



# バイオシミラー分子のキャラクタリゼーション： 有効性評価のためのオルソゴナルな手法としての SPR 利用

バイオシミラーは発展および成長を続けています。2015年の時点では、米国または欧州で承認されたバイオシミラーモノクローナル抗体 (mAb) は 1 種類しかありませんでしたが、2016 年には同地域で 5 種類のバイオシミラー mAb が承認されています (表 1)。発売日は未定であるものの、FDA および EMA では同様の申請を多数審査中であり、2017 年にはさらに増える見込みです。

バイオシミラリティーを証明するために、医薬品メーカーは「そのバイオシミラーが細胞株、製造法等の相違により完全一致はしないが、先行品に非常に類似」しており、「安全性、純度、および有効性に関して、バイオシミラーと先行医薬品との間に臨床的に意味のある差がない」ことを示さなければなりません (文献 1、2)。バイオシミラリティーの証明に関して、規制当局は、段階的な「エビデンスの総合性 (Totality of Evidence)」アプローチをとっています。提示されたバイオシミラーと先行医薬品が構造解析および機能解析上で非常に類似していれば (すなわち “fingerprint-like” な類似)、*in vivo* 動物実験および臨床試験の計画および実施を行う際に、よりターゲットを絞った選択的なアプローチをとることができます。開発初期に厳密な *in vitro* での構造および機能のキャラクタリゼーションを行ってコスト効率および資源効率を高めることで、よりターゲットを絞った選択的なアプローチを選択することができます。

生理化学的な分析では分子の構造的および物理的な特徴を評価できますが、どのようにターゲットと相互作用してエフェクター機能を発揮するのかという分子の機能的な能力に関する情報は得られません。そのため、規制当局は *in vitro* および/または *in vivo* での機能的アッセイによる薬理学的活性の調査を行うよう推奨しています。機能解析には、リガンド結合アッセイおよび細胞ベースアッセイなどがありますが、それだけに限定されません。

バイオシミラリティーの証明に関しては、開発業務受託機関 (CRO) がクライアントのサポートにおいてより大きな役割を果たすようになってきています。Sartorius Stedim BioOutsource 社 (文献 3) は、トップクラスの CRO であり、バイオシミラー試験のサービスを行っており、世界的なバイオ医薬品およびバイオテクノロジー業界にサービスを提供しています。同社はバイオ医薬品抗体の生物学的な評価に特化しており、バイオシミラーの開発時間およびコスト削減を目的として開発された、さまざまな既製の試験サービスを提供しています。

本アプリケーションノートでは、Sartorius Stedim BioOutsource 社が細胞ベースアッセイと並行して有効性を調査するためのオルソゴナルな機能的手法として、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance ; SPR) を使用した事例をご紹介します。同社では、エフェクター機能として抗体依存性細胞傷害 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity ; ADCC) を引き起こすさまざまなバイオシミラー mAb の研究を行っています。また、SPR のバリデーションのために、SPR から得た有効性データと、従来の細胞ベース手法の有効性データとの相関を調べています。

表 1. 2016 年に米国および欧州で承認されたバイオシミラー mAb

バイオ シミラー	Benepali™	Remsima™	Flixabi™	Erelzi™	Amjevita™
バイオ シミラー 開発業者	Samsung/ Biogen	fizer/ Celltrion	Biogen	Sandoz	Amgen
先行医薬品	Enbrel™	Remicade™	Remicade	Enbrel	Humira™
先行品 開発社	Amgen	J&J	J&J	Amgen	Abbvie
承認された 地域	欧州	米国	欧州	米国	米国

## 表面プラズモン共鳴

SPR は標識を使用せず、生物分子複合体の形成および解離をリアルタイムでモニタリングする技術であり、結合カインティクス、アフィニティー、および結合特異性を測定できます。そのため SPR は、バイオシミラーに関連する結合相互作用を測定し、それを先行医薬品 (Reference Medicinal Product ; RMP) と比較することを目的とした機能分析に最適な技術です。SPR には、ELISA や RIA といった、従来型のエンドポイントのイムノアッセイアプローチにはない利点があります。結合データをリアルタイムで取得してアフィニティーおよびカインティクスのキャラクタリゼーションを行えるため、エンドポイントのアッセイ手法だけでは得られない、より包括的な分析が可能になります。

SPR アッセイでは、ターゲット分子 (例えばターゲットタンパク質または Fc 受容体) を準備したセンサーチップの表面に固定化し、アナライト (例えばバイオシミラーまたは RMP) をセンサーチップ表面にインジェクションします。SPR で測定されるレスポンスは、センサーチップ表面付近の質量濃度の変化に直接比例し、データはセンサーグラムとして表されます。センサーグラムに数理モデルを適合させ、カインティクス定数およびアフィニティー定数を求め、結合挙動の特性を明らかにします。

このようなアプローチでは、固定化されたリガンドに対する分子結合が完全なフレキシビリティを保っており、固定化によるアーチファクトに由来する差が最小限であるため、高い精度が得られます。さらに、SPR アッセイにはウォッシュのステップがないため、アフィニティーが低い相互作用および高い相互作用のどちらのキャラクタリゼーションにも適しています。

## Sartorius Stedim BioOutsource 社

クライアントのバイオシミラー開発をサポートするため、Sartorius Stedim BioOutsource 社では Sarah Stone 博士のチームがバイオシミラーのキャラクタリゼーションに注力しています。Stone 博士は特に Fc および Fab 特異的な相互作用を分析する SPR ベースのアッセイを開発し運用しています。博士らは Biacore T200 および Biacore 4000 システムを利用し、会合および解離速度と結合定数の分析を行い、製品候補とその RMP 間で、結合特性の定量的な比較を行っています。

## 結果および所見

### 有効性のキャラクタリゼーションに対するオルソゴナルなアプローチ

機能的試験として、Stone 博士のチームはスクリーニングの過程に Biacore アッセイを取り入れ、従来の細胞ベース結合アッセイを補完し、有効性試験の代用となる高感度なアッセイを行っています。オルソゴナルな分析法の採用により、分子の主要作用機序および副次作用機序をより理解し、より高い精度で RMP との比較を行うことができるようになります。

### Biacore FcγRIIIa スクリーニングから ADCC 活性を予測

Fcγ-受容体 (FcγR) は、免疫系のエフェクター細胞表面上に存在しており、IgG の Fc 領域へ結合することで、抗体ベース治療薬の細胞性エフェクター機能を仲介する重要な役割を担っています。FcγR の活性は、食細胞または細胞傷害性細胞を刺激し、感染細胞または侵入した病原体の破壊を引き起こしますが、FcγR はがん治療薬においても重要であり、早期臨床試験では良好な結果が得られています。

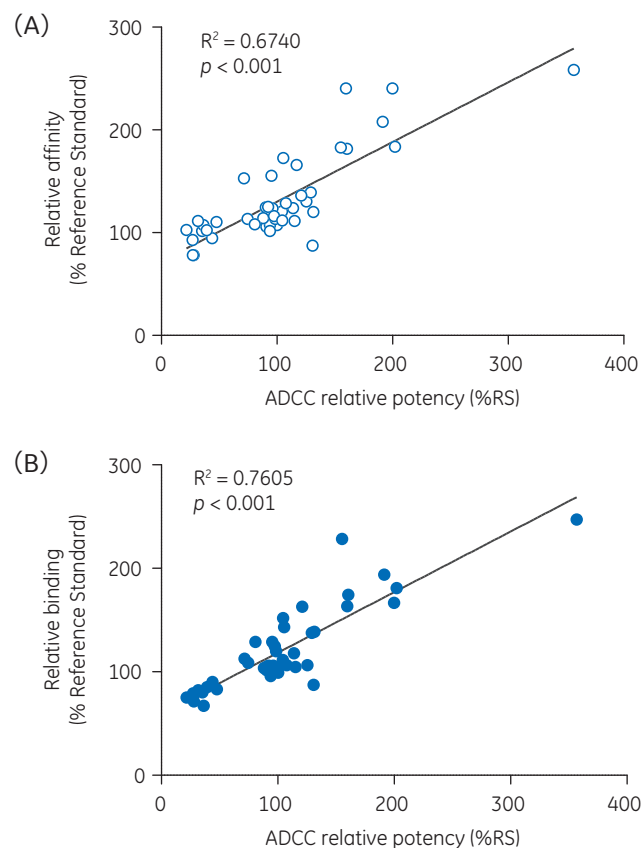


図 1. Adalimumab を RS とした時の FcγRIIIa と ADCC の相関

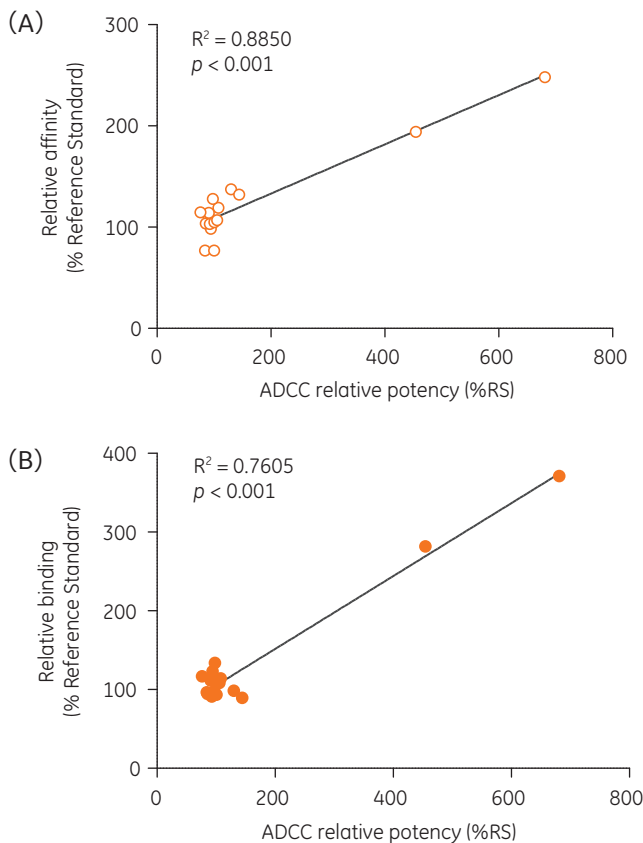


図 2. Etanercept を RS とした時の FcγRIIIa と ADCC の相関

FcγRIIIa は抗体依存性細胞傷害 (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity ; ADCC) を仲介しますが、ADCC 活性の予測における Biacore を用いた FcγRIIIa スクリーニングの有用性を確認するため、Stone 博士のチームは Adalimumab、Etanercept および Trastuzumab といった参照標準を使用して相関を調べました (図 1、2、および 3)。

Biacore Sensor Chip CM5 の表面に Fc γ RIIIa を固定化し、各参照標準物質と FcγRIIIa 間の相互作用のカイネティクスを解析するためのアッセイを行いました。結合挙動を表すセンサーグラムの解析は、1 対 1 のカイネティクス解析によって行いました。図 1A、2A、および 3A では、ADCC 活性が高い (すなわち細胞死亡率が高い) 時、これに対応して相対的アフィニティーも高くなっていました。予想された通り、ほとんどの分子では「ノーマル」なレベルの細胞死が見られ、これは被検物質の相対的アフィニティーがノーマルな範囲にあることと一致していました。

相対的結合レスポンスは相対的アフィニティーよりもさらに強い相関を示しました (図 1B、2B、3B)。この結果から、Biacore アッセイは広いレスポンス範囲で分子特異的な差異を検出でき、真の *in vitro* 状況および生理的な ADCC 状況のどちらにも適した感度をもち、ADCC 活性予測の指標となることが示されます。

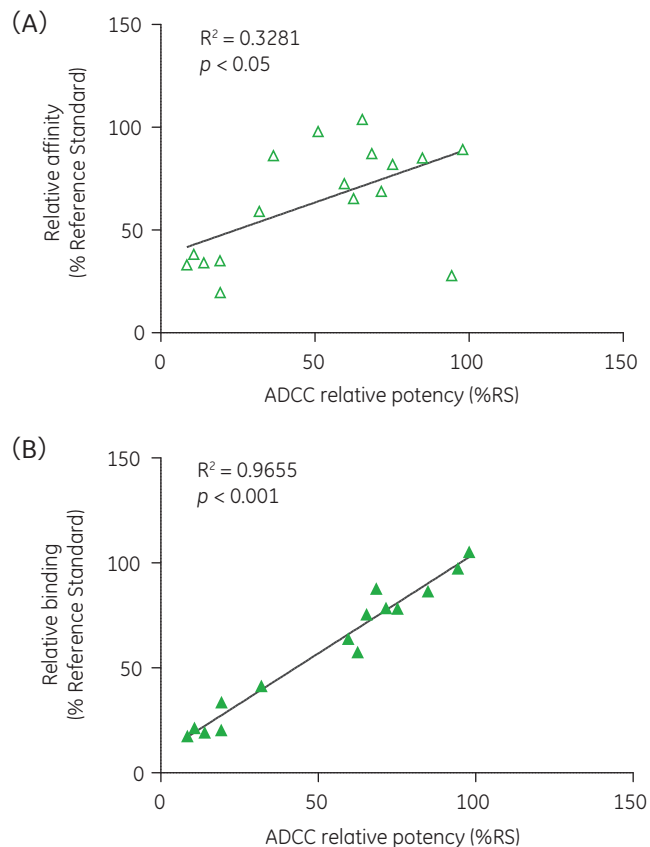


図 3. Trastuzumab を RS とした時の FcγRIIIa と ADCC の相関

## まとめ

Sartorius Stedim BioOutsource 社では、バイオシミラリティーを実証するための機能的試験の中に、高速かつ高感度で再現性に優れた Biacore FcγRIIIa アッセイを取り入れ、これが ADCC 活性と強く相関することを見出しました。ターンアラウンド時間が短く、他の手法では不可能な 1 アッセイでの複数アナライトの分析および結合カイネティクス測定を行う能力は、キャラクタリゼーションに使用するデータの質を高め、バイオシミラーの同等性を評価してその開発をサポートします。このオルソゴナルなアプローチは FDA および EMA の勧告に合致しており、Biacore システムを利用して有効性試験の代用となるアッセイを行うものであり、これは将来の抗体ベース治療薬において開発プロセスにとどまらず製造、品質管理にまで適用を拡大できる可能性をもっています。

## 文献

1. FDA. Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. *Guidance for Industry* (2015). (Online) <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm291128.pdf>
2. EMA. Guideline on similar biological medicinal products (2016). (Online) [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2014/10/WC500176768.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/10/WC500176768.pdf)
3. To contact Sartorius Stedim BioOutsource please visit [www.biooutsource.com](http://www.biooutsource.com)

GE ヘルスケア・ジャパン株式会社

ライフサイエンス統括本部

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370

e-mail : Tech-JP@ge.com



Intertek

ISO 9001:2015  
認証取得

掲載されている価格は 2019 年 2 月 1 日現在の希望小売価格です (消費税は含まれておりません)。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。