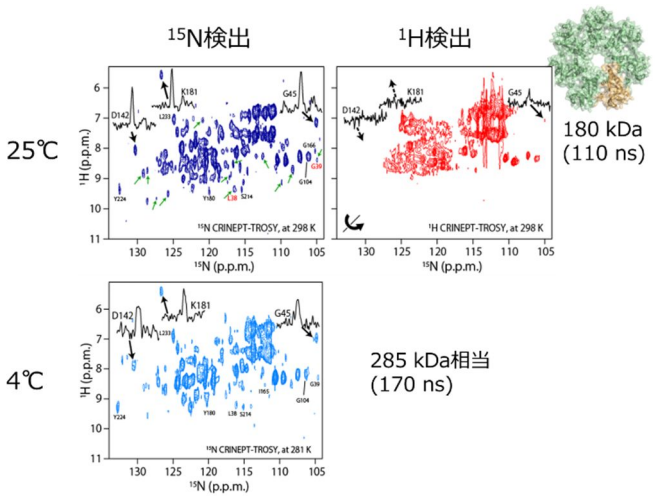

図４: ^{15}N 観測 CRINEPT によるα7-SRP の観測

^{15}N 観測 CRINEPT 法を α7-SRP に適応したところ、従来法では観測できなかった条件で（図 4 右上）、NMR 測定を行うことが可能になった（図 4 左上）。さらに、測定温度を低温にし、見かけの分子量を増大させることで、NMR 測定に不利な条件にしても、十分な感度での観測が可能であった（図４左下）。

平成 31 年度は、^{15}N 観測 CRINEPT 法を、医薬品として使用されている抗体との相同性が高い完全長 IgG 分子（以下、抗体医薬アナログ）に適用した。その結果、従来の NMR 測定技術(^{15}N 観測 TROSY)では全く検出できなかった抗体医薬アナログに由来するシグナルを、製剤組成下（皮下注および静脈注）、保存温度 4 ℃で初めて捉えることに成功した（図５）。更に、皮下注および静脈注のスペクトルの違いから、溶液条件の違いによる高次構造変化の観測にも成功した。さらに、^{15}N 観測 CRINEPT 法により、糖鎖修飾パターンに依存した抗体医薬アナログの HOS 変化を調べた。抗体の N 型糖鎖の末端におけるガラクトースの有無は、補体依存的な細胞障害活性（CDC）に影響することが知られている。しかし、補体と直接的に結合しない糖鎖末端におけるガラクトースの有無がなぜ CDC に影響するかは不明であった。興味深いことに、^{15}N 観測 CRINEPT 測定より、糖鎖末端から 10 Å 以上離れた Lys-248 にて、ガラクトースの有無に依存した高次構造の不均一性を検出することに成功した（図６）。このことは、自由度の高い末端部分であっても、糖鎖の修飾パターンが抗体の高次構造に影響を与えることを示している。また、^{15}N 観測 CRINEPT 法により、不均一な状態のままで、糖鎖末端の状態を定量することができた。今回、糖鎖末端のガラクトースの影響を検出できたことから、^{15}N 観測 CRINEPT により大きな影

響を与える糖鎖根元部分のフコースについても、^{15}N 観測 CRINEPT を用いることで高次構造変化を鋭敏に検出可能と考えられる。さらに、本手法は、糖鎖以外の翻訳後修飾や溶液条件の違いによる高次構造変化の検出を行うことができると期待され、生産、製剤化、保存、輸送の様々な局面で、その高次構造情報を取得に活用可能である（図７）。また、^{15}N 観測 CRINEPT 法は、昆虫細胞や、哺乳細胞でしか発現できない大きな膜タンパク質の解析などにも活用が期待され、NMR 法の適用範囲を大幅に拡大するものである。本研究の成果は、J. Med. Chem. (2020), **63**, 10, 5360–5366 に発表された。

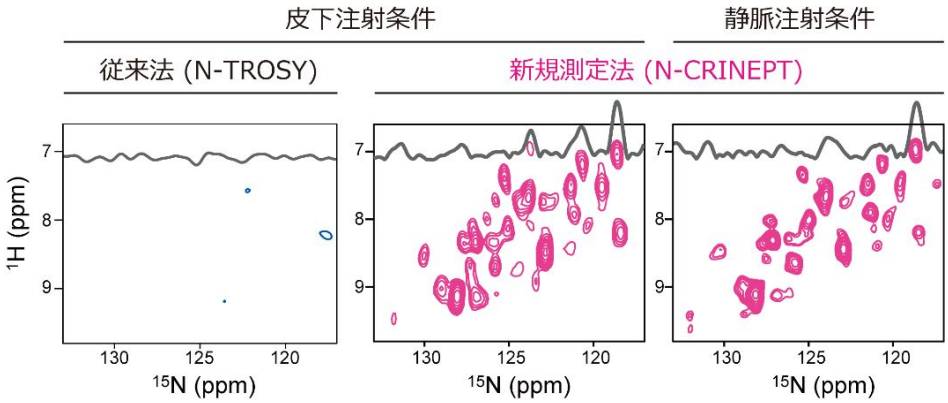

図 5：製剤組成における保存温度での抗体医薬アナログの 2 次元 NMR スペクトル

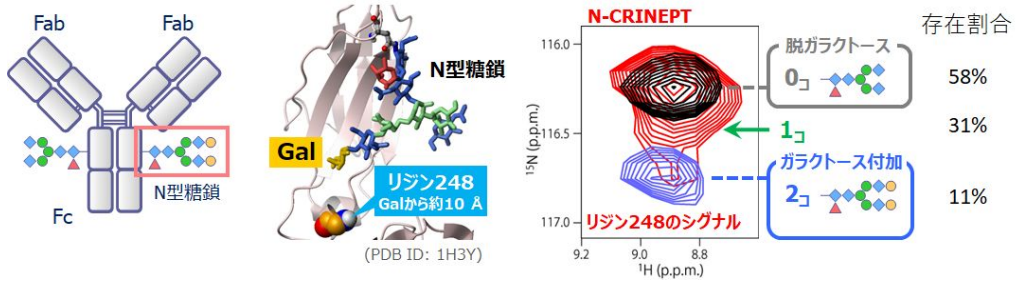

図 6：^{15}N 観測 CRINEPT 法により明らかとなった糖鎖修飾パターンの高次構造への影響

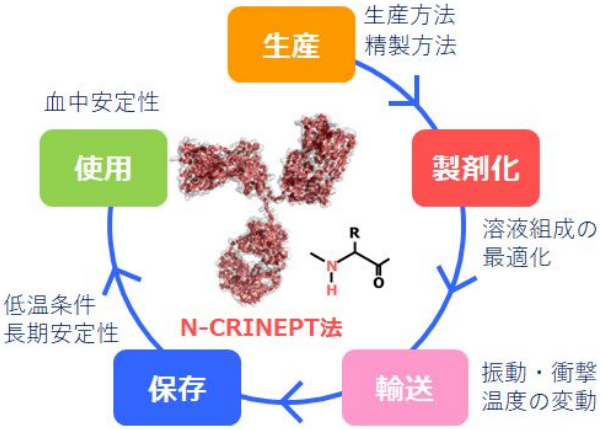

図 7：^{15}N 観測 CRINEPT 法の使用が想定される様々な局面

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Tokunaga Yuji、Takeuchi Koh、Okude Junya、Ori Kazutomo、Torizawa Takuya、Shimada Ichio	４．巻 63
２．論文標題 Structural Fingerprints of an Intact Monoclonal Antibody Acquired under Formulated Storage Conditions via 15N Direct Detection Nuclear Magnetic Resonance	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	６．最初と最後の頁 5360～5366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.0c00231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Tokunaga Yuji、Viennet Thibault、Arthanari Haribabu、Takeuchi Koh	４．巻 21
２．論文標題 Spotlight on the Ballet of Proteins: The Structural Dynamic Properties of Proteins Illuminated by Solution NMR	５．発行年 2020年
３．雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	６．最初と最後の頁 1829～1829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21051829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 徳永 裕二, 竹内 恒, 鳥澤 拓也, 奥出 順也, 嶋田 一夫
２．発表標題 15N 直接検出NMR法による高分子量バイオ医薬の非侵襲的観測
３．学会等名 第57回NMR討論会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	徳永　裕二 (Tokunaga Yuji) (80713354)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	