

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）
平成24年度分担研究報告書

－先端バイオ医薬品規制に関する研究－

研究分担者：内田恵理子（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第一室長）

研究要旨

先端バイオ医薬品規制に関する研究として、遺伝子工学技術を用いたがん免疫療法用製品、特に遺伝子改変細胞を用いたがん免疫療法を中心に、その開発と規制の国際動向を調査した。がん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞製品は、治療用がんワクチンとして用いられる遺伝子改変がん細胞や樹状細胞と、養子免疫療法に用いられる遺伝子改変T細胞に大別される。規制の現状としては、遺伝子改変細胞は遺伝子治療薬と細胞治療薬の両指針を考慮する必要があるとあり、使用するウイルスベクターによっては個別指針も参照する必要がある。欧州には遺伝子改変細胞に特化した指針があるが、遺伝子改変細胞の安全性確保において最も懸念される造腫瘍性や遺伝子の挿入変異によるがん化の問題は、がん免疫療法に用いる製品の場合、対象疾患や用いる細胞を考慮すると必ずしも必要ではない。また、一般的な遺伝子改変細胞では有害事象となりうる免疫応答の惹起を目的とする製品であることなどを含め、その品質、安全性確保には、がん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞製品に特有の性質を考慮することが重要であると考えられる。

キーワード：がん免疫療法、遺伝子改変細胞、遺伝子治療

A. 研究目的

本研究は、遺伝子治療薬や細胞治療薬等の先端バイオ医薬品の品質、有効性、安全性確保のための規制の国際調和の推進に関わる研究を行うことを目的としている。

遺伝子治療薬や細胞治療薬の対象疾患として、がんは最も大きなターゲットであり、遺伝子治療薬では臨床プロトコルの7割近くががんを対象としたものである。がんの遺伝子治療法としては、自殺遺伝子治療やがん抑制遺伝子を用いる方法など様々な方法が試みられているが、特に生体内のがん免疫の活性化による治療を目指すがん免疫療法は、様々な導入遺伝子、様々なベクターを用いて実施されてきており、後期臨床試験が実施されている製品も複数存在する。また、遺伝子改変したT細胞を用いる遺伝子治療も近年増加している。一方、細胞治療薬で

は、Sipleucel-T（商品名Provence）という樹状細胞製品が、ホルモン抵抗性前立腺がんに対するがんワクチンとして2010年に初めて米国で承認されており、がん免疫療法はすでに実用化段階に入っている。

がん免疫療法、治療用がんワクチンの開発は、上記の例の他にも、ペプチドワクチンを中心に近年非常に活発化しているが、従来の抗がん剤やバイオ医薬品とは異なる作用機序を持つものであり、品質、有効性、安全性確保には従来の医薬品とは異なる視点が必要であり、またこれら医薬品の開発・実用化の促進には規制の国際調和が必要である。

そこで、今年度は、遺伝子工学技術を用いたがん免疫療法用製品、特にがん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞製品を中心に、国内外の開発動向と規制状況を調査した。

B. 研究方法

製品の開発動向は米国国立衛生研究所（NIH）の治験データバンクClinicalTrials.govに登録されている治験プロトコールを中心に、関連する書籍や論文等を調査・分析した。また製品の規制動向は、米国食品医薬品局（FDA）および欧州医薬品庁（EMA）のHP情報を中心に調査した。

（倫理面への配慮）

本研究は調査研究であり、倫理面への配慮が必要な試料・資料の取り扱いはない。

C. 研究結果及び考察

1. 遺伝子工学を利用したがん免疫療法用製品の開発動向

1.1 がん免疫療法用製品の種類と特徴

がん免疫療法は能動免疫療法と受動免疫療法に大別される（表1）。能動免疫療法は、宿主の樹状細胞による抗原提示能や、液性免疫、細胞性免疫を活性化して宿主の抗腫瘍免疫を誘導する方法で、いわゆる治療用がんワクチンと呼ばれるペプチドワクチンや、DNAワクチン、組換えウイルスや細胞など、多種多様な剤形が用いられている（図1）。一方、受動免疫療法は、それ自体が直接、抗腫瘍免疫能を持つ細胞や抗体を投与する方法で、細胞性免疫の中心的

表1 がん免疫療法用製品の分類

<p>能動免疫（宿主の抗腫瘍免疫を誘導）</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 治療用がんワクチン <ul style="list-style-type: none"> ➢ ペプチド ➢ タンパク質・抗体 ➢ <u>DNA（プラスミド）</u> ➢ <u>組換えウイルス・細菌ベクター</u> ➢ 細胞（がん細胞、樹状細胞、<u>遺伝子改変細胞</u>）
<p>受動免疫（直接作用）</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 養子免疫細胞療法（T細胞療法） <ul style="list-style-type: none"> ➢ 活性化T細胞 ➢ <u>遺伝子改変T細胞</u> ● 抗腫瘍抗体

下線は遺伝子工学技術を用いたもの

役割を担うがん細胞特異的CTLを体外で活性化したり、遺伝子導入により作製して投与する養子免疫細胞療法や、液性免疫を担う抗腫瘍抗体を直接投与する方法などがこれに該当する。

この中で、遺伝子工学技術、遺伝子治療技術を用いたものとしては、能動免疫療法に用いられるDNA（プラスミド）ワクチン、組換えウイルス・細菌ベクターワクチン、遺伝子改変細胞ワクチンと、受動免疫療法に用いられる遺伝子改変T細胞が該当する。

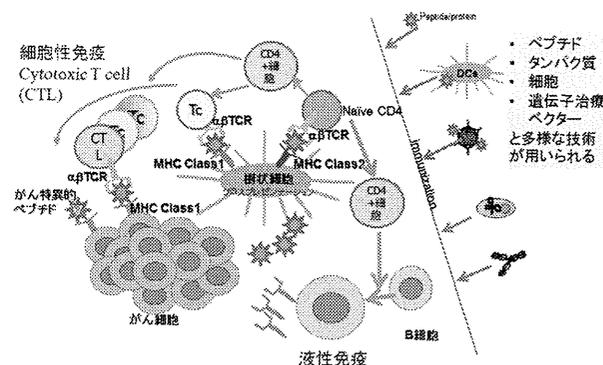


図1 治療用がんワクチン
がん免疫の増強による抗腫瘍効果

1.2 治療用がんワクチンの開発動向

治療用がんワクチンは、大きく分けてがんペプチドワクチンと呼ばれる9-10アミノ酸からなるがん細胞（がん抗原）特異的ペプチドやタンパク質からなるもの、樹状細胞やがん細胞などの細胞治療薬に該当するもの、プラスミド（DNAワクチン）やウイルスベクター、遺伝子改変細胞など遺伝子治療に該当するものに分類される。治療用がんワクチンについて、NIHの治験登録を検索した結果、1067プロトコールがヒットした。プロトコールの詳細を検討し、分野別に示したものが図2である。樹状細胞やがん細胞を含めた細胞治療薬が最も多く、次いでペプチドワクチンのプロトコールが多いが、遺伝子治療薬に該当するものやDNAワクチンも一定数存在する。

遺伝子工学を利用したがんワクチンに絞ってさらに詳細に検討した（図3）。治験プロトコール総数273件中、組換えウイルスを用いたプロトコールが77件と最も多い。これは複数回の免疫を行う際、異なる種類のウイルスを投与するものが含まれる。vaccinia

virus48件、fowlpox virus38件など、一過性に増殖能と強い抗原性を持つウイルスがウイルスワクチンとしてよく使われている。DNA（プラスミド）と遺伝子組換え細胞はいずれも30件以上の治験が登録されている。遺伝子組換え細菌を用いたプロトコールも1件登録されている。

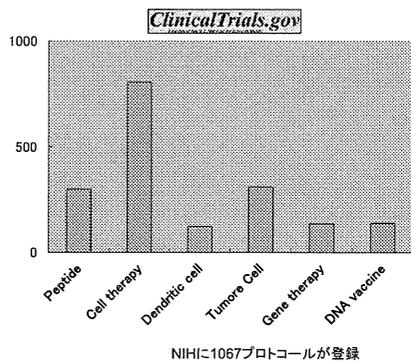


図2 治療用がんワクチンのProtocol数

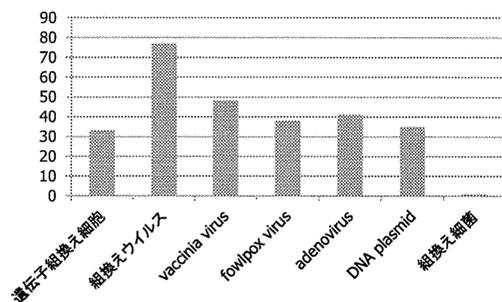


図3 遺伝子工学を利用したがんワクチンのProtocol数 (ClinicalTrials.gov)

1.3 治療用がんワクチンとしての遺伝子改変細胞の開発動向

治療用がんワクチンとして用いられている遺伝子改変細胞について、さらに詳細に開発動向を分析した(図4)。用いられている細胞の種類としては、がん細胞と樹状細胞(DC)に大別される。

遺伝子改変がん細胞は、がん抗原を発現しているがん細胞にさらに宿主の免疫活性化に関与するサイトカインなどの遺伝子を導入し、がん抗原に対する抗腫瘍免疫をより強力に誘導しようとするものである。がん細胞は、放射線照射等の処理を行い、遺伝子発現は起こるが、生体内での増殖性を持たない細胞が用いられる。

がん細胞に対する導入遺伝子としては、顆粒球コ

ロニー刺激因子GM-CSFが最も多く11件で用いられており、次いでIL-2が10件、CD40Lが5件であった。GM-CSFは、抗原提示細胞、特に樹状細胞に作用してその抗原提示能を増強し、最終的にCD8+細胞障害性T細胞(CTL)を介して宿主の抗腫瘍免疫能を増強する作用があることから導入遺伝子として頻用されている。GM-CSF遺伝子は単独で導入されている例が多いが、抗原提示細胞の活性化に作用するCD40リガンド(CD40L)遺伝子や、TGF-β2アンチセンス遺伝子と共導入される例もある。一方、細胞性免疫を活性化させるIL-2遺伝子は、CD40LやLymphotoxin遺伝子と組み合わせて導入されている。

がん細胞の種類としては、同種がん細胞株を用いた例が15件、自己がん細胞を用いた例が11件である。医薬品としての開発が進めやすい同種がん細胞の開発が多く行われているが、自己がん細胞と比較して特異性が低い可能性がある。同種がん細胞株では、複数の細胞株を混合して用いることも行われている。自己がん細胞を遺伝子改変して用いるプロトコールはかなり以前から行われており、日本でも、患者の自己腎がん細胞を取り出してレトロウイルスベクターによりGM-CSF遺伝子を導入後、放射線照射により増殖能を消失させてから患者に戻すという遺伝子治療臨床研究が1998年に承認され、東京大学医科学研究所で実施された。

がん細胞を用いた治療用がんワクチンとして、現在、最も開発段階が進んでいるものとしては、NovaRx社が開発中のBelagenpumatucel-L(商品名Lucanix)が挙げられる。Belagenpumatucel-Lは、4種類の同種由来非小細胞肺癌(NSCLC)細胞株にTGF-β2のアンチセンス遺伝子をプラスミドとして細胞に導入したものである。TGF-β2はがん細胞から分泌される免疫抑制性サイトカインであり、樹状細胞のT細胞活性化能やサイトカイン産生、細胞障害活性の抑制、制御性T細胞や制御性DCなどの免疫抑制性細胞の誘導を通じて、がん細胞を宿主免疫系から防御する働きがある。Belagenpumatucel-LはTGF-β2のアンチセンスを発現することにより、TGF-β2の発現を抑制し、がん抗原を宿主免疫系に暴露する作用を期待したものである。非小細胞肺癌

を適応症としてPhase III試験が行われている。

一方、樹状細胞は、取り込んだ細胞を免疫担当細胞に提示する能力を持つ抗原提示細胞のなかでも最も強力な細胞であり、がん免疫療法では様々な方法でがん抗原を提示させて用いられている。遺伝子改変細胞としては、がん抗原等の遺伝子を導入した自己樹状細胞が用いられる。ClinicalTrials.govの登録内容を分析すると、抗原遺伝子としてケモカインリガンドCCL21、がん抑制遺伝子p53、腫瘍マーカーのCEAを用いたものが各2件、EBウイルスの潜伏感染膜蛋白LMP1/2が1件であった。細胞への遺伝子導入には一過性に強力に遺伝子発現を行うアデノウイルスベクターやfowlpox virusがよく用いられている。

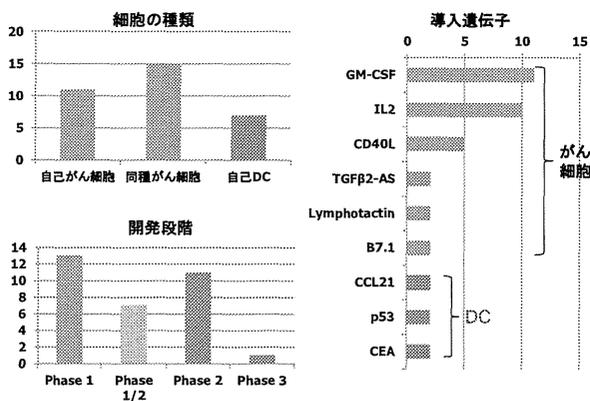


図4 がんワクチンとしての遺伝子改変細胞 (ClinicalTrials.gov)

1.4 がんの遺伝子改変T細胞療法の開発動向

遺伝子改変T細胞療法とは、遺伝子導入により、T細胞を抗腫瘍免疫の主役であるがん細胞特異的細胞障害性T細胞(CTL)に改変して投与する方法であり、遺伝子治療の分野では最近、非常に多くのプロトコールが実施されている。導入遺伝子としては、T細胞受容体(T cell receptor: TCR)遺伝子を用いる方法とキメラ抗原受容体(Chimeric antigen receptor: CAR)遺伝子を用いる方法に大別される(図5)。

2006年, 2009年のICH FDA update

がん抗原を認識するT細胞受容体遺伝子や、キメラ受容体遺伝子を導入した自己T細胞を用いる養子免疫遺伝子治療が増加

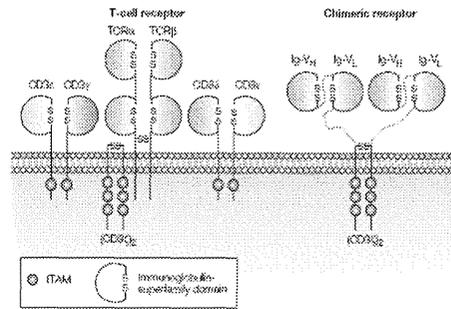
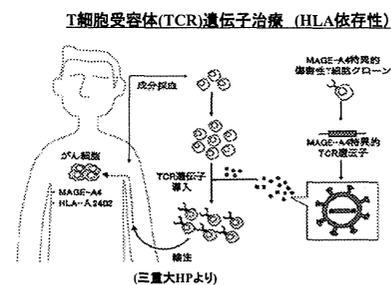


図5 遺伝子改変T細胞療法

TCRを用いる方法は、がん抗原特異的T細胞から得たTCR遺伝子を患者から取り出した自己T細胞に導入する方法であるが、がん細胞の認識・T細胞活性化はHLAに依存する(図5、6)。現在日本では、がん抗原のMAGE-A4特異的TCR遺伝子を導入したT細胞を用いる遺伝子治療臨床研究が三重大大学により実施されている。T細胞への遺伝子導入はレトロウイルスベクターが用いられている。なお、TCRはTCRα鎖、TCRβ鎖の2本鎖から構成されているが、発現されたα鎖、β鎖と内在性のTCRとのミスペアリングにより、目的とするCTLが得られる効率が低くなる可能性がある。そこで、三重大では、がん抗原のWT1特異的TCR遺伝子の他に、内在性TCRとのミスペアリングを防ぐため、内在性TCRを阻害するsiRNAを発現する遺伝子をT細胞に導入する遺伝子治療臨床研究を多施設共同研究として計画している。



三重大:

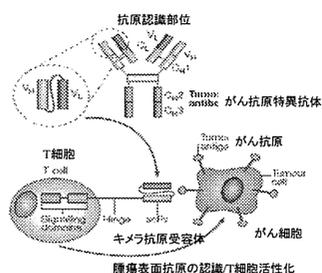
- MAGE-A4特異的TCR遺伝子を導入したT細胞を用いる遺伝子治療について、臨床研究実施中
- 内在性TCRと導入TCRとのミスペアリングを防ぐため、TCRに対するsiRNAとWT1特異的TCR遺伝子を導入したT細胞を用いる遺伝子治療臨床研究を申請中

図6 遺伝子改変T細胞療法: TCR

一方、CARは、がん抗原特異的抗体の抗原認識部

位を含む単鎖抗体と、T細胞受容体の細胞内シグナル伝達部位とのキメラ遺伝子を自己T細胞に導入する方法で、T-bodyとも呼ばれる(図5、7)。TCRを用いる方法と異なり、HLA非依存的にがん抗原を認識してT細胞が活性化する(図7)。CARを用いる遺伝子治療では、CD19を認識するCAR遺伝子を、レンチウイルスベクターを用いて導入したT細胞を用いた慢性リンパ性白血病の遺伝子治療臨床試験が実施され、3名中2名が完全寛解という、がんの遺伝子治療としては初めての有望な成果が報告されている(Kalos M et al: Sci. Transl. Med., 3, 95, 2011)。このCARを用いる遺伝子改変T細胞療法は、大手製薬企業のNovartis社が開発を進めることを2012年に発表しており、医薬品としての実用化も期待される。

キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子治療 (HLAの型に依存しない)



CD19を認識するCAR遺伝子導入T細胞を用いた慢性リンパ性白血病遺伝子治療により3名中2名が完全寛解(Sci. Transl. Med 3, 95, 2011)

図7 遺伝子改変T細胞療法: CAR (T-body)

遺伝子改変T細胞療法について、ClinicalTrials.govに登録されている治験を調査した(図8)。全部で42件登録されているうち、TCRは13件、CARが29件とCARがTCRの倍以上多いという結果であった。CTLの標的抗原としては、これまでに有望な成果が報告されているB細胞抗原のCD19を用いたものが最も多い。次いで黒色腫のMART1、乳がんのHER2など、多様な抗原が用いられており、さまざまながんに対して遺伝子改変T細胞療法が試みられていることが明らかになった。遺伝子導入に用いられるベクターはClinicalTrials.govの資料では明記されていない場合も多いが、有効な治療には体内に投与したT細胞での持続発現が必要となることから、染色体組込み型のレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが用いられている。

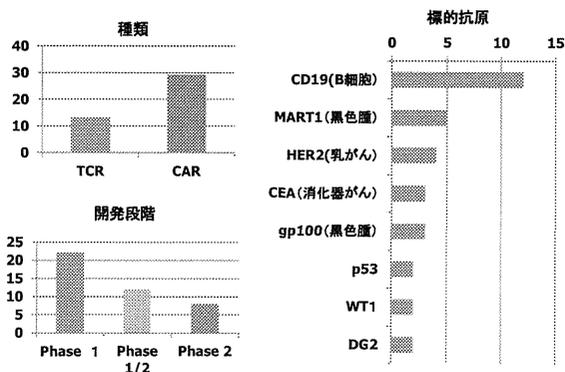


図8 遺伝子改変T細胞療法 (ClinicalTrials.gov)

2. 遺伝子工学を利用したがん免疫療法用製品に関する規制・指針の国際動向

2.1 指針の作成状況

遺伝子工学を利用したがん免疫療法用製品に関係する規制・指針について調査を行った(表2)。がん免疫療法用製品や治療用がんワクチンに特化した規制・指針は日本には存在しないが、米国には治療用がんワクチンに関する指針が、また欧州にはがん免疫療法用細胞製品の力価試験に関する指針が存在する。

一方、がん免疫療法用製品のなかでも、本研究で対象としている遺伝子工学を利用したものについては、遺伝子治療薬に関する指針を参照する必要がある。日本では「遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する指針」が対象となる。欧米には遺伝子治療薬全般に関する指針の他に、遺伝子治療薬の初回投与のための非臨床試験に関するガイダンスや、遺伝子治療用ウイルスベクターの種類別の指針も発出されており、使用するベクターによっては個別指針の参照が必要となる。なお、日本ではウイルスベクターを用いた製品の臨床使用は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)の第一種使用となることに注意が必要である。

また、EMAには遺伝子改変細胞に特化した指針が作成されており、がん免疫療法用細胞製品の場合は、本指針も参考になる。

表2 遺伝子工学を利用したがん免疫療法用製品に関する指針等

対象製品	日本	米国FDA	欧州EMA
治療用がんワクチン	なし	Guidance for Industry : Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines (2011)	Potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer (2008)
遺伝子治療用製品	遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する指針 (1995. 2002、2004一部改正)	Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy(1998) Guidance for Industry: Gene Therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse Events (2006)	Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products(2001) Follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products (2009) Non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (2008)
遺伝子治療用ウイルスベクター	「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)	Guidance for Industry: Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors (2006)	Development and Manufacture of Lentiviral Vectors (2005) ICH Considerations - Oncolytic Viruses (2009) Quality, non-clinical and clinical issues relating specifically to recombinant adeno-associated viral vectors (2009)
細胞治療用製品	ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(2008) ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(2008)	Guidance for FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)(2008)	Guideline on human cell-based medicinal products(2008)
遺伝子改変細胞	なし	なし	Quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (2012)

2.2 がん免疫療法用製品に関する指針

がん免疫療法用製品に関する欧米の指針について検討した。米国には、治療用がんワクチンに関する指針として、“Guidance for Industry: Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines”がFDAにより2011年に公表されている。この指針は、治療用がんワクチンのIND申請を行う開発者に対して、

これらの製品の治験において推奨する臨床的な考慮点、臨床試験デザインや初期臨床試験、後期臨床試験で考慮すべき事項について示したものである。がんワクチンは、抗原特異的なT細胞応答、特にCTLの応答の増幅を介してその薬効を発揮すると考えられているが、抗原提示及びそのプロセッシング、リンパ球の活性化を経て腫瘍細胞死に至る過程には、

生体内でかなりの時間を要する。また、免疫システムに影響する複数の治療を受けている可能性がある。したがって、がんワクチンの開発には、従来のバイオ医薬品や抗がん剤とは異なる新たな視点が必要となる。また、臨床の評価には、抗腫瘍効果に直接関連すると考えられる免疫応答を測定するためのアッセイ系の開発やバイオマーカーの開発が重要となる。本指針の項目・ポイントを表3に示す。本指針は、治療用がんワクチンの種類によらず考慮すべき点を示しており、遺伝子工学を利用したがん免疫療法用製品の場合も、その臨床試験デザインを考えるのに有用である。

表3 Guidance for Industry: Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines (FDA, 2011) の項目

A. 臨床試験デザインの考慮事項	
1. 患者の選択	
a. 適用症の設定	
b. 患者集団での腫瘍の不均一性	
c. がんワクチンと目的抗原のアッセイ系の同時開発	
2. 免疫応答性のモニタリング	
3. 有効性の指標としてのバイオマーカー	
4. 免疫反応を促進するために用いられるアジュバント	
5. 複数の抗原ワクチン	
6. がんワクチン投与直後や短期間のうちに起るがんの進行や再発	
7. 併用療法、投与後のがん治療	
B. 初期臨床試験の考慮事項	
1. 治験開始投与量と投与スケジュール	
2. 追加免疫と維持療法	
3. 投与量の選択	
4. 開発初期における単群試験とランダム化第2相試験	
C. 後期臨床試験の考慮事項	
1. 初期臨床試験の安全性プロファイル	
2. エンドポイント	
3. 統計的課題	
4. コントロール群	
5. 遅発性のワクチン効果	
6. 自己由来ワクチン製品	
7. 迅速承認制度	

一方、欧州ではEMAより、“Potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer” が2008年に公表されている。この指針は、がん免疫療法に用いるがん細胞や樹状細胞、養子免疫細胞治療に用いるCTLを含む細胞製品の力価試験に関する指針である。化学的処理を行った細胞や遺伝子改変細胞も対象としている。力価試験は特性解析、製造工程のバリデーション、バッチ間の一貫性確認、安定性試験など様々な活用されるため、生物学的効果と関連する適切な力価試験を可能な限り早く確立することが望ましいこと、また、抗腫瘍免疫では細胞性免疫が中心的な役割を果たすことから、細胞性免疫、CTL活性を測定可能な力価試験の設定を考慮することが重要である。その他、細胞性免疫制御製品の力価試験に関するポイントを表4にまとめた。本指針は、がん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞も対象としており、力価試験の設定では本指針が有用である。

表4 Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer (EMA, 2007) の概要

項目	要点
<i>in vivo</i> (動物) 力価試験	適切な動物モデル、ヒトMHC発現トランスジェニック動物、免疫不全動物の利用が有用である可能性
<i>in vitro</i> 力価試験	細胞レベルでの生物応答の直接試験: 標的細胞のCTLによる溶解、細胞応答によるサイトカイン産生等 代替試験: 細胞表面マーカー、活性マーカー、遺伝子発現の測定等
生細胞数の計測	細胞の生存率は力価の重要なパラメーターとなるが、バイオアッセイで得られる生物活性や抗原発現量との相関が必要
自己細胞製品	製品の変動が多く、力価試験のバリデーションが困難
参照品の調製	力価の測定には力価の定まった参照品が必要 <i>in house</i> の参照品は組成、純度、生物活性等の特性解析が重要
アジュバント含有製品	アジュバントは力価試験を妨害する可能性があり、注意が必要

2.3 遺伝子改変細胞に関するEMAの指針

EMAには遺伝子改変細胞を用いた製品に特化した指針として、“Quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells” が 2012年に発出されている。この指針は、遺伝子改変細胞の承認申請時における品質、有効性、安全性の要件を示したものである。表5に項目を示すとともに、以下にその要点を抜粋した。

表5 Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA, 2012) の項目

品質
1. 原材料（出発原料、その他の原材料）
2. 製造工程（細胞調製、遺伝子導入、他の工程、工程管理）
3. 特性解析（同一性、純度、力価）
4. 品質管理
5. 安定性試験
非臨床
1. 薬力学、薬物動態試験（体内動態、ホーミング、細胞の生存期間）
2. 毒性試験（挿入変異による癌化）
臨床
⑤ 投与量選択
⑥ 薬力学
⑦ 薬物動態
⑧ 臨床有効性
⑨ 臨床安全性
⑩ フォローアップ
医薬品安全性監視
環境リスク評価

2.3.1 品質

1) 原材料

① 出発原料

遺伝子改変細胞の出発原料はベクターと細胞であり、ベクターは遺伝子治療薬の指針に準じ、細胞は細胞治療薬の指針に準じることになる。組込み型ベクターでは自己不活化（SIN）ベクターのように挿

入変異のリスクを低減させ、安全性を高めたデザインが望ましい。レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターを産生細胞から一過性発現させる場合は、導入するプラスミドの塩基配列の検証が必要である。遺伝子改変が一過性で最終細胞製品では外来遺伝子が含まれないなどの妥当性がない限り、既知のがん遺伝子の使用は避けること。ベクターにヘルパーウイルスや外来ウイルスの混入、増殖性ウイルスの混入がないことを示すこと。未精製のベクターの使用は可能な限り避けること。

② その他の原材料、試薬、添加物

無菌試験、感染性物質否定試験、エンドトキシン試験を含む品質試験が必要。ウイルス安全性、TSEリスクの低減を考慮すること。ベータラクタム系抗生物質の使用を避けること。

2) 製造工程

① 細胞調製と培養

培養条件の変動は細胞が変化する可能性があるのを避けること。

② 遺伝子導入

遺伝子導入は動的工程であるが、そのコントロールが重要である。遺伝子導入効率は細胞の性質、培養段階、生存率、ベクターや細胞の種類、培地組成により変化するため、方法の詳細を示す必要がある。挿入型ベクター（レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター）を用いる場合は、遺伝子導入試験と臨床試験で有効性を示す中で最も低い感染重複度（MOI）とすべきである。

③ 以後の製造工程

遺伝子導入後の細胞は、通常、最終処方までにさらに選別や培養など数工程を経る。保存可能な遺伝子導入細胞はセルバンクシステムを樹立して管理すべきである。

一過性の遺伝子改変で、最終製品を得るのに遺伝子改変に用いた遺伝物質を除去する場合、用いた方法を示すと同時に、外来配列の除去を示すための適切なコントロールを用いること。

④ 工程内管理

重要な中間段階で、導入遺伝子やマイコプラズマ、細胞形態などのパラメーターの測定により、工程管理を実施すること。

⑤プロセスバリデーション

以下の点について示すこと：感染性物質・増殖性ベクター・トランスポザーゼ配列（トランスポゾンを用いた場合）の否定、細胞からのベクターの遊離、導入効率、ベクターコピー数、導入遺伝子配列とその他の配列、遺伝子発現レベル、発現分子の品質、一過性遺伝子発現の場合は目的配列の除去。

3) 特性解析

以下の特性について明らかにすること。

- ・細胞の同定と生存率
- ・導入遺伝子の配列
- ・ベクターの同定
- ・細胞あたりの遺伝子コピー数
- ・ベクターの組み込みプロファイル（既知のがん遺伝子・がん抑制遺伝子との関係）
- ・遺伝子導入効率（遺伝子導入細胞の割合）
- ・ベクター・導入遺伝子の除去（妥当な場合）
- ・遺伝子発現産物の同定と活性
- ・細胞の表現型・形態
- ・細胞集団の均一性（サブポピュレーションの割合）
- ・遺伝子改変細胞の増殖性と分化能
- ・ベクターの細胞からの遊離
- ・ベクターの増殖能と再活性化の可能性
- ・*in vitro*での細胞の増殖や分化による遺伝的安定性
- ・遺伝子導入による標的細胞への免疫原性の向上（がん免疫療法）

①同一性

同一性試験では、目的の遺伝子改変を検出し、細胞集団に特異的なアッセイを用いること。

②純度

純度は導入効率、遺伝子導入細胞の割合と関連する。非増殖性レンチウイルスベクターやレトロウイルスベクターを用いた場合、増殖性ウイルス否定試験の実施は必須である。

③力価

力価試験は生物学的試験を実施すること。

4) 品質管理

無菌性、エンドトキシン等の一般的な試験に加え、出荷試験として同一性、純度、力価、不純物、細胞生存率、細胞数・投与量、遺伝子導入細胞の比率、細胞あたりのベクター・プラスミドコピー数、増殖性ウイルス否定試験が必要である。

5) 安定性試験

細胞製品の安定性試験に準じる。

2.3.2 非臨床試験

細胞治療指針、遺伝子治療指針、遺伝子治療のヒト初回投与のための非臨床試験ガイダンスを参照すること。

1) 薬力学、薬物動態試験

薬力学試験での考慮事項

- ・遺伝子改変により得られる効果（細胞の分化・増殖や機能回復等）
- ・遺伝子産物の発現量、発現制御、局在、発現期間、構造の完全性
- ・細胞内でのベクターの存在状態（エピソーマルか染色体組込か）
- ・目的とする組織・臓器での治療効果、局在と限界（有効性、安全性）
- ・周辺組織との相互作用の可能性（自殺遺伝子による周辺細胞へのバイスタンダー効果等）
- ・発現消失の可能性

薬物動態試験での考慮事項

- ・導入遺伝子産物の発現と分布、持続性
- ・遺伝子改変細胞の*in vivo*での運命（生体内分布、ホーミング、生存期間）
- ・生殖組織へのベクターの組込リスク

2) 毒性試験

遺伝子改変による以下のような副作用の有無を明らかにすること。

- ・目的外の細胞形態や表現型、機能の変化、増殖、

分化、不死化、形質転換、導入遺伝子発現部位の病的変化等

- ・ベクター・導入遺伝子の発現や、発現産物の活性と持続性による毒性学的変化、遺伝子改変による目的外の免疫応答など想定外の性質
- ・挿入型ベクター（レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター）を用いた場合は、挿入変異によるがん化の可能性
- ・遺伝子改変初代細胞の挿入部位がクロールな場合やがん遺伝子・がん抑制遺伝子部位の場合、がん原性試験が必要
- ・ベクターが遺伝子導入細胞から遊離することにより生じる毒性

2.3.3 臨床試験

①一般的考慮事項

目的とする臨床効果が導入遺伝子によるのか、遺伝子改変細胞によるのかを明らかにする試験が望ましい。

②投与量選択

古典的手法は使えないかもしれないが、ある程度のdose-responseを確認する必要がある。

③薬力学

治療用遺伝子の発現量や遺伝子改変細胞の正着を評価し、機能や薬力学パラメーターとの相関を調べること。

④薬物動態

細胞製品にADME試験はふさわしくないが、導入遺伝子についてはADME試験が可能である。遺伝子改変細胞からのベクターの遊離を調べること。

導入遺伝子や遺伝子導入細胞に対する免疫応答が生じる可能性があるため、データを収集すること。

⑤臨床有効性

試験デザインと期間は既存のガイドラインに基づくこと。遺伝子改変細胞の正着や導入遺伝子発現レベルと相関する臨床的に意味のあるパラメーター（エンドポイント）を設定すること。がん免疫療法用遺伝子改変細胞のように、複数回の投与を行う場合は、導入遺伝子産物の動態と細胞の性質から治療スケジュールを設定すること。治療目的が長期間持

続し、遺伝子改変細胞・導入遺伝子の長期間の持続性と機能によるものの場合、適切な治療期間とフォローアップで対応する。

⑥臨床安全性

臨床安全性は短期間での有害事象と遅発性の有害事象が考えられる。遅発性の有害事象や活性低下のリスクは、遺伝子改変に用いたベクターや導入遺伝子、細胞生存期間、生体内分布に依存する。生涯持続する可能性のある遺伝子改変幹細胞の場合は、がん原性、免疫原性、ベクターの再活性化などに特に配慮が必要である。

⑦フォローアップ

遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップに関するガイダンスを参照する。

2.4 がん免疫療法用細胞製品の品質・安全性に関する考察

がん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞製品の規制としては、遺伝子治療薬と細胞治療薬の両指針を考慮する必要があり、使用するウイルスベクターによっては個別指針も参照する必要がある。EMAの遺伝子改変細胞に関する指針は、遺伝子改変細胞全般に関して品質、非臨床、臨床の要件がまとめられており、がん免疫療法用細胞製品についても参照すべきであるが、必ずしも当てはまらない要件もある。例えば、遺伝子改変細胞での最も大きな懸念の一つに、挿入変異によるがん化のリスクが挙げられるが、治療用がんワクチンとして用いられる遺伝子導入がん細胞は、細胞が増殖しないような処理が行われており、がん化の恐れはない。また、製品の対象疾患ががんであることから、がん化のリスクはがん以外を対象とする遺伝子改変細胞と同列に扱うことは妥当でない。さらに、遺伝子改変T細胞療法では染色体組込型のベクターが用いられているが、これまでに数多く実施されているT細胞へのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入で、がん化が生じた例は確認されておらず、造腫瘍性試験は必要ないと考えられる。その代わりに、治療後のフォローアップとして、遺伝子導入細胞の持続性やクローン増殖の有無について確認することが必要と考えられる。

遺伝子改変細胞では目的外の免疫応答も安全性上の大きな課題であるが、治療用がんワクチンでは免疫誘導が目的であり、異なる視点が必要である。この点で、がん免疫療法用製品に特化した指針を考慮することが必要と考えられる。FDAの治療用がんワクチンに関する指針は、遺伝子工学を利用したがん免疫療法用製品の場合も、その臨床試験デザインを考えるのに有用であろう。また、EMAのがん免疫療法に用いる細胞製品の力価試験に関する指針は、がん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞も対象としており、力価試験の設定では本指針が有用である。

D. 結論

先端バイオ医薬品規制に関する研究として、遺伝子工学技術を用いたがん免疫療法用製品、特に遺伝子改変細胞を用いたがん免疫療法を中心に、その開発と規制の国際動向を調査した。がん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞製品は、治療用がんワクチンとして用いられる遺伝子改変がん細胞や樹状細胞と、養子免疫療法に用いられるがん抗原特異的T細胞受容体やキメラ抗原受容体を導入した遺伝子改変T細胞に大別される。規制状況としては、遺伝子改変細胞は遺伝子治療薬と細胞治療薬の両指針を考慮する必要があり、使用するウイルスベクターによっては個別指針も参照する必要がある。欧州には遺伝子改変細胞に特化した指針があるが、遺伝子改変細胞の安全性確保において最も懸念される造腫瘍性や遺伝子の挿入変異によるがん化の問題は、がん免疫療法に用いる製品の場合、対象疾患や用いる細胞を考慮すると必ずしも必要ではない。また、一般的な遺伝子改変細胞では有害事象となりうる免疫応答の惹起を目的とする製品であることなどを含め、その品質、安全性確保には、がん免疫療法に用いる遺伝子改変細胞製品に特有の性質を考慮することが重要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山口照英、内田恵理子；“世界の薬事規制対応・承認申請”，核酸医薬品：核酸医薬品の開発動

向とその品質・安全性確保，技術情報協会，東京（2013），印刷中

- 2) Teruhide Yamaguchi and Eriko Uchida: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies, *Current Cancer Drug Targets* (in press)
- 3) 内田恵理子：“バイオ医薬品”，Part IV第3章 遺伝子治療薬，西島正弘・川崎ナナ編，化学同人，京都（2013），印刷中
- 4) 内田恵理子：“医薬品の名前 ステムを知ればクスリがわかる”，第15章 生物薬品，宮田直樹編著，じほう，東京（2013），pp185-215
- 5) Teruhide YAMAGUCHI, Toshie KANAYASU-TOYODA, Eriko UCHIDA: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases, *Biol. Pharm. Bull.*, 36 (2), 176-181 (2013)
- 6) 内田恵理子：遺伝子治療臨床研究の現状，*PharmStage*, 12(11), 1-3 (2012)
- 7) 内田恵理子：“希少疾患/難病の診断・治療技術と製品開発”，第4章 ゲノム創薬技術・遺伝子治療薬・核酸医薬の開発動向，技術情報協会，東京（2012），pp95-107
- 8) 内田恵理子：遺伝子治療の現状と課題について，*Risk Management Times*, 28, 1-4 (2012)
- 9) 内田恵理子：講座こうすればできる日本薬局方微生物試験7 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件，*防菌防黴*，40 (7)，435-444 (2012)
- 10) 内田恵理子：“バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発”，第8章トランスジェニック動物によるバイオ医薬品生産に関する海外ガイドライン解説，山口照英監修，シーエムシー出版，東京（2012），pp202-209

2. 学会発表

- 1) Birei Furuta, Eriko Uchida, Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Souko Takayasu, Mahito Nakanishi, Teruhide Yamaguchi : The application of gp91phox expressing Sendai virus vector in X-CGD

- gene therapy, 第18回日本遺伝子治療学会学術集会 (2012.6) (熊本)
- 2) 内田恵理子: 核酸医薬品開発の動向と課題、薬物動態学会第27回年会 (2012.11) (江戸川区)
- 3) 竹内光恵, 小木美恵子, 會澤康治, 西村駿, 内田恵理子, 得永嘉昭: Nd:YAGレーザーによる応力波を用いた遺伝子導入, 第35回日本分子生物学会年会 (2012.12) (福岡)
- 4) 内田恵理子: 国内外の遺伝子治療に関する指針及びICH遺伝子治療専門家会議について、第3回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム (2013.1) (港区)
- F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当なし

抗体医薬品の品質管理手法構築に資する研究

研究分担者：川崎 ナナ（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長）
橋井 則貴（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長）
日向 昌司（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官）
栗林 亮佑（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員）

研究要旨

抗体医薬品の品質管理手法構築の基盤となる品質特性を解析するための新しい手法について検証実験を実施した。1) 抗TNF- α 抗体医薬品をモデルとした高親和性ペプチドカラムを作製し、抗体医薬品のグリコフォームごとの体内動態解析のための血中抗体医薬品の回収法としての適用可能性について検討した。2) プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残留する宿主由来タンパク質（HCP；Host Cell Protein）の同定を試みた。また、トラスツズマブに吸着するHCPの存在を検証した。

キーワード：抗体医薬品、バイオアナリシス、宿主由来タンパク質

A. 研究目的

近年、開発品目数が急増している抗体医薬品は、骨格部分が共通した構造を有しており、その製造工程も類似していることが特徴であり、有効性・安全性についても、従来の知見を基盤とした考えを元とした推論が成立することも少なくない。一方、わずかな構造の違いが、有効性・安全性に影響する可能性も完全に排除できない。したがって、抗体医薬品特有の構造や製法に立脚した品質管理手法を設定し、さらには滞りなく国際調和させるためには、裏付けとなる十分なエビデンスの蓄積が必要である。

本研究は、抗体医薬品の品質特性を解析するための新しい手法を提示することを目標とし、その第一歩として、1) 目的物質である抗体医薬品のグリコフォームごとの体内動態解析のための血中抗体医薬品の回収法、2) プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残留する宿主由来タンパク質（HCP；

Host Cell Protein）の同定手法について検討した。

A.1 抗体医薬品のグリコフォームごとの体内動態解析のための血中抗体医薬品の回収法の検討

抗体の糖鎖は、直接、抗原-抗体反応に関係していないが、重要なエフェクター機能に影響することが知られている。例えば、還元末端のGlcNAcにフコースが付加していない抗体は、抗体依存性細胞障害（ADCC；Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity）活性が高い。非還元末端のガラクトースは補体依存性細胞障害（CDC；Complement-Dependent Cytotoxicity）活性に関与することが示唆されている。さらに、高マンノース型糖鎖が結合した抗体は、フコシル化複合型二本鎖糖鎖やハイブリッド型糖鎖と比較してADCC活性が高いが、逆に血中半減期は短くなることが報告されている。このように、糖鎖は生物活性だけではなく薬物動態にも関係することから、抗体医薬品の開発段階においては、グリコフォ

ームごとのバイオアナリシスを実施し、それぞれの体内の挙動を把握することが、重要品質特性を特定する上で重要になると思われる。

抗体医薬品のバイオアナリシス手法としてリガンドバインディングアッセイ (LBA ; Ligand Binding Assay) がある。試験方法としては、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光 (ECL ; Electro-Chemical Luminescence) 法などが用いられているが、対象薬物検出用抗体の特異性が課題の一つとされており、LBAによりグリコフォームを識別することは難しい。一方、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) による多重反応モニタリング (MRM ; Multiple Reaction Monitoring) 法がバイオ医薬品のバイオアナリシスに応用されつつある。この方法は、既に化学医薬品のバイオアナリシスにおいて広く利用されており、その特異性の高さからLBAに替わる手法として注目されている。しかし、本方法により抗体のバイオアナリシスを実施する場合、もともと血液中に存在していた抗体と区別するために、目的物質に特異的な配列のペプチド (Fab領域のペプチド) を指標として定量する必要がある。N-結合型糖鎖コンセンサス配列はFc領域に存在するため、糖ペプチドを指標とすることができない。したがって、MRM法により目的物質の糖ペプチドをモニタリングすることは困難である。これらの理由から、グリコフォームごとの体内動態を明らかにするためには、血液中の目的物質を高収率かつ特異的に回収する技術が不可欠である。

本研究では、抗TNF- α 抗体をモデルとし、抗体高親和性ペプチドカラムを作製し、グリコフォームごとの体内動態解析時の抗体回収法としての適用可能性を検証した。

A.2 プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残留するHCPに関する検討

現在、HCPは、バイオ医薬品ごとに、原薬段階の残留量の上限値を設定し管理されている。HCP量の測定には、抗HCP抗体を用いた免疫学的定量法が用いられているが、従来の製造工程を変更しないアプローチの場合、残存するHCPの質的な変動は少なく、

量的な変動を確認すれば良いと考えられる。一方、デザインスペースを設定する場合、製造パラメータの違いにより、残留するHCPは、量的だけでなく質的にも変動するものと予想されることから、残留するHCPを同定する手法の開発が課題となった。

本研究では、トラスツズマブの実験的製造システムを利用し、プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残留するHCPの同定手法について検討した。

B. 研究方法

B.1 抗体医薬品のグリコフォームごとの体内動態解析のための血中抗体医薬品の回収法の検討

B.1.1 材料等

抗TNF- α 抗体として、アダリムマブ (アボットジャパン, Tokyo, Japan)、インフリキシマブ (田辺製薬, Osaka, Japan)、及びゴリムマブ (ヤンセンファーマ, Tokyo, Japan) を使用した。トリプシン (Trypsin Gold, Mass spectrometry Grade) は、Promega (Madison, WI, USA) より購入した。ペプチドライブラリー作製のTNF- α は、Miltenyi Biotech (Tokyo, Japan) より購入した。抗TNF- α 抗体親和性ペプチドカラム作製用カラムとして、TSKgel Tresyl-5PWカラム (2 \times 35 mm, 東ソー) を使用した。合成親和性ペプチド (CGSGSGSIAVSYQTK) は東レリサーチセンター (Kanagawa, Japan) から購入した。ヒト血漿及び脱塩カラム (PD MiniTrap G-25カラム) は、それぞれKAC corporation (Kyoto, Japan)、及びGE Healthcare (Tokyo, Japan) より購入した。

B.1.2 抗TNF- α 抗体固定化ゲルの作成

3種類の抗TNF- α 抗体 (アダリムマブ、インフリキシマブ、及びゴリムマブ) を0.5 M リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した (1.0 μ g/ μ L)。その抗TNF- α 抗体溶液 (100 μ L) を10 mgの抗体固定化用ゲル (TSKgel Tresyl-5PW, 東ソー, Tokyo, Japan) に加え、室温で一晩振とうさせた (ゲルの活性基はトレシル基でリガンドのアミノ基又はチオール基と反応)。200 μ Lの0.5M NaClでゲルを洗浄した後、100 μ Lの0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) で未反応の活性基をブロックし、抗体固相化ゲルを作製した。

B. 1.3 TNF- α 由来ペプチドライブラリーの作成

精製水で1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製したTNF- α (10 μL) にトリプシン (1 μL) を加え、37°Cで16時間インキュベートし、得られたTNF- α 由来トリプシン消化物をペプチドライブラリーとした。

B. 1.4 抗体と結合するペプチドの選別

TNF- α 由来ペプチドライブラリーを乾燥後、精製水 (100 μL) で再溶解した後、抗TNF- α 抗体固相化ゲルに加え、室温で一晩振とうさせた。抗体に結合しないペプチドを除去するために、400 μL の25 mM 酢酸アンモニウム (pH 7.0) でゲルを洗浄した。抗体固相化ゲルに結合しているペプチドを300 μL の0.5 M酢酸 (pH 2.5) で溶出・乾燥させて、抗体に親和性を示すペプチドを得た。

B. 1.5 LC/MS及びLC/MS/MS

B. 1.5.1 ペプチド同定

ペプチド同定に用いたLC/MS及びLC/MS/MSの条件は以下のとおりであった。

(1) LC

装置 : Paradigm MS4 (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA)

トラップカラム : L-column ODS (0.3 \times 5 mm, 5 μm , 化学物質評価研究機構)

分析カラム : L-column ODS (0.075 \times 150 mm, 3 μm , 化学物質評価研究機構)

移動相 : バッファーA、0.1%ギ酸/5%アセトニトリル、バッファーB、0.1%ギ酸/90%アセトニトリル
グラジエント条件 : 5–65% (Bバッファー) 45分間
流速 : 300 nL/min

(2) MS

装置 : LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

スプレー電圧 : 2.5 kV

電極 : ポジティブイオンモード

MSスペクトルの取得 : フルスキャンモード (測定範囲 : m/z 400–2,000)

MS/MSスペクトルの取得 : データ依存的なプロダクトイオンスキャンモード

(3) データベース検索

検索ソフト : BioWorks 3.1 (Thermo Fisher Scientific)

データベース : UniProtデータベース

B. 1.5.2 グライコフォーム解析

グライコフォーム解析に用いたLC/MSの条件は以下のとおりであった。

(1) LC

装置 : Paradigm MS4

カラム : MassPREP™ Micro desalting column (2.1 \times 5.0 mm, 20 μm ; Waters, Milford, MA, USA)

移動相 : バッファーA、0.1%ギ酸、バッファーB、0.1%ギ酸/90%アセトニトリル

グラジエント条件 : 10–80% (Bバッファー) 30分間

流速 : 600 nL/min

(2) MS

装置 : QSTAR Elite Qq-TOF mass spectrometer (AB Sciex, MA, USA)

スプレー電圧 : 4.0 kV

電極 : ポジティブイオンモード

MSスペクトルの取得 : フルスキャンモード (測定範囲 : m/z 800–4,000)

マススペクトルデコンボリューションソフト : Bioanalyst™ software (AB Sciex)

B. 1.6 ヒト血漿中からの抗TNF- α 抗体回収の確認

抗TNF- α 抗体 (アダリムマブ、インフリキシマブ、及びゴリムマブ) を精製水に溶解した (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。抗TNF- α 抗体水溶液 (10 μL) を90 μL のヒト血漿で希釈した後、ペプチドカラムに注入した。1 mLの25 mMの酢酸アンモニウム (pH7.0) でカラム洗浄した後、300 μL の0.1 M Tris-NaOH (pH 11.5) でカラムから吸着物を溶出させた。洗浄及び溶出画分を乾燥後、10 μL の精製水に溶解させた (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 各画分を試料として、以下の条件でSDS-PAGEを行い、本ペプチドカラムの特異性を検証した。

SDS-PAGEの条件

(1) グラジエントゲル : e-PAGEL (18ウェル, 厚さ 1.0 mm, グラジエント 5–20% ; ATTO Corporation, Tokyo, Japan)

(2) ローディングバッファー : 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.25 mL、SDS (Wako Osaka Japan) 0.2g、グリセロール (Wako Osaka Japan) 2 mL、プロモフェノ

ールブルー (Wako Osaka Japan) 少量/10 mL精製水

(3) 泳動バッファー : Tris (Sigma Aldrich Tokyo Japan) 3 g、グリシン (Wako Osaka Japan) 14.4 g、SDS (Wako) 1 g/L精製水

(4) サンプル調製 : 9 μ Lのローディングバッファーに2 μ Lのサンプル溶液を添加

(5) ゲル染色 : SYPRO Rudy Protein Gel Stain (Invitrogen)

(6) 検出 : Typhoon 9400 (GE Healthcare) でバンド確認

B.2 プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残留するHCPに関する検討

B.2.1 精製トラスツズマブの調製

予備培養工程

0.18% Pluronic F-68 (SIGMA) を添加したOpti-CHO培地 (GE Healthcare) に、 2.0×10^5 cells/mLとなるようにトラスツズマブを安定発現するCHO細胞株 (DGT13-4細胞) を播種し、4日間、巡回培養 (125 rpm、37°C、8% CO₂気流下) した。

生産培養工程

生産培養は、0.18% Pluronic F-68を添加したOpti-CHO培地に、 2.0×10^5 cells/mLとなるようにDGT13-4細胞を播種し、1週間、巡回培養 (125 rpm、37°C、8% CO₂気流下) した。馴化培地を回収し、350xg、15分間の遠心分離後、上清をろ過フィルター (0.22 μ m、Millipore) で清澄化し、精製工程の出発材料とした。

精製工程1ー濃縮

生産培養の上清を限外ろ過 (Pellicon XL 50 kDa, Millipore) で、約1/10量となるまで濃縮した。

精製工程2ープロテインAアフィニティークロマトグラフィー

精製工程1の濃縮液について、平衡化・洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25 M NaCl) で平衡化したプロテインAカラム (HiTrap MabSelect, GE Healthcare) に流速1 mL/minでアプライし、280 nmの吸光度が0.01 au以下になるまで平衡化・洗浄バッファーで洗浄した。溶出バッファー (0.1 M Gly-HCl pH 3.0) で溶出した後、中和バッファー (2 M Tris-HCl pH 8.5) でpH 7.5に調整し、さらに、ミリQ水で2.5 mS/cm

に調整した。

精製工程3ー陽イオン交換クロマトグラフィー

精製工程2の溶液について、低塩濃度トリスバッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5) で平衡化したHiTrap SPカラム (GE Healthcare) に流速1 mL/minでアプライし、30分で0.2 M NaClを含むトリスバッファーとなるリニアグラジエントで溶出した。280 nmの吸光度でモニターし、約15分で溶出する主ピークを手動で分取し、精製トラスツズマブを得た。各溶出液のHCP濃度は、ELISA Kit (CHO HCP ELISA kit 3G, CYGNUS) を用いて測定した。

B.2.2 CHO-DG44細胞の馴化培地の調製

0.18% Pluronic F-68を添加したDG44培地 (GE Healthcare) に、 2.0×10^5 cells/mLとなるようにCHO-DG44細胞を播種し、1週間、巡回培養 (125 rpm、37°C、5% CO₂気流下) した。馴化培地を回収し、350xg、15分間の遠心分離後、上清をろ過フィルター (0.22 μ m) で清澄化した。限外ろ過 (Pellicon XL 10 kDa, Millipore) で、約1/20量となるまで濃縮し、馴化培地濃縮液とした。

B.2.3 トラスツズマブに吸着して残留するHCP量の評価

低吸着チューブ6本に、それぞれ馴化培地濃縮液400 μ Lを取り、精製トラスツズマブ100 μ L及び低塩濃度トリスバッファー100 μ Lをそれぞれ3本ずつ添加後、氷中で30分間放置し、スパイクサンプル及びコントロールサンプルとした。

各サンプルをプロテインAカラムに流速1 mL/minアプライし、10分間洗浄した。溶出バッファーで溶出した後、中和バッファーでpH 7.5に調整した。各溶出液のHCP濃度は、ELISA Kitを用いて測定した。

B.2.4 ショットガン解析

精製トラスツズマブ約100 μ gを凍結乾燥した後、7 M guanidine-HCl pH 8.6, 0.5 M Tris-HCl, 5 mM EDTAに再溶解した。DTT溶液を添加し、65°Cで30分間インキュベートした。さらに、ヨード酢酸溶液を添加し、室温で40分間反応させた。脱塩カラム (PD MiniTrap G-25, GE Healthcare) で脱塩し、凍結乾燥した。消化バッファー (50 mM Tris-HCl pH8.5) に再溶解し、トリプシンを添加した後、37°Cで16時間イ

ンキュベートした。遠心乾燥させ、0.1% ギ酸で溶解し、ショットガン解析に供した。

液体クロマトグラフィー (LC) は、Paradigm MS4 (Michrom BioResources) に逆相カラム (L-Column, 0.075 mm×150 mm, 粒子径 3 μm, 化学物質評価研究機構) を接続して用いた。質量分析 (MS) 装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AB/MDS Sciex) を接続したQq-TOF質量分析装置 (Qstar Elite, AB/MDS Sciex) を使用し、ポジティブイオンモードでデータを取得した。LC及びMSの測定条件は以下の通りである。

A溶媒：0.1%ギ酸、2%アセトニトリル水溶液

B溶媒：0.1%ギ酸、90%アセトニトリル水溶液

グラジエント：5–65% B溶媒、リニア、50分間

流速：0.3 μL/min

スキャン範囲：*m/z* 400-2,000

スプレー電圧：4.0 kV

検出されたマススペクトル、マスマススペクトルについて、検索エンジン SEQUEST (Proteome Discoverer, Thermo Fisher Scientific) を用いてマウスのタンパク質データベース (Swiss-Prot) に対して検索を行い、含有するものと考えられるタンパク質を推定した。

C. 結果と考察

C.1 抗体医薬品のグリコフォームごとの体内動態

解析のための血中抗体医薬品の回収法の検討

C.1.1 抗TNF-α親和性ペプチドのスクリーニング、及びペプチドの同定

図1に、本研究で実施した抗TNF-α抗体に親和性を示すペプチドのスクリーニング法を示した。抗

TNF-α抗体として、アダリムマブ、インフリキシマブ及びゴリムマブを固定化したゲルとトリプシン消化により調製したTNF-α由来ペプチドライブラリーを混合後、ゲルを洗浄した後、抗TNF-α親和性ペプチドを回収した。回収した親和性ペプチドを40 μLの精製水に溶解させ、質量分析用の試料とした後、LC/MSによりマススペクトルを取得した (図2 A-2 C)。検出されたペプチド由来イオンについて、データ依存的プロダクトイオンスキャン及びデータベース検索によりペプチド同定を行った。図2 Dはペプチド1のマススペクトル及びMS/MSスペクトルである。データベース検索の結果、IAVSYQTKと同定された。ペプチド同定結果を表1に要約した。図2 A-2 Cに示したペプチド1、2、3、4、及び5は、それぞれTNF-αの83-90、7-32、33-44、16-31、及び91-98番目のアミノ酸配列に相当するペプチドと同定された。ペプチド1及び5は、3種類の抗TNF-αに共通して親和性を示すペプチドであった。一方、ペプチド2及びペプチド3は、アダリムマブ及びゴリムマブに特異的なペプチドであった。ペプチド4は、インフリキシマブ及びゴリムマブに共通したペプチドであった。次に、TNF-αの立体構造を考慮したとき、これらの親和性ペプチド候補が内側と外側のどちらに位置するのかを、過去の文献 (Nagahira, K., *et al.*, Immunol Lett. 1995, 46, 135-41) を参考に検討した (図3)。その結果、ペプチド2、3及び4は内側、ペプチド1及び5は外側の領域のペプチドであることが示唆された。本研究では、外側に位置するペプチドを抗TNF-α抗体が結合するペプチド配列と想定し、ペプチド1を親和性ペプチドとして用いることにした。

表1 抗TNF- α 抗体親和性ペプチド同定結果

Peptide	配列	位置	m/z	Charge state	Observed MW (monoisotopic)	Theoretical MW (monoisotopic)
Peptide 1	IAVSYQTK	83-90	455.26	2 ⁺	908.51	908.50
Peptide 2	TPSDKPVAHVVANPQAEGLQWLN	7-32	728.65	4 ⁺	2910.60	2910.52
Peptide 3	ANALLANGVELR	33-44	620.86	2 ⁺	1239.72	1239.69
Peptide 4	VVANPQAEGLQWLN	16-31	911.99	2 ⁺	1821.98	1821.95
Peptide 5	VNLLSAIK	91-98	429.28	2 ⁺	856.56	856.55

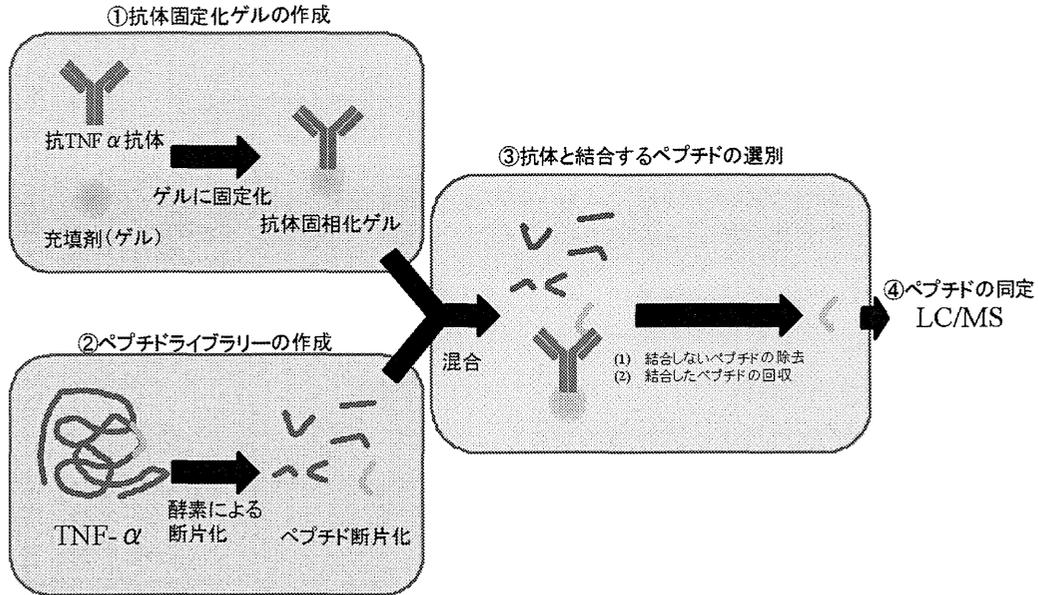


図1 親和性ペプチドのスクリーニング法

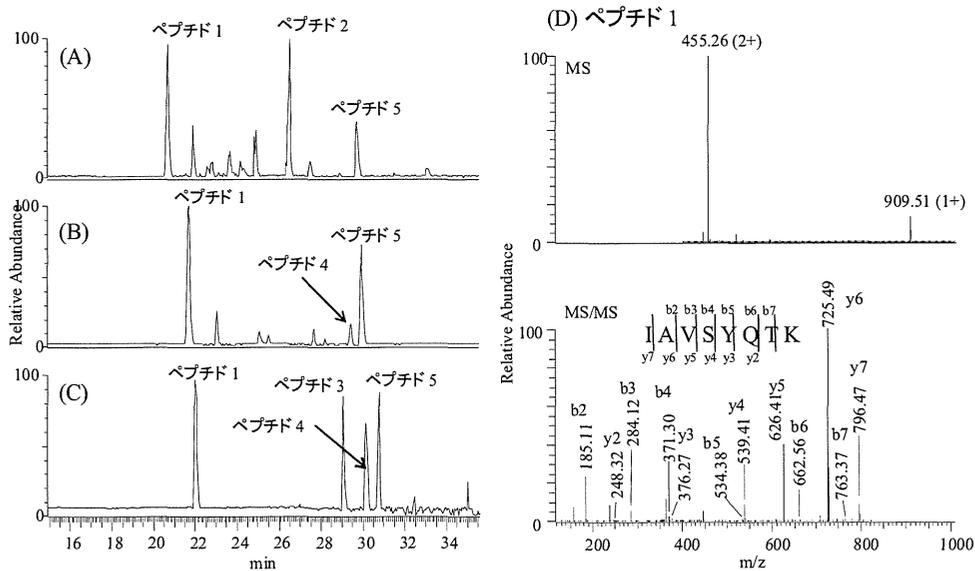
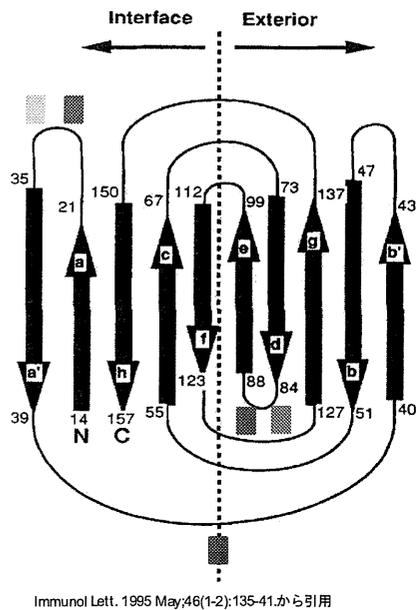


図2 LC/MS及びデータベース検索によるTNF- α 由来親和性ペプチドの同定

LC/MSにより取得されたアダリムマブ(A)、インフリキシマブ(B)、及びゴリムマブ(C)親和性ペプチドのトータルイオンカレントクロマトグラム。

(D)、ペプチドの一次構造決定例。上段、ペプチド1のMSスペクトル；下段、MS/MSスペクトル、及びデータベース検索によるプロダクトイオンの帰属結果。



```

1      10      20      30      40      50
VRSSS RTPSD KPAVAH VVAVNF QAEQG LQWLN RRANA LLANG VELRD NQLVV
.....
51     60     70     80     90    100
PSEGL YLIYS QVLFK GQGCP STHVL LHTI SRIAV SYQFK VNLAS AKKSP
.....
101    110    120    130    140    150
QRET  PEGAE AKPWY EPIYL GGVEQ LEKGD RLSAE INRPD YLDFE ESGQV
.....
151
YFGII AL

```

- 7-32 Interface (ペプチド2)
- 16-31 Interface (ペプチド4)
- 32-44 Interface and Exterior (ペプチド3)
- 83-90 Exterior (ペプチド1)
- 91-98 Exterior (ペプチド5)

Immunol Lett. 1995 May;46(1-2):135-41から引用

図3 同定したTNF-α由来ペプチドの位置

C. 1. 2 抗TNF-α親和性ペプチドを用いたペプチドアフィニティーカラムの作成

C. 1. 2. 1 ペプチド1を用いた抗TNF-α抗体親和性ペプチドの作製

カラムを作成するとき、親和性ペプチドを充填ゲルに直接結合させると、親和性ペプチドの結合部位付近に抗TNF-α抗体がアクセスしにくくなり、親和性が低下する可能性がある。そこで、その立体障害を防ぐことを目的として、ペプチド1のN末端側にリンカー配列 (CGSGSGGS) を付加させることとした。その「リンカー配列-ペプチド1」を化学合成し、親和性ペプチドカラム用ペプチドとして用いた (図4A)。

C. 1. 2. 2 抗TNF-α抗体親和性ペプチドカラムの作製

図4Bにペプチドカラムの作製法を示した。まず、TSKgel Tressyl-5PWカラムを500 μLの0.5 M リン酸水素二カリウム溶液 (pH 7.5) で洗浄した。次に、合成ペプチドを0.5 M リン酸水素二カリウム溶液 (pH 7.5) で溶解させた後 (1.0 μg/μL)、その100 μLをカラムに注入し、4℃で一晩放置した。反応終了後、200 μLの0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) を注入し、室温で1時間、未反応の活性基をブロッキングした。500 μLの25 mMの酢酸アンモニウム (pH7.0) でカラムを洗浄して、未反応の合成ペプチドを除去し、抗TNF-α抗体親和性ペプチドカラムとした。

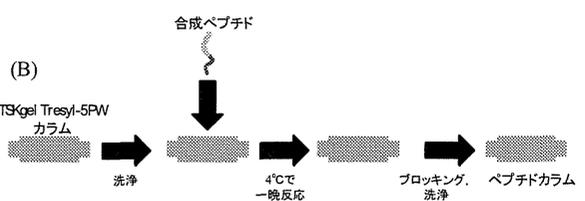


図4 抗TNF-α抗体親和性ペプチド及びペプチドカラムの作製法

(A)、合成ペプチドのアミノ酸配列；(B)、ペプチドカラムの作製法

C. 1. 3 抗TNF-α親和性ペプチドアフィニティーカラムの回収効率及び特異性確認

本カラムに抗TNF-α抗体を添加したヒト血漿を試料として注入し、洗浄画分及び溶出画分を回収した。コントロールの抗TNF-α抗体、洗浄画分及び溶出画分のSDS-PAGEを行い、回収効率を確認した。3種類の抗TNF-α抗体について検討した結果、いずれの抗体を添加したヒト血漿を試料とした場合においても、コントロールと溶出画分の泳動パターンは類似していた (図5A)。

次に、本カラムの特異性を確認するために、ヒト

血漿のみを試料として洗浄画分及び溶出画分の SDS-PAGEを行ったところ、溶出画分の泳動像にバンドは認められなかった。一方、ペプチドアフィニティーカラムの代わりに、protein A カラムを用いたとき、ヒト血漿中の抗体に由来するバンドが検出された (図 5 B)。

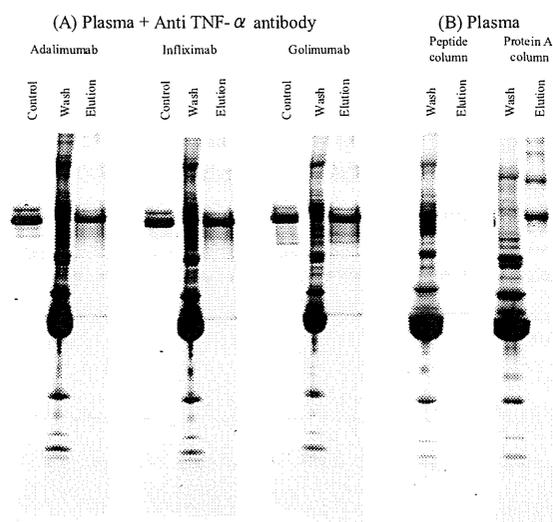


図 5 ヒト血漿中からの抗TNF-α抗体回収の確認

(A)、抗TNF-α抗体を添加したヒト血漿を試料としたときの洗浄及び溶出画分の電気泳動像；(B)、ヒト血漿を試料としたときの洗浄及び溶出画分の電気泳動像。コントロールは、抗TNF-α抗体水溶液を試料としたときの電気泳動像

以上の結果から、本カラムを用いることにより、血液中に存在する抗体等による非特異的な結合や交差反応の影響を受けることなく、抗TNF-α抗体のみを高収率且つ特異的に回収できることが確認された。

C. 1. 4 LC/MSによる糖鎖不均一性解析

本研究で開発したペプチドアフィニティーカラムをグリコフォームごとの体内動態解析に応用する場合、カラムで回収する前後で、抗体のグリコフォームパターンに変化がみられないことが重要である。そこで、研究方法B. 1. 5. 2に示した条件のLC/MSにより、本カラムで回収する前後の抗TNF-α抗体のLC/MSを行い、得られたデコンボリューションマススペクトルに基づきグリコフォームの比較を行った。図 6 Aは、ゴリムマブを添加した血漿を試料としたときに、本カラムにより回収されたゴリムマブのデコンボリューションマススペクトルである。精製水に溶解したゴリムマブを試料としたときのデコンボリューションマススペクトル (図 6 B) と比較して、同様の質量及び糖鎖不均一性が確認された。本カラムは、グリコフォーム解析に利用できることが明らかとなった。

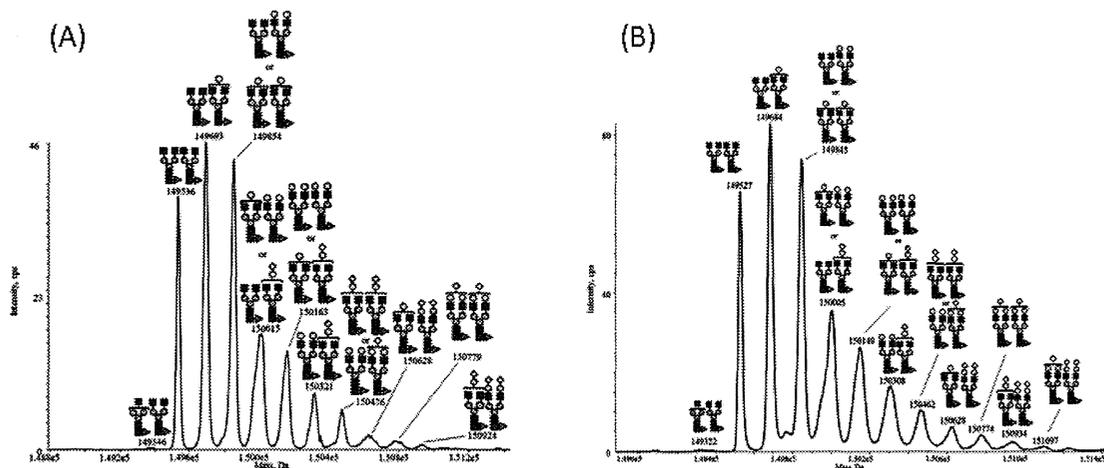


図 6 回収前後のゴリムマブのグリコフォームパターンの比較

血漿から回収されたゴリムマブ(A)及び精製水で溶解したゴリムマブ(B) (コントロール) のLC/MSにより取得されたデコンボリューションマススペクトル