

高度分析機器を用いたバイオ医薬品の特性解析法の検討

小島 理恵子

Investigation on analytical methods of biopharmaceutical products using advanced analytical instruments

Rieko KOJIMA

要 約

本研究は、近年国内外で開発が加速されているバイオ医薬品に関する製薬企業からの新たなニーズを見据えて、富山県薬事総合研究開発センターにおいてバイオ医薬品の解析技術を確認することを目的とする。R1年度までに、NISTmAb（モノクローナル抗体の標準品 RM8671）を対象とした特性解析法の検討を行い、所有する液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置（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等の特性解析技術を確認してきた。R2年度は、①バイオ医薬品の生物活性や安定性に影響を及ぼす糖鎖について、キャピラリー電気泳動を使った解析法の検討、②バイオ医薬品（G-CSF製剤）を対象とした解析法の検討、を行ったので報告する。

Summary

The biopharmaceutical industry has increased significantly over recent years and is believed to have great potential for further development. In this study, we aimed to establish the analytical methods of biopharmaceuticals, especially therapeutic proteins, for technical support of pharmaceutical companies in Toyama prefecture. Here we investigated glycosylation profile of NISTmAb (standard monoclonal antibody RM8671) using capillary electrophoresis. We also applied the analytical methods we have established so far to G-CSF formulation (filgrastim) and optimized the 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により生産されるため、糖鎖修飾等の様々な翻訳後修飾を受け、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。医薬品規制調和国際会議（ICH）や厚生労働省から公示されているガイドライン^{1,2)}においても、バイオ医薬品は従来の化学合成医薬品と比して、多角的で複雑な解析が必要とされている。創薬研究開発センターでは、製薬企業へ技術的な支援を行うことを目的として、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ている。これまでに解析対象としてNIST（米国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）を選定し、インタクト解析、サブユニット解析、ペプチドマッピング等の特性解析法のプロトコル作成およびプロトコルの改良を

行ってきた^{3,4)}。本研究では、LC-TOF/MS解析において感度およびイオン化効率が低く解析が困難であったNISTmAbの遊離糖鎖について、キャピラリー電気泳動を使った解析法を検討したので報告する。また、抗体以外のバイオ医薬品（製剤）に対してこれまでに培った解析技術を応用し、G-CSF製剤（フィルグラスチム）の解析法を確認したので報告する。

方法及び結果

1. NISTmAbの遊離糖鎖解析

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はタンパク質の生物活性に影響を与え、特に抗体医薬品では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には50種類近いN型糖鎖が修飾されることが報告されている^{5,6)}が、G0F、G1F、G2F^{a)}の

3種類がメジャーな糖鎖成分であり、残りはマイナーな糖鎖成分から構成される。NISTmAbの遊離糖鎖をGlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit (Waters社)を用いて調製し、LC-TOF/MSにより解析したところ、メジャー成分であるG0F、G1F、G2Fの検出および解析は可能だったが、マイナー成分はほとんど解析できなかつた(図1A)。一般的に糖鎖はイオン化効率が低いことが知られている。また、LC-TOF/MSを使った解析では糖鎖構造の推定は可能だが、MS/MS測定を繰り返すMSⁿ測定機能を有してい

ないため、糖鎖構造を決定することは困難である。したがって、糖鎖を感度良く検出しプロファイルを解析するには、LC-TOF/MS以外の解析法が有効であると考えられた。そこで、キャピラリー電気泳動装置を用いたNISTmAb遊離糖鎖の解析法を検討した。遊離糖鎖の標識および精製は、Fast Glycan Labeling and Analysis Kit (SCIEX社)を使用し、SCIEX社のプロトコルに従って行った。その結果、メジャーな糖鎖ならびに数種類のマイナーな糖鎖が検出され、LC-TOF/MSでの遊離糖鎖解析と比較して、高感度かつ

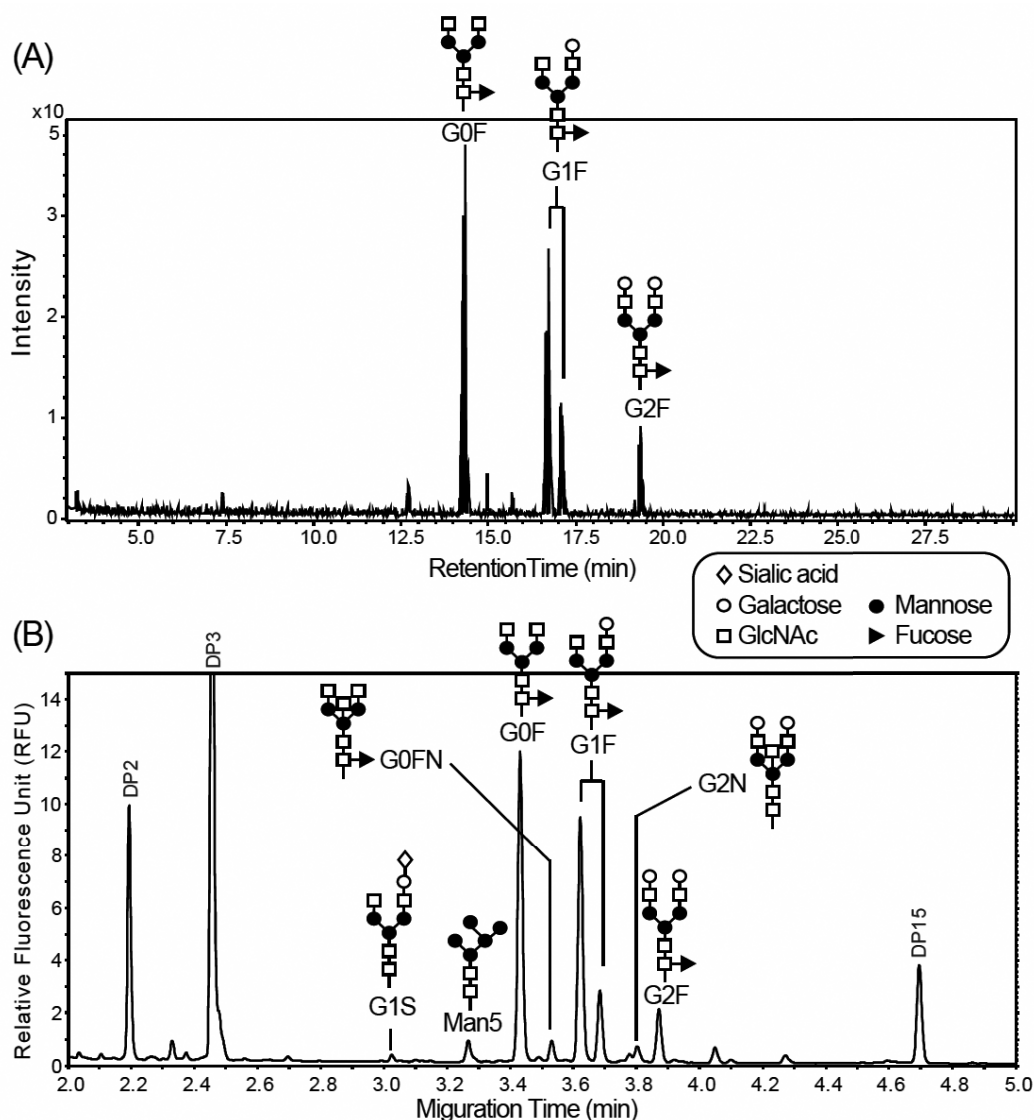


図1 NISTmAbの遊離糖鎖解析

- (A) NISTmAb遊離糖鎖のトータルイオンクロマトグラム。NISTmAbから遊離糖鎖をGlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit (Waters社)を用いて調製し、LC-TOF/MS解析を行った(リニアグラジエント溶出)。使用カラム: AQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130 \AA $1.7 \mu\text{m}$ $2.1 \times 150 \text{ mm}$ (Waters社)、移動相A: 50 mM ギ酸アンモニウム、移動相B: アセトニトリル。
- (B) NISTmAb遊離糖鎖のキャピラリー電気泳動チャート。NISTmAbから遊離糖鎖をFast Glycan Labeling and Analysis Kit (SCIEX社)を用いて調製し、キャピラリー電気泳動を行った。使用キャピラリー: $50 \mu\text{m}$ I.D., 全長 300 mm, 検出: LIF (Laser-induced Fluorescence) Excitation: 488 nm/Emission: 520 nm, 注入: 1.0 kV, 5.0 sec, 分離: 30.0 kV, 5.25 min。DP2, DP3, DP15は糖鎖標準品。

短時間で糖鎖の検出および解析が可能になったことが確認できた(図1B)。しかしながら、現段階では検出できる糖鎖の種類が少ないため、今後、試料調製法や測定・解析条件の検討を行い、糖鎖の同定数を上げる必要がある。

- a) 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。

2. G-CSF製剤のLC-TOF/MS解析

これまで当センターではNISTmAbを対象とした解析法^{3,4)}を検討してきたが、実利用においてはバイオ医薬品の製剤そのもの(製品形態)や抗体以外の種々のタンパク質が解析対象となる。タンパク質は分子量が大きく複雑な構造を持つため、安定性や親水性、電気的性質等は個々のタンパク質で大きく異なる。したがって、タンパク質の性質に合わせた前処理、LCの分離・溶出条件、測定法の調整がその都度必要となる。そこで、①当センターのLC-TOF/MSを用いてモノアイソトピック質量^{b)}が測定可能な30kDa以下の分子量を持つこと、②抗体以外のバイオ医薬品であること、③富山県内の製薬企業に対する支援を目的とすること等を考慮し、G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor, 顆粒球コロニー形成刺激因子)製剤の特性解析をLC-TOF/MSを用いて行った。G-CSFは骨髄中の好中球前駆細胞に存在するG-CSF受容体に結合し、好中球前駆細胞から好中球への分化を促進することで、末梢血中の好中球数を増加させる働きを持つことから、がん化学療法による好中球減少、再生不良性貧血などの治療に用いられる。国内では複数のG-CSF製剤が販売されているが、本研究では、ヒト膀胱細胞由来のG-CSF遺伝子発現により組換え体(大腸菌)で産生されるG-CSF製剤のフィルグラスチムを解析対象とした。フィルグラスチムのG-CSFは175個のアミノ酸残基から構成される比較的小さなタンパク質(C₈₄₅H₁₃₃₉N₂₂₃O₂₄₃S₉, 約19kDa)を主成分とし、添加剤として、ポリソルベート80, D-マンニトール, pH調整剤として、酢酸ナトリウム等を含む注射剤である。

フィルグラスチム注射剤原液をLC-TOF/MSに注入し、インタクト解析^{c)}したところ、9min付近にG-CSFのピークが溶出したが、その他に添加剤成分に由来すると考えられる夾雑ピークも複数認められた(図2A)。これらの夾雑ピークは解析に影響する可能性があるため、脱塩処理により添加剤成分の除去を試みたが、脱塩カラムの成分に由来すると考えられる別の夾雑ピークが増加する結果となった(図2B)。

そこで、カラムを通さず、アセトン沈殿による精製を試みたところ、大部分の夾雑ピークを除くことができ(図2C)、G-CSF製剤の前処理にはアセトン沈殿が有効であることが分かった。デコンボリューション^{d)}後の質量スペクトルからは約10成分がピークとして観測されたが、そのうち存在比の90%以上を占めるNative(未修飾)のG-CSFの質量スペクトルは、理論上の質量スペクトルと一致し、モノアイソトピック質量もわずかに1ppm以下の誤差で算出できることが確認できた(図2D)。その他のマイナー成分については、メチオニン残基が酸化等の翻訳後修飾を受けた成分や、精製過程で人工的な修飾を受けた成分の可能性が考えられる。

次に、アセトン沈殿により精製したフィルグラスチム注射剤を試料として、ペプチドマッピング^{e)}を行った(図3)。ペプチドの調製には、塩基性アミノ酸(Lys, Arg)のカルボキシル基側ペプチド結合を切断するトリプシンが一般的に用いられるが、G-CSFには塩基性アミノ酸の数が少なく、さらに配列上偏って存在しているため、適切な長さのペプチドが調製できないことが懸念された。そこで、芳香族アミノ酸(Tyr, Phe, Trp)のカルボキシル基側ペプチド結合を切断するキモトリプシンを使用してペプチドを調製した。サンプル調製および測定・解析は、当センターのホームページで公開している「抗体のペプチドマッピング基礎編」プロトコルに準じて行った⁷⁾。その結果、シーケンスカバー率^{f)}、フラグメントカバー率^{g)}ともに目標値を達成し、良好なカバー率を示した(図3B)。また、翻訳後修飾として、1番目のMetが7.3%の割合で酸化されていることが分かった。さらに、非還元条件でのキモトリプシン消化によるペプチドマッピングの結果では、G-CSFに存在する2つのジスルフィド結合が検出できた。

- b) モノアイソトピック質量: 分子を構成する各元素のうち最も存在比の高い同位体のみから構成される精密質量。
c) インタクト解析: タンパク質をそのままの状態で質量分析計により解析する方法。タンパク質全体の分子量に加え、翻訳後修飾(糖鎖やアミノ酸修飾等)の一部についておおまかな情報を得られ、ある程度の不均一性を評価できる。
d) 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。
e) ペプチドマッピング: タンパク質をプロテアーゼ処理によりペプチドに分解し、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。
f) 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。
g) 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。

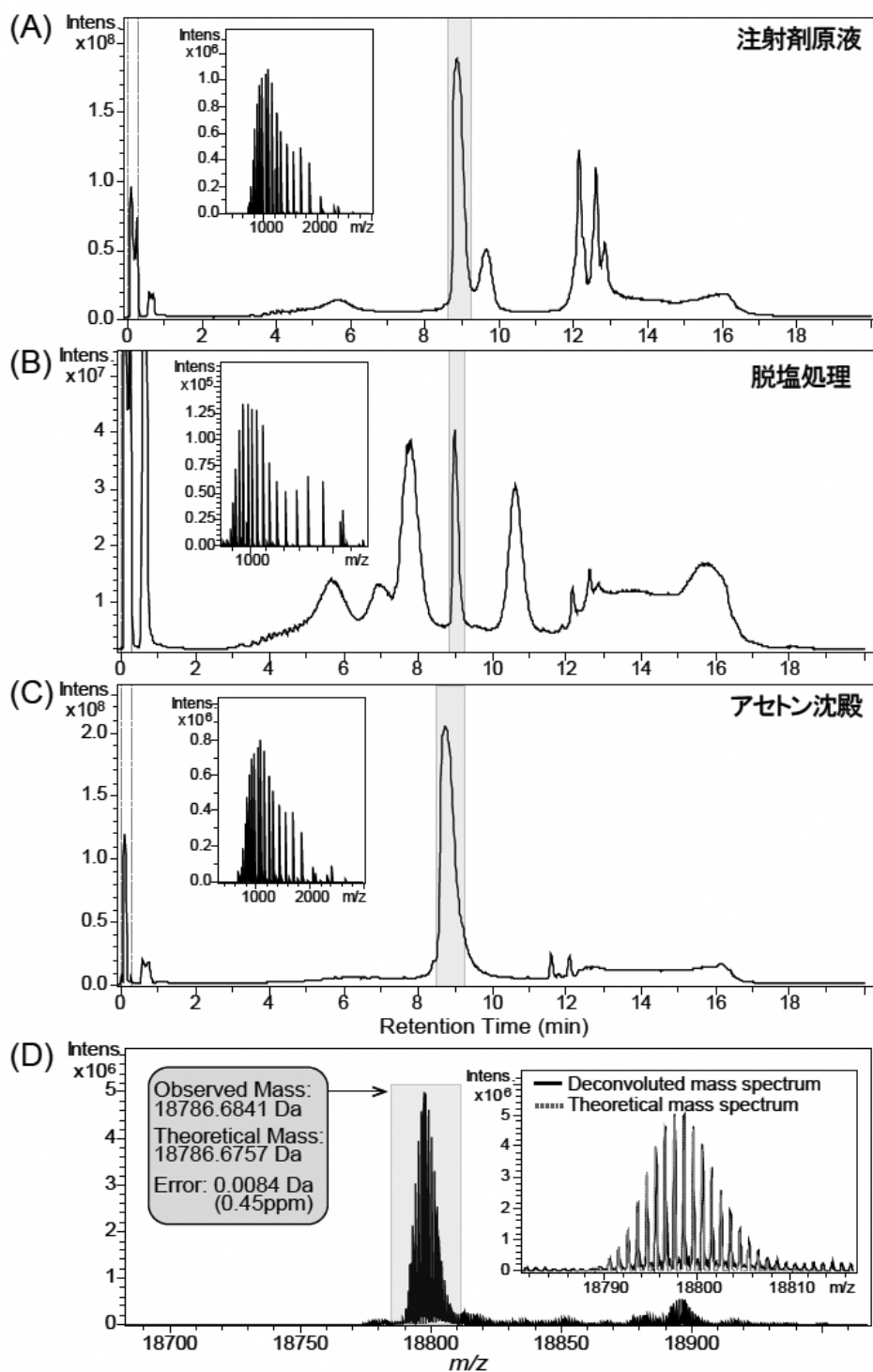


図2 LC-TOF/MSを使ったフィルグラスチムのインタクト解析

- (A) フィルグラスチム注射剤原液のトータルイオンクロマトグラム。9 min付近に溶出されるG-CSFのピークをグレーでハイライト表示し、その質量スペクトルを隣に示した。0.2 μg のG-CSFを含む注射剤原液をインジェクトし、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%ギ酸, 移動相B: 0.1%ギ酸/アセトニトリル。
- (B) フィルグラスチム注射剤を脱塩カラム (Zeba™ Spin Desalting Column, 7K MWCO, Thermo Fisher Scientific社) を用いて脱塩処理し、1 μg 相当量のG-CSFをインジェクトしたときのトータルイオンクロマトグラム。分析条件は (A)と同じ。
- (C) フィルグラスチム注射剤をアセトン沈殿により精製し、1 μg 相当量のG-CSFをインジェクトしたときのトータルイオンクロマトグラム。分析条件は (A)と同じ。
- (D) (C) で示したG-CSFのピークをデコンボリューション処理したときの0価の質量スペクトル。メジャー成分であるNativeのG-CSFスペクトルをグレーでハイライト表示し、隣に拡大した質量スペクトルを示す。

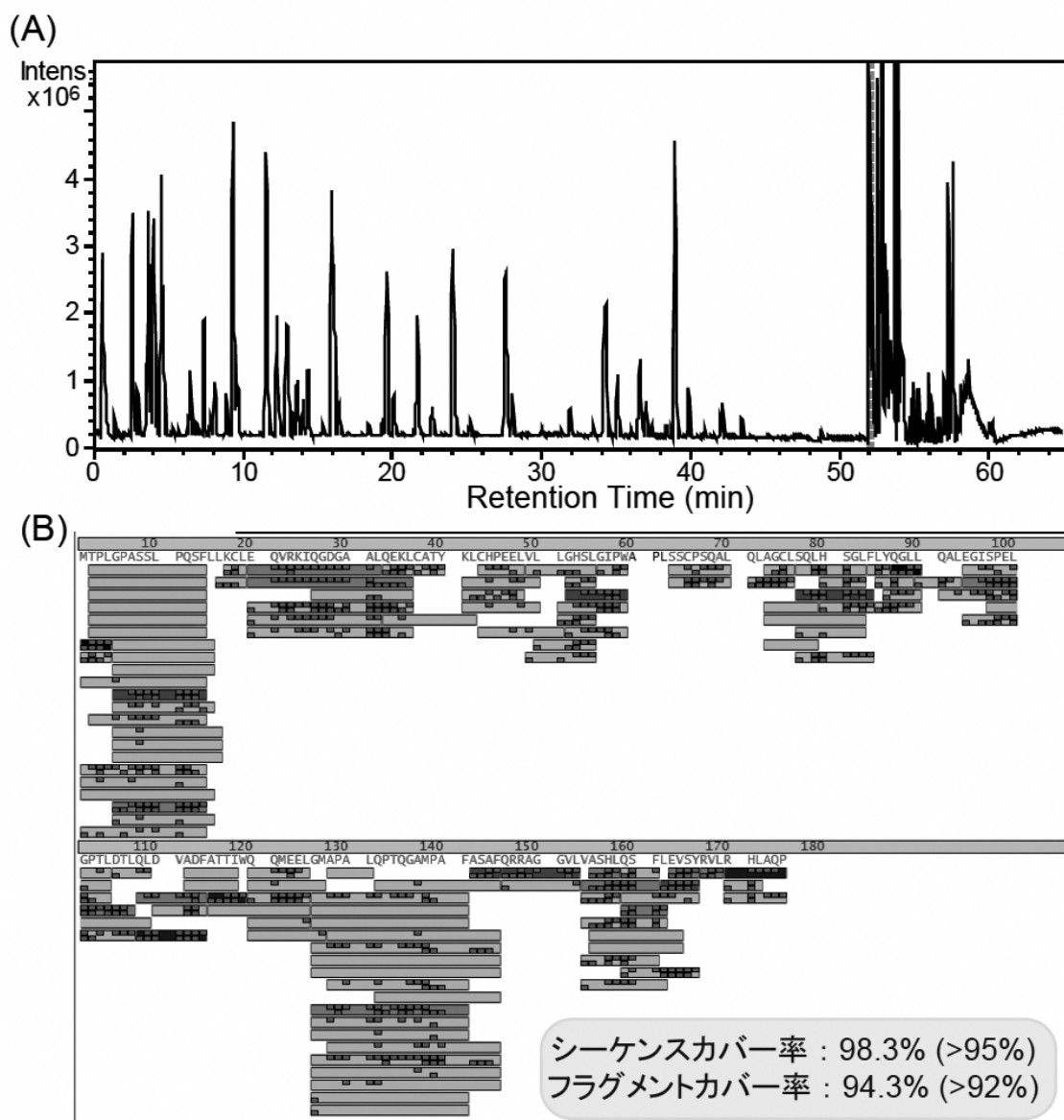


図3 ペプチドマッピングによるフィルグラスチムのアミノ酸配列解析

- (A) 還元条件でキモトリプシン消化を施したフィルグラスチムのベースピーククロマトグラム。使用カラム：AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 1.0 x 100 mm (Waters社)，移動相A：0.1% ギ酸，移動相B：0.1% ギ酸/アセトニトリル。
- (B) ペプチドマッピング解析結果のイメージ図 (BioPharma Compassソフトウェアによる解析)。アミノ酸配列の下に表示されたグレーのバーは、MS測定により観測されたペプチド配列を示し、シーケンスカバー率に反映される。バー中の個々のアミノ酸に相当する小さな四角形はMS/MS測定により観測されたフラグメントイオンを示し、フラグメントカバー率に反映される。右下にフィルグラスチムのシーケンスカバー率、フラグメントカバー率、およびそれぞれの目標値を () 内に示す。

ま と め

バイオ医薬品は、長期間に渡る培養工程に加えて、多くの精製工程を経て製造されるため、各工程におけるタンパク質の状態を正確に把握することが重要である。また、ロット間における品質も適正に評価しなければいけない。キャピラリー電気泳動装置を用いた遊離糖鎖解析では、LC-TOF/MSを用いた解析法と比較して、高感度かつ短時間で糖鎖の検出および解析が可能であり、多検体解析も比較的簡便に行えることから、バイオ医薬品の糖鎖の品質評価に適している。また、G-CSF製剤であるフィルグラスチムを対象としたLC-TOF/MS解析から、前処理としてアセトン沈殿が適していることや、LC条件や適切な酵素選択等についてある程度の調整が必要であるものの抗体分析に準じた方法により一連の解析が可能であることが分かった。一方、R1年度までに薬事研究会生物部会の中で研究対象としていたエリスロポエチン製剤⁸⁾のインタクト解析において、エリスロポエチンは、通常、タンパク質の分離に用いるC2、C4ベースの疎水性の低いカラムでは分析できず、ペプチド等の比較的低分子の分析に用いる疎水性の高いC18カラムを用いて分析する必要があることが分かった（データ未掲載）。これは、エリスロポエチンが複雑な糖鎖修飾（親水性）を受けることによりタンパク質全体の疎水性が下がり、C2やC4カラムに結合しないためと考えられる。これらのことからバイオ医薬品の特性解析では、個々のバイオ医薬品の性質を見極め、最適な分析法をその都度検討する必要があることが分かる。今後、本研究の中で得られた技術的知識や情報、ノウハウ等を積極的に活用し、富山県内企業ならびに大学等の支援につなげたいと考える。

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) 小島理恵子，小木曾英夫：バイオ医薬品の品質特性解析—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—，富山県薬事総合研究開発センター年報，47，45-49（2020）
- 4) 小木曾英夫，小島理恵子，薬事研究会生物部会：タンパク質製剤開発のための品質評価技法—高分

解能質量分析計を用いた抗体医薬の品質特性解析—，富山県薬事総合研究開発センター年報，48，43-51（2021）

- 5) De Leos M et al., NIST Interlaboratory Study on Glycosylation Analysis of Monoclonal Antibodies: Comparison of Results from Diverse Analytical Methods, Mol Cell Proteomics, 2020 Jan;19 (1) :11-30.
- 6) Zhao J et al., Analysis of NIST Monoclonal Antibody Reference Material Glycosylation Using the LC-MS/MS-Based Glycoproteomic Approach, J. Proteome Res., 2021, 20, 1, 818-830
- 7) 富山県薬事総合研究開発センター ホームページ，実験マニュアル（バイオ医薬品の分析）「抗体のペプチドマッピング基礎編」<https://www.pref.toyama.jp/documents/15986/manual103.pdf>
- 8) 宮本朋美ら：バイオ医薬品の品質評価—バイオ後続品の同等性／同質性の検討（活動3年間のまとめ）—，富山県薬事総合研究開発センター年報，47，26-33（2020）