

表4. エフェクター活性の減弱を目的とした Fc 領域改変の例

開発	改変部位、技術	特徴	文献
Alexion (Eculizumab)	IgG2/IgG4 キメラ	ADCC, CDC 減弱	a
Bristol-Meyers (Abatacept)	IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S	ADCC 減弱	b
Tolerx/GlaxoSmithKline (Otelixizumab)	IgG1-N297A	ADCC 減弱 (Fc 部の糖鎖の除去)	c
GlaxoSmithKline (Clenoliximab)	IgG4-S228P, L236E	ADCC, CDC 減弱	d
Ortho Biotech (huOKT3)	IgG1-L234A, L235A	ADCC, CDC 減弱 サイトカインストームの抑制	e
Protein Design Labs (visilizumab)	IgG2-V234A, G237A	ADCC, CDC 減弱 サイトカインストームの抑制	f
Wellcome Lab.	IgG4-L235A, G237A, E318A	ADCC 減弱	g
Merck	IgG2-H268Q, V309L, A330S, P331S (IgG2m4)	ADCC, CDC 減弱	h
MedImmune	IgG1-L234F, L235E, P331S	ADCC, CDC 減弱	i
Xencor	IgG1-S267E, L328F	抑制型FcγIIb への選択的結合	j

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

- a) R.P. Rother, *et al.*, *Nat Biotechnol*, 25, 1256 (2007)
- b) P.M. Davis, *et al.*, *J Rheumatol*, 34, 2204 (2007)
- c) S. Bolt, *et al.*, *Eur J Immunol*, 23, 403 (1993)
- d) M.P. Reddy, *et al.*, *J Immunol*, 164, 1925 (2000)
- e) D. Xu, *et al.*, *Cell Immunol*, 200, 16 (2000)
- f) M.S. Cole, *et al.*, *Transplantation*, 68, 563 (1999)
- g) J.T. Hutchins, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11980 (1995)
- h) Z. An, *et al.*, *MAbs*, 1, 572 (2009)
- i) V. Oganessian, *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64, 700 (2008)
- j) S.Y. Chu, *et al.*, *Mol Immunol*, 45, 3926 (2008)

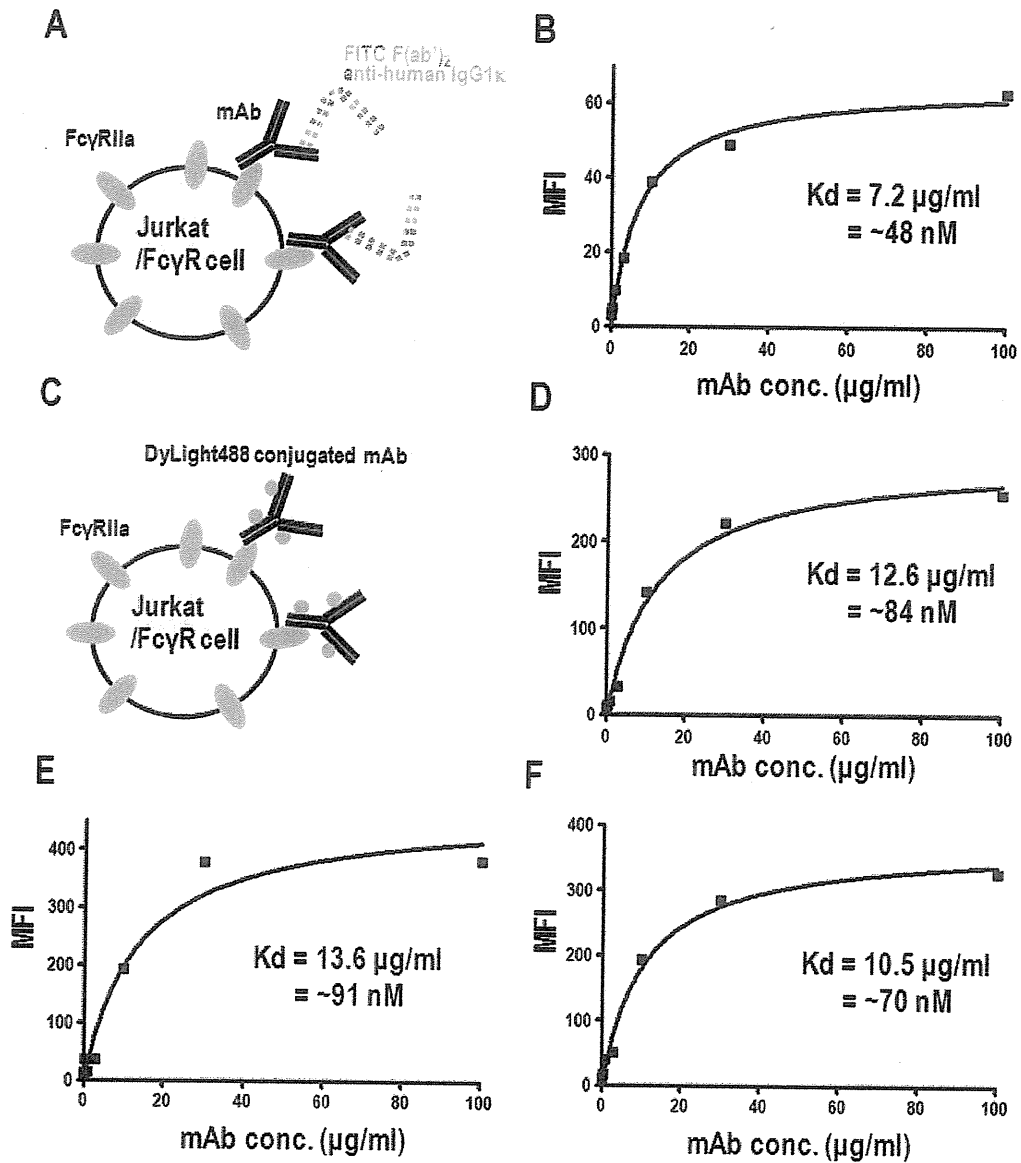


図1 Fc γ 受容体発現細胞株を用いた cell-based binding assay

A : 蛍光標識二次抗体を用いた結合実験の模式図

B : Jurkat/Fc γ RIIa に対するアダリムマブおよび FITC 標識二次抗体を用いた結合実験

C : DyLight488 標識抗体医薬品を用いた結合実験の模式図

D : Jurkat/Fc γ RIIa に対する DyLight488 標識アダリムマブの結合実験

E : Jurkat/Fc γ RIIa に対する DyLight488 標識インフリキシマブの結合実験

F : Jurkat/Fc γ RIIa に対する DyLight488 標識ゴリムマブの結合実験

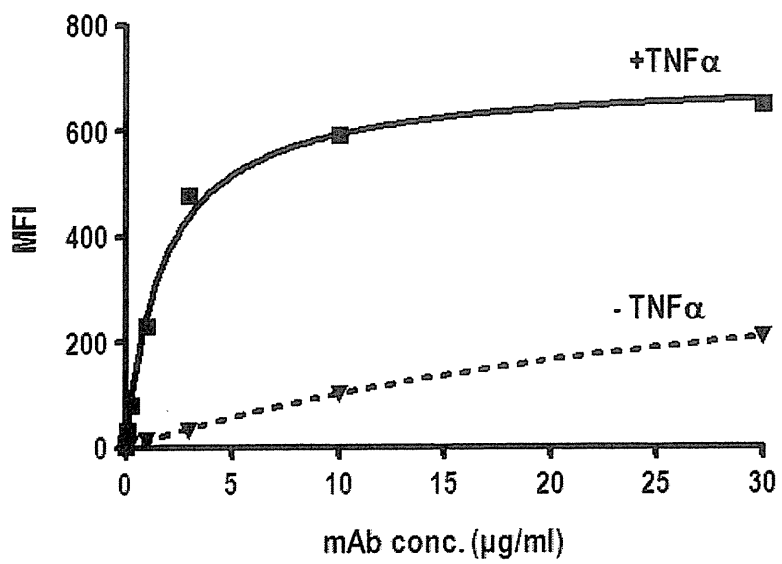


図2 Jurkat/FcγRIIa に対する TNFα-Adalimumab 複合体の結合

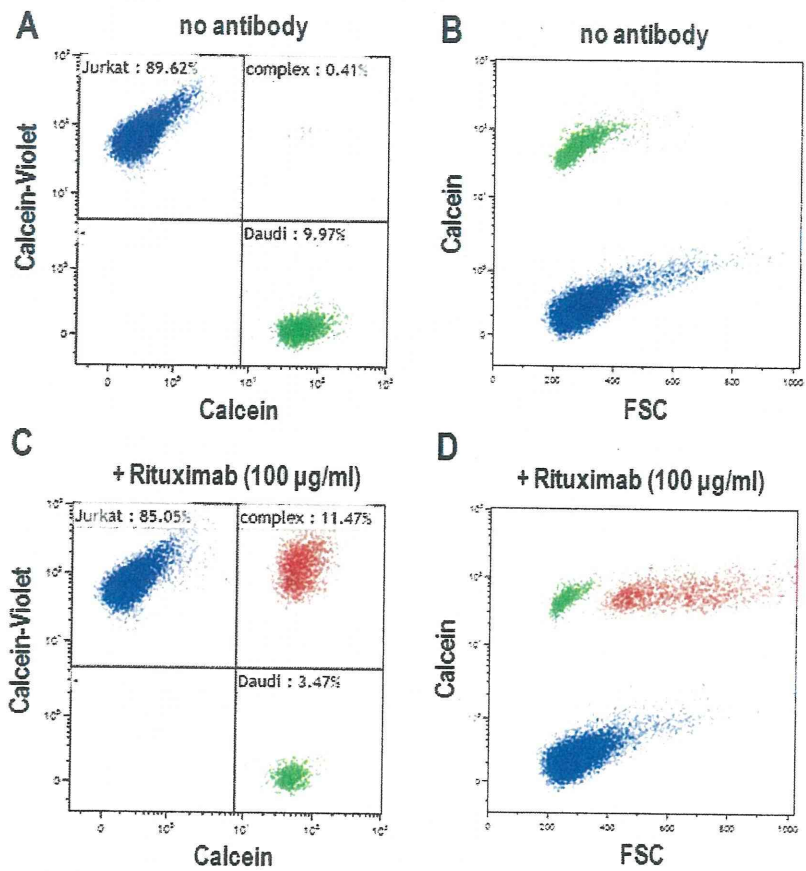


図3 リツキシマブによる Daudi 細胞と Jurkat/FcγRIIIa 細胞の架橋
 リツキシマブ非存在下 (A,B) および存在下 (C,D) における細胞集団の蛍光強度の
 ドットプロット。標的細胞 (Daudi) 単独を緑色、エフェクター細胞 (Jurkat/FcγRIIIa)
 単独を青色、両者が架橋されたもの (complex) を赤色で示した。

	% of total	Calcein MFI	Calcein-Violet MFI
Jurkat	85.05	0.29	72.25
Daudi	3.47	47.92	0.07
Complex	11.47	58.45	130.89

表5 各細胞集団の割合と平均蛍光強度(MFI)

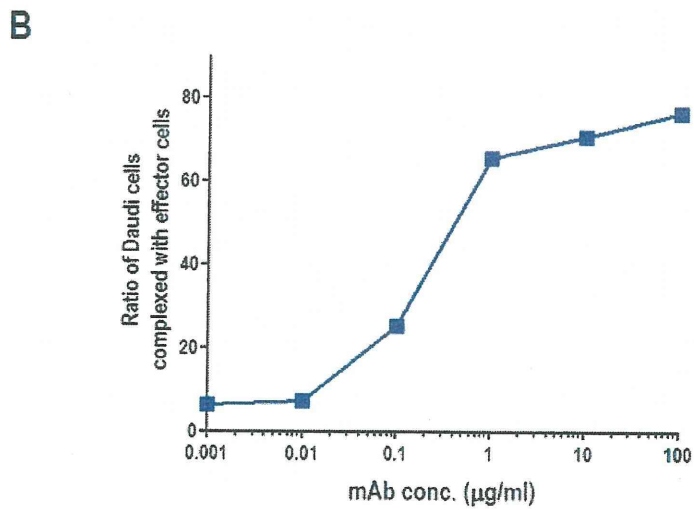
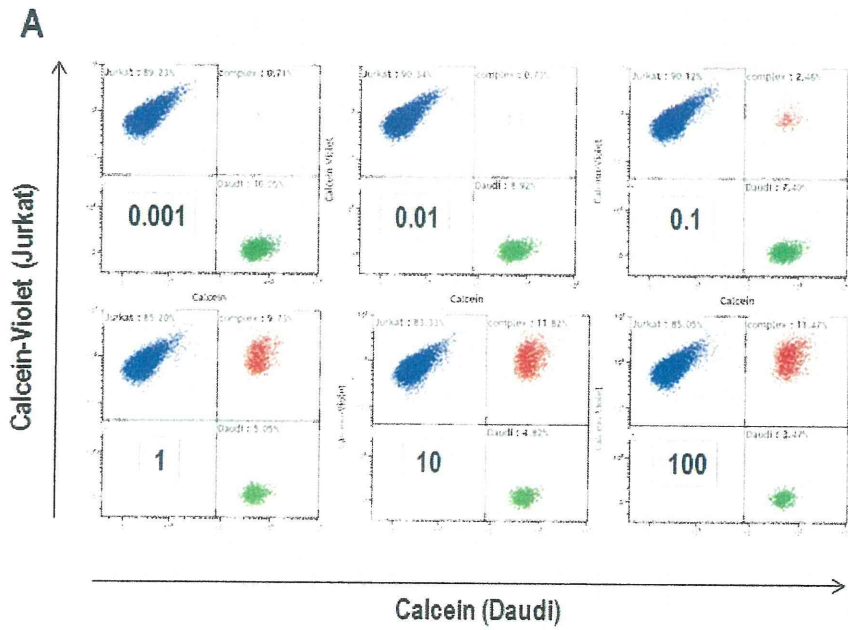


図4 Bridging Assay

A : リツキシマブの添加濃度を変化させた際のドットプロット

緑色-Daudi細胞、青色-Jurkat/FcγRIIIa細胞、赤色-架橋された細胞

B : 抗体濃度に依存した架橋細胞の割合の変化

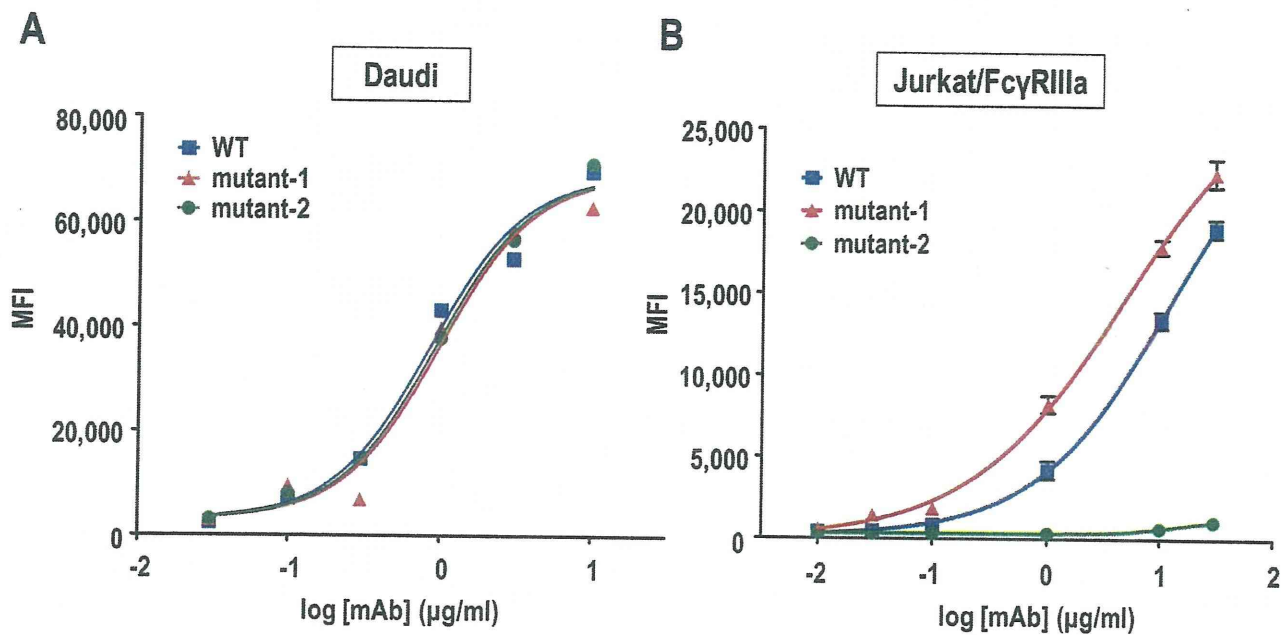


図5 フローサイトメーターを用いた Cell-based binding assay
 A : Daudi 細胞に対するリツキシマブ野生型および改変体の結合
 B : Jurkat/FcγRIIIa 細胞に対するリツキシマブ野生型および改変体の結合

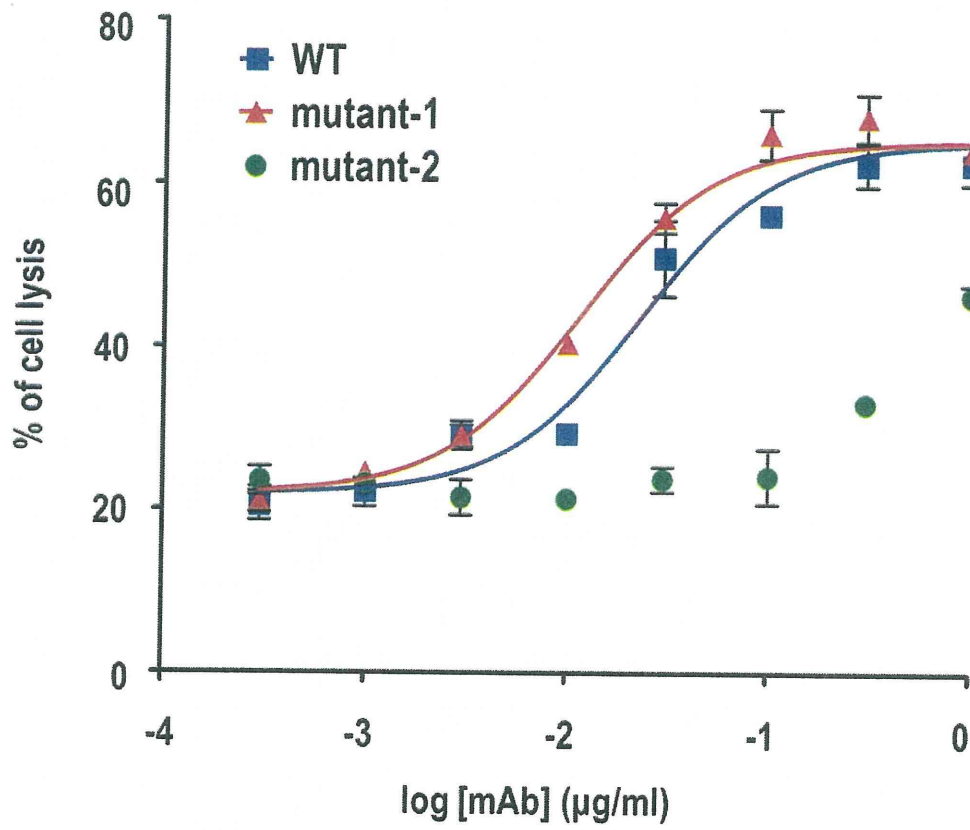


図6 末梢血単核球細胞を用いた ADCC 活性測定

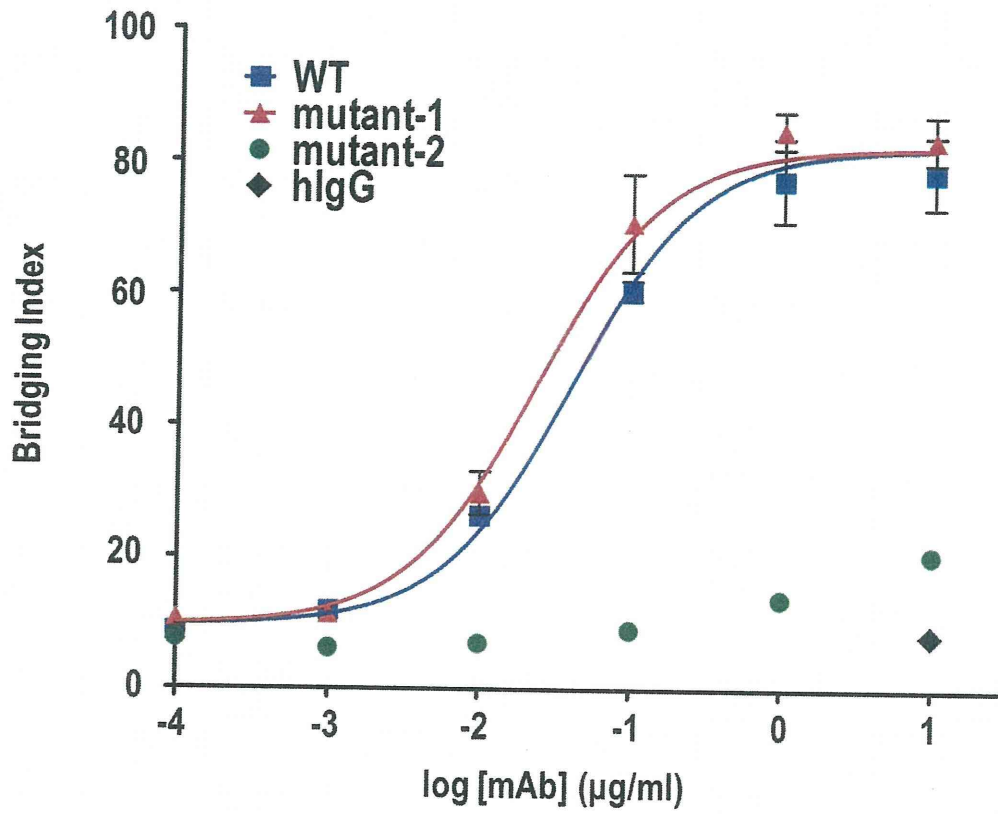


図7 Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用いた Bridging Assay

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）
分担研究総括報告書

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 日向昌司 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室主任研究官
協力研究者 風間宏美

研究要旨

生物活性の観点からのバイオ医薬品の同等性/同質性評価の重要性について、製造方法の異なる組換えヒト HGF 試薬 (rhHGF)、抗ヒト VEGF 抗体製剤、天然型及び組換え IFN- β 1a 製剤について検討した。

CHO 細胞、High-5 昆虫細胞、マウスミエローマ細胞で発現させ精製した rhHGF の生物活性、抗原価及び受容体に対する結合能について、それぞれ初代培養ラット肝細胞の DNA 合成促進、ELISA 及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、各 rhHGF は各測定法で異なる値を示し、各製品間における相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。したがって、rhHGF は製造方法により活性が異なり、活性の観点からも同等/同質性を評価することの重要性が示された。

大腸菌及び CHO 細胞での発現系で生産した組換え抗ヒト VEGF 抗体製剤の生物活性について VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイ及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、2 種類の抗ヒト VEGF 抗体製剤は VEGF による HUVEC の増殖促進をほぼ同様なモル濃度で阻害した。しかし、表面プラズモン共鳴法では異なる値を示した。本結果から、VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイは製造方法の異なる抗 VEGF 抗体製剤の活性比較に有用であることが明らかになった。しかし、少なくとも本研究で用いた測定条件において、表面プラズモン共鳴法は VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイに代替できず、採用にあたっては、測定条件の検討など慎重に見極めることが肝要であることが明らかになった。

製造方法の異なる 3 種類の IFN- β 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- β 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。

そこで本研究では以下の製造方法の異なる組換えヒト HGF 試薬 (rhHGF)、抗ヒト VEGF 抗体医薬品製剤 (抗ヒト VEGF 抗体製剤)、及び天然型及び組換えヒト IFN- β 1a 製剤 (IFN- β 1a 製剤) について生物活性の観点からのバイオ医薬品の同等性/同質性評価の重要性について検討を行なった。

B. 研究方法

1. rhHGF 試薬に関する検討

1.1 試薬

研究用試薬として市販されている、Mouse myeloma 細胞由来 (R&D Systems)、CHO 細胞 (R&D Systems)、High-5 昆虫細胞由来 (R&D Systems) の rhHGF を購入し、表示値に従い 5 μ g/ml となるよう 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS に溶解した。

1.2 肝細胞の単離と培養

Wistar 系ラット (オス、体重 約 180g) からコラゲナーゼ灌流により消化した肝臓を、50 \times g、1 分遠心した。この操作を 4 回繰り返し、肝細胞を沈殿に得た。肝細胞は 5%ウシ胎児血清 (FBS)、 10^{-8} M インスリン、 10^{-8} M デキサメタゾン を添加した Williams' E (WE) 培地 0.6ml を用いて 5×10^4 cells/cm² となるようにコラーゲンコートした 24 ウエルマイクロプレートに播種した。培養 2.5 時間後、1 μ g/ml アプロチニンを含む WE 培地に交換し、さらに 18 時間培養した。1 μ g/ml アプロチニン及び 0.1%BSA を含む WE 培地 0.4ml に交換し、rhHGF を各種の濃度で添加した。培養 1 日後、³H 標識チミジンを最終濃度として 60 kBq/ml 添加し、1 日培養した。

1.3 DNA 合成の測定

培養液を取り除き、氷冷した PBS(-) 0.4 ml で 2 回洗浄後、10% TCA を 0.4 ml 添加して 4 $^{\circ}$ C で 2 時間放置した。10%TCA を除去し、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.4 ml を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションし、細胞を溶解した。得られた細胞溶解液をポリプロピレン製遠心チューブに移し、そのうち 32 μ l をタンパク量の測定に用い、残りの液に、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.65 ml、10 mg/ml BSA 12.8 μ l を加え混合後、さらに 100% TCA 0.2 ml を加えて混

合した。氷中で1時間放置後、3000 rpm、10分間、4°Cで遠心した。上清を除き沈殿に10% TCA 1.0 mlを加え、沸騰水中で15分間放置した。氷中に5分間放置後、3000 rpm、10分間、4°Cで遠心した。上清 0.7 mlをアクアゾール 25 mlに加えて攪拌後、液体シンチレーションカウンターでカウントを測定した。得られたカウントをタンパク量で補正し、DNA合成活性を求めた。

1.4 タンパク量の測定

クーマシー染色を用いたタンパク質測定液(バイオラッド) 1 mlを用い、BSAをコントロールとし、595 nmにおける吸光度を測定した。

1.5 ELISAによるHGF抗原価の測定

Quankine[®] Human HGF (R&D Systems)を用いて操作法に従って測定した。なお、予備的な検討結果から、測定値が同時に測定した検量線の中央部に位置するように、Mouse myeloma 細胞由来、CHO 細胞、High-5 昆虫細胞のrhHGFを、それぞれ3571倍、758倍、2500倍希釈して用いた。

1.6 表面プラズモン共鳴法を用いたrhHGF受容体-Fc融合タンパク質との結合能の解析

速度論的解析は、BIAcore 3000を用い、解析はすべて25°Cで行った。NHS (50 mM) / EDC (200 mM) 溶液 (50/50)で7分間活性化させたCM5 センサーチップに10 mM 酢酸緩衝液 pH6.0に溶解したrhHGF受容体-Fc融合タンパク質をインジェクトし、1530 resonance unit 固定化した。残存活性基は、1 M ethanolamine でブロッキングした。

Mouse myeloma 細胞由来 rhHGF、High-5 昆虫細胞由来 rhHGF、CHO 細胞由来 rhHGF について、それぞれ2.5、5、10 nM となるよ

うにHBST緩衝液で希釈し、流速20 μ l/minで2分間の結合、3分間の解離で得られたセンサーグラムをBIAevaluation softwareによりcurve fittingさせることで結合速度定数(k_a)および解離速度定数(k_d)を求め、平衡定数KD (k_d/k_a)を算出した。なお、センサーチップは、1 M NaClを1分間流すことで再生した。

2. 抗VEGF抗体製剤に関する検討

2.1 VEGFによるHUVECの増殖促進の阻害を指標とした抗VEGF抗体製剤の生物活性の測定

2.1.1 培地、抗VEGF抗体製剤サンプル、組換えVEGF溶液の調製及びHUVECストック溶液の調製

Human Endothelial-SFM 基礎培地 (GIBCO) にゲンタマイシン(三光純薬)を50 μ g/ml、アンフォテリシン(三光純薬)を50 ng/ml、接合因子 (GIBCO) を5%添加し培地を調製した。抗ヒトVEGF抗体製剤A及びBを培地で適当な濃度に希釈し抗VEGF抗体サンプルを調製した。組換えVEGF(Invitrogen)ストック溶液(10 μ g/ml)に培地を加えて120 ng/mlに希釈し組換えVEGF溶液を調製した。HUVECストック溶液はHUVEC(東洋紡)を添付の増殖培地で約6継代培養し、 2×10^6 細胞/mlの溶液を調製し0.3 mlずつセラムチューブに分注し-150°Cに保存した。

2.1.2 操作法

抗ヒトVEGF抗体製剤サンプル60 μ lに等容量の組換えVEGF溶液を加えて混和後、90分室温で静置した。混合液を96穴マイクロテストプレートの各穴に50 μ lずつ添加した。なお、同一濃度の抗VEGF抗体サンプルから調製した混合液は2穴ずつ添加した。

HUVEC ストック溶液を 37°C の水中で溶かし、3 ml の培地に加え 1100rpm で 5 分遠心した。上清を除去し 2×10^5 細胞/ml になるように培地で懸濁した。細胞懸濁液を 50 μ l ずつ各穴に添加して 2 分間振とうした。細胞を 4 日間培養した。培地を除去後 Cell counting Kit-8 (同人化学) を 10% 含む培地を各穴に 100 μ l ずつ添加し 3~5 時間培養した。対照波長 650 nm、測定 450 nm で吸光度を測定した。

2.2 表面プラズモン共鳴法を用いた VEGF と の結合能の解析による抗 VEGF 抗体製剤の生物活性の測定

速度論的解析は BIACORE 3000 を用い、解析はすべて 25°C で行い、ランニング液は、すべて 10 mM HEPES buffer pH7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP buffer) を用いた。25 mM NHS / 100 mM EDC 溶液で 7 分間活性化させた CM5 センサーチップに 10 mM acetate buffer pH 6.0 に溶解した組換えヒト VEGF をインジェクトし、3974 resonance unit 固定化した。残存活性基は、1 M ethanalamine でブロッキングした。

抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B を、それぞれ 18.75, 37.5, 75 nM となるように HBS-EP buffer で希釈し、流速 20 μ L/min で 2 分間結合、3 分間解離、1 M citrate-NaOH buffer pH 2.2 で再生した。

得られたセンサーグラムを BIAevaluation software により curve fitting させることで結合速度定数(k_a)および解離速度定数(k_d)を求め、平衡定数 KD (k_d/k_a)を算出した。

3. IFN- β 1a 製剤に関する検討

3.1 試薬

IFN- β 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 1×10^4 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 μ l、plasmid DNA (ISRE-responsive firely luciferase construct) 1 μ l を含む液を調製し、Plus reagents を 0.216 μ l 加え室温で 5 分放置した。混合液に Lipofectamine™ LTX を 0.648 μ 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 β 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 β 1a 製剤を 20 μ 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 μ 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 μ 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

1. rhHGF 試薬に関する検討

1.1 DNA 合成促進を指標とした rhHGF の生物活性の測定

Mouse myeloma 細胞由来の rhHGF のほうが、High-5 昆虫細胞由来よりもより低濃度で DNA 合成を促進した。40 ng/ml における最大値は両者で同じであった (図 1)。一方、CHO 細胞由来の rhHGF は両者よりも DNA 合成促進により高濃度必要であり、40 ng/ml における値は両者の約 60% であった。Mouse myeloma 細胞及び High-5 昆虫細胞由来の 40 ng/ml における値を最大値として 50% 有効濃度を比較すると、Mouse myeloma 細胞由来、High-5 昆虫細胞由来、CHO 細胞由来で、それぞれ 2.86 ng/ml, 3.71 ng/ml, 17.1 ng/ml であった。

1.2 ELISA による rhHGF 抗原価の測定

ELISA により求めた rhHGF 抗原価の表示値に対する比率を計算すると、Mouse myeloma 細胞由来、High-5 昆虫細胞由来、CHO 細胞由来で、それぞれ 1.43、1.01、0.338 であった (表 1)。

1.3 表面プラズモン共鳴法を用いた rhHGF の rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質との結合能の解析

各 rhHGF の rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質に対する結合の解離速度定数は異なり、Mouse myeloma 細胞由来、High-5 昆虫細胞由来、CHO 細胞由来で、それぞれ 0.18 nM, 0.25 nM, 2.69 nM であった (表 2)。

2. 抗 VEGF 抗体製剤に関する検討

2.1 VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害を指標とした抗ヒト VEGF 抗体製剤の生物活性の測定

抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B において 1.4 nM までの比較的狭い濃度範囲で良好な阻害曲線が得られた (図 2)。データは示していないが二連における誤差は 10% 以内と値のばらつきは少なかった。なお、増殖の 50% 阻害に要する抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B の濃度はそれぞれ 0.504 nM 及び 0.617 nM であった。一方、抗ヒト VEGF 抗体製剤 A では 0.78 nM 以上でほとんど阻害がみられなかったのに対し、抗ヒト VEGF 抗体製剤 B ではさらに阻害がみられた。

2.2 表面プラズモン共鳴法を用いた VEGF との結合能の解析による抗ヒト VEGF 抗体製剤の生物活性の測定

抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B のセンサーグラムを示す (図 3)。両者において VEGF に対する平衡定数 (KD) は抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B でそれぞれ 26.3 pM 及び 400 pM であった (表 3)。

3. IFN- β 1a 製剤に関する検討

IFN- β 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 10~100 IU/ml で飽和に達し、最大で 4.9~7.4 倍活性が増大した (図 4)。各 IFN- β 1a 製剤で表示単位依存性に若干の違いが見られた。IFN- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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ばらつきは大きかった。1~2%FCS を培地に加えることによりこれらの問題は改善されると共に IFN- β 1a 製剤に対する高い反応性も示された。2 番目の点は IFN- β 1a 製剤との反応時間である。IFN- β 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- β 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- β 1a 製剤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。顕微鏡での観察により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

1. 組換えヒト HGF 試薬に関する検討

CHO 細胞、High-5 昆虫細胞、Mouse myeloma

細胞で発現させ精製した rhHGF の生物活性、抗原価及びヒト HGF 受容体に対する結合性について、それぞれ初代培養ラット肝細胞の DNA 合成促進、ELISA 及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、各 rhHGF は各測定法で異なる値を示し、rhHGF 間の相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。

添付書類によると、各 rhHGF とも SDS-PAGE あるいは HPLC で 95%以上の純度であり、不純物及び分解物の含量の違いにより rhHGF の含量が違う可能性は極めて低い。また、付加した糖鎖が異なることも予想されるが、HGF の糖鎖は活性に影響を及ぼさないことが既に報告されている。したがって、標品間の活性の違いは、高次構造の違いが原因であると考えられる。すなわち、各産生細胞の特性によって、あるいは精製過程の違いにより rhHGF の高次構造が異なるため、生物活性、抗体との結合性、rhHGF 受容体との結合性に差異が観察されたものと考えられる。これに関連し、ELISA では標準曲線の作成に Sf-21 昆虫由来の rhHGF を用いているが、High-5 昆虫細胞由来の rhHGF では表示値と同じ値が得られている点は興味深い。少なくともこの場合は、宿主の起源が同じであれば細胞の種類が異なっても同じ抗原性を有する rhHGF が産生されることを示している。

本研究は研究用の組換えタンパク質で行ったものであるが、治療用タンパク質においても製造方法の違いにより活性が異なる可能性を示した点で興味深い。したがって、製造方法の異なるバイオ医薬品の評価は品質だけでなく活性についても同等/同質性を評価することが極めて重要であることが

示された。

2. 抗 VEGF 抗体製剤に関する検討

異なる細胞で製造した抗ヒト VEGF 抗体 A 及び B の生物活性について VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害及び表面プラズモン共鳴法を用いた VEGF に対する結合能により測定した。

VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害を用いたアッセイでは、増殖の 50%阻害に要する濃度は約 0.5~0.6 nM でほぼ同等であった。一方、抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B では 0.78 nM 以上の阻害様式が異なっていた。通常抑制作用を示す抗体医薬品では 50%阻害濃度により生物活性が評価される。しかし、今回のように両方で阻害率の最大値が異なることが予想される場合、生物活性の比較評価は 50%阻害濃度の比較のみで十分であるかどうか今後の検討課題として提起された。

一方、表面プラズモン共鳴法を用いた VEGF に対する結合能により生物活性を評価した場合は、上記増殖阻害アッセイの結果と異なり、両方で約 15 倍活性の違いが観察された。したがって、表面プラズモン共鳴法では、少なくとも今回用いた測定条件では、両者の生物活性を増殖アッセイに替わって比較することは困難であることが明らかになった。

表面プラズモン共鳴法での結果が、増殖アッセイと異なった原因のひとつとして、抗原と抗体の複合体が解離しにくいことが挙げられる。すなわち、極めてゆっくりした解離から解離速度定数 (kd 値) を予測する必要があるため、ばらつきが大きくなり、結果的に平衡定数 (KD 値) に顕著な差が生じている可能性が考えられる。したがって、

表面プラズモン共鳴法での高親和性の分子間相互作用解析における原理的なハードルが原因であり、注意が必要であると言えよう。なお、増殖因子とそのレセプターのように、結合定数が高く無いケースでは、通常の解析法で安定した測定が可能であるため、有効な手法である。具体的な事例として、昨年度の本研究で、製造方法の異なる HGF の生物活性の比較において表面プラズモン共鳴法を用いた場合の値と生物活性の値とが良く一致していることを報告している。

表面プラズモン共鳴法は操作が簡単で平衡定数を正確にかつ高精度で測定できハイスループットであることから抗体医薬品の生物活性測定法への応用が期待されている。しかしながら、本研究の結果は、親和性の高い抗体医薬品の活性評価に表面プラズモン共鳴法を用いる場合、適切であるか十分に留意する必要がある。高親和性を原因とした不適例の解決方法の開発は、今後の課題であるが、測定条件等を十分に検討することで、適用可能となることが期待される。具体的な改善方法として、抗原・抗体複合体の解離を促進させる界面活性剤の添加、あるいは反応温度を高めることなどが考えられる。ただし、採用した測定条件での評価結果が生物活性を反映しているか、細胞を用いた生物活性の測定結果と慎重に比較検討することが必要であろう。

3. IFN- β 1a 製剤に関する検討

IFN- β 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- β 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- β 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濃度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- β 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、本法は細胞変性効果アッセイと置き換え可能であること示された。

E. 結論

1. rhHGF に関する検討

CHO 細胞、High-5 昆虫細胞、Mouse myeloma 細胞で発現させ精製した rhHGF の生物活性、抗原価及び rhHGF 受容体に対する結合性について、それぞれ初代培養ラット肝細胞の増殖促進、ELISA 及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、各 rhHGF は各測定法で異なる値を示し、各製品間における相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。本結果は、製造方法の違いにより、治療用タンパク質の活性が異なる場合がある可能性を示しており、バイオ後続品の評価において活性の観点からの検討の重要性が示された。

2. 抗 VEGF 抗体医薬品製剤に関する検討

大腸菌及び CHO 細胞で発現させ精製した組換え抗ヒト VEGF 抗体医薬品製剤の生物

活性について VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイ及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、二種類の抗ヒト VEGF 抗体製剤は VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害ではほぼ同様の値を示した。しかし、表面プラズモン共鳴法では異なる値を示した。本結果から製造方法の異なる抗 VEGF 抗体製剤の活性の比較には VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイが有用であることが示された。一方、表面プラズモン共鳴法では少なくとも今回用いた測定条件で両者の活性を比較することは困難であることが明らかになった。

3. IFN- β 1a 製剤に関する検討

製造方法の異なる 3 種類の IFN- β 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ことから、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- β 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. Kita, T., Nishida, H., Shibata, H., Niimi, S., Higuti, T., Arakaki, N., Possible role of mitochondria

- remodeling on cellular triacylglycerol accumulation. *J. Biochem.*, 146, 787-796 (2009)
2. Shibata, H., Nakano, T., Parvez, MA., Furukawa, Y., Tomoshi, A., Niimi, S., Arakai, N., and Higuti, T.: Triple combination of lower and longer alkyl gallates and oxacillin improve antibiotic synergy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2218-2220 (2009),
 3. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英 RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望 医薬品研究 2009 vol. 40 No. 12 789-809
 4. 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1 医薬品研究 2009 vol. 40 No. 11 703-715
 5. Niimi, S., Harashima, M., and Hyuga, M.: Current Status of Therapeutic Angiogenesis with Protein, Gene and Cell Therapy *Current Drug Therapy*, 4, 221-233 (2009).
 6. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 川崎ナナ 治療用タンパク質の免疫原性 その3 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010 vol. 41 No.9 726-735
 7. 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2 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010 vol. 41 No.5 390-400
 8. Gotoh, Y., Ishizuka, Y., Matsuura T., Niimi S., Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. *Biomacromolecules in press* (2011)
 9. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 川崎ナナ, 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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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)
 14. 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. 後藤洋子、石塚保行、松浦知和、新見伸吾：ラクトース修飾絹フィブロインのスポンジ基材で培養したヒト肝癌細胞株 FLC-4 細胞のスフェロイド培養と機能発現. 第 18 回ポリマー材料フォーラム (2009. 11. 26-27) 名古屋
 2. 原島 瑞、新見伸吾、江添悠、日向昌司、関泰一朗、有賀豊彦、山口照英 初代培養肝細胞において HGF と Annexin A3 はプロスタグランジン E2 の産生を促進しない 第 82 回 日本生化学会大会、神戸 (2009 年 10 月 21-24 日)
 3. 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、斉藤千恵子、布留川みなこ、関泰一朗、有賀豊彦、山口照英 初代培養ラット肝細胞における Dexamethasone 依存的な mRNA レベルの増加のプロテアソーム阻害剤による阻害 第 16 回 肝細胞研究会 山形 (2009 年 6 月 26-27 日)
 4. 原島 瑞、日向昌司、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いて Annexin A3 は細胞周期阻害因子である P16^{INK4A} の発現を抑制することにより肝細胞増殖を促進する 第 83 回 日本生化学会大会、神戸 (2010 年 12 月 7-10 日)
 5. 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)
 6. 新見伸吾 生物薬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)
 7. 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)
 8. 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)
 9. Shingo Niimi Risk factors of immunogenicity and their mitigation, Immunogenicity Seminar 2012 (2012.3) (東京)
 10. 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
- 該当なし

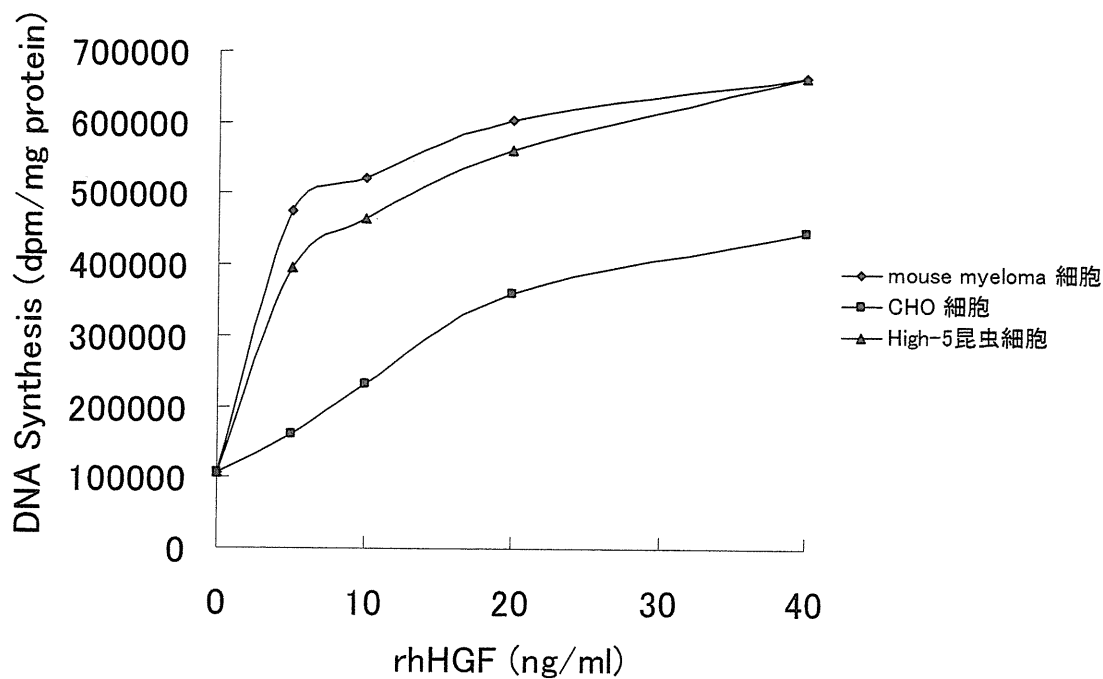


図1 初代培養ラット肝細胞における rhHGF による DNA 合成促進

表1 ELISA による rhHGF 抗原価の測定

	Mouse myeloma 細胞	High-5 昆虫細胞	CHO 細胞
表示値	5 ug/ml	5 ug/ml	5 ug/ml
測定値	7.18 ug/ml	5.07 ug/ml	1.69 ug/ml
表示値/測定値	1.43	1.01	0.338

表2 表面プラズモン共鳴法を用いた rhHGF の rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質との結合能

	k_a ($M^{-1}S^{-1}$)	k_d (S^{-1})	K_d (nM)
Mouse myeloma 細胞	5.76×10^6	1.04×10^{-3}	0.18
High-5 昆虫 細胞	3.76×10^6	9.26×10^{-4}	0.25
CHO 細胞	2.19×10^6	5.90×10^{-3}	2.69

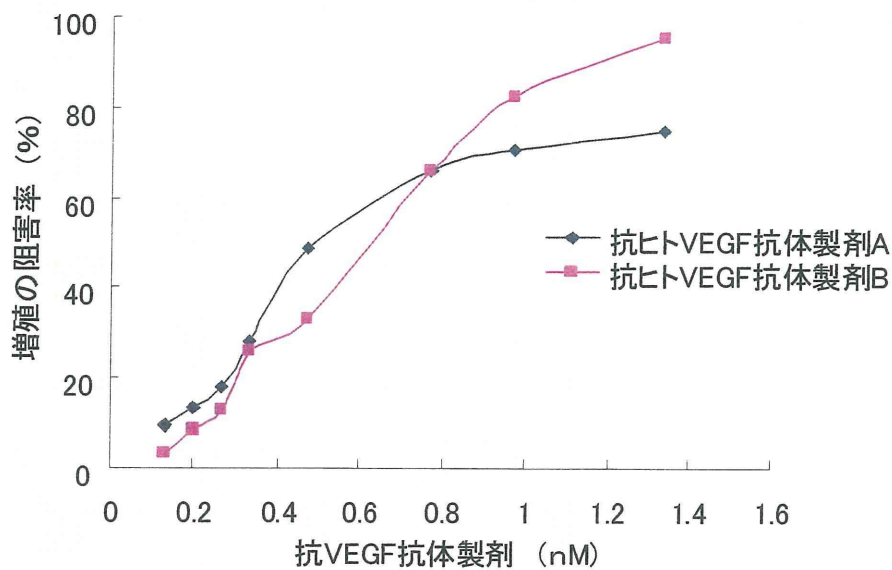


図2 VEGFによるHUVECの増殖促進の抗ヒトVEGF抗体製剤による阻害

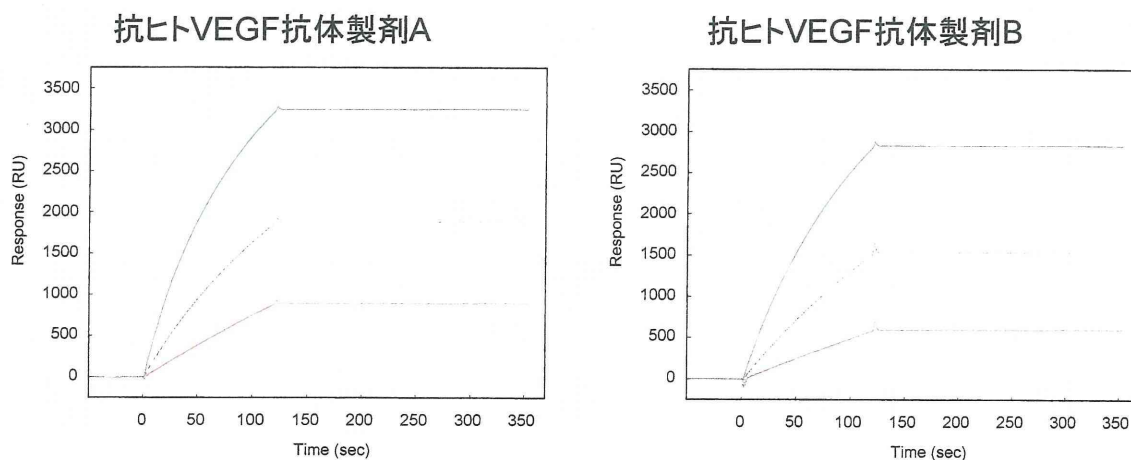


図3 共鳴プラズモン共鳴法を用いた抗ヒトVEGF抗体製剤のVEGFに対する結合のセンサーグラム

表2 表面プラズモン共鳴法を用いた抗ヒトVEGF抗体製剤のVEGFに対する結合能

	k_a ($\times 10^4$) $M^{-1}s^{-1}$	k_d ($\times 10^{-7}$) s^{-1}	KD (pM)
抗ヒトVEGF抗体A製剤	2.81	7.40	26.3
抗ヒトVEGF抗体B製剤	4.60	1.84	400