

図 18 トラスツズマブの検量線

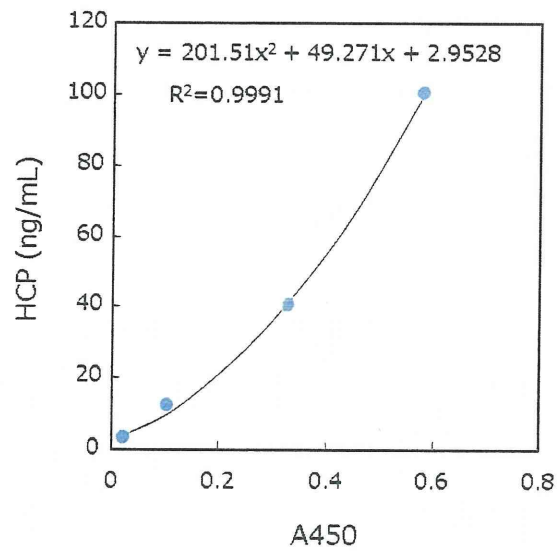


図 19 CHO 細胞由来タンパク質の検量線

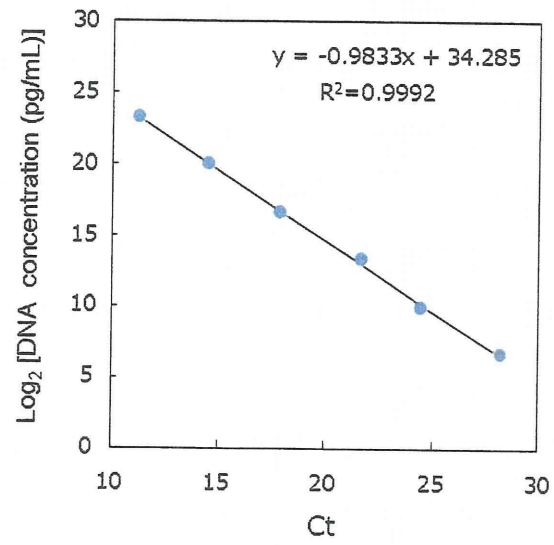


図 20 CHO 細胞由来 DNA の検量線

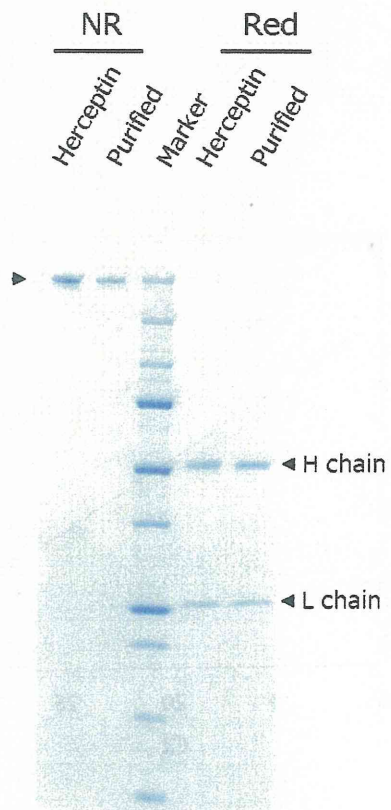


図 21 実験的に製造したトラスツズマブと市販トラスツズマブ製剤の SDS-PAGE による比較

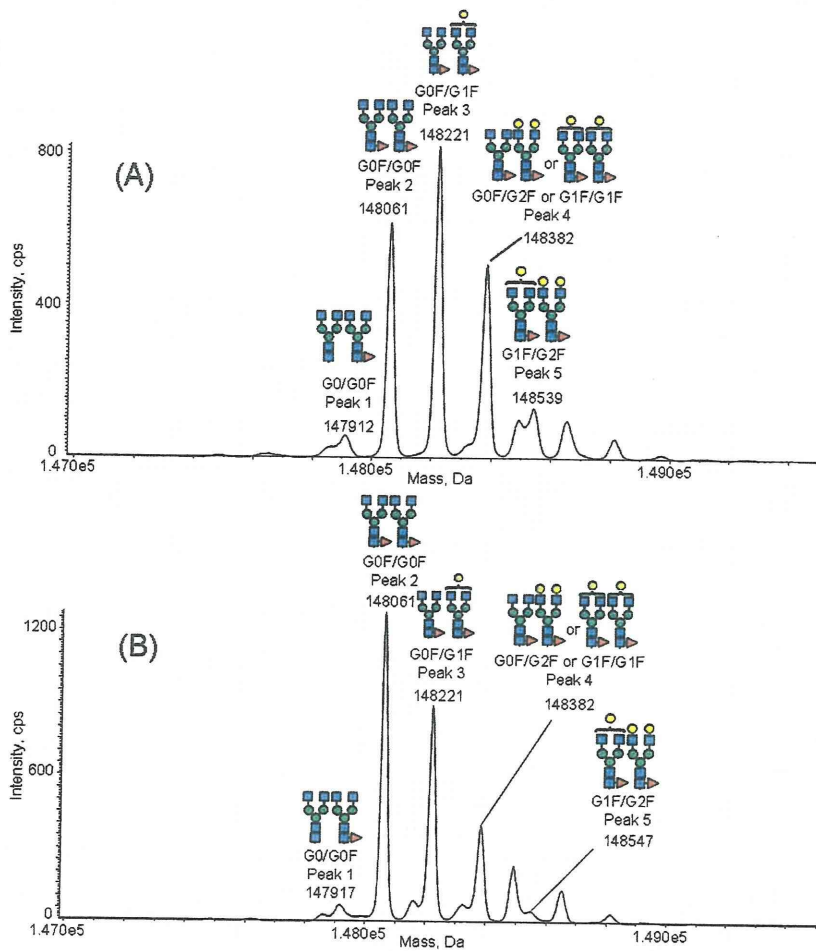


図 22 LC/MS により得られたトラスツズマブのデコンボリューションマススペクトル (A), ハーセプチン; (B), 本研究のトラスツズマブ

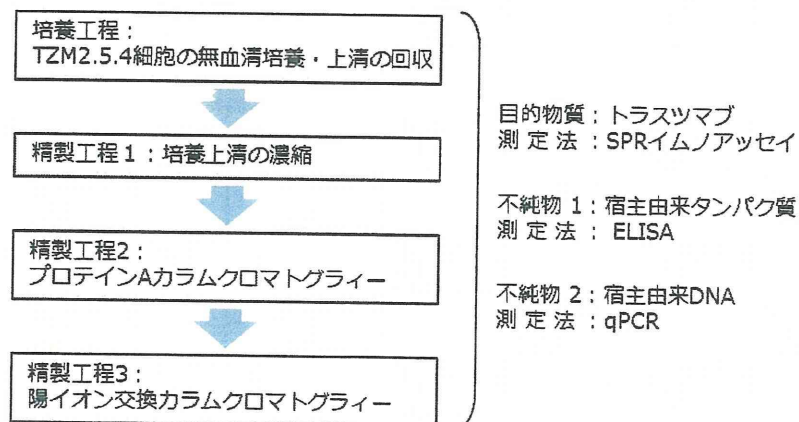


図 23 トラスツズマブの実験的製造工程フロー

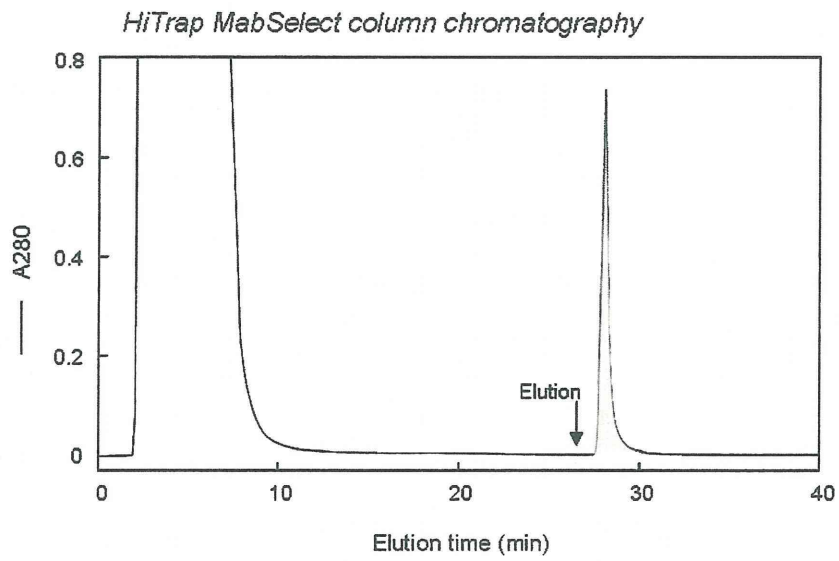


図 24 プロテイン A カラムクロマトグラフィー

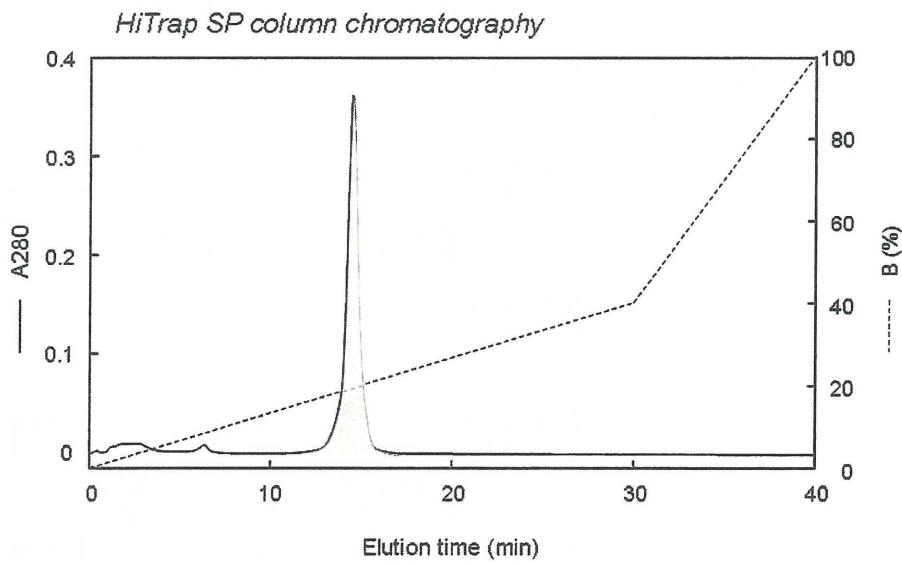


図 25 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

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

代表的な先端バイオ医薬品である抗体医薬品に関して、平成 21 年度は、近年の製品開発動向を調査し、エフェクター活性を増強あるいは減弱した抗体医薬品の開発が進んでいること、また、これらの抗体医薬品の生物活性評価の課題として、抗体と抗原及び Fc γ 受容体の結合が関与する抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性の評価法開発が必要とされていることを明らかにした。平成 22～23 年度は、ADCC 活性を持つ抗体医薬品の評価に有用な方法として、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、抗 TNF 抗体及び抗 CD20 抗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 γ 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 γ 受容体結合能の評価に有用な方法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 34 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 7 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⁽¹⁾。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⁽²⁾。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「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス（案）」が公開され、意見公募中である。

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的とした。

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 γ 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。

本研究では、初年度（平成 21 年度）に、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実施し、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⁽²⁾という状況も踏まえ、抗腫瘍効果に関わる ADCC 活性の評価の現状について検討した。平成 22~23 年度は、新たな ADCC 活性評価法の確立を目指し、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 γ 受容体結合能評価系、ならびに、Bridging assay による抗原結合に依存した Fc γ 受容体結合能評価系の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

B.1 抗体医薬品の開発動向調査

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。

B.2 細胞および抗体

Fc γ RIIa あるいは Fc γ RIIIa を安定発現する Jurkat 細胞（以下、各々 Jurkat/ Fc γ RIIa, Jurkat/ Fc γ 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 Bleocin（Merck、終濃度 30 μ g/ml）あるいは 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 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 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。

実験に用いた抗体、アダリムマブ（Humira[®], Abbott）、インフリキシマブ（Remicade[®], Centocor）、ゴリムマブ（Simponi[®], Centocor）は医薬品として販売されているものを購入して使用した。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.3 Fc γ 受容体発現細胞株を用いた Fc γ 受容体

結合能の評価

B.3.1 蛍光標識二次抗体を用いた結合実験

Jurkat/ FcγRIIIa (一点あたり 2×10^5 個) を染色バッファー (PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN₃) で洗浄した後、抗体医薬品を各濃度で添加し 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、FITC 標識した F(ab')₂ anti-human IgG1κ (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) で解析を行った。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 FITC 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent Intensity: MFI) を算出した。見かけ上の解離定数 (Kd 値) は GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて、抗体濃度に対して FITC の MFI をプロットし非線形回帰分析により算出した。

B.3.2 蛍光標識した抗体医薬品を用いた結合実験

抗体医薬品の蛍光標識は DyLight488 Antibody Labeling Kit (PIERCE) を用いて添付文書に従って行った。蛍光色素の結合量はどれも抗体医薬品 1 分子あたり 4 分子程度となるように調製した。Jurkat/ FcγRIIIa (一点あたり 2×10^5 個) を染色バッファーで洗浄した後、DyLight488 標識した抗体医薬品を各濃度で添加し 4°C で 30 分間結合させた。染色バッファーで二回洗浄を行った後、フローサイトメーターによる解析を行い、見かけ上の結合親和性を測定した。

B.3.3 抗原抗体複合体を用いた結合実験

TNFα 組換えタンパク質は QIAGEN Expression Kits (QIAGEN) を使用して大腸菌により His タグを付加した状態で発現および精製を行った。その後 TAGZyme System (QIAGEN) により His タグを除去したものを実験に使用した。抗原抗体複合体を形成させる

ため、DyLight488 標識した Adalimumab と TNFα をモル比 3 : 1 で混合し、37°C で 30 分間反応させた。抗体濃度を基準に希釈系列を調製し Jurkat/FcγRIIIa に対する結合をフローサイトメーターにより評価した。

B.4 Fcγ受容体発現細胞株を用いた 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 (5×10^4 個) と Jurkat/FcγRIIIa (5×10^5 個) を混合し、各濃度の Rituximab 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 の細胞の割合と各々の集団における平均蛍光強度を算出した。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。

B.5 Daudi 細胞を用いたリツキシマブ改変体の CD20 結合能の評価

Daudi 細胞 (一点あたり 2×10^5 個) を染色バッファー (PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN₃) 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')₂ 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.6 PBMC を用いた ADCC 活性測定

標的細胞 Daudi (一点あたり 1×10^4 個) およびエフェクター細胞 PBMC (一点あたり 2×10^5 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。

(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. 抗体医薬品の開発動向調査

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、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。

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 γ 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 γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII の 3 つの Fc γ 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 γ RIIa、Fc γ RIIIa および負に制御する Fc γ RIIb が知られている。Fc γ RIIa には 131R/131H、Fc γ 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 γ 受容体への結合の重要性が *in vivo* レベルで示されている^(3, 4)。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 γ 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⁽⁵⁾。ヒトの天然型 IgG1~4 はこれら Fc γ 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 γ 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 γ 受容体ファミリーの中でも Fc γ 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 γ 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 γ 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 γ RIIa との結合を高める改変体も開発されている。Fc γ RIIa と抑制型受容体である Fc γ 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 γ 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型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⁽⁶⁾および新川ら⁽⁷⁾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 α 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 γ 受容体との結合と ADCC 活性の発揮に必須であるが、Sazinsky ら⁽⁸⁾、Jung ら⁽⁹⁾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 γ 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エクリズマブ、アバタセプトが承認されている。抗 C5 抗体であるエクリズマブは IgG2 と IgG4 のキメラ化により⁽¹⁰⁾、CTLA-4 と Fc の融合タンパク質であるアバタセプトはヒンジ領域へのアミノ酸点変異の導入により⁽¹¹⁾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) であるロミプロスチム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⁽¹²⁾。

IgG1 について Fc γ 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 γ 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 γ RIIb 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 γ 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。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。

C.2. フローサイトメトリーを用いた結合活性評価系

ADCC 活性は、抗体の抗原への結合、それに伴う Fc γ 受容体との結合 (標的細胞とエフェクター細胞の架橋)、Fc γ 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。抗原および Fc γ 受容体発現細胞を用い、抗原結合に依存した抗体医薬品の Fc γ 受容体結合活性を測定することができれば、末梢血を用いない ADCC 活性評価法を構築できると考え、以下の検討を行った。

C.2.1. Fc γ 受容体結合能評価系の構築 (Cell-based binding assay)

Jurkat/Fc γ RIIIa 細胞にアダリムマブを結合させ、蛍光標識した二次抗体を用いて蛍光強度

を指標に結合量を解析した結果、添加濃度に依存した結合の増加が認められた (図 1-A, B)。非線形回帰により求められる Kd 値は約 48 nM であった。FcγRIIIa に対する IgG1 の Kd 値は SPR 法を用いた多くの論文で数百 nM と報告されており^(13, 14)、cell-based binding assay では見かけ上、より強い親和性を示すことが明らかとなった。

次に DyLight488 標識したアダリムマブを用いて同様に結合能を測定した結果、未標識体を用いた場合に比べて結合能は低下し、Kd 値は約 84 nM であった (図 1-C, D)。同程度の蛍光色素を結合させたインフリキシマブおよびゴリムマブについても FcγRIIIa 親和性を測定したところ、各々の Kd 値は~91 nM、~70 nM であった (図 1-E, F)。蛍光標識に限らず抗体の化学標識による活性の低下や不均一性の増大は不可避な問題ではあるが、比較試料を同様の条件で標識するなどの工夫によりその影響を最小限に抑えることが重要であると考えられた。

次に、抗原抗体複合体を形成した際の抗体医薬品の FcγRIIIa 結合能を評価するため、DyLight488 標識したアダリムマブと TNFα をモル比 3 : 1 で混合しアダリムマブ・TNFα 複合体を形成させた。Jurkat/FcγRIIIa 細胞に対する結合をフローサイトメーターにより測定した結果、結合能の著しい増加が認められた (図 2)。

抗体医薬品の結合解析に汎用される SPR 法はリガンド・アナライトの結合をリアルタイムでモニター可能であり結合速度及び解離速度を含めた結合親和性の評価に強みを有する一方で、免疫複合体のように不均一で結合部位の複数存在するような試料の測定は困難である。図 2 に示したように、cell-based binding assay ではこのような免疫複合体を形成した抗体医薬品の Fcγ受容体親和性を簡便に評価できることも特徴である。

以上のように cell-based binding assay は簡便性、迅速性およびコスト面のみならず、より生体内に近い環境で結合を評価可能であるという利点を有しており、抗体医薬品の Fcγ受容体

親和性の評価において有用な選択肢の一つであるといえる。また Fcγ受容体発現細胞を用いた実験では抗体医薬品の結合のみならず、それに伴う細胞内シグナル活性化の評価も可能である。サイトカイン等の可溶性タンパク質を標的とし ADCC 活性を示さない抗体医薬品においても、免疫複合体の形成とその Fcγ受容体への結合およびシグナル活性化は、貪食による抗体の分解や免疫細胞の介在するインフュージョン反応の発生にも関与しうる特性であり、Fcγ受容体発現細胞を用いたアッセイ系はこれらの評価においても有用であると考えられる。

C.2.2 標的細胞とエフェクター細胞の架橋評価系の構築 (Bridging Assay)

抗原に結合していない IgG は、ADCC 活性の発揮に主要な役割を果たす FcγRIIIa (CD32) および FcγRIIIa (CD16) に対する親和性が低く、抗原タンパク質と結合することではじめて強い結合能を示す。また、標的細胞における抗原の発現量 (抗原密度) や抗原認識部位の違いが抗体医薬品の ADCC 活性に影響することが知られている。このため ADCC 活性の評価においては、生理的条件に近い状態で抗原と結合した抗体医薬品の活性 (Fcγ受容体結合・活性化能) をモニターすることが重要となるが、上で述べたような結合実験では標的細胞膜上に局在する抗原タンパク質と結合した抗体の機能を評価することは困難である。そこで次に、細胞膜上に発現する抗原に対する抗体医薬品の結合とそれに追従する Fcγ受容体への結合を同時に評価可能な実験系として、Bridging Assay の有用性について検討を行った。

抗 CD20 抗体である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 CD20 を高発現するパーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞を、モデルエフェクター細胞として Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用い、各々異なる蛍光色素で標識した。両者を混合しフローサイトメーターを用いて解析した結果、抗体非存在下では、ほぼ両者の単独の細胞のみが観察された (図

3-A, B)。一方、リツキシマブ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下では両蛍光色素陽性 (double positive) の細胞集団の増加が観察された (図 3-C)。これらの集団は細胞の大きさを反映する前方散乱光が増大しており (図 3-D)、標的細胞とエフェクター細胞が抗体により架橋されたものであると考えられた。

表 5 にリツキシマブ存在下で培養した際のエフェクター細胞単独 (Jurkat)、標的細胞単独 (Daudi) およびこれらが架橋された細胞 (complex) の割合と各々の平均蛍光強度 (MFI) を示した。標的細胞を標識した Calcein の平均蛍光強度は標的細胞単独 (MFI = 47.92) と架橋された細胞集団 (MFI = 58.45) とで大きな差がないのに対し、エフェクター細胞を標識した Calcein-Violet の平均蛍光強度は架橋された細胞集団 (MFI = 130.89) においてエフェクター細胞単独 (MFI = 72.25) のおよそ 1.8 倍の値を示した。このことから架橋された細胞集団においては一個の標的細胞に対して複数個のエフェクター細胞が結合している可能性が考えられた。

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能を定量的に示すため、標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された細胞の割合を指標 (Bridging Index) とした。リツキシマブ濃度を変化させてアッセイを行った結果、抗体濃度の増加に伴って架橋された標的細胞の割合の増加が認められた (図 4)。

C.2.3 Cell-based binding assay によるリツキシマブ変体体の抗原結合能の評価

構築した Cell-based binding assay 系及び Bridging assay 系が、Fc γ 受容体結合親和性の異なる抗体の結合活性を識別できることを確認するため、抗 CD20 抗体リツキシマブ野生型、Fc γ 受容体高親和性変体 (mutant-1 : G236A/S239D/I332E) ⁽¹⁴⁾、Fc γ 受容体低親和性変体 (mutant-2 : L234A/L235A) ⁽¹⁵⁾ を作製し、結合実験を行った。

まず、作製した抗体の抗原結合能を確認するため、CD20 を高発現するバーキットリンパ腫

細胞株である Daudi 細胞に対する結合実験を行った。野生型、高親和性変体 (mutant-1)、低親和性変体 (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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であった (図 5A)。

C.2.4 Cell-based binding assay によるリツキシマブ変体体の Fc γ 受容体結合能の評価

リツキシマブとその変体について、Jurkat/Fc γ RIIIa 細胞を用いて Fc γ 受容体に対する結合実験を行った。高親和性変体 (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 5B)。

C.2.5 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、高親和性変体 (mutant-1)、低親和性変体 (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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において約 60% の細胞死が検出された (図 6)。この際の 50% 効果濃度 (EC50) は野生型 22.9 ng/ml に対し、高親和性変体 (mutant-1) では 11.3 ng/ml であり、EC50 の比から高親和性変体 (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 γ 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。

C.2.6 リツキシマブ改変体を用いた Bridging Assay 系の評価

リツキシマブおよびリツキシマブ改変体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/FcγRIIIa 細胞を用い、Bridging Assay を行った (図 7)。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 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 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 Fcγ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

D.1. 抗体医薬品の開発動向調査

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、Fcγ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⁽²⁾。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 Fcγ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 FcγRIIIa 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(14, 16)。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た。

D.2. フローサイトメトリーを用いたCell-based binding assay及びBriding assayの有用性

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Fcγ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。Fcγ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(17)、細胞膜上で多量体化して働くFcγ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(18)などから、Fcγ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。

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Fcγ受容体との結合、Fcγ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 FcγRIIa および FcγRIIIa に対する結合親和性は低く (図 5B)、抗原と結合することではじめて強い結合能を示す (図 7)。これによりエフェクター細胞上の Fcγ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 Fcγ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 Fcγ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 Fcγ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 Fcγ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) 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動向について調査し、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が進んでいること、また、エフェクター活性測定系の開発が求められていることを明らかにした。

2) Fcγ受容体発現細胞株を用いた Cell-based Binding Assay を構築し、抗 TNFα抗体及び抗 CD20 抗体を用いたモデル実験により、本試験法が抗体医薬品の抗原結合能、及び、Fcγ受容体結合の測定に適用可能であることを示した。

3) 抗原発現細胞及び Fcγ受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay を構築し、抗 CD20 抗体を用いたモデル実験により、標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された細胞の割合を bridging index とすることで、抗体医薬品の抗原結合能と Fcγ受容体結合能を評価できること、Bridging assay は、頑健性の高い試験法確立が困難とされる ADCC 活性の代替試験法になり得ることを示した。

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. 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.
4. 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.
 5. 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.
 6. 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 Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277:26733-26740.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Jung, S. T., S. T. Reddy, T. H. Kang, M. J. Borrok, I. Sandlie, P. W. Tucker, and G. Georgiou. Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind Fcγ₃ potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:604-609.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Strohl, W. R. 2009. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Opin Biotechnol* 20:685-691.
 13. Bruhns, P., B. Iannascoli, P. England, D. A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daeron. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-3725.
 14. Richards, J. O., S. Karki, G. A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J. R. Desjarlais. 2008. Optimization of antibody binding to Fcγ₃ enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 7:2517-2527.
 15. Xu, D., M. L. Alegre, S. S. Varga, A. L. Rothermel, A. M. Collins, V. L. Pulito, L. S. Hanna, K. P. Dolan, P. W. Parren, J. A. Bluestone, L. K. Jolliffe, and R. A. Zivin. 2000. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function

- variant antibodies. *Cell Immunol* 200:16-26.
16. 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 USA* 103:4005-4010.
 17. 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.
 18. 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.
- (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) Akiko Ishii-Watabe, Yoshiro Saito, Takuo Suzuki, Minoru Tada, Maho Ukaji, Keiko Maekawa, Kouichi Kurose, Nahoko Kaniwa, Jun-ichi Sawada, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi, Takako Eguchi Nakajima, Ken Kato, Yasuhide Yamada, Yasuhiro Shimada, Teruhiko Yoshida, Takashi Ura, Miyuki Saito, Kei Muro, Toshihiko Doi, Nozomu Fuse, Takayuki Yoshino, Atsushi Ohtsu, Nagahiro Saijo, Tetsuya Hamaguchi, Haruhiro Okuda, Yasuhiro Matsumura: Genetic polymorphisms of *FCGRT* encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab. Pharmacokine* 25(6), 578-587 (2010)
 - 4) 石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、川西 徹、山口照英、川崎ナナ: 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn 日本薬理学会誌 136(5), 280-4 (2010)
 - 5) 石井明子、川崎ナナ: バイオ治験薬の品質安全性確保 ファームテクジャパン 16, 69-80 (2010)
 - 6) 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)

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

2. 学会発表

- 1) 多田 稔、石井明子、鈴木琢雄、斎藤嘉朗、川崎ナナ: FCGRT 遺伝子多型解析により見出された Neonatal Fc receptor (FcRn) 変異体の機能解析」 BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会) 2010 年 12 月

- 2) 多田 稔、石井明子、鈴木琢雄、豊田淑江、川崎ナナ：複合体形成能に着目した抗 TNF α 抗体医薬品の生物活性評価に関する研究
日本薬学会第 131 年会 2010 年 3 月 静岡
- 3) 多田 稔、石井明子、鈴木琢雄、川崎ナナ：Fc γ 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

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 tixetan	Zevalin	IgG1κ (MX-DTPA : ⁹⁰ Y標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	2008
		Zevalin	IgG1κ (MX-DTPA : ¹¹¹ In標識)					2008
	Iodine 131 Tositumomab	Bexxar	IgG2aλ (¹³¹ I標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA
	Catumaxomab	Removab	mouse IgG2aκ (EpCAM), rat IgG2bλ (CD3)	EpCAM, CD3	癌性腹水	NA	2009	NA
キメラ抗体								
	Abciximab	ReoPro	IgG1 (Fab)	GP1Ib/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
	Brentuximab vedotin	Adcetris	IgG1 (MMAE結合、4分子) プロテアーゼ	CD30	ホジキンリンパ腫	2011	NA	NA
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 (カリクマイシン結合)	CD33	急性骨髄性白血病	2000	refused	2005
	Alemtuzumab	Campath	IgG1κ (ラットモノクローヒト化)	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	IgG1κ	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007
	Natalizumab	Tysabri	IgG4κ	α4integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA
	Tocilizumab	Actemra	IgG1κ	IL-6R	キャッスルマン病、関節リウ	2010	2009	2005
	Ranibizumab	Lucentis	IgG1κFab (48K77カブント)	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	2009
	Eculizumab	Soliris	IgG2/4κ (改変Fc)	C5	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	2010
	Certolizumab pegol	Cimzia	Fab+PEG	TNFα	関節リウマチ、重症クローン	2008	2009	NA
	Mogamulizumab	Poteligeo	IgG1	CCR4	CCR4陽性成人T細胞白血病リ	NA	NA	2012
ヒト抗体								
	Adalimumab	Humira	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2002	2003	2008
	Panimumab	Vectibx	IgG2κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	2007	2010
	Golimumab	Simponi	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2009	2009	2011
	Ustekinumab	Stelara	IgG1κ	IL12, IL23の共通サブユニットp40	乾癬	2009	2009	2011
	Canakinumab	Ilaris	IgG1κ	IL-1β	クリオピリン関連周期性症候	2009	2009	2011
	Ofatumumab	Arzerra アルゼラ	IgG1κ	CD20	慢性リンパ性白血病	2009	2010	NA
	Denosumab	Prolia/Xgeva ランマーク	IgG2	RANKL	骨病変、骨粗鬆症	2010	2010	2012
	Ipilimumab	Yervoy	IgG1κ	CTLA4	黒色腫	2011	2011	NA
	Belimumab	Benlysta	IgG1λ	BlyS (B lymphocyte stimulator)	SLE	2011	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 + 改変Fc	CD80/CD86	関節リウマチ	2005	2007	2010
	Rilonacept	Arcalyst	IL-1 R + IL-1 RAcP + Fc	IL-1	クリオピリン関連周期性症候	2008	2009	NA
	Romiplostim	NPLate	改変Fc+TPOアゴニストペプチド	TPOR	血小板減少性紫斑病	2008	2009	2011
	Belatacept	Nulojix	改変CTLA4 + 改変Fc	CD80/CD86	腎移植拒絶の防止	2011	2011	NA
	Aflibercept	Eylea	VEGFR1R2+Fc	VEGF		2011	NA	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 3AB4a	製造/品質
2004	Concept paper on the need to revise the guideline on production and quality control of monoclonal antibodies (3AB4a) CHMP/BWP/64/04	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/BWP/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/BWP/632613/2009	非臨床/臨床

表3. エフェクター活性の増強を目的とした Fc 領域改変の例

開発	改変部位、技術	特徴	文献
Genentech	IgG1-S298A, E333A, K334A	ADCC 増強 (II _L , IIIa _↑)	a
Xencor	IgG1-S239D, I332E	ADCC 増強 (IIIa/IIb _↑)	b, c
	IgG1-S239D, A330L, I332E	ADCC 増強、CDC 減弱 (IIIa/IIb _↑ , C1q _↓)	b, d
	IgG1-G236A, S239D, I332E	ADCC 増強 (IIa/IIb _↑ , IIIa _↑)	e
AME/Eli Lilly	IgG1-D280H, K290S, S298D	ADCC 増強 (IIb _↓ , IIIa _↑)	f
Macrogenics	IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L	ADCC 増強 (IIa _↑ , IIIa _↑)	g
Abgenix/Amgen	IgG1-K326A, E333A	CDC 増強、ADCC 維持 (C1q _↑)	h
	IgG1-K326W, E333S IgG2-E333S	CDC 増強、ADCC 消失 (C1q _↑)	h
協和発酵キリン	IgG1/IgG3 mixed isotype	CDC 増強、ADCC 維持 (C1q _↑)	i, j
	Fucose depletion from IgG1 oligosaccharide (FucT8(-/-) CHO)	ADCC 増強 (IIIa _↑)	i, k
GlycArt/Roche	Enrichment of Fucose-free mAb (GnTIII overexpression)	ADCC 増強	l
MIT	IgG1-S298G, T299A	糖鎖修飾を受けず ADCC 活性を維持	m
Univ. of Texas	IgG1-E382V, M428I (produced in E.coli)	FcγI を介した単球による 抗腫瘍活性	n

Strohl WR *et al.* Cur. Opin. in Biotech. 2009, 20:685-691 を参考に作成

* 特徴の項の括弧内は対象とする受容体あるいは補体との親和性の変化を記載している。

(IIIa/IIb_↑ は FcγRIIIa との親和性と FcγRIIb との親和性の比が増加したことを示す)

* 本表ではマクロファージ等による抗体依存性細胞食作用(ADCP)も ADCC 活性の一部として区別無く表記した。

- a) R.L. Shields, *et al.*, *J Biol Chem*, 276, 6591 (2001)
- b) G.A. Lazar, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4005 (2006)
- c) H.M. Horton, *et al.*, *Cancer Res*, 68, 8049 (2008)
- d) E.M. Bruckheimer, *et al.*, *Neoplasia*, 11, 509 (2009)
- e) J.O. Richards, *et al.*, *Mol Cancer Ther*, 7, 2517 (2008)
- f) J. Watkins, *et al.*, *Fc region variants. WO 2004/074455 A2*. 2004.
- g) J.B. Stavenhagen, *et al.*, *Cancer Res*, 67, 8882 (2007)
- h) E.E. Idusogie, *et al.*, *J Immunol*, 166, 2571 (2001)
- i) T. Kubota, *et al.*, *Cancer Sci*, 100, 1566 (2009)
- j) A. Natsume, *et al.*, *Cancer Res*, 68, 3863 (2008)
- k) T. Shinkawa, *et al.*, *J Biol Chem*, 278, 3466 (2003)
- l) C. Ferrara, *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 93, 851 (2006)
- m) S.L. Sazinsky, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20167 (2008)
- n) S.T. Jung, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 604