

を決定は困難である。マウスでは数回の投与で心筋の全体をカバーするのは容易だが、マウスより数百倍大きい豚の心臓をカバーすることははるかに難しい。筋肉内注入により起こる注射針の癢痕のようなことでもマウスではヒトと全体的に占める割合が異なる。例えば、28-Gの注射針では筋肉組織で約500 μ mの幅の壊死した癢痕が起きる。そのような状態では筋肉の炎症性細胞および障害筋細胞が自ら増殖因子を供給するようになる。その注射針の癢痕の大きさはマウスでは左心室筋肉の1/8であるが、ヒトでは左心室筋肉のわずか1/200にしかすぎない。

13.14 血管新生増殖因子たん白質を用いた治療におけるリスクと何か

VEGFによる透過性の増加のような特異的な有害作用と、腫瘍の成長、糖尿病性網膜症の悪化、アテローム性動脈硬化のような血管新生に直接関連した有害作用は区別できる。VEGF/VPF(血管透過性因子)の血管透過性を促進する活性は、ヒスタミンに比べて50000倍以上高い。他の可能性も除外できないが、この効果は内皮開窓の誘導によると考えられる。

腫瘍成長と糖尿病性網膜症は血管新生と血管新生促進因子に依存することが多くの研究で示されている。しかし、投与した増殖因子により腫瘍成長および網膜症の悪化が実際に促進されるという知見はほとんどない。顕性腫瘍および糖尿病性網膜症の患者は臨床試験において除外されているが、現在、血管新生促進因子のたん白質あるいは遺伝子治療を受けている1000人以上の患者において、この二つの疾患の合併症の患者は見つかっていない。特にVEGFの動脈硬化促進作用がアテローム性動脈硬化の前臨床モデルで試験されている。VEGFを投与すると、プラークの形成が促進されるが、flt-1をブロックすると動脈硬化の形成が低下した。これと一致して、TNP40あるいはAngのような一般的な血管新生阻害剤により実験的アテローム性動脈硬化症が低下する。しかし、VEGF遺伝子治療

の臨床試験ではVEGFの動脈硬化の形成促進作用を裏づけることができなかった。同様に、アテローム性動脈硬化症の大動物モデルで、FGF-2を冠動脈ステント移植しても、作用が示されなかった。このような統一的な見解が得られない状況において、限られた数の試験において示された、血管新生促進作用を有する増殖因子による動脈の形成促進作用と臨床との関連の有無については判断できない。したがって、将来の臨床試験では、アテローム性動脈硬化症の進行を第一に注意する必要がある。

13.15 遺伝子治療におけるリスクとは何か

遺伝子治療の副作用はデリバリーのプロセス、ベクターあるいは遺伝子産物そのものにより起き得る。遺伝子治療の最終目標の一つは選択枝のない患者に適した治療法を提供することである。遺伝子治療ベクターのデリバリー自体可能な限り非侵襲的でリスクが低い必要がある。したがって、外科的アプローチおよび長期間にわたるかん流の繰り返しは、心筋の血管新生において臨床上適切なデリバリー戦略とは言いがたい。インビボにおいてウイルスおよび非ウイルスを用いた遺伝子デリバリーにより、有害効果が起き得る。高投与量の裸のDNAは壊死と炎症を起こすとの報告もある。ほとんどのウイルスは免疫反応を惹起し、その結果、一過性の体温上昇から敗血性ショックまで一連の臨床症状が起きる。宿主染色体へベクターが組み込まれる場合はガン遺伝子の活性化、正常な遺伝子発現の妨害、宿主染色体の変異促進が起きる可能性がある。

小動物を用いた侵襲的なアプローチでは心臓において血管新生分子に特異的な有害作用は表に出てこない。したがって、大動物およびヒトにおける有害作用の立証は不十分である。また、小動物を用いた研究ではその後のフォローアップの期間は非常に短い。血管新生遺伝子治療では導入組織における過剰血管成長、いわゆる血管腫あるいは糸球体硬化形成が懸念される。しかしながら、そのような

構造は通常血流により再構成され、血管は正常に構築される。遺伝子治療により増殖因子を標的組織以外にも発現させた場合、他の組織に対して腫瘍の成長促進、網膜症、関節炎のような有害な副作用が起きるかも可能性がある。このような有害作用は組織特異的なプロモーターあるいは低酸素状態の条件で発現が促進されるようなベクターを用いることにより克服できるかもしれない。VEGFの副作用は血管透過性の亢進と浮腫であるが、心臓におけるそのような兆候、すなわち心膜液貯留という副作用は用量が多すぎる場合に起きることが最近になって示された。このように、可能性のある副作用について総合的に評価するためには、大動物において、最適投与量及びベクターと遺伝子のそれぞれに組み合わせにおいてデリバリーの戦略を決める必要がある。

D. 結論

治療的血管新生に対するたん白質および遺伝子治療、細胞治療のアプローチは、動物モデルおよび初期の非盲試験において良好な結果が得られたことから、大規模二重盲検コントロール試験における結果は大いに期待された。しかしながら、今まで全て失敗に終わった。その原因として多くの可能性が考えられている。しかし、有効性については芳しくないデータであったとしても、最近の臨床試験では、少なくとも血管新生療法が安全であることは示されつつある。したがって、この治療は今後さらに検討を重ねることにより、有効性を示すことが可能かもしれない。一方、血管の再構成および幹細胞の動員といった可能性のある治療標的の解明には血管発生、血管新生、動脈形成という血管新生 (vasculogenesis) の概念が有効となっている。このような観点において、臨床特に基礎研究の成果を評価する際、血管新生、動脈形成、脈管形成の評価を有効性の評価に織り込む必要がある。

今後改良すべき主な点として、適切な増殖因子をたん白質あるいは遺伝子として標的組

織に効率良く持続的にデリバリーすることあるいは標的組織に対してのみ活性を示す薬を用いてシステムティックな治療を行なうことが考えられる。まだ見解の一致をみていないが、細胞治療は未知の非常に大きな可能性を秘めている。最適の細胞の選択からデリバリーの方法、患者の選択、作用機構の解明まで今後検討すべき課題は多い。しかしながら、今後十年でこの領域における研究が大きく進歩し、虚血病の治療において新しい治療法が出現することが大いに期待される。その場合、治療方法は基礎的な前臨床のデータに基づいて妥当性が示されていることは必要不可欠である。

E. 参考文献

1. B. H. Annex, and M. Simons, Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the heart: protein therapy, *Cardiovasc Res* 65:649-655 (2005)
2. D. Tirziu, and M. Simons, Angiogenesis in the human heart: Gene and cell therapy, *Angiogenesis* 8:241-251 (2005)
3. Y. Cao, A. Hong, H. Schulten, and M. J. Post, Update on therapeutic neovascularization, *Cardiovasc Res* 65:639-648 (2005)
4. J. E. Markkanen, T. T. Rissanen, and S. Yla-Herttuala, Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the heart—gene therapy, *Cardiovasc Res* 65:656-664 (2005)

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- [1] Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa:

Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on DNA synthesis. 第3回アネキシン国際会議 (2005年, スイス)

- [2] Mizuho Harashima, Shingo Niimi, Hitomi Koyanagai, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanihsi, Takao Hayakawa: Regulation of annexin A3 expression by growth regulatory factors in primary cultured rat hepatocytes. 第78回日本生化学会 (2005年)
- [3] Seiji Noma, Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Kazuko Takayama, Mayumi Hara, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. 第78回日本生化学会 (2005年)
- [4] 原島 瑞、新見伸吾、蒲生 優、日向昌司、関泰一郎、有賀豊彦、川西 徹、早川堯夫、初代培養ラット肝細胞における AnnexinA3 の発現と RNAI を用いた AnnexinA3 発現抑制に DNA 合成の阻害 第12回 肝細胞研究会 (2005年)
- [5] 伊東由真、吉田麻衣子、柳めぐみ、長友俊介、原島 瑞、関泰一郎、有賀豊彦、新見伸吾、川西 徹、早川堯夫、2-AAF/CCl₄ を用いた肝幹細胞分化誘導モデルラットにおける肝再生と AnnexinA3 の発現 第12回 肝細胞研究会 (2005年)

2. 論文発表

- 1) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T.,

Kawanishi, T., Hayakawa, T. Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. J. Biochem (Tokyo) 137, 579-586 (2005)

- 2) Niimi, S., Harashima, M., Gamou, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. Expression of annexin A3 in primary cultured parenchymal rat hepatocytes and inhibition of DNA synthesis by suppression of annexin A3 using RNA interference. Biol. Pharm. Bull. 28, 424-428 (2005)
- 3) 新見伸吾、原島 瑞、川西 徹、早川堯夫、抗体医薬の現状と展望、医薬品研究、36, 163-193 (2005)
- 4) 新見伸吾、原島 瑞、川西 徹、日向昌司、野間誠司、川西 徹、早川堯夫、肝幹細胞に関する研究の現状と肝疾患の細胞治療への応用の展望、医薬品研究、36, 481-496 (2005)
- 5) 後藤洋子、新見伸吾、ラクトース修飾絹フィブロイン基材上の初代培養ラット肝細胞の形態および機能に及ぼすインスリンとデキサメタゾンの作用、高分子論文集 (Kobunshi Ronbunshu)、62, 326-330 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案 なし
3. その他 なし

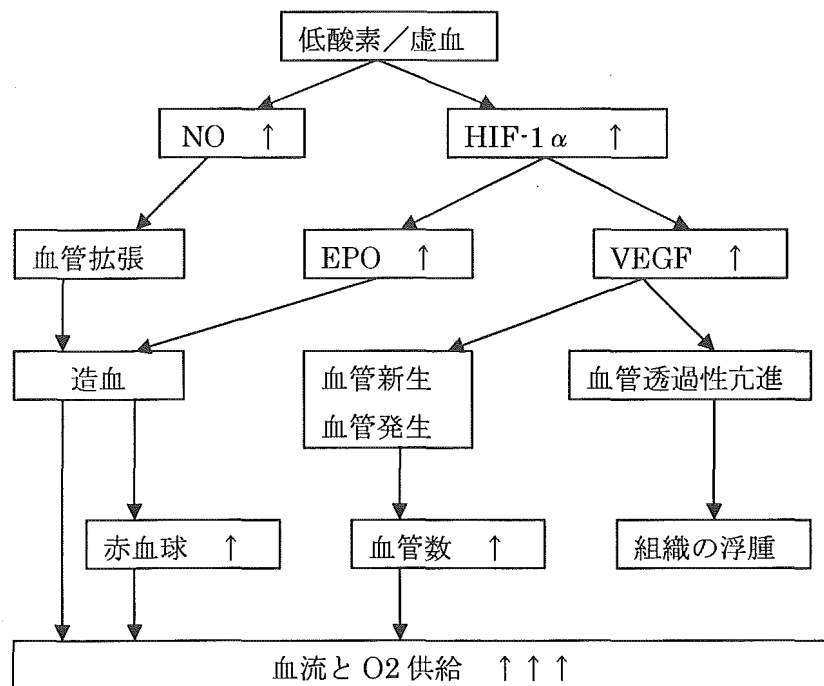


Fig. 1 虚血に対する組織の反応
(参考文献 3 を元に一部改変)

Table 1 増殖因子が neovascularization (血管新生)の各プロセスに及ぼす作用

	血管新生	動脈形成	血管発生
VEGF-A	+	+	+
FGF-2	+	+	+
HGF	+	+	?
MCP-1	+	+	?
TGF-β	+	+	+
GM-CSF	?	+	+
PDGF-BB	+	+	?

(参考文献 3 を元に一部改変)

Table 2 血管新生療法としてたん白質を用いた臨床試験

たん白質	試験の種類	試験のタイプ	N	デリバリー	結果
FGF-1	フェーズ I OL	CABA 補助療法	20	IM 注射	安全、投与部位における毛細血管紅潮
FGF-2	フェーズ I OL	CABA 補助療法	8	へパリン・アルギン酸	安全
FGF-2	フェーズ I/II DBR	CABA 補助療法	24	へパリン・アルギン酸	虚血域サイズの低下、3年間効果持続
FGF-2	フェーズ I OL、投与量決定、 ブラセボコントロール	単独療法	25	IC 注入	耐性、低血圧
FGF-2	フェーズ I OL、投与量決定	単独療法	52	IC 注入	安全、高投与量で低血圧 狭心症、心筋かん流の改善
FGF-2	フェーズ II DBR	単独療法, FIRST 試験	337	IC 注入	ETT あるいは SPECT において安全/無効 ブラセボと比較し症状の短期間改善
VEGF-A ₁₆₅	フェーズ I OL	単独療法	15	IC 注入	低投与量で低血圧、SPECT による障害サイズの低下
VEGF-A ₁₆₅	フェーズ I OL	単独療法	14	IV 注入	安全、明らかに効果無し
VEGF-A ₁₆₅	フェーズ II DBR	単独療法 VIVA 試験	178	IC + IV 投与	コントロールと比較し、ETT、症状、SPECT における 改善無し
GM-CSF	フェーズ I/II DBR	単独療法	21	IC + IV 注入 2週間 注入	GM-CSF グループにおいて側副フローインデックス(流動指数)の改善

(参考文献 1,2 を元に一部改変) IM (intramuscular)(筋肉内)、 OL (open label) (非盲検)、 DBR (double-blind randomized)(無作為二重盲検)、

IC (intracoronary) (冠動脈内)、 IV (intravenous) (静脈内)、 SPECT (single photon emission computed tomography) (単光子放出コンピュータ断層撮影)

Table 3 血管新生療法として遺伝子治療を用いた臨床試験

増殖因子	試験の種類	試験のタイプ	N	デリバリー	結果
VEGF	単独療法	フェーズ I	5	プラスミド (VEGF ₁₆₅)、IM	安全、心筋かん流の改善
	単独療法	フェーズ I	20	プラスミド (VEGF ₁₆₅)、IM	安全、症状の改善
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I	13	プラスミド (VEGF ₁₆₅)、IM	安全、心筋かん流の改善
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I	6	プラスミド (VEGF-2) IM	安全、実行可能
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I / II 決定、ブラセボコントロール	29	プラスミド (VEGF-2) IM	安全、狭心症のクラスの下
FGF	CAGB 補助療法/単独療法	フェーズ I	21	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁) IM	耐性、
	血管形成術およびステント挿入 KAT 試験に付随して実施	フェーズ II DBR	103	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁) あるいはプラスミド リポソーム (VEGF ₁₆₅) 局所 IC	安全、臨床的再狭窄率における違い無し、Ad-VEGF グループにおける心筋かん流の改善
	単独治療 AGENT 1 および 2 試験	フェーズ I DBR、漸増用量、ブラセボコントロール	131	アデノウイルス (FGF-4) IC	安全、副作用無し、ETT,かん流改善の傾向

(参考文献 2 を元に一部改変)

Table 4 血管新生療法として細胞を用いた臨床試験

細胞のタイプ	試験の種類	試験のタイプ	患者数	デリバリー	結果
自家未分画 BM 細胞	フェーズ I	CAGB 虚血心筋補助	5	IM	安全
	フェーズ I	選択の無い患者への単独治療	10	IM NOGA 法併用	実行可能
	フェーズ I 無作為コ ントロールと標準的な MI 治療との比較	単独治療 MI, ステントを用いた PCI BOOST 試験	60	IC	安全 LV 機能の改善
自家 BM 由来単核球細胞 (フィコリンにより分画) CD133+, CD34+, CD45+, CD117+ その他の前駆細胞 が混合された組成	フェーズ I、MI の標準 治療に対する比較	単独治療 MI, PTCA	20	IC	安全、改善
	フェーズ I	単独治療 虚血心筋	8	IM NOGA 法併用	安全
	フェーズ I OL 非無作 為コントロール	単独治療 虚血心筋	20	IM NOGA 法併用	安全、心筋かみ流改善
	フェーズ I 非無作為 コントロール	単独治療 MI, ステント血管形成術	20	IC	安全、改善
自家 BM 由来単核球細胞ま たは循環血液由来前駆細胞	フェーズ I 非無作為コ ントロール	MI, ステント血管形成術 TOPCARE-AMI 試 験	59	IC	安全、前駆細胞グループ との間において差無し
Ac133+BM 細胞	フェーズ I	CAGB 補助	6	IM	安全

(参考文献 2 を元に一部改変) MI (myocardial infarction) (心筋梗塞)、PCI (percutaneous coronary intervention) (経皮冠動脈インターベンション)、

PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty) (経皮経管冠動脈形成術)、LV (left ventricular) (左心室)

改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究

分担研究者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長

タンパク質医薬品の有効性・安全性向上、あるいは、新たな作用機構を有する医薬品の創出を目指して、改変型タンパク質医薬品の開発が進められている。本研究では、改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向として、日米 EU 三極における改変型タンパク質医薬品承認の状況と、それぞれの品目の特性を調査した。これまでに、アミノ酸配列改変型、糖鎖改変型、ポリエチレングルコール結合型、融合タンパク質に分類される改変型タンパク質医薬品が日米 EU で合わせて 20 種類承認されており、そのほとんどには、体内動態制御を目的とした改変が行われていた。タンパク質医薬品の品質・安全性確保における改変型タンパク質に特有の課題として、化学修飾工程を有する場合の特性解析、生物学的性質と免疫原性の評価の重要性を考察した。

A. 研究目的

組換えタンパク質医薬品は、高度な生物活性を持つ医薬品として現代の医療に欠かせない存在となっている。組換えタンパク質医薬品の魅力の一つは、アミノ酸配列や修飾構造の改変によって、望ましい薬効／体内動態プロファイルを目指して、合理的アプローチによる改良を進められるところにある。これまでにインスリンやインターフェロン等で改変型医薬品が開発され、患者の *quality of life* の向上にも大きく貢献してきているが、今後は、疾患関連タンパク質の同定や、分子進化法などによる人工タンパク質作製技術の開発、医薬品としての有効性・安全性を向上させるためのタンパク質体内動態制御技術の進歩等を背景に、改変型タンパク質性医薬品の創出がこれまで以上に加速されると予想される。

従来、タンパク質性医薬品は、生体由来試料から精製されて用いられていた血液凝固因子

や、組換え医薬品として最初に承認されたインスリンのように、生体が本来発現しているものを補うためのものであった。天然に存在するタンパク質と同等のものとして製造されたタンパク質医薬品では、その作用プロファイルはほぼ明らかであり、一定の品質が確保されていれば、生体内に存在する濃度における一定の安全性も確保できると期待される。これに対して、天然のものとは異なる構造を持つ改変型タンパク質性医薬品では、改変の目的とした機能以外の特性にも変化がおよび、安全性への影響が生じる可能性も考えられることから、品質および安全性の確保においては、特段の配慮が必要になると考えられる。本研究では、改変型タンパク質医薬品の品質・安全性確保における課題を考察するため、開発の国際的動向として、日米 EU 三極における改変型タンパク質医薬品承認の動向と、それぞれの品目の特性に関する調査を行った。

ところで、遺伝子組換え技術を応用して製造されるタンパク質が天然のものと比較して完全に同じ構造を持つということは、糖鎖を持たない単純タンパク質においてのみ考えることである。医薬品として用いられているタンパク質の多くは糖タンパク質であるが、糖タンパク質の場合は、タンパク質を発現する細胞の種類によって付加される糖鎖の構造が異なる上に、糖鎖の構造に著しい不均一性が存在するため、生体由来タンパク質と組換えタンパク質で、糖鎖を含めた構造が完全に一致することは現実的には有り得ないことと考えられる。しかしながら、このように、組換えタンパク質において機能的差異を目的とせず生じる天然のタンパク質との差異は、本研究では改変として取り扱わないこととする。本来は糖タンパク質であるものを、機能的差異が生じないという根拠に基づいて糖鎖非修飾体として製造して用いる場合も、改変体としては取り扱わないこととする。また、天然のものと同等の活性を期待する場合でも、特許対策や技術的理由によりいくつかのアミノ酸残基が置換あるいは付加されている場合もあるが、そのような場合も機能的改変を意図していないと考えられることから、改変体としては取り扱わないこととする。つまり、本研究では、改変型タンパク質として、機能的改変を意図してアミノ酸あるいは修飾構造を変化させたタンパク質を取り扱うこととしたい。また、改変型タンパク質の代表例の1つであるヒト化モノクローナル抗体やその修飾体については、現状と問題点に関して、本研究班の平成15年度報告書で詳細な内容が報告されているため割愛した。

B. 研究方法

改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向を、米国食品医薬品庁 FDA [1]、米国 Biotechnology Industry Organization [2]、欧

州医薬品審査庁 EMEA [3]、European Commission – Enterprise and Industry DG – Pharmaceuticals [4]、医薬品医療機器総合機構[5]の医薬品に関するサイト、および、文献 [6,7]を参考に、調査した。

C. 研究結果

C-1. 改変型タンパク質開発の国際的動向

これまでに、米国、EU、あるいは日本で承認された改変タンパク質医薬品を、アミノ酸置換型、糖鎖改変型、ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol: PEG) 結合型、融合タンパク質に分類し、それぞれの名称、各極で承認された時期、改変部位の特徴、改変の目的、適応疾患などについて Table 1 にまとめた。

Table 1 あげた 20 種類のうち、米国では 17 種類、EU では 15 種類、日本では 10 種類が承認されている。我が国でのみ承認されているものとして、改変型 t-PA のパミテプラゼ、改変型 G-CSF のナルトグラスチムの 2 種類があるが、欧米でのみ使用されていて我が国では未承認のものは 10 種類であった。欧米で承認され、その後我が国でも承認された 8 品目について、欧米での承認後に我が国での承認までに要した年数は平均 3.75 年であった。

タンパク質に改変が施される場合、目的は大きく 2 つあると考えられる。1 つは、**pharmacodynamics** に関わる改変、すなわち、標的分子との親和性や特異性の上昇、特定の機能の分離など、薬効に関わる機能そのものの改良。もう 1 つは、**pharmacokinetics** に関わる改変、すなわち、血中滞留性の改善や、標的指向性の付与など体内動態の改良である。これまでに承認された改変型タンパク質医薬品では、後者の体内動態制御に関わる改変が施されている例が多く、融合タンパク質を含めた 20 種類のうち 18 種類では、体内動態の制御に関する機能が付与されていた。タンパク質の体内動態

を制御することにより有効性・安全性の向上を期待する試みが、これまでのタンパク質改変の主要な目的であったことが推察される。

実際の例として、アミノ酸配列を改変した速効型あるいは持続型のインスリン、PEG 結合型インターフェロンなどは、ドラッグデリバリーシステムの改良を加えることで患者の QOL 向上やコンプライアンスの改善に大きく貢献している。糖鎖構造を改変したイミグルセラゼは、改変によって初めて標的細胞内へのタンパク質の送達が可能になり、医薬品として応用された例である。新たなタンパク質医薬品として設計された融合タンパク質においても、標的細胞へのターゲティングや血中濃度維持のためのタンパク質ドメインが用いられており、これらも DDS 的な機能付与が改変型タンパク質医薬品の新規開発において重要であることの表れであると考えられる。

以下、それぞれの改変型タンパク質医薬品の特性について述べる。

C-2. アミノ酸改変体

改変型インスリン

<速効型インスリン>

インスリンは、生理的濃度 (10^{-10}M) では単量体で存在しているが、製剤中の濃度 (10^{-3}M) では主として二量体あるいは六量体となっている。皮下あるいは筋肉に投与されたインスリンが血中に移行するには、多量体から解離して単量体になる必要があるため、患者は食事の 30 分以上前にインスリンを打つことを余儀なくされていた。食事時間を常に事前に確定させることは社会生活を送る上では困難な場合も多く、また、投与後に予定どおり食事がとれない場合は低血糖に陥る危険などがあるため、食事の直前或いは直後に投与可能な速効型インスリンの開発が望まれていた。

インスリン分子同士の会合に関わる部分は B 鎖の C 末端付近であるため、この領域のア

ミノ酸を改変することで、投与後速やかに血中に移行することのできる速効型のインスリンが開発できると考えられた。しかし、この領域のアミノ酸を置換する当初の試みは成功せず、insulin like growth factor-1 (IGF-1)の構造にヒントを得て、最初の改変インスリンが生まれている。IGF-1 はその名のとおりインスリンに類似した構造を持ち、IGF-1 の A 鎖 B 鎖に存在するアミノ酸の 50%は対応する位置のインスリンのアミノ酸に一致している。しかし、IGF-1 はインスリンのように分子間で会合体を形成しない。そこで、インスリン B 鎖の 28 番目の Pro と 29 番目の Lys が IGF-1 では逆になっている点に着目し、B28Pro と B29Lys を逆にしたインスリン (B28Lys, B29Pro) が作製されたところ、速効性の血糖降下作用を示すことが分かった。こうしてできたのが、最初の改変型インスリン Insulin lispro である。

Insulin lispro インスリン リスプロ

改変部位：B 鎖 28 番目 Pro→Lys, B 鎖 29 番目 Lys→Pro

製造用宿主：大腸菌

特徴：食事の直前に投与される速効型インスリン。多量体形成が抑制される結果、投与後に速やかに血中に以降する。多量体形成の抑制は、プロリン残基を移動させることにより、分子間の疎水結合形成が減ったためと考えられる。

Insulin Aspart インスリン アスパルト

改変部位：B 鎖 28 番目 Pro→Asp

製造用宿主：酵母

特徴：食事の直前に投与される速効型インスリン。インスリンリスプロと同様、B 鎖 28 番目の Pro を置換することにより分子間の疎水的相互作用が抑制され、多量体形成が抑制される結果、速やかな血中への移行を実現した改変体。

Insulin Glulisine

改変部位：B鎖3番目 Asn→Lys, B鎖29番目 Lys→Glu

製造用宿主：大腸菌

特徴：多量体形成の抑制により、血中への速やかな移行が可能な速効型インスリン。

<持続型インスリン>

健常人では、インスリンは血糖値の上昇に応じて分泌されるのみでなく、定常的に低濃度のインスリンが分泌されている。従って、糖尿病の治療においては、健常人でみられるベースラインレベルのインスリンを維持するために、速効型と持続型のインスリンの併用が行われる。インスリンの持続性を増すためには、製剤に亜鉛やプロタミンを添加する手法が用いられてきたが、血中インスリンレベルの推移が一定でなくピークが存在することや、患者間での吸収のばらつきが大きいといった問題があった。これらの問題を解決すべく、等電点の変化による投与部位からの徐放、あるいはアルブミン結合性の付与により投与部位からの徐放と血中濃度の持続を実現した改変体が開発されている。

Insulin Glargin インスリン グラルギン

改変部位：B鎖のC末端に Arg2 個付加、A鎖のC末端の Asp→Gly

製造用宿主：大腸菌

特徴：アミノ酸置換により等電点がインスリンの pH 5.4 より中性側 (pH 6.7) にシフトしている。製剤の pH が 4.0 であるため製剤中では **Insulin Glargin** 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にインスリンの微細な沈澱が生じる。個々のインスリン分子は、その沈澱からゆっくりと再溶解されて循環血中に入るため、血中にインスリンを持続的に供給することが可能となっている。

Insulin Detemir インスリン デテミル

改変部位：B鎖30番目 Thr 欠損、B鎖29番目 (C末端) Lys の ε アミノ基に C14 脂肪酸 (ミリスチン酸) が結合

製造方法：酵母で生産されたタンパク質に、化学修飾によりミリスチン酸を結合

特徴：分子間会合による多量体形成とアルブミンへの結合のために投与部位から血中に徐放される。また、アルブミンとの結合のために、血中滞留性が向上している。比活性はインスリンの 1/4。

改変型 tissue-plasminogen activator (t-PA)

天然の t-PA は、血管内皮細胞から産生されるセリンプロテアーゼであり、限定分解により plasminogen を活性化して、fibrin 分解活性を持つ plasmin を生成させることにより血栓溶解反応を開始させる。t-PA は、Finger ドメイン (フィブリンへの高親和性結合に関与)、Protease ドメイン (プラスミノゲンの特異的な切断に関与)、EGF ドメイン (肝臓にある受容体との結合とそれによる血中からの消失に関与)、Kring1 ドメイン (肝臓への結合に関与)、Kring2 ドメイン (フィブリンに促進されるプロテアーゼ活性に関与) の 5 つの機能ドメインを有している。天然型 t-PA の血中半減期は約 3 分と非常に短いために、点滴による持続投与が必要であるのに対して、血中半減期の長い改変体では、単回投与が可能となっている。天然の t-PA は糖鎖修飾されており、糖鎖は肝臓への取り込み、血中からの消失に関わっている。

Retepase

改変部位：t-PA のドメインのうち、P ドメイン (プロテアーゼドメイン) と K2 ドメイン (Kring2 ドメイン) の 2 つのドメインのみからなる。

製造用宿主：大腸菌

特徴：糖鎖がないこと、および、EGF ドメイ

ン、K1 ドメインがないことにより、血中半減期が 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、F1 ドメインの欠損によりフィブリン親和性が減少する結果、本薬が血栓の奥まで浸透できるようになり、血栓の速やかな溶解が可能となった。

Tenecteplase

改変部位：P ドメインと K1 ドメインに 3 箇所のアミノ酸置換

製造用宿主：CHO 細胞

特徴：血中半減期の長い改変型 t-PA。フィブリン親和性および、t-PA の阻害因子 plasminogen activator inhibitor-1 への抵抗性が上昇している。

Pamiteplase パミテプラーゼ

改変部位：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

製造用宿主：CHO 細胞

特徴：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はフィブリンにより顕著に増強される。天然型 t-PA と比較して血中半減期が延長されている。

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

改変部位：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、各位置の出現頻度が最も高いアミノ酸に置換。

製造用宿主：大腸菌

特徴：インターフェロンアルファに比較して高い抗ウイルス活性、NK 細胞およびマクロファージ活性化などの免疫賦活作用、腫瘍細胞の増殖抑制作用を示す。

改変型顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)

Nartograstim ナルトグラスチム

改変部位：N 末端側から 1、3、4、5、17 番目のアミノ酸が Ala, Thr, Tyr, Arg, Ser に置換されている。

製造用宿主：大腸菌

特徴：非改変型の G-CSF と比較して、約 3 倍の比活性を示す。また、In vitro 試験により、血漿中での安定性が天然型 hG-CSF (糖鎖非結合) と比較して高いことが示されており、N 末端の置換により立体構造が安定化した結果、プロテアーゼに対して耐性になったものと考えられている。

C-3. 修飾構造改変タンパク質

アミノ酸置換による改変の他、いわゆる Post-translational engineering も盛んに試みられている。タンパク質に化学修飾を行うもの、糖鎖部分の構造を改変したもの、アミノ酸置換により糖鎖修飾部位を増やした改変体などが開発されている。PEG 化や糖鎖修飾部位の増加により血中半減期が延長された改変型タンパク質では、改変を加えないものと比較して投与回数を減らすことができ、患者の負担軽減やコンプライアンス改善に貢献している。

C-3-1. 糖鎖構造改変型

糖鎖改変型グルコセレブロシダーゼ

Imiglucerase イミグルセラゼ

改変部位：グルコセレブロシダーゼの糖鎖末端のシアル酸を除去

製造方法：CHO 細胞で生産された組換えタンパク質をエキソグリコシダーゼで処理

特徴：ゴーシェ病は、糖脂質分解に関わるリソソーム酵素グルコセレブロシダーゼ活性の遺伝的な欠損によるものであり、組織性マクロファージに変化が最も顕著に現われる。グルコセレブロシダーゼをエキソグリコシダーゼで処理することにより、糖鎖末端のシアル酸を除去し、マンノース残基を露出させる結果、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マクロファージに取り込まれ、細胞内に薬が送達される。改変していないグルコセレブロンシダーゼを投与した場合は、肝臓に取り込まれ、血中から速やかに消失する。

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
改変部位：アミノ酸置換により、ヒト erythropoietin (EPO) に N 型糖鎖結合部位を新たに 2 つ導入した改変体。

製造用宿主：CHO 細胞

特徴：非改変型の EPO と比較して N 型糖鎖結合部位が 2 箇所多く、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。糖鎖が増えることにより血中半減期が延長され、週 1 回の投与が可能となった。

C-3-2. PEG 結合型

PEG 結合型インターフェロン

インターフェロンの血中半減期は 3~5 時間程度である。インターフェロン療法では週 2 回の投与が必要であったが、PEG 化により血中半減期が 24 時間程度にまで延長され、週 1 回の投与が可能になった。

Peginterferon alfa-2a ペグインターフェロン アルファ-2a

構造：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 箇所、1 分子の分枝ポリエチレングリコール（分子量約 40kDa、2 つの約 20kDa のモノメトキシポリエチレングリコール鎖がカルボキシリジンに結合したものが、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 60K）。

製造方法：組換えタンパク質を化学修飾

特徴：血中半減期が非 PEG 修飾型インターフェロンの約 10 倍に延長され、投与頻度を減ら

すことが可能となった。

Peginterferon alfa-2b ペグインターフェロン アルファ-2b

構造：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 及び Lys¹⁶⁴)の 1 箇所に 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 12K）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 32K）。

製造方法：大腸菌で生産された組換えタンパク質を化学修飾

特徴：PEG 修飾により高分子化されることによって、主として腎からの排泄が抑制され、生体内での保持時間が長くなることにより持続的な体内動態を示す。非 PEG 修飾型インターフェロン製剤と比べて投与回数を減らすことが可能。

PEG 結合型 G-CSF

Pegfilgrastim

構造：フィルグラスチムの N 末端アミノ酸に、20kDa の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が 1 分子結合。

製造方法：大腸菌で生産されたタンパク質を化学修飾

特徴：PEG 化によってフィルグラスチムの腎クリアランスを減少させることにより、持続性とした改変体。

PEG 結合型成長ホルモン誘導体

Pegvisomant ペグビソマント

構造：Human growth hormone (hGH) のアミノ酸配列を 9 箇所置換し、アミノ酸残基 (Phe¹, Lys³⁸, Lys⁴¹, Lys⁷⁰, Lys¹¹⁵, Lys¹²⁰, Lys¹⁴⁰, Lys¹⁴⁵, Lys¹⁵⁸) に hGH 誘導体 1 分子あたり、4~6 個の PEG（分子量 5K）が結合している。

製造方法:大腸菌で生産されたタンパク質を化学修飾

特徴: Human growth hormone (hGH) のアミノ酸配列を9箇所置換し、hGH受容体への結合能を有するものの細胞内応答は惹起しない誘導体にPEG化を施した改変体。内因性hGHの受容体への結合を阻害する。hGH誘導体1分子あたり、4~6個のPEG(分子量5K)がLys残基に結合しており、PEG化により血中半減期の延長が図られている。hGHの過剰分泌が原因でおこる内分泌疾患である先端巨大症に用いられる。

C-4. 融合タンパク質

複数のタンパク質ドメインを融合させた人工タンパク質は、新しい作用機構を有する医薬品として、いわゆる rational approach により創出された医薬品と言える。これまでに4種類が医薬品として承認されているが、いずれも、2種類のタンパク質ドメインのうち、1つのドメインが薬効を担い、もう1つのドメインが主に体内動態制御に関わっている。

Denileukin Diftitox

構造: Interleukin2 (IL-2) の一部(2-133アミノ酸)と diphtheria toxin の一部(細胞傷害性ドメインと細胞内移行ドメイン 1-386、484-485アミノ酸)の融合タンパク質。分子量58K。

製造用宿主: 大腸菌

特徴: IL2由来ドメインにより標的細胞(IL2受容体発現リンパ腫細胞)へのターゲティングが行われ、細胞に結合した後、受容体リガンド複合体として細胞内に取り込まれる。ジフテリアトキシンによるタンパク合成阻害によって、細胞死が誘導される。

IL-2受容体として機能するCD25が発現している非ホジキン型リンパ腫の一種である皮膚T細胞リンパ腫に用いられる。副作用とし

て、IL2受容体を発現している活性化B細胞やT細胞、マクロファージにも作用してしまうため、感染症が起こる場合がある。

Etanercept エタネルセプト

構造: 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。分子量150K。
製造用宿主: CHO細胞

特徴: 細胞表面のTNF受容体へのTNFの結合を拮抗的に阻害することにより、炎症性サイトカインであるTNF α の阻害剤として働く。薬効を担うのは、TNF α への結合性を有するTNF受容体由来ドメインで、Fc部分は血中半減期延長の役割を持つ。関節リウマチに用いられる。

Alefacept

構造: 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。分子量91.4K。

製造用宿主: CHO細胞

特徴: CD2抗原を表面に発現しているTリンパ球に結合し、リンパ球の活性化を阻害する。Tリンパ球の細胞数減少も認められるが、その機構としては、AlefaceptのFc部分がNK(Natural Killer)細胞などFc受容体を有する細胞傷害性の細胞とT細胞を架橋するためと考えられている。中程度から重症の乾癬に用いられる。

Abatacept

構造: 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。分子量92K。

特徴: 抗原提示細胞上に存在する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。T細胞の機能抑制効果を有する新しいタイプのリウマチ

治療薬であり、2005年12月に米国で承認された。TNF α 阻害剤などこれまでの治療薬が効かない症例での効果が期待されている。

D. 考察

D-1. 改変型医薬品の品質・安全性確保

タンパク質医薬品の品質・安全性確保における改変型タンパク質に特有の課題として、化学修飾工程を有する場合の特性解析、および、生物学的性質と免疫原性の評価の重要性を取り上げ、以下に考察する。

化学修飾工程を有する場合

タンパク質医薬品の品質・安全性は製造方法の影響を大きく受ける。従って、遺伝子組換え、細胞培養、タンパク質精製からなる通常の組換えタンパク質の製造工程に加えて、PEG化、脂質修飾などの化学修飾工程が加わる場合は、修飾に関連する項目についての評価が品質・安全性確保のポイントとなると思われる。ここではPEG化を例に、化学修飾工程を有する場合の品質・安全性確保について考察する。

PEG化反応はタンパク質の部位特異的なものではなく、1種類あるいは数種類のアミノ酸にPEGが導入されるものである。従って、PEG化反応後のタンパク質はPEG化された部位、導入されたPEG分子数のいずれにおいても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、PEG修飾位置異性体の混合物となる。従って、物理的・化学的性質として、分子量、PEG結合分子数、PEG結合部位、PEG修飾位置異性体の構成比などを解析し、目的物質や目的物質関連物質の構造を明確にすることが重要になると思われる。生物学的性質の点では、PEG修飾位置異性体ごとの生物活性や体内動態、PEG非修飾体との比活性の比較も、明らかにすべき特性である。不純物については、製造工

程由来不純物として、PEG化反応の工程で用いられる試薬を評価項目に加え、目的物質由来不純物としては、PEG非結合型となった遊離のタンパク質や、生物活性の異なるPEG修飾位置異性体を評価すべきであると思われる。修飾反応条件が、修飾部位異性体の構成比に大きく影響し、原薬の生物活性にも影響を与えると予想されることから、製品の品質の一定性を確保するためには、PEG化反応の条件、精製工程などが厳密に管理されなければならないと考えられる。また、工程管理の中では、PEG化反応に用いられる各種試薬の品質管理なども必要であろう。

生物学的性質等

改変型タンパク質医薬品が単純タンパク質あるいは糖タンパク質であり、特別な加工工程を経ない場合、その物理的・化学的性質については、通常の組換えタンパク質と同様の特性解析を行うことで評価が可能であると考えられる。しかし、改変型タンパク質医薬品の生物学的性質に関しては、改変目的とされた機能以外も変化している可能性が十分あり、安全性に影響がおよぶ場合もあると考えられるため、生物活性、体内動態、がん原性などについて、できる限り詳細な解析が必要であると考えられる。

一例を挙げると、持続型のインスリン改変体であるインスリン グラルギンでは、インスリン受容体との親和性はインスリンと差異がないものの、インスリン様成長因子 IGF-1 受容体との結合親和性がインスリンの6~8倍であると報告されている[8]。げっ歯類を用いた24ヶ月間反復投与の発がん性試験により、インスリン グラルギンは発がん性を有しないと判断されており[9]、IGF-1 受容体への高親和性結合と安全性との関連は明らかでないが、このような特性をもつタンパク質の場合は、市販後調査等により長期投与の安全性について検証する必要があると思われる。

一方、医薬品ではないが、B鎖10番目のHisをAspに置換し、インスリン受容体との親和性が亢進した改変インスリンでは、ラットで乳腺腫瘍の発生が報告されている[10,11]。1アミノ酸の置換により発がん性が生じることを示す例であり、改変による生物学的性質の変化が安全性に大きく影響する可能性があることを認識する必要があると思われる。生物活性の評価は、評価項目ごとに試験の設定が必要であるが、想定外の変化がある場合も予想されることから、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析などの網羅的解析手法を用いた評価も有用と考えられる。

免疫原性

アミノ酸置換などにより改変を加えた場合に必ず懸念されるのが、免疫原性の問題である。しかし、タンパク質医薬品の免疫原性は、タンパク質の一次構造のみで決定されるわけではなく、製剤中の目的物質の凝集体や製造工程由来不純物、添加物、投与経路、投与量なども影響する[12]。また、癌患者のように免疫機能の低下した患者では抗体が出現しにくく、免疫機能の亢進した患者では抗体が産生されやすい、血友病患者のように遺伝子に欠損のある場合は対応するタンパク質の抗体が産生されやすい、といった患者側の要因も変動要素として加わる。さらに、ヒトに対する免疫原性は動物実験で評価することができず、臨床試験に入ってから評価となる、といった事情により、タンパク質医薬品の免疫原性は予測が難しく、医薬品開発の早い段階での評価が困難になっている。しかし、天然型の組換えタンパク質医薬品においても免疫原性が問題になる例もあり[13]、天然にはない構造を持つ改変型のタンパク質医薬品では、免疫原性に十分な注意を払う必要があると考えられる。これまでの事例で特に目立った免疫原性が報告されているのは、菌体由来タンパク質であるジフテリアトキシン

のドメインを持つ Denileukin Diftitox で、3回目の投与後には97%の患者で抗体が検出され、抗体の影響により当該タンパク質のクリアランスが亢進していると報告されている。

タンパク質医薬品の免疫原性の問題が難しい原因の一つは、先に述べたような免疫原性を決定する要因の複雑さにあるが、無視できないのが評価系の問題である[14]。抗体の存在は、RIA (Radioimmunoassay) や ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) のような免疫学的測定法や、目的タンパク質に対する中和活性を評価するバイオアッセイを用いて評価されるが、抗体陽性患者の割合に関するデータは、アッセイ系の感度と特異性に依存する。また、血中に残存する医薬品タンパク質や、サンプリングの時期、サンプルのハンドリングなどにも影響を受けるため、異なるラボや異なる臨床試験の結果を相互比較することは容易ではない。独立して行われた試験で明らかにされた抗体出現率を比較して、タンパク質ごとの免疫原性の強弱を論じることが難しいと考えられる。

投与したタンパク質医薬品に対して抗体が産生された場合、中和抗体は目的タンパク質の効果を減弱させ、その他の抗体は目的タンパク質の体内動態に影響する。改変型タンパク質ではなく、エリスロポエチンやトロンボポエチンの例であるが、産生された抗体が、投与されたタンパク質と同様の構造を持つ生体内タンパク質の作用や体内動態にも影響を与えて深刻な副作用を起こす事例が報告されており[15]、免疫原性の問題はやはり重要であると思われる。ヒトでの免疫原性の予測についての方法論の確立、抗体出現を適切に評価するための方法の標準化や標準物質の策定などが望まれる。文献からは、米国で抗体検出法の標準化に向けた検討が行われている様子が伺われるが[16]、古くから新しい問題と言われるタンパク質の免疫原性について、評価方法の開発・標準化に関する

る国際的動向を今後もフォローしていきたい。

D-2. 今後の開発動向

これまでに承認されている改変型タンパク質では、点突然変異導入法により天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列を一部置換したもののや、タンパク質の大きなドメインを用いたものであった。今後は、今までの方向の延長での開発が進められる他、分子進化法などを用いて、より人工的なタンパク質も創製されると予想される。

アミノ酸改変体では、特定部位のアミノ酸配列を個別に置換していく従来の手法とは異なり、フェージディスプレイ法、リボゾームディスプレイ法などの分子進化法により、特定の結合特異性を示す分子をスクリーニングすることによって、新たな機能性人工タンパク質を創製しようとする試みが進められている。フェージディスプレイ法を用いてスクリーニングされた改変型 TNF では、部位特異的 PEG 修飾を可能とする Lys 欠損型改変体や、高比活性を示す改変体が創出されている[17]。リボゾームディスプレイ法では、アンキリンリピートを基本とした人工タンパク質分子の作製に成功した例が報告されており[18,19]、より人工的な構造を持つタンパク質医薬品が開発されていく可能性が感じられる。

近年は糖タンパク質糖鎖の構造・機能解析研究の進展が著しく、糖鎖含有タンパク質医薬品の有効性・安全性の向上を目指して、タンパク質の糖鎖を改変する試みが進んでいる。抗体に結合している N 結合型糖鎖のフコース含量と抗体の細胞傷害活性 (Antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC 活性) に逆相関があることが明らかになり、フコース低減により ADCC 活性を増強した糖鎖改変型抗体の開発が進められている[20-22]。また、糖鎖合成関連遺伝子を組み換えた酵母を用いて、高い ADCC 活性を持つ抗体の生産に成功した例も

報告されており[23]、糖タンパク質生産の新技术という側面とも合わせて興味深い。

新たな医薬品タンパク質のデザインとしては、Fc ドメインを融合させたタンパク質が既に 3 品目承認されており、Fc ドメインをタンパク質の血中濃度維持のために利用する方法の有用性が確立されつつある。これを改良して、2 種類のサイトカイン受容体と Fc ドメインを融合させることにより、サイトカインとの高親和性結合を実現したサイトカインの阻害タンパク質 (サイトカイントラップ) も報告されている[24]。

Fc 含有タンパク質の血中半減期が他のタンパク質と比べて長い理由は、Fc 受容体 FcRn を介したリサイクリング機構にあるとされているが、FcRn は IgG (Fc 含有タンパク質) の血中濃度維持の他、局所でのタンパク質輸送にも関わっていることが報告されている[25]。これを利用して、Fc 融合タンパク質の経肺投与が可能であることが報告されており[26,27]、注射以外での投与が可能なタンパク質として注目される。

タンパク質医薬品はこれまでの実績の上でバイオ医薬品の中核となるものであり、今後もその位置付けには変わりがないと思われる。それを裏付けるように、米国研究製薬工業協会 (The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America; PhRMA) に加盟している企業が開発中のバイオ医薬品 324 品目のうち、11 品目が遺伝子治療薬、14 品目が核酸医薬品で、その他、すなわち開発品目全体の 9 割はタンパク質性医薬品であると報告されている[28]。ゲノミクス、プロテオミクス、グライコミクス等の進展を背景に、機能的改変を施したタンパク質医薬品は、今後さらに増加することが予想される。タンパク質の持つ力に人の知恵を加えた改変型タンパク質医薬品が、多くの患者への福音となり、健康的な生活が実

現するよう、品質・安全性確保に関連する行政支援研究の課題を今後も考えていきたい。

E. 参考文献

- 1) http://www.fda.gov/cder/biologics/biologics_table.htm.
- 2) <http://www.bio.org/speeches/pubs/er/approveddrugs.asp>.
- 3) <http://www.emea.eu.int/index/indexh1.htm>.
- 4) <http://pharmacos.eudra.org/F2/register/alfregister.htm>.
- 5) http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/shinyaku_index.html.
- 6) Hayakawa, T., and Ishii, A. (2002). Trends and perspectives in development of Biologics produced by new technology (in Japanese). *IYAKUHIN KENKYU* 33: 693-729.
- 7) Walsh, G. (2004). Second-generation biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 185-196.
- 8) Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 151-159.
- 9) http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/g031003/78006900_21500AMY00131_Q100_1.pdf.
- 10) Dideriksen, L., Joegensen, L., and Drejer, K. (1992). Carcinogenic effect on female rats after 12 months administration of the insulin analogue B10 ASP. *Abstract. Diabetes* 41: 143A.
- 11) Drejer, K. (1992). The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. *Diabetes Metab Rev* 8: 259-286.
- 12) Schellekens, H. (2003). The immunogenicity of biopharmaceuticals. *Neurology* 61: S11-S12.
- 13) Schellekens, H., and Casadevall, N. (2004). Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. *J Neurol* 251 Suppl 2: II4-9.
- 14) Anderson, P., Louie, J., Lau, A., and Broder, M. (2005). Mechanisms of differential immunogenicity of tumor necrosis factor inhibitors. *Curr Rheumatol Rep* 7: 3-9.
- 15) Schellekens, H. (2002). Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 1: 457-462.
- 16) Mire-Sluis, A. R., et al. (2004). Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods* 289: 1-16.
- 17) Yamamoto, Y., et al. (2003). Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 21: 546-552.
- 18) Amstutz, P., et al. (2005). Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem* 280: 24715-24722.
- 19) Binz, H. K., et al. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* 22: 575-582.
- 20) Natsume, A., et al. (2005). Fucose removal from complex-type oligosaccharide enhances the

- antibody-dependent cellular cytotoxicity of single-gene-encoded antibody comprising a single-chain antibody linked the antibody constant region. *J Immunol Methods* 306: 93-103.
- 21) Niwa, R., et al. (2005). IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J Immunol Methods* 306: 151-160.
- 22) Niwa, R., et al. (2005). Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res* 11: 2327-2336.
- 23) Li, H., et al. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*
- 24) Economides, A. N., et al. (2003). Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* 9: 47-52.
- 25) Ghetie, V., and Ward, E. S. (2002). Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol Res* 25: 97-113.
- 26) Dumont, J. A., et al. (2005). Delivery of an erythropoietin-Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway. *J Aerosol Med* 18: 294-303.
- 27) Bitonti, A. J., et al. (2004). Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9763-9768.
- 28) van de Weert, M., Jorgensen, L., Horn Moeller, E., and Frokjaer, S. (2005). Factors of importance for a successful delivery system for proteins. *Expert Opin Drug Deliv* 2: 1029-1037.
- F. 健康危険情報
該当事項なし
- G. 研究発表
1. 論文発表、総説
Akira Harazono, Nana Kawanishi, Satsuki Itoh, Noritake Hashii, Akiko Ishii-Watabe, Toru KAWANISHI, and Takao Hayakawa: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 348, 259-268 (2006)
- 早川堯夫、石井明子 スタンダード薬学シリーズ 第 8 巻 医薬品の開発と生産 第 13 章 組換え医薬品 (SBO28 組換え医薬品の特色と有用性を説明できる、SBO29 代表的な組換え医薬品を列挙できる、SBO30 組換え医薬品の安全性を概説できる) (日本薬学会編、東京化学同人) P.98-P.103, 2005
2. 学会発表
石井明子、鈴木琢雄、小林 哲、山口照英、川西 徹:細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質の有用性評価 日本薬学会 第 126 年会 2006 年 3 月 仙台
- 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川西 徹: MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強 Part3 日本薬学会 第 126 年会

2006年3月 仙台

鈴木琢雄、桜井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：
Bioimaging of caspase activation during ER stress-induced cell death. 第79回日本薬理学会年会 2006年3月 横浜

鈴木琢雄、桜井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：小胞体ストレスによるカスパーゼ活性化のイメージング：第14回 日本バイオイメーキング学会 2005年10月 東京

Martin K Ng, Edwin Chang, Jenny Wu, Bing-yin Wang, Regina Katzenburg-Clark, Akiko Ishii-Watabe, John P Cooke : A Central Role for Nicotinic Cholinergic Regulation of Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration - Novel Insights into Angiogenesis. American Heart Association Scientific Sessions 2005 Nov. 13-16, 2005, Dallas

小林哲、河合洋、鈴木琢雄、石井明子、早川堯夫、川西 徹：MALDI-TOF MSにおけるタンパク質シグナルの増強 Part 2 質量分析総合討論会 2005年5月 埼玉

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし