

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業
(英語) Regulatory Harmonization and Evaluation of Pharmaceuticals, Medical Devices, Regenerative and Cellular Therapy Products, Gene Therapy Products, and Cosmetics

研究開発課題名： (日本語) 精密質量分析技術を活用した抗体医薬品の品質評価と血中濃度解析に関する研究
(英語) Quality evaluation and structure analysis of therapeutic antibody drugs with accurate mass spectrometry

研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院薬学研究科 准教授 米澤 淳
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Associate Professor, Atsushi Yonezawa

実施期間： 平成27年4月1日～平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 血中リツキシマブ構造解析
開発課題名： (英語) Structural analysis of rituximab in the blood

研究開発分担者 (日本語) 京都大学医学部附属病院薬剤部 講師 今井 哲司
所属 役職 氏名： (英語) Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Kyoto University Hospital, Assistant Professor, Satoshi Imai

分担研究 (日本語) バイオ後続品の品質評価
開発課題名： (英語) Quality evaluation of biosimilars

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院薬学研究科 特定講師 津田 真弘
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Associate Professor, Masahiro Tsuda

分担研究 (日本語) 患者リクルートならびに臨床検体の採取

開発課題名： (英 語) Recruiting the patients for clinical study

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学 助教 北野 俊行

所属 役職 氏名： (英 語) Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine,
Kyoto University,, Assistant Professor, Toshiyuki Kitano

II. 成果の概要（総括研究報告）

① TOF-MSを用いた抗体製剤品質評価

米澤淳准教授（京都大学大学院薬学研究科）および津田真弘特定講師（京都大学大学院薬学研究科）らのグループは、Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MSを用いた高分子医薬品の定性分析法を確立し、G-CSF製剤フィルグラスチムおよび抗体製剤インフリキシマブのバイオ後発品の構造解析を行った。フィルグラスチムについては、ジスルフィド結合の有無を含め分子量1の違いについても区別できることを明らかにし、バイオ後続品が先行品と比較して差がないことを確認できた。この研究成果について論文発表を行った（松村ら、医療薬学、2016）。インフリキシマブでは、アミノ酸と糖鎖修飾の解析を可能とし、先行品と後続品ではアミノ酸の一部や糖鎖の割合が異なることを示した。本研究成果は、バイオ医薬品の評価に非常に有用であると考えられる。

② ラットを用いた血中リツキシマブ構造解析

米澤淳准教授（京都大学大学院薬学研究科）および今井哲司講師（京都大学医学部附属病院薬剤部）らのグループは、前臨床試験として、ラットにおける血中のリツキシマブの構造解析を実施した。内因性IgGが測定を妨害することから、抗リツキシマブ抗体を結合させた磁気ビーズを用いてリツキシマブを血中から単離し、Q-TOF LC/MSを用いて構造解析を実施する新たな手法を確立した。さらに、ラットに投与後の経時的な構造の変化を観察し、アミノ酸配列は変化せず、一部の糖鎖構造体のみ低下が大きいことを見出した。さらに、この構造変化が血漿中で起こっている可能性を示唆した。本研究成果は、学術論文として発表した（Otani, et al., PLoS One, 2017）。

③ 臨床検体を用いた血中リツキシマブ構造解析

米澤淳准教授（京都大学大学院薬学研究科）、今井哲司講師（京都大学医学部附属病院薬剤部）および北野俊行助教（京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学）らのグループは、動物実験の結果に基づいて、患者におけるリツキシマブの構造解析を実施した。まず、本研究に係る「生体内におけるリツキシマブの経時的な構造変化の評価」について、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認（2015年3月6日、承認番号：E2472）を受け、臨床試験を開始した。最終的に、目標とした20例の登録を行い、試験を完了した。

得られた検体を用いて、まずはELISA法によりリツキシマブの血中濃度測定を実施したところ、一部の症例において極端な血中濃度低下が確認された。他方、抗薬物抗体はすべての症例において陰性であった。さらに、上記で確立したAgilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MSを用いた抗体の構造解析を実施したところ、血中濃度低下が見られた症例において一部の糖鎖の変化が大きいことが判明した。

さらに、他の研究助成金が獲得できたことから、付随研究として計画をしていた薬効解析も合わせて実施した。すなわち、患者血液から採取・保管している末梢血単核球を用いてナチュラルキラー細胞の活性化マーカーの評価を行い、血中濃度や臨床効果との関連についても検討を行っている。

① Evaluation of quality of therapeutic antibodies using TOF-MS

Dr. Yonezawa (Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University) and Dr. Tsuda (Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University) have established novel method to analyze the quality of biomedicines with Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, and carried out the structural analysis of filgrastim and infliximab biosimilars. With our method, we could discriminate between filgrastim with and without disulfide bond, which means that it is possible to detect the difference in 1 molecular weight. It was indicated that filgrastim biosimilar was the same as original one. These data were published as an original article (Matsumura et al., Jpn J Pharm Health Care Sci, 2016). In case of infliximab, we could detect the amino acid and N-linked glycan modification. In some glycoforms, the composition ratios were significantly different between original and biosimilar. In addition, the content rates of C-terminal lysine were also different. Our method can provide new strategy to evaluate biosimilar products.

② Structural Analysis of rituximab in rats using TOF-MS

Dr. Yonezawa (Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University) and Dr. Imai (Assistant Professor, Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Kyoto University Hospital) carried out pre-clinical studies in rats. We have developed the method to isolate rituximab from plasma in which endogenous IgGs interfere the detection of rituximab, and successfully developed the analytical method with LC/TOF-MS to detect the overall structure of rituximab in plasma with errors less than 30 parts per millions. Interestingly, time-dependent changes in carbohydrate chains were observed in rats, although the structure of the amino acids was stable. Additionally, these structural changes were observed via incubation in plasma as in the rat experiment, suggesting that a certain type of enzyme in plasma caused the alterations of the carbohydrate chains. These data were published as an original article (Otani, et al., PLoS One, 2017).

③ Structural Analysis of rituximab in the patients

Dr. Yonezawa (Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University), Dr. Imai (Assistant Professor, Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Kyoto University Hospital) and Dr. Kitano (Assistant Professor, Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University) carried out clinical studies in the patient with B cell lymphoma. The protocol of this study was approved at Kyoto University Graduate School and Faculty of Medicine, Ethics Committee (March 6, 2015; E2472). Twenty patients were enrolled in this study.

The plasma concentrations of rituximab in some patients were dramatically decreased. However, anti-drug antibody was not detected in all patients. One glycoform was also changed in some patients with a decrease in rituximab concentrations.

In addition, using other grants, we analyzed the biomarkers of Natural Killer cell with FACS, and are comparing them with pharmacokinetics and clinical outcomes.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 3件）

1. Yonezawa A, Dutt S, Chester C, Kim J, Kohrt HE. Boosting Cancer Immunotherapy with Anti-CD137 Antibody Therapy. *Clin Cancer Res.* 2015, 21:3113-3120
2. 松村健吾, 大谷祐基, 大村友博, 米澤 淳, 津田真弘, 池見泰明, 中川俊作, 今井哲司, 中川貴之, 矢野育子, 吉貴達寛, 松原和夫 LC/QTOF-MS によるフィルグラスチムバイオ後続品の定性・成分分析 医療薬学 2016, 42(9), 402-407
3. Yonezawa A, Chester C, Rajasekaran N, Kohrt HE. Harnessing the innate immune system to treat cancer: enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity with anti-CD137 Ab. *Chin Clin Oncol.* 2016, 5:5
4. Otani Y, Yonezawa A, Tsuda M, Imai S, Ikemi Y, Nakagawa S, Omura T, Nakagawa T, Yano I, Matsubara K. Time-Dependent Structural Alteration of Rituximab Analyzed by LC/TOF-MS after a Systemic Administration to Rats. *PLoS One.* 2017, 12: e0169588

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. リツキシマブの生体における構造変化の評価, 口頭, 大谷祐基, 米澤 淳, 今井哲司, 津田真弘, 池見泰明, 大村友博, 中川俊作, 中川貴之, 松原和夫, 第 30 回日本薬剤学会, 2015/5/21, 国内.
2. 生体内におけるリツキシマブの経時的構造変化の解析, 口頭, 大谷祐基, 米澤 淳, 今井哲司, 津田真弘, 兼吉真千子, 池見泰明, 大村友博, 中川俊作, 中川貴之, 矢野育子, 北野俊行, 高折晃史, 松原和夫, 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 2015/10/29, 国内.
3. ラット血中における Rituximab の構造変化と抗体依存性細胞傷害への影響, ポスター, 谷崎亮介, 大谷祐基, 米澤 淳, 津田真弘, 池見泰明, 今井哲司, 中川俊作, 大村友博, 中川貴之, 松原和夫, 第 65 回日本薬学会近畿支部総会大会, 2015/10/17, 国内.
4. 抗体医薬品の薬物動態評価とその変動因子の探索, 口頭, 大谷祐基, 米澤 淳, 池見泰明, 津田真弘, 磯本 唯, 今井哲司, 大村友博, 中川俊作, 中川貴之, 矢野育子, 北野俊行, 高折晃史, 松原和夫, 第 32 回京都がん研究会, 2016/9/16, 国内.
5. Assessment of structural alterations of Rituximab in vivo and correlation with ADCC and CDC activities, ポスター, Yuki Otani, Atsushi Yonezawa, Satoshi Imai, Masahiro Tsuda, Yasuaki Ikemi, Tomohiro Omura, Shunsaku Nakagawa Takayuki Nakagawa, Kazuo Matsubara, 第 26 回日本医療薬学会年会, 2016/9/17, 国内.
6. 腎臓病モデルラットにおけるリツキシマブの薬物動態評価, 口頭, 岡田凌太, 大谷祐基, 米澤 淳, 今井哲司, 磯本 唯, 池見泰明, 津田真弘, 中川俊作, 大村友博, 中川貴之, 北野俊行, 高折晃史, 松原和夫, 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016/10/15, 国内.
7. 個別化療法を目指した抗体医薬品の臨床薬理学的研究, 口頭, 米澤 淳, 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会, 2016/12/1, 国内.
8. 抗体医薬の個別化療法を目指したリバーシ・トランスレーショナルリサーチ, 口頭, 米澤 淳, 大谷祐基, 松原和夫, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/25, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし