

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名:

(日本語) 特殊免疫グロブリンの遺伝子組換え血液製剤の製造等に関するレギュラトリーサイエンス研究

(英語) Regulatory science study on the production of specific recombinant antibody drugs originated from human blood

研究開発実施期間: 平成30年4月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 佐竹正博

(英語) Masahiro Satake

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 所長

(英語) President at the Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross

II 研究開発の概要

B型肝炎ウイルス (HBV) の感染性を中和する抗体として、高力価の抗 HBs を含むヒト血漿に由来する免疫グロブリン製剤が使用されている。日本では大きな需要があるが、その98%は海外の血漿に依存している。破傷風毒素 (TeNT) を中和する免疫グロブリン製剤は100%海外血漿に由来する。本研究は、原料血漿の国内確保が困難であるこれらの特殊免疫グロブリン製剤—抗 HBs ヒト免疫グロブリン (HBIG) および抗破傷風毒素ヒト免疫グロブリン (TTIG) —の遺伝子組換え型免疫グロブリン (recombinant hyperimmune globulins, rHIG) を開発し、その実製造へ向けての基礎データを獲得することを目標とする。先行した3年間のAMED研究によって、数人のボランティア供血者からHBIG、TTIGとも複数の抗体産生クローンを得た。今回の研究はそれら抗体の工業的生産にむけた諸評価をするものである。

抗 HBs ヒト免疫グロブリン (HBIG)

1. 先行研究の成果

我々が行った先行AMED研究「特殊な血液製剤や遺伝子組換え製剤の製造等に関する研究」(3か年)において、HBVワクチン接種経歴のある高いHBs抗体価を持つボランティアの末梢血単核球から、抗HBs産生B細胞クローンを複数得た。抗原特異的single cell sorting法により得られた1クローン (XX)

は、ELISA 等の binding assay で HBs 抗原への結合が示され、また胆汁酸トランスポーターNTCP を発現させたヒト肝癌由来培養細胞株 (NCTP-HepG2) を用いた HBV 感染阻止試験で、HBV の中和能を持つ可能性が示された。いっぽう、従来の EBV-ハイブリドーマ法によって得た複数のクローンは、binding assay では HBs 抗原への結合が示されたが、感染阻止能は得られなかった。

2. 抗体リソースの拡大

先行研究に引き続き抗体リソースの拡充に努め、新たに 3 名の高力価抗 HBs 保有協力職員より採取した末梢血リンパ球を用いて EBV-ハイブリドーマ法にて抗 HBs 産生ハイブリドーマ 12 株を樹立した。これらには遺伝子配列の重複があり、異なる配列の 7 クローンであることが判明した。それぞれのリコンビナントモノクローナル抗体 (mAb) を作成し、NCTP-HepG2 を用いた *in vitro* 感染実験にて、ウイルス中和活性を持つ 2 クローン (YY, ZZ) を同定した。

これらとは別に、より確度の高い新たなシーズ採取法の開発を試みた。高力価の抗 HBs を保有する職員の末梢血より B 細胞と血漿を確保した。B 細胞を用いて抗体レパトア解析を行い、抗体可変領域リファレンスとなるアミノ酸配列群を決定した。一方、血漿 IgG より目的抗体アミノ酸配列を質量分析法にて決定するために、HBs 抗原によるアフィニティ精製を実施した。両者を突き合わせることで、実際に機能している抗体の産生にあずかる抗体遺伝子クローンを効率よく同定しようとするものである。方法の確立の途上であるが、将来のシーズ探索の有用な手段になると考えられる。

いっぽう、マウスモノクローナル抗体のヒト化の可能性も考えて、より中和能の高い抗体のエピトープとされている HBV preS1 蛋白でマウスを免疫し、ハイブリドーマ法にて 8 つの陽性クローンを取得している。

3. 抗体の機能評価

・ 中和試験

これまでに得られたリコンビナント抗 HBs-mAb (XX, YY, ZZ) について、ヒト肝細胞キメラマウス由来初代肝培養細胞を用いた *in vitro* HBV 感染実験を行なった。HBV としては日本に多い genotype の臨床分離株を用いた。ウイルスとリコンビナント抗体をプレインキュベーションせずに細胞へ同時添加する系において、3 つの mAb は、血漿分画製剤である抗 HBs ヒト免疫グロブリン製剤 (ヘブスブリン、日本血液製剤機構) と同等かそれを上回るウイルス中和活性を示した。また、いずれももう一つの genotype の HBV に対しても強い中和能を持っていることを確認した。

さらに異なる遺伝子型の HBV に対しての中和能を調べるための準備として、HBV 陽性献血者血液より HBs 抗原を高濃度を含む血漿を、その他二つの genotype についてそれぞれ確保した。これらを *in vitro* 感染中和実験の感染源として用いるために、標的細胞であるヒトキメラマウス初代培養肝細胞を用いてこれらウイルスの馴化実験を行い、市販品と同等の感染効率の標準ウイルスを得た。

・ エピトープ解析

変性 HBs 抗原およびウイルス様 HBs 抗原粒子に対する抗体結合性を、SDS-PAGE または Native-PAGE -Western Blotting で解析した。いずれの mAb も、還元処理に感受性のあるエピトープを認識していることが示された。また各抗体の CDRH3 配列から、結合様式は 3 種とも異なることが示唆された。

・ 免疫原性試験

この研究では、ワクチン接種によって実際にヒトが産生した抗体を採取しており、原理的にヒト正常組織に交差反応を示すことはないはずであるが、*in vitro* の実験によってそれを間接的に証明する必要もある。ELISA を用いて、ヒト由来生体分子 (インスリンおよびゲノム DNA) に対する mAb の交差反応性を見たところ、抗体の高濃度においてもそれらへの結合は認められなかった。また混合 mAb は、市販の HBV 陽

性患者肝臓組織パネル切片において HBs 抗原を明瞭に染色する一方、HBV 非感染健常ヒト組織アレイにおいては、どの臓器の組織にも交差反応を示さなかった。

4. 抗体の品質試験

・ 抗体純度評価

品質管理の前提として、モノクローナル抗 HBs の純度を評価した。遺伝子を導入した細胞の培養上清を精製して得られたリコンビナント抗体を、LC-MS/MS を用いて網羅的にタンパク質同定を行なった。3 種の mAb いずれの試料も主要タンパク質は IgG であったが、複数の夾雑タンパク質が同定された。また、精製した抗体溶液の一つ (ZZ) が、容易に凝集体を形成することがわかり、以降の諸評価から外すこととした。

・ 表面プラズモン共鳴 (SPR) 試験

リコンビナント mAb の 2 クローン (XX, YY) について表面プラズモン共鳴 (SPR) 試験により、抗原との親和性を評価した。センサーチップに Protein A を固定し、そこへ精製 mAb を結合させリガンドとし、酵母で発現・精製した HBs 抗原をアナライトとして SPR を測定した。クローン XX は非常に高い親和性を有している可能性が示された。他方、クローン YY ではリガンド抗体を高濃度にした場合に結合がみられた。これは、アナライトに用いた精製 HBs 抗原が、立体コンフォメーションの異なる particle の混合物であり、それぞれの mAb が major と minor の particle に結合するためと考えられた。両クローンとも抗原サンドイッチ ELISA では良好な結合性を示し、感染中和能も有しているため、抗体のシーズとして有力なものと考えられる。

・ 熱力学的安定性

これら 2 つの抗体の熱力学的安定性を評価するために、安定的に工業生産されているリツキシマブを比較対象にして、示差走査型蛍光測定法で解析を行った。両抗体ともリツキシマブには及ばないが良好な熱安定性を示した。酢酸緩衝液などの酸性条件においては、YY の熱安定性がやや低かった。すなわち pH 変化の影響を受けやすいことが分かった。

・ 凝集傾向の評価

散乱光を検出するサイズ排除クロマトグラフィーでは、両抗体とも少量の二量体を含み、また XX はわずかに多量体を含んでいた。nanoparticle tracking 解析と流路イメージ解析を行ったところ、 $0.2 \mu\text{m} < \text{size} < 2.0 \mu\text{m}$ では XX により多くの凝集体が認められ、 $2.0 \mu\text{m}$ 以上の凝集体は YY の方が多かった。しかしながら両者とも精製法の改良等で解決できる範囲であると考えられた。

以上の物性解析から、両抗体クローンとも、医薬品シーズとしての十分なポテンシャルを有すると結論された。

5. 安定発現細胞株の樹立と小規模試験製造

HBIG については、これまで実験に用いてきた一過性発現株から得られる抗体には不純物が多いため、CHO を用いた安定発現株を樹立する必要があり、現在実施中である。

抗破傷風毒素ヒト免疫グロブリン (TTIG)

1. 先行研究の成果

三種混合ワクチン (DPT) の接種経歴がある健常人の末梢血単核球中の B 細胞を、改良した EBV-ハイブリドーマ法により不死化、株化を行った。その培養上清を用いた ELISA にて、15 種類のヒト抗破傷風毒素 (TeNT) 抗体を同定した。これらのクローンについて、次世代シーケンサーにより抗体遺伝子配列を決定した。TeNT のサブユニット (Hn、Hc 及び Lc) それぞれのリコンビナント蛋白を作成し、各サブユニッ

トに対する抗体を別々に評価する ELISA 系を立ち上げた。

2. TTIG のリコンビナント化

サブユニット ELISA により、12 個の TTIG 産生クローンを同定した (Hc:8 個、Lc:3 個、Lc-Hn:1 個)。抗体の活性評価 (後述) により、最終的に 4 つのクローンが残り、それらの抗体遺伝子配列を得、リコンビナント化を行った。

3. 抗体活性の評価

TeNT の活性発現には、TeNT がまず神経筋接合部の神経細胞膜に結合することが必要であるが、その細胞基質結合の阻害効果を見る GT1b-Hc 結合阻害アッセイを構築した。その結果、2 つの陽性クローンを得た。また、TeNT の標的蛋白は上位抑制性ニューロンの Vesicle-Associated Membrane Protein-2 (VAMP-2) であるが、VAMP-2 を切断する TeNT のプロテアーゼ活性を抗体が阻害する効果を見る VAMP2 切断阻害アッセイを構築し、陽性クローンを 1 種同定した。また、3 つのサブユニット全体に反応すると思われる 1 クローンを同定した。

これらの抗体が実際の生体内で機能するかどうかを評価するために、破傷風毒素抗体の国家検定に使用されている、マウス *in vivo* アッセイ系を用いて TeNT 中和活性を評価した。一定量の TeNT と、異なる濃度の抗体溶液とを *preincubation* し、マウスに投与して生存率を見るものである。その結果、4 つの抗体いずれもが、TeNT の中和活性を持っていたが、単独クローン投与によっては十分な中和活性は得られないことがわかった。しかしながら、抗体の組み合わせ混合投与によって、TeNT 毒性の完全中和が認められた。この結果は、抗体クローン間における相互の活性増強作用が存在することを示している。

また、中和活性の認められた 4 種類の抗体クローンのうち、少なくとも一つの抗体は、TeNT の複数ドメインで構成される立体構造を認識する抗体であることが明らかとなった。一方、Hn に対する抗体クローンの中和活性発現様式は明らかとなっていないため、Hn 反応性抗体クローンと Hn の結合様式をエピトープマッピング手法にて検討した。リコンビナント変異 Hn を調製し、Hn 反応性抗体との結合性を検討した結果、Hn エピトープがアミノ酸 835 番目から 849 番目までの領域に存在することがわかった。この領域は Hn C 末端領域に位置し、細胞側レセプター認識領域、酵素活性領域に相当しない領域であることから、細胞結合侵入に伴う TeNT の構造変化に影響を与える領域であることが予想された。

4. 小規模製造の準備

抗体クローンの産生能と溶解性を検討するために、Hc あるいはトキシイドに反応する 2 種類の抗体クローンに対して抗体骨格 (フレームワーク) グラフティング試験を行った。抗原認識部位を同一にした 2 種類のクローンにおいて、トキシイド反応性フレームワークの溶解性は同一であるが、抗体産生能の違いが認められた。これは、フレームワークの選択により、より抗体産生能の高いクローンの選択が可能であることを示すものである。

また、CHO 細胞株を用いて Master cell bank (MCB) の作成を完了した。それぞれ 4 クローンずつの MCB リソースとして準備した結果、小規模生産に対応できるだけの産生量を維持する細胞株であることが明らかとなった。これら細胞株は、少なくともマイコプラズマ等の感染性微生物が混入していない。したがって、GLP 製造に向けた安全性試験に合格する品質が保持されていると思われる。

なお、以上のヒト抗体クローンの採取とは別に、マウス抗体のヒト化の可能性を見据えて、マウスを TeNT で免疫し、通常のマウスハイブリドーマ法にて合計 34 クローンの TeNT 反応性抗体クローンを得た。その中から、細胞結合阻害活性を持つクローンを 3 つ同定している。

Establishment of master cell bank for the production of recombinant human antibodies against HBV and tetanus toxin

We established two B-cell clones for anti-HBs and four clones for anti-tetanus toxin (TeNT) from the peripheral blood mononuclear cells of vaccinated volunteers.

[Anti-HBs monoclonal antibodies]

The two B cell clones were established either through antigen-specific single cell sorting or EBV-hybridoma technique. Sandwich ELISA method revealed that these monoclonal antibodies (mAbs) strongly bound to solid-phase HBs antigen. Reductive SDS-PAGE-Western Blot analysis showed that both mAbs recognize XX structure of HBs antigen. They were found to have a neutralizing ability for HBV of genotypes YY and ZZ through the infection-inhibiting experiment using NCTP-HepG2 cells. Their inhibiting ability was comparable to that of the commercial polyclonal anti-HBV immunoglobulin. We confirmed their specific binding to liver cell section from HBV-infected patient but no binding to the array of normal human tissue section.

Surface Plasmon Resonance analysis using HBsAg as analyte and mAb as fixed ligand verified that the two mAbs had dissociation constant of RR and SS, respectively. This suggests that the two mAbs each recognize major and minor populations of HBs antigen with distinctive structure. Differential scanning fluorimetry revealed the moderate thermal stability for both mAbs, although one of them showed lower stability in the acidic condition. Both mAbs contained some amount of aggregation of varying size which was revealed by size exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis.

In total, although both mAbs may need further optimization, they represent good candidates for the seeds for the production of recombinant human anti-HBs and are in the process of establishing the master cell bank.

[Anti-tetanus toxin (TeNT) monoclonal antibodies]

We first succeeded in constructing the assay system for the inhibition of GT1b-Hc binding and established two mAb clones positive with the assay. Another clone was identified using newly developed assay for the inhibitory effect on the TeNT protease activity against Vesicle-Associated Membrane Protein-2 (VAMP-2). We also identified one clone which seemed to recognize all three TeNT subunits (Hn, Hc and Lc).

All four mAbs were found to have TeNT neutralizing ability using mouse inoculation experiments where mice were challenged with the mixture of TeNT and varying concentration of mAb. Although the TeNT neutralizing ability is incomplete when the mAbs were used individually, they showed a complete neutralization of TeNT toxicity when used as a mixture of mAbs. Peptide mapping technique revealed that the Hn-reactive antibody recognizes amino-acid epitope of 835-849.

By grafting antibody framework, we found an enhanced antibody production, which suggests the possibility of efficient production of mAb by selecting appropriate Ab framework. We have already established the master cell bank employing CHO cells and are almost ready for GMP-based production of those mAbs.