

FcRnヒト化マウスを用いた 抗体医薬のPK評価系の最適化試験

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社
オケヨケネディ、坂口佳子、加藤 税子、森下 佳彦

概要

ジャクソン・ラボラトリーが提供する FcRn ヒト化マウスを用いた PK 試験サービスを国内で展開していくに当たり、プロトコルの最適化と評価系の確立を目的とし、代表的な抗体医薬品を用いてパイロットスタディを実施した。本稿では、試験デザインおよび結果を示すとともに、今回明らかとなった抗薬物抗体 (anti-drug antibody, ADA) の課題についても触れる。

1. はじめに

抗体医薬品は、がんや自己免疫疾患等の治療薬として注目度が高く最も急速に成長している薬品クラスの一つである [1]。その研究は国内外で活発に行われており、承認される抗体医薬品の数は年々増加傾向にある。多くの抗体医薬品は、標的分子に高い親和性を有するモノクローナル抗体 (monoclonal antibodies, mAbs)、特に免疫グロブリン G (immunoglobulin G, IgG) である。IgG は血液中に最も多く含まれる免疫グロブリンであり、体内の免疫グロブリンの 75% を占めている。また、その他の免疫グロブリン (IgA, IgD, IgE および IgM) と比較して、血中における半減期が比較的長いことが特徴であり、抗体医薬品に用いられる理由の一つでもある。IgG の半減期が長い理由は、新生仔 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor, FcRn) と呼ばれる受容体を介したリサイクル機構にあり、血管内皮細胞等のエンドソーム内に存在する FcRn が IgG を結合することで分解から保護し、血中へのリサイクルを補助する [2]。

抗体医薬品の前臨床薬物動態 (PK) 試験は、臨床試験における投与量や投与回数等のパラメータを決定するために重要である。従来、抗体医薬品の PK 試験には非ヒト霊長類 (主にサル) が用いられてきたが、近年、サルの供給不足に伴う価格高騰や、その使用の倫理的な問題などがあり、非ヒト霊長類の使用が年々難しくなっている。一方、野生型 (wild type, WT) のマウスは、その FcRn (mFcRn) がヒト IgG との親和性が極めて高いため、ヒトの場合よりも IgG のリサイクルが行われるので、抗体医薬品のヒトでの PK 予測が困難である。

そこで、ジャクソン研究所 (JAX) は、ヒトにおける抗体医薬品の薬物動態をより正確に予測できるモデルとして、ヒト FcRn (hFcRn) のみを発現する一連のトランスジェニックマウス、FcRn ヒト化マウスモデルを開発した [3]。これらのモデルは、抗体医薬品のみならず、抗体薬物複合体 (antibody drug conjugate, ADC) や、アルブミン結合薬等の生物製剤 (biologics) も評価可能であるため、世界的に注目されている。また、抗体医薬品の PK 予測において、ヒトデータとの相関性が極めて高いという FcRn ヒト化マウスモデルの特徴が複数の研究グループによって確認されている。この特徴を生かすことで、リード薬候補の選択や前臨床試験の期間短縮が可能となり、抗体医薬品開発プロセスの成功率を上げることができる。本稿では、JAX の代表的な FcRn ヒト化モデルである Tg32 ホモおよび Tg276 ホモを用い、半減期の異なる 3 つの代表的な抗体医薬品の PK 評価を行ったので、その結果を報告する。

2. 試験デザインおよび実験条件

試験デザインおよび実験条件をそれぞれ Fig. 1 および Table 1 に示す。本試験では、半減期が既知の抗体医薬品 (Table 1) を選定し、導入時の週齢が 8~9 週齢の Tg32 および Tg276 に対して 10 mg/kg の投与量で単回投与を行い、ELISA 法によりそれぞれの血中濃度変化を経時的に評価した。具体的には、Fig.1 に示すタイムポイントで頸静脈 或いは顔面静脈叢より血液量 ~25 μ L を採血し、血漿処理後、~10 μ L の血漿サンプルを得た。血漿中のヒト IgG 濃度を市販の ELISA キット (ELISA Flex kit # 3850-1AD, Mabtech 社) を用いて測定した。

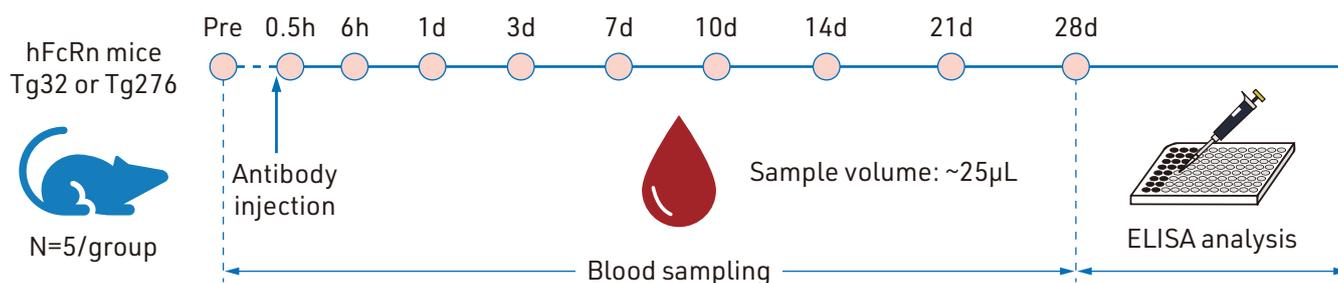


Fig. 1 Study design

Table 1 Study animals and test articles

Group	Mice			mAbs	Dose	Route	Sampling Point
	Model	Sex	N				
1	Tg32 homo (#014565)	♀	5	Adalimumab	10 mg/kg	i.v.	Pre, 0.5h, 6h, 1d, 3d, 7d, 10d, 14d, 21d, 28d
2		♀	5	Bevacizumab	10 mg/kg	i.v.	
3		♀	5	Pembrolizumab	10 mg/kg	i.v.	
4	Tg276 homo (#004919)	♀	5	Adalimumab	10 mg/kg	i.v.	Pre, 0.5h, 6h, 1d, 3d, 7d, 10d, 14d, 21d, 28d
5		♀	5	Bevacizumab	10 mg/kg	i.v.	
6		♀	5	Pembrolizumab	10 mg/kg	i.v.	

3. 抗体医薬の PK 評価結果

今回のパイロットスタディで評価した抗体の PK プロファイルを図 2 に示す。Tg32 モデルにおける adalimumab の PK プロファイルより、血漿濃度変化は投与後 7 日目まではほぼ線形的に推移したが、その後、非線形的な挙動に転じ、その変動は個体間で異なった。特に個体 #1-4 の血中 IgG 濃度が 14 日目の時点で検出下限値に達した。Tg276 モデルにおいてもこの抗体の急激な血中濃度低下が顕著にみられ、クリアランスが比較的早いというこのモデルの特徴が反映された。Adalimumab とは対照的に、bevacizumab は Tg32 および Tg276 のいずれのモデルにおいて、28 日間の評価期間における血中濃度変化がほぼ線形的に推移し、各々の個体の PK プロファイルが比較的揃っていた。一方、pembrolizumab については、Tg32 モデルでは 3 匹の血中濃度変化は線形的に推移したものの、非線形的な PK プロファイルを示す個体もみられた（個体 # 3-2）。このような非線形的な PK プロファイルを示した個体においては抗薬物抗体（anti-drug antibody, ADA）の反応が疑われたので、さらに ADA 評価を行った。その結果を 4 項で説明する。なお、Tg276 モデルでは ADA の疑いのある個体は確認されなかった。

次に、得られた PK プロファイルに基づいて各抗体の半減期を求め、文献値または弊社米国側のデータと比較検討した。その結果を Table 2 にまとめる。なお、半減期は、抗体の血中濃度が対数線形的に推移する PK プロファイルの領域（いわばβ相）を使って求めた。その際、ADA が疑われる個体は除いた。Table 2 に示すように、本試験で求めた 3 つの抗体の半減期が、文献値あるいは参考データ（JAX-US）と近い数値であった。

Table 2 Summary of predicted half-life results

Mouse model	mAbs	Half-life (day)	Reference value
Tg32 homo	Adalimumab	9.3 ± 4.83	8.7 (ref 4)
	Bevacizumab	12.4 ± 2.45	11.4 (ref 4)
	Pembrolizumab	18.7 ± 4.22	17.2 (JAX-US data)
Tg276 homo	Adalimumab	3.1 ± 0.47	NA
	Bevacizumab	6.5 ± 0.52	6.4 (ref 4)
	Pembrolizumab	7.3 ± 1.27	7.1 (JAX-US data)

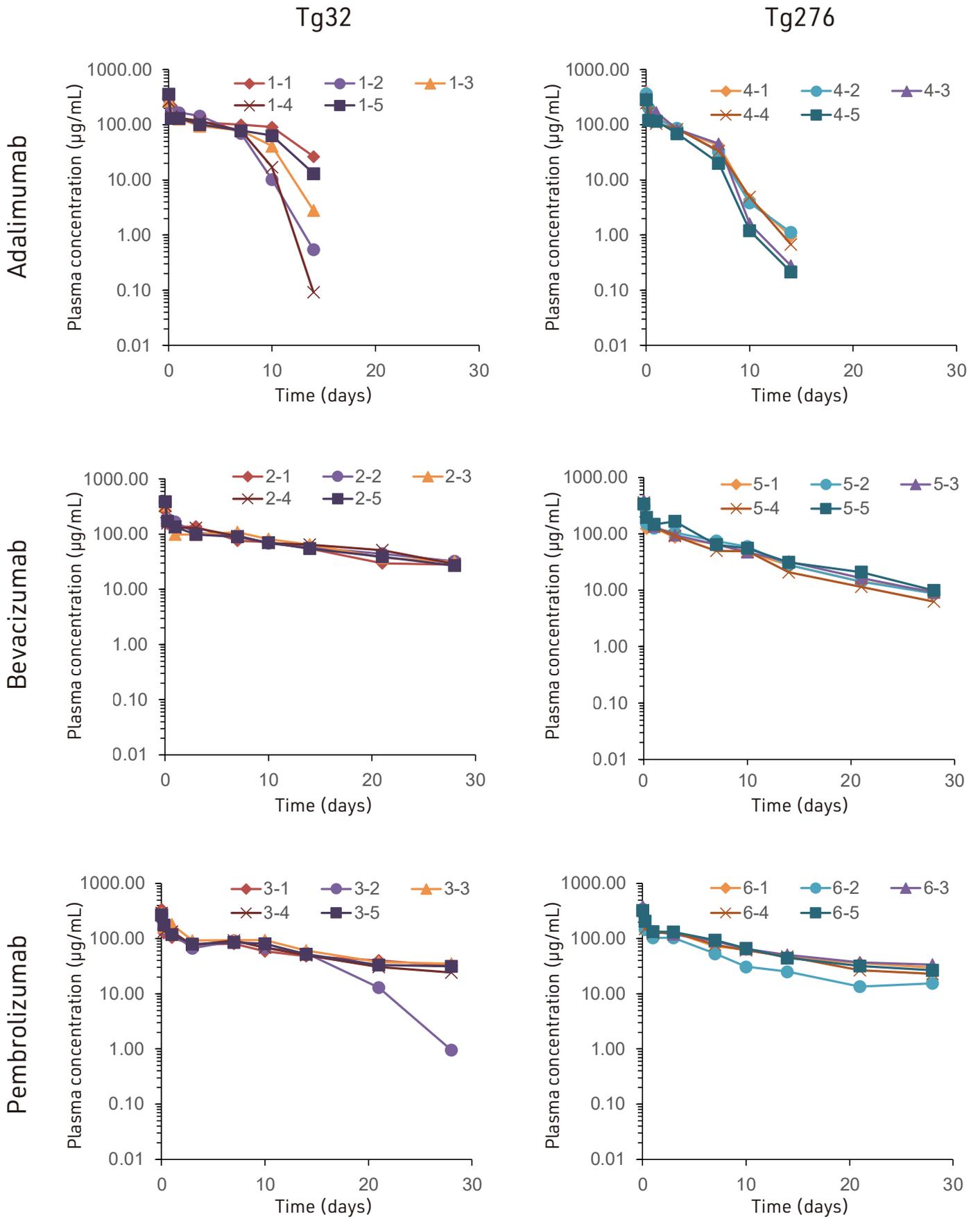


Fig. 2 Time profiles of plasma concentration for the mAbs tested using hFcRn Tg 32 and Tg276 (N = 5)

4. ADA の評価結果

上述の通り、非線形的な PK プロファイルを示した一部の個体では ADA が疑われたため、抗マウス抗体を用いて ADA の確認試験を実施した。ADA は、投与されたヒト IgG に対してマウスの抗ヒト IgG が産生されることで生じるため、抗マウス抗体の ELISA 評価により ADA の有無を判断できる。ADA 評価には ELISA エンドポイント力価法 [5] を用い、Tg32 マウスのみを対象に行った。Adalimumab については投与後の 7 日目～14 日目、bevacizumab および pembrolizumab については 14 日目～28 日目のタイムポイントにおけるサンプルを 5 段階希釈し、投与前サンプルの 50 倍希釈の吸光度値を超えた最高の希釈倍率を用いて変化率を計算し、変化率が 1 以上の場合は ADA 陽性とみなした。評価結果を Fig. 3 に示す。Adalimumab 投与群については 7 日目から ADA 陽性の個体が確認され、特に、#1-2, #1-3 および #1-4 の個体については PK プロファイルの予測と一致したため、ADA 陽性と判断された。Pembrolizumab 投与群においては、PK プロファイルより予測された個体 #3-2 については ADA が確認されたのに加え、個体 #3-1 も 28 日目に ADA を発症した可能性が示唆された。なお、bevacizumab 投与群については、PK プロファイルからも明らかなように、ADA は確認されなかった。

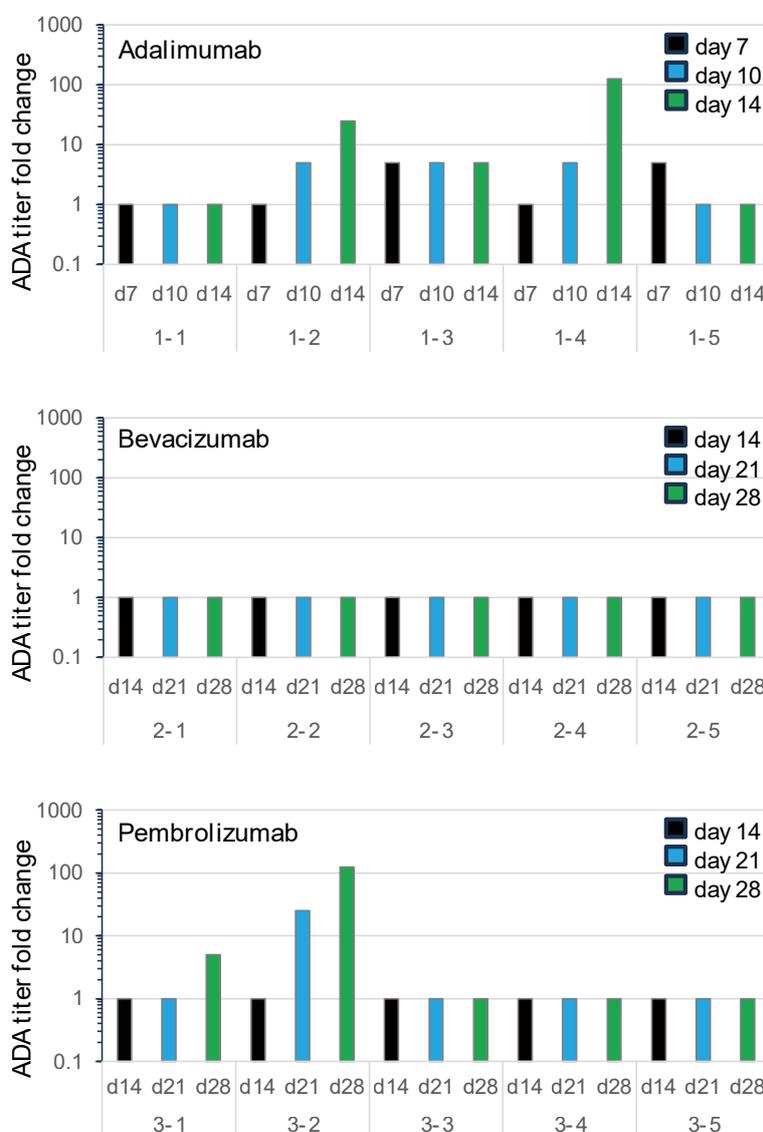


Fig. 3 Results of ADA analysis for Tg32 mice following administration with the antibodies shown.

5. 考察

(a) ELISA を用いた PK 評価

本試験では3つの抗体を評価し、いずれも論文等で報告されている半減期に近い値が得られた。また、クリアランスが比較的早いことで知られる Tg276 モデルの半減期が Tg32 モデルよりも短いという結果も得られ、すでに報告されている結果と一致した。これらを踏まえ、ELISA を用いた今回の PK 評価の妥当性が確認されたと言える。

(b) ADA の確認

PK プロファイルに基づいて ADA の発症が予測されていた全個体において ADA が確認され、期待通りの結果が得られた。免疫系が健全な Tg32 モデル（Tg276 も同様）を用いた場合では ADA の発症リスクが存在するということを確認できたのが、今回の試験の最も重要な知見の一つである。ADA は抗体医薬品の PK 試験を実施する際に考慮すべき事柄であり、今後、①十分な N 数を確保すること、また、②免疫不全 FcRn ヒト化マウス、例えば、Tg32 SCID を使用することがその対策として検討していく予定である。

6. まとめ

本試験では、ジャクソン・ラボラトリーが提供する FcRn ヒト化マウスを用いた PK 試験サービスを国内で展開していくにあたり、3つの代表的な抗体を用いてプロトコルの最適化および ELISA 評価系の確立を目指した。PK プロファイルに基づいて導出した半減期が論文等で報告されているものに近いこと、ADA のケースが正しく確認されたことを受け、評価系の確立ができたと言える。従って、抗体医薬品の PK 評価試験サービスの展開が可能であり、今後、質の高いサービス提供に注力する。

参考文献

- [1] Avery, L.B., Wang, M., Kavosi, M.S., Joyce, A., Kurz, J.C., Fan, Y.Y., Dowty, M.E., Zhang, M., Zhang, Y., Cheng, A. and Hua, F., Utility of a human FcRn transgenic mouse model in drug discovery for early assessment and prediction of human pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *MABS*, Vol. 8 (6), pp. 1064-1078 (2016).
- [2] Pyzik, M., Kozicky, L.K., Gandhi, A.K. and Blumberg, R.S., The therapeutic age of the neonatal Fc receptor. *Nature Reviews Immunology*, 23(7), pp.415-432 (2023).
- [3] Roopenian, D.C., Christianson, G.J. and Sproule, T.J., Human FcRn transgenic mice for pharmacokinetic evaluation of therapeutic antibodies. *Mouse Models for Drug Discovery: Methods and Protocols*, pp.93-104 (2010).
- [4] Valente, D., Mauriac, C., Schmidt, T., Focken, I., Beninga, J., Mackness, B., Qiu, H., Vicat, P., Kandira, A., Radošević, K. and Rao, S., January. Pharmacokinetics of novel Fc-engineered monoclonal and multispecific antibodies in cynomolgus monkeys and humanized FcRn transgenic mouse models. *MABS*, Vol. 12 (1), pp. 1829337 (2020).
- [5] Myzithras, M., Bigwarfe, T., Li, H., Waltz, E., Ahlberg, J., Giragossian, C. and Roberts, S., Utility of immunodeficient mouse models for characterizing the preclinical pharmacokinetics of immunogenic antibody therapeutics. *MABS*, Vol. 8 (8), pp. 1606-1611 (2016).

The Jackson Laboratory Japan, Inc.

micetech@jax.or.jp

www.jax.or.jp

WPJ24-08A

