

ーニングした (pOpti-VEC-FSH  $\alpha$  および pcDNA-3.3/Neo-FSH  $\beta$ , 図 2-1 A, 1B). 挿入方向は制限酵素のマッピングで確認するとともに, 挿入部分の塩基配列を確認した.

#### B. 2. 2 ヒト FSH $\alpha$ 鎖/FSH $\beta$ 鎖発現株の作製

ヒト FSH  $\alpha$  鎖発現ベクター pOpti-VEC-FSH  $\alpha$  および FSH  $\beta$  鎖発現ベクター pcDNA-3.3/Neo-FSH  $\beta$  を CHO-DG44 細胞 (Invitrogen) にリポフェクトアミン (Invitrogen) を用いて共導入した. 導入条件は製品の添付文書に従って行った.

遺伝子導入後, G418 (500  $\mu$ g/ml) およびメトトレキサート (50 nM) を添加した Opti-CHO 培地 (Invitrogen) で 2 週間セクションした後, 限界希釈法で 48 株クローン化した. メトトレキサート濃度を 500 nM まで順次増加させた.

#### B. 2. 3 ヒト FSH $\alpha$ 鎖/FSH $\beta$ 鎖の発現量の解析

各トランスフェクタントから Trizol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出し, ランダムヘキサマーをプライマーとして Superscript III キットを用いて cDNA を調製した. ヒト FSH  $\alpha$  鎖および FSH  $\beta$  鎖に特異的なプライマーを設計し, Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche) を用いてリアルタイム PCR を行った. Ct 値から相対発現強度を算出し, GAPDH の発現強度で補正することで各クローンにおける相対発現量を求めた.

#### B. 2. 4 ヒト FSH のウェスタンブロット

培養上清および組換えヒト FSH (フォリスチム, シェリングプラウ) を 12.5%SDS-PAGE で分離, PVDF 膜に転写後, 1 次抗体として抗ヒト FSH 抗体 (Leinco Technologies あるいはハイブリドーマ #57-5), 2 次抗体として Cy5 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) を用いて蛍光スキャナーで検出した.

#### B. 2. 5 抗ヒト FSH 抗体を産生するハイブリド

マの作製

ヒト下垂体から精製した FSH (MBL) を抗原としてマウスに免疫し, 抗体価が上昇したことを確認した後, 脾臓を取り出し, ポリエチレングリコール法でミエローマ細胞と融合させハイブリドーマを作成した. ハイブリドーマは限界希釈法でクローン化し, 抗原とした FSH を固定化したプラスチックプレートを用いた ELISA によって抗体産生を確認した.

#### B. 2. 6 抗ヒト FSH 抗体の評価

BIACORE を用いて, 組換えヒト FSH (フォリスチム, シェリングプラウ) を CM5 センサーチップに固定化し, ハイブリドーマ培養上清をインジェクトして結合させた. 溶離液として 0.5 M NaCl, 4 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M Gly-NaOH pH 10, 0.1 M citrate-NaOH pH 2.2 を順次インジェクトし, RU 値の減少から溶出量を推定した.

#### B. 2. 7 ヒト FSHR の発現ベクターの作製

ヒト FSHR 鎖 (NM\_000145) の cDNA は, Origene 社より入手し, 末端に Sgf I および Pme I 部位を持つプライマーを用いた PCR 法でコーディング領域全長を増幅して断片を得た. Sgf I および Pme I で消化したヒト FSHR 断片を, pF9A CMV hRluc-neo Flexi (Invitrogen) の Sgf I/Pme I 部位に組み込み, クローニングした後, (pCMV-FSHR-hRluc, 図 2-1 C) 挿入部分の塩基配列を確認した.

#### B. 2. 8 FSH 応答ルシフェラーゼ発現株の作製

CHO 細胞に cAMP レスポンスエレメント (CRE) をプロモーターに導入されたルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.29 (Invitrogen, 図 2-1 D) を導入し, ハイグロマイシン耐性を利用したセクションの後, 限界希釈法でクローン化した. CRE 応答ルシフェラーゼ発現株は, フォルスコリンを添加した際のルシフェラーゼ活性の誘導能を指標にスクリーニングした.

CRE 安定発現株に FSH のレセプター遺伝子発現ベクター-pCMV-FSHR-hRluc をさらに導入し、G418 耐性を利用したセクションの後、限界希釈法でクローン化した。FSHR 安定発現株は、FSH に依存したルシフェラーゼ活性の増加を指標にスクリーニングした。

#### B. 2. 9 FSH 応答ルシフェラーゼ発現株の評価

$2 \times 10^4$  cells/well の CFL2 の細胞に、FSH の濃度を 4IU から 9 段階の 4 倍希釈液をそれぞれ添加して 6 時間インキュベートした後、ピッカジーン試薬(東洋インキ)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。同じ実験を 4 回繰り返し実施し、X 軸に対数表示で濃度、Y 軸にバックグラウンドのルシフェラーゼ活性に対する相対活性をプロットした。得られた応答値から Excel のソルバーを用いてシグモイド曲線の近似式のパラメータから  $IC_{50}$  値を求めた。

#### (倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので、特に配慮を必要としていない。

### C. 結果と考察

#### C. 1. 最終製品の類似性評価

エポエチンは、ヒトエリスロポエチンと同一二次構造をもつ糖タンパク質で、分子内に 3 つの N 結合型糖鎖と一つの O 結合型糖鎖が結合している。主な糖鎖構造は、シアル酸が 4 分子結合したフコシル 4 本鎖糖鎖であり、一部の糖鎖に N-アセチルラクトサミン繰り返し構造が存在することが報告されている。日米欧では 1990 年前後にエポエチン アルファ先行品が承認され、最近になって欧州で INN のないエポエチン 3 製剤及び INN エポエチン ゼータ 2 製剤がバイオシミラーとして、また、日本において INN エポエチン カップ製剤がエポエチン アルファ製剤のバイオ後続品として承認された(表 1-2)。糖鎖が異なるエポエチンとしては、他にエポエチン ベータ、

epoetin delta、及び epoetin omega などが知られている。エポエチンの糖鎖は血中半減期に影響することから、先行品と後続品の類似性評価は重要である。

そこで、nanoLC/MS を糖鎖の類似性評価に応用することを目的として、まず、SDS-PAGE により、市販の製剤から添加剤等を含まないエポエチンタンパク質のみを分離した(図 1-1)。いずれの製剤も、概ね同様な分子量分布をもつエポエチンを含んでいることが確認された。つぎに、エポエチンを含むゲルバンドを切り取り、それぞれのゲルに PNGase F を作用させて N-結合型糖鎖を切り出した。LC 上でアノマーが分離されるのを避けるため、還元末端を  $NaBH_4$  で還元した後、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS により糖鎖プロファイリングを行った。

図 1-2 は、ネガティブイオンモードで測定した epoetin  $\alpha 1 \sim 4$ 、epoetin  $\beta$  及び epoetin  $\zeta$  (研究方法 B.1.1.参照)に由来する N-結合型糖鎖のプロファイルである。クロマトグラムはいずれも類似したパターンを示した。Epoetin  $\alpha 1$  の主な糖鎖の構造は、マスペクトルから、シアル酸が 4 分子結合したフコシル 4 本鎖であり、シアル酸部分に 1 ~ 5 個のアセチル基が結合していることが確認された(図 1-3)。この特徴的なアセチル化は、epoetin  $\alpha 2$  でも認められたが、epoetin  $\alpha 3$  及び  $\alpha 4$  ではアセチル化の程度が低く、epoetin  $\beta$  及び  $\zeta$  はほとんどアセチル化されていないことが確認された。

以上のように、nanoLC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、製剤中の糖タンパク質の糖鎖の類似性評価法として利用できることが示された。

#### C. 2. 製造工程評価

##### C. 2. 1 ヒト FSH を高発現する CHO 細胞株の樹立

FSH は下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンで、女性では、卵巣に作用して卵胞成長、排卵、及びエストロゲン合成を促進させる。男性では、精巣セルトリ細胞に作用して精子形成を促

す。ヒト FSH は 92 個のアミノ酸残基からなる  $\alpha$  鎖 1 分子、及び 111 個のアミノ酸残基からなる  $\beta$  鎖 1 分子から構成される。FSH と同じ一次構造をもつ医薬品として、ホリトロピン アルファ（効能：ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)との併用で、視床下部または下垂体前葉の機能及び器質的障害に由来する低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症患者を対象とした精子形成を誘導する）とフォリトロピン ベータ（効能：体外受精などの生殖補助技術を受ける患者を対象とした複数卵胞発育のための調節卵巣刺激に適応される）が承認されている。FSH の  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖にはそれぞれ 2 本の N-結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は血中半減期に影響する。FSH は、糖鎖の恒常性を保証する製造工程の設計や工程管理試験の策定のモデルとして適していると考えられたので、高発現が期待できるジヒドロ葉酸レダクターゼによる遺伝子増幅を利用した組換えヒト FSH 産生系を樹立することとした。

CHO-DG44 細胞にヒト FSH  $\alpha$  鎖発現ベクターおよび FSH  $\beta$  鎖発現ベクターを共導入し、G418 およびメトトレキサート耐性株 10 クローンを得た。各クローンの FSH  $\alpha$  鎖および FSH  $\beta$  鎖の発現量をリアルタイム PCR で解析し、高発現株 DGF-1.7 を得た（図 2-2）。DGF-1.7 細胞を 24 時間培養した上清について FSH レポータージーンアッセイを行った結果、200 IU/ml の FSH 活性が確認された。なお、この活性から含量を推定すると、組換え FSH であるフォリスチム 20  $\mu$ g/ml に相当する。また、ウェスタンブロットで確認した結果、予想された分子量が確認された（図 2-3）。

### C.2.2 抗ヒト FSH 抗体を産生するハイブリドーマの樹立

FSH は、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘテロダイマーを形成しており、酸性条件で不安定であることが知られている。そこで、アフィニティー精製に適した抗体として、中性領域で溶出可能な抗体を樹立することを目指した。ヒト下垂体から精製した FSH

を抗原としてハイブリドーマを作製し、ELISA によって抗体産生を確認し、51 株の陽性クローンを得た。さらに、BIACORE を用いて、アフィニティー精製用として中性領域のマグネシウム塩溶液で解離する抗体（塩溶出可能抗体）、ウェスタンブロット用抗体として酸性条件化で解離する抗体（酸溶出可能抗体）を産生するハイブリドーマクローンをスクリーニングした結果、塩溶出可能抗体および酸溶出可能抗体を産生するクローンが複数得られた。このうち抗体価が高かった 3 クローンおよび 2 クローンを再度クローン化して、酸溶出可能抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#57-5、および塩溶出可能抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#37-4 を得た（表 2-1）。抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#57-5 については、ウェスタンブロットに供し、検出可能であることを確認した（図 2-4）。

### C.2.3 FSH 活性測定用のレポータージーンアッセイ用細胞株の樹立

FSH は、そのシグナルの下流に cAMP を生じるため、CRE の応答で活性を定量化することが可能であり、CRE 応答ルシフェラーゼを利用することでレポータージーンアッセイが可能となる。ルシフェラーゼ発現ベクター-pGL4.29 を CHO 細胞に導入し、ハイグロマイシン耐性株 48 クローンを得た。ハイグロマイシン耐性株について、フォルスコリンによるルシフェラーゼ活性の誘導能を指標にスクリーニングした結果、CRE 応答ルシフェラーゼ発現株 CRE2 を得た（図 2-5）。CRE2 細胞に FSH のレセプター遺伝子発現ベクター pCMV-FSHR-hRluc をさらに導入し、G418 耐性株 48 クローンを得た。G418 耐性株について、FSH に依存してルシフェラーゼ活性が増加する株をスクリーニングし、FSH 応答ルシフェラーゼ発現株 CFL36 を得た（図 2-6）。予備的な検討結果であるが、このレポーター細胞を用いて、FSH の応答をソルバーによる非線形解析で評価した結果、極め

て良好なシグモイドの近似曲線が得られ、そのパラメータから本アッセイにより  $IC_{50}$  値が 20 mIU/ml (20 ng/ml 相当) 程度で FSH の検出が可能であることが確認された (図 2-7)。

以上のように、FSH 高発現を樹立し、精製用抗体を作製した。また、FSH 活性測定系を確立した。来年度は、nanoLC/MS 及び本活性測定法をベースとして、製造条件を変動させたときの糖鎖や活性の変化を、適時に測定できる手法の開発を行う予定である。

#### D. 結論

- 1) nanoLC/MS は、最終製品の糖鎖の類似性評価法として利用できることが確認された。
- 2) 工程設計及び工程管理に利用できる糖鎖恒常性評価技術を開発するためのモデルシステムとして、FSH 高発現株及び精製用抗体を作製し、FSH 活性測定法を開発した。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析. 第7回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム, 大阪(2009, 12)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1-1 日本で承認されている糖タンパク質医薬品(2010年1月現在)

G-CSF	レノグラスチム
M-CSF	ミリモスチム
インターフェロン	インターフェロン アルファ (NAMALWA), インターフェロン アルファ (BALL-1), インターフェロン ベータ, インターフェロン ベータ-1a, インターフェロン ガンマ-n1
エリスロポエチン	エポエチンアルファ, エポエチンベータ, ダルベポエチン アルファ
モノクローナル抗体	アダリムマブ, イブリツモマブ チウキセタン, インフリキシマブ, オマリズマブ, ゲムツズマブ オゾガマイシン, セツキシマブ, トシリズマブ, トラスツズマブ, バシリキシマブ, パリビズマブ, ベバシズマブ, リツキシマブ,
受容体	エタネルセプト
卵胞刺激ホルモン	ホリトロピン アルファ, フォリトロピン ベータ
性腺刺激ホルモン	ヒト下垂体性性腺刺激ホルモン, ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン, 血清性性腺刺激ホルモン
第 VII 因子	エプタコグ アルファ
第 VIII 因子	オクタコグ アルファ, ルリオクタコグ アルファ
トロンボモジュリン	トロンボモジュリン アルファ
ウロキナーゼ	ウロキナーゼ
プロウロキナーゼ	ナサルプラーゼ
tPA	アルテプラーゼ, パミテプラーゼ, モンテプラーゼ
酵素	アガルシダーゼ アルファ, アガルシダーゼ ベータ, アルグルコンダーゼ アルファ, アルグルセラーゼ, イデュルスルファーゼ, イミグルセラーゼ, カリジノゲナーゼ, ガルスルファーゼ, ラロニダーゼ,

表 1-2 主なエポエチン製剤

	INN		製剤名	メーカー	販売国
1	epoetin alfa	先行	EPOGEN	Amgen	米国
2	epoetin alfa	先行	Eprex	Jassen-Cilag	欧州
3	epoetin alfa	先行	エスポー	協和発酵キリン	日本
4	epoetin alfa	後続	Abseamed	Medice Arzneimittel	欧州
5	epoetin alfa	後続	Binocrit	Sandoz	欧州
6	epoetin alfa	後続	Epoetin alfa Hexal	Hexal Biotech	欧州
7	epoetin beta	先行	エポジン	中外製薬	日本
8	epoetin zeta	後続	Retacrit	Hospira	欧州
9	epoetin zeta	後続	Silapo	Stamda Arzneimittel	欧州
10	epoetin kappa	後続	エポエチンアルファ BS 注 JCR	日本ケミカルリサーチ	日本

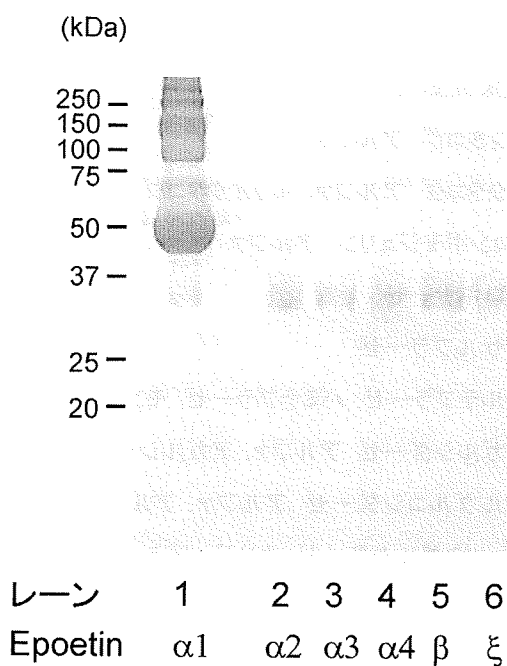


図 1-1 エポエチン製剤の SDS-PAGE

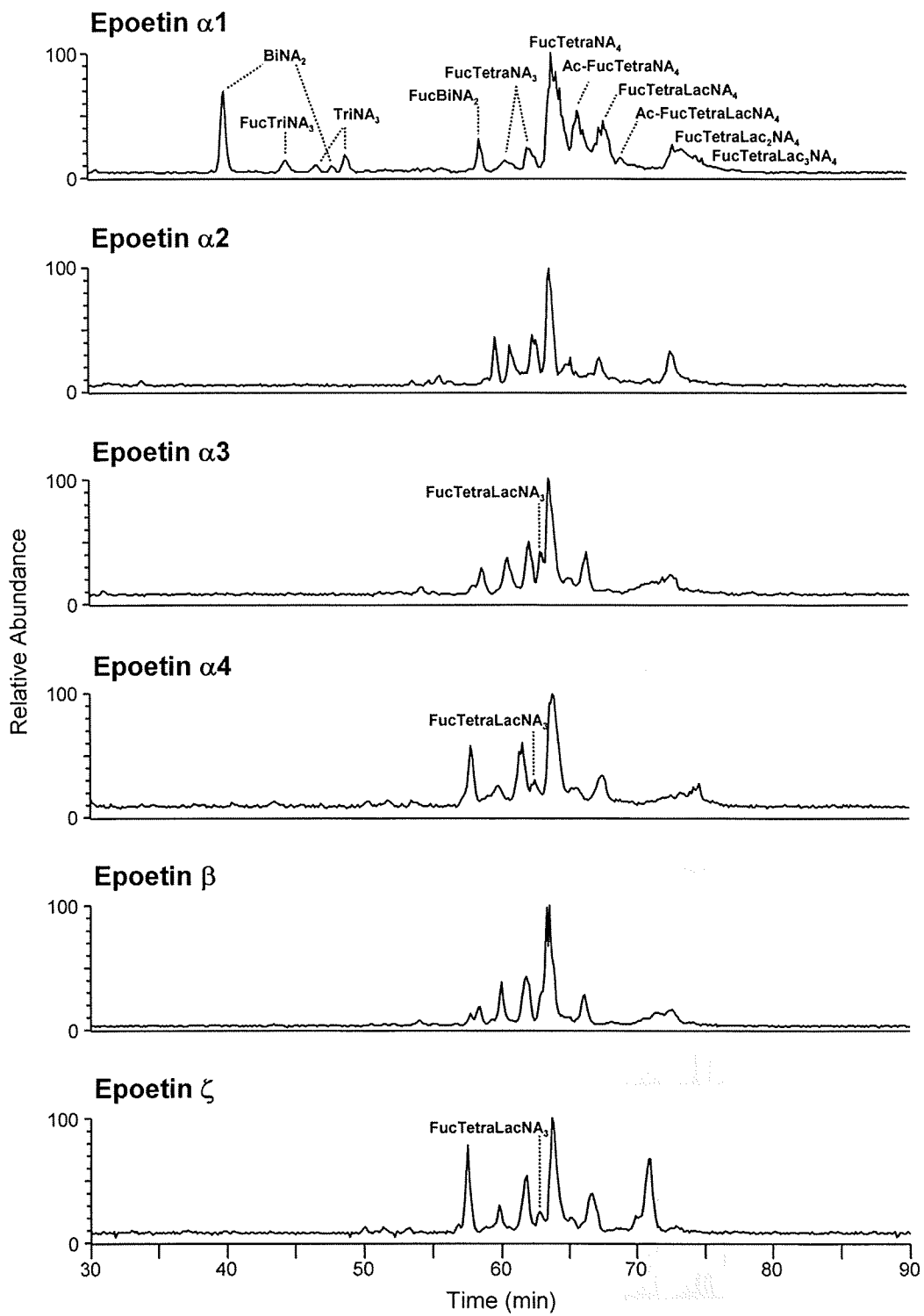


図 1-2 エポエチンの糖鎖プロファイル (ネガティブイオンモード)

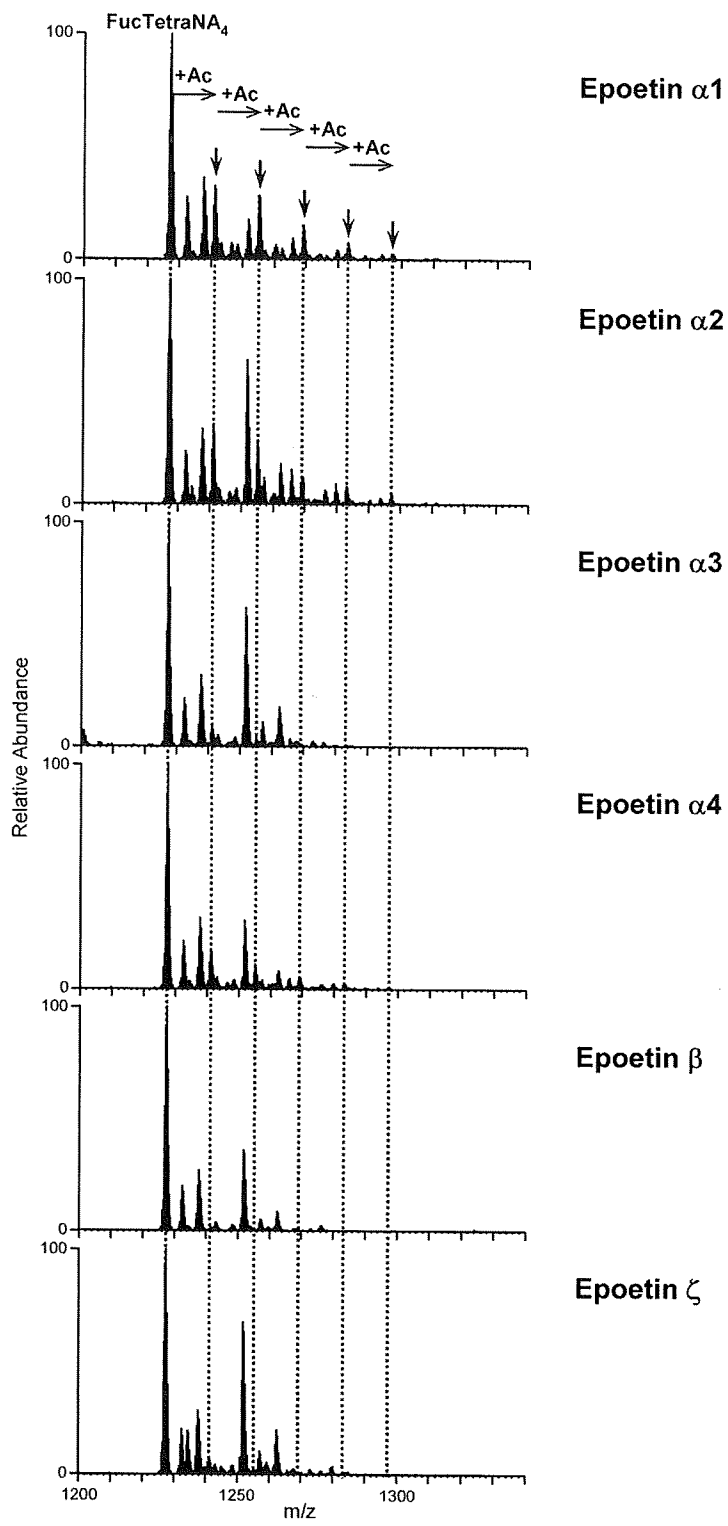


図 1-3 溶出時間 63-73 分のマスペクトル



表 2-1 抗ヒト FSH 抗体の結合特性

No.	Bound	0.5 M NaCl	4 M MgCl <sub>2</sub>	pH 10	pH 2
37-4	124	33	85	0	3
57-5	226	6	3	1	189

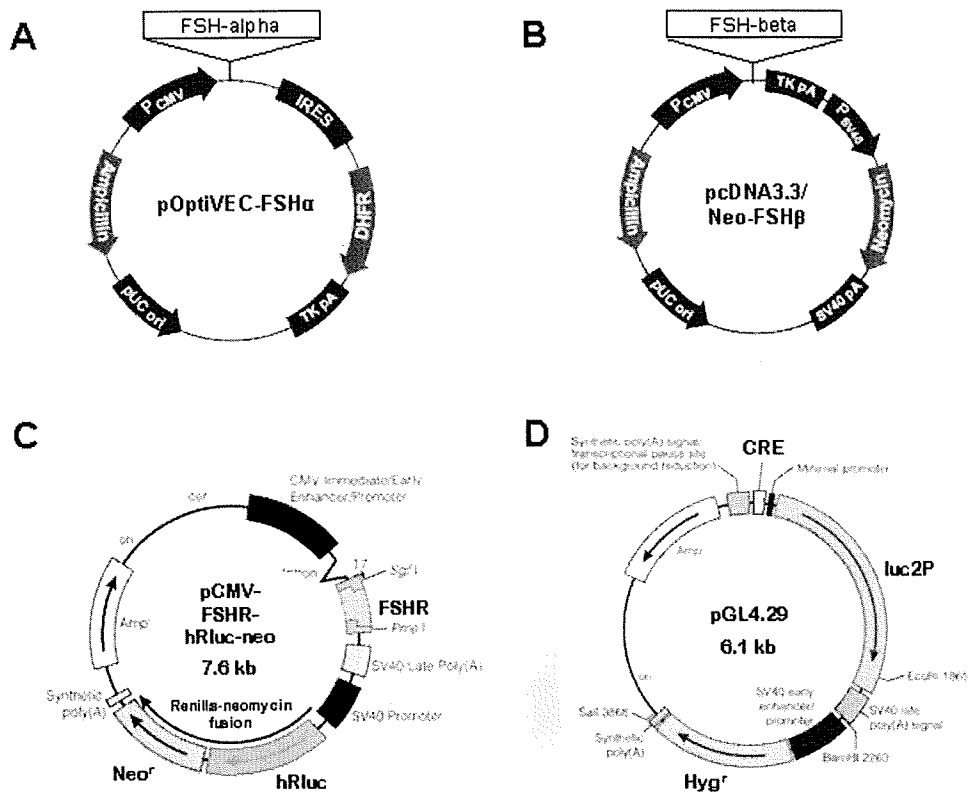


図 2-1 本研究で用いた発現ベクターの構造

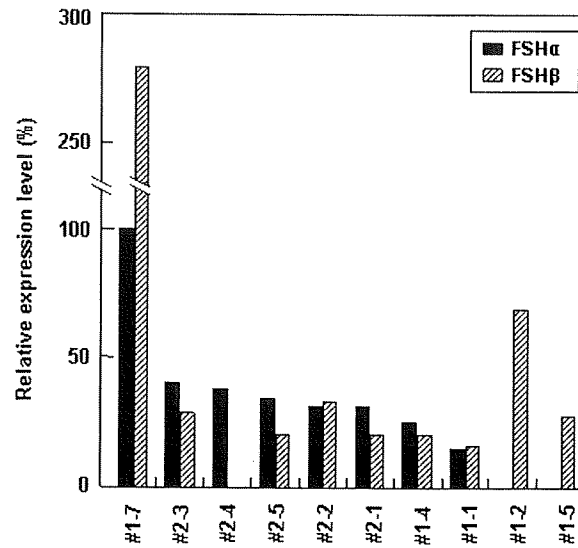


図 2-2 ヒト FSH 遺伝子の発現量

ヒト FSH $\alpha$  鎖発現ベクターおよび FSH $\beta$  鎖発現ベクターを共導入した CHO-DG44 細胞に, G418 およびメトトレキサート耐性株 10 クローンについて FSH $\alpha$  鎖および FSH $\beta$  鎖の発現量をリアルタイム PCR で解析した.

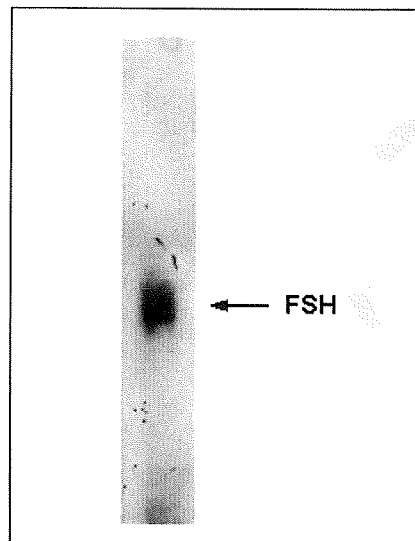


図 2-3 DGF-1.7 の培養上清のウェスタンブロット

DGF-1.7 の培養上清について非還元条件で電気泳動した後, 1 次抗体を抗ヒト FSH 抗体 (ハイブリドーマ#57-5), 2 次抗体を Cy5 標識抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光スキャナーで検出した.

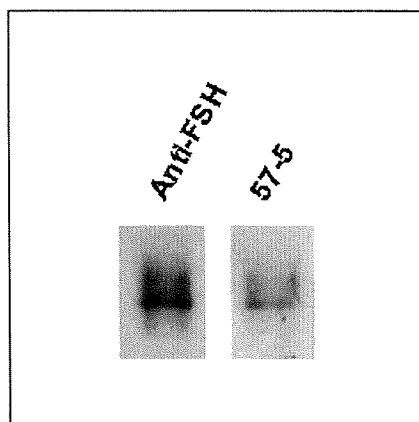


図 2-4 DGF-1.7 の培養上清のウェスタンブロット

FSH（フォリスチム、シェリングプラウ）を非還元条件で電気泳動した後、1 次抗体を市販の抗ヒト FSH 抗体（Leinco Technologies）あるいは本研究で作製した抗ヒト FSH 抗体（ハイブリドーマ#57-5）、2 次抗体を Cy5 標識抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光スキャナーで検出した。

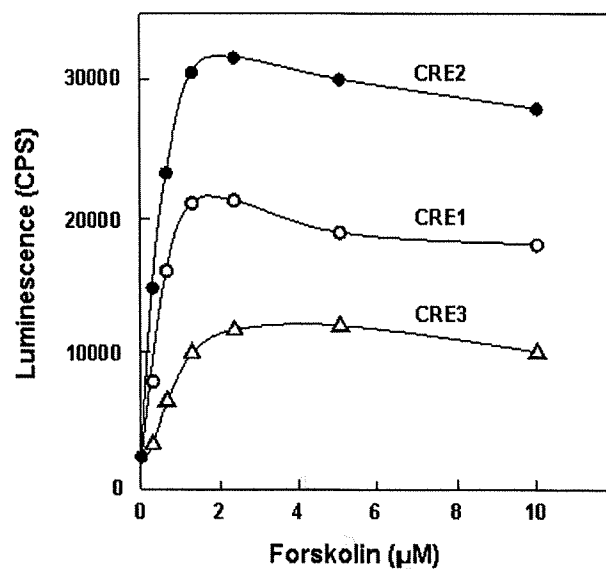


図 2-5 フォルスコリンによるルシフェラーゼ活性の誘導

フォルスコリンを添加して6時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

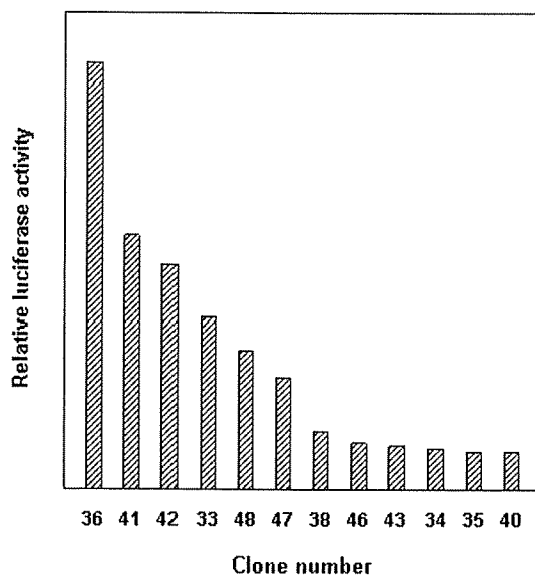


図 2-6 FSH 応答ルシフェラーゼ活性の測定

FSH を 10mIU/ml となるように添加して 6 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

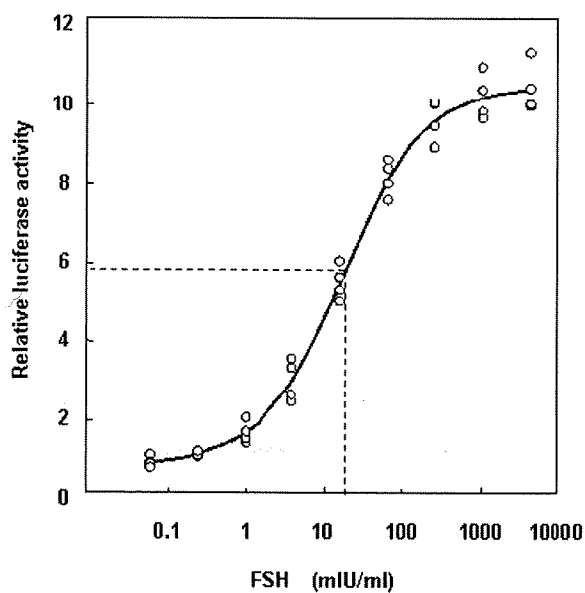


図 2-7 FSH 応答ルシフェラーゼ活性の応答と近似曲線

FSH を 4 IU から 9 段階の 4 倍希釈液をそれぞれ添加して 6 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した (白抜き丸)。ソルバーによる非線形解析を行い、シグモイドの近似曲線 (実線) を求めた結果、IC50 値は 20 mIU/ml であった。

先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長  
研究協力者 多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員  
研究協力者 鈴木琢雄 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

代表的な先端バイオ医薬品である抗体医薬品に着目し、日米欧三極における承認とガイドライン策定の現状、および開発動向を明らかにすると共に、製造工程の評価や特性解析、品質試験において、有効性・安全性に関連する特性として解析が求められる生物学的性質の評価法について検討した。IgG 骨格を持つ抗体医薬品では Fc 領域のアミノ酸置換や糖鎖構造の改変によりエフェクター活性を増強あるいは減弱した改変型抗体の開発が進み、有効性・安全性の向上が図られている。しかしその一方で、汎用されているエフェクター活性測定法には再現性や目的とする細胞群の確保の点で問題があり、これらの問題を解決し得る新たな試験法の開発が今後の重要課題であると考えられた。

A. 研究目的

近年の医薬品開発では、分子標的薬を求める創薬研究の動向に既承認抗体医薬品(\*)の成功が呼応し、抗体作製技術や組換えタンパク質大量発現・精製技術の進歩も相まって、抗体医薬品がバイオ医薬品開発の主流となっている。日米欧でこれまでに 28 品目の抗体医薬品と、抗体医薬品と類似した構造を持つ Fc 融合タンパク質医薬品 5 品目が承認され（表 1）、バイオ医薬品の売上高の 35%以上が抗体医薬品および Fc 融合タンパク質医薬品によるものとなっている<sup>(1, 2)</sup>。さらに、化学合成医薬品を含めた世界の医薬品売上高の上位 10 品目のうち 4 品目を抗体および Fc 融合タンパク質医薬品が占めるなど急速な発展を遂げている。現在、臨床開発段階にある抗体医薬品は 140 品目以上にのぼり、ここ数年の間に大幅な承認品目数の増加が予想されている<sup>(2)</sup>。欧米では既に、抗体医薬品に特化したガイドラインが策定され(表 2)、我が国でもその必要性が考えられているところである。

抗体医薬品の特徴の一つは、その殆どが

IgG 骨格を持ち、品目間で構造上の類似性が高いことである。そのため抗体医薬品では、目的物質の発現及び精製工程、あるいは特性解析において共通性の高い技術の適用が可能となっている。現在、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）では、原薬製造に関する Q11 ガイドライン策定に向けた議論が進められ、製造工程の理解と管理に基づき品質確保を計る QbD アプローチを盛り込むことが検討されているが、抗体医薬品は、米国製薬企業グループで作成された QbD による製法確立例示の題材とされるなど、バイオ医薬品の品質管理法確立のケーススタディに適した製品群と考えられている。また、目的物質の構造において共通部分が多い抗体医薬品では、ガイドラインにおいても工程評価や規格及び試験方法の設定において配慮すべき事項を具体的に記述することが可能と考えられることから、ICH ガイドライン Q11 や Q6B 等に付属する各論の作成が検討されるような場合には、対象候補の一つになると思われる。

IgG 骨格を持つ抗体医薬品は、分子量約

150,000 の高分子量糖タンパク質であり、分子構造上の不均一性が存在する。また、高次構造が適切に形成されることが活性発現に必須である。製造工程の解析において、プロセスパラメータと得られたタンパク質画分の生物活性の関連を明らかにすることや、原薬及び製剤の特性解析において、目的物質の不均一性等の特性と生物活性の関連を解析することは、それぞれの解析において有効性・安全性への影響を考慮した検討を行うことになる。そのため、有効性及び安全性に直結した生物活性を迅速かつ高精度に測定する試験法は、製造工程の理解を進める上でも、また、原薬及び製剤の特性を明らかにし規格及び試験方法を考える上でも極めて有用である。そこで本研究では、医薬品開発及び医薬品品質確保の国際調和に関する動向を踏まえ、抗体医薬品について有効性・安全性に直結する生物活性の評価法に関する技術的課題を明らかにし、その課題を解決し得る新しい生物活性評価法を開発することを目指す。

抗体医薬品の生物活性としては抗原との結合およびそれに伴う中和・阻害活性に加え、ナチュラルキラー細胞（NK 細胞）等のエフェクター細胞上の Fc $\gamma$ 受容体を介した抗体依存性細胞傷害活性（ADCC 活性）および補体を介した補体依存性細胞傷害活性（CDC 活性）が挙げられる。これらは抗体医薬品の抗腫瘍効果に関わる主要なメカニズムの一つである一方で、サイトカイン等の活性中和を目的とする抗体医薬品では安全性上の問題となり得る作用である。抗体の分子構造上、ADCC 活性や CDC 活性は Fc 領域が担っているが、Fc 領域に存在する N 結合型糖鎖の構造により、その活性が変動することが知られている。そのため、これらのエフェクター活性は、製造工程の変動による影響を受ける可能性が高く、製造工程の一定性を確保し、製品の有効性・安全性を担保する上でも重要な評価指標になると考えられる。

本年度は抗体医薬品の生物活性評価法に関

する検討の一環として、抗体の Fc 領域の改変等によるエフェクター活性の最適化に関する開発動向について調査研究を行うとともに、現在行われている抗体医薬品の臨床試験の 8 割近くが癌の治療に関するものである<sup>④</sup>という状況も踏まえ、抗腫瘍効果に関わる ADCC 活性の評価法について検討した。

(\*）本報告書では、抗体医薬品とはモノクローナル抗体医薬品を指し、ヒト血漿由来  $\gamma$  グロブリンを有効成分とする医薬品は含まないこととする。

## B. 研究方法

### Fc 領域の改変等によるエフェクター活性の最適化に関する調査研究

学術雑誌に掲載された論文および開発企業からの公開情報等を参考に調査を行った。

## C. 研究結果

抗体医薬品の開発では、マウス抗体からヒト抗体への移行期が過ぎ、現在は、以下のように、目的とする効能効果に適した IgG アイソタイプの選択や Fc 領域の改変等によるエフェクター活性の増強や減弱を目的とした研究開発が進められている。

### C.1. Fc 領域の改変等によるエフェクター活性の最適化に関する調査研究

抗体医薬品の ADCC 活性は、NK 細胞やマクロファージといったエフェクター細胞に発現する Fc $\gamma$ 受容体が、抗原と結合した抗体の Fc 領域との結合により活性化することにより発揮される。ヒトには Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII の 3 つの Fc $\gamma$ 受容体サブファミリーが存在し、種々の免疫系細胞において発現が認められるが、特に ADCC 活性に関与するものとして、シグナル伝達を正に制御する Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIIa および負に制御する Fc $\gamma$ RIIb が知られている。Fc $\gamma$ RIIa には 131R/131H、Fc $\gamma$ RIIIa には 158F/158V とい

うアミノ酸置換を伴う遺伝子多型が存在し、これらは抗体に対する親和性の違いを有している。対象疾患や抗体医薬品の種類によって異なるものの、高親和性の遺伝子型をもつ患者では抗体医薬品の抗腫瘍活性が高く治療効果も大きいという報告がなされており、抗体医薬品の抗腫瘍活性における活性型 Fc $\gamma$ 受容体への結合の重要性が *in vivo* レベルで示されている(4, 5)。また、ノックアウトマウス等を用いた実験により抑制性受容体である Fc $\gamma$ RIIb が抗体医薬品の抗腫瘍活性に抑制的に働くことが報告されている(6)。ヒトの天然型 IgG1~4 はこれら Fc $\gamma$ 受容体および CDC 活性を担う補体に対して様々な親和性で結合することから、抗体医薬品の開発においては、目的とする生物活性に応じた IgG サブクラスが選択されるのみならず、近年になって抗体の Fc 領域の改変によるエフェクター活性の最適化が盛んに進められている。

### C.1.1 エフェクター活性の増強を目的とした Fc 領域の改変

表 3 にエフェクター活性の増強を目的とした Fc 領域の改変の例を挙げた。IgG と Fc $\gamma$ 受容体あるいは補体との結合については構造生物学的な解析が詳細になされており、結合に関与するアミノ酸の置換により親和性を増大させる手法が主に用いられている。ADCC 活性を担う主要なエフェクター細胞の一つである NK 細胞は Fc $\gamma$ 受容体ファミリーの中でも Fc $\gamma$ RIIIa を特異的に発現すること、抗 CD20 抗体であるリツキシマブの治療効果において先に述べた Fc $\gamma$ RIIIa の遺伝子多型の関与が認められたことなどから、特に Fc $\gamma$ RIIIa との親和性の増大を目的とした改変が多く見られる。また、マクロファージや好中球による抗体依存性細胞食作用 (ADCP 活性) に着目して、Fc $\gamma$ RIIIa との結合を高める改変体も開発されている。Fc $\gamma$ RIIIa と抑制性受容体である Fc $\gamma$ RIIb は細胞外領域の相同性が非常に高く、IgG の両者に対する親和性

を完全に分離した改変は困難であることから、Fc $\gamma$ RII 親和性改変体の評価では、活性型受容体に対する親和性と抑制性受容体に対する親和性の比 (A/I 比) を指標としている点が特徴である。

一方、抗体の Fc 領域の N 結合型糖鎖の構造に着目した開発も行われている。2002 年に Shields ら(7)および新川ら(8)によって Fc 領域に結合する N 結合型糖鎖の還元末端に付加するフコースの除去が ADCC 活性を大幅に増強することが報告され、抗体に結合する糖鎖中のフコースの含量を減少させる手法の開発が進んでいる。フコースの付加を直接担う  $\alpha$ 1,6 フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) の欠損や抑制をはじめ、N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnTIII) の過剰発現など N 結合型糖鎖合成経路の改変によりフコース含量の低減が可能な細胞が開発されている。

抗体の Fc 領域の糖鎖は Fc $\gamma$ 受容体との結合と ADCC 活性の発揮に必須であるが、Sazinsky ら(9)、Jung ら(10)は Fc 領域へのアミノ酸置換の導入により N 結合型糖鎖の無い IgG に Fc $\gamma$ 受容体との結合能および ADCC 活性を付加することに成功している。これにより大腸菌など、タンパク質への糖鎖付加ができない宿主細胞を用いた抗体産生が可能となり、従来の動物細胞を用いた生産系に比べて大幅な生産コストの削減を望める技術として注目されている。

### C.1.2 エフェクター活性の減弱を目的とした Fc 領域の改変

表 4 にエフェクター活性の減弱を目的とした Fc 領域の改変の例を挙げた。エフェクター活性を抑制した医薬品としては既に Eculizumab、Abatacept が承認されている。抗 C5 抗体である Eculizumab は IgG2 と IgG4 のキメラ化により(11)、CTLA-4 と Fc の融合タンパク質である Abatacept はヒンジ領域へのアミノ酸点変異の導入により(12)エフェクター活性を抑制している。またアミノ酸

配列の改変ではないが、ペプチドと Fc 領域の融合タンパク質 (Peptibody) である Romiplostim は大腸菌によって生産されるため糖鎖修飾をうけず、エフェクター活性を持たないとされている<sup>(13)</sup>。

IgG1 について Fc $\gamma$ 受容体や補体との結合モデルから結合能を消失する種々のアミノ酸点変異体が作製されているほか、天然型においても Fc $\gamma$ 受容体および補体との結合親和性が低い IgG2 や IgG4 に点変異を導入することにより更にエフェクター活性を抑える試みも行われている。

また、抑制型受容体である Fc $\gamma$ IIb との結合親和性を高めるようなアミノ酸点変異により、免疫応答を積極的に抑制するという戦略も用いられている。

### C.1.3 エフェクター活性評価法

エフェクター活性の最適化の例を含め、抗体医薬品の研究開発に関する文献では、抗体医薬品の ADCC 活性測定のエフェクター細胞としてヒト末梢血単核球が用いられることがほとんどである。すなわち、健常な提供者から得た末梢血から単核球を単離し、標的とする腫瘍細胞および抗体医薬品とインキュベートすることで、腫瘍細胞への傷害性を指標に ADCC 活性を測定するというものである。この方法は ADCC 活性の測定法として広く用いられ、抗体の Fc 領域の改変においても Fc $\gamma$ RIIIa との親和性と比較的高い相関を有することが示されているが、一方で再現性および目的とする細胞群の確保の面で課題が存在している (考察参照)。したがって、これらの問題を解決し、製造工程の解析や品質試験への応用も可能な ADCC 活性測定系の開発が今後の重要課題であると考えられる。

### D. 考察

ADCC 活性をはじめとするエフェクター活性は抗体医薬品の抗腫瘍活性における主要なメカニズムの一つであり、Fc $\gamma$ 受容体との

親和性を高めるアミノ酸点変異の導入など、エフェクター活性を増強する様々な改変技術が開発されている。このような技術を導入した抗体医薬品で臨床開発段階にあるものは少なくなく、今後数年の間にはエフェクター活性を増強した非天然型の IgG 骨格をもつ抗体医薬品が市場に出ることが予想されている<sup>(2)</sup>。また、エフェクター活性の減弱を目的とした改変体は、先に述べたように既に承認されているものに加え、既に複数の品目が臨床開発後期にある。このような開発動向からも、抗体医薬品の製造工程評価や特性解析、品質試験、非臨床試験においてエフェクター活性の測定が今後より一層重要な役割を果たすであろうことが伺える。

ADCC 活性の測定法として広く用いられている末梢血単核球を用いた方法には、いくつかの問題点が存在している。まず第一に使用する末梢血単核球のロットの違いによる再現性の問題が挙げられる。単一の提供者から得た末梢血単核球を永続的に使用し続けることは不可能であり、多くの場合、複数の提供者由来の細胞を用いて実験が行われているのが現状である。この際、提供者の年齢・健康状態等による違いに加え、細胞調製時の手法やアッセイに用いるまでの保存状態など様々な要因による影響が予想され、実際、同一の抗体と標的腫瘍細胞を用いた実験でも使用する末梢血単核球のロットの違いにより ADCC 活性に大きな差が生じることが知られている。また、冒頭で述べた Fc $\gamma$ 受容体の遺伝子多型も考慮すべきである。末梢血単核球を用いた実験では特に Fc $\gamma$ RIIIa の遺伝子多型の影響が大きいことが知られており、抗体の ADCC 活性を評価する上では実験に用いる細胞の遺伝子型を明らかにし、場合によっては各々の遺伝子型のエフェクター細胞を調製して実験を行う必要がある。しかしながら、提供者の遺伝子型を調べる際には倫理面での配慮が必須であることを含め、常に目的



とする遺伝子型をもつエフェクター細胞群を確保することは容易ではない。

さらに目的とするエフェクター活性によっては末梢血単核球を用いることが適切ではない場合もある。末梢血単核球を用いた測定系では主としてNK細胞による細胞傷害活性を検出しており、例えばマクロファージによるファゴサイトーシス活性(ADCP活性)を評価することはできない。実際、ADCP活性の増強を目的として抗体Fc領域のFcγRIIIaへの親和性を向上させた論文のように、末梢血単核球では検出できない活性の変化を分化させたマクロファージ細胞を用いて評価した例もある<sup>(14, 15)</sup>。マクロファージ細胞への分化は提供者由来の末梢血単核球を用いて数日間かけて行うため、末梢血そのものを用いる場合と同様、遺伝子多型等のロット差が生じることとなり、評価系の一定性の確保は容易でないといえる。

エフェクター活性評価用細胞の安定供給のためには不死化した株化細胞の使用が望ましいが、エフェクター細胞として機能するNK細胞やマクロファージ由来の有用なヒト株化細胞は樹立されていない。抗腫瘍効果を持つ抗体医薬品の評価においては、このような問題を解決し得るADCC活性評価法の開発が今後の重要課題であると考えられる。

新規抗体医薬品開発が進展する一方で、2012年以降、売上高上位の抗体医薬品類が次々と特許期間満了を迎えるため、抗体医薬品の後続品の承認申請がなされるのも間近であると考えられる。抗体医薬品の先行品と後続品の同等性評価においても、生物活性評価は重要である。医療上重要な製品が多い抗体医薬品について、有効で安全な製品の迅速な提供に貢献することを目標に、工程管理や品質管理法の妥当性を検証する際に有用な科学的根拠となるデータを提供すべく、研究を展開できればと考えている。

## E. 結論

抗体医薬品のエフェクター活性の最適化を目的とした研究開発について調査し、エフェクター活性の増強および減弱を目的とした改変型抗体の開発動向を明らかにした。また、現状のエフェクター活性測定系における課題について考察した。

## F. 参考文献

1. Aggarwal, S. 2009. What's fueling the biotech engine. 2008. *Nat Biotechnol* 27:987-993.
2. Strohl, W. R. 2009. Therapeutic Monoclonal Antibodies: Past, Present, and Future. In *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*. John Wiley & Sons, Inc.
3. Green, J. M., A. D. Schreiber, and E. J. Brown. 1997. Role for a glycan phosphoinositol anchor in Fc gamma receptor synergy. *J Cell Biol* 139:1209-1217.
4. Treon, S. P., M. Hansen, A. R. Branagan, S. Verselis, C. Emmanouilides, E. Kimby, S. R. Frankel, N. Touroutoglou, B. Turnbull, K. C. Anderson, D. G. Maloney, and E. A. Fox. 2005. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 23:474-481.
5. Weng, W. K., and R. Levy. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21:3940-3947.
6. Clynes, R. A., T. L. Towers, L. G. Presta, and J. V. Ravetch. 2000. Inhibitory Fc

- receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446.
7. Shields, R. L., J. Lai, R. Keck, L. Y. O'Connell, K. Hong, Y. G. Meng, S. H. Weikert, and L. G. Presta. 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ<sub>3</sub>RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277:26733-26740.
  8. Shinkawa, T., K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, and K. Shitara. 2003. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278:3466-3473.
  9. Sazinsky, S. L., R. G. Ott, N. W. Silver, B. Tidor, J. V. Ravetch, and K. D. Wittrup. 2008. Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20167-20172.
  10. Jung, S. T., S. T. Reddy, T. H. Kang, M. J. Borrok, I. Sandlie, P. W. Tucker, and G. Georgiou. 2010. Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind Fcγ<sub>1</sub>RI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:604-609.
  11. Rother, R. P., S. A. Rollins, C. F. Mojcik, R. A. Brodsky, and L. Bell. 2007. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol* 25:1256-1264.
  12. Davis, P. M., R. Abraham, L. Xu, S. G. Nadler, and S. J. Suchard. 2007. Abatacept binds to the Fc receptor CD64 but does not mediate complement-dependent cytotoxicity or antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Rheumatol* 34:2204-2210.
  13. Strohl, W. R. 2009. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Opin Biotechnol* 20:685-691.
  14. Lazar, G. A., W. Dang, S. Karki, O. Vafa, J. S. Peng, L. Hyun, C. Chan, H. S. Chung, A. Eivazi, S. C. Yoder, J. Vielmetter, D. F. Carmichael, R. J. Hayes, and B. I. Dahiyat. 2006. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4005-4010.
  15. Richards, J. O., S. Karki, G. A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J. R. Desjarlais. 2008. Optimization of antibody binding to Fcγ<sub>2</sub>RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 7:2517-2527.
- G. 研究発表**
1. 論文発表、総説
  - 1) Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Minoru Tada, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Importance of FcRn in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human FcRn. *J.Immunol.* 184(4), 1968-76 (2010)
  - 2) 山口照英、石井明子 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保

- 臨床評価 36, 611-627 (2009)
- 3) 川崎ナナ、石井明子、荒戸照世、山口照英 抗体医薬品の構造及び品質特性解析 抗体医薬品製造の留意点～承認申請をふまえて～ サイエンス&テクノロジー社 p.119-132 (2009)
  2. 学会発表
    - 1) 豊田淑江、北川博子、石井明子、多田 稔、鈴木 琢雄、小林 哲、山口照英：血管内皮前駆細胞の機能解析・Early EPC を中心に 第 9 回日本再生医療学会総会 2010年3月 広島
    - 2) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬品と Fc ドメイン融合タンパク質医薬品における胎児性 Fc 受容体 (FcRn) 親和性の差異に関する検討 日本薬学会第 130 年会 2010年3月 岡山
    - 3) 多田 稔、伊藤さつき、川崎ナナ、石井明子、鈴木 琢雄、小林 哲、豊田 淑江、山口照英：Notch リガンド糖タンパク質 Jagged1 の Allagille 症候群関連変異体の機能解析 第 82 回日本生化学大会 2009年10月 神戸
    - 4) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品の Fc 受容体(FcRn および Fc $\gamma$ RI) との結合特性比較 第 82 回日本生化学大会 2009年10月 神戸
    - 5) 北川博子、豊田淑江、石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、小林 哲、山口照英：血管内皮細胞である Early EPC の機能解析 第 82 回日本生化学大会 2009年10月 神戸
    - 6) 小林哲、鈴木琢雄、石井明子、川崎ナナ、山口照英：MALDI-TOF MS におけるマトリックスの塩基性アミノ酸残基に対する影響 質量分析討論会 2009年5月 大阪
  - 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

表1. 抗体医薬品及びFc融合タンパク質医薬品の承認状況

分類	名称	商品名	構造	標的	主な適応疾患	承認年		
						US	EU	Japan
マウス抗体								
	Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991
	Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	IgG1κ (MX-DTPA:90Y標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	2008
	Iodine 131 Tositumomab	Bexxar	IgG1κ (MX-DTPA:111I標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA
	Catumaxomab	Removab	IgG2aλ (131I標識) mouse IgG2aκ (EpCAM), rat IgG2bλ (CD3)	EpCAM, CD3	癌性腹水	NA	2009	NA
キメラ抗体								
	Abciximab	ReoPro	IgG1 (Fab)	GPIIb/IIIa	心筋虚血	1994	NA	NA
	Rituximab	Rituxan	IgG1κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001
	Basiliximab	Simulect	IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002
	Infliximab	Remicade	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	1998	1999	2002
	Cetuximab	Erbix	IgG1κ	EGFR	頭頸部癌、結腸・直腸癌	2004	2004	2008
ヒト化抗体								
	Daclizumab	Zenapax	IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA
	Palivizumab	Synagis	IgG1κ	RSV F protein	RSウイルス感染	1998	1999	2002
	Trastuzumab	Herceptin	IgG1κ	HER2	転移性乳癌	1998	2000	2001
	Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	IgG4κ (カカアミン結合)	CD33	急性骨髄性白血病	2000	NA	2005
	Alemtuzumab	Campath	IgG1κ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	NA
	Omalizumab	Xolair	IgG1κ	IgE	喘息	2003	2005	2009
	Efalizumab	Raptiva	IgG1κ	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA
	Bevacizumab	Avastin	IgG1	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007
	Natalizumab	Tysabri	IgG4κ	α4integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA
	Tocilizumab	Actemra	IgG1	IL-6R	キャッスルマン病、関節リウマチ	2010	2009	2005
	Ranibizumab	Lucentis	IgG1κ Fab (48Kフラグメント)	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	2009
	Eculizumab	Soliris	IgG2/4κ	C5	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	NA
	Certolizumab pegol	Cimzia	Fab+PEG	TNFα	重症クローン病	2008	2010	NA
ヒト抗体								
	Adalimumab	Humira	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2002	2003	2008
	Panitumumab	Vectibix	IgG2κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	2007	NA
	Golimumab	Simponi	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2009	2009	NA
	Ustekinumab	Stelara	IgG1κ	IL12, IL23 p40	乾癬	2009	2009	NA
	Canakinumab	Ilaris	IgG1κ	IL-1β	クリオピリン関連周期性症候群	2009	2009	NA
	Ofatumumab	Arzerra	IgG1κ	CD20	慢性リンパ性白血病	2009	NA	NA
融合タンパク質								
	Etanercept	Enbrel	TNFR + Fc	TNFα, LTα	関節リウマチ	1998	2000	2005
	Alefacept	Amevive	LFA3 + Fc	CD2	尋常性乾癬	2003	NA	NA
	Abatacept	Orencia	CTLA4 + Fc	CD80/CD86	関節リウマチ	2005	2007	NA
	Rilonacept	Arcalyst	IL-1 R + IL-1 RAcP + Fc	IL-1	クリオピリン関連周期性症候群	2008	2009	NA
	Romiplostim	NPLate	Fc+TPOアゴニストペプチド	TPO受容体	血小板減少性紫斑病	2008	2009	NA

NA: Not approved (未承認)

表2. 抗体医薬品関連ガイドライン

FDA		
公表年	タイトル	範囲
1996	Guidance for industry: For the submission of chemistry, manufacturing, and controls information for a therapeutic recombinant DNA-derived product or a monoclonal antibody product for in vivo use	製造/品質
1997	Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use	製造/品質/非臨床/臨床
EMA		
公表年	タイトル	範囲
1987	Production and quality control of monoclonal antibodies of murine origin	製造/品質
1990	Production and quality control of human monoclonal antibodies	製造/品質
1991	Radiopharmaceuticals based on monoclonal antibodies 3AQ1a	製造/品質/非臨床/臨床
1994	Production and quality control of monoclonal antibodies 3AB1a	製造/品質
2004	Concept paper on the need to revise the guideline on production and quality control of monoclonal antibodies (GAB 1a) CHMP/BWP/6104	製造/品質
2007	Guideline on production and quality control of monoclonal antibodies and related substances (DRAFT) EMEA/CHMP/BWP/157653/2007	製造/品質
2008	Guideline on development, production, characterisation and specifications for monoclonal antibodies and related products EMEA/CHMP/BWP/157653/2007	製造/品質
2009	Concept paper on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies for in vivo clinical use EMEA/CHMP/BMWP/114720/2009	
2009	Concept paper on the revision of the guideline on radiopharmaceuticals based on monoclonal antibodies EMEA/CHMP/CVMP/362268/2009	製造/品質/非臨床/臨床
2009	Concept paper on the development of a guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies EMEA/CHMP/BMWP/632613/2009	非臨床/臨床