

改変タンパク質製剤（改変型抗体医薬品）の評価に関する RS 研究

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長

**研究要旨** 改変型抗体医薬品に代表される改変タンパク質製剤は、高い標的特異性を持つ次世代医薬品として期待されている。その開発に際しては、治療効果はもとより、免疫原性等の安全性や、製剤の安定性等、様々な要素を考慮して分子設計を行うことが必要である。本邦でも様々な開発が進む改変型抗体医薬品の品質・有効性・安全性確保の要件を明らかにし、その開発環境整備を行うことを目的に、本年度は、改変型医薬品の分子設計について、薬理作用・体内動態・免疫原性・製剤化・製造工程を考慮して、留意すべき事項をまとめた。また、Fc $\gamma$  受容体結合親和性プロファイリングに適した SPR 解析法構築し、改変型抗体医薬品の非臨床評価において課題となる Fc $\gamma$  受容体結合親和性の種差を解析した。

研究協力者

多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 第三室 室長

鈴木琢雄 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 第一室 主任研究官

**A. 研究目的**

マウスモノクローナル抗体作製技術の開発を端緒に、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体と進化した抗体医薬品は、IgG サブクラス置換、アミノ酸置換、糖鎖改変、薬物修飾、低分子化、PEG 化等の分子設計技術の応用により、多様化している。抗体医薬品の開発では、目的とする適応疾患、剤形、投与経路等を念頭に、有効性・安全性を得るために必要な薬理作用、薬物動態、ならびに、製剤化を考え、構造の至適化が進められるが、その他に、有効性低下や有害反応発生につながる可能性のある免疫原性、さらには、製造工程や品質管理の効率についても考慮した分子設計が必要である。

本研究では、改変型抗体医薬品の品質・有効

性・安全性確保の要件を明らかにし、その開発環境整備を行うことを目的に、本年度は、まず、IgG の構造と機能に基づき、抗体医薬品の薬理作用及び薬物動態に関する基本的な知見を整理した上で、改変型抗体医薬品の開発事例をもとに、分子設計において重要と考えられる事項を整理した。

また、抗体医薬品の有効性・安全性には、標的抗原との結合性に加え、免疫エフェクター細胞の活性化に関与する Fc $\gamma$  受容体が関わることをふまえ、抗体医薬品の非臨床試験に用いられるマウス及び非ヒト霊長類の Fc $\gamma$  受容体と抗体医薬品の結合性を解析し、非臨床試験結果のヒトへの外挿における留意点について考察した。

**B. 研究方法**

**B.1 抗体医薬品の体内動態及び分子設計に関する調査研究**

バイオ医薬品の製造と開発に関する考え方として、ICH Q11 ガイドラインに記載されている目標製品品質プロファイルや重要品質特性の考え方、ならびに、改変型抗体に関する学術文献をも

とに、改変型抗体医薬品製剤の分子設計において求められる要件を考察した。

## B.2 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による Fc 受容体結合親和性の解析

SPR 解析には Biacore T200 (GE ヘルスケア) を使用した。アミンカップリングによりセンサーチップ CM5 に抗 His 抗体 (GE ヘルスケア) を固定化した。His-tag 付加された Fc $\gamma$ R 細胞外ドメインの組換えタンパク質 (Sino Biologicals) をキャプチャーし、アナライトとして各種の抗体医薬品を用いて結合親和性の解析を行った。

測定用緩衝液は HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.05% Surfactant P20), 再生用緩衝液は 10 mM glycine (pH1.5) を用いた。キャプチャー分子の濃度は 1  $\mu$ g/ml, 結合時間は 1 分, 流速は 10  $\mu$ l/min とした。アナライト結合, 解離, 再生の時間はそれぞれ 3 分, 5 分, 1 分とし, 流速は 30  $\mu$ l/min とした。解析には, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa についてそれぞれ, 1:1 binding model, steady state model, two state reaction model を適用し, 結合解離定数 ( $K_D$ ) を算出した。

(倫理面への配慮)

調査研究については検体を用いることがないため, 倫理面への配慮を必要としない。実験に用いたタンパク質等の試薬類は, 市販の組換えタンパク質であり, 倫理面での配慮を要するものではない。

## C. 研究結果

### C.1 分子設計における要件

基礎研究あるいは医薬品開発を目的に作製されている改変型抗体医薬品の具体例を調査し, 開発目標となる適応疾患, 用法, 薬理作用・体内動態・免疫原性・製剤化・製造工程等を考慮した分子設計における要件をまとめた。

#### C.1.1 IgG 及び抗体医薬品の構造と機能

##### C.1.1.1 IgG の構造と機能

IgG1 は, 2 本の H 鎖及び 2 本の L 鎖からなる分子量約 150,000 の糖タンパク質で, CH2 ドメインの Asn297 に N-結合型糖鎖付加部位が存在する。可変部の配列が各抗体により異なり, 可変部に含まれる相補性決定部 (CDR) が抗原結合に関わる。定常部は, 遺伝子多型による数個のアミノ酸残基の違いを除き, IgG サブクラスが同じ抗体に共通する配列である。可変部と定常部の間はヒンジ部と呼ばれ, H 鎖間のジスルフィド結合が位置する (図 1 A)。

ヒンジ部の一部, CH2, 及び CH3 ドメインからなる Fc ドメインは, Fc 受容体や補体との結合能を持ち, Fc 受容体の活性化による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性, 及び, 補体の活性化による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性に関与している (図 1 B-i)。

また, Fc ドメインは, IgG の輸送担体である新生児型 Fc 受容体 FcRn との結合能を持ち, FcRn によるリサイクリングあるいはトランスサイトシスに関与する (図 1 B-ii)。

##### C.1.1.2 抗体医薬品の骨格構造

図 2 に, IgG 型抗体, 低分子抗体, PK 改良型低分子抗体に分類して, 現在開発されている抗体医薬品の骨格を示した。

典型的な IgG 型抗体としてマウス抗体, キメラ抗体, ヒト化抗体, ヒト抗体があり, その他に, 二重特異性抗体, 抗体薬物複合体, 糖鎖改変抗体, アミノ酸配列改変抗体等の改変型抗体が開発されている。

低分子抗体として, 可変部と定常部 CL 及び CH1 ドメインからなる Fab の他, 可変部のみからなる scFv, 2 つの scFv が会合した diabody, 2 つの scFv をリンカーでつないだ tandem-scFv, 1 本鎖で抗原結合能を持つラマ由来抗体可変部 V<sub>HH</sub> などが開発されている。これら低分子抗体においても, キメラ化やヒト化等, 免疫原性を低減する改変が行われている。また, 低分子抗体では,

PEG 化や FcRn 結合性の付与等 , 血中半減期延長に寄与する修飾が行われることがあり , 図 2 では , これらを PK 改良型低分子抗体として示した .

### C.1.2 抗体医薬品の分子設計における要件

開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計において重要と考えられる主な事項を図 3 にまとめた .

抗体医薬品の開発では , まず , 目的とする適応疾患に応じて抗原が選択され , ハイブリドーマやファージディスプレイライブラリー等のスクリーニングにより , 目的とする抗原への結合能を持つ抗体クローンが取得される . 得られた抗体クローンの中から , 抗原との結合親和性や特異性 , 及び , 抗原の生理機能への影響を評価して , 開発候補となるリード抗体が選択される .

めんえきげん

#### C.1.2.1 有効性・安全性

##### C.1.2.1.1 薬理作用

抗体医薬品の薬理作用は , 抗原との結合 , 及び , エフェクター活性に寄与する Fc $\gamma$  受容体や補体との結合に依存するため , これらの結合能を至適化するための改変が行われる . また , 目的とする薬理作用に応じ , 二重特異性抗体への改変や , 化学薬品による修飾等が行われることもある .

##### (1) 抗原結合の至適化

抗原結合には , 可変部の構造が関与する . リード抗体の抗原結合親和性が不十分な場合や , ヒト化に伴い親和性が低下した場合 , あるいは , 特異性の向上が必要となる場合 , CDR 及びその周辺のフレームワーク部のアミノ酸置換が行われる .

1 つの抗体が 2 種類の抗原に結合することで薬理作用の発揮が期待できる場合 , 1 つの抗体に 2 種類の可変部を持たせ , 二重特異性抗体とすることがある .

##### (2) エフェクター活性の至適化

ADCC 活性や CDC 活性等のエフェクター活性

には , Fc ドメインのアミノ酸配列及び糖鎖構造が関与している . 通例 , 細胞傷害活性を期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を増強 , 中和活性のみを期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を低減する方向で改変が行われる .

エフェクター活性を考慮した至適化において , まず , IgG サブクラスの選択が行われ , さらに , 必要に応じて , Fc 受容体や補体結合に関与するアミノ酸残基の改変が行われる . ヒト IgG には , IgG1~4 のサブクラスがあり , これまでに承認されている抗体医薬品の多くでは , IgG1 サブクラスが用いられているが , IgG2 , IgG4 , あるいは , IgG2 と 4 のキメラ定常領域が用いられている例がある . IgG4 はエフェクター活性が弱く , 特に補体活性化能が低い点の特徴で , 中和のみを目的とする抗体に選択される . IgG3 はエフェクター活性が強いという特徴を持つが , ヒンジ領域が長く分子間ジスルフィド結合の数が多いことや , 遺伝子多型が多いこと等が懸念され , これまでのところ , 抗体医薬品に使われている例はない .

糖鎖構造改変の例として , Asn297 に結合する N 結合型糖鎖において , フコシル化された糖鎖の含量を低減することで Fc RIII への結合親和性を上げ , ADCC 活性を増強する技術が開発されている . 抗 CCR4 抗体モガムリズマブがこの例である ( 表 1 ) .

##### (3) 化学薬品による修飾

抗腫瘍効果を期待する抗体医薬品では , 抗体と強力な細胞傷害作用を持つ薬物を共有結合させた抗体薬物複合体 ( ADC ) として開発されることがある . 細胞表面抗原に結合した ADC は , 抗原の細胞内移行に伴いエンドソームに移行し , 酸性化 , 酵素消化等により , 薬物が放出される . 薬物の放出性はリンカーの構造に依存するため , ADC の分子設計においてはリンカーの設計が重要である .

##### C.1.2.1.2 薬物動態

抗体医薬品は、それ自身が標的指向性を持っているため、薬物動態に関しては、血中滞留性や組織移行性が課題となる。抗体医薬品の体内動態には、有効成分の分子サイズ、荷電、及び、FcRn 結合性等が関与する。図 4 に、抗体医薬品の分子サイズと、組織毛細血管、リンパ管、及び、腎糸球体基底膜の細胞間隙の大きさを示した。皮下投与の際、低分子抗体は、毛細血管及びリンパ管から吸収される大きさで、IgG 型抗体はリンパ管から吸収される大きさである(図 5)。低分子抗体は、糸球体ろ過を受けるサイズであるため、消失には、糸球体ろ過の寄与が大きい(図 6)。IgG 型抗体は、糸球体ろ過されず、その消失には、細胞への非特異的取り込みに伴う分解、及び、標的介在性の薬物消失 (Target mediated drug disposition)、さらに、これらに対する FcRn の抑制効果が関与する(図 1B-ii)。

IgG 抗体では、Fc ドメインの改変による FcRn 結合親和性向上や、可変部の改変による抗原非結合型抗体のリサイクリング等を目的とした分子設計が行われる。低分子抗体では、主に、血中半減期延長のための分子設計が行われる。

#### (1) IgG 型抗体

IgG 型の抗体医薬品では、他のタンパク質医薬品と比較して血中滞留性はよいが、標的介在性の薬物消失等により、血中半減期が 2~5 日程度のものもある。また、一度、抗原に結合した抗体医薬品は、リサイクルされても、再度別の抗原に結合することはできず、生体内に存在しても機能を発揮できない。これらの課題を踏まえ、血中半減期の延長や、抗原の結合していない遊離型抗体をリサイクルさせるための分子設計が必要となる。

血中半減期の延長には、Fc ドメインのアミノ酸置換により、FcRn 結合親和性を上昇させる分子設計が行われており、動物実験では、野生型の 4 倍程度までの血中半減期の延長がみられている。遊離型抗体のリサイクリングには、細胞内エンドソームの酸性条件下で荷電状態が変わる His 残基

を CDR に導入する手法が開発されており、この手法を用いると、抗原抗体複合体が細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内で抗原が抗体から解離するため、遊離型抗体のみが FcRn によりリサイクルされる。これらの分子設計による体内動態改良は、投与量や投与頻度の低減につながり、慢性疾患治療用抗体で望まれる皮下投与製剤の開発可能性も高めるものと考えられる。

#### (2) 低分子抗体

IgG 型の抗体医薬品とは対照的に、Fc ドメインを持たない低分子抗体医薬品は、FcRn によるリサイクリングを受けず、また、糸球体ろ過により消失するため、半減期が数時間程度と短い。血中半減期を延長し、有効血中濃度を維持するための分子設計として、Fc ドメイン、あるいは、IgG に結合するペプチドと低分子抗体を融合することで、直接あるいは間接的に FcRn 結合性を付与する試みがなされている。また、FcRn には、IgG のみならず、アルブミンも結合するため、Fc に代わり、アルブミンを利用することも試みられている。

##### (2)-1 直接的 FcRn 結合性付与

低分子抗体-Fc 融合タンパク質として、scFv、あるいは、二重特異性 scFv と Fc の融合タンパク質等の作製が報告されており、scFv では 3.5 時間であった血中半減期が、scFv-Fc では 93 時間に延長された例もある。また、低分子抗体-アルブミン融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabody とアルブミンの融合タンパク質、また、diabody とアルブミンドメイン III 融合タンパク質等の分子設計の例がある。

##### (2)-2 間接的 FcRn 結合性付与

IgG 結合配列として、IgG 結合性を持つタンパク質である Protein A、Protein G、あるいは Protein L 由来のペプチド配列を低分子抗体に付与する方法が開発されており、低分子抗体-IgG 結

合性ペプチド融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabody と IgG 結合性ペプチドの融合タンパク質等が報告されている。IgG 上の Protein A 及び Protein G 結合部位は、FcRn 結合部位に近い場合、IgG の FcRn への結合を阻害しないペプチド配列を選択することが重要となる。ペプチドを利用する方法では、Fc ドメインやアルブミンとの融合タンパク質とする場合と比べ、分子量が大きくならないため、組織浸透性を保てる可能性が高くなると考えられる。

### (2)-3 その他

他のバイオ医薬品の血中半減期延長のために用いられている PEG 化は、低分子抗体医薬品にも応用されており、PEG 化された Fab 構造を持つセルトリズマブ ペゴルがその例である(表 1)。有効成分の構造を改変する手法の他、開発中の製品では、ポンプを用いて低分子抗体を持続注入する方法も用いられており、投与デバイスの工夫で有効血中濃度を維持する手法も含め、体内動態の制御には、様々な手法が考えられる。

#### C.1.2.1.3 免疫原性

投与された医薬品が免疫原性を示し、抗薬物抗体が産生されると、薬物の血中半減期への影響や、有効性の低下、免疫応答による有害作用発生につながる可能性がある。ヒトに対する免疫原性の程度は、臨床試験を実施しなければ分からないが、臨床試験段階で免疫原性の問題が生じると、開発の続行が危ぶまれるため、分子設計の段階で、免疫原性に寄与する構造についても考慮する必要がある。

免疫原性の回避について、今のところ定型化された手法はないが、分子設計に寄与する情報を得る方法として、抗原提示に関わる MHC クラス II 分子に結合するペプチド配列(T 細胞エピトープ)を推定することや、リード抗体選択に際し、ヒト T 細胞の活性化を指標とした *in vitro* アッセイ等が利用される。

#### C.1.2.2 製剤化

##### C.1.2.2.1 溶解性

これまでに承認されている抗体医薬品は、全て注射剤であり、投与経路は、抗腫瘍薬では点滴静注、免疫調節薬では皮下投与が多い(表 1)。免疫調節薬が用いられる慢性疾患では、自己注射が可能な皮下投与製剤が好まれる傾向が強くなっており、静脈内投与製剤が承認されて数年後に、皮下投与製剤が開発・承認される例も出てきている。皮下投与製剤では液量が限られ、高濃度の溶液が必要となる。抗体医薬品の投与量は高く、数十 mg/ml 程度の高濃度の溶液が必要になることもあり、製剤処方最適化のみでは目的とする濃度での溶液製剤の作製が困難な場合もあり得るため、分子設計の段階から、製剤化を考慮した分子の選択が必要である。

##### C.1.2.2.2 安定性

抗体医薬品製剤は、溶液製剤または凍結乾燥製剤で、通例、4 で保存される。有効期間の設定には、実時間実保存条件での安定性試験が必要であり、最終的な評価には長時間を要する。安定性の評価項目は、有効性・安全性に影響する品質特性となるが、製剤の保存中にもその含量が増加し得る凝集体は、免疫原性等、安全性への影響が懸念される不純物であるので、製剤の安定性を考える上で、特に注意が必要である。また、脱アミドや酸化等の化学的な修飾、高次構造変化等も有効性・安全性に影響する品質特性として、安定性の評価項目になることが想定される。安定性試験結果で問題が生じる事態を避けるため、分子設計の段階で、凝集体形成や化学修飾の懸念が少ないアミノ酸配列を選択することが望ましい。凝集体形成を起こしやすいアミノ酸配列を予測する方法が検討されており、これらに一致する配列を回避する等の分子設計が考えられる。

#### C.1.2.3 製造工程

IgG 骨格を持つ典型的な抗体医薬品の製造工程としては、プラットフォーム化された技術があり、分子設計の際に考慮すべきことは多くない。しかし、その他の改変抗体では、個別に対応すべき問題を考慮して、分子設計を行う必要がある。

代表的な例は二重特異性抗体である。抗原 A に結合する H 鎖, L 鎖, 抗原 B に結合する H 鎖, L 鎖からは, 10 通りの分子種が生じ得るため, 目的とする抗体の収率は低い。これを回避するため, 2 種類の H 鎖にそれぞれ鍵と鍵穴となるアミノ酸置換を施し, 目的とする H 鎖の会合を促進する方法や, L 鎖の共通化等の分子設計が行われている。

また, Fc ドメインを持たない低分子抗体の精製には, IgG 型抗体で汎用される Protein A カラムを用いることができないため, 別のアフィニティーカラムに結合させるためのアミノ酸配列が導入される例もある。培養上清中の安定性が悪い等, 大量生産に適さない抗体は, 除外すべきである。

## C.2 ヒト Fc 領域を持つ抗体医薬品の Fc<sub>γ</sub> 受容体結合の種差

抗体医薬品の有効性・安全性には, 標的抗原との結合を介した作用の他, Fc<sub>γ</sub> 受容体の活性化を介した作用が関与する。Fc<sub>γ</sub> 受容体の活性化は, 抗体依存性細胞傷害作用に関与し, 抗腫瘍作用を期待する抗体医薬品の薬理作用発現に寄与する一方で, インフュージョン反応の発現等の有害反応につながる可能性もあることから, 非臨床試験に用いる動物種の選択や, 非臨床試験結果のヒトへの外挿の際には, 抗体医薬品と標的抗原の結合のみならず, Fc<sub>γ</sub> 受容体結合に関する種差を考慮する必要がある。

### C.2.1 Fc<sub>γ</sub> 受容体ファミリー

表 2 に, ヒト, マウス, 非ヒト霊長類の Fc<sub>γ</sub> 受容体ファミリーの特徴をまとめた。ヒトでは 4 つの活性化型受容体 (Fc<sub>γ</sub>RI, Fc<sub>γ</sub>RIIa, Fc<sub>γ</sub>RIIIa, Fc<sub>γ</sub>RIIIb) と 1 つの抑制性受容体 (Fc<sub>γ</sub>RIIb) が存在し, 抗腫瘍活性を目的とする抗体医薬品では

NK 細胞に発現する Fc<sub>γ</sub>RIIIa を介した ADCC 活性が主要な薬理メカニズムの一つとして知られている。最近では, マクロファージや好中球を介した抗体医薬品の細胞傷害活性の発揮における Fc<sub>γ</sub>RIIa および Fc<sub>γ</sub>RIIIb の関与が報告され, Fc<sub>γ</sub>RIIIa を含むこれら Fc<sub>γ</sub> 受容体への親和性を増強した抗体医薬品の開発が進展している。また炎症性サイトカインの中和など免疫系の抑制を目的とする抗体医薬品では抑制性受容体である Fc<sub>γ</sub>RIIb との親和性の向上も試みられている。

マウスには 3 つの活性化型 Fc<sub>γ</sub> 受容体 (Fc<sub>γ</sub>RI, Fc<sub>γ</sub>RIII, Fc<sub>γ</sub>RIV) と一つの抑制性 Fc<sub>γ</sub> 受容体 (Fc<sub>γ</sub>RII) が存在する。マウス Fc<sub>γ</sub>RI はヒト Fc<sub>γ</sub>RI の相同タンパク質であり, 主な機能はヒト・マウスともに抗原提示細胞における抗原-抗体複合体の貪食である。マウス Fc<sub>γ</sub>RII は抑制性の受容体であり, 構造的にも機能的にもヒト Fc<sub>γ</sub>RIIb と類似している。

一方, マウスには, ヒト Fc<sub>γ</sub>RIIa の直接的な相同タンパク質は存在しない。マウス Fc<sub>γ</sub>RIII は NK 細胞に発現する唯一の Fc<sub>γ</sub> 受容体であり, ヒト Fc<sub>γ</sub>RIIIa と同様に CD16 と命名されているが, 系統学的にはヒト Fc<sub>γ</sub>RIIa と類似している。しかし, マウス Fc<sub>γ</sub>RIII の細胞内ドメインには ITAM 配列が存在しないため, 機能的な面では, 細胞内ドメインに ITAM 配列を持つヒト Fc<sub>γ</sub>RIIa と異なる可能性が考えられる。

マウスにはヒト Fc<sub>γ</sub>RIII と一次配列上約 60% の相同性を有する Fc<sub>γ</sub>RIV が存在するが, Fc<sub>γ</sub>RIII をはじめとするヒトの低親和性 Fc<sub>γ</sub> 受容体と比較して, 単量体の IgG に対する結合親和性が高いことや, IgE 受容体としても機能すること等の特徴があり, マウス Fc<sub>γ</sub>RIV は, ヒトのどの Fc<sub>γ</sub> 受容体とも異なる特性を有する受容体である。

非ヒト霊長類はヒトと同様の各種 Fc<sub>γ</sub> 受容体を有しており, カニクイザルの Fc<sub>γ</sub> 受容体はヒトとの間で Fc<sub>γ</sub>RI 90%, Fc<sub>γ</sub>RIIa 89%, Fc<sub>γ</sub>RIIb 92%,

Fc $\gamma$ RIIIa 91%と一次構造上、高い同一性を有している。一方で、カニクイザル Fc $\gamma$ RIIIa ではヒト Fc $\gamma$ RIIIa において IgG との結合に關与するとされるアミノ酸残基が異なっており、ヒト IgG に対する結合親和性が異なることが報告されている。さらにカニクイザル、アカゲザルにはヒト Fc $\gamma$ RIIIb の相同タンパク質が存在しないことも大きな特徴の一つである。

### C.2.2 ヒト IgG サブクラスの Fc $\gamma$ 受容体結合性

図 7 に、SPR 解析により、ヒト IgG 由来 Fc 領域を持つ抗体医薬品のヒト Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ RI, IIa, IIIa) 結合親和性を解析した結果を示す。用いた抗体医薬品は、ヒトマウスキメラ型 IgG1 抗体 (セツキシマブ)、糖鎖改変型ヒト化 IgG1 抗体 (モガムリズマブ)、ヒト IgG2 抗体 (パニツムマブ)、ヒト化 IgG4 抗体 (ナタリズマブ) である。結合親和性の指標である  $K_D$  は、3 回の測定 of 平均値として示した。

各 Fc $\gamma$  受容体への抗体の結合および解離により、それぞれ特徴的なセンサーグラムが得られた。Fc $\gamma$ RI と抗体との結合及び解離は比較的遅く、また、 $K_D$  が数十 nM 程度と、高親和性を示した。Fc $\gamma$ RIIIa は、結合と解離がともに速く、 $K_D$  が数  $\mu$ M 程度と、低親和性を示した。

また、各サブクラスの抗体の Fc $\gamma$  受容体の結合性も特徴的なパターンを示した。Fc $\gamma$ RI との結合は、IgG2 では検出されず、IgG4 では、IgG1 より低親和性であった。Fc $\gamma$ RIIIa との結合は、IgG1、糖鎖改変 IgG1、IgG2、及び、IgG4 の 4 種類の抗体全てで検出されたが、IgG4 では他の 3 種類と比較して低親和性であった。Fc $\gamma$ RIIIa との結合親和性は、糖鎖改変 IgG1 で顕著に高く、糖鎖改変 IgG1 の  $K_D$  は、IgG1 に対して 1/6 程度であった。IgG2 及び IgG4 では、Fc $\gamma$ RIIIa との結合は、検出されなかった。

### C.2.3 ヒト IgG1-Fc 領域を持つ抗体医薬品のヒト、マウス、非ヒト霊長類 Fc $\gamma$ 受容体結合親和性

## 解析

図 8 に、ヒトマウスキメラ型 IgG1 抗体インフリキシマブについて、ヒト、マウス、及び、カニクイザル Fc $\gamma$  受容体結合親和性を解析した結果を示す。実験の繰り返し数が十分でないため、今年度の結果としては、センサーグラムの形状のみを示している。

ヒト IgG1-Fc を持つ抗体インフリキシマブとの結合性に関して、ヒトとマウスを比較すると、Fc $\gamma$ RI 結合性に関しては、マウス Fc $\gamma$ RI との結合速度および解離速度ともに大きく、ヒト Fc $\gamma$ RI と比較して、結合親和性が低い結果となった。

マウス Fc $\gamma$ RIII との結合は、結合及び解離速度が共に大きく、ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 結合と類似したセンサーグラムになった。マウス Fc $\gamma$ RIII との結合量が低く、リガンドとして用いた組換えタンパク質の失活等の可能性も考えられたが、マウス IgG2b であるムロモナブ CD3 を用いた実験では、マウス Fc $\gamma$ RIII との結合が十分検出されており (data not shown)、失活等が起こっている可能性は少ないと考えられる。ヒト Fc $\gamma$ RIIIb、及び、マウス Fc $\gamma$ RII との結合は、いずれも、結合速度、解離速度が大きいセンサーグラムとなり、類似していた。また、ヒトには存在しないマウス Fc $\gamma$ RIV に対して、ヒト IgG1-Fc を持つ抗体インフリキシマブは明確に結合性を示した。

## D. 考察

### D.1. 分子設計

抗体医薬品の分子設計において考慮すべきポイントについて、薬理、薬物動態、免疫原性、溶解性、安定性、製造工程、品質管理の効率の観点から考察した。抗体医薬品の分子設計は、生産用細胞株の樹立、治験薬製造、非臨床試験、臨床試験等からなる一連の開発過程の入り口である。生産に適した高発現株の樹立には、数か月以上の期間と多大な労力がかかるとされており、適切な生産用細胞を効率的に構築することが、開発初期段階での重要課題の一つとなっている。開発途中で

アミノ酸配列を変更することになると、生産用細胞の構築、非臨床試験等を全てやり直すことになるため、開発過程で考慮すべき事項を早期に明確化して解析を行い、必要に応じて改変を行う等、適切な分子設計を行うことが必要である。

## D.2. Fc 受容体結合性

SPR 法を用いた Fc<sub>γ</sub> 受容体結合性プロファイリングにより、ヒト IgG1、糖鎖改変 IgG1、IgG2、及び IgG4 由来 Fc を持つ抗体の Fc<sub>γ</sub> 受容体の特徴が明らかになった (図 7)。糖鎖改変 IgG1 抗体モガムリズマブでは、非改変 IgG1 由来 Fc を持つ抗体と比較して、Fc<sub>γ</sub>RIIIa 結合親和性が上昇していることが確認された。また、Fc<sub>γ</sub>RIIIb 結合親和性も上昇していた (data not shown)。モガムリズマブでは、フコシル化糖鎖の含量が低減されているが、これによる Fc<sub>γ</sub>RI 及び Fc<sub>γ</sub>RIIIa 結合への影響はあまりないことも確認された。

IgG2 抗体パニツムマブは、図に示した 3 種類の Fc<sub>γ</sub> 受容体の中では、Fc<sub>γ</sub>RIIIa にのみ結合性を示した。また、パニツムマブと Fc<sub>γ</sub>RIIIb 及び Fc<sub>γ</sub>RIIIb との結合は検出されなかった (data not shown)。これらの結果から、IgG2 は、専ら、Fc<sub>γ</sub>RIIIa を発現する好中球やマクロファージ等をエフェクターとする免疫応答を惹起すると考えられる。

IgG4 抗体ナタリズマブは、Fc<sub>γ</sub>RIIIa との結合性が検出されず、Fc<sub>γ</sub>RI 及び Fc<sub>γ</sub>RIIIa との結合親和性も低かった。IgG4 は、エフェクター活性が低いことが特徴とされており、その知見と一致する結果であった。

ヒト、マウス、カニクイザルの Fc<sub>γ</sub> 受容体結合親和性解析の結果から、ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とマウス Fc<sub>γ</sub> 受容体では、ヒト IgG1-Fc を持つ抗体医薬品の結合性が異なることが明らかになった。抗体医薬品の非臨床試験では、標的抗原トランスジェニックマウスやヒト由来癌細胞を移植したマウス等が用いられるが、マウスでは、Fc<sub>γ</sub> 受容体を介した生体応答が、ヒトと異なることを考慮して、

試験結果を解釈する必要があると考えられる。

ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とカニクイザル Fc<sub>γ</sub> 受容体の結合に顕著な差は認められなかったが、カニクイザルでは Fc<sub>γ</sub>RIIIb が存在しない点は、本質的に異なる点である。Fc<sub>γ</sub>RIIIb を介する反応が、非臨床試験では検出されていないことに留意する必要があるだろう。今年度は、ヒト IgG1 由来 Fc を持つインフリキシマブを例に、Fc<sub>γ</sub> 受容体結合性の解析を行ったが、他の IgG サブクラス由来 Fc を持つ抗体や、代表的な改変型抗体についても同様の解析を行い、改変型抗体医薬品の非臨床試験における留意点をまとめる予定である。

## E. 結論

抗体医薬品の分子設計における留意点を考察すると共に、Fc<sub>γ</sub> 受容体結合親和性の種差を解析し、以下の点を明らかにした。

- 1) 改変型医薬品の開発では、薬理作用や体内動態のみならず、免疫原性等の安全性、製剤化、及び、製造工程を考慮した分子設計を行うことが重要である。
- 2) ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とマウス Fc<sub>γ</sub> 受容体では、ヒト IgG1 由来 Fc を持つ抗体の結合親和性に相違が認められた。ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とカニクイザル Fc<sub>γ</sub> 受容体に対する抗体の結合性には、大きな違いはなかった。Fc<sub>γ</sub>RIIIb は、マウスやカニクイザルには存在しないため、非臨床試験結果のヒトへの外挿において、注意が必要である。

## F. 研究発表

### (1) 総説

- 1) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ: 抗体医薬品の分子設計 薬剤学 74(1), 1-8 (2014)
- 2) 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: 新薬開発にむけた臨床試験 (第 ~ 相臨床試験) での適切な投与量設定と有効性 / 安全性評価 第 4 章 ヒト初回投与量設定方法 第 2 節 バ



イオ医薬品 サイエンス&テクノロジー出版  
東京, pp. 72-86 (2013)

(2) 学会発表

- 1) 石井明子, 多田稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 次  
世代抗体医薬品の非臨床評価 日本薬学会  
第134年会シンポジウム 2014年3月 熊本

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

- (1) 特許取得 なし
- (2) 実用新案登録 なし
- (3) その他 なし

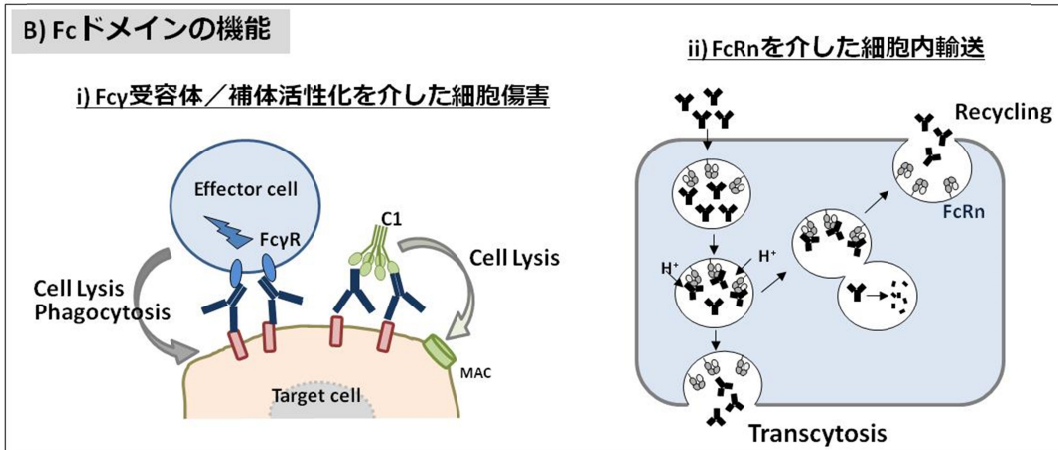
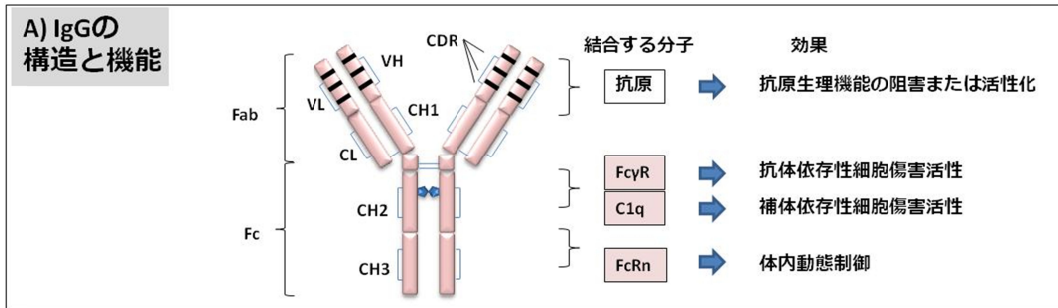
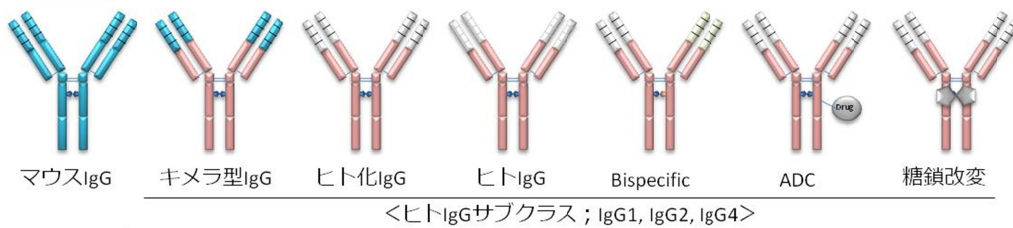


図 1 IgG の構造と機能

**IgG型抗体**



**低分子抗体**



**PK改良型低分子抗体**

分子量増大, FcRn結合性付与

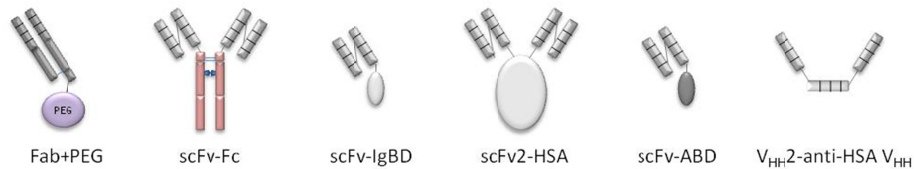


図2 抗体医薬品の骨格構造の例

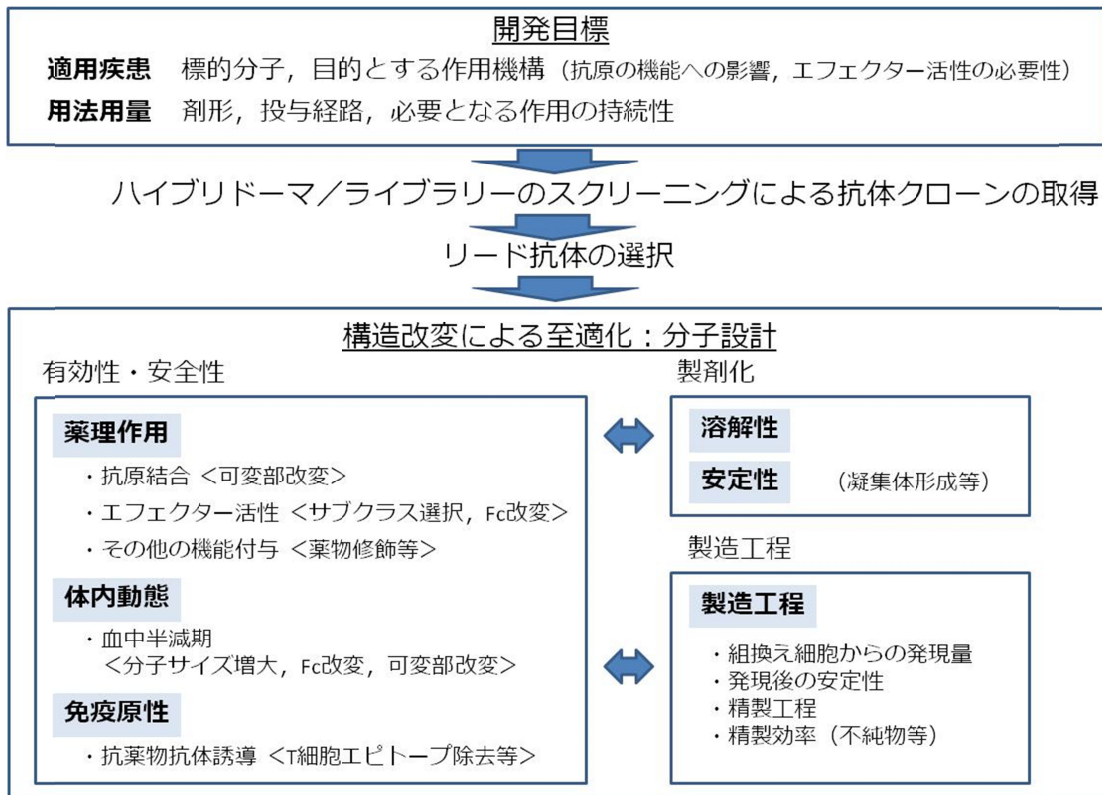


図3 開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計

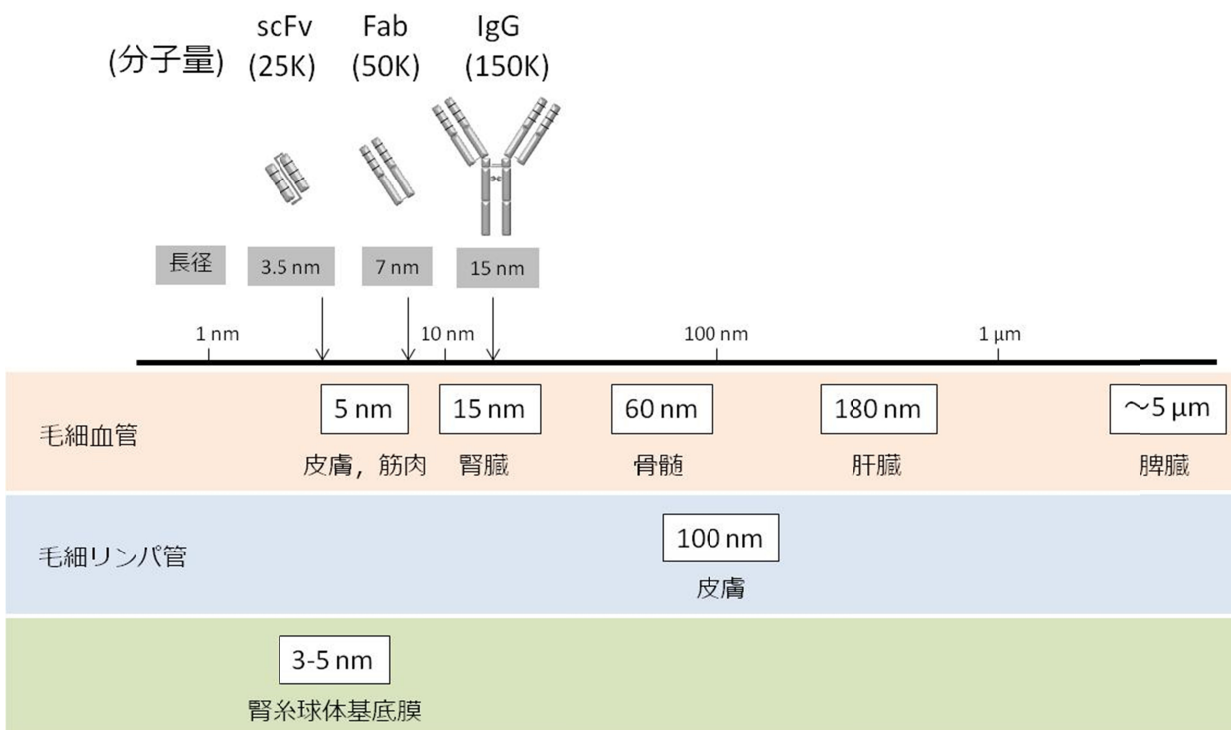


図4 抗体医薬品の分子量・分子サイズと細胞間隙経路の大きさ

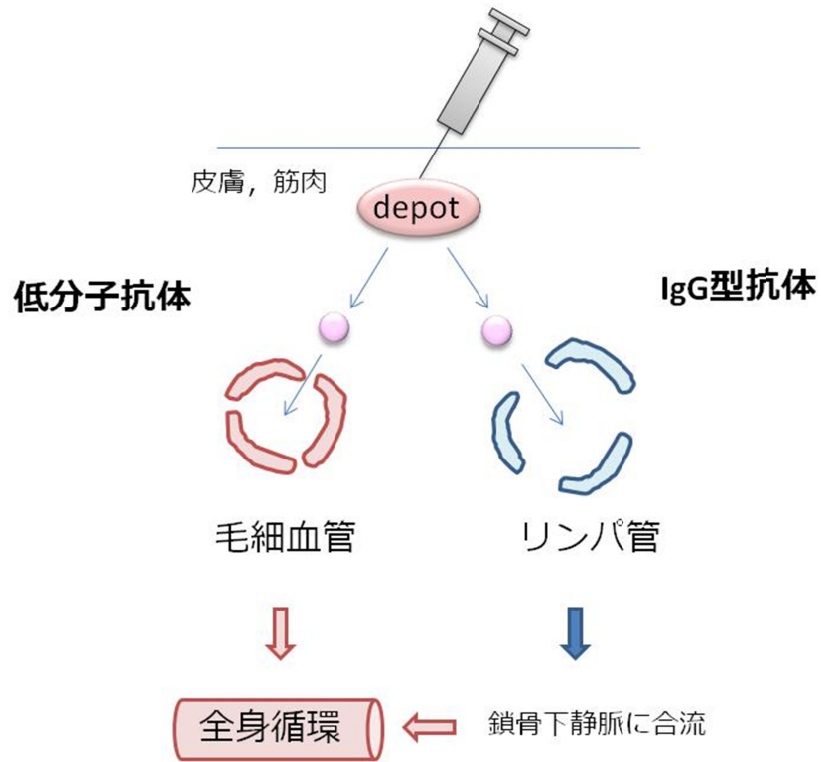


図5 皮下, 筋肉からの薬物の吸収

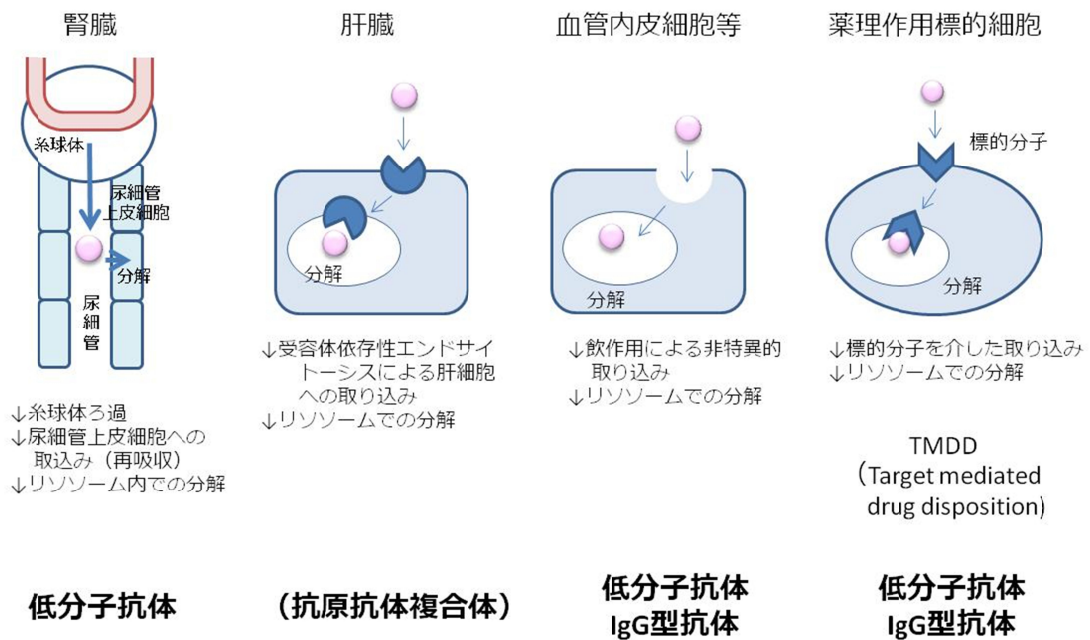


図6 種々の組織におけるバイオ医薬品の消失機構

表1 日本で承認された抗体医薬品の性状および投与経路

構造	標的分子	一般名	販売名	性状	投与経路	主な適用疾患
<b>抗腫瘍薬</b>						
マウス IgG1 <sub>K</sub> (MX-DTPA : <sup>90</sup> γ標識)	CD20	イブリツモマブ チウキセタン	ゼヴアリン イットリウム	溶液	点滴静注	β細胞性非ホジキンリンパ腫
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	CD20	リツキシマブ	リツキサン	溶液	点滴静注	β細胞性非ホジキンリンパ腫
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	EGFR	セツキシマブ	アービタックス	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	VEGF	ベバシズマブ	アバスチン	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	HER2	ペルツズマブ	パージェタ	溶液	点滴静注	乳がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	HER2	トラスツズマブ	ハーセプチン	凍結乾燥	点滴静注	転移性乳がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub> (糖鎖改変)	CCR4	モガムリスマブ	ボテリジオ	溶液	点滴静注	成人T細胞白血病リンパ腫
ヒト化 IgG4 <sub>K</sub> (カリケアマイシン修飾)	CD33	ゲムツズマブオゾガマイシン	マイロターグ	凍結乾燥	点滴静注	急性骨髄性白血病
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	CD20	オフアツムマブ	アーゼラ	溶液	点滴静注	慢性リンパ性白血病
ヒト IgG2 <sub>K</sub>	EGFR	パニツムマブ	ベクティビックス	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
<b>免疫調節薬</b>						
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	TNFα	インフリキシマブ	レミケード	凍結乾燥	点滴静注	関節リウマチ
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	CD25	バシリキシマブ	シムレクト	凍結乾燥	静脈内	腎移植後の急性拒絶反応抑制
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	IL6R	トシリズマブ	アクテムラ	溶液	点滴静注, 皮下	関節リウマチ
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	IgE	オマリズマブ	ゾレア	凍結乾燥	皮下	気管支喘息
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	RSウイルス	パリビズマブ	シナジス	凍結乾燥, 溶液	筋肉内	RSウイルス感染
ヒト化 Fab' (PEG化低分子抗体)	TNF抗体	セルトリスマブ ベゴル	シムジア	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	TNFα	アダリムマブ	ヒュミラ	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	IL12/IL23-p40	ウステキヌマブ	ステラーラ	溶液	皮下	尋常性乾癬
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	TNFα	ゴリムマブ	シンボニー	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	IL-1β	カナキヌマブ	イラリス	凍結乾燥	皮下	クリオピリン関連周期性症候群
ヒト IgG2/4 <sub>K</sub>	補体C5	エクリズマブ	ソリリス	溶液	点滴静注	発作性夜間ヘモグロビン尿症
<b>その他</b>						
ヒト化 Fab (低分子抗体)	VEGF	ラニズマブ	ルセンチス	溶液	硝子体内	加齢黄斑変性症
ヒト IgG2	RANKL	デノスマブ	ランマーク, プラリア	溶液	皮下	骨病変, 骨粗鬆症

表2 ヒト, マウス, 非ヒト霊長類の Fc $\gamma$  受容体ファミリーの特徴

ヒト	マウス	非ヒト霊長類
Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RI 構造, 発現分布および生理機能の点 でヒトとの類似性は比較的高い	Fc $\gamma$ RI ヒトとの相同性高い (90%)
Fc $\gamma$ RIIa	直接的な相同タンパク質は 存在しない	Fc $\gamma$ RIIa ヒトとの相同性高い (89%) ITAM部分の配列異なる
Fc $\gamma$ RIIb	Fc $\gamma$ RII	Fc $\gamma$ RIIb ヒトとの相同性高い (92%)
Fc $\gamma$ RIIIa	Fc $\gamma$ RIII NK細胞に発現. 細胞外領域の構造 はヒトFc $\gamma$ RIIIaにより近い.	Fc $\gamma$ RIIIa ヒトとの相同性高い (91%) IgG結合部位のアミノ酸配列異なる
Fc $\gamma$ RIIIb	なし	なし
	Fc $\gamma$ RIV IgGに対して比較的親和性高い IgE受容体としても機能	

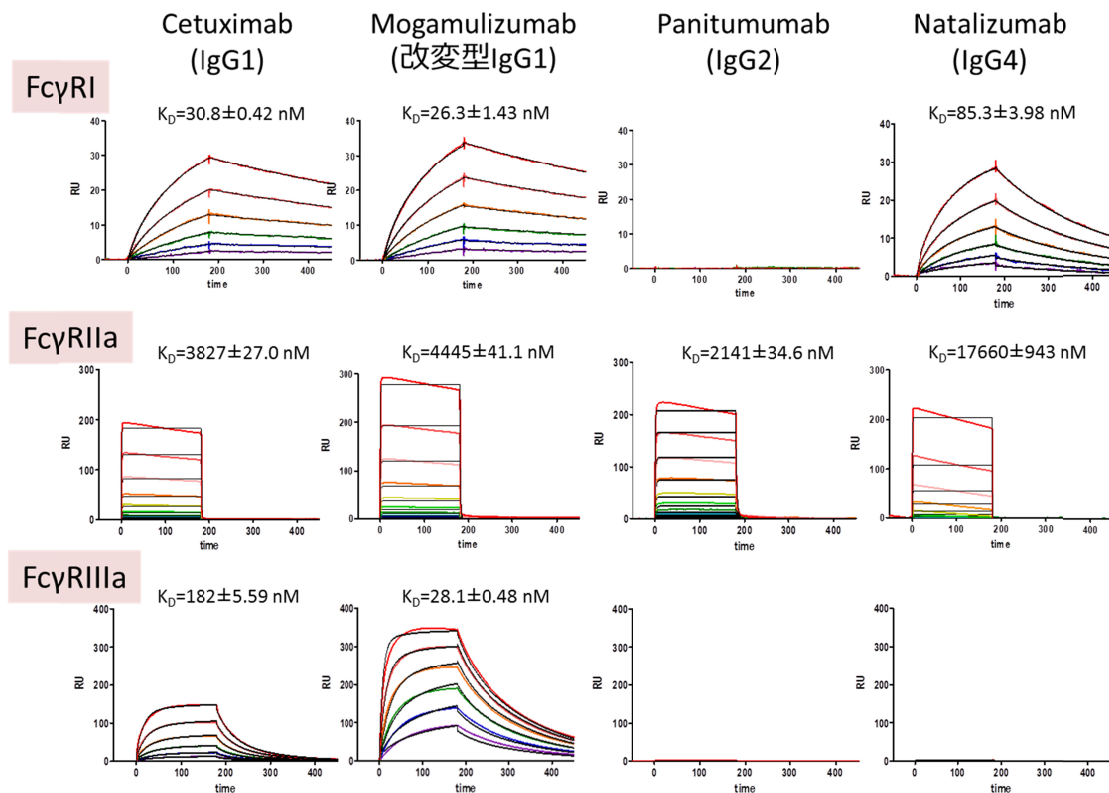


図7 SPR法によるヒト IgG 各サブクラスの抗体医薬品のヒト Fc 受容体結合親和性解析

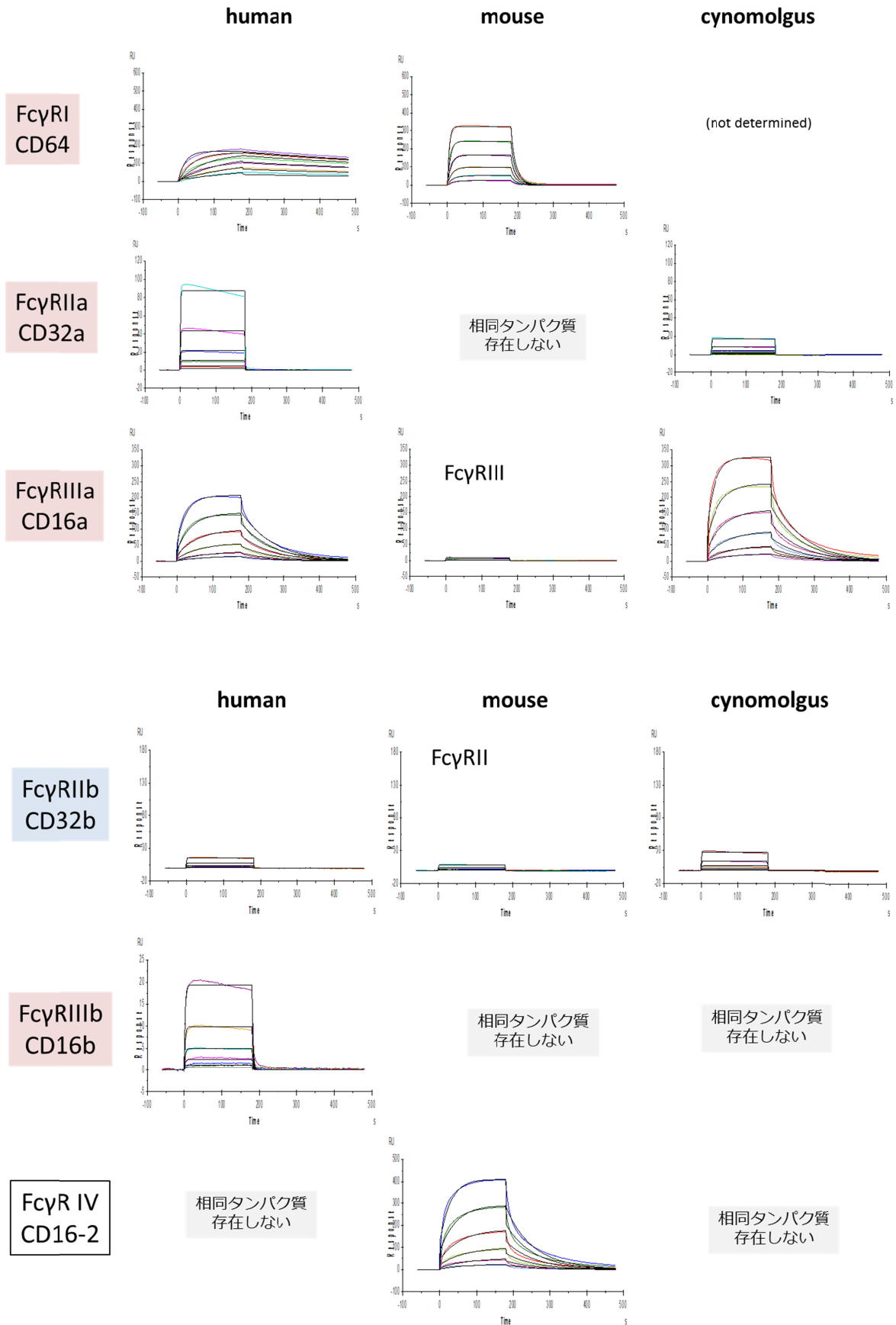


図8 ヒト IgG1Fc 領域を持つ抗体 (インフリキシマブ) のヒト, マウス, カニクイザル Fcγ 受容体結合親和性解析

