

学位論文題名

水素/重水素交換および質量分析法（HDX/MS）を用いた  
バイオ医薬品の薬物動態の予測と作用機序の解析に関する  
研究

学位論文内容の要旨

<背景>

バイオ医薬品は多数の深刻な疾患の治療において、生命と QOL の維持に貢献してきた存在であり、その医療上の重要性は高い。バイオ医薬品の様々な特性を理解し評価することは、有効性と安全性を確保する上で必要であり、また新たな医薬品を開発する上でも有益である。しかしバイオ医薬品の多くは、複雑かつ不均一な構造を持つタンパク質を有効成分とするため、特性の解析は容易ではない。

<目的>

タンパク質を有効成分とするバイオ医薬品の特性には、バイオ医薬品自身およびその標的分子の高次構造変化と関連するものが多い。バイオ医薬品の特性を高次構造変化の観点から理解し、薬物動態の予測や作用機序の解明につなげる目的で、本研究を行った。

<方法>

高次構造変化に関する情報を得るために、水素/重水素交換質量分析法(HDX/MS)と呼ばれる手法を利用した。これは重水溶媒中でタンパク質を重水素標識する(HDX 反応)もので、タンパク質中の水素原子の、溶媒への露出の程度の変化を検出することができる。

<結果と考察>

1. 糖尿病治療に用いられるインスリンアナログ製剤は、多量体安定性という高次構造上の特徴が、皮下投与時の作用時間に直接影響するバイオ医薬品である。多量体安定性と作用時間の異なる 7 種類のインスリンアナログ製剤の HDX/MS 結果から、それぞれの HDX 反応速度パラメーターと体内動態パラメーターの間に、直線相関の関係があることを見出した。この結果から、インスリンアナログの多量体安定性をこの方法で評価し、インスリンアナログ製剤の体内動態を予測できることを

明らかにした。

2. リウマチなどの治療に用いられる抗 TNF $\alpha$  薬は、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  を標的とする分子標的薬である。現在日本で承認されている 4 品目は、それぞれ独立に開発されたバイオ医薬品であるが、類似の作用を持つ。TNF $\alpha$  の HDX/MS を行い、4 種類の抗 TNF $\alpha$  薬のいずれが結合した場合でも、TNF $\alpha$  の共通した 4 つの領域が溶媒から遮蔽されることを見出した。これらの領域は抗 TNF $\alpha$  薬と結合する可能性が低い部位であり、これらの領域での HDX 結果の変化は、抗 TNF $\alpha$  薬の結合に伴う高次構造変化によるものと推測される。この結果は、4 種類の異なる抗 TNF $\alpha$  薬が意外にも、共通の高次構造変化を TNF $\alpha$  にもたらすことで作用を発現している可能性を示唆する。また、変化の程度が少なく、抗 TNF $\alpha$  薬間でも差がある、数ヶ所の領域を見出した。これらは薬剤結合領域の候補である。

#### <結論>

高次構造変化の観点からインスリンアナログ製剤と抗 TNF $\alpha$  薬の特性解析を行い、以上の知見を得た。これらは、バイオ医薬品の高次構造の動的な側面への理解を深めるとともに、以下の用途にも有益な情報である。

1. インスリンアナログ製剤の多量体安定性評価と薬物動態予測
2. 新規抗 TNF $\alpha$  薬開発時の候補物質の選別および、評価系の選択

# 学位論文審査の要旨

主査	客員教授	川崎	ナナ	(連携分野)
副査	教授	鈴木	利治	
副査	教授	前仲	勝実	
副査	准教授	尾瀬	農之	

## 学位論文題名

# 水素/重水素交換および質量分析法 (HDX/MS) を用いた バイオ医薬品の薬物動態の予測と作用機序の解析に関する 研究

博士学位論文審査等の結果について (報告)

バイオテクノロジー応用医薬品 (バイオ医薬品) は、高い分子標的性を有することから、有害反応が少なく、新たな治療を実現させるファースト・イン・クラス医薬品候補として世界中の患者及び企業からの期待を集めている。また、新規標的分子探索の限界、生活習慣病など創薬ターゲットの変更、コスト削減等の理由により、改良型医薬品やバイオ後続品などに対しても、ベスト・イン・クラス医薬品候補として関心が高まっている。その一方で、種特異性が高いバイオ医薬品には、動物モデルを用いた非臨床試験結果から予測できない有害作用が発現するリスクが存在することから、有効性はもとより、非臨床試験から臨床試験へ移行するときの被験者の安全性を確保するための方策が求められている。例えば、初回ヒト投与臨床試験の用量を適切に設定するためには、バイオ被験薬の作用機序、標的分子の特性、被験薬と標的分子の反応性、動物モデルの妥当性、及び、薬物の体内動態を解析・予測・評価するための技術の開発が必要である。しかし、バイオ医薬品は構造が複雑で不均一性があること、また、現在の分析技術では高次構造やタンパク質間相互作用解析に限界があることから、それらの技術に関して今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、このような現状にあるバイオ医薬品の薬物動態の予測及び作用機序の解析について、四次構造が体内動態に密接に関わるインスリン類、及び、共通の標的を持つが作用機序の詳細が未知である抗体医薬品等を用いて、X線結晶構造解析などの一般的な高次構造解析法ではなく、溶媒との接触を観測することで高次構造の変化を検出する重水素交換及び質量分析法(HDX/MS)と呼ばれる手法に関して、その可能性を明らかにしたものである。著者は、インスリン類の自己会合と解離、並びに、抗 TNF $\alpha$ 抗体等と標的分子 TNF $\alpha$ の相互作用を高次構造の動的な側面から解析することにより、従来法では得られなかった新たな知見や、*in vivo* 試験と相関性のある結果が得られることを明らかにしながら、HDX/MSを用いたインスリン類の新たな体内動態予測、及び分子標的薬の作用機序解析手法を見出している。

第1章では、自己会合の安定性を変化させることにより、皮下から血中への移行と作用時間を調節したインスリン及びアナログ製剤の多量体安定性解析について述べられている。まず、分子全体の HDX/MS の結果から、速効型ヒトインスリン製剤に比べ、解離傾向が強いとされる超速効型アナログ製剤である lispro と glulisine は、溶媒との接触がより活発であること、一方、会合傾向が強いとされる持効型アナログ製剤 glargine、並びに、中間型ヒトソフェンインスリン製剤(NPH)及び中間型リスプロ製剤 (NPL) は、ヒトインスリンより溶

媒から遮蔽されていることを見出した。また、ヒトインスリンおよび lispro の各部位の重水素交換化率を比較することにより、このような差異がインスリンの解離の差異に由来していること、すなわち、インスリン六量体が二量体を経て単量体へと解離する一連の過程の各ステップで生じているものと推定している。

さらに、HDX/MS で測定したインスリン類の水素/重水素交換反応を、擬一次反応のモデルで表現し、そこから求められる速度論パラメーターの中で、交換反応速度が遅い水素原子数  $D_h$  と、交換し得る全水素原子数  $D_{\infty}$  の 2 つが、これらのインスリン類を皮下投与した際の体内動態パラメーターと直線相関を示すことを明らかにしている。

これらの結果は、インスリン類の重要品質特性の一つである製剤中の有効成分分子の多量体安定性を、*in vivo* 試験を行うことなく評価できることを新たに見出し、多量体安定性の結果である体内動態が予測可能であることを初めて示すものである。また、本論文では、一般的には、バイオ医薬品の有効性・安全性が高次構造に依存している場合に、構造的な手法によってそれらを予測・評価することができる可能性が述べてられている。さらに著者が見出した知見は、意図した作用プロファイルを持つ新たなインスリンアナログ製剤の分子設計にも役立つものと考えられる。

第 2 章では、関節リウマチ等の治療に適応されている抗 TNF $\alpha$  抗体 infliximab, adalimumab, 及び golimumab, 並びに TNF $\alpha$  受容体 etanercept (以下、これらの 4 品目を抗 TNF $\alpha$  薬と記す) と標的分子 TNF $\alpha$  の相互作用解析について述べている。これらの医薬品は、同じ標的分子と規制上類似の薬理作用を持つが、結合領域等作用の構造的な機序の詳細は不明である。著者は、4 種の抗 TNF $\alpha$  薬の結合領域と作用の構造的背景の解明を目的に、抗 TNF $\alpha$  薬の存在時・非存在時の HDX/MS 結果を比較することにより、4 種類の抗 TNF $\alpha$  薬のいずれが結合した場合にも TNF $\alpha$  上の共通した領域(58-64, 43-56, 71-83, 並びに 111-134 番目のアミノ酸残基)において溶媒からの遮蔽が起こることを明らかにしている。これらの結果は、それぞれ個別に開発された抗 TNF $\alpha$  薬が、いずれも共通の高次構造変化を介して TNF $\alpha$  の中和などの薬理作用を発揮している可能性を指摘している。また、著者は、共通領域に加え、薬物結合領域の候補となる、各抗 TNF $\alpha$  薬に固有のやや弱い遮蔽の起こる領域を見出したことに加え、それぞれの抗 TNF $\alpha$  薬が TNF $\alpha$  の高次構造にもたらす影響にマイナーな差異がある可能性にも言及している。これらの知見は既存の抗 TNF $\alpha$  薬の活性の評価に有益であるとともに、新規抗 TNF $\alpha$  薬の候補の選別にも寄与しうるものである。また、中和活性に加え、ADCC 活性や CDC 活性等免疫調節作用をもつ抗体医薬品の開発、特に、臨床試験の用量設定、効能拡大等においても、著者が得た知見は役立つものと期待される。

本論文は、ヒトインスリン及びインスリンアナログ製剤の多量体安定性と解離、それに不随する投与後の皮下から血中への移行を、HDX/MS により予測・解析できることを新たに明らかにし、従来法に依らない体内動態予測の途を開いたものである。また、HDX/MS により、抗 TNF $\alpha$  薬の薬効発揮に係わる作用機序を新たに見出し、HDX/MS が、類似薬・改良薬の開発だけでなく、抗体医薬品等分子標的薬の分子設計や臨床開発にも応用できる可能性を示したものである。これを要するに、著者は、HDX/MS を用いた高次構造の動的解析に基づくインスリン類の体内動態予測、及び、バイオ医薬品の作用機序の解析法を開発したものであり、バイオ医薬品の有効性・安全性確保に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(薬科学)の学位を授与される資格あるものと認める。