

バイオ医薬品の品質特性解析法の検討 —液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置を利用した NISTモノクローナル抗体標準品の解析—

小島 理恵子, 小木曾 英夫

Characterization of the NIST monoclonal antibody using liquid chromatography time - of - flight mass spectrometry

Rieko KOJIMA, Hideo OGISO

要 約

近年国内外において精力的にバイオ医薬品の研究開発が進んでおり、今後ますますの発展が期待される。なかでも抗体医薬品は、現在までに承認されている約70品目のうち、過半数がここ10年の間に開発されており、急速に研究開発が進められていることが伺える。本研究では、バイオ医薬品に関する富山県内製薬企業からの新たなニーズを見据えて、バイオ医薬品の解析技術を当センターにおいて確立することを目的とした。

本研究では、液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) を用いてNISTmAb (モノクローナル抗体の標準品 RM8671) の解析法の検討を行い、一連の基本的な解析手法を確立した。

Summary

The biopharmaceutical industry has increased significantly over recent years and is believed to have great potential for further development. The majority of approved antibody drugs have been developed in the last 10 years, suggesting the rapid growth of their development. In this study, we aimed to establish the analytical methods of antibody drugs for technical support of pharmaceutical companies in Toyama.

We investigated the analytical method of NISTmAb (standard monoclonal antibody RM8671) using a liquid chromatograph / time-of-flight mass spectrometer (LC-TOF/MS) and established a series of basic analytical methods.

緒 言

バイオ医薬品は、従来の化学合成医薬品と比べて分子量がはるかに大きく、複雑な構造を持つ。バイオ医薬品は遺伝子組換え技術や細胞培養技術を用いて生産されるため、糖鎖修飾等の様々な翻訳後修飾を受けることにより、不均一性を生ずる。翻訳後修飾に伴う不均一性は、タンパク質の活性、すなわち、薬剤としての機能に影響を及ぼすことがあるため、バイオ医薬品の取り扱いには適切な品質評価と管理が求められる。バイオ医薬品の品質評価に関するガイドラインは医薬品規制調和国際会議 (ICH) から公示され (1)、日本においても抗体医薬品に関するガイドライン (2) が公示されており、従来の化学合成医薬品と比べて多角的で複雑な解析が必要である。本研究では、富山県内製薬企業への技術的な支援を行うことを目的として、創薬研究開発センターに設置の液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) を用

いたバイオ医薬品の品質特性解析法の検討を行った。解析対象として、NIST (アメリカ国立標準技術研究所) が開発したモノクローナル抗体標準品 NISTmAb (RM8671) を選出し、LC-TOF/MSを使ったインタクト解析、サブユニット解析、ペプチドマッピング、遊離糖鎖解析の4つの基本的な解析手法を確立した。

方法及び結果

1. インタクト解析

バイオ医薬品の品質管理では、目的タンパク質の分子量を決定することが求められる。インタクト解析では、タンパク質をそのままの状態ですべての質量分析計を用いて解析することにより、タンパク質全体の分子量に加えて、糖鎖やアミノ酸修飾の一部についておおまかな情報を得ることができ、ある程度の不均一性を評価できる。図1に、インタクトのNISTmAbをLC-TOF/MSを用いて解析した結果を示す。デコン

ポリマー化*後の質量スペクトルから、インタクトのNISTmAbからは18成分がピークとして観測され、そのうちG0F/G0F, G0F/G1F, G1F/G1F**の組み合わせでN型糖鎖修飾されたものがメジャーな成分であることが分かった(図1B及び表1のピーク番号7, 9, 11)。NISTmAbの分子量は約150 kDaであるが、

インタクト解析から得られた平均質量(Observed Mass)は、いずれも理論上の平均質量(Theoretical Mass)と10 Da以内の誤差に収まっており、高い質量精度で測定できることが確認できた(表1)。また、今回我々が取得したデータ並びに解析結果は、報告されているデータ(3)と同等であることが確認できた。

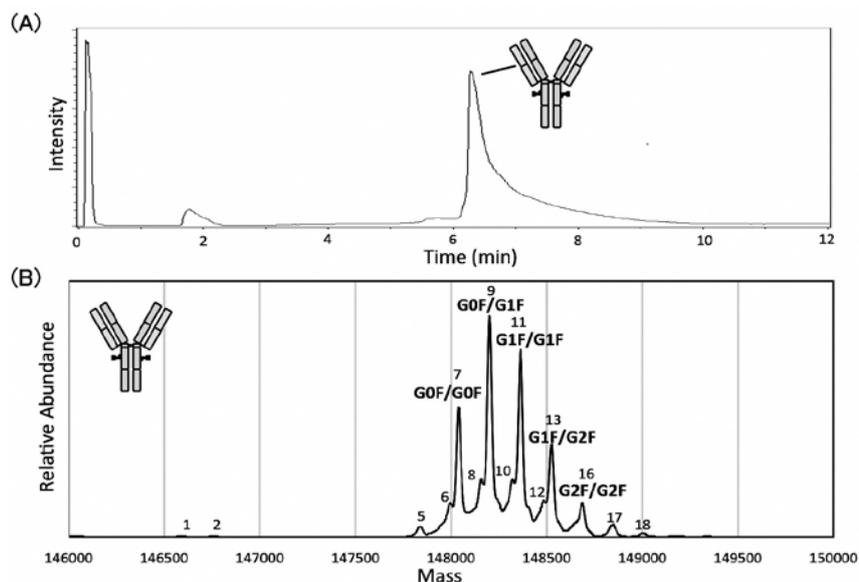


図1 LC-TOF/MSを使ったNISTmAbのインタクト解析

- (A) インタクトNISTmAbのトータルイオンクロマトグラム。1 µgのNISTmAbをインジェクトし、リニアグラジエント溶出を行った。使用カラム:BioResolve RP mAb Polyphenyl 2.1x150 mm (Waters社)、移動相A:0.1% Formic acid, 移動相B:0.1% Formic acid in acetonitrile。
 (B) (A)の6.3 minの溶出ピークをデコンポリマー化処理した0価の質量スペクトル。18のピークが観測された。

表1. LC-TOF/MSを用いて測定したNISTmAbの平均質量

Peak#	Proteoform	Theoretical Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Relative abundance
1	G0F/Aglycosylated	146591.8	146592.2	t
2	G1F/Aglycosylated	146754.0	146759.5	t
3	G2F/Aglycosylated	146916.1	ND	-
4	G0F/G0F · 2GlcNAc	147630.8	ND	-
5	G0F/G0F · GlcNAc	147834.0	147837.3	mn
6	G0F/G1F · GlcNAc	147996.1	147996.8	mn
7	G0F/G0F	148037.2	148039.7	M
8	G0F/G0F + K	148165.3	148158.8	mn
9	G0F/G1F	148199.3	148201.6	M
10	G0F/G1F + K	148327.5	148323.3	mn
11	G1F/G1F	148361.4	148363.5	M
12	G1F/G1F + K	148489.6	148487.3	mn
13	G1F/G2F	148523.6	148525.4	mn
14	G1F/G1F + 2K	148617.8	ND	-
15	G1F/G2F + K	148651.8	ND	-
16	G2F/G2F	148685.7	148686.7	mn
17	G2F/G2F + Hex	148847.7	148845.8	mn
18	G2F/G2F + 2Hex	149010.0	149004.0	t

ND: Not Detected, M: Major (>40% of maximum peak height),
 mn: minor (3%–40% of maximum peak height), t: trace (<3% of maximum peak height)
 Peak#は図1Bに示したピーク番号に相当する。

*デコンボリューション：価数の異なる複数の質量スペクトルから0価に相当する質量に変換する処理。

**ガラクトースを含まないN型糖鎖をG0、1つあるいは2つのガラクトースを含むものをそれぞれG1、G2とし、さらにフコースが付加されたものをG0F、G1F、G2Fと表す。NISTmAbはCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を用いて生合成されており、G0F、G1F、G2Fの3種類のN型糖鎖が主に修飾されることが分かっている。また、抗体1分子につき2カ所のN型糖鎖修飾部位があるため、この3種類を組み合わせた糖鎖が修飾される。

2. サブユニット解析

サブユニット解析は、抗体を3つのサブユニットに分解して質量分析計による解析を行う手法である。抗体を分子量約25 kDaのサブユニットに分解して解析することにより、モノアイソトピック質量（各元素の最も存在比の高い同位体から構成される分子の精密質量）を得られるため、インタクト解析と比べてより詳細な翻訳後修飾の情報を得ることができる。NISTmAbのサブユニットは、IdeS (IgGのヒンジ領域の下で特異的に切断する酵素, Genovis社) による消化と、還元変性処理により調製した。

図2に、LC-TOF/MSを使ったNISTmAbサブユ

ニット解析の結果を示す。3つのサブユニットはLCにより分離され、Fc/2、Lc、Fdの順に溶出された(図2A)。図2BにFc/2サブユニットのデコンボリューション後の質量スペクトルを示す。Fc/2サブユニットには、G0F、G1FのN型糖鎖が修飾されたものが多く存在し、G2Fが修飾されたものはマイナー成分であることが分かった。これはインタクト解析とも一致する結果であった。今回我々が行ったNISTmAbのサブユニット解析では、0.1 Da程度の誤差でサブユニットのモノアイソトピック質量を算出できることを確認した。加えて、微量成分であるハイマンノース型N型糖鎖やシアル酸含有糖鎖が付加したFc/2サブユニットが検出可能であることを確認できたことから、本手法が抗体医薬品の品質特性解析に有益であることが改めて確認できた。

3. ペプチドマッピング

ペプチドマッピングは、プロテアーゼ処理によりタンパク質をペプチドに分解し、アミノ酸配列の確認やアミノ酸修飾の有無および割合を解析する手法である。NISTmAbのペプチドマッピングには、NISTmAbを還元変性させ、トリプシン (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega社) によ

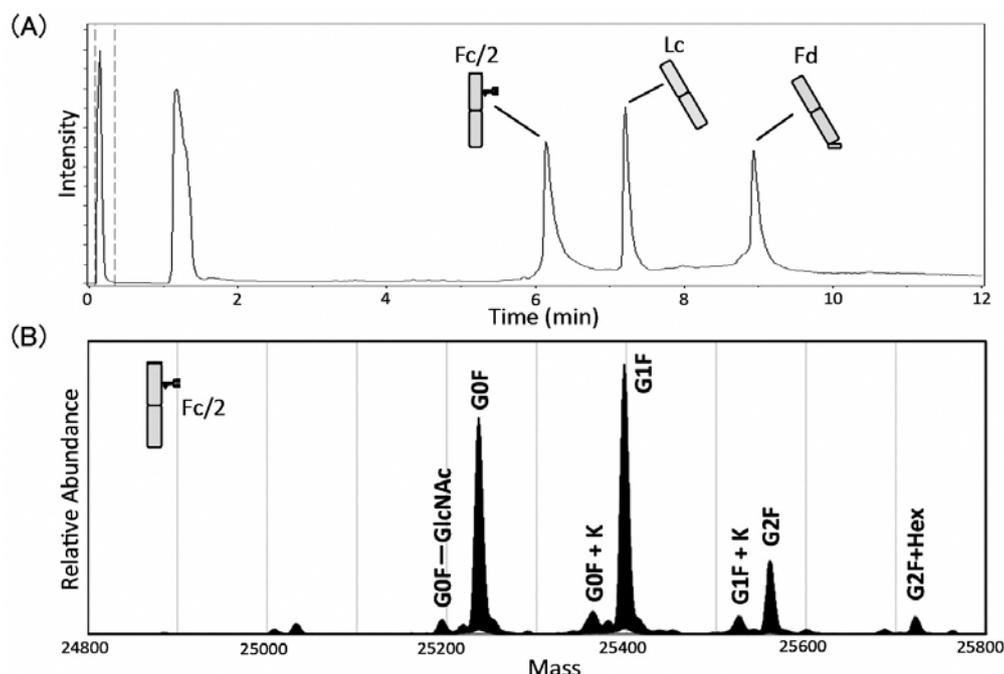


図2 LC-TOF/MSを使ったNISTmAbのサブユニット解析

- (A) 還元処理、IdeS消化後のNISTmAbのトータルイオンクロマトグラム。リニアグラジエントにより、サブユニットはFc/2、Lc、Fdの順に溶出された。使用カラム: BioResolve RP mAb Polyphenyl 2.1x150 mm (Waters), 移動相A: 0.1% Formic acid, 移動相B: 0.1% Formic acid in acetonitrile。
- (B) Fc/2サブユニットのデコンボリューション後の0価の質量スペクトル。G0F、G1FのN型糖鎖が修飾されたものがmajor peakとして観測された。

り一晚消化し、脱塩カラム (Zeba Spin Desalting Columns 7K MWCO, Thermo Scientific社) を用いて脱塩処理を行ったものを試料とした。試料はC18カラム (AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 1.0x100mm, Waters社) を用いてLC分離を行った後、TOF/MSによりMS及びMS/MS測定を行い、BioPharma Compassソフトウェアを用いて解析した (図3)。トリプシン消化を行ったNISTmAbは、Heavy Chain,

Light Chainともにシーケンスカバー率の目標値 (>95%) を達成したが、フラグメントカバー率は目標値 (>92%) に到達しなかった (図3Bトリプシン)。そこで、キモトリプシン (Chymotrypsin Endoproteinase, TLCK treated, MS Grade, Thermo Scientific社) により消化した試料を調製して同様に測定を行い、トリプシンのデータと合わせて解析したところ、フラグメントカバー率についても目標値を達成

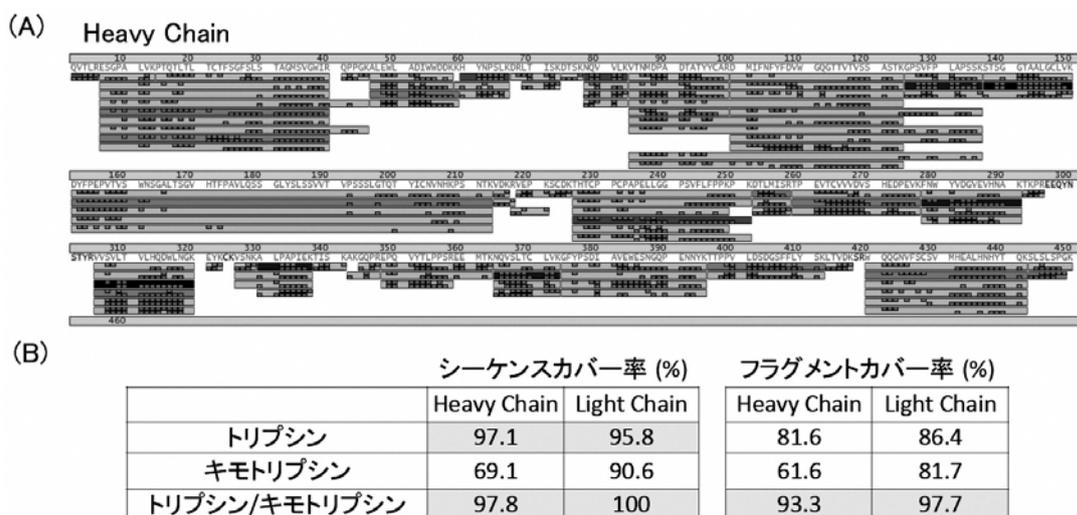


図3 ペプチドマッピングによるNISTmAbのアミノ酸配列の解析

- (A) 還元処理、トリプシン消化を施したNISTmAbのペプチドマッピング結果 (Heavy Chain) のイメージ図 (BioPharma Compassソフトウェアによる解析)。灰色のバーはMS測定により観測されたペプチド配列を示し、灰色の小さな四角はMS/MS測定により観測されたフラグメントイオンを示す。
- (B) トリプシンおよびキモトリプシンにより消化したNISTmAbのシーケンスカバー率a)、フラグメントカバー率b)を示す。最下段には、トリプシンとキモトリプシンのデータを合わせた解析結果を示す。目標値を達成したカバー率をハイライトで示す。
- a) シーケンスカバー率：MS測定で検出したペプチドの分子量から確認できたアミノ酸配列の割合。
b) フラグメントカバー率：MS/MS測定で検出したフラグメントイオンから確認できたアミノ酸配列の割合。

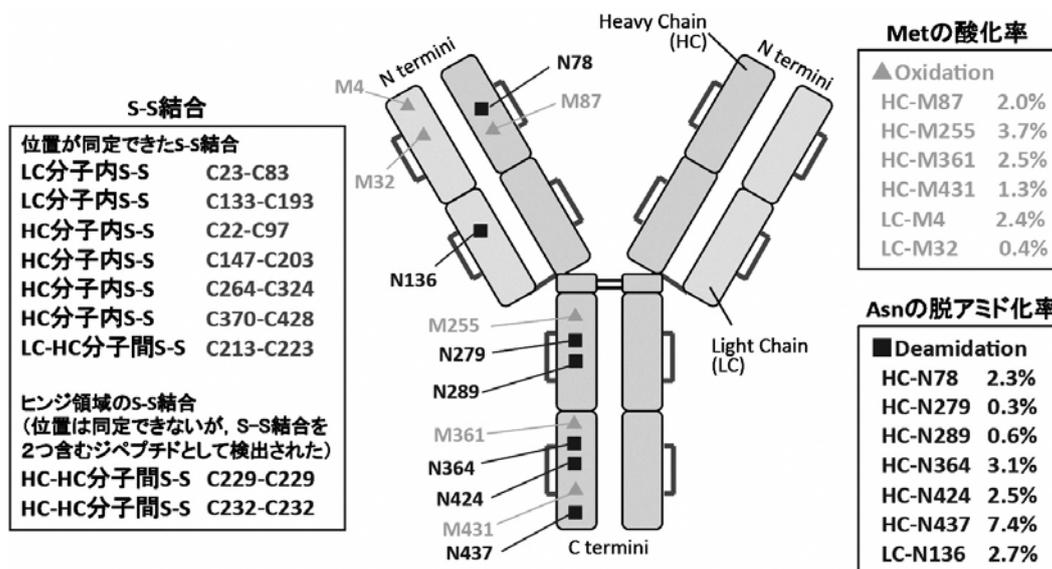


図4 ペプチドマッピングによるNISTmAbアミノ酸修飾の分析

することができた（図3Bトリプシン/キモトリプシン）。また、NISTmAbにおけるアミノ酸修飾の分析結果を図4に示す。タンパク質の安定性や活性に影響を与えることが知られているメチオニン残基の酸化やアスパラギン残基の脱アミド化など、不均一性の要因となるアミノ酸修飾について評価できることが確認できた。また、非還元下においてトリプシンとキモトリプシンによる同時消化を行うことで、ジスルフィド結合（S-S結合）の位置解析を行う手法を確立した。ただし、ヒンジ領域のS-S結合については本手法では正確な位置決定は困難であるため、別の手法（N末端アミノ酸配列解析等）を用いる必要がある。

4. 遊離糖鎖解析

遊離糖鎖解析は、タンパク質に修飾された糖鎖をグリコシダーゼ処理や化学的な方法により切り出し、糖鎖の種類や割合を解析する手法である。糖鎖はその種類によってタンパク質の生物活性に影響を与えることが知られており、特に、抗体医薬品においてはADCC（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity：抗体依存性細胞障害）、CDC（Complement Dependent Cytotoxicity: 補体依存性細胞障害）活性が変動するため、重要な品質評価項目である。

NISTmAb遊離糖鎖解析には、GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit（Waters社）を使用し、グリコシダーゼPNGaseFによる糖鎖切断と遊離糖鎖の精製を行い、試料とした。LC-TOF/MSを使った解析では、メジャーな糖鎖の検出と解析は可能であったが、十分な感度が得られなかったため、試料の調製や測定条件等について更に検討する必要がある。また、TOF/MS解析では糖鎖構造の推定は可能であるが、決定することはできないため、将来的には他の質量分析計やキャピラリー電気泳動装置を用いた解析手法を検討する必要があると考えられる。

まとめ

本研究ではNISTmAbを用いて、質量分析計を使った抗体分子の基本的な解析手法を確立した。今後、富山県内の製薬企業がバイオ医薬品あるいはバイオ後続品の研究開発に取り組む機会があれば、本研究により得た解析技術やノウハウを積極的に活用し、支援につなげたいと考えている。

文献

1) 生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生

物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定（ICH, Q6B）。

2) 「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」について（薬食審査発1214第1号）。

3) Formolo T, Ly M, Levy M, et al., Determination of the NISTmAb Primary Structure, 2015, ACS Symposium Series, Vol. 1201.