

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	総合医療・健康科学領域プロテオソーム解析学教育研究分野 氏名 津山 博匡
<p>(論文題目)</p> <p>バイオシミラー製剤採用に向けたバイオ医薬品の安全性・有用性の評価</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>本研究ではバイオ医薬品の中で糖鎖の付加がない単純タンパク質である顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte- colony stimulating factor, G-CSF) 製剤 (先行品およびバイオシミラー) そして各種抗体製剤 (キメラ型, ヒト化, そしてヒト型) の純度について検討し, その安全性を評価することを目的とした. さらにキメラ型抗体製剤ではエピトープマッピングを行い, 中和抗体の性状について考察を加えた.</p> <p>分析手法として, SDS-PAGE 法, HPLC 法, そして SELDI-TOF MS 法を用いた. また, キメラ型抗体製剤のエピトープマッピングでは, 患者への投与時に中和抗体が産生し治療効果に影響を及ぼすことが危惧されている infliximab を対象とし, オーバーラッピング法にて部分配列ペプチド (アミノ酸残基 20 個) を作製し抗原として用いた.</p> <p>また, 各製剤は各販売会社より購入したものをを用いた.</p> <p>G-CSF 製剤では純度について比較検討した. その結果, 1) SDS-PAGE 法, 2) 逆相系 HPLC 法, 3) MALDI-TOF MS 法において, 先行品およびバイオシミラーは高純度の G-CSF を含んでいることが明らかとなった. なお, filgrastim の構造には Met が 4 残基 (Met¹, Met¹²², Met¹²⁷, Met¹³⁸) 存在している. 生合成・精製過程における Met の酸化や化学修飾 (フォルミル化) が生じるとされているが, MS 分析にて filgrastim 由来のピークがシングルピークを示したことから, filgrastim への化学修飾は生じていないと考えられた.</p> <p>また, G-CSF には分子内に反応性の高い Cys が 5 残基 (Cys¹⁸, Cys³⁷, Cys⁴³, Cys⁶⁵, Cys⁷⁵) 存在し, その内の 4 残基はそれぞれ分子内において S-S 結合を形成し (Cys³⁷-Cys⁴³, Cys⁶⁵-Cys⁷⁵), G-CSF の生理的構造を維持している. しかしながら残りの 1 残基 (Cys¹⁸) とのミスマッチングによる構造異常体は, このようなミスマッチングを修正する強力な機構が備わっている大腸菌を発現細胞に用いていることから, そのような分子の存在の可能性はきわめて少ないと判断される. 本検討ではその存在を見出すことはできなかった. 結果として, 現在発売されている先行品およびバイオシミラーの G-CSF 製剤の安全性は問題がないことが明らかとなった.</p> <p>次に各種抗体製剤について純度ならびにキメラ型抗体のエピトープマッピングを行った. まず, 各試料 (5μg/lane および 50 μg/lane) を還元条件下泳動後, CBB 染色により各タンパク質を検出した. その結果, 全ての試料において, IgG の構成成分である分子量約 50kDa の H 鎖, および分子量約 25kDa の L 鎖に分離され, 主成分の各種抗体の含有を認めた. さらに, 10 倍量の試料 (50μg/lane) を用いた分析では各試料において H</p>	

鎖および L 鎖以外に分子量約 100kDa および 30kDa の複数のバンドが検出され、各製剤は抗体以外に複数の不純物を含んでいる可能性が示唆された。全ての抗体製剤において主成分である分子量約 50kDa の糖鎖を含む H 鎖および分子量 25kDa の単純タンパク質の L 鎖を示すバンドが検出され、さらに極微量の高分子物質の存在が認められた。これらの物質の同定を行うことができなかつたため、これらの物質がアレルギー反応等の原因物質であるかは今後検討を行う必要がある。

また、抗体製剤の H 鎖には糖鎖が結合し、この構造の維持は抗体製剤の薬理活性である CDC 活性および ADCC 活性に大きく影響を及ぼすことが知られている。タンパク質内での構成糖は分子の荷電に大きく影響を及ぼすことから、本研究では分析手段として、等電点電気泳動法による分離を行い純度の比較試験法としての妥当性について検討を行った。その結果、infliximab では糖鎖の電荷に依存して分離された複数のバンドが認められ、今後バイオシミラーとの品質比較試験として有用であることが明らかとなった。

さらに、バイオ医薬品の 1 つであるキメラ型抗体製剤 (infliximab) に対する抗 infliximab 抗体をウサギで作製し、この抗体を用いて infliximab のエピトープマッピングを行い、投与患者に産生される中和抗体に対する抗原部位を予測した。その結果、少なくとも 3 箇所抗原部位を認めたことから、患者でも複数の中和抗体が産生されている可能性が示唆され、中和抗体のマルチタイプの検索が今後の抗体製剤による薬物療法への重要な指標となることを明らかにした。