

平成 29 年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「ヒト抗原マウスによる抗体医薬の薬効、安全性のインビボ評価基盤の構築」

研究開発成果等報告書

平成 30 年 5 月

担当局

関東経済産業局

補助事業者

株式会社特殊免疫研究所

目 次

第1章 研究開発の概要

- 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標
- 1-2 研究体制
- 1-3 成果概要
- 1-4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

2-1 ヒト抗原マウスラインナップの作出

- 2-1-1 BAC ベクター30 種の設計、構築
- 2-1-2 ヒト抗原マウス 10 種作出
- 2-1-3 ライブラリー化

2-2 抗体医薬の薬理活性評価

- 2-2-1 自己免疫性肝疾患モデルマウス、リウマチモデルマウスに対する抗体医薬の薬理活性評価
- 2-2-2 マウス抗体の調製と抗体医薬との薬理効果の比較

2-3 抗体医薬の力価測定法の開発

- 2-3-1 第三世代抗体の評価
- 2-3-2 安定性と生物活性の比較

2-4 ヒト抗原発現の安定性保証

- 2-4-1 性別、週齢別発現安定性評価
- 2-4-2 世代間発現安定性評価

最終章 全体総括

- 3-1 研究開発成果
- 3-2 事業化の見通し

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1) 研究開発の背景

当社は組換え BAC トランスジェニック動物作出技術を開発し、それを応用して多くの動物モデルの作出プロジェクトに関与し、医学・薬学研究に有用な動物モデルを提供してきた。

「抗体医薬」は効果が高くて副作用が少ないが、ヒトの特定のタンパク質にだけ結合して作用をもたらすため、抗体医薬のインビボ評価方法は十分に確立されていない。

抗体医薬の開発に利用することを目的に、ヒトの抗原や受容体等をマウスで発現させたトランスジェニックマウスの作製が多数報告されている。しかし、従来の技術で作製されるトランスジェニックマウスでは、ヒト遺伝子の発現量や組織特異性を再現することが難しかったため、有用なインビボ評価方法とは成りえなかった。

そこで、これまでの組換え BAC ベクターを利用したモデルマウスの作製実績に基づいて、ヒト抗原タンパク質を組織特異的に正確に発現する組換え BAC トランスジェニックマウス（『ヒト抗原マウス』）を作製し、抗体医薬の探索、薬効薬理、および安全性薬理のバイオアッセイを実施することを通じて、現在の抗体医薬開発に欠如しているインビボ評価系の提供を事業化することを企画した。

(2) 研究開発の目的

全世界で開発されている抗体医薬の評価に利用できる新規ヒト抗原マウスを作出するとともに、作製されたヒト抗原マウスを利用して臨床で治療に応用されている抗体医薬のバイオアッセイを実施することを通じて、探索研究、薬効薬理試験、安全性薬理試験、製剤規格試験に応用できることのバリデーションを実施することを目的とした。

(3) 研究開発の目標

抗体医薬の薬理作用、安全性評価は、ヒトとの遺伝的相似性からサルを使用した実験により行われてきた。しかし、サルを使用した実験には動物数や費用の点で制約が多く、新規抗体医薬を探索、開発していく際に必要な、生体に薬剤を投与して新規に付与された機能が薬理作用に反映されるかを評価するステップ（インビボ評価）を実施することができず、開発の進捗が著しく滞ってしまう懸念があった。

マウスを利用した抗体医薬のインビボ評価法が確立されれば、抗体医薬を投与した疾患モデルマウスの「多層的疾患オミックス解析」により、抗体医薬の創薬標的、および薬理的応答の網羅的探索を目指した基礎研究を進めることが可能となるばかりでなく、次世代型抗体医薬の開発の進捗を著しく促進することが可能になる。

当社が保有する組換え BAC トランスジェニックマウス作製技術を利用して、抗体医薬の標的となる抗原遺伝子、抗体医薬のエフェクター活性をもたらす Fcγ 受容体ファミリー遺伝子、および PD-1 などの免疫チェックポイント遺伝子等の発現をヒト化したマウスを開発し、臨床試験に供する治療用抗体の探索、薬効薬理、安全性薬理、および力価評価のためのバイオアッセイを実施することを通じて、現在の抗体医薬開発に不可欠なインビボ評価系を高度化して、抗体医薬のスクリーニングサービス提供を事業化するための基盤を確立することを目指した（図 1）。

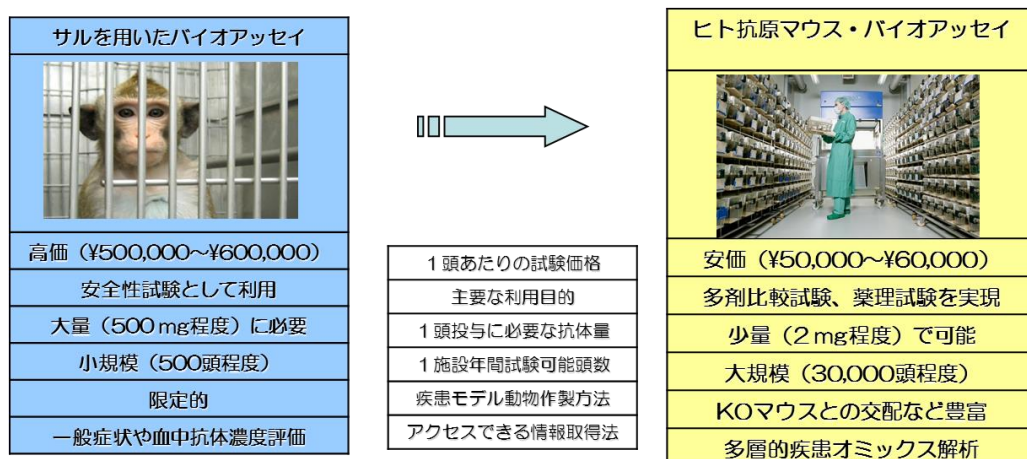
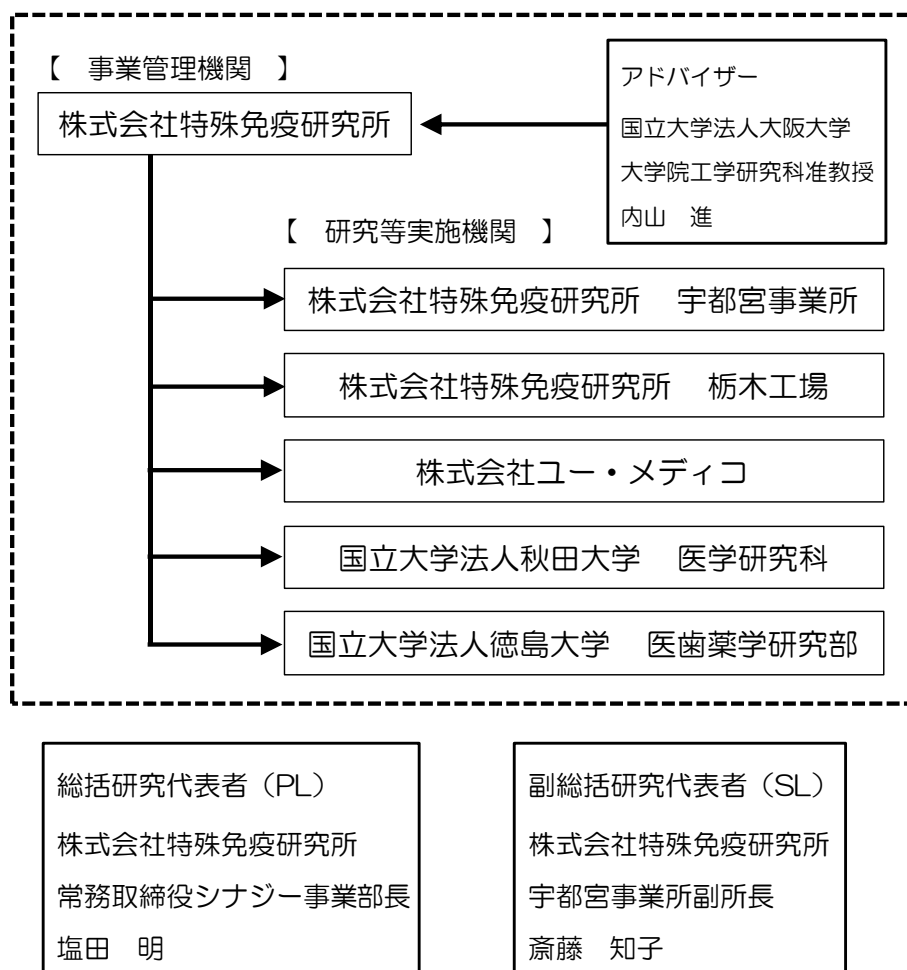


図1 本研究開発で目指す技術高度化内容

1-2 研究体制

本研究開発の 研究組織および管理体制を以下に示す。



1-3 成果概要

【1】 ヒト抗原マウスラインナップの作出

今後臨床開発が期待されている新規、および高性能抗体医薬の標的となるヒト抗原遺伝子を選定し、標的ヒト抗原遺伝子を発現するヒト抗原マウスのシリーズを作出してラインアップし、クライアントが短期間でバイオアッセイを利用できるリソースの構築を行った。

抗体医薬のターゲットとなる重要なヒト抗原として、ヒトCD19、ヒトCD3、ヒトPD-1、ヒトPD-L1、ヒトCD38、ヒトEGFR、ヒトHER2、ヒトOX40、ヒトCD27、ヒトCD137、ヒトLAG-3、ヒトTIM-3、ヒトCTLA-4、ヒトSiRP α 等、主としてがんの治療に求められるヒト遺伝子を選定した。

大腸菌内での能動型相同組み換え反応を利用して、ターゲットとなるヒト抗原遺伝子を含むBACクローンから、マウスのオーソログ遺伝子を含むBACクローンにヒト抗原遺伝子のタンパク質をコードする遺伝子配列を転移させ、ヒト抗原発現ベクターとなる組換えBACクローンを構築した。これらのヒト抗原を発現させる組換えBAC発現ベクター、27種の設計、構築、精製を完了した。

これらの組換えBAC発現ベクターを複数組み合わせることにより、付加価値の高いモデルマウスとなる組み合わせを10種選定し、それらのBAC発現ベクターをBalb/c系統のマウス受精卵にマイクロインジェクションで導入し、10系統のヒト抗原マウスを作出した。

作出したヒト抗原マウスの精子を凍結してライブラリー化し、体外受精による交配でマウスを繁殖させることにより、事業を開始した際に顧客からの注文の3ヶ月後に高品質なヒト抗原マウスを利用したバイオアッセイサービスの提供が可能になることを検証することができた。

【2】 抗体医薬の薬理活性評価

疾患モデルマウスに対する抗体医薬の薬効薬理試験が実現すれば、従来の抗体医薬より効果の優れたベストインクラス抗体医薬の開発、および臨床試験導入を促進することが期待されるとともに、既に臨床で使用されている抗体医薬の新規適用を検討するドラッグリポジショニングにとっても有益なツールとなる。そこで、ヒト抗原マウスを利用した抗体医薬の薬理活性評価を実施した。

ヒトCD20、およびヒトFc γ 受容体を発現するヒト抗原マウス（C57BL/6系統）と原発性胆汁性胆管炎モデルトランスジェニックマウスを交配して、ヒトCD20/原発性胆汁性胆管炎モデルマウスを作成し、抗ヒトCD20-ヒト化モノクローナル抗体であるTKM-O11（CD20抗体医薬；以前はTKM-O11と呼称していた）を16週間継続して腹腔内に投与して、その治療効果を確認した。

CD20抗体医薬がヒトCD20を発現するマウスのB細胞に結合することにより、マウスの末梢血液中Bリンパ球比率が著しく減少し、投与期間中に渡り末梢血液中Bリンパ球比率は低いレベルを維持していることが確認できた。CD20抗体医薬の投与終了後に病理組織学的検査による原発性胆汁性胆管炎を発症したマウスの肝臓炎症、胆管障害の評価を行なった結果、CD20抗体医薬投与群ではコントロール群に比較して、肝臓の実質域炎症の悪化度、悪化頻度が、それぞれ有意に改善した。

さらに、CD20抗体医薬投与による自己免疫性肝疾患の治療効果の作用機作を明らかにするために、肝臓内に存在して炎症を引き起こすリンパ球数の評価を行なった。その結果、CD20抗体医薬投与により、原発性胆汁性胆管炎を発症したマウスの肝臓に浸潤した総リンパ球数、およびCD8陽性細胞傷害性T細胞数が有意に減少し、特に肝臓の炎症を引き起こすCD44高発現CD8陽性活性化細胞傷害性T細胞数が著しく減少していることが明らかになった。

また、関節炎誘発用モノクローナル抗体カクテル、およびLPSをCD20ヒト抗原マウス（Balb/c系統）に投与してヒトCD20/急性関節炎モデルマウスを作成し、抗ヒトCD20-ヒト化モノクローナル抗体であるTKM-O11、および抗ヒトCD20-ヒト・マウスキメラモノクローナル抗体であるリツキシマブを、それぞれ3週間投与による関節炎抑制効果を確認した。

その結果、抗体医薬を投与しなかった未治療のマウスでは、関節炎誘発後5日目から四肢の関節に急性炎症が発症するのに対して、ヒト化モノクローナル抗体であるTKM-O11は、この四肢関節の急性炎症の

発症を抑制する傾向が認められた。一方、同用量のヒト・マウスキメラモノクローナル抗体であるリツキシマブ投与群では、関節炎を抑制する効果は見られなかった。

以上の結果から、ヒト抗原マウスを利用することにより、臨床で使用する抗体医薬を直接投与して疾患モデルマウスに対する治療効果を確認する薬効薬理試験を実現することができることが示された。

【3】 抗体医薬の力価測定法の開発

ベストインクラスの抗体医薬を開発する場合、インビボでの抗体医薬の力価を迅速に測定して探索プロセスにフィードバックする必要がある。また、抗体医薬が製剤化された後に発生するタンパク質の会合や凝集など物理的変性と、それに伴う生物活性の低下や免疫原性は、臨床開発、および上市後の抗体医薬の治療効果や安全性に大きく影響を及ぼす。そこで、抗体医薬の臨床試験や臨床で患者の治療に利用するためには、その高分子タンパク質を安定的に維持する製剤化条件を検討する必要がある。そこで、いくつかの方法で、ヒト抗原マウスを利用した迅速かつ簡便な抗体医薬の力価測定実施の可能性を評価した。

それぞれ力価が異なる、抗ヒト CD20-ヒト・マウスキメラモノクローナル抗体であるリツキシマブ（第1世代抗体医薬）、抗ヒト CD20-ヒト化モノクローナル抗体である TKM-O11（第2世代抗体医薬）、および抗ヒト CD20-糖鎖改変型ヒト化モノクローナル抗体であるオビヌツズマブ（第3世代抗体医薬）を入手して CD20 ヒト抗原マウスに単回投与し、各投与群のマウスの脾臓の B 細胞除去効果をフローサイトメーターを利用して測定した。その結果、第2世代、第3世代の抗体医薬による B 細胞除去効果は第1世代抗体医薬に較べて、統計的に有意に強いことが示された。

抗体の会合、凝集、溶解性を指標にした加速安定性試験により、抗ヒト CD20-ヒト化モノクローナル抗体である TKM-O11 の製剤化条件とその安定性を評価し、製剤の安定性の違いによる抗体医薬の力価の変化を、CD20 ヒト抗原マウスを利用したバイオアッセイにより評価した。加速安定性試験により決定した抗体医薬 TKM-O11 に特有な安定性の異なる様々な製剤条件のうち、高安定的製剤、中安定的製剤、および低安定的製剤の3種類で TKM-O11 の製剤化サンプルを調製し、それぞれ CD20 ヒト抗原マウスに単回投与し、各投与群のマウスの脾臓の B 細胞除去効果をフローサイトメーターを利用して測定した。その結果、高安定的製剤、中安定的製剤の抗体医薬による B 細胞除去効果は、低安定的製剤の抗体医薬に較べて、統計的に有意に強いことが示された。

上記と同様の加速安定性試験により、抗体医薬 TKM-O11 に特有な高安定的製剤条件における高濃度製剤の安定性を評価し、製剤における抗体医薬の原薬濃度の変更に及ぼす抗体医薬の力価への影響を、CD20 ヒト抗原マウスを利用したバイオアッセイにより評価した。その結果、TKM-O11 に特有な高安定的製剤条件では、濃度を2倍に高めても抗体医薬の物理的安定性を維持できることが分かった。そこで、この製剤条件で調製した標準濃度、および高濃度の TKM-O11 の製剤化サンプルを調製し、それぞれ CD20 ヒト抗原マウスに投与し、各投与群のマウスの脾臓の B 細胞除去効果をフローサイトメーターを利用して測定した。その結果、標準濃度の TKM-O11 の製剤化サンプル、および高濃度 TKM-O11 の製剤化サンプルによる B 細胞除去効果に、統計的に有意な差はなかった。

以上の試験結果から、抗体医薬の開発において非常に重要な過程である、探索研究における力価評価、および高濃度製剤化条件の検討において、物理化学的分析による安定性評価と、ヒト抗原マウスを利用した迅速な生物活性の評価結果に有意に相関性があることを統計学的に立証することができた。

【4】 ヒト抗原発現の安定性保証

抗体医薬の開発にヒト抗原マウスを利用する場合、マウスに遺伝子導入した外来性の組換え DNA からのヒト抗原の発現が、個体間、世代間を超えて安定的に発現している必要がある。そこで、ヒト抗原マウスの性別、および週齢別ヒト抗原の発現量を定量的に測定するとともに、ヒト抗原マウスの世代間での導入遺伝子の安定性、およびヒト抗原の発現量を定量的に測定した。

雌雄の CD20 ヒト抗原マウスを同一出生日で出生させ、自由摂食で6週齢、16週齢、および2

4週齢まで育成させた後に脾臓組織を摘出、リアルタイム PCR 法、およびフローサイトメトリーにより脾臓におけるヒト CD20 抗原、およびヒト Fc γ IIIa の発現量を、mRNA、およびタンパク質レベルで測定した。その結果、各週令の CD20 ヒト抗原マウス、脾臓におけるヒト CD20 抗原、およびヒト Fc γ 受容体 IIIa 発現レベルには、雌雄間、個体間に統計的に有意な差が無いことが示された。

また、4世代に渡って雌雄の CD20 ヒト抗原マウスを出生させ、10 週齢4週齢まで育成させた後に、脾臓組織を摘出し、サザンブロットハイブリダイゼーション法、リアルタイム PCR 法、およびフローサイトメトリーにより、それぞれ、ゲノムに導入された BAC 発現ベクターのコピー数、脾臓におけるヒト CD20 抗原、および Fc γ IIIa の発現量を、mRNA、およびタンパク質レベルで測定した。その結果、3世代に渡って CD20 ヒト抗原マウスを育成し、各世代の CD20 ヒト抗原マウスのゲノムに導入された BAC 発現ベクターのコピー数、および脾臓におけるヒト CD20 抗原、および Fc γ 受容体 IIIa 発現レベルには、雌雄間、個体間に顕著な差が無いことが示された。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(総括研究代表者)

〒112-0004

東京都文京区後楽1-1-10

株式会社特殊免疫研究所 シナジー事業本部

塩田 明

Tel : 03-3814-4081 Fax : 03-3814-5957

E-mail : akirashiota@tokumen.co.jp

第2章 本 論

「抗体医薬」は効果が高くて副作用が少ないが、ヒトの特定のタンパク質にだけ結合して作用をもたらすため、抗体医薬のインビボ評価方法は十分に確立されていない。抗体医薬の開発に利用することを目的に、ヒトの抗原や受容体等をマウスで発現させたトランスジェニックマウスの作製が多数報告されている。しかし、従来の技術で作製されるトランスジェニックマウスでは、ヒト遺伝子の発現量や組織特異性を再現することが難しかったため、有用なインビボ評価方法とは成りえなかった。

当社は組換え BAC トランスジェニック動物作出技術を開発し、それを応用して多くの動物モデルの作出プロジェクトに関与し、医学・薬学研究に有用な動物モデルを提供してきた。さらに、フィージビリティスタディとしてヒト CD20、およびヒト Fc γ 受容体を発現するヒト抗原マウスを作成し、臨床で使用する抗ヒト CD20-モノクローナル抗体の薬理作用である B 細胞除去効果をインビボで確認することに成功していた。

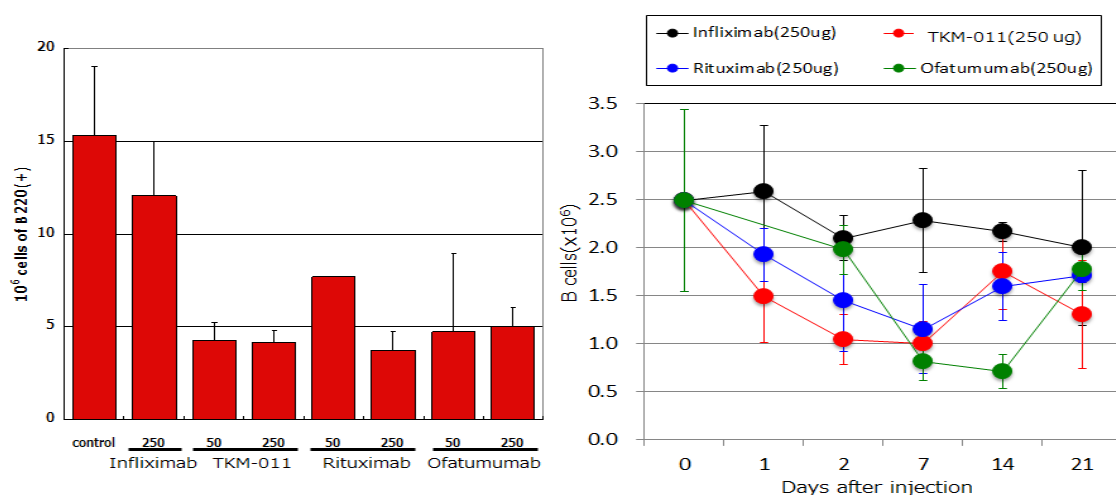
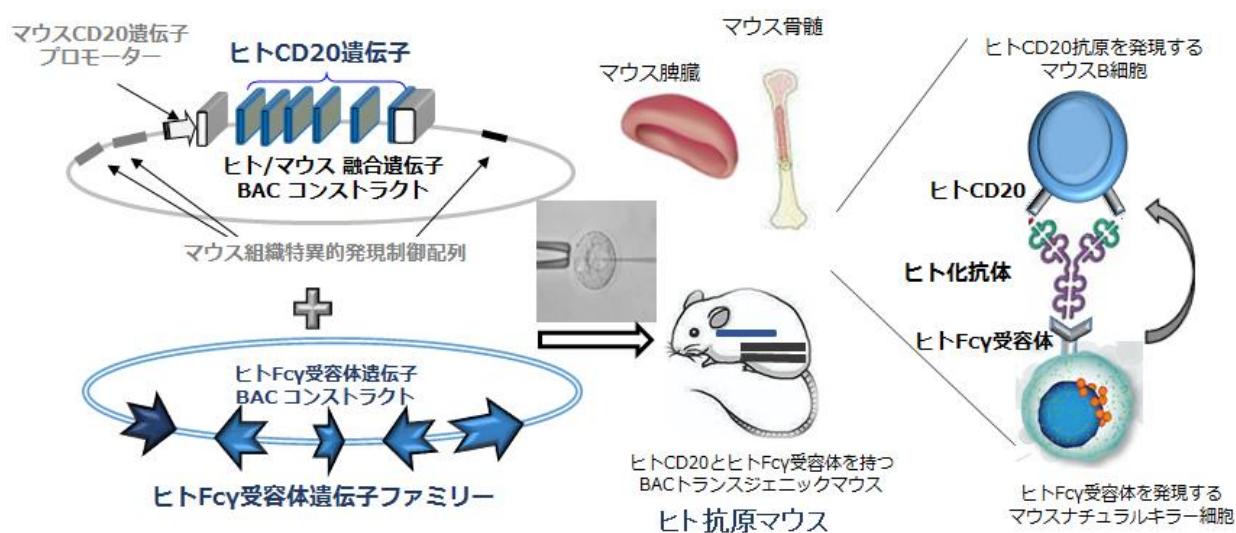


図2 フィージビリティ・スタディとして行った CD20 ヒト抗原マウスの作出（上）とこのマウスを利用した抗体医薬の in vivo スクリーニングの結果（下）

そこで、これまでの組換え BAC ベクターを利用したモデルマウスの作製実績に基づいて、ヒト抗原タンパク質を組織特異的に正確に発現する組換え BAC トランスジェニックマウス（『ヒト抗原マウス』）を作製し、抗体医薬の探索、薬効薬理、および安全性薬理のバイオアッセイを実施することを通じて、現在の抗体医薬開発に欠如しているインビボ評価系の提供を事業化することを企画した。

2-1 ヒト抗原マウスラインナップの作出

今後臨床開発が期待されている新規、および高性能抗体医薬の標的となるヒト抗原遺伝子を選定し、標的ヒト抗原遺伝子を発現するヒト抗原マウスのシリーズを作出してラインアップし、クライアントが短期間でバイオアッセイを利用できるリソースの構築を行った。

本研究開発計画を立案した時点では、がん細胞表面のヒト抗原に結合して、エフェクター細胞の活性化を通じて抗癌作用を発揮する「抗体医薬」が主流であったため、当初計画のヒト抗原マウスラインナップはこのタイプの抗体医薬の評価を行なうためのマウスモデルであった。

ところが、2014年9月に小野薬品工業から発売が開始されたPD-1抗体医薬、「オプジーボ」をきっかけにして、既にグローバル市場で活躍するビッグファーマ5陣営が「がん免疫療法」の治療薬の開発にしのぎを削る状況にあり、多くの製薬会社、バイオベンチャーがこの免疫チェックポイント阻害抗体医薬を開発してがん免疫療法に進出しつつあるので、その潮流に合わせて腫瘍免疫に関わる免疫チェックポイントのマウスモデル作製も実施してきた。

2-1-1 BACベクター30種の設計、構築

抗体医薬のターゲットとなる重要なヒト抗原として、ヒトCD19、ヒトCD3、ヒトPD-1、ヒトPD-L1、ヒトCD38、ヒトEGFR、ヒトHER2、ヒトOX40、ヒトCD27、ヒトCD137、ヒトLAG-3、ヒトTIM-3、ヒトCTLA-4、ヒトSiRP α 等、主としてがんの治療に求められるヒト遺伝子を選定した。これらのヒト抗原を発現させる組換えBAC発現ベクター、27種の設計、構築、精製を完了した（表1）。現在の抗体医薬の開発状況から、活況を示す“腫瘍免疫活性化抗体医薬”を対象とするヒト遺伝子（下記青字）を多く取り入れた。

表1. 設計、構築を完了したヒト抗原発現用組換えBAC発現ベクター

番号	対象ヒト抗原	番号	対象ヒト抗原	番号	対象ヒト抗原
1	ヒトCD19	11	ヒトFcRn	21	ヒトSiRP α
2	ヒトCD3	12	ヒトFCYRs (F158V)	22	ヒトCD47
3	ヒトPD-1	13	ヒトOX40	23	ヒトKIR
4	ヒトPD-L1	14	ヒトCD27	24	ヒトMHC-II
5	ヒトCD38	15	ヒトCD137	25	ヒトMHC-I
6	ヒトEGFR	16	ヒトLAG-3	26	VEGF-A
7	ヒトHER2	17	ヒトTIM-3	27	EGF
8	ヒトIGF-IR	18	ヒトGAL9		
9	ヒトVEGFR-3	19	ヒトCTLA-4		
10	ヒトVEGFR-2	20	ヒトCD80		

大腸菌内での能動型相同組み換え反応であるRed/ET Recombination Technologyを利用して、マウス抗原遺伝子、およびヒト抗原遺伝子を含むBACクローンからヒト抗原発現ベクターとなる組換えBACクローンを構築した。

Red/ETテクノロジーとゲノムライブラリーを利用した組換えゲノム発現ベクターの構築

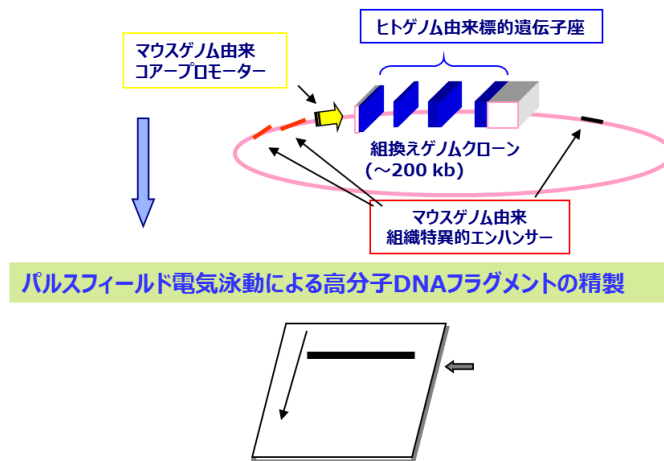


図3 ヒト抗原発現ベクターとなる組換え BAC クローンを構築、および精製

下の表に示したように、ヒト抗原遺伝子の翻訳開始コドンから停止コドンまでの配列の両端の配列 (H1、H2)、ヒト抗原遺伝子のイントロンの配列 (H3、H4)、およびマウス BAC クローンの抗原遺伝子の上流配列の 3' 側末端、下流配列の 5' 側末端 (H5、H6) を大腸菌内での能動型相同組み換え反応のためのキー配列とした。

キー配列：位置

H1： ヒト抗原遺伝子の開始コドンから 30 塩基

H2： ヒト抗原遺伝子の停止コドンまで 30 塩基

H3： ヒト抗原遺伝子のイントロン配列の RpsI-kan 挿入サイト、5' 側の 30 塩基

H4： ヒト抗原遺伝子のイントロン配列の RpsI-kan 挿入サイト、3' 側の 30 塩基

H5： マウス抗原遺伝子の開始コドン手前までの 30 塩基

H6： マウス抗原遺伝子の 3'UTR の 30 塩基

まず、ヒト BAC クローンの抗原遺伝子のイントロン配列にポジティブ/ネガティブセレクションマーカーカセット (RpsI-kan) を挿入するために、抗原-H3 配列、RpsI-kan、および抗原-H4 配列をタンデムにつないだ DNA フラグメントを、PCR により構築した (ヒト抗原 RpsI-Kan ブレークインフラグメント)。Red/ET 反応の能力を有した大腸菌株に、抗原遺伝子座を含むヒト BAC クローンとヒト抗原 RpsI-Kan ブレークインフラグメントを導入し、この宿主大腸菌内で Red/ET 反応を誘導し、クロラムフェニコール耐性、かつカナマイシン耐性のコロニーをピックアップすることにより、抗原 RpsI-kan ブレークインフラグメントを抗原遺伝子座のイントロン配列に挿入した組み換え BAC クローンをスクリーニングした (ヒト抗原 Intermediate)。

そして、このヒト抗原 Intermediate から、RpsI-kan カセットを挿入したヒト抗原遺伝子のゲノム DNA 配列をプラスミドベクターにサブクローニングするため、H1-H2 配列をタンデムにつないだ DNA カセットを構築した (抗原プレトランスファープラスミド)。上記と同様の方法で、Red/ET 反応の能力を有する大腸菌株に、ヒト抗原 Intermediate とともに、直鎖化した抗原プレトランスファープラスミドを導入し、この宿主大腸菌内で Red/ET 反応を誘導してアンピシリンおよびカナマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、RpsI-kan カセットを挿入したヒト抗原遺伝子のゲノム DNA 配列を持つプラスミドをスクリーニングした (ヒト抗原トランスファープラスミド)。

次に、制限酵素反応により、このヒト抗原トランスファープラスミドから、マウスゲノム配列に由来する H5 配列と H6 配列を両端に持ち、RpsI-kan カセットを挿入したヒト抗原遺伝子のゲノム DNA 配列をプラスミドベクターから切り出した(ヒト抗原トランスファーフラグメント)。上記と同様の方法で、Red/ET 反応の能力を有する大腸菌株に、マウス抗原 BAC クローンとともに、ヒト抗原トランスファーフラグメントを導入し、この宿主大腸菌内で Red/ET 反応を誘導してクロラムフェニコール、およびカナマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、マウス抗原遺伝子の開始コドンから停止コドンまでの配列を、ヒト抗原トランスファーフラグメントの配列と正確に置換したマウス抗原/ヒト抗原遺伝子の組換え BAC クローンをスクリーニングした(マウス抗原/ヒト抗原 RecBAC Intermediate)。

最後に、ヒト抗原遺伝子座のイントロン配列を合成し、ネガティブセレクションによりヒト抗原遺伝子のイントロンに挿入した RpsI-Kan を除去するための DNA 配列とした(ヒト抗原 リペアーフラグメント)。上記と同様の方法で、Red/ET 反応の能力を有する大腸菌株にマウス抗原/ヒト抗原 RecBAC Intermediate とともに、ヒト抗原 リペアーフラグメントを導入し、この宿主大腸菌内で Red/ET 反応を誘導してクロラムフェニコール、およびストレプトマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、マウス抗原遺伝子のコード配列を、ヒト抗原遺伝子のコード配列と正確に置換したマウス抗原/ヒト抗原遺伝子の組換え BAC クローンの構築を行なった(ヒト抗原 RcBAC)。シーケンス解析により、Red/ET 反応で接合した H1~H6 のゲノム DNA 配列を確認した。

ヒト抗原遺伝子発現コンストラクトであるヒト抗原 RecBAC により形質転換した DH10B セルを、クロラムフェニコールを含む LB アガー培地上でクローニングし、そのシングルコロニーをピックアップして液体培地で一昼夜震盪培養した。ヒト抗原 RecBAC をプラスミド抽出キットを用いて精製し、PI-SceI を加えて 37℃、16 時間反応させてダイジェスションを行った。

直鎖化したヒト抗原 RecBAC を 1%アガロースゲルにアプライし、パルスフィールド電気泳動装置により電気泳動を行った。得られた長鎖 DNA 断片を電気溶出法によりアガロースゲルから抽出し、マイクロインジェクション用に調製した TE バッファーで、4℃、2 時間透析した。精製した DNA 断片をパルスフィールド電気泳動にアプライして、より長鎖 DNA 断片が分断することなく高度に精製されていることを確認するとともに、NanoDrop 分光光度計によりその DNA 濃度を決定し、トランスジェニックマウス作出用の発現コンストラクトの溶液を調製した。

2-1-2 ヒト抗原マウス 10 種作出

上記で構築された組換え BAC 発現ベクターを複数組み合わせることにより、付加価値の高いモデルマウスとなる組み合わせを 10 種選定し、以下に示す方法で、それらの BAC 発現ベクターを主に Balb/c 系統マウスの受精卵にマイクロインジェクションで導入し、10 系統のヒト抗原マウスを作出した。

雌性 Balb/cA マウスに PMSG および hCG を投与して過排卵を誘起し、同系統の雄性マウスと交配した後、受精卵を採取した。マイクロマニピレーターを用いて、Balb/cA マウスの前核期胚の雄性核に、精製したヒト抗原 RecBAC 発現コンストラクトを直接注入した。この DNA 注入胚、各系統当たり 600 個以上を偽妊娠誘起した受胎雌マウスの卵管に移植した。

マイクロインジェクション、サザンスクリーニング

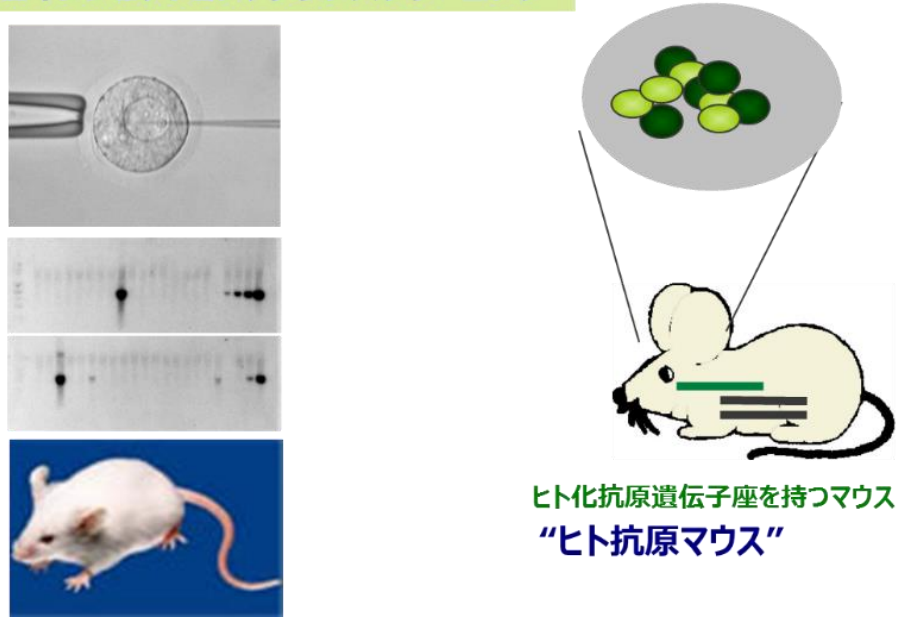


図4 組換え BAC クローンのマイクロインジェクションによるヒト抗原マウスの作出

ヒト抗原 RecBAC 発現コンストラクトを注入した Balb/cA マウス受精卵から自然分娩により得た産子を、離乳まで保育した。ヒト抗原マウス、ファウンダー候補個体を4週令で離乳させ、個体識別のための耳標をつけた後に尾部組織を生検して解析に供するまで-80℃に保管した。

-80℃で保存しておいた離乳まで育成したヒト抗原マウスの候補個体の尾部組織を可溶化させ、フェノール抽出法により高分子ゲノム DNA を抽出します。抽出したゲノム DNA を TE に再溶解させ、各検体から調製したゲノム DNA 溶液の DNA 濃度を吸光法により決定し、各検体の DNA 濃度の値から DNA 5 μ g に相当するゲノム DNA 溶液を調製した。各検体から調製したゲノム DNA、陽性対照 DNA、および陰性対照 DNA に制限酵素を加え、生成したゲノム DNA 断片をアガロースゲルにアプライして電気泳動し、アガロースゲル中に分離したゲノム DNA 断片をナイロンメンブレン にトランスファーした。ランダムプライム法により [32 P]ラベル化させたヒトプローブ用フラグメントとゲノム DNA 断片をトランスファーしたナイロンメンブレンをハイブリダイズさせ、洗浄した後にメンブレンを X 線フィルムとともにオートラジオグラフィカセットに入れた。感光した X 線フィルムを現像して、ヒト組換え BAC 発現コンストラクトに由来する特異的なシグナルをオートラジオグラフィで検出し、[32 P]ラベル化プローブとのハイブリダイゼーションによる特異的なシグナルをもたらす個体をヒト抗原マウス、ファウンダー個体として同定した。各検体のシグナルの強度を陽性対照 DNA のシグナルの強度と比較して、ゲノムに導入した発現コンストラクトのコピー数を概算した。

合計17,000個におよぶ受精卵へのマイクロインジェクション、およびサザンハイブリダイゼーションにより、合計86頭のヒト抗原マウスファウンダーを獲得することができた(表2)。

表2. マイクロインジェクション、サザンハイブリダイゼーションにより得られたヒト抗原マウス

番号	系統番号	系統名	移植胚数	獲得数
1	MBD-MI-002	CD19/CD3eヒト抗原マウス	2,063	6 頭
2	MBD-MI-003	PD-1/PD-L1ヒト抗原マウス	2,740	13 頭
3	MBD-MI-004	CD38ヒト抗原マウス	2,894	7 頭
4	MBD-MI-010	ヒトOX40+ヒトCD27+ヒトCD137ヒト抗原マウス	2,141	5 頭
5	MBD-MI-011	ヒトTIM-3/ヒトGAL9ヒト抗原マウス	2,219	9 頭
6	MBD-MI-012	CTLA-4/CD80ヒト抗原マウス	1,244	10 頭
7	MBD-MI-013	Sirpa/CD47 ヒト抗原マウス	1,607	11 頭
8	MBD-MI-006	HER2ヒト抗原マウス	838	6 頭
9	MBD-MI-015	ヒトVegfr2+ヒトVEGF-A+Fcy ヒト抗原マウス	725	14 頭
10	MBD-MI-005	ヒトEGFR+ヒトEGF+Fcyヒト抗原マウス	1,147	5 頭
合計			17,618	86 頭

2-1-3 ライブラリー化

精子を凍結保管した後に体外受精により個体蘇生を行った場合の効率を検討した。雄性野生型 Balb/cA マウスから精子を回収し、液体窒素容器内に保存した。凍結保管の後に精子を融解させ、過剰排卵を誘起した雌性 Balb/cA 系統マウスから得た未受精卵と体外培養して得られた受精卵のうち540個を、偽妊娠処置を施した仮親マウスの子宮に移植した。その結果、合計164頭の後代マウス個体を蘇生させることができた。今回の実験の凍結精子からの個体蘇生率は30.3%であり、30%以上の効率で蘇生させたヒト抗原マウスを提供する目標を上回る結果であった。

以上の結果から、作出したヒト抗原マウスの精子を凍結してライブラリー化し、体外受精による交配でマウスを繁殖させることにより、事業を開始した際に顧客からの注文の3ヶ月後に高品質なヒト抗原マウスを利用したバイオアッセイサービスの提供が可能になることを検証することができた。

2-2 抗体医薬の薬理活性評価

疾患モデルマウスに対する抗体医薬の薬効薬理試験が実現すれば、従来の抗体医薬より効果の優れたベストインクラス抗体医薬の開発、および臨床試験導入を促進することが期待されるとともに、既に臨床で使用されている抗体医薬の新規適用を検討するドラッグリポジショニングにとっても有益なツールとなる。そこで、CD20 抗体医薬と CD20 ヒト抗原マウスを利用した抗体医薬の薬理活性評価を実施した（図 5）。

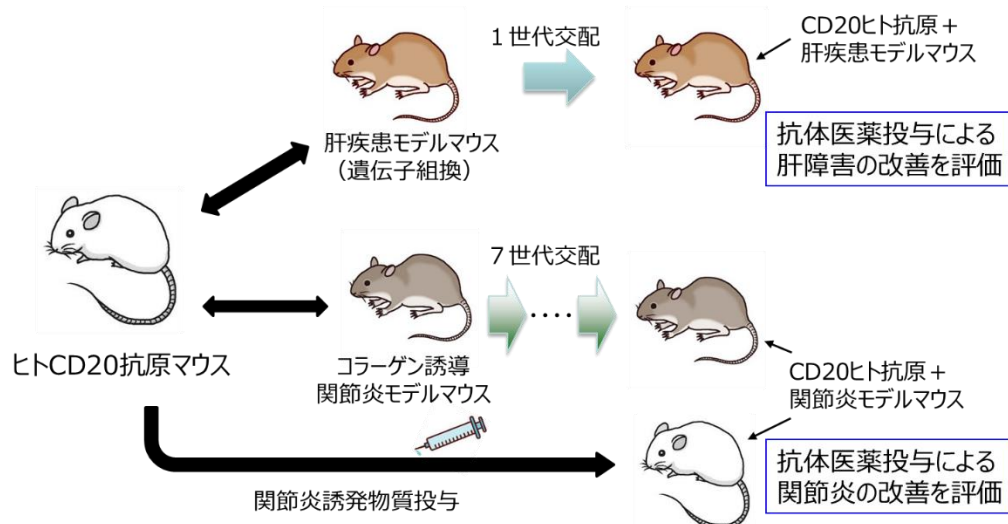


図 5 ヒト抗原マウスを利用した CD20 抗体医薬の薬理活性評価

【想定された CD20 抗体医薬の薬理活性評価のメカニズム】

脾臓は、二次リンパ系器官として個体の免疫機能を担う臓器である。脾臓には暗赤色の赤脾髄中に白色点状の白脾髄が散在しており、そこに多くのリンパ球が集積している。免疫抗体産生細胞である B 細胞は、中心動脈周囲の鞘状に取囲む T 細胞を介して、白脾髄末端のリンパ小節にある胚中心で活性化され、増殖する。

CD20 分子はこの B 細胞分化の間に発現される一般的な B 細胞マーカーであるとともに、B 細胞性非ホジキンリンパ腫の治療標的となる分子でもある。CD20 抗体医薬であるリツキシマブ（ロシュ社 / ジェネンテック社）は最初に非ホジキンリンパ腫治療薬として FDA から承認を受けた第 1 世代の抗体医薬であるが、その後多くの CD20 抗体医薬が開発されている。現在では、CD20 抗体医薬は関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）または多発性硬化症などのいくつかの自己免疫疾患の治療にも使用されている。

CD20 抗体医薬が投与されると、血中、および脾臓などのリンパ組織にある B 細胞と速やかに結合する。B 細胞に結合した抗体医薬は、補体系の活性化、NK 細胞やマクロファージの活性化等を介して、体内から B 細胞を除去させることができる。一方、T 細胞には CD20 が発現していないため、何ら影響を受けない。

CD20 ヒト抗原マウスはヒト CD20、およびヒト Fcγ 受容体を発現しているため、ヒトの治療用の抗体医薬の投与に応答して体内から B 細胞を除去させることができる。この薬理作用を通じて、CD20 抗体医薬の自己免疫疾患の治療効果を再現できると想定された（図 6）。

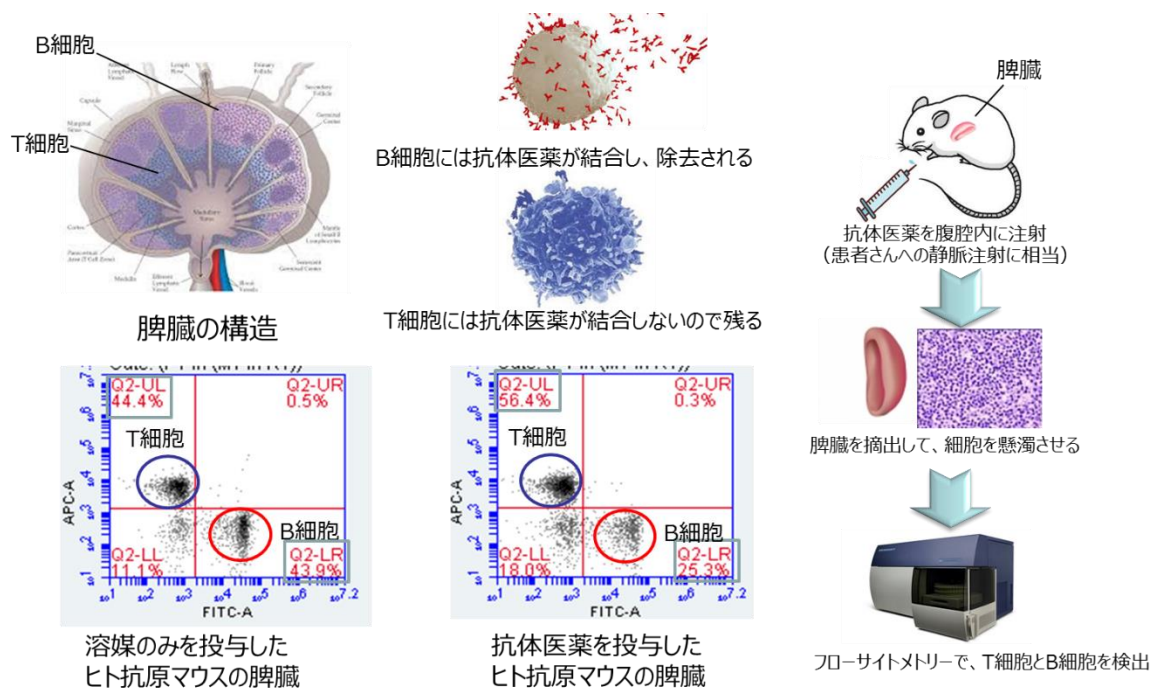


図6 ヒト抗原マウスを利用したCD20抗体医薬の薬理活性評価のメカニズム

2-2-1 自己免疫性肝疾患モデルマウス、リウマチモデルマウスに対する抗体医薬の薬理活性評価

CD20 ヒト抗原マウス (C57BL/6 系統)、雄性 F1 個体を繁殖期まで育成させ、CD20 ヒト抗原マウス、雄性 F1 個体と雌性野生型 C57BL/6 系統マウスとの体外受精により交配させ、胚を偽妊娠誘起した受胎雌マウスの卵管に移植した。自然分娩で産まれる CD20 ヒト抗原マウスの F2 個体を4週令で離乳させ、 $[^{32}\text{P}]$ ラベル化ヒト CD20 プローブ、および $[^{32}\text{P}]$ ラベル化ヒト $\text{Fc}\gamma$ 受容体 IIIa プローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法により CD20 ヒト抗原マウスの雌性 F2 個体を選別した。これらの CD20 ヒト抗原マウスの雌性 F2 個体と雄性の遺伝子改変原発性胆汁性胆管炎モデルマウス (疾患モデルマウス) を上記と同様に体外受精により交配させ、生まれたマウスを4週齢で離乳させ、PCR により CD20 ヒト抗原・疾患モデルマウスを選別した。これらのマウスのうち雌性個体、合計 20 頭程度を選別し、抗 CD20 抗体医薬である TKM-O11 投与による肝臓炎症の抑制作用を確認する薬効薬理試験に供した。選別された雌性 CD20 ヒト抗原・疾患モデルマウスを各実験群に割り付け、250 μg の治療用抗 CD20 抗体医薬 TKM-O11、および溶媒 (PBS) を、それぞれ腹腔内に週 1 回、16 週間に渡って反復投与した。

CD20 抗体医薬の投与期間中に、ヒト CD20/原発性胆汁性胆管炎モデルマウスから経時的に採血を行ない、末梢血の B 細胞数、および T 細胞数を測定した。その結果、CD20 抗体医薬がヒト CD20 を発現するマウスの B 細胞に結合することにより、マウスの末梢血液中 B リンパ球比率が著しく減少し、投与期間中に渡り末梢血液中 B リンパ球比率は低いレベルを維持していることが確認できた (図7)。

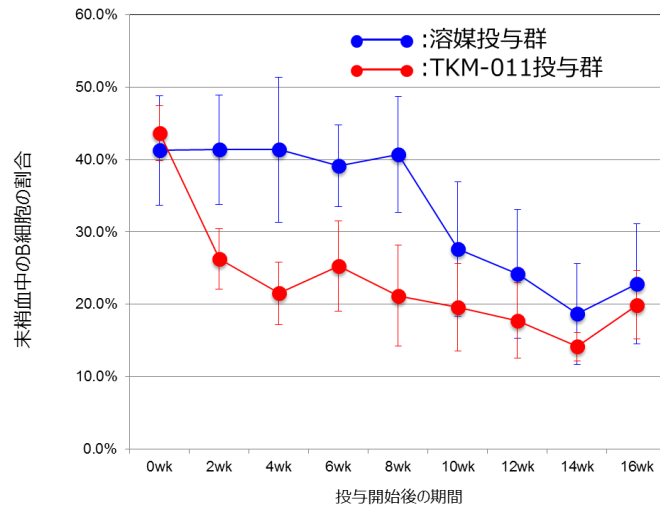


図7 CD20 抗体医薬投与によるヒト CD20/原発性胆汁性胆管炎モデルマウスの末梢血 B 細胞除去活性

CD20 抗体医薬の投与終了後にヒト CD20/原発性胆汁性胆管炎モデルマウスを犠牲死させ、病理組織学的検査によるマウスの肝臓炎症、胆管障害の評価を行なった結果、CD20 抗体医薬投与群では、コントロール群と比較して、肝臓の実質域炎症の悪化度、悪化頻度が、それぞれ有意に改善した（図8、上）。

さらに、CD20 抗体医薬投与による自己免疫性肝疾患の治療効果の作用機作を明らかにするために、フローサイトメトリーにより、ヒト CD20/原発性胆汁性胆管炎モデルマウスの肝臓内に存在して炎症を引き起こすリンパ球数の評価を行なった。その結果、CD20 抗体医薬投与により、原発性胆汁性胆管炎を発症したマウスの肝臓に浸潤した総リンパ球数、および CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞数が有意に減少し、特に肝臓の炎症を引き起こす CD44^{high}CD8 陽性活性化細胞傷害性 T 細胞数が著しく減少していることが明らかになった（図8、下）。

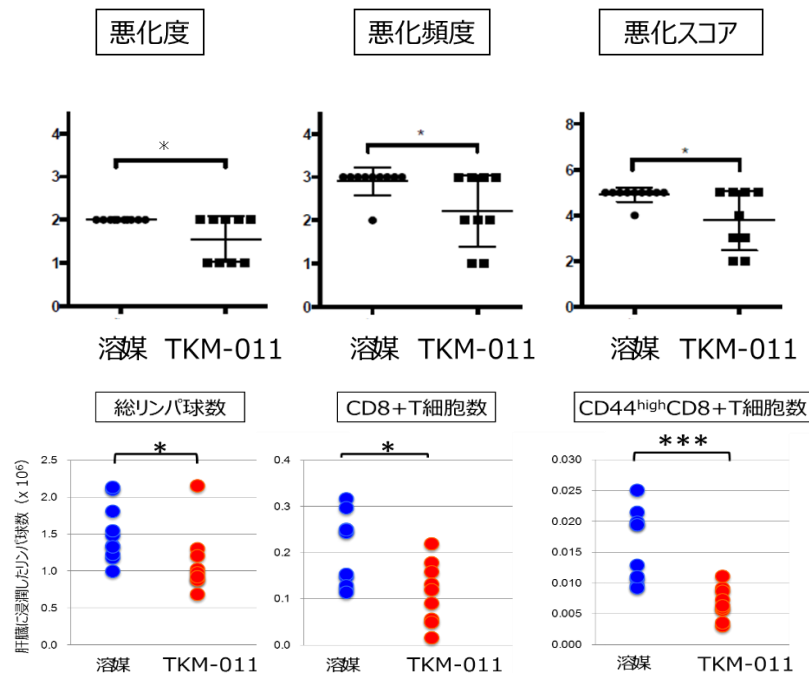


図8 CD20 抗体医薬投与によるヒト CD20/原発性胆汁性胆管炎モデルマウスの肝障害の改善効果（上）、および CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の肝臓への浸潤抑制効果（下）

CD20 抗体医薬投与による自己免疫性肝疾患モデルマウスのリンパ組織からの B 細胞を除去作用を明らかにするために、マウスの脾臓に存在する B 細胞を病理組織学的検査により検出した。その結果、溶媒投与群のマウスでは脾臓のリンパ小節に明瞭にヒト CD20 陽性 B 細胞が存在していることが確認できるが、CD20 抗体医薬投与群のマウスではヒト CD20 陽性 B 細胞が完全に消失していた（図9、上）。同様に、CD20 抗体医薬投与群のマウスではマウス CD19 陽性 B 細胞の数が減少していた（図9、下）。

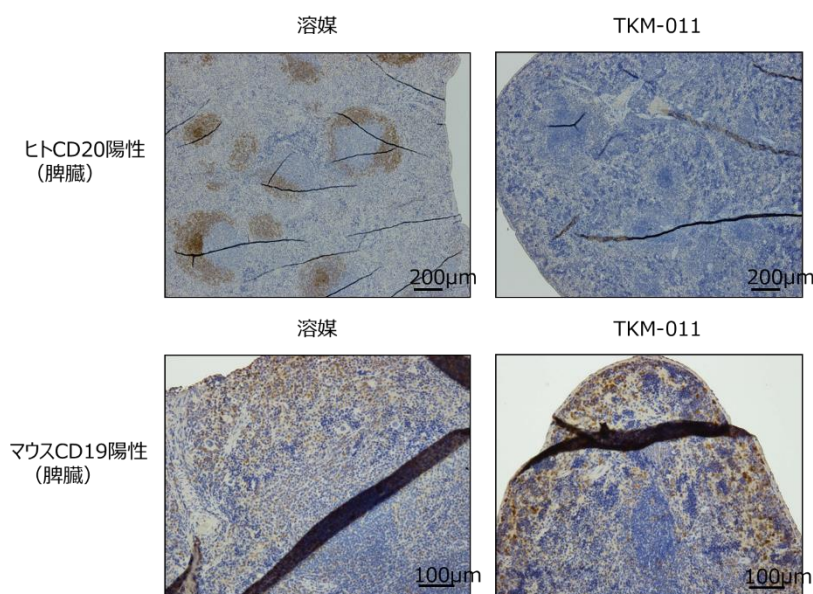


図9 CD20 抗体医薬投与によるヒト CD20/原発性胆汁性胆管炎モデルマウス脾臓におけるヒト CD20 陽性 B 細胞（上）、およびマウス CD19 陽性 B 細胞の除去効果

また、CD20 ヒト抗原マウスを利用して急性関節炎モデルマウスを作成し、抗ヒト CD20-ヒト化モノクローナル抗体である TKM-O11、および抗ヒト CD20-ヒト・マウスキメラモノクローナル抗体であるリツキシマブを、それぞれ 3 週間投与による関節炎抑制効果を確認した。

CD20 ヒト抗原 (Balb/c 系統) マウスに 250 μg の抗 CD20 治療用モノクローナル抗体、TKM-O11、および 250 μg の抗 CD20 治療用モノクローナル抗体リツキシマブを、それぞれ腹腔内に週 1 回 3 週間投与し、関節炎誘発用モノクローナル抗体カクテル (コンドレックス社製)、および LPS を各実験群のヒト CD20/急性関節炎モデルマウスに投与して急性関節炎を誘発した。各実験群の CD20 ヒト抗原マウスの関節炎の発症を観察し、四肢関節の関節炎スコアを測定した。

その結果、抗体医薬を投与しなかった未治療のマウスでは、関節炎誘発用モノクローナル抗体カクテル、LPS 投与後 5 日目から四肢の関節に急性炎症が発症した。この四肢関節の急性炎症に対して、新薬である TKM-O11 投与によりその抑制する傾向が認められた。一方、同用量のヒト・マウスキメラモノクローナル抗体であるリツキシマブ投与群では、関節炎を抑制する効果が見られなかった（図 10）。

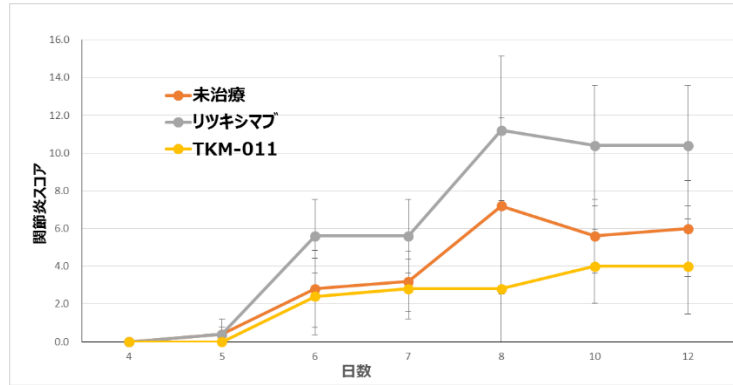


図 10 CD20 抗体医薬投与によるヒト CD20/急性関節炎モデルマウスの関節炎発症に対する効果

CD20 ヒト抗原 (Balb/c 系統) マウスと DBA/1 系統マウスとの戻し交配を 7 世代目まで進め、CD20 ヒト抗原マウスにウシ由来 II 型コラーゲン (CII) をフロイント完全アジュバントとを混和して左後肢足蹠に皮内注射した。この日に 250 μ g の抗 CD20 治療用モノクローナル抗体、TKM-O11 を 3 週間継続して腹腔内に投与した。CII を投与した 21 日後に CII とフロイント不完全アジュバントを同様に混和したものを、尾根部皮内に追加免疫した後、各実験群の CD20 ヒト抗原マウスの関節炎の発症を観察し、四肢関節の関節炎スコアを測定して記録した。その結果、抗体医薬を投与しなかった未治療の CD20 ヒト抗原マウス (DBA/1) では、5 世代目までは全く見られなかったウシ由来 II 型コラーゲンの免疫による関節炎の発症が認められた。この四肢関節の炎症に対して、TKM-O11 投与によりその発症が遅延、抑制される傾向が認められた (図 11)。

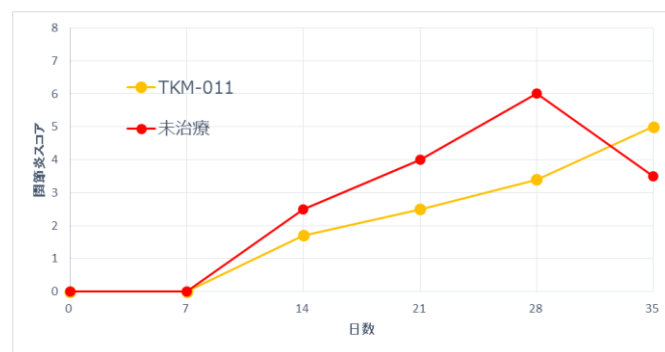


図 11 CD20 抗体医薬投与による CD20 ヒト抗原マウス (DBA/1) のコラーゲン誘発関節炎モデルに対する効果

以上の研究成果により、①「自己免疫性肝炎モデル」において、抗 CD20 治療用モノクローナル抗体、TKM-O11 を投与することにより、肝臓炎症の有意な改善、肝内炎症浸潤細胞の減少、脾臓 B 細胞の減少をもたらすこと、②「リウマチモデル」において、TKM-O11 投与により、関節炎発症時間の遅延、または関節炎の抑制効果をもたらす傾向があることを示すことができた。

2-2-2 マウス抗体の調製と抗体医薬との薬理効果の比較

以下に示す方法で、抗ヒト CD20-ヒト化モノクローナル抗体である TKM-O11 のベースになった抗ヒト CD20 マウスモノクローナル抗体、1k1791 を調製し、CD20 ヒト抗原マウスに投与を行ない、ヒト Fc γ 受容体を発現することによってヒト化された CD20 ヒト抗原マウスのエフェクター細胞の効果を比較した。

【1-1】細胞馴化

抗ヒト CD20 マウスモノクローナル抗体 1K1791 産生ハイブリドーマの直接馴化法による無血清培地への馴化を実施した。ハイブリドーマ細胞を 1×10^6 cell/mL で無血清培地に播種し、 3×10^6 cell/mL になった時点で継代した。細胞の生存率が90%以上になるまで継代を続け、約 35 日で馴化した。無血清培地は、hybridoma-SFM (Gibco 社製) と ASF104 (AJIMONOTO 社製) を使用し、ASF104 に馴化した細胞の方が抗体産生効率が良かった (約 100mg/L ; 図 12)。得られた細胞は、細胞凍結用試薬バンバンカー (Gibco 社) を用いて、 1.0×10^6 /バイアルで凍結保管した。

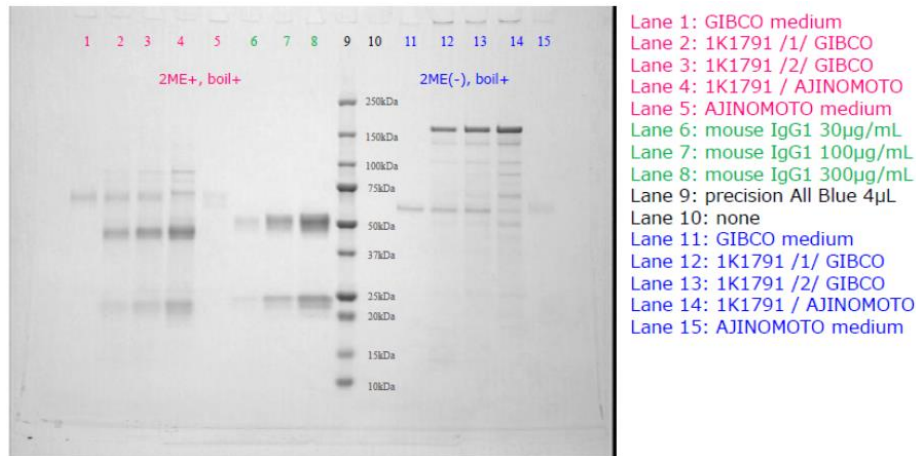


図 12 無血清培養下で生産された抗ヒト CD20 マウスモノクローナル抗体 1K1791 (SDS-PAGE)

【1-2】細胞培養

ASF104 に馴化した 1K1791 産生ハイブリドーマを用いて、バイオリアクターによる細胞培養を実施した。凍結保管した ASF104 へ馴化した細胞を 24well プレートに解凍し、顕微鏡観察にて細胞の状態を担保しながらフラスコで 240mL まで培養スケールをアップした。フラスコでスケールアップした細胞培養の生存率が 80%以上であることを確認し、1 リッターのスピナーフラスコへ移して培養をおこなった。1L でのスピナーフラスコへ播種後、17 日目で生細胞生存率が 10%以下になったところで培養液を回収した (図 13)。

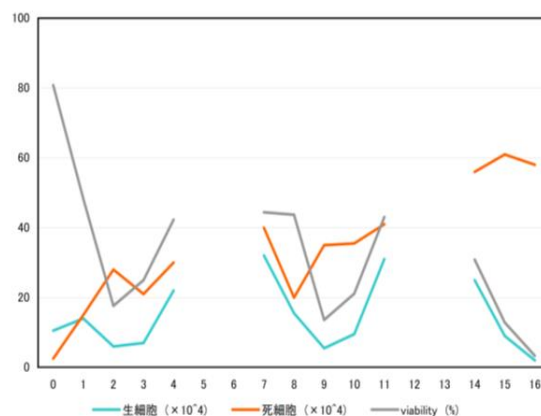


図 13 スピナーフラスコ培養 (左) とハイブリドーマ 1K1791 の培養経過

【1-3】ProteinG 精製

得られた細胞培養上清から、ProteinG カラムを用いたアフィニティ精製を実施した。遠心分離によりスピナー培養の培養上清から細胞を除去し、限外ろ過膜を用いて濃縮した後、ProteinG カラムにアプライした。1.5M グリ

シン、3.0M 塩化ナトリウム (pH8.9) で平衡化させた後、0.2M クエン酸 (pH6.0) によりカラムから 1K1791 を溶出させた。以上の ProteinG 精製の結果、120mg の 1K1791 を回収することができた (図 14)。

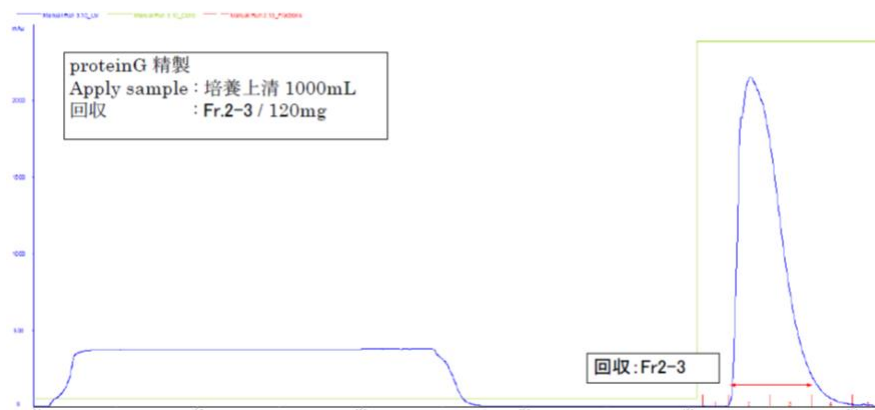


図 14 1K1791 の ProteinG 精製

【1-4】ゲルろ過精製

ゲルろ過精製により、ProteinG 精製フラクション中に混在する可能性がある核酸、エンドトキシンなどの夾雑物を除去すると共に、バッファー置換を行って、マウス接種用に高純度 1K1791 を精製した。

ProteinG 精製して回収した 1K1791 フラクションを限外ろ過膜により濃縮し、Superdex 200 pg カラム (GE ヘルスケア社) によるゲルろ過精製を実施し、各フラクションの純度を SDS-PAGE により確認した。その結果、十分な純度で 1K1791 が精製され、その回収量は約 95mg であった (図 15)。

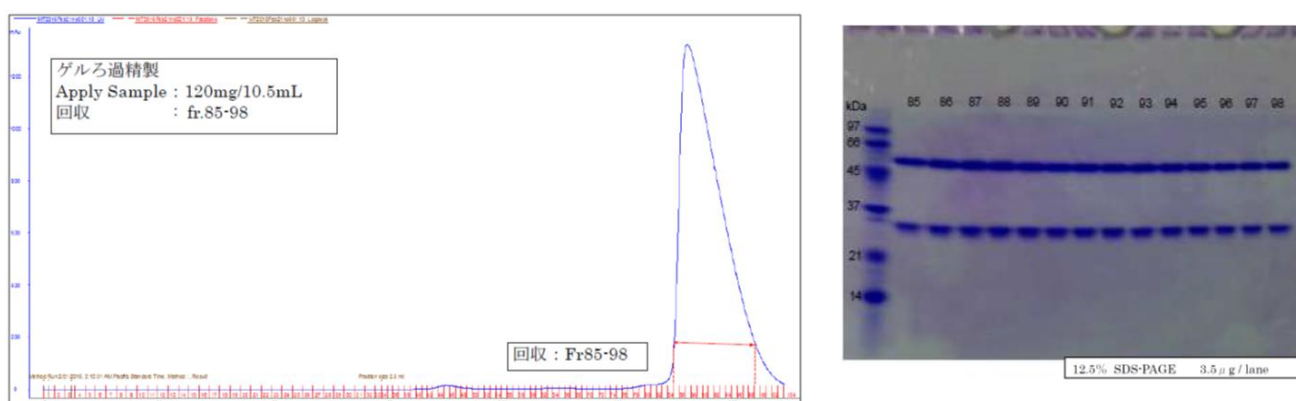


図 15 1K1791 のゲルろ過精製

各群3頭のCD20 ヒト抗原マウスを育成し、TKM-O11 (抗体医薬) 投与群、および 1K1791 (マウス抗体) 投与群に分けて、それぞれ 250 μ g の被験薬を腹腔内投与した。7日後に各投与群のヒト抗原マウスから脾臓を摘出し、フローサイトメーターを利用して脾臓 B 細胞数を計測した。溶媒投与群の脾臓 B 細胞数をコントロールとして、抗体医薬、およびマウス抗体による B 細胞除去効果を算出した。その結果、抗体医薬、およびマウス抗体の投与により、それぞれ、59%、および24%の脾臓 B 細胞数が除去されていた。Student's t 検定により抗体医薬、およびマウス抗体による B 細胞除去効果を評価したところ、抗体医薬による B 細胞除去効果はマウス抗体に較べて有意に大きかった (図 16)。

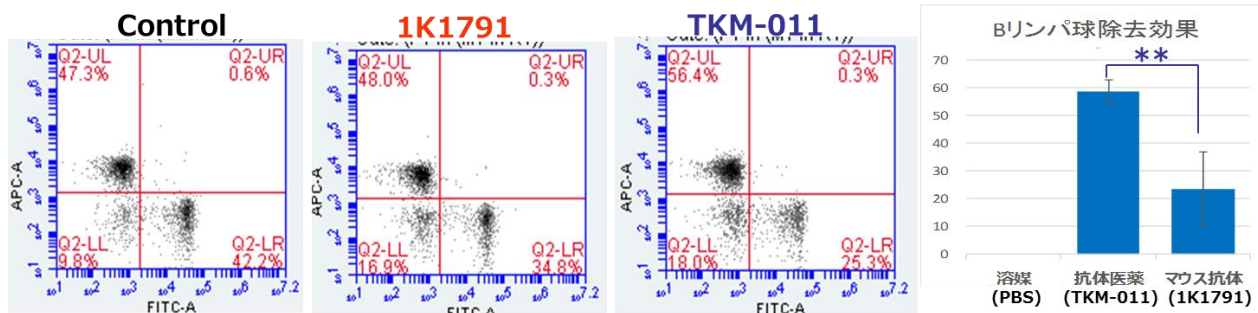
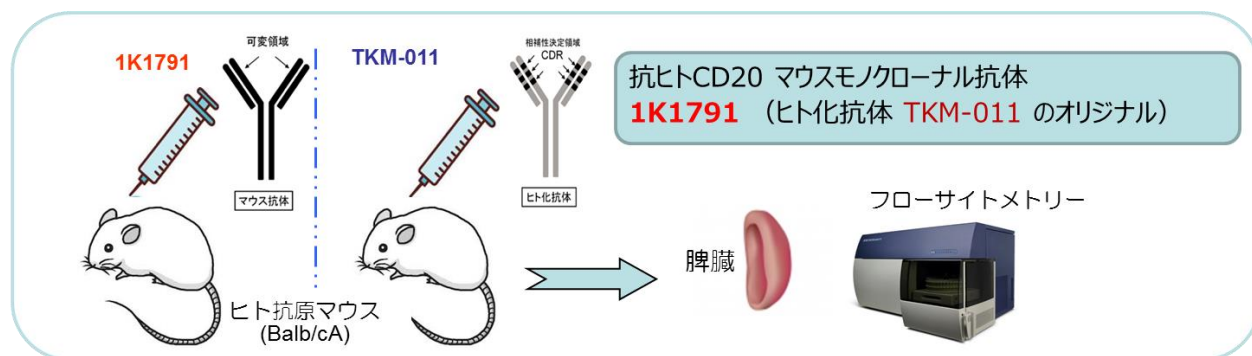


図 16 マウス抗体と抗体医薬の薬理効果の比較

以上の結果から、ヒト抗原マウスに導入されたヒト $Fc\gamma$ 受容体の効果により、内在性のマウス $Fc\gamma$ 受容体を介した B 細胞除去効果をむしろ上回る抗体医薬に対する応答性が実現されていることが示された。

2-3 抗体医薬の力価測定法の開発

ベストインクラスの抗体医薬を開発する場合、インビボでの抗体医薬の力価を迅速に測定して探索プロセスにフィードバックする必要がある。また、抗体医薬が製剤化された後に発生するタンパク質の会合や凝集など物理的変性と、それに伴う生物活性の低下や免疫原性は、臨床開発、および上市後の抗体医薬の治療効果や安全性に大きく影響を及ぼす。そこで、抗体医薬の臨床試験や臨床で患者の治療に利用するためには、その高分子タンパク質を安定的に維持する製剤化条件を検討する必要がある。そこで、CD20 抗体医薬と CD20 ヒト抗原マウスを利用して、ヒト抗原マウスを利用した迅速かつ簡便な抗体医薬の力価測定実施の可能性を検証した。

2-3-1 第三世代抗体の評価

1990 年代後半に CD20 抗体医薬としてリツキシマブが初めて臨床応用されて以来、B 細胞リンパ腫の治療成績が著しく向上した。CD20 抗原は B 細胞悪性腫瘍の 95%に見出される一方で、他の組織には発現していないため、リツキシマブは優れた効果をもたらすことに成功した。しかしながら、リツキシマブによる優れた治績成績にも関わらず、大部分の B 細胞リンパ腫患者においては最終的にリツキシマブに対する抵抗性が発生し、再発および再燃を免れることができない。そこで、リツキシマブ以降も様々な新規 CD20 抗体医薬が開発されてきた(図 17)。

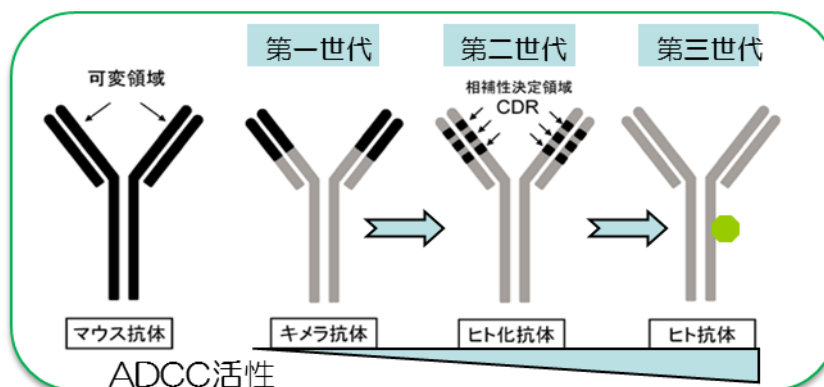


図 17 抗体医薬モダリティの変遷

ヒト化された CD20 ヒト抗原マウスのエフェクター細胞による ADCC 活性がヒト抗原マウスでの力価に反映されるかを調べるために、ヒト抗原マウスに複数の抗体医薬を投与し、薬理活性の多剤比較試験を行なった。

各群 3 頭の CD20 ヒト抗原マウスを育成し、それぞれ力価が異なる、抗ヒト CD20-ヒト・マウスキメラモノクローナル抗体であるリツキシマブ（第 1 世代抗体医薬）、抗ヒト CD20-ヒト化モノクローナル抗体である TKM-O11（第 2 世代抗体医薬）、および抗ヒト CD20-糖鎖改変型ヒト化モノクローナル抗体であるオビヌツズマブ（第 3 世代抗体医薬）を入手し、それぞれ 250 μ g の被験薬を腹腔内投与した。7 日後に各投与群のヒト抗原マウスから脾臓を摘出し、フローサイトメーターを利用して脾臓 B 細胞数を計測した。溶媒投与群の脾臓 B 細胞数をコントロールとして、各抗体医薬による B 細胞除去効果を算出した。

その結果、第 1 世代抗体、第 2 世代抗体、および第 3 世代抗体による CD20 ヒト抗原マウスの B 細胞除去効果は、それぞれ、53%、59%、および 62%であった。Student's t 検定により B 細胞除去効果を評価したところ、第 2 世代、第 3 世代の抗体医薬による B 細胞除去効果は第 1 世代抗体医薬に較べて有意に大きかった（図 18）。

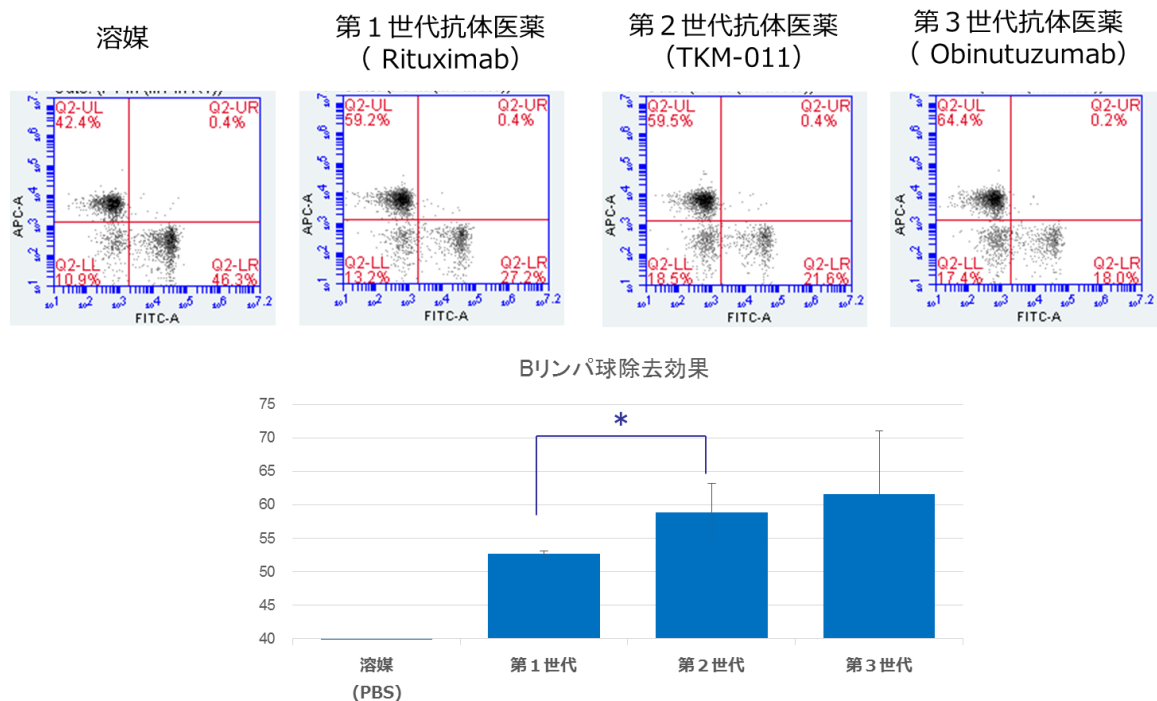


図 18 各世代の抗体医薬の薬理効果の比較

2-3-2 安定性と生物活性の比較

モノクローナル抗体を医薬品として応用する場合、製造後の物流、保管時に発生しうる薬剤の変性・凝集体形成（図 19）を抑制して、長期安定性を保持することが重要である。そこで、抗体の会合、凝集、溶解性を指標にした加速安定性試験により、抗ヒト CD20-ヒト化モノクローナル抗体である TKM-011 の製剤化条件とその安定性を評価し、製剤の安定性の違いによる抗体医薬の力価の変化を、CD20 ヒト抗原マウスを利用したバイオアッセイにより評価した。

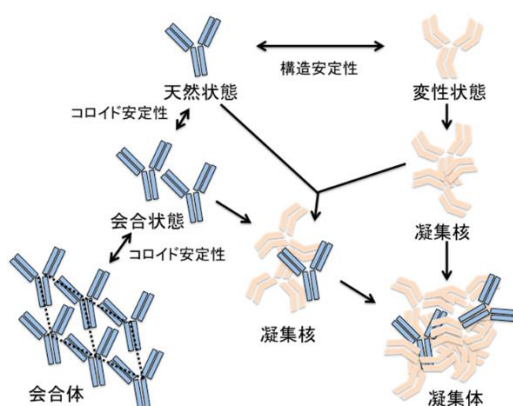


図 19 抗体医薬に起こりうる薬剤の変性・凝集体形成

以下に示す方法で、pH とイオン強度を変化させた条件で抗 CD20 治療用モノクローナル抗体、TKM-011 を製剤化して、物理化学的分析によりコロイド安定性、構造・凝集安定性を評価した。

まず、使用した TKM-011 抗体医薬製剤の溶媒交換を行った。10 mL の TKM-011 5 mg/ml を 20 mM

酢酸ナトリウム溶液、pH5.0 へ透析後、AKTA prime を使用して、Hitrap SPHP を通し、100 mM リン酸、400 mM 塩化ナトリウム、pH8.0 で溶出した。抗体画分を slide-a-lyzer dialysis cassettes を用いて、蒸留水へ透析後、Vivapore を用いて、5 mg/ml 以上の濃度まで濃縮した。各測定条件に合わせて、溶液調製を行った。

次に、DLS による kD を指標としてコロイド安定性 (DLS,kD) 評価した。各試料について、抗体濃度 2 点 (1 mg/ml, 5 mg/ml)、n=1 として、384-Well Multiwell Plates へ各ウェルあたり 20 μ L 分注した。遠心分離の後、Dynapro Plate reader を用いて、DLS を測定した。各試料の抗体濃度と Diffusion Coefficient (um²/s) をプロットすることで kD を算出した。

そして、DLS による Tagg を指標として構造安定性 (DLS,Tagg) を評価した。各試料について、抗体濃度 1 mg/ml、n=1 として、384-Well Multiwell Plates へ各ウェルあたり 20 μ L 分注した。遠心分離の後、Dynapro Plate reader を用いて、測定温度 25~80℃の範囲で DLS を測定した。各試料の温度変化と Diameter (nm) をプロットすることで凝集開始温度 Tagg を決定した。

最後に、OPTIM による Tagg を指標として構造安定性 (OPTIM,Tagg) を評価した。各試料について、抗体濃度 1 mg/ml、n=3 として、OPTIM1000 を用いて、測定温度 20~90℃の範囲で測定した。各試料の温度変化と静的光散乱より凝集開始温度 Tagg を決定した。

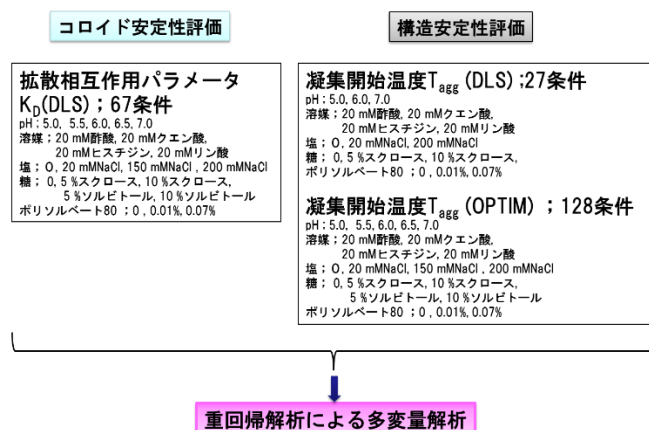


図 20 抗体医薬 TKM-011 の製剤化条件と物理化学的分析によるコロイド安定性、構造・凝集安定性評価

以上の試験結果から、全てのパラメータについて、NaCl は添加しない、pH は酸性側、構造安定性の観点から糖を添加する方が好ましいが、コロイド安定性の観点からは添加しない方が好ましい、PS80 の添加は大きく影響を与えない、等の知見が重回帰解析による多変量解析から明らかとなった(図 21)。

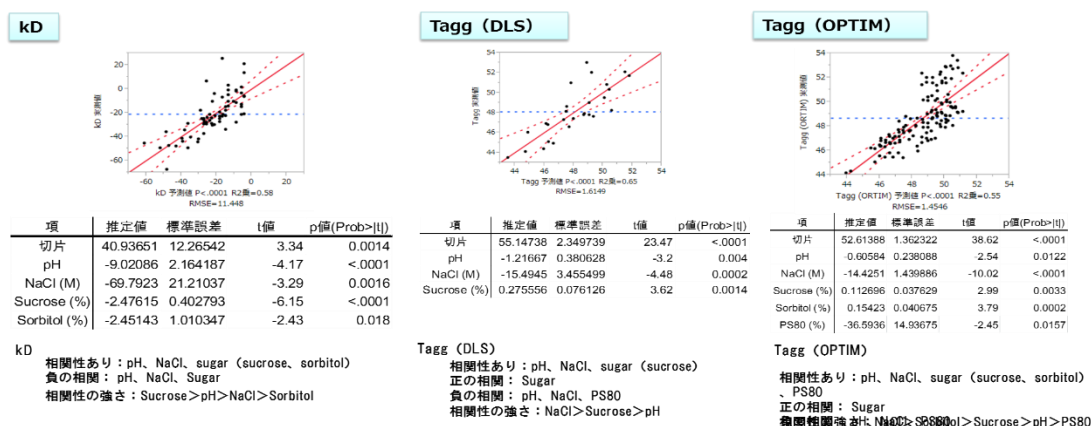


図 21 TKM-011 の製剤化条件とコロイド安定性、構造・凝集安定性の多変量解析

次に、コロイド安定性と構造安定性の評価、加速試験の結果より選抜した15の製剤化条件でTKM-O11を調製し、実際に $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 及び $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $75\%\text{RH}\pm 5\%$ の条件で1、3、6ヶ月の保管試験を実施し、重合体形成（サイズ排除クロマトグラフィー）、濁度、可溶性（吸光解析）、粒子形成（フローイメージング）を測定して、凝集体の定量解析を行った。

表3 TKM-O11の長期保管試験に供した製剤化条件

	バッファー	NaCl (mM)	Sucrose (%)	Sorbitol (%)	PS80 (%)
13	20 mM 酢酸, pH5.0	0	6	0	0.01
15	20 mM 酢酸, pH5.0	0	12	0	0.01
19	20 mM 酢酸, pH5.0	0	0	6	0.01
14	20 mM 酢酸, pH5.0	60	6	0	0.01
11	20 mM 酢酸, pH5.0	0	0	0	0.01
17	20 mM 酢酸, pH5.0	0	0	3	0.01
16	20 mM 酢酸, pH5.0	60	12	0	0.01
35	20 mM クエン酸, pH5.0	0	12	0	0.01
39	20 mM クエン酸, pH5.0	0	0	6	0.01
12	20 mM 酢酸, pH5.0	60	0	0	0.01
21	20 mM クエン酸, pH5.0	0	0	0	0
22	20 mM クエン酸, pH5.0	60	0	0	0
28	20 mM クエン酸, pH5.0	60	0	3	0
41	20 mM クエン酸, pH6.5	150	0	0	0.07
42	20 mM ヒスチジン, pH6.0	150	0	0	0.07

その結果から統計学的に安定な製剤化条件をランク化し、さらに、コロイド安定性、構造・凝集安定性と実際の保管安定性との相関性を見出した（図22）。

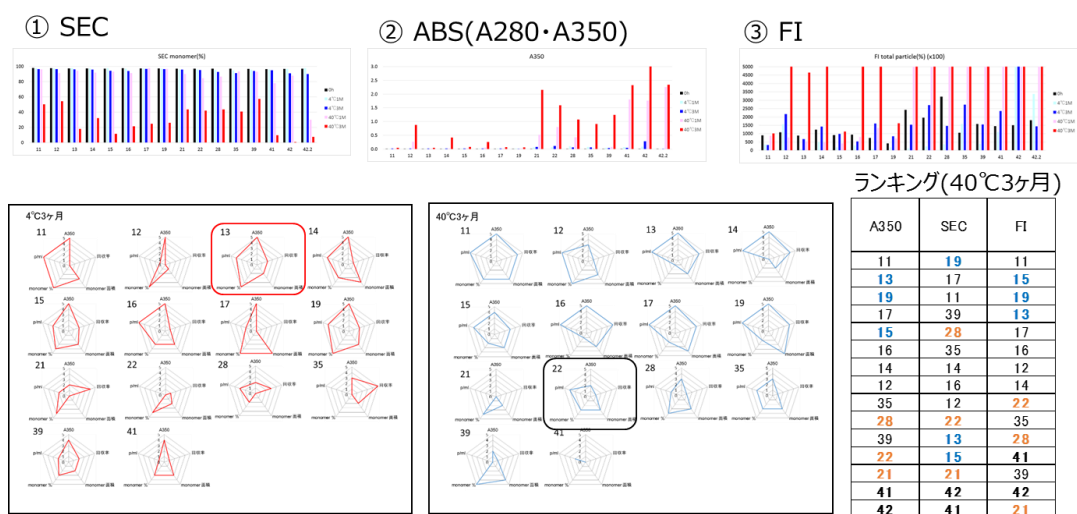


図22 TKM-O11の製剤化条件とコロイド安定性、構造・凝集安定性

以上の試験結果から、安定性の異なる以下の3種類の製剤条件によるTKM-O11を調製しサンプル3種類を調製し、ヒト抗原マウスでの薬理効果に反映されるかを調べるために、ヒト抗原マウスに安定性の異なる3種類の抗体医薬を投与し、薬理活性の多剤比較試験を行なった。

- ・ TKM-O11 (A)；4°C保管したサンプル13
- ・ TKM-O11 (B)；3日間振とうにより凝集を発生させたサンプル22
- ・ TKM-O11 (C)；30日間40°C保管により凝集を発生させたサンプル22

各群4頭のCD20ヒト抗原マウスを育成し、それぞれ安定性が異なる、(A)高安定的製剤、(B)中安定的製剤、および(C)低安定的製剤のTKM-O11、それぞれ $250\mu\text{g}$ を腹腔内投与した。7日後に各投与群のヒト抗原マウス

から脾臓を摘出し、フローサイトメーターを利用して脾臓 B 細胞数を計測した。溶媒投与群の脾臓 B 細胞数をコントロールとして、各製剤条件の TKM-011 による B 細胞除去率を算出した。その結果、高安定的製剤抗体、中安定の製剤抗体、および低安定的製剤抗体による B 細胞除去効果はそれぞれ、51%、52%、および19%であった。Student's t 検定により B 細胞除去効果を評価したところ、高安定的製剤抗体、中安定の製剤抗体の抗体医薬による B 細胞除去効果は低安定的製剤抗体医薬に較べて有意に大きかった (図23)。

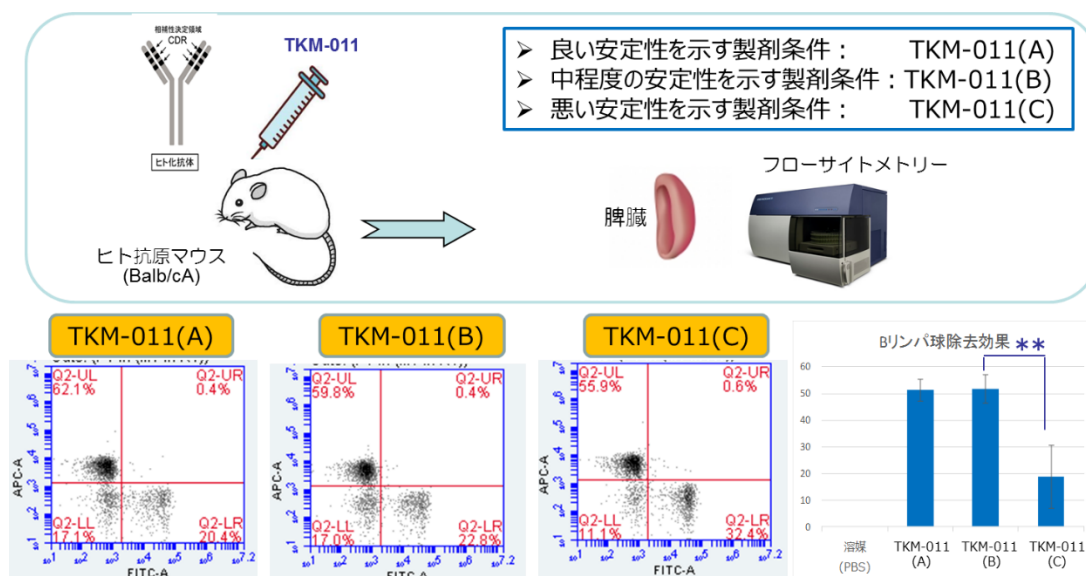


図 23 TKM-011 の各種製剤化条件での薬理効果の比較

さらに、表2に示した 15 種類の製剤化条件の中から、より安定性に優れた製剤化条件を 2 種類 (サンプル 13 (20 mM 酢酸 pH5.0, 6 %Sucrose, 0.01 %PS80)、およびサンプル 19 (20 mM 酢酸 pH5.0, 6 %Sorbitol, 0.01 %PS80)) を選択し、この 2 種類の製剤条件で調製した高濃度 (10 mg/mL) の TKM-011 製剤をサンプルにして、以下の条件で安定性試験及び過酷試験を実施した。

【硫酸溶解度試験】溶媒を超純水に置換した TKM-011 溶液を、ピバポア (ザルトリウス社) を用いた限外ろ過により 10 mg/mL 以上に濃縮した。硫酸アンモニウム濃度 1.1~2 M になるように TKM-011 溶液を添加し、10 分間静置後、16,000g、1 分遠心分離し、上清の吸光度を測定することにより、各溶媒条件で溶解度を測定した (図 24)。その結果、サンプル 19 に較べて 13 の方が溶解度が高いことがわかった (図 25)。

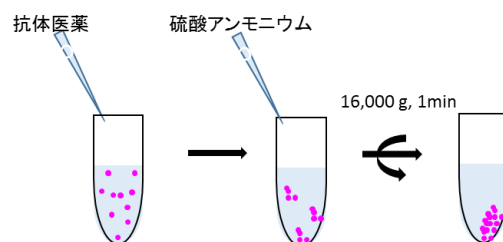
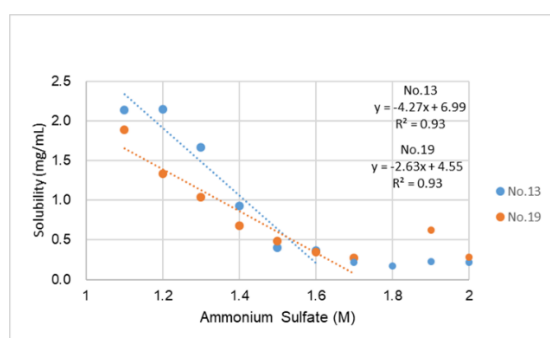


図 24 抗体医薬の硫酸溶解度試験



	Kdiff	Tm
No.13	15.7	47.3°C
No.19	16.6	46.5°C

図 25 高濃度 TKM-011 の硫酸溶解度試験結果

【過酷試験】 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $75\%\text{RH}\pm 5\%$ の条件で3日間振盪させた後、液体窒素 $\leftrightarrow 20^{\circ}\text{C}$ の凍結融解を3回繰り返すことにより過酷試験を実施し、濁度、可溶性（吸光解析）を測定して、凝集体の定量解析を行った。その結果、図26に示すように、サンプル13で過酷試験後に白濁が確認され、濁度が明らかに高くなった。

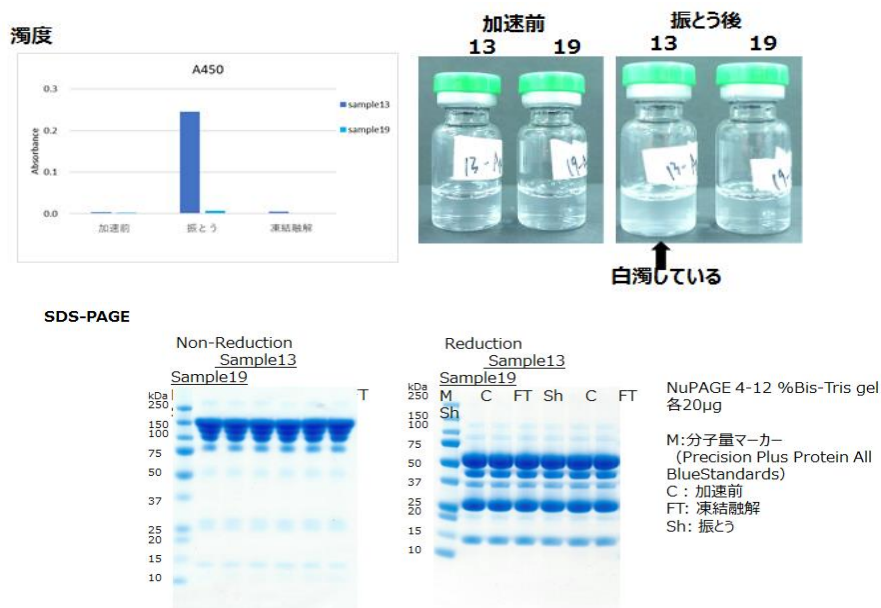


図26 高濃度 TKM-011 の過酷試験

【安定性試験】 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 及び $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $75\%\text{RH}\pm 5\%$ の条件で6ヶ月の保管試験を実施し、濁度、可溶性（吸光解析）を測定して、凝集体の定量解析を行った。その結果、両サンプルともに 40°C で6ヶ月保管後には目視で白濁が確認され、濁度が明らかに高くなった。また、 4°C で保管したサンプルに比べ、 4°C で保管したサンプルには多くのバンドが確認された（図27）。

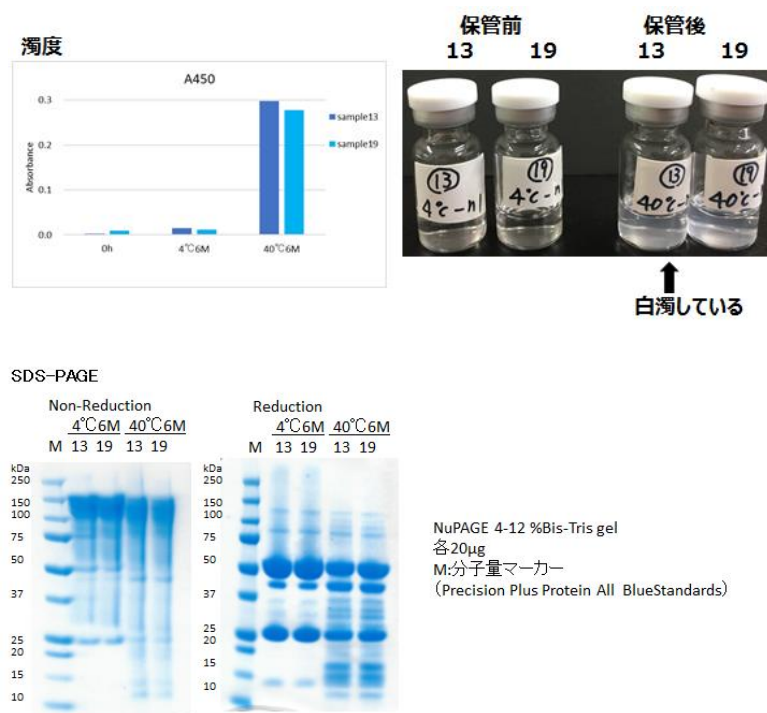


図27 高濃度 TKM-011 の安定性試験結果

以上の結果から、硫安溶解度試験からはサンプル 13 がやや溶解度は高いものの、振盪、凍結融解による過酷試験からはサンプル 19 の安定性がより優れていることが明らかになった。従って、TKM-O11 の高濃度化を図る条件として、サンプル 19 を最終的な処方として選択した。この製剤条件で調製した高濃度 TKM-O11 を CD20 ヒト抗原マウスに投与して、薬理活性の比較試験を行なった。

各群3頭のCD20 ヒト抗原マウスを育成し、標準濃度の TKM-O11 製剤、および高濃度の TKM-O11 製剤を、それぞれ 250 μ g 腹腔内投与した。7日後に各投与群のヒト抗原マウスから脾臓を摘出し、フローサイトメーターを利用して脾臓 B 細胞数を計測した。溶媒投与群の脾臓 B 細胞数をコントロールとして、各濃度の TKM-O11 製剤による B 細胞除去効果を算出した。

その結果、標準濃度の TKM-O11 製剤、および高濃度の TKM-O11 製剤による B 細胞除去効果は、それぞれ、70%、および73%であった。Student's t 検定により B 細胞除去効果を評価したところ、標準濃度の TKM-O11 製剤、および高濃度の TKM-O11 製剤による B 細胞除去効果に有意な違いはなかった (図 28)。

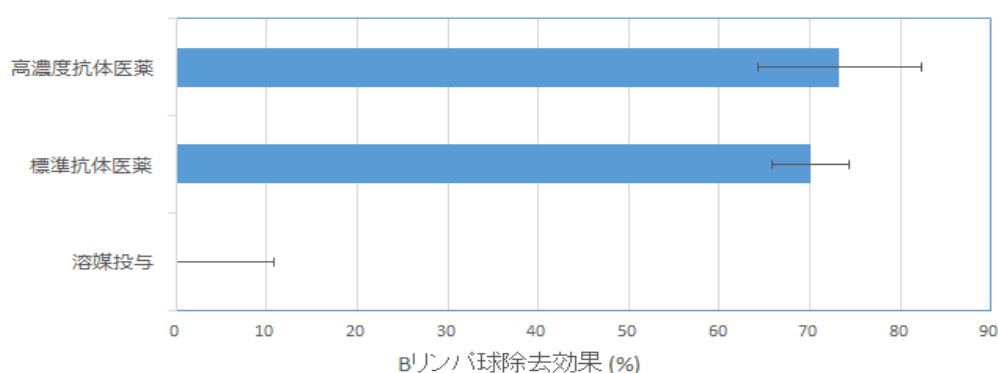


図 2 8 ヒト抗原マウスを利用した高濃度 TKM-O11 製剤の薬理効果の比較

以上の試験結果から、抗体医薬の開発において非常に重要な過程である高濃度製剤化条件の検討において、ヒト抗原マウスを利用した生物活性の評価が重要な決定指標になることを示すことができた。

抗体医薬の開発において非常に重要な過程である、探索研究における力価評価、および高濃度製剤化条件の検討において、物理化学的分析による安定性評価と、ヒト抗原マウスを利用した迅速な生物活性の評価結果に有意に相関性があることを統計学的に立証することができた。

2-4 ヒト抗原発現の安定性保証

抗体医薬の開発にヒト抗原マウスを利用する場合、マウスに遺伝子導入した外来性の組換え DNA からのヒト抗原の発現が、個体間、世代間を超えて安定的に発現している必要がある。そこで、ヒト抗原マウスの性別、および週齢別ヒト抗原の発現量を定量的に測定するとともに、ヒト抗原マウスの世代間での導入遺伝子の安定性、およびヒト抗原の発現量を定量的に測定した。

2-4-1 性別、週齢別発現安定性評価

雌雄のCD20ヒト抗原マウスを同一出生日で出生させ、自由摂食で6週齢、16週齢、および24週齢まで育成させた後に脾臓組織を摘出、リアルタイムPCR法、およびフローサイトメトリーにより脾臓におけるヒトCD20抗原、およびヒトFc γ 受容体の発現量を、mRNA、およびタンパク質レベルで測定した。その結果、各週齢のCD20ヒト抗原マウスの脾臓におけるヒトCD20抗原のmRNA、およびタンパク質の発現レベル（図29、上）、ヒトFc γ 受容体3A、および3BのmRNA発現レベル（図29、下）は、雌雄間、週齢間で安定しており、個体間に統計的に有意な差が無いことが示された。

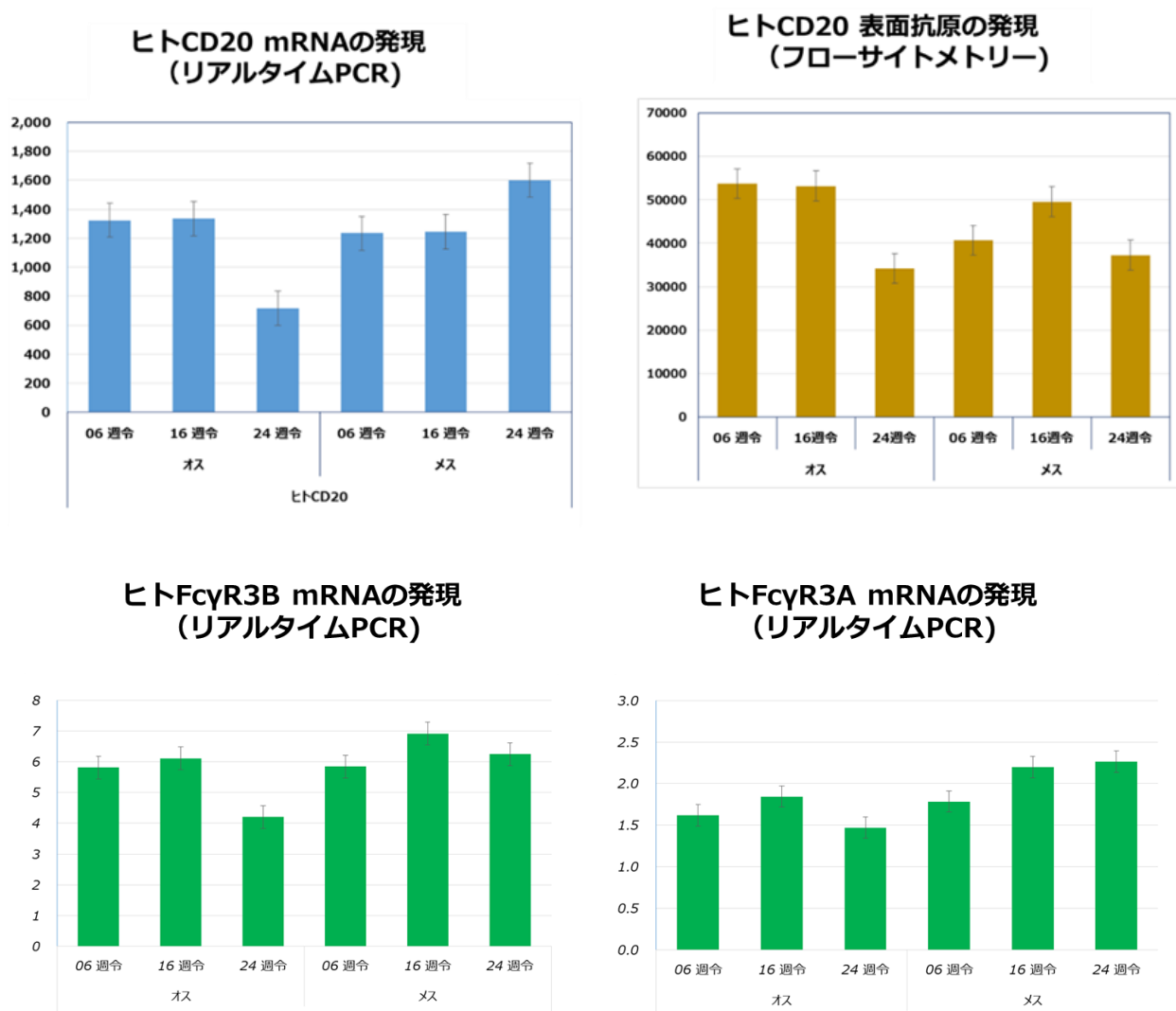


図29 ヒト抗原マウスの脾臓におけるヒトCD20、Fc γ 受容体の発現量

2-4-2 世代間発現安定性評価

F4 世代、F5 世代、F6 世代の CD20 ヒト抗原マウスを 10 週齢時に安楽死させ、脾臓組織を摘出、サザンブロットハイブリダイゼーション法、リアルタイム PCR 法、およびフローサイトメトリーにより、それぞれ脾臓におけるヒト CD20 抗原、およびヒト Fc γ 受容体の発現量を、mRNA、およびタンパク質レベルで測定した。

ゲノムに導入されたヒト CD20、およびヒト Fc γ 受容体 BAC 発現ベクターのコピー数をサザンブロットハイブリダイゼーションで検出したところ、ゲノムに導入されたヒト CD20、およびヒト Fc γ 受容体 BAC 発現ベクターのコピー数は、世代を超えて、雌雄間、個体間において均一で、それぞれ、3 コピー、および 3 コピーであった (図 30)。

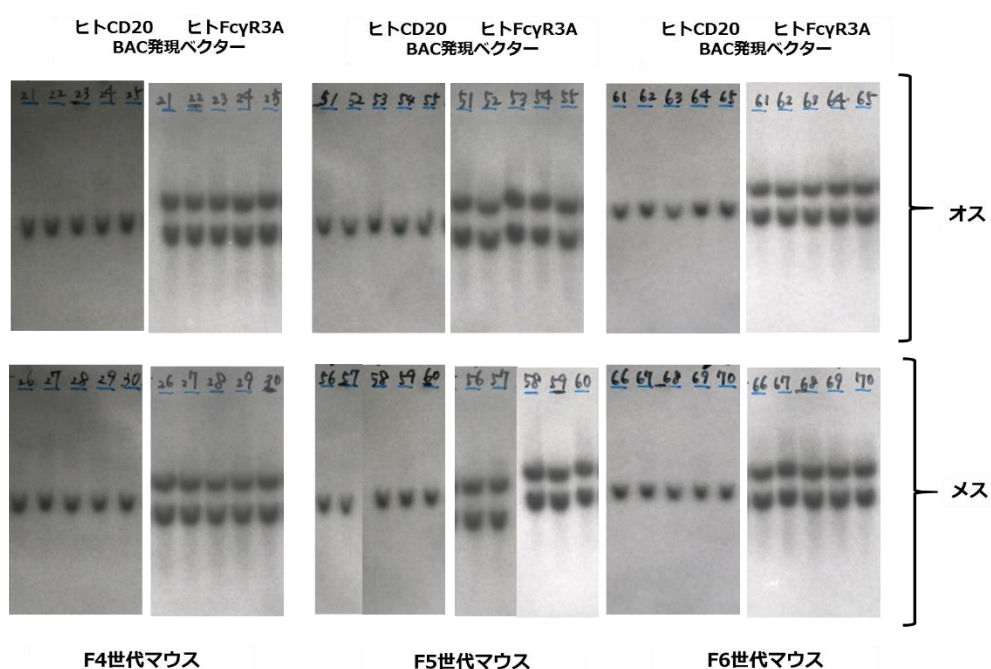


図 30 各世代ヒト抗原マウスゲノムに伝達されたヒト CD20、およびヒト Fc γ 受容体 BAC 発現ベクター

世代を超えた雌雄間、個体間の脾臓におけるヒト CD20 抗原、およびヒト Fc γ 受容体 3A 発現レベルは、ヒトヒト Fc γ 受容体 3A の F4/F5 世代間のばらつきのみ 20%を超えたが、ほぼ誤差 20%の範囲内にあることを示すことができた。(図 31、32)。

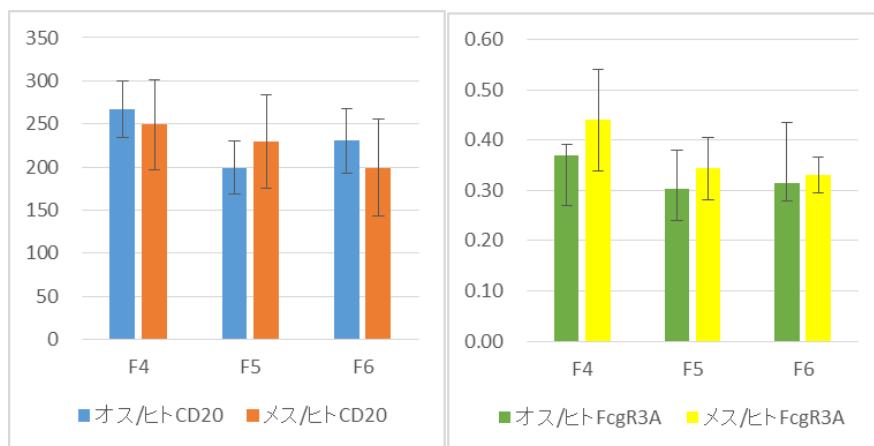


図 31 ヒト抗原マウスの脾臓におけるヒト CD20、Fc γ 受容体 mRNA の発現量

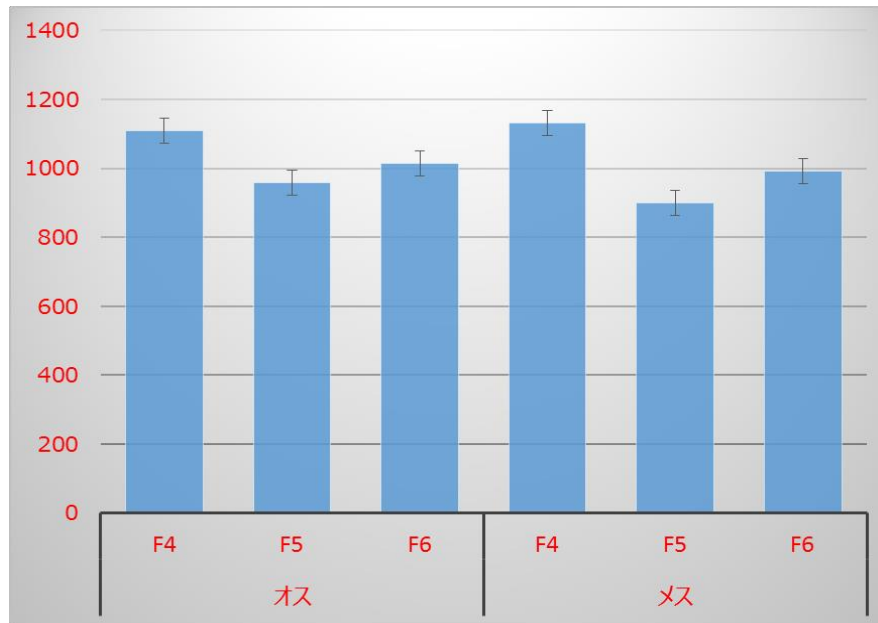


図 32 ヒト抗原マウスの脾臓におけるヒト CD20 表面抗原の発現量

最終章 全 体 総 括

3-1 研究開発成果

- 川下の製薬企業やバイオベンチャーの動向に関する情報を収集し、免疫チェックポイント阻害抗体医薬の活性評価を可能にするヒト抗原マウスの作出にフォーカスした開発を実施した。小野薬品工業が販売したPD-1 抗体医薬、「オプジーボ」をきっかけにして、既にグローバル市場で活躍するビッグファーマ5陣営が「がん免疫療法」の治療薬の開発にしのぎを削る状況にあり、多くの製薬会社、バイオベンチャーがこの免疫チェックポイント阻害抗体医薬を開発してがん免疫療法に進出しつつあるので、その潮流に合わせてモデルマウスの品揃えを整備することができた。
- 事業化に向けた取り組みとして、当社のPCT 特許を、国内では早期審査制度による特許査定を獲得し、海外では米国、欧州、中国、カナダ、イスラエルへの出願を進めた。
- また、抗体医薬の保管安定性を予測可能とする新規技術の特許出願を行った。
- 学会発表、展示会参加、論文公表を実施し、当技術の周知を図った。国際会議に参加してターゲット顧客の明確化、市場ニーズの情報収集を実施した。
- 当事業の市場価値を算出し、潜在的市場規模を推定した。
- 既に、幾つかのバイオベンチャーから「ヒト腫瘍免疫マウス」の引き合いを得ている。
- 補助事業による開発成果から、ベストインクラス抗体医薬をスクリーニングできるマウスモデルの妥当性を示すことができた。当社のビジネスモデルが新規抗体医薬の創薬に有効であることをポイントにして、事業計画を検討している。上記のマウスモデルの開発に必要な開発資金を確保するために、当社のビジネスプランを投資家に説明し、資金調達を実施すべく準備を進めている。

3-2 事業化の見通し

オブジーボに代表されるように、抗体医薬は極めて付加価値の高い製品に成長してきた。現在抗体医薬の評価は専ら霊長類であるサルを使用した投与試験により行なわれている。しかし、動物数の制約や高額な費用がネックとなり、試験の機会、回数が非常に限られている。抗体医薬の開発現場においては、抗体医薬品候補のうちどれが最も優れているかを臨床試験前に評価する方法がないため、開発が不成功に終わるリスクの高い状況で臨床試験を遂行せざるを得なかった。

マウスを利用した抗体医薬のインビボ評価法（図 33）が確立されることにより、臨床試験に供する抗体医薬の探索、薬効薬理、安全性薬理のバイオアッセイを実施できるようになる。また、作製方法をプラットフォーム化したので、あらゆる創薬ターゲットに対して短期間、かつ確実にマウスモデルを作出が可能となる。

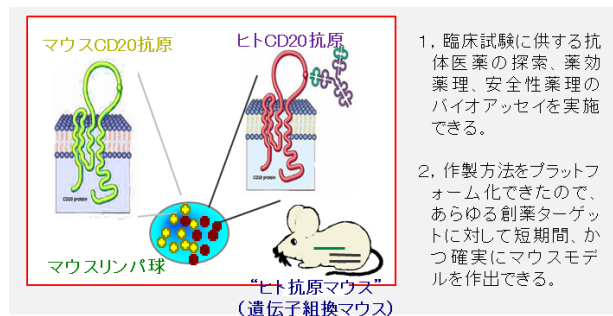


図 33 マウスを利用した抗体医薬のインビボ評価法

市場	2025 年度医薬 売上	総研究 開発費	非臨床 試験費	当事業の 市場 規模推定
抗体医薬	2兆円	4,000 億円	960 億円	20億円
腫瘍免疫 医薬	3兆円	6,000 億円	1,440 億円	30億円

図 34 当事業の市場価値の算出

当事業の市場価値を算出するために、潜在的市場規模を推定した。大手製薬企業やバイオベンチャーの売上高研究開発費率を 20%、その当社の需要ドメインとなる非臨床試験費用の比率が 24%、当社がターゲットする事業の潜在的市場を非臨床試験費用の 2%と想定すると、2025年の抗体医薬、腫瘍免疫医薬の全世界での売上高予想（それぞれ2兆円、3兆円）から推定される当事業の市場規模は、それぞれ20億円、および30億円となる（図 34）。さらに、ヒト抗体ライブラリーとのアライアンスによりヒト抗原マウスから実現する創薬プラットフォームを構築することにより、創薬の標的の枯渇に直面する製薬大手に新しいシーズを提供する、新しいバイオベンチャーのビジネスモデルを実現することも可能となる。

抗体医薬は標的分子に物理的に結合するという一義的な機能を共有しているため、同じ作用機作を持つ他剤との性能の差別化が困難であるという宿命をもっている。従って、抗体医薬が臨床で使用されるようになって20年におよぶ期間、専ら最も初めに市場に出た薬剤（「ファーストインクラス抗体医薬」）が市場を独占してきた（図 35）。

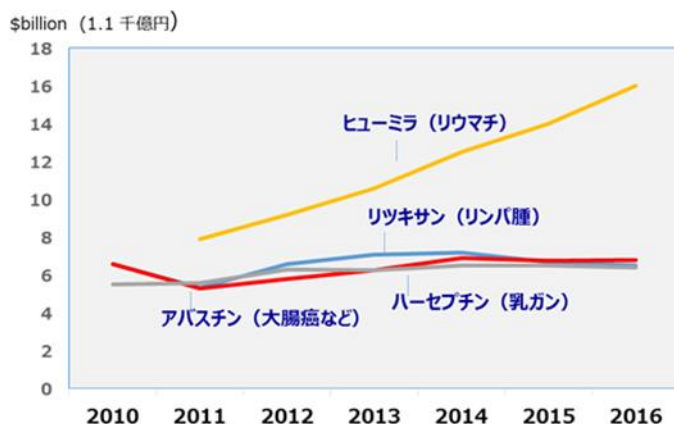


図 35 ファーストインクラス抗体医薬による市場独占

これらの抗体医薬が臨床で成功した最も大きな要因は、臨床効果に直結する標的抗原を見出し、その抗体の臨床開発という高いハードルをいち早くクリアできたことにある。抗体医薬開発には、非常に大きな先行者（ファーストインクラス）利益が伴っていたとすることができる。

しかしながら、2016 年以降の各種の第一世代の抗体医薬の特許失効し、バイオシミラーの市場導入により売上が低下しつつある。そこで、次世代の抗体医薬開発に向けて、抗体工学とその製造方法の進歩に伴い、従来のネイティブタイプのヒト化 IgG 分子そのものではなく、進化した新しいプラ

ットフォームの抗体医薬が顕在化し、またオプジーボの成功に刺激されて様々な免疫チェックポイント阻害抗体医薬の開発が精力的に進められている（図 36）など抗体医薬の開発にもベストインクラスの時代が訪れている。

医薬品では、開発期間の短縮が重要課題と言える。開発期間が短縮されれば、特許の期間がそれだけ延長されることと同等の意味を持つ。仮に現在のブロックバスターとなっている抗体医薬品が特許を 1 年延長できれば、約 3 兆円のユーザーメリットをもたらす。ヒト抗原マウスを中心とした当社プラットフォームが、抗体医薬品製造ビジネスで勝ち残るための必須のツールに成りうると考えることが出来る（図 37）。

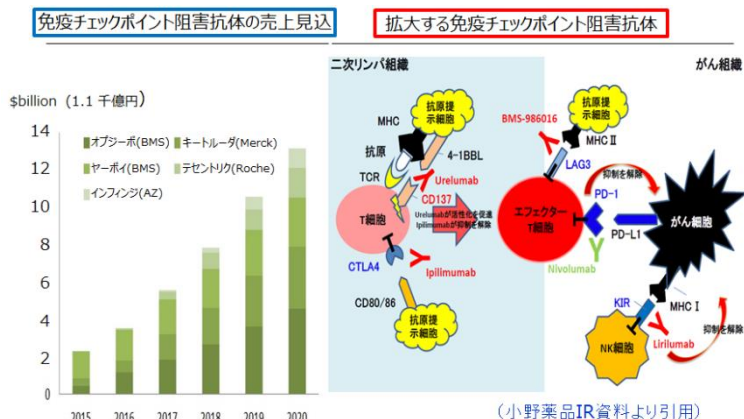
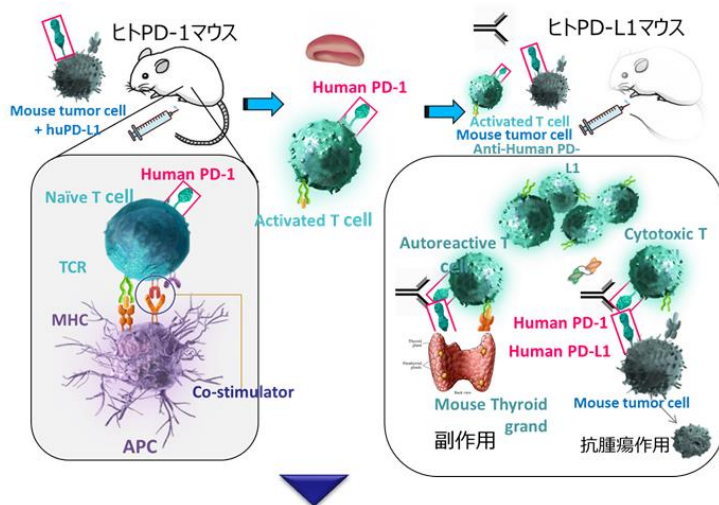


図 36 加速する免疫チェックポイント阻害抗体の開発



ヒト腫瘍免疫マウスでは、治療効果の判定のみならず、副作用の判定も可能

図 37 ヒト抗原マウスを用いた免疫チェックポイント阻害抗体の開発