

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) 多重特異性抗体等次世代抗体医薬品の品質・安全性評価に関するレギュラトリーサイエンス研究

(英語) Regulatory science study for evaluating quality and safety of advanced therapeutic antibodies including multispecific antibodies

研究開発実施期間: 令和2年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 柴田 寛子

(英語) Hiroko Shibata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長

(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals, Section Chief

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

高度化した抗体エンジニアリング技術を用いて開発が進む多重特異性抗体医薬品などの次世代抗体は、複数の標的への結合性や非対称構造を持つといった複雑な特性を有するため、これまでの抗体医薬品とは異なる品質評価手法が必要となる。また、新規作用機序や様々な機能を持つ次世代抗体医薬品においては、先駆け承認審査制度など早期承認審査制度の活用が期待されるが、開発期間が大幅に短縮されるため、短期間での重要品質特性の特定及び品質管理戦略の構築や安定性試験の実施など、品質確保の点で課題が指摘されている。本研究では、多重特異性抗体等次世代抗体医薬品の早期承認を見据えた品質リスクマネジメント手法や、品質リスクマネジメントを支える評価技術基盤の整備を目的に、(1)次世代抗体国内シーズを用いたケーススタディとして1-1 多機能抗体の機能解析に関する研究、1-2 多機能抗体の物性解析に関する研究、(2) 品質・安全性評価手法として2-1 安定性評価手法に関する研究、2-2. 次世代抗体医薬品のバイオトランスフォーメーション解析に関する研究、2-3. 生物活性・免疫作用評価に関する研究を実施した。

(1) 次世代抗体国内シーズを用いたケーススタディ

1-1. 多機能抗体の機能解析に関する研究

我々のグループで開発した抗体部位特異的修飾法 CCAP (Chemical Conjugation by Affinity Peptide) 法による抗体コンジュゲートの医薬品開発へ向け、機能性や熱安定性、凝集性評価を行うためのサンプルの調製を進めた。特に、CCAP 法によるアジド化 IgG をベースに金属キレート修飾 IgG、抗癌剤修飾 IgG の作製を行い、研究分担者と共同で熱安定性、凝集性評価を行った。その結果、CCAP コンジュゲートでの高い熱安定性を見出すことができた。機能評価の観点からは、CCAP 修飾は、抗原結合能には全く影響しないものの、Fc γ 受容体 (Fc γ 受容体 I, Fc γ 受容体 IIIa) への結合については、未修飾体より結合力が高まることで、特に Fc γ 受容体 IIIa のシグナルを介した NK 細胞の活性化増強により高い抗体依存性細胞障害活性 (ADCC 活性) を発現することが示された。一方、胎児性 Fc 受容体 (FcRn) に対する結合能は、CCAP 修飾 (2 価) よって完全に失われ、結果として、体内での IgG 抗体の半減期が短くなることが懸念された。そこで、このような問題を解決するために開発した t-CAP 法によるコンジュゲートの、新たな高機能性医薬品の開発に向けた評価法を検討した。この手法は、CCAP 法と異なり、生成するコンジュゲートには親和性ペプチドが残存せず、アジド Lys-Gly-Gly というトリペプチドのみが、Fc 上の標的の Lys248 の側鎖に結合する修飾法である。このコンジュゲートによる医薬品開発に向け、金属キレート修飾、抗癌剤修飾 IgG の調製を進め、機能評価、安定性評価を行った。その結果、機能性・安定性では、tCAP コンジュゲートは、未修飾体とほぼ同一の機能を示した。このように、IgG をベースとした高機能性コンジュゲート開発にむけた評価の基盤の構築を達成した。

1-2. 多機能抗体の物性解析に関する研究

本研究は、多重特異性抗体を始めとする次世代抗体医薬品の品質リスクマネジメント手法の提案と評価技術基盤を整備することを目的としており、津本は其中で多様な低分子化抗体を連結して多重特異性抗体を作製、その物性を解析して単独の低分子化抗体の物性と比較することにより、多価のフォーマットすることによる物性変化の精査を担当した。

具体的には、これまでに単価抗体として物性評価を行ってきた scFv (single chain Fv) や VHH (variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody) 等の低分子化抗体について、複数種の抗体をリンカーでつないだ多重特異性抗体を作製し、異種発現させた際の発現量変化や抗原に対する結合親和性、熱安定性および

抗原機能の阻害効果について、各種物理化学的手法および計算化学により解析した。各種物性および抗原に対する作用を単独の抗体と比較することにより、多価のフォーマットにすることによる物性の変化について精査した。その結果、多重特異性抗体のフォーマットでは発現量が大幅に減少する、あるいは熱安定性が低下するコンストラクトが見られたが、逆に抗原に対する見かけ上の親和性の大幅な上昇が確認できたコンストラクトや、単独の抗体では見られなかった抗原の機能阻害効果を獲得したコンストラクトも存在した。さらにその抗原の機能阻害効果について分子機構を詳細に解析したところ、それぞれの抗体間をつなぐリンカーの種類に依存して異なる会合体を形成することが明らかになった。いずれの多重特異性抗体によっても標的抗原の機能阻害効果が見られたことから、単純な分子間相互作用によるものではなく、標的分子の動的挙動の制御による効果が得られたことが示唆された。このように、複数の抗体を連結させて作製した多重特異性抗体においては、リンカー長を含め、コンストラクトの設計によって想定したものとは異なる作用が見られることがあるため、開発の際には様々な観点からの解析が重要であることが改めて浮き彫りとなった。

(2) 品質・安全性評価手法

2-1. 統括及び安定性評価手法に関する研究

多重特異性抗体をはじめとする次世代抗体医薬品は、抗体の高度改変および低分子化により構造安定性の低下を引き起こし、製造工程中あるいは保存中の安定性が低いことが医薬品開発の障壁となり得るが、長期保存における安定性予測の指標となる品質特性やその評価技術について、統一された見解は得られていない。本研究では、次世代抗体医薬品等を対象に、タンパク質の凝集体形成の評価手法を構築するとともに、種々安定性評価手法を使った安定性予測の妥当性を考察した。タンパク質の凝集体形成における会合体形成初期の分子論を理解するため、経時劣化、変性剤、加熱によって変性させた抗体試料を用い、二量体や三量体などを分取するため SEC の分離条件を最適化した。これら精製した抗体分子の物性評価を行い、凝集体の形成過程を評価した。SEC を使って保存中の凝集体形成を評価するには、容器への吸着や沈殿、カラムフィルターへトラップされる凝集体、不溶性の凝集体など、SEC で評価しにくい凝集体もカバーするため、開始時点の総ピーク面積からの減少率を加味して評価することが有用であることを示した。さらに、次世代抗体国内シーズを活用したケーススタディの一環として、1-1 多機能抗体の機能解析に関する研究で作製されたペプチドコンジュゲート抗体、DOTA を結合させた DOTA コンジュゲート抗体について構造安定性や生物活性などの特性解析を行った。生物活性の評価には、ヒト末梢血単核球を用いた抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) 活性測定系を用いた。その結果、コンジュゲート抗体はいずれも高い ADCC 活性を示し、さらに熱安定性を向上していることを示した。特性解析の結果から、結合ペプチドが抗体 Fc の動的構造 (ダイナミクス) を「くさび」のようにブロックしており、その結果、(1) 分子エントロピーの低下により ADCC 活性が向上し、(2) Fc の変性を阻害することで熱安定性が向上する、という新たな分子メカニズムを明らかにした。

本研究課題で得られた成果、学術論文、FDA や EMA など海外規制当局の動向などを踏まえ、迅速承認に対応した品質管理戦略を構築する上で特に課題となる安定性評価に重点を置き、品質リスクマネジメントの観点から現状と今後の課題を整理した。

2-2. 次世代抗体医薬品のバイオトランスフォーメーション解析に関する研究

近年、抗体薬物複合体 (ADC) 等の次世代抗体医薬品の開発が活発化している。それら新規構造を有するモダリティの薬物動態を正確に評価するためには、生体内における分解、代謝、及び修飾等により引き起こされる構造変化 (バイオトランスフォーメーション) を明らかにすることが重要である。一方、それらを適切かつ迅速に評価可能な手法が確立されておらず、次世代抗体のバイオトランスフォーメーションについては不明な点が多い。本研究では、ADC 等の次世代抗体のバイオトランスフォーメーション解析手法を確立するとともに、バイオトランスフォーメーションが ADC の薬物動態に及ぼす影響を考察することを目的とする。

ADC の濃度測定は、一般に、抗ペイロード抗体及び抗イディオタイプ抗体を用いたリガンド結合法により行われることが多いが、捕獲した ADC のペイロード結合数を解析できないことから、抗薬物体比 (drug-to-antibody ratio, DAR) の分布を求めることができない。DAR 分布の生体内変化を評価することは、薬物動態プロファイルを正確に理解するために重要であり、さらに、ADC を開発する際の構造最適化において有用な情報となりうる。本分担研究では、市販の Lys 結合型及び Cys 結合型 ADC を分析対象として DAR 分布分析手法を確立した。さらに、新規リンカー構造を有する ADC にも適用可能であることも実証した。また、ヒト FcRn トランスジェニックマウスに投与した ADC の DAR 分布の生体内における変化を明らかにするとともに、構築した分析手法の有用性を実証した。加えて、DM1 等の遊離ペイロードを対象とした血液試料中薬物濃度測定手法を確立した。

2-3. 生物活性・免疫作用評価に関する研究

複数の標的抗原への結合によって薬理作用を発揮する多重特異性抗体の生物活性評価においては複数抗原への同時結合、及び、これによって引き起こされる作用の評価が不可欠である。特に BiTE (Bispecific T-cell Engager) のように直接的に免疫細胞の活性化を促す多重特異性抗体の場合には、過剰な免疫細胞の活性化が重篤な有害作用発現につながるリスクを有しており、*in vitro* での生物活性評価の重要性は高い。本分担研究では、複数の免疫細胞受容体及びがん抗原を標的とする BiTE 型二重特異性抗体の試験的製造を行い、抗原結合、免疫エフェクター細胞の活性化、標的細胞殺傷活性等の生物活性評価手法を比較し、その特徴を明らかにした。また、強制劣化処理によって誘導した凝集体の免疫細胞活性化能を測定し、BiTE 型二重特異性抗体凝集体の免疫細胞活性化リスクは、標的とする免疫細胞受容体の種類や凝集体の特性によって異なることを明らかにした。特に、CD3 を標的とする二重特異性抗体の凝集体はヒト末梢血単核球からの炎症性サイトカイン・ケモカインの分泌を強力に誘導したことから、意図せぬ免疫細胞活性化を介した有害作用発現を誘導するリスクが高いことが示唆された。本研究で提示した *in vitro* 生物活性評価系は凝集体等の免疫細胞活性化リスクを有する分子変化体の特性解析に有用であると考えられた。

英文：

(1) Case study using next-generation antibody domestic seeds

1-1. Study on functional analysis of multifunctional antibodies

For the development of antibody conjugate drugs using antibody site-specific modification methods, CCAP and its improved method t-CAP, the functional properties and thermal stability of the metal chelator-modified and anti-cancer drug-modified IgG were evaluated. While both conjugates did not change the antigen-binding affinity, CCAP conjugate showed enhanced stability and increased affinity to Fcγ receptor. The t-CAP conjugate showed the same functionality and stability as the unmodified antibody. Through these studies, the production method of next-generation's highly functional antibody conjugates and their functional evaluation system were established.

1-2. Study on physical analysis of multifunctional antibodies

In this study, we analyzed the properties of multi-specific antibodies, especially focusing on the antibodies constructed by conjugation of multiple fragment antibodies by using physicochemical techniques. As a result, we have elucidated the multi-specific antibodies can obtain novel properties, which are totally different from parental antibodies. Therefore, multifaceted analyses are crucial in the steps of multi-specific antibody development.

(2) Quality and safety evaluation approaches

2-1. Study on stability evaluation

In this study, we developed a method to evaluate protein aggregate formation during storage, and discuss the validity of stability prediction approach using various existing stability parameters and evaluation methods. In addition, through structural and thermodynamic analysis of CCAP conjugates, we revealed that the conjugated peptide blocks the Fc dynamics like a 'wedge', resulting in 1) enhanced ADCC via decreased molecular entropy as well as 2) increased thermal stability via blockade of Fc denaturation.

2-2. Study on biotransformation analysis of next-generation antibodies

Antibody-drug conjugate (ADC) is a modified monoclonal antibody connected to cytotoxic drug via an optimized linker. Evaluating the drug-to-antibody ratio (DAR) changes in vivo provides valuable information for a deep understanding of PK profile as well as the structural optimization of ADCs. In this study, a DAR distribution analysis method for ADCs in human plasma was established using commercially available ADCs. In addition, the usefulness of the method was demonstrated through animal experiments using human neonatal Fc receptor (FcRn) transgenic mice.

2-3. Study on evaluation of bioactivity/immunological effect

In this study, we prepared a tandem scFv-typed bsAb targeting HER2 and CD3 (HER2-CD3), and evaluated the impact of aggregation of HER2-CD3 on the in vitro immunotoxicity. Comparison of the aggregates generated under various stress conditions indicated the possibility that insoluble protein particles, which were detected by qLD analysis and found to contain non-denatured functional domains, contributed to the activation of CD3-expressing immune cells in the absence of HER2-expressing target cells. These results indicated the potential risk of aggregation of T cell-redirecting bsAbs, which could induce unwanted immune cell activation and inflammation and thereby immune-mediated adverse reactions.