

図5 TZM-2.5.4細胞の無血清培養における細胞像

## C.2 製造工程の開発

### C.2.1 培養工程

無血清培地として Select CHO 培地 (Becton, Dickinson and Company) 及び FreeStyle CHO 培地 (GIBCO) を用い、TZM-2.5.4 細胞を 1 週間培養した。両培地とも、死滅することなく、維持することができた (図 5)。

SPR イムノアッセイで培養上清中のトラスツズマブ濃度を解析した結果、Select CHO 培地で 3.6 mg/L、FreeStyle CHO 培地で 3.0 mg/L となった。より高発現した Select CHO 培地を生産培地として選択した。

### C.2.2 精製工程

#### 精製工程 1—濃縮

限外濾過による濃縮において、トラスツズマブの分子量が約 150 kDa であることを踏まえ 100 kDa MWCO の限外濾過膜を用いていたが、回収率が 70% 程度に留まった。10 kDa MWCO に変更した結果、ほぼ 100% 回収することが可能となった。

#### 精製工程 2—プロテイン A クロマトグラフィー

プロテイン A カラムクロマトグラフィーには、抗体医薬品の製造に実績がある MabSelect のラボスケールタイプの HiTrap MabSelect カラムを用いることとした。

溶出は、0.1 M Glycine-HCl をベースとして、pH4.0 から順次 0.2 ずつ低いものについて順次検討し、100% 溶出される条件として pH 3.0 に決定した。

#### 精製工程 3—陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオン交換クロマトグラフィーは、SP セファロースを採用し、ラボスケールタイプの HiTrap SP カラムを用いることとした。

精製工程 2 の溶液を本工程に適用するためには、pH 及び塩濃度を調整することが必要である。ラボスケールでは、透析あるいはゲル濾過による平衡化が一般的であるが、実生産スケールでは、塩基性溶液添加による中和と加水による希釈で調整する方法が一般的であることを踏まえ、本研究では、後者の方法を採用した。

## C.3 特性解析

### C.3.1 トラスツズマブの定量

SPR イムノアッセイでトラスツズマブの濃度を測定する条件を決定し、ハーセプチンを標準物質として検量線を作製した。定量可能範囲は、37.5~600 ng/mL であった (図 6)。

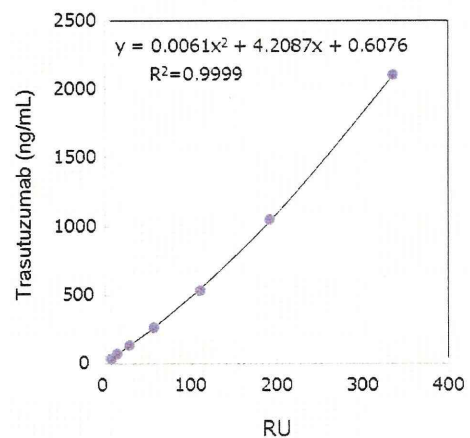


図6 トラスツズマブの検量線

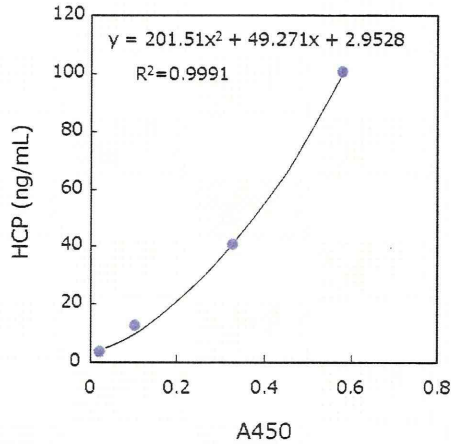


図7 CHO細胞由来タンパク質の検量線

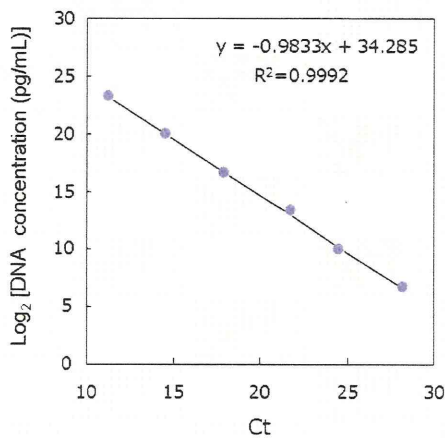


図8 CHO細胞由来DNAの検量線

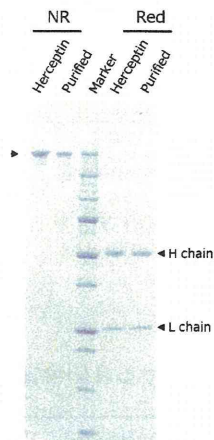


図9 実験的に製造したトラスツズマブと市販トラスツズマブ製剤(ハーセプチン)のSDS-PAGEによる比較

### C.3.2 CHO細胞由来タンパク質の定量

ELISAでCHO細胞由来タンパク質の濃度を測定するため、CHO細胞由来タンパク質標準物質として検量線を作製した。定量可能範囲は、12~100 ng/mLであった(図7)。

### C.3.3 CHO細胞由来DNAの定量

定量PCRでCHO細胞由来DNAの濃度を測定するため、CHO細胞由来DNAを用いて検量線を作製した。定量可能範囲は、10 pg/mL~10 μg/mlであった(図8)。

### C.3.4 SDS-PAGE

精製工程2のプロテインAクロマトグラフィーで得られたサンプルと市販のトラスツズマブ製剤であるハーセプチンをSDS-PAGEで比較した結果、非還元条件、還元条件ともに、見掛けの分子量は、ハーセプチンと一致していることが確認された(図9)。

### C.3.5 質量測定

ハーセプチンと本研究のトラスツズマブの質量を比較した。図10に、トラスツズマブの

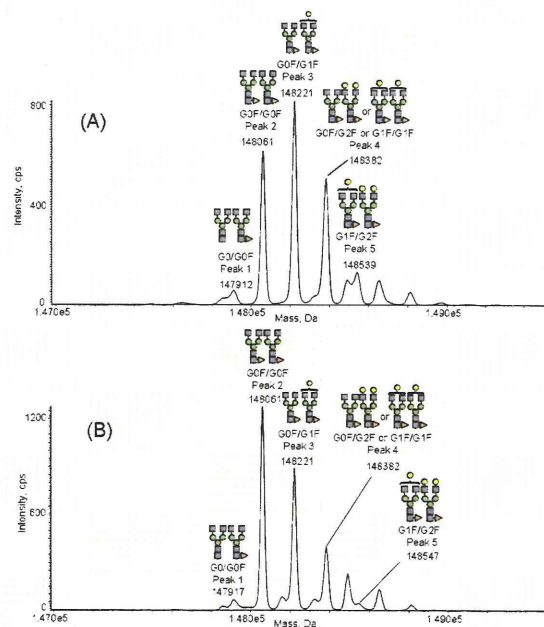


図10 LC/MSにより得られたトラスツズマブのデコンボリューションマスペクトル (A)、ハーセプチン; (B)、本研究のトラスツズマブ

表 1 各糖鎖の存在比率 (%)

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
市販品	2.7	29.0	38.3	23.9	6.1
製造品	2.6	47.6	33.3	14.6	1.9

LC/MS により得られたデコンボリューションマススペクトルを示した。ハーセプチンと本研究のトラスツズマブで検出された主なアイソフォーム（ピーク 1-5）の質量は一致し、本研究のトラスツズマブのアミノ酸配列及び糖鎖構造は、ハーセプチンと一致することが示唆された。

なお、グライコフォームの分布には違いが観察された。すなわち、ハーセプチンではピーク 3 (G0F/G1F)、本研究のトラスツズマブではピーク 2 (G0F/G0F) が最も多いグライコフォームであると推定された。各ピーク高さの和（ピーク 1-5 の和）に対する各ピーク高さの比率を求めたところ、ハーセプチンでは G0/G0F, G0F/G0F, G0F/G1F, G0F/G2F（または G1F/G1F), G1F/G2F でそれぞれ 3, 29, 38, 24, 6%, 本研究のトラスツズマブでは 3, 48, 33, 15, 2%であった（表 1）。

#### C.4 製造工程の評価

本研究で構築した製造工程の流れを図 11 にまとめた。100 mL スケールの培養で得た上清を 5 mL まで濃縮した。これを HiTrap MabSelect カラムにアプライし、0.1 M Glycine-HCl pH 3.0 で溶出した（図 12）。

さらに、pH と電気伝導度を調整後、HiTrap SP カラムにアプライし、塩化ナトリウムのリニアグラジエントで溶出した（図 13）。

表 2 に各精製工程における、トラスツズマブの回収率、宿主由来タンパク質、宿主由来 DNA の除去状況を示した。

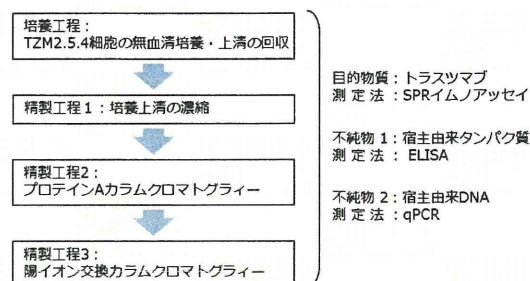


図 11 トラスツズマブの実験的製造工程フロー

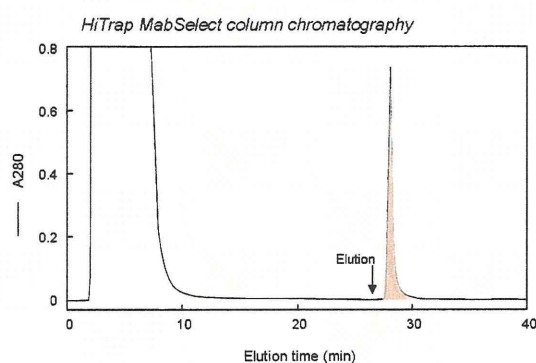


図 12 プロテイン A カラムクロマトグラフィー

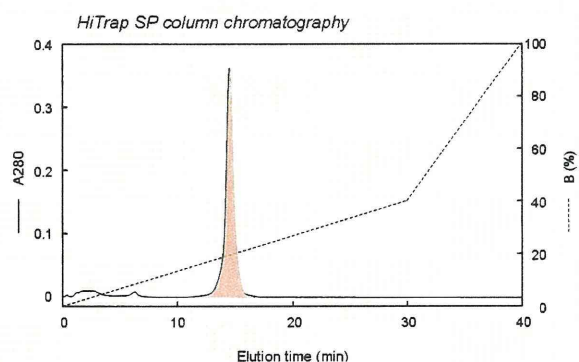


図 13 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

表 2 精製工程における目的物質と不純物の推移

	TZM [ $\mu$ g]	Recovery [%]	HCP [ng]	DNA [ng]
Harvest	540	100	6,100,000	927,000
MabSelect	119	22	480	16
SP	73	13	145	5

## D. 結論

本研究では、

- 1) 製造方法の開発・変更モデルとしてトラスツズマブの実験的製造システムを確立した。
- 2) 本研究で作製したトラスツズマブは、LC/MS を用いた質量測定の結果、市販のトラスツズマブと同一の質量であったことから、目的とする一次構造と糖鎖構造をもつ抗体が得られたものと結論付けた。
- 3) BIACORE を用いたトラスツズマブ定量法、CHO 細胞由来タンパク質の定量法、CHO 細胞由来 DNA の定量法が確立され、製造工程を評価することが可能となった。

したがって、本研究で構築したトラスツズマブの試験的製造工程と各種解析法は、QbD に関する研究を推進するための重要なツールとなるものと期待される。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし



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

本研究では、代表的な先端バイオ医薬品として抗体医薬品を取り上げ、その有効性・安全性に関連する重要な品質特性と考えられる抗原及び Fc $\gamma$ 受容体との結合活性に関して、各種評価法の特徴や品質試験法としての有用性と課題に関する検討を行っている。本年度は、リツキシマブ、及び、Fc $\gamma$ 受容体親和性の異なる改変型リツキシマブをモデルとして、抗原（CD20）結合能、Fc $\gamma$ 受容体結合能、ならびに抗原を介したエフェクター細胞の架橋（Bridging）についてフローサイトメトリーを用いた実験系の品質評価系としての適応可能性と課題について検証した。フローサイトメトリーを用いた Cell-based binding assay 系は、細胞表面の膜タンパクを抗原とする抗体医薬品の抗原結合能の評価や、種々の抗体医薬品の Fc $\gamma$ 受容体結合能の評価に有用と考えられた。また、抗原発現細胞とエフェクター細胞の架橋を評価する Bridging Assay 系は、末梢血単核球細胞を用いた従来の ADCC 活性測定法に代わる新規試験法として有用である可能性が示された。

#### A. 研究目的

現在までに日米欧で 34 品目の抗体医薬品、および抗体 Fc 領域と他のタンパク質やペプチドを融合させた 7 品目の Fc 融合タンパク質医薬品が承認されている。現在も多くの抗体医薬品が臨床開発段階にあり、今後も承認品目数の大幅な増加が見込まれている。最近では特に有効性・安全性の向上を目的とした改変型抗体医薬品の開発が活発化しており、本邦では 2012 年 3 月に、糖鎖改変技術により抗腫瘍活性を増強した抗体医薬品モガムリズマブが世界に先駆けて承認されている。

抗体医薬品は、抗原結合を担う Fab 領域とエフェクター活性を担う Fc 領域からなる多機能分子である。したがってその生物活性としては抗原との結合による標的分子の中和・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。抗腫瘍活性を目的とする抗

体医薬品においては、これらの細胞傷害活性の発揮による腫瘍細胞死の誘導が主要な作用メカニズムの一つとなっており、細胞傷害活性の増強を目的とした Fc 領域改変型抗体医薬品の開発が進展している。先に述べたモガムリズマブは、抗体 Fc 領域に付加する糖鎖修飾のうち、還元末端に付加されるフコースを除去することにより抗体医薬品の ADCC 活性を増強する技術を用いて生産されており、有効性の向上を目的とした改変型抗体医薬品の代表的な一例である。この他にも同様の糖鎖改変技術を利用した抗体医薬品や、アミノ酸置換により Fc $\gamma$ 受容体親和性を増強した抗体医薬品の開発が進められており、何れも高 ADCC 活性を有する抗腫瘍抗体医薬品として注目されている。

抗体医薬品のように複雑な高次構造からなり、分子不均一性を有する糖タンパク質医薬品においては、理化学試験のみでは高次構造の完全性を確認できない場合がある。このため、抗体医薬品の品質試験では、タンパク質の高次構造と機能を評価可能な生物活性評価が必要とされて

いる。標的タンパク質の中和・阻害活性を目的とする抗体医薬品の生物活性評価系としては、主に抗原結合能を評価する目的で抗原タンパク質を固相化した ELISA 法が用いられている。一方で、複数の膜貫通領域を有する膜タンパク質等を抗原とする場合には、抗原調製が困難となる場合があり、より生理的な条件下での結合活性を評価可能な手法として、抗原発現細胞への抗体医薬品の結合をフローサイトメーター等により測定する Cell-based binding assay も抗原結合能評価系の一つとして考えられる。また近年では国際的に、各々の抗体医薬品の作用メカニズム (MOA : Mechanism of Action) に基づいた生物活性評価系が求められる傾向にあり、MOA を反映した Cell-based assay の確立が課題となっている。特に ADCC 活性評価系については、改変型抗体医薬品の開発の進展が著しいこともあり、頑健な活性評価系の確立が急務となっている。

本年度は、4 回膜貫通型タンパク質である CD20 を標的とする抗体医薬品リツキシマブをモデルとして選択し、リツキシマブ、及び、Fc $\gamma$ 受容体親和性を増強あるいは減弱したリツキシマブ改変体を作製して、フローサイトメーターを用いた Cell-based binding assay による抗原および Fc $\gamma$ 受容体結合能評価系の有用性について検討した。また、既存の ADCC 活性測定系の代替法としての Bridging assay 系の適応可能性について検討を行った。

## B. 研究方法

### B.1 細胞および抗体

Fc $\gamma$ RIIIa を安定発現する Jurkat 細胞 (以下 Jurkat/ Fc $\gamma$ RIIIa と表記) は RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清 (ニチレイ、終濃度 10%) および G418 (ナカライテスク、終濃度 1 mg/ml) を添加した培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。ヒトバーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞は RPMI1640 に終濃度 20% でウシ胎児血清を添加した培地を用いて同様の条件で培養した。ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) は Cellular Technology 社より購入したものを使用した。

抗 CD20 抗体リツキシマブおよびその改変体 ( G236A/S239D/I332E ある い は L234A/L235A) は、当該遺伝子を発現するベクターを Freestyle CHO-S 細胞 (Invitrogen) に導入し、7 日間培養後の培養上清を HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) を用いて精製したものを使用した。

### B.2 Daudi 細胞を用いた CD20 結合能の評価

Daudi 細胞 (一点あたり 2 x 10<sup>5</sup> 個) を染色バッファー (PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN<sub>3</sub>) で洗浄した後、リツキシマブを各濃度で添加し 4°C で 30 分間結合させた。細胞を染色バッファーにより洗浄した後、DyLight488 標識した F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG Fc (Jackson ImmunoResearch) を添加し、さらに 4°C で 30 分間結合させた。その後、染色バッファーを用いて二回洗浄を行い、7-AAD (BD) を添加してフローサイトメーター (BD, FACSCantoII) による解析を行った。前方散乱光 (FSC)、側方散乱光 (SSC) および 7-AAD の染色強度によりゲートを指定し、生細胞集団の DyLight488 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent Intensity: MFI) を算出した。

### B.3 Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa 細胞を用いた Fc $\gamma$ R 結合能の評価

Jurkat/ Fc $\gamma$ RIIIa 細胞 (一点あたり 2 x 10<sup>5</sup> 個) を染色バッファーで洗浄した後、リツキシマブを各濃度で添加し 4°C で 30 分間結合させた。細胞を染色バッファーにより洗浄した後、DyLight488 標識した F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch) を添加し、さらに 4°C で 30 分間結合させた。その後、B.2 と同様の手法で生細胞集団の DyLight488 蛍光強度の MFI を算出した。

### B.4 PBMC を用いた ADCC 活性測定

標的細胞 Daudi (一点あたり 1 x 10<sup>4</sup> 個) およびエフェクター細胞 PBMC (一点あたり 2 x 10<sup>5</sup> 個) を異なる濃度のリツキシマブ存在下で 4 時間共培養した。死細胞より培養上清中に放出された LDH の活性を Cytotoxicity Detection

Kit (Roche) により測定し、標的細胞死の割合を算出した。

## B.5 Jurkat/FcγR 細胞を用いた Bridging Assay

標的細胞として Daudi 細胞、エフェクター細胞として Jurkat/FcγRIIIa を使用した。各々の細胞を OPTI-MEM (Invitrogen) で洗浄した後、Daudi 細胞は Calcein AM (eBiosciences、終濃度 10 nM) で、Jurkat/FcγRIIIa は Calcein Violet 450 AM (eBiosciences、終濃度 1 μM) で 30 分間標識した。OPTI-MEM で 3 回洗浄した後、Daudi 細胞 (5 × 10<sup>4</sup> 個) と Jurkat/FcγRIIIa (5 × 10<sup>5</sup> 個) を混合し、各濃度のリツキシマブ存在下で 37°C、60 分間共培養した。細胞集団の Calcein AM および Calcein Violet 450 AM の蛍光強度をフローサイトメーターにより解析し、single positive および double positive の細胞の割合を算出した。標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された集団の割合を Bridging Index とし、抗体医薬品による両細胞の架橋を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト末梢血単核球細胞は、Cellular Technology 社の管理の下、血液提供者からの同意を得た上で採血、連結不可能匿名化されている。また本細胞の使用については国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理審査委員会による承認を得ている。

## C. 研究結果

### C.1. Cell-based binding assay による抗原結合能の評価

抗 CD20 抗体リツキシマブ野生型、Fcγ受容体高親和性改変体 (mutant-1 : G236A/S239D/I332E)<sup>2)</sup>、Fcγ受容体低親和性改変体 (mutant-2 : L234A/L235A)<sup>3)</sup> を作製し、CD20 を高発現するパーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞に対する結合実験を行った。野生型、高親和性改変体 (mutant-1)、低親和性改変体 (mutant-2) の何れの抗体においても添加濃度に依存した結合の増加が認められ、そ

の見かけの解離定数 (Kd 値) は約 5.8 nM (0.84 μg/ml) であった (図 1 A)。

医薬品医療機器総合機構から公開されているリツキシマブ®の審査報告書では、<sup>125</sup>I 標識リツキシマブを用いた SB 細胞 (ヒト由来 CD20 陽性細胞) への結合実験の結果が示されており、その見かけの Kd 値は 5.2 nM とされている。このことは本研究で用いた非標識抗体と蛍光標識二次抗体を用いたフローサイトメーターによる結合実験により、放射標識抗体を用いた従来の結合実験と同様に抗原結合能の評価が可能であることを示している。放射性物質による抗体医薬品の直接標識は抗体の機能に影響を及ぼす可能性があること、放射標識した抗体を使用するには実験室の制約があることなどを考慮すると、本研究で用いた蛍光標識二次抗体とフローサイトメーターを用いた結合実験系の有用性は高いと考えられる。

### C.2. Cell-based binding assay による Fcγ受容体結合能の評価

リツキシマブとその改変体について、Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用いて Fcγ受容体に対する結合実験を行った。高親和性改変体 (mutant-1) で野生型に比べて著しい結合能の増加が認められ、低親和性改変体 (mutant-2) では結合能の減弱が観察されたことから、本実験系により Fc 領域の機能の差異を検出可能であることが示された (図 1 B)。

しかし、今回の実験条件では結合量が飽和に達しなかったため、最大結合量 (Bmax) を算出することができず、Kd 値での結合性の比較は不可能であった。抗原に結合していない抗体の FcγRIIa および FcγRIIIa に対する結合親和性は数百 nM (数十 μg/ml) と報告されており<sup>4)</sup>、本実験系で Kd 値を算出するにはより高濃度の抗体の添加が必要である。細胞を用いた結合実験系では、実験に要する試料の容量等を考慮すると Kd 値の算出に必要な高濃度の抗体を添加することは現実的ではなく、Fcγ受容体親和性を定量的に評価する場合には、速度論的解析が可能な表面プラズモン共鳴 (SPR) 法等の利用を検討する必要があると考えられた。

### C.3. PBMC を用いた ADCC 活性測定

PBMC をエフェクター細胞として Daudi 細胞に対するリツキシマブ野生型、高親和性改変体 (mutant-1)、低親和性改変体 (mutant-2) の ADCC 活性を測定した結果、野生型および高親和性改変体 (mutant-1) において、添加抗体濃度に依存した細胞傷害活性の増強が認められ、ともに 1  $\mu\text{g/ml}$  において約 60% の細胞死が検出された (図 2)。この際の 50% 効果濃度 (EC50) は野生型 22.9  $\text{ng/ml}$  に対し、高親和性改変体 (mutant-1) では 11.3  $\text{ng/ml}$  であり、EC50 の比から高親和性改変体 (mutant-1) は野生型に比べて約 2 倍の ADCC 活性を有することが示された。低親和性改変体 (mutant-2) の ADCC 活性はこれらに比べて低く、EC50 は算出不可能であった。

ここで用いた PBMC をエフェクター細胞とする方法は、ADCC 活性測定法として一般的に用いられている方法である。抗原結合に依存した Fc $\gamma$  受容体の活性化を反映した結果が得られるが、PBMC のドナーやロットによる反応性の違いや再現性の低さが問題となり、品質試験法としては適していない。本実験結果も、複数ロットの PBMC を検討した中で反応性の高いロットを用いて取得したものであり、同一ロットを用いても最大活性等の反応性については再現性が高くなかった。

そこで、次に、エフェクター細胞として Fc $\gamma$  受容体発現細胞を用いて、標的細胞とエフェクター細胞の架橋を指標に、抗原結合に依存した Fc $\gamma$  受容体結合を評価する Bridging assay 法について検討した。

### C.4. Fc $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay

リツキシマブによる標的細胞とエフェクター細胞の架橋 (bridging) を評価するため、標的細胞として Daudi 細胞を、エフェクター細胞として Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa 細胞を用い、Bridging Assay を行った (図 3)。野生型リツキシマブでは添加濃度の増加に伴い、両細胞の架橋の亢進が認められ、最大で 80% 程度の標的細胞の架橋

が観察された (EC50 = 39.7  $\text{ng/ml}$ )。また高親和性改変体 (mutant-1) は野生型に比べてより強い細胞架橋能を示した (EC50 = 23.1  $\text{ng/ml}$ )。野生型と高親和性改変体 (mutant-1) の EC50 比は 1.7 であり、PBMC を用いた ADCC 活性測定系で算出された力価比と比較的近い値を示したことから、Bridging Assay が ADCC 活性測定の代替試験法として有用である可能性が示された。

一方、低親和性改変体 (mutant-2) および陰性コントロールとして用いたポリクローナル hIgG では顕著な架橋の亢進は認められなかった。低親和性改変体 (mutant-2) は PBMC を用いた ADCC 活性測定系では高濃度で細胞傷害活性を示していたものである。リツキシマブは CD20 発現細胞に対してアゴニスト活性を発揮し、アポトーシスを誘導することが知られている。標的細胞死を検出する測定系では、エフェクター細胞を介した細胞傷害活性に加えて、このようなアゴニスト活性も寄与するため、Bridging Assay とは異なる結果が得られたと考えられる。したがって、抗体医薬品の Fc 領域の機能を評価するという観点では、抗原結合に依存した Fc $\gamma$  受容体との結合のみを評価可能であるという点で Bridging Assay がより適切な評価系であると考えられた。

### D. 考察

本研究では、フローサイトメトリーを用いた Cell-based binding assay 及び Bridging assay 系を構築し、リツキシマブとリツキシマブ改変体をモデルとした実験により、その有用性を検証した。構築した Cell-based binding assay は、細胞表面の膜タンパクを抗原とする抗体医薬品の抗原結合能の評価や、種々の抗体医薬品の Fc $\gamma$  受容体結合能の評価に有用と考えられた。また、Bridging assay は、末梢血単核球を用いる従来の ADCC 活性測定法の代替法として、抗原結合に依存した Fc $\gamma$  受容体結合能の評価に有用な方法であると考えられた。

以下に、抗体医薬品の品質評価におけるこれらの試験法の位置づけと役割、及び、細胞を用いた結合性試験を品質試験として設定する際の



留意事項を考察する。

### D.1. Cell-based binding assay

近年開発の進展の著しいバイオ医薬品の中でも抗体医薬品はその大部分を占め、様々な抗原タンパク質を標的とする抗体医薬品の開発が進められている。特に抗腫瘍活性を目的とした抗体医薬品の開発は顕著であり、これまでの化学薬品では治療が困難であった様々な腫瘍に対する治療薬として大きな期待が寄せられている。これらの抗腫瘍抗体医薬品の多くは標的腫瘍細胞表面に特異的あるいは過剰に存在する膜タンパク質を標的としており、受容体シグナルの阻害やエフェクター細胞等を介した細胞傷害活性が主要な薬理メカニズムとして知られている。

抗体医薬品の品質確保のためには、その作用メカニズムに基づいた適切な生物活性試験を設定することが重要である。サイトカイン等の可溶性抗原の中和を目的とする抗体医薬品では、抗原結合能と中和活性の相関性を確認した上で、生物活性試験として抗原結合実験が設定されることが多い。この場合、可溶性抗原の組換えタンパク質を固相化した ELISA 等が用いられるのが一般的である。また、細胞膜上の受容体タンパク質を標的とし、リガンド結合による受容体シグナル活性化の阻害を目的とした抗体薬品においても、受容体シグナルの阻害活性と抗原結合能の相関関係が示されれば、可溶性抗原の場合と同様に ELISA 等の結合実験を生物活性評価法として設定することが可能であると考えられる。

しかしながら、複数膜貫通型タンパク質を抗原とする場合には、生理的条件下での構造を保持した組換えタンパク質の調製が困難なことから、抗体のエピトープとなるペプチド断片等が結合実験に用いられ、必ずしも細胞膜上での抗原-抗体結合能を評価できないという問題が生じることも想定される。このような場合には、標的タンパク質を発現する細胞を用いた Cell-based binding assay が有用な選択肢の一つとして挙げられる。

一方、細胞傷害活性を作用メカニズムとする抗体医薬品では抗原結合能に加え、Fc 領域を介

した補体や Fc $\gamma$ 受容体といったエフェクタータンパク質との結合についても評価する必要がある。生産細胞の培養条件や精製方法などにより変動しうる抗体 Fc 領域の糖鎖構造が、これらエフェクタータンパク質との結合能に影響を及ぼすことが知られており、工程評価の面でも Fc 領域を介した生物活性の評価系の有用性は高い。Fc $\gamma$ 受容体は糖タンパク質でありその糖鎖修飾が抗体との結合に影響すること<sup>5)</sup>、細胞膜上で多量体化して働く Fc $\gamma$ 受容体との結合は単量体の組換えタンパク質を用いた実験では評価できない例があること<sup>6)</sup>などから、Fc $\gamma$ 受容体との結合実験においても Cell-based binding assay の適応が妥当であると考えられる。

### D.2. Bridging assay

抗腫瘍効果を持つ抗体医薬品の作用メカニズムの一つである ADCC 活性は、抗体の抗原への結合、それに伴う Fc $\gamma$ 受容体との結合（標的細胞とエフェクター細胞の架橋）、Fc $\gamma$ 受容体の活性化によるエフェクター細胞内のシグナル伝達の亢進という多段階の反応からなる。本実験でも示されたように、抗原と結合していない抗体の Fc $\gamma$ RIIa および Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合親和性は低く（図 1 B）、抗原と結合することではじめて強い結合能を示す（図 3）。これによりエフェクター細胞上の Fc $\gamma$ 受容体が活性化され、抗原発現細胞に対する細胞傷害活性が発揮される。

このような作用機構を考えると、細胞傷害活性を有する抗体医薬品の品質評価においては、抗原結合に依存した Fc 領域の Fc $\gamma$ 受容体への結合の評価が重要となる。組換えタンパク質を用いた ELISA 法や SPR 法では、標的細胞膜上に局在する抗原と結合した抗体の機能を評価することは困難なため、細胞膜上に発現する抗原への抗体医薬品の結合とそれに追従する Fc $\gamma$ 受容体への結合を同時に評価可能な実験系として、Cell-based binding assay を応用した Bridging Assay が有用と考えられる。

### D.3. 細胞を用いた結合性試験設定における留意事項

本研究で用いた Cell-based binding assay や

Bridging Assay のような細胞を用いた結合性試験では、抗原や Fc $\gamma$ 受容体タンパク質の調製が不要であり、より生理的条件下に近い環境で抗体医薬品の結合活性を評価可能であるという利点を有する。一方で、抗原あるいは Fc $\gamma$ 受容体タンパク質の発現量など、実験に用いる細胞の状態の変化が試験結果に影響を及ぼす可能性が考えられ、その管理には十分な注意が必要である。実験に用いる細胞の一定の品質を保つためには、医薬品生産に用いられる細胞基材の管理の考え方が参考になる。すなわち、抗原や受容体タンパク質の発現量、発現の安定性等、試験結果に影響する細胞の特性を十分に解析して、試験に適した細胞株を樹立し、セル・バンク・システムにより細胞を管理する。試験に使用可能な継代数を設定することに加え、実際に試験に用いる細胞の状態（継代後の日数、細胞密度等）を一定に保つことにより、より頑健な試験系の構築が可能であろう。

## E. 結論

1) フローサイトメーターを用いた抗原および Fc $\gamma$ 受容体結合実験系の品質試験法への適応可能性について検討を行い、その有用性を明らかにした。

2) 抗原発現細胞とエフェクター細胞の架橋を評価する Bridging Assay 系の PBMC を用いた ADCC 活性測定系の代替試験法として有用性について明らかにした。

## F. 参考文献

- 1) Shapiro, M. A. 2010. Regulatory Perspectives and Expectations of Fc Effector Function Assessment. In *AAPS National Biotechnology Conference*.
- 2) Richards, J. O., Karki, S., Lazar, G. A., Chen, H., Dang, W., Desjarlais, J. R. 2008. Optimization of antibody binding to Fc $\gamma$ RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 7:2517-2527
- 3) Xu, D., Alegre, M. L., Varga, S. S., Rothermel, A. L., Collins, A. M., Pulito, V. L., Hanna, L.

S., Dolan, K. P., Parren, P. W., Bluestone, J. A., Jolliffe, L. K., Zivin, R. A. 2000. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell Immunol*. 200(1):16-26

4) Bruhns, P., B. Iannascoli, P. England, D. A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daeron. 2009. Specificity and affinity of human Fc $\gamma$  receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-3725.

5) Shibata-Koyama, M., S. Iida, A. Okazaki, K. Mori, K. Kitajima-Miyama, S. Saitou, S. Kakita, Y. Kanda, K. Shitara, K. Kato, and M. Satoh. 2009. The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology* 19:126-134.

6) Shashidharamurthy, R., F. Zhang, A. Amano, A. Kamat, R. Panchanathan, D. Ezekwudo, C. Zhu, and P. Selvaraj. 2009. Dynamics of the interaction of human IgG subtype immune complexes with cells expressing R and H allelic forms of a low-affinity Fc gamma receptor CD32A. *J Immunol*. 183:8216-8224.

## G. 研究発表

### 1. 総説

1) 中澤志織, 橋井 則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題 特性解析の新しい位置づけと重要性 レギュラトリーサイエンス学会誌 2(1), 21-30 (2012)

### 2. 学会発表

1) 多田稔, 石井明子, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: Fc $\gamma$ 受容体発現細胞を用いた抗体医薬品の ADCC 活性評価系の開発 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

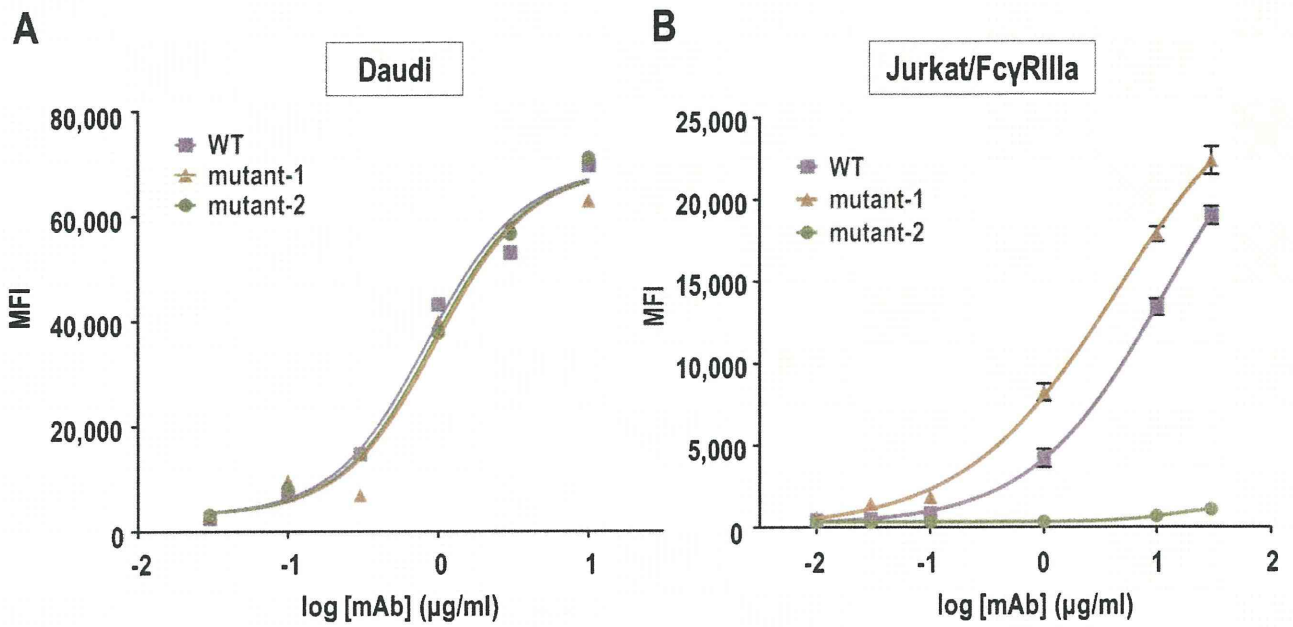


図1 フローサイトメーターを用いた Cell-based binding assay  
 A : Daudi 細胞に対するリツキシマブ野生型および改変体の結合  
 B : Jurkat/FcγRIIIa 細胞に対するリツキシマブ野生型および改変体の結合

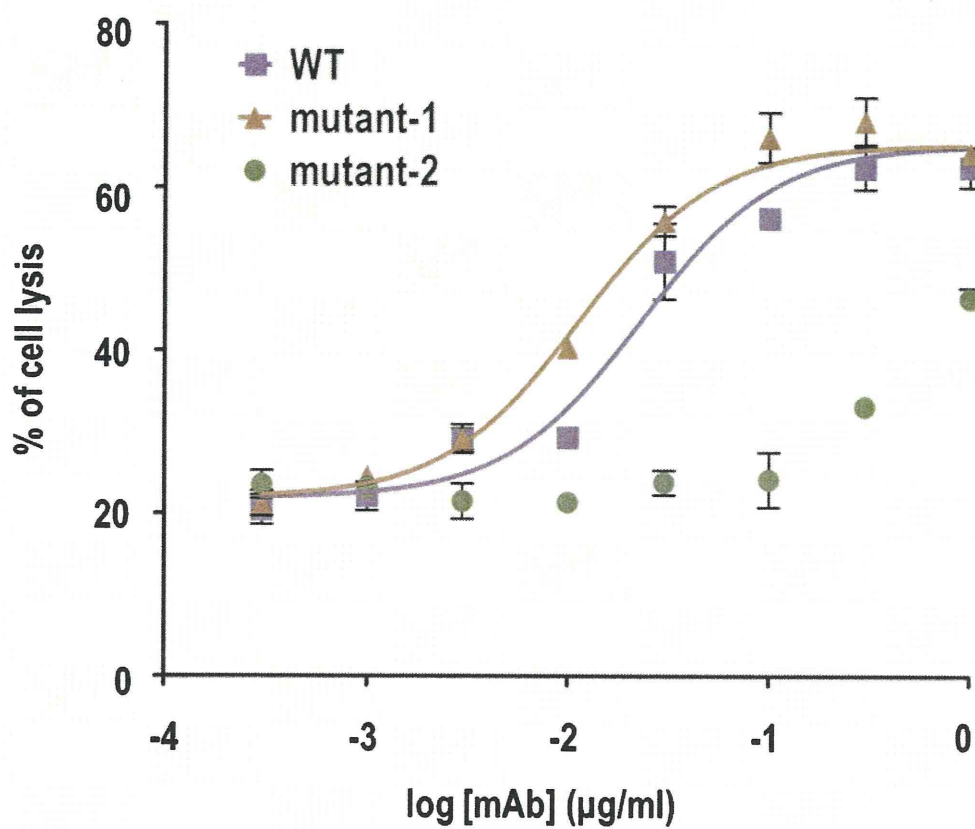


図2 末梢血単核球細胞を用いた ADCC 活性測定



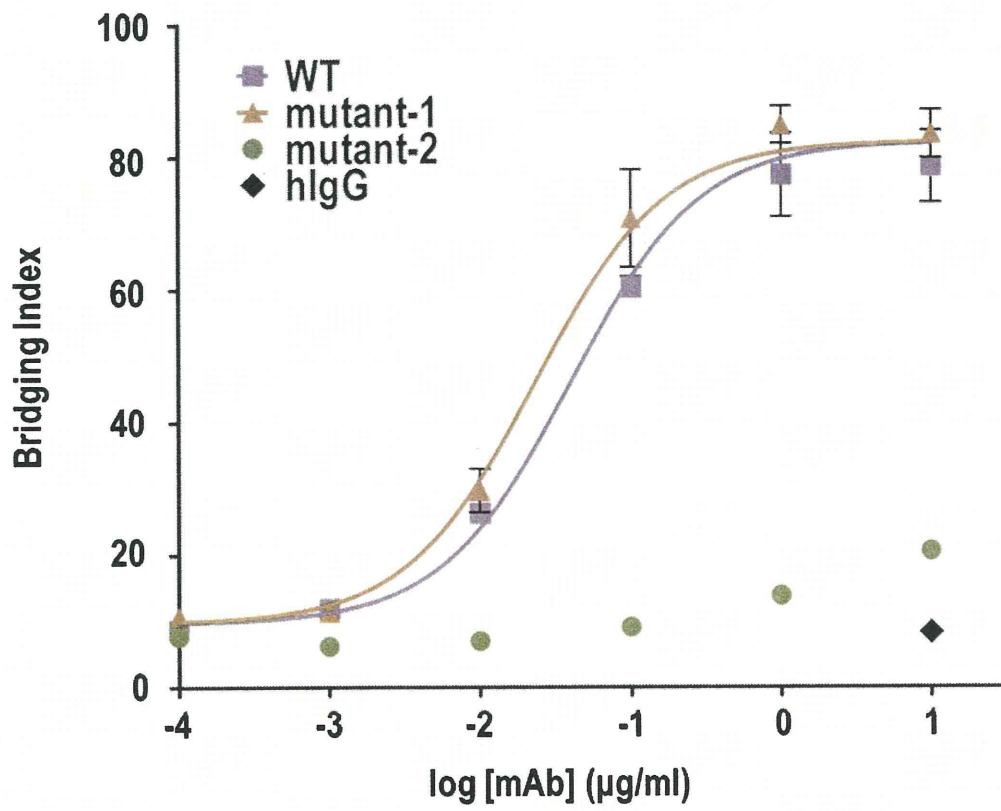


図3 Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用いた Bridging Assay

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する研究

研究分担者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室長  
協力研究者 風間宏美

**研究要旨** 製造方法の異なる 3 種類の IFN- $\beta$  1a 製剤の力価測定法として A549 細胞を用いた導入レポーター遺伝子の発現促進を指標とした試験法を開発しその有用性について検討した。その結果、表示単位に依存した遺伝子発現の促進が観察されたが、表示単位依存性については製剤間で若干の違いがみられた。したがって、本法は IFN- $\beta$  1a 製剤の力価の違いを識別可能な力価測定法として有用であることが示された。

**A. 研究目的**

組換え DNA 技術を応用した治療用タンパク質は 1980 年代に始めて承認されて以来、多くの治療用タンパク質が開発・承認されている。現在、これらの治療用タンパク質は特許切れを迎えることとなり、それらのバイオ後発品の開発が活発に行われつつある。実際、我が国においても成長ホルモンとエリスロポエチンのバイオ後続品が承認され、複数の G-CSF においてバイオ後続品の承認申請が行なわれている。

治療用タンパク質は化学薬品に比べて構造が複雑で、様々な翻訳後修飾を受けるため、製造方法が異なる場合、一次構造は同じであっても翻訳後修飾や高次構造が同一であるかどうかは不明である。したがって、臨床試験を行う前に、有効性評価の一環として生物活性を測定し、バイオ後続品と先発品と同等/同質性を評価することが必要である。さらに、品質特性に違いがある場合においても、有効性及び安全性において

先発品と同等/同質性が認められれば承認が可能な場合もありうる。したがって、バイオ後続品の同等/同質性評価は、構造に関する品質特性だけでなく、生物活性の観点からも評価を行うことが重要と考えられた。

再発寛解性多発性硬化症及び C 型肝炎の治療薬として用いられている IFN- $\beta$  1a はバイオ後続品の有力な候補の一つである。IFN- $\beta$  の力価はウイルスを用いた細胞変性効果アッセイに基づき力価が設定される。本法は高感度であり、臨床効果に関与するシグナル伝達系の阻害を反映できる。しかし、以下のような欠点もある。用いるセルライン及びウイルスが研究者により異なるため、研究室間における結果の比較が困難である。操作が煩雑であり、ウイルスを取り扱うため特別の施設が必要である。

そこで、本研究ではより簡便な IFN- $\beta$  の力価測定法として A549 細胞を用いた導入レポーター遺伝子の発現促進を指標とした試験法を開発しその有用性について検討し

た。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

天然型及び組換え IFN- $\beta$  1a 製剤は製造会社から代理店を介して購入した。Cignal™ ISRE Reporter Assay Kit は SABiosciences から購入した。ピッカジーンデュアルシーパンジー発光キットは TOYO INK から購入した。Lipofectamine™ LTX & Plus Reagent は life technologies™ から購入した。

### 2. 細胞培養及びレポーター遺伝子の導入

A549 細胞は 2%FCS 含有 DMEM 0.216ml に  $1 \times 10^4$  個含むように調製して 48 ウェルに添加し 1 日培養した。

以下に示すようにしてレポーター遺伝子の導入を行なった。1 ウェル当たり、OPTI-MEM 43.2  $\mu$ l、plasmid DNA (ISRE-responsive firely luciferase construct) 1  $\mu$ l を含む液を調製し、Plus reagents を 0.216  $\mu$ l 加え室温で 5 分放置した。混合液に Lipofectamine™ LTX を 0.648  $\mu$ l を添加し混合後 25 分室温で放置した。最終混合物を培地に添加しウェルを軽く前後にゆすり、16 時間培養した。

IFN  $\beta$  1a 製剤を 2%FCS 含有 DMEM で希釈する。2%FCS 含有 DMEM 0.18ml で培地交換を行い、希釈した IFN  $\beta$  1a 製剤を 20  $\mu$ l 加え 6 時間培養した。

### 3. Firely Luciferase 活性の測定

培養液を除き、PBS(-)0.2ml で 2 回洗浄する。5 倍希釈した溶解剤 96  $\mu$ l を加え MicroMixer E36 (TAITEC) にプレートをセットし 15 分ミキシングした。10 回ピペティングした後、1.5ml のチューブに溶解液を移し 15 秒間 10 回超音波処理を行なっ

た。測定用 96 ウェルプレートにピッカジーン発光試薬 0.1ml、細胞溶解液 20  $\mu$ l 加え上記のように 30 秒ミキシングした。プレートを Wallac 1420 Workstation にセットし Firely Luciferase 活性を化学発光により測定する。活性は 2 ウェルで同じサンプルを測定し、その平均として示した

## C. 結果

IFN- $\beta$  1a 製剤は 0.1 IU/ml から表示単位依存的に Firely Luciferase 活性を増加させ 10~100IU/ml で飽和に達し、最大で 4.9~7.4 倍活性が増大した(図 1)。各 IFN- $\beta$  1a 製剤で表示単位依存性に若干の違いが見られた。IFN- $\beta$  1a 製剤 1 では 1 IU/ml において 2.9 倍活性が増加し、10 IU/ml で最大に達し 7.4 倍活性が増加した。IFN- $\beta$  1a 製剤 2 では 1 IU/ml において 3.4 倍活性が増加し、10 IU/ml で最大に達し 5.1 倍活性が増加した。IFN- $\beta$  1a 製剤 3 では 1 IU/ml 及び 10 IU/ml においてそれぞれ 1.9 倍及び 4.0 倍活性が増加し、100 IU/ml で最大に達し 5.9 倍活性が増加した。各 IFN- $\beta$  1a 製剤で表示単位依存性が若干異なる理由については明らかではないが、細胞変性効果アッセイに比べて高感度及び高精度で測定できることによるのかもしれない。

基礎的検討を行なっている過程において以下の点に注意する必要があるようになった。1 番目の点は培地の選択である。コントロールと IFN- $\beta$  1a 製剤添加における活性の違いをより顕著にするために、無血清培養を試みた。その結果、レポーター遺伝子の導入操作によりかなりの細胞が死滅することにより活性は低くそのばらつきも大きかった。1~2%FCS を培地に加えると、これら

の問題点は改善されると共に IFN- $\beta$  1a 製剤に対する高い反応性も示された。2 番目の点は IFN- $\beta$  1a の反応時間である。IFN- $\beta$  1a 製剤添加 24 時間後活性を測定したところコントロールと IFN- $\beta$  1a 製剤を添加したもので活性の違いはみられなかった。これは恐らく 24 時間では IFN- $\beta$  1a の有無にかかわらず活性が飽和に達したためと考えられる。この点は反応時間を 6 時間に設定することにより改善された。3 番目の点は細胞を溶解する条件である。ミキシングのみを用いて細胞を溶解させると活性のばらつきが大きかった。顕微鏡で観察すると細胞が十分溶解されていなかったため、この原因は基質と酵素の反応性の低下によることが示された。この点はさらに超音波処理を行なうことにより改善された。

#### D. 考察

IFN- $\beta$  1a 製剤の力価測定法として細胞変性効果アッセイとの相関が示されている方法が 3 種類ある。最初の二つは A431 細胞を用いて IFN- $\beta$  1a による MxA タンパク質あるいは mRNA レベルの増加を測定するものである。もう一つは HuH7 細胞を用いて導入されたレポーター遺伝子の IFN- $\beta$  1a による発現増加を測定するものである。前者と本法を比較すると同様な表示単位依存性を示し同等な結果が得られた。本法と比較すると、MxA タンパク質は ELISA により MxA mRNA レベルは RNA を抽出後 RT-PCR により測定する必要がある。本法では細胞を溶解して基質と反応させるだけで測定可能であり、より簡便な方法と考えられる。後者を本法と比較すると同様な表示単位依存性を示し同等な結果が得られた。なお、この方

法では IFN- $\beta$  1a 製剤添加 12 時間後に活性を測定している。本法は、間接的ではあるが細胞変性効果アッセイとの相関が示されたことから、細胞変性効果アッセイと置き換え可能であることが示された。

#### E. 結論

製造方法の異なる 3 種類の IFN- $\beta$  1a 製剤の力価測定法として A549 細胞を用いた導入レポーター遺伝子の発現促進を指標とした試験法を開発しその有用性について検討した。その結果、表示単位に依存した遺伝子発現の促進が観察されたが、その単位依存性については若干の違いがみられた。本法は間接的ではあるが細胞変性効果アッセイとの相関が示された。したがって、本法は細胞変性効果アッセイと置き換え可能な簡便で高感度及び高精度な IFN- $\beta$  1a 製剤の力価測定法として有用であることが示された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 新見伸吾、原島 瑞、日向昌司、山口照英、治療用タンパク質の免疫原性 その 4 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス Vol, 42, No.9 818-826 (2011)
2. 橋井則貴、石井明子、新見伸吾、川崎ナナ共著：「第 1 章申請に必要な品質評価試験項目設定でのポイント 第 1 節申請をふまえた構造・特性解析での押

- さえ所」第1章 第2節申請で求められる不純物分析のポイント」、『バイオ医薬品 CMC 申請のための品質評価と申請書作成 実学集』, 技術情報協会 (東京), 3-18, 19-35 (2011)
3. 新見伸吾、石井明子、川崎ナナ バイオ医薬品の不純物の評価(1) ファームテクジャパン Vol. 28, No.3 43-38 (2012)
  4. 新見伸吾、石井明子、川崎ナナ バイオ医薬品の不純物の評価(2) ファームテクジャパン Vol. 28, No.4 113-119 (2012)
  5. 新見伸吾: 第6章 ウイルス除去, 不活化 2) 抗体医薬品製造におけるプラットフォーム精製工程によるウイルスクリアランス, 不純物の除去, 『医薬品の品質管理とウイルス安全性』, 文光堂, 222-236 (2011)
  6. 新見伸吾: ヒト IgG 及びヒト化モノクローナル抗体製剤において様々なストレスにより誘導された凝集体の粒子径及び相対光散乱強度の動的散乱による測定, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 129, 55-60 (2011)
2. 学会発表
    1. 原島 瑞、日向昌司、長岡陽子、斉藤千恵子、布留川みなこ、関泰一朗、有賀豊彦、川崎ナナ、新見伸吾 初代培養肝細胞におけるデキサメタゾン依存的な特異的遺伝子の mRNA レベルの増加のプロテアソーム阻害剤による制御機構の解明 第 84 回 日本生化学会大会、京都 (2011年12月7-10日)
    2. 新見伸吾 生物製品の免疫原性と安全性について 平成23年11月11日全国衛生化学技術協議会年会 自由集会部門 (2011.11) (長野)
    3. 新見伸吾 バイオ医薬品における免疫原性のリスク因子について 平成24年2月10日 日本製薬工業協会 バイオ医薬品委員会 技術実務委員会 全体会合、(2012.2) (東京)
    4. 新見伸吾 免疫原性のリスク因子と予測方法 -有効性に及ぼす影響、低下させる治療戦略- 平成24年3月12日 薬事エキスパート研修会 第4回 品質/科学技術特別研修 (2012.3) (大阪)
    5. Shingo Niimi Risk factors of immunogenicity and their mitigation, Immunogenicity Seminar 2012 (2012.3) (東京)
    6. Shingo Niimi Japanese Concerns of the Japanese Regulatory Agency regarding Immunogenicity of Monoclonal Antibody Products in Relation to their efficacy and Safety, 1st Immunogenicity Determinates and Correlates Conference Prediction and Mitigation Risk (2011.5) (United States)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. そのほか なし



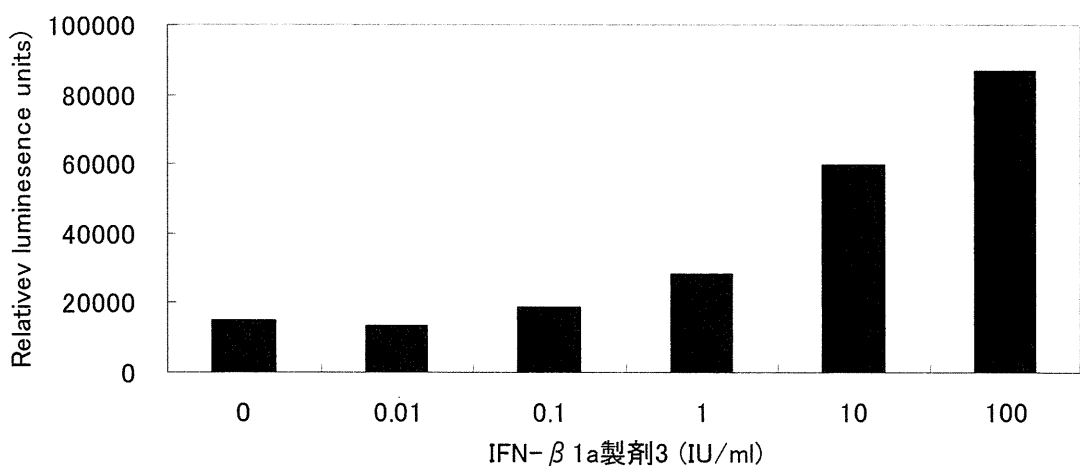
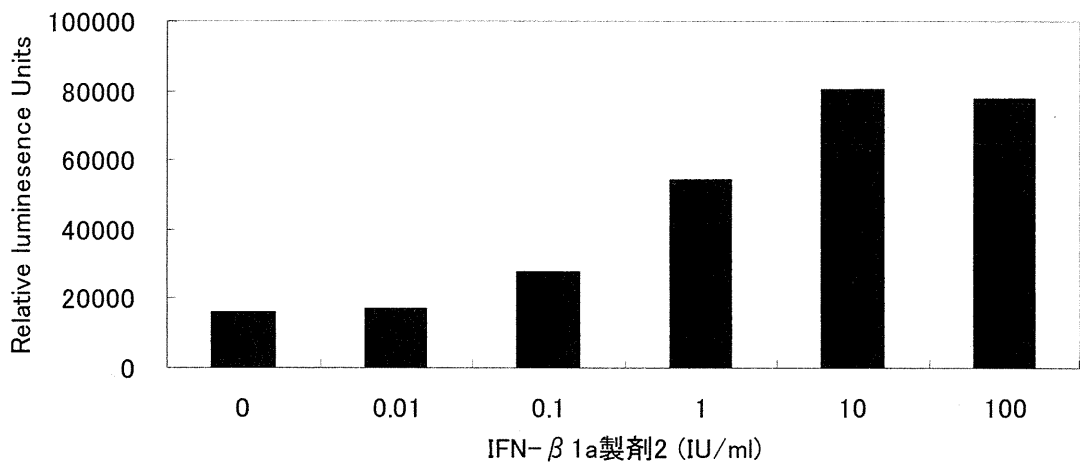
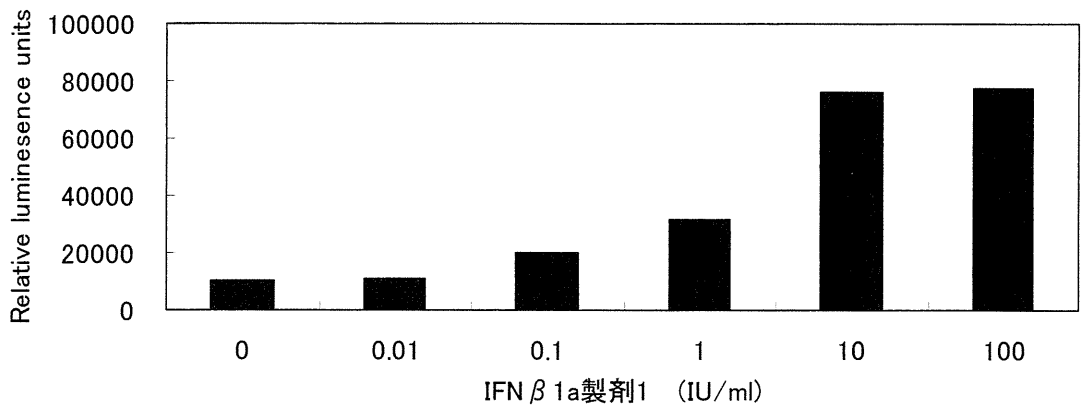


図1 IFN-β 1a 製剤の力価測定

## 遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究

研究分担者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長

遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究の一環として、遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件について、欧州医薬品庁（EMA）から発出されているガイダンスを中心に検討した。遺伝子治療薬にはプラスミド、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、遺伝子導入細胞など様々な性質の異なる種類のもが含まれるが、これら遺伝子治療薬に共通して必要とされる非臨床試験の要件と、遺伝子治療薬の種類により異なる特有の考慮事項について考察した。

### A. 研究目的

遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患やがん、心血管疾患、神経変性疾患等、現在効果的な治療法が確立されていない難病や生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患に対する革新的医療として期待されている。本邦では平成7年に最初の臨床研究が開始されて以来、現在までに30件程の臨床研究・試験が実施され、治療を受けた患者数も200名程度にのぼる。平成20年には我が国で初めての遺伝子治療薬の承認申請が出されるなど、遺伝子治療薬の開発は急速に進展している。しかし、先天性免疫不全症やレーバー先天性黒内障などで目覚ましい成果が得られている一方で、レトロウイルスベクターを用いたX連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）の遺伝子治療における白血病の発症など、遺伝子治療により予想を超える重篤な副作用の発現も認められ、遺伝子治療薬の本格的な実用化・普及には克服すべき課題は未だ多い。特に重要な課題となるのは遺伝子治療薬の品質・安全性等の確保である。遺伝子治療薬のような先端医薬品は、従来の医薬品にない概念や画期的な機能を有しているため、その品質、安全性、

有効性の確保には新たな評価手法の開発が望まれている。このような技術の進歩が著しい分野においては、特に臨床開発が進んでいる海外での開発動向を踏まえ、国際的な水準からみた医薬品の評価手法や開発ステージで明らかにしておくべきデータ、あるいは承認申請において求められるデータ等の科学的妥当性について絶えず評価・検証し、評価手法や規制の国際調和を推進することが医薬品審査の迅速化には重要である。本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療薬の品質・安全性確保のための評価手法や規制に関する国際調和を推進するための基盤的研究を行うものである。

今年度は、遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件について、欧州医薬品庁（EMA）から発出されているガイダンスを中心に検討した。

### B. 研究方法

2008年5月にEMAから発出された「GUIDELINE ON THE NON-CLINICAL STUDIES REQUIRED BEFORE FIRST CLINICAL USE OF GENE THERAPY