

# 博士論文

## 抗体医薬品の標的抗原選択ならび に *in vivo* 薬物動態評価における 効率化に関する研究

2017年

原谷 健太

本論文は以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済みである。

- (1) Kenta Haraya, Tatsuhiko Tachibana, Yuki Iwayanagi, Atsuhiko Maeda, Kazuhisa Ozeki, Junichi Nezu, Masaki Ishigai, and Tomoyuki Igawa. PK/PD analysis of a novel pH-dependent antigen-binding antibody using a dynamic antibody-antigen binding model. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. [第1章]
- (2) Kenta Haraya, Tatsuhiko Tachibana, Masahiko Nanami, and Masaki Ishigai. Application of human FcRn transgenic mice as a pharmacokinetic screening tool of monoclonal antibody. *Xenobiotica* **2014**, 44(12), 1127-1134. [第2章]
- (3) Kenta Haraya, Tatsuhiko Tachibana, and Junichi Nezu. Predicting pharmacokinetic profile of therapeutic antibodies after iv injection from only the data after sc injection in cynomolgus monkey. *Xenobiotica* **2017**, 47(3), 194-201. [第3章]

## 略号

ADC:	Antibody-drug conjugate
ADCC:	Antibody dependent cell cytotoxicity
BSA:	Bovine serum albumin
CL:	クリアランス (Clearance)
CTLA-4:	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
ECLIA:	Electrochemiluminescence immunoassay
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
F:	Bioavailability
FcRn:	Neonatal Fc receptor
HEK:	Human embryonic kidney
hFcRn Tgm:	Human FcRn transgenic mouse
IgE:	Immunoglobulin E
IgG:	Immunoglobulin G
KD:	解離定数 (Dissociation constant)
M252Y/S254T/T256E:	YTE
M428L/N434S:	LS
NMO:	視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica)
PBS:	Phosphate-buffered saline
PEG:	ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol)
PK/PD:	Pharmacokinetics and pharmacodynamics
PMDA:	医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceutical and medical devices agency)
Q:	組織移行間クリアランス (Inter-compartmental clearance)
QOL:	Quality of life
TBS:	Tris-buffered saline
TMDD:	Target mediated drug disposition
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
V <sub>c</sub> :	中央コンパートメント分布容積 (Central compartment volume)
V <sub>dss</sub> :	定常状態分布容積 (Volume of distribution at steady state)
V <sub>p</sub> :	末梢コンパートメント分布容積 (Peripheral compartment volume)

## 目次

緒言 .....	5
第一章 新規抗体医薬品の標的抗原の選択における効率化のための PK/PD 解析 .....	9
第一節 緒言 .....	9
第二節 実験材料及び方法 .....	12
第三節 実験結果 .....	17
第四節 考察 .....	26
第二章 抗体医薬品の薬物動態スクリーニング動物としての human FcRn transgenic mouse の有用性評価 .....	32
第一節 緒言 .....	32
第二節 実験材料及び方法 .....	34
第三節 実験結果 .....	37
第四節 考察 .....	45
第三章 皮下投与後の薬物動態データを用いた静脈内投与後の薬物動態の予測 .....	49
第一節 緒言 .....	49
第二節 実験材料及び方法 .....	51
第三節 実験結果 .....	54
第四節 考察 .....	63
結論 .....	66
謝辞 .....	69
引用文献 .....	70

## 緒言

近年、世界の医薬品市場では、抗体医薬品と呼ばれる新規の分子形を有する医薬品が様々な疾患を標的として販売されている。さらに現在400を超える抗体医薬品が臨床試験段階にあり、今後医薬品市場での更なる発展が予想される [1]。抗体医薬品は immunoglobulin G (IgG) を基本分子形とした分子量約150kDa の高分子医薬品であり、その特徴は、標的抗原への非常に高い選択性と結合性、さらに高い安全性及び長い血中半減期である。Figure 1 A 及び B に示すように、抗体は Y 字型をしたタンパク質で、2つの heavy chain 及び2つの light chain で構成される。それぞれの heavy chain はジスルフィド結合により結合しており、それぞれの heavy chain に1つの light chain がジスルフィド結合により結合している。また Figure 1 C に示すように、抗体の構造は variable region 及び constant region の2つに分類できる。高い標的抗原への特異性を発揮するために抗体ごとにそのアミノ酸配列に多様性を有するのが variable region であり、一方抗体ごとにほぼアミノ酸配列が一定であるのが constant region である。また抗体はプロテアーゼであるパパインによる分解を受けることが知られており、パパイン分解により3つの断片が得られる。Figure 1 D に示すように、3つの断片の内2つは同一の構造を有し、また標的抗原結合性を有しており、この断片は Fab と呼ばれる。残る1つの断片は標的抗原結合性を有さない Fc である。

抗体医薬品の薬物動態特性の面で注目すべき点は、その長い血中半減期である。多くの低分子医薬品はヒトでの血中半減期は1日以内であり毎日1-3回の服薬が必要である。一方、高分子医薬品である分子量約34kDa のエリスロポエチンはヒトでの血中半減期が1日前後であり [2]、PEG 化したエリスロポエチンではヒトでの血中半減期は5日程度であると報告されている [3]。すでに承認されている抗 VEGF 抗体 bevacizumab はヒトで血中半減期が18.4日 [4]、抗 IL-12/23抗体 ustekinumab は28.6日 [5]と報告されており、低分子医薬品及び他の高分子医薬品と比較しても顕著に長い血中半減期を有している。この長い血中半減期は neonatal Fc receptor (FcRn) による抗体のリサイクル作用によると報告されている。抗体は血中からピノサイトーシスで細胞内に取り込まれ、エンドソームに移行する。通常のタンパク質はエンドソームからライソゾームに移行してタンパク分解酵素等により分解を受けるが、抗体は酸性条件下で FcRn に結合できるという特性を有し、酸性条件下であるエンドソーム内で FcRn に結合する。さらに FcRn はリサイクル機能を有し、抗体-FcRn 複合体はエンドソームから細胞膜上に移行する。抗体と FcRn の結合は pH 依存性があり、中性条件では結合しないことから、細胞膜上に移行した抗体-FcRn 複合体は速やかに解離し、抗体が血中へ放出される。このメカニズムに基づき、抗体はライソゾームでの分解を回避することで長い血中半減期を示すと考えられている。この抗体と FcRn の結合は、抗体の Fc 部分が FcRn と結合する事により起こる事が明らかになっており、Fc のアミノ酸改変により FcRn

との結合性が変化する事が知られている [6]。血中タンパク質の中ではアルブミンもまた FcRn に酸性条件下で結合できる事が知られており、FcRn によるリサイクル作用により長い血中半減期を有する [7]。アルブミンは抗体とは異なる FcRn の構造部分を認識する事が知られており、互いに競合することなく、エンドソームから細胞膜上に FcRn によってリサイクルされる [8]。

抗体医薬品は可溶性抗原を標的とする際に、抗体投与後、血中の総標的抗原濃度（抗体-標的抗原複合体+遊離標的抗原）が著しく上昇する事が報告されている。例えば抗 amyloid  $\beta$  抗体をヒトに投与すると、血漿中総 amyloid  $\beta$  濃度が約10000倍上昇する事が報告されており [9]、また抗 CCL2抗体をヒトに投与すると、血清中総 CCL2濃度が約2000倍上昇する事が報告されている [10]。これは抗体投与後、血中において、抗体が標的抗原に結合することで分子量が大きくなり、標的抗原の腎クリアランスを阻害する事、また、抗体と標的抗原の複合体が FcRn によりエンドソーム内からリサイクルされることにより、標的抗原の消失クリアランスを低下させるためであると考えられている。私はこの可溶性標的抗原総濃度の上昇を抑制することで、標的抗原の中和に必要な抗体の投与量の低減及び投与頻度の低下を実現可能とする技術を開発した。この新規抗体技術を適用することで必要な抗体の投与量の低減及び投与頻度の低下を通して利便性向上による大きな付加価値を患者に提供しうる標的抗原を予測することにより、事前に有望な標的抗原を選別できれば、効率的かつ成功確率の高い非臨床研究開発に貢献できると考えられる。第一章では私が開発した pH 依存性の標的抗原結合性を有する新規抗体分子が有効性を発揮しうる標的抗原の薬物動態プロファイルを推定する事を目的に PK/PD 解析を実施した。

抗体の体内動態において FcRn は大きな役割を担っているが、抗体と FcRn の結合には種差が存在する事がすでに明らかとなっている。抗体を医薬品として開発する際には、ヒトにおける免疫原性を低減する事を目的にアミノ酸配列を可能な限りヒト IgG 配列に置換するヒト化が実施される。一般的に非臨床段階で使用する動物種の中で、酸性条件下及び中性条件下において、マウスにおいてはマウス FcRn と Fc 領域にヒト IgG 配列を有する抗体との結合が、ヒト FcRn と Fc 領域にヒト IgG 配列を有する抗体との結合よりも強いという事が報告されている [11]。一方カニクイザルにおいてはその FcRn とヒト IgG 配列を有する抗体の結合性が、酸性条件下及び中性条件下において、ヒト FcRn とヒト IgG 配列を有する抗体との結合性に類似している事から、抗体医薬品のヒトにおける体内動態予測にカニクイザルが頻繁に使用される。また標的抗原のアミノ酸配列の相同性がカニクイザルとヒトで高いケースが多いことから抗体医薬品の非臨床薬効試験及び毒性試験にもカニクイザルが頻繁に使用される。しかし、非ヒト霊長類の使用は動物愛護の観点からも最小限に抑える必要があり、またコストの面からも頻回に渡る大規模な試験の実施は容易ではない。本研究の第二章では、抗体の FcRn 結合の種差を考慮したより簡便かつ有効な非臨床薬物動態スクリーニング

動物としての human FcRn transgenic mouse (hFcRn Tgm) の有用性評価を行った。

前述したように、抗体医薬品の非臨床開発においてカニクイザルは非常に有用な動物種である一方、その使用に関しては制限がある。しかし、抗体医薬品の標的抗原に対する種交差性から薬効試験や毒性試験ではカニクイザルの使用を回避する事が難しい。また近年、特に慢性疾患を適用疾患とする抗体医薬品で、皮下投与を投与経路とするものが多数承認されている。抗体医薬品の皮下投与後における血中濃度はそのバイオアベイラビリティ (F) により影響を受けるが、F を算出するためには静脈内投与及び皮下投与の2つの群を設定し、それぞれの血中濃度の AUC の比から F を算出する必要がある。抗体医薬品の非臨床開発で使用されるカニクイザルの使用頭数及びコストの低減を目的とし、第三章ではカニクイザルにおいては、過去に報告されている複数の抗体医薬品の静脈内投与後のデータを利用して、対象とする抗体医薬品を皮下投与後の血清もしくは血漿中抗体濃度推移のみから皮下投与後のバイオアベイラビリティ、静脈内投与後のクリアランス (CL)、及び血清もしくは血漿中抗体濃度推移の予測を試みた。

以下、それぞれの章で、緒言、実験材料及び方法、実験結果、考察について論述する。

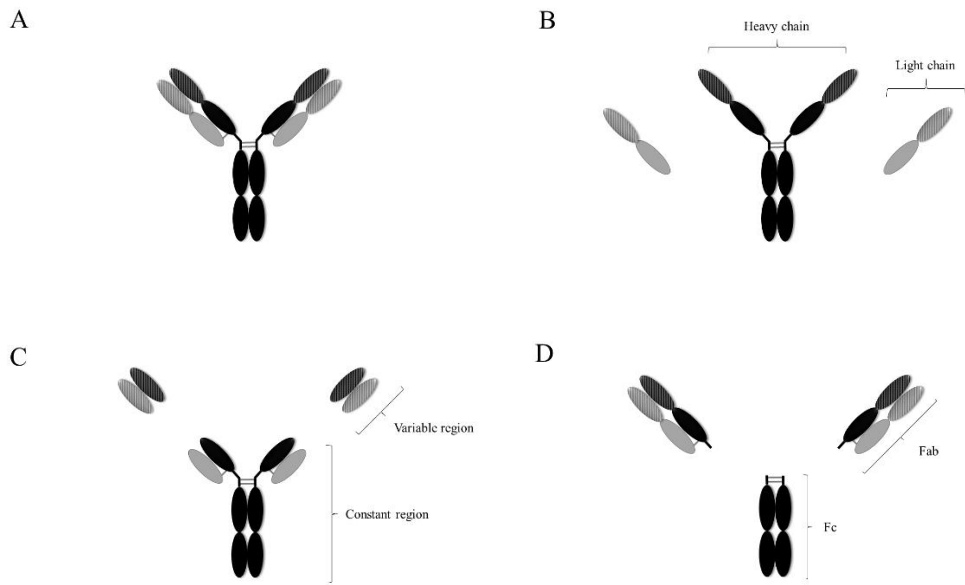


Figure 1. Structure of immunoglobulin G.



## 第一章 新規抗体医薬品の標的抗原の選択における効率化のための PK/PD 解析

### 第一節 緒言

近年、抗体医薬品の開発が急速に広がる一方、同一標的抗原に対する複数の抗体医薬品が開発、承認されている。例えば、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) に対する抗体医薬品は、infliximab, golimumab, adalimumab の3つがすでに承認されており、また TNF  $\alpha$ を標的とした Fc 融合タンパク質である etanercept やポリエチレングリコール (PEG) を付加した TNF $\alpha$ に対する Fab 製剤である certolizumab pegol も承認されている。抗体医薬品の欠点として、その高い分子量のために細胞膜を透過できない事が挙げられ、その特性から体外から投与された抗体は細胞内の標的抗原を狙う事ができない。そのため、抗体により標的としうる抗原は細胞外に限られている。抗体医薬品の場合、低分子医薬品に比べて有望な標的抗原が限られているために同一の標的抗原に対しての研究開発の競争が激しく、同様の性質を持つ複数の臨床開発品が臨床試験段階にあり、また各国で既に承認されている。このような状況下において、他の臨床開発品と差別化するためには、薬効、安全性、薬物動態、利便性等で明確な利点を有する必要がある。

抗体医薬品は、その標的抗原が細胞膜上に発現しており、かつその発現量が多い場合、非線形性の消失を示すことが報告されている。これは細胞膜上の標的抗原に結合した抗体が細胞内へ内在化し、標的抗原と共にライソゾームへ移行する事で分解するため、抗体の消失が加速するためと考えられ、標的抗原に対して過剰量の抗体を投与した際には、内在化による非線形の消失過程が飽和し、見かけ上は内在化以外による線形の消失過程を示す [12, 13]。この内在化による非線形消失のために、抗体医薬品にとって高い投与量もしくは頻回投与が必要になり、非線形消失を示す抗体の欠点となっている。私はこの課題を克服するために、標的抗原に対する抗体の結合性に pH 依存性を持たせることで、酸性エンドソーム内で標的抗原を解離して、遊離した抗体は FcRn に結合する事で細胞膜上へリサイクルされ、非線形消失を改善する技術を開発した [14]。この技術を有する抗体は中性で標的抗原に高い結合性を示す一方、酸性条件では速やかに抗原を解離する特性を示す。筆者らの研究グループはこの技術を抗 IL-6受容体抗体である tocilizumab に適用し、その効果を非臨床試験で検証した。カニクイザルにおいて tocilizumab 及び pH 依存的 IL-6受容体結合を持つ PH2-FcRn を 2 mg/kg の投与量で皮下投与したところ、血中における抗体の AUC を約5倍改善する事に成功した。また tocilizumab はカニクイザルにおいて約1週間ほどしか IL-6受容体を中和できなかったが、PH2-FcRn は4週間以上も中和を持続する事に成功した。この抗体は臨床においても tocilizumab に比べて体内動態を改善する事がすでに証明され [15]、現在、視神経脊髄炎 (NMO) を対象とした第三相臨床試験を実施中である

[1]。

一方、前述した通り、血中に存在する可溶性標的抗原を対象とする場合、抗体投与後に血漿中の総標的抗原濃度の上昇がしばしば観察される。この現象は抗体が標的抗原に結合する事による標的抗原の血中からの腎クリアランスの阻害及び細胞内エンドソームからのリサイクルにより標的抗原の消失クリアランスが著しく低下するためと考えられる。つまり、例え抗体が限りなく0に近い非常に強い解離定数 (KD) を有しているとしても、1つの抗体は2つの標的抗原しか中和する事ができない。この事から、抗体が標的抗原を中和するためには、理論的に血漿中抗体濃度は血漿中の総標的抗原濃度よりも高い濃度を維持する必要がある、内因性の遊離の標的抗原が血漿中で高濃度を有する場合、もしくは抗体投与により著しくその総濃度が上昇する場合においては、中和に必要な抗体投与量が非常に高くなることが予想される。実際に内因性の遊離の血漿中濃度が高い、complement C5や immunoglobulin E に対する抗体医薬品である eculizumab [16]や omalizumab [17]は臨床で高い投与量を必要とする。

この課題を解決するために標的抗原に対する Fab 領域の結合性に pH 依存性を持つ recycling antibody、さらに標的抗原に対する Fab 領域の結合性に pH 依存性を持ち、かつ Fc 領域で中性条件において細胞膜表面上の FcRn に結合することにより細胞内への取り込み速度を上昇させた sweeping antibody を開発した [18]。Recycling antibody はエンドソームにおける酸性条件下でのヒスチジン残基のプロトン化を利用して、中性条件と酸性条件で標的抗原との結合性を変化させることが可能である。つまり血中の中性条件下では標的抗原に強い結合性を有し、エンドソーム内に入ると素早く標的抗原を解離することで標的抗原のリサイクルを防ぐことが可能となり、加えて抗体は FcRn との結合によりリサイクルされる事で血中に戻り、標的抗原を再度中和する事ができる。つまり pH 依存性の標的抗原結合性により、1つの抗体で複数の標的抗原を中和する事が可能となる。さらに sweeping antibody では標的抗原の細胞内への取り込みクリアランスを上昇させるために、中性条件で FcRn に強く結合する様に Fc 領域にもアミノ酸改変を導入することで抗体-標的抗原複合体の細胞内への取り込みを上昇させ、recycling antibody よりもさらに標的抗原のクリアランスを上昇させることに成功した。IL-6受容体に対する sweeping antibody はマウス薬効モデル評価系において、可溶性 IL-6受容体のクリアランスを加速させ、通常の抗 IL-6受容体抗体及び recycling antibody よりも優れた血清アミロイド A の抑制効果を示した [18]。この結果から、sweeping antibody は通常の抗体に比べて、必要投与量及び投与頻度の低減、また同投与量における薬効の増強を実現可能と考えられ、臨床における患者の QOL を大きく改善できると考えられる。

PK/PD 解析は臨床候補品の選抜、ヒトにおける薬効予測、臨床試験プロトコールの最適化など、医薬品開発に広く用いられており、非常に有用なツールである。抗体医薬品の開発においても頻繁に用いられ、非臨床及び臨床の両過程において様々な

PK/PD モデルの使用が報告されている [19, 20]。可溶性標的抗原の場合、抗体投与後の遊離標的抗原（抗体と結合していない標的抗原）濃度が PD の指標となりえることから、標的抗原の体内動態を組み込んだ target mediated drug disposition (TMDD) model が PK/PD 解析に頻繁に適用される [21, 22]。TMDD model は標的抗原のターンオーバー、発現量、抗体との結合パラメータを組み込んだメカニズムに基づくモデルであるため、非臨床結果から臨床における PK/PD 予測にも適用可能であると考えられる。また抗体医薬品の候補物質の標的抗原中和能を向上するためにどのパラメータを最適化すれば良いかを評価でき、臨床候補品創製のスキーム最適化に貢献できるツールとして非常に有用であると考えられる。また recycling antibody 及び sweeping antibody を適用すべき標的抗原を選別する際に、その選別基準が必要となる。抗体で標的可能な抗原は非常に多岐に渡り、1つ1つの標的抗原に対する recycling antibody 及び sweeping antibody を作製して評価するのは非現実的であるため、PK/PD 解析によりあらかじめ開発の成功確率が高いと予測される標的抗原を絞り込めれば、非臨床評価を効率化でき、かつ成功確率の向上も可能である。

本研究では、recycling antibody 及び sweeping antibody の適用価値を評価する事を目的に PK/PD 解析を実施した。TMDD with recycling mechanism model を構築し、hFcRn Tgm PK 試験から算出した PK/PD パラメータを用いて様々な標的抗原プロファイル（血漿中濃度、消失クリアランス、抗体との結合様式）に対する抗体医薬品の投与量低減及び投与期間延長効果を評価した。

## 第二節 実験材料及び方法

### 抗体作製

pH 依存的結合性を示さない抗 IL-6受容体抗体 (NPH-IgG1)、pH 依存性結合性を有する抗 IL-6受容体抗体 (PH-IgG1)、pH 依存的結合性及び中性条件における FcRn 結合性を有する抗 IL-6受容体抗体 (PH-Fx) は human embryonic kidney (HEK) 293細胞で発現、精製した。すでに報告している通り、NPH-IgG1及び PH-IgG1は pH7.4において同等の hsIL-6R に対する結合性 (KD) を示した [18]。また、NPH-IgG1は酸性 (pH 6.0) 及び中性 (pH 7.4) における KD の比が0.9の pH 依存的結合性を示さないが、PH-IgG1は酸性 (pH 6.0) 及び中性 (pH 7.4) における KD の比が23.0の pH 依存的結合性を示した [18]。NPH-IgG1及び PH-IgG1は同じヒト IgG1配列の Fc を有し、PH-Fx は中性条件で FcRn に結合をできるように Fc にアミノ酸改変を導入した。pH7.0におけるヒト FcRn に対する KD は Biacore T200 (GE Healthcare, USA) を用いて評価した。抗ヒト IgG kappa chain 抗体 (BD Bioscience, USA) を固定した CM5センサーチップに PH-Fx を捕捉させ、フローセルにヒト FcRn を注入し、結合性を評価した。

### hFcRn Tgm を用いた PK 試験

Human FcRn homozygous transgenic mice (line 32) (B6.mFcRn<sup>-/-</sup>. hFcRn Tg line 32<sup>+/+</sup> mouse) (The Jackson Laboratory, USA) を用いて PK 試験を実施した。抗体 (1 mg/kg) は hsIL-6R (50 µg/kg) 及び human IgG (1 g/kg) (CSL Behring, USA) と共に尾静脈より単回静脈内投与 (N=3) した。マウス内因性 IgG はヒト FcRn への結合性が弱いため、hFcRn Tgm における内因性 IgG 濃度が低い事が報告されている [23]。ヒトにおける内因性 IgG 濃度を模するために、human IgG (1 g/kg) を抗体と共に投与した。単回静脈内投与後15分、7時間、1、2、4、7、14、21、28日で血液を採取した。血液を 12000rpm、4°C、15分の条件で遠心し、血漿を得た。血漿は分析まで-40°C保存した。すべての動物実験は中外製薬株式会社の guidelines for the care and use of laboratory animals に従って実施した。

### 血漿中抗体及び総 hsIL-6R 濃度測定

血漿中総抗体濃度測定は ELISA を用いて実施した。96穴 ELISA プレート (Nunc-immuno plates with a maxisorp surface; Nalge Nunc International, USA) に1 µg/mL の anti-idiotypic antibody (In-house) を固相し、4°Cで一晩静置した。ウォッシュ溶液 (PBS with 0.05% tween 20 (Sigma, USA)) でプレートを洗浄後、ブロッキング溶液 (0.5%

BSA (Roche Applied Science, Germany)、10% block ace (Dainippon Sumitomo Pharma, Japan)、TBS with 0.05% tween 20 (Sigma, USA) をプレートに添加し、2時間静置した。検量線、QC サンプル、血漿サンプル中の抗体をすべて hsIL-6R と複合体を形成させるために、20 ng/mL の hsIL-6R を添加し、1時間静置した。その後、ウォッシュ溶液でプレートを洗浄後、検量線、QC サンプル、血漿サンプルをプレートに添加し、室温で1時間反応させた。さらにウォッシュ溶液でプレートを洗浄後、biotinylated anti-human IL-6R antibody (R&D, USA) を添加し、室温で1時間反応させた。その後ウォッシュ溶液でプレートを洗浄後、streptavidin-polyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies, Germany) を添加し、室温で1時間反応させた。ウォッシュ溶液でプレートを洗浄後、TMB one component HRP microwell substrate (BioFX Laboratories, USA) で添加する事で発色反応を行い、0.5 M sulfuric acid (Showa Chemical, Japan) を添加することで反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、450nm の吸光度を測定した。得られた吸光度は softmax pro (ver. 4.6, Molecular Devices Corporation, USA) で解析した。

血漿中総 hsIL-6R 濃度測定は electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) を用いて実施した。検量線、QC サンプル、血漿サンプルに以下3つの試薬①SULFO-TAG NHS ester (Meso Scale Discovery, USA) でルテニウム化した monoclonal anti-human IL-6R antibody (R&D, USA)、②biotinylated anti-human IL-6 R antibody (R&D, USA)、③tocilizumab を混合し、37°Cで一晩反応させ、hsIL-6R と3種の抗体を含んだ複合体を形成させた。streptavidin gold multi-array plate (Meso Scale Discovery, USA) にブロッキング溶液 (0.5% BSA (Roche Applied Science, Germany)、PBS with 0.05% tween 20 (Sigma, USA)) を添加し、4°Cで一晩静置した。ウォッシュ溶液 (PBS with 0.05% tween 20 (Sigma, USA)) で streptavidin gold multi-array plate を洗浄後、検量線、QC サンプル、血漿サンプルを添加し、室温で2時間反応させた。その後、ウォッシュ溶液で streptavidin gold multi-array plate を洗浄後、read buffer T (×2) (Meso Scale Discovery, USA) を添加し、sector imager 2400 (Meso Scale Discovery, USA) を用いて発光強度のシグナルを検出した。得られたシグナルは softmax pro (ver. 4.6, Molecular Devices Corporation, USA) で解析した。

#### PK/PD パラメータの算出

可溶性標的抗原の薬物動態を記述するために、TMDD with recycling mechanism model を構築した (Figure 2)。各コンパートメントにおける物質収支式を以下に記載した。

$$\frac{dX_{1,mab}}{dt} = -\frac{CL_{mab}}{V_{1,mab}} * X_{1,mab} - k_{12,mab} * X_{1,mab} + k_{21,mab} * X_{2,mab} - k_{on} * \frac{X_{1,antigen}}{V_{1,antigen}} *$$

$$X_{1,mab} + k_{off} * X_{1,complex} + F_{rec} * \left( \frac{CL_{complex}}{V_{1,complex}} - \frac{CL_{mab}}{V_{1,mab}} \right) * X_{1,complex} \quad (1)$$

$$\frac{dX_{2,mab}}{dt} = k_{12,mab} * X_{1,mab} - k_{21,mab} * X_{2,mab} \quad (2)$$

$$\frac{dX_{1,antigen}}{dt} = -\frac{CL_{antigen}}{V_{1,antigen}} * X_{1,antigen} - k_{12,antigen} * X_{1,antigen} + k_{21,antigen} * X_{2,antigen} -$$

$$k_{on} * \frac{X_{1,antigen}}{V_{1,antigen}} * X_{1,mab} + k_{off} * X_{1,complex} + k_{synth} \quad (3)$$

$$\frac{dX_{2,antigen}}{dt} = k_{12,antigen} * X_{1,antigen} - k_{21,antigen} * X_{2,antigen} \quad (4)$$

$$\frac{dX_{1,complex}}{dt} = -\frac{CL_{complex}}{V_{1,complex}} * X_{1,complex} - k_{12,complex} * X_{1,complex} + k_{21,complex} * X_{2,complex} +$$

$$k_{on} * \frac{X_{1,antigen}}{V_{1,antigen}} * X_{1,mab} - k_{off} * X_{1,complex} \quad (5)$$

$$\frac{dX_{2,complex}}{dt} = k_{12,complex} * X_{1,complex} - k_{21,complex} * X_{2,complex} \quad (6)$$

$X_{1,mab}$ ,  $X_{1,antigen}$ ,  $X_{1,complex}$  はそれぞれ、中央コンパートメントにおける遊離の抗体（標的抗原と結合していない抗体）、遊離の標的抗原（抗体と結合していない標的抗原）、複合体の量を示している。 $X_{2,mab}$ ,  $X_{2,antigen}$ ,  $X_{2,complex}$  はそれぞれ、末梢コンパートメントにおける遊離の抗体、遊離の標的抗原、複合体の量を示している。 $CL_{mab}$ ,  $CL_{antigen}$ ,  $CL_{complex}$  はそれぞれ、中央コンパートメントからの遊離の抗体、遊離の標的抗原、複合体のクリアランスを示している。 $V_{1,mab}$ ,  $V_{1,antigen}$ ,  $V_{1,complex}$  はそれぞれ、中央コンパートメントにおける遊離の抗体、遊離の標的抗原、複合体の分布容積を示している。 $k_{12,mab}$ ,  $k_{12,antigen}$ ,  $k_{12,complex}$  はそれぞれ、中央コンパートメントから末梢コンパートメントへの遊離の抗体、遊離の標的抗原、複合体の分布速度定数を示している。 $k_{21,mab}$ ,  $k_{21,antigen}$ ,  $k_{21,complex}$  はそれぞれ、末梢コンパートメントから中央コンパートメントへの遊離の抗体、遊離の標的抗原、複合体の分布速度定数を示している。 $k_{on}$  は抗体と標的抗原の結合における結合速度定数を、 $k_{off}$  は解離速度定数を示している。 $F_{rec}$  はエンドソームで標的抗原を解離して血漿中にリサイクルされる遊離の抗体の割合を示している。 $k_{synth}$  は標的抗原の0次産生速度を示している。

PK/PD パラメータを算出するために、PK 試験における平均血漿中総抗 hsIL-6R 抗体及び総 hsIL-6R 濃度は TMDD with recycling mechanism model に当てはめられた。得られた平均血漿中総抗 hsIL-6R 抗体濃度は3つの抗体間（NPH-IgG1、PH-IgG1及び PH-Fx）で同等であり、また本試験では抗体の投与量が hsIL-6R の投与量に対して過剰であることから、得られた平均血漿中総抗 hsIL-6R 抗体濃度は血漿中遊離抗 hsIL-6R 抗

体濃度を示していると考えられる。このため、測定誤差が解析値に影響を及ぼすのを避けるために、各抗体間の遊離の抗体の PK パラメータは同等であると仮定した。また複合体の分布パラメータは以下の式のようにフリー抗体と同等であると仮定した。

$$k_{12,mab} = k_{12,complex} \quad (7)$$

$$k_{21,mab} = k_{21,complex} \quad (8)$$

$$V_{1,mab} = V_{1,complex} \quad (9)$$

$k_{on}$  (27.65 /day/nM for NPH-IgG1 and 38.88 /day/nM for PH-IgG1 and PH-Fx) ,  $k_{off}$  (38.88 /day for NPH-IgG1 and 39.74 /day for PH-IgG1 and PH-Fx) ,  $CL_{antigen}$ ,  $V_{1,antigen}$ ,  $k_{12,antigen}$ ,  $k_{21,antigen}$  は以前に報告している値を用いた [18]。NPH-IgG1, PH-IgG1, PH-Fx の  $F_{rec}$  はそれぞれ、0, 1, 1 と設定した。抗体は1分子で2つの標的抗原結合部位があるため、標的抗原結合部位当たりの抗体の分子量を75 kDa、hsIL-6R の分子量を37.8 kDa と設定した。

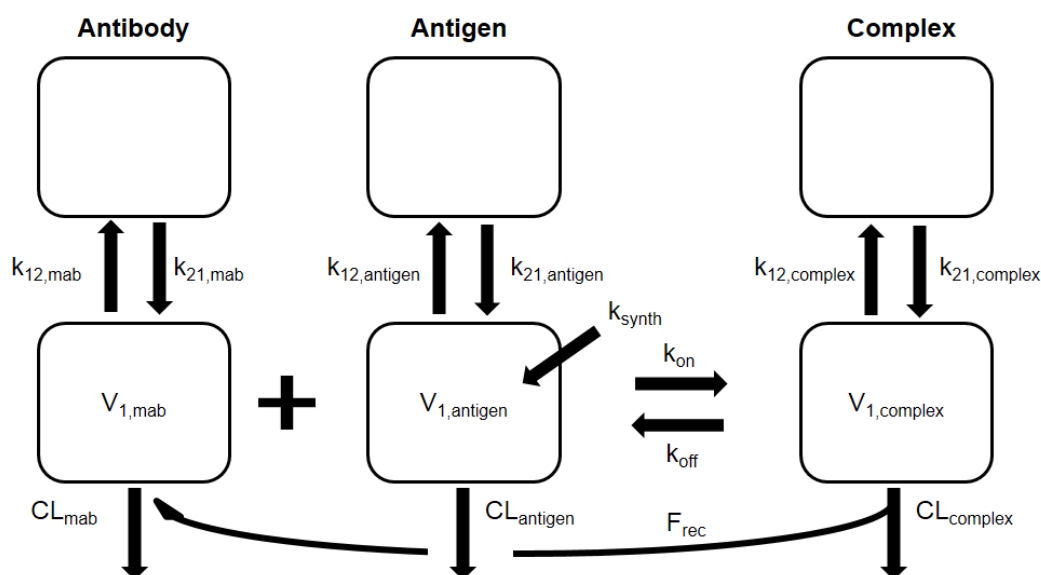


Figure 2. Target-mediated drug disposition (TMDD) with recycling mechanism model.

## PK/PD シミュレーション

Recycling antibody 及び sweeping antibody の優位性を検証するために2つのサロゲートエンドポイントを指標に PK/PD シミュレーションを実施した。まず1つ目のサロゲートエンドポイントとして遊離の標的抗原を90% ( $X_{1,antigen}/V_{1,antigen} < 0.1 * C_{ss,antigen}$ ) 阻害する期間を設定した。ヒト化抗 IgE 抗体が臨床において、IgE を90%阻害する事で薬効を示すことが報告されている事から [24]、阻害率として90%を選択した。 $C_{ss,antigen}$  は抗体投与前における標的抗原のベースライン濃度を示している。シミュレーションにおいて NPH-IgG1, PH-IgG1, PH-Fx は遊離の抗体の中央コンパートメントに2 mg/kg で単回静脈内投与した。シミュレーション結果から、遊離の標的抗原を90%阻害していた期間を算出した。シミュレーション結果に対する、 $C_{ss,antigen}$ ,  $CL_{antigen}$ ,  $KD$  ( $k_{off}/k_{on}$ ) の影響を評価するために、それぞれの値を変動させてシミュレーションを実施した。 $C_{ss,antigen}$  は0.01-100 nM、 $CL_{antigen}$  は50-5000 mL/day/kg の範囲で変動させた。 $k_{synth}$  は以下の式から算出した。

$$k_{synth} = C_{ss,antigen} * CL_{antigen} \quad (10)$$

$KD$  の影響は  $k_{off}$  もしくは  $k_{on}$  を変動させる事で評価した。初期設定として、 $k_{on} = 38.88$  /day/nM、 $k_{off} = 38.88$  /day を用いた。

2つ目のサロゲートエンドポイントとして遊離の標的抗原を1か月間90%阻害するために必要な抗体の投与量を設定した。シミュレーションにおいて NPH-IgG1, PH-IgG1, PH-Fx は遊離の抗体の中央コンパートメントに単回静脈内投与した。投与1か月後に遊離の標的抗原濃度が  $C_{ss,antigen}$  の10%になるように投与量を当てはめた。1つ目のサロゲートエンドポイントと同様に  $C_{ss,antigen}$ ,  $CL_{antigen}$ ,  $KD$  ( $k_{off}/k_{on}$ ) の影響を評価するために、それぞれの値を変動させてシミュレーションを実施した。

すべての解析は解析ソフトウェア SAAM II (The Epsilon Group, USA) を用いて実施した。



### 第三節 実験結果

#### ヒト FcRn への結合性評価

中性条件におけるヒト IgG1 のヒト FcRn に対する KD は非常に弱く、pH 7.4 では測定する事が難しいため、pH 7.0 における KD を評価した。pH 7.0 におけるヒト IgG1 のヒト FcRn に対する KD は 88000 nM であると以前に報告しており [18]、今回の評価では pH 7.0 における PH-Fx のヒト FcRn に対する KD は 44.8 nM と算出された。

#### hFcRn Tgm を用いた PK 試験

単回静脈内投与後の hFcRn Tgm における血漿中総抗体及び総 hsIL-6R 濃度は ELISA 及び ECLIA で測定した (Figure 3 A and B)。血漿中抗体濃度推移は2相性を示し、抗体間で同等の推移を示した。NPH-IgG1 と同時投与後の hsIL-6R のクリアランスは最も小さく、NPH-IgG1-hsIL-6R 複合体が FcRn を介したエンドソームからのリサイクルによりクリアランスが小さくなっている事を示唆している。PH-IgG1 と同時投与後の hsIL-6R のクリアランスは NPH-IgG1 よりも大きい事から、pH 依存的にエンドソームで hsIL-6R を解離する事で FcRn を介した hsIL-6R のエンドソームからのリサイクルを阻害したものと考えられる。さらに PH-Fx と同時投与後の hsIL-6R のクリアランスは PH-IgG1 よりも大きく、中性条件 (pH 7.4) における抗体の Fc 領域の FcRn への結合が細胞内への複合体の取り込みを促進させることで hsIL-6R のクリアランスを上昇させたものと考えられる。本試験内で抗薬物抗体の測定は実施しなかったが、すべての個体で抗薬物抗体産生を疑うような血中からの消失の加速は認められなかった。

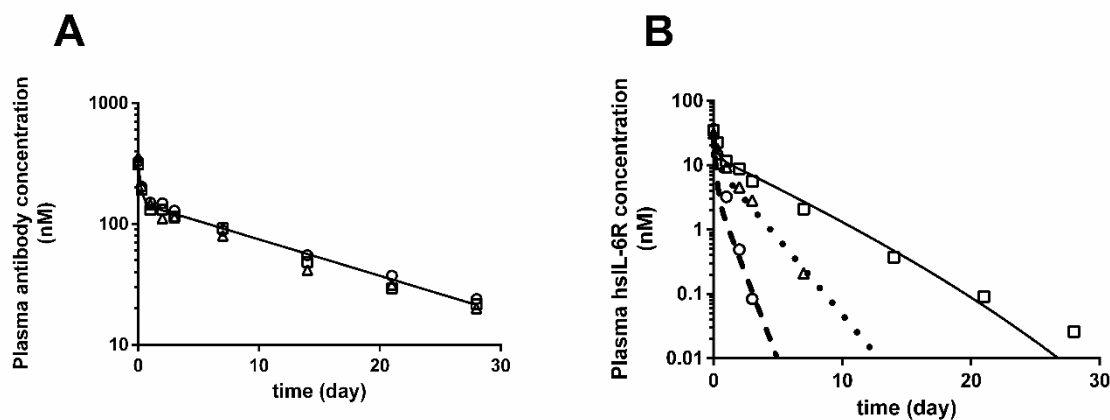


Figure 3. Mean plasma concentration-time profiles of antibody (A) and total hsIL-6R (B) in hFcRn Tgm co-injection model and fitting curve of plasma antibody (A) and total hsIL-6R (B) concentration-time profiles. Open squares indicate the observed mean values of NPH-IgG1, open triangles indicate PH-IgG1, and open circles indicate PH-Fx. Solid lines indicate the fitting lines of NPH-IgG1, dotted lines indicate PH-IgG1, and broken lines indicate PH-Fx.

*Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. Figure 2

#### PK/PD パラメータの算出

測定した血漿中抗体濃度及び総 hsIL-6 濃度は TMDD with recycling mechanism model に良く当てはまり (Figure 3 A and B)、各 PK/PD パラメータを算出した (Table 1)。すべてのパラメータは CV 30% 以内に算出された。CL<sub>mab</sub> 及び V<sub>1,mab</sub> はそれぞれ 6.1 ml/d/kg、40.6 ml/kg と算出され、ヒトにおける一般的なヒト IgG の値と同等であった [25, 26, 27]。抗体間の血漿中抗体濃度推移は同等であったが、CL<sub>complex,PH-IgG1</sub> は CL<sub>complex,NPH-IgG1</sub> よりも約 3 倍大きく、またさらに CL<sub>complex,PH-Fx</sub> は CL<sub>complex,NPH-IgG1</sub> よりも約 10 倍大きい値を示した。

Table 1. PK/PD parameters estimated from hFcRn Tgm co-injection study.

Parameter	Unit	Value	CV (%)
$CL_{\text{antigen}}$	ml/d/kg	267 (fix)	-
$V_{1,\text{antigen}}$	ml/kg	57.2 (fix)	-
$k_{12,\text{antigen}}$	/d	2.09 (fix)	-
$k_{21,\text{antigen}}$	/d	3.06 (fix)	-
$CL_{\text{mab}}$	ml/d/kg	6.1	1.87
$V_{1,\text{mab}}$	ml/kg	40.6	4.83
$k_{12,\text{mab}}$	/d	2.32	18.9
$k_{21,\text{mab}}$	/d	2.07	15.7
$CL_{\text{complex, NPH-IgG1}}$	ml/d/kg	17.8	7.26
$CL_{\text{complex, PH-IgG1}}$	ml/d/kg	53.2	5.82
$CL_{\text{complex, PH-Fx}}$	ml/d/kg	185	11.2

$CL_{\text{antigen}}$  ; clearance from the central compartment of free antigen,  $V_{1,\text{antigen}}$  ; volume of distribution of free antigen in the central compartment,  $k_{12,\text{antigen}}$  ; distribution rate constant of free antigen from the central to the peripheral compartment,  $k_{21,\text{antigen}}$  ; distribution rate constant of free antigen from the peripheral to the central compartment,  $CL_{\text{mab}}$  ; clearance from the central compartment of free antibody,  $V_{1,\text{mab}}$  ; volume of distribution of free antibody in the central compartment,  $k_{12,\text{mab}}$  ; distribution rate constant of free antibody from the central to the peripheral compartment,  $k_{21,\text{mab}}$  ; distribution rate constant of free antibody from the peripheral to the central compartment,  $CL_{\text{complex, NPH-IgG1}}$  ; clearance from the central compartment of NPH-IgG1-hsIL-6R complex,  $CL_{\text{complex, PH-IgG1}}$  ; clearance from the central compartment of PH-IgG1-hsIL-6R complex,  $CL_{\text{complex, PH-Fx}}$  ; clearance from the central compartment of PH-Fx-hsIL-6R complex

*Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. Table 1

#### PK/PD シミュレーション (90%阻害期間)

hFcRn Tgm PK 試験結果から算出した PK/PD パラメータを用いて、異なる血漿中濃度 (0.01, 1, 100 nM)、消失クリアランス (50, 500, 5000 ml/day/kg)、抗体との結合性 (0.01, 0.1, 1, 10 nM) を有する様々な標的抗原に対する recycling antibody 及び sweeping antibody の有用性を評価した。血漿中総抗体濃度、総標的抗原濃度、遊離標的抗原濃度のシミュレーション結果の例を Figure 4 に示した。Figure 4 は、標的抗原プロファイ

ルとして血漿中濃度 0.01 nM、消失クリアランス 50 ml/day/kg、抗体との KD が 1 nM の条件でシミュレーションした結果を示している。血漿中総抗体濃度は、NPH-IgG1, PH-IgG1, PH-Fx で同等の推移を示した。NPH-IgG1 投与後、抗体が標的抗原と結合し、消失クリアランスを低下させることから血漿中総標的抗原濃度の上昇を示した (Figure 4 B)。PH-IgG1 投与後、NPH-IgG1 と比較して約 3 倍の血漿中総標的抗原濃度の低下を示した。さらに PH-Fx 投与後、NPH-IgG1 と比較して約 10 倍の血漿中総標的抗原濃度の低下を示した。また Figure 4 C に示すように、総標的抗原濃度の低下に比例して遊離標的抗原濃度の低下が示されており、recycling antibody 及び sweeping antibody は総標的抗原濃度を低下させることで遊離標的抗原濃度を低下出来る事が示された。

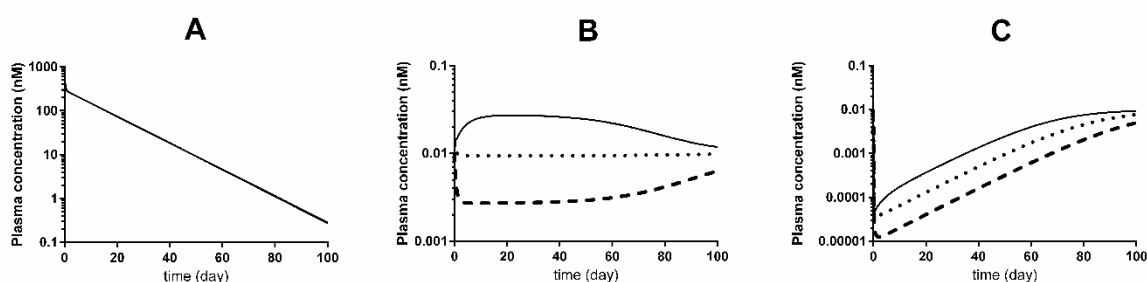


Figure 4. Simulated profiles of total antibody (A), total antigen (B), and free antigen (C) concentration after administration of antibody. Solid lines indicate NPH-IgG1, dotted lines indicate PH-IgG1, and broken lines indicate PH-Fx.

*Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. Figure 3

Recycling antibody 及び sweeping antibody の有用性を評価するために、まず 1 つ目のサロゲートエンドポイントとして 2 mg/kg で遊離の標的抗原を 90% 阻害する期間を設定した。血漿中標的抗原濃度及び消失クリアランスを変動させることで、9 つの異なるプロファイルを持つ標的抗原 (3 つの異なる血漿中濃度 (0.01, 1, 100 nM) 及び 3 つの異なる消失クリアランス (50, 500, 5000 ml/day/kg) の組み合わせ) でのシミュレーションを実施した (Figure 5 and 6)。さらにそれぞれの標的抗原プロファイルにおいて、 $k_{on}$  (Figure 5) もしくは  $k_{off}$  (Figure 6) を変動させることで、KD 変動の影響をシミュレーションした。

ほとんどの標的抗原において、KD の低下 (= 結合性の増強) により 90% 阻害期間の延長を示した。これは KD を低下させることで中和に必要な抗体量が低減されたた

めであると考えられる。抗体投与前の血漿中標的抗原濃度が高い場合 (Figure 5 C, F, I and Figure 6 C, F, I) において、NPH-IgG1 はほとんど 90% 阻害を示すことができなかつた。これは 2 mg/kg の投与量で中和するには標的抗原濃度が高すぎるためであると考えられる。しかし、血漿中標的抗原濃度が高く、消失クリアランスが遅い抗原の場合 (Figure 5 C and Figure 6 C) において、NPH-IgG1 は 3 日間しか 90% 阻害を維持できなかったが、PH-IgG1 は約 20 日間、PH-Fx は約 40 日間 90% 阻害を維持していた。また抗体投与前の血漿中標的抗原濃度が低いもしくは中程度の抗原の場合においても、NPH-IgG1 と比較して、PH-IgG1 及び PH-Fx は 90% 阻害期間を延長する事が示された。

$k_{off}$  を変動させた際のシミュレーション結果において、KD を低下させることによる 90% 阻害期間の延長効果に飽和性が認められたが、 $k_{on}$  を変動させる事でこの飽和性が認められなくなった。血漿中標的抗原濃度が高く、消失クリアランスが中程度もしくは大きい場合を除いて、ほとんどの標的抗原プロファイルにおいて、recycling antibody 及び sweeping antibody の有用性が示された。血漿中標的抗原濃度が高く、消失クリアランスが中程度もしくは大きい場合においては、2 mg/kg の投与量では sweeping antibody でも中和を持続する事ができなかったが、そういった場合においても投与量を上げることで中和する事が可能であると考えられ、投与量を上げることで sweeping antibody の有用性が示されると考えられる。

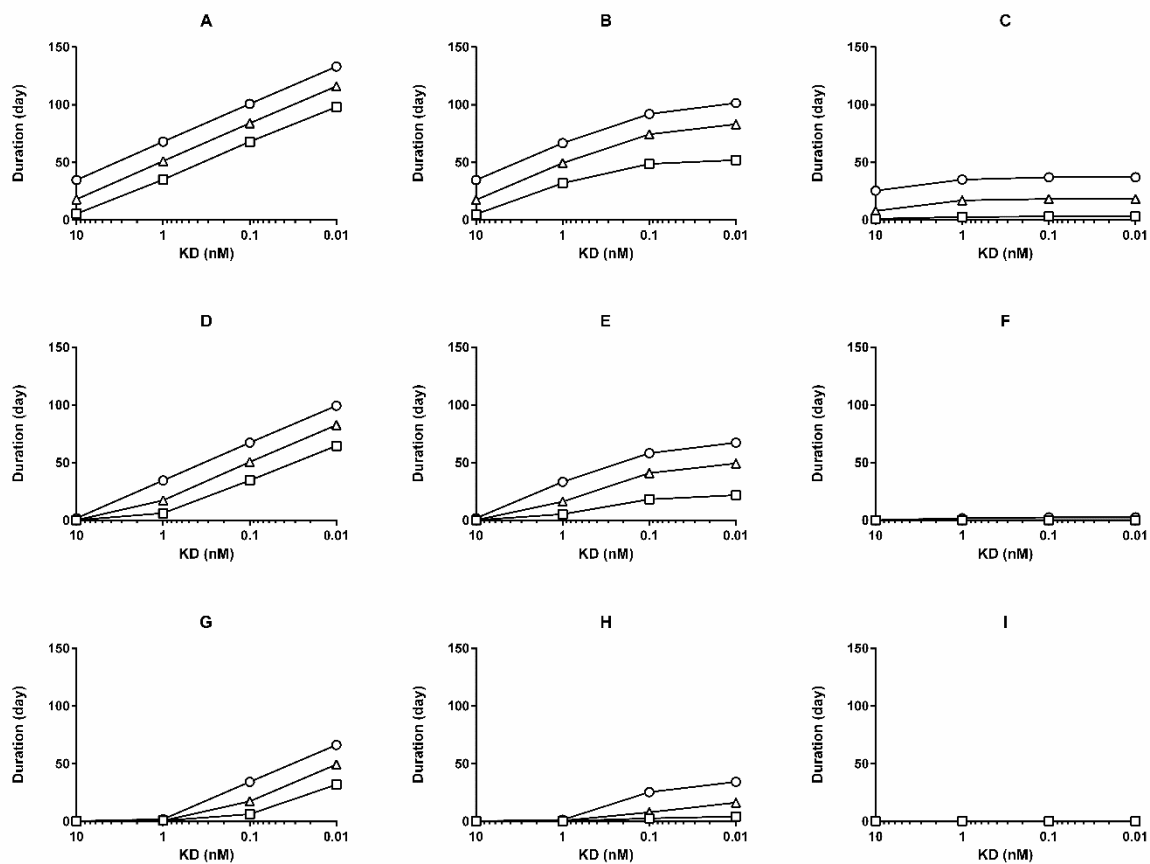


Figure 5. Simulation of duration of 90% inhibition by changing  $k_{on}$ .  $C_{ss,antigen}$ : A, D, G (0.01 nM), B, E, H (1 nM), C, F, I (100 nM).  $CL_{antigen}$ : A, B, C (50 ml/day/kg), D, E, F (500 ml/day/kg), G, H, I (5000 ml/day/kg). Open squares indicate the observed values of NPH-IgG1, open triangles indicate PH-IgG1, and open circles indicate PH-Fx. Antibodies were singly administered at 2 mg/kg.

*Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. Figure 4

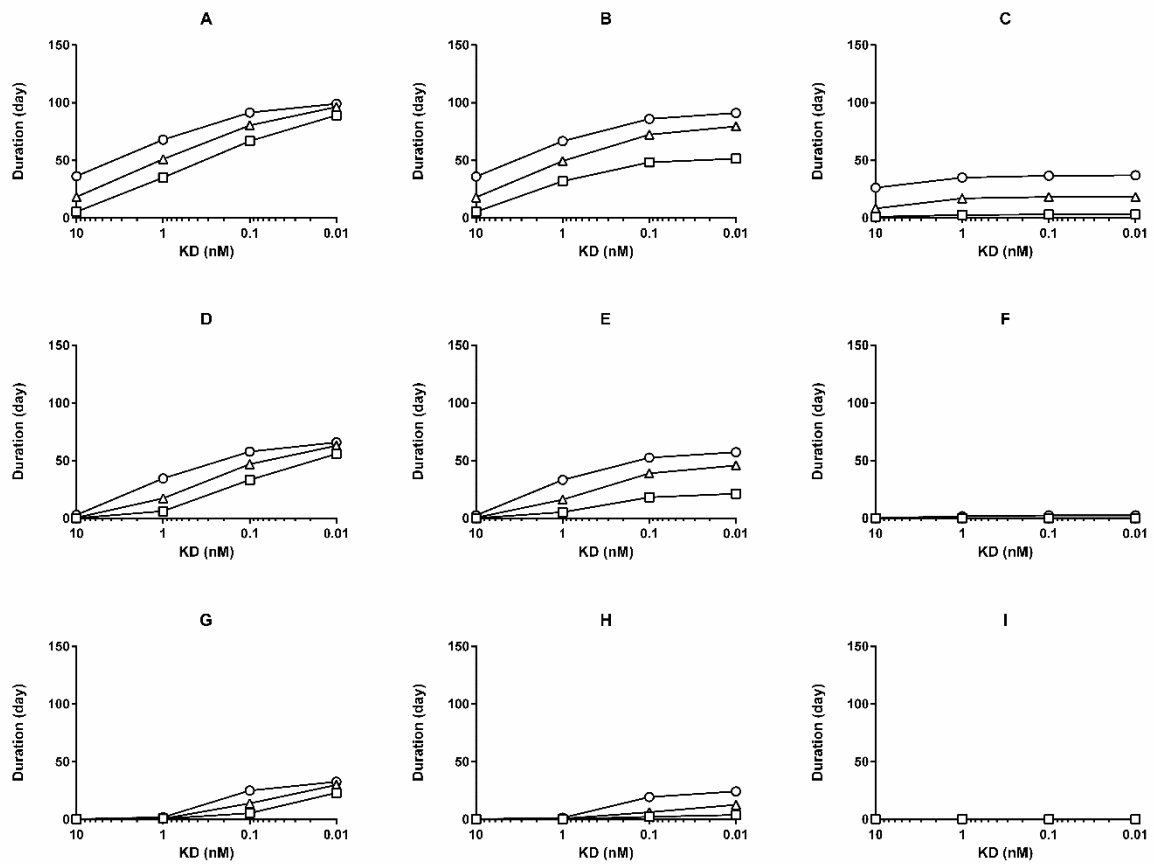


Figure 6. Simulation of duration of 90% inhibition by changing  $k_{off}$ .  $C_{ss,antigen}$ : A, D, G (0.01 nM), B, E, H (1 nM), C, F, I (100 nM).  $CL_{antigen}$ : A, B, C (50 ml/day/kg), D, E, F (500 ml/day/kg), G, H, I (5000 ml/day/kg). Open squares indicate the observed values of NPH-IgG1, open triangles indicate PH-IgG1, and open circles indicate PH-Fx. Antibodies were singly administered at 2 mg/kg.

*Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. Figure 5

## PK/PD シミュレーション (遊離の標的抗原を1か月間90%阻害するために必要な投与量)

2つ目のサロゲートエンドポイントとして遊離の標的抗原を1か月間90%阻害するために必要な投与量を設定した。血漿中標的抗原濃度及び消失クリアランスを変動させることで、9つの異なるプロファイルを持つ標的抗原 (3つの異なる血漿中濃度 (0.01, 1, 100 nM) 及び3つの異なる消失クリアランス (50, 500, 5000 ml/day/kg) の組み合わせ) でのシミュレーションを実施した (Figure 7 and 8)。さらにそれぞれの標的抗原プロファイルにおいて、 $k_{on}$  (Figure 7) もしくは  $k_{off}$  (Figure 8) を変動させることで、KD 変動の影響をシミュレーションした。シミュレーションの結果、 $CL_{antigen}$  が高いほど高い投与量が必要であった。 $CL_{complex,PH-Fx}$  が  $CL_{complex,NPH-IgG1}$  よりも約10倍大きいので、sweeping antibody は約10倍の必要な投与量の低減効果を示した。90%阻害期間のシミュレーションと同様に、 $k_{off}$  を変動させた際のシミュレーション結果において、KD を低下させることにより遊離の標的抗原を1か月間90%阻害するために必要な投与量の低減効果に飽和性が認められた。しかし、 $k_{on}$  を変動させる事でこの飽和性は認められなくなった。特に血漿中濃度が低い抗原プロファイルでこの飽和性が認められたが、 $k_{on}$  を変動させることで認められなくなり、sweeping antibody の有用性がすべての標的抗原プロファイルで示された。



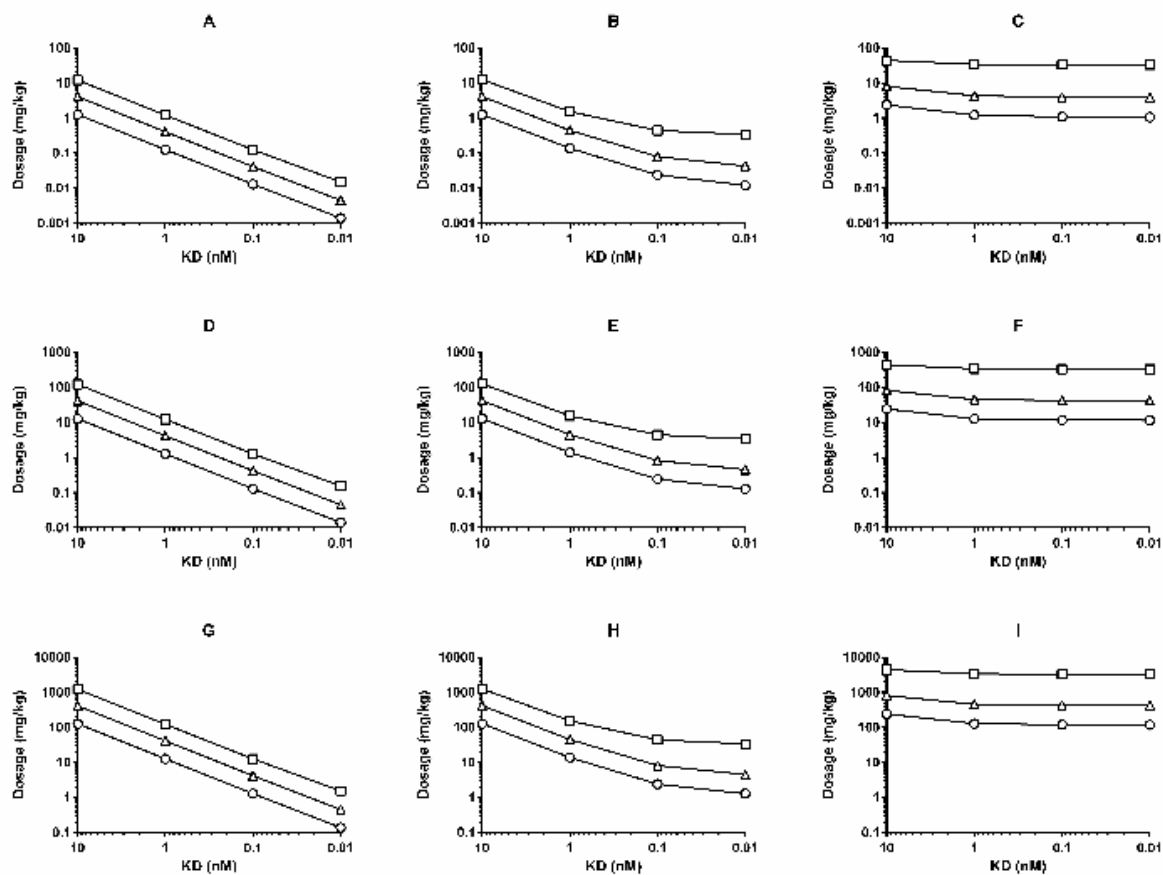


Figure 7. Simulation of required dosage to achieve 90% inhibition for 1 month by changing  $k_{on}$ .  $C_{ss,antigen}$ : A, D, G (0.01 nM), B, E, H (1 nM), C, F, I (100 nM).  $CL_{antigen}$ : A, B, C (50 ml/day/kg), D, E, F (500 ml/day/kg), G, H, I (5000 ml/day/kg). Open squares indicate the observed values of NPH-IgG1, open triangles indicate PH-IgG1, and open circles indicate PH-Fx.

*Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. Figure 6

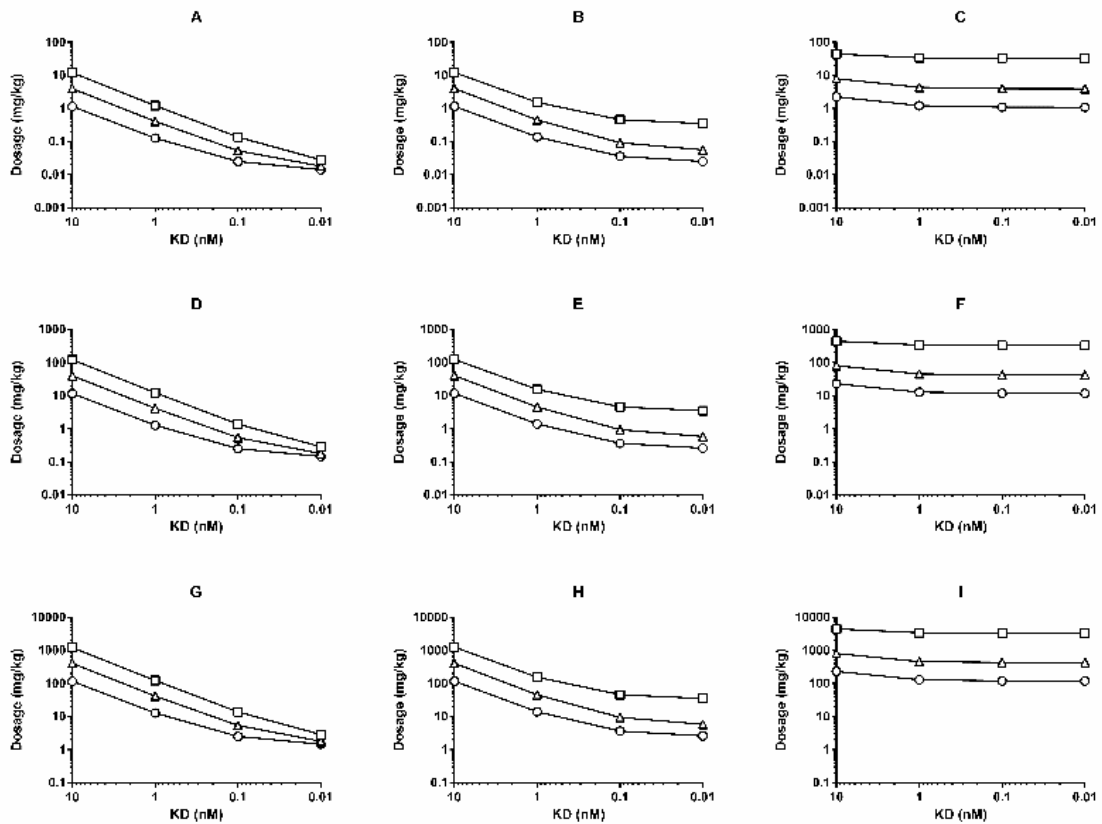


Figure 8. Simulation of required dosage to achieve 90% inhibition for 1 month by changing  $k_{off}$ .  $C_{ss,antigen}$ : A, D, G (0.01 nM), B, E, H (1 nM), C, F, I (100 nM).  $CL_{antigen}$ : A, B, C (50 ml/day/kg), D, E, F (500 ml/day/kg), G, H, I (5000 ml/day/kg). Open squares indicate the observed values of NPH-IgG1, open triangles indicate PH-IgG1, and open circles indicate PH-Fx.

*Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, 31(2), 123-132. Figure 7

#### 第四節 考察

本研究では、recycling antibody 及び sweeping antibody の有用性を、hFcRn Tgm PK 試験結果から算出した PK/PD パラメータを用いた TMDD with recycling mechanism model でシミュレーションした。hFcRn Tgm はマウス FcRn の代わりにヒト FcRn を発現しており、ヒトにおける抗体の PK を良好に予測できると報告されている [28, 29]ことから、本研究での評価に使用した。可溶性標的抗原に対する pH 依存性のない一般的な抗体を、標的抗原と共にマウスに投与することで、抗体-標的抗原複合体の消失クリアランスが低下することが報告されている [30, 31]。これは抗体-標的抗原複合体がエンドソームにおいて FcRn に結合し、血漿中へリサイクルされるため、また分子量の増大による腎排泄の低下のためと考えられる。このように抗体と標的抗原を共に投与する事で、抗体-標的抗原複合体の消失クリアランスを評価できると考えられるため、本研究における recycling antibody 及び sweeping antibody の評価に本方法を用いた。

抗体の標的となりうる可溶性の抗原は血漿中において様々な消失クリアランス及び内因性濃度を有する事が知られている。例えば、adalimumab、infliximab、golimumab などの抗体の標的抗原である TNF $\alpha$ は血漿中で非常に大きな消失クリアランス及び低い内因性濃度 (pg/mL) を有する事が知られており [32, 33]、また omalizumab の標的抗原である immunoglobulin E (IgE) は血漿中で小さな消失クリアランス及び高い内因性濃度 (ng- $\mu$ g/mL) を有する事が知られている [34, 35]。理論的には、抗体投与後の血漿中総標的抗原濃度の上昇は、標的抗原の消失クリアランスと抗体-標的抗原複合体の消失クリアランスの比によって決定される。そのため、大きな消失クリアランスを有する標的抗原 (IL-6 や hepcidin など) の場合、抗体投与により高い血漿中総標的抗原濃度の上昇が予想される [36, 37]。標的抗原プロファイルは抗体の薬効、必要投与量、投与頻度に影響を与えると予想でき、実際に今回のシミュレーション結果からも、抗体投与前の通常条件下において高い血漿中濃度を示す標的抗原もしくは大きな消失クリアランスを有する標的抗原に対しては、標的抗原を中和するための抗体にはより高い投与量および頻回投与が必要であると示された。

投与経路は医薬品使用における利便性を考える上で非常に重要であると考えられる。抗体医薬品においては、静脈内投与に比べて皮下投与が利便性の面で優れており、在宅による自己注射も実現可能である事から患者の QOL を改善できる投与経路として期待されている。一般的に抗体医薬品の臨床における皮下投与製剤は200 mg/mL の濃度が限界であり、また投与可能な容量が約1 mL であることから、ヒトにおいて抗体医薬品の皮下投与量は2-3 mg/kg が限界である。このため、高い投与量が必要な標的抗原に対しては皮下投与が適用できないという問題が存在する。本研究におけるシミュレーション結果では、recycling antibody 及び sweeping antibody が中和に必要な投与量を低減できる事が示されている。特に Figure 7 E, H, C 及び Figure 8 E, H, C において、低い KD を持

つ NPH-IgG1 (conventional antibody) でも2 mg/kg の投与量における有効性を達成できなかったが、sweeping antibody はいずれの標的抗原においても2 mg/kg の投与量における有効性を達成した。このように conventional antibody では皮下投与が適用不可能な標的抗原に対しても、recycling antibody 及び sweeping antibody は皮下投与が適用可能になる可能性を有しており、患者の QOL 改善に大きく貢献できる可能性がある。また静脈内投与においても、高すぎる投与量は臨床で使用する事ができない。Eculizumab は非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の治療薬として承認されており、1200 mg (体重75 kg 換算で16 mg/kg) の静脈内投与を必要とする、承認されている抗体医薬品の中でも最も高い投与量を必要とするものの1つである。シミュレーション結果から、高い血漿中標的抗原濃度もしくは大きな消失クリアランスを有する標的抗原において、conventional antibody は100 mg/kg を超える投与量が必要であるケースが認められたが、recycling antibody 及び sweeping antibody は必要投与量を非現実的な値から現実的な値へと低減できる事が示された。この結果から、conventional antibody では標的にできない抗原に対して、recycling antibody 及び sweeping antibody を適用する事で初めて標的可能になりえる事が示され、抗体医薬品で標的可能な抗原の範囲を拡大できる可能性が示された。

慢性疾患を治療する上で、医薬品の投与頻度も非常に重要な因子である。抗体医薬品を含むバイオ医薬品はほとんどが注射剤であり、投与の際に病院を訪問する必要がある。特に小児患者に多いとされる投与の際の恐怖及び苦痛を持つ患者も存在し、例えば皮下投与製剤であっても頻回投与を必要とする場合に患者の QOL を低下させる可能性が高い。投与頻度の低減は、病院への訪問頻度の低減、また投与の際の恐怖及び苦痛を感じる頻度の低減を実現可能であり、患者の QOL を改善できる事が期待できる。シミュレーション結果から、高い血漿中標的抗原濃度及び小さな消失クリアランスを有する標的抗原 (Figure 5 C 及び6 C) において、conventional antibody は約3日間しか標的抗原の90%中和を維持できなかったが、recycling antibody は約20日間標的抗原の90%中和を維持し、さらに sweeping antibody は約40日間も標的抗原の90%中和を維持できる可能性が示された。これらの結果は、様々な標的抗原において、conventional antibody に対して recycling antibody 及び sweeping antibody が投与頻度を低減できる可能性を示している。

本研究におけるシミュレーションの結果、いくつかの標的抗原プロファイルにおいて、KD を低下させることによる必要投与量及び投与頻度の低減効果に飽和が認められた。この飽和現象を説明する仮説として、現在2つの可能性について考えている。1つ目が  $k_{off}$  及び  $k_{complex}$  のバランスである。定常状態を仮定すると、式(3)-(6)は以下のように変換できる。

$$0 = -\frac{CL_{antigen}}{V_{1,antigen}} * X_{1,antigen} - k_{12,antigen} * X_{1,antigen} + k_{21,antigen} * X_{2,antigen} - k_{on} *$$

$$\frac{X_{1,antigen}}{V_{1,antigen}} * X_{1,mab} + k_{off} * X_{1,complex} + k_{synth} \quad (11)$$

$$0 = k_{12,antigen} * X_{1,antigen} - k_{21,antigen} * X_{2,antigen} \quad (12)$$

$$0 = -\frac{CL_{complex}}{V_{1,complex}} * X_{1,complex} - k_{12,complex} * X_{1,complex} + k_{21,complex} * X_{2,complex} + k_{on} *$$

$$\frac{X_{1,antigen}}{V_{1,antigen}} * X_{1,mab} - k_{off} * X_{1,complex} \quad (13)$$

$$0 = k_{12,complex} * X_{1,complex} - k_{21,complex} * X_{2,complex} \quad (14)$$

さらに式(13)及び(14)から以下の式に変換できる。

$$X_{1,complex} = \frac{\left( k_{on} * \frac{X_{1,antigen} * X_{1,mab}}{V_{1,antigen}} \right)}{\left( k_{off} + \frac{CL_{complex}}{V_{1,complex}} \right)} \quad (15)$$

さらに式(10)-(12)及び(15)から以下の式に変換できる。

$$\frac{C_{1,antigen}}{C_{ss,antigen}} = \frac{\left( \frac{(k_{off} + k_{complex}) * k_{antigen}}{k_{complex} * k_{on}} \right)}{\left( \frac{(k_{off} + k_{complex}) * k_{antigen}}{k_{complex} * k_{on}} + \frac{X_{1,mab}}{V_{1,antigen}} \right)} \quad (16)$$

$k_{complex}$  は複合体の中央コンパートメントからの消失速度定数を示している。 $k_{antigen}$  は遊離の標的抗原の中央コンパートメントからの消失速度定数を示している。 $C_{1,antigen}$  は中央コンパートメントにおける遊離の標的抗原の濃度を示している。 $C_{ss,antigen}$  は抗体投与前の中央コンパートメントにおける遊離の標的抗原の濃度（ベースライン濃度）を示している。 $V_{1,antigen}$  と  $V_{1,mab}$  の値が近いため、 $X_{1,mab}/V_{1,antigen}$  は遊離の抗体の中央コンパートメントにおける濃度と考えることができる。式(17)を  $K_m$  と仮定すると、式(16)から式(18)に変換できる。

$$K_m = \frac{(k_{off} + k_{complex}) * k_{antigen}}{k_{complex} * k_{on}} \quad (17)$$

$$\frac{C_{1,antigen}}{C_{ss,antigen}} = \frac{K_m}{\left(K_m + \frac{X_{1,mab}}{V_{1,antigen}}\right)} \quad (18)$$

$C_{1,antigen}/C_{ss,antigen}$  は定常状態における抗体投与による遊離の標的抗原濃度の減少率を示している。もし  $X_{1,mab}/V_{1,antigen}$  が  $K_m$  よりも非常に小さな値である場合、 $C_{1,antigen}/C_{ss,antigen}$  は 1 となる。つまり、 $K_m$  に比べて血漿中の遊離の抗体濃度が非常に低い場合は、標的抗原を中和する事ができない。一方  $X_{1,mab}/V_{1,antigen}$  が  $K_m$  よりも非常に大きな値である場合、 $C_{1,antigen}/C_{ss,antigen}$  は 0 に近づく。つまり、 $K_m$  に比べて血漿中の遊離の抗体濃度が非常に高い場合は、標的抗原をほぼ完全に中和する事ができる。上記の式より、標的抗原をどの程度中和できるかどうかは遊離の抗体濃度と  $K_m$  のバランスにより決まる事がわかり、中和率を上げるには遊離の抗体濃度を増加させるか、 $K_m$  を低下させるか、もしくはその両方により達成できる。

式(17)は、 $k_{off} \gg k_{complex}$  の場合、式(19)に近似できる。

$$K_m = \frac{k_{off} * k_{antigen}}{k_{complex} * k_{on}} \quad (19)$$

この場合、KD ( $k_{off}/k_{on}$ ) の変動が直接  $K_m$  に影響するため、アミノ酸改変による affinity maturation により KD を低下 ( $k_{off}$  を低下もしくは  $k_{on}$  を増加) させれば  $K_m$  が低下し、標的抗原の中和率が向上する事で薬効を増強する事が可能である。

一方、式(17)は、 $k_{off} \ll k_{complex}$  の場合、式(20)に近似できる。

$$K_m = \frac{k_{antigen}}{k_{on}} \quad (20)$$

この場合、 $K_m$  は  $k_{on}$  の変動により影響を受けるが、 $k_{off}$  の変動には影響を受けない。つまり、 $k_{off}$  を低下させることにより KD を低下させても  $K_m$  は変動せず、標的抗原の中和率は変化しないため、Figure 6 及び 8 で認められた  $k_{off}$  の低下による必要投与量の低下及び 90% 阻害期間の延長効果に飽和が認められたものと考えられる。さらに式(20)に従うと、 $k_{on}$  の上昇では  $K_m$  を低下する事が可能であるため、Figure 5 及び 7 では、飽和現象が改善されたものと考えられる。つまり、 $k_{off} \ll k_{complex}$  の場合においては、 $k_{on}$  を上昇させる事が標的抗原の中和率を向上できる事から、抗体のアミノ酸改変作業においてもその点を考慮すればさらなる薬効の改善が期待できる。

飽和現象が起こる2つ目の可能性は、非常に高い標的抗原濃度にある。シミュレーションにおいても標的抗原濃度が高い C, F, I の条件においては、Figure 5, 6, 7, 8 のいずれの条件においても KD を低下させる事による必要投与量の低下及び 90% 阻害期間の延長

効果に飽和が認められ、 $k_{on}$ の上昇でも改善されなかった。式(15)において、 $K_m$ は標的抗原を50%中和するために必要な遊離の抗体濃度と定義されている。 $KD$ を低下させるということは、 $k_{off}$ を低下させる、もしくは $k_{on}$ を上昇させることにより $K_m$ を低下させ、中和に必要な遊離の抗体量を低減することで投与量の低下及び90%阻害期間の延長効果を発揮すると考えられる。しかし、標的抗原濃度が高い場合においては、 $K_m$ に対して標的抗原濃度が高すぎるために、中和に必要な総抗体濃度（複合体濃度+遊離の抗体濃度）に占める遊離の抗体濃度が小さく、 $K_m$ を低下させても中和に必要な総抗体濃度はほとんど低下させる事ができない。このため、標的抗原濃度が高い場合において $KD$ を低下させる事による必要投与量の低下及び90%阻害期間の延長効果に飽和が認められるものと考えられる。このような標的抗原においては、複合体濃度を低下させる事により中和に必要な総抗体濃度を低下させる事が可能であると考えられ、**recycling antibody** 及び **sweeping antibody** が有効であると考えられる。

アミノ酸改変により標的抗原に対する $KD$ を低下させ、薬効発現に必要な抗体濃度を低下させる事を目的とした **Affinity maturation** は抗体の薬効を向上するために頻繁に適用される技術である [38, 39]。シミュレーション結果からも $KD$ の低下により中和に必要な投与量の低減及び投与期間の延長を達成できる事が示されているが、標的抗原プロファイルによってはその効果が不十分な場合もある。このような場合でも、**recycling antibody** 及び **sweeping antibody** と **affinity maturation** を組み合わせる事でさらなる投与量の低減及び投与期間の延長効果を発揮できる事から、中性条件で非常に強い標的抗原への結合性（小さい $KD$ ）を持ち、酸性条件では非常に弱い標的抗原への結合性（大きい $KD$ ）に変化し、さらに中性条件で **FcRn** に結合できる性質を持つ抗体を作製する事で、**conventional antibody** では達成できない投与量、投与頻度、標的にできる抗原を達成できる可能性がある。また **affinity maturation** と同様に他の抗体技術との組み合わせに関しても両立可能であり、今後更なる適用範囲の拡大が期待される。

本研究において、**TMDD with recycling mechanism model** を用いた **PK/PD** 解析により **recycling antibody** 及び **sweeping antibody** の広域な標的抗原プロファイルにおける適用価値が示された。異なる消失クリアランス及び血漿中濃度を持つ標的に対して、必要な抗体の投与量の低減及び投与期間の延長を達成できる可能性がある。さらに **affinity maturation** との組み合わせにより効果をさらに向上可能であり、**conventional antibody** では達成できない価値を患者に提供する事で、患者の **QOL** を大きく改善する事が期待できる。またこのような **PK/PD** 解析は **recycling antibody** 及び **sweeping antibody** のような新規抗体医薬品候補物質の標的抗原を選別する際に非常に有用であり、効率的な非臨床開発に大きく貢献できると考えられる。

## 第二章 抗体医薬品の薬物動態スクリーニング動物としての human FcRn transgenic mouse の有用性評価

### 第一節 緒言

長い半減期は抗体医薬品の特徴であり、これはピノサイトーシスで細胞に取り込まれた抗体が酸性条件であるエンドソームで FcRn に結合し、抗体-FcRn 複合体が細胞表面へリサイクルされ、中性条件である血中で抗体が FcRn から解離するというメカニズムに依存している。FcRn 欠損マウスに抗体を投与すると、WT マウスよりも半減期が大幅に低下する事が報告されており、抗体の体内動態における FcRn の重要性が多数報告されている [40, 41]。抗体と FcRn の結合に関してこれまで、ヒト、サル、ラット、マウス等において報告されているが、その結合性には種差が認められている [42, 43]。

通常、抗体医薬品を創製する過程で、臨床において免疫原性を低下させることを目的に、アミノ酸配列をヒト IgG 配列に置換するヒト化という作業を行う。特に標的抗原結合性に関与しない constant region はすべてヒト IgG 配列に置換されることから、ほとんどの抗体医薬品は constant region にヒト IgG 配列を保有している。抗体は constant region の中でも Fc 領域が FcRn と結合する事が知られており、ヒト IgG 配列を有する抗体医薬品の非臨床開発ではヒト IgG 配列の Fc 領域と各動物種の FcRn との結合性を考慮する必要がある。FcRn 結合性における種差で特に注目すべきは、ヒト IgG の Fc 領域とマウス FcRn の結合性が、ヒト IgG の Fc 領域とヒト FcRn の結合性より強い点であり、マウスでヒト IgG 配列を有する抗体医薬品の体内動態を評価する事では、ヒトでの体内動態を模倣する事は難しいと想定される [11]。一方、ヒト IgG のカニクイザル FcRn への結合性が、ヒト IgG のヒト FcRn への結合性と似ていると報告されており、ヒトでの抗体医薬品の体内動態を予測するための動物種としてカニクイザルが汎用されている。実際にヒトにおける抗体医薬品の CL や  $Vd_{ss}$  をカニクイザルから allometric scaling 法により良好に予測可能である事が報告されている [44, 45]。また標的抗原のアミノ酸相同性という点においても、ヒトとカニクイザル間で高い相同性を有するケースが多く、薬効試験及び毒性評価の面からも抗体医薬品の非臨床試験においてカニクイザルは非常に重要な動物種である。しかし、動物愛護の観点や、経済的な理由により頻繁にカニクイザルを使用するのは難しい。抗体医薬品の体内動態スクリーニングのためには、より簡便に使用でき、かつヒトへの外挿性が高い動物種が望まれている。

抗体医薬品と同様に、近年 Fc 融合タンパク質という医薬品も増加傾向にある。Fc 融合タンパク質は、膜結合タンパク質の細胞外ドメインや可溶性タンパク質をヒト IgG の Fc 領域に結合させた分子形を有しており、FcRn によるリサイクルを利用して



長い半減期を示す事が知られている。Fc 融合タンパク質はこの長い半減期により利便性を改善することで既存のタンパク質医薬品との差別化を可能としている。Fc 融合タンパク質はエンドソームにおける Fc 部分の FcRn への結合を介したリサイクルを利用している点で、抗体医薬品と同様の体内動態メカニズムを有しており、抗体医薬品同様に簡便かつ有用な非臨床体内動態スクリーニングツールが望まれる。

抗体の血中からの消失メカニズムは大きく分けて、標的抗原依存的消失と非依存的消失の2つに分類できる。標的抗原依存的消失は標的抗原の特性に依存する部分があるが、標的抗原非依存的消失は抗体自体の特性により大きく影響を受け、ピノサイトーシスによる細胞への取り込み速度及び FcRn によるエンドソームからのリサイクル率等により決定される。抗体はその高い標的抗原特異性のために通常マウスの標的抗原には結合できない事から、マウスにおける体内動態試験は標的抗原非依存的消失を評価する事になる。

本研究ではヒト FcRn を発現している遺伝子改変マウス (hFcRn Tgm) を用いて、抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の非臨床体内動態スクリーニングへの有用性を評価した。hFcRn Tgm は The Jackson Laboratory 社が開発した遺伝子改変マウスで、マウス FcRn  $\alpha$  鎖を欠損し、ヒト FcRn  $\alpha$  鎖を保有しており [46]、FcRn 結合性の種差の問題を解決し、かつ小動物である事から簡便なスクリーニング動物としての有用性が期待される。本研究では客観的なデータの信頼性を保証するために、すでに医薬品として承認されている抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質を評価に使用した。これらの抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質を hFcRn Tgm 及び wild type (WT) マウスに静脈内投与し、半減期を算出し、またカニクイザルにおける半減期を公開されているデータから収集し、ヒトにおける半減期との比較を行う事で、標的抗原非依存的消失を見積もる上で他の動物種に対する hFcRn Tgm の有用性を評価した。

## 第二節 実験材料及び方法

### データ収集

本研究ではヒトにおける半減期が入手可能な承認取得済みの11の抗体医薬品及び2つのFc融合タンパク質を使用した。Table 2に本研究で使用した抗体医薬品及びFc融合タンパク質の名称、標的抗原、subclass及び体内動態の線形性について示した。

Abataceptはヒトcytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)をヒトIgG1のFcと融合したタンパク質であり、etanerceptはヒトtumor necrosis factor receptor p75をヒトIgG1のFcと融合したタンパク質である。ヒト及びカニクイザルにおけるこれらの体内動態データは文献もしくは医薬品医療機器総合機構(PMDA)より入手した。線形の消失過程を示す場合、投与量によりその半減期は影響を受けないが、一般的に薬物定量では低濃度でその精度が低くなり、また検出限界の点から低投与量群では観察期間が短くなることで半減期の算出精度が低くなる可能性がある。また標的抗原依存的な非線形の消失過程を示す場合、血中濃度が高いほど、非線形消失の影響が小さくなると考えられる。このことから、同一医薬品で複数のデータがある場合は、その最高投与量におけるデータを採用した。

Table 2. List of antibodies and Fc-fusion proteins used in this study

Antibody name	Target	Subclass	PK linearity
Trastuzumab	HER2	IgG1	nonlinear
Bevacizumab	VEGF	IgG1	linear
Infliximab	TNF $\alpha$	IgG1	linear
Palivizumab	RSV	IgG1	linear
Omalizumab	IgE	IgG1	linear
Tocilizumab	IL-6R	IgG1	nonlinear
Golimumab	TNF $\alpha$	IgG1	linear
Ustekinumab	IL-12/23	IgG1	linear
Rituximab	CD20	IgG1	linear
Panitumumab	EGFR	IgG2	nonlinear
Denosumab	RANKL	IgG2	nonlinear
Abatacept	CD80/86	Fc-fusion	linear
Etanercept	TNF $\alpha$	Fc-fusion	linear

*Xenobiotica* 2014, 44(12), 1127-1134. Table 1

## 非線形解析

Tocilizumab、trastuzumab、panitumumab 及び denosumab は臨床で標的抗原依存的な非線形の体内動態を示すことが知られている。特に低い血漿中抗体濃度で消失が加速する非線形動態を示す事が報告されている。ヒトにおける tocilizumab 及び trastuzumab の血漿中抗体濃度推移データは PMDA 及び Tokuda らの報告よりデータを読み取ることによって入手した。またカニクイザルにおける tocilizumab、trastuzumab 及び denosumab の血漿中抗体濃度推移データは PMDA からデータを読み取ることによって入手した。血漿中抗体濃度推移データは michaelis-menten model で表現される非線形消失クリアランス及び線形クリアランスを有する以下の式で記述する2-compartment model によって解析した (Figure 9)。非線形消失クリアランスは中央コンパートメントから生じると仮定した。

$$\frac{dX_c}{dt} = -\frac{V_{max}}{V_1 \cdot (K_m + C_c)} \cdot X_c - k_{el} \cdot X_c - k_{12} \cdot X_c + k_{21} \cdot X_c \quad (21)$$

$$\frac{dX_p}{dt} = k_{12} \cdot X_c - k_{21} \cdot X_p \quad (22)$$

$X_c$  は drug amount in central compartment を、 $X_p$  は drug amount in peripheral compartment を、 $V_{max}$  は maximum rate of nonlinear elimination を、 $K_m$  は michaelis-menten constant を、 $k_{el}$  は linear elimination rate constant を、 $k_{12}$  は transfer rate constant from central compartment to peripheral compartment を、 $k_{21}$  は transfer rate constant from peripheral compartment to central compartment を、 $V_1$  は volume of distribution of central compartment を示している。

線形半減期は以下の式より算出した。(  $\alpha > \beta$  )

$$\alpha + \beta = k_{12} + k_{21} + k_{el} \quad (23)$$

$$\alpha \times \beta = k_{12} + k_{el} \quad (24)$$

$$\beta = \frac{1}{2} \times (k_{el} + k_{12} + k_{21}) - \sqrt{(k_{el} + k_{12} + k_{21})^2 - 4 \times k_{el} \times k_{21}} \quad (25)$$

$$\text{Half-life} = \frac{\ln 2}{\beta} \quad (26)$$

ヒトにおける panitumumab 及び denosumab の線形消失パラメータは文献より入手した。

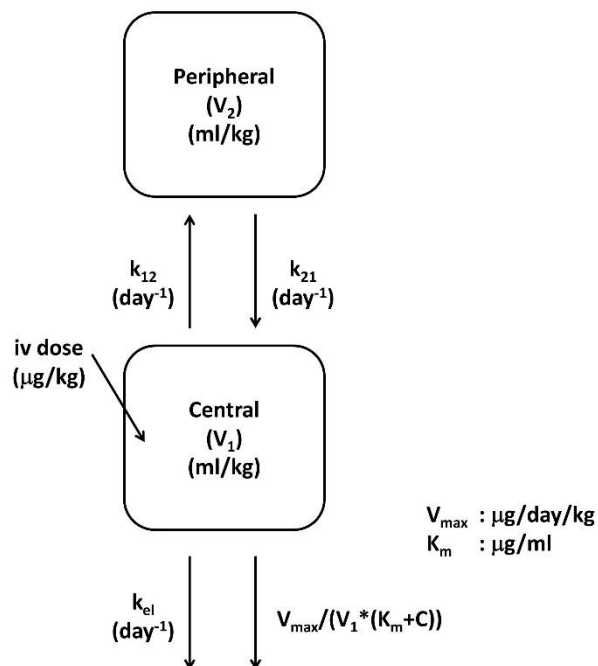


Figure 9. Two-compartment models with parallel linear and nonlinear clearance after intravenous administration.  $k_{el}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_{max}$  and  $K_m$  represents linear elimination rate constant, transfer rate constant from central compartment to peripheral compartment, transfer rate constant from peripheral compartment to central compartment, volume of distribution of central compartment, volume of distribution of peripheral compartment, maximum rate of nonlinear elimination and michaelis-menten constant, respectively.

*Xenobiotica* **2014**, 44(12), 1127-1134. Figure 1

## WT マウス及び hFcRn Tgm を用いた PK 試験

雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー、日本）及び human FcRn homozygous transgenic mice (line 276) (B6.mFcRn<sup>-/-</sup>. hFcRn Tg line 276<sup>+/+</sup> mouse) (The Jackson Laboratory, USA) を用いて PK 試験を実施した。Tocilizumab、trastuzumab、bevacizumab 及び rituximab は中外製薬株式会社より入手した。それ以外の抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質は Komtur Pharmaceuticals より入手した。抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質を 1 mg/kg で尾静脈より単回静脈内投与 (N=3) した。投与後 15分、7時間、1、2、4、7、14、21、28、35、42、49、56日 で血液を採取した。血液を 12000rpm、4°C、15分の条件で遠心し、血漿を得た。血漿は分析まで -40°C 保存した。すべての動物実験は中外製薬株式会社の guidelines for the care and use of laboratory animals に従って実施した。

## 血漿中抗体濃度測定

血漿中抗体濃度測定はヒト IgG を特異的に検出する enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて実施した。96穴 ELISA プレート (nunc-immuno plates with a maxisorp surface; Nalge Nunc International, USA) に 1 ug/mL の anti-human IgG (g-chain specific) F (ab')<sub>2</sub> fragment of antibody (Sigma, USA) を固相し 4°C で一晩静置した。0.05% tween 20 含有 phosphate-buffered saline (PBS) 溶液 (Sigma, USA) でプレートを洗浄後、ブロッキング溶液 (0.5% bovine serum albumin (BSA) (Roche Applied Science, Germany)、10% block ace (Dainippon Sumitomo Pharma, Japan)、tri-buffered saline (TBS) (Sigma, USA)) をプレートに添加し、2時間静置した。その後、0.05% tween 20 含有 PBS 溶液 (Sigma, USA) でプレートを洗浄後、血漿をプレートに添加し、室温で 1時間反応させた。さらに 0.05% tween 20 含有 PBS 溶液 (Sigma, USA) でプレートを洗浄後、biotinylated goat anti-human IgG (Southern Biotechnology Associates, USA) を添加し、室温で 1時間反応させた。その後 0.05% tween 20 含有 PBS 溶液 (Sigma, USA) でプレートを洗浄後、streptavidin-polyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies, Germany) を添加し、室温で 1時間反応させた。0.05% tween 20 含有 PBS 溶液 (Sigma, USA) でプレートを洗浄後、TMB one component HRP microwell substrate (BioFX Laboratories, USA) で添加する事で発色反応を行い、0.5 M sulfuric acid (Showa Chemical, Japan) を添加することで反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、450nm の吸光度を測定した。得られた吸光度は softmax pro (ver. 4.6, Molecular Devices Corporation, USA) で解析した。

## データ解析

Phoenix winnonlin (ver. 6.2, Pharsight Corporation, USA) を用いてノンコンパートメントモデル解析を実施し、血漿中抗体濃度推移から半減期を算出した。相関係数 ( $r$ )、平均値、SD は Microsoft Excel 2007 を用いて算出した。

### 第三節 実験結果

#### カニクイザル及びヒトにおける半減期

カニクイザル及びヒトにおける抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の半減期は文献もしくは PMDA より入手した (Table 3)。ほとんどの半減期は静脈内投与後のデータより取得可能であったが、一部皮下投与後のデータより取得した。ヒトにおける抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の半減期は広範囲の値 (約3–30 days) を示し、またカニクイザルにおいても同様の傾向 (約1–18 days) を示した。カニクイザルにおける panitumumab の半減期は入手できなかった。

標的抗原が細胞膜上に発現している場合、抗体の体内動態は非線形を示すことがある。抗体が細胞膜上の標的抗原に結合し、細胞内へ内在化する事によって、通常のピノサイトーシスよりも早い速度で消失する事がこの非線形過程を引き起こすといわれており、標的抗原が飽和しない低い血漿中抗体濃度域で観察される事が多い。細胞膜上の標的抗原を持つ tocilizumab、trasutuzumab、panitumumab 及び denosumab はヒトで標的抗原依存的非線形消失を示すことが報告されている。一方、これらの抗体医薬品はマウスにおいて標的抗原に交差性を示さない事から、線形性の体内動態を示すと考えられる。本研究は抗原非依存的線形消失評価に焦点を当てている事から、ヒト及びカニクイザルにおいて非線形消失を示すデータから、線形消失と非線形消失を組み込んだモデルを用いた解析から得られたパラメータを用いて線形部分の半減期を算出した。算出したヒト及びカニクイザルにおける線形半減期は Table 3に記載した。

Table 3. Half-lives (day) of antibodies and Fc-fusion proteins in human, monkey, hFcRn Tgm and WT mouse

Antibody name	Human		Monkey		hFcRnTgm	WT mouse
	High dose	Linear	High dose	Linear		
Trastuzumab	10.4	21.6	6.8	16.9	7.7 ± 0.7	21.5 ± 3.2
Bevacizumab	18.4	-	13.8	-	9.7 ± 1.8	18.0 ± 5.5
Infliximab	12.3	-	5	-	9.1 ± 1.3	30.3 ± 0.9
Palivizumab	16.8	-	7.1	-	3.5 ± 0.6	20.5 ± 3.2
Omalizumab	18.2	-	8.5	-	9.1 ± 0.8	28.5 ± 4.9
Tocilizumab	10.1	11.9	8.2	9.2	6.9 ± 0.8	19.9 ± 0.4
Golimumab	19.9	-	17.7	-	12.3 ± 0.6	20.4 ± 1.5
Ustekinumab	28.6	-	12.1	-	13.1 ± 1.2	26.8 ± 5.7
Rituximab	16	-	8	-	7.0 ± 1.9	20.0 ± 3.0
Panitumumab	6.7	18.7	-	-	13.2 ± 0.7	29.3 ± 2.3
Denosumab	31.5	35.8	1.2	4.1	12.6 ± 2	21.1 ± 1.1
Abatacept	11.8	-	5.4	-	1.7 ± 0.6	1.6 ± 0.1
Etanercept	2.8	-	1.9	-	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2

Half-lives in hFcRn Tgm and WT mice are represented as mean±SD.

*Xenobiotica* **2014**, 44(12), 1127-1134. Table 2



## WT マウス及び hFcRn Tgm における半減期

単回静脈内投与後の11の抗体医薬品及び2つの Fc 融合タンパク質の体内動態を WT マウス及び hFcRn Tgm で評価した。ノンコンパートメントモデル解析によって算出した半減期は Table 3に記載した。単回静脈内投与後、血漿中抗体濃度推移は1相性もしくは2相性の消失を示し、消失相は線形であった。hFcRn Tgm における半減期は1.1から13.2 days で、WT マウスにおける半減期は1.2から30.3 days であった。本試験内で抗薬物抗体の測定は実施しなかったが、抗薬物抗体産生を疑うような消失の加速は認められなかった。

## ヒトにおける半減期と WT マウス、hFcRn Tgm 及びカニクイザルにおける半減期の相関性

ヒトにおける半減期に対する各種動物種における半減期の相関性を確認するため、各動物種で認められた半減期をヒトにおける半減期に対してプロットした。相関性は4つのグループに分けて検討した。Group 1ではヒトにおける最高投与量における半減期に対する各動物種で認められた半減期の相関性を評価した (Figure 10)。カニクイザルの半減期は最高投与量における値を用いた。Group 1において、ヒトにおける半減期に対する WT マウス ( $r=0.35$ ) 及びカニクイザル ( $r=0.26$ ) における半減期の相関性よりも、hFcRn Tgm ( $r=0.57$ ) における半減期の方が良好な相関性を示した。次に、Group 2では、ヒト及びカニクイザルにおける半減期として、ヒト及びカニクイザルで非線形消失を示す抗体に関しては線形消失と非線形消失を組み込んだモデルを用いた解析から得られたパラメータを用いて算出した線形半減期を用いた (Figure 11)。Group 1と比較して、いずれの動物種でもヒトにおける半減期に対する相関係数が改善し (WT マウス ( $r=0.50$ )、カニクイザル ( $r=0.31$ )、hFcRn Tgm ( $r=0.74$ ))、Group 2においても hFcRn Tgm が最も高い相関係数を示した。さらに Group 3では、ヒト及びカニクイザルで非線形消失を示す抗体医薬品を除外し、ヒト及びカニクイザルで線形消失を示す抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質のみを使用して、半減期の相関性を評価した (Figure 12)。Group 3では、Group 1及び2と比較していずれの動物種でも、ヒトにおける半減期に対する相関係数がさらに改善し (WT マウス ( $r=0.66$ )、カニクイザル ( $r=0.75$ )、hFcRn Tgm ( $r=0.80$ ))、Group 3においても hFcRn Tgm が最も高い相関係数を示した。Group 4では Fc 融合タンパク質を除く、すべての抗体医薬品のデータを用いて相関性を評価した (Figure 13)。ヒト及びカニクイザルで非線形消失を示す抗体に関しては、線形消失と非線形消失を組み込んだモデルを用いた解析から得られたパラメータを用いて算出した線形半減期を用いた。Group 4においては、カニクイザル及

び WT マウスでは相関性が認められなかったが、hFcRn Tgm で良好な相関性が認められた (WT マウス ( $r = -0.05$ ), カニクイザル ( $r = -0.01$ ), hFcRn Tgm ( $r = 0.59$ ))。これらの結果から、Group 1-4のいずれのグループにおいても hFcRn Tgm が最も高い相関係数を示した。

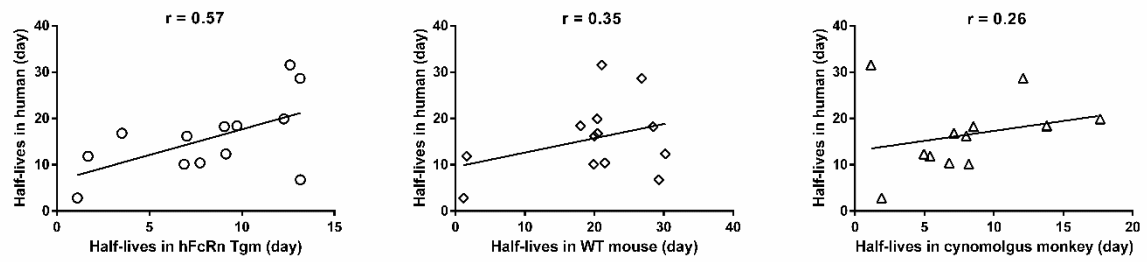


Figure 10. Correlations of half-lives between human and hFcRn Tgm (a), WT mice (b) and monkey (c) using highest dosing data in human. (Group 1, including all mAbs and Fc-fusion proteins)

*Xenobiotica* 2014, 44(12), 1127-1134. Figure 2

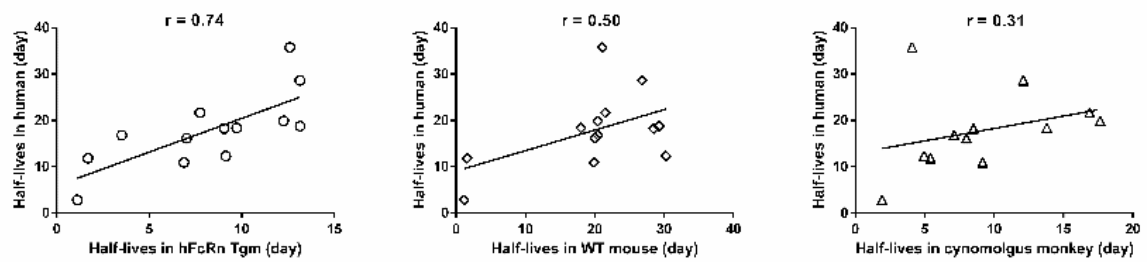


Figure 11. Correlations of half-lives between human and hFcRn Tgm (a), WT mice (b) and monkey (c) using linear data calculated from nonlinear pharmacokinetic analysis. (Group 2, including all mAbs and Fc-fusion proteins)

*Xenobiotica* 2014, 44(12), 1127-1134. Figure 3

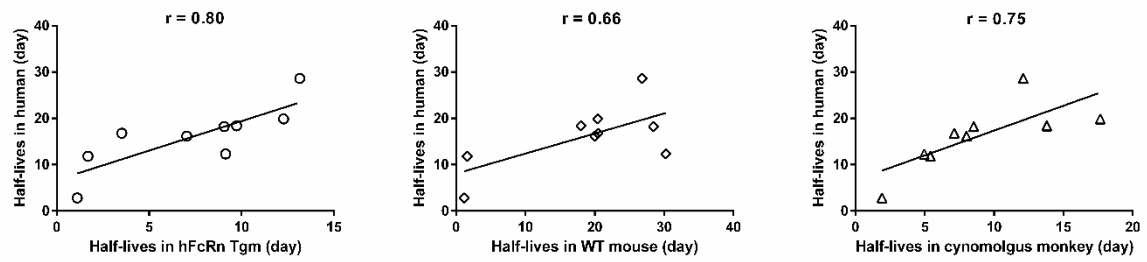


Figure 12. Correlations of half-lives between human and hFcRn Tgm (a), WT mice (b) and monkey (c) using only data of mAbs and Fc-fusion proteins exhibiting linear pharmacokinetics in human. (Group 3, including bevacizumab, infliximab, palivizumab, omalizumab, golimumab, ustekinumab, rituximab, abatacept and etanercept)

*Xenobiotica* **2014**, 44(12), 1127-1134. Figure 4

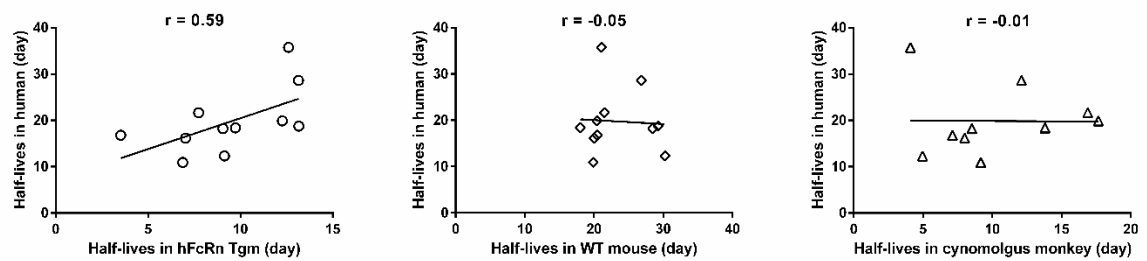


Figure 13. Correlations of half-lives between human and hFcRn Tgm (a), WT mice (b) and monkey (c) using data from group 2, except those for Fc-fusion proteins. (Group 4, including all mAbs)

*Xenobiotica* **2014**, 44(12), 1127-1134. Figure 5

#### 第四節 考察

抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の体内動態には様々な因子が関わっており、例えば、FcRn への結合性 [47]、isoelectric point (pI) [48]、免疫原性 [49]、糖鎖付加 [50]、off-target binding [51, 52]等が抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の体内動態に影響を与える事が報告されている。その中でも特に FcRn 結合はこれまで広く研究されており、酸性条件下における FcRn 結合を増強するアミノ酸改変を導入する事で、半減期が延長する事が、hFcRn Tgm [53]、カニクイザル [6, 54]、ヒト [55]で報告されている。ヒト FcRn に対する結合を増強した改変抗体の半減期延長効果は WT マウスでは検出できないが、hFcRn Tgm では検出できる事が報告されており、このような改変抗体の *in vivo* スクリーニングにも hFcRn Tgm は有用である [46]。

本研究では半減期を相関性評価の指標に用いた。CL も PK パラメータの中で重要なパラメータであるが、ヒトにおける CL は個体換算、体表面積換算等单位が異なるケースや体重情報が記載されていないケースがあるため、また動物種及びヒト両方において投与のバラつきが直接影響を受けるため、今回のような評価では結果をミスリードする可能性がある。またヒト及びカニクイザルにおいて皮下投与のみのデータしか取得できない場合 CL は算出できないが、理論上線形消失を示す抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の場合、静脈内投与及び皮下投与において半減期の値はほぼ同一である。また皮下投与後の半減期を用いる際に注意しなければいけないのが、フリップフロップ現象であるが、一般的に抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の皮下からの吸収速度定数は 0.5/day より大きく、消失速度よりも吸収速度の方が速いため、フリップフロップ現象を考慮する必要はないと判断した [56]。

本研究では、すべての相関性評価において、WT マウス及びカニクイザルと比較して、hFcRn Tgm での半減期とヒトでの半減期で良好な相関性が認められた。まず Group 1ではカニクイザル及びヒトで最高投与量における半減期を用いて相関性を評価した。これは最高投与量のデータを使用する事で、非線形消失を示す抗体医薬品で抗原依存的消失の影響を最小化する事が目的であった。カニクイザル及びヒトにおける半減期で低い相関係数が認められている理由は、カニクイザル及びヒトで、最高投与量の半減期でも抗原依存的消失の影響を完全には除けていないためと考えられる。そのため、Group 2では非線形消失を示す抗体において、非線形解析を実施して、線形半減期を算出する事で、抗原依存的消失の影響を完全に除いた条件で評価する事を試みた。

非線形消失を示す抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質において、線形及び非線形クリアランスを有する2コンパートメントモデル (TMDD model or michaelis-menten model) が PK 解析に頻繁に用いられる [22, 57]。TMDD model は標的抗原の産生速度や発現量、抗体の標的抗原への結合性などの情報を組み込むことで、よりメカニズムに基づ

く PK 解析に使用される [58]。しかし標的抗原に関する産生速度や発現量の情報は取得できない場合があり、そのような場合は、**michaelis-menten model** が用いられる [59, 60]。本研究においても、非線形消失を示す抗体において、**michaelis-menten model** を用いて線形半減期を算出した。

**Group 2**において、カニクイザル及びヒトで非線形消失を示す抗体医薬品は非線形解析により算出した線形半減期を、線形消失を示す抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質は最高投与量における半減期を用いて、相関性を評価した。その結果、いずれの動物種でも **Group 1**における結果と比較して高い相関係数を示し、また **Group 1**と同様に WT マウス及びカニクイザルと比較して、**hFcRn Tgm** の半減期とヒトの半減期で良好な相関性が認められた。この結果は、非線形消失を示す抗体医薬品の半減期が最高投与量においても影響を受けていた可能性を支持するもので、非線形解析を実施することでその影響を減らすことに成功したものと考えられる。**Group 2**の結果から、標的抗原依存的消失を示す抗体においても、その標的抗原非依存的消失のスクリーニングに **hFcRn Tgm** が有用であることが示された。しかし、非線形解析を実施する際に注意しなければいけない点はその解析データの質である。非線形解析モデルによく当てはまるように、広域な濃度範囲における血漿中濃度推移を取得する必要がある、また本研究ではいくつかの抗体医薬品において、血漿中濃度データを画像認識により読み取ることからデータを取得していることから、読み取りによる多少のバラつきが含まれている可能性がある。これらの要因は算出される半減期に影響を与える可能性があることから、**Group 3**ではカニクイザル及びヒトで線形消失を示す抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質のみを選択し、相関性評価を実施した。その結果、**Group 1**及び**2**と比較して、**Group 3**においていずれの動物種でもより高い相関係数を示した。これは、非線形解析により算出した線形半減期における抗原依存的消失の影響が完全には除外できておらず、**Group 2**の結果に影響を及ぼしていた可能性を示唆している。また **Group 3**においても、WT マウス及びカニクイザルと比較して、**hFcRn Tgm** の半減期とヒトの半減期で良好な相関性が認められた。

本研究では2つの Fc 融合タンパク質 (**etanercept** 及び **abatacept**) を評価に使用した。Fc 融合タンパク質は、IgG の Fc をタンパク質に結合させた構造をしており、一般的にタンパク質の半減期を延長するために適用される。例えばリコンビナント血液凝固第 VIII 因子に Fc を融合させると、**hFcRn Tgm** で半減期が2倍延長する事が報告されている [61]。さらにリコンビナント血液凝固第 VIII 因子及びその Fc 融合タンパク質を FcRn 欠損マウスに投与すると同等の半減期を示すことから、Fc を結合させることで FcRn によりエンドソームからのリサイクル作用が働き、半減期が延長したと考えられる。しかし、Fc 融合タンパク質は FcRn によるリサイクル作用を受けるものの、FcRn への結合は抗体医薬品よりも弱く、またそのために抗体医薬品よりも半減期が短い事が報告されている [47]。抗体医薬品と比較して Fc 融合タンパク質が短い半減期を有

している事から、Fc 融合タンパク質を相関性評価に加えると相関係数が良好に見える傾向が出る可能性がある。実際、Group3において、WT マウスは hFcRn Tgm 及びカニクイザルよりも相関係数は低かったものの、 $r=0.66$ と比較的高い値を示した。しかし、半減期の分布を見ると、2つの Fc 融合タンパク質とその他の抗体医薬品から成る2つの分布に明確に分かれており、そのために見かけ上相関係数が高くなっている可能性を示している。また通常、1つのプロジェクトにおけるスクリーニング段階で複数の開発候補品を有する場合、抗体と Fc 融合タンパク質が混在する場合は発生しないと考えられる事から、Group 4では Fc 融合タンパク質を除いた抗体医薬品のみでの評価を実施した。Group1, 2, 3での評価と異なり、WT マウス及びカニクイザルの半減期とヒトの半減期間に相関性は認められなかったが、hFcRn Tgm では Group 4においても相関性が認められた。Figure 6に示されているように、カニクイザルでは denosumab が外れ値となる可能性があり、denosumab をカニクイザルの Group 4のデータセットから除外すると  $r=0.56$ と hFcRn Tgm と同程度の相関係数を示した。カニクイザルにおいてはバイアスが含まれている可能性があるものの、WT マウスと比較して、hFcRn Tgm の有用性が明確に示されている結果となり、非臨床スクリーニング動物としての hFcRn Tgm の有用性が示された。Denosumab の線形半減期がヒトとカニクイザルで大きく異なる原因は明らかではないが、panitumumab のカニクイザルのデータが取得できなかったことから今回のデータセットでは denosumab が唯一の IgG2抗体であり、subclass による生体内安定性等の差異が影響している可能性がある。

本研究で抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の非臨床スクリーニング動物としての hFcRn Tgm の有用性を示したが、hFcRn Tgm にはまだ改善の余地があると考えられる。マウスの内因性 IgG はヒト FcRn への結合が非常に弱い事が知られており [43]、hFcRn Tgm は内因性 IgG 濃度が非常に低いことが報告されている [23]。一方ヒトは約 10 mg/mL の IgG が血中に存在しており [62]、投与された抗体医薬品と FcRn 結合において競合が起きる可能性がある。このようなヒト体内で起きている内因性 IgG による FcRn 結合の競合を模した評価系とするために、抗体医薬品と共に大量のヒト IgG を投与するという方法が考えられ、有用性をより向上できる可能性がある。またマウスの標的抗原に結合する事が可能な抗体の場合においては、ヒトにおける体内動態をより反映した薬効試験及び毒性試験に hFcRn Tgm を適用できる可能性があり、より簡便な薬効及び毒性評価動物としての使用にも期待される。

本研究結果を通して、抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の非臨床における体内動態スクリーニング動物の第一選択として、hFcRn Tgm を用いる事を提案する。抗体医薬品の非臨床プロジェクトにおいて、複数の候補抗体が存在する場合、少しでもヒトにおいて長い半減期を有する抗体を選択する事が求められる。hFcRn Tgm はカニクイザルと比較して、スループット、経済面、簡便性、動物愛護の観点から見てもより有用であり、また FcRn の種差の観点からも WT マウスよりも体内動態におけるヒト外挿

性を有する事から、複数の候補抗体の中から薬物動態面で有望な抗体を選択するために非常に有用であると考えられる。また近年、酸性条件において FcRn への結合を増強するアミノ酸改変を Fc に導入する事でエンドソームからのリサイクル効率を向上し、体内動態を改善するアプローチが多数報告されている [63, 64]。このアプローチはすでにヒトで体内動態改変効果が証明されており [55]、また非臨床において、hFcRn Tgm においても体内動態改善効果が認められている [53]。この事から、hFcRn Tgm は FcRn 結合を増強することによる体内動態改善を目的とした Fc 改変体のスクリーニングにも有用であると考えられる。また現在、二重特異性抗体、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性増強抗体、antibody-drug-conjugate (ADC) などの機能付加抗体の研究開発も加速している。これらの抗体も FcRn を介しエンドソームからのリサイクルを受けるため、非臨床における体内動態評価に hFcRn Tgm が適用でき、またアルブミンを基盤とした新規のバイオ医薬品の非臨床体内動態評価にも hFcRn Tgm が使用されており [65]、通常の抗体医薬品だけではなく、今後 FcRn のリサイクルシステムを利用した広範囲に渡る医薬品の評価に適用可能であると考えられる。



### 第三章 皮下投与後の薬物動態データを用いた静脈内投与後の薬物動態の予測

#### 第一節 緒言

一般的にヒト及び各種動物において静脈内投与後の抗体医薬品の血漿中濃度推移は、線形消失の場合に2相性の消失を示すことが報告されており、抗体医薬品の血漿中濃度推移を数理モデルで解析する際には2コンパートメントモデルが頻繁に使用される [66, 67]。2コンパートメントモデルにおいては、2相性の血漿中濃度推移を表現するために4つのパラメータ（クリアランス（CL）、組織移行間クリアランス（Q）、中央コンパートメント分布容積（ $V_c$ ）、末梢コンパートメント分布容積（ $V_p$ ））が使用される。これらのパラメータは定量的な体内動態の理解及び PK/PD 解析を実施する際にも非常に重要なパラメータである [68, 69]。

第二章で前述した通り、抗体医薬品の非臨床開発過程において、薬理評価、体内動態評価及び毒性評価のためにカニクイザルが頻繁に使用される [70, 71]。これは標的抗原のアミノ酸配列がヒトとカニクイザル間で高い相同性を有する事例が多いため、また抗体医薬品の体内動態に重要な役割を担っている FcRn の結合性がヒトとカニクイザル間で類似しているためと考えられる [72]。近年、その優れた薬効、体内動態及び安全性のために抗体医薬品の開発が加速し、非臨床段階で使用されるカニクイザルの頭数も今後さらに増加する事が予想される。しかし、動物愛護の観点から、非臨床開発段階におけるカニクイザルの使用において3Rs（replacement, reduction and refinement）を考慮する必要がある。

現在、主に慢性疾患を適用疾患とした複数の抗体医薬品において、皮下投与製剤が承認されている。皮下投与製剤は病院での滞在時間短縮、痛みの低減、及び自己注射の実現を通して、患者に **quality of life (QOL)** の改善を提供する事が可能である。抗体医薬品の皮下投与製剤での開発の増加に伴い、非臨床段階においてもカニクイザルを用いた皮下吸収性評価が増加している。皮下吸収性評価において、その被験物質の皮下投与後のバイオアベイラビリティー（F）の見積もりが非常に重要である。仮に F が低いと、皮下投与後の血漿中抗体濃度が低くなり、期待する薬効を発揮できない可能性がある。皮下投与後の F を算出するためには静脈内投与後及び皮下投与後の AUC データが必要である事から、少なくとも2つの群（静脈内投与群及び皮下投与群）が必要となる。しかし、もし皮下投与後の F を皮下投与後の体内動態データのみから算出できればカニクイザルの使用頭数の減少、開発コスト及び期間の減少に貢献できると考えられるが、これまでそのような方法論の報告はない。

抗体医薬品は分子量が大きい（150 kDa）事から、一般的に組織移行性は低いと報告されている [73]。つまり、抗体医薬品の各組織への移行性は血流速度、血流量、組織構成成分等の生理学的パラメータによって決まる可能性があり、各抗体医薬品間の Q、

$V_c, V_p$ の変動は小さいと予想されるが、そのような報告はこれまでにない。また各抗体医薬品間で定常状態分布容積 ( $V_{ss}$ ) の変動は小さいという事がカニクイザルですすでに報告されている [44]。理論的には、2コンパートメントモデルにおいて、消失相の傾きは  $CL, Q, V_c$  及び  $V_p$  によって決まり、線形消失を示す抗体医薬品においては静脈投与後及び皮下投与後の消失相の傾きは同じである。つまり、もし  $Q, V_c$  及び  $V_p$  を固定すれば、皮下投与後の消失相の傾きから  $CL$  が算出可能である。さらに  $CL$  を算出できれば、皮下投与後の AUC から皮下投与後の  $F$  が算出可能である。この理論に基づき、本研究では、カニクイザルを動物種として選択し、過去に報告されている複数の抗体医薬品の静脈内投与後のデータを利用して、対象となる抗体医薬品の皮下投与後のデータのみから皮下投与後の  $F$  及び静脈内投与後の  $CL$  及び血漿中濃度推移の予測を試みた。また近年、半減期の延長を目的として  $FcRn$  への結合を増強するために  $Fc$  にアミノ酸改変を導入している抗体の開発が進んでいる。今後さらに開発が加速する事が予想されることから、本研究でのデータセットにも  $FcRn$  への結合を増強するために  $Fc$  にアミノ酸改変を導入している複数の抗体を組み込んだ。

## 第二節 実験材料及び方法

### データ収集

カニクイザルにおける抗体の血清もしくは血漿中濃度推移及び PK パラメータは文献もしくは PMDA から平均値のデータを取得した。標的抗原依存的消失の影響を排除するために、カニクイザルにおいて線形消失を示す抗体のみを解析対象として選択した。取得したデータは2つのグループに分類した。静脈内投与後のデータのみ取得できる抗体は Group A に、静脈内投与及び皮下投与後のデータが取得できる抗体は Group B に分類した。

Group A において、2コンパートメントモデルパラメータが取得できる場合は、そのデータを使用した。取得できない場合は、血清もしくは血漿中濃度推移を読み取り、2コンパートメントモデル解析を実施してパラメータを算出した。Group B において、静脈内投与及び皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移を読み取り、本アプローチの予測性評価に用いた。Group B において CL 及び F データのいずれかもしくは両方が取得できない場合、静脈内投与及び皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移を用いて、1次吸収過程を有する2コンパートメントモデルによる同時当てはめ計算を実施し、各パラメータを算出した。Group A において複数の投与量におけるデータが取得可能な場合、最高投与量のデータを選択した。Group B においては静脈内投与及び皮下投与後のデータで同一の投与量を選択した。

### 2コンパートメントモデル解析を用いた Group A における静脈内投与後の PK パラメータの算出

Group A における静脈内投与後の血清もしくは血漿中濃度推移は1次消失過程を有する2コンパートメントモデルを用いて解析し、各 PK パラメータ (CL, Q,  $V_c$ ,  $V_p$ ) を算出した。Group A における静脈内投与後の血清もしくは血漿中濃度推移は以下の式に当てはめた。

$$C = A \times e^{-\alpha \times t} + B \times e^{-\beta \times t} \quad (27)$$

各 PK パラメータは以下の式に従って算出した。論文データから他の2コンパートメントモデルパラメータ ( $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{el}$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ , A and B) が取得可能な場合、以下の式を用いて CL, Q,  $V_c$ ,  $V_p$  に変換した。

$$\alpha + \beta = k_{12} + k_{21} + k_{el} \quad (28)$$

$$\alpha \times \beta = k_{21} + k_{el} \quad (29)$$

$$\beta = \frac{1}{2} \times \left[ (k_{el} + k_{12} + k_{21}) - \sqrt{(k_{el} + k_{12} + k_{21})^2 - 4 \times k_{el} \times k_{21}} \right] \quad (30)$$

$$V_c = \frac{Dose}{A+B} \quad (31)$$

$$CL = k_{el} \times V_c \quad (32)$$

$$Q = k_{12} \times V_c \quad (33)$$

$$V_p = \frac{V_c \times k_{12}}{k_{21}} \quad (34)$$

Group B における皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移のみを用いた F 及び CL の予測

Group B における皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移は1次吸収過程及び1次消失過程を有する2コンパートメントモデルを用いて解析し、F 及び CL を算出した。Q、V<sub>c</sub> 及び V<sub>p</sub> は、Group A における静脈内投与後のデータから算出した各パラメータの幾何平均値で固定した。皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移は F、CL 及び吸収速度定数 (k<sub>a</sub>) を変動させる事で1次吸収過程及び1次消失過程を有する2コンパートメントモデルに当てはめた。

Group B における予測した CL を用いた静脈内投与後の血清もしくは血漿中濃度推移の予測

Group B における皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移から予測した CL 及び Group A における静脈内投与後のデータから算出した Q、V<sub>c</sub> 及び V<sub>p</sub> の幾何平均値を用いて、Group B における静脈内投与後の血清もしくは血漿中濃度推移をシミュレーションした。予測精度を確認するためにシミュレーションされた血清もしくは血漿中濃度推移を実データと比較した。

データ解析

本研究の解析スキームを Figure 14に示した。すべての当てはめ及びシミュレーションは解析ソフトウェア SAAM II (The Epsilon Group, USA) を用いて実施した。幾何平均値及びその CV 及び $1.96*SD$  は Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA) を用いて算出した。一般的に PK パラメータは対数正規分布を示すと報告されていることから、本研究においても対数正規分布を仮定した [74]。

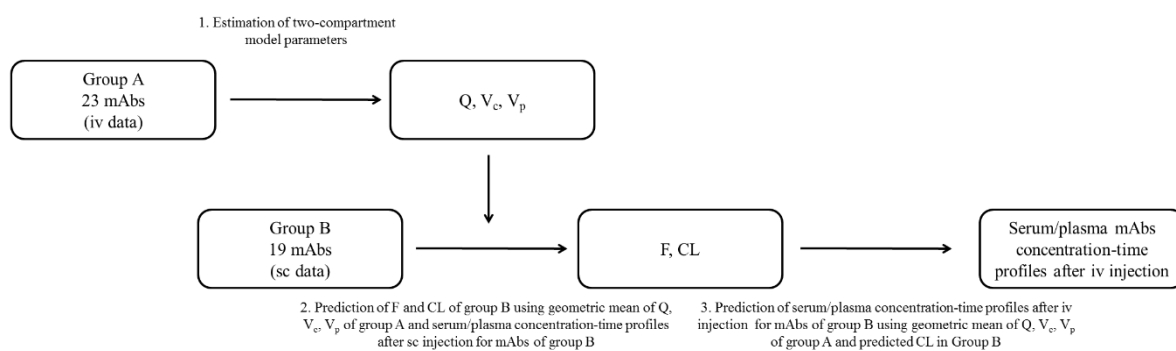


Figure 14. A scheme for predicting F, CL, and serum/plasma concentration-time profiles after iv injection for mAbs.

*Xenobiotica* 2017, 47(3), 194-201. Figure 1

### 第三節 実験結果

2コンパートメントモデル解析を用いた Group A における静脈内投与後の PK パラメータの算出

カニクイザルにおいて線形消失を示す21の抗体 (golimumab, CNTO328 [37], CDP571 [75], MEDI-524 [76], MEDI-524-YTE [76], SB-249417 [77], AMG102 [78], tanezumab [79], belimumab [80], RSHZ19 [81], anti-gD WT [82], anti-LTa WT [82], anti-X [82], wild type [83], P257I/Q311I [83], T250Q/M428L [83], CAT6001 [64], MEDI5117 [64], VRC01 [84], VRC01-LS [84] and Xtend-VEGF [85] ) の PK データを Group A として選択した。選択された21の抗体の内、18が IgG1、2が IgG2、1が IgG4であった。21の抗体の CL, Q,  $V_c$  及び  $V_p$  の各値及び幾何平均値、幾何平均値の CV は Table 4に記載した。また CL, Q,  $V_c$  及び  $V_p$  の各値及び幾何平均値は $1.96 \times SD$  と共に Figure 15に示した。算出した Group A の CL, Q,  $V_c$  及び  $V_p$  の各値及び幾何平均値 (CV) はそれぞれ、7.4 (96.0%) mL/day/kg, 18.9 (53.0%) mL/day/kg, 40.3 (20.6%) mL/kg 及び45.1 (46.6%) mL/kg であった。 $V_c$  はカニクイザルにおける plasma volume と同程度であった [86]。これらのパラメータの中で CL が最も大きな変動を示し、 $V_c$  が最も小さい変動を示した。Group A には FcRn への結合を増強するために Fc にアミノ酸改変 (2つの M428L/N434S (LS)、2つの M252Y/S254T/T256E (YTE)、P257I/Q311I、T250Q/M428L) を導入している6つの抗体も含まれていた。特に LS 及び YTE を導入した抗体は、導入していない抗体よりも小さな CL を示したが、Q,  $V_c$  及び  $V_p$  には特に傾向は認められなかった。

Table 4. Pharmacokinetic parameters of two compartment model after intravenous injection in cynomolgus monkey (Group A).

Antibody	Target	IgG subtype	CL mL/day/kg	Q mL/day/kg	V <sub>c</sub> mL/kg	V <sub>p</sub> mL/kg
Golimumab	TNF $\alpha$	IgG1	10.2	18.0	38.2	41.8
CNTO 328	IL-6	IgG1	4.3	21.1	44.7	46.6
CDP571	TNF $\alpha$	IgG4	30.2	35.3	55.9	84.9
MEDI-524	RSV	IgG1	11.9	13.9	47.4	21.0
MEDI-524-YTE <sup>#</sup>	RSV	IgG1	2.5	20.5	51.0	27.3
SB-249417	FIX	IgG1	15.1	25.9	40.5	28.9
AMG102	HGF	IgG2	7.3	7.1	30.8	18.8
Tanezumab	NGF	IgG2	6.1	26.0	49.5	38.1
Belimumab	BLyS	IgG1	6.4	16.9	35.7	48.6
RSHZ19	RSV	IgG1	3.5	20.0	50.6	65.7
Anti-gD WT	gD	IgG1	3.8	26.1	38.3	39.8
Anti-LT $\alpha$ WT	LT $\alpha$	IgG1	11.7	24.1	29.9	29.7
Anti-X	X	IgG1	3.4	38.2	26.6	40.1
Wild type	TNF $\alpha$	IgG1	18.9	18.0	37.7	58.0
P257I/Q311I <sup>##</sup>	TNF $\alpha$	IgG1	22.6	19.5	48.9	57.8
T250Q/M428L <sup>*</sup>	TNF $\alpha$	IgG1	18.4	40.1	29.0	71.6
CAT6001	IL-6	IgG1	11.4	8.7	45.0	57.0
MEDI5117 <sup>#</sup>	IL-6	IgG1	2.6	6.1	41.8	55.5
VRC01	HIV	IgG1	10.8	18.8	42.2	94.9
VRC01-LS <sup>**</sup>	HIV	IgG1	5.3	23.2	42.6	75.7
Xtend-VEGF <sup>**</sup>	VEGF	IgG1	1.5	12.9	35.4	33.8
Geometric mean			7.4	18.9	40.3	45.1
Geometric CV (%)			96.0	53.0	20.6	46.6

<sup>#</sup> contains YTE mutation

<sup>##</sup> contains P250I/Q311I mutation

<sup>\*</sup> contains T250Q/M428L mutation

<sup>\*\*</sup> contains LS mutation

*Xenobiotica* 2017, 47(3), 194-201. Table 1

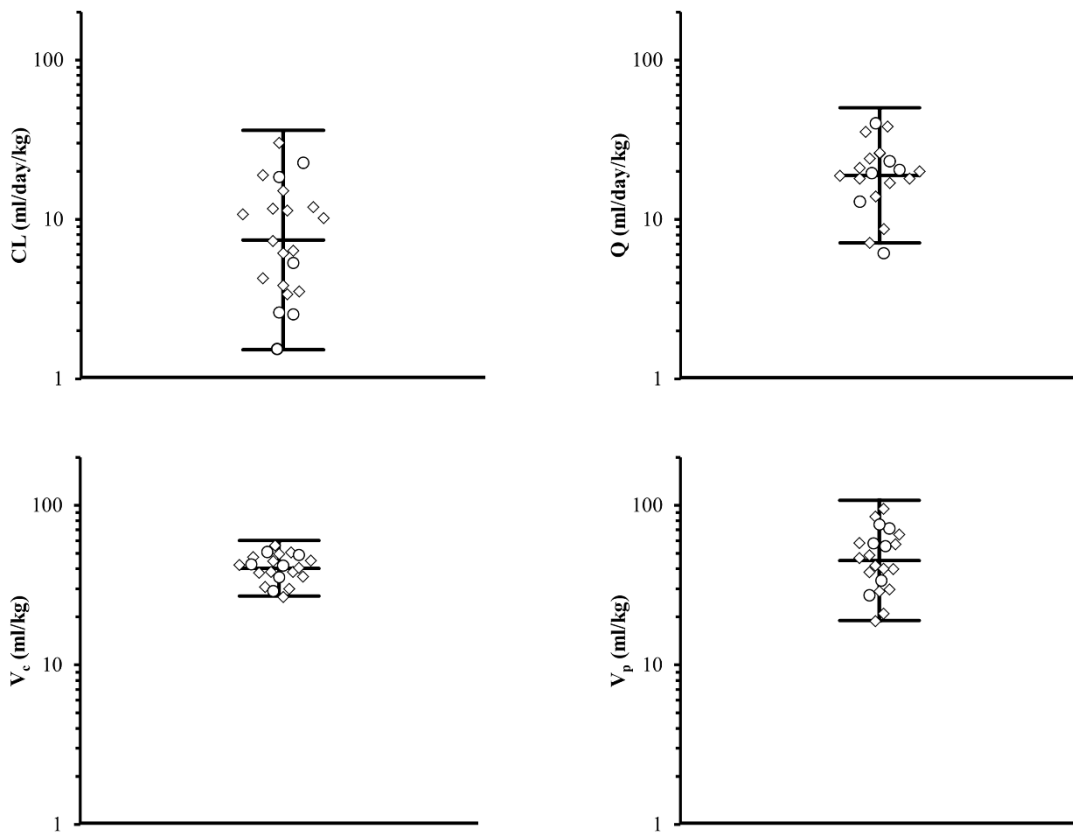


Figure 15. Distribution of pharmacokinetic parameters (geometric mean and  $1.96 * SD$ ) in cynomolgus monkey. Open diamond indicates normal mAbs. Open circle indicates variants with increased FcRn binding.

*Xenobiotica* **2017**, 47(3), 194-201. Figure 2



## Group B における皮下投与後の血清/血漿中濃度推移のみを用いた F 及び CL の予測

カニクイザルにおいて線形消失を示す19の抗体 (Ab 12B9m [36], adalimumab, AMG139 [87], rhu Mab VEGF [88], CNTO5825 [89], IL4IL13 [90], mAbA [91], SB-240563 [92], omalizumab, A1 wild type [93], B1 wild type [93], C1 wild type [93], D1 wild type [93], E1 wild type [93], A1 T250Q/M428L [93], B1 T250Q/M428L [93], C1 T250Q/M428L [93], D1 T250Q/M428L [93], E1 T250Q/M428L [93] ) の PK データを Group B として選択した。

選択された19の抗体の内、6が IgG1、2が IgG2、11が IgG4であった。Group B で選択した抗体は、いずれも Group A で選択した抗体とは重複していなかった。選択された19の抗体すべてで静脈内投与後の血清もしくは血漿中濃度推移が取得可能であった。Group B には FcRn への結合を増強するためにアミノ酸改変 (T250Q/M428L) を導入している5つの抗体も含まれていた。論文及び PMDA のデータソースから取得した Group B で選択した抗体の CL 及び F はそれぞれ、3.12-21.12 mL/day/kg (CL) 及び0.36-1.18 (F) の値を示した (Table 5)。また CL 及び F の実測値を予測値と共に Table 5及び Figure 16に記載した。19の抗体中18の抗体で CL 及び F は実測値の30%以内に予測することに成功した。唯一 C1 wild type のみ実測値に対して CL が47.5%及び F が42.3%の予測精度であった。また FcRn への結合を増強するためにアミノ酸改変を導入している5つの抗体も CL 及び F は実測値の30%以内に予測することに成功した。

Table 5. Observed and predicted clearance and sc bioavailability in cynomolgus monkey (Group B).

Antibody	Target	IgG subtype	Observed CL mL/day/kg	Predicted CL mL/day/kg	Observed F	Predicted F
Ab 12B9m	Hepcidin	IgG2	3.59	4.09	0.86	1.05
Adalimumab	TNF $\alpha$	IgG1	8.64	7.59	0.88	0.77
AMG139	IL-23	IgG2	6.12	6.58	0.81	0.93
rhuMAb VEGF	VEGF	IgG1	5.59	6.96	0.98	1.13
CNTO5825	IL-13	IgG1	5.78	7.36	0.79	1.02
IL4IL13 mAbA	IL-4/IL-13	IgG4	6.25	7.69	0.95	1.13
SB-240563	IL-17	IgG1	4.46	4.65	0.93	0.93
Omalizumab	IL-5	IgG1	3.77	3.62	1.18	1.15
A1 Wild type	IgE	IgG1	4.66	5.18	1.04	1.11
B1 Wild type	-	IgG4	6.00	6.72	0.75	0.89
C1 Wild type	-	IgG4	5.04	4.53	0.66	0.76
D1 Wild type	-	IgG4	8.40	12.39	0.84	1.20
E1 Wild type	-	IgG4	13.20	14.04	0.42	0.41
A1 T250Q/M428L*	-	IgG4	21.12	17.52	0.36	0.36
B1 T250Q/M428L*	-	IgG4	4.80	3.60	0.72	0.55
C1 T250Q/M428L*	-	IgG4	3.12	3.21	0.69	0.78
D1 T250Q/M428L*	-	IgG4	7.44	8.47	0.65	0.79
E1 T250Q/M428L*	-	IgG4	8.40	6.74	0.51	0.47
E1 T250Q/M428L*	-	IgG4	6.48	5.27	0.48	0.45

\* contains T250Q/M428L mutation

*Xenobiotica* 2017, 47(3), 194-201. Table 2

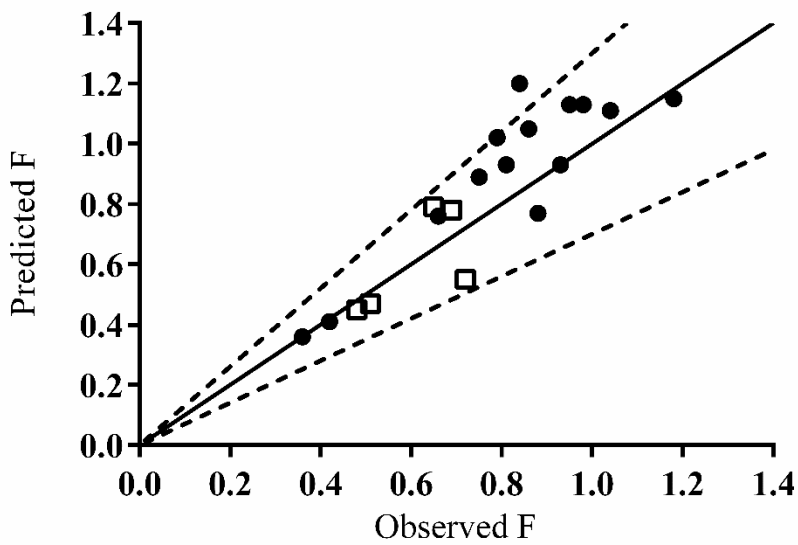
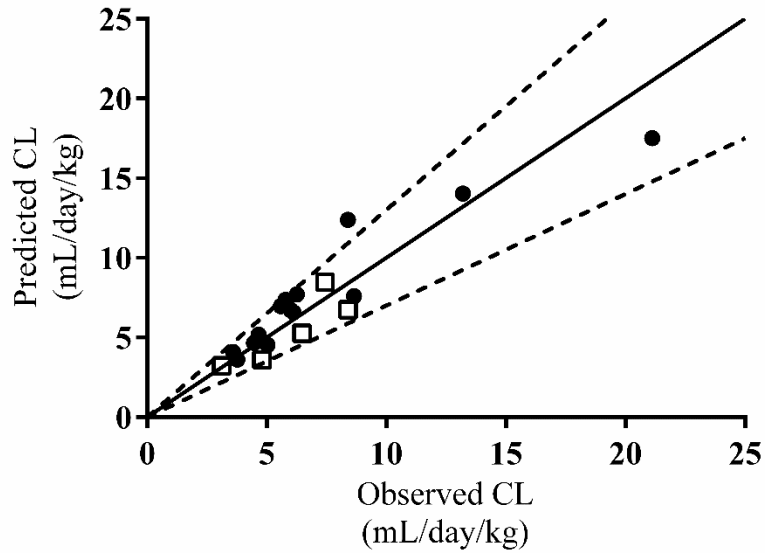


Figure 16. Prediction of clearance and sc bioavailability in cynomolgus monkey. Solid line indicates 100% prediction line. Dashed lines indicate 70% and 130% prediction. Closed circle indicates normal mAbs. Open squares indicate variants with increased FcRn binding.

*Xenobiotica* 2017, 47(3), 194-201. Figure 3

Group B における予測した CL を用いた静脈内投与後の血清もしくは血漿中濃度推移の予測

Group B において皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移から予測した CL 及び Group A において静脈内投与後のデータから算出した  $Q$ ,  $V_c$  及び  $V_p$  の幾何平均値を用いて、Group B における静脈内投与後の血清もしくは血漿中濃度推移をシミュレーションし、実測値と予測値を Figure 17 に示した。FcRn への結合を増強するためにアミノ酸改変を導入している抗体も含めて 19 の抗体すべてで良好な予測精度を示した。またすべての実測値及び予測値を Figure 18 に示したところ、低濃度から高濃度に渡る広範囲のほとんどの値で実測値の 2 倍以内に予測することに成功した。

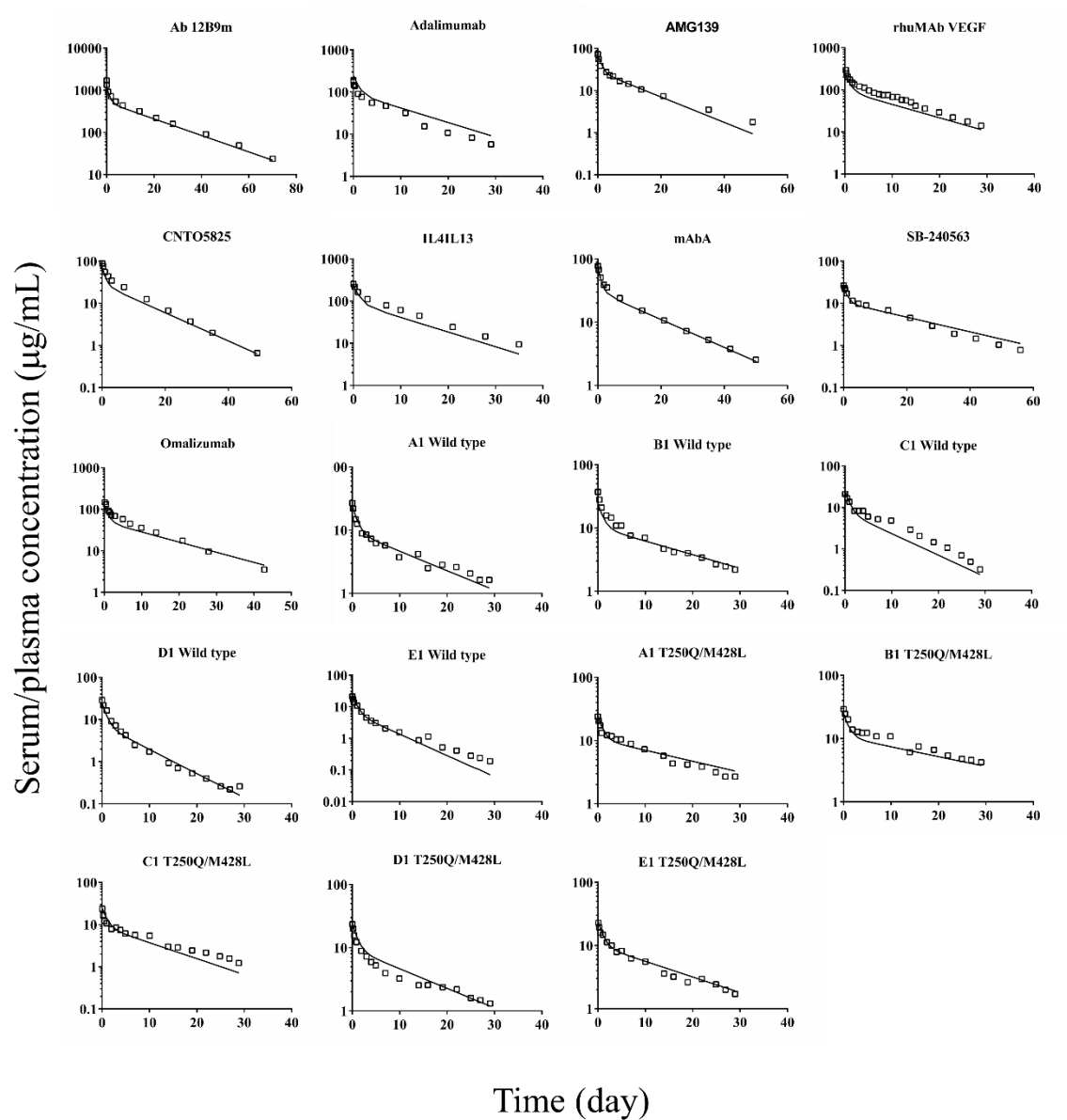


Figure 17. Prediction of serum/plasma mAbs concentration-time profiles after iv injection in cynomolgus monkey. Open squares indicate observed serum/plasma mAbs concentration-time profiles. Solid line indicates predicted serum/plasma mAbs concentration-time profiles.

*Xenobiotica* **2017**, 47(3), 194-201. Figure 4

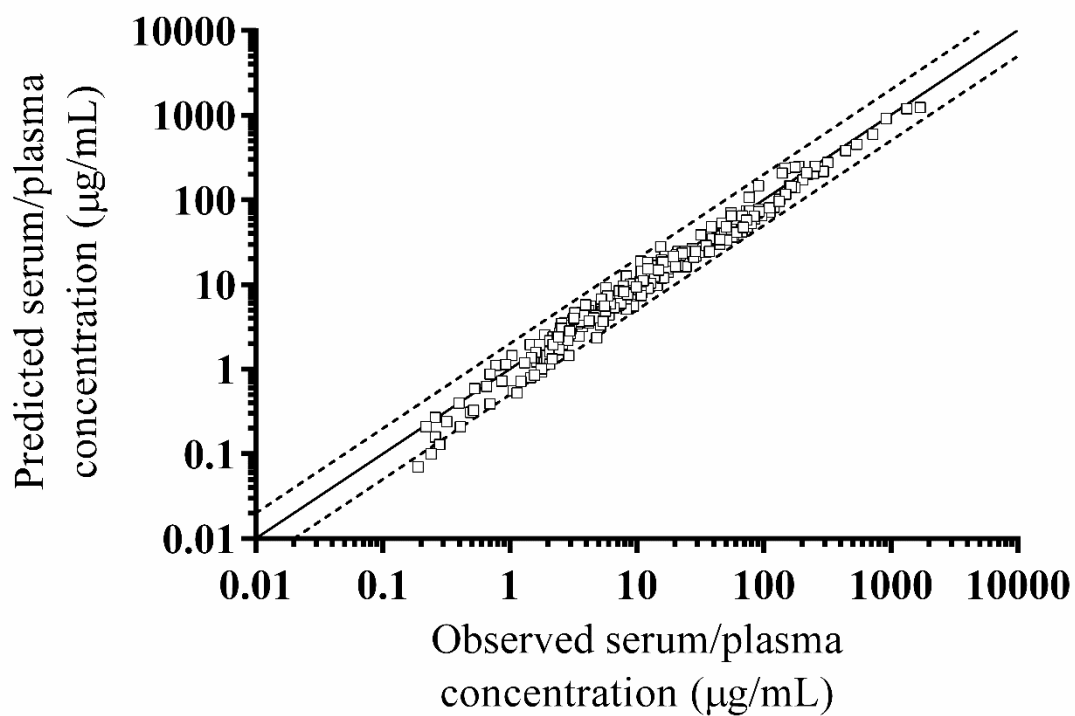


Figure 18. Scatter plot of observed serum/plasma concentration in mAbs versus predicted concentration. Open squares indicate observed and predicted serum/plasma mAbs concentration. Solid line indicates 100% prediction line. Dashed lines indicate 50% and 200% prediction.

*Xenobiotica* 2017, 47(3), 194-201. Figure 5

#### 第四節 考察

本研究では、カニクイザルにおいて、過去に報告されている複数の抗体医薬品の静脈内投与後のデータを利用して、対象となる抗体医薬品の皮下投与後の体内動態データのみから皮下投与後のF及び静脈内投与後のCL及び血清もしくは血漿中濃度推移の予測を試みた。

一般的に抗体はその体内動態特性から2つのグループに分類される。1つ目は線形消失を示す抗体である。標的抗原の発現量が抗体量に比べて著しく低い、もしくは発現量が多いにも関わらず、抗体の体内動態に影響を与えない場合、抗体は線形消失を示す。2つ目は非線形消失を示す抗体である。特に標的抗原が細胞膜上に発現しており、またその発現量が多い場合、抗体は非線形の消失を示す。非線形消失を示す抗体の場合、その解析には非線形消失を組み込んだ解析と質の高いデータセットが必要になる事から、本研究では線形消失を示す抗体のみを選択した。Group A では21の抗体のCL, Q,  $V_c$ ,  $V_p$ のパラメータを収集もしくは算出し、4つのパラメータの中でCLが最も大きい変動を示した。CLは、FcRn結合 [55]、isoelectric point (pI) [48]、糖鎖付加 [50]、off-target結合 [52]等のさまざまな要因により、大きく影響を受ける事が報告されている。一方、抗体は高い分子量を持つために $V_c$ は血清もしくは血漿容量で規定されると考えられる事から小さい変動を示した。また $V_p$ 及びQは組織移行性で規定され、前述したように抗体の組織移行性は低く、生理学的パラメータが影響すると考えられるため、CLに比べて小さな変動を示した。これらCLに比べて変動の小さい3つのパラメータ(Q,  $V_c$ ,  $V_p$ )をGroup Aで算出した幾何平均値で固定し、Group Bの皮下投与後の血清もしくは血漿中濃度推移のみからCL及びFを予測した結果、良好な予測性を示した。19の抗体中唯一C1 wild typeのみCL及びF共に実測値の30%以内に予測できなかった。要求される予測精度は適用するプロジェクトに依存するが、血清もしくは血漿中抗体濃度の定量系のバラつきや動物の個体間差を考慮すると予測精度は十分であると考えられる。

本解析のデータセットにはFcRnへの結合を増強するためにアミノ酸改変を導入している抗体も含まれている。FcRnへの結合を増強するための様々なアミノ酸改変が、hFcRn Tgm [53]、カニクイザル [63]、ヒト [55]で抗体のCLを改善する事がすでに報告されている。CLを改善する事により、投与量の低減及び投与間隔の延長を達成でき、すでにヒトにおいてもその効果が示されている事から、今後FcRnへの結合を増強するためにアミノ酸改変を導入している抗体の開発が加速する事が予想される。Figure 15に示すように、CLにはFcRn結合が影響を与えるが、Q,  $V_c$ 及び $V_p$ には影響を与えない事から本アプローチの適用が可能である事が示唆され、またFigure 16及び17に示すように皮下投与後のF及び静脈内投与後のCL及び血清もしくは血漿中濃度推移の良好な予測性が示された。本研究結果から、それらのFcRnへの結合を増強するためにアミノ酸改変を導入している抗体に関しても本アプローチが適用可能である事が示された。

本アプローチを使用する際にはフリップフロップ現象を考慮する必要がある。フリップフロップ現象は経口投与や皮下投与後の薬物の吸収速度が消失速度よりも遅いため吸収速度律速となる場合に観察され、臨床においてもしばしば観察される [94]。しかし、本研究で使用したすべての抗体は消失速度よりも早い吸収速度（約 1.0/day）を示したため、フリップフロップ現象の影響はないものと判断した。今後、本アプローチを使用する場合、通常の吸収速度である 1/day よりも早い  $\beta$  相が観察された際にはフリップフロップ現象の影響を考慮しなければならない。

皮下投与製剤を開発する際に、しばしばカニクイザルにおける皮下投与後の体内動態データのみが論文に記載されることがある [30, 71]。これまでは皮下投与後の体内動態データのみでは CL と F を分離推定する事ができなかったが、こういったケースにおいても本アプローチを用いる事で良好な精度を持って CL と F を推定できると考えられる。また本研究ではカニクイザルを評価対象としたが、ヒトにおいても皮下投与製剤を開発する際に、静脈内投与及び皮下投与の評価が実施されることがある。もし本アプローチがヒトにおいても適用でき、皮下投与データから精度良く CL 及び F が推定出来れば、臨床試験実施の効率を改善できる可能性がある。さらに非臨床における抗体の体内動態評価には、マウス [95]、ラット [96]、ウサギ [12]、モルモット [97]、フェレット [98]などが使用されることから、これらの動物種においても本アプローチを適用できる可能性がある。また本研究では皮下投与に焦点を当てたが、抗体の投与経路は静脈内及び皮下投与だけではなく、筋肉内 [99]、腹腔内 [100]、硝子体内 [101]等が報告されており、本アプローチの方法論は皮下投与に限定したものではないと考えられるため、皮下投与以外の投与経路にも適用できる可能性がある。

3Rs の観点において、Han らはカニクイザルの再使用について報告している [91]。通常、抗体をカニクイザルに投与すると抗薬物抗体を産生することがあり、体内に抗薬物抗体が存在すると抗体の体内動態に影響を及ぼす可能性がある。このため、抗体のカニクイザルの評価においては、抗体の投与歴のない個体を使用されることが多い。Han らは投与する抗体に交差性のある抗薬物抗体を保有する個体を選抜除外することで、抗体の投与歴のあるカニクイザルも評価に使用できる可能性を報告している。また私や他のグループから、抗体の体内動態評価におけるカニクイザルの代替としての hFcRn Tgm の使用を提案している [28, 29]。hFcRn Tgm は体内動態評価に有用であり、カニクイザルの評価を一部代替できる可能性があるが、薬効試験や毒性試験ではカニクイザルを使用しなければいけないケースも多く、また皮下投与後の吸収性評価における hFcRn Tgm の有用性は未だ報告されていない。これらの事から今後もカニクイザルを用いた評価は抗体医薬品の非臨床開発に非常に重要であり、本アプローチによりカニクイザルの使用頭数を削減できる可能性がある。

本研究では、カニクイザルにおいて過去に報告されている複数の抗体医薬品の静脈内投与後のデータを利用して  $Q$ ,  $V_c$ ,  $V_p$  を固定することで、対象となる抗体医薬品の皮下



投与後の血清もしくは血漿中抗体濃度推移データのみから皮下投与後の F 及び静脈内投与後の CL 及び血清もしくは血漿中抗体濃度推移を良好な精度で予測する事に成功した。さらに近年開発が進んでいる FcRn への結合を増強するためにアミノ酸改変を導入している抗体にも本アプローチが適用可能である事が示された。本アプローチは線形消失を示す抗体の非臨床体内動態評価において、コスト削減及び時間短縮に貢献でき、また必要動物数の削減により 3Rs に大きく貢献できると考えられる。

## 結論

以上三章において、抗体医薬品の標的抗原選択ならびに *in vivo* 薬物動態評価における効率化に関して論述し、以下の結論を得た。

### 第一章 新規抗体医薬品の標的抗原の選択における効率化のための PK/PD 解析

Recycling antibody 及び sweeping antibody の適用可能な標的抗原範囲の探索及びその効果を推定する事を目的に、PK/PD 解析を実施した。hFcRn Tgm を用いた PK 試験結果から PK/PD parameters を抽出して、様々な標的抗原プロファイル（血漿中濃度、消失クリアランス、抗体との結合プロファイル）に対する投与量低減効果及び投与期間延長効果を評価した。Recycling antibody 及び sweeping antibody は conventional antibody に比べて 2 mg/kg の投与量で標的抗原の 90% 阻害期間を延長できる事が明らかとなり、特に血漿中濃度が高い標的抗原においては、conventional antibody に対する優位性が大きい事が明らかとなった。また  $k_{off}$  を低下させる事により KD を減少させた際に、90% 阻害期間の延長効果に飽和性が認められたが、 $k_{on}$  を上昇させる事により KD を減少させる事でこの飽和性を改善できる事が明らかとなった。また 90% 阻害に必要な投与量においても、recycling antibody 及び sweeping antibody は conventional antibody に比べてすべての標的抗原プロファイルで低減できる事が明らかとなった。また投与期間延長効果と同様に  $k_{off}$  低下による投与量低減効果に飽和性が認められたが、 $k_{on}$  の上昇により改善できる事が明らかとなった。これらの結果から、複合体の消失クリアランスを上昇させる事で recycling antibody 及び sweeping antibody が投与頻度の低下及び投与量の低減を広範囲の標的抗原プロファイルで達成できる可能性がある事が明らかとなった。また  $k_{off}$  低下による投与頻度の低下及び投与量の低減効果の飽和が起きるメカニズムを速度論から明らかにし、 $k_{on}$  上昇の有用性を示した。これらの新規技術は他の技術とも組み合わせが可能であり、conventional antibody では達成できない価値を患者に提供する事で、QOL を改善する事が期待される。またこのような PK/PD 解析は新規抗体技術の標的抗原を選別する際に非常に有用であり、効率的な非臨床医薬品開発に大きく貢献できると考えられる。

### 第二章 抗体医薬品の薬物動態スクリーニング動物としての human FcRn transgenic mouse の有用性評価

抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質のヒトにおける半減期を精度良く反映する動物種を

探索するために、WT マウス、hFcRn Tgm 及びカニクイザルにおけるすでに承認取得済みの抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の半減期を比較したところ、ヒトに対して hFcRn Tgm が最も高い相関性を示した。特に WT マウスではヒトとの相関性が悪く、抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質の体内動態スクリーニングには適さない事が示された。ヒトで抗原非依存的な体内動態を示す抗体医薬品及び Fc 融合タンパク質において hFcRn Tgm は高い相関性を示したが、ヒトで抗原依存的消失を示すような抗体医薬品を含めた場合においても、その線形半減期を評価する場合は hFcRn Tgm が有用であることが明らかとなった。抗原依存的な非線形消失はカニクイザル等を使用する事が避けられないが、単一標的抗原を狙う1つのプロジェクト内における初期段階の体内動態評価においては、hFcRn Tgm を用いた抗原非依存的な体内動態評価が有用であることが明らかとなった。また Fc 融合タンパク質のような FcRn を介したリサイクルを利用した他の医薬品においても有用である可能性が示された。

### 第三章 皮下投与後の薬物動態データを用いた静脈内投与後の薬物動態の予測

カニクイザルにおいて、過去に報告されている複数の抗体医薬品の静脈内投与後のデータを利用して、対象となる抗体医薬品の皮下投与後の体内動態データのみを用いて、F、静脈内投与後の CL、及び血清もしくは血漿中抗体濃度推移の予測を試みた。カニクイザルにおける21の抗体の2コンパートメントモデルパラメータの中で、CL が最も大きい変動を示し、また Q、V<sub>c</sub>、V<sub>p</sub> は相対的に小さな変動を示す事が明らかとなった。次にここで得られた Q、V<sub>c</sub>、V<sub>p</sub> の幾何平均値と他の19の抗体の皮下投与後の血清もしくは血漿中抗体濃度推移から F 及び静脈内投与後の CL を予測した。その結果、いずれのパラメータも19抗体中の18例で±30%以内に予測されたことから、本アプローチの良好な予測精度が明らかとなった。さらに皮下投与後の血清もしくは血漿中抗体濃度推移から静脈内投与後の血清もしくは血漿中抗体濃度推移を予測したところ、実測値のほとんどを±2倍以内に予測する事が可能であった。このことから、本アプローチは F 及び CL に限らず、静脈内投与後の血清もしくは血漿中抗体濃度推移であっても良好に予測可能である事が明らかとなった。また本データセットには FcRn への結合を増強するためにアミノ酸改変を導入している抗体も含まれており、通常の抗体同様に良好な予測精度を示したことから、本アプローチはこのような改変抗体においても適用可能である事が明らかとなった。このようなアプローチは非臨床体内動態評価において、コスト削減及び時間短縮に貢献でき、また必要動物数の削減により 3Rs に大きく貢献できると考えられる。

以上、抗体医薬品の非臨床薬物動態評価において、新規抗体技術による標的抗原の選択において、メカニズムに基づく PK/PD 解析を用いる事で効率的により有望な標的抗原を選抜する事を可能とし、効率的なプロジェクト創出へ貢献するための有用な知見を提供した。また初期 *in vivo* 薬物動態スクリーニングにおける hFcRn Tgm の有用性を示し、またカニクイザルにおいて静脈内投与群を設定することなく、皮下投与群のみで皮下吸収性を評価する事を可能とする事により、より効率的な研究スキームを提供した。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、親身なるご指導を賜りました京都薬科大学 薬物動態学分野 栄田敏之 教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、終始ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました中外製薬株式会社 前臨床研究部 橘達彦 博士に深甚なる謝意を表します。

本研究遂行の機会を与えて戴き、著者の研究活動にあらゆる面でのご支援をいただきました中外製薬株式会社 前臨床研究部 部長 石谷雅樹 博士、中外製薬株式会社 バイオ医薬研究部 部長 井川智之 博士、Chugai Pharmabody Research Pte. Ltd. Research Head 根津淳一 博士に多大なる感謝の意を表します。

本研究には、多くの共同研究者の方々の協力を頂きました。岩柳有起氏、尾関和久博士、名波雅彦博士には本研究の薬物動態評価について、前田敦彦氏には抗体作製及び調製についてご協力頂き、深く感謝致します。またここで記載させて頂いた方以外にも多くの中外製薬株式会社の研究者の方々に多大なるご協力及びご助言を頂きました。ご協力頂きました皆様に深く感謝の意を表します。

末筆ながら、これまで学生時代より私の研究活動を支援してくれた両親、妻、子供たちに心から感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Janice M. Reichert. Antibodies to watch in 2016. *MAbs* **2016**, 8(2), 197-204.
- 2) Emmanuelle Varlet-Marie, Aurélie Gaudard, Michel Audran, and Francoise Bressolle. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of recombinant human erythropoietins in doping control. *Sports Med.* **2003**, 33(4), 301-315.
- 3) Iain C. Macdougall, Richard Robson, Sylvie Opatrna, Xavier Liogier, Anne Pannier, Paul Jordan, Frank C. Dougherty, and Bruno Reigner. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, 1(6), 1211-1215.
- 4) Roy S. Herbst, David H. Johnson, Eric Mininberg, David P. Carbone, Ted Henderson, Edward S. Kim, George Blumenschein, Jack J. Lee, Diane D. Liu, Mylene T. Truong, Waun K. Hong, Hai Tran, Anne Tsao, Dong Xie, David A. Ramies, Robert Mass, Somasekar Seshagiri, David A. Eberhard, Sean K. Kelley, and Alan Sandler. Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23(11), 2544-2555.
- 5) Alice B. Gottlieb, Kevin D. Cooper, Thomas S. McCormick, Eiko Toichi, Daniel E. Everitt, Bart Frederick, Yaowei Zhu, Charles E. Pendley, Martin A. Graham, and Mary Ann Mascelli. A phase 1, double-blind, placebo-controlled study evaluating single subcutaneous administrations of a human interleukin-12/23 monoclonal antibody in subjects with plaque psoriasis. *Curr. Med. Res. Opin.* **2007**, 23(5), 1081-1092.
- 6) Yik Andy Yeung, Maya K. Leabman, Jonathan S. Marvin, Julia Qiu, Camellia W. Adams, Samantha Lien, Melissa A. Starovasnik, and Henry B. Lowman. Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J. Immunol.* **2009**, 182(12), 7663-7671.
- 7) Frank J. Dixon, Paul H. Maurer, and Maria P. Deichmiller. Half-lives of homologous serum albumins in several species. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1953**, 83(2), 287-288.
- 8) Chaity Chaudhury, Charles L. Brooks, Daniel C. Carter, John M. Robinson, and Clark L. Anderson. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* **2006**, 45(15), 4983-4990.
- 9) Izuru Miyoshi<sup>1</sup>, Yoko Fujimoto, Masahito Yamada, Sadahiro Abe, Qinying Zhao, Carol Cronenberger, Kanae Togo, Taro Ishibashi, Martin M. Bednar, James W. Kupiec, and Brendon Binneman. Safety and pharmacokinetics of PF-04360365 following a single-dose intravenous infusion in Japanese subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, 51(12), 911-923.

- 10) Jasper J. Haringman, Danielle M. Gerlag, Tom J. M. Smeets, Dominique Baeten, Filip Van den Bosch, Barry Bresnihan, Ferdinand C. Breedveld, Huib J. Dinant, Francois Legay, Hermann Gram, Pius Loetscher, Robert Schouder, Thasia Woodworth, and Paul P. Tak. A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemotactic protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **2006**, 54(8), 2387-2392.
- 11) Yasmina Noubia Abdiche, Yik Andy Yeung, Javier Chaparro-Riggers, Ishita Barman, Pavel Strop, Sherman Michael Chin, Amber Pham, Gary Bolton, Dan McDonough, Kevin Lindquist, Jaume Pons, and Arvind Rajpal. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs* **2015**, 7(2), 331-343.
- 12) Lene Hansen, Lars Christian Petersen, Brian Lauritzen, Jes Thorn Clausen, Susanne Nedergaard Grell, Henrik Agersø, Brit Binow Sørensen, Ida Hilden, and Kasper Almholt. Target-mediated clearance and bio-distribution of a monoclonal antibody against the Kunitz-type protease inhibitor 2 domain of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Thromb. Res.* **2014**, 133(3), 464-471.
- 13) Greg P. Coffey, Judith A. Fox, Susanne Pippig, Susan Palmieri, Barbara Reitz, Michelle Gonzales, Anahid Bakshi, Josette Padilla-Eagar, and Paul J. Fielder. Tissue distribution and receptor-mediated clearance of anti-CD11a antibody in mice. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, 33(5), 623-629.
- 14) Tomoyuki Igawa, Shinya Ishii, Tatsuhiko Tachibana, Atsuhiko Maeda, Yoshinobu Higuchi, Shin Shimaoka, Chifumi Moriyama, Tomoyuki Watanabe, Ryoko Takubo, Yoshiaki Doi, Tetsuya Wakabayashi, Akira Hayasaka, Shoujiro Kadono, Takuya Miyazaki, Kenta Haraya, Yasuo Sekimori, Tetsuo Kojima, Yoshiaki Nabuchi, Yoshinori Aso, Yoshiki Kawabe, and Kunihiro Hattori. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat.Biotechnol.* **2010**, 28(11), 1203-1207.
- 15) T. Igawa, F. Mimoto, and K. Hattori. pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, 1844(11), 1943-1950.
- 16) Richard J. Kelly, Anita Hill, Louise M. Arnold, Gemma L. Brooksbank, Stephen J. Richards, Matthew Cullen, Lindsay D. Mitchell, Dena R. Cohen, Walter M. Gregory, and Peter Hillmen. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood* **2011**, 117(25), 6786-6792.
- 17) Robert C. Strunk, and Gordon R. Bloomberg. Omalizumab for asthma. *N. Engl. J. Med.* **2006**, 354(25), 2689-2695.
- 18) Tomoyuki Igawa, Atsuhiko Maeda, Kenta Haraya, Tatsuhiko Tachibana, Yuki Iwayanagi, Futa Mimoto, Yoshinobu Higuchi, Shinya Ishii, Shigero Tamba, Naoka Hironiwa, Kozue Nagano, Tetsuya Wakabayashi, Hiroyuki Tsunoda, and Kunihiro Hattori. Engineered monoclonal antibody with novel antigen-sweeping activity *in vivo*. *PLoS One* **2013**, 8(5), e63236.
- 19) Benjamin Wu, Amita Joshi, Song Ren, and Chee Ng. The application of mechanism-based

- PK/PD modeling in pharmacodynamic-based dose selection of muM17, a surrogate monoclonal antibody for efalizumab. *J. Pharm. Sci.* **2006**, 95(6), 1258-1268.
- 20) Chee M. Ng, Eric Stefanich, Banmeet S. Anand, Paul J. Fielder, and Louis Vaickus. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (TRX1) in healthy human volunteers. *Pharm. Res.* **2006**, 23(1), 95-103.
- 21) Yulia Vugmeyster, Cynthia Rohde, Mylene Perreault, Ruth E. Gimeno, and Pratap Singh. Agonistic TAM-163 antibody targeting tyrosine kinase receptor-B: applying mechanistic modeling to enable preclinical to clinical translation and guide clinical trial design. *MAbs* **2013**, 5(3), 373-383.
- 22) Alison M. Betts, Tracey H. Clark, Jianxin Yang, Judith L. Treadway, Mei Li, Michael A. Giovanelli, Yasmina Abdiche, Donna M. Stone, and Vishwas M. Paralkar. The application of target information and preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in predicting clinical doses of a Dickkopf-1 antibody for osteoporosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 333(1), 2-13.
- 23) Carsten Stein, Lothar Kling, Gabriele Proetzel, Derry C. Roopenian, Martin Hrabě de Angelis, Eckhard Wolf, and Birgit Rathkolb. Clinical chemistry of human FcRn transgenic mice. *Mamm. Genome* **2012**, 23(3-4), 259-269.
- 24) Louis-Philippe Boulet, Kenneth R. Chapman, Johanne Cote, Sanjay Kalra, Rajesh Bhagat, Veronica A. Swystun, Michel Laviolette, Laura D. Cleland, Francine Deschesnes, John Q. Su, Arthur Devault, Robert B. Fick, Jr., and Donald W. Cockcroft. Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, 155(6), 1835-1840.
- 25) M. A. Alyanakian, E. Bernatowska, J.M. Scherrmann, P. Aucouturier, and J.L. Poplavsky. Pharmacokinetics of total immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses in patients undergoing replacement therapy for primary immunodeficiency syndromes. *Vox. Sang.* **2003**, 84(3), 188-192.
- 26) Anthony W. Tolcher, Monica Mita, Neal J. Meropol, Margaret von Mehren, Amita Patnaik, Kristin Padavic, Monique Hill, Theresa Mays, Therese McCoy, Norma Lynn Fox, Wendy Halpern, Alfred Corey, and Roger B. Cohen. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25(11), 1390-1395.
- 27) Alejandro D. Ricart, Anthony W. Tolcher, Glenn Liu, Kyle Holen, Garry Schwartz, Mark Albertini, Geoffrey Weiss, Salim Yazji, Chee Ng, and George Wilding. Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds alpha5beta1 integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14(23), 7924-7929.



- 28) Kenta Haraya, Tatsuhiko Tachibana, Masahiko Nanami, and Masaki Ishigai. Application of human FcRn transgenic mice as a pharmacokinetic screening tool of monoclonal antibody. *Xenobiotica* **2014**, 44(12), 1127-1134.
- 29) Lindsay B. Avery, Mengmeng Wang, Mania S. Kavosi, Alison Joyce, Jeffrey C. Kurz, Yao-Yun Fan, Martin E. Dowty, Minlei Zhang, Yiqun Zhang, Aili Cheng, Fei Hua, Hannah M. Jones, Hendrik Neubert, Robert J. Polzer, and Denise M. O'Hara. Utility of a human FcRn transgenic mouse model in drug discovery for early assessment and prediction of human pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *MAbs* **2016**, 1-15.
- 30) Deborah L. Mortensen, Saileta Prabhu, Eric G. Stefanich, Saloumeh Kadkhodayan-Fischer, Thomas R. Gelzleichter, Dana Baker, Jenny Jiang, Kristin Wallace, Suhasini Iyer, Paul J. Fielder, and Wendy S. Putnam. Effect of antigen binding affinity and effector function on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-IgE monoclonal antibodies. *MAbs* **2012**, 4(6), 724-731.
- 31) A. T. Jones, and H.J. Ziltener. Enhancement of the biologic effects of interleukin-3 *in vivo* by anti-interleukin-3 antibodies. *Blood* **1993**, 82(4), 1133-1141.
- 32) T. Moritz, N. Niederle, J. Baumann, D. May, E. Kurschel, R. Osieka, J. Kempeni, E. Schlick, and C.G. Schmidt. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor alpha in advanced malignant disease. *Cancer Immunol. Immunother.* **1989**, 29(2), 144-150.
- 33) Jussi Kosola, Jani P. Vaarac, Markku Ahotupa, Heikki Kyröläinen, Matti Santtila, Niku Oksala, Mustafa Atalay, and Tommi Vasankari. Elevated concentration of oxidized LDL together with poor cardiorespiratory and abdominal muscle fitness predicts metabolic syndrome in young men. *Metabolism* **2013**, 62(7), 992-999.
- 34) Thomas A. Waldmann, Atsushi Iio, Makio Ogawa, O. Ross McIntyre, and Warren Strober. The metabolism of IgE. Studies in normal individuals and in a patient with IgE myeloma. *J. Immunol.* **1976**, 117(4), 1139-1144.
- 35) Floyd J. Malveaux, Mary Carol Conroy, N. Franklin Adkinson, Jr., and Lawrence M. Lichtenstein. IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *J. Clin. Invest.* **1978**, 62(1), 176-181.
- 36) Jim J. Xiao, Wojciech Krzyzanski, Yow-Ming Wang, Hongyan Li, Mark J. Rose, Mark Ma, Yuling Wu, Beth Hinkle, and Juan Jose Perez-Ruixo. Pharmacokinetics of anti-hepcidin monoclonal antibody Ab 12B9m and hepcidin in cynomolgus monkeys. *AAPS J.* **2010**, 12(4), 646-657.
- 37) Weirong Wang, Xiaofeng Wang, Rajitha Doddareddy, Damien Fink, Thomas McIntosh, Hugh M. Davis, and Honghui Zhou. Mechanistic pharmacokinetic/target engagement/pharmacodynamic (PK/TE/PD) modeling in deciphering interplay between a monoclonal antibody and its soluble target in cynomolgus monkeys. *AAPS J.* **2014**, 16(1), 129-139.

- 38) Patrick S. Daugherty, Gang Chen, Mark J. Olsen, Brent L. Iverson, and George Georgiou. Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng.* **1998**, 11(9), 825-832.
- 39) Laurence Renaut, Céline Monnet, Olivier Dubreuil, Ouafa Zaki, Fabien Crozet, Khalil Bouayadi, Hakim Kharrat, and Philippe Mondon. Affinity maturation of antibodies: optimized methods to generate high-quality ScFv libraries and isolate IgG candidates by high-throughput screening. *Methods Mol. Biol.* **2012**, 907, 451-461.
- 40) Victor Ghetie, James G. Hubbard, Jin-Kyoo Kim, May-Fang Tsen, Yukfung Lee, and E. Sally Ward. Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **1996**, 26(3), 690-696.
- 41) E. J. Israel, D.F. Wilsker, K.C. Hayes, D. Schoenfeld, and N.E. Simister. Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology* **1996**, 89(4), 573-578.
- 42) Jan Terje Andersen, Muluneh Bekele Daba, Gøril Berntzen, Terje E. Michaelsen, and Inger Sandlie. Cross-species binding analyses of mouse and human neonatal Fc receptor show dramatic differences in immunoglobulin G and albumin binding. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285(7), 4826-4836.
- 43) Raimund J. Ober, Caius G. Radu, Victor Ghetie, and E. Sally Ward. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int. Immunol.* **2001**, 13(12), 1551-1559.
- 44) Jennifer Q. Dong, David H. Salinger, Christopher J. Endres, John P. Gibbs, Cheng-Pang Hsu, Brian J. Stouch, Eunju Hurh, and Megan Gibbs. Quantitative prediction of human pharmacokinetics for monoclonal antibodies: retrospective analysis of monkey as a single species for first-in-human prediction. *Clin. Pharmacokinet.* **2011**, 50(2), 131-142.
- 45) Rong Deng, Suhasini Iyer, Frank-Peter Theil, Deborah L. Mortensen, Paul J. Fielder, and Saileta Prabhu. Projecting human pharmacokinetics of therapeutic antibodies from nonclinical data: what have we learned? *MAbs* **2011**, 3(1), 61-66.
- 46) Stefka B. Petkova, Shreeram Akilesh, Thomas J. Sproule, Gregory J. Christianson; Hana Al Khabbaz, Aaron C. Brown, Leonard G. Presta, Y. Gloria Meng, and Derry C. Roopenian. Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int. Immunol.* **2006**, 18(12), 1759-1769.
- 47) Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Minoru Tada, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. *J. Immunol.* **2010**, 184(4), 1968-1976.

- 48) T. Igawa, H. Tsunoda, T. Tachibana, A. Maeda, F. Mimoto, C. Moriyama, M. Nanami, Y. Sekimori, Y. Nabuchi, Y. Aso, and K. Hattori. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Eng. Des. Sel.* **2010**, 23(5), 385-392.
- 49) Konstantinos Karmiris, Gilles Paintaud, Maja Noman, Charlotte Magdelaine–Beuzelin, Marc Ferrante, Danielle Degenne, Karolien Claes, Tamara Coopman, Nele Van Schuerbeek, Gert Van Assche, Severine Vermeire, and Paul Rutgeerts. Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease. *Gastroenterology* **2009**, 137(5), 1628-1640.
- 50) Marcella Yu, Darren Brown, Chae Reed, Shan Chung, Jeff Lutman, Eric Stefanich, Anne Wong, Jean-Philippe Stephan, and Robert Bayer. Production, characterization, and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked mannose-5 glycans. *MAbs* **2012**, 4(4), 475-487.
- 51) Daniela Bumbaca, Anne Wong, Elizabeth Drake, Arthur E. Reyes II, Benjamin C. Lin, Jean-Philippe Stephan, Luc Desnoyers, Ben-Quan Shen, and Mark S. Dennis. Highly specific off-target binding identified and eliminated during the humanization of an antibody against FGF receptor 4. *MAbs* **2011**, 3(4), 376-386.
- 52) Yulia Vugmeyster Email author, Pam Szklut, David Wensel, John Ross, Xin Xu, Michel Awwad, Davinder Gill, Lioudmila Tchistiakov, and Garvin Warner. Complex pharmacokinetics of a humanized antibody against human amyloid beta peptide, anti- $\beta$  Ab2, in nonclinical species. *Pharm. Res.* **2011**, 28(7), 1696-1706.
- 53) M. Jack Borrok, Yanli Wu, Nurten Beyaz, Xiang-Qing Yu, Vaheh Oganesyanyan, William F. Dall'Acqua, and Ping Tsui. pH-dependent binding engineering reveals an FcRn affinity threshold that governs IgG recycling. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290(7), 4282-4290.
- 54) Rong Deng, Kelly M. Loyet, Samantha Lien, Suhasini Iyer, Laura E. DeForge, Frank-Peter Theil, Henry B. Lowman, Paul J. Fielder, and Saileta Prabhu. Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, 38(4), 600-605.
- 55) Gabriel J. Robbiea, Ryan Cristea, William F. Dall'Acqua, Kathryn Jensenc, Nita K. Patel, Genevieve A. Losonskye, and M. Pamela Griffin. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57(12), 6147-6153.
- 56) Wolfgang F. Richter, Suraj G. Bhansali, and Marilyn E. Morris. Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration. *AAPS J.* **2012**, 14(3), 559-570.
- 57) D. R. Mould, A. Baumann, J. Kuhlmann, M.J. Keating, S. Weitman, P. Hillmen, L.R. Brettman, S. Reif, and P.L. Bonate. Population pharmacokinetics-pharmacodynamics of alemtuzumab (Campath) in patients with chronic lymphocytic leukaemia and its link to treatment response. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2007**, 64(3), 278-291.

- 58) Kenneth T. Luu, Simon Bergqvist, Enhong Chen, Dana Hu-Lowe, and Eugenia Kraynov. A model-based approach to predicting the human pharmacokinetics of a monoclonal antibody exhibiting target-mediated drug disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, 341(3), 702-708.
- 59) Valérie F. Cosson, Vivian W. Ng, Michaela Lehle, and Bert L. Lum. Population pharmacokinetics and exposure-response analyses of trastuzumab in patients with advanced gastric or gastroesophageal junction cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, 73(4), 737-747.
- 60) C. Kloft, E.U. Graefe, P. Tanswell, A.M. Scott, R. Hofheinz, A. Amelsberg, and M.O. Karlsson. Population pharmacokinetics of sibrotuzumab, a novel therapeutic monoclonal antibody, in cancer patients. *Invest. New Drugs* **2004**, 22(1), 39-52.
- 61) Jennifer A. Dumont, Tongyao Liu, Susan C. Low, Xin Zhang, George Kamphaus, Paul Sakorafas, Cara Fraley, Douglas Drager, Thomas Reidy, Justin McCue, Helen W. G. Franck, Elizabeth P. Merricks, Timothy C. Nichols, Alan J. Bitonti, Glenn F. Pierce, and Haiyan Jiang. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood* **2012**, 119(13), 3024-3030.
- 62) A. Belldegrin, Y. Shoenfeld, A.I. Pick, and D. Vana. Age related distribution of serum immunoglobulin concentration in 1003 healthy children and adults. *Biomedicine* **1980**, 33(1), 8-12.
- 63) Yik Andy Yeung, Xiumin Wu, Arthur E. Reyes II, Jean-Michel Vernes, Samantha Lien, John Lowe, Mauricio Maia, William F. Forrest, Y. Gloria Meng, Lisa A. Damico, Napoleone Ferrara, and Henry B. Lowman. A therapeutic anti-VEGF antibody with increased potency independent of pharmacokinetic half-life. *Cancer Res.* **2010**, 70(8), 3269-3277.
- 64) Donna K. Finch, Matthew A. Sleeman, Jacques Moisan, Franco Ferraro, Sara Botterell, Jamie Campbell, Duncan Cochrane, Simon Cruwys, Elizabeth England, Steven Lane, Elizabeth Rendall, Monisha Sinha, Craig Walker, Gareth Rees, Michael A. Bowen, Amy Schneider, Meina Liang, Raffaella Faggioni, Michael Fung, Philip R. Mallinder, Trevor Wilkinson, Roland Kolbeck, Tristan Vaughan, and David C. Lowe. Whole-molecule antibody engineering: generation of a high-affinity anti-IL-6 antibody with extended pharmacokinetics. *J. Mol. Biol.* **2011**, 411(4), 791-807.
- 65) Jan Terje Andersen, Bjørn Dalhus, Dorthe Viuff, Birgitte Thue Ravn, Kristin Støen Gunnarsen, Andrew Plumridge, Karen Bunting, Filipa Antunes, Rebecca Williamson, Steven Athwal, Elizabeth Allan, Leslie Evans, Magnar Bjørås, Søren Kjærulff, Darrell Sleep, Inger Sandlie, and Jason Cameron. Extending serum half-life of albumin by engineering neonatal Fc receptor (FcRn) binding. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289(19), 13492-13502.
- 66) Sean K Kelley, Thomas Gelzleichter, Dong Xie, Wyne P Lee, Walter C Darbonne, Ferhan Qureshi, Kim Kissler, Ezogelin Oflazoglu, and Iqbal S Grewal. Preclinical pharmacokinetics,

- pharmacodynamics, and activity of a humanized anti-CD40 antibody (SGN-40) in rodents and non-human primates. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 148(8), 1116-1123.
- 67) Honghui Zhou, Haishan Jang, Roy M. Fleischmann, Esther Bouman-Thio, Zhenhua Xu, Joseph C. Marini, Charles Pendley, Qun Jiao, Gopi Shankar, Stanley J. Marciniak, Stanley B. Cohen, Mahboob U. Rahman, Daniel Baker, Mary Ann Mascelli, Hugh M. Davis, and Daniel E. Everitt. Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF-alpha monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Pharmacol.* **2007**, 47(3), 383-396.
- 68) R. J. Bauer, R. L. Dedrick, M. L. White, M. J. Murray, and M. R. Garovoy. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-CD11a antibody hu1124 in human subjects with psoriasis. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1999**, 27(4), 397-420.
- 69) Fung-Sing Chow, Lisa J. Benincosa, Sunita B. Sheth, Douglas Wilson, Charles B. Davis, Elisabeth A. Minthorn, and William J. Jusko. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of humanized anti-factor IX antibody (SB 249417) in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2002**, 71(4), 235-245.
- 70) Atsushi Muto, Kazutaka Yoshihashi, Minako Takeda, Takehisa Kitazawa, Tetsuhiro Soeda, Tomoyuki Igawa, Zenjiro Sampei, Taichi Kuramochi, Akihisa Sakamoto, Kenta Haraya, Kenji Adachi, Yoshiki Kawabe, Keiji Nogami, Midori Shima, and Kunihiro Hattori. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood* **2014**, 124(20), 3165-3171.
- 71) Patricia C. Ryan, Matthew A. Sleeman, Marlon Rebelatto, BingWang, Hong Lu, Xiaomin Chen, Chi-Yuan Wu, Mary Jane Hinrichs, Lorin Roskos, Heidi Towers, Kathleen McKeever, and Rakesh Dixit. Nonclinical safety of mavrilimumab, an anti-GMCSF receptor alpha monoclonal antibody, in cynomolgus monkeys: relevance for human safety. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, 279(2), 230-239.
- 72) Neuber, T., K. Frese, J. Jaehrling, S. Jager, D. Daubert, K. Felderer, M. Linnemann, A. Hohne, S. Kaden, J. Kolln, T. Tiller, B. Brocks, R. Ostendorp, and S. Pabst. Characterization and screening of IgG binding to the neonatal Fc receptor. *MAbs* **2014**, 6(4), 928-942.
- 73) Laurence T. Baxter, Hui Zhu, Daniel G. Mackensen, and Rakesh K. Jain. Physiologically based pharmacokinetic model for specific and nonspecific monoclonal antibodies and fragments in normal tissues and human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.* **1994**, 54(6), 1517-1528.
- 74) Eiji Mizuta, and Atsuko Tsubotani. Preparation of mean drug concentration--time curves in plasma. A study on the frequency distribution of pharmacokinetic parameters. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1985**, 33(4), 1620-1632.
- 75) S. Stephens, S. Emtage, O. Vetterlein, L. Chaplin, C. Bebbington, A. Nesbitt, M. Sopwith, D. Athwal, C. Novak, and M. Bodmer. Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses. *Immunology* **1995**, 85(4), 668-674.

- 76) William F. Dall'Acqua<sup>1</sup>, Peter A. Kiener, and Herren Wu. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.* **2006**, 281(33), 23514-23524.
- 77) Lisa J. Benincosa, Fung-Sing Chow, Leeann P. Tobia, Deborah C. Kwok, Charles B. Davis, and William J. Jusko. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a humanized monoclonal antibody to factor IX in cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 292(2), 810-816.
- 78) Tarundeep Kakkar, Mark Ma, Yao Zhuang, Aaron Patton, Zheng Hu, and Barbara Mounho. Pharmacokinetics and safety of a fully human hepatocyte growth factor antibody, AMG 102, in cynomolgus monkeys. *Pharm. Res.* **2007**, 24(10), 1910-1918.
- 79) Mark Zorbasa, Susan Hurstb, David Sheltonc, Mark Evansa, Deborah Fincob, and Mark Butt. A multiple-dose toxicity study of tanezumab in cynomolgus monkeys. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, 59(2), 334-342.
- 80) Wendy G. Halpern, Patrick Lappin, Thomas Zanardi, Wendy Cai, Marta Corcoran, John Zhong, and Kevin P. Baker. Chronic administration of belimumab, a BLYS antagonist, decreases tissue and peripheral blood B-lymphocyte populations in cynomolgus monkeys: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicologic effects. *Toxicol. Sci.* **2006**, 91(2), 586-599.
- 81) C. B. Davis, T.W. Hepburn, J.J. Urbanski, D.C. Kwok, T.K. Hart, D.J. Herzyk, S.G. Demuth, M. Leland, and G.R. Rhodes. Preclinical pharmacokinetic evaluation of the respiratory syncytial virus-specific reshaped human monoclonal antibody RSHZ19. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, 23(10), 1028-1036.
- 82) Maya K Leabman, Y Gloria Meng, Robert F Kelley, Laura E DeForge, Kyra J Cowan, and Suhasini Iyer. Effects of altered Fcγ<sub>1</sub> binding on antibody pharmacokinetics in cynomolgus monkeys. *MAbs* **2013**, 5(6), 896-903.
- 83) Amita Datta-Mannan, Derrick R. Witcher, Ying Tang, Jeffrey Watkins, and Victor J. Wroblewski. Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282(3), 1709-1717.
- 84) Sung-Youl Ko, Amarendra Pegu, Rebecca S. Rudicell, Zhi-yong Yang, M. Gordon Joyce, Xuejun Chen, Keyun Wang, Saran Bao, Thomas D. Kraemer, Timo Rath, Ming Zeng, Stephen D. Schmidt, John-Paul Todd, Scott R. Penzak, Kevin O. Saunders, Martha C. Nason, Ashley T. Haase, Srinivas S. Rao, Richard S. Blumberg, John R. Mascola, and Gary J. Nabel. Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. *Nature* **2014**, 514(7524), 642-645.
- 85) Jonathan Zalevsky, Aaron K Chamberlain, Holly M Horton, Sher Karki, Irene W L Leung, Thomas J Sproule, Greg A Lazar, Derry C Roopenian, and John R Desjarlais. Enhanced antibody half-life improves *in vivo* activity. *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28(2), 157-159.
- 86) Naohide A Geyama, Hiroaki Shibata, Hayato Narita, Khoji Hanari, Ayako Kohno, Fumiko Ono,

- Yasuhiro Yoshikawa, and Keiji Terao. Specific gravity of whole blood in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*), and tamarins (*Saguinus labiatus*) and total blood volume in cynomolgus monkeys. *Contemp. Top Lab. Anim. Sci.* **2001**, 40(3), 33-35.
- 87) K. Kock, W.J. Pan, J.M. Gow, M.J. Horner, J.P. Gibbs, A. Colbert, T.J. Goletz, K.J. Newhall, W.A. Rees, Y. Sun, Y. Zhang, J.C. O'Neill, A.N. Umble-Romero, S.P. Prokop, C.D. Krill, L. Som, S.A. Buntich, M.W. Trimble, W.H. Tsuji, and J.E. Towne. Preclinical development of AMG 139, a human antibody specifically targeting IL-23. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, 172(1), 159-172.
- 88) Yvonne S. Lin, Cindy Nguyen, Jose-Luis Mendoza, Enrique Escandon, David Fei, Y. Gloria Meng, and Nishit B. Modi. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 288(1), 371-378.
- 89) Ivo P. Nnane, Zhenhua Xu, Honghui Zhou, and Hugh M. Davis. Non-Clinical Pharmacokinetics, Prediction of Human Pharmacokinetics and First-in-Human Dose Selection for CNTO 5825, an Anti-Interleukin-13 Monoclonal Antibody. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, 117(4), 219-225.
- 90) Christoph Spiess, Jack Bevers, Janet Jackman, Nancy Chiang, Gerald Nakamura, Michael Dillon, Hongbin Liu, Patricia Molina, J. Michael Elliott, Whitney Shatz, Justin M. Scheer, Glen Giese, Josefine Persson, Yin Zhang, Mark S. Dennis, James Giulianotti, Prateek Gupta, Dorothea Reilly, Enzo Palma, Jianyong Wang, Eric Stefanich, Heleen Scheerens, Germaine Fuh, and Lawren C. Wu. Development of a human IgG4 bispecific antibody for dual targeting of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) cytokines. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288(37), 26583-26593.
- 91) Chao Han, George R. Gunn, Joseph C. Marini, Gopi Shankar, Helen Han Hsu, and Hugh M. Davis. Pharmacokinetics and immunogenicity investigation of a human anti-interleukin-17 monoclonal antibody in non-naïve cynomolgus monkeys. *Drug Metab. Dispos.* **2015**, 43(5), 762-770.
- 92) P. Zia-Amirhosseini, E. Minthorn, L.J. Benincosa, T.K. Hart, C.S. Hottenstein, L.A. Tobia, and C.B. Davis. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of SB-240563, a humanized monoclonal antibody directed to human interleukin-5, in monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 291(3), 1060-1067.
- 93) Amita Datta-Mannan, Derrick R. Witcher, Jirong Lu, and Victor J. Wroblewski. Influence of improved FcRn binding on the subcutaneous bioavailability of monoclonal antibodies in cynomolgus monkeys. *MAbs* **2012**, 4(2), 267-273.
- 94) Jaime A Yáñez, Connie M Remsberg, Casey L Sayre, M Laird Forrest, and Neal M Davies. Flip-flop pharmacokinetics--delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. *Ther. Deliv.* **2011**, 2(5), 643-672.

- 95) David G. Covell, Jacques Barbet, Oscar D. Holton, Christopher D. V. Black, R. J. Parker, and John N. Weinstein. Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab' in mice. *Cancer Res.* **1986**, 46(8), 3969-3978.
- 96) Susan E Lacy, Chengbin Wu, Dominic J Ambrosi, Chung-Ming Hsieh, Sahana Bose, Renee Miller, Donna M Conlon, Edit Tarcsa, Ravi Chari, Tariq Ghayur, and Rajesh V Kamath. Generation and characterization of ABT-981, a dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig(TM)) molecule that specifically and potently neutralizes both IL-1alpha and IL-1beta. *MAbs* **2015**, 7(3), 605-619.
- 97) Stuart Dowall, Irene Taylor, Paul Yeates, Leonie Smith, Antony Rule, Linda Easterbrook, Christine Bruce, Nicola Cook, Kara Corbin-Lickfett, Cyril Empig, Kyle Schlunegger, Victoria Graham, Mike Dennis, and Roger Hewson. Catheterized guinea pigs infected with Ebola Zaire virus allows safer sequential sampling to determine the pharmacokinetic profile of a phosphatidylserine-targeting monoclonal antibody. *Antiviral Res.* **2013**, 97(2), 108-111.
- 98) Thomas C. Nessor, and Bernard Scallon. Chimeric antibodies with extended half-life in ferrets. *Influenza Other Respir. Viruses* **2014**, 8(5), 596-604.
- 99) X. Saez-Llorens, E. Castano, D. Null, J. Steichen, P.J. Sanchez, O. Ramilo, F.H. Top, Jr., and E. Connor. Safety and pharmacokinetics of an intramuscular humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. The MEDI-493 Study Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1998**, 17(9), 787-791.
- 100) Victor H. Leyva-Grado, Gene S. Tan, Paul E. Leon, Mark Yondola, and Peter Palesea. Direct administration in the respiratory tract improves efficacy of broadly neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59(7), 4162-4172.
- 101) Eduardo Dib, Mauricio Maia, Ieda Maria Longo-Maugeri, Maria Cristina Martins, Juliana Sekeres Mussalem, Carla Cristina Squaiella, Fernando M. Penha, Octaviano Magalhães Jr, Eduardo B. Rodrigues, and Michel Eid Farah. Subretinal bevacizumab detection after intravitreal injection in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, 49(3), 1097-1100.