

**Fig. 1.** Linkage disequilibrium (LD) analysis of *FCGRT*

Pairwise LD is expressed as  $r^2$  (upper right) and  $|D'|$  (lower left) values (from 0 to 1) by 10-graded blue colors. A denser color represents closer linkage.

( $p \geq 0.05$ ). Two novel non-synonymous variations, 629G>A (R210Q) and 889T>A (S297T), were found as heterozygotes. The allele frequencies were 0.004 for R210Q and 0.020 for S297T. The functional significance of these non-synonymous variations was explored *in vitro* in the following sections. The other coding variations were previously reported synonymous variations. A variable number of tandem repeats (VNTR) was detected in the 5'-flanking region as was found in Caucasian subjects,<sup>8)</sup> and the frequencies of VNTR3 (with 3 repeats) and VNTR2 were 0.968 and 0.032, respectively. A short tandem repeat of GGAA was also detected in the 5'-flanking region with a repeat number of 8 (frequency: 0.024), 9 (0.103), 10 (0.754), 11 (0.099) and 12 (0.020). With the 12 detected variations with  $\geq 0.03$  frequencies, linkage disequilibrium (LD) was analyzed using  $|D'|$  and  $r^2$  values (Fig. 1). Because of relatively weak linkage between the variations in  $r^2$  values, haplotype analysis was not performed.

**Intracellular localization of FcRn variants:** Two novel non-synonymous variations, R210Q and S297T, were functionally tested using a mammalian expression system. First, relative expression levels of wild-type and variant FcRn proteins were evaluated by Western blotting. As shown in Figure 2, similar levels of the proteins were detected in the three FcRn constructs, and we did not find any statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) between the wild-type and the two variants assessed by Dunnett's multiple comparison test when normalized by the expression levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a control. When the wild-type levels were

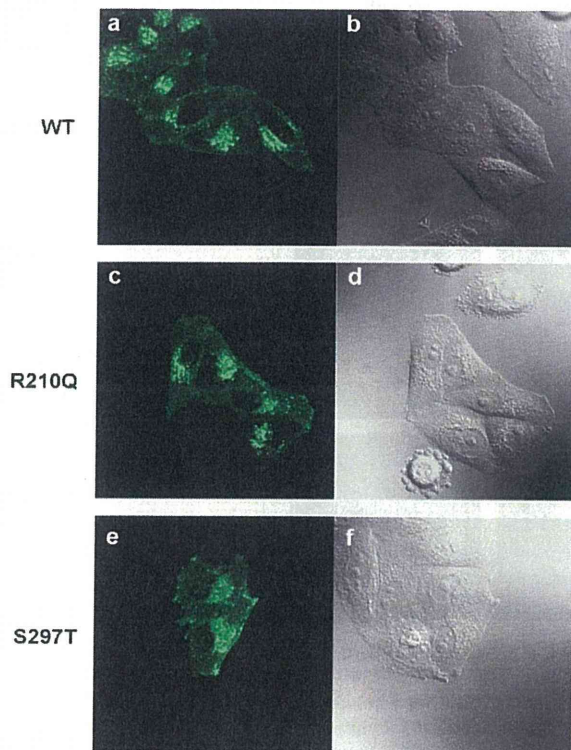


**Fig. 2.** Western blotting of wild-type and variant FcRns

Cell lysates obtained from the HeLa cells transfected with wild-type or either of the two variant FcRn-EGFP plasmids were subjected to electrophoresis, followed by transfer to the membrane. Detection of FcRn-EGFP was performed as described in Materials and Methods. One representative data of three independent transfections is shown. The FcRn band (64 kDa) consists of 37 kDa of FcRn and 27 kDa of EGFP. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) levels were used for normalization of the lysate proteins applied to electrophoretic gels.

set as 100%, R210Q and S297T levels were  $95.08 \pm 12.38\%$  and  $93.94 \pm 13.24\%$ , respectively.

In order to examine the differences of intracellular localization between wild-type FcRn and its variants, each EGFP fusion construct together with a human  $\beta 2m$  construct was transfected into HeLa cells, and fluorescent images were observed by confocal microscopy. There have been several studies reporting the intracellular localization or trafficking of FcRn using fluorescent protein-tagged FcRn.<sup>9-12)</sup> N- and C-terminally tagged FcRn showed similar localization.<sup>13)</sup> Since FcRn is a type I membrane protein, N-terminal amino acid residues including R210 and S297 were located in the extracellular



**Fig. 3.** Intracellular localization of wild-type (WT) and variant FcRns in HeLa cells  
HeLa cells were transfected with wild-type (a) or variant (c; R210Q, e; S297T) FcRn-EGFP. The intracellular localization of FcRn-EGFP was observed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. Differential interference contrast images of the field are also shown (b, d, f).

or intraluminal region. Therefore, we chose a C-terminal EGFP tag located in the cytoplasmic region of FcRn in order to minimize the effect of the fluorescent tag on the structural environment around the mutation sites.

As shown in **Figure 3a**, the fluorescent signal of wild-type FcRn-EGFP was located primarily in intracellular vesicular components, especially in the perinuclear region. Similar localization was observed for R210Q and S297T variants (**Figs. 3c** and **3e**), suggesting that these amino acid mutations do not affect the intracellular localization of FcRn.

**Intracellular co-localization of FcRn variants and incorporated antibody:** We then examined the co-localization of the incorporated CypHer5-labeled infliximab and FcRn-EGFP. The binding of CypHer5-labeled infliximab to FcRn was confirmed beforehand (data not shown).

As shown in **Figure 4**, co-localization of FcRn-EGFP and CypHer5-labeled infliximab in intracellular vesicular compartments was observed in HeLa cells expressing wild-type or variant FcRn. Since the fluorescence intensity of CypHer5 increases in acidic pH,<sup>14</sup> the observed

fluorescent signal can indicate that CypHer5-labeled infliximab is localized in intracellular acidic compartments such as endosomes. Since the fluorescent images were obtained by confocal microscopy from cells which were washed with neutral pH media, the fluorescence is thought to be derived from incorporated antibodies and not from cell surface-bound antibodies. Therefore, these results showed that both types of FcRn variant, as well as wild-type FcRn, were in acidic endosomes in which incorporated antibodies localized.

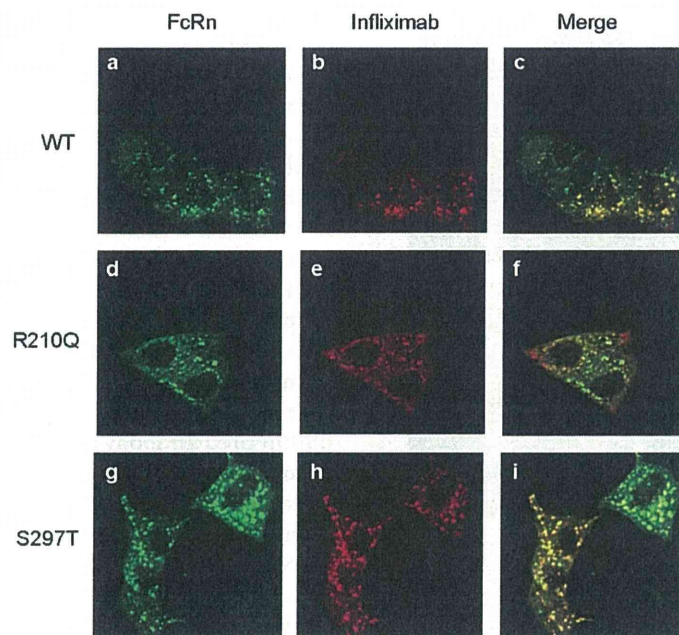
**Antibody recycling activity of FcRn variants:** In order to elucidate the antibody recycling activity of wild-type and variant FcRn, we established the ELISA for biotinylated antibody (infliximab in this study), and measured the amount of recycled antibody from wild-type or variant FcRn-transfected cells. The binding of biotinylated infliximab to FcRn was confirmed by surface plasmon resonance (SPR) analysis (data not shown).

As shown in **Figure 5b**, recycled biotinylated infliximab was detected when the biotinylated infliximab had been loaded to the HeLa cells transfected with wild-type FcRn. The recycling was not detected in mock-transfected cells (**Fig. 5a**), showing that recycling was dependent on expression of FcRn. When the cells were incubated at 4°C for incorporation or recycling, the antibody was not detected in the supernatant. Therefore, recycling was mediated by intracellular trafficking of antibody and not by nonspecific mechanisms. As shown in **Figures 5c** and **5d**, similar levels of antibody recycling were also observed in HeLa cells transfected with either variant FcRn, suggesting similar IgG binding and intracellular trafficking properties of variant FcRns to those of wild-type FcRn. **Figure 6** shows the time course of antibody recycling from cells transfected with wild-type or variant FcRn. The amount of incorporated antibody was measured using the cell lysate at 0 min, and it is noteworthy that no statistical differences assessed by Dunnett's multiple comparison test were observed in the amount of incorporated antibodies between wild-type and either variant FcRn at time 0 (data not shown). The amount of recycled antibody at each time point was expressed as a percentage of the initially incorporated antibody. There was no significant difference between wild-type and the variant FcRns in the amount of recycled antibody, suggesting that these amino acid substitutions do not affect the antibody recycling activity of FcRn.

## Discussion

In general, antibody therapeutics have longer half-lives than those of chemical drugs, and the  $T_{1/2}$  of IgGs, except for IgG3, in humans is around 21 days. IgG1, IgG2 and IgG4, which are currently used isoforms for antibody therapeutics, have high affinities for FcRn.<sup>15</sup> Escaping from intracellular degradation by binding to FcRn has shown to contribute to this long half-life of the IgGs.





**Fig. 4.** Co-localization of CypHer5-labeled infliximab and FcRn in HeLa cells expressing wild-type (WT) or a variant FcRn. HeLa cells transfected with wild-type (a, b, c), or variant (d, e, f; R210Q, g, h, i; S297T) FcRn-EGFP were incubated with CypHer5-labeled infliximab in cell culture media containing sodium phosphate buffer (pH. 6.0) for 2–3 hr. After washing the cells twice with neutral pH medium, the fluorescent signal was observed. Panels (a, d, g) and (b, e, h) show the intracellular localization of FcRn-EGFP and the incorporated CypHer5-labeled infliximab, respectively. In panels (c, f, i) the fluorescent signal of FcRn-EGFP was merged with that of CypHer5-labeled infliximab.

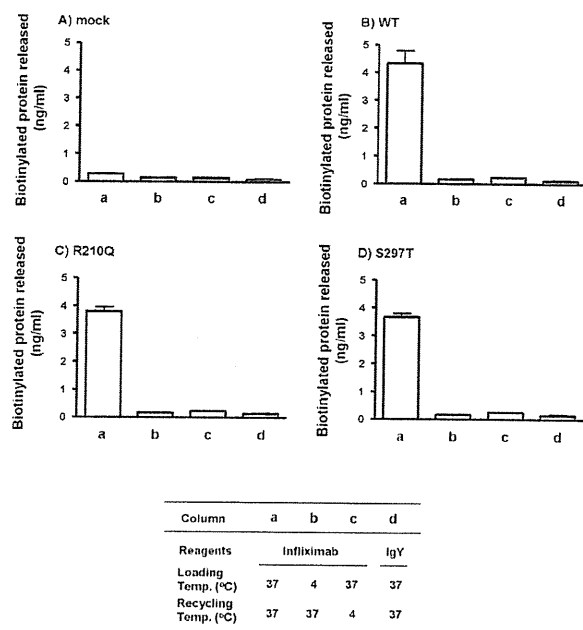
Large interindividual variations in pharmacokinetic parameters have been reported for at least several antibody therapeutics. For example, trough concentrations in repetitive dosing of antibodies were reported to show 5.6-fold interindividual differences in 22 palivizumab-treated patients,<sup>16</sup> 18.2-fold differences in 16 cetuximab-treated patients,<sup>17</sup> and over 70-fold differences in 86 infliximab-treated patients.<sup>18</sup> In addition, large percent coefficients of variation were reported for  $T_{1/2}$ , such as 72.0% for gemtuzumab ozogamicin<sup>19</sup> and 76.4% for basiliximab,<sup>20</sup> after second dose of their treatments. We presumed that changes in FcRn expression levels and function caused by genetic variations of *FCGRT* may lead to these interindividual differences in pharmacokinetics of antibody therapeutics.

In order to identify genetic polymorphisms of *FCGRT*, we sequenced genomic DNA from 126 Japanese subjects. A total of 33 genetic variations, including 17 novel ones, were detected. A VNTR was detected in the 5'-flanking region, as was the case in Caucasian subjects reported previously.<sup>8</sup> Although a recent study showed that no significant impact was observed in the rates of maternal-fetal IgG transfer,<sup>21</sup> VNTR3 is known to be associated with 1.66-fold higher transcriptional activity than VNTR2 *in vitro*. In addition, monocytes with VNTR3/3 showed increased binding of IgG compared to those with 2/3.<sup>8</sup> Thus, this variation may contribute to

the interindividual differences in pharmacokinetics of antibody therapeutics. The allele frequency of VNTR2 in Japanese (0.032) was lower than that in Caucasians (0.075).<sup>8</sup>

In this study, two novel nonsynonymous variations were found and their functional significance was assessed *in vitro* using a mammalian expression system. However, the two FcRn variants did not show any changes in intracellular localization or recycling, suggesting that the two nonsynonymous substitutions found in a Japanese population probably do not contribute to the interindividual variations in the pharmacokinetics of antibody therapeutics. Since FcRn function is important for maintenance of IgG levels as well as maternal-fetal IgG transfer, functionally-affecting genetic variations might be few to retain its functional capability.

Amino acid residues of human FcRn that interact with IgG were reported to be E138, E139, D153 and W154, in the  $\alpha 2$  domain.<sup>1</sup> (Amino acid numbers shown in this paper include the signal peptide.) The electrostatic binding of these anionic amino acid residues in FcRn with H310 and H435 in IgG, which has an isoelectric point of pH 7.6, defines the strict pH-dependent binding of IgG to FcRn.<sup>22</sup> The variant amino acid residues identified in this study, R210Q and S297T, are both located in the  $\alpha 3$  domain of FcRn. According to the predicted higher order structure,<sup>1</sup> R210 and S297 are located very close to the

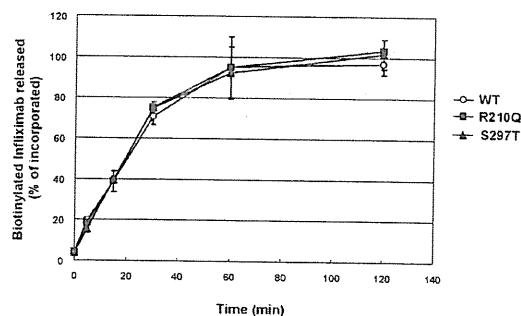


**Fig. 5.** Recycling of biotinylated antibodies from wild-type (WT) or variant FcRn-transfected HeLa cells

HeLa cells transfected with wild-type or a variant FcRn were incubated for 1 hr with biotinylated infliximab. After washing, the cells were further incubated for 2 hr. The amount of recycled protein in the supernatant was determined by ELISA. Experimental conditions are shown in the table. For the samples shown as columns a-c, biotinylated infliximab was loaded, whereas biotinylated IgY was used for d. The temperature for antibody loading was 37°C (a, c, d) or 4°C (b). The temperature for recycling antibodies from antibody-loaded cells was 37°C (a, b, d) or 4°C (c).

transmembrane region that is distant from the IgG binding site. Considering the results obtained here, where no difference in antibody recycling activity between wild-type and each variant FcRn was detected *in vitro*, the amino acid substitutions identified in a Japanese population may not have significant impact on structural and functional properties of FcRn. Although FcRn is known to bind with albumin as well as IgG, the albumin binding site of FcRn has been identified as H189, which also is located in the  $\alpha 2$  domain.<sup>23</sup> The polymorphic sites are also far from the albumin binding site. However, the effect of amino acid substitutions R210Q and S297T on the albumin recycling activity via FcRn should be determined in a future study.

In the present study, we used HeLa cells to examine the localization and recycling activity of FcRn variants. Since endogenous expression of FcRn protein in HeLa cells has not been detected,<sup>24</sup> we considered HeLa cells suitable for examining the antibody recycling activity of variant FcRn since the background responses are negligible. In fact, as shown in **Figure 5**, antibody recycling was detected only in FcRn-transfected cells. Therefore, we concluded that HeLa cells can be used as a suitable



**Fig. 6.** Quantitative analyses of recycling of biotinylated infliximab; Time course of release of the biotinylated infliximab incorporated into the HeLa cells transfected with wild-type (WT) or variant FcRn

HeLa cells transfected with wild-type or a variant FcRn were incubated for 1 hr with biotinylated infliximab. After washing, cells were further incubated for the indicated periods of time. The amount of recycled protein was determined by ELISA. The amount of recycled antibody at each time point was expressed as a percentage of the initially incorporated antibody at time 0.

model for evaluating the function of variant FcRn proteins.

Our results suggested that at least no common functional polymorphic site with amino acid change was present in *FCGR2* in our Japanese population. Since FcRn function is important for maintenance of IgG levels, there may be few functionally-affecting genetic variations. Further analysis is necessary for the functional significance of transcriptional regulatory regions.

**Acknowledgement:** We thank Ms. Chie Sudo for secretarial assistance.

## References

- Andersen, J. T. and Sandlie, I.: The versatile MHC class I-related FcRn protects IgG and albumin from degradation: implications for development of new diagnostics and therapeutics. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**: 318–332 (2009).
- Lobo, E. D., Hansen, R. J. and Balthasar, J. P.: Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.*, **93**: 2645–2668 (2004).
- Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T.: Importance of neonatal FcR 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 neonatal FcR. *J. Immunol.*, **184**: 1968–1976 (2010).
- Claypool, S. M., Dickinson, B. L., Yoshida, M., Lencer, W. I. and Blumberg, R. S.: Functional reconstitution of human FcRn in Madin-Darby canine kidney cells requires co-expressed human beta 2-microglobulin. *J. Biol. Chem.*, **277**: 28038–28050 (2002).
- Praetor, A. and Hunziker, W.: Beta(2)-microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG bind-

- ing of human FcRn. *J. Cell. Sci.*, **115**: 2389–2397 (2002).
- 6) Tesar, D. B., Tiangco, N. E. and Bjorkman, P. J.: Ligand valency affects transcytosis, recycling and intracellular trafficking mediated by the neonatal Fc receptor. *Traffic*, **7**: 1127–1142 (2006).
  - 7) Kamei, D. T., Lao, B. J., Ricci, M. S., Deshpande, R., Xu, H., Tidor, B. and Lauffenburger, D. A.: Quantitative methods for developing Fc mutants with extended half-lives. *Biotechnol. Bioeng.*, **92**: 748–760 (2005).
  - 8) Sachs, U. J., Socher, I., Braeunlich, C. G., Kroll, H., Bein, G. and Santoso, S.: A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter. *Immunology*, **119**: 83–89 (2006).
  - 9) Goebel, N. A., Babbey, C. M., Datta-Mannan, A., Witcher, D. R., Wroblewski, V. J. and Dunn, K. W.: Neonatal Fc receptor mediates internalization of Fc in transfected human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, **19**: 5490–5505 (2008).
  - 10) Ober, R. J., Martinez, C., Lai, X., Zhou, J. and Ward, E. S.: Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**: 11076–11081 (2004).
  - 11) Ober, R. J., Martinez, C., Vaccaro, C., Zhou, J. and Ward, E. S.: Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J. Immunol.*, **172**: 2021–2029 (2004).
  - 12) Ward, E. S., Martinez, C., Vaccaro, C., Zhou, J., Tang, Q. and Ober, R. J.: From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. *Mol. Biol. Cell.*, **16**: 2028–2038 (2005).
  - 13) Gan, Z., Ram, S., Vaccaro, C., Ober, R. J. and Ward, E. S.: Analyses of the recycling receptor, FcRn, in live cells reveal novel pathways for lysosomal delivery. *Traffic*, **10**: 600–614 (2009).
  - 14) Mark, S. B., Burns, D. D., Cooper, M. E. and Gregory, S. J.: A pH sensitive fluorescent cyanine dye for biological applications. *Chem. Commun.*, **23**: 2323–2324 (2000).
  - 15) Ternant, D. and Paintaud, G.: Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **5 Suppl 1**: S37–47 (2005).
  - 16) Subramanian, K. N., Weisman, L. E., Rhodes, T., Ariagno, R., Sanchez, P. J., Steichen, J., Givner, L. B., Jennings, T. L., Top, F. H. Jr, Carlin, D. and Connor, E.: Safety, tolerance and pharmacokinetics of a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. MEDI-493 Study Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **17**: 110–115 (1998).
  - 17) Cézé, N., Ternant, D., Piller, F., Degenne, D., Azzopardi, N., Dorval, E., Watier, H., Lecomte, T. and Paintaud, G.: An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of cetuximab. *Ther. Drug Monit.*, **31**: 597–601 (2009).
  - 18) St Clair, E. W., Wagner, C. L., Fasanmade, A. A., Wang, B., Schaible, T., Kavanaugh, A. and Keystone, E. C.: The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.*, **46**: 1451–1459 (2002).
  - 19) Dowell, J. A., Korth-Bradley, J., Liu, H., King, S. P. and Berger, M. S.: Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J. Clin. Pharmacol.*, **41**: 1206–1214 (2001).
  - 20) Kovarik, J. M., Nashan, B., Neuhaus, P., Clavien, P. A., Gerbeau, C., Hall, M. L. and Korn, A.: A population pharmacokinetic screen to identify demographic-clinical covariates of basiliximab in liver transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**: 201–209 (2001).
  - 21) Freiberger, T., Ravcuková, B., Grodecká, L., Kurecová, B., Jarkovský, J., Bartonková, D., Thon, V. and Litzman, J.: No association of FCRN promoter VNTR polymorphism with the rate of maternal-fetal IgG transfer. *J. Reprod. Immunol.*, **85**: 193–197 (2010).
  - 22) Vaughn, D. E., Milburn, C. M., Penny, D. M., Martin, W. L., Johnson, J. L. and Bjorkman, P. J.: Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor. *J. Mol. Biol.*, **274**: 597–607 (1997).
  - 23) West, A. P., Jr. and Bjorkman, P. J.: Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor. *Biochemistry*, **39**: 9698–9708 (2000).
  - 24) Liu, X., Ye, L., Christianson, G. J., Yang, J. Q., Roopenian, D. C. and Zhu, X.: NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. *J. Immunol.*, **179**: 2999–3011 (2007).

## 総説

## 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体：FcRn

石井 明子<sup>1)</sup>, 鈴木 琢雄<sup>1)</sup>, 多田 稔<sup>1)</sup>,  
川西 徹<sup>2)</sup>, 山口 照英<sup>1)</sup>, 川崎 ナナ<sup>1)</sup>

**要約：**腫瘍や自己免疫疾患等の治療を目的とした分子標的薬として、抗体医薬品の研究開発が国内外で活発に行われている。抗体医薬品の特徴は標的分子に高い親和性をもって極めて特異的に結合することであるが、他のバイオ医薬品と比較して血中半減期が長いことも特筆すべき点である。ペプチドあるいはタンパク質を医薬品として応用する場合には血中半減期が実用化のためのハードルとなることが少なくない。しかし、多くの抗体医薬品は、生体内 IgG の分解抑制に関わる neonatal Fc receptor (FcRn) を介したリサイクリング機構を利用することができるため、数日~数週間という長い血中半減期を有している。FcRn は齶歯類の新生児小腸に高発現し、乳汁に含まれる母親由来 IgG の吸収に関与する受容体として同定された。その後の研究により、FcRn が成体においても種々の組織に発現し、IgG のリサイクリングやトランスサイトーシス等に関与していることが報告され、母子免疫以外にも様々な側面で IgG の体内動態制御に関わっていることが明らかにされている。我々は、既承認抗体医薬品の FcRn 結合親和性を解析し、ヒトでの血中半減期と FcRn 結合親和性の相関、および抗体医薬品の FcRn 結合親和性を規定する構造特性の一端を明らかにした。近年の創薬研究では、FcRn 結合親和性を改変した抗体医薬品等の開発が進んでいる他、FcRn のもう 1 つのリガンドであるアルブミンを利用することにより体内動態特性を改変したタンパク質医薬品の開発も進んでいる。FcRn は、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品の体内動態制御に関わる鍵分子の 1 つと言えるであろう。

## はじめに

2010 年 9 月までに日米欧で 29 品目のモノクローナル抗体医薬品が承認されている (図 1)。既承認抗体医薬品の中には顕著な有効性が認められているものも少なくなく、例えば、抗 TNF  $\alpha$  抗体が奏功している関節

リウマチの治療では “The era of biological therapy has arrived.” と言われるほどである (1)。現在臨床開発段階にある抗体医薬品は 140 品目に上り、今後さらに承認品目数が増加する可能性が高い。本稿では、抗体医薬品および抗体医薬品に類似した性質を持つ Fc 融合タンパク質医薬品の概略を述べた後、抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体 FcRn について、発見の経緯、構造と機能、および抗体医薬品の体内動態との関連に関して、既承認抗体医薬品の FcRn 結合親和性を解析した我々の知見を含めて紹介する。

## 1. 抗体医薬品

抗体医薬品の多くは抗腫瘍作用あるいは免疫調節作用を持つ医薬品である (図 1)。これらは作製法に起因するアミノ酸配列の相違により、マウス抗体、キメラ型抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体に分類される (2)。1975 年に Köhler と Milstein によりマウスモノクローナル抗体作製技術 (3) が開発された当初、ミサイル療法が現実のものになると抗体医薬品の開発に大きな期待が寄せられた。しかし、マウス抗体をヒトに投与すると高頻度で抗体産生が起こりアナフィラキシー反応が懸念されるために繰り返し投与が困難であること、および半減期が短いことが障壁となり (4)、多くの開発が失敗に終わった。ヒト生体内 IgG の半減期が約 20 日 (5) であるのに対して、ヒトに投与されたマウス抗体の半減期は数時間~3 日程度である (6)。1980 年代に承認された抗体医薬品は、腎移植後の急性拒絶反応の治療に用いられるマウス抗 CD3 抗体のみであったが、その後、キメラ型抗体 (7) やヒト化抗体 (8) の作製技術が確立されてヒト IgG 骨格を持った抗体を遺伝子組換えにより作製・製造することが可能になり、1990 年代半ば以降、抗体医薬品の開発が急伸した。マウス抗体の可変領域あるいは相補性決定領域以外をヒト IgG 由来の配列に置き換えることで、免疫原性を低下させ、

分類	承認年	名称	標的	主な適応疾患	血中半減期
マウス抗体	1986	ムロモナブ-CD3	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	0.75日
	2002	イブリツモマブ チウキセタン	CD20	非ホジキンリンパ腫	1.1日
	2003	トシツモマブ	CD20	非ホジキンリンパ腫	2.7日
キメラ型抗体	1997	リツキシマブ	CD20	非ホジキンリンパ腫	9.4日
	1998	バシリキシマブ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	4.1日
	1998	インフリキシマブ	TNF $\alpha$	関節リウマチ	9.5日
	2004	セツキシマブ	EGFR	頭頸部癌, 結腸・直腸癌	4.8日
ヒト化抗体	1997	ダクリズマブ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	20日
	1998	バリビズマブ	RSV F protein	RSウイルス感染	19~27日
	1998	トラスツズマブ	HER2	転移性乳癌	2.7~10日
	2001	アレムツズマブ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	12日
	2003	オマリズマブ	IgE	喘息	20日
	2003	エファリズマブ	CD11	尋常性乾癬	5.5~10.5日(*)
	2004	ベナシズマブ	VEGF	結腸・直腸癌	11.7~13.4日(*)
	2005	トシリズマブ	IL-6R	キャッスルマン病, 関節リウマチ	5.5日(*)
ヒト抗体	2002	アダリムマブ	TNF $\alpha$	関節リウマチ	14.7~19.3日
	2009	ゴリムマブ	TNF $\alpha$	関節リウマチ	14日(*)
	2009	ウスチキヌマブ	IL12, IL23 p40	乾癬	14.9~45.6日(*)
	2009	カナキヌマブ	IL-1 $\beta$	クリオピリン関連周期性症候群	26日(*)
	2009	オファツムマブ	CD20	慢性リンパ性白血病	14日(*)
Fc融合タンパク質	1998	エタネルセプト	TNF $\alpha$ , LT $\alpha$	関節リウマチ	4日
	2003	アレファセプト	CD2	尋常性乾癬	11.3日(*)
	2005	アバタセプト	CD80/CD86	関節リウマチ	13.1日(*)
	2008	リロナセプト	IL-1	クリオピリン関連周期性症候群	6.3~7.5日(*)
	2008	ロミプロスチム	TPOR	血小板減少性紫斑病	1~34日(*)



図1 既承認抗体医薬品の例 (マウス抗体およびヒト IgG1 の Fc 領域を持つ抗体と Fc 融合タンパク質)  
血中半減期は文献 6 より引用 (\*は製品添付文書より引用)

血中半減期を延長できたことが抗体医薬品の実用化におけるブレークスルーであったと言える。

抗体分子は、抗原との結合を担う Fab 領域と Fc 受容体や補体との結合に関与する Fc 領域から構成される。近年、抗体に類似した特徴を持つ医薬品として、標的分子特異的結合能を持つ受容体タンパク質等を抗体の Fc 領域と融合させた Fc 融合タンパク質医薬品の開発も進んでおり、これまでに日米欧で 5 品目が承認されている (図 1)。例えば、TNF 受容体の細胞外領域と Fc 領域の融合タンパク質であるエタネルセプトは、TNF を中和する作用を持ち、関節リウマチ等の治療に用いられる。これらは、標的分子結合部位のみでは医薬品とすることが難しいタンパク質あるいはペプチドを Fc 領域との融合タンパク質として血中安定化を図ることにより臨床応用することに成功した例と言える。本稿では、抗体医薬品として、モノクローナル抗体医薬品および Fc 融合タンパク質医薬品を指すこととする。

## 2. FcRn の発見の経緯および構造と機能

### 1) FcRn 発見の経緯

IgG の体内動態制御に関わる受容体は、IgG の代謝や輸送に特異性と飽和が存在することを根拠に 1964 年に Brambell によりその存在が提唱され、Brambell receptor とも言われていたものである (9)。その後、新生児小腸での IgG 吸収に関わる受容体 (neonatal gut

transport receptor) として “FcRn”, IgG 分解抑制に関わる受容体 (IgG protection receptor) として “FcRp” の存在が考えられるようになっていた (10)。1989 年になり、ラット新生児小腸から FcRn がクローニングされて一次構造が解明され、 $\beta 2$ -microglobulin ( $\beta 2m$ ) とヘテロダイマーを形成する受容体であることも明らかになった (11)。キメラ型抗体医薬品やヒト化抗体医薬品が承認され始めていた 1996 年、 $\beta 2m$  ノックアウトマウスを用いた実験により、FcRn が IgG の半減期制御に関わる受容体 FcRp としての機能も合わせ持つことが明らかにされた (12-14)。IgG の半減期制御における FcRn の寄与については FcRn ( $\alpha$  鎖) のノックアウトマウスを用いた検証も行われている (15)。これらの研究により、FcRn および FcRp と考えられていた受容体の実体は同じ分子であり、“FcRn” として同定された受容体が IgG の輸送と血中濃度維持の両方の機能を担っていることが明らかになった。

### 2) FcRn の構造と機能

ヒト FcRn は MHC クラス I 分子に類似した構造を持ち、342 アミノ酸残基からなる  $\alpha$  鎖 (図 2) と 99 アミノ酸残基からなる  $\beta$  鎖 ( $\beta 2m$ ) により構成される。 $\beta 2m$  は FcRn  $\alpha$  鎖の細胞内局在に関与する (16, 17) ほか、IgG 結合にも関与している (17)。

FcRn と IgG は酸性条件下 (pH6~6.5) で結合し、中性条件下 (pH7.4) では解離する。FcRn との結合には、



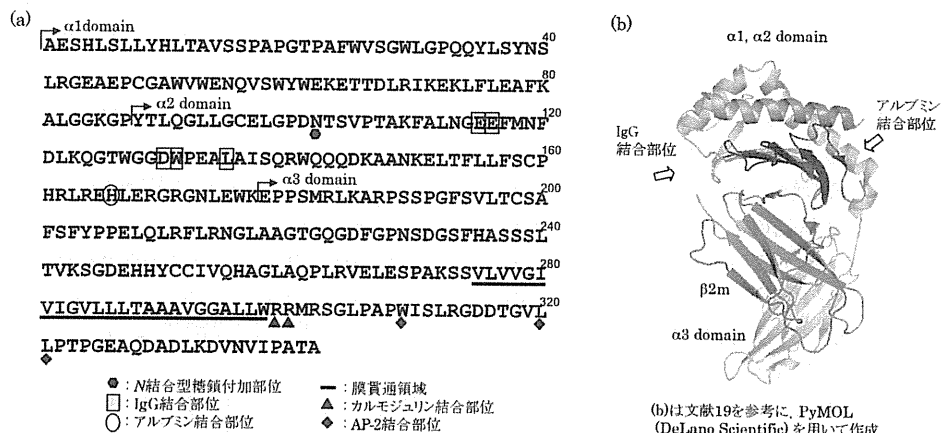


図2 ヒトFcRn (α鎖) のアミノ酸配列 (a) および細胞外領域の立体構造 (b)

IgGの高次構造上CH2領域とCH3領域の間に位置するLeu253, His310, His435が関与し, IgGのHis残基とFcRnの酸性アミノ酸残基の静電的相互作用がpH依存性の結合に寄与しているとされている(18). IgG結合に関与するFcRn上のアミノ酸残基は, FcRn α2ドメインのGlu115, Glu116, Asp130, Trp131, Leu135とされている(19)が, この部位のアミノ酸配列には種による相違がみられ, FcRnとIgGの結合に種差があることの一因と考えられている(18). 現在では, マウスIgG1およびIgG2aはヒトFcRnに結合しないことが明らかにされており(20), ヒトに投与されたマウス抗体が短半減期であることの科学的根拠となっている.

FcRnにはIgGの他にアルブミンもpH依存的に結合する(21). FcRnにおけるアルブミン結合部位はHis166であり, IgG結合部位とは異なっているため, IgGとアルブミンは拮抗することなくFcRnに結合する(22). ヒトにおけるアルブミンの半減期は約20日であり, IgGと同様である(22).

FcRnの膜貫通領域直下の2つのArg残基はカルモジュリンの結合に関わっており, カルモジュリンとの結合がFcRnタンパク質の半減期やIgGの輸送効率に関与していることが報告されている(23). また, ヒトを含む多くの種で保存されているTrp309, Leu320, Leu321がadaptor protein AP-2との結合およびFcRnのエンドサイトーシスに関与することが報告されている(18).

### 3. 生体各組織におけるFcRnの役割

FcRnは新生児期のみならず成体においても種々の組織に発現していることが明らかにされており(21), IgGの分解抑制による血中濃度維持, および細胞内経路を介したIgGの輸送により, IgGによる生体防御機構に関与していると考えられる.

#### 1) IgG血中濃度維持

FcRnは, 主として細胞内に局在している(24).

FcRnは細胞内に取り込まれたIgGとエンドソーム内で結合して, IgGがリソソームに輸送されて分解されるのを抑制し, IgGを細胞外にリサイクルすることによってIgGの血中濃度を維持していると考えられている(21)(図3a). IgG血中濃度維持には血管内皮細胞および血球系細胞に発現しているFcRnが関与していることが, 組織特異的ノックアウトマウスを用いた実験等により示されている(25, 26). IgGの細胞への取り込みはピノサイトーシスによるとされているが(21), *in vitro*実験ではFcRn発現量とIgG取り込み量が相関するという報告(27)がある他, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の活性が高い上皮細胞やがん細胞あるいは炎症部位などでは細胞表面の微小環境の酸性化により細胞表面でのIgGとFcRnの結合が可能になり, FcRnがIgG取り込みに関与している可能性も考えられている(18).

#### 2) IgG輸送

FcRnは上皮細胞等においてトランスサイトーシスによりIgGを輸送する(図3b). 多量体免疫グロブリン受容体pIgRによる二量体IgAの輸送が基底膜側から管腔側への単方向であるのと対照的に, FcRnは双方向性にIgGを輸送し得ることが報告されている(16, 28). 各組織でのFcRnの役割については未解明の点が多いが, 齧歯類の新生児小腸における乳汁中IgGの吸収の他, ヒト, サル, およびウサギの胎盤における母親由来IgGの胎児への輸送, 成体の小腸におけるIgGの管腔側への分泌と基底膜側への抗原の取り込み, および抗原提示細胞への輸送(29), 腎糸球体基底膜からのIgG除去(30)等にFcRnが関与していると考えられている. また, 好中球における抗体結合細菌の貪食(31)や, 抗原提示細胞での抗原抗体複合体の取り込みと抗原提示にもFcRnが関わっている(32).

### 4. 抗体医薬品の体内動態とFcRn

#### 1) 抗体医薬品の血中半減期とFcRn

図1に抗体医薬品のヒトにおける血中半減期を示し



た(6). マウス抗体の血中半減期が短いこと、また、表に記載したキメラ型、ヒト化、ヒト抗体およびFc融合タンパク質は全てヒトIgG1由来のFc領域を持つが、その血中半減期は製品により異なっていることが分かる。一般に、バイオ医薬品の血中半減期制御には、分子量や等電点、受容体結合性など多くの要素関わっている。我々は、抗体医薬品の血中半減期とFcRn結合親和性の関連を明らかにする目的で、11種類の代表的な既承認抗体医薬品について、表面プラズモン共鳴法を用いてヒトFcRnとの結合親和性を解析した。その結果、ヒトIgG1由来Fc領域を持つ抗体医薬品のFcRn結合親和性は製品により異なっており、特にFc融合タンパク質ではFcRn結合親和性が低いことが明らかになった。また、一部の抗体を除いて、FcRn結合親和性とヒトでの血中半減期(文献値)に相関が認められ、FcRn結合親和性が血中半減期制御に関わる重要な要素の1つであることが示された(33)。

さらに、評価に用いた抗体医薬品の中には、アロタ

イプの違いによりFc領域のアミノ酸2残基の配列が異なる製品があることや、Fc領域に結合している糖鎖の構造も製品により異なっていると考えられることから、これらの限定的な差がFcRn結合親和性に影響している可能性を考え、パパイン消化によりFc領域をFab領域あるいは受容体領域から分離してFcRnとの結合親和性を測定した。興味深いことに、FcRn結合親和性が相対的に低い抗体医薬品のFcRn結合親和性は、パパイン消化により上昇し、FcRnに高親和性を示す抗体医薬品と同程度になることが明らかになった(図4)。すなわち、アロタイプや糖鎖構造の相違がFcRn結合親和性に影響しているのではなく、Fab領域あるいは受容体領域の構造がFc領域内のFcRn結合部位の高次構造に影響する結果、各抗体医薬品が固有のFcRn結合親和性を有していることが示唆された(33)。

2) 抗体医薬品の生体内分布と FcRn

3.の2)で述べたように、FcRnを介した生体局所でのIgG動態制御に関する知見が集積され、IgGを介し

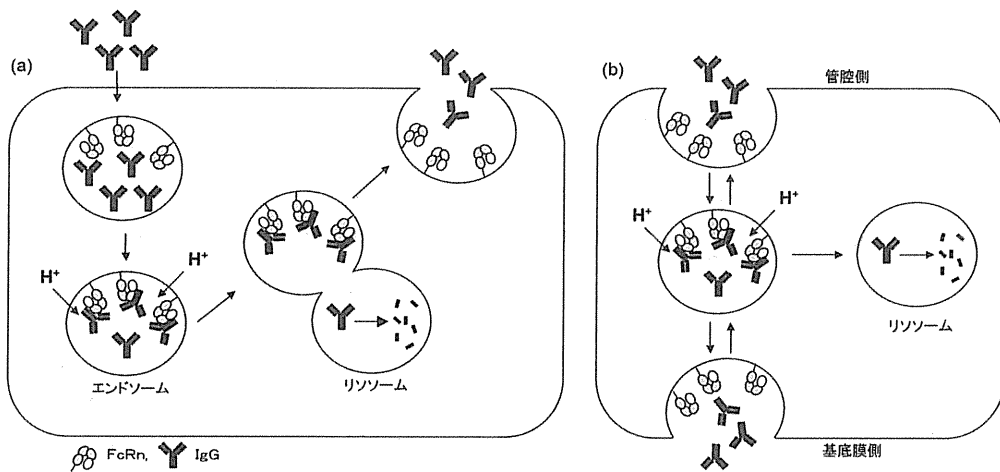


図3 FcRnを介したIgGのリサイクリング (a) およびトランスサイトosis (b)

(a) リサイクリング：血管内皮細胞等に発現しているFcRnはIgG分解抑制を担っている。ピノサイトosisにより細胞内に取り込まれたIgGは、H<sup>+</sup>の流入により酸性化したエンドソーム内でFcRnに結合する。FcRnに結合しなかったIgGはリソソームで分解されるが、FcRnと結合したIgGは分解を免れ、細胞外に輸送されてFcRnから解離することにより、リサイクルされる。(文献21より改変)  
 (b) トランスサイトosis：小腸上皮細胞等に発現しているFcRnは細胞内経路を介したIgG輸送を担っている。

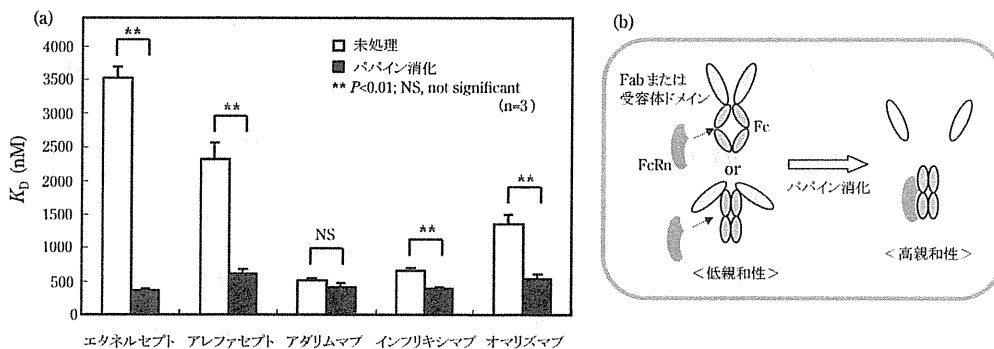


図4 抗体医薬品のFcRn結合親和性のパパイン消化による変化 (a) およびデータから想定されるモデル (b)  
 (a) Suzuki T. et al. (文献33より一部改変)

た免疫応答における FcRn の役割が解明されつつある。投与された抗体医薬品も生体内 IgG と同様の機構により局所で輸送されると考えられるが、血中から組織への抗体医薬品の移行は主として対流や拡散等の受動的な機構によるものと考えられており(34)、抗体医薬品の生体内分布と FcRn の関連に関する知見は限られている。しかし、FcRn を介した抗体の胎盤通過が抗体医薬品の安全性を考える上で重要であるという点は明確であり(35)、ヒトでは胎盤に FcRn が発現する妊娠第3期以降には母親に投与された抗体医薬品が胎児に移行する可能性が高い。また、非臨床生殖発生毒性試験の実施に際しては、試験に用いる動物の FcRn と被験薬の結合親和性や、動物における IgG 母子免疫の機構を十分に考慮する必要がある。この他、アルツハイマー病治療薬として開発が進められている抗 $\beta$ アミロイド抗体の作用機構についてはまだ一定の見解が得られていないが、FcRn の関与を示唆する報告もあり(36)、抗体医薬品の生体内分布と FcRn の関連の解明は今後の課題である。

## 5. FcRn との結合性を利用したバイオ医薬品の開発動向

現在までに、FcRn との結合親和性を上昇させ、血中半減期の延長と有効性の向上を目的とした改変型抗体(37)の開発が進められている他、ホルモンやサイトカイン、酵素などを Fc 領域と融合させることにより血中半減期を延長することが試みられている(38)。また、エリスロポエチンあるいは卵胞刺激ホルモンを Fc 領域と融合させたタンパク質では、FcRn を介した肺上皮細胞におけるトランスサイトーシスを利用し、経肺的に投与する試みが報告されている(39,40)。FcRn はアルブミンの半減期制御にも関わっているが、Fc 融合タンパク質の場合と同様、有効成分となるタンパク質をアルブミン融合タンパク質(41)あるいはアルブミン結合性タンパク質(42)に改変することにより、血中半減期の延長を図っている例もある。

一方、FcRn を介したリサイクリングには、結合の pH 依存性が保たれていることが重要であるため、pH 非依存的に FcRn と結合する改変型抗体は FcRn の阻害薬として作用する。このような抗体は内因性抗体のクリアランスを亢進させるため、自己免疫疾患治療に有用である可能性が考えられており(43)、今後、FcRn 阻害薬が自己免疫疾患治療薬として開発される可能性もある(44)。ヒト血漿由来 IgG を大量に静注する免疫グロブリン製剤の有効性メカニズムにも FcRn の飽和による内因性自己抗体のクリアランス亢進が関わっている可能性が考えられている(45)。

## おわりに

バイオ医薬品の開発には、生命科学の進歩による新たな知見の蓄積と、医薬品製造技術の進展が関わっており、抗体医薬品は両者が相乗的に作用して発展を続ける好例と言える。ペプチドおよびタンパク質医薬品では、体内動態の改善が開発の鍵となっている例が少なくないが、IgG の Fc 領域やアルブミンは、種々の生理活性タンパク質に血中安定性を付与し得るドメインとして今後も活用されると予想される。FcRn を含め、タンパク質医薬品の体内動態制御に関わる分子的基盤の解明が進み、新薬の分子設計や関連する医薬品の有効性・安全性確保に寄与することが期待される。

謝辞：本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、ならびに厚生労働科学研究費補助金により行われたものである。

## 文 献

- 1) Isenberg DA. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:229.
- 2) 川西 徹. *日薬理誌*. 2008;131:102-108.
- 3) Köhler G, et al. *Nature*. 1975;256:495-497.
- 4) 野口浩. *医学のあゆみ*. 1993;167:457-462.
- 5) Morell A, et al. *J Clin Invest*. 1970;49:673-680.
- 6) Lobo ED, et al. *J Pharm Sci*. 2004;93:2645-2668.
- 7) Morrison SL, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:6851-6855.
- 8) Jones PT, et al. *Nature*. 1986;321:522-525.
- 9) Brambell FW, et al. *Nature*. 1964;203:1352-1354.
- 10) Junghans RP. *Immunol Res*. 1997;16:29-57.
- 11) Simister NE, et al. *Nature*. 1989;337:184-187.
- 12) Ghetie V, et al. *Eur J Immunol*. 1996;26:690-696.
- 13) Israel EJ, et al. *Immunology*. 1996;89:573-578.
- 14) Junghans RP, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5512-5516.
- 15) Roopenian DC, et al. *J Immunol*. 2003;170:3528-3533.
- 16) Claypool SM, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:28038-28050.
- 17) Praetor A, et al. *J Cell Sci*. 2002;115:2389-2397.
- 18) Ward ES, et al. *Adv Immunol*. 2009;103:77-115.
- 19) Andersen JT, et al. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24:318-332.
- 20) Andersen JT, et al. *J Biol Chem*. 2010;285:4826-4836.
- 21) Roopenian DC, et al. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:715-725.
- 22) Anderson CL, et al. *Trends Immunol*. 2006;27:343-348.
- 23) Dickinson BL, et al. *Mol Biol Cell*. 2008;19:414-423.
- 24) Lencer WJ, et al. *Trends Cell Biol*. 2005;15:5-9.
- 25) Akilesh S, et al. *J Immunol*. 2007;179:4580-588.
- 26) Montoyo HP, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:2788-2793.
- 27) Goebel NA, et al. *Mol Biol Cell*. 2008;19:5490-5505.
- 28) McCarthy KM, et al. *J Cell Sci*. 2000;113(Pt 7):1277-1285.
- 29) Yoshida M, et al. *J Clin Invest*. 2006;116:2142-2151.
- 30) Akilesh S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:967-972.
- 31) Vidarsson G, et al. *Blood*. 2006;108:3573-3579.
- 32) Qiao SW, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:9337-9342.
- 33) Suzuki T, et al. *J Immunol*. 2010;184:1968-1976.
- 34) Tabrizi M, et al. *Aaps J*. 2009;12:33-43.
- 35) Pentsuk N, et al. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009;86:328-344.
- 36) Deane R, et al. *J Neurosci*. 2005;25:11495-11503.
- 37) Zalevsky J, et al. *Nat Biotechnol*. 2010;28:157-159.
- 38) Jazayeri JA, et al. *BioDrugs*. 2008;22:11-26.
- 39) Bitonti AJ, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9763-9768.
- 40) Low SC, et al. *Hum Reprod*. 2005;20:1805-1813.
- 41) Subramanian GM, et al. *Nat Biotechnol*. 2007;25:1411-1419.
- 42) Dennis MS, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:35035-35043.
- 43) Vaccaro C, et al. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1283-1288.
- 44) Sesarman A, et al. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:2533-2550.
- 45) Akilesh S, et al. *J Clin Invest*. 2004;113:1328-1333.

# バイオ医薬品開発における潮流と規制

Recent Progress in biomedical research & development  
(trend and regulations)

第6回

最終回

## バイオ治験薬の品質・安全性確保

Approaches for ensuring quality and safety of  
biological investigational medicinal products

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

石井明子, 川崎ナナ

AKIKO ISHII, NANA KAWASAKI

National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals

### はじめに

新薬開発が容易ではない状況を打破するべく提示されたFDAのクリティカルパスから6年、医薬品開発推進の動きは国内外で続いている。わが国でも、治験環境の充実を目的として、全国治験活性化3カ年計画、新たな治験活性化5カ年計画に続き、平成23年度には早期臨床試験の強化やグローバル臨床研究拠点の整備を含む「ポスト治験活性化5カ年計画」が公表される予定である<sup>1)</sup>。また、有効な新薬を海外に遅れることなく審査承認できるよう、医薬品の開発時期を海外と同調させるための有力な手段である国際共同治験の推進を目的として、「国際共同治験に関する基本的考え方」が平成19年に通知として発出されている。

新薬の治験ではヒトに対する有効性・安全性が未知の薬物が投与されるため、実施に際して最も配慮すべき点は被験者の安全確保である。また、新薬開発を適切に進めていくためには、治験環境の整備に加えて、治験薬の品質保証に基づく治験データの信頼性確保が欠かせない。バイオ医薬品には、作用の種特異性が高く非臨床試験による安全性評価が難しいケースが少なくないこと、目的物質の構造に不均一性が存在し製造方法が品質に大きく影響することなど、化学合成医薬品とは異なる特徴がある。有用なバイオ医薬品を迅速に開発していくためには、

これらの特徴を考慮しつつ、安全かつ効率的に治験を進める努力が必要である。本稿では、治験に用いられる被験薬としてのバイオ医薬品(組換えタンパク質医薬品)候補薬物をバイオ治験薬と称し、知識管理、科学的理解、ならびにリスクマネジメントをベースとする近年の医薬品の製法開発・品質管理の潮流を踏まえて、バイオ治験薬の品質・安全性確保について考察する。なお、本稿の内容は公的に入手可能な資料と国立医薬品食品衛生研究所における業務を通じて学んだことから考察した筆者の私見である。

### 1. バイオ治験薬の品質・安全性確保の考え方

医薬品とは、治験を通じて有効性・安全性が確認され、確認された有効性・安全性を裏付ける物質特性として一定の品質を備えたものである。これに対して治験薬は、ヒトに対する有効性・安全性が未知であり、有効性・安全性を裏付ける品質特性やそれを作り出す製造工程も確定していない。有効性・安全性が未検証である治験薬の投与には本質的にリスクが潜在するため、治験薬の有効性・安全性確保のためには、それまでに得られた実証データや既存の知識をもとに当該治験薬の特徴を十分に理解してリスク要因を明らかにし、リスクを低減する方策を考えることが重要である。その上で、残存するリスク



表1 治験薬GMP(平成20年7月9日 薬食発第0709002号)

第1 総則
1. 目的
1.1 治験薬の品質を保証することで、不良な治験薬から被験者を保護すること
1.2 治験薬のロット内及びロット間の均質性を保証することで、臨床試験の信頼性を確保すること
1.3 治験薬が開発候補として絞り込まれた段階においては、当該治験薬と市販後製品の一貫性を、治験薬の製造方法及び試験方法が確立した段階においては、当該治験薬と市販後製品の同等性を保証することで、市販後製品の有効性及び安全性並びに臨床試験の適切性を確保すること

表2 治験薬GMPに掲げられた目的に対応して、バイオ治験薬の品質・安全性確保に求められる要件

1.1 治験薬の特性を十分に理解して想定されるリスク要因を明らかにして、リスクの低減化を図ると共に、適切な工程管理・品質試験を設定すること
1.2 頑健性の高い製造方法を構築し、治験薬ロットの品質試験により品質の一定性を確認すること (製造工程管理手法が確立されていない開発初期では、品質試験の重要性が高い)
1.3 製法変更時の同等性/同質性評価を適切に実施しながら開発を進めること

については、被験者への危害が生じないように十分な対策を講じるべきである。

わが国には、バイオ治験薬の品質・安全性に特化したガイドラインはないが、治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬GMP)(平成20年7月9日 薬食発第0709002号)が定められており、治験薬の品質管理に関して、医薬品開発をめぐる近年の動向を踏まえた規制当局の考え方を知らる上で、大変参考になる事項が書かれている。治験薬GMPの冒頭に掲げられている3つの「目的」(表1)は、WHO-GMP/ヒト用治験薬ガイドラインの一般原則を原型とし<sup>2)</sup>、治験薬の製造管理、品質管理を通じて目指すべき方向が明確に示されたものである。したがって、この「目的」を達成する方法を考えることが、ヒト初回投与試験から第Ⅲ相臨床試験を通じて、治験薬の品質・安全性確保に求められる要件を考える切り口の1つになると考えられる(表2)。

表3～5に治験および治験薬に関する規制環境整備の国際的動向を記載した。わが国の特徴は、治験届出制により治験が行われていること、治験薬の品質・安全性に特化したガイドラインが定められていないこと、ならびに、医薬品GMPとは独立して、早期探索的段階から第Ⅲ相まで治験の段階に応じた治験薬の品質保証を可能とする治験薬GMPが定められている点である。旧治験薬GMP(平成9年3月31日 薬発第480号)の改正により現

表3 治験および治験薬に関する規制環境整備の国際的動向

	日本	米国	EU
治験の実施許可	治験届出制	治験申請制	治験申請制 (2004年より)
バイオ治験薬の品質安全性に関するガイドライン	無	有 (表4参照)	有 (表4参照)
治験薬のGMP <sup>2)</sup>	治験薬GMPによる規制	医薬品GMPによる規制(21CFR 210&211) 治験薬のGMPに関するガイダンス(表5参照)	医薬品GMPによる規制(Directive 2003/94/EC) 治験薬のGMPに関する補遺(表5参照)

表4 欧米におけるバイオ治験薬の品質安全性に関するガイドライン

[米国]	
1995年	Guidance for Industry: Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase 1 Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products 第1相臨床試験に用いられる治験薬の申請に関するガイダンス
2006年	Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies 探索的臨床試験に関するガイダンス (CMCに関する記載を含む)
[EU]	
2007年	Guideline on Strategies to Identify and Mitigate Risks for First-in-Human Clinical Trials with Investigational Medicinal Products EMEA/CHMP/SWP/28367/07 ヒト初回投与臨床試験におけるリスクの同定と低減に関するガイドライン
2008年	Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products EMEA/CHMP/BWP/398498/2005 バイオ治験薬のウイルス安全性に関するガイドライン
2010年	Guideline on the Requirement for Quality Documentation concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials(Draft) EMA/CHMP/BWP/534898/2008 バイオ治験薬の品質関連の記載事項に関するガイドライン案

在の治験薬GMPが策定された際、目的1.3(表2)に対応して、ベリフィケーションやクオリフィケーションの概念が取り入れられたことによって、治験の進展に応じた合理的な管理が認められることとなった。

GMPでは、あらかじめ規定された手順に従って製造工程が管理・記録され、品質規格に定められた適否の判

表5 欧米における治験薬のGMPに関するガイドライン

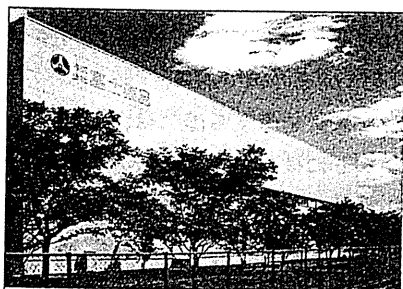
[米国] Guidance for industry : CGMP for phase 1 investigational drugs Guideline on the preparation of investigational new drug products (human and animal) 第Ⅱ相、第Ⅲ相試験に用いられる治験薬は後者のガイドラインの適用を受ける
[EU] Good Manufacturing practices Annex 13 Manufacturing of investigational medicinal products

定基準を満たす製品が得られたことを確認・記録することをもって、品質が保証されたと判断される。しかし、どのような工程管理を行い品質試験を設定すれば製品の有効性・安全性を担保できるのか。これには画一的な答えはなく、製品の特性や開発段階に応じたケースバイケースの対応が必要である。一般に、第Ⅲ相試験までには製造方法および品質試験をほぼ確定することが求められるが、製造工程や品質特性への理解が十分でない開発初期には、どこまで特性解析を行い、どのように品質管理を行うべきか、また非臨床試験系の妥当性をどのように評価し、臨床試験に入るべきであろうか。

治験薬GMPに掲げられた3つの目的を達成するためのアプローチを考えると、科学とリスクマネジメントに基づくライフサイクル全期間に適用可能な医薬品の品

質管理の戦略が述べられたICH Qトリオ(Q8, Q9, Q10)ガイドラインの考え方が参考になる。すなわち、治験薬の品質確保を1つのリスクマネジメントプロセスと考え、既存の知識と当該治験薬に関して得られている実験データをもとに治験薬の被験者への安全性に関するリスクアセスメントを行い、そのリスクを低減するための特性解析、品質試験の設定、製法開発、工程管理の設定をリスクコントロールと位置づける。治験薬の品質に関する情報を治験担当医師と共有することがリスクコミュニケーションであり、治験結果の次のステップへの反映がリスクレビューに相当すると考えることも可能ではないだろうか。

有効な品質リスクマネジメントのアプローチは、開発および製造中に潜在する品質問題を特定し、コントロールする予防的な手段を提供し、より高品質の医薬品を患者に提供することを可能とする。製品ライフサイクルの初期にあたる治験薬の品質管理は、リスクマネジメントを基本とし、目的とする製品品質プロファイル(QTPP: quality target product profile)の構築を目指した製造品質設計を行うことにより、治験の各段階で得られている知識レベルに応じた管理戦略の妥当性を説明することが可能と考えられる。知識管理と科学的理解に基



最新の製造設備で

開発から製造まで

注射剤のことなら富士薬品におまかせ下さい!!

Medical Innovator  
一人ひとりの健康を守るために、  
新たな未来に向けた挑戦を続けてまいります

注射剤(液剤・凍結乾燥製剤)  
医薬品・治験薬

受託製造

- 小量スケールから実生産規模大量スケールまで対応可能
- 治験薬製造 EU-GMPに対応!
- 製剤設計から安定性試験受託

医薬品製造業・無菌医薬品区分



お問い合わせは…



株式会社 富士薬品  
富山第二工場

〒939-2721 富山県富山市婦中町板倉750番地  
TEL: 076-465-3242 FAX: 076-465-5450  
E-mail: jyutaku-info@fujiyakuhin.co.jp

DM資料請求カードNo.79

づくリスクマネジメントの重要性を踏まえ、バイオ治験薬の安全性に関する既存の情報を概説した上で、ヒト初回投与試験実施に際して求められる要件、および、市販製剤の製法確立・品質確保に向けて治験段階で検討していくべき事項を以下に考察する。

## 2. バイオ治験薬の安全性に関する 概論

バイオ治験薬の安全性を考える上では、知識管理の1つとして、既承認バイオ医薬品あるいはバイオ治験薬に関して蓄積されてきた知見を整理し、リスク要因を考察することが有用である。バイオ治験薬の安全性は、初回臨床試験で被験者全員が多臓器不全に陥った抗CD28アゴニスト抗体TGN1412<sup>3)</sup>の事故から得られた教訓なしに語ることはできないが、欧州医薬品庁(EMA)からは、TGN1412事故の原因検証とその後の議論を元に、初回臨床試験のためのリスク同定とリスク低減のためのガイドライン“Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products”が公表されており、バイオ治験薬の安全性を考える上で参考となる内容が書かれている。リスク要因として、作用機構、標的分子の性質、動物モデルの妥当性、の3点が重要であるとするこのガイドラインの記載を参考に、バイオ治験薬の安全性について、リスク要因として考慮すべき事項を以下に列挙する。各項目について、リスクが高いという知見がある場合、または、その内容が不明確な場合、有害作用が生じる可能性が懸念されるため、リスクを低減する対策が必要である。

### (1) 作用機構および標的分子の性質

化学合成医薬品では、標的外分子への作用や毒性のある代謝物への変換等によるoff-target効果が原因となって有害作用が生じるケースも比較的多いが、バイオ医薬品ではそのような例は稀であり、有効成分の過剰な薬理作用、すなわちon-targetな作用が有害作用の原因となるケースが多い。したがって、治験薬の有効性の根拠となる作用機構と用量反応性を十分に理解することが重要である。TGN1412により生じたサイトカイン放出症候群は過剰な薬理作用が原因であったケースと言えるであろう。その他に、t-PAによる出血傾向やインスリンによる低血糖等がこれにあたる。有害作用の出現頻度や出

現までの投与期間を考えると治験では検出されない可能性があるが、免疫抑制作用を持つバイオ治験薬では、腫瘍形成や日和見感染の懸念がある。欧米で承認されていた抗CD11抗体efalizumabは、市販後にJCウイルスの再活性化により生じる進行性多巣性白質脳症を生じたことから、販売が中止された。

また、有効成分が複数の薬理作用を持つ場合、目的外の作用が生じ有害作用が生じる可能性がある。インターフェロンによる発熱等がその例である。細胞増殖因子としての作用を合わせ持つバイオ医薬品では、腫瘍形成のリスクが懸念される。

既承認のバイオ医薬品にはない新規な作用機構を持つバイオ治験薬では、非臨床試験結果からは予測が困難な有害作用が生じる可能性も否定できない。

有効成分の作用機構に関連して、標的分子の組織分布や機能等の性質もリスク要因として重要である。例えば、標的分子が標的組織外にも存在する場合、有害作用が生じることがある。抗EGFR抗体では、ざ瘡様皮疹や皮膚の乾燥等の皮膚症状が高頻度に生じることが知られているが、これは正常皮膚組織に存在するEGFRが標的となる結果とされる。CD28のように生理的なフィードバック機能を超えて標的分子を介した反応が進展する可能性がある場合は、注意が必要である。また、標的分子が複数の生理活性を持つ場合、目的外の作用が生じる可能性がある。抗TNF $\alpha$ 抗体による結核再燃(TNF $\alpha$ の肉芽形成阻害作用の抑制による)がその例である。

作用機構に関連したリスクを考える際には、関連する作用機構を持つ薬物がヒトに投与された過去の例や、薬理作用を介した重篤な毒性発現のリスクを模倣しうる動物モデル(トランスジェニック動物、ノックインあるいはノックアウト動物などを含む)での実験結果を参照することも有用である。

投与量設定により回避することが難しい有害作用については、有害作用の出現が懸念されることを踏まえた観察と迅速な処置のための備えが、リスクへの対応として必要と考えられる。

### (2) 有効成分の構造

バイオ医薬品の多くは糖鎖を持つ糖タンパク質であるが、動物細胞で生産された糖タンパク質の糖鎖には、Gal( $\alpha$ 1-3)GalあるいはNeuGcといった非ヒト型糖鎖が付加される可能性がある。非ヒト型糖鎖が問題となった例は多くはないが、Gal( $\alpha$ 1-3)Galを含有する糖鎖をFab



領域に持つ抗体医薬品では、Gal( $\alpha$ 1-3)Galに対するIgE抗体を保有する患者で過敏症反応が生じた例が報告されている<sup>7)</sup>。治験薬が糖タンパク質である場合は、非ヒト型糖鎖の有無について調べ、安全性への影響を考慮しておく必要がある。

また、非臨床試験では評価ができないが、有効成分の構造によっては、ヒトに対する免疫原性が高い場合がある。血小板増加作用を持つトロンボポエチンの部分配列を持つPEG化MGDFの開発は、治験段階で中和抗体産生による重篤な血小板減少症が生じ、中止されている<sup>8)</sup>。生体内生理活性タンパク質と同じあるいは類似の構造を持つバイオ医薬品に対して中和抗体が産生されると、内在性の生理活性タンパク質の作用をも抑制する結果、重篤な有害作用を生じる可能性があるため注意が必要である。

### (3) 不純物の種類と残存量、免疫原性

バイオ医薬品の原薬あるいは製剤に残存する不純物としては、製造工程由来不純物および目的物質由来不純物があり、それらが治験薬の安全性に影響する可能性を考慮すべきである。製造工程由来不純物としては、宿主細胞由来タンパク質や宿主細胞由来DNA、エンドトキシン(大腸菌を宿主とする場合)、培地成分、精製用カラムからの浸出物等がある。宿主細胞由来タンパク質の残存量が高い場合に免疫原性が増し、抗体出現率が高くなることが知られている。成長ホルモン後続品の開発においては、宿主細胞由来タンパク質の残存量が多い製剤を用いた治験で抗体産生率が高く、製法改良後の製剤では抗体産生率が低下したことが報告されている<sup>9)</sup>。大腸菌を宿主とする場合、DNAの非メチル化CpG配列やエンドトキシンがアジュバントとして作用し、抗体産生を亢進させる可能性も考えられる。また、エリスロポエチン製剤では、ラバーストッパーからの浸出物が抗体産生を増強していた可能性が指摘されている<sup>7)</sup>。ヒトに対する免疫原性は非臨床試験では評価ができないため、臨床試験において評価すべき項目の1つである。抗体産生による有害作用が生じないかについても注意が必要である。免疫原性は投与経路によっても異なり、皮下投与では静脈内投与に比較して、抗体産生が起こる可能性が高い。目的物質由来不純物に関しては、擬似抗原として免疫原性増強に関わる可能性が考えられる。不純物に対する免疫応答がインフュージョン反応につながる可能性もある。また、目的物質が酵素前駆体である場合に、すでに活性化されている分子種は目的物質由来不純物であり、その含

量は限度値を定めて管理する必要がある。

### (4) 混入汚染物質

動物あるいはヒト細胞を生産基材とするバイオ医薬品では、細胞基材に存在する可能性のある内在性ウイルスや非内在性ウイルス、あるいは培養中に混入・増殖する可能性が懸念される外来性ウイルス等の感染性物質が製品に混入し、感染症が伝播する可能性が否定できない。バイオ医薬品生産に用いられている多くの細胞で、レトロウイルスあるいはレトロウイルス様粒子が存在することが知られている。これまでにバイオ医薬品でウイルス感染事故が起こった例は報告されていないが、動物あるいはヒト細胞を生産基材とする場合には、感染性物質混入のリスクを考え、ウイルスの混入否定試験を実施するとともに、ウイルス除去不活化の対策を講じることが必須である。

### (5) 細胞の使用経験

バイオ医薬品製造には、大腸菌、酵母の他、CHO細胞やSP2/0細胞、NS0細胞等の動物細胞がよく用いられている。生産性の向上やコストダウンを目的に新たな細胞基材の開発が進んでいるが、使用経験の少ない細胞を用いる場合、内在性ウイルスに関する安全性や翻訳後修飾の点で未知の要素があることを念頭におくべきである。

### (6) 非臨床試験の妥当性

バイオ医薬品の作用は標的特異性が高いため、標的分子の構造がヒトと動物で異なる場合は動物を用いた有効性・安全性の評価が困難である。そのため、非臨床試験では適切な動物種の選択が重要であり、標的分子、標的分子の構造上のホモロジー、分布、情報伝達経路、薬理効果の性質を考慮して、利用可能な動物種を見極める必要がある。反応性がない、あるいは反応性がヒトと異なる動物を用いた試験では、ヒトで予想される薬理作用を検出することができない、薬物動態および薬力学の解析結果の誤った解釈につながる、毒性作用を見出すことができないといったリスクがある。治験薬の薬理作用および毒性作用の評価を通じて、利用可能な動物種/モデルの妥当性が疑わしいと考えられた場合は、非臨床結果から予測されない問題が生じるリスクが増すと考えるべきである。バイオ医薬品の非臨床試験については、ICH S6ガイドラインとその補遺が参考になる。

動物モデルの妥当性を示すためには、下記のような点

についてヒトとの比較を行うことが考えられる。

- ▶ 標的分子の発現, 分布, 一次構造
- ▶ 薬力学
  - ・結合と占有率, 細胞のシグナル伝達を含めた機能発現の結果
  - ・他の機能ドメインがある場合には, 動物におけるそのドメインの機能に関するデータ
- ▶ 代謝および排泄等の薬物動態
- ▶ ヒトと動物の組織を用いた交差反応試験(例: モノクローナル抗体)

### (7) 使用される治験薬の適格性

医薬品開発の際には, 開発の進展に伴い, 製造方法の変更がしばしば行われる。バイオ治験薬の製法変更前後での品質の同等性/同質性については, ICH Q5Eガイドラインに従って評価を行う必要があるが, 非臨床試験からヒト初回投与試験に移行する際に, 製法変更が行われ, 製品の品質に違いが生じた場合, 特に安全性に関して, 临床上, 悪影響がないことを十分に検証しなければならない。複雑な分子の場合は特に, 製法変更により, 恐らく特性解析では検出されないものの生物学的性質や臨床効果に影響し得るような微細な変化が有効成分に生じる可能性があるため, 注意が必要である。このような懸念が生じることを避けるため, 初期の臨床試験に用いられる治験薬は, 非臨床試験に用いられた治験薬と同じ製造方法のものにすべきである。治験薬の適格性を評価するために用いられる試験法の妥当性にも注意が必要である。

## 3. ヒト初回投与試験の実施に際してバイオ治験薬に求められる要件

バイオ治験薬の安全性に関して考慮すべき事項を踏まえ, これら既存の知識から考えられるリスクを低減するため, ヒト初回投与試験の実施に際して最低限必要と考えられる要件として, 次のようなものが考えられる。被験者の健康被害に直接つながるリスクを避けることが第一であり, 微生物の混入否定が求められる。また, アレルギー反応の原因となる可能性や, 有効成分の免疫原性を増強する可能性がある宿主細胞由来タンパク質等, 製造工程由来不純物の含量が一定レベル以下であることを確認する必要がある。製造工程に添加される原料で, 安全性への影響が懸念されるものがある場合は, その除去

状況の確認も必要である。さらに, 特性解析や非臨床試験結果等から設定された投与量が適切であり, 設定どおりの量(力価)が投与されることを担保する必要がある。

### (1) 微生物の混入否定

#### ① ウイルス安全性の確保

動物あるいはヒト細胞を生産宿主とする場合, ICH Q5Aガイドラインに準じたウイルス安全性確保のための対応が必須である。Q5Aではセル・バンクおよび未加工/未精製バルクにおけるウイルス試験, ならびに, 精製工程に関するウイルスクリアランス工程評価試験が求められているが, ヒト初回投与試験前においても必須と考えられるのは, マスター・セル・バンクおよび未加工/未精製バルクのウイルス試験であろう。マスター・セル・バンクに関しては, レトロウイルス試験(感染性試験, 電子顕微鏡観察, 逆転写酵素活性等), *in vitro*試験, *in vivo*試験, 抗体産生試験等が必要である。未加工/未精製バルクに関しては, *in vitro*スクリーニング試験やNAT法等の試験を用いる。

#### ② マイコプラズマ否定試験

マスター・セル・バンクを対象としたマイコプラズマ否定試験が必要である。日本薬局方参考情報20(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験)が参考になる。

### (2) 製造工程由来不純物の残存量評価

#### ① 宿主細胞由来タンパク質

宿主細胞由来タンパク質(HCP: Host cell protein)は安全性に影響する可能性のある製造工程由来不純物であるため, 治験に使用される製剤ロットあるいはその工程中間体での含量を測定する。通例, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)が用いられるが, 使用する抗HCP抗体について, 残存する可能性のあるHCPの種類と検出可能なHCPの種類に関する検討によりその適格性を評価しておくことが望ましい。許容されるHCP残存量に関する明確な基準はないが, 既承認バイオ医薬品に含まれる残存量を参考に1日投与量あたりのHCP量の基準を考えることも可能と考えられる。酵母を宿主とする場合は, アレルギー反応が生じた例も知られており, 宿主細胞に応じた検討が必要と考えられる。

②宿主細胞由来DNA

宿主細胞由来DNAは、宿主細胞が大腸菌の場合は免疫応答を惹起し、安全性に影響する可能性も否定できない。その他の場合も精製度の目安として、治験に使用される製剤ロットあるいはその工程中間体での含量を測定する必要があると考えられる。サザンハイブリダイゼーションや定量的PCRが用いられるが、使用するプローブやプライマーの妥当性を検証しておくべきである。DNAの混入量に関しては、投与量あたり10ngを上限とするという考え方がWHOから示されている<sup>8)</sup>。

(3) 投与量の適切性の評価

治験薬が目的とする生物活性を有することを確認し、生物学的性質の特性解析や非臨床試験結果をもとに算出された投与量が適切に投与されることを担保する必要がある。そのため、信頼性のある力価測定法を確立して、治験に使用される製剤ロットに設定どおりの力価の治験薬が含まれていることを示す必要がある。力価測定法は、有効性と関連のある作用機構を反映したものであることが望ましい。力価は標準物質との効力比をもとに算出されるため、標準物質の設定も必要である。投与量が重量表示される場合でも、力価は測定し、比活性を確認する。

<ヒト初回投与量の設定>

初回投与量の設定はヒト初回投与試験の被験者の安全確保において、重要な要素である。用量設定には利用可能なすべての情報を考慮し、ケースバイケースの原則に基づいて行わなければならない。一般には、最も感受性の高い適切な動物種を用いて実施された非臨床安全性試験により求められた最大無作用量No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)を、allometric factorまたは薬物動態学的解析に基づいて補正したものが、最も重要な情報となる。適切な投与量は、分子の特性や臨床試験のデザインに応じて、適切なsafety factorを用いてさらに補正することにより算出される。

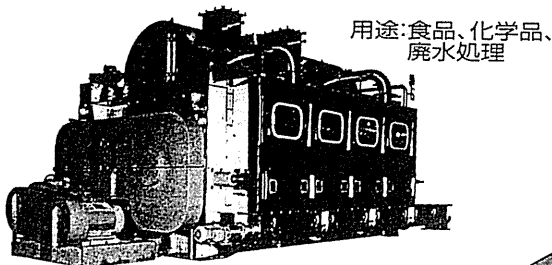
2. バイオ治験薬の安全性に関する概論(1)~(7)についてリスク要因があると考えられた治験薬では、用量設定のためにその他の方法を考慮すべきであり、MABEL (Minimal Anticipated Biological Effect Level: 推定最小薬理作用量)を用いる方法が推奨される。MABELは、ヒトで最小限度の生物学的影響が得られると予測される用量である。MABELの算出には、以下のような薬物動態/薬力学(PK/PD)データから利用可能なすべての*in vitro*および*in vivo*の情報を利用することができる。

# KATSURAGI

乾燥 冷却 濃縮  
蒸発 真空 廃水処理

## ドラムドライヤ (常圧式)

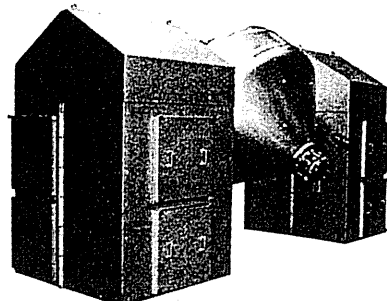
液状、スラリー状の原料を  
1パスで濃縮乾燥



用途:食品、化学品、  
廃水処理

## ダブルコーン ドライヤ

高真空、低温乾燥、GMP対応



▶テスト機を完備しております。お気軽にご相談下さい。◀

**K** カツラギ工業株式会社  
ホームページ <http://www.katsuragi.co.jp/>

本社 〒557-0063 大阪市西成区南津守5丁目4番6号  
TEL (06) 6659-2432 (代) FAX (06) 6658-3789



- i) ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における *in vitro*での標的分子との結合および占有率
- ii) ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における *in vitro*での用量反応曲線と、適切な動物種における *in vivo*での用量反応
- iii) 適切な動物種への薬理量の投与

ヒトで有害反応が生じる可能性をさらに限定するため、MABELからのヒト初回投与量算出には、safety factorが適用される場合もある。その際には、有効成分の新規性、生物活性、作用機構、種特異性の程度、用量反応曲線の形、MABEL算出の不確かさなどのリスク要因を考慮する。用いたsafety factorの妥当性を示す必要がある。使用した方法(例：NOAEL, MABEL)により算出されたヒト初回投与量が異なる場合は、正当性が示されない限り、最も低い用量を用いることが妥当と考えられる。

#### (4) 注射剤の製剤試験の実施

治験に用いられる製剤ロットに関して、一般的に注射剤に求められる試験が必要である。いずれも日本薬局方一般試験法を用いることができる。エンドトキシン試験(日本薬局方一般試験法<4.01>)、無菌試験法(日本薬局方一般試験法<4.06>)が必須である他、局方注射剤に求められている注射剤の不溶性異物検査(日本薬局方一般試験法<6.06>)、注射剤の不溶性微粒子試験(日本薬局方一般試験法<6.07>)に適合することは基本的な要件である。

### 4. 臨床試験開始から承認申請へ： 開発の進展に応じた治験薬の製造 と品質評価

治験薬の製造と品質評価には、開発段階に応じた対応が必要である。開発初期では製造工程に関する検討や理解が十分でなく、製造工程管理による品質の一定性確保が十分でないと考えられることから、治験薬の品質の確認のため、また治験薬の品質の一貫性を示すために、治験に使用されるロットの品質評価が特に重要である(図1)。製造されたロット数が限られている場合などでは品質試験(規格及び試験方法)を設定することができず、特性解析結果を確認しておくに留まる可能性もあるが、特性解析は、製品の特性に関する理解を深めるためのみならず、製法変更が行われた際に、変更前後での同等性/同質性

評価を適切に実施するためにも必要であるので、構造および物理的・化学的性質の解析も可能な限り開発初期から実施するべきである。一般に、第Ⅲ相試験の開始前までには承認時の製造方法と品質試験が定められている必要がある。

治験薬を評価する段階は、市販製剤の製造工程管理、品質管理を検討する段階でもある。重要品質特性(CQA: critical quality attribute)の確定を進め、工程管理に役立てることが有用であろう。原薬および製剤のCQAは、目標製品品質プロファイルやこれまでに得られた知識に基づいて得られ、製品および工程開発の指針として利用される。バイオ医薬品原薬のCQAに関する考え方を図2に示した。想定されるCQAは、バイオ医薬品の品質特性に関する従来の知識から考えることができるが、有効性・安全性に関連する生物活性、製造工程の影響を受けやすい構造および物理的・化学的性質、生物活性に影響する構造および物理的・化学的性質が、製品ごとに明らかにすべきCQAであると考えられる。

#### (1) 特性解析

##### ① 構造解析・構造確認

目的とする構造のタンパク質が得られていることを確認するため、アミノ酸配列を解析する。LC/MSを用いたペプチドマッピングが有用である。ペプチドマッピングは確認試験にも応用が可能であるため、開発初期であっても実施することが望ましい。分子内にCys残基を含む場合は、スルフヒドリル基およびジスルフィド結合を解析する。大腸菌のインクルージョンボディに目的タンパク質を発現させ、還元、再酸化のステップが含まれる製品では特に、目的とする位置にジスルフィド結合が存在することを確認する必要がある。目的物質が糖タンパク質である場合は、糖組成・糖鎖構造を明らかにする。糖鎖が有効成分の体内動態や生物活性に影響すると考えられる場合は、開発初期からロットごとのデータを蓄積し、製法と糖鎖構造、動態あるいは活性との関連を明らかにしていくことが管理戦略構築のためにも有用である。

##### ② 物理的・化学的性質

分子量・分子サイズ、アイソフォームパターン、電気泳動パターン、液体クロマトグラフィーパターン、および、分光学的性質(紫外可視吸収スペクトル、円偏光二色性、核磁気共鳴)等を必要に応じて解析する。製造工程による変動が大きい品質特性や、生物活性との関連の

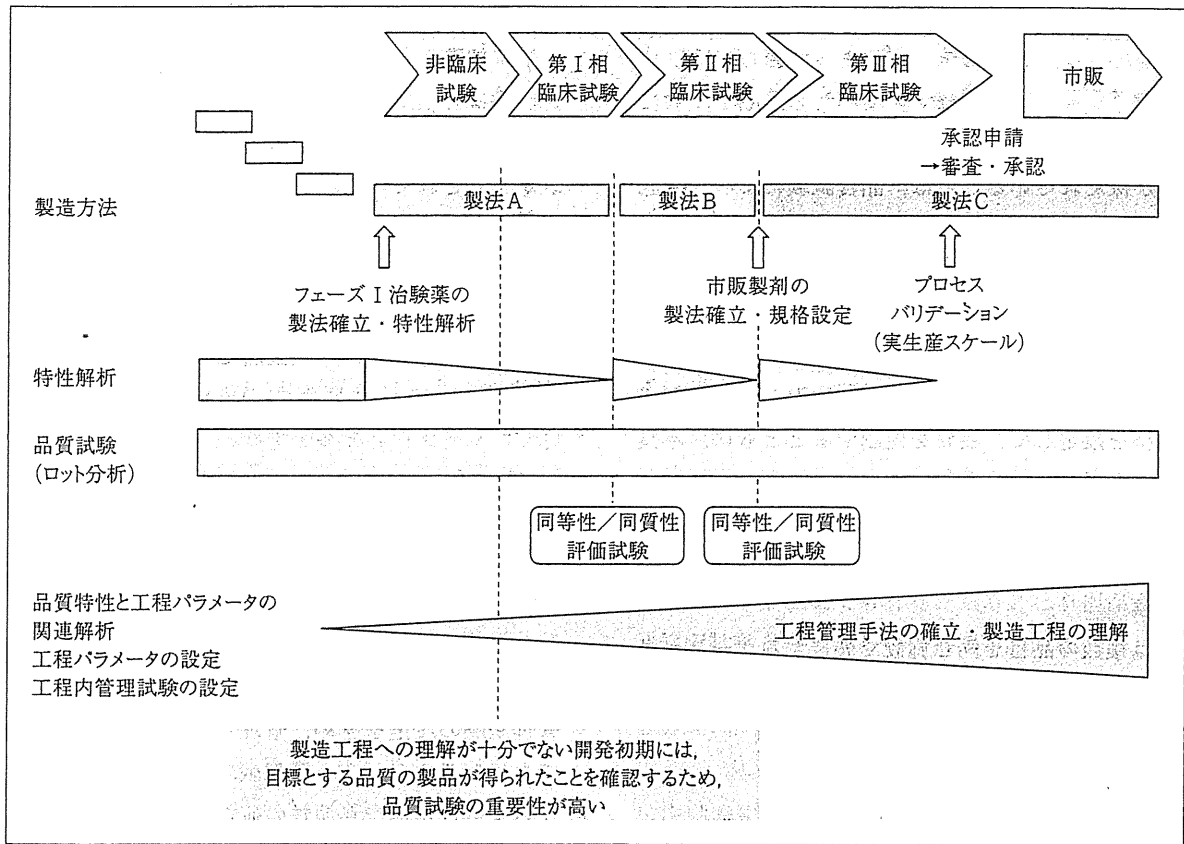


図1 バイオ治験薬の製造方法および品質試験法の開発

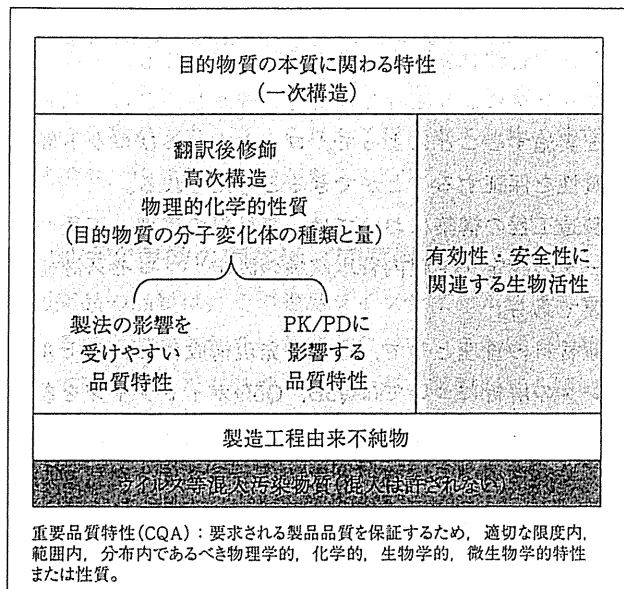


図2 バイオ医薬品原薬の重要品質特性

ある品質特性は、CQAであると考えられる。

③生物学的性質

生物活性の定性的、定量的評価は、作用機構の解析や臨床投与量の検討のために重要である。定性的評価とし

ては、特異的な標的および標的外分子に対して生じる医薬品の作用の性質(影響の及ぶ範囲、増幅性、持続性、可逆性)、さらにその下流の反応機構が含まれる。

定量的評価としては、用量反応曲線のタイプと傾き、すなわち、考えられる濃度の範囲で直線性が成り立つか、あるいは、非直線性か(最大効果でプラトーとなる、濃度変化以上に反応の変化が大きい、U型、ベル型)、といった特徴が重要である。

④不純物

製造工程由来不純物として、宿主細胞由来タンパク質、DNA、培地成分、クロマトグラフィー用樹脂からの浸出物などの残存量を評価する。宿主細胞由来タンパク質は、製品の免疫原性に影響するため、十分に低減化されていることを評価する必要がある。

目的物質由来不純物としては、切断体、脱アミド体、異性体、ジスルフィド結合ミスマッチ体、酸化体、凝集体等がある。脱アミド体は活性に影響がない場合もあり、その場合は目的物質関連物質である。

## (2) 品質試験(規格及び試験方法)

開発初期には、工程管理手法が定まっておらず、プロセスバリデーションも行われていないため、品質試験による品質の確認が重要である。ロット内およびロット間の均質性が保たれていることは、品質試験によって確認することができる。承認申請時の規格及び試験方法は、ロット分析結果、安定性試験結果、非臨床試験および臨床試験のデータ等を考慮して設定する必要があるが、治験段階ではこれらのデータがそろっていない。したがって、その時点までに得られているデータから妥当と考えられる規格を設定して、品質を確認するとともに、不良ロットの検出に努めるべきである。

### ①原薬の品質試験

#### ・確認試験

治験薬は複数の品目を同じ施設で製造するケースが多いと考えられるため、確認試験の実施が推奨される。ペプチドマッピングが望ましい。

#### ・純度試験

安全性に影響すると考えられる不純物(宿主細胞由来タンパク質等)については、開発初期であっても規格を設定する必要がある。製造工程の中間体を試料とするほうが妥当なケースもあり、その場合は工程内管理試験として設定する。凝集体は抗体産生を誘導する可能性があるため、限度値を定めて含量を管理すべきである。

#### ・糖鎖試験

特性解析において、糖鎖構造が体内動態や生物活性に影響するという知見が得られている場合は特に、糖鎖試験を設定する必要がある。

#### ・力価試験

定められた量の治験薬を確実に投与するためには、製品の力価を測定する方法の妥当性が問われる。測定系が適格でない場合や、測定系の信頼性が十分検証されていない場合は、非臨床試験で用いられた用量が正確でなく、安全な用量に関して誤った解釈がなされてしまう可能性がある。また、力価の測定には、開発の早い段階から標準物質を整備することが重要である。

### ②製剤の品質試験

#### ・無菌性試験

バイオ治験薬はほとんどが注射剤であるので、開発初期においても無菌性試験は必須である。

#### ・エンドトキシン試験

無菌性試験と同様、開発初期においてもエンドトキシン試験は必須である。大腸菌を宿主とする製品で、工程内管理試験あるいは原薬の試験としてエンドトキシン試験が実施されている場合でも、製剤中のエンドトキシン残存量の測定が必要である。

### ③安定性試験

規格及び試験方法として設定された試験法を用い、実保存条件での治験期間中の安定性を担保する。ICH Q5Cガイドラインを参照する。

## (3) 製法開発, 工程管理手法の構築

医薬品の品質は、製品になってから検証するものではなく、製品設計によって製品に組み込まれていることが望ましい。品質特性(特にCQA)と製造工程の関連を解析して工程の理解を深め、重要工程パラメータや工程内管理試験の設定を含め、管理手法を確立することが有用であると考えられる。管理戦略の構築においては、ウイルス安全性確保や無菌性の確保といった被験者の健康被害防止に直接つながる事項を最優先としつつ、宿主細胞由来タンパク質等の不純物の低減を図ることが合理的である。

工程内管理試験が未整備の段階であっても、工程のモニタリングにより工程の適切性を確認し、さらに品質試験を実施することによって、ロット内およびロット間の均質性を保証することができると考えられる。

製造工程の構築においては、原材料の管理、工程パラメータの設定、工程内管理試験の設定、プロセス評価が必要である。

原材料の管理として、遺伝子発現構成体およびセル・バンクの解析についてはQ5B、Q5Dガイドラインを参照し、出発原料であるセル・バンクの管理を適切に実施する。培養に用いる細胞の世代数については、開発初期には規定されていなくても差し支えないであろう。動物細胞あるいはヒト細胞を細胞基材とする場合は、治験開始前にセル・バンクのウイルス試験が必須である。精製工程に関するウイルスクリアランス工程評価試験も実施すべきであるが、セル・バンクのウイルス試験のほうが重要度は高いと考えられる。ウイルス安全性評価はQ5Aガイドラインに従って実施する。ヒトあるいは動物細胞を用いて製造されるバイオ治験薬の安全性確保において、ウイルス安全性評価が必須である一方で、製造工程の検