

タンパク質性医薬品・核酸医薬品の安定性に関する研究

分担研究者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

研究要旨 タンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼすと考えられる有効成分分子の高次構造の揺らぎを評価する手法(タンパク質の緩和時間等を指標にした)として、 ^{13}C -NMR 緩和時間の可能性について検討し、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の ^{13}C -NMR 緩和時間によって評価できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

革新的医薬品として注目を集めているタンパク質性医薬品の品質変化は化学的な分解とともに、分子の高次構造の変化を伴う物理的な変化によっても引き起こされ、有効性、安全性に影響を及ぼす。低分子医薬品に比べ分解メカニズムが複雑であり、医薬品添加剤が品質変化に及ぼす影響も複雑である。タンパク質性医薬品の品質確保のためには品質変化と関連する有効成分、添加剤の因子を明らかにし、その因子を評価し、コントロールする手法を開発ことが不可欠である。特に、安定性を短期間に評価できる標準的な評価法があれば、安定な処方探索のための期間が短縮され、開発を促進するものと考えられる。

本研究においてはタンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼす有効成分側、医薬品添加剤側の因子に関する調査を行うとともに、特に安定性に影響を及ぼすと考えられる有効成分分子の高次構造の揺らぎや、有効成分と添加剤との相互作用を評価する手法を開発する。特に、近年タンパク質の安定性との関連が示唆される緩和時間等の分子内の局所的な運動性を指標にした評価法について検討する。局所的な運動性はタンパク質医薬品の疎水性相互作用によるタンパク質の凝集反応や酸無水物中間体を経る脱アミド反応に関連することが示唆されている。タンパク質医薬品の安定性に影響を及ぼす因子と実測される保存安定性との関連を明らかにし、安定性評価法と

しての標準化をめざす。

NMR 緩和時間は分子運動性の指標とされ、タンパク質については動的な揺らぎの保存安定性の指標となりうることが示唆されている。昨年度の検討により、タンパク質濃度が 5%程度あれば ^{13}C -NMR の測定が可能であり、抗体医薬の市販剤中のタンパク質の運動性評価に適用できることを明らかにした。本年度はいくつかの抗体医薬の市販剤とそれを透析することにより溶液の塩濃度を变化させた試料について緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。

B. 研究方法

^{13}C -NMR 緩和時間の市販剤中のタンパク質の局所的な運動性の評価への適用性についてはヒュミラ皮下注(アダリムマブ)、アクテムラ注(トシズマブ)、レミケード注用(インフリキマブ)を用いて検討した。レミケード注用は凍結乾燥品であり、5%溶液になるよう水を加え溶解したものについて測定した。緩和時間は Inversion-recovery 法によって 20 において測定した。変性温度はマイクロ熱量計 (TAM、TA Instruments) を用い、毎時 1 の昇温速度で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は化学実験のみを行い、倫理面への配慮の必要はないと考えられる。

C. 研究結果

1) タンパク質の動的な揺らぎの ^{13}C -NMR 緩和時間による評価

NMR 緩和時間は分子運動性の指標とされ、タンパク質については動的な揺らぎが保存安定性の指標となりうることを示唆されている。昨年度の検討により、タンパク質濃度が 5% 程度であれば ^{13}C -NMR の測定が可能であり、タンパク質カルボニル炭素の緩和時間の測定が可能であることを明らかにした。本年度はいくつかの抗体医薬の市販製剤とそれを透析することにより溶液の塩濃度を变化させた試料についてタンパク質カルボニル炭素の緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。ヒュミラ皮下注のカルボニル炭素の緩和時間は 3.4s であるのに対し、水に対して透析し、塩や添加物濃度を低下させた試料では 2.7s に短縮した。一方、0.9% の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液に対して透析し、塩濃度を増加させた試料では 3.6s であった。溶液状態の試料においては NMR 緩和時間が長いほど分子運動性が良いので、ヒュミラ皮下注に処方されるアダリムマブについては、塩濃度が高いほど分子運動性が高いと考えられる。アクテムラ注に処方されるトシズマブのカルボニル炭素の緩和時間は 2.5s、レミケード注用に処方されたインフリキマブ（凍結乾燥品を 5% の濃度に溶解）については 3.2s であった。

2) 示差走査熱量測定による変性温度の測定

タンパク質溶液を一定速度（毎時 1 ）で昇温すると変性に伴う吸熱が観測される。吸熱のピーク温度は変性温度 (T_m) といわれ、タンパク質の熱的安定性の指標として用いられる。pH や緩衝塩濃度を変えて測定した変性温度と保存試料の動的な光散乱の経時的な増加によって見積もられる凝集速度との間に関連があることが報告されており、変性温度は保存安定性の指標として用いることができると考えられる。そこで、本研究におい

ては市販製剤中の抗体タンパク質の保存安定性の指標として T_m を用いた。ヒュミラ皮下注の変性温度の測定例を Fig. 1 に示す。毎時 1 の昇温速度で試料温度を上昇させると 65 付近に吸熱ピークが観測された。水に対して透析し、塩や添加物濃度を低下させた試料では T_m は高温にシフトし、0.9% の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液に対して透析し、塩濃度を増加させた試料では低温にシフトした。表 1 にいくつかの市販製剤中の抗体タンパク質の変性温度を示す。ヒュミラ注に処方されるアダリムマブの変性温度は、塩の濃度の他に pH の影響も受け、pH5 にくらべ pH6 の方が高い変性温度を示した。また、アクテムラ注に処方されるトシズマブの変性温度も溶液の pH、塩濃度の影響を受けることが示された。

抗体タンパク質のカルボニル炭素の ^{13}C -NMR 緩和時間と変性温度との関係を Fig. 2 に示す。緩和時間が大きく分子運動性が高いと考えられる試料ほど、変性温度が低く不安定であることが示された。タンパク質の安定性がカルボニル炭素の ^{13}C -NMR 緩和時間によって評価できる可能性を示唆するものとする。

D. 考察

本年度の検討により、保存安定性の指標として用いたタンパク質の変性温度とカルボニル炭素の ^{13}C -NMR 緩和時間との間に関連があることを示唆する結果が得られた。関連を結論付けるためには更なる検討が必要であると考えられる。たんぱく質の保存安定性の指標として用いた変性温度については、相対的な安定性の比較が可能であり、溶液の pH や緩衝塩の濃度によって T_m が変化し、高い T_m が観測される溶液における凝集が起こりにくいことは明らかであるが、タンパク質間の保存安定性の比較に適用が可能かについては不明である。今回検討した抗体タンパク質においては、タンパク質が異なっても、見かけ上変性温度と緩和時間に関連があるように見える。今後、凝集等の保存安定性を実測し、 ^{13}C -NMR 緩和

時間との関連を明らかにする必要があると考える。NMR 緩和時間と保存安定性との関連が明らかにできれば、実時間での保存に比べ、短時間で安定性評価が可能になり、革新的なタンパク質医薬の実用化促進につながるものと考えられる。

E. 結論

タンパク質の高次構造の揺らぎを ^{13}C -NMR に よって評価する方法について市販モノクロナル抗体製剤を用いて検討した。動的な揺らぎの指標である ^{13}C -NMR 緩和時間は保存安定性の指標として用いた変性温度と関連することが示唆され ^{13}C -NMR 緩和時間は製剤中のタンパク質の保存安定性の評価に有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 阿曾幸男, 医薬品の発がん性不純物の評価と管理に関するガイダンス. 公衆衛生, 印刷中(2014)

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

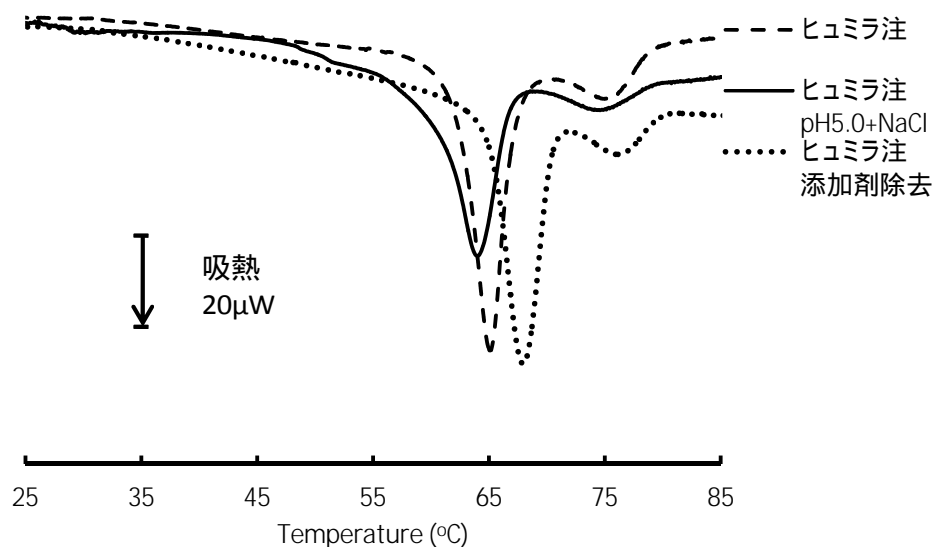


図 1 変性温度の測定例

表 1 変性温度に及ぼすpH、塩濃度の影響

	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
ヒュミラ注	64.8	75.0	
ヒュミラ 水 透析	67.7	77.4	
ヒュミラ pH6.0 透析	67.2	75.7	
ヒュミラ pH8.0 透析	67.1	74.2	
ヒュミラ pH5.0 透析	65.4	75.0	
ヒュミラ pH5.0+0.9%NaCl 透析	63.3	74.6	
アクテムラ注	70.6	76	85.3
アクテムラ 水 透析	71.3	75.5	85.7
アクテムラ pH6.0 透析	71.1	76.7	85.6
アクテムラ pH6.0+0.9%NaCl 透析	67.6	74.8	85.5
レミケード 50mg/mL	64.4	66.2	77.3

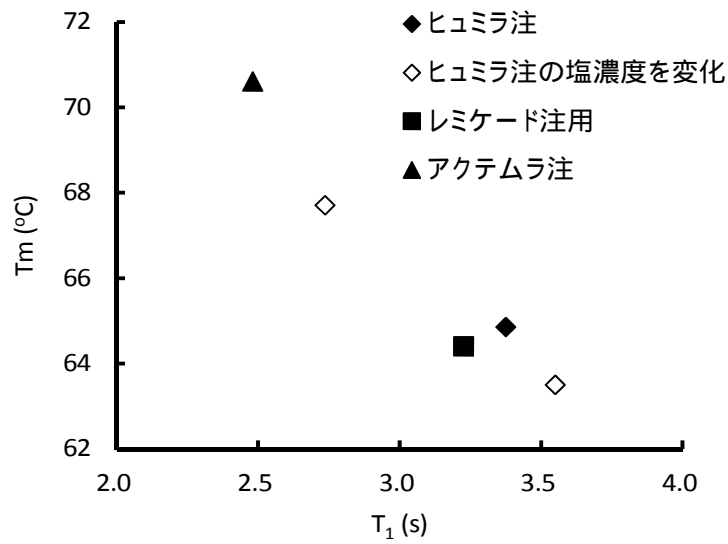


図 2 変性温度と ^{13}C -NMR 緩和時間の関係