



Title	UVC照射による抗体医薬品のヒスチジン残基の光酸化
Author(s)	宮原, 佑弥
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/82176">https://doi.org/10.18910/82176</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

UVC 照射による  
抗体医薬品のヒスチジン残基の光酸化

大阪大学大学院 薬学研究科  
創成薬学専攻 高分子化学分野  
宮原 佑弥

# 目次

略語一覧	2
序論	3
本論	10
第一章 UVC 照射による抗体医薬品およびモデルペプチド(アンジオテンシン II)の光酸化機構	10
第一節 UVC 照射による抗体医薬品の光酸化	10
第二節 UVC 照射によるモデルペプチド(アンジオテンシン II)中のヒスチジン残基の光酸化	19
第三節 ヒスチジン残基の光酸化機構	25
第四節 小括	32
第二章 抗体医薬品におけるヒスチジン残基の光酸化感受性に関する因子の決定	33
第一節 アダリムマブ中のヒスチジン残基のイミダゾール C2 位の水素/重水素交換速度の測定	33
第二節 ヒスチジン残基の光酸化感受性と RSA、 $pK_a$ および $k_2$ との関係性	39
第三節 抗体医薬品におけるヒスチジン残基の機能と重要性	42
第四節 小括	44
結論	45
謝辞	46
実験の部	47
参考文献	53
主論文	60

## 略語一覧

ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
AGEs	Advanced Glycation End products
ASA	Solvent Accessible Surface Area
CAM	Carboxamide methyl
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CID	Collision Induced Dissociation
CQA	Critical Quality Attribute
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EO	Ethylene Oxide
FcRn	Neonatal Fc Receptor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IgG	Immunoglobulin G
LC	Liquid Chromatography
mAb	Monoclonal Antibody
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
PDUVL	Planar Deep Ultraviolet Light Source
UV	Ultraviolet
UVGI	Ultraviolet Germicidal Irradiation

# 序論

遺伝子組換えタンパク質医薬品が初めて承認されてから約 30 年が経過し、世界では 100 品目以上のバイオテクノロジーを応用した医薬品（バイオ医薬品）が承認されている。特に、高い特異性を持ちながらも、基本分子構造が共通するモノクローナル抗体（mAb）医薬品は、製造技術や分析技術を共通化することで盛んに開発が行われており、バイオ医薬品市場において主要製品となっている<sup>1</sup>。最初に認可された mAb は、腎移植拒絶の予防に使用されるムロモナブ-CD3 であった<sup>2</sup>。ムロモナブ-CD3 はマウス mAb であるため、ヒトに対して免疫原性のリスクをもたらした。その後、マウス及びヒト領域の両方を含むキメラ抗体であるリツキシマブが承認され、その治療効果の高さにより大きな成功を収めた。さらに複数のキメラ mAb が承認されたが、キメラ mAb もマウス由来の配列を含むため、免疫原性のリスクがあった。このような非ヒト由来の配列に起因する免疫原性リスクを克服するために、完全にヒトの配列を持つ mAb の開発が行われ、2004 年に関節リウマチの治療薬として初めて完全ヒト化抗体であるアダリムマブが承認された。現在、開発されているほとんどの mAb はヒト化又は完全ヒト化されている。

このような mAb の設計・製造技術の高度化に伴い、mAb の品質管理への要求も高まっている。mAb のようなバイオ医薬品中の有効成分であるタンパク質は、精製、製剤化および保存中の化学・物理的ストレスにより化学修飾を受け一次構造が変化し、変性・凝集といった高次構造変化が起こる。その結果、医薬品としての、有効性および安全性が損なわれる懸念がある<sup>3</sup>。mAb の代表的な化学修飾構造とその原因について序論末尾の表 1 に示す。最も重要な変化の一つはアミノ酸残基の側鎖の酸化であり、しばしばタンパク質の安定性および機能に多大な影響を及ぼす<sup>4,5</sup>。またその原因の中でも光は、製造中や保存中に避けることができないストレス因子である<sup>6,7</sup>。そこで、可視光（400 – 700 nm）および地表に到達する紫外線（UV : Ultraviolet）の成分である UVA（320 – 400

nm) または UVB (280–320 nm) によるタンパク質の分解や修飾に関する研究が進められてきた<sup>8–11</sup>。

一方、UV を mAb の汚染リスク低減に積極的に用いようとする考え方もある。世界中で開発が盛んな mAb であるが、製造過程でウイルスや細菌による汚染が多数報告されている<sup>12–15</sup>。これらの汚染は、製造の中止や汚染源の特定など、広範な調査が必要となり、製造業者の被害は甚大である。そこでバイオ医薬品製造業者である Genzyme 社および Sanofi Pasteur 社は、原材料の汚染リスクを低減するため、UV を外来性感染性物質の除去技術として有用であると報告している<sup>16</sup>。紫外線殺菌照射 (UVGI : Ultraviolet Germicidal Irradiation) においては、UVA または UVB よりも短波長側の高いエネルギーを有する UVC (280 nm 以下) による照射の有効性が高いことが知られている。UVC 照射は、微生物のデオキシリボ核酸 (DNA : Deoxyribonucleic Acid) を損傷することによる殺菌に用いられている<sup>17</sup>。また UVGI は医薬品製造における原材料に含まれるウイルスの不活化に有用であるという報告もなされている<sup>18,19</sup>。UVGI の利点は、化学物質の添加が不要であること、シンプルな制御方法とメンテナンスにある。また微生物やウイルスの核酸に直接影響を及ぼす UV のユニークな作用機序も、ろ過や化学的不活性化などの技術を補完する点で有用である。その結果、ろ過が容易ではなく、化学物質に耐性を有する微生物やウイルスに対する処理方法として適用が期待されている。

このように、汚染リスクの低減に有効と考えられている UVC 照射だが、一方で、タンパク質への影響も懸念されており、mAb 中のメチオニン (Met : Methionine) 残基の酸化や血清タンパク質中のジスルフィド結合の光分解などが報告されている<sup>20,21</sup>。しかし、この分野に関する参考可能な研究が不足しているため、未だ UVGI は mAb 製造工場に実装されるに至っていない。したがって、UVC 照射によるタンパク質の修飾および分解産物を同定し、各反応の機序を解明する必要がある。特に、光による影響を受けやすいイミダゾール基を持つヒスチジン (His : Histidine) は注目に値する研究対象であ

る<sup>10</sup>。mAb の Fc 領域に存在する His 残基は、抗体の機能に関与していることが報告されている<sup>22-28</sup>。これまでに光照射の研究例として、光増感剤の存在下で、UVA 照射により His がアスパラギン酸 (Asp : Aspartic acid) およびアスパラギン (Asn : Asparagine) へと光酸化された例<sup>8,9</sup>や、可視光 (400 – 700 nm) と UVA の両方の照射により、mAb 中の His 残基が光酸化された例が報告されているが<sup>10,11</sup>、UVC 照射による mAb 中の His 残基の光酸化機構や、その光酸化感受性について、報告例はほとんどない。

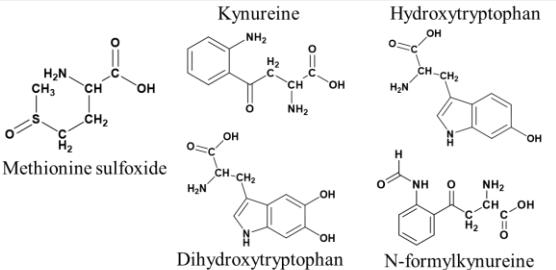
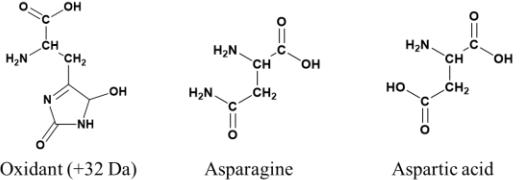
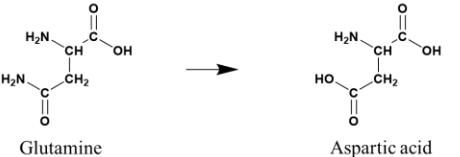
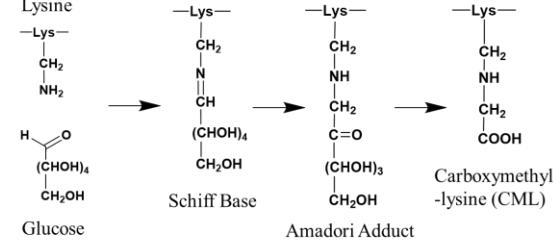
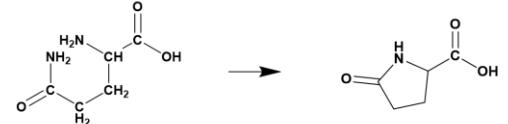
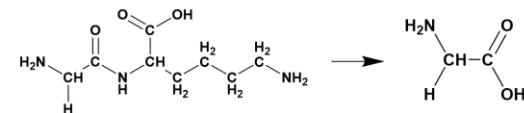
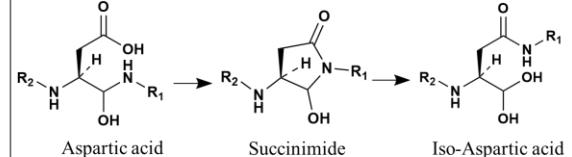
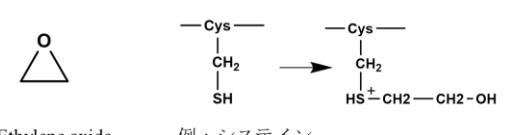
そこで本研究では、mAb の UVC 光酸化の問題に取り組むため、UVC による酸化生成物、特に His 残基由来のものを同定し、その反応機構の解明を目的とした。実験には、バイオ医薬品の特性解析及び品質試験においても広く利用されている液体クロマトグラフィー (LC : Liquid Chromatography) とタンデム質量分析 (MS/MS : Tandem Mass Spectrometry) を組み合わせた LC/MS/MS を用いた<sup>29-31</sup>。MS/MS では、特定のイオンを分離し、衝突誘起解離 (CID : Collision Induced Dissociation)、高エネルギー衝突誘起解離 (HCD : High-energy CID) などの手法により、装置内でフラグメントを生成させ質量を測定することで、より詳細な構造情報を得ることができる。さらに質量分析による構造変化を捉える手法として  $H_2^{18}O$  や  $D_2O$  を溶媒として使用する方法がある<sup>11,32</sup>。反応において、水分子から酸素もしくは水素の供与を受ける場合、それぞれ溶媒中から<sup>18</sup>O もしくは D が供給され、質量が増加するため、化学修飾部位を特定することが可能となる。この方法を利用して、UVC 照射時における His 残基の光酸化反応機構を考察した。

本論の概要を示す。第一章では、UVC による mAb の His 残基への影響を明らかにするため、UVC を照射した mAb の LC/MS/MS を実施した。その結果、His が Asp、iso-Asp および Asn に光酸化されることを特定した (第一章 第一節)。mAb において観測された UVC 照射による His 残基の光酸化についての反応機構を調べるために、モデルペプチド (アンジオテンシン II) および  $H_2^{18}O$  を使用した解析を行った (第一章 第二節)。この実験では、最終産物の Asp および Asn ならびに様々な化合物が同定された。

しかし、UVA および UVB を照射した報告例で観測された His の酸素付加体は認められなかった<sup>8,9</sup>。また溶媒である  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  からの  $^{18}\text{O}$  原子は、予想に反して、Asp にのみ取り込まれ、Asn には取り込まれなかった。これらの結果を基に、UVC による His 残基の酸化が純粋な光化学プロセスで進行することを示し、His のイミダゾール基と一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) の光誘起協奏反応を含む反応機構を考察した（第一章 第三節）。次に第二章では、mAb における His 残基の光酸化感受性に影響を与える要因を明らかとするため、各 His 残基の溶媒露出度、酸性度、イミダゾール基 C2 位の水素/重水素 (H/D) 交換の速度定数を算出した（第二章 第一節）。算出された各パラメータと His 残基の光酸化感受性を比較したところ、各 His 残基の光酸化は、 $\text{p}K_{\text{a}}$  と相関があることを見出した（第二章 第二節）。

以上の結果から、本研究では、2 種類の mAb、アダリムマブとリツキシマブの His 残基が、UVC 照射により光酸化され、他のアミノ酸へと変換することを特定した。またその反応は、一重項酸素とイミダゾール基の  $\text{C}^\gamma-\text{C}^{\delta 2}$  二重結合との光化学的 [2+2] 付加環化反応により進行することを明らかとした。さらに、mAb 中の His 残基の光酸化に対する感受性が、各 His 残基の  $\text{p}K_{\text{a}}$  に依存することを示した。本研究結果は、mAb の製造、輸送、保管中に生じるタンパク質の光酸化に関する知見を与え、今後の UV 照射による滅菌やウイルス不活性化研究を進めるための貴重な情報となることが期待される。

表1 mAbの代表的な化学修飾構造とその原因

アミノ酸	変化	反応及び変化後の構造（代表例）	主な原因
メチオニン トリプトファン システイン	酸化	 <p>Methionine sulfoxide Kynureine Dihydroxytryptophan N-formylkynureine</p>	熱 酸素 光
ヒスチジン	酸化	 <p>Oxidant (+32 Da) Asparagine Aspartic acid</p>	光
アスパラギン グルタミン	脱アミド	 <p>Glutamine Aspartic acid</p>	熱 pH 配列
リジン	糖化	 <p>Lysine Glucose Schiff Base Amadori Adduct Carboxymethyl-lysine (CML)</p>	熱
N末端グルタミン グルタミン酸	環化		熱
リジン	欠失		酵素
アスパラギン酸 システイン	異性化	 <p>Aspartic acid Succinimide Iso-Aspartic acid</p>	熱 pH
アミノ酸側鎖	側鎖付加	 <p>Ethylene oxide 例：システイン</p>	EO滅菌

### メチオニン、トリプトファン、システイン、ヒスチジンの酸化

メチオニン、トリプトファン、システインやヒスチジンは、精製から保存の過程で酸化され、特にメチオニンの酸化は、mAb の劣化の指標として解析の対象にされることが多い。IgG の場合、Fc 部分のメチオニンは酸化されやすく、安定性の低下や体内動態の変化が生じる<sup>33</sup>。酸化には溶存酸素が関与する反応経路が知られており、溶存酸素量の低減による抑制が可能である<sup>34</sup>。ヒスチジンの酸化は光ストレスにより引き起こされやすく<sup>11</sup>、有効性・安全性に影響を及ぼすと報告されている<sup>22</sup>。

### アスパラギンとグルタミンの脱アミド化

アスパラギンは、スクシンイミド中間体を経て、脱アミド化し、アスパラギン酸もしくはイソアスパラギン酸に変化する。グルタミンも同様の機構により脱アミド化を起こすが、反応速度はアスパラギンと比べ 1/10 程度である。脱アミド化部位が CDR (Complementarity Determining Region) に含まれている場合には、抗体の機能に大きな影響を与える。アスパラギン-グリシンのような特定配列中のアスパラギンは脱アミド化しやすい。脱アミド化による質量変化はわずか 1 Da の増加であるため、検出には精密質量を高分解能で測定可能な質量分析装置が必要となる。

### リジンの糖化

リジンの側鎖が還元末端を持つ糖によって不可逆的に修飾されると、終末糖化産物 (AGEs: Advanced Glycation End products) が生成される。AGEs 修飾タンパク質と AGE 受容体の結合により種々の細胞応答が生じ、糖尿病性血管合併症をはじめとする様々な疾患を引き起こす可能性がある<sup>35</sup>。ショ糖は還元末端を有さないが、37°C ではゆっくりと加水分解しタンパク質と反応し AGEs を生じることがある。

### N 末端グルタミンまたはグルタミン酸の環化

重鎖または軽鎖の N 末端は、グルタミンもしくはグルタミン酸残基が環化したピログルタミン酸であることが多い。安全性には影響なく、一般に重要品質特性 (CQA: Critical Quality Attribute) には含まれていない。

### 重鎖 C 末端リジンの欠失

重鎖 C 末端のリジンは、カルボキシペプチダーゼにより切断されている場合がある。これは天然の IgG でも生じる欠失であり、その機能は明らかでない部分が多く、現時点では CQA に含まれていないが、最近では補体活性化において重要な役割を果たすという報告もある<sup>36</sup>。

### ジスルフィド結合のスクランブリング

システイン残基間で形成されるジスルフィド結合は、ドメインの高次構造の安定化やドメイン間相互作用の向上に寄与する。ただし、適切にジスルフィド結合が形成されていない場合や、近接して存在するシステイン同士が不適切なジスルフィド結合を形成している場合があり、結果、活性や安定性の低下へつながる。

### アスパラギン酸、システインの異性化

アスパラギン酸は、スクシンイミド中間体を経て、イソアスパラギン酸へと変化する。この異性化反応では pH および隣接するアミノ酸残基が反応速度に大きな影響を与える。また Amano らは、IgG1 のヒンジ領域のシステインが異

性化することを質量分析により報告している<sup>32</sup>。これら異性化は、構造の不均一性や有効性に影響を与えるとされ ており、トラスツズマブにおいて、アスパラギン酸の異性化により、有効性が 70% 低下したという報告もある<sup>37</sup>。

#### アミノ酸側鎖への添加剤の付加

近年の研究により、シリンジの滅菌法による違いが、保存中の生物学的製剤の凝集や分解に影響を与えることが示唆されている。シリンジは通常、放射線、蒸気、エチレンオキサイドガス (EO : Ethylene Oxide) にて滅菌されるが、EO は、アミノ酸残基と付加体を形成し、分解を引き起こす可能性がある。蒸気滅菌したシリンジ製剤と比較して、EO 滅菌したシリンジ製剤では、約 45% の EO 付加したアミノ酸残基が確認されており、EO 滅菌の代替法の開発が望まれている<sup>8</sup>。

# 本論

## 第一章 UVC 照射による抗体医薬品およびモデルペプチド（アンジオテンシン II）の光酸化機構

本章では、UVC 照射による mAb への影響を評価するため、UVC を照射した mAb のペプチドマッピングを実施し、His が Asp、iso-Asp および Asn に変換されることを特定した。次に、この反応機構を調べるために、モデルペプチドとして、アンジオテンシン II および  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  を使用した解析を行った。アンジオテンシン II は、MS の校正試薬としても使用され、配列に His 残基を一つ含む一般的なペプチドであることから選択した。この実験では、Asp および Asn ならびに様々な化合物が同定されたが、UVA および UVB を照射した報告例で観測された His の酸素付加体は認められなかった。また溶媒である  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  からの  $^{18}\text{O}$  原子は、Asp にのみ取り込まれ、Asn には取り込まれなかった。これらの結果を基に、His 残基の酸化が純粋な光化学プロセスで進行することを示し、His のイミダゾール基と一重項酸素の光誘起協奏反応を含む反応機構を考察した。

### 第一節 UVC 照射による抗体医薬品の光酸化

mAb への UVC 照射を行うための光源として、共同研究先であるパナソニック株式会社で開発された PDUVL (Planar Deep Ultraviolet Light Source) を用いた。PDUVL の発光スペクトルは 237 nm にピークを有し、広範囲の UVC 波長 (図 1) を持つ。この UVC を 2 種類の mAb (アダリムマブおよびリツキシマブ) に照射した後、個々の His 残基の酸化生成物をペプチドマッピングにより分析した。光酸化の時間経過をトリプシン消化物のベースピークイオンクロマトグラムの測定によりモニターした (図 2)。図 3 に図 2 のクロマトグラムの拡大図を示す。UVC 照射前のクロマトグラム (図 3a) では  $m/z$  938.4656 ( $z=2$ ) のベースイオンピークが観測され、保持時間 33.0 分に溶出したペプチドを示している。このペプチドは、MS/MS 分析の結果、アミノ酸配列 VYAC<sub>(CAM)</sub>

EVTHHQGLSSPVTK (モノアイソトピック質量として 1874.92 Da、C<sub>(CAM)</sub> は S-Carboxamidomethylcysteine を示す) のアダリムマブおよびリツキシマブの残基 191–207 と同定された (表 3 および図 7)。UVC を 30 分間照射した mAb のトリプシン消化物から、このペプチド由来と考えられる、保持時間 35.3 分、36.3 分および 37.4 分に溶出した、少なくとも 3 つのペプチドが得られた (図 3b)。

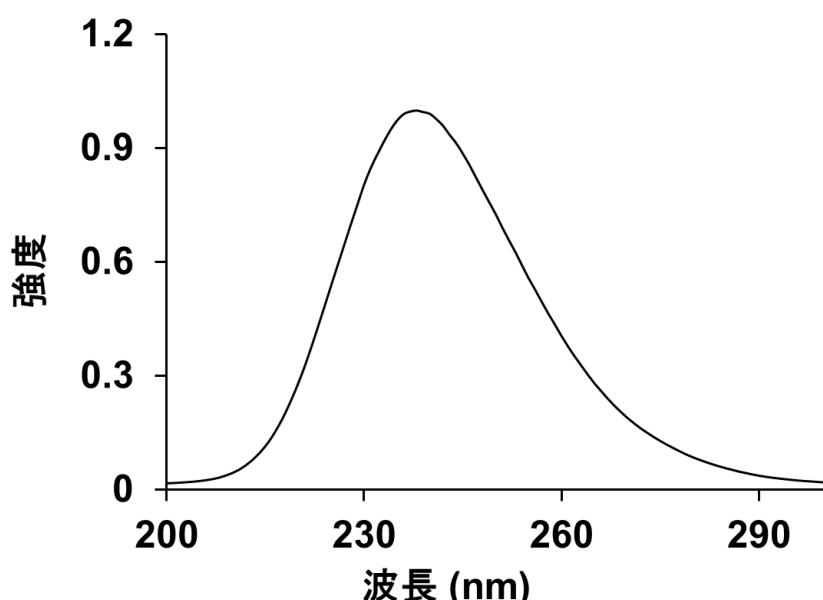


図 1 UVC 光源 PDUVL の発光スペクトル。

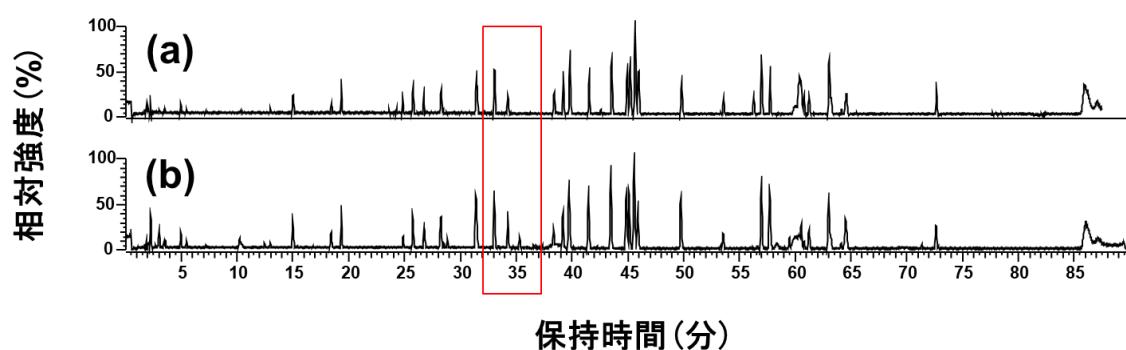


図 2 アダリムマブのトリプシン消化物のベースピークイオンクロマトグラム。

(a) UVC 未照射、(b) UVC 照射 30 分。保持時間 32–38 分の赤色の枠で囲まれた範囲の拡大クロマトグラムを図 3 に示す。

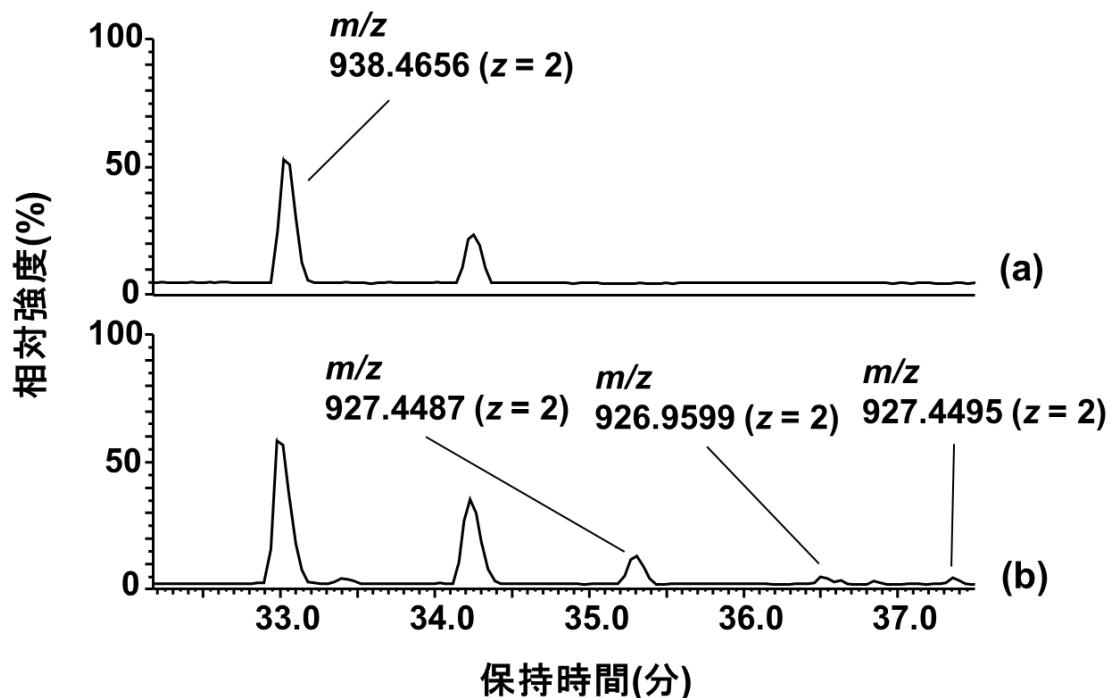


図 3 UVC 未照射 (a) および UVC30 分間照射後 (b) の S-CAM-アダリムマブのトリプシン消化物のベースピークイオンクロマトグラム。保持時間 32-38 分の範囲を示す。保持時間 34.2 分に溶出したペプチドは SLSLSPG であり、アダリムマブ重鎖の C 末端ペプチドに相当する 659.35 Da の質量であった (図 5、表 3)。

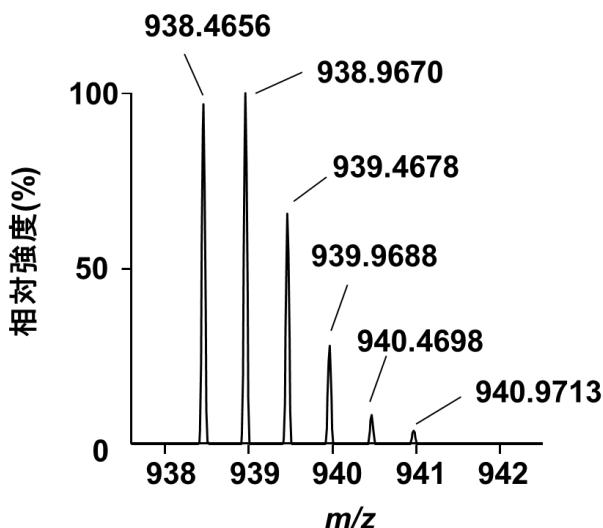


図 4 図 3a の保持時間 33.0 分に観測されたペプチドの MS スペクトル。最も強度の高い同位体ピークは  $m/z$  938.9670、モノアイソトピックピークは、 $m/z$  938.4656 であった。

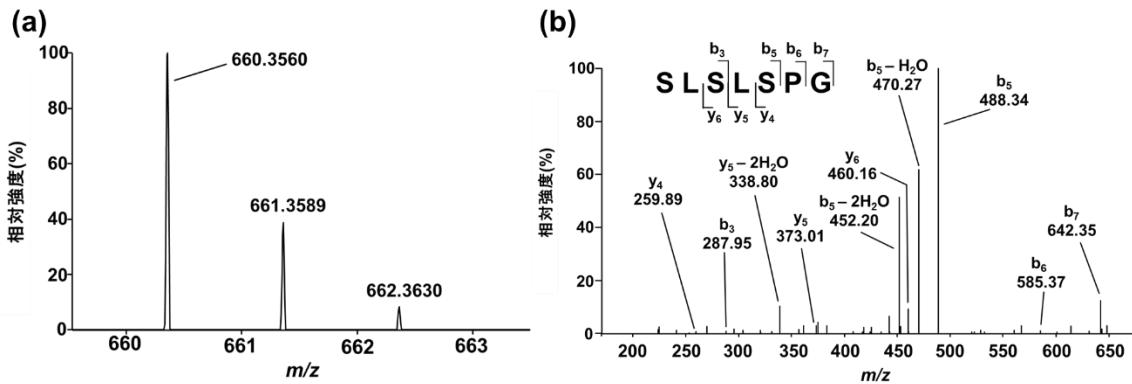


図 5 (a) 図 3a の保持時間 34.2 分に溶出したペプチドの MS スペクトル。(b) (a) のプリカーサーイオン  $m/z$  660.3560 の MS/MS スペクトル。

保持時間 35.3 分および 37.4 分に溶出したペプチドから得られた MS スペクトル中の  $m/z$  の値はそれぞれ 927.4487 および 927.4495 で、ほぼ同一であった。これらの値と His 残基を含むペプチドの  $m/z$  値 938.4656 との差は、His の分子量から Asp の分子量を引いた差に相当していた。このことから、これらのペプチドは His 残基由来の酸化生成物として Asp を含む可能性が示された。さらに各ベースイオンピークの MS/MS 分析の結果 (MS/MS スペクトルを図 6b、6d に示す)、フラグメントトイオンの  $y_9$  イオン ( $m/z$  916.6) と  $y_{10}$  イオン ( $m/z$  1031.6) との質量差はどちらのペプチドにおいても 115.0 Da であった。これは Asp の残基質量 (115.027, monoisotopic mass) に相当する。ここで、両ペプチドの溶出時間は異なるため、実際には一方のペプチドでは Asp の異性体である iso-Asp が生じていると示唆された。iso-Asp は Asp に比べて N 末端側の  $b$  イオンまたは  $y$  イオンの強度が高くなるとの報告例があることから<sup>38</sup>、MS/MS スペクトルのフラグメントーションパターンの違いに注目した。図 6b に示すように、Asp の N 末端側のフラグメントーションを示す  $y_{10}$  イオンは、C 末端側の開裂から生じる  $y_9$  イオンよりも明らかにピーク強度が高いが、この関係は図 6d に示す MS/MS スペクトルではそれほど顕著ではなかった。これらの結果は、保持時間 35.3 分および 37.4 分で溶出したペプチド

が、それぞれ iso - Asp および Asp を含むことを示唆した。保持時間 36.3 分で溶出したペプチドは  $m/z$  926.9599 ( $z=2$ ) にベースイオンピークを示した。 $y_{10}$  イオンピークである図 6b の  $m/z$  1031.59 および図 6c の  $m/z$  1030.76 において、約 1 Da の差が確認されたことから、残基 198 を Asn (残基質量 114.043, monoisotopic mass) として同定した。ほとんどすべての His 残基が光酸化の影響を受け、Asp (または iso-Asp) および Asn を様々な割合で生成したが、これらの生成物のいずれに対しても特記すべき優先性は認められなかった (表 2)。His189 は、ペプチド HKVYACEVTHQGLSSPVTK (残基 189-207)、つまり VYACEVTHQGLSSPVTK (残基 191-207) の前駆体としてのみ存在したが、トータルイオンクロマトグラムの最大ピーク強度と比較して、カットオフ値である 0.3% を超える強度でペプチドのピークが検出されなかつたため、光酸化感受性の指標として、本実験において新たに定義した分解率 (Dr : Degradation ration) を定量することは困難であった。

His の酸化生成物としては、医薬品規制調和国際会議 (ICH : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) のガイドライン (Q1B 新原薬及び新製剤の光安定性試験ガイドライン) に準拠した D65 ランプなどの曝露下において、オキソヒスチジンおよび 1, 2-ジオキソランや  $\gamma$ -ヒドロキシヒダントイインを含む [4+2] 付加環化生成物 (構造については図 14 を参照) が予測されていた<sup>11</sup>。また、これまでの光酸化による反応機構としては、過酸化物や光増感剤の存在下における UVA (もしくは UVB) 照射により生成するラジカル種を含むものが提唱され、His の酸素付加体に由来する複雑な生成物が想定されている<sup>39-42</sup>。しかし、UVC ランプを用いた本実験では、このような予測された生成物ピークは全く検出されなかつた。このことは UVC 照射により誘導される光酸化が、従来の反応機構では説明できない異なる様式で進行する可能性を示唆した。

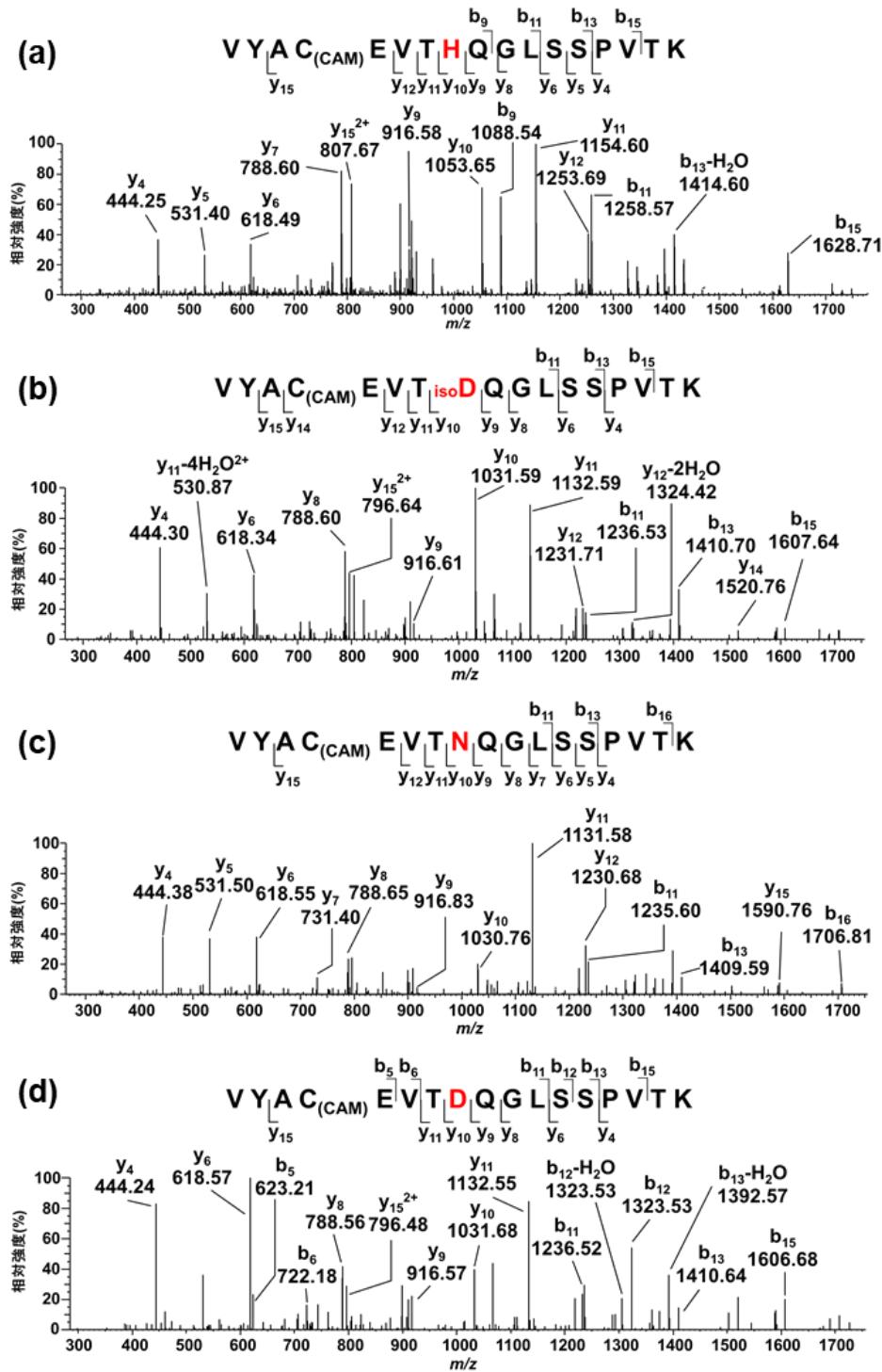


図 6 残基 191-207 に対応するペプチド VYAC<sub>(CAM)</sub>EVTHQGLSSPVTK の MS/MS スペクトル。個々のプリカーサーイオンの  $m/z$  値は図 3 中のピーク上に示す。(a) X = His198、保持時間 33.0 分、(b) X = iso-Asp、保持時間 35.3 分、(c) X = Asn、保持時間 36.3 分、(d) X = Asp、保持時間 37.4 分。

表2 30分間のUVC照射後のmAb中の各His残基のDr。

His-Peptide						Product Peptide <sup>c</sup>						$\Delta M_{H/X}/Da^d$	$Product\ (N/D)$	$Dr^e\ (%)$
Retention time (min)	Base peak $m/z^a$	Monoisotopic mass (Da)	$M_H/Da$ (calculated)	Peptide <sup>b</sup>	Residue No. of His	Retention time (min)	Base peak $m/z^a$	Monoisotopic mass (Da)	$M_X/Da$ (calculated)					
58.4	834.4145	3333.6267	3333.6348	S223-K252 (ADL, HC)	228	60.7	828.6597	3310.6075	3310.6189	23.0192 (N)	N.D. <sup>f</sup>			
60.3	948.8233	2843.4464	2843.4502	T227-K252 (RTX, HC)	228	63.7	941.1498	2820.4259	2820.4343	23.0205 (N)	N.D. <sup>f</sup>			
45.5	1070.0154	2138.0151	2138.0201	T260-K278 (ADL, HC)	272	47.0	1058.5073	2114.9989	2115.0041	23.0162 (N)	1.4			
45.6	1070.0151	2138.0145	2138.0201	T260-K278 (RTX, HC)	272	47.6	1058.9989	2115.9821	2115.9882	22.0330 (D)	3.0			
45.1	839.4034	1676.7911	1676.7947	F279-K292 (ADL, HC)	289	49.0	827.8950	1653.7743	1653.7787	23.0168 (N)	3.6			
45.1	839.4033	1676.7909	1676.7947	F279-K292 (RTX, HC)	289	50.0	828.3879	1654.7601	1654.7627	22.0310 (D)	2.6			
59.5	743.4067	2227.1966	2227.2001	V306-K324 (ADL, HC)	314	65.4	736.0624	2205.1637	2205.1681	22.0329 (D)	N.D. <sup>f</sup>			
62.9	904.5079	1807.0001	1806.9993	V306-K321 (RTX, HC)	314	69.4	892.9980	1783.9803	1783.9857	23.0198 (N)	4.5			
43.4	701.0718	2800.2559	2800.2598	W421-K443 <sup>e</sup> (ADL, HC)	437 <sup>e</sup> 439 <sup>e</sup>	46.1	695.5640	2778.2239	2778.2279	22.0320 (D)	1.7			
43.4	701.0718	2800.2559	2800.2598	W421-K443 <sup>e</sup> (RTX, HC)	437 <sup>e</sup>	46.9	695.3173	2777.2379	2777.2439	23.0180 (N)	1.3			
43.4	701.0718	2800.2559	2800.2598	W421-K443 <sup>e</sup> (RTX, HC)	437 <sup>e</sup>	47.9	695.5638	2778.2247	2778.2279	22.0312 (D)	2.3			
43.4	701.0718	2800.2559	2800.2598	W421-K443 <sup>e</sup> (RTX, HC)	439 <sup>e</sup>	46.9	695.5634	2778.2223	2778.2279	22.0336 (D)	2.7			
28.2	714.3649	2140.0712	2140.0735	H189-K207 <sup>f</sup> (ADL, LC)	189 198	46.1	695.3176	2777.2391	2777.2439	23.0168 (N)	1.7			
33.0	938.4656	1874.9155	1874.9196	V191-K207 (ADL, LC)	198	47.9	695.5635	2778.2227	2778.2279	22.0332 (D)	1.6			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	48.5	695.3171	2777.2371	2777.2427	23.0188 (N)	N.D. <sup>f</sup>			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	32.6	706.6918	2117.0519	2117.0575	23.0193 (N)	N.D. <sup>f</sup>			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	31.2	706.6920	2117.0525	2117.0575	23.0187 (N)	N.D. <sup>f</sup>			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	32.6	707.0186	2118.0323	2118.0416	22.0389 (D)	N.D. <sup>f</sup>			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	36.3	926.9572	1851.9041	1851.9037	23.0114 (N)	4.0			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	35.3	927.4487	1852.8821	1852.8877	22.0334 (isoD)	4.9 <sup>h</sup>			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	37.4	927.4495	1852.8833	1852.8877	22.0322 (D)				
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	36.3	926.9579	1851.9001	1851.9037	23.0172 (N)	4.4			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	35.3	927.4493	1852.8839	1852.8877	22.0334 (isoD)	8.2 <sup>h</sup>			
33.0	938.4665	1874.9173	1874.9196	V190-K206 (RTX, LC)	197	37.4	927.4498	1852.8829	1852.8877	22.0344 (D)				

<sup>a</sup>  $m/z$  の質量精度として $\pm 10\ ppm$  でピークを抽出し、MSクロマトグラムからDrを求めた。<sup>b</sup> 重鎖 (HC: Heavy chain) および軽鎖 (LC: Light chain) を有するアダリムマブ (ADL: adalimumab) およびリツキシマブ (RTX: rituximab) の全アミノ酸配列を表3に示す。

<sup>c</sup> His を含むペプチドから、23 Da、22 Da 減少したペプチドを、それぞれ Asn、Asp を含むペプチドとした。

<sup>d</sup> His から Asp または Asn への酸化に関連するペプチドの分子量の違い  $M_H - M_X$  ( $X = D$  または  $N$ )。

<sup>e</sup> ペプチド W421 - K443 には 3 つの His 残基が存在する。それらの  $Dr$  を個々に計算した。

<sup>f</sup> N.D.:未決定。ピーク強度が非常に低いため、 $Dr$  を定量することは困難であった。

<sup>g</sup> ある His 残基から生じるすべてのピークの合計面積に対する Asn または Asp のピーク面積の比を  $Dr$  とした。

<sup>h</sup> アスパラギン酸の異性体を含めて算出した。(例えば、Asp または iso-Asp)。

表3 アダリムマブとリツキシマブのアミノ酸配列。

Adalimumab	Heavy chain	EVOLVESGGG LVQPGRLRL SCAASGFTFD DYAMHWRQQA PGKGLEWVSA ITWNNSGHIDY ADSVEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAKVS YLSTASSLDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSSFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
	Light chain	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDVATYYCQR YNRAPYTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
Rituximab	Heavy chain	QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYNMHWRVKQT PGRGLEWIGA IYPGNGDTSY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARST YYGGDWYFNV WGAGTTVTVS AASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHP SNTKVDKKAЕ PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSSFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
	Light chain	QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS YIHWFQQKPG SSPKPWIYAT SNLASGPVPR FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW TSNPPTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLNNFY REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSLTTL SKADYEKHK VYACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

His 残基を太字の赤色で示した。本研究で同定された His 残基を含むペプチドのアミノ酸配列は、黄色 (アダリムマブ) およびオレンジ色 (リツキシマブ) でハイライトした。

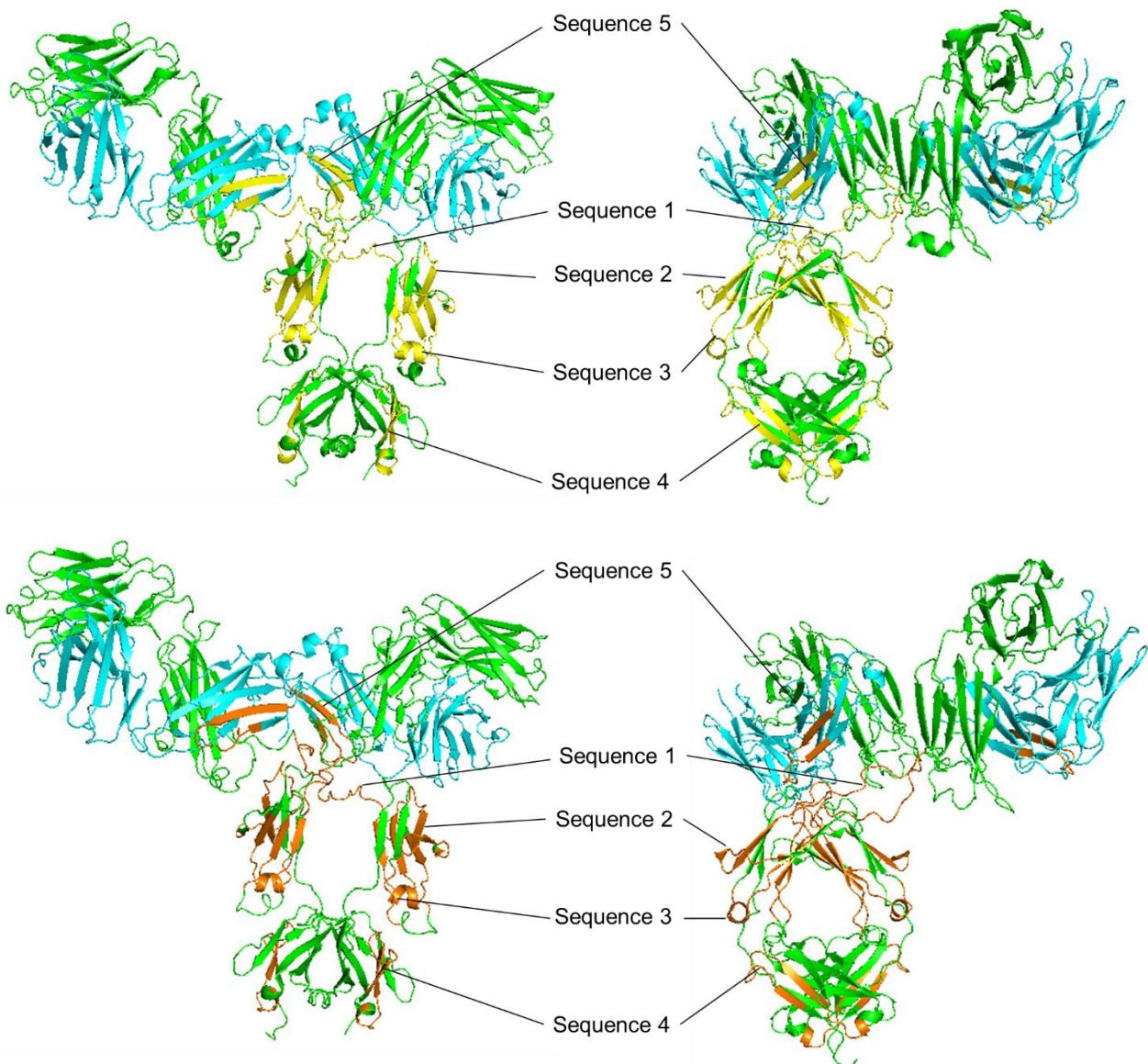


図 7 Human IgG (PDB ID : 1HZH) の結晶構造によるアダリムマブおよびリツキシマブのモデル構造 (上図 : アダリムマブ、下図 : リツキシマブ)。

H鎖を緑色、L鎖を青色、表3に記載したように本研究で同定されたHis残基を含むペプチドのアミノ酸配列を黄色(アダリムマブ)およびオレンジ色(リツキシマブ)で示した。

Sequence 1: SCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPK、(リツキシマブでは THTCPPCPAPELLGGPSVFLPPK)

Sequence 2: TPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAK

Sequence 3: VVSVLTVLHQDWLNGKEYK、(リツキシマブでは VVSVLTVLHQDWLNGK)

Sequence 4: WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK

Sequence 5: HKVYACEVTHQGLSSPVTK、(リツキシマブでは VYACEVTHQGLSSPVTK)

## 第二節 UVC 照射によるモデルペプチド（アンジオテンシン II）中のヒスチジン残基の光酸化

第一節にて観測された His の光酸化の反応機構を解明するために、 $\text{H}_2^{16}\text{O}$  あるいは  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  に溶解したモデルペプチド（アンジオテンシン II）に UVC を 60 分間照射した（図 7）。保持時間 8.2 分に溶出したピークは  $m/z$  523.7855 ( $z = 2$ ) のベースイオンピークを示し、これは DRVYIHPF 配列を有するアンジオテンシン II (1045.5345 Da) の分子量と一致していた（図 8a）。酸化生成物のフラグメントイオン解析のための基準として、このピークから MS/MS スペクトルを取得した（図 8b）。

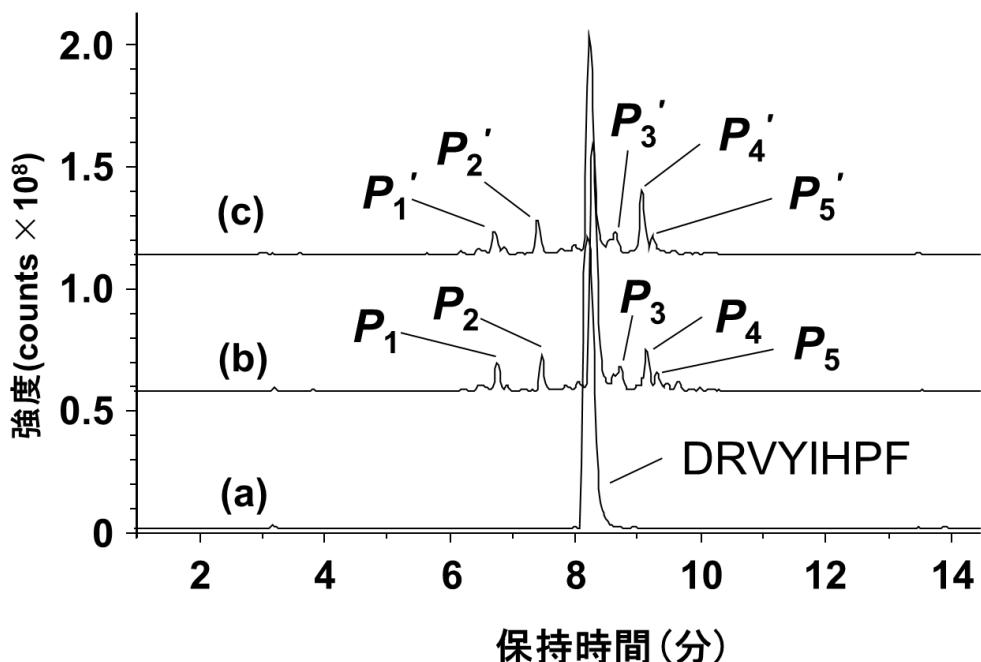


図 7 アンジオテンシン II [DRVYIHPF ; 保持時間 8.2 分、 $m/z$  523.7855 ( $z = 2$ ) ] のベースイオンピーククロマトグラム (a) と  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  (b) および  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (c) 中で UVC を 60 分間照射した後のアンジオテンシン II の酸化生成物のベースイオンピーククロマトグラム。各ピークの保持時間と  $m/z$  の値を以下に示す。 $P_1, P_1'$  : 6.7 分、 $m/z$  379.7197 ( $z = 2$ ) ;  $P_2, P_2'$  : 7.5 分、 $m/z$  263.1391 ( $z = 1$ ) ;  $P_3, P_3'$  : 8.7 分、 $m/z$  501.7804 ( $z = 2$ ) ;  $P_4, P_4'$  : 9.1 分、 $m/z$  512.2673 ( $z = 2$ ) ;  $P_5, P_5'$  : 9.3 分、 $m/z$  512.7595 ( $z = 2$ )、 $P_5$  ( $z = 2$ )、 $P_5'$  ( $z = 2$ )。

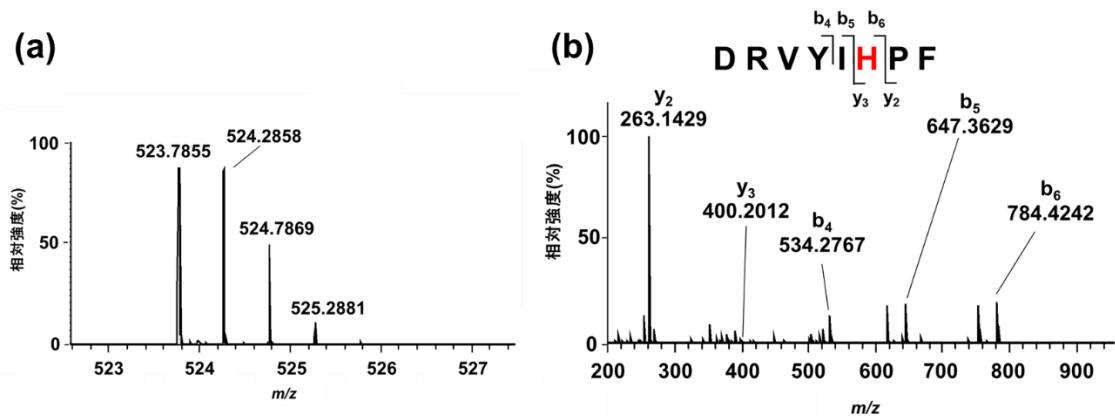


図 8 (a) 図 7a の保持時間 8.2 分に溶出したペプチドの MS スペクトル。 (b) (a) のプリカーサーイオン  $m/z$  523.7855 の MS/MS スペクトル。

図 7a、b に示すように、光酸化生成物のベースイオンピーククロマトグラムにおいて、保持時間 6.7 分 ( $P_1$ )、7.5 分 ( $P_2$ )、8.7 分 ( $P_3$ )、9.1 分 ( $P_4$ )、9.3 分 ( $P_5$ ) にペプチドのピークが観測された。 $m/z$  512.27 ( $P_4$ ) および  $m/z$  512.76 ( $P_5$ ) のベースイオンピークは、Asn ( $P_4$ ) および Asp ( $P_5$ ) を含むペプチドの指標である (図 10a および図 9c)。それぞれの実測のペプチド溶出順序は、配列特異的な保持時間計算ソフトによる予測の溶出順序と一致していた<sup>43-45</sup>。 $P_4$  と  $P_4'$  の質量は  $H_2^{16}O$  および  $H_2^{18}O$  中での反応に関係なく同一 (1022.5 Da) であり、 $H_2^{18}O$  の  $^{18}O$  原子が Asn に取込まれないことを示した (図 9a、b、図 10a、b)。対照的に、 $H_2^{18}O$  中で得られた  $P_5'$  (1025.5 Da) の質量は  $H_2^{16}O$  中で得られた  $P_5$  (1023.5 Da) の質量より 2 Da 重く、 $^{18}O$  原子が一つ Asp (図 9c、e) に取り込まれたことを示した。

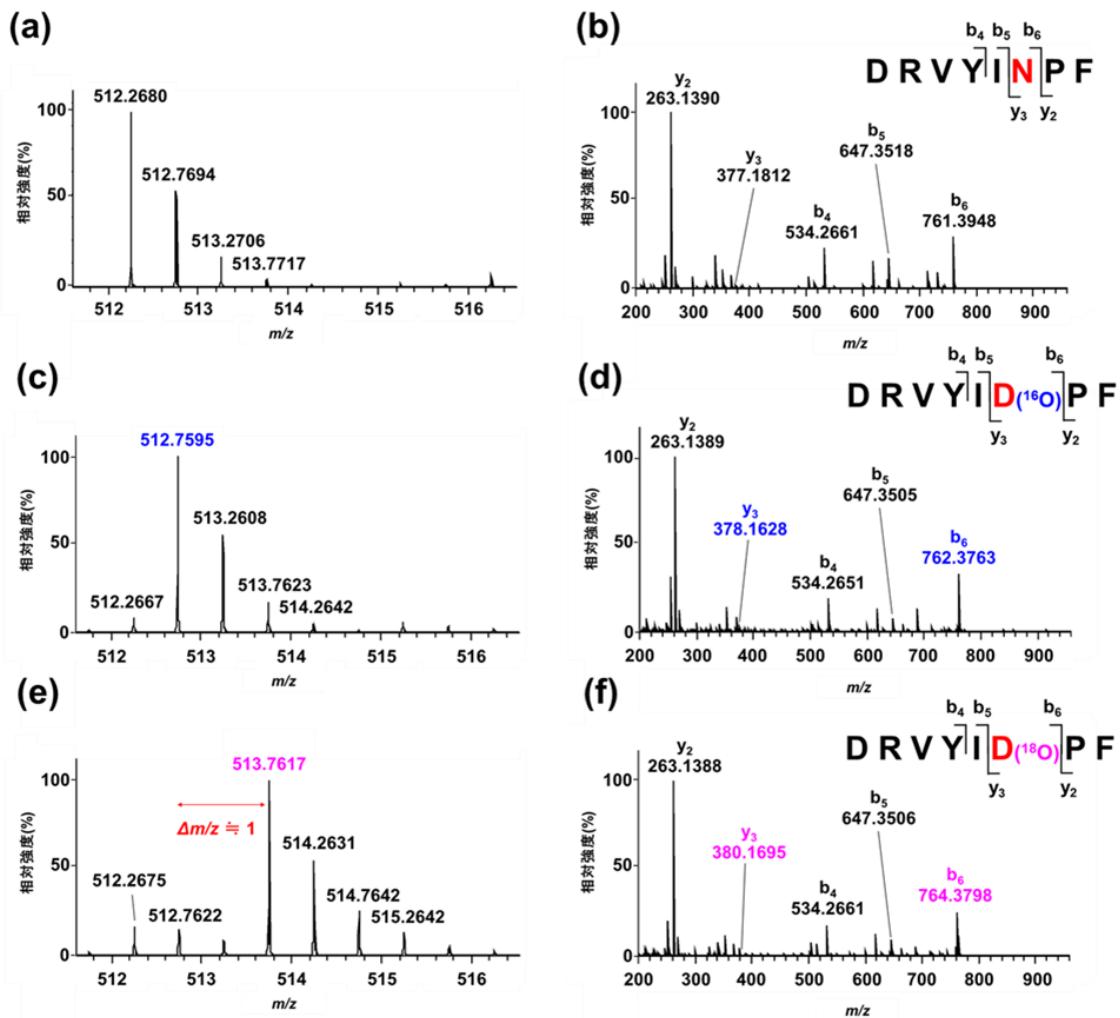


図 9 (a) 図 7c の保持時間 9.1 分の光酸化生成物  $P_4'$  の MS スペクトル。 (b) スペクトル (a) のプリカーサーイオン  $m/z$  512.2680 の MS/MS スペクトル。 (c) 図 7b の保持時間 9.3 分の光酸化生成物  $P_5$  の MS スペクトル。 (d) スペクトル (c) のプリカーサーイオン  $m/z$  512.7595 の MS/MS スペクトル。 (e) 図 7c の保持時間 9.3 分の光酸化生成物  $P_5'$  の MS スペクトル。 (f) スペクトル (c) のプリカーサーイオン  $m/z$  513.7617 の MS/MS スペクトル。すべてのスペクトルは  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  (c, d) および  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (a, b, e, f) 中で 60 分間 UVC を照射した後のアンジオテンシン II 溶液から取得した。

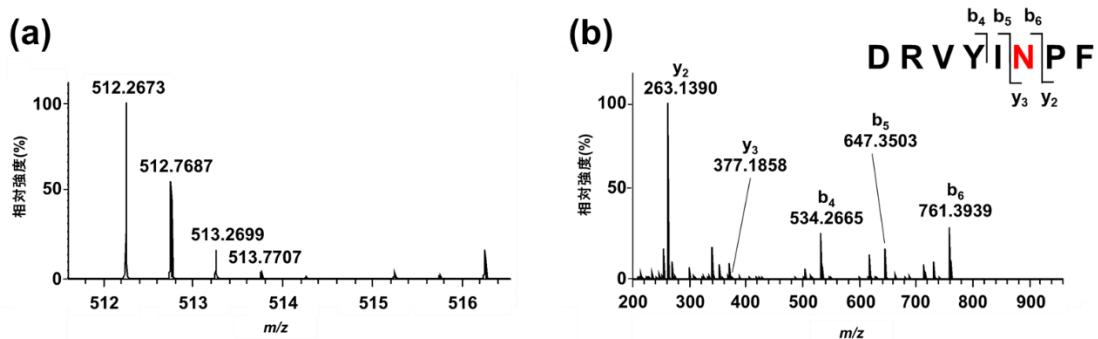


図 10 (a) 図 7b の保持時間 9.1 分の光酸化生成物  $P_4$  の MS スペクトル。 (b) スペクトル (a) のプリカーサーイオン  $m/z$  512.2673 の MS/MS スペクトル。 UVC を 60 分間照射したアンジオテンシン II の  $H_2^{16}O$  溶液において観測された  $P_4$  のピークから得られたスペクトルである。MS スペクトル (a) と MS/MS スペクトル (b) は、 $H_2^{18}O$  溶液において観測された  $P_4'$  のピークから得られたスペクトル (それぞれ図 9a と図 9b) と区別できなかった。

$P_5$  と  $P_5'$  の MS/MS スペクトルを比較すると、 $P_5$  で認められた  $b_6$  イオンピークの  $m/z$  762.3763 および  $y_3$  イオンピークの  $m/z$  378.1628 は、 $P_5'$  ではそれぞれ  $m/z$  764.3798 および  $m/z$  380.1695 にそれぞれ 2 Da 増加してシフトしていた。一方、 $P_5$  の  $b_5$  イオンピーク  $m/z$  647.3505 および  $y_2$  イオンピーク  $m/z$  263.1389 は、 $P_5'$  の  $b_5$  イオンピークおよび  $y_2$  イオンピークとほとんど変わらなかった。 $P_5$  および  $P_5'$  の MS/MS スペクトルで観測されたこれらのフラグメントピークは、 $H_2^{18}O$  から供給された  $^{18}O$  が Asp の  $\beta$ -カルボキシル基に取り込まれることを明確に示した。

またその他の生成物として、 $P_1$  は保持時間 6.7 分に溶出し、 $P_2$  は保持時間 7.5 分に溶出が確認された(図 7)。 $m/z$  379.7197 のベースイオンピーク( $z = 2$ )およびそのフラグメントイオンピーク(図 11)から、 $P_1$  は DRVYIN-イミド(質量 760.39 Da、構造は図 16a を参照)と同定した。生成物  $P_2$  のピークは  $m/z$  263.1391( $[M+H]^+$ )として検出され、262.14 Da の質量に対応し、ジペプチド PF(図 12)として同定した。このペプチドは、プロリン(P)残基の N 末端側のペプチド結合が切断されることにより、 $P_4$  または  $P_5$  から明らかに誘導される。保持時間 8.7

分に溶出したマイナーピーク  $P_3$  は  $m/z$  501.7804 ( $z = 2$ ) のベースイオンピークを示した。しかしながら、 $P_3$  のピーク強度は、このペプチドの化学構造を決定付けるのに必要な MS/MS スペクトルを得るのに十分ではなかった(図 13)。

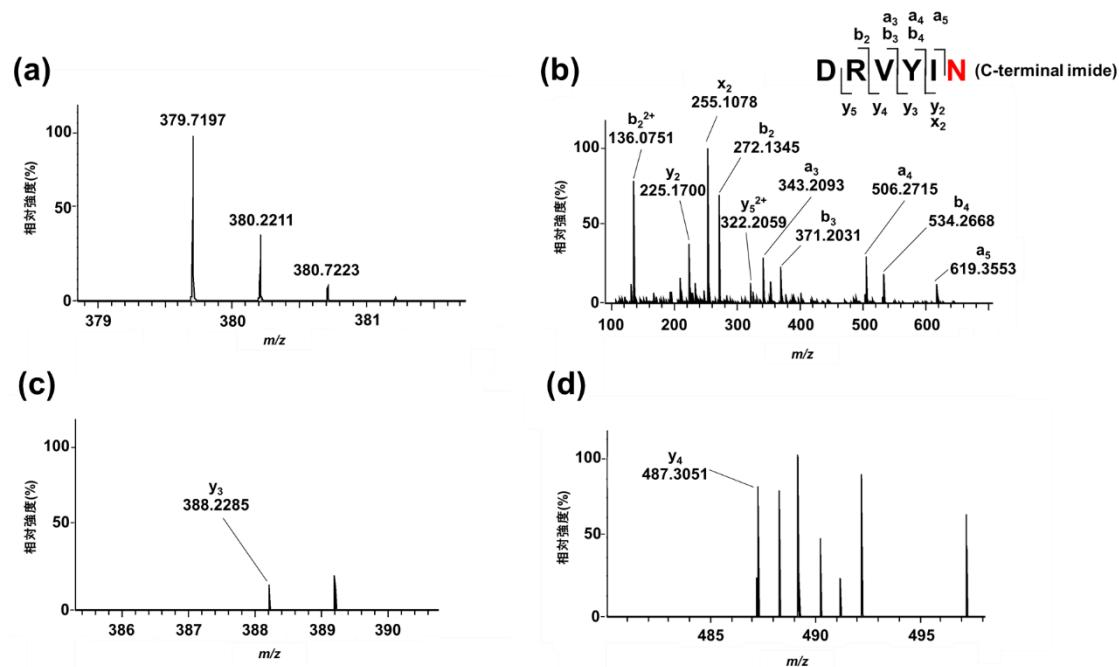


図 11 (a) 図 7b の保持時間 6.7 分の光酸化生成物  $P_1$  の MS スペクトル。(b) スペクトル (a) のプリカーサーイオン  $m/z$  379.7197 の MS/MS スペクトル。スペクトル (b) の  $m/z$  386–390 の拡大図 (c) と  $m/z$  485–495 の拡大図 (d)。この生成物を質量 760.39 Da の DRVYIN-イミドとして同定した。この生成物の構造および生成機構については図 16 に示した。

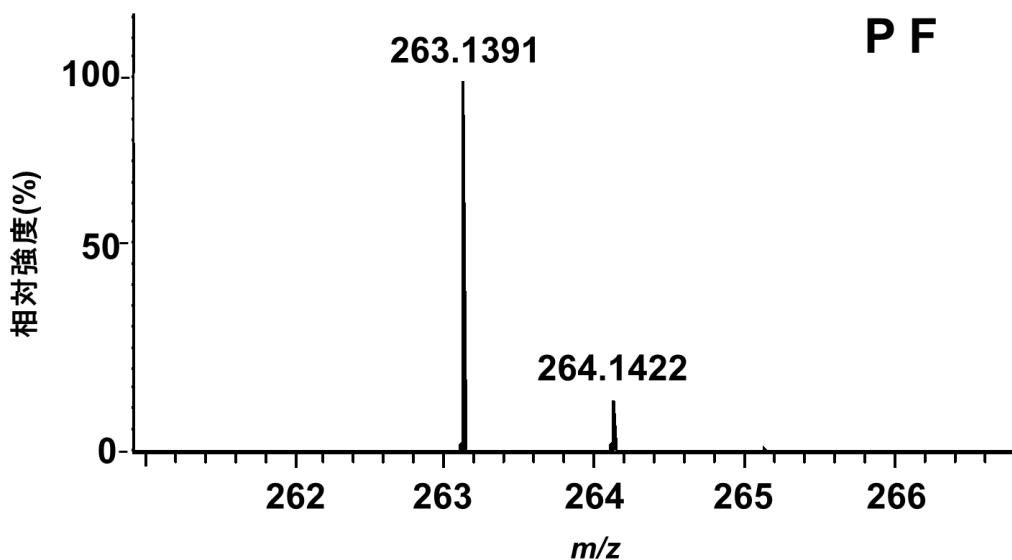


図 12 図 7b の保持時間 7.5 分の光酸化生成物  $P_2$  の MS スペクトル。この生成物をアンジオテンシン II の C 末端側のジペプチド PF (質量 262.14 Da) として同定した。このペプチドの形成機構については図 16 に示した。

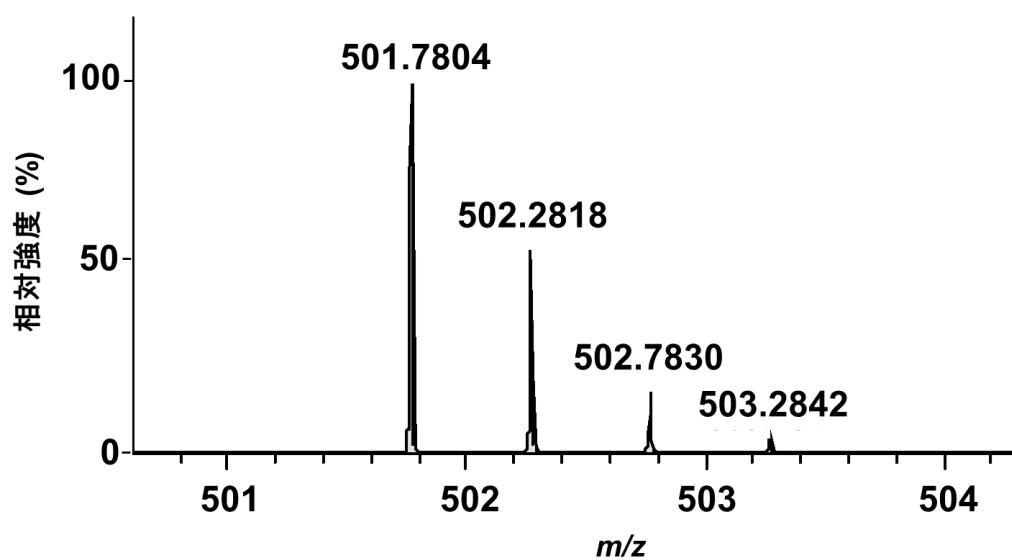


図 13 図 7b の保持時間 8.7 分の光酸化生成物  $P_3$  の MS スペクトル。

### 第三節 ヒスチジン残基の光酸化機構

光増感剤の存在下での His の光酸化の機構は、約半世紀にわたって調べられてきた<sup>8,9,39,40</sup>。それらの機構では、多くの場合、UVA または UVB による照射に起因する一重項酸素の形成と、それに続くラジカル種によるヒドロペルオキシドの生成が想定されている<sup>41,42</sup>。一般に His を含む芳香族アミノ酸のヒドロペルオキシドは不安定であり、さらにカルボン酸誘導体等へと分解していく。これらの過程は温度や pH などの反応条件にも依存し、多様性があると考えられる。His の場合も複数の反応経路を経て、Asp および Asn を含む複雑な混合物が生成すると予想されていた<sup>39</sup>。しかし、本研究では光子エネルギーが高い UVC を用いたにもかかわらず、His の光酸化生成物は Asp および Asn のみに限定されていた（表 2）。

Asp および Asn を選択的に生成する反応機構としては、Diels-Alder 反応様式に基づく His への  ${}^1\text{O}_2$  の対称許容な熱的 [4+2] 付加環化が提案されている<sup>5,8,9,39,46</sup>。この機構においては、エンドペルオキシドが生成した後、ヒダントイン構造を持つ中間体が形成され、それが開裂することにより Asp と Asn が誘導される（図 14）。しかし、中間体の形成機構や、Asn の生成に必要な C $\gamma$ -C $\delta^2$  結合の開裂の機構が不明確である。また、この機構が  $\text{H}_2{}^{18}\text{O}$  中で進行した場合、 ${}^{18}\text{O}$  原子が Asp/Asn の双方に取り込まれる。したがって、本研究で得られた  ${}^{18}\text{O}$  原子が Asp のみに取り込まれたという結果を説明できない。

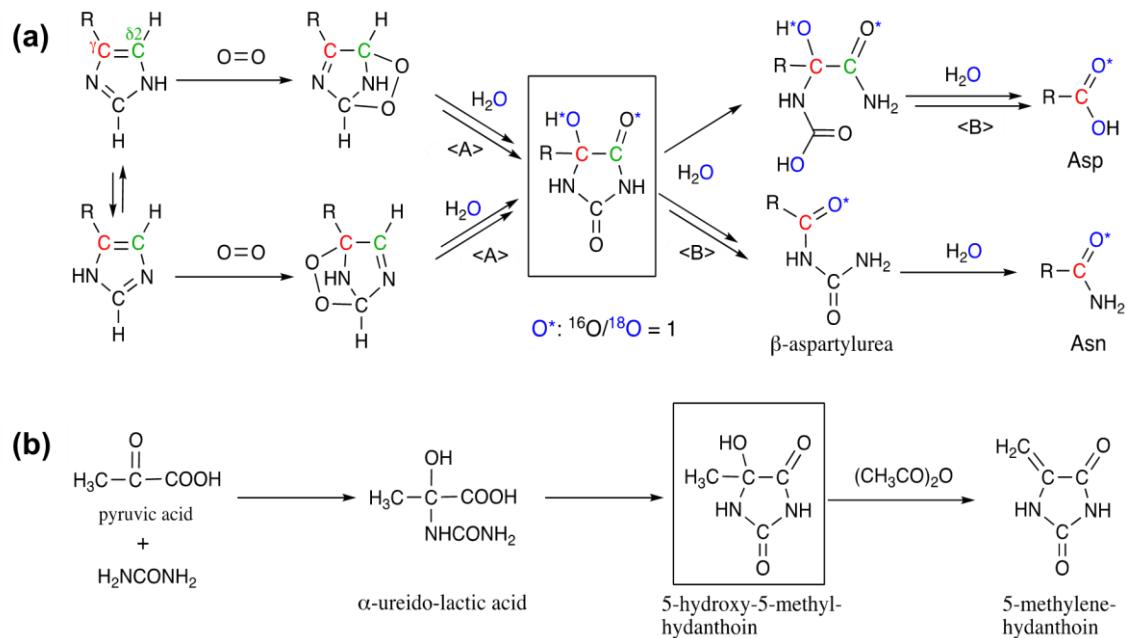


図 14 (a) Tomita らが提唱したヒスチジンの光酸化機構<sup>8</sup>。

His と一重項酸素の間の反応の初期段階は [4+2] 付加環化の様式で進行すると仮定した。生成物への  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  からの  $^{18}\text{O}$  の取込を容易に識別できるように参考文献<sup>8</sup>のスキーム 1 を改変した。5-アルキル-5-ヒドロキシ-ヒダントイン（四角で囲った構造）を含む注目すべき中間体を示した。この機構に従うと、 $\text{H}_2^{18}\text{O}$  中の  $^{18}\text{O}$  原子は Asp (1.5 原子) と Asn (0.5 原子) の両方に取り込まれる。しかしながら、我々の実験結果はこの機構では説明できなかったため、図 16 に示した別の機構を提案した。(a) における水和<A>および  $\text{C}^{\gamma}-\text{C}^{\delta 2}$ 結合の開裂<B>の機構はあいまいである。5-アルキル-5-ヒドロキシ-ヒダントイン中間体は安定であり、前の工程<A>で形成されたとしても、分解工程<B>が自発的に進行しないことを示唆している。(b) 安定な化合物として単離、特定された 5-ヒドロキシ-5-メチル-ヒダントインの合成反応<sup>47</sup>。5-メチレン-ヒダントインへの反応は、無水酢酸と熱を加える必要がある。

そこで著者は、モデルペプチド（アンジオテンシン II）の実験で得られた生成物および Asp への変換時の溶媒から  $^{18}\text{O}$  原子が取り込まれた結果から、本研究における光酸化の機構として、ジオキセタン (Dox) 環を含む中間体を形成する一重項酸素とイミダゾール基の  $\text{C}^{\gamma}-\text{C}^{\delta 2}$ 二重結合との光化学的 [2+2] 付加環化反応を提唱した（図 15）。ペリ環状 [2+2] 付加環化は熱的には対称禁制であるが、励起状態を経て進行する対称許

容な光化学的反応である。

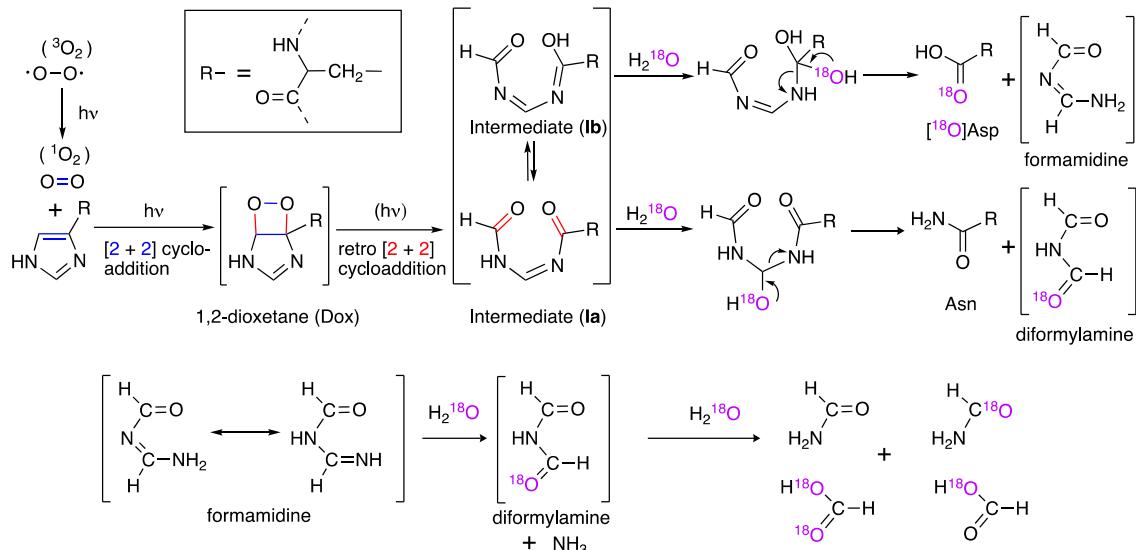


図 15 UVC によるヒスチジンの光酸化反応機構

Woodward-Hoffmann 則に従って、励起状態の Dox には逆 [2+2] 付加環化（または環状脱離）が起こりうる<sup>48-50</sup>。O-O 結合と C-C 結合が同時に開裂して、生成物中に励起状態でも存在する一対のカルボニル基が形成される。付加環化と逆付加環化の両反応は連続的に起こり、反応を開始する唯一の源として一つの光子を必要とする。Dox の誘導体は、四員環の高度に歪んだ構造にもかかわらず、それらの分解を引き起こす [2+2] 環状脱離が基底状態で対称禁制であるので、比較的安定である。従って、169 Da (His+O<sub>2</sub>) の質量を有する Dox が検出されていないことは、このプロセスにおいて、Dox が励起状態を経て反応し、消失したことを示唆する。ビラジカル中間体が関与する熱的二段階機構によっても Dox の O-O 結合および C-C 結合は開裂する可能性があるが<sup>48</sup>、[2+2] 付加環化による Dox の形成と、次に熱ラジカル反応による Dox の分解が起きるという多段階機構を支持する証拠は見つけられなかった。そのため、UVC 照射による、より単純な一段階協奏機構の方が反応機構として適切であると考える。

中間体 I を生成する光化学的逆 [2+2] 付加環化による C<sup>γ</sup>-C<sup>δ2</sup> 結合の開裂が、図 15 に

示す機構の最も重要な特徴の一つである。中間体 I は、互変異性体 Ia および Ib の平衡混合物であり、両者は開裂可能な C=N 結合の位置が異なる。 $H_2^{18}O$  中での光酸化で Asp にのみ  $^{18}O$  原子が取り込まれ、Asn には取り込まれなかったことは、中間体 Ia および Ib が加水分解され、それぞれ Asn および Asp を生じることを示す。同時にジホルミルアミン、ホルムアミジンの生成を予測したが、これらは検出不可と考えた。ジホルミルアミンは「超不安定試剤」として知られており、もう一つのホルムアミジンも加水分解されてジホルミルアミンになり、最後はギ酸、ホルムアミド、アンモニアにまで分解すると予測される<sup>51</sup>。また図 15 の反応機構の主な特徴の一つは、ラジカル種が関与しないことである。

$H_2^{18}O$  を溶媒とした mAb に UVC 照射を行ったところ、 $H_2^{18}O$  の  $^{18}O$  原子は、アンジオテンシン II の実験時と同様にアダリムマブの His から酸化された Asp にのみ取り込まれた（図 18）。[2+2] 付加環化および脱離に基づく我々の反応機構は、His198 の光酸化における Asp および Asn の生成を説明できるが（図 2）、中間体 I の iso-Asp への変換を説明するためには、追加で環状スクシンイミド中間体を仮定する必要があった（図 16）。この環状中間体は、スクシンイミド環の C-N 結合のどちらが開裂するかによって、iso-Asp だけでなく Asp の前駆体にもなり得る。このような環状構造は mAb の光酸化生成物では同定されていないが、アンジオテンシン II の光酸化生成物の中で、DRVYIN-イミド（図 7 の  $P_1$ ）として確認されている。中間体 Ia は、ペプチドの  $\alpha$ -カルボニル炭素原子への C=N の窒素の攻撃により形成された、スクシンイミドの前駆体と考えることができる。その後、C-N 結合の開裂による DRVYIN-イミドの形成およびピーク  $P_2$  として検出されたプロリン（Pro : Proline）-フェニルアラニン（Phe : Phenylalanine）の C 末端ジペプチドが放出される（図 16）。この機構は、スクシンイミド環でラセミ化が生じる可能性も示唆しており、その結果、His の別の光酸化生成物として D-Asp が生成する（図 17）<sup>20</sup>。しかしながら、D-Asp を含むペプチドは、もしあれば、L-Asp を含むペプ

チドと共に溶出されると考えられる。これは、17 アミノ酸ペプチド中の Asp198 のキラリティーの違いが、LC 保持時間において、有意な差を与えないと考えられるからである（図 3b）。

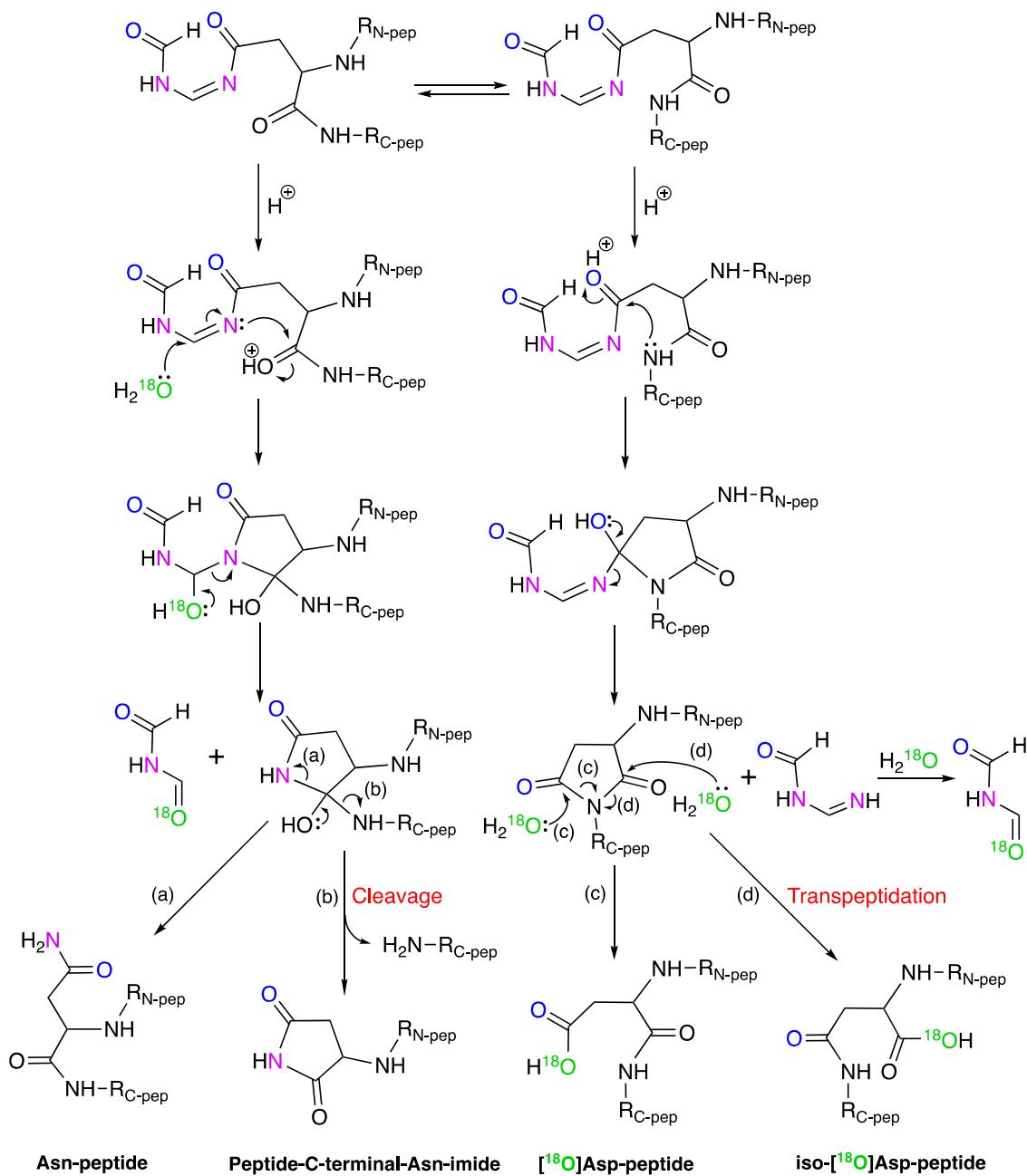


図 16 Asn-Pro 結合が切断されて C 末端 Asn-イミドが形成される機構。これはペプチド転移による iso-Asp 形成 (d) 機構も含む。これらの反応は、中間体の 2 つの異性体 (図の top) から個別に発生する可能性があり、[2+2] 付加環化および脱離による連続反応後に発生すると予想される (図 15)。この機構は、<sup>18</sup>O 原子が Asp ( $[^{18}\text{O}]\text{Asp}$ ) にのみ組み込まれ、Asn には組み込まれなかつたという、 $\text{H}_2^{18}\text{O}$  中での UVC による His の光

酸化の結果と一致している。中間体は互変異性体 Ia と Ib の平衡混合物であり、プロトノンの移動を通じて変換可能である。

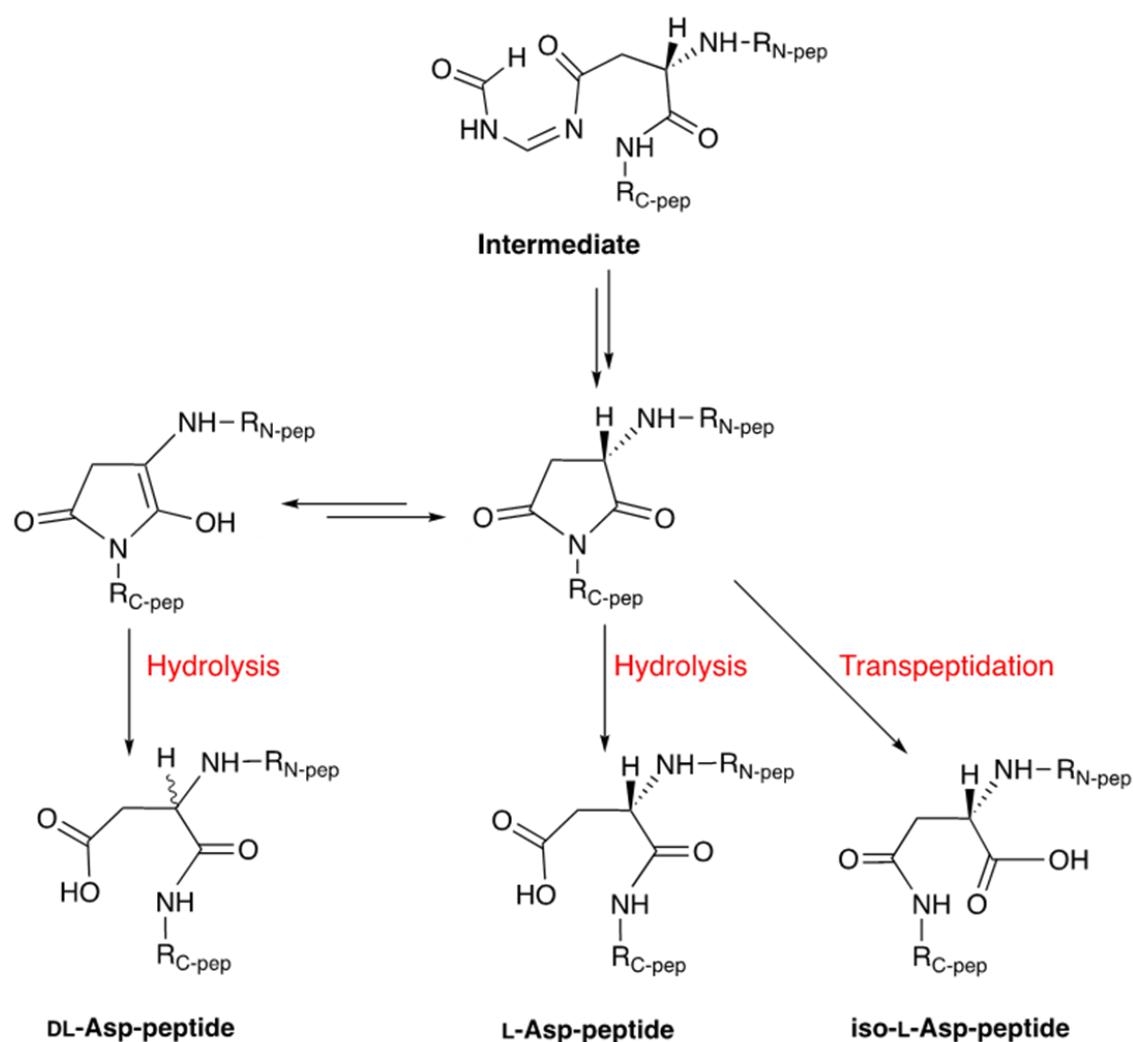


図 17 Asp 残基のラセミ混合物を含む酸化生成物の形成の機構。これらの生成物はすべて、一般的な前駆体として中間体とそれに続く五員環スクシンイミドから誘導できる。スクシンイミドはラセミ化しやすいことが広く知られている<sup>52</sup>。

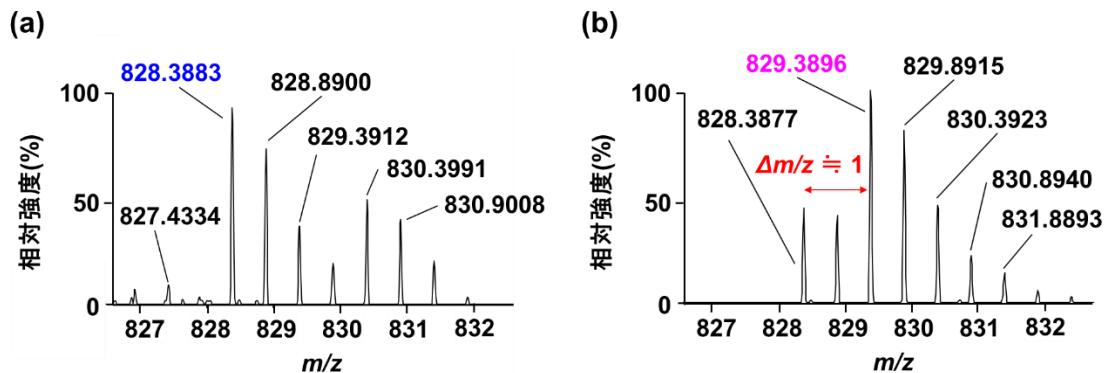


図 18 His289 を含むアダリムマブの残基 279-292 として同定されたペプチド FNWYVVDGVEVD (H から D に酸化) NAK (モノアイソトピック質量 1654.76 Da) の MS スペクトル。30 分間 UVC を照射した後のアダリムマブ  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  溶液 (a) および  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  溶液 (b)。スペクトル (b) において  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  から Asp への  $^{18}\text{O}$  原子の取り込みを確認した。

#### 第四節 小括

本章では、PDUVL による UVC 照射を 2 種類の mAb に行い、一重項酸素に対して反応性が高い His に着目し<sup>53</sup>、その影響を評価したところ、His 残基の Asp および Asn への光酸化が確認された。次に、この反応機構を調べるため、モデルペプチド (アンジオテンシン II) および  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  を使用した実験を行った。この実験では、Asp および Asn ならびに様々な化合物が同定されたが、UVA や UVB を使用した過去の報告例で観測された His の酸素付加体は認められなかった。また溶媒である  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  からの  $^{18}\text{O}$  原子は、Asp にのみ取り込まれ、Asn には取り込まれなかった。これらの結果を基に、His のイミダゾール基と一重項酸素の [2+2] 付加環化反応を含む反応機構を提唱した。

## 第二章 抗体医薬品におけるヒスチジン残基の光酸化感受性に関する因子の決定

本章では、mAb における His 残基の光酸化感受性が、どのような因子によって決まるのか明らかとするため、各 His 残基の酸性度、溶媒露出度との関係性を評価した。そのために、アダリムマブ中の His 残基のイミダゾール C2 位の H/D 交換速度の測定を行い、各 His 残基の  $pK_a$ 、二次速度定数  $k_2$  を算出した。またモデル構造からアダリムマブとリツキシマブの各 His 残基の相対的な溶媒露出表面積 (RSA : Relative solvent accessible surface area) を算出した。これら His 残基の特徴を表す値と  $Dr$  値を比較することで、His 残基の光酸化感受性に関する因子を特定した。

### 第一節 アダリムマブ中のヒスチジン残基のイミダゾール C2 位の水素/重水素交換速度の測定

mAb 分子中に複数存在する His 残基の光酸化感受性の違いを解析するにあたり、 $H^+$  および OH 以外のイオン種による影響を除外するため、水で透析することにより脱塩処理を行った。調製後の溶液の pH はアダリムマブで 4.95、リツキシマブで 6.10 であった。これらの試料についてイオンクロマトグラムから求めたアダリムマブとリツキシマブ中の各 His 残基の分解率 ( $Dr$  値) を表 4 にまとめた。 $Dr$  値が特に高かった残基は、アダリムマブでは、His289 の 6.2%、His198 の 8.9%、リツキシマブでは His289 の 10.5%、His197 の 12.6% であった。またアダリムマブとリツキシマブの  $Dr$  値を比較したところ、各残基の  $Dr$  値は、リツキシマブでは決定できなかった His439 を除き、リツキシマブの方が高かった。これら光酸化感受性の差は、それぞれ pH 4.95 と pH 6.10 における溶液のイオン状態を反映している可能性が考えられたため、イミダゾール C2 (ヒスチジン C<sup>51</sup>) 位の H/D 交換速度を質量分析により測定し、個々の His 残基の  $pK_a$  値を求めた<sup>54</sup>。D<sub>2</sub>O 中では、His 残基のイミダゾール環の C2 水素が重水素原子と交換していくが、その速度はイミダゾール環の電離状態に依存する。よってこの H/D 交換反応が一次速度

式に従うとして近似して得られた擬一次速度定数  $k_\varphi$  の pH 依存性から  $pK_a$  値を求めることができる（図 19）。得られた  $pK_a$  値を表 4 に示した。また、光酸化の一つの指標として、過去の報告例を参照し、H/D 交換反応の二次速度定数  $k_2$  を算出した<sup>55</sup>。 $k_2$  は溶媒露出表面積（ASA : solvent accessible surface area）と密接に関連していることが知られている<sup>54</sup>。次に Human IgG（PDB ID : 1HZH）の結晶構造から、アダリムマブとリツキシマブのモデル構造を構築し、RSA を算出した。両モデル構造をそれぞれ図 20、図 21 に示し、UVC により光酸化を受けた His 残基を赤色で、その他の His 残基を黄色で示した。His35、His314 および His198 では、RSA は 13% 以下であり、H/D 交換反応の速度は非常に遅かった（表 4、図 22）。

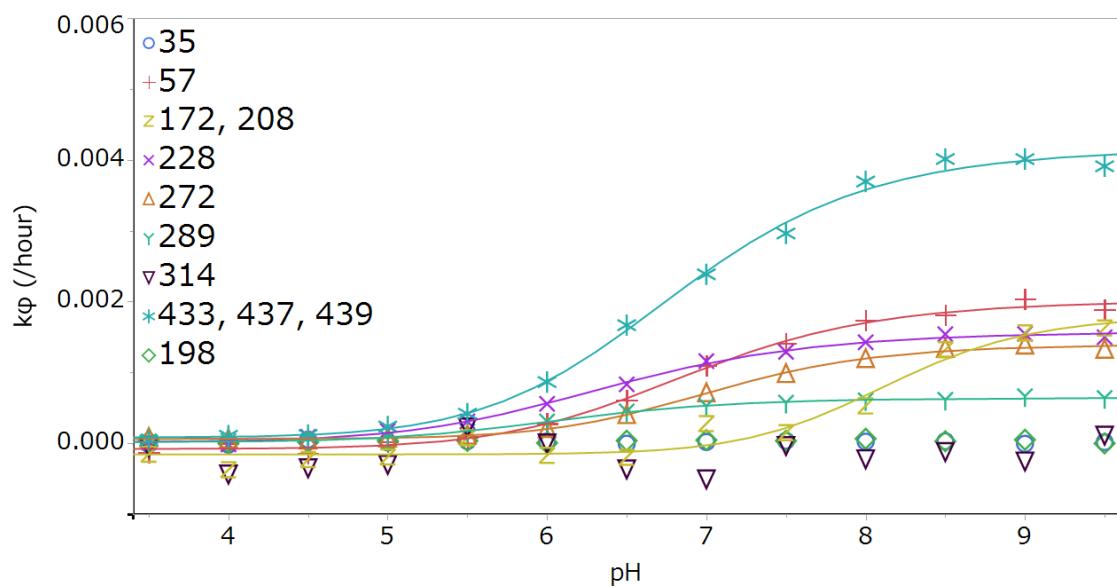


図 19 ヒスチジン残基の C2 位の H/D 交換の擬一次速度定数  $k_\varphi$  の pH 依存性。

表4 mAb 中の各 His 残基の  $Dr$  と  $RSA$ 、 $pK_a$  および  $k_2$  の関係。

Chain	Residue number of His	Degradation ratio of His at UVC irradiation 30 min (%)		RSA (%)		$pK_a$	His C2-H/D exchange reaction	
		Adalimumab	Rituximab	Adalimumab	Rituximab		$t_{1/2}$ (day)	$k_2$ ( $\times 10^4 \cdot M^{-1} \cdot h^{-1}$ )
Heavy chain	35	N.D. <sup>a</sup>	N.D.	7	5	N.D.	> 45	N.D.
	57 <sup>b</sup>	N.D.		41		6.9	14	2.5
	172	N.D.	N.D.	6	6	8.1 <sup>f</sup>	16 <sup>f</sup>	0.1 <sup>f</sup>
	208	N.D.	N.D.	0	0			
	228	N.D.	N.D.	19	30	6.4	18	6.3
	272	4.4	5.6	21	21	7.0	21	1.4
	289	6.2	10.5	48	48	6.2	45	4.1
	314	N.D.	9.4	13	13	N.D.	> 45	N.D.
	433	N.D.	2.7	0	0			
	437	1.7	3.3	53	53	6.8 <sup>g</sup>	7.0 <sup>g</sup>	6.6 <sup>g</sup>
Light chain	33 <sup>c</sup>		N.D.		1	N.D.	N.D.	N.D.
	189 <sup>d</sup>	N.D.	N.D.	14	14	N.D.	N.D.	N.D.
	198 <sup>e</sup>	8.9	12.6	5	2	N.D.	> 45	N.D.

<sup>a</sup> N.D. : 検出されなかつた(または決定されなかつた)。<sup>b</sup> リツキシマブでは存在しない。<sup>c</sup> アダリムマブでは存在しない。<sup>d</sup> リツキシマブでは His188。<sup>e</sup> リツキシマブでは His197。<sup>f</sup> 2 つの His 残基の見かけの値。<sup>g</sup> 3 つの His 残基の見かけの値。

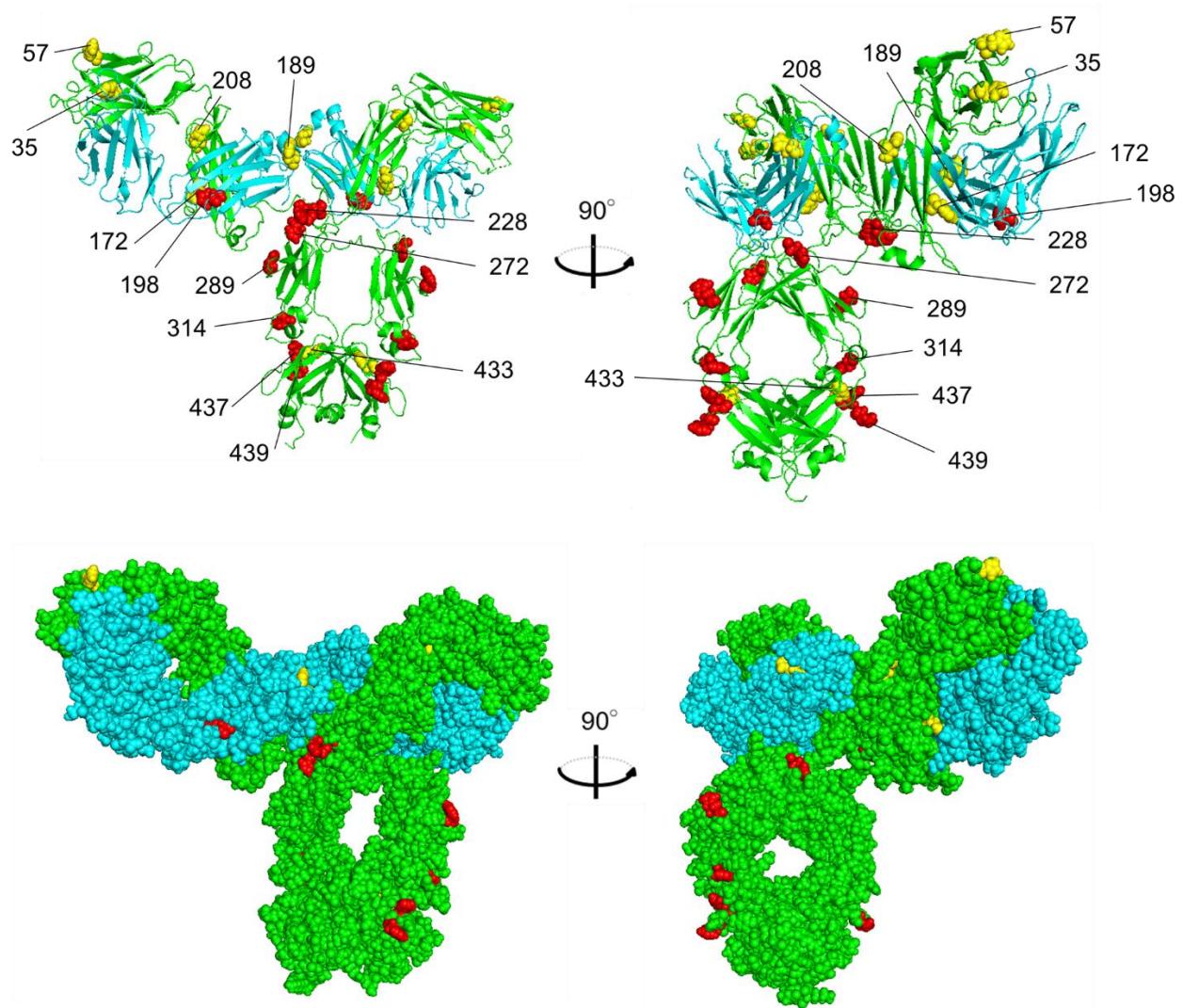


図 20 Human IgG (PDB ID : 1HZH) の結晶構造によるアダリムマブのモデル構造 (上図 : cartoon 表示、His 残基のみ spheres 表示、下図 : spheres 表示)。

H鎖を緑色、L鎖を青色、His残基のうち、UVCにより光酸化を受けたHis残基を赤色で、その他His残基を黄色で示す。

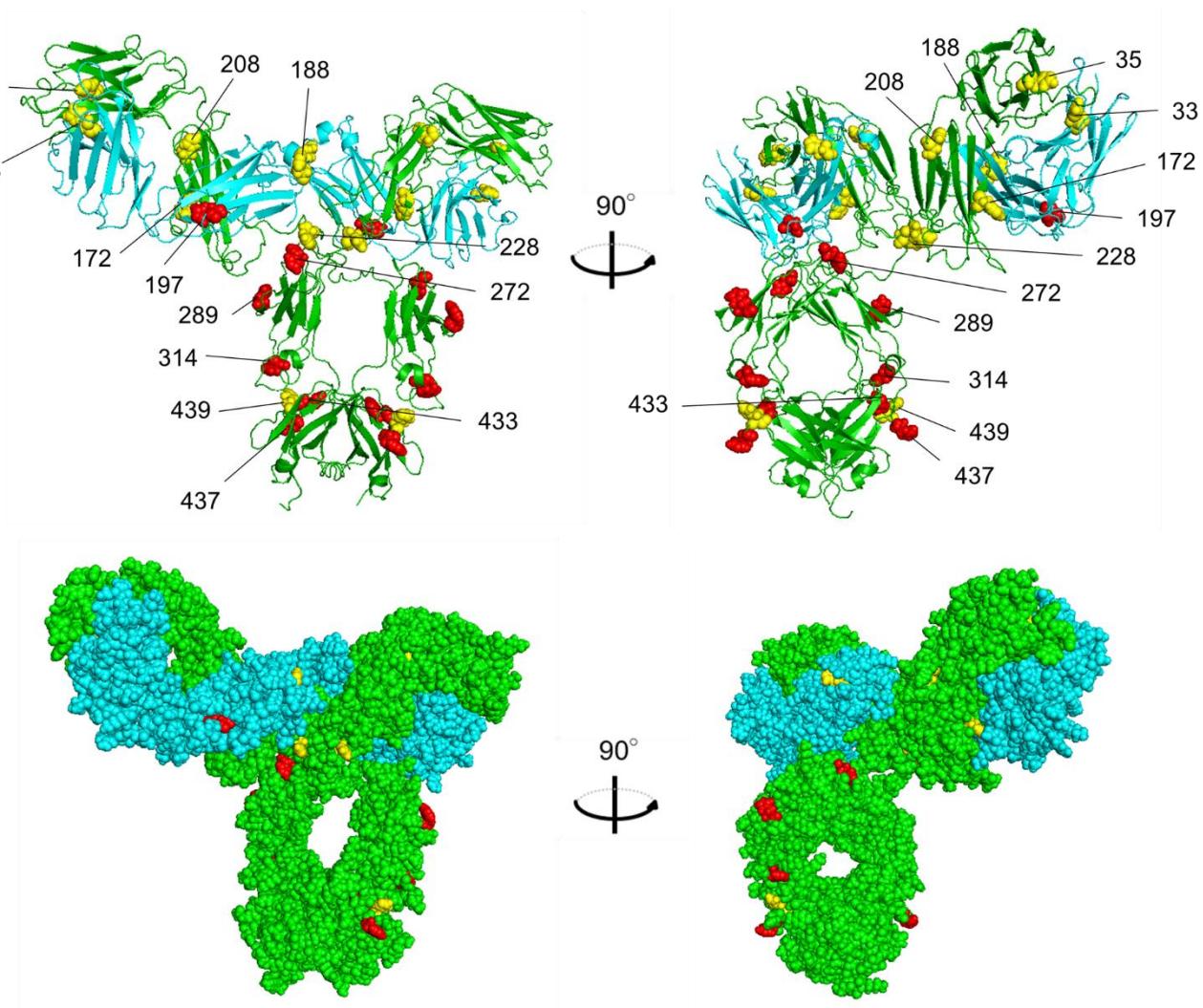


図 21 Human IgG (PDB ID : 1HZH) の結晶構造によるリツキシマブのモデル構造 (上図 : cartoon 表示、His 残基のみ spheres 表示、下図 : spheres 表示)。

H 鎖を緑色、L 鎖を青色、His 残基のうち、UVC により光酸化を受けた His 残基を赤色で、その他の His 残基を黄色で示す。

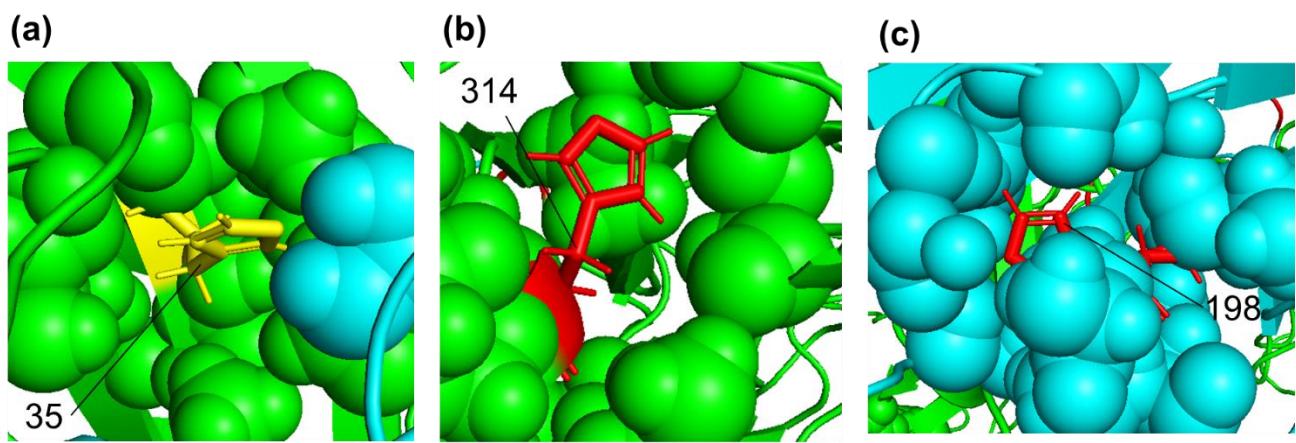


図 22 アダリムマブのモデル構造における各 His 残基近傍の拡大図。

(a) His35、(b) His314、(c) His198。各 His 残基から 4Å 以内のアミノ酸残基を spheres 表示した。

## 第二節 ヒスチジン残基の光酸化感受性と *RSA*、*pK<sub>a</sub>* および *k<sub>2</sub>* との関係性

各 His 残基の光酸化感受性と *RSA*、*pK<sub>a</sub>* および *k<sub>2</sub>* との関係性を評価した（表 4 および図 23）。His 残基の *Dr* 値は、pH 6.10 のリツキシマブ溶液の方が、pH 4.95 のアダリムマブ溶液よりも His439 を除き高かった。H/D 交換速度の値が最も高い His433、His437、His439 は光酸化に対する感受性（*Dr* 値）がかなり低かった。最も *pK<sub>a</sub>* 値が低く（酸性度の高く）、*RSA* の値も高い His289 は最も光酸化を受けやすかった。これらの結果から、His の光酸化感受性に関しては *k<sub>2</sub>* との相関が低く、*pK<sub>a</sub>* および *RSA* と相関が高いことが示された。

第一章で述べた mAb の光酸化における His 残基の [2+2] 付加環化の反応機構から、一重項酸素はカチオン型よりも電気的に中性なイミダゾール基と優先的に反応することが予測された。イミダゾール基のプロトン化が、C<sup>γ</sup>-C<sup>δ2</sup> 結合の適切な二重結合性を損ない、一重項酸素との反応性を低下させるからである。実際、図 23 から His 残基の光酸化感受性はその *pK<sub>a</sub>* 値に依存すると考えられた。典型的な例は *pK<sub>a</sub>* 6.2 の His289 であり、pH 4.95 のアダリムマブでは、ほぼ完全にプロトン化されているが、pH 6.10 のリツキシマブでは約半分しかプロトン化されていない。これにより、*Dr* 値が pH 4.95 での 6.2% から pH 6.10 では 10.5% に向上したと考えられた（表 4）。また、この残基の計算上の *RSA* はアダリムマブ、リツキシマブとも 48% であり、UVC 照射下での His の一重項酸素に対する反応性に影響する主な要因が、溶媒へのアクセスのし易さよりも、その残基の酸性度である可能性が高いと考えられる。

またイミダゾール基の励起に必要なエネルギーの観点から考察したところ、イミダゾール基では 6.0 eV、イミダゾール基がプロトン化したイミダゾリウムでは 6.9 eV が必要である<sup>56-58</sup>。このため、イミダゾール基がプロトン化する pH よりも酸性条件では His が酸化されにくいという今回の結果と一致する。さらに UVC であれば 200 nm (6.2 eV に相当) に近い短波長でイミダゾール基の励起が可能であるが、UVA/UVB (3.1 eV – 4.4

eV に相当) では励起が困難と考えられる。

以上より、 $pK_a$  値が低い His 残基は、弱酸性～中性の溶液では脱プロトン化が起きることで光酸化に対する感受性が高まっている、すなわち His 残基の光酸化は非プロトン型で起きやすい、と考えることができる。これは、非プロトン型のイミダゾール環の C<sup>γ</sup>-C<sup>δ2</sup> 二重結合への一重項酸素の [2+2] 付加環化を仮定した反応機構に合致する。

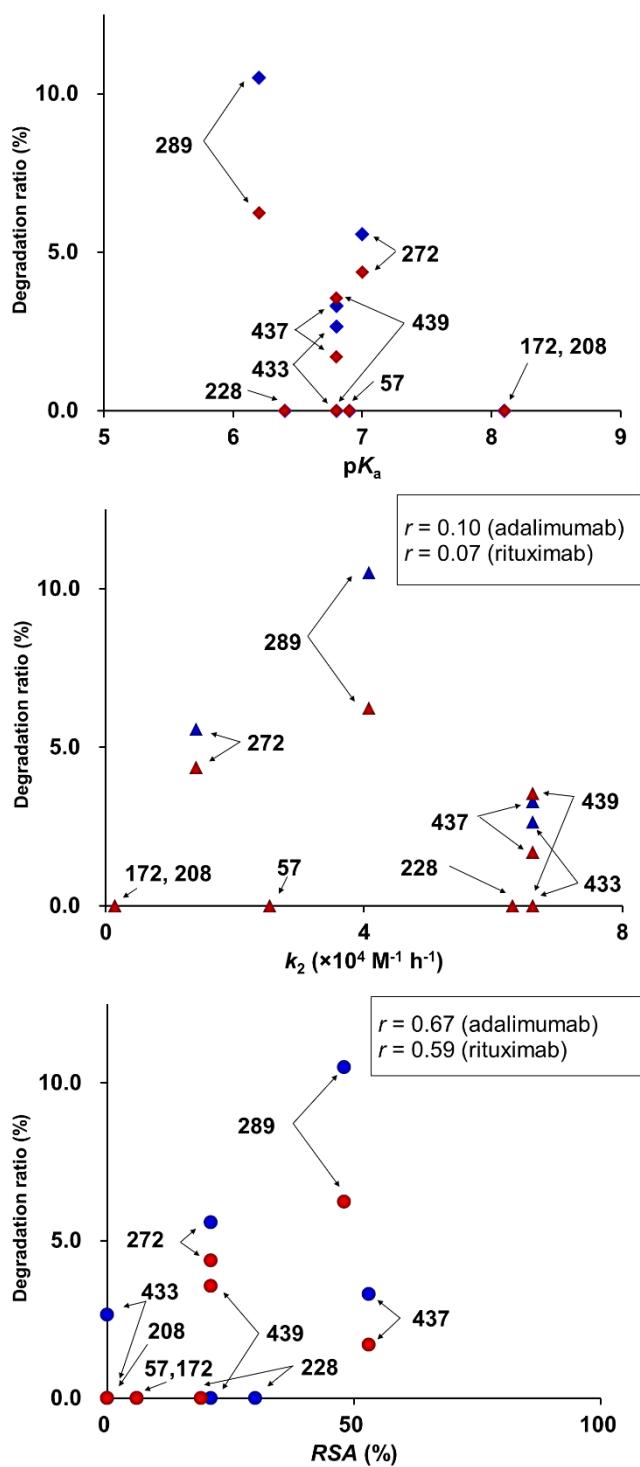


図 23 mAb 中の各 His 残基の光酸化による Dr と、pH 4.95 (赤) のアダリムマブおよび pH 6.10 (青) のリツキシマブの  $pK_a$  (上)、 $k_2$  (中央)、および RSA (下) の関係。Dr と  $k_2$  および RSA の間の相関係数  $r$  を算出した。

### 第三節 抗体医薬品におけるヒスチジン残基の機能と重要性

序論にて触れたが、Fc 領域に存在する His 残基が抗体の機能に影響することが報告されている（図 24）。His268（本研究では His272）は、補体依存性細胞傷害活性（CDC：Complement Dependent Cytotoxicity）および抗体依存性細胞傷害活性（ADCC：Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity）の機能と関連していることが知られている<sup>22,23</sup>。Moore らは、Fc 変異体 S267E/H268F/S324T が IgG1 の C1q 結合を増強することを報告している<sup>24</sup>。Mimoto らは、H268D を含む Fc 変異体が FcγR IIIa に対する親和性を増加させることを示している<sup>25</sup>。また、CH2-CH3 ヒンジ領域の His310（本研究では His314）、His433（本研究では His437）および His435（本研究では His439）は、IgG1 の FcRn-Fc 相互作用において重要な役割を果たすことが報告されている<sup>26-28</sup>。我々の結果は、これら Fc 領域に位置する His 残基が UVC 照射で損傷することを示した。mAb の機能として重要な役割を担うこれら His 残基の損傷を避けるために UVC 照射方法を開発することは重要であり、それは mAb の滅菌、殺菌のための有効な手段として広く使用される可能性がある。

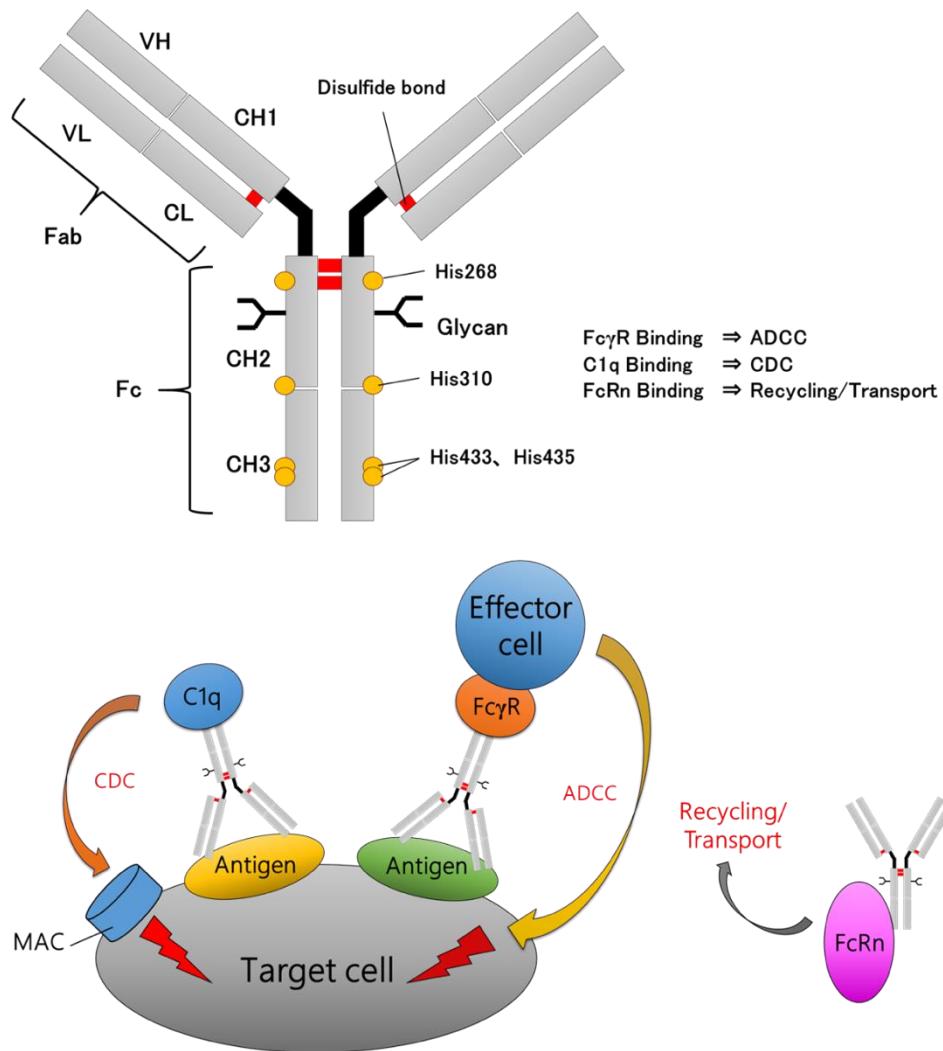


図 24 IgG1 の模式図（上図）および各機能の概略図（下図）。Fc 領域に存在し、抗体の機能に関与する His 残基を示した。

ADCC 活性: 抗体が標的細胞の抗原に結合すると、Fc $\gamma$ R を介してエフェクター細胞が抗体に結合し、標的細胞を攻撃する。CDC 活性: 抗体が標的細胞の抗原に結合すると補体系 (C1q) が活性化し、細胞の表面で一連の反応、細胞膜障害性複合体 (MAC: Membrane Attack Complex) の形成が起こり、細胞が破壊される。リサイクリング: 血漿中から細胞内に取り込まれた抗体のエンドソームからのリサイクルの役割を果たす。IgG の Fc 領域に結合し、血漿中にリサイクルさせることで IgG がリソソームで分解されることを避ける。

Fab: Fragment Antigen Binding、Fc: Fragment Crystallizable、CH: Constant region of Heavy chain、CL: Constant region of Light chain、VH: Variable region of heavy chain、VL: Variable region of light chain

#### 第四節 小括

本章では、mAb における His 残基の光酸化感受性と  $RSA$ 、 $pK_a$ 、 $k_2$  との関係性を評価した。その結果、UVC 照射によって mAb の機能に重要である Fc 領域の His 残基が光酸化されることを示した。また UVC 照射による光酸化は  $pK_a$  値が低い His 残基で一重項酸素と反応し起こるため、溶液の pH を下げ、溶存酸素を除去することにより、His のイミダゾール基がプロトン化され、光酸化を抑制できる可能性を示した。これらタンパク質に対する強力な UVC 照射の効果に関する包括的な知見は、タンパク質の損傷を最小限にしながらウイルス DNA またはリボ核酸 (RNA : Ribonucleic Acid) の分解を目的とした、安全な UVC 利用のために不可欠な情報となる。

## 結論

本研究では、質量分析を用いて、UVC 照射が 2 種類の mAb の His 残基に及ぼす影響を評価した。その結果、2 つの mAb の His 残基は同様に光酸化され、UVC 照射は His を Asn および Asp へと光酸化することを見出した。モデルペプチド（アンジオテンシン II）への UVC 照射実験では、His の光酸化において、溶媒である  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  からの  $^{18}\text{O}$  原子は、Asp にのみ取り込まれ、Asn には取り込まれなかつた。この結果は、UVC 照射が一重項酸素を生成し、His の  $\text{C}^{\gamma}$ - $\text{C}^{\delta 2}$  二重結合との [2+2] 付加環化を誘発して、ジオキセタン (Dox) を形成することを示唆している。この反応は熱的には対称禁制とされているが、光化学的には対称許容である。得られた Dox は、逆 [2+2] 付加環化により中間体を経て、加水分解により Asp または Asn のいずれかを生成すると考えられた。さらに、 $Dr$  と  $pK_a$  の間に相関が見られ、His 残基の光酸化に対する感受性が、各 His 残基の  $pK_a$  に依存することを示した。イミダゾール基がプロトン化される酸性条件では、His 残基への UVC による光酸化を回避できる可能性がある。また反応の起点となる一重項酸素の発生を抑えるため、溶存酸素を除去することも有効と考えられる。

本研究結果は、mAb の製造、輸送、保管中に生じるタンパク質の光酸化に関する知見を与える、UV 殺菌装置の研究において有用な情報となることが期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました大阪大学大学院 薬学研究科 高分子化学分野 大久保忠恭 教授、吉田卓也 准教授、河原一樹 助教に謹んで感謝いたします。

貴重なご助言を多く頂きました大阪大学 小林祐次 名誉教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導・ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院 工学研究科 内山進 教授に心より感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、適切なご指導を賜りました奈良女子大学 中沢隆 名誉教授に厚くお礼申し上げます。

本論文の審査をしていただきました大阪大学大学院 薬学研究科 荒井雅吉 教授ならびに高木達也 教授に感謝いたします。

実験にご協力いただきました大阪大学大学院 工学研究科 新谷晃也 氏、林原加代子 博士、パナソニック株式会社の頭川武央 氏、森田幸弘 氏にお礼申し上げます。

多くの場面でご協力いただきました大阪大学大学院 薬学研究科 高分子化学分野および大阪大学大学院 工学研究科 高分子バイオテクノロジー領域の皆様に感謝申し上げます。

最後に、長い間応援してくれた家族に感謝いたします。

# 実験の部

## 材料

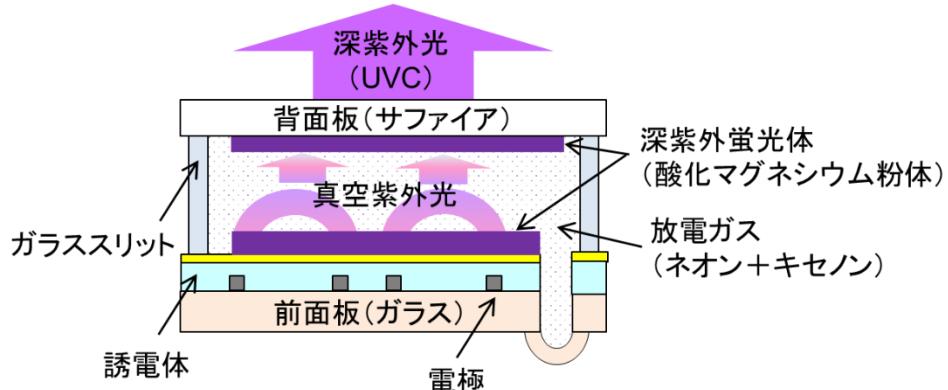
mAb のアダリムマブおよびリツキシマブは、それぞれエーザイ株式会社 (Tokyo, Japan)、中外工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、10% トリフルオロ酢酸、0.1% ギ酸含有の水、0.1% ギ酸含有のアセトニトリル、7K の透析カートリッジは、Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA)、8 M グアニジン塩酸塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。ジチオスレイトール、ヨードアセトアミド、酢酸ナトリウム、MES、HEPES、D<sub>2</sub>O は富士フィルム和光純薬株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。MicroSpin G-25 columns は Cytiva (Chicago, IL) から購入した。トリプシンは Promega 社 (Madison, WI) から、アンジオテンシン II はペプチド研究所 (Osaka, Japan) から、H<sub>2</sub><sup>18</sup>O、アセトニトリル (LC-MS grade)、水 (LC-MS grade) は Merck (Darmstadt, HE) から購入した。

## 方法

### UVC 照射

mAb を H<sub>2</sub><sup>16</sup>O もしくは H<sub>2</sub><sup>18</sup>O で透析後、希釈し、濃度 5 mg/mL とした。この時、各溶液の pH はアダリムマブで 4.95、リツキシマブで 6.10 であった。H<sup>+</sup>および OH<sup>-</sup>以外のアニオンおよびカチオンによる影響を除外するため、緩衝液の使用は避けた。UVC の光源として、パナソニック株式会社の PDUVL を使用した。PDUVL は、プラズマディスプレイパネル (PDP : Plasma Display Panel) の発光原理を用いた水銀を使用しない高出力で大面積の紫外光光源である<sup>59</sup>。すべての照射実験は、0.1cm の石英キュベットを用いた。室温にて、30 分間照射を行った。UVC の照度は、化学光量計を用いて 1.26×10<sup>3</sup> J/cm<sup>2</sup> に設定した。

(a)



(b)

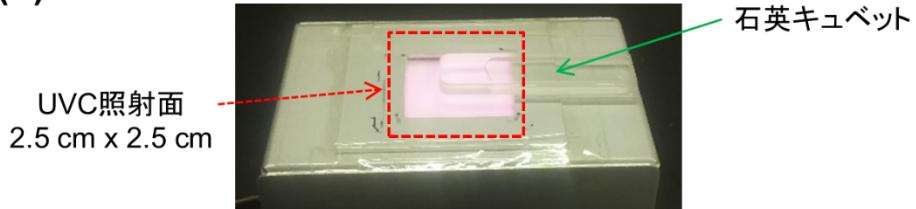


図 25 PDUVL 装置の概要。

(a) PDUVL の概略図。PDP の原理を利用して、希ガスの放電で生じる真空紫外光で蛍光体を光励起し、深紫外光を得るため、水銀を用いる必要がなくなる。また大型化が容易であることから面積を広くし、高い出力を得ることが可能である。さらにプレートタイプであることから広い領域を均一に照射できるメリットを有する。(b) サンプルへの UVC 照射時の様子。

#### ペプチドマッピング処理

UVC 照射有無の mAb サンプル (20  $\mu$ g) に 8M グアニジン塩酸塩 (66  $\mu$ L)、およびジチオスレイトール (3  $\mu$ L) を加え、37°Cで 30 分還元し、次にヨードアセトアミドを加えて、遮光室温にて 15 分静置し、フリーのチオール基をアルキル化した。4  $\mu$ L のジチオスレイトールを加えてアルキル化反応を停止させた後に、MicroSpin G-25 を用いて、試料の緩衝液を 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に交換した。還元・アルキル化処理を行ったサンプルにトリプシン (2  $\mu$ g) を加え、37°Cで 12 時間消化した。消化は 10%

トリフルオロ酢酸を 10  $\mu$ L 加えることで停止した。消化後のサンプルは、50°Cに加温した ACQUITY UPLC Peptide BEH C18、130Å、1.7  $\mu$ m、2.1 mm  $\times$  150 mm (Waters) を接続した液体クロマトグラフィーUltimate3000 (Thermo Fisher Scientific) で分離した。移動相 A には、0.1%ギ酸含有の水を、移動相 B には 0.1%ギ酸含有のアセトニトリルを用いた。流速は 0.2 mL/min、移動相 B の比率を 80 分で 3%から 40%になるようにグラジエント条件を設定した。溶離液を質量分析計 LTQ/XL Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。パラメータは以下のように設定した。ポジティブイオンモード、 $m/z$  : 150 – 2000、衝突誘起解離 (CID : Collision Induced Dissociation) のアイソレーション幅 : 4 Da、コリジョン電圧 : 35V。解析には、BioPharmaFinder (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

His および他の光感受性残基を含有するペプチドを同定するために、-58 Da から+162 Da の質量変化範囲を設定し適用した。特に 32 Da (+O<sub>2</sub>)、48 Da (+O<sub>3</sub>) の質量増加に注意した。他のすべての推定される生成物は、図 14、図 15 および図 16 に示す機構に記載した。BioPharmaFinder によるピークの同定のための、その他の設定パラメータは、デフォルト設定に従った。例えば、酵素特異性のレベルは“Strict”、質量精度のフィルタ一機能は MS ピークの  $m/z$  値 10 ppm 未満とした。

### mAb の His 残基の RSA の算出

Human IgG (PDB ID : 1HZH) の結晶構造を用いて、IgG1 のモデル構造を作成した。His 残基の側鎖の RSA は、ASA と最大溶媒露出表面積 (ASA<sup>max</sup> : the maximum possible solvent accessible surface area) の比率で算出した。

$$RSA = 100 \frac{ASA}{ASA^{max}}$$

*ASA* とは、溶媒露出面積、*ASA*<sup>max</sup> とは、あるアミノ酸残基が完全に露出したときの *ASA* を示す。これらの値を Molecular Operating Environment version 2018 を用いて計算した。抗体の立体構造は非対称であるため、重鎖および軽鎖の *RSA* の平均値を採用した。

### mAb の His 残基の $pK_a$ 値の算出

$pK_a$  値と各 His 残基のイミダゾール C2 (ヒスチジン C<sup>ε1</sup>) 位での水素/重水素 (H/D) 交換反応の二次速度定数  $k_2$  を、過去の報告例を参照し、pH に対する H/D 変化反応の擬一次速度定数  $k_\phi$  を質量分析により求めた<sup>11,54,55</sup>。緩衝液の D<sub>2</sub>O 溶液として、50 mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5 - 4.5)、50 mM MES (pH 5.0 - 7.0)、および 50 mM HEPES (pH 7.5 - 9.5) を使用した。これら各溶液にて調製した mAb 試料 (5 mg/mL) を 25°C でインキュベートし、H/D 交換反応を行った。決められた時間インキュベートした後、mAb 試料を上記のペプチドマッピングと同じ方法で処理した。His 残基を含む各トリプシン消化ペプチドの同位体存在パターンの時間依存的変化をモニターした。このペプチドの  $k_\phi$  値は次式で与えられる<sup>17</sup>。

$$k_\phi = \frac{\ln(1 + R_t - R_0)}{t}$$

ここで  $R_t$  は、インキュベーション時間  $t$  (h) におけるモノアイソトピック質量  $M$  および  $(M+1)$  に対応する同位体ピークの強度比  $I_M(t) / I_{M+1}(t)$  であり、 $R_0$  は  $t = 0$  における  $R_t$  の値である。そして本研究では  $t = 336$  h とした。JMP ソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、4 パラメータロジスティックフィッティングにより、pH に対する  $k_\phi$  のシグモイド曲線の変曲点および上方漸近線から  $pK_a$  値および  $k_\phi^{\max}$  値を求めた。二次速度定数  $k_2$  は次式により、これら実験パラメータと水のイオン積  $K_w = 1 \times 10^{-14}$  mol<sup>2</sup> L<sup>-2</sup> にて表される<sup>17,20</sup>。

$$k_2 = k_{\varphi}^{\max} \left( \frac{K_a}{K_W} \right)$$

### アンジオテンシン II への UVC 照射と LC/MS 分析

アンジオテンシン II を  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  もしくは  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  で溶解し、濃度 2 mg/mL とした。この溶液の pH は 6.29 であった。0.1 cm の石英キュベットに溶液を入れ、室温にて PDUVL による UVC 照射を 60 分間実施した。UVC 照射後、水で 5 倍希釈した溶液 5  $\mu\text{L}$  を、カラム温度 50 度で、ACQUITY UPLC Peptide BEH C18、130Å、1.7  $\mu\text{m}$ 、2.1 mm × 150 mm (Waters) を接続した液体クロマトグラフィーLC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan) で分離した。移動相 A には、0.1% ギ酸含有の水を、移動相 B には 0.1% ギ酸含有のアセトニトリルを用いた。流速は 0.2 mL/min、移動相 B の比率を 13 分で 2% から 80% になるようグラジェント条件を設定した。溶離液を質量分析計 maXisII ETD (Bruker Daltonics, Billerica, MA) にて測定した。質量分析装置は、ESI-L Low-Concentration Tuning Mix (Agilent) を用いて校正した。測定はすべてポジティブイオンモードで測定し、データの解析には、data analysis (Bruker) を使用した。

### 光酸化による分解率

His 残基の光酸化感受性の指標として、本実験において新たに定義した分解率 (Dr) を、抽出された MS クロマトグラムにおける各ペプチドの相対ピーク面積を用いて、以下の計算式に従い算出した。

$$Dr(\%) = 100 \left( \frac{A_X}{A_H + A_X} \right)$$

ここで  $A_H$  は未反応の His 残基を含むペプチドのピーク面積、 $A_X$  ( $X = D$  or  $N$ ) は His

残基が Asp または Asn のいずれかに酸化されたペプチドのピーク面積を示す。 $A_D$  には Asp および iso-Asp の両方を含むペプチドのピーク面積を含めた。 $Dr$  を算出するためのカットオフ値としてトータルイオンクロマトグラムにおける最大ピーク強度の 0.3% とした。カットオフ値に満たない強度で検出されたピークが、光酸化反応による生成物として同定されたとしても、 $Dr$  の算出には用いなかった。

## 参考文献

- (1) Kaplon H., Reichert J. M. Antibodies to watch in 2019. *MAbs* 2019, *11* (2), 219–238.
- (2) Surjit S., Nitish K. T., Pradeep D., Jaykaran C., Rimplejeet K., Preeti. S., Vinay. K. C. Monoclonal antibodies. A review. *Indian J. Med. Sci.* 2001, *55* (12), 651–654.
- (3) Kaltashov, I. A., Bobst C. E., Abzalimov R. R., Wang G., Baykal B., Wang S., Wang S. Advance and challenges in analytical characterization of biotechnologt products: mass spectrometry-based approaches to study properties and behavior of protein therapeutics. *Biotechnol. Adv.* 2013, *30* (1), 210–222.
- (4) Kerwin B. A., Remmele R. L. Protect from light: Photodegradation and protein biologics. *J. Pharm. Sci.* 2007, *96* (6), 1468–1479.
- (5) Pattison D. I., Rahmanto A. S., Davies M. J. Photo-oxidation of proteins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012, *11* (1), 38–53.
- (6) Mason B. D., Schöneich C., Kerwin B. A. Effect of pH and light on aggregation and conformation of an IgG1 mAb. *Mol. Pharm.* 2012, *9* (4), 774–790.
- (7) Bommana R., Chai Q., Schöneich C., Weiss W. F., Majumdar R. Understanding the increased aggregation propensity of a light-exposed IgG1 monoclonal antibody using hydrogen exchange mass spectrometry, biophysical characterization, and structural analysis. *J. Pharm. Sci.* 2018, *107* (6), 1498–1511.
- (8) Tomita M., Irie M., Ukita T. Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. products and mechanism of the reaction. *Biochemistry* 1969, *8* (12), 5149–5160.
- (9) Tomita M., Irie M., Ukita T. Sensitized photooxidation of N-benzoyl histidine. *Tetrahedron Lett.* 1968, *9* (47), 4933–4936.
- (10) Bane, J., Mozziconacci, O., Yi, L., Wang, Y. J., Sreedhara, A., Schöneich, C. Photo-

oxidation of IgG1 and model peptides: Detection and analysis of triply oxidized His and Trp side chain cleavage products. *Pharm. Res.* 2017, 34 (1), 229–242.

(11) Amano M., Kobayashi N., Yabuta M., Uchiyama S., Fukui K. Detection of histidine oxidation in a monoclonal immunoglobulin gamma (IgG) 1 antibody. *Anal. Chem.* 2014, 86 (15), 7536–7543.

(12) Chen J., Bergevin J., Kiss R., Walker G., Battistoni T., Lufburrow P., Lam H., Vinther A. Case study: A novel bacterial contamination in cell culture production - *Leptospira licerasiae* *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2012, 66 (6), 580–591.

(13) Drexler H. G., Uphoff C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002, 39 (2), 75–90.

(14) Aranha H. Virus safety of absence of evidence is not evidence of absence. *Contract Pharma* 2011, November/December.

(15) Moody M., Alves W., Varghese J., Khan F. Mouse minute virus (MMV) contamination - A case study: Detection, root cause determination, and corrective actions. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2011, 65 (6), 580–588.

(16) Goetschalckx S., Fabre V., Wynants M., Bertaux L., Plavsic M., Boussif O., Laenen L. A holistic biosafety risk mitigation approach. 2014, *Amer Pharm Rev* 17(4), 48–56.

(17) Reed, N. G. The History of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. *Public Health Rep.* 2010, 125 (1), 15–27.

(18) Tseng C. C., Li C. S. Inactivation of viruses on surfaces by ultraviolet germicidal irradiation. *J. Occup. Environ. Hyg.* 2007, 4 (6), 400–405.

(19) Vaidya V., Dhore R., Agnihotri S., Muley R., Patil S., Pawar A. Ultraviolet-C irradiation for inactivation of viruses in foetal bovine serum. *Vaccine* 2018, 36 (29), 4215–4221.

(20) Lorenz C. M., Wolk B. M., Quan C. P., Alcala E. W., Eng M., McDonald D. J., Matthews

T. C. The effect of low intensity ultraviolet-C light on monoclonal antibodies. *Biotechnol. Prog.* 2009, 25 (2), 476–482.

(21) Chan H. L., Gaffney P. R., Waterfield M. D., Anderle H., Matthiessen H.P., Schwarz, H. P., Turecek P. L., Timms J. F. Proteomic analysis of uvc irradiation-induced damage of plasma proteins: Serum amyloid P component as a major target of photolysis. *FEBS Lett.* 2006, 580 (13), 3229–3236.

(22) Roopenian D. C., Akilesh S. FcRn: The neonatal fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7 (9), 715–725.

(23) Wang X., Mathieu M., Brezski R. J. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 2018, 9 (1), 63–73.

(24) Moore G. L., Chen H., Karki S., Lazar G. A. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. 2010, 2 (2), 181–189.

(25) Taylor P., Mimoto F., Igawa T., Kuramochi T., Katada H., Kadono S., Kamikawa T. Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior FcγR binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant. *MAbs* 2015, 5 (2), 37–41.

(26) Burmeister W. P., Huber A. H., Bjorkman P. J. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* 1994, 372 (24), 379–383.

(27) Shimizu A., Honzawa M., Ito S., Miyazaki T., Matsumoto H., Nakamura H., Michaelsen T. E., Arata, Y. <sup>1</sup>H NMR studies of the Fc region of human IgG1 and IgG3 immunoglobulins: Assignment of histidine resonances in the CH3 domain and identification of IgG3 protein carrying G3m(st) allotypes. *Mol. Immunol.* 1983, 20 (2), 141–148.

(28) Shields R. L., Namenuk A. K., Hong K., Meng Y. G., Rae J., Brigg, J., Xie D., Lai J.,

Stadlen A., Li B. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc $\gamma$ R. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (9), 6591–6604.

(29) Zhang G., Annan R. S., Carr S. A., Neubert T. A. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014, 10.21.1-10.21.30.

(30) Yates J. R., Ruse C. I., Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2009, 11, 49–79.

(31) Zhang H., Cui W., Gross M. L. Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 2014, 588 (2), 308–317.

(32) Amano M., Hasegawa J., Kobayashi N., Kishi N., Nakazawa T., Uchiyama S., Fukui K. Specific racemization of heavy-chain cysteine-220 in the hinge region of immunoglobulin gamma 1 as a possible cause of degradation during storage. *Anal. Chem.* 2011, 83 (10), 3857–3864.

(33) Kuo T. T., Aveson V. G. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *MAbs* 2011, 3 (5), 422–430.

(34) Amano M., Fukui K., Uchiyama S. Suppression of methionine oxidation of a pharmaceutical antibody stored in a polymer-based syringe. *J. Pharm. Sci.* 2016, 105 (2), 623–629.

(35) Yan S. F., Ramasamy R., Schmidt A. M. Mechanisms of disease: Advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2008, 4 (5), 285–293.

(36) Heidebrecht T., Christodoulou E., Chalmers M. J., Jan S., Ter Riet B., Grover R. K., Joosten R. P., Littler D., Luenen v. H., Griffin P. R., Wentworth Jr P., Borst P., Perrakis A. The structural basis for recognition of base J containing DNA by a novel DNA binding

domain in JBP1. *Nucleic Acids Res.* 2011, **39** (13), 5715–5728.

(37) Harris R. J., Kabakoff B., Macchi F. D., Shen F. J., Kwong M., Andya J. D., Shire S. J., Bjork N., Totpal K., Chen, A. B. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001, **752** (2), 233–245.

(38) DeGraan-Weber N., Zhang J., Reilly J. P. Distinguishing aspartic and isoaspartic acids in peptides by several mass spectrometric fragmentation methods. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2016, **27** (12), 2041–2053.

(39) Agon V. V., Bubb W. A., Wright A., Hawkins C. L., Davies M. J. Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: evidence for the formation of reactive side-chain peroxides. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, **40** (4), 698–710.

(40) Castaño C., Oliveros E., Thomas A. H., Lorente C. Histidine oxidation photosensitized by pterin: pH dependent mechanism. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2015, **153**, 483–489.

(41) Davies M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, **305** (3), 761–770.

(42) Foote C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 1991, **54** (5), 659.

(43) Yang H., Zubarev R. A. Mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in polypeptides. *Electrophoresis* 2010, **31** (11), 1764–1772.

(44) Spicer V., Yamchuk, A., Cortens, J., Sousa S., Ens W., Standing K. G., Wilkins J. A., Krokhin O. V. Sequence-specific retention calculator. a family of peptide retention time prediction algorithms in reversed-phase HPLC: Applicability to various chromatographic conditions and columns. *Anal. Chem.* 2007, **79** (22), 8762–8768.

(45) Vu, H.; Spicer, V.; Gotfrid, A.; Krokhin, O. V. A model for predicting slopes  $S$  in the basic equation for the linear-solvent-strength theory of peptide separation by reversed-phase

high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2010, **1217** (4), 489–497.

(46) Méndez-Hurtado J., López R., Suárez D., Menéndez M. I. Theoretical study of the oxidation of histidine by singlet oxygen. *Chem. - A Eur. J.* 2012, **18** (27), 8437–8447.

(47) Murahashi S., Yuki H., Kosai K., Doura F. Methylene-hydantoin and related compounds. I. On the reaction of pyruvic acid and urea: The synthesis of 5-methylene-hydantoin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1966, **39** (7), 1559–1562.

(48) Vacher M., Fdez Galván I., Ding B. W., Schramm S., Berraud-Pache R., Naumov P., Ferré N., Liu Y. J., Navizet I., Roca-Sanjuán D., Baader W. J., Lindh R. Chemi- and bioluminescence of cyclic peroxides. *Chem. Rev.* 2018, **118** (15), 6927–6974.

(49) Mazur, S., Foote, C. S. Chemistry of singlet oxygen. IX. Stable dioxetane from photooxygenation of tetramethoxy ethylene. *J. Am. Chem. Soc.* 1970, **92** (10), 3225-3226.

(50) Ohloff, G. Singlet oxygen: a reagent in organic synthesis, *Pure and Applied Chemistry*, 1975, **43** (3-4), 481-502

(51) Nishiwaki N., Tohda Y., Ariga M. Facile synthesis of functionalized nitroenamines. III. Aminolysis of 1-methyl-5-nitropyrimidin-2(1H)-one. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1996, **69** (7), 1997-2002

(52) McFadden P. N., Clarke S. Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: Possible step in the repair of aged membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982, **79** (8), 2460–2464.

(53) Remucal C. K., McNeill K. Photosensitized amino acid degradation in the presence of riboflavin and its derivatives. *Environ. Sci. Technol.* 2011, **45** (12), 5230–5237.

(54) Miyagi M., Nakazawa T. Determination of pK<sub>a</sub> values of individual histidine residues in proteins using mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2008, **80** (17), 6481–6487.

(55) Hayashi N., Kuyama H., Nakajima C., Kawahara K., Miyagi M., Nishimura O., Matsuo

H., Nakazawa T. Imidazole C-2 hydrogen/deuterium exchange reaction at histidine for probing protein structure and function with matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Biochemistry* 2014, *53* (11), 1818–1820f.

(56) Serrano-Andrés, L., Fülscher, M. P., Karlström, G. Solvent effects on electronic spectra studied by multiconfigurational perturbation theory. *Int. J. Quantum Chem.* 1997, *65* (2), 167–181.

(57) Serrano-Andrés, L., Fülscher, M. P.; Roos, B. O., Merchán, M. Theoretical study of the electronic spectrum of imidazole. *J. Phys. Chem.* 1996, *100* (16), 6484–6491.

(58) Barbatti, M., Lischka, H., Salzmann, S., Marian, C. M. UV excitation and radiationless deactivation of imidazole. *J. Chem. Phys.* 2009, *130* (3).

(59) Sasaki Y., Zukawa T., Kurosawa T., Nagao N., Kamiko N. Development of ultraviolet-light-emitting light source and water treatment technology. *Panasonic Technical Journal* 2017, *63* (1), 101–106.

# 主論文

**Miyahara Y**, Shintani K, Hayashihara-Kakuhou K, Zukawa T, Morita Y, Nakazawa T, Yoshida T, Ohkubo T & Uchiyama S. Effect of UVC irradiation on the oxidation of histidine in monoclonal antibodies. *Scientific Reports* 2020, 10 (1), 6333.