

B. 研究方法

酸化処理; 10mM リン酸バッファー (pH7.2) で 1mg/ml に調製したエンブレル 400 μ l と、40mM アスコルビン酸ナトリウム 50 μ l、0.4 mM 塩化銅 50 μ l を混合し、25 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた。その後、100mM EDTA 5 μ l を加え反応を停止した。その後、10mM リン酸バッファー (pH7.2) で 4 $^{\circ}$ C、24 時間透析した後、サンプルとして用いた。

チオフラビン T; 65 μ M チオフラビン T 溶液 1.8ml とサンプル 0.2ml を混合し、室温で 30 分遮光で反応させた。その後、Ext435nm、emi485nm を測定した。

IL-8 産生; 96 穴プレートにヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞 1×10^5 cells/well で播種し、サンプルを加えた。24 時間後、上清中の IL-8 量を ELISA で測定した。

C. 研究結果

蛋白質製剤のモデルとして、多発性硬化症、リウマチなどの自己免疫疾患に適用されている腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体の Fc キメラであるエンブレルを用いた。蛋白質医薬品は、製造工程・保存過程で酸化修飾を受けることが知られている。そこで本年度は、エンブレルを人工的に酸化処理し、変性状態など特性を評価した。酸化処理は一般的に使用される、塩化銅、アスコルビン酸による酸化法を用いた。その結果、エンブレルの酸化処理群において、目視では白濁などは観察されなかったが、蛋白質凝集の指標である A280/260 の低下が観察された (Fig. 1)。また、SDS-PAGE 解析の結果、未処理群と比較して全く異なるバンドパターンを示した (Fig. 2)。分子量の増大したバンドと同時に分子量の低下した分解産物なども観察されたが、詳細は不明である。現在、ゲルろ過 HPLC を用い、より詳細な分子量変化に関して検討を進めている。

次に、分子間の β 構造を認識するプローブであり、アミロイド繊維に特異的に結合するチオフラビン T を用い、酸化処理による蛋白質変性を詳細に観察した。その結果、酸化処理群において、チオフラビン

T による蛍光強度の増加が確認されたことから、酸化処理によりアミロイド繊維を含む変性が誘導されることが判明した (Fig. 3)。本検討では、96 穴プレートによる解析を行ったが、来年度はより感度の高い機器を用い測定することで、より高感度に評価する予定である。

更に、これら変性蛋白質の免疫細胞に与える影響を検討した。ヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞に加え、24 時間後に上清中の IL-8 量を ELISA にて測定した。その結果、未処理群では全く IL-8 産生は認められなかったが、酸化処理群では有意な IL-8 産生が観察された (Fig. 4)。以上の結果から、エンブレルの酸化処理により免疫細胞から炎症性サイトカインが産生される可能性が示唆された。

D. 考察

TNF 受容体 Fc キメラは、リウマチ患者への投与において 16% の患者で抗 TNF 受容体 Fc キメラ抗体の産生が認められたが、治療成績に影響はなかった報告がある。一方で、多発性硬化症患者への投与では、90% の患者において抗体産生が認められ、TNF 受容体 Fc キメラの体内クリアランスが増大したとの報告もある。疾患により抗原性に違いが出た理由は明らかでないが、今後もその抗原性を詳細に検討していく必要性が高い蛋白質医薬品の一つである。そこで、本年度はエンブレルを用い、酸化処理による蛋白質変性、免疫細胞に与える影響に関して検討した。その結果、酸化処理によりアミロイド繊維を含む蛋白質変性が誘発され、マクロファージを活性化する可能性が示唆された。本年度は、IL-8 のみを測定したが、来年度は他のサイトカイン、ケモカインに関しても検討する予定である。また、マクロファージだけでなく、抗原性惹起により深く関与している樹状細胞に対する影響も検討する予定である。

データに示していないが、本年度熱処理による影響も検討した。エンブレルの熱処理によってもチオフラビン T の蛍光値増大が酸化処理群と同等に認められたことから、アミロイド繊維を含む蛋白質変性を誘発したと考えられる。しかし、熱処理群では全く IL-8 産生は観察されなかった。この違いが何に起

因するのか、現段階では詳細は不明であり手がかりは無い状態である。そのため、酸化処理群でどのようなメカニズムで IL-8 産生を誘導するかを検討していくことが重要と考えられる。近年、アルツハイマー病発症に関与するβアミロイドなど、アミロイド様物質がスカベンジャーレセプターを介して、細胞に認識されることが明らかとなってきた。現在、酸化処理したエンブレルが、スカベンジャーレセプターを介してマクロファージを活性化していると考えており、来年度の検討課題としている。

実際の医薬品の製造工程・保存過程で、どの程度このような現象が誘導されているかは不明である。しかし、現在販売されている蛋白性医薬品においても、長期保存において蛋白質が変性しているとの報告もある。来年度は、エンブレルなど他の蛋白質医薬品においても、長期保存などにおいてどの程度、アミロイド繊維を含む変性が誘発されるかに関して検討する予定である。

E. 結論

①エンブレルを熱処理、酸化処理することで、アミロイド繊維形成を伴う蛋白質変性が誘導されることが判明した。更に、酸化処理群では、マクロファージの活性化を惹起する可能性が示唆された。

②MHC クラス II とペプチドの結合性を指標とした抗原性評価システムの構築に向けて、材料などの準備を行った。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants., *BBA - Proteins and Proteomics.*, 1774(8):1029-1035,

2007.

2. Shibata H., Kamada H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB. Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Creation of receptor-selective TNFs with agonistic activity., *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.

②学会発表

国内学会

1. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央 : 抗腫瘍活性に優れた TNF レセプター指向性変異体の創製., 第 23 回 DDS 学会, 熊本, 2007 年 6 月.
2. 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 腫瘍壊死因子-αの活性に及ぼす 90 番目のアミノ酸の影響に関する検討., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
3. 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 鎌田春彦, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : フェージ表面提示法を駆使した TNFR2 指向性アゴニストの創製., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
4. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 山本昌, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価(1): 関節リウマチモデルに対する治療効果の検討., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.

国際学会

1. Minowa K., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Fujita T., Yamamoto A., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNFR1-selective mutant TNF using phage display

system, Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.

2. Nomura T., Shibata H., Abe Y., Minowa K., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
3. Yoshioka Y., Morishige T., Watanabe H., Tanabe A., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Okada N., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF superfamily with full bioactivity, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007
4. Minowa K., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Kayamuro H., Shibata H., Fujita T., Yamamoto A., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

無し

②実用新案登録

無し

③その他

無し

I. 研究協力者

無し

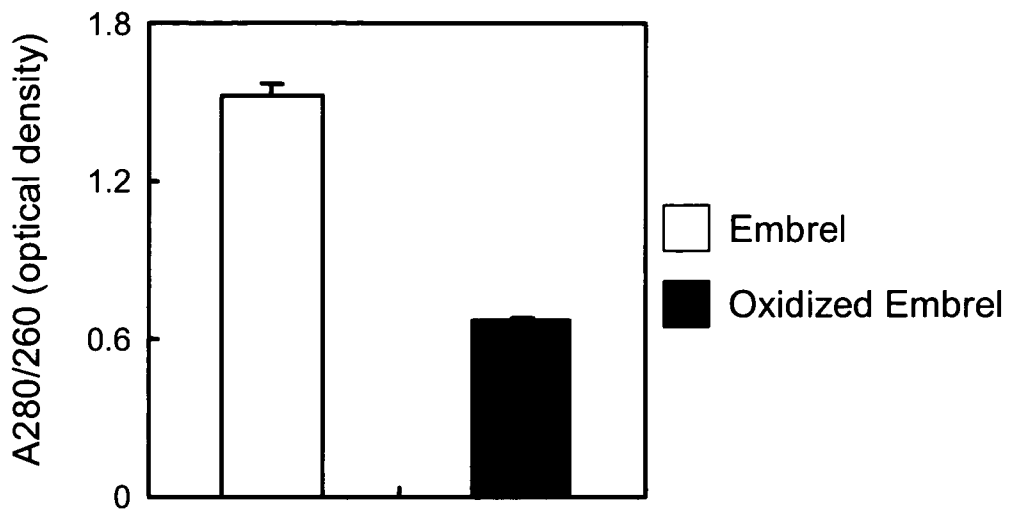


Fig 1. The presence of aggregates in oxidized Embrel. In oxidized Embrel, a decrease in A280/A260 ratio as compared to native Embrel was observed, which indicated the presence of aggregates.

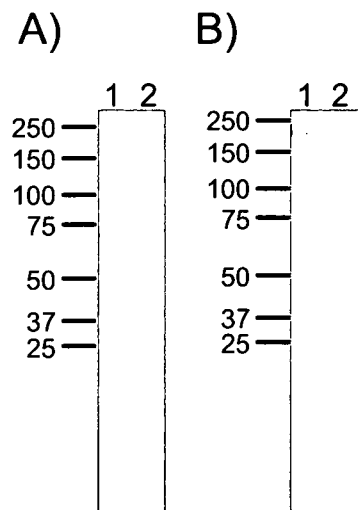


Fig 1. SDS-PAGE Gels run under reducing (A) and nonreducing (B). Numbers on the left represent band positions (in kDa) of the molecular weight markers. Lane 1. Embrel, Lane 2. oxidized Embrel.



Fig 3. Embrel display amyloid-like properties upon exposure to oxidation, indicating protein misfolding. Amyloid-like structure, indicative for misfolding, in Embrel was induced by oxidation and was verified using thioflavin-T fluorescence enhancement assay.

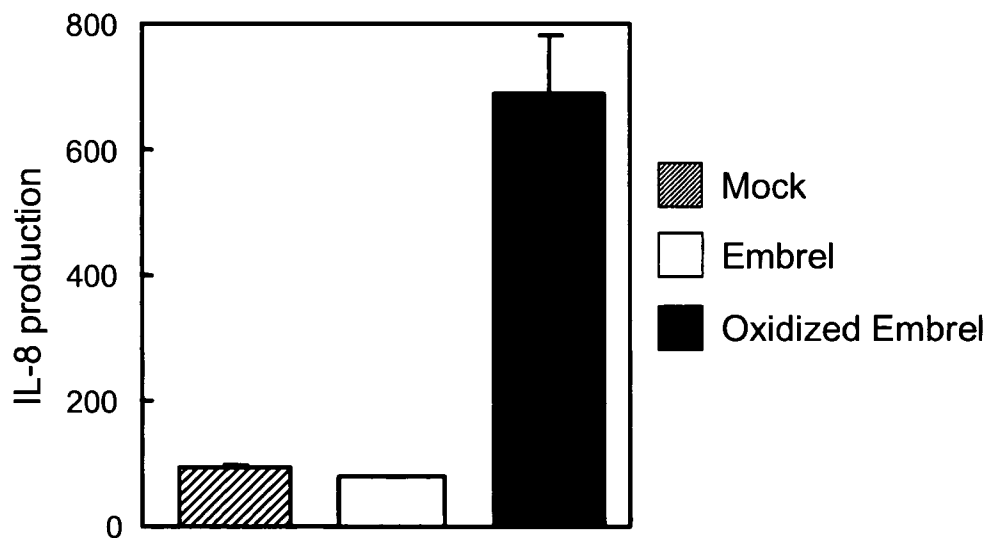


Fig 4. IL-8 secretion induced by oxidized Embrel. THP cells were incubated with oxidized Embrel for 24 hr. IL-8 levels were determined in conditioned medium.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
堤 康央、 石井明子、 早川堯夫	第6節 機能性人工 たんぱく質	早川堯夫	バイオ医薬品 の品質・安全 性評価	(株)エル・ アイ・シ ー	東京都	2007	p.369-378
向 洋平、 堤 康央、 中川晋作	絵で見てわかるナ ノ DDS 細胞内薬物導入キ ャリアとしての細 胞内移行ペプチド の応用技術	田畑泰彦	遺伝子医学 MOOK 別冊	(株)メディ カルドゥ	大阪市	2007	p.184-190
水口裕之	遺伝子治療研究の 動向		医薬ジャーナ ル新薬展望 2008	(株)医薬ジ ャーナル 社	大阪市	印刷中	
水口裕之、 櫻井文教、 川端健二	カプシドタンパク 質改変アデノウイ ルスベクター	田畑泰彦	遺伝子医学 MOOK 別冊	(株)メディ カルドゥ	大阪市	2007	p.235-242
水口裕之	アデノウイルスベ クター開発の最前 線	島田隆	バイオテクノ ロジージャー ナル	(株)羊土社	東京都	2007	p.168-173
水口裕之、 早川堯夫	アデノウイルスベ クター	早川堯夫	バイオ医薬品 の開発と品質 ・安全性確保	(株)エル・ アイ・シ ー	東京都	2007	p563-577

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S.	Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain.	Biol. Pharm. Bull.	30(2)	218-223	2007
Gao J.Q., Kanagawa N., Motomura Y., Yanagawa T., Sugita T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S.	Cotransduction of CCL27 gene can improve the efficacy and safety of IL-12 gene therapy for cancer.,	Gene Ther.	14(6)	491-502	2007
Hayashi A., Wakita H., Yoshikawa T., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Mukai Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S.	A strategy for efficient cross-presentation of CTL-epitope peptides leading to enhanced induction of in vivo tumor immunity.	J Control Release.	117(1)	11-19	2007
Tanimoto T., Yamamoto S., Taniai M., Taniguchi M., Ariyasu H., Ushio C., Aga M., Mukai Y., Tsutsumi Y., Ariyasu T., Ohta T. and Fukuda S.	The combination of IFN- α 2 and IFN- α 8 exhibits synergistic antiproliferative activity on renal cell carcinoma (RCC) cell lines through increased binding affinity for IFNAR-2.	J. Interferon. Cytokine. Res.	27(6)	517-523	2007

<p>Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y.</p>	<p>Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants.</p>	<p>BBA - Proteins and Proteomics.</p>	<p>1774(8)</p>	<p>1029-1035</p>	<p>2007</p>
<p>Gao J.Q., Eto Y., Yoshioka Y., Sekiguchi F., Kurachi S., Morishige T., Yao X., Watanabe H., Asavatanabodee R., Sakurai F., Mizuguchi H., Okada Y., Mukai Y., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S.</p>	<p>Effective tumor targeted gene transfer using PEGylated adenovirus vector via systemic administration</p>	<p>J. Control. Release</p>	<p>122(1)</p>	<p>102-110</p>	<p>2007</p>
<p>Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S.</p>	<p>Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library.</p>	<p>Pharmazie</p>	<p>62(8)</p>	<p>569-573</p>	<p>2007</p>

<p>Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.</p>	<p>Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide.</p>	<p>Biochem. Biophys. Res. Commun.</p>	<p>363</p>	<p>1027-1032</p>	<p>2007</p>
<p>Shibata H., Kamada H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB. Tsunoda S., Tsutsumi Y.</p>	<p>Creation and X-ray Structure Analysis of the Tumor Necrosis Factor Receptor-1-selective Mutant of a Tumor Necrosis Factor-α Antagonist</p>	<p>J.Biol. Chem.</p>	<p>283</p>	<p>998-1007</p>	<p>2008</p>
<p>Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.</p>	<p>Comparative study on transduction and toxicity of protein transduction domains</p>	<p>Br. J. Pharmacol</p>		<p>1-10</p>	<p>2008</p>

Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y.	Development of new anti-TNF therapy.	Inflammatio n and Regeneration	27	512-515	2007
Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity	Immunol. Methos.		in press.	
Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi.	The claudin family as a new approach for drug delivery	Drugs of the Future.	32	1-5	2007
Masuo Kondoh, Makiko Fujii, kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe	Barriology-based Strategy for drug Absorption	Ykakugaku Zasshi.	127	601-609	2007
Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi.	Tight Junction Modulator : Promising Candidates for Drug Delivery	Curr. Medicin. Chem.	14	2482-2488	2007
Motoki Harada, Masuo Kondoh, Akane Masuyama, Tsuyoshi nakanishi, Naoki Utogushi, Yoshiteru Wtanabe.	Effect of forskolin on the expression of claudin-5 in human trophoblast BeWo cells	Phamizie.	62	291-294	2007

Chiaki Ebihara, Masuo Kondoh, Motoki Harada, Makiko Fujii, Hiroyuki Mizuguchi, Shin-ichi Tsunoda, Yasuhiko Horiguchi, Kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe.	Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin for modulation of tight junction.	Biochem. Pharmacol.	73	824-830	2007
Motoki Harada, Masuo Kondoh, Chiaki Ebihara, Azusa Takahashi, Eriko Komiya, Makiko Fujii, Hiroyuki Mizuguchi, Shin-Ichi Tsunoda, Yasuhiko Horiguchi, Kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe.	Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin.	Biochem. Pharmacol.	73	206-214	2007
Katsuhiko Isoda, Noritaka Kagaya, Soichiro Akamatsu, Shinji Hayashi, Makoto Tmesada, Aiko Watanabe, Masakazu Kobayashi, Yoh-ichi Tagawa, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi.	Hepatoprotective Effect of Vitamin B12 on Dimethylnitr osamine-Induced Liver Injury	Biol. Pharm. Bull.	31	309-311	2008

Kiyohito Yagi, Midori Kojima, Suguru Oyagi, Etsuko Ikeda, Motihiro Hirose, Katsuhiro Isoda, Masaya Kawase, Masuo Kondoh, Hajime Ohgushi.	Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine	Ykakugaku Zasshi.	128	3-9	2008
Shinji Hayashi, Ayano Itoh, Katsuhiro Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi.	Fucoidan partly prevents CCl4-induced liver fibrosis	Eur. J. Pharmacol.	580	380-384	2008

第6節 機能性人工タンパク質

1. はじめに

本章で前述されている抗体をはじめ、ホルモン、酵素、血液凝固因子、ワクチン、さらにはインターフェロン類、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチンなどのサイトカイン類やそのレセプターを含む機能性タンパク質は、遺伝性疾患、代謝異常、循環器病、がん、免疫疾患、感染症などの各種疾病に対する従来にはない特異的な薬効を発揮する医薬品として医療に大きなインパクトを与えてきた。最近、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス等の進展も相俟って、各種疾病の治癒に資すると思われるタンパク質(医薬品シーズ・タンパク質)を探索・同定し、これら医薬品シーズ・タンパク質を安全かつ効果的に疾病治療できる医薬品として開発しようとする試みが益々注目を集めるようになってきた。しかし、「医薬品シーズ・タンパク質」そのものを医薬品として使用しようとしても、これらは一般に体内安定性に極めて乏しいことや投与方法に限界があるために、臨床応用の際には全身に大量頻回投与を余儀なくされ、コンプライアンス面はもとより安全性・有効性面で必ずしも満足すべき結果が得られないことが往々にしてある。ちなみにサイトカインなどの生体内生理活性タンパク質は、様々な細胞上の複数のレセプターを介したり、活性タンパク質間のクロストークやフィードバック機構などを通じて、“必要な場所で、必要なタイミングと濃度で”多彩な *in vivo* 生理活性を示すものである。こうした生理活性タンパク質の薬理的効果を期待して生理的濃度を超えて非経口的

(全身)に投与すると、これらが非生理的な時空間で、非生理的な濃度でレセプターや他の生体機能分子と相互作用することになり、目的とする治療作用のみならず副作用の原因となる他の作用までも同時に発現してしまうことも少なからずある。これらの理由から、多くの機能性タンパク質のうちでそれ自身が医薬品化されたタンパク質は一部にすぎない。そこで、上記課題を克服し、医薬品シーズ・タンパク質の有効性と安全性を確保することを可能とする創薬技術の開発は、疾患関連タンパク質として探索・同定されたものをより多く医薬品化するためのキーポイントと言える。以上の観点から現在、機能性タンパク質の医薬品化を目指して生物学的あるいは化学的アプローチを用いて、有効性と安全性に優れた“機能性人工タンパク質”を創出しようとする試みがなされており、コンセンサスイインターフェロンのようなタンパク質のアミノ酸配列改変体はもとより、ペグイントロンやペガシスのようなポリエチレングリコール(PEG)修飾タンパク質などが実際に臨床へ供され始めている。本節では、すでに医薬品として開発された機能性人工タンパク質について概説すると共に、新たな機能性タンパク質の創出技術並びに機能性人工タンパク質の品質、安全性確保策について述べることにする。なお近年、医薬品として多くの品目が承認されているヒト化モノクローナル抗体やその修飾体も機能性人工タンパク質の範疇ではあるが、すでに本章第4節および第5節で取り上げられているので本稿では言及しない。

2. 上市されている機能性人工タンパク質

これまでに日米 EU で承認されたタンパク質性医薬品の中で、“機能性人工タンパク質”と位置づけられる主なものを表 1 に示した。アミノ酸配列改変型、糖鎖改変型、PEG 結合型、融合タンパク質に分類される。主として投与回数・投与量の削減を目指し、薬効の持続性を得るため体内(血中)での安定性の向上を図る、特定レセプターへの指向性付与(ターゲティング能の導入)を図る、また薬物自体の有効成分放出システムや作用機構を制御する設計を施して持続性や速効性を図るといった“タンパク質の体内動態制御”を目的とした改変が施されている場合が多い。言い換えれば、前項で述べたタンパク質の生体内における時空間的挙動を制御しようとするドラッグ・デリバリー・システム(Drug Delivery System : DDS)の 1 つとして、機能性人工タンパク質の創製が試みられているものが中心と言えよう。以下に、それぞれの機能性人工タンパク質の特性について簡単に述べる。医薬品の名称は、日本名が決められているものについてのみ日本語を併記した。

2.1 アミノ酸改変型

(1) 改変型インスリン

・ Insulin lispro

インスリン リスプロ(ヒューマログ[®])

インスリン B 鎖 28 番目の Pro を Lys に、B 鎖 29 番目の Lys を Pro に置換した改変体。インスリン分子間での会合を抑制する結果、多量体形成が阻害され、投与部位から血中への速やかな移行を実現した速効型インスリンである。

・ Insulin Aspart インスリン アスパルト (ノボラピッド[®])

インスリン B 鎖 28 番目の Pro を Asp に置換し

た改変体。分子間の疎水的相互作用を抑制し、多量体形成が抑制される結果、投与部位から速やかに血中へ移行するため、速効型インスリンと位置づけられる。

・ Insulin Glulisine (Apidra[®])

インスリン B 鎖 3 番目の Asn を Lys に、B 鎖 29 番目の Lys を Glu に置換した改変体。多量体形成が抑制されるため、血中への速やかな移行が可能となった速効型インスリン。

・ Insulin Glargin

インスリン グラルギン(ランタス[®])

インスリン B 鎖 C 末端に Arg を 2 個付加し、A 鎖 C 末端の Asn を Gly に置換した改変体。等電点がインスリンの pH 5.4 より中性側にシフトしているため、pH 4.0 の製剤中では完全に溶解しているが、皮下投与されると pH が 7.0 まで上昇するために投与部位で微細な不溶体を形成する。個々のインスリン分子は、その不溶体からゆっくりと再溶解されて循環血中に入るため、血中にインスリンが徐放され、薬効の持続化が図られる。

・ Insulin Detemir インスリン デテミル(Levemir[®])

インスリン B 鎖 30 番目の Thr を欠損させ、B 鎖 29 番目(C 末端)Lys の ε-アミノ基に C14 脂肪酸を結合した改変体。アルブミンへの結合性を持つため、血中での滞留性が向上している。また投与部位での多量体形成とアルブミン結合性のため、血中に徐放されることから、薬効の持続化が期待される。比活性はインスリンと比較して低く、脂肪細胞における脂質合成を指標にした *in vitro* の代謝促進作用はインスリンの約 27% であり、インスリン受容体に対する親和性はインスリンの約 46% であること、また、インスリン様成長因子 IGF-1 受容体を介した細胞増殖促進作用はインスリンの約 11%、IGF-1 受容体に対する親和性はインスリンの約 16% であると報告されている¹⁾。

表1 日米EUで医薬品として承認されている機能性人工タンパク質

分類	一般名	適応疾患	改変部位	付加された主な機能
アミノ酸配列改変型				
インスリン	Insulin Lispro	糖尿病	B28Pro→Lys, B29Lys→Pro	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	Insulin Aspart	糖尿病	B28Pro→Asp	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	insulin Glulisine	糖尿病	B3Asn→Lys, B29Lys→Glu	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	Insulin Gargin	糖尿病	A鎖のC末端のAsn→Gly, B鎖のC末端にArg2個付加	持続性(中性pHでの溶解性低下による徐放化)
インスリン	insulin Detemir	糖尿病	B30Thr欠損, B29LysにC14脂肪酸結合	持続性(アルブミンとの結合による)
t-PA	Retepase	急性心筋梗塞	Fドメイン, EGFドメイン, K1ドメイン欠損, 糖鎖なし	血中半減期延長
t-PA	Tenecteplase	急性心筋梗塞	K1ドメインの2アミノ酸置換, Pドメインの4アミノ酸置換	血中半減期延長
t-PA	Pamiteplase	急性心筋梗塞	K1ドメイン欠損, Arg275→Glu	血中半減期延長
インターフェロン α	Interferon alfacon-1	C型肝炎	各サブタイプで出現頻度の高いアミノ酸に置換	比活性上昇
G-CSF	Nartograstim	好中球減少症	N末端付近5アミノ酸置換	比活性上昇
糖鎖改変型				
グルコセレブロシダーゼ	Imiglucrase	ゴーシェ病	シアル酸を酵素的に除去し, 糖鎖末端をマンノースに	標的細胞(マクロファージ)への取り込み促進
エリスロポエチン	Darbepoetin alfa	貧血	アミノ酸置換によりN型糖鎖付加部位を2カ所追加	血中半減期延長
PEG結合型				
インターフェロン α	Peginterferon alfa-2a	C型肝炎	PEG修飾(40kDaの分岐型PEG, 1カ所, Lys)	血中半減期延長
インターフェロン α	Peginterferon alfa-2b	C型肝炎	PEG修飾(12kDaのPEG, PEG, 1カ所, Lys他)	血中半減期延長
G-CSF	Pegfilgrastim	好中球減少症	PEG修飾(20kDaのPEG, 1カ所, N末端)	血中半減期延長
成長ホルモン誘導体	Pegvisomant	先端巨大症	9アミノ酸置換+PEG修飾(5kDaのPEG, 4-6カ所, Lys)	GHアンタゴニストとしての作用+血中半減期延長
融合タンパク質				
サイトカイン+毒素	Denileukin Diftitox	皮膚T細胞リンパ腫	Diphtheria toxin+IL2	IL2受容体に結合
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Etanercept	関節リウマチ	TNFR+Fc	TNFに結合+血中濃度持続
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Alefacept	尋常性乾癬	LFA3+Fc	CD2に結合+血中濃度持続
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Abatacept	関節リウマチ	CTLA4+Fc	CD80/CD86に結合+血中濃度持続

(2) 改変型 tissue-plasminogen activator(t-PA)

・ Reteplase (Retavase[®])

t-PA のドメインのうち、K2 ドメイン(Kringle2 ドメイン)とPドメイン(プロテアーゼドメイン)の2つのドメインのみからなる改変体。非改変型のt-PAでは血中半減期が約3分であるため、点滴静注(持続投与)によりようやく薬効が得られるが、Reteplaseの血中半減期は90分以上と延長されており、単回の静脈内投与が可能となっている。また、フィブリン親和性減少のため、血栓への浸透性が高く、血栓の速やかな溶解が可能であるとされている。

・ Tenecteplase (TNKase[®])

t-PAのK1ドメインの103番目のThrをAsnに、117番目のAsnをGluに置換し、Pドメインの4つのAlaを置換した改変体。非改変型と比較して、フィブリン親和性および、t-PAの阻害因子であるplasminogen activator inhibitor-1への抵抗性が上昇し、血中半減期が延長されている。

・ Pamiteplase パミテプララーゼ(ソリナーゼ[®])

t-PAのK1ドメインを欠損させ、天然型t-PAでN末端から275番目のArgをGluに置換した改変体。フィブリンに対する高い親和性を有し、プラスミノゲン活性化作用がフィブリンにより顕著に増強され、血中半減期も延長されている。

(3) 改変型インターフェロン

・ Interferon alfacon-1

インターフェロンアルファコン-1(アドパフェロン[®])

ヒトインターフェロンアルファの12種類のサブタイプのアミノ酸配列において、各位置のアミノ酸を出現頻度の最も高いアミノ酸に置換した改変体。コンセンサスインターフェロンとも呼ばれる。現在臨床に供されている「PEG非修飾型」のインターフェロンアルファ(主としてインターフェロン α 2a/ α 2b)と比較して、高い抗ウイルス活性、抗肝炎活性を示す。

(4) 改変型顆粒球コロニー刺激因子

・ Nartograstim ナルトグラスチム(ノイアツプ[®])

Granulocyte colony stimulating factor(G-CSF)のN末端側から1, 3, 4, 5, 17番目のアミノ酸がAla, Thr, Tyr, Arg, Serに置換した改変体。天然型のG-CSFと比較して、約3倍の比活性を示す。

2.2 糖鎖改変型

(1) 糖鎖改変型グルコセレブロシダーゼ

・ Imiglucerase イミグルセララーゼ(セレザイム[®])

CHO細胞で生産された β -グルコセレブロシダーゼをシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびヘキソサミニダーゼの酵素処理により糖鎖末端をマンノースにした改変体。標的細胞であるマクロファージ表面に存在するマンノース受容体を介して細胞に取り込まれる。レセプターへの標的指向能、レセプター介在性のエンドサイトーシスを有するDDS製剤と位置づけられる。

(2) 糖鎖改変型エリスロポエチン

・ Darbepoetin alfa ダルベポエチン アルファ(ネスプ[®])

5カ所のアミノ酸置換により、天然のerythropoietin(EPO)にN型糖鎖結合部位を新たに2カ所導入した改変体。天然のEPOには3本のN結合型糖鎖と1本のO結合型糖鎖が付加されているが、ダルベポエチンアルファでは、5本のN結合型糖鎖と1本のO結合型糖鎖が結合している。結合糖鎖が増えることにより血中半減期が延長され、投与量・投与回数の削減が期待される。

2.3 PEG結合型

(1) PEG結合型インターフェロン

・ Peginterferon alfa-2a

ペグインターフェロン アルファ-2a(ペガシス[®])

インターフェロンアルファ-2aのリジン残基(主な部位:第31位,第121位,第131位,第

134位)の1カ所に、1分子の分枝ポリエチレングリコール(分子量:約40,000)が、アミド結合を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約60,000)。血中半減期が従来の約10倍に延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。そのため、患者のコンプライアンスの向上に大きく貢献している。

・ Peginterferon alfa-2b

ペグインターフェロン アルファ-2b
(ペグイントロン®)

インターフェロンアルファ-2bのアミノ酸残基(Cys¹, His⁷, Lys³¹, His³⁴, Lys⁴⁹, Lys⁸³, Lys¹¹², Lys¹²¹, Tyr¹²⁹, Lys¹³¹, Lys¹³³, Lys¹³⁴, Ser¹⁶³およびLys¹⁶⁴)の1カ所に1分子のメトキシポリエチレングリコール(平均分子量:約12,000)がカルボニル基を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約32,000)。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。

(2) PEG 結合型顆粒球コロニー刺激因子

・ Pegfilgrastim (Neulasta®)

大腸菌で生産されたG-CSF(フィルグラスチム)のN末端アミノ酸に、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド(平均分子量:約20,000)を1分子結合させた修飾タンパク質。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減が期待される。

(3) PEG 結合型成長ホルモン誘導体

・ Pegvisomant ペグビソマント(ソマバート®)

Human growth hormone(hGH)のアミノ酸配列を9カ所置換することにより、hGH受容体アンタゴニストとして作用するよう改変したタンパク質にPEG化を施した修飾タンパク質。タンパク質1分子あたり、4~6分子のPEG(分子量5,000)がLys残基に結合しており、体内安定性や血中滞留性の

向上が期待される。

2.4 融合タンパク質

・ Denileukin Diftitox (Ontak®)

Diphtheria toxinの一部(Met1~Thr387)-HisとInterleukin 2(IL-2)の一部(Aln1~Thr133)からなる融合タンパク質。リンパ腫細胞表面のIL-2受容体に結合し、受容体リガンド複合体として細胞内に取り込まれる。IL-2受容体の発現細胞へのターゲティング能を有し、これらの細胞特異的にジフテリアトキシンによるタンパク質合成阻害に基づいた細胞死を誘導する。

・ Etanercept エタネルセプト(エンブレル®)

ヒトTumor necrosis factor(TNF)受容体p75の細胞外のリガンド結合ドメインとヒトIgGのFc部分の融合タンパク質。細胞表面のTNF受容体へのTNFの結合を拮抗的に阻害する。Fc部分は血中半減期延長や可溶性受容体の二量化(リガンド【TNF】への親和性向上)の役割を持つ。

・ Alefacept (Amevive®)

ヒトleukocyte function antigen 3(LFA-3)の細胞外領域であるCD2結合ドメインとヒトIgG1のFcドメインの融合タンパク質。CD2抗原を表面に発現しているTリンパ球に選択的に結合し、リンパ球の活性化を阻害する。

・ Abatacept (Orencia®)

ヒトCTLA-4の細胞外ドメインとIgG1のFcドメインの融合タンパク質。抗原提示細胞(APC)上に存在するCD80/CD86分子に結合することにより、CD28分子を介したT細胞の活性化が阻害される。

3. 新たな機能性人工タンパク質の創出技術

従来から多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた“生理活性タンパク質のアミノ酸置換体(機能性人工タンパク質)”を創製するため、Kunkel法などの点突然変異法を用いた構造変異体(アミノ酸置換体)の作製を精力的に試みている。しかし点突然変異法は、1つ1つのアミノ酸を置換した変異体を作製し、個々の変異体を別々に精製し機能評価しなければならぬため、莫大な時間と労力を要するうえ、評価できる変異体の数には実質的に限界があり、有効な変異体の効率的・効果的な作製とはいえなかった。それに対して近年、ファージ表面提示法を利用することにより 10^8 種類以上もの多様性を有した構造変異タンパク質(生理活性タンパク質のアミノ酸置換体)を一挙にCombinatorial Biosynthesisし、この構造変異体ライブラリーの中から、レセプター親和性や特異性などが向上した“機能性人工タンパク質”を迅速かつ効率よくスクリーニングできる基盤技術が開発されている。

ファージ表面提示法を用いたスクリーニングでは、ファージ表面にタンパク質を発現させ、固定化された標的分子と結合するファージを選別する操作を繰り返して、目的の結合特性を示すタンパク質を発現するファージを選択していく。また、選択されたファージを大腸菌に感染させれば、その培養上清中にタンパク質を発現させ、これを用いて、タンパク質の生物活性もハイスループットに評価することが可能である。さらに、培養上清というクルードなサンプルでは必ずしも評価できない発現タンパク質の物理化学的性質や生物学的性質を詳細に解析する必要がある場合には、発現させた変異体タンパク質を精製して評価を行うこともできる。

多数の変異体を評価できるという利点を活かし、

ファージ表面提示法を用いて、従来の方法では見出すことのできなかった構造変異体の探索に成功した例として、腫瘍壊死因子(TNF)のリジン欠損体が報告されている²⁾。従来の点突然変異法を用いた構造-活性相関研究では、TNFのLys11やLys65・Lys90はその立体構造(三量体)形成やレセプター結合に必須と報告されていた。TNFに限らず、一般にリジン残基は多くの場合、生理活性タンパク質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合などに必須の役割を担っているため、他のアミノ酸への置換は致命的な活性低下を招いてしまうことが、従来までの点突然変異解析によって常識となっていた。しかしファージ表面提示法を用いることで、Lys11やLys65・Lys90を含む全6個のリジン残基を一挙に他の様々なアミノ酸へ置換したタンパク質ライブラリーを構築することが可能となった結果、野生型TNFと同等さらには10倍以上もの生物活性を有するリジン欠損TNFを創製できることが判明した²⁾。この例では、TNFの6カ所のリジン残基を他の各種のアミノ酸に置換したTNF変異体ライブラリーをファージに導入し、固定化したTNF受容体への結合能を有するTNF変異体を発現しているファージをBiacore[®]を用いて選別、さらに、選別されたファージを感染させた大腸菌の上清を用いたバイオアッセイ(TNF感受性細胞に対する細胞傷害性試験)により、変異体の生物活性を評価している。リジン残基を置換しても活性を保持した変異体が得られた理由としては、リジンから置換されたアミノ酸が、TNFの活性保持に適したアミノ酸であったことが考えられる。従来の点突然変異法を用いた検討では、リジンをアラニンなどのアミノ酸に置換してTNFの活性が失われることを評価しているが、6カ所あるリジン残基をリジン以外のアミノ酸19種類に置換した変異体(19⁶種類)の機能を個別に評価することは現実的でないこともあり、活性を保持したリジン欠損体を見出す試みはなされていなかった。ファージ表面提示法を駆

見功損用やレに活ブ他てっ法む酸こら損は、駿ジををたイ生る。がアでをノ面外のも々取

使うことにより現在までに、TNF受容体サブタイプに選択的に結合する機能性人工TNFや、体内安定性に優れた機能性人工TNFも多数得られており³⁾、今後の研究の進捗に期待が持たれるところである。

このようなファージ表面提示法を利用した機能性人工タンパク質の創出以外にも、ジーン・シャッフリング法や種々糖鎖修飾テクノロジーの開発が広く進められており、今後の“有効かつ安全なタンパク質性医薬品候補”の分子設計に寄与するものと考えられる。

4. 機能性人工タンパク質の品質・安全性確保

タンパク質性医薬品において薬効を期待される作用機構の代表的なものは、生体の恒常性維持機構の中で、本来、時空間的に厳密な発現制御のもとで発現・機能すべきであった当該タンパク質が欠損あるいは質的、量的に変化していることが発症の原因であった場合、あるいは疾患状態で質的、量的に変化したり欠損していくような場合に、これを補うというものである。そのような使用目的で開発されてきたものとしては、ヒトインスリン、グルカゴン、成長ホルモン、インスリン様成長因子、ナトリウム利尿ペプチド、グリコセレブリンダーゼ、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、血液凝固因子類などが典型的な例として挙げられる。その作用プロファイルがすでにほぼ明らかにされている天然型タンパク質と同等のものとして製造されたタンパク質性医薬品では、必要とされる品質が確保され、投与後の生体内濃度や作用局所さえ適正に制御できれば、一定の安全性を確保できるものと期待される。これに対して、天然のものとは異なる構造を持つ機能性人工タンパク質の品質および安全性の確保のためには、従来までのタンパク質性医薬品で必要とされていた

品質・安全性確保のための方策に加え、機能性人工タンパク質の特性に応じた個別の配慮が必要になる。

タンパク質性医薬品の品質・安全性等を確保するためには、まず申請しようとする製造方法を明らかにする必要がある。そして得られた原薬について、その構造・組成、物理化学的性質、免疫化学的性質、生物学的性質などの分子特性や安定性を最新の解析法を用いて詳細に解析するとともに、目的物質関連物質や目的物質由来不純物(定義については第3章概論およびICH Q6B参照)、製造工程由来不純物などの存在状況、感染性物質が存在しないこと、その他の汚染物質の存在実態等を含めた「品質特性」(定義についてはICH Q5Eを参照)を明らかにすることが必要である。また、製剤の製造方法と「品質特性」についても必要な情報やデータを明らかにする必要がある。その上で、臨床の場に、適切な品質を有する医薬品を恒常的に提供するための品質確保、品質管理の方策を講ずる必要がある。品質確保、管理のキーポイントは非臨床および臨床試験により有効性、安全性が評価された製品の「品質特性」をいかに継続して保証するかということである。その際、製品レベルでのロットごとの試験による保証(適切な規格・試験法の設定)と製造方法での保証(原材料や添加物などの品質管理、重要工程の一定性、プロセス評価・検証、プロセスコントロール・工程内管理試験など)を相互補完的にいかに合理的に組み合わせて品質確保策とするかが最大の課題となる。なお開発段階においては、非臨床および臨床試験により明らかになる有効性・安全性の解析結果と品質との関連を評価・検討し、望ましい品質を確保できるよう製造方法を最適化したり、品質の一定性を確保するための規格・試験法の改定を図ったりすることが必要な場合もある。試験法には、特性解析に用いた分析手法を適切に応用する。製品の安全性評価を行う際には、その「品質特性」から考えられる安全性上の懸念事項につ

いて、特に注意して解析を行う必要があるが、機能性人工タンパク質の場合は、化学修飾により製造される修飾タンパク質の修飾位置異性体の問題、構造変化により目的以外の生物活性が変化している可能性、抗原性の問題、などが特に留意すべきポイントである。

製造工程で PEG 化、デキストランやマンノース等を用いた糖修飾のような化学的変化(化学修飾)を行う場合、人為的に施される PEG 化反応や糖付加反応などはタンパク質の部位特異的に起こるものではないため、1種類あるいは数種類のアミノ酸に、しかも複数カ所に PEG あるいは糖などがランダムに導入される場合が多い。したがって、PEG 化反応あるいは糖修飾後の機能性人工タンパク質は PEG 化あるいは糖修飾された部位、導入された PEG や糖の分子数などにおいて異なる構造を持つ分子種の混合物となり、分子量などを指標に精製された画分についても、修飾位置異性体の混合物となってしまう。したがって、特性解析においては、得られた修飾タンパク質について、分子量、PEG あるいは糖などの結合分子数、PEG あるいは糖などの結合部位、修飾位置異性体の構成比といった構造・組成や物理化学的性質を最新の分析法を用いて明らかにすると共に、修飾位置異性体ごとの生物学的性質についても可能な範囲で詳細な解析を行う必要がある。修飾位置異性体ごとに作用プロファイルが異なる場合、修飾位置異性体の混合物は機能面(生物活性、体内挙動)から見ても不均一な機能分子の集団となり、そのために修飾位置異性体の構成比が有効性および安全性に影響を及ぼす可能性がある。実際、PEG 化インターフェロンでは、PEG の修飾位置異性体ごとに抗ウイルス活性が異なることが報告されている。また、修飾位置異性体の構成比が異なるロット間では体内動態も異なるとされている。修飾タンパク質における修飾位置異性体の解析手法としては、例えば、液体クロマトグラフィーにより異性体を分離し、それぞれのピークについて、

ペプチド分析、アミノ酸配列分析、質量分析などを行うことによって、修飾部位を同定することが可能である。また、液体クロマトグラフィーの溶出パターンから異性体の構成比が分かるため、ピーク強度比を規定することで、異性体構成比の一定性が確保できる。

ここで重要なことは、前臨床、臨床試験に供した製品が、どのような不均一な分子種の集団であったか、不純物プロフィール等を明らかにすることである。前臨床、臨床試験を通して不均一性のパターンや不純物プロフィールなどの品質特性の変動がどのような範囲内であったか、その品質特性プロフィールの変動が有効性、安全性にどのように影響を及ぼしたかを精密に観察する必要がある。その結果、有効性、安全性に影響を及ぼすことがなかった品質特性プロフィールの変動の範囲が、以降、維持管理すべき製品の品質特性プロフィールの変動の範囲ということになる。当然、異性体構成比の一定性の確保や目的物質関連物質、主要な不純物に関する試験方法および規格値・判定基準は、製品の規格および試験方法の必須の項目とする必要がある。化学修飾を行う場合に製品に混入する可能性のある不純物については、製造工程由来不純物として、PEG 化反応や糖付加反応などの工程で用いられる試薬やその変化物を評価項目に加える必要がある。また、目的物質由来不純物として、非結合型となった遊離のタンパク質、PEG が目的とする分子数以上に結合した di-あるいはオリゴ PEG 変異体、O-結合型 PEG 修飾体、凝集体が混在する可能性を評価して、必要に応じて許容量に関する規格を設定すべきである。目的物質の脱アミド体や酸化体も多くはタンパク質性医薬品では、留意すべきものである。これらが、目的物質に匹敵する生物活性と安全性を有していれば目的物質関連物質として有効成分の一部を構成するが、目的物質に匹敵しない場合は目的物質由来不純物となる。

修飾反応条件が修飾部位異性体の構成比に大き