

博士論文

抗体医薬と抗薬物抗体により形成される  
免疫複合体検出法の開発

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である。

2020 年 9 月

静岡県立大学大学院

薬食生命科学総合学府 薬科学専攻

小林 和弘

**Development of a method for detecting circulating  
immune complexes between therapeutic monoclonal  
antibodies and anti-drug antibodies**

**September 2020**

**Kazuhiro Kobayashi**

## 目次

序論 .....	1
第 1 章 抗体医薬と抗薬物抗体により形成される免疫複合体検出法の開発 .....	6
1.1 実験材料と試験方法 .....	9
1.1.1 実験材料 .....	9
1.1.1.1 抗体 .....	9
1.1.1.2 マトリクス .....	10
1.1.1.3 BN-PAGE .....	10
1.1.1.4 In-gel digestion .....	10
1.1.1.5 LC-MS/MS .....	10
1.1.2 BN-PAGE .....	11
1.1.3 In-gel digestion .....	11
1.1.4 LC-MS/MS .....	12
1.1.5 検出法の性能評価 .....	13
1.1.5.1 BN-PAGE による分離 .....	13
1.1.5.2 特異性 .....	14
1.1.5.3 定量性 .....	14
1.1.5.4 サル血清試料中の免疫複合体検出 .....	15
1.2 実験結果 .....	16
1.2.1 検出法の構築 .....	16
1.2.2 BN-PAGE による分離 .....	19
1.2.3 特異性 .....	21
1.2.4 定量性 .....	23
1.2.5 サル血清試料中の免疫複合体検出 .....	25
1.3 考察 .....	27
1.4 小括 .....	29
第 2 章 抗薬物抗体が抗体医薬の薬物動態や安全性に与える影響 .....	30
2.1 実験材料と試験方法 .....	32

2.1.1	実験材料.....	32
2.1.2	動物実験.....	32
2.1.3	血漿中薬物濃度測定方法.....	33
2.1.4	ADA 測定方法.....	33
2.1.5	免疫複合体検出方法.....	34
2.1.6	補体活性測定方法.....	34
2.1.7	血漿中クレアチニン濃度測定方法.....	34
2.1.8	血液学的検査.....	35
2.1.9	試験スケジュールと測定項目.....	35
2.1.9.1	短期試験.....	36
2.1.9.2	長期試験.....	37
2.2	実験結果.....	40
2.2.1	短期試験.....	40
2.2.1.1	血漿中薬物濃度と ADA 産生.....	40
2.2.1.2	免疫複合体.....	47
2.2.1.3	補体活性.....	50
2.2.2	長期試験.....	52
2.2.2.1	血漿中薬物濃度と ADA 産生.....	52
2.2.2.2	免疫複合体.....	60
2.2.2.3	血漿中クレアチニン濃度.....	64
2.2.2.4	血液学的検査.....	65
2.3	考察.....	68
2.4	小括.....	70
	総括.....	71
	謝辞.....	74
	参考文献.....	75

## 略語表

ADAs : anti-drug antibodies

BN-PAGE : blue native polyacrylamide gel electrophoresis

CDR : complementarity determining region

CBB : coomassie brilliant blue

DNP : dinitrophenol

EGFR : epidermal growth factor receptor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

ESI : electrospray ionization

Fab : antigen-binding fragment

Fc : fragment crystallizable

FCM : flow cytometry

IC : immune complex

IS : internal standard

LC-MS/MS : liquid chromatography tandem-mass spectrometry

LLOQ : lower limit of quantification

mAb : monoclonal antibody

NAb : neutralizing antibody

PBS : phosphate-buffered saline

QC : quality control

SDS : sodium dodecyl sulfate

SEC : size exclusion chromatography

SPR : surface plasmon resonance

SRM : selected reaction monitoring

TFA : trifluoroacetic acid

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor-alpha

## 序論

抗体医薬は、遺伝子組み換え技術により人工的に製造された抗体を主成分とする治療薬である。抗体は異物に対する免疫応答として生体内で産生され、特定の抗原に対して高い親和性を有する分子として知られており、その特徴から古くから治療への応用が期待されていた。1975 年に Köhler と Milstein により開発されたハイブリドーマによるモノクローナル抗体作製技術の開発が起点となり[1]、様々な技術革新を経て医薬品として抗体を製造できるようになり、2000 年以降、飛躍的に臨床応用研究が進んだ。抗体医薬は高い薬効と少ない副作用が両立した理想的なプロファイルをもつことから世界中で研究開発が進められ、現在までに 30 以上のターゲット分子に対する抗体が様々な疾患に対して承認を受けている[2,3]。医薬品の売上の中で抗体医薬が占める割合が年々高くなっており、その市場規模や実績から創薬の主要なプラットフォームとして確立されたと言える[4,5]。

抗体医薬を患者に投与した後、生体内では抗薬物抗体（Anti-drug antibodies, ADAs）が産生される場合がある[6–8]。ADA 産生は有効性低下や副作用の誘発に繋がることから、臨床上の課題と認識されている。抗体医薬の開発が始められた当初はマウス由来抗体が利用されており、世界で初めて承認されたモノクローナル抗体医薬である Muromonab-CD3（OKT3）のようにマウス由来抗体で上市された事例はあるものの、免疫原性の問題から利用に制限があった[9,10]。その後、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体の作製技術が確立され[2]、マウス由来抗体で認められた異種タンパク質成分由来の免疫原性は低減した。しかしながら、100%ヒト遺伝子由来の配列を持つ抗体においても高頻度で ADA 産生が検出される事例も報告されており[11,12]、例えば、完全ヒト抗体である Adalimumab の ADA 陽性率は、17~87%と報告されている[13,14]。ヒト遺伝子配列への置換のみでは免疫原性のリスクを抑制するには不十分であると考えられた[15]。現在までに免疫原性を回避するための定型化された手法はなく、全ての抗体医薬品は潜在的に ADA

産生のリスクがあると考えられている。抗体医薬の開発において ADA 産生による有効性や安全性への影響を適切に解析し、リスクを評価することが必要となる。

ADA 産生による臨床的な影響については多くの報告がある[16,17]。薬物動態への影響としては抗体医薬のクリアランスを上昇させる事例が多い[18]。抗体医薬に対する中和活性をもった抗体 (Neutralizing antibody, NAb) が産生した場合には薬効減弱の影響が考えられる。また安全性への影響としてはインフュージョン反応やアレルギー反応への関与が指摘されている[19,20]。具体例として、腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) を標的にした抗体医薬においては ADA 産生によるトラフ濃度の低下が認められ、臨床的な効果の減弱に繋がることが知られており、問題視されている[21]。また上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) を標的としたセツキシマブの antigen-binding fragment (Fab) には、アレルギーの原因になる galactose- $\alpha$ -1,3-galactose が存在する。galactose- $\alpha$ -1,3-galactose に対する Immunoglobulin E (IgE) を保有する患者にセツキシマブを投与すると、アナフィラキシーを発症しやすいことが知られている[22]。

このように治験や臨床研究を通じて ADA 産生による有効性や安全性へのリスクが明確になる事例もあるが、一方で ADAs の影響が不明確な場合も多い[23]。ADAs の産生頻度が低いため、関連性を考察するためにはデータが不十分である場合もあるが、陽性事例が十分に集まった試験においても考察が難しい場合がある[12]。その大きな要因としては、ADAs は個体ごとに結合するエピトープや親和性、サブクラスなどが異なり、多様な作用を示すためと考えられている[19,20,24]。個体ごとに異なる ADAs の影響度を事例毎に評価する必要があり、一貫した結論を得ることが出来ない研究の難しさが考えられる。また治験においては開発品自体の作用も不明確であるため、開発品の直接的な作用による所見と ADAs の作用による所見を区別して評価することは難しい。ADAs に関する研究は発展途上であることから、その作用メカニズムを理解するためには、データの蓄積が必要となる。また個別の ADA 作用を考察するためには、ADAs の特性

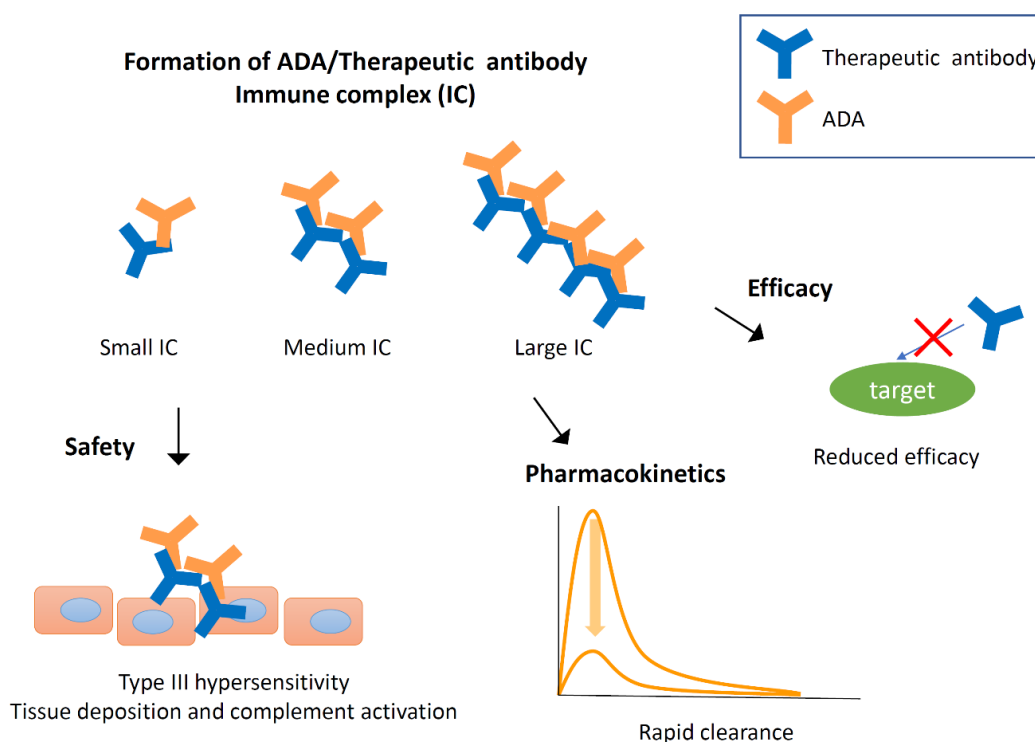


を解析できる測定法が必要となる。

現在の抗体医薬の研究開発においては、開発品ごとに ADA アッセイが構築されている[25,26]。アッセイの原理としては表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance、SPR）を原理としたバイオセンサーを用いた方法や[27]、電気化学発光等を利用したリガンド結合法が主流である[28,29]。規制当局から治験における評価方法やバリデーション内容を定めたガイドラインが発出され、年々厳しくなる要求事項に合致したアッセイ系の開発が求められている[30,31]。検出技術の向上も図られており、例えば試料中に高濃度の抗体医薬が存在した場合には ADAs の検出が阻害される課題があったが、近年は酸解離を組み込むなどの改善が図られ、実用的な方法として定着している[32–34]。このように ADAs を検出する方法は確立されつつあるが、これらの方法は陽性／陰性を判定する定性的な方法である。ADAs の有効性や安全性への影響を考察するためには、ADAs の特性評価が有用と考えられるが、そのようなアッセイの報告は限定的である。現在のガイドラインでは ADAs の抗体医薬に対する中和能を評価するよう定めているが[30]、評価系構築の難易度は高く、全ての開発品で一律に測定されているわけではない。また安全性の観点で ADAs の特性を解析する方法はほとんど報告がないのが現状である。ADAs の作用を解析し、薬効や安全性への影響を考察するためには、その特性を分析する新規のアッセイ系確立が喫緊の課題である。

生体内で産生された ADAs は抗体医薬と免疫複合体を形成する (Fig. 1)。ADAs が引き起こす様々な作用は免疫複合体のサイズや濃度などにより説明できる場合がある[35–37]。例えば抗体医薬も ADAs も多価結合が可能な抗体であることから、結合様式によっては抗体医薬と ADAs が架橋して大きな免疫複合体を形成することがある[38]。大きな免疫複合体は fragment crystallizable (Fc) 受容体への親和性向上により、貪食細胞への取り込みが増加し、抗体医薬の消失を速める可能性がある[35,39]。一例として、サル及びヒトの放射標識抗体を用いた試験では大きな免疫複合体が血中から速やかに消失することが報告されている[40,41]。また免疫複合体に

起因する副作用としては III 型アレルギーが良く知られている[42]。循環する免疫複合体が血管内皮や組織に沈着し、補体経路活性化、好中球減少及び腎炎といった様々な炎症反応が惹起される[43,44]。このような炎症反応の起きやすさは免疫複合体の濃度、あるいは構成する ADAs のサブクラスに依存する可能性が考えられる[45,46]。このように免疫複合体のサイズや濃度、サブクラス等の情報は ADAs の作用を説明する一助となるため、個体ごとに ADAs の作用を考察するためには免疫複合体を定量的に検出し、その特性を評価する方法が有用である。しかしながら抗体医薬と内因性抗体が高濃度で存在する中で、両者が結合した免疫複合体を特異的に検出する難易度は高い。現状では、標準的に使用できる免疫複合体測定方法が未確立であり、新しい測定法の開発が望まれている。



**Fig. 1.** The impact of immune complex formation on pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicological profiles of therapeutic monoclonal antibodies.

このような背景のもとで、本研究では Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) によるサイズ分離と Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) によるヒト抗体医薬の特異的な検出を組み合わせた免疫複合体検出法を開発した。従来の ADA 測定法は陽性／陰性を判定する定性的な方法であり、ADAs の作用を特定することは困難であったが、本検出法は免疫複合体のサイズや量を測定可能であり、ADAs の作用を免疫複合体の特徴に基づいて評価できる。本検出法は動物試料において汎用的に使用可能であり、ADAs が高頻度で産生される非臨床試験において ADAs の作用を特定するための強力なツールになると考えられる。

本研究では、ヒト抗体医薬を添加したサル血清を用いて、検出法の特異性や定量性などの性能評価を実施した。また開発した免疫複合体検出法を用いて、ヒト抗体医薬をマウスに投与したときに産生する ADAs が薬物動態や安全性に与える影響を評価した。

## 第 1 章 抗体医薬と抗薬物抗体により形成される免疫複合体検出法の開発

抗体医薬を投与した際に産生される ADAs は薬効や副作用に影響を与えることが知られているが、個体ごとに異なる ADAs の作用を一律に議論し考察することは難しい。多様な ADAs の作用を個体ごとに考察するためには、抗体医薬と ADAs により形成される免疫複合体のサイズ（二量体～多量体）や濃度を測定することが有用と考えられる。

血中には投与された抗体医薬と内因性抗体が高濃度で存在する中で、両者が結合した免疫複合体を特異的に検出する必要があるため、生体試料中に存在する免疫複合体の検出難易度は非常に高い。これまでに報告のある免疫複合体の測定法はサイズ分離と特異的検出法を組み合わせた方法が多い。一例としては、サイズ排除クロマトグラフィー（Size Exclusion Chromatography、SEC）により免疫複合体をサイズにより分離する方法が報告されている[47,48]。SEC により分離された免疫複合体を検出する方法としては、そこに含まれる抗体医薬を検出するリガンド結合法が用いられる場合がある。リガンド結合法は高感度かつ特異的な検出ができるため、生体試料を用いた分析において汎用されている。しかしながら免疫複合体に含まれる抗体医薬を検出する場合、検出抗体のエピトープが ADAs によりマスクされることがあるため、必ずしも全ての免疫複合体を検出できる訳ではない。別の検出方法としては、放射標識した抗体医薬を利用する方法が報告されている[40]。SEC による分離後、高分子フラクションに存在する抗体医薬の放射能を測定することで免疫複合体が検出可能であり、リガンド結合法で課題となるエピトープマスクの問題も回避できる。しかしながら、放射標識体を使用する試験は実施できる施設が限られており日常的な利用が難しいため、汎用的な方法とは言い難い。サイズで分画せず、補体や Fc 受容体を利用したリガンド結合法により免疫複合体を直接検出する方法も知られているが[49,50]、サイズ情報が得られないため利用は限定的である。このように現状では、標準的に使用できる免疫複合体の測定方法が未確立であり、新しい測定法の開発が望まれている。

本研究では非臨床試験において ADAs の特性を解析するため、BN-PAGE によるサイズ分離と LC-MS/MS によるヒト抗体医薬の特異的な検出を組み合わせた免疫複合体の検出方法を開発した。動物種やヒト抗体医薬の種類によらず汎用的に使用できる検出法を考案した。

BN-PAGE はタンパク質を未変性状態で分離させる Native-PAGE の一種である [51,52]。Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) -PAGE では SDS による変性により複合体が解離してしまうが、Native-PAGE ではタンパク質間相互作用を維持した状態で複合体を泳動可能であり、タンパク質複合体の分析に用いられている。しかしながら、従来から利用されてきた Native-PAGE ではタンパク質表面の荷電状態により泳動位置が決まるため、SDS-PAGE のように分子量に応じた泳動度が得られる訳ではなく、目的タンパク質の泳動度を予測することが難しい。BN-PAGE では泳動時にタンパク質表面に Coomassie Brilliant Blue (CBB) を弱く結合させることで負電荷を付与する。CBB はタンパク質間相互作用を解離させることなく分子全体を負に帯電させることができるため、BN-PAGE では複合体を分子量に応じて分離可能である。タンパク質を泳動後のゲルは CBB により青く染色されることから BN-PAGE と呼ばれている。BN-PAGE は簡便かつ汎用的に使用可能であり、タンパク質複合体を単一の構成成分からサイズ分離できることから、本研究では複合体に含まれない遊離型の抗体医薬及び内因性抗体と免疫複合体の分離に BN-PAGE を用いた。

BN-PAGE による分離後の免疫複合体の検出には LC-MS/MS を用いた。近年、質量分析装置を用いて生体試料中のタンパク質を定量する手法が汎用されている。タンパク質をそのまま分析するインタクト分析のアプローチや、トリプシンに代表される酵素を用いた消化後の特異的なペプチドを検出するアプローチが報告されている [53,54]。後者の酵素消化によるアプローチは免疫沈降等の適切な前処理と組み合わせることにより、従来のリガンド結合法と遜色ない感度や再現性で測定できるようになった。本検出法においては、BN-PAGE による泳動後にゲルの各レーンを切り出し、そこに含まれるヒト抗体医薬をトリプシンによる In-gel digestion でヒト抗体由来

ペプチドに消化した後に LC-MS/MS を用いて定量した[55]。

本章では、抗体医薬を Phosphate-buffered saline (PBS)、もしくはサル血清に添加して調製した試料を用いて開発した免疫複合体検出法の性能を検証した。

## 1.1 実験材料と試験方法

### 1.1.1 実験材料

試薬は特に断らない限り分析用もしくは特級以上のものを使用した。

#### 1.1.1.1 抗体

下記の抗体を協和キリン株式会社 (Tokyo, Japan) 及び Abcam (Cambridge, MA, UK) から入手し、モデル抗体医薬として使用した (Table 1)。

**Table 1.** Properties of monoclonal antibodies used as drugs in this study.

Name	Species	Subclass	Antigen	Manufacturer
K804	Mouse/human chimeric	IgG1	DNP	Kyowa Kirin
K806	Mouse/human chimeric	IgG4	DNP	Kyowa Kirin
K809	Rat/human chimeric mAb	IgG4	DNP	Kyowa Kirin
K851	Humanized mAb	IgG1	DNP	Kyowa Kirin
K853	Humanized mAb	IgG4	DNP	Kyowa Kirin
4-4-20	Human mAb	IgG1	Fluorescein	Abcam
4-4-20	Human mAb	IgG2	Fluorescein	Abcam
4-4-20	Human mAb	IgG4	Fluorescein	Abcam

下記の抗体を協和キリン株式会社及び Abcam から入手し、モデル ADA として使用した (Table 2)。

**Table 2.** Properties of monoclonal antibodies used as anti-drug antibody in this study.

Name	Species	Antigen	Manufacturer
K455	Mouse mAb	Human kappa light	Kyowa Kirin
K041	Mouse mAb	Therapeutic mAb	Kyowa Kirin
4A11	Mouse mAb	human IgG Fab fragment	Abcam

#### 1.1.1.2 マトリクス

カニクイザルプール血清（サル血清）を株式会社新日本科学（Kagoshima, Japan）から入手して使用した。

#### 1.1.1.3 BN-PAGE

下記の試薬を Thermo Fisher Scientific（Waltham, MA, USA）から入手して使用した。

- Native PAGE Novex 4-16% Bis-Tris Gels
- Native PAGE Running Buffer Kit
- Native PAGE Sample Prep Kit
- Native Mark unstained protein standard

#### 1.1.1.4 In-gel digestion

- RapiGest SF (Waters, Milford, MA, USA)
- No-Weigh Dithiothreitol (Pierce, Rockford, IL, USA)
- Iodoacetamide (富士フイルム和光純薬, Osaka, Japan)
- Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade (Promega, Madison, WI, USA)
- メタノール、液体クロマトグラフィー用（富士フイルム和光純薬）
- 酢酸、特級（富士フイルム和光純薬）

#### 1.1.1.5 LC-MS/MS

- アセトニトリル、LC/MS 用（関東化学, Tokyo, Japan）
- ギ酸、LC/MS 用（富士フイルム和光純薬）
- 内部標準物質（internal standard、IS）：以下の配列の C 末端リジンを安定同位体標識し



たペプチド の trifluoroacetic acid (TFA) 塩、純度 97.65% (Scrum, Tokyo, Japan)

GFYPSDIAVEWESNGQPENNY[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>]K

### 1.1.2 BN-PAGE

BN-PAGE は Thermo Fisher Scientific の NativePAGE™ Bis-Tris Gel System を使用し、メーカーから提供されたプロトコルに従い実施した。血清試料は前処理として PBS を用いて 10～40 倍に希釈した。全ての試料は Native PAGE Sample Buffer (4×)を用いて希釈後、Native PAGE Novex 4-16% Bis-Tris Gel の各ウェルに 15 μL を添加した。150V の定電圧で約 100 分間、電気泳動を実施した。電気泳動後のゲルは固定化溶液（40%メタノール、10%酢酸）で約 15 分間インキュベーションした。固定化溶液を廃棄後、脱色溶液（8%酢酸）で少なくとも 60 分間インキュベーションした。その後、ゲルを撮影する場合には ImageQuant LAS 4000 (富士フイルム, Tokyo, Japan) を用いて画像を取得した。In-gel digestion を実施する場合には次項の操作に従った。

### 1.1.3 In-gel digestion

脱色した BN-PAGE ゲルの各レーンについて目的位置のゲルを切り出した。血清試料を泳動する場合、内因性タンパク質由来の非特異的なバンドがレーン全体に渡って認められるため、抗体医薬や免疫複合体の位置を特定することは難しい。そこで、血清試料の泳動時に PBS で調製した抗体医薬を同じゲルの任意のウェルに添加し、抗体医薬の泳動位置を確認できるようにした。抗体医薬の位置を指標に、血清試料のレーンの目的位置を切り出した。1 レーンあたり 1～2 mm の大きさのゲル片を 10～18 個切り出した。

各ゲル片は 25 mmol/L ammonium bicarbonate 溶液（200 μL）とアセトニトリル（200 μL）を用いて順に 2 回洗浄した。ゲル片を完全に乾燥させた後に 0.1% Rapigest 溶液（100 μL）を添加し、37℃で少なくとも 1 時間インキュベーションした。溶液を廃棄後、ゲル片にアセトニトリル

ル (100  $\mu$ L) と 25 mmol/L ammonium bicarbonate (100  $\mu$ L) を等量混合した溶液を添加し、37°Cで少なくとも 30 分間インキュベーションした。溶液を廃棄してゲル片を完全に乾燥させた後に 20 mmol/L dithiothreitol 溶液 (100  $\mu$ L) を添加し、60°Cで 15 分間インキュベーションした。溶液を廃棄後、ゲル片に 180 mmol/L iodoacetamide 溶液 (100  $\mu$ L) を添加し、37°Cで少なくとも 30 分間インキュベーションした。溶液を廃棄後、ゲル片を 25 mmol/L ammonium bicarbonate 溶液 (200  $\mu$ L) とアセトニトリル (200  $\mu$ L) の順に洗浄した。ゲル片を完全に乾燥させた後に 13  $\mu$ g/mL の Trypsin/Lys-C Mix 溶液 (100  $\mu$ L) を添加し、37°Cでオーバーナイトインキュベートした。約 80  $\mu$ L の上清を回収し、62 nmol/L の IS 及び 0.1%ギ酸を含むアセトニトリル溶液と等量混合した。さらに 0.1%ギ酸と等量混合後、LC-MS/MS に注入し、分析した。

#### 1.1.4 LC-MS/MS

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) 装置として Acquity UPLC I-Class System (Waters) を使用した。質量分析装置として Qtrap 6500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を使用した。分析カラムとして Acquity UPLC CSH C18 column (130 Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm) (Waters) を使用した。ガードカラムとして Acquity UPLC CSH C18 VanGuard Pre-column (130 Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm $\times$ 5 mm) (Waters) を使用した。移動相は A (0.1%ギ酸) と B (0.1%ギ酸を含むアセトニトリル) を使用した。カラム温度は室温、流速は 0.4 mL/min に設定した。下記のグラジエント条件に従い、溶媒組成を変化させて分析した。

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	85	15
6.00	55	45
6.01	15	85
8.00	15	85
8.01	85	15
10.00	85	15

検出は Electrospray ionization (ESI) プローブを用いて、ポジティブモード、Selected Reaction Monitoring (SRM) で下記のイオンを検出した。

Name	Sequence	Monitor ion ( <i>m/z</i> , Q1/Q3)
IgG PEP4	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	848.943/764.2
IgG PEP4 IS	GFYPSDIAVEWESNGQPENNY[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	851.643/772.2

#### 1.1.5 検出法の性能評価

下記項目を評価して検出法の性能を検証した。

- (1) BN-PAGE による免疫複合体と遊離型の抗体医薬のサイズ分離
- (2) BN-PAGE と LC-MS/MS を組み合わせた方法によるサル血清中のヒト抗体測定に関する特異性
- (3) BN-PAGE と LC-MS/MS を組み合わせた方法によるサル血清中のヒト抗体測定に関する定量性
- (4) BN-PAGE と LC-MS/MS を組み合わせた方法によるサル血清中の免疫複合体の検出

##### 1.1.5.1 BN-PAGE による分離

抗体医薬と ADA により形成される免疫複合体の BN-PAGE による分離能を確認するため、PBS で調製した抗体医薬及び免疫複合体を含む試料を用いて BN-PAGE を実施し、CBB 染色に

より評価した。モデル抗体医薬として 4-4-20 (IgG4) を用いた。モデル ADA として K455 と 4A11 を用いた。ADA のネガティブコントロール (ヒト抗体医薬に結合しないマウス IgG) として K041 を用いた (data not shown)。

各試料を 1.1.2 に示した方法に従い、BN-PAGE ゲルに添加し、電気泳動を実施した。電気泳動後のゲルは固定化溶液 (40%メタノール、10%酢酸) で約 15 分間インキュベーションした。固定化溶液を廃棄後、脱色溶液 (8%酢酸) で少なくとも 60 分間インキュベーションした。その後、ImageQuant LAS 4000 を用いてゲルの画像を取得した。

#### 1.1.5.2 特異性

LC-MS/MS による検出能を確認するため、モデル抗体医薬として K804、K806、K851、K853、4-4-20 (IgG1)、4-4-20 (IgG2) 及び 4-4-20 (IgG4) をサル血清に添加した試料を分析した。ネガティブコントロールとして、サル血清を同時に分析した。

各試料を 1.1.2 に示した方法に従い、BN-PAGE ゲルに添加し、電気泳動を実施した。BN-PAGE 後、各レーンの目的位置付近において 1~2 mm の大きさのゲル片を 10 個切り出し、1.1.3 に示した方法に従い、In-gel digestion により処理した。各処理溶液について 1.1.4 に示した方法に従い、LC-MS/MS で分析した。

#### 1.1.5.3 定量性

LC-MS/MS による定量性を確認するため、K853 (モデル抗体医薬) を 10~1000 µg/mL の濃度でサル血清に添加した試料を分析した。ネガティブコントロールとして、サル血清も同時に分析した。

各試料を 1.1.2 に示した方法に従い、BN-PAGE ゲルに添加し、電気泳動を実施した。BN-PAGE 後、各レーンの目的位置付近において 1~2 mm の大きさのゲル片を 10 個切り出し、1.1.3 に示

した方法に従い、In-gel digestion により処理した。各処理溶液について 1.1.4 に示した方法に従い、LC-MS/MS で分析した。

#### 1.1.5.4 サル血清試料中の免疫複合体検出

ヒト抗体医薬と ADA により形成される免疫複合体の検出能を確認するため、K853（モデル抗体医薬）をサル血清に添加した試料、K853 と K455（モデル ADA）をサル血清に添加した試料を分析した。ネガティブコントロールとして、サル血清も同時に分析した。

各試料を 1.1.2 に示した方法に従い、BN-PAGE ゲルに添加し、電気泳動を実施した。BN-PAGE 後、高分子量の複合体を含む領域を分析するため、各レーンの目的位置付近からレーン上端までを 1～2 mm の大きさのゲル片 18 個に切り出し、1.1.3 に示した方法に従い、In-gel digestion により処理した。各処理溶液について 1.1.4 に示した方法に従い、LC-MS/MS で分析した。

## 1.2 実験結果

### 1.2.1 検出法の構築

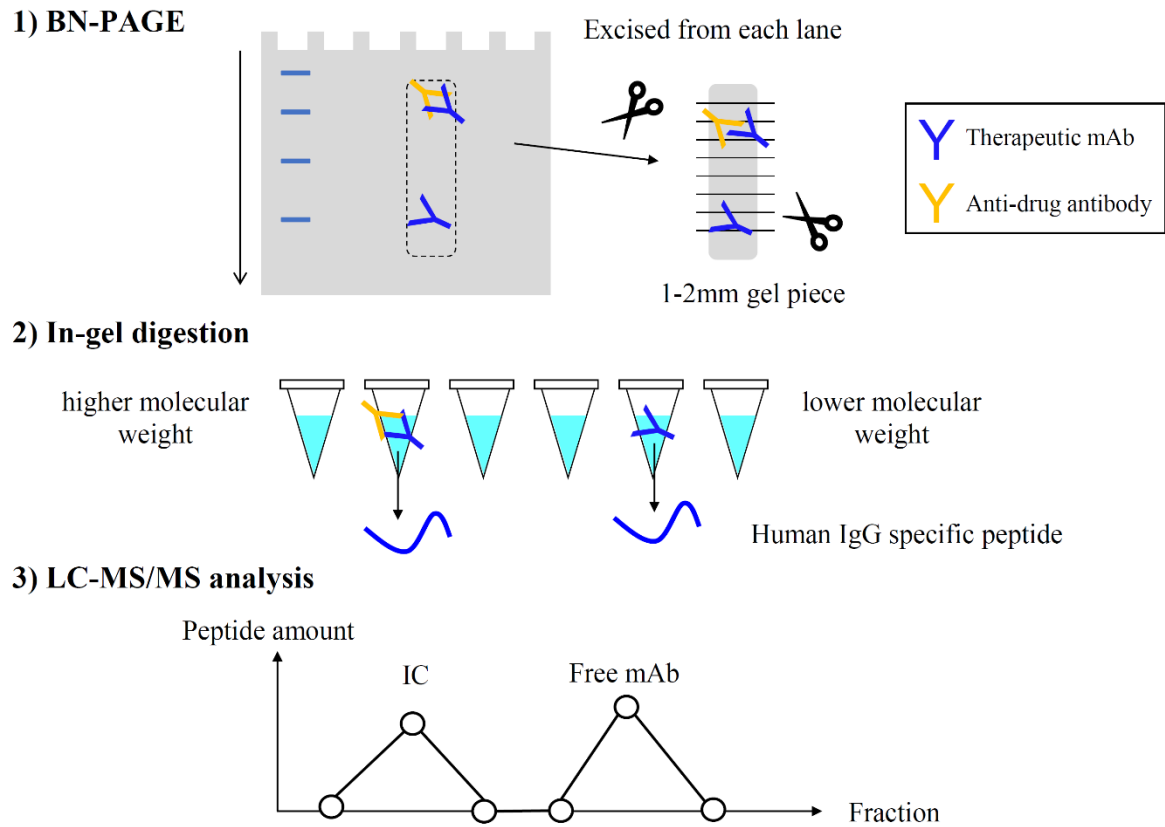
本研究で開発した免疫複合体検出法を Fig. 2 に示す。サイズ分離方法として BN-PAGE、ヒト抗体医薬検出方法として LC-MS/MS を用いた。これまでに報告のある免疫複合体のサイズ分離方法としては SEC を利用したものが多い[47,48]。しかしながら、SEC を用いた生体試料の分析は一般的ではなく、条件検討の難易度が高いと予測される。本研究では、簡便かつ汎用的なサイズ分離方法として BN-PAGE を選択した。BN-PAGE は実験条件が確立されたキットも市販されており、比較的低コストで再現性の高い実験が可能である。

BN-PAGE を用いたサイズ分離後、ゲルから分析対象となるレーンを切り出した。ゲルの切り出しには抗体医薬の泳動位置の特定が必要であるが、生体試料を泳動したレーンは内因性タンパク質由来のラダーなバンドが認められるため、抗体医薬の位置特定が困難である。そこで、生体試料の泳動時に PBS で調製した抗体医薬を同じゲルの別ウェルに添加し泳動することで、抗体医薬の泳動度を目視で確認できるようにした。切り出したレーンを In-gel digestion 処理に適した 1~2mm のゲル片に切り分けてチューブに回収した。その際、高分子量側から低分子量側までの順番がわかるようにフラクション番号を付与した。

In-gel digestion においては変性剤処理によりタンパク質の高次構造を変化させ、還元アルキル化処理により、ジスルフィド結合を切断した。Trypsin/Lys-C を用いて抗体医薬のアルギニンとリジン残基の C 端側のペプチド結合を切断し、短鎖ペプチドへ消化した。

LC-MS/MS を用いたヒト抗体医薬の検出では、動物由来試料中においてヒト抗体医薬を汎用的に検出するため、ヒト IgG の定常領域に存在するヒト特異的な配列のペプチドを選択した。サルやマウス等の動物由来 IgG に存在せず、ヒト IgG 特異的な配列を検索した結果、候補となるペプチドが複数見出されたため、LC-MS/MS による定量性を検討した。その結果、重鎖の Fc ドメインにある GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK の配列を持つペプチドが再現性よく検出できた

め[56,57]、本検出法の定量用ペプチドとして選択した (data not shown)。



**Fig. 2.** Schematic illustration of the method for detecting immune complexes (ICs) in biological samples.

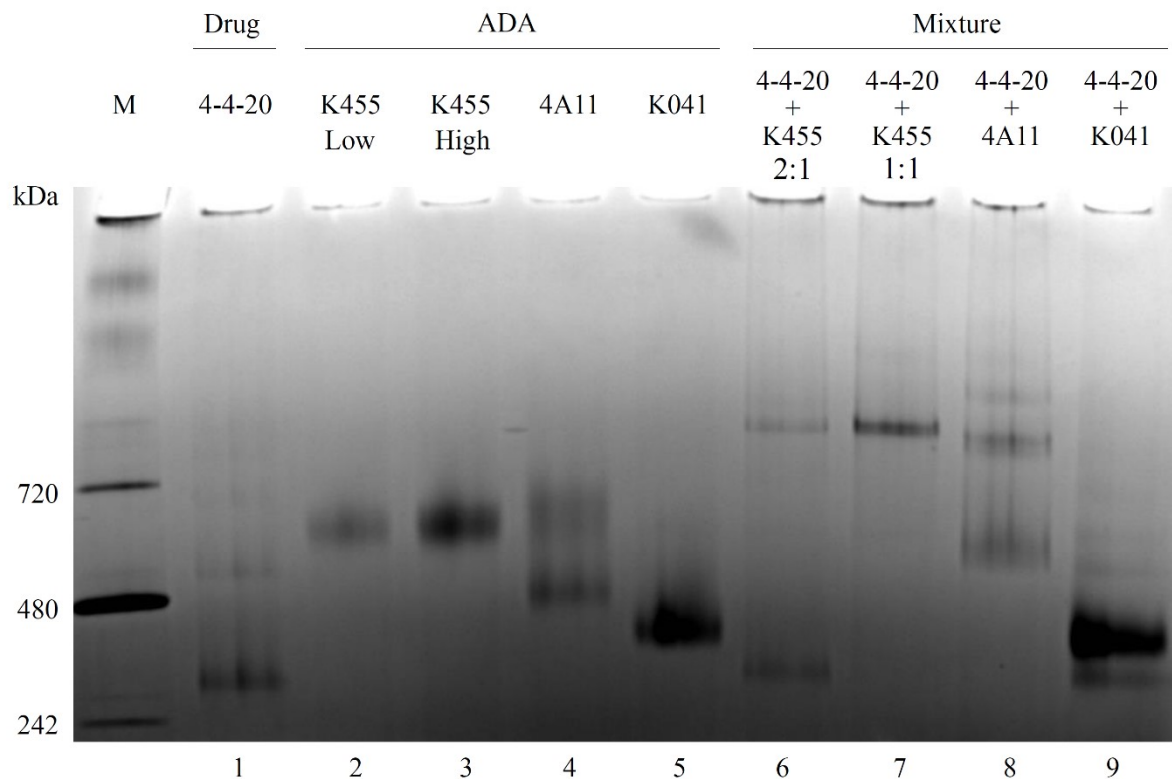


### 1.2.2 BN-PAGE による分離

抗体医薬と ADA により形成される免疫複合体の BN-PAGE による分離能を確認するため、PBS で調製された試料を BN-PAGE ゲルで泳動し、CBB 染色して評価した。CBB 染色後のゲル撮影像を Fig. 3 に示す。

モデル抗体医薬として用いた 4-4-20（ヒト抗体、IgG4）は 242 kDa から 480 kDa の間に主要なバンドが観察された（Lane 1）。またモデル ADA として用いた K455、4A11、K041（いずれもマウス IgG）は 242-720 kDa の範囲でバンドが 1 つ又は 2 つ観察された（Lane 2-5）。バンドが観察された位置は抗体の分子量である 150 kDa と乖離した。BN-PAGE の泳動度は分子量だけではなく立体構造などにも影響を受けるため、分子量マーカーの泳動度と乖離が生じたと考えられる[51]。またマウスモノクローナル抗体である 4A11 においてはバンドが 2 つ観察された（Lane 4）。一般的にモノクローナル抗体は糖鎖修飾などが不均一な混合物として製造される。4A11 で認められた 2 つのバンドは泳動度の異なる 2 種の分子種に由来すると考えられた。

ヒト抗体と結合能を有する K455 及び 4A11 を ADA として 4-4-20 と混合した免疫複合体溶液では、720 kDa 以上の高分子量の領域に 1 つ又は複数のバンドが観察された（Lane 6-8）。混合する K455 の濃度を上げることにより、高分子量の領域のバンド染色が濃くなった。またこれらのレーンのゲルの上端にもバンドが観察された。一方で、ヒト抗体とは結合能を持たない K041 を ADA として 4-4-20 と混合した溶液では、高分子量の領域にバンドが観察されなかった（Lane 9）。このことから、K455 及び 4A11 との混合により認められた高分子量の領域のバンドは、4-4-20 と形成した免疫複合体由来であると考えられた。また分子量の異なる複数の免疫複合体を検出可能であることが確認できた。

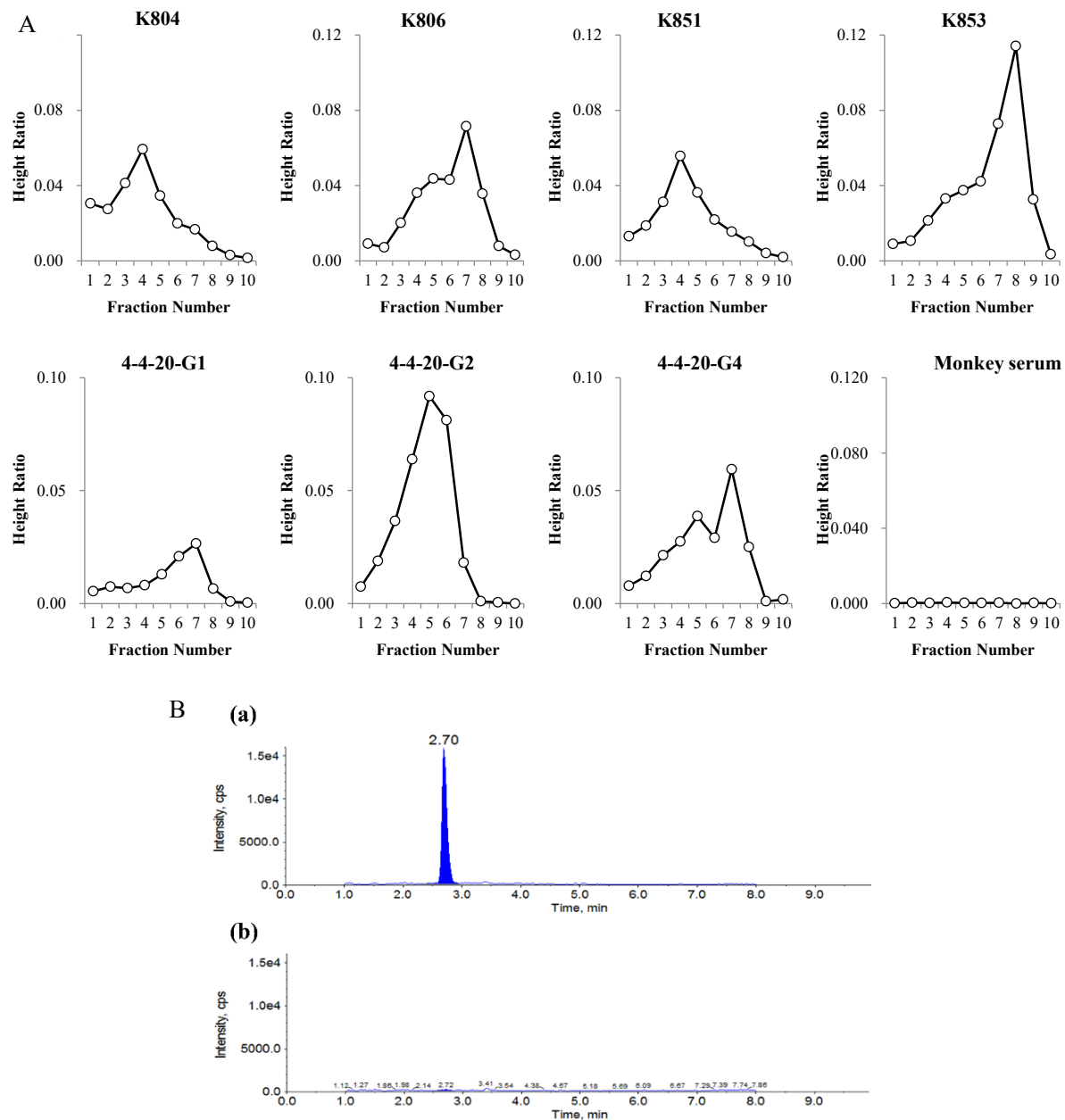


**Fig. 3.** Electrophoresis of the ICs separated from unbound human antibody by BN-PAGE. 4-4-20 (IgG4) was used as a model drug. K455 and 4A11 were used as ADAs. K041 was used as a negative control of ADA. All protein samples were prepared with PBS and then mixed with Native PAGE Sample Buffer (4×). Fifteen microliters of each sample was loaded into a gel well. The molecular weight markers (lane M) were used, and their molecular weights are indicated on the left side. Lane 1: 4-4-20 (200 µg/mL); Lane 2: K455 (100 µg/mL); Lane 3: K455 (200 µg/mL); Lane 4: 4A11 (200 µg/mL); Lane 5: K041 (200 µg/mL); Lane 6: Mixture of 4-4-20 (200 µg/mL) and K455 (100 µg/mL); Lane 7: Mixture of 4-4-20 (200 µg/mL) and K455 (200 µg/mL); Lane 8: Mixture of 4-4-20 (200 µg/mL) and 4A11 (200 µg/mL); Lane 9: Mixture of 4-4-20 (200 µg/mL) and K041 (200 µg/mL).

### 1.2.3 特異性

サル血清中の K804、K806、K851、K853 及び 4-4-20 (IgG1、IgG2、IgG4) を BN-PAGE で分離後、各抗体位置でゲルを切り出し、In-gel digestion 処理後、LC-MS/MS で分析した。ネガティブコントロールとしてサル血清も同時に分析した。各試料の分析結果を Fig. 4A、典型的なクロマトグラムを Fig. 4B に示す。

各抗体をサル血清に添加した試料を分析した結果、いずれの試料に関してもヒト IgG ペプチド由来のシグナルが明確に観察された。一方、抗体を添加していないサル血清ではシグナルが検出されなかった。本検出法を用いることで、ヒト IgG と類似構造を持つサル IgG を高濃度に含むサル血清中においても、ヒト抗体を特異的に検出できることを確認した。またマウス/ヒトのキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などの抗体の種類や IgG1、IgG2、IgG4 などの抗体サブクラスによらずヒト抗体由来のペプチドを検出可能であることを確認した。LC-MS/MS で検出可能なペプチドの配列を持つ抗体分子であれば、汎用的に本検出法が使用可能であることが示唆された。ただし、シグナル強度や最大シグナル強度が得られるフラクションは、抗体ごとに異なる結果であった。免疫複合体分析時には、遊離型の抗体を含む試料も同時に分析し、それらを比較の上で免疫複合体の有無を判断するのが良いと考えられた。



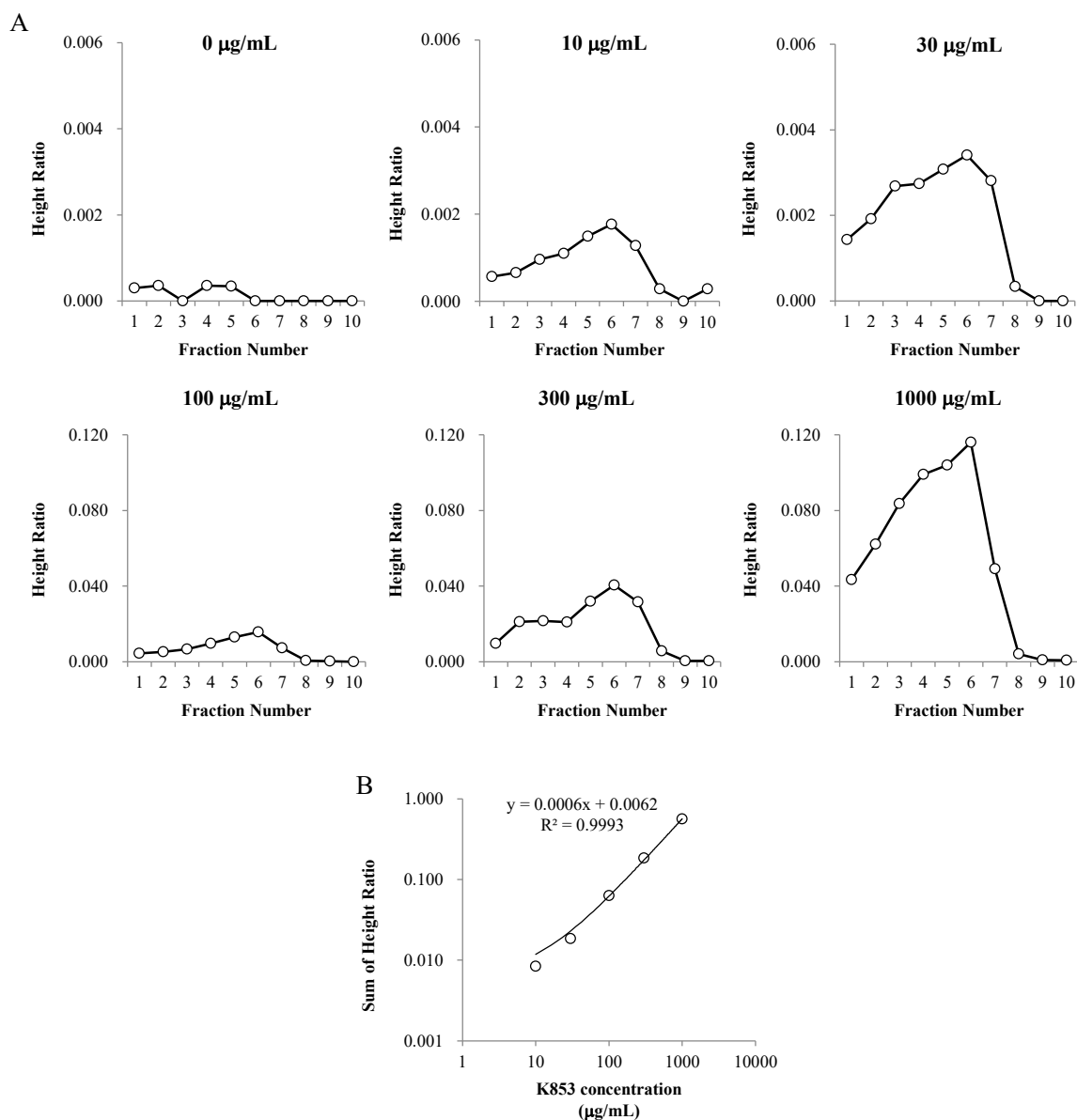
**Fig. 4.** Specific detection of human monoclonal IgG in monkey serum.

(A) K804, K806, K851, and K853 were spiked into monkey serum at a concentration of 300  $\mu\text{g/mL}$ . 4-4-20 (IgG1, IgG2, IgG4) was spiked into monkey serum at a concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$ . Monkey serum was analyzed as a negative control. The y-axis represents the peak height ratio of the signature peptide to internal standard. A lower fraction number indicates a higher molecular weight. (B) The typical chromatograms of (a) human monoclonal IgG in monkey serum (K804, fraction 4) and (b) monkey serum (fraction 4).

#### 1.2.4 定量性

サル血清中の K853 (10~1000  $\mu\text{g/mL}$ ) を BN-PAGE で分離後、K853 の泳動位置でゲルを切り出し、In-gel digestion 処理後、LC-MS/MS で分析した。ネガティブコントロールとしてサル血清も同時に分析した。各試料の分析結果を Fig. 5 に示す。

10  $\mu\text{g/mL}$  の K853 を含むサル血清試料において明確にヒト IgG ペプチド由来のシグナルが観察された (Fig. 5A)。K853 の濃度が高くなるほど、ヒト IgG ペプチドのシグナルも上昇した。各試料中の K853 濃度に対して全フラクションのシグナル総和をプロットして直線回帰したところ、決定係数は 0.9993 と良好なフィッティングが得られた (Fig. 5B)。試料中の抗体医薬濃度とシグナル強度に相関関係が認められたことから、各フラクションで得られたシグナルの半定量的比較も可能であると考えられた。また 10  $\mu\text{g/mL}$  の K853 試料のシグナル総和とサル血清のシグナル総和の比は 6.2 と算出され、十分なシグナルノイズ比が得られたことから、本検出法のヒト抗体に対する感度は 10  $\mu\text{g/mL}$  であると考えられた。



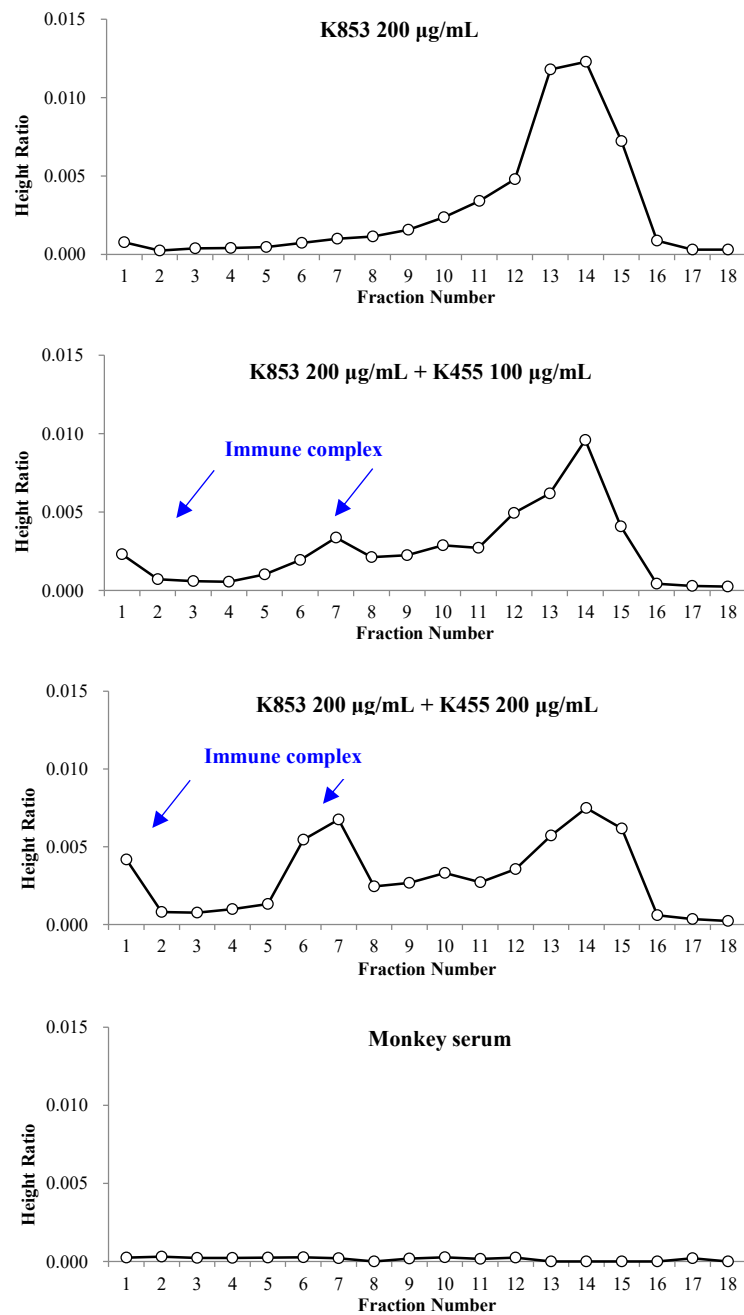
**Fig. 5.** Quantitativity of the method for K853 in monkey serum.

(A) K853 was spiked into monkey serum at each concentration. Monkey serum was analyzed as a negative control. The y-axis represents the peak height ratio of the signature peptide to internal standard. A lower fraction number indicates a higher molecular weight. (B) Relationship between K853 concentration and the sum of the height ratio.

### 1.2.5 サル血清試料中の免疫複合体検出

BN-PAGE と LC-MS/MS を組み合わせた方法による免疫複合体の検出能を確認するため、K853 のみを添加したサル血清試料及び K853 と K455 により形成される免疫複合体を添加したサル血清試料を BN-PAGE により分離後、各レーンの K853 の泳動位置からゲル上端までを切り出し、In-gel digestion 処理後、LC-MS/MS で分析した。ネガティブコントロールとしてサル血清も同時に分析した。各試料の分析結果を Fig. 6 に示す。

K853 のみを含む試料を分析した結果、主にフラクション 12 から 15 までの範囲で、ヒト IgG ペプチド由来の高いシグナルが観察された。それに対してフラクション 1 から 11 までの高分子量の領域においては、ほとんどシグナルが観察されなかった。一方で K853 と K455 を混合して免疫複合体を形成させた試料では、フラクション 1 及び 7 の高分子量の領域にヒト IgG ペプチド由来のシグナルが観察され、免疫複合体に含まれる K853 を検出できたと考えられた。高分子量の領域におけるシグナルは K455 の添加濃度を上げることにより上昇したことから、免疫複合体量に応じたシグナルが得られていると考えられた。また各試料に関して、全 18 フラクションのシグナル合計値を算出したところ、K853 のみを含む試料では 0.0502、K853 と 100 µg/mL の K455 を含む試料では 0.0464、K853 と 200 µg/mL の K455 を含む試料では 0.0556 であった。シグナル合計値は K455 の有無にかかわらず同等の値であったことから、本検出法は ADA による干渉を受けずに免疫複合体に含まれるヒト抗体医薬を検出可能であることが示唆された。



**Fig. 6.** IC detection in monkey serum spiked with a mixture of K853 and K455.

K853 and K455 were spiked into monkey serum at each concentration. Monkey serum was analyzed as a negative control. The y-axis represents the peak height ratio of the signature peptide to internal standard. A lower fraction number indicates a higher molecular weight. The sums of the height ratio of K853, K853 with K455 100 µg/mL, K853 with K455 200 µg/mL, and monkey serum were 0.0502, 0.0464, 0.0556, and 0.00281, respectively.



### 1.3 考察

本章では BN-PAGE と LC-MS/MS を組み合わせによる動物試料中の抗体医薬と ADAs により形成される免疫複合体の特異的検出法を開発した。本検出法では BN-PAGE により複合体に含まれない遊離型の抗体医薬と免疫複合体を形成する抗体医薬をサイズ分離し、LC-MS/MS を用いてヒト抗体の定常鎖に存在する特異的ペプチドを検出することで免疫複合体を測定している。

LC-MS/MS において検出対象としたペプチドは hIgG1、hIgG2 及び hIgG4 に共通する配列であり、抗体医薬汎用的に免疫複合体を測定可能である。また非臨床試験で用いられる典型的な動物種であるマウス、ラット、ブタ及びサルには存在しない配列であることから、これら動物種のマトリクスに対しても適用可能である。ヒト試料中では本ペプチド配列を持つ内因性 IgG が存在するため、そのままでは適用できない。ヒト抗体医薬を区別するために検出ペプチドとして complementarity determining region (CDR) 配列を含むペプチドに変更することで適用可能と考えられる[58–60]。LC-MS/MS は同一試料の分析において複数のペプチドを同時に検出可能であるため、この特性を利用することで抗体医薬以外の免疫複合体の構成成分である ADAs や補体なども同時に検出することが出来る[61]。例えば動物のイムノグロブリンに特異的なペプチドを利用し、LC-MS/MS を用いて検出することで、免疫複合体を構成する ADAs のイムノグロブリンの種類（例：IgM や IgG）やサブクラス（例：IgG1–IgG4）が同定可能となる[62]。イムノグロブリンの違いによって Fc 受容体への結合性や補体活性化能が異なることから、ADAs の分子種はその作用を考察する上で重要な情報となる[63,64]。以上のように本検出法では LC-MS/MS の検出能を活用することにより、ヒト試料中を含めた免疫複合体の検出が可能であり、ADAs とその関連分子の実体を明らかにできるなど、幅広い研究への応用が可能と考えられる。

BN-PAGE ではサイズに基づいた分離が可能であることから、免疫複合体の大きさを特定することができる。免疫複合体の大きさは ADAs の薬物動態や安全性に与える影響の程度を決定する要素と考えられるため、重要な情報と考えられる。例えば大きな免疫複合体は Fc 受容体などを

介した貪食細胞内への取り込み速度が上がることにより、複合体に含まれる抗体医薬の消失が速まることが報告されている[39]。一般的に ADAs は抗体医薬の曝露を低下させる事例が多いものの、一部 ADAs が曝露に影響しない事例もあり、一様な解釈が難しい状況にある。本検出法により個体ごとに免疫複合体の大きさに基づいた解釈が可能になると考えられる。

本検出法は ADAs の定量という観点でも優れた方法である。従来から汎用されている ADA 測定法はリガンド結合法や表面プラズモン共鳴を利用したアッセイであり、ADAs と抗体医薬の結合を指標に検出する方法である。これらのアッセイは陽性と陰性の判定をする定性的な評価方法として用いられている。定量という観点では、希釈試験に基づいたタイター評価やシグナルの高低で ADA 量が判断されることがあるものの、測定の原理上、結合の強弱もシグナル強度に影響するため、多様な結合性をもつ ADAs の定量性に乏しい。開発した免疫複合体検出法では、遊離型の抗体医薬と免疫複合体に含まれる抗体医薬を区別できるため、血中に存在する抗体医薬のうち免疫複合体を形成している割合を算出可能である。すなわち、ADAs が抗体医薬の一部に結合しているか、あるいは全ての抗体医薬に結合しているか、といった情報が得られる。ADAs の抗体医薬に対する影響を半定量的に考察可能である。

本検出法は少量の試料で分析可能であることから、マウスやラットなど採血量が限られるげっ歯類にも適用可能である。また全ての試薬や機器が購入可能であるため、質量分析装置を所有する施設であれば、測定系のセットアップが可能である。一方でモデル抗体医薬として K853 を用いた評価では、検出には少なくとも 10  $\mu\text{g/mL}$  が必要であり、1  $\text{mg/kg}$  以下の低用量の動物試験では感度が不足している。感度の改善にあたっては BN-PAGE による分離能の向上や LC-MS/MS による検出感度の向上が考えられる。例えば LC-MS/MS の定量用ペプチドの再選択や検出条件最適化により、数倍の感度向上が容易に達成可能である。今回確立した条件を応用することで、低用量の試験にも十分対応可能と考えられる。

## 1.4 小括

本章では動物試料中においてヒト抗体医薬と抗薬物抗体により形成される免疫複合体を特異的に検出する方法を開発した。BN-PAGE による分離を CBB 染色で評価した結果、遊離型の抗体由来のバンドに対して免疫複合体由来のバンドが明確に高分子量の領域にシフトし、免疫複合体のサイズ分離が可能であった。BN-PAGE 後の LC-MS/MS によるモデル抗体の検出能を評価した結果、マウス/ヒトのキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体をサブクラスによらず検出できた。またサル血清中のモデルヒト抗体の検出感度は 10  $\mu\text{g/mL}$  であった。モデルヒト抗体と ADA を混合して形成させた免疫複合体を含むサル血清を分析した結果、遊離型のヒト抗体由来のシグナルと免疫複合体由来のシグナルを分別して検出できた。分子量の異なる複数の免疫複合体由来のシグナルが検出できたことから、免疫複合体のサイズを評価可能であることが示された。免疫複合体の濃度に応じたシグナルが得られたことから、半定量的な評価が可能であることが示された。以上より、開発した検出法は動物試料中で免疫複合体を検出可能であり、免疫複合体のサイズや濃度を測定可能であることが示された。本検出法はヒト抗体医薬の種類によらず汎用的に使用可能である。また一般的な試薬や機器を用いていることから、特殊な技術が不要で一般的な研究施設で実施可能である。ヒト抗体医薬の非臨床試験に本検出法を用いることで、ADAs による作用を免疫複合体のサイズや量から考察が可能となり、個体差があり考察が難しかった ADAs の作用への理解を深め、発展途上である ADA 研究を加速化させることが期待される。

## 第2章 抗薬物抗体が抗体医薬の薬物動態や安全性に与える影響

動物を用いた非臨床試験は候補医薬品の薬効、安全性及び薬物動態を評価し、ヒトにおける作用を予測するために不可欠な試験である。ヒト抗体医薬の非臨床試験で大きな問題になるのが ADAs である。ヒト抗体医薬を動物に投与する試験においては異種タンパク質に対する免疫応答により、ADAs が産生しやすい状況にある[65]。動物における ADAs の産生頻度は、ヒトにおける免疫原性を予測するものではないことから[66]、非臨床試験において ADAs が高頻度で産生されたとしても医薬品として問題があるわけではない。しかしながら ADAs が薬効や安全性に影響を与える場合には、医薬品候補抗体の作用を適切に評価できないため、十分なデータが取得できないリスクがある[67]。例えば毒性試験において、ADAs が候補抗体の消失を速める作用を持っていた場合に、十分な曝露が得られずに投与量と毒性の関連を適切に評価できないことになる。また ADAs に起因するアレルギー反応が生じた場合には候補抗体の毒性と区別が出来ずに誤った考察を導いてしまう可能性がある。

ADAs による作用は多様であり、同じ ADA 陽性であってもその影響は個体によって異なる。加えて候補抗体においては、候補抗体自身の作用も不明確であることから、ADA 陽性個体において ADAs の作用のみを区別することは困難である。ヒト抗体医薬の非臨床試験の結果を正確に解釈する上で大きな障害となる ADAs の作用を適切に把握するためには、ADAs の作用に対する基本的な情報の蓄積が必要である。現状では ADAs の作用を網羅的に評価した報告は限定的であり、参照とする情報も少ない。また一般的に用いられる ADA 測定法は陽性判定のみを目的にした定性的な方法であり、ADA 作用の個体差を説明するデータが取得できないため、ADA 作用の考察には限界があった。

本章では、こうした現状の ADA 研究の課題への対応として、ヒト抗体医薬をマウスに投与したときに産生される ADAs が薬物動態や安全性に与える影響を多面的に評価した。安全性の観点

からは免疫複合体形成に伴う III 型アレルギーに着目し、メカニズム研究に汎用されているマウスを本研究に用いた[68,69]。ADAs の作用を評価しやすくするため、生体内で抗原の存在しない DNP に対するヒト抗体を投与した。第 1 章で開発した免疫複合体検出法を用いてマウス試験で得られた試料を分析することで、ADA 作用の個体差を解析した。

## 2.1 実験材料と試験方法

試薬は特に断らない限り分析用もしくは特級以上のものを使用した。

### 2.1.1 実験材料

下記の抗体を協和キリン株式会社から入手し、モデル抗体医薬として使用した (Table 3)。

**Table 3.** Properties of monoclonal antibodies used as drugs in this study.

Name	Species	Subclass	Antigen	Manufacturer
K806	Mouse/human chimeric mAb	IgG4	DNP	Kyowa Kirin
K809	Rat/human chimeric mAb	IgG4	DNP	Kyowa Kirin
K838	Rabbit/human chimeric mAb	IgG4	DNP	Kyowa Kirin
K851	Humanized mAb	IgG1	DNP	Kyowa Kirin
K853	Humanized mAb	IgG4	DNP	Kyowa Kirin

投与媒体は 0.05 mg/mL の Polysorbate 80 を含む PBS を用いた。

### 2.1.2 動物実験

動物実験の計画は事前に協和キリン株式会社 動物実験委員会の審査を受け承認を得た。日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入した雌性の CD-1 マウス (購入時 6 週齢) を試験に使用した。CD-1 マウスは非近交系の系統であり、臨床で認められる ADA 産生の個体差を模倣できると考えて使用した。また抗原投与に伴う高い免疫応答も報告されている [68]。

マウスはステンレスケージにて 4~5 匹ごとの群飼育とした。水及び固形試料は自由摂取とした。入荷後、少なくとも 1 週間を馴化期間に設定した。

### 2.1.3 血漿中薬物濃度測定方法

マウス血漿中の抗体医薬濃度測定には Gyrolab xP workstation (Gyros Protein Technologies, Uppsala, Sweden) によるリガンド結合法を用いた。ビオチン標識した抗ヒト IgG サルポリクローナル抗体 (協和キリン) を固相化抗体に用いた。Alexa 647 標識した抗ヒト IgG サルポリクローナル抗体 (協和キリン) を検出抗体に用いた。検量線及び精度管理用の quality control (QC) 試料は REXXIP H (Gyros Protein Technologies) を用いて抗体医薬を希釈して調製した。マウス血漿試料は REXXIP H を用いて 30~1000 倍希釈した。

全ての試料は PCR プレートに各 well に添加し、microplate foils を用いて密封した。PCR プレート及び Bioaffy 200 CD (Gyros Protein Technologies) を Gyrolab xP workstation にセットし、Gyrolab Control software による制御のもとで自動測定を行った。Gyrolab xP workstation のニードル及び Bioaffy 200 CD 内のカラム洗浄には 0.05% Tween 20 を含む PBS を用いた。

### 2.1.4 ADA 測定方法

マウス血漿中の ADA 測定には電気化学発光によるリガンド結合法を用いた。遊離型の ADAs 及び抗体医薬と免疫複合体を形成した ADAs の総和であるトータル ADAs を測定するため、前処理として 10 µg/mL の抗体医薬を血漿試料に添加しインキュベーションさせ、免疫複合体を形成させた。前処理により形成させた免疫複合体をリガンド結合法により検出した。詳細は下記の記載に従った。

MSD Gold 96-well Streptavidin plate (Meso scale discovery, Rockville, MD, USA) の各ウェルを 1%Casein/PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。0.05% Tween 20 を含む PBS を用いて 3 回洗浄した後 (以降の洗浄は同様の操作とする)、ビオチン標識した抗ヒト IgG ヤギポリクローナル抗体 (協和キリン) をウェルに添加し、500 rpm の速度で振とうさせながら室温で約 1 時間固相化させた。洗浄後、前処理後試料をウェルに添加し、500 rpm の速度で振とうさせ

ながら室温で約 1 時間反応させた。洗浄後、ルテニウム標識した抗マウス IgG ウサギポリクローナル抗体（協和キリン）をウェルに添加し、500 rpm の速度で振とうさせながら室温で約 1 時間反応させた。洗浄後、read buffer (2×) をウェルに添加し、SECTOR Imager 2400 (Meso scale discovery)を用いて、電気化学発光強度を測定した。

#### 2.1.5 免疫複合体検出方法

マウス血漿中の抗体医薬と ADAs により形成される免疫複合体を、第 1 章で開発した BN-PAGE と LC-MS/MS を組み合わせた方法により検出した。マウス血漿試料は PBS を用いて 20 倍に希釈後、Native PAGE Sample Buffer (4×)を用いて希釈し、1.1.2 に示した方法に従い、BN-PAGE ゲルに添加し、電気泳動を実施した。BN-PAGE 後、各レーンの目的位置付近からレーン上端までを 1~2 mm の大きさのゲル片 16 個に切り出し、1.1.3 に示した方法に従い、In-gel digestion により処理した。各処理溶液について 1.1.4 に示した方法により LC-MS/MS で分析した。

#### 2.1.6 補体活性測定方法

マウス血漿中補体経路の活性化を評価するため、補体経路の最終生成物である C5b-9 複合体の生成量を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。測定には Classical Complement Pathway Assay (Hycult Biotech, Uden, Netherlands) を用いた。測定手順はメーカーの添付文書に従った。

#### 2.1.7 血漿中クレアチニン濃度測定方法

マウス血漿中のクレアチニン濃度測定には LC-MS を用いた。検量線はリン酸バッファーにクレアチニン標準物質（関東化学）を添加して調製した。内標準物質であるクレアチニン-D3 を含



むアセトニトリルを血漿試料と混合し、除タンパク処理後の上清を LC-MS 分析に供した。

液体クロマトグラフィー装置として LC-30AD（島津製作所, Kyoto, Japan）を使用した。質量分析装置として Q Exactive Plus（Thermo Fisher Scientific）を使用した。分析カラムとして CORTECS UPLC HILIC Column (1.6  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  150 mm)（Waters）を使用した。ガードカラムとして CORTECS UPLC HILIC Van Guard Pre-Column (130 Å, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  5 mm)（Waters）を使用した。

#### 2.1.8 血液学的検査

マウス血液を用いて ADVIA120（Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA）により下記の項目について測定した。

Item	Indication in the table	Method
Red blood cell count	RBC	FCM method
Hematocrit	Hematocrit	Calculated from MCV and RBC
Hemoglobin	Hemoglobin	Cyanmethemoglobin method
Mean corpuscular volume	MCV	FCM method
Mean corpuscular hemoglobin	MCH	Calculated from Hemoglobin and RBC
Mean corpuscular hemoglobin concentration	MCHC	Calculated from Hemoglobin and Hematocrit
Reticulocyte (percentages and counts)	Reticulocyte	FCM method
Platelet count	Platelets	FCM method
White blood cell count	WBC	FCM method
Hemogram (percentages and counts)	Hemogram	FCM method

#### 2.1.9 試験スケジュールと測定項目

本試験では ADAs による抗体医薬の薬物動態や安全性への影響を評価するため、まずマウスにおいて ADAs を産生させる必要がある。一般的に ADA 産生頻度は高用量よりも低用量、静脈内投与よりも皮下投与のほうが高い傾向がある[70]。本試験においても 1 週間に 1～2 回の頻度で

低用量（1 mg/kg）の抗体医薬を皮下投与して、ADA 産生を惹起した。免疫複合体を検出するためには、血漿中に高濃度の抗体医薬が存在する必要があることから、ADA 産生がある程度見込まれる 2～4 週間後に高用量（50 mg/kg）の抗体医薬を投与し、免疫複合体を検出した。ADAs による薬物動態への影響を評価するため、各投与日の投与前及び高用量投与後の血漿中薬物濃度を測定した。また ADAs による安全性への影響を評価するため、短期投与試験では補体活性の指標として C5b-9 複合体量を測定し、長期投与試験では腎機能障害の指標として血漿中クレアチニン濃度を測定した。また長期投与試験の最終採血時点において臨床検査を実施した。

#### 2.1.9.1 短期試験

7 日間の馴化後の 16 匹のマウスを無作為に 4 群に分けた（各群 4 匹）。

初回投与日を Day 0 とした。Days 0、4、7 に K806、K809 及び K838 を 1 mg/kg の用量でマウスに皮下投与した。Day 11 に K806、K809 及び K838 を 50 mg/kg の用量でマウスに皮下投与した。抗体の各投与日に媒体群に割り当てたマウスに 0.05 mg/mL Polysorbate 80 を含む PBS を皮下投与した。

Group	Test article on Days 0, 4, 7			Test article 2 on Day 11			Number of animal (Animal No.)
	Name	Dose (mg/kg)	Dosing volume (mL/kg)	Name	Dose (mg/kg)	Dosing volume (mL/kg)	
1	Vehicle	-	10	Vehicle	-	10	4 (S1-S4)
2	K806	1	10	K806	50	10	4 (S5-S8)
3	K809	1	10	K809	50	10	4 (S9-S12)
4	K838	1	10	K838	50	10	4 (S13-S16)

各投与日（Days 0、4、7、11）の投与前、Day 12、Day 14 及び Day 18 に尾静脈からヘパリン採血管を用いて採血した。血液試料は 4℃で 5 分間、10000×g の回転数で遠心し、上清を回収して血漿試料を得た。各試料を用いて下記の分析を実施した。

測定項目	測定対象群	時点
血漿中薬物濃度	Group 2, 3, 4	Day 4, 7, 11, 12, 14, 18
ADAs の量	Group 2, 3, 4	Day 0, 4, 7, 11, 14, 18
免疫複合体の大きさと量	Group 2, 3, 4	Day 12
補体活性	Group 1, 3, 4	Day 0, 11, 18

#### 2.1.9.2 長期試験

7 日間の馴化後の 16 匹のマウスを無作為に 4 群に分けた（各群 4 匹）。

初回投与日を Day 0 とした。Days 0、7、14、21 に K809、K851 及び K853 を 1 mg/kg の用量でマウスに皮下投与した。Day 28 に K809、K851 及び K853 を 50 mg/kg の用量でマウスに

皮下投与した。抗体の各投与日に媒体群に割り当てたマウスに 0.05 mg/mL Polysorbate 80 を含む PBS を皮下投与した。

Group	Test article on Days 0, 7, 14, 21			Test article 2 on Day 28			Number of animal (Animal No.)
	Name	Dose (mg/kg)	Dosing volume (mL/kg)	Name	Dose (mg/kg)	Dosing volume (mL/kg)	
1	Vehicle	-	10	Vehicle	-	10	4 (L1-L4)
2	K809	1	10	K809	50	10	4 (L5-L8)
3	K851	1	10	K851	50	10	4 (L9-L12)
4	K853	1	10	K853	50	10	4 (L13-L16)

各投与日 (Days 0、7、14、21、28) の投与前及び Day 28 の投与 4 時間後、6 日後 (Day 34)、8 日後 (Day 36) に尾静脈からヘパリン採血管を用いて採血した。血液試料は 4℃で 5 分間、10000×g の回転数で遠心し、上清を回収して血漿試料を得た。Day 36 では尾静脈採血後に心採血により血液試料を得た。

各試料を用いて下記の分析を実施した。臨床検査以外の項目は血漿試料、臨床検査は Day 36 で得た血液試料を用いた。

測定項目	測定対象群	時点
血漿中薬物濃度	Group 2, 3, 4	Day 7, 14, 21, 28 の投与前、 Day 28 の投与 4 時間後、Day 34, 36
ADAs の量	Group 2, 3, 4	Day 7, 14, 21, 28 の投与前、Day 34, 36
免疫複合体の大きさと量	Group 2, 3, 4	Day 28 の投与 4 時間後、Day 36
血漿中クレアチニン濃度	Group 1, 4	Day 0, 7, 14, 21, 28 の投与前、 Day 28 の投与 4 時間後、Day 34, 36
臨床検査	Group 1, 2, 3, 4	Day 36

## 2.2 実験結果

### 2.2.1 短期試験

#### 2.2.1.1 血漿中薬物濃度と ADA 産生

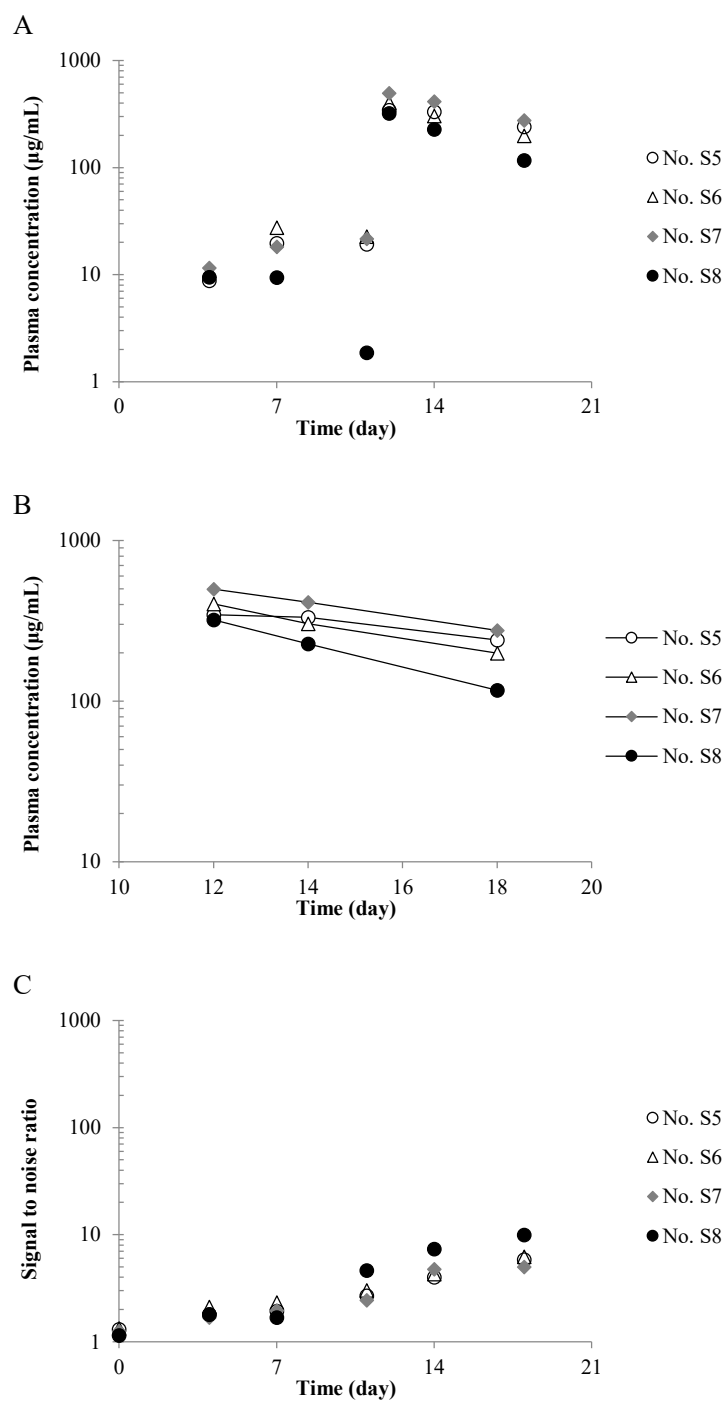
K806、K809 及び K838 を反復投与（1 mg/kg で 3 回、50 mg/kg で 1 回）したときの血漿中薬物濃度及び ADA シグナルを、それぞれ Fig. 7、Fig. 8 及び Fig. 9 に示す。K806、K809 及び K838 を 50 mg/kg 投与後の半減期を Table 4 に示す。

いずれの投与群においても初回投与後及び 2 回目投与後のトラフ濃度は、個体差なく概ね同じ血漿中薬物濃度であった。しかしながら、3 回目投与後のトラフ濃度は K806 投与群の Animal No. S8 において著しい低下が認められ（Fig. 7A）、その他の投与群においても低値を示す個体が認められた（Fig. 8A、Fig. 9A）。50 mg/kg 投与後の濃度推移から半減期を算出したところ、各抗体投与群で 7～11 日前後の良好な半減期を示した個体が認められた一方で、2 日前後の短半減期を示す個体も散見された（Table 4）。

ADA シグナルは各抗体投与群の全個体で経時的に増加したが、全体として増加の程度は緩やかであった。K809 投与群の Animal No. S12 及び K838 投与群の Animal No. S13 は、Day 14 前後で急激なシグナル増加が認められた（Fig. 8C、Fig. 9C）。特に Animal No. S12 は ADA シグナルが 100 を超えることから他の個体と比較して過剰な ADA 産生が起きたと考えられる。ADA シグナルの急激な増加が認められた個体についてはいずれも 2 日前後の短半減期を示しており、ADA 産生に伴う抗体医薬のクリアランス上昇が示唆された。

各抗体投与群の薬物動態と ADA 産生の関連を網羅的に検討するため、50 mg/kg 投与 6 日後の ADA シグナルと血漿中薬物濃度の相関関係を確認したところ、ADA シグナルが高いほど血漿中薬物濃度が低下する傾向が認められた（Fig. 10）。同様に ADA シグナルと 50 mg/kg 投与後の半減期についても相関関係を確認したところ、ADA シグナルが高いほど半減期が短くなる傾向が認められた（Fig. 11）。

約 2 週間と短期間で実施した試験において、ADA シグナルの上昇は限定的であったものの、ADA 産生による抗体医薬のクリアランス上昇が示唆された。



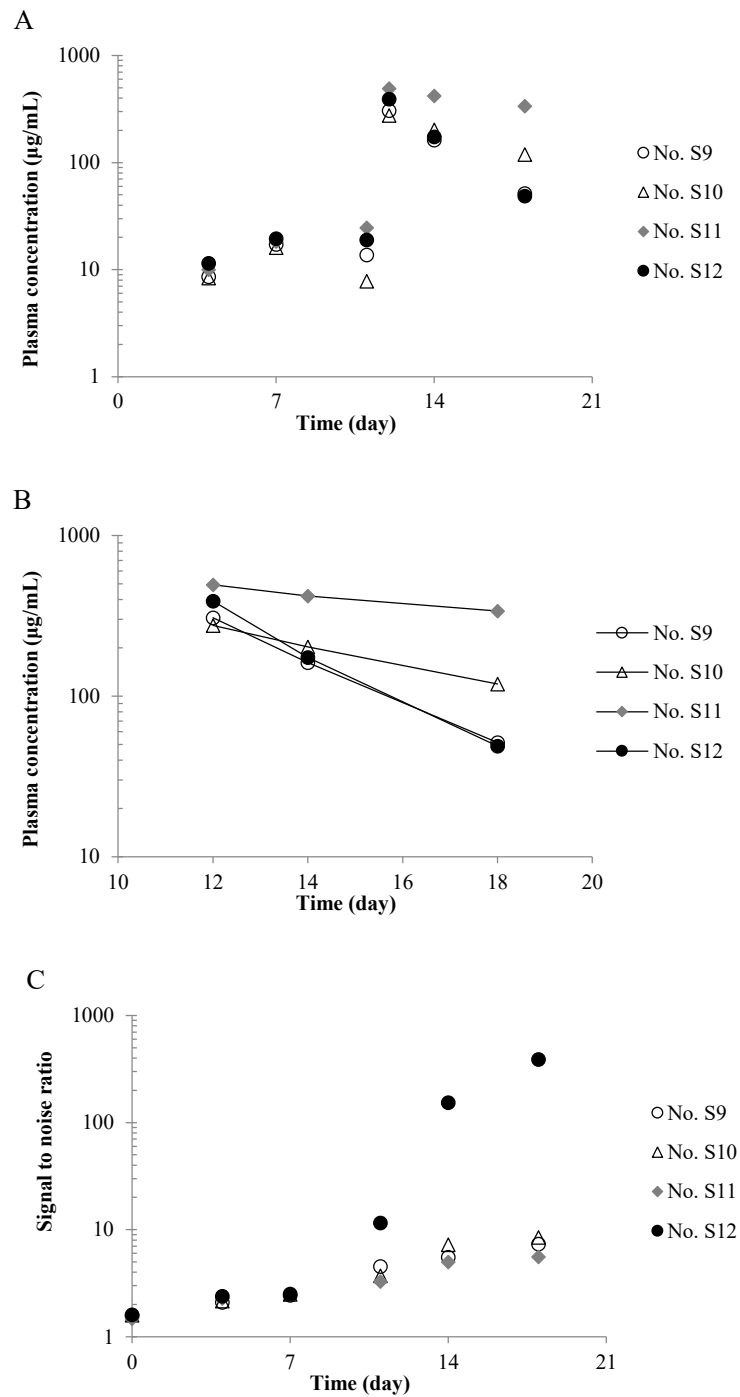
**Fig. 7.** Pharmacokinetics of K806 and ADA production against K806 in mice.

(A) Plasma concentrations of K806 during repeated subcutaneous administration of K806.

(B) Plasma concentration-time profiles of K806 after the last dose at 50 mg/kg. (C) The time

course of the ADA level (SN ratio) during repeated subcutaneous administration of K806.



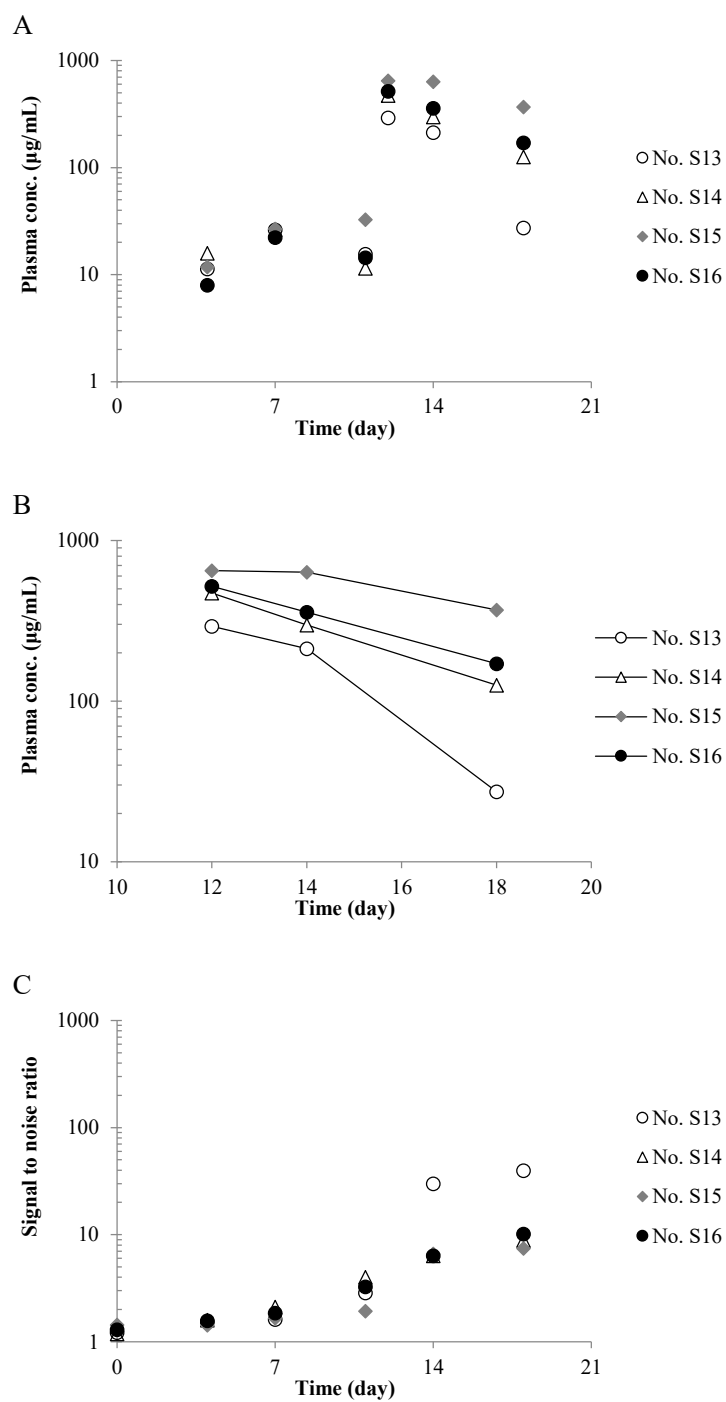


**Fig. 8.** Pharmacokinetics of K809 and ADA production against K809 in mice.

(A) Plasma concentrations of K809 during repeated subcutaneous administration of K809.

(B) Plasma concentration-time profiles of K809 after the last dose at 50 mg/kg. (C) The time

course of the ADA level (SN ratio) during repeated subcutaneous administration of K809.

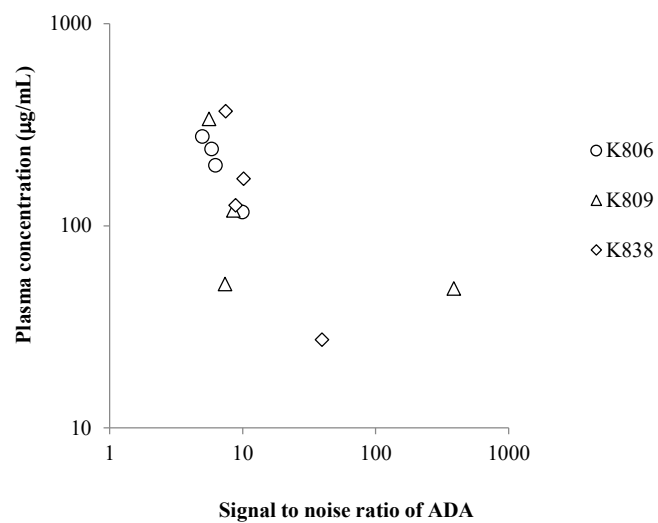


**Fig. 9.** Pharmacokinetics of K838 and ADA production against K838 in mice.

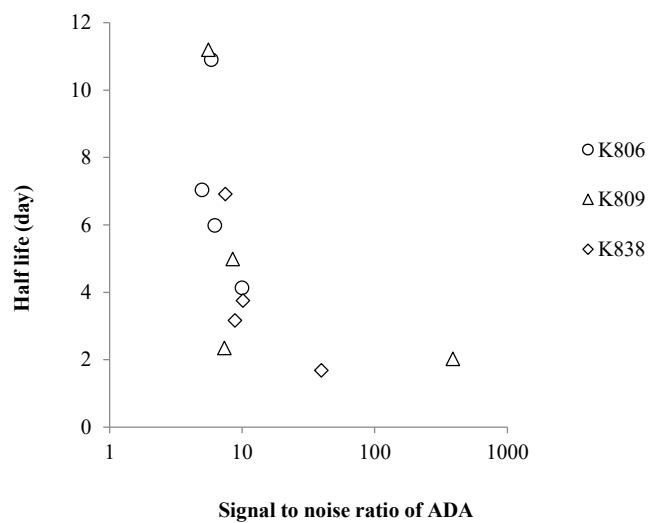
(A) Plasma concentrations of K838 during repeated subcutaneous administration of K838.

(B) Plasma concentration-time profiles of K838 after the last dose at 50 mg/kg. (C) The time

course of the ADA level (SN ratio) during repeated subcutaneous administration of K838.



**Fig. 10.** Relationship between drug concentration and signal to noise ratio of anti-drug antibody.



**Fig. 11.** Relationship between half-life and signal to noise ratio of anti-drug antibody.

**Table 4.** Half-lives of K806, K809, and K838 after the last dose at 50 mg/kg.

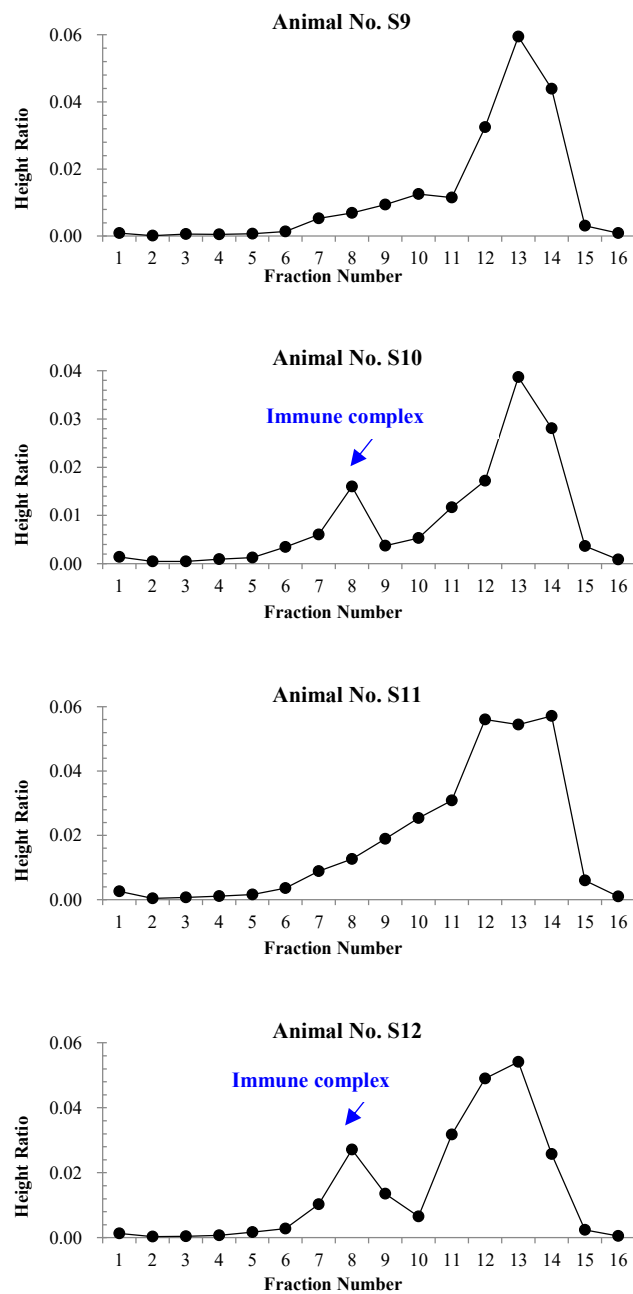
Test article	Animal Number	Half-life (day)
K806	S5	10.9
	S6	5.98
	S7	7.04
	S8	4.13
K809	S9	2.34
	S10	4.98
	S11	11.2
	S12	2.02
K838	S13	1.68
	S14	3.16
	S15	6.91
	S16	3.75

### 2.2.1.2 免疫複合体

K809 投与群及び K838 投与群の 50 mg/kg 投与 1 日後の血漿試料を用いて免疫複合体を測定した (Fig. 12、Fig. 13)。K806 投与群に関しては、K806 を BN-PAGE で泳動した際に高分子量の領域においても遊離型の K806 に由来するシグナルが認められ、免疫複合体の評価が難しいと考えられたため、評価対象から除外した (data not shown)。

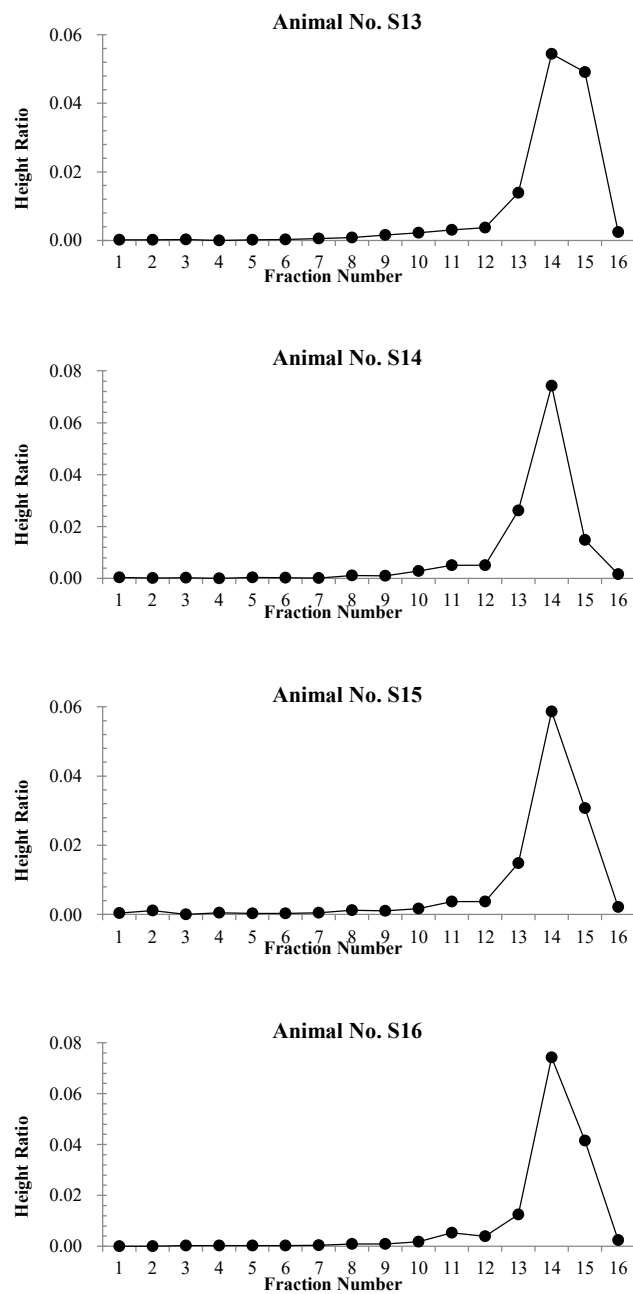
分析の結果、K809 投与群の Animal No. S10 と Animal No. S12 において、免疫複合体が検出された (Fig. 12)。いずれの個体においても、血漿中に存在する抗体医薬の一部が免疫複合体を形成しており、サイズに関しては小さな免疫複合体のみが検出された。K838 投与群においては、いずれの個体でも免疫複合体は検出されなかった (Fig. 13)。

分析対象とした 50 mg/kg 投与 1 日後はいずれの個体でも ADA シグナルが明確に上昇していないことから、ADA 産生量が低いため免疫複合体が形成していないものと考えられる。免疫複合体の作用を考察するためには、さらに ADA 産生を惹起する必要があると考えられた。



**Fig. 12.** IC detection in mouse plasma on Day 12 after repeated subcutaneous administration of K809 to mice.

The y-axis represents the peak height ratio of the signature peptide to internal standard. A lower fraction number indicates a higher molecular weight.



**Fig. 13.** IC detection in mouse plasma on Day 12 after repeated subcutaneous administration of K838 to mice.

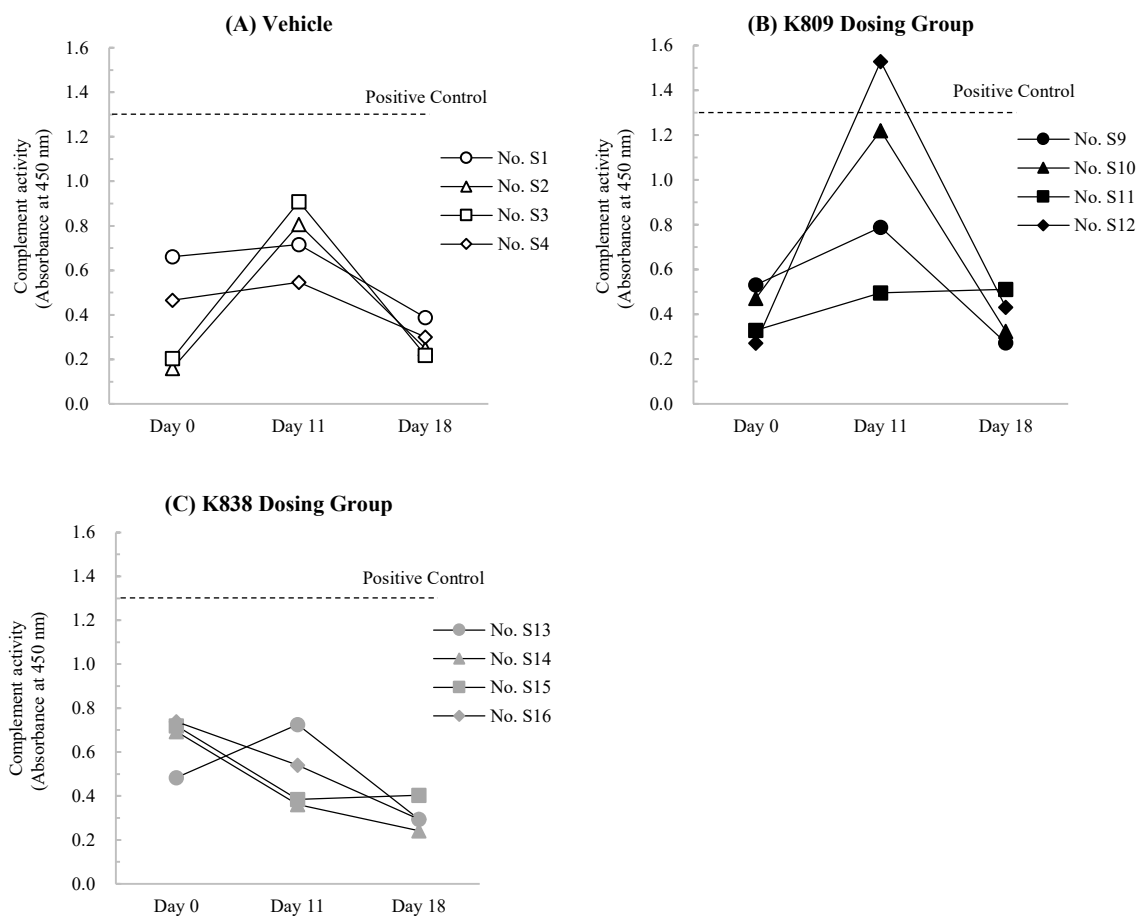
The y-axis represents the peak height ratio of the signature peptide to internal standard. A lower fraction number indicates a higher molecular weight.

### 2.2.1.3 補体活性

マウス血漿中補体経路の活性化を評価するため、補体経路の最終生成物である C5b-9 複合体の生成量を ELISA で測定した (Fig. 14)。顕著な ADA 産生を示した個体が含まれる K809 投与群及び K838 投与群の全個体を対象に Day 0、Day 11、Day 18 を測定した。またネガティブコントロールとして媒体群を測定した。

K809 投与群の Animal No. S10 及び Animal No. S12 の Day 11 において、陽性対照と同等の吸光度が観察され、一過性の C5b-9 複合体量の上昇が認められた (Fig. 14B)。その他の個体の吸光度は Day 0 で測定したベースラインの吸光度である 0.2~0.8 の範囲であり、陽性対照の吸光度と比較して低値であった。C5b-9 複合体量の上昇が認められた 2 個体は免疫複合体が検出されており (Fig. 12)、免疫複合体の形成による補体経路活性化の結果、C5b-9 複合体量が増加したと考えられる。免疫複合体は血管内皮や組織に沈着して III 型アレルギーを誘発することが知られており、本試験においても免疫複合体の曝露に伴い、同様の炎症反応が起きたと推察される。





**Fig. 14.** Complement pathway activity during repeated subcutaneous administration of K809 and K838 to mice.

The dashed line represents the signal of the positive control in the kit.

## 2.2.2 長期試験

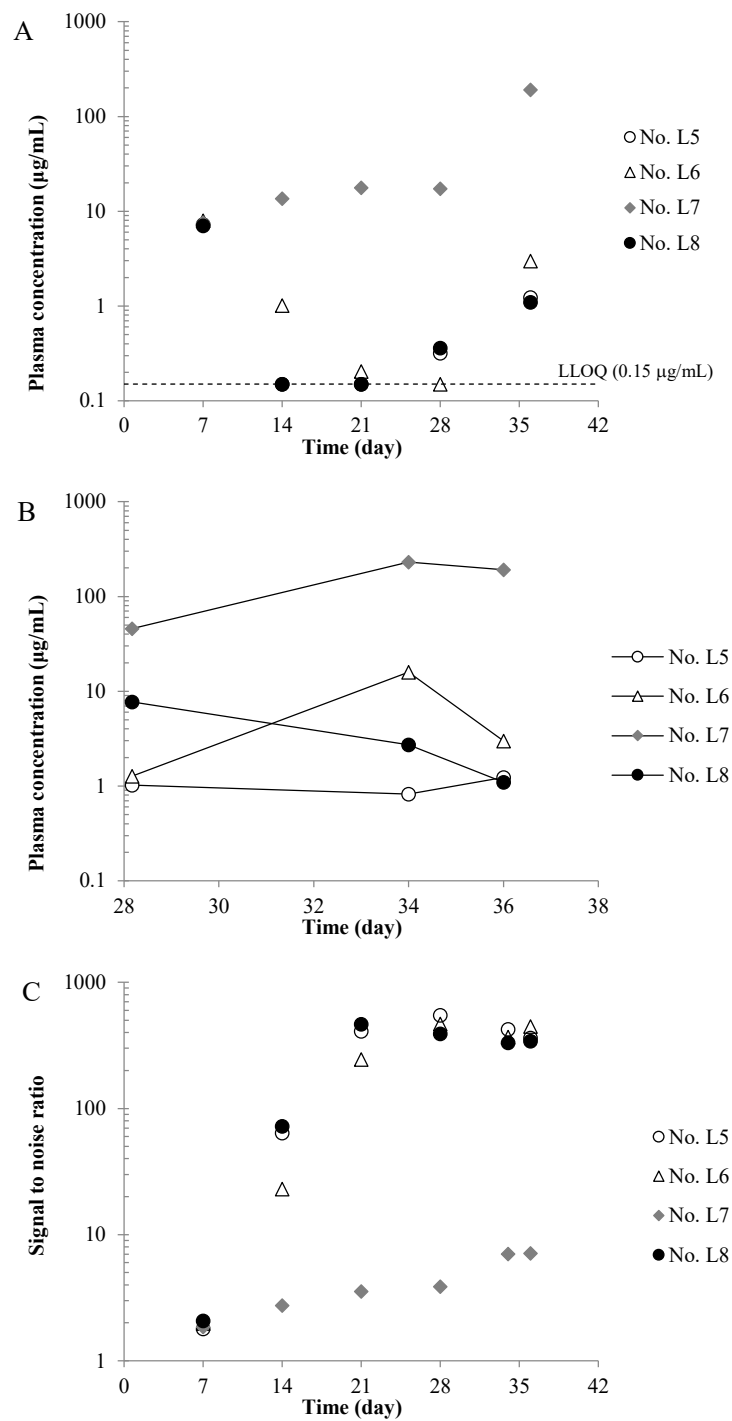
短期試験では ADA 産生頻度や産生量が不十分であり、免疫複合体の形成も限定的であったため、その作用を十分に評価できなかった。ADA 産生が十分な条件で免疫複合体の作用を評価するため、低用量投与条件として 1 mg/kg の週 1 回反復投与を 1 カ月間に設定して ADA 産生を誘導できる長期試験を実施した。

### 2.2.2.1 血漿中薬物濃度と ADA 産生

K809、K851 及び K853 を反復投与（1 mg/kg で 4 回、50 mg/kg で 1 回）したときの血漿中薬物濃度及び ADA シグナルをそれぞれ Fig. 15、Fig. 16 及び Fig. 17 に示す。

K809 を 1 mg/kg で反復投与したときの Day 7 における血漿中薬物濃度（初回投与後のトラフ濃度）は、個体差なく概ね同じ値であった。2 回目投与以降のトラフ濃度は Animal No. L7 を除いた 3 例において著しく低下した（Fig. 15A）。50 mg/kg 投与後の薬物濃度推移も Animal No. L7 を除いた 3 例は著しく低かった（Fig. 15B）。

Animal No. L7 を除く 3 個体では Day 14 から急激な ADA 産生が認められた（Fig. 15C）。ADA シグナルは Day 21 以降で概ね頭打ちになり、一定の高値を持続した。ADA 産生個体では血漿中薬物濃度の低下が認められており、ADAs による K809 のクリアランス上昇が示唆された。



**Fig. 15.** Pharmacokinetics of K809 and ADA production against K809 in mice.

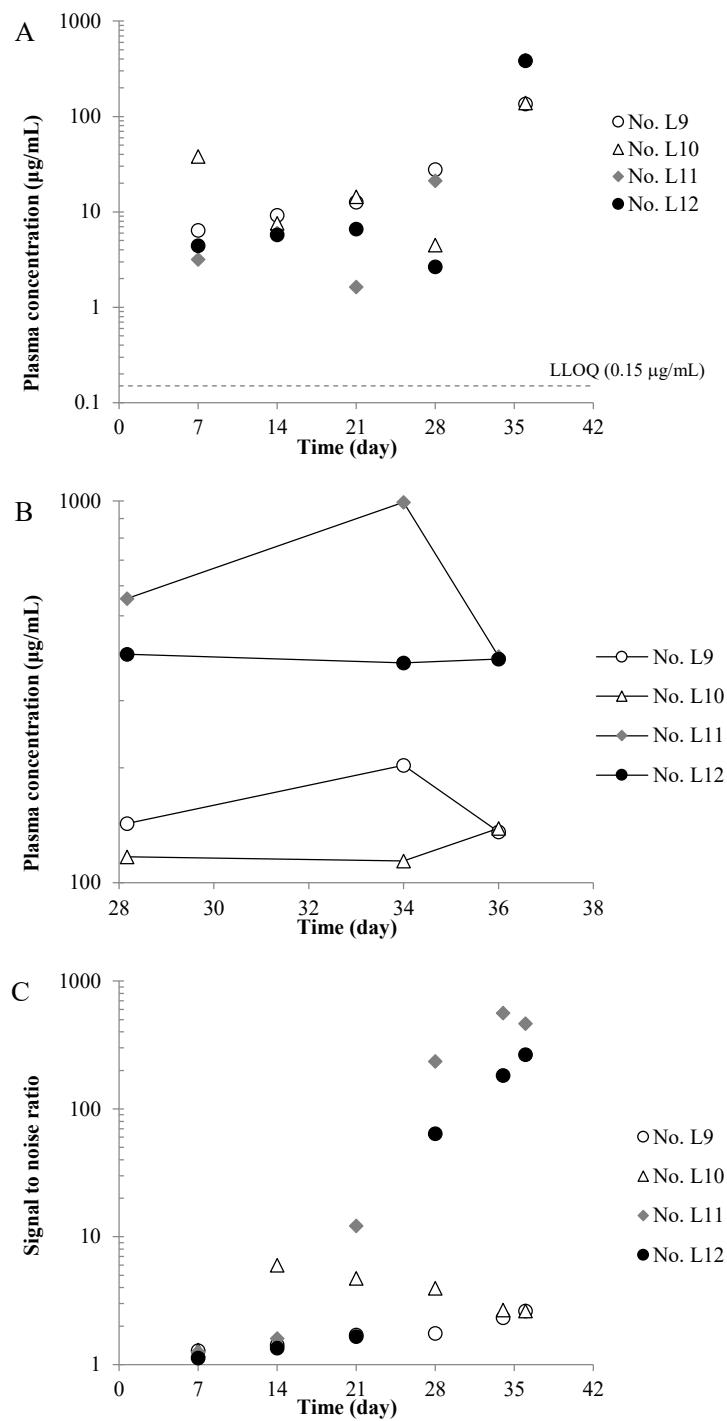
(A) Trough concentrations of K809 during repeated subcutaneous administration of K809.

(B) Plasma concentration-time profiles of K809 after the last dose at 50 mg/kg. (C) The time

course of the ADA level (SN ratio) during repeated subcutaneous administration of K809.

K851 を 1 mg/kg で反復投与したときの各トラフ濃度は、初回投与時から個体差が認められた (Fig. 16A)。2 回目以降も継続的に個体差が散見されたが、特定個体の顕著な濃度低下は認められなかった。50 mg/kg 投与後の薬物濃度は Animal No. L9 と Animal No. L10 において低値であった (Fig. 16B)。

Animal No. L11 と Animal No. L12 において、Day28 から急激な ADA 産生が認められた (Fig. 16C)。当該 2 個体は ADAs が高値にもかかわらず、ADA 産生の低い Animal No. L9 と Animal No. L10 に比べて 50 mg/kg 投与後の薬物濃度は高値を示した。他の投与群において考察されている ADA 作用による抗体医薬のクリアランス上昇とは異なる結果であり、ADA 存在下でも血漿中薬物濃度が維持される逆の結果となった。



**Fig. 16.** Pharmacokinetics of K851 and ADA production against K851 in mice.

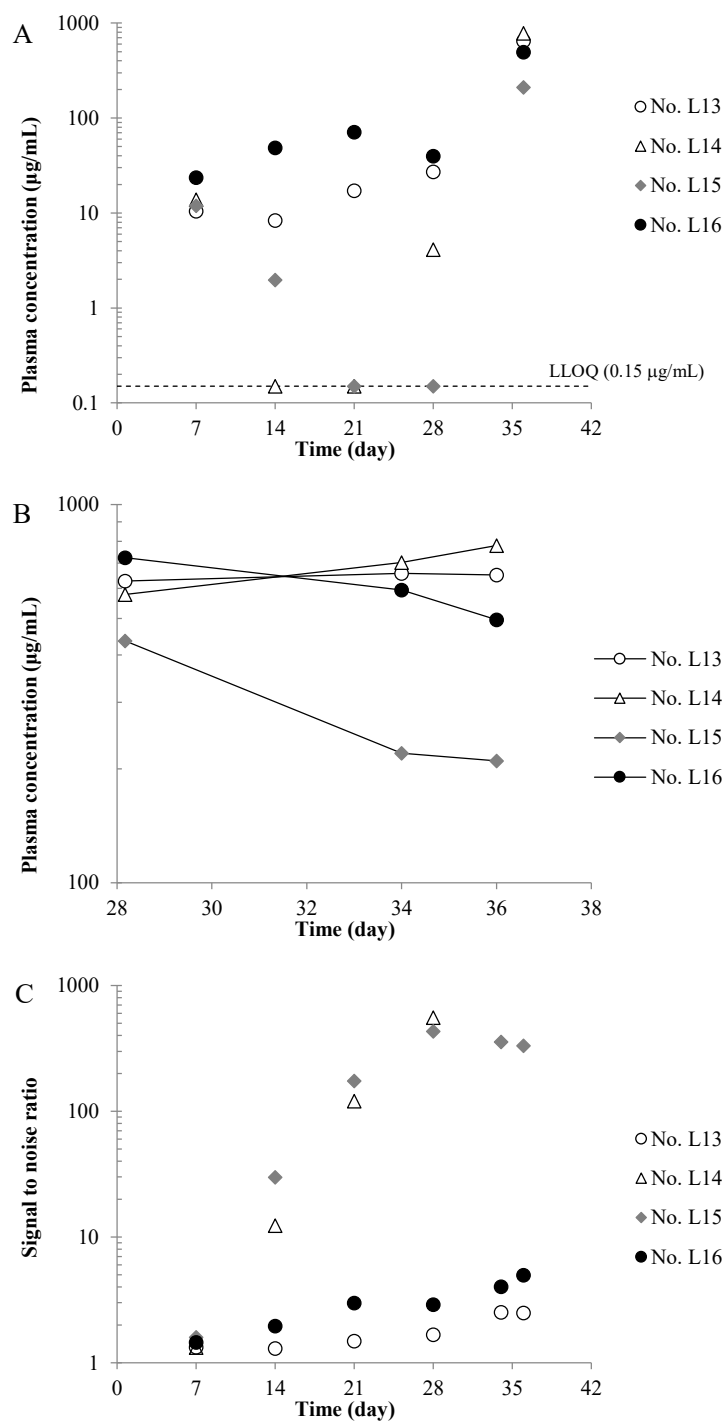
(A) Trough concentrations of K851 during repeated subcutaneous administration of K851.

(B) Plasma concentration-time profiles of K851 after the last dose at 50 mg/kg. (C) The time

course of the ADA level (SN ratio) during repeated subcutaneous administration of K851.

K853 を 1 mg/kg で反復投与したときの Day 7 における血漿中薬物濃度（初回投与後のトラフ濃度）は、個体差なく概ね同じ値であった（Fig. 17A）。2 回目投与以降のトラフ濃度は Animal No. L14 及び Animal No. L15 において著しく低下した。両個体ともに Day 21 では定量下限未満になったが、Animal No. L14 のみ Day 28 で再び濃度が検出された。50 mg/kg 投与後の薬物濃度は Animal No. L15 のみ低値であった（Fig. 17B）。

Animal No. L14 と Animal No. L15 において、Day 14 から急激な ADA 産生が認められ、Day 28 以降でおおむね頭打ちになり一定の高値を持続した（Fig. 17C）。当該 2 個体は ADA 産生が高い点で共通しているものの、50 mg/kg 投与後の薬物濃度に関して Animal No. L14 では高値、Animal No. L15 では低値を示しており、ADAs の作用が異なることが示唆された。



**Fig. 17.** Pharmacokinetics of K853 and ADA production against K853 in mice.

(A) Trough concentrations of K853 during repeated subcutaneous administration of K853.

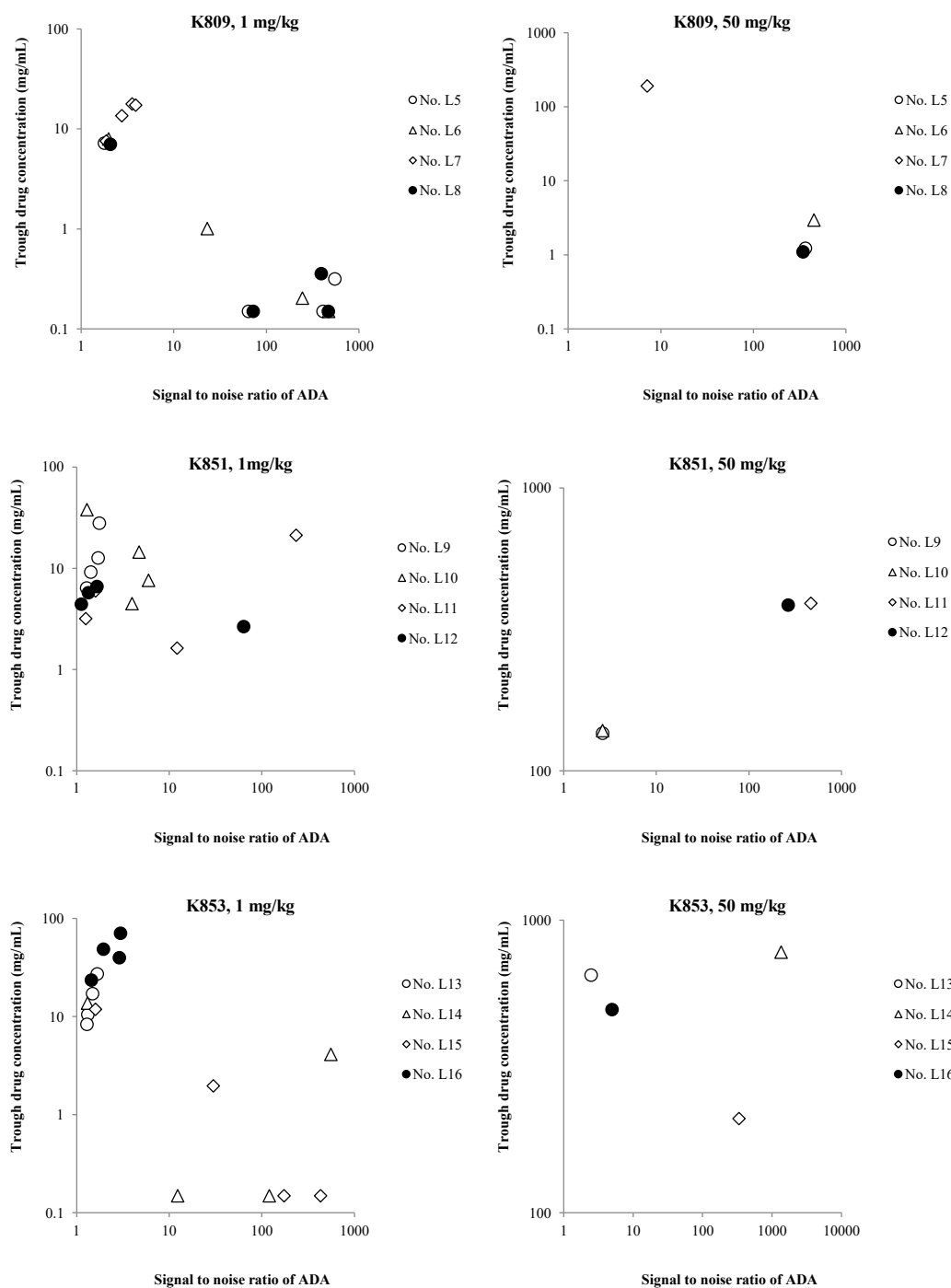
(B) Plasma concentration-time profiles of K853 after the last dose at 50 mg/kg. (C) The time

course of the ADA level (SN ratio) during repeated subcutaneous administration of K853.

各抗体投与群の薬物動態と ADA 産生の関連を網羅的に検討するため、1 mg/kg 投与後の ADA シグナルと血漿中薬物濃度の相関関係を確認した (Fig. 18)。全体としては ADA シグナルが高いほど血漿中薬物濃度が低下する傾向が認められたが、試験後半の ADA シグナルが高い領域において、血漿中薬物濃度が高い個体が散見された。同様に ADA シグナルと 50 mg/kg 投与後の血漿中薬物濃度に関しても相関関係を確認したところ、ADA シグナルが高値にもかかわらず血漿中薬物濃度が高い個体が散見された。また ADA 陽性かつ血漿中薬物濃度が維持されたのは、ヒト化抗体を投与した群であった。

以上より、抗体 1 mg/kg の週 1 回反復投与を 1 カ月継続することにより、各群ともに半数以上の個体で急激な ADA 産生が認められた。陽性個体の ADA シグナルは 100 を超えており、薬物動態への影響も認められたことから、血漿中薬物濃度に相当する量の ADAs が産生されたと考えられた。ADAs による薬物動態や安全性への影響を評価するには十分な ADA 産生量と陽性個体数であると判断できた。ADAs による薬物動態への影響としては、従来から報告されている ADA 産生に伴う血漿中薬物濃度の低下が認められた一方で、Day 28 前後から高い ADA 産生が認められるにもかかわらず、薬物濃度が高値を維持する個体が散見された。1 カ月を超える長期試験では、試験期間中に ADAs の性質が変化する場合があることが示唆された。





### 2.2.2.2 免疫複合体

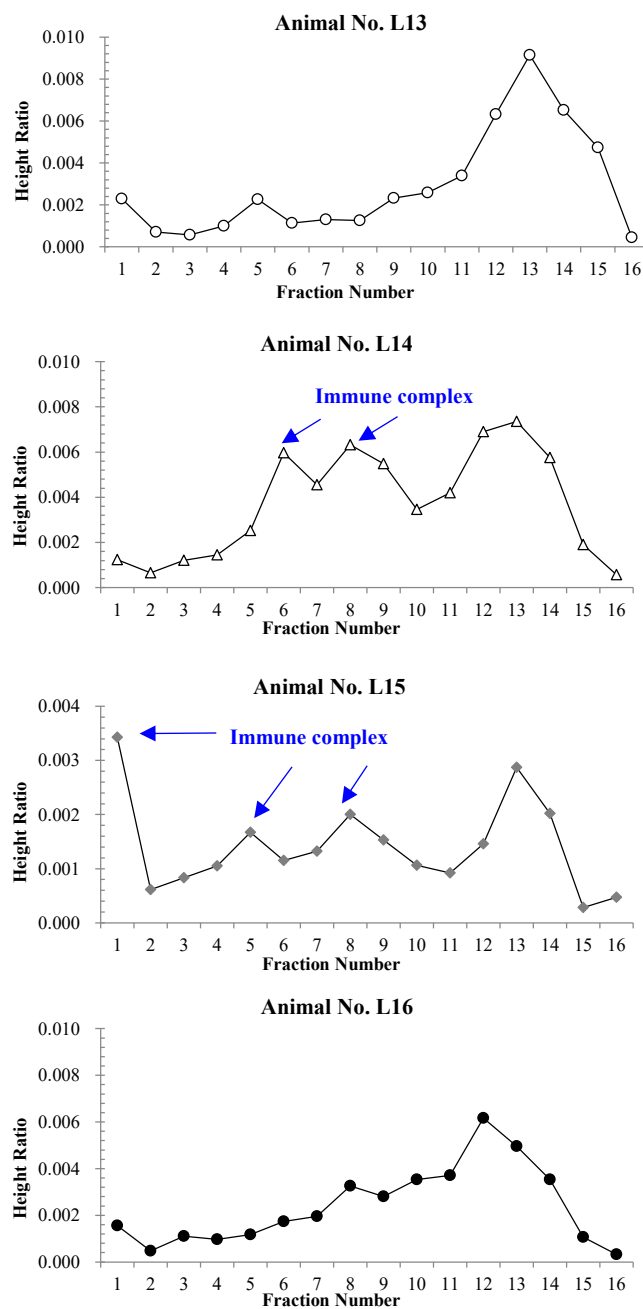
抗体を 50 mg/kg の用量で投与した 4 時間後 (Day 28) 及び 8 日後 (Day 36) の血漿試料を用いて免疫複合体を測定した。3 種の抗体投与群の中で、K853 投与群に関して Day 28 の結果を Fig. 19、Day 36 の結果を Fig. 20 に示す。なお K809 投与群において顕著な ADA 産生を示した個体は血漿中薬物濃度が低かったため全フラクションでシグナルが検出されなかった (data not shown)。K851 投与群に関しては、K851 を BN-PAGE で泳動した際に高分子量の領域においても遊離型の K851 に由来するシグナルが認められ、免疫複合体の評価が難しいと考えられたため、評価対象から除外した (data not shown)。

K853 を 50 mg/kg の用量で投与した 4 時間後 (Day 28) に採取した血漿試料を用いて免疫複合体を分析したところ、Animal No. L14 と Animal No. L15 において、明確に免疫複合体が検出された (Fig. 19)。Animal No. L14 ではフラクション 6 及びフラクション 8 前後に分子量の異なる 2 種の免疫複合体が確認され、小さな免疫複合体の形成が示唆された。Animal No. L15 ではフラクション 5 及びフラクション 8 前後に 2 種の免疫複合体が確認されたことに加えて、最も分子量が大きいフラクション 1 に免疫複合体由来のシグナルが検出された。フラクション 1 には BN-PAGE による電気泳動でゲルをほとんど移動していない分子量の大きなタンパク質が存在することから、大きな免疫複合体の形成が示唆される。またこのフラクション 1 のシグナルが最も高いことから、Animal No. L15 では主に大きな免疫複合体が形成していたと考えられた。

K853 を 50 mg/kg の用量で投与した 8 日後 (Day 36) に採取した血漿試料を用いて免疫複合体を分析したところ、Animal No. L14 では投与 4 時間後と同様のフラクションに免疫複合体が確認されたため (Fig. 20)、本個体では投与直後から 8 日目まで一貫して小さなサイズの免疫複合体が形成していたことが示唆された。Animal No. L15 は投与 8 日後において血漿中薬物濃度が低かったため全フラクションでシグナルが検出されなかった。

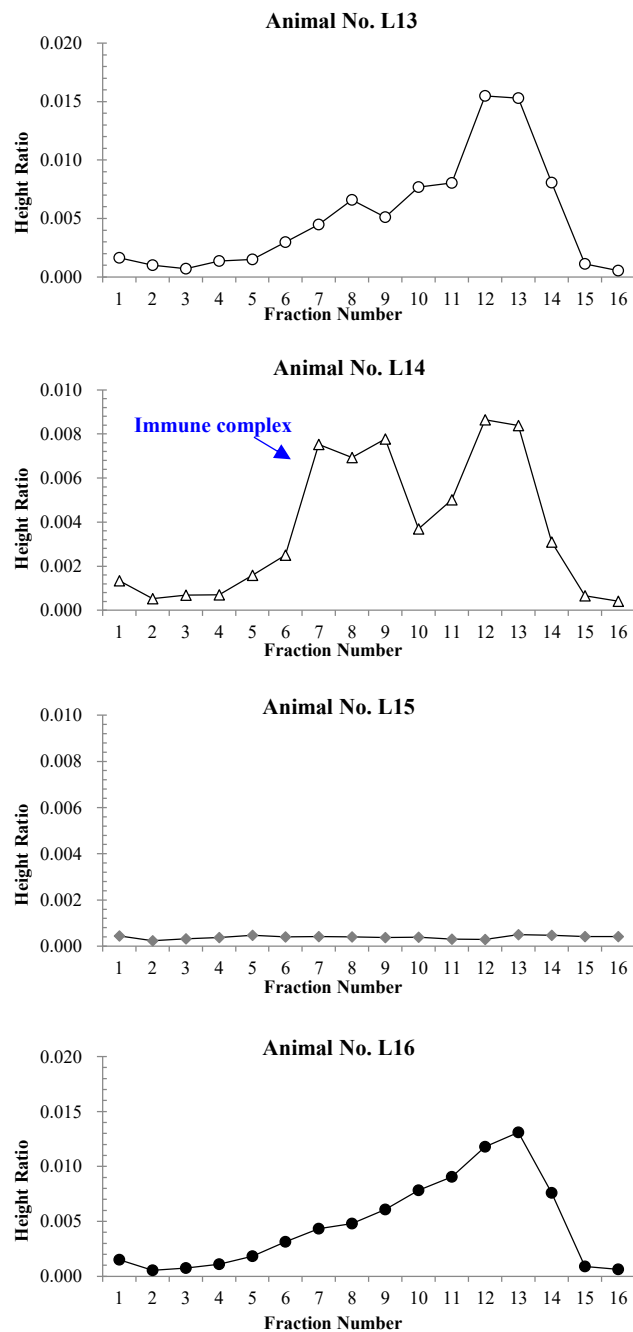
小さな免疫複合体のみが検出された Animal No. L14 では、50 mg/kg 投与後の血漿中薬物濃度

推移は ADA 陰性個体と同等であった。一方で、大きな免疫複合体が検出された Animal No. L15 では、顕著な血漿中薬物濃度の低下が認められた (Fig. 17B)。免疫複合体はサイズが大きくなるほど、Fc 受容体などを介した貪食細胞への取り込みが増加し、クリアランスが大きくなることが推察されることから[39]、2 個体で認められた ADAs の薬物動態への影響の違いは、免疫複合体の大きさの違いに起因することが示唆された。



**Fig. 19.** IC detection in mouse plasma on Day 28 after repeated subcutaneous administration of K853 to mice.

The y-axis represents the peak height ratio of the signature peptide to internal standard. A lower fraction number indicates a higher molecular weight.



**Fig. 20.** IC detection in mouse plasma on Day 36 after repeated subcutaneous administration of K853 to mice.

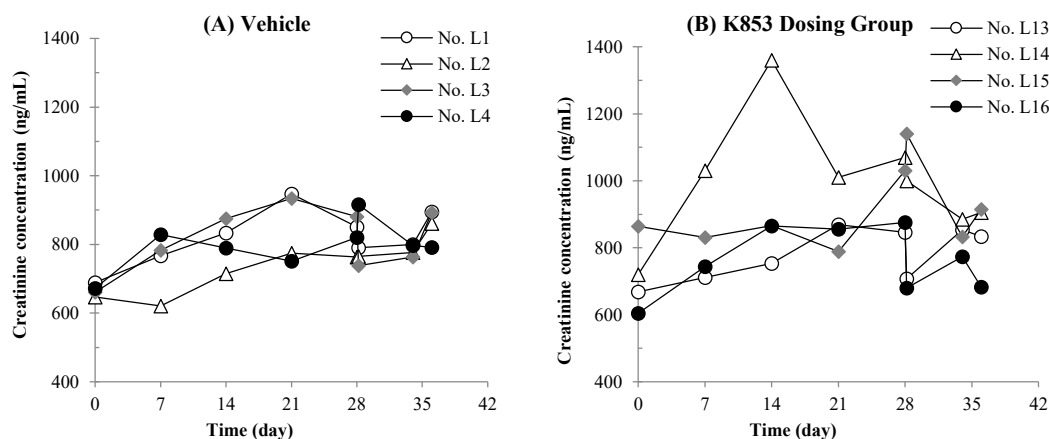
The y-axis represents the peak height ratio of the signature peptide to internal standard. A lower fraction number indicates a higher molecular weight.

### 2.2.2.3 血漿中クレアチニン濃度

ADAs の腎臓への影響を評価するため、腎機能の指標である血漿中クレアチニン濃度を LC-MS を用いて測定した (Fig. 21)。測定対象群は K853 投与群と媒体群とした。

K853 投与群の Animal No. L14 と Animal No. L15 において一過性のクレアチニン濃度上昇が認められた (Fig. 21B)。クレアチニン濃度のピークは、Animal No. L14 は Day 14 前後、Animal No. L15 は Day 28 の 50 mg/kg 投与 4 時間後であった。K853 投与群のその他の個体及び媒体投与群の全個体では、クレアチニン濃度が明確に上昇した個体は認められなかった。

Animal No. L14 と Animal No. L15 はともに免疫複合体が検出された個体であり、Animal No. L15 では、クレアチニン濃度のピーク時点 (Day 28) において大きな免疫複合体が検出された。Animal No. L14 では、クレアチニン濃度のピーク時点 (Day 14) では血漿中薬物濃度が定量下限以下であり、免疫複合体の評価ができなかった。



**Fig. 21.** The creatinine concentration in mouse plasma during and after repeated subcutaneous administration of K853.

An LC-MS/MS-based assay was used to determine the creatinine concentration during repeated subcutaneous administration of vehicle (PBST) (A) or K853 (B).

#### 2.2.2.4 血液学的検査

ADAs の血液学的検査の値に対する影響を評価するため、全群について血液学的検査を実施した (Table 5)。その結果、抗体投与群の好酸球が高値を示す傾向が確認された。また明確ではないものの、ADA 陽性個体において高値を示す傾向が確認された。TNF- $\alpha$ に対する抗体医薬において ADA 産生に伴う好酸球上昇を示唆する報告もあり[71]、本試験で認められた好酸球上昇は ADAs による二次的な作用の可能性が示唆された。その他の検査値に関しては、媒体群と抗体投与群において顕著な差は認められなかった。

**Table 5.** Hematological examination on Day 36 after repeated subcutaneous administration of vehicle or anti-DNP antibodies to mice

<b>Animal Number</b>	<b>RBC (<math>\times 10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	<b>Hematocrit (%)</b>	<b>MCV (fL)</b>	<b>MCH (pg)</b>	<b>MCHC (g/dL)</b>	<b>Platelets (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>
L1	8.25	12.2	35.2	42.7	14.8	34.7	1018
L2	7.58	11.6	33.8	44.6	15.3	34.3	1040
L3	8.16	11.9	36.3	44.5	14.6	32.8	568
L4	7.47	11.6	34.3	45.9	15.5	33.8	1060
L5	8.00	12.7	37.8	47.3	15.9	33.6	1116
L6	8.07	11.6	35.7	44.2	14.4	32.5	1178
L7	7.82	12.6	36.8	47.1	16.1	34.2	1249
L8	8.07	12.0	36.1	44.7	14.9	33.2	1135
L9	7.77	12.4	36.2	46.6	16.0	34.3	1196
L10	7.40	11.1	33.4	45.1	15.0	33.2	1075
L11	7.71	11.4	33.6	43.6	14.8	33.9	1007
L12	7.49	10.9	32.6	43.5	14.6	33.4	1119
L13	7.36	11.4	33.3	45.2	15.5	34.2	1068
L14	7.20	11.1	32.5	45.1	15.4	34.2	1045
L15	7.35	11.6	33.8	46.0	15.8	34.3	740
L16	7.98	11.4	34.4	43.1	14.3	33.1	1187

<b>Animal Number</b>	<b>PDW (fL)</b>	<b>MPV (fL)</b>	<b>PCT (%)</b>	<b>NRBC (%)</b>	<b>NRBC (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Reticulocytes (<math>\times 10^9/\text{L}</math>)</b>	<b>Reticulocytes (%)</b>	<b>IRF (pg)</b>
L1	7.2	7.0	0.69	0.7	0.01	2.68	221.1	61.4
L2	6.5	6.8	0.67	0.7	0.01	3.38	256.2	57.5
L3	7.6	7.5	0.28	0.0	0.00	1.44	117.5	44.5
L4	6.4	6.8	0.78	0.3	0.01	5.10	381.0	67.6
L5	6.2	6.7	0.81	0.7	0.03	7.34	587.2	62.4
L6	7.1	7.3	0.59	0.7	0.03	6.26	505.2	63.8
L7	6.1	6.4	0.76	0.2	0.01	2.36	184.6	42.7
L8	6.7	7.2	0.89	0.6	0.02	2.88	232.4	55.6
L9	6.8	7.1	0.75	1.0	0.01	5.97	463.9	60.0
L10	6.0	6.5	0.59	0.0	0.00	3.26	241.2	63.0
L11	6.5	7.0	0.67	0.3	0.02	2.59	199.7	55.9
L12	6.2	6.8	0.66	0.0	0.00	4.60	344.5	57.5
L13	6.3	6.8	0.64	0.7	0.02	4.32	318.0	64.7
L14	5.8	6.5	0.58	0.9	0.03	4.16	299.5	61.0
L15	7.3	7.5	0.60	0.7	0.02	5.78	424.8	60.2
L16	6.5	6.7	0.71	0.4	0.01	4.34	346.3	58.5



<b>Animal Number</b>	<b>WBC (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Neutrophils (%)</b>	<b>Lymphocytes (%)</b>	<b>Monocytes (%)</b>	<b>Eosinophils (%)</b>	<b>Basophils (%)</b>
L1	1.34	23.1	70.9	3.0	3.0	0.0
L2	1.41	23.5	72.3	1.4	2.8	0.0
L3	3.62	7.1	86.5	3.6	2.8	0.0
L4	3.09	10.0	86.1	1.6	2.3	0.0
L5	4.14	9.1	74.9	2.2	13.8	0.0
L6	4.17	6.5	83.5	2.6	7.4	0.0
L7	4.81	8.9	79.2	2.3	9.6	0.0
L8	3.51	12.9	81.2	1.1	4.8	0.0
L9	1.05	25.6	64.8	2.9	6.7	0.0
L10	2.07	19.9	76.3	1.4	2.4	0.0
L11	6.99	4.4	81.0	1.3	13.3	0.0
L12	1.53	14.4	83.0	1.3	1.3	0.0
L13	2.74	20.7	74.5	2.6	2.2	0.0
L14	3.28	18.0	76.2	1.5	4.3	0.0
L15	3.07	17.9	64.2	8.8	9.1	0.0
L16	2.79	8.9	86.4	1.1	3.6	0.0

<b>Animal Number</b>	<b>Neutrophils (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Lymphocytes (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Monocytes (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Eosinophils (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Basophils (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>
L1	0.31	0.95	0.04	0.04	0.00
L2	0.33	1.02	0.02	0.04	0.00
L3	0.26	3.13	0.13	0.10	0.00
L4	0.31	2.66	0.05	0.07	0.00
L5	0.38	3.10	0.09	0.57	0.00
L6	0.27	3.48	0.11	0.31	0.00
L7	0.43	3.81	0.11	0.46	0.00
L8	0.45	2.85	0.04	0.17	0.00
L9	0.27	0.68	0.03	0.07	0.00
L10	0.41	1.58	0.03	0.05	0.00
L11	0.31	5.66	0.09	0.93	0.00
L12	0.22	1.27	0.02	0.02	0.00
L13	0.57	2.04	0.07	0.06	0.00
L14	0.59	2.50	0.05	0.14	0.00
L15	0.55	1.97	0.27	0.28	0.00
L16	0.25	2.41	0.03	0.10	0.00

## 2.3 考察

本章では ADAs による抗体医薬の薬物動態や安全性への影響を評価するため、マウスにヒト抗体を投与して ADA 産生下における血中薬物濃度や安全性に関するパラメーターを分析した。ADA 作用を評価しやすくするため、生体内に抗原がなく薬理作用を持たない DNP に対するヒト抗体をマウスに投与した。免疫誘導が起きやすい投与方法として低用量の反復皮下投与により ADA 産生を惹起させた後、高用量投与による評価を実施した。試験期間の異なる 2 つの試験により、ADAs の短期的な影響と長期的な影響を考察した。

低用量の抗体を反復皮下投与することにより、すべての個体で ADA シグナルが上昇した。しかしながら、短期試験では全体としてシグナルの上昇が限定的であり、初回投与から 2 週間以降において一部の個体のみで顕著な ADA 産生が認められた。一方で ADA 産生を惹起させる期間を 1 カ月に延長した長期試験では顕著な ADA 産生を示す個体が散見された。本試験系においては、試験期間が 2 週間を超える時点から抗体医薬の反復投与に伴う過剰な ADA 産生のリスクが高くなることが示唆された。長期投与試験においては、ADA シグナルが上昇後、低下に転じた個体も認められており、試験期間の途中で ADA 産生量が低下する場合があることが示唆された。

ADA 産生により薬物動態には明確な影響が認められた。特に短期試験においては例外なく ADA 陽性個体において血漿中薬物濃度の低下が認められた。長期投与試験では、ADA 産生による血漿中薬物濃度の低下が概ね認められているものの、ADA 陽性個体において濃度維持が認められる個体も散見され、長期投与により ADAs の質が変化した可能性が示唆された。特に興味深かったのは長期投与試験における Animal No. L14 の血漿中薬物濃度の経時的変化であった。当該個体は Day 14 以降、一旦は濃度低下が認められたが、Day 28 以降で回復し、以降は高濃度を維持した (Fig. 17A)。初回投与から概ね 1 カ月が経過した時点で ADAs の質が変化したことが示唆される事例であった。ADAs の産生過程は通常の免疫反応と同様に、当初は IgM が惹起され、数週間が経過すると IgG へのクラススイッチが起き、親和性成熟の過程を経て、選択的な

ADAs のみが血中に存在するものと考えられる[72–74]。今回マウスで認められた 1 カ月前後における ADAs の質の変化も ADAs の成熟過程で性質が変化したものと考えられる。

K853 投与群の ADA 陽性と判定された 2 個体において、Animal No. L14 は小さな免疫複合体のみが検出され血漿中薬物濃度が維持されており、一方 Animal No. L15 は大きな免疫複合体が検出され血漿中薬物濃度の低下が認められた。大きな免疫複合体は多数の Fc を含むことから Fc 受容体に対する結合性が増強され、マクロファージなどの貪食細胞への取り込みが速くなることが報告されている[39]。本研究で認められた Animal No. L15 の濃度低下も大きな免疫複合体形成による貪食細胞への取り込み促進が示唆される。50 mg/kg を投与した場合、投与直後の血漿中薬物濃度としては 1 mg/mL 前後と想定される。そのような高い血漿中薬物濃度にも関わらず濃度低下が認められており、血中に存在する抗体医薬の半分以上が ADAs と結合していることから、ADAs が相当量産生されていることが示された。一般的な非臨床試験でも高用量の試験が行われるため、ADA 産生による影響は無視できないことが予想される。

ADAs の腎機能への影響を評価するため、K853 投与群のクレアチニン濃度を測定した結果、ADA 陽性個体である Animal No. L14 と Animal No. L15 で一過性の上昇が認められた。Animal No. L15 は Day 28 においてクレアチニン濃度のピークが認められており、大きな免疫複合体が検出された時点と一致した。Animal No. L14 は Day 14 においてクレアチニン濃度のピークが認められているが、同時点では免疫複合体の分析を実施していなかった。血漿中薬物濃度のデータから免疫複合体のサイズを考察すると、Day 14 では濃度低下が認められていることから大きな免疫複合体の形成が推測される。Day 28 時点では小さな免疫複合体のみが認められ、クレアチニン濃度も低下している。以上を合わせて考察すると、免疫複合体の中でも大きな複合体が腎機能障害に影響している可能性が考えられた。

## 2.4 小括

試験期間の異なる 2 つのマウス試験において、ADAs による薬物動態と安全性への影響を評価した。

抗体医薬を 2 週間、低用量反復投与して ADAs を誘導した短期投与試験では、ADA 産生は比較的限定的であったが、薬物動態への影響が明確に認められた。ADA 産生量に応じて例外なく血漿中薬物濃度が低下した。一部の個体では免疫複合体が検出されており、当該個体において補体経路の活性化が検出された。免疫複合体の形成に伴う、III 型アレルギー反応の惹起が示唆された。

さらなる ADA 惹起を目的に、抗体医薬を 4 週間、低用量反復投与して ADA 産生を惹起した長期投与試験では、ADA 産生頻度が上昇し、産生量も増加した。ADA 産生に伴い大部分の個体で血漿中薬物濃度の低下が認められたが、後期になると ADA 陽性でも濃度が高い個体が散見された。試験期間中に ADAs の特性が変化し、薬物動態への影響が小さくなる場合があることが示された。一部の個体では免疫複合体が検出されており、大きな免疫複合体が検出された個体では低曝露を示し、小さな免疫複合体が検出された個体では陰性個体と同程度の曝露を示した。形成する免疫複合体のサイズにより ADAs の薬物動態への影響が異なることが示唆された。また ADA 産生に伴うクレアチニン濃度の上昇が認められた。データは不十分であるものの、大きな免疫複合体の形成とクレアチニン上昇のタイミングが一致しており、ADAs の腎機能への影響についても免疫複合体のサイズの重要性が示唆された。

## 総括

抗体医薬を投与した際に産生される ADAs は有効性の低下や副作用の誘発に繋がることから、臨床上の課題と認識されている。ヒト抗体医薬を動物に投与する非臨床試験においても異種タンパク質に対する免疫応答により ADAs が産生しやすい状況にあり、候補医薬品の適切な評価の妨げとなっている。ADA 産生による有効性や安全性へのインパクトに関しては多くの報告例があるが、ADAs は個体ごとに性質が異なり多様な作用を示すため一律に評価することが難しい。その作用メカニズムを理解するためにはデータの蓄積が必要であり、個別の ADA 作用を考察するためには ADAs の特性を解析できる測定法が必要である。

本研究では、ADA 研究の課題へのアプローチとして、生体試料中において免疫複合体の大きさと量を測定するアッセイを開発した。従来の ADA アッセイは陽性／陰性のみを判定する定性的なアッセイであり、作用の異なる ADAs が産生された場合でも区別ができないため、ADAs の影響に関する考察が難しかった。開発したアッセイでは免疫複合体の大きさと量により ADAs を特徴付けることができる。ADAs が示す多様な作用は免疫複合体形成の結果であり、その大きさや量を測定することで多様な ADAs の作用を個別に考察することが可能となる。

第 1 章では、BN-PAGE と LC-MS/MS を組み合わせた免疫複合体検出法の性能を検証した。特異性を評価した結果、本検出法はヒト抗体医薬の種類によらず汎用的に使用可能であることが示された。定量性を評価した結果、モデルヒト抗体の検出感度は 10  $\mu\text{g/mL}$  であり、抗体濃度に応じたシグナルが得られたことから半定量的な評価が可能であることが示された。モデルヒト抗体と ADA を混合して形成させた免疫複合体を含むサル血清を分析した結果、遊離型のヒト抗体由来のシグナルと免疫複合体由来のシグナルを分別して検出できた。本検出法は動物試料中で免疫複合体を検出可能であり、免疫複合体のサイズや濃度を測定可能であることが示された。ヒト抗体医薬の非臨床試験に本検出法を用いることで、ADAs による作用を免疫複合体のサイズや量が

ら考察が可能となる。個体間で多様な ADAs の作用を説明するための有力なツールとなることが示唆された。

第 2 章では、ヒト抗体医薬をマウスに投与したときに産生される ADAs が薬物動態や安全性に与える影響を多面的に評価した。短期試験においては ADA 産生量と抗体医薬の曝露低下が相関関係にあるものの、1 カ月を超える長期試験においては、ADA 高産生にもかかわらず曝露が維持される個体が認められた。長期投与に伴い ADAs の特性が変化する可能性が示唆された。免疫複合体検出法による検討により、曝露低下を示した個体では大きな免疫複合体が検出され、曝露が維持された個体では小さな免疫複合体のみが検出された。免疫複合体の大きさにより、ADAs の薬物動態への影響が変わることが示唆された。また免疫複合体が検出された個体のみで補体活性の上昇が認められた。腎機能の指標としてクレアチニン濃度を検討したところ、ADA 産生とクレアチニン濃度上昇の関連性が認められた。特に大きな免疫複合体が腎機能障害に関与していることが示唆された。これら補体活性の上昇や腎機能障害は典型的な III 型アレルギーの所見であり、免疫複合体の曝露により炎症反応が惹起されたことが示唆された。ADA 陽性個体の中で ADAs の薬物動態や安全性へのインパクトが異なる事例において、免疫複合体の特性を分析することで個体差を説明できることが示された。

開発した免疫複合体検出法を用いることにより、非臨床試験における ADAs の作用を免疫複合体の量や大きさから考察できるようになった。本検出法を用いることにより、これまで個体差があり考察が難しかった ADAs の薬物動態への影響や III 型アレルギーへの関与について免疫複合体のデータに基づいて説明が可能となる。創薬において非臨床試験は有効性や安全性を検討し、ヒトへの作用を予測する上で不可欠な試験である。医薬品候補抗体を動物に投与する試験では ADAs が産生される場合が多く、ADAs の多様な作用により試験結果の解釈が困難になることがある。本検出法により測定された免疫複合体の量や大きさに基づいて個体ごとの ADAs の作用を明確化することにより、試験結果に対する ADAs の影響を判断可能となり、ひいては医薬品候補

抗体の適切な評価に繋がると期待される。本検出法は LC-MS/MS の検出法を工夫することにより、臨床検体の評価や複合体構成分子の同定も可能になることから拡張性が高く、ADA 研究を加速化させる強力なツールになると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました静岡県立大学 薬学部 臨床薬剤学分野 賀川義之教授に心より感謝申し上げます。

本論文作成にあたり、御助言、御指導を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 創薬探索センター 浅井章良教授、臨床薬効解析学分野 伊藤邦彦教授、生体機能分子分析学分野 轟木堅一郎教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、終始御指導・御支援頂きました協和キリン株式会社 田原晴信博士、榎園淳一博士、細木淳博士、依田陽子さん、木村珠永さん、高井勝己さん、影林麻衣子さんに厚く感謝申し上げます。業務と並行して本研究を遂行するにあたり、御理解と激励頂きました協和キリン株式会社 薬物動態研究所の皆様には感謝致します。

最後に、本研究に対して、日々の惜しみない援助、協力をしてくれた家族に感謝致します。



## 参考文献

- [1] G. Köhler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*. 256 (1975) 495–497.
- [2] H.M. Shepard, G.L. Phillips, C.D. Thanos, M. Feldmann, Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins, *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London*. 17 (2017) 220–232.
- [3] H. Kaplon, M. Muralidharan, Z. Schneider, J.M. Reichert, H. Kaplon, M. Muralidharan, Z. Schneider, J.M. Reichert, H. Kaplon, M. Muralidharan, Z. Schneider, J.M. Reichert, Antibodies to watch in 2020, *MAbs*. 12 (2020) 1703531.
- [4] A.L. Grilo, A. Mantalaris, The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market, *Trends Biotechnol*. 37 (2019) 9–16.
- [5] N.A.P.S. Buss, S.J. Henderson, M. McFarlane, J.M. Shenton, L. De Haan, Monoclonal antibody therapeutics: History and future, *Curr. Opin. Pharmacol*. 12 (2012) 615–622.
- [6] S. Sethu, K. Govindappa, M. Alhaidari, M. Pirmohamed, K. Park, J. Sathish, Immunogenicity to biologics: Mechanisms, prediction and reduction, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 60 (2012) 331–344.
- [7] W. Han, Y. Pan, Y. Wang, D. Chen, Z. Liu, Q. Zhou, L. Feng, D. Peng, Z. Yuan, Development of a monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for nitroimidazoles in edible animal tissues and feeds, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 120 (2016) 84–91.
- [8] J.M. Carrascosa, M.B.A. van Doorn, M. Lahfa, F.O. Nestle, D. Jullien, J.C. Prinz, Clinical relevance of immunogenicity of biologics in psoriasis: Implications for treatment strategies, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol*. 28 (2014) 1424–1430.
- [9] K. Kuus-Reichel, L.S. Grauer, L.M. Karavodin, C. Knott, M. Krusemeier, N.E. Kay, Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies?, *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1 (1994) 365–372.
- [10] C. Sgro, Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review, *Toxicology*. 105 (1995) 23–29.
- [11] R. Dingman, S. V. Balu-Iyer, Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals, *J. Pharm. Sci*. 108 (2019) 1637–1654.
- [12] E.M.J. Van Brummelen, W. Ros, G. Wolbink, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Antidrug Antibody Formation in Oncology: Clinical Relevance and Challenges, *Oncologist*. 21 (2016) 1260–1268.

- [13] N.K. Bender, C.E. Heilig, B. Dröll, J. Wohlgemuth, F.P. Armbruster, B. Heilig, Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients, *Rheumatol. Int.* 27 (2007) 269–274.
- [14] G.M. Bartelds, C.A. Wijbrandts, M.T. Nurmohamed, S. Stapel, W.F. Lems, L. Aarden, B.A.C. Dijkmans, P.P. Tak, G.J. Wolbink, Clinical response to adalimumab: Relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 921–926.
- [15] F.A. Harding, M.M. Stickler, J. Razo, R.B. DuBridge, The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions, *MAbs.* 2 (2010) 256–265.
- [16] P.A. Van Schouwenburg, T. Rispens, G.J. Wolbink, Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.* 9 (2013) 164–172.
- [17] R.J. Moots, R.M. Xavier, C.C. Mok, M.U. Rahman, W.C. Tsai, M.H. Al-Maini, K. Pavelka, E. Mahgoub, S. Kotak, J. Korth-Bradley, R. Pedersen, L. Mele, Q. Shen, B. Vlahos, The impact of anti-drug antibodies on drug concentrations and clinical outcomes in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: Results from a multinational, real-world clinical practice, non-interventional study, *PLoS One.* 12 (2017) e0179308.
- [18] L. Zhou, S.A. Hoofring, Y. Wu, T. Vu, P. Ma, S.J. Swanson, N. Chirmule, M. Starcevic, Stratification of Antibody-Positive Subjects by Antibody Level Reveals an Impact of Immunogenicity on Pharmacokinetics, *AAPS J.* 15 (2012) 30–40.
- [19] FDA, Guidance for industry: Immunogenicity assessment for therapeutic protein products, *Biotechnol. Law Rep.* 32 (2013) 172–185.
- [20] EMA, Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins, *J. Am. Soc. Nav. Eng.* 68 (2017) 45–48.
- [21] I. Cludts, F.R. Spinelli, F. Morello, J. Hockley, G. Valesini, M. Wadhwa, Anti-therapeutic antibodies and their clinical impact in patients treated with the TNF antagonist adalimumab, *Cytokine.* 96 (2017) 16–23.
- [22] D.F. Arnold, S.A. Misbah, Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- $\alpha$ 1,3- galactose, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 2735–2736.
- [23] M.W. Leach, J.B. Rottman, M.B. Hock, D. Finco, J.L. Rojko, J.C. Beyer, Immunogenicity/Hypersensitivity of biologics, *Toxicol. Pathol.* 42 (2014) 293–300.
- [24] Y.M.C. Wang, J. Wang, Y.Y. Hon, L. Zhou, L. Fang, H.Y. Ahn, Evaluating and Reporting the Immunogenicity Impacts for Biological Products—a Clinical Pharmacology

- Perspective, *AAPS J.* 18 (2016) 395–403.
- [25] M. Deehan, S. Garcês, D. Kramer, M.P. Baker, D. Rat, Y. Roettger, A. Kromminga, Managing unwanted immunogenicity of biologicals, *Autoimmun. Rev.* 14 (2015) 569–574.
  - [26] M. Wadhwa, I. Knezevic, H.N. Kang, R. Thorpe, Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility, *Biologicals.* 43 (2015) 298–306.
  - [27] V. Jawa, M. Hokom, Z. Hu, N. El-Abaadi, Y. Zhuang, D. Berger, S. Gupta, S.J. Swanson, N. Chirmule, Assessment of immunogenicity of romiplostim in clinical studies with ITP subjects, *Ann. Hematol.* 89 (2010) 75–85.
  - [28] Y. Wu, X. Liu, Y. Chen, R. Woods, N. Lee, H. Yang, P. Chowdhury, L.K. Roskos, W.I. White, An electrochemiluminescence (ECL)-based assay for the specific detection of anti-drug antibodies of the IgE isotype, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 86 (2013) 73–81.
  - [29] L. Boysen, A.M.E. Sprinkel, B. Lauritzen, J. Breinholt, J. Lykkesfeldt, B.M. Viuff, L.H. Landsy, Generic immune complex assay for detection of murine anti-drug-antibodies in complex with human IgG, *Biologicals.* 60 (2019) 42–48.
  - [30] FDA, Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection, United States Food Drug Adm. (2019) 1–33.
  - [31] G. Shankar, V. Devanarayan, L. Amaravadi, Y.C. Barrett, R. Bowsher, D. Finco-Kent, M. Fiscella, B. Gorovits, S. Kirschner, M. Moxness, T. Parish, V. Quarmby, H. Smith, W. Smith, L.A. Zuckerman, E. Koren, Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 1267–1281.
  - [32] D. Sickert, K. Kroeger, C. Zickler, E. Chokote, B. Winkler, J.M. Grenet, F. Legay, A. Zaar, Improvement of drug tolerance in immunogenicity testing by acid treatment on Biacore, *J. Immunol. Methods.* 334 (2008) 29–36.
  - [33] J. Zoghbi, Y. Xu, R. Grabert, V. Theobald, S. Richards, A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays, *J. Immunol. Methods.* 426 (2015) 62–69.
  - [34] U. Kavita, J. Duo, S.M. Crawford, R. Liu, J. Valcin, C. Gleason, H. Dong, S. Gadkari, R.W. Dodge, R.C. Pillutla, B.S. DeSilva, A systematic study of the effect of low pH acid treatment on anti-drug antibodies specific for a domain antibody therapeutic: Impact on drug tolerance, assay sensitivity and post-validation method assessment of ADA in clinical serum samples, *J. Immunol. Methods.* 448 (2017) 91–104.
  - [35] M. Krishna, S.G. Nadler, Immunogenicity to biotherapeutics - The role of anti-drug

- immune complexes, *Front. Immunol.* 7 (2016).
- [36] X.Y. Wang, B. Wang, Y.M. Wen, From therapeutic antibodies to immune complex vaccines, *Npj Vaccines.* 4 (2019) 1–8.
  - [37] T.N. Mayadas, G.C. Tsokos, N. Tsuboi, Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury, *Circulation.* 120 (2009) 2012–2024.
  - [38] M. Oda, S. Uchiyama, M. Noda, Y. Nishi, M. Koga, K. Mayanagi, C. V. Robinson, K. Fukui, Y. Kobayashi, K. Morikawa, T. Azuma, Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes, *Mol. Immunol.* 47 (2009) 357–364.
  - [39] K.A. Van Schie, S. Kruithof, P. Ooijevaar-De Heer, N.I.L. Derksen, F.S. Van De Bovenkamp, A. Saris, G. Vidarsson, A.E.H. Bentlage, W. Jiskoot, S. Romeijn, R.I. Koning, E. Bos, E.M. Stork, C.A.M. Koeleman, M. Wuhler, G. Wolbink, T. Rispen, Restricted immune activation and internalisation of anti-idiotypic complexes between drug and antidrug antibodies, *Ann. Rheum. Dis.* (2018) 1–9.
  - [40] J.R. Rojas, R.P. Taylor, M.R. Cunningham, T.J. Rutkoski, J. Vennarini, H. Jang, M.A. Graham, K. Geboes, S.D. Rousselle, C.L. Wagner, Formation, distribution, and elimination of infliximab and anti-infliximab immune complexes in cynomolgus monkeys, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 (2005) 578–585.
  - [41] C.J. Van Der Laken, A.E. Voskuyl, J.C. Roos, M. Stigter Van Walsum, E.R. De Groot, G. Wolbink, B.A.C. Dijkmans, L.A. Aarden, Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 253–256.
  - [42] J.R. Heyen, J. Rojko, M. Evans, T.P. Brown, W.F. Bobrowski, A. Vitsky, S. Dalton, N. Tripathi, S.S. Bollini, T. Johnson, J.C. Lin, N. Khan, B. Han, D. Morton, L. Tomlinson, Characterization, Biomarkers, and Reversibility of a Monoclonal Antibody-induced Immune Complex Disease in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*), *Toxicol. Pathol.* 42 (2014) 765–773.
  - [43] W.G. Couser, Mechanisms of glomerular injury in immune-complex disease, *Kidney Int.* 28 (1985) 569–583.
  - [44] H. Izzedine, H. Boostandoost, A. Mathian, Panitumumab-Induced Immune Complex Glomerulonephritis, *Am. J. Kidney Dis.* 69 (2017) 320–321.
  - [45] G.R. Gallo, T. Caulin-Glaser, M.E. Lamm, Charge of circulating immune complexes as a factor in glomerular basement membrane localization in mice, *J. Clin. Invest.* 67 (1981) 1305–1313.
  - [46] Y.M.L. Valim, P.J. Lachmann, The effect of antibody isotype and antigenic epitope density

- on the complement - fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti - NIP antibodies with human Fc regions, *Clin. Exp. Immunol.* 84 (1991) 1–8.
- [47] M. Boysen, L. Schlicksupp, I. Dreher, R. Loebbert, M. Richter, SEC Based Method for Size Determination of Immune Complexes of Therapeutic Antibodies in Animal Matrix, *J. Immunol. Res.* 2016 (2016) 1–9.
  - [48] E. Hoffmann, G. Jordan, M. Lauer, P. Ringler, E.A. Kusznir, A.C. Rufer, S. Huber, A. Jochner, G. Winter, R.F. Staack, Generation, Characterization, and Quantitative Bioanalysis of Drug/Anti-drug Antibody Immune Complexes to Facilitate Dedicated In Vivo Studies, *Pharm. Res.* 36 (2019).
  - [49] P. Pierog, M. Krishna, A. Yamniuk, A. Chauhan, B. DeSilva, Detection of drug specific circulating immune complexes from in vivo cynomolgus monkey serum samples, *J. Immunol. Methods.* 416 (2015) 124–136.
  - [50] R.J. Stopforth, R.J. Oldham, A.L. Tutt, P. Duriez, H.T.C. Chan, B.F. Binkowski, C. Zimprich, D. Li, P.G. Hargreaves, M. Cong, V. Reddy, M.J. Leandro, G. Cambridge, A. Lux, F. Nimmerjahn, M.S. Cragg, Detection of Experimental and Clinical Immune Complexes by Measuring SHIP-1 Recruitment to the Inhibitory FcγRIIB, *J. Immunol.* (2018) ji1700832.
  - [51] I. Wittig, H.P. Braun, H. Schägger, Blue native PAGE, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 418–428.
  - [52] M. Swamy, G.M. Siegers, S. Minguet, B. Wollscheid, W.W.A. Schamel, Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes., *Sci. STKE.* 2006 (2006) 1–18.
  - [53] L. Kang, N. Weng, W. Jian, LC–MS bioanalysis of intact proteins and peptides, *Biomed. Chromatogr.* 34 (2020) e4633.
  - [54] K. Todoroki, H. Mizuno, E. Sugiyama, T. Toyo'oka, Bioanalytical methods for therapeutic monoclonal antibodies and antibody–drug conjugates: A review of recent advances and future perspectives, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 179 (2020) 112991.
  - [55] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havliš, J. V. Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.* 1 (2007) 2856–2860.
  - [56] M.T. Furlong, Z. Ouyang, S. Wu, J. Tamura, T. Olah, A. Tymiak, M. Jemal, A universal surrogate peptide to enable LC-MS/MS bioanalysis of a diversity of human monoclonal antibody and human Fc-fusion protein drug candidates in pre-clinical animal studies, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 1024–1032.

- [57] Q. Zhang, D.S. Spellman, Y. Song, B. Choi, N.G. Hatcher, D. Tomazela, M. Beaumont, M. Tabrizifard, D. Prabhavalkar, W. Seghezzi, J. Harrelson, K.P. Bateman, Generic automated method for liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry based monoclonal antibody quantitation for preclinical pharmacokinetic studies, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8776–8784.
- [58] N. Iwamoto, T. Shimada, H. Terakado, A. Hamada, Validated LC-MS/MS analysis of immune checkpoint inhibitor Nivolumab in human plasma using a Fab peptide-selective quantitation method: Nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1023–1024 (2016) 9–16.
- [59] S. Schokker, F. Fusetti, F. Bonardi, R.J. Molenaar, R.A.A. Mathôt, H.W.M. van Laarhoven, Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of co-administered trastuzumab and pertuzumab, *MAbs.* 12 (2020) 1795492.
- [60] M. Dubois, F. Fenaille, G. Clement, M. Lechmann, J.C. Tabet, E. Ezan, F. Becher, Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1737–1745.
- [61] D. Pflieger, C. Przybylski, F. Gonnet, J.P. Le Caer, T. Lunardi, G.J. Arlaud, D. Régis, Analysis of human c1q by combined bottom-up and top-down mass spectrometry detailed mapping of post-translational modifications and insights into the c1r/c1s binding sites, *Mol. Cell. Proteomics.* 9 (2010) 593–610.
- [62] L.Z. Chen, D. Roos, E. Philip, Development of Immunocapture-LC/MS Assay for Simultaneous ADA Isotyping and Semiquantitation, *J. Immunol. Res.* 2016 (2016) 17–19.
- [63] K.R. Chan, E.Z. Ong, D.Z. Mok, E.E. Ooi, Fc receptors and their influence on efficacy of therapeutic antibodies for treatment of viral diseases, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 13 (2015) 1351–1360.
- [64] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding, *Science.* 310 (2005) 1510–1512.
- [65] T.M. Thway, I. Magana, A. Bautista, V. Jawa, W. Gu, M. Ma, Impact of anti-drug antibodies in preclinical pharmacokinetic assessment, *AAPS J.* 15 (2013) 856–863.
- [66] P.J. Bugelski, G. Treacy, Predictive power of preclinical studies in animals for the immunogenicity of recombinant therapeutic proteins in humans, *Curr. Opin. Mol. Ther.* (2004).
- [67] S.J. Swanson, J. Bussiere, Immunogenicity assessment in non-clinical studies, *Curr. Opin. Microbiol.* 15 (2012) 337–347.

- [68] L.D. MacDonald, A. MacKay, V. Kaliaperumal, G. Weir, A. Penwell, R. Rajagopalan, J.M. Langley, S. Halperin, M. Mansour, M.M. Stanford, Type III hypersensitivity reactions to a B cell epitope antigen are abrogated using a depot forming vaccine platform, *Hum. Vaccines Immunother.* 14 (2018) 59–66.
- [69] R. Clynes, J.S. Maizes, R. Guinamard, M. Ono, T. Takai, J. V. Ravetch, Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 179–185.
- [70] A.M. Fathallah, R.B. Bankert, S. V. Balu-Iyer, Immunogenicity of subcutaneously administered therapeutic proteins - A mechanistic perspective, *AAPS J.* 15 (2013) 897–900.
- [71] N. Azuma, K. Matsui, N. Hashimoto, T. Yoshikawa, H. Sano, Successful switch to golimumab for eosinophilia and skin symptoms related to multiple biologics in a patient with rheumatoid arthritis, *Intern. Med.* 56 (2017) 1585–1590.
- [72] R. Huchet, M. Feldman, Studies on antibody affinity in mice, *Eur. J. Immunol.* 3 (1973) 49–55.
- [73] N. Hozumi, S. Tonegawa, Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73 (1976) 3628–3632.
- [74] G.D. Victora, M.C. Nussenzweig, Germinal Centers, *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012) 429–457.