

課題番号 : 29指1012
研究課題名 : 医師主導治験を目指した抗マラリア完全ヒト型抗体医薬の開発研究
主任研究者名 : 狩野繁之
分担研究者名 : なし
キーワード : マラリア、感染症、抗体医薬、開発医療、政策研究
研究成果 :

本研究は、マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチド AD22 を標的とした“完全ヒト型モノクローナル抗体” 医薬を開発し、この抗体による、1) メロゾイトの赤血球への侵入阻害（発症防御／重症化阻止）、2) 肝細胞への侵入阻害（感染防御）というマラリア原虫生活史における 2 つの異なるステージで感染防御／阻害効果を示す POC (proof of concept) を得ることを目的とし、医師主導治験を目指す。すなわち、現在用いられる副作用や薬剤耐性が心配される抗マラリア薬の代用／併用を目指し、治療のみならず、感染予防効果も期待できる。

1) 抗 AD22 完全ヒト型モノクローナル抗体 5 クロンの単離

主任研究者が所属する国立国際医療研究センター (NCGM) が包括的共同研究協定 (MoU) を結んでいるラオス国立パスツール研究所 (IPL) で、そのスタッフと共に南部チャンパサック県に赴き、過去 1 ヶ月以内に熱帯熱マラリアから快復した既往歴のあるボランティア 20 名から、インフォームドコンセントを得て血液 (10 mL) を採取し、IPL のクリーンルームで末梢血単核球 (PBMC) と血清の調製を行い、凍結保存して日本国内に持ち帰ることができた。

PBMC と血清を、ELISA で AD22 に対する抗体価の高いサンプルを選抜し、EB ウイルスを感染させてポリクローナルな増殖を行い、抗 AD22 抗体産生細胞のクローニングを行った。さらに抗体産生細胞より RT-PCR 法で抗 AD22 抗体遺伝子を単離して、CHO 細胞に導入して抗体を発現させた。産生した抗体はプロテイン A カラム等で精製し、“抗 AD22 完全ヒト型モノクローナル抗体 (AD22-malumab)” を 5 クローン得ることができた。

2) メロゾイト期における赤血球侵入阻害効果

① in vitro 原虫増殖阻害試験

リング期に同調した培養熱帯熱マラリア原虫 (FCR3 株) と共に、96 穴プレートに各種濃度の“AD22-malumab”を加えて培養し、42~46 時間後の寄生率を計測し、侵入阻害率 (%) を算出した。対照群は、PBS およびマラリア抗原と反応しない malumab クローン添加群で行った。

その結果、“AD22-malumab” 5 クローンとも PBS 添加のコントロール群に対して有意に原虫増殖阻害活性を持つことが判明した。その中でも特に高い原虫増殖阻害活性を示したクローンを抗体薬としての有望な候補に決定した (活性の程度は特許申請予定であるので開示しない)。

② “AD22-malumab” の大量作製

現在この候補クローンの特許申請および製品化にむけて、通常の Overwrap peptide scan 法のみならず、スプリングエイトなどによるエピトープ解析、ELISA もしくはビアコア解析等によるアフィニティー (kD 値測定など) の解析、さらには、ローデントマラリア原虫を用いたマウス感染実験で *in vivo* における抗体治療効果の評価を行うため、大量に候補モノクローナル抗体の追加作成に着手した。

3) スポロゾイトの肝細胞侵入阻害活性試験

本研究に先立つ開発研究 (26 指 202) において、抗 AD22 ウサギポリクローナル抗体のネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) のスポロゾイトとの反応性を確認し、さらに同ポリクローナル抗体がスポロゾイトの肝細胞侵入阻害活性を持つことを確認している。“AD22-malumab”での同試験を行うことを考慮し、ポジコンをなる抗 AD ウサギポリクローナル抗体の追加作製も行い、精製抗体を得た。今後、スポロゾイトの肝細胞への侵入阻害活性ならびに共焦点レーザー顕微鏡によるスポロゾイト表面の“AD22-malumab”によるエピトープの局在解析を進める。

Subject No. : 29A1012

Title : Development of an anti-malaria fully human therapeutic monoclonal antibody leading to an investigator-initiated trial

Researchers : Shigeyuki Kano

Key word : malaria, infectious disease, antibody drugs, development of medicine, policy study

Abstract :

1) Isolation of 5 clones of anti-AD22 fully human monoclonal antibody (AD22-malumab)

At the Institut Pasteur du Laos (with which NCGM made a collaborative research agreement), we collected peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum from volunteers who lived in southern part of Laos and had past histories of falciparum malaria.

The samples with high antibody titers against AD22 were selected by an ELISA. The EB virus was infected, polyclonal proliferation was performed, and anti-AD22 antibody producing cells were cloned. Anti-AD22 antibody gene was isolated from antibody-producing cells by the RT-PCR and transferred the antibody gene to CHO cells to express the antibody. The produced antibody was purified with protein A column. Finally, we obtained a total of 5 clones of AD22-malumab.

2) Inhibitory effect of erythrocyte invasion

a. In vitro growth inhibition test

Synchronized ring stage of cultured *P. falciparum* parasites (FCR 3 strain) were incubated with various concentrations of AD22-malumab. After 42 to 46 hours, the parasitemia was measured and the invasion inhibition rate (%) was calculated.

As a result, it was revealed that 5 clones of AD22-malumab had a significant growth inhibitory activity against the control PBS group. Among them, one of the clones showing particularly highly growth inhibitory activity was selected as a promising candidate.

b. Production of the AD22-malumab in a large scale

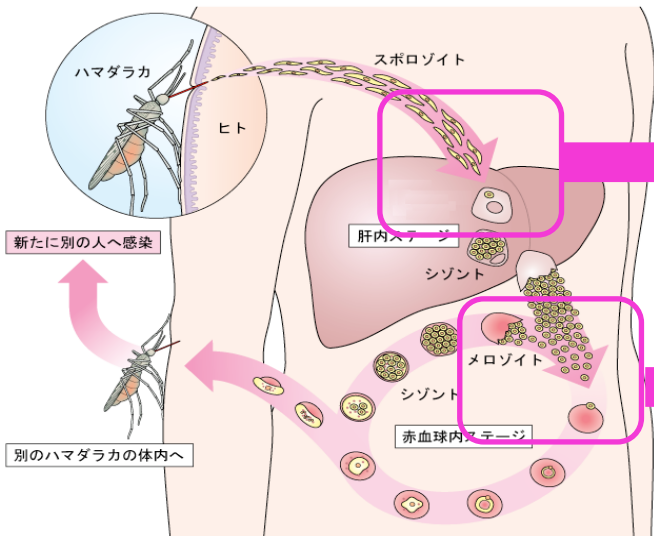
For producing human therapeutic monoclonal antibody to be applied to patents, we started pre-clinical studies such as analyzing the affinity (kD value measurement) and the epitope. In order to evaluate antibody therapeutic effect in mouse, we started to prepare rodent malaria parasites. We also began to prepare additional volume of candidate AD22-malumab in large quantity.

3) Inhibitory effect of hepatocyte invasion

The anti-AD22 rabbit polyclonal antibody was confirmed to react with the sporozoite of the rodent malaria parasite (*P. berghei*) in our previous study. The polyclonal antibody further inhibited the invasion of sporozoites into hepatocytes. For measuring the inhibitory effect of AD22-malumab to hepatocyte invasion of sporozoites, anti-AD22 rabbit polyclonal antibodies were produced in a large scale as an experimentally positive control.

Researchers には、分担研究者を記載する。

医師主導治験を目指した抗マラリア完全ヒト型抗体医薬の開発研究 1



感染予防

スポロゾイト期の原虫表面に発現するエノラーゼは、肝細胞への侵入を促進すると推定される。

重症化阻止

メロゾイト期の原虫表面に発現するエノラーゼは、赤血球への侵入を促進すると推定される。

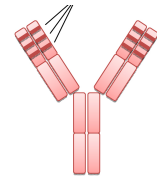


抗エノラーゼ抗体の作用機序 --> 原虫の宿主細胞への侵入を原虫生活史で阻害する

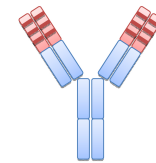
本研究は、マラリア原虫エノラーゼ部分ペプチドAD22を標的にしたマラリア治療薬として**世界初**となる抗体医薬（抗AD22完全ヒト型モノクローナル抗体）の開発を行う。

抗原結合部位

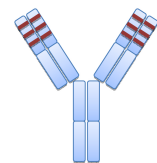
抗体医薬品の構造的分類



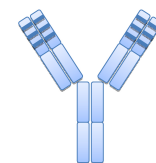
マウス抗体



キメラ型抗体



ヒト化抗体



完全ヒト抗体

マウス抗体由来配列

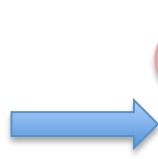
ヒト抗体由来配列

抗AD22完全ヒト型抗体を作製法

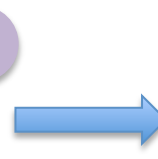
マラリア既往者



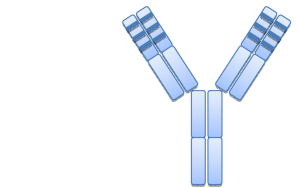
PBMCを単離



EVウイルスを感染させ増殖



抗AD22抗体産生細胞を単離



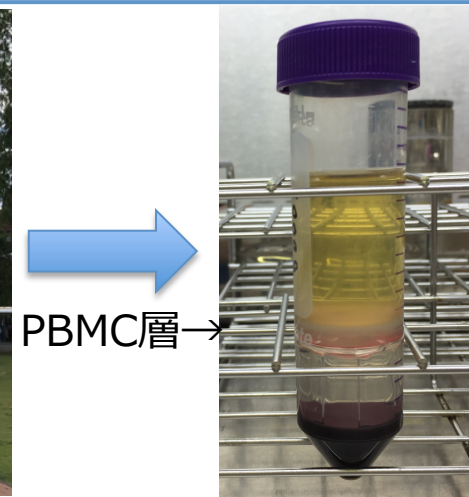
IgGのmRNAからcDNAを作製、CHO細胞に導入発現させて抗AD22完全ヒト型抗体を作製



ラオス南部チャンパサック県パライ村でマラリア既往歴のあるボランティアからの採血



血液をビエンチャンIPLに持ち帰り末梢血単核球 (PBMC) 及び血清を調製



PBMC層→

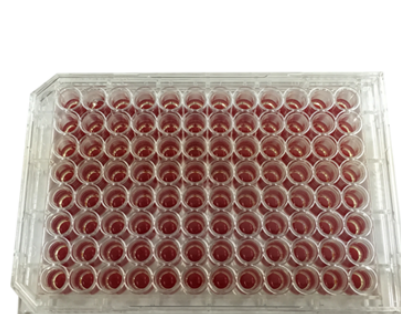
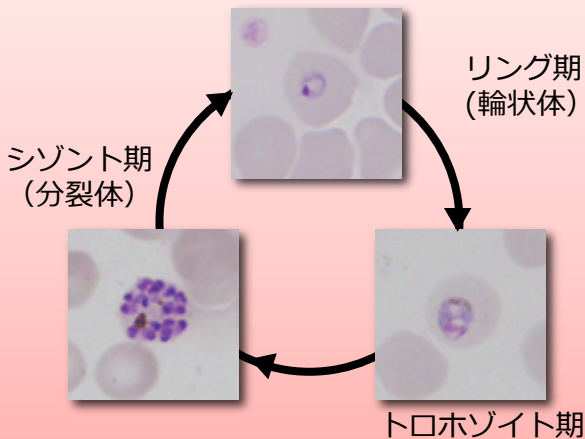
日本国内に持ち帰り完全ヒト抗体薬を作製

In vitro 原虫増殖阻害試験

寄生率0.05%になるように希釈した培養熱帯熱マラリア原虫 (FCR3株) に96穴プレートに抗AD22 (モノクロ、ポリクロ) 抗体 (精製IgG) を各種濃度で加えて培養し、42~47時間後 (1 サイクル後) の寄生率を計測し、増殖阻害率を算出した。

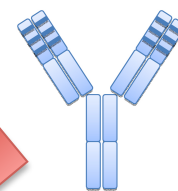
対照群は、抗体希釈Bufferと等量のPBS群、及びマラリア抗原と反応しない完全ヒト型モノクローナル抗体添加群で行った。

赤内型原虫サイクル



培養上清に添加し培養する (96穴プレート 100μL/well)

コントロール群の寄生率と比較



抗AD22完全ヒト型モノクローナル抗体



ギムザ染色後検鏡

原虫増殖阻害活性の確認

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指1012

研究課題名： 医師主導治験を目指した抗マalaria完全ヒト型抗体医薬の開発研究

主任研究者名： 狩野繁之

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。