

Title	バイオシミラー製剤採用に向けたバイオ医薬品の安全性・有用性の評価
Author(s)	津山, 博匡; 中川, 潤一; 細井, 一広; 照井, 一史; 兵藤, 壘; 上野, 桂代; 早狩, 誠
Citation	弘前医学. 67, 2017, p.136-146
Issue Date	2017-02-27
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10129/6013">http://hdl.handle.net/10129/6013</a>
Rights	
Text version	publ isher



<http://repository.ul.hirosaki-u.ac.jp/dspace/>

原著

## バイオシミラー製剤採用に向けたバイオ医薬品の安全性・有用性の評価

津山博匡<sup>1)</sup> 中川潤一<sup>1)</sup> 細井一広<sup>1)</sup> 照井一史<sup>1)</sup>  
兵藤 壘<sup>1)</sup> 上野桂代<sup>1)</sup> 早狩 誠<sup>1,2)</sup>

**抄録** 本研究ではバイオ医薬品の純度について検討し、その安全性を評価することを目的とした。

糖鎖の付加がない単純タンパクである顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 製剤では、バイオシミラー (2社製) も含め純度について比較検討した。その結果、SDS-PAGE法、HPLC法、SELDI-TOF MS法において、先行品およびバイオシミラーは高純度のG-CSFを含んでいることが明らかとなり、安全性は問題がないことが明らかとなった。

また、バイオ医薬品の1つであるキメラ型抗体製剤 (infiximab) のエピトープマッピングを行い、投与患者に産生される中和抗体に対する抗原部位を検索した。その結果、少なくとも3箇所抗原部位を認め、中和抗体のマルチタイプの検索が今後の薬物療法への重要な指標となることを明らかにした。

弘前医学 67:136-146, 2017

**キーワード** : Filgrastim ; infliximab ; 中和抗体 ; エピトープマッピング。

### 緒言

科学の目覚ましい進歩は医療の現場にも波及し、各種難治性疾患の薬物療法が劇的に改善されてきた。特に遺伝子組換えや細胞融合、クローニングなどのバイオテクノロジーを駆使して製造されたバイオ医薬品が多数開発され、各種疾患の成因に関わる物質を標的とした分子標的薬の臨床応用は目覚ましいものがある。

バイオ医薬品の実用化は、ヒトインスリン製剤の開発に始まり、腎性貧血の治療薬エリスロポエチン、免疫力亢進によりがんの化学療法の補助やC型肝炎の治療に使用されるインターフェロン、低身長症の治療薬のヒト成長ホルモンなど、現在まで約230種類以上が臨床応用され、全医薬品売上の約20%を占めている。これらバイオ医薬品開発には膨大な時間と巨額な開発経費が必要であり、薬価も一般の医薬品と比較して非常に高価であり、バイオ医薬品の使用は国政での医薬品費や各医療機関の医薬品の購入費を増大させるなど、医療経済上大きな問題となってきている。このような背景からも先行医薬品に代わって、同効主成

分を含んだ後発医薬品 (バイオシミラー) の開発が望まれるところである。

近年、バイオ医薬品の特許切れから、多くのバイオシミラーが発売され医薬品費の高騰抑制に少なからず貢献している。このような医療事情からバイオ医薬品の市場規模は今後もさらに拡大することが想定されるとともにバイオシミラーの開発も活発化すると考えられるが、バイオシミラー製剤の品質に関するガイドライン等が輩出されている<sup>1,2)</sup>。

バイオ医薬品は、目的遺伝子を大腸菌 (E.coli) やマウス卵母細胞 (Chinese Hamster Ovary cell, CHO) 等に導入し大量に培養を行った後、発現した目的タンパク質を、原理の異なる各種クロマトグラフ法を駆使して培養液より精製した製剤である。一般に生化学の領域では各種タンパク質が混在する溶液から目的タンパク質を高い効率で均一に精製することは、非常に困難である場合が多い。嘗てブタやウシから分離されたインスリン製剤では、不純物によるアレルギー反応が生じた経緯もあることから、先行医薬品も含めて近年発売されているバイオシミラーにおける純度が懸念さ

<sup>1)</sup> 弘前大学医学部附属病院薬剤部

<sup>2)</sup> 弘前大学大学院医学研究科薬剤学講座

別刷請求先: 早狩 誠

平成28年6月23日受付

平成28年7月1日受理

れる。今回我々はバイオ医薬品として発売されている filgrastim 製剤の先行バイオ医薬品およびそのバイオシミュラーについて純度等を解析し安全性の評価を行うとともに、キメラ型抗体製剤の1つである infliximab のエピトープマッピングを行い、抗 infliximab 抗体の性状を解析し、二次無効となった患者に対する他剤の選択への考察を行った。

## 材料および方法

### 1. 試薬

Filgrastim(協和発酵キリン株式会社, 持田製薬株式会社, 日本化薬株式会社), infliximab(田辺三菱製薬株式会社), rituximab, tocilizumab, bevacizumab(いずれも中外製薬株式会社), adalimumab(エーザイ株式会社)の医薬品は各社より購入したものをを用いた。Infliximab のエピトープマッピングに用いた各種ペプチド(>90%)の合成はピーエイチジャパン株式会社(広島)に委託した。西洋わさびペルオキダーゼ(HRP)標識ウサギ抗 IgG 抗体(ECL 用)は GE Healthcare UK 株式会社(UK)より, ELISA 用 HRP 標識ウサギ抗 IgG 抗体、ECL 用ニトロセルロース膜そして等電点電気泳動用アンフォライトは Bio-Rad 社(Hercules, CA, USA)よりそれぞれ購入した。ELISA 用プレートは住友ベークライト株式会社(東京)製を用いた。ELISA 用発色試薬( $\alpha$ -フェニレンジアミン二塩酸塩, OPD), トリフルオロ酢酸(TFA), エーテル, HPLC 用アセトニトリル, およびクマージブリアントブルー(CBB)は和光純薬株式会社(東京)より購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

### 2. Filgrastim および抗体製剤の純度分析

#### 2-1. SDS-PAGE 法および immuno-blot 法による分析

試料の分離は Laemmli の方法<sup>3)</sup>によりアクリルアミド濃度(12.5%)ゲルを用いて行った。タンパクの検出は CBB 染色にて行った。

また、抗体製剤については、上記条件下 SDS-PAGE 法にて分離し、ニトロセルロース膜に転写後 3%スキムミルクにて 4℃一晩ブロッキング

を行った<sup>4)</sup>。一次抗体はウサギ抗 IgG 抗体(後述)を用い、二次抗体は HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(ECL 用)を用いて検出した。

#### 2-2. 逆相 HPLC 法による分析

Filgrastim の HPLC 分析は Elite LaChrom HPLC システム(日立)を用い以下の条件で行った。カラム; TSK-80<sup>TM</sup> (4.6 x 250 mm, TOSOH, 東京), 溶離液; A:0.1% TFA 用液, B:80%/アセトニトリル(0.1% TFA を含む)の 2 種, グラジエント条件; 0-3分 A:B=90:10, 3-60分 A:B=40:60, 流速; 1.0 ml/min, 試料注入量; 50  $\mu$ l, カラム温度 35℃ とした。ピークの検出には Diode Array Detector (HITACHI L-2455, 東京)を用い, 測定波長は 230 nm とした。

#### 2-3. SELDI-TOF MS 法による分析

Filgrastim の質量分析には SELDI Protein Chip System 装置(Bio-Rad 社製, Hercules, CA, USA)を用いた。なお、分析用 Protein Chip は NP20 (Bio-Rad 社製, Hercules, CA, USA)を用いた。

### 3. Infliximab の等電点電気泳動による分析

Infliximab の等電点電気泳動は、以下の方法にて行った<sup>5)</sup>。アクリルアミドゲル濃度は 4.2%, ワイドレンジアンフォライト(pH 3-10)濃度は 2% とし、試料は 5  $\mu$ g/lane とした。陽極に 0.01 M リン酸、陰極に 0.02 M NaOH を用い、4℃にて一昼夜泳動を行った。泳動後のタンパク質は CBB 染色にて検出した。

### 4. 抗 infliximab 抗体の作成

抗 infliximab 抗体の作製は、ペプチド抗体作製法を参考にして行った<sup>6)</sup>。Infliximab(1 mg/回)とアジュバンドとを混合しエマルジョンにしたものを 10 日間隔でウサギ背部(約 10 箇所)に皮下注射して作製した。

なお、抗体の産生は、ELISA 法により検出した。マトリックとして infliximab(2  $\mu$ g/well)を 4℃一晩静置してコーティングした。抗体の産生はウサギ耳静脈より採取した血液を遠心分離して得た血清を希釈して一次抗体として用いて確認した。

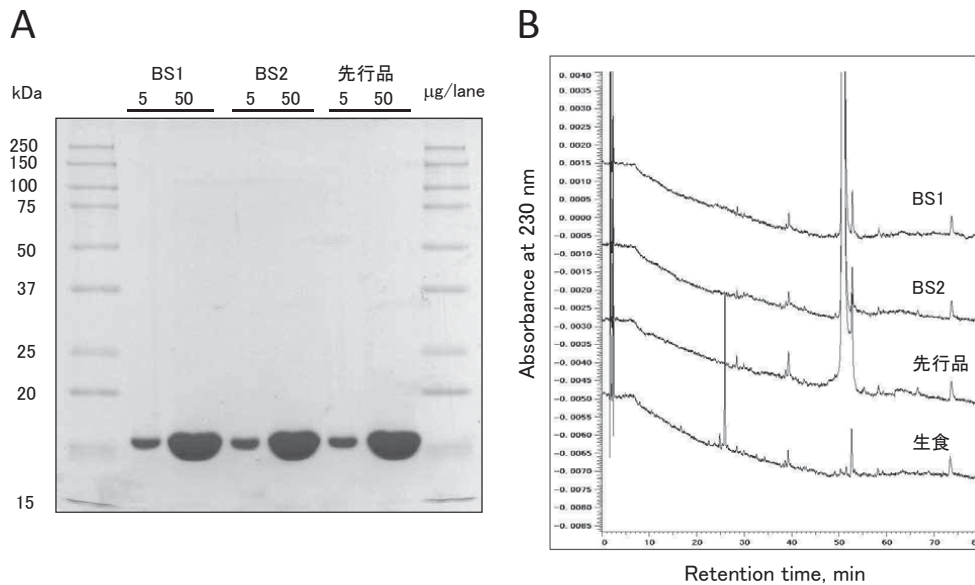


図1 各種 filgrastim 製剤の SDS-PAGE 法(A)および HPLC 法による分析(B).

BS1 および BS2: バイオシミラー 2 社製.

条件: SDS-PAGE 用各試料は 2-メルカプトエタノール存在下加熱処理を行った.

HPLC 用試料はすべて 37.5 µg 注入量とした.

## 5. Infliximab のエピトームマッピング法

Infliximab の H 鎖 (Glu<sup>1</sup>-Glu<sup>155</sup>) および L 鎖 (Asp<sup>1</sup>-Tyr<sup>140</sup>) の N 末端より 20 残基毎にペプチドをオーバーラッピング (5 残基を交叉) させて合成した<sup>7, 8)</sup> (図 6, 表 1).

エピトームマッピングは ELISA プレートを用いて行った. マトリックスとして infliximab (0.25 µg/well) を一晩 4 °C にて ELISA 用プレートにコーティングした. 次にウサギ抗 infliximab 抗体 (最終希釈: 128,000 倍, 1% スキムミルクにて希釈) と合成した各ペプチドの溶解液 (最終濃度 25 nmoles/ml, 20 mM PBS pH 7.2 に溶解) とを一晩 4 °C にて反応させた後, 13,500 rpm にて遠心操作を行った. その上清を一次抗体として well に添加し, マトリックスと 2 時間反応させた. 反応後二次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体溶液 (2,000 倍) を加え, 室温にて 1 時間反応させ基質 (ODP) 溶液を加え 5 分間酵素反応を行った. 4N 硫酸 (50 µl) にて反応停止後発色液の吸光度はプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad 社) を用い波長 490 nm にて測定した.

## 6. タンパク質の定量

タンパク量は Bradford<sup>9)</sup> によって定量した. ウシ血清アルブミンを標準物質として検量線を作製し, 発色液はプロテインアッセイキット (Bio-Rad 社) を用いた. 反応はマイクロタイタープレートで行い, 吸光度はプレートリーダーを用い 595 nm で測定した.

## 結 果

### 1. 遺伝子組換え G-CSF 製剤の品質

2014 年までに製造販売されていた先行バイオ医薬品およびバイオシミラーが発売されていた G-CSF 製剤 (filgrastim) を各種分析法にて純度・品質について検討した.

#### 1-1. Filgrastim 製剤の SDS-PAGE 法による分析

Filgrastim 製剤について SDS-PAGE 法による純度の分析を行った. その結果, 先行品およびいずれのバイオシミラー製剤いずれもの試料 (5 µg/lane) にも主成分である filgrastim の存在を示すバンドが検出できた. また 10 倍量の試料を用いた分析においても, filgrastim 以外に高分子量の不

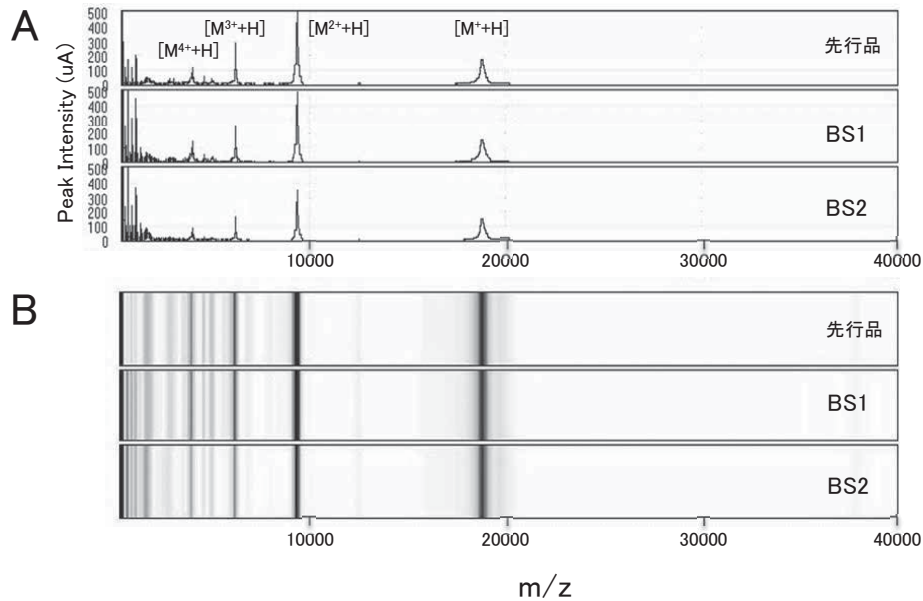


図2 各種 filgrastim 製剤の SELDI-TOF MS 分析。  
A：マスキロマトグラム，B：MSのgel view。  
BS1およびBS2：バイオシミラー2社製。

純物は検出できなかった(図1, A)。

### 1-2. Filgrastim 製剤の HPLC 法による分析

大腸菌に発現させた filgrastim は分子量約190 kDa の糖鎖が結合していない単純タンパク質であることから，低分子の分析が可能な HPLC 法による先行品ならびにバイオシミラー2剤について分析を行った。その結果，いずれの試料においても不純物と思われるピークは検出されなかった(図1, B)。

### 1-3. Filgrastim 製剤の SELDI-TOF MS 法による分析

SELDI-TOF MS 法では塩の混在が測定を部外することから，各社 filgrastim 製剤から固相抽出を行った。抽出後0.1% TFA 溶液に溶解，常法にて Protein Chip(NP-20)を用いて SELDI-TOF MS 装置で質量分析を行った。その結果，まず先行品では filgrastim(MW:18798.61)由来の1価イオン( $M^++H$ )，2価イオン( $M^{2++H}$ )，3価イオン( $M^{3++H}$ )および4価イオン( $M^{4++H}$ )のシグナルが検出された。同様にいずれのバイオシミラー製剤においても同様のシグナルが検出された(図2)。

## 2. 各種遺伝子組換え抗体製剤の品質

バイオ医薬品の中には抗体製剤も存在し，現在

抗体の抗原認識部位の可変領域(Fab 部分)にマウスのアミノ酸配列を抗体分子全体の約25%の比率で導入したキメラ型抗体，さらにマウス部分による有害事象(中和抗体の産生等)を抑制するために抗原認識部分の改変が行われマウスのアミノ酸配列部分を約5%の比率としたヒト化型抗体，そして抗体の全アミノ酸配列をヒトの配列に置換した完全ヒト型抗体が作製されている。本検討では，これらの中で代表的な抗体製剤5剤について品質等について検討を行った。

### 2-1. 遺伝子組換え抗体製剤の SDS-PAGE 法による分析

今回分析対象とした遺伝子組換え抗体製剤は，キメラ抗体(infliximab および rituximab)，ヒト化抗体(tocilizumab および bevacizumab)，そしてヒト抗体(adalimumab)を用いた。これらの製剤について SDS-PAGE 法による分析を行った。各試料(5  $\mu\text{g}/\text{lane}$  および 50  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )を還元条件下泳動後，CBB 染色により各タンパク質を検出した。その結果，全ての試料において，IgG の構成成分である分子量約50 kDa のH鎖，および分子量約25 kDa のL鎖に分離され，主成分の各種抗体の含有を認めた(図3：A)。また，10倍量の試料(50  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )を用いた分析では各試料におい

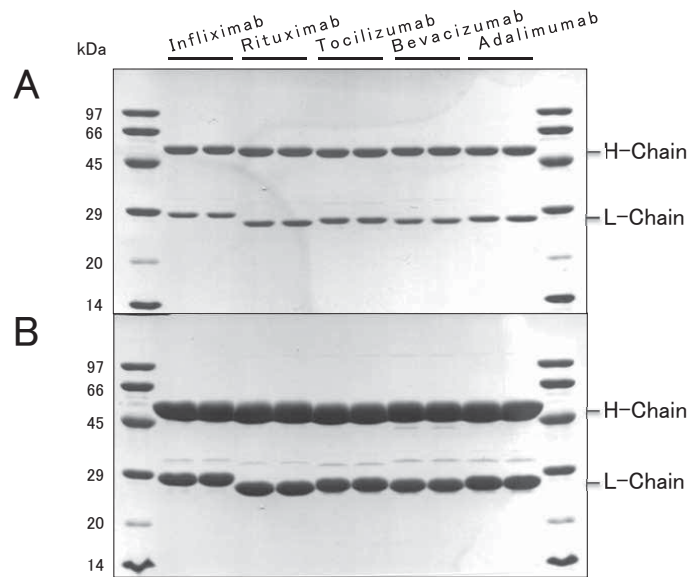


図3 各種抗体製剤のSDS-PAGE法による分析.

A: 各試料チャージ量, 5  $\mu\text{g}/\text{lane}$ .

B: 各試料チャージ量, 50  $\mu\text{g}/\text{lane}$ . タンパク質はCBB染色にて検出.

H-Chain: heavy-chain, L-Chain: light-chain.

てH鎖およびL鎖以外に分子量約100 kDa および30kDaの複数のバンドが検出され(図3:B), 各製剤は抗体以外に複数の不純物を含んでいる可能性が示唆された(図3:A, B).

## 2-2. キメラ型遺伝子組換え抗体製剤の等電点電気泳動法による分析

IgG 抗体のH鎖には糖鎖が結合している. さらにこの糖鎖構造が抗体製剤の生理活性(CDC活性: complement-dependent cytotoxicity およびADCC 活性: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)に影響を及ぼすことが明らかになっている. 本検討では構成糖の電荷等に依存した分離が得られる等電点電気泳動法による分離を行い, 糖鎖構造の違いの解析方法としての有用性を検討するため, キメラ抗体(infliximab)を用いてpH3-10のpHグラジエント勾配にて分離を行った. その結果, 再現性良く分離された(図4).

## 3. ウサギ抗 infliximab 抗体の作成およびその特性

本研究では, 血中 infliximab 濃度測定法の開発を目的としてウサギにて抗 infliximab 抗体を作製した. なお本実験は弘前大学動物実験指針に沿っ

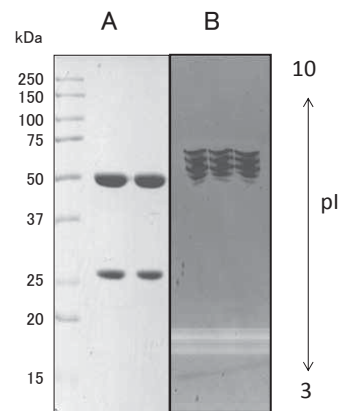


図4 Infliximab の等電点電気泳動法による分離.

A: SDS-PAGE法: チャージ量, 5  $\mu\text{g}/\text{lane}$ .

B: 等電点電気泳動法: チャージ量, 10  $\mu\text{g}/\text{lane}$ .

て行われた(承認番号M15019).

## 3-1. 抗 infliximab 抗体の免疫交叉性

作製した抗体の特異性について検討を行った. その結果, キメラ型抗体製剤, ヒト化抗体製剤, そしてヒト抗体製剤のすべてのH鎖およびL鎖と交叉性を示した(図5).

## 3-2. Infliximab のエピトープマッピング

今回作製した抗体は infliximab のみならず

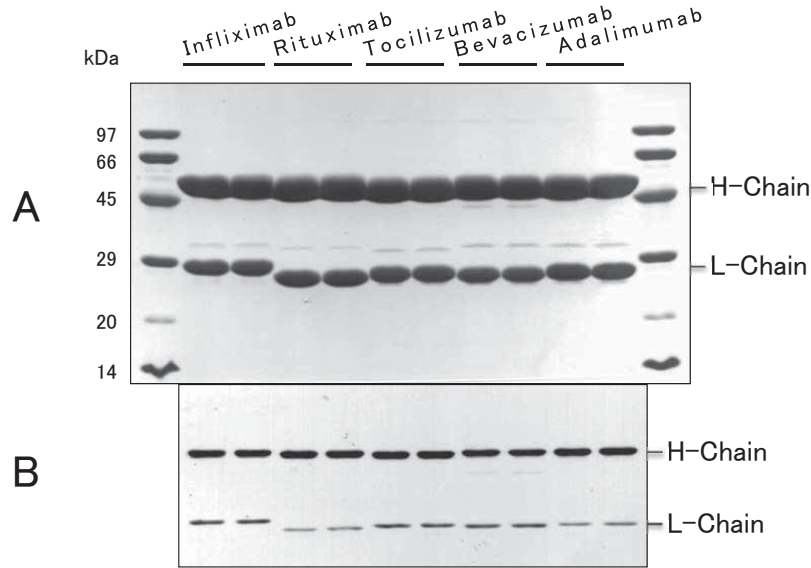


図5 ウサギ抗 infliximab 抗体による各種抗体製剤との反応性。  
 A：各種抗体製剤の SDS-PAGE 法による分析. 各試料チャージ量, 50 µg/lane.  
 タンパク質は CBB 染色にて検出。  
 B：各種抗体製剤のイムノプロット法による分析. 各試料チャージ量, 2.5 µg/lane.  
 一次抗体：ウサギ抗 infliximab 抗体(4,000倍希釈),  
 二次抗体：HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体(2,000倍希釈).



図6 Infliximabの一次構造(HおよびL鎖).  
 太字部分：マウス由来アミノ酸配列部分. 点線：分子内S-S結合.

多数の遺伝子組替え製剤と免疫交叉性を示し, infliximab の TDM 解析には使用できないことが懸念されたことから, infliximab に特異性の高い抗体の作製を目指し, infliximab の H鎖および L鎖それぞれの N末端に存在するマウスのアミノ

酸配列部位を主体に, エピトープマッピングを行った(図6, 表1), その結果, H鎖では Glu<sup>1</sup>~Asp<sup>35</sup>(マウス配列部分, Fab 領域 V<sub>H</sub>部)および Tyr<sup>106</sup>~Gly<sup>125</sup>(Fab 領域 V<sub>H</sub>部), L鎖では Asp<sup>1</sup>~Ser<sup>20</sup>(マウス配列部分, Fab 領域 V<sub>L</sub>部)におい

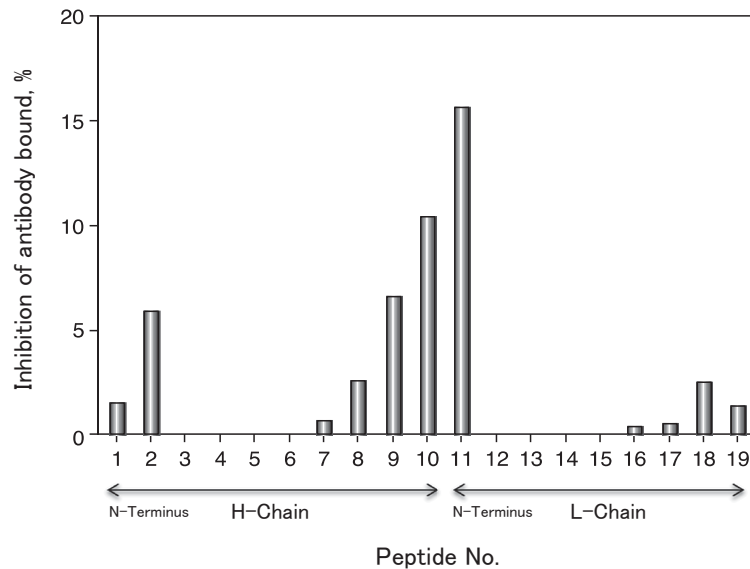


図7 ウサギ抗 infliximab 抗体による infliximab のエピトープマッピング。  
 ①~⑩：C-Chain での合成ペプチド番号, ⑪~⑲：L-Chainでの合成ペプチド番号。  
 一次抗体：ウサギ抗 infliximab 抗体(5,000倍希釈),  
 二次抗体：HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体(2,000倍希釈).

表1 エピトープマッピングに使用した infliximab におけるアミノ酸配列.

	Peptide No.	Position in Infliximab	Sequence of Peptides	Region in Infliximab
H-Chain	①	1 - 20	EVKLEESGGGLVQPGGSMKL	Fab, V <sub>H</sub>
	②	16 - 35	GSMKLSCVASGFIFSNHWMN	Fab, V <sub>H</sub>
	③	31 - 50	NHWMNWVRQSPEKGLEWVAE	Fab, V <sub>H</sub>
	④	46 - 65	EWVAEIRSKSINSATHYAES	Fab, V <sub>H</sub>
	⑤	61 - 80	HYAESVKGRFTISRDDSKSA	Fab, V <sub>H</sub>
	⑥	76 - 95	DSKSAVYLQMTDLRTEDTGV	Fab, V <sub>H</sub>
	⑦	91 - 110	EDTGVYYCSRNYYGSTYDYW	Fab, V <sub>H</sub>
	⑧	106 - 125	TYDYWGQGTTLTVSSASKTG	Fab, V <sub>H</sub>
	⑨	121 - 140	ASKTGPSPVFPLAPSSKSTSG	Fab, C <sub>H1</sub>
	⑩	136 - 155	KSTSGGTAALGCLVKDYFPE	Fab, C <sub>H1</sub>
L-Chain	⑪	1 - 20	DILLTQSPAILSVPGERVS	Fab, V <sub>L</sub>
	⑫	16 - 35	GERVSFSCRASQFVGSSIHV	Fab, V <sub>L</sub>
	⑬	31 - 50	SSIHVYQRTNGSPRLIKY	Fab, V <sub>L</sub>
	⑭	46 - 65	LLIKYASEMSGIPSRFSGS	Fab, V <sub>L</sub>
	⑮	61 - 80	RFSGSGGTDFTLSINTVES	Fab, V <sub>L</sub>
	⑯	76 - 95	NTVESEDIADYICQQSHSWP	Fab, V <sub>L</sub>
	⑰	91 - 110	SHSWPFTFGSGTNLEVKRTV	Fab, V <sub>L</sub>
	⑱	106 - 125	VKRTVAAPSVFIFPPSDEQL	Fab, C <sub>L</sub>
	⑲	121 - 140	SDEQLKSGTASVVCLLNNFY	Fab, C <sub>L</sub>

太字：オーバーラップ配列部分.

て抗体と反応性を示した(図7).

## 考 察

バイオ医薬品の実用化は、ヒトインスリン製剤の開発に始まり、現在まで約230種類以上が発売

されている。2014年では悪性黒色腫に対するバイオ医薬品が発売され、その後肺がんにも適応が拡大された。この薬剤は優れた治療効果とともに高額な医療費が課題になっている。

一方これらバイオ医薬品の申請特許切れから、多くの後発医薬品、所謂バイオシミラーも発売さ



れ医療費の高騰の抑制に少なからず貢献している。このような医療事情からバイオシミラーの開発も活発化すると考えられるが、バイオシミラーは、化学物質を主体とし、しかも主成分が同一である後発医薬品とは異なり、成分が生体成分であり、培養細胞にて作製することから、目的タンパク質は必ずしも同一とは限らないとされることから「同等性/同質性」という表現で品質を評価している<sup>1)</sup>。

また、バイオ医薬品では化学物質が主成分の医薬品で生じてきた有害事象とは全く異なる有害事象が発生することも知られている<sup>1,2)</sup>。従って優れた治療効果もさることながら安全性には十分な配慮が求められる。特にタンパク質の精製は生化学領域では困難であることが知られている。事実ソマトスタチンの遺伝子組換え製剤の開発(治験)過程において、発現細胞である大腸菌由来のタンパク質が混入し、被験者の60%に抗体の産生された事例が報告されている。

このような背景からバイオ医薬品における純度等の品質に関する情報は、患者への安全な薬物療法において重要な情報である。本研究では、近年バイオシミラーが発売されたG-CSF製剤および各種(キメラ型、ヒト化型、そしてヒト型)抗体製剤の純度について解析を行った。さらに投与により患者自身に、薬効を減じる中和抗体が産生されることが知られているキメラ抗体製剤の1つ infliximab に対する抗体をウサギにて作製し、その性状を解析しTDMへの有用性および中和抗体産生患者でのバイオシミラーの使用や他剤の選択について考察を行った。

まず、G-CSF製剤(filgrastim)について、先行品およびバイオシミラー(2製剤)についてその純度を、1)SDS-PAGE法、2)逆相系HPLC法、3)MALDI-TOF MS法により解析を行ったが、いずれの分析法においても、filgrastim以外に不純物の存在は認められなかった(図1、2)。しかしながら、filgrastimの構造にはMetが4残基そしてCysが5残基存在している<sup>10,11)</sup>。生合成・精製過程におけるMetの酸化や化学修飾(フォルミル化)が生じるとされているが<sup>12)</sup>、今回の検討ではMS分析にてfilgrastim由来のピークがシングルピークを示したことから(図2)、filgrastim

への化学修飾は生じていないと考えられた。また、filgrastim分子内では、Cys<sup>37</sup>-Cys<sup>43</sup>およびCys<sup>65</sup>-Cys<sup>75</sup>間でS-S結合を形成し、三次構造を維持しているとされる。一方Cys<sup>18</sup>はSH基がフリーであり、培養細胞内でfilgrastimが生合成される過程でこのCys<sup>18</sup>と他の位置のCysとのS-S結合が形成される可能性も考えられる。このような構造を有するfilgrastimはG-CSF受容体と結合ができず、薬理活性を失うことが予想されるが、本検討ではその存在を見出すことはできなかった。しかしながらfilgrastimの発現時に用いた培養細胞内(大腸菌)ではリボソーム上でタンパク合成後、disulfide bond因子と呼ばれる一連の酵素群が存在し、効率よくS-S結合が形成されていると報告されている<sup>13)</sup>。またタンパク質の生合成過程でフォールディング等に異常をきたしたタンパク質は、細胞内に存在するシャペロン分子の働きにより、速やかに修復または消去される機構が備わっており、構造が異常なfilgrastimは除去されていると考えられる。以上先行品およびバイオシミラー2社製のfilgrastim製剤の品質についてはいずれも高純度にfilgrastimを含む製剤であることが考えられた。

## 各種抗体製剤について

### 1. 品質について

抗体製剤では、タンパク質が不純物として混在する場合はインフュージョンリアクションやアレルギー反応の原因物質となる可能性が高いことから、これらの製剤の純度に関する情報は有害事象の未然防止やその原因の探求でも重要な情報である。今回の検討ではキメラ型、ヒト化、そして完全ヒト型製剤について純度の検討を行った。その結果、全ての抗体製剤において主成分である分子量約50 kDaの糖鎖を含むH鎖および分子量25 kDaの単純タンパク質のL鎖を示すバンドが検出され、さらに極微量の高分子物質の存在が認められた(図3)。これらの物質の同定を行うことができなかったため、これらの物質がアレルギー反応等の原因物質であるかは今後検討を行う必要がある。

また、抗体製剤のH鎖には糖鎖が結合し、これの構造の維持は抗体製剤の薬理活性であるCDC

活性および ADCC 活性に大きく影響を及ぼすことが知られている<sup>14)</sup>。タンパク質内での構成糖は分子の荷電に大きく影響を及ぼすことから、本研究では分析手段として、等電点電気泳動法による分離の妥当性について検討を行った。その結果、infiximab では複数のバンドが得られ、今後バイオシミラーとの品質比較試験として有用であることが明らかとなった(図4)。

Infiximab は関節リウマチやクローン病等の疾患の増悪因子である TNF- $\alpha$  を認識する抗体製剤として開発されたバイオ医薬品であり、優れた治療効果から多くの患者に使用されている。Infiximab は構造内の cysteine 残基に存在する SH 基を介し複数の S-S 結合を形成することにより二次構造を維持しているが、infiximab の H 鎖および L 鎖の N 末端領域は TNF- $\alpha$  との結合部位である。この領域のアミノ酸配列は各種抗原に対して特徴的な配列を示す。Infiximab のこの部位はマウスのアミノ酸配列を含むキメラ抗体であり、その部分は抗体分子の約25%を締めていることから、infiximab 製剤が投与された場合ではマウス配列部分に対する抗体(human anti-chimeric antibody;HACA)が疾患患者に産生され、infiximab の効果を減弱し寛解期間も短縮することが推定されている<sup>15-17)</sup>。現在では本剤投与時には HACA の産生を抑制するために免疫調整薬(methotrexate, azathioprine, mercaptopurine 等)が併用されている場合が多い。さらに適応疾患の1つである関節性リウマチにおいて infiximab の効果が不十分な場合(二次無効)では2009年より増量投与が認められた<sup>18, 19)</sup>。

しかしながら、一般にウサギ等に抗体を作製する際には、最後に抗原そのものを投与し抗体価を高める手技がとられる(ブースター効果)。一旦 HACA が産生された二次無効の患者に抗原となる infiximab を増量投与することは、ブースター効果により HACA の産生を増長する可能性もあり、このようなケースでは患者の予後に十分な注意を払う必要があると考えられる。さらに先発品からバイオシミラーへの切り替えは、HACA の産生状況を十分に把握した上で行うことが重要とされている<sup>20)</sup>。

一方、infiximab のようなキメラ抗体投与時の

HACA 産生抑制のため、技術的な改善が行われマウス部分の比率を約5%に削減したヒト化型抗体、そして配列を完全にヒト型としたヒト型抗体が開発されてきた。

今回我々はウサギにて infiximab に対する抗体を作製し、その抗体の性状を解析した。まず各種抗体製剤との免疫交叉性を検討したところ、検討したすべての製剤と反応性を示した。Infiximab はヒト IgG<sub>1</sub> 部分を約75%有していることから、ヒト免疫グロブリン(IgG)による吸収操作による検討を行ったが、各種抗体製剤の H 鎖と強い反応性を示した(図5)。この結果は、adalimumab のように完全ヒト型 IgG の構造を有していても、免疫原性は残存している可能性が高いことを示している。事実 adalimumab においても中和抗体が産生されている<sup>21)</sup>。また、infiximab 投与時では IgE 依存性のアナフィラキシー反応を生じることとも報告されており<sup>22)</sup>、infiximab 希釈溶液によるスキントテストも有用とされている<sup>23)</sup>。

薬剤が患者に投与された場合では、その薬剤の有効性を判断する情報として TDM 解析が必要である。今回我々は特異性の高い infiximab の血中濃度測定用抗体の作製を目的として、ウサギにて infiximab の抗体を作製し、その抗体を用い infiximab のエピトープマッピングを行った。その結果、H 鎖では N 末端のマウス配列部分(Glu<sup>1</sup>-Asn<sup>35</sup>) およびそれ以外の部分(Tyr<sup>106</sup>-Glu<sup>155</sup>)、そして L 鎖の N 末端部位(Asp<sup>1</sup>-Ser<sup>20</sup>)に免疫原性を見出すことができた(図7)。Infiximab の H 鎖および L 鎖の N 末端部位はマウスのアミノ酸配列であることから、抗原性を有することは想定できたが、これらの部位以外の部位にも抗原性を有することが明らかとなった(図7)。従って infiximab の構造内には複数の抗原部位が存在することが想定される。通常生体は体内に侵入してきた抗原に対して抗体を産生するが、体内で産生された抗体は抗原として認識されないような機構が機能していることが予測される。しかしながら、ヒト IgG 製剤(免疫グロブリン製剤)にて吸収操作を行った場合でも、ウサギ抗 infiximab 抗体は各種抗体製剤の H 鎖部分と強い反応性を示したことから(データ未掲載)、培養細胞で作製した infiximab のヒト IgG 部分の構造はネイティブなヒト IgG

の構造と若干異なる構造を有し、特に分子の表面部分に差異を生じ、その部分がエピトープとなり中和抗体が産生されている可能性も想定される。Infliximab 投与時に二次無効となった患者では、infiximab の血液中濃度とともに、産生された HACA の性状(アイソタイプ)の情報を得ることは、他の抗体製剤への切り替えに際し貴重な情報となることが考えられる。

さらに、infiximab の有効性の判定には、血液中濃度解析も重要な指標となる。現在市販されている血中 infiximab 測定用キットは血清中に存在する妨害タンパク質により定量値に誤差を生じる場合も報告されていることから、infiximab により特異性の高い抗体を作製し、infiximab を正確に測定可能な検出法の開発は今後の薬物療法において重要と考えられる。今後本研究で得られた infiximab のエピトープ部位のペプチドを用いた抗体を利用し特異性の高い定量法を開発し、診療に貢献する予定である。

## 文 献

- 1)「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(平成21年3月4日付薬食審査第0304007号, 2009.)
- 2)「遺伝子組換え製剤について-厚生労働省」[www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/2a/dl/2c.pdf](http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/2a/dl/2c.pdf).
- 3) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
- 4) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:4350-4.
- 5) 口野嘉幸, 平井久丸, 櫻林郁之介. 遺伝子・タンパク質「実験操作プロトコリング法」. 東京: ライフサイエンス社; 1978. p.239-40.
- 6) 大海 忍, 辻村邦夫, 稲垣昌樹. 細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ 抗ペプチド抗体実験プロトコル -ペプチド合成からタンパク質機能解析まで-; 1994. p.48-73.
- 7) Atassi MZ, Dolimbek BZ, Hayakari M, Middlebrook JL, Whitney B, Oshima M. Mapping of the antibody-binding regions on botulinum neurotoxin H-chain domain 855-1296 with antitoxin antibodies from three host species. *J Protein Chem*. 1996;15:691-700.
- 8) Oshima M, Hayakari M, Middlebrook JL, Atassi MZ. Immune recognition of botulinum neurotoxin type A: regions recognized by T cells and antibodies against the protective H(C) fragment (residues 855-1296) of the toxin. *Mol Immunol*. 1997;34:1031-40.
- 9) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- 10) Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*. 1986;319:415-8.
- 11) Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*. 1986;232:61-5.
- 12) 大庭澄明, 今田和則, 友光将人, 竹谷仁史, 金子大樹. フィルグラスチム BS 注シリンジ「モチダ」/「F」の品質特性, 非臨床試験および臨床試験成績. *日薬理誌*. 2013;142:304-14.
- 13) 稲葉謙次. 大腸菌における DsbB-DsbA タンパク質ジスルフィド結合形成システムの構造と機能発現メカニズム. *日本結晶学会誌* 2009;51:100-3.
- 14) 加藤晃一: NMR 法による免疫グロブリンと Fc レセプターの相互作用の構造生物学的研究. *薬学雑誌*. 2001;121:345-54.
- 15) Baert F, Noman M, Vermeire S, Assche GV, Haens GD, Carbonez A, Rutgeerts P. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:601-8.
- 16) Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, de Groot E, Nurmohamed MT, Stapel S, et al. Development of anti-infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid

- arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:711-5.
- 17) Afif W, Loftus EV Jr, Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, Sandborn WJ. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:1133-9.
- 18) Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Ramiro S, Nuño L, Bonilla G, Nagore D, Ruiz Del Agua A, Martínez A, et al. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:1445-52.
- 19) 関節リウマチ(RA)に対するTNF阻害薬使用ガイドライン(2015年3月12日改訂版), 日本リウマチ学会. <http://www.ryumachi-jp.com>
- 20) Ruiz-Argüello MB, Maguregui A, Ruiz Del Agua A, Pascual-Salcedo D, Martínez-Feito A, Jurado T, Plasencia C, et al. Antibodies to infliximab in Remicade-treated rheumatic patients show identical reactivity towards biosimilars. *Ann Rheum Dis.* 2016;75:1693-6.
- 21) Bartelds GM, Kriekkaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, Dijkmans BA, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA.* 2011;305:1460-8.
- 22) Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O, Romagnani S, et al. Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy.* 2010;65:657-61.
- 23) Matucci A, Pratesi S, Petroni G, Nencini F, Virgili G, Milla M, et al. Allergological in vitro and in vivo evaluation of patients with hypersensitivity reactions to infliximab. *Clin Exp Allergy.* 2013;43:659-64.