

バイオ医薬品の品質特性解析と類似性比較

小島 理恵子, 小木曾 英夫, 本田 裕恵, 宮本 朋美, 薬事研究会生物部会

Characterization and similarity comparison of biopharmaceuticals

Rieko KOJIMA, Hideo OGISO, Hiroe HONDA, Tomomi MIYAMOTO,
The Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

近年のバイオ医薬品およびバイオシミラー開発の活発化を受け、薬事総合研究開発センターではこれまでに液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) を用いた抗体医薬品の品質特性解析法の検討を行い、プロトコルの作成と公開を実施してきた。今年度は、薬事研究会生物部会において、キャピラリー電気泳動を用いた抗体の遊離糖鎖解析と、バイオ医薬品としてG-CSF製剤を解析対象とした品質特性解析を行ったので報告する。G-CSF製剤の解析では、我々が確立してきた解析手法が実用のバイオ医薬品製剤を対象とした解析においても有用であることに加えて、先発品とバイオシミラーの間で高い類似性を確認することができた。本研究の中で得られた技術的知識や情報は、富山県内企業ならびに大学等の支援に活用していきたい。

Summary

In response to the development of biopharmaceuticals and biosimilars, we have established the analytical methods of antibody drugs using a liquid chromatograph time-of-flight mass spectrometer (LC-TOF/MS), and published protocols. Here we analyzed the glycosylation profile of antibodies using capillary electrophoresis and performed characteristics analysis of G-CSF formulations using LC-TOF/MS in the activities of Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association. In the analysis of G-CSF formulations, we confirmed high similarity between the original drug and the biosimilars in each method. We aim to support companies and universities in Toyama Prefecture using technical knowledge and experience gained in this research in the future.

緒 言

近年国内外で抗体医薬品などバイオ医薬品の研究開発が急速に進む中、富山県内の製薬企業においてもバイオ医薬品およびバイオ後続品（バイオシミラー）が開発されていくことが期待されている。バイオ医薬品は糖鎖修飾など翻訳後修飾に伴う不均一性を持つことから、品質評価や管理において化学合成医薬品よりも多角的で複雑な品質特性解析が求められる。

薬事総合研究開発センターでは、これまでに液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) を用いた抗体医薬品の品質特性解析法の検討を行い、プロトコルの作成と公開を実施してきた。令和2年度生物部会では、この「抗体医薬品の品質特性解析法」を県内製薬企業と共有することを目的として、NISTmAb（モノクローナル抗体の標準品 RM8671）を解析対象とした特性解析をトレーニング形式で実施した。今年度の生物部会では、1. キャピラリー電気泳動を用いたNISTmAb遊離糖鎖解析、2. G-CSF製剤の特性解析法の検討および先発品とバイオシミラーの類似性比較を実施したので報告する。2年間の部会活動

を通して、バイオ医薬品の品質特性解析について知識と経験を深めることができたと考える。

方法及び結果

1. キャピラリー電気泳動を用いたNISTmAb遊離糖鎖解析

糖鎖修飾はタンパク質の生物活性や安定性に関わるが、なかでも抗体医薬品の糖鎖修飾はADCC（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity：抗体依存性細胞障害）活性およびCDC（Complement Dependent Cytotoxicity：補体依存性細胞障害）活性に影響を与えることが知られているため、糖鎖解析は重要な品質評価項目として位置付けられている（1, 2）。

糖鎖解析には複数の手法があるが、遊離糖鎖解析は、グリコシダーゼ処理や化学的な方法によりタンパク質から遊離させた糖鎖を直接または還元末端を標識し、糖鎖の種類や割合を解析する手法であり、糖鎖の不均一性を評価するために有用である。糖鎖の分離にはキャピラリー電気泳動（CE）やHPLCが用いら

れ、各ピーク成分を蛍光検出や質量分析装置（MS）により解析する。本研究ではNISTmAbを解析対象とし、遊離糖鎖の調製から測定、解析までの一連の操作を迅速にかつ高感度に行うことが可能であり、実生産の場での品質管理にも使用されることが多いCEを用いた遊離糖鎖解析を行った。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社のマニュアルに従って行った。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おり（3, 4）、G0F、G1F、G2F^{a)}の3種類のメジャーな糖鎖成分と、その他のマイナーな糖鎖成分から構成される。CEの結果、メジャーな糖鎖に加えて、G2FにN-アセチルノイラミン

酸（Neu5Ac）が付加したG2FS1とG0FにN-アセチルガラクトサミン（GlcNAc）が付加したG0FBの2つのマイナーな糖鎖が検出された（図1、表1）。現段階では検出できる糖鎖の種類が少ないため、実使用に向けては、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。

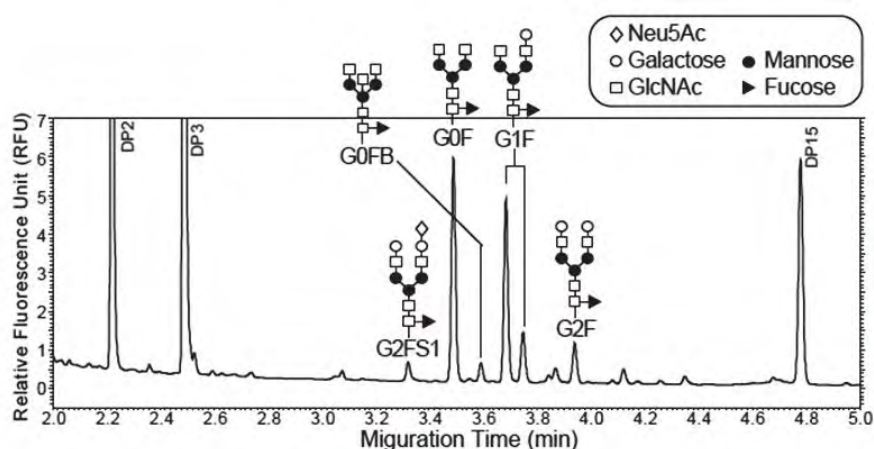


図1 キャピラリー電気泳動によるNISTmAb遊離糖鎖

NISTmAb遊離糖鎖のキャピラリー電気泳動チャート（左）とSCIEX社のキャピラリー電気泳動装置PA800Plusの写真（右）。NISTmAbから遊離糖鎖をFast Glycan Labeling and Analysis Kit（SCIE社）を用いて調整し、キャピラリー電気泳動を行った。使用キャピラリー：50 μ 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

表1 キャピラリー電気泳動で検出されたNISTmAb遊離糖鎖

Glycan Name	Migration Time (min)	Abundance (%)	GU値*
DP2	2.229	—	2.000
DP3	2.497	—	3.000
G2FS1	3.329	3.9	6.848
G0F	3.498	40.8	7.781
G0FB	3.600	3.0	8.338
G1F (FA2(6)G1)	3.693	31.6	8.867
G1F' (FA2(3)G1)	3.756	8.6	9.205
G2F	3.949	6.5	10.269
DP15	4.790	—	15.000

*GU値：グルコースユニット値。試料の溶出時間をグルコースの重合度に換算した値。

2. G-CSF製剤の特性解析法の検討および先発品とバイオシミラー品の類似性比較

これまでNISTmAbを対象とした解析法を検討し、プロトコルの作成と公開を行ってきた(5)が、実使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も解析対象となる。そこで今年度は実使用を想定して、バイオ医薬品の中から複数のバイオシミラーが承認されているG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor, 顆粒球コロニー形成刺激因子) 製剤・製品を解析対象とし、LC-TOF/MSを用いた特性解析法を検討するとともに、先発品とバイオシミラーの類似性比較を行った。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して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(6)。本研究では、大腸菌から産生されるフィルグラスチムとそのバイオシミラー (BS) 2 製剤並びにチャイニーズハムスター

卵巣 (CHO) 細胞から産生されるレノグラスチムを解析対象とした(表2)。G-CSFは174または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で、2つのジスルフィド結合をもつ(図2)。またレノグラスチムには、一箇所のO結合型糖鎖が修飾される(図2)。いずれも剤型は注射剤で、添加剤として界面活性剤(ポリソルベート)や等張化剤(D-マンニトール)、pH調節剤等を含んでいる。フィルグラスチムおよび2つのフィルグラスチムBSはG-CSF A, B, Cとし、レノグラスチムはG-CSF Dとして以降の解析を行った。

1) G-CSF製剤のインタクト解析

注射剤原液をそのままLC-TOF/MSに注入し(インタクト解析b)を行った場合、添加剤成分由来の夾雑ピークが検出され解析に影響を与えることが懸念された。そこで製剤中の添加剤成分を除去するため、前処理としてアセトン沈殿を行い、インタクト解析に供した。G-CSFの分子量は抗体のサブユニット^{o)}約25

表2 解析に用いたG-CSF製剤

	フィルグラスチム	フィルグラスチムBS①	フィルグラスチムBS②	レノグラスチム
	先行品	後続品(バイオシミラー)		先行品
宿主細胞		大腸菌		CHO細胞
アミノ酸数		175		174
組成式		C845H1339N223O243S9		C840H1330N222O242S8 (糖鎖を除く)
精密質量		18,786.6761 Da		18,655.6356 Da (糖鎖を除く)
糖鎖修飾		なし		あり
開封前の剤形		注射剤(溶解液)		凍結乾燥注射剤 +注射用水(1 mL)
溶解液のG-CSF濃度		300 µg/0.7 mL (0.43 mg/mL)		250 µg/mL (1 mLに溶解時)
添加物	ポリソルベート80 0.028 mg D-マンニトール 30 mg pH 調節剤	ポリソルベート80 0.028 mg D-マンニトール 30 mg 酢酸ナトリウム水和物 適量 氷酢酸 適量		ポリソルベート20 0.1 mg D-マンニトール 25 mg L-アルギニン 10 mg L-フェニルアラニン 10 mg L-メチオニン 1 mg 希塩酸 適量
pH		3.7~4.3		6.0~7.5
保存温度		10℃以下		室温

G-CSF A, B, C
G-CSF D

【フィルグラスチム, フィルグラスチムBS】

1 MIPPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGA 30
 31 ALQEKLCATYKLCHEPELVLLGHSLGLPWAP 60
 61 PLSSCPQALQLAGCLSQIHSGLFLYQGLL 90
 91 QALEGLSPELGPPTLDFTLQLDVADFATTIWQ 120
 121 QMEELGMAPALQPTQGGAMPAFASAFQRRRAG 150
 151 GVLVASHLQSFLEVSYSRVLRLHAQP 175

【レノグラスチム】

1 TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAA 30
 31 LQEKLCATYKLCHEPELVLLGHSLGLPWAP 60
 61 LSSCPQALQLAGCLSQIHSGLFLYQGLLQ 90
 91 ALEGLSPELGPPTLDFTLQLDVADFATTIWQQ 120
 121 MEELGMAPALQPTQGGAMPAFASAFQRRRAGG 150
 161 VLVASHLQSFLEVSYSRVLRLHAQP 174

— :ジスルフィド結合
 * :糖鎖付加アミノ酸

図2 G-CSFのアミノ酸配列

kDaよりも小さく、約20 kDaであることから、モノアイソトピック質量^{d)}の測定が可能であるため、LC条件および測定条件は薬事総合研究開発センターの実験マニュアル「【バイオ医薬品の分析】抗体のサブユニット解析編」(5)に従った。G-CSF A-Dはいずれも9 min付近に1本のピークとして溶出され、+10から+25価程度の多価イオンとして検出された(図3)。フィルグラスチムおよびフィルグラスチムBS (G-CSF A, B, C) のデコンボリューション^{e)}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、そのうち存在比80%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良く一致し、1.5 ppm以下の質量精度によりモノアイソトピック質量を測定できることが確認できた(図4)。また、フィルグラスチムおよびフィルグラスチムBS (G-CSF A, B, C) は非常に類似性の高い分子種のパターンを示し、Native G-CSFに対するメチオニン酸化体の割合はA,B,Cの順に10.0%, 8.7%, 8.3%と同等であった。一方、レノグラスチム (G-CSF D) は約20成分がピークとして観測され、3種類の異なるO結合型糖鎖が付加したG-CSFならびに糖鎖が付加していないNativeの

G-CSFが同定された(図5)。このうちメジャー成分は、O-GalNAc^{f)}に1分子のガラクトース (Gal) と1分子のN-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) が修飾されたもの (49.8%) ならびにO-GalNAcに1分子のGalと2分子のNeu5Acが修飾されたもの (47.6%) の2つで、それぞれのメチオニン酸化体の割合は9.3%, 11.3%であった。

- b) インタクト解析: タンパク質をそのままの状態での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。
- c) 抗体のサブユニット: 抗体特異的プロテアーゼ処理等により生成する抗体の断片。還元処理とIdeS消化を組み合わせることにより、約25 kDaの3つのサブユニット (Fc/2, Fd, LC) が生成する。
- d) 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。
- e) 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。
- f) O-GalNAc: 主なO結合型糖鎖のコア構造の1つ。セリンまたはスレオニン残基にN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が結合したもの。このコア構造にガラクトース (Gal) やN-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) が付加し、糖鎖が伸長する。

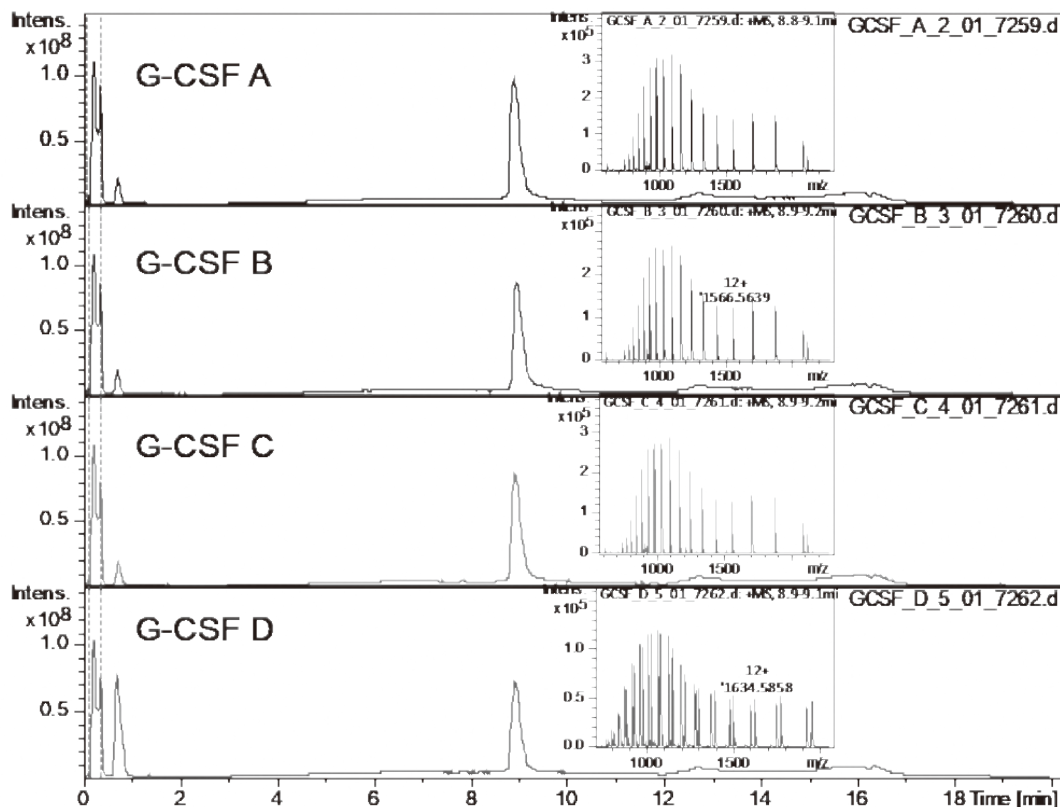


図3 G-CSF製剤のトータルイオンクロマトグラム

G-CSF A-D のトータルイオンクロマトグラム。注射剤原液をアセトン沈殿により精製し、0.1 μ g相当量のG-CSFをインジェクトし、リニアグラジエント溶出を行った。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。使用カラム: BioResolve RP mAb Polyphenyl 2.1 \times 150mm (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。

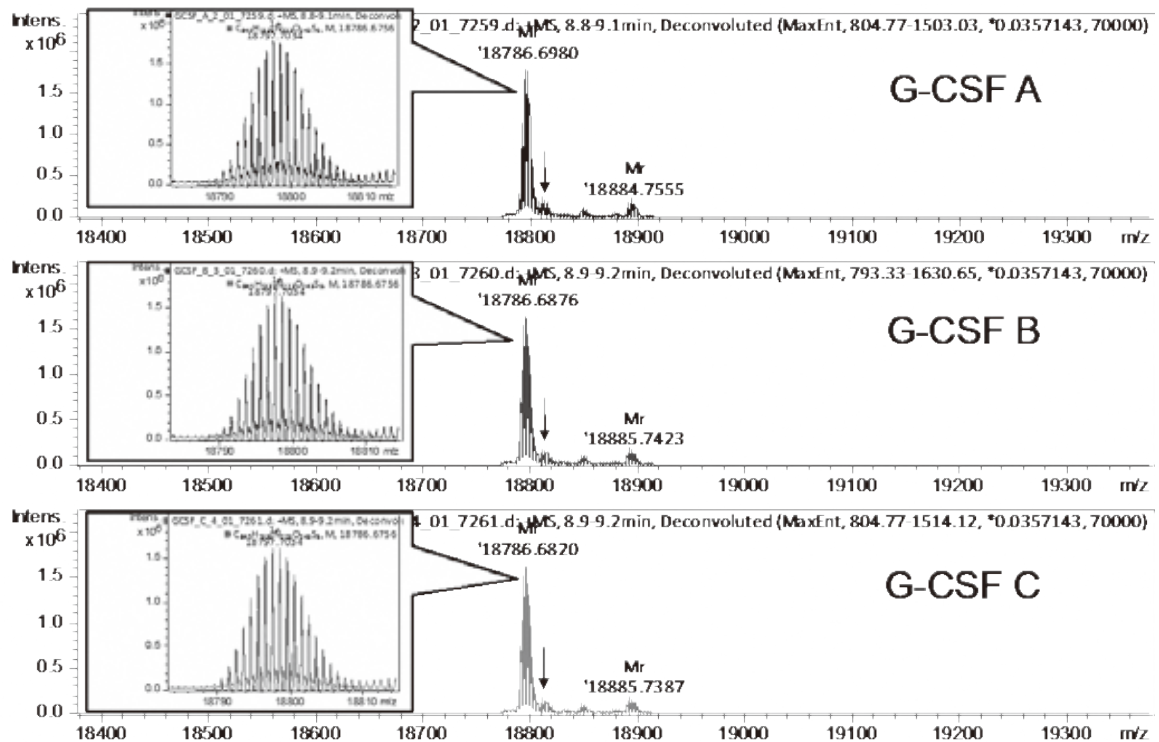


図4 フィルグラスチム、フィルグラスチムBSのデコンボリューション後の質量スペクトル

デコンボリューション処理したG-CSF A, B, Cの質量スペクトル, NativeのG-CSFの質量スペクトル(分子量18786.7)について, 隣に拡大した質量スペクトルを示した. Native G-CSFのモノアイソトピック質量(理論値)は18786.6757Da. メチオニン酸化体と推測されるピークを矢印で示す.

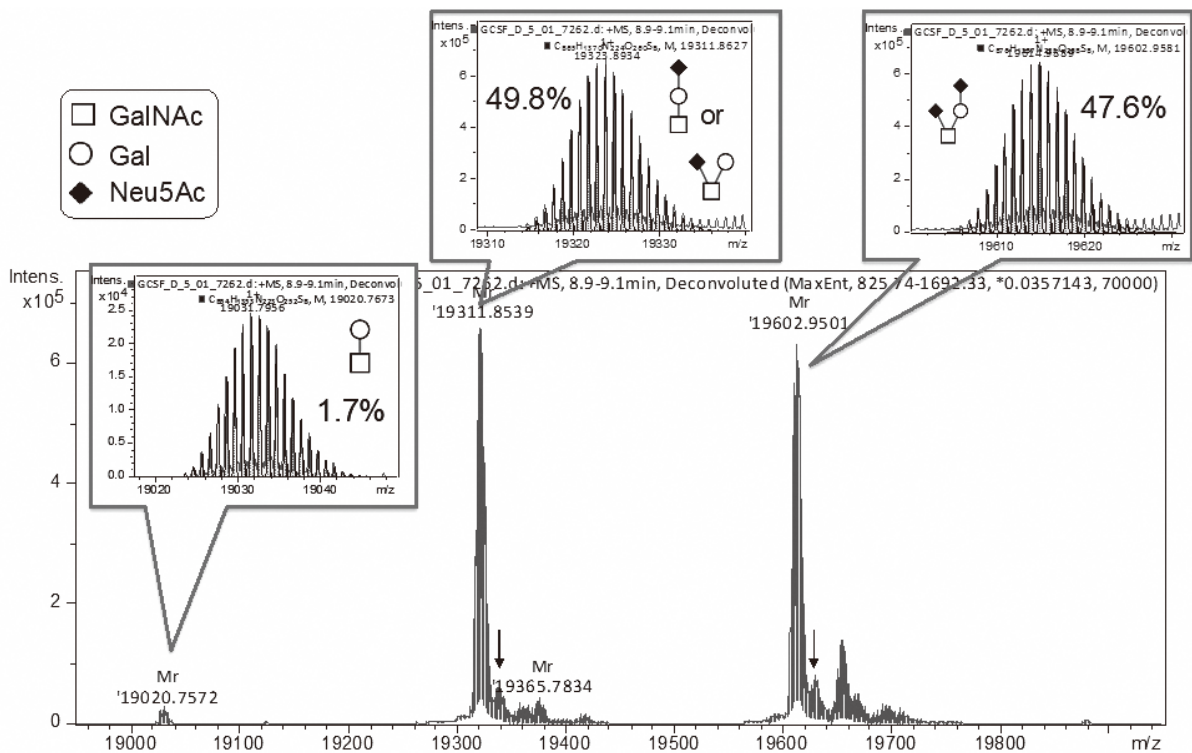


図5 レチノグラスチムのデコンボリューション後の質量スペクトル

デコンボリューション処理したG-CSF Dの質量スペクトル. 3種類のO-GlcNAcが修飾されたG-CSFについて, それぞれの拡大した質量スペクトルと存在比を上にした. メチオニン酸化体と推測されるピークを矢印で示す.

2) G-CSF製剤のペプチドマッピング

ペプチドマッピング⁸⁾には数mg/mLの濃度のタンパク質溶液が必要となるが、製剤に含まれるG-CSF濃度は0.43 mg/mLのため、濃度を上げる前処理が必要となる。 intact解析の前処理として用いたアセトン沈殿では、添加剤成分のD-マンニトール（水溶性）が除去できず、濃縮により析出してしまうため、ペプチドマッピングでは水溶性成分の除去が可能なクロホルム・メタノール法により前処理を行い、G-CSFの濃度を4.3 mg/mLに調製後、プロテアーゼ処理を行った。ペプチドマッピングでは、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プロテアーゼとして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、かつ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、比較的均等にG-CSFを切断できるプロテアーゼとして、

主に芳香族アミノ酸（Tyr, Phe, Trp）のカルボキシル基側を切断するキモトリプシンを選択した。サンプル調製および測定・解析は、薬事総合研究開発センターの実験マニュアル「【バイオ医薬品の分析】抗体のペプチドマッピング基礎編」（5）に準じて行った。その結果、G-CSF A, B, Cのマスキロマトグラムは、G-CSF Bに関して前半のピークの保持時間がわずかに前にシフトしたが、全体的に類似性の高いピークパターンを示した（図6）。また、全てのG-CSFが95%を超える良好なシーケンスカバー率^{h)}、フラグメントカバー率ⁱ⁾を示した（表3）。

次に、翻訳後修飾の1つであるメチオニン（Met）の酸化について解析を行った。G-CSF AのペプチドマッピングではMet1, Met122, Met138が酸化されたペプチドが観測され、Met 1, Met138, Met127の順に高い酸化率を示した（図7）。これは同順に酸化されやすいという報告（7）やMet 1が酸化されている

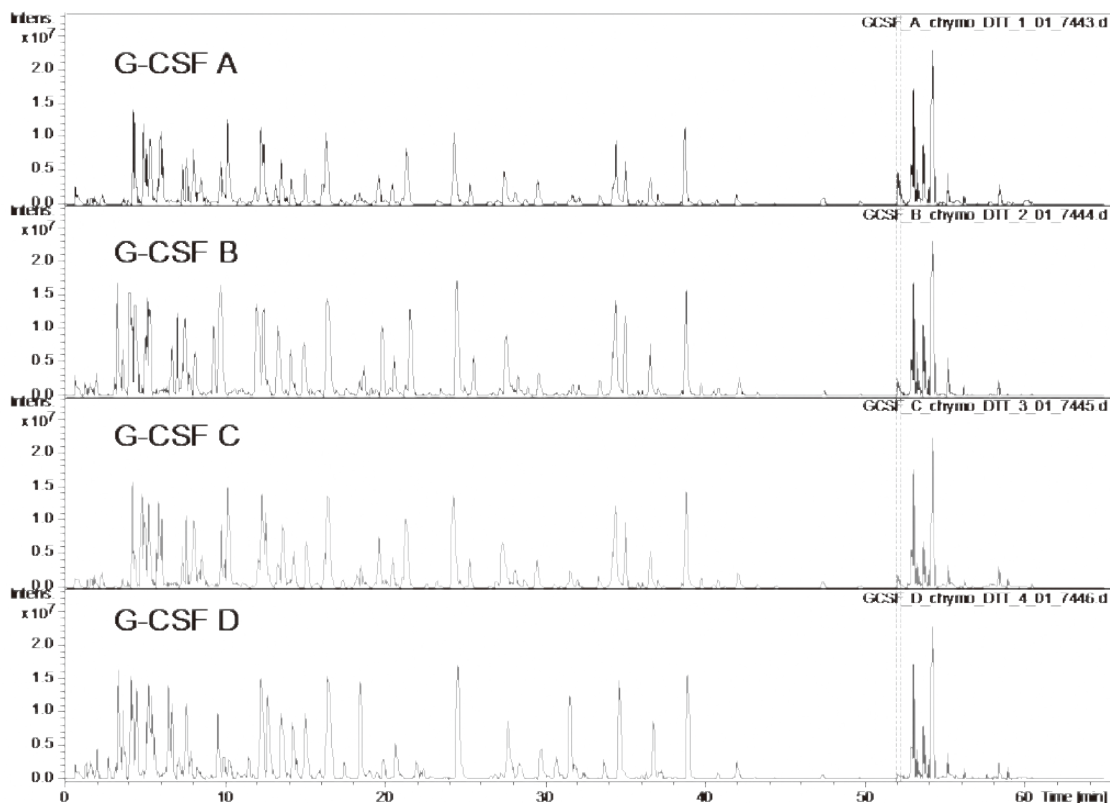


図6 キモトリプシン処理したG-CSF製剤のベースピーククロマトグラム

表3 Peptide MappingによるG-CSF製剤のカバー率

	G-CSF A	G-CSF B	G-CSF C	G-CSF D
シーケンスカバー率 (%)	100.0	98.3	98.3	98.3
フラグメントカバー率 (%)	96.0	96.0	96.6	97.1

という報告 (8) と一致した。また、G-CSF B, CについてG-CSF Aと同様の酸化率を示した (表4) ことから、フィルグラスチムおよびフィルグラスチムBSの間でMet酸化率の類似性が確認できた。一方、G-CSF DについてはMet121が酸化されたペプチドが0.1%観測されたが、他のMetが酸化されたペプチドは観測されなかった。またG-CSF Dのペプチドマッピングでは、インタクト解析で観測された3種類のO結合型糖鎖修飾を含む2価と3価の糖ペプチドが観測された。(図8)。さらに、インタクト解析 (図5) とペプチドマッピングから算出した糖鎖修飾の割合は同程度であり (図9)、異なる解析法を用いて同様のGlycoform¹⁾を持つことが確認できた。メチオニンの酸化および糖鎖修飾以外の翻訳後修飾 (アスパラギンの脱アミド化、

リジンのアセチル化等) は、いずれのG-CSF製剤においても観測されなかった。

- g) 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。
- h) 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。
- i) 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。
- j) Glycoform：糖鎖修飾の不均一性。

3) G-CSF製剤のジスルフィド結合解析

タンパク質の立体構造形成および維持に重要であるジスルフィド結合は、タンパク質の機能や活性にも重要であるため、バイオ医薬品の特性解析においても評価すべき項目とされている (1, 2)。ジスルフィド

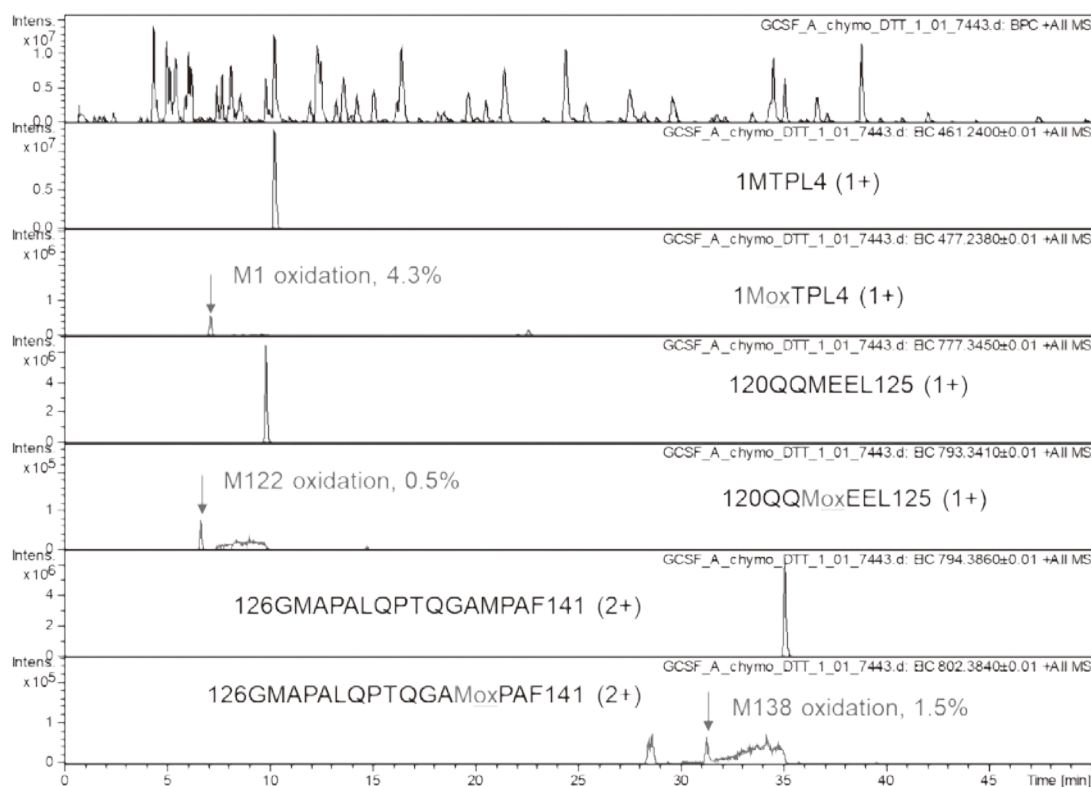


図7 参加メチオニンを含むペプチドの検出

最上段にキモトリプシン処理したG-CSF Aのベースピーククロマトグラムを示し、下段に未修飾メチオニン (M) または酸化メチオニン (Mox) を含むペプチドの抽出イオンクロマトグラムを示した。アミノ酸配列の隣の括弧内の数字はイオン価数を示し、酸化メチオニンを含むペプチドのピークを矢印で示した。また未修飾メチオニン含有ペプチドに対する酸化メチオニン含有ペプチドの存在比を%で示した。

表4 フィルグラスチム、フィルグラスチムBSのMet酸化率

	G-CSF A	G-CSF B	G-CSF C
Met1の酸化率(%)	4.3	5.8	4.6
Met122の酸化率(%)	0.5	0.2	0.2
Met138の酸化率(%)	1.5	1.9	1.0

結合は、ペプチドマッピングの応用編として、非還元条件下でプロテアーゼ消化を行い、ジスルフィド結合を保った状態のペプチドを生成させ、LC-TOF/MS解析を行うことにより解析が可能である。G-CSF製剤のジスルフィド結合解析には、ペプチドマッピングと同様にクロロホルム・メタノール法を用いて前処理を行い、非還元条件下でキモトリプシン消化を行ってサンプルを調製した。サンプル測定は、「【バイオ医薬品の分析】抗体のペプチドマッピング基礎編」(5)に準じて行い、解析はBruker社のBiotools^{k)}ソフトウェアを用いて行った。その結果、全てのG-CSF製剤において3種類のジスルフィド結合が架橋されたジペプチドが検出され(図10)、いずれもG-CSFに含まれる2つのジスルフィド結合(図2)を保持したものであった。また、全てのG-CSF製剤において、3つのジペプチドがReferenceペプチドに対して同様の強度比で観測された(図11)ことから、フィルグラスチムおよびフィルグラスチムBSの間でジスルフィド結合についても類似性が確認できたと考える。

k) Biotools: 目的のタンパク質のアミノ酸配列情報をもとに各種プロテアーゼ処理により生成するペプチドのアミノ酸配列を計算し、質量スペクトルと一致するペプチドを検索するソフトウェア。タンパク質に含まれるジスルフィド結合をあらかじめ設定することでジスルフィド結合が架橋されたペプチドの検索にも対応している。

まとめ

バイオ医薬品は、時間を要す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ならない。CE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、LC条件や適切な酵素選択等については至適条件の調整が必要ではあるが、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

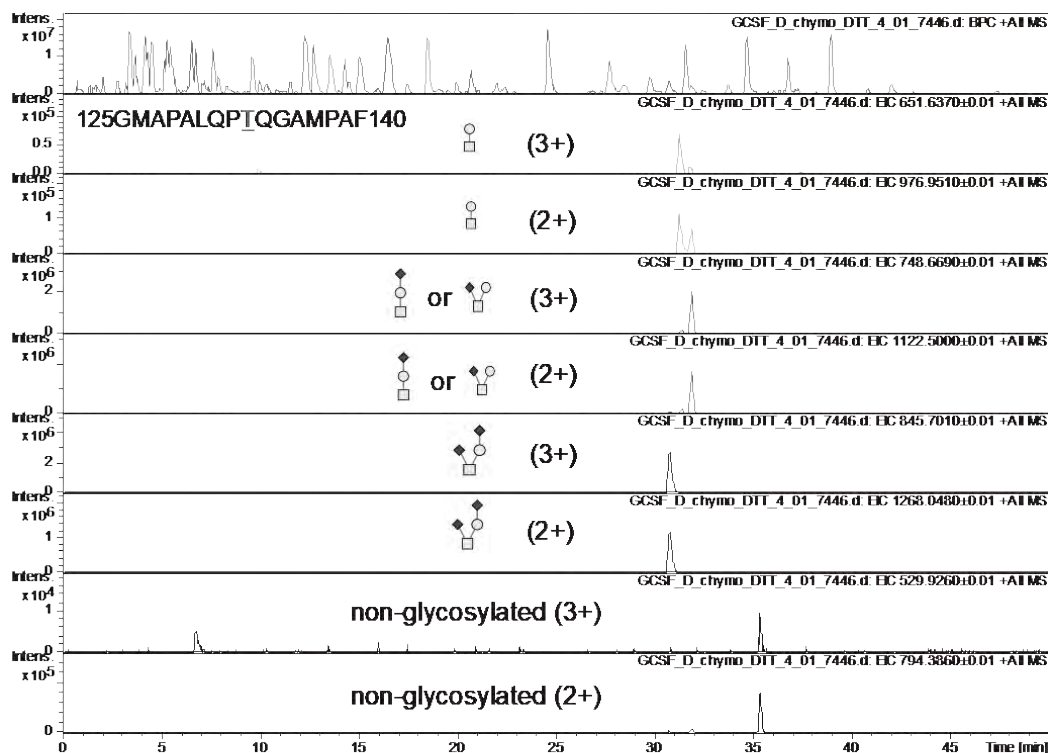


図8 レチノグラスチムに含まれる糖ペプチドの検出

最上段にキモトリプシン処理したG-CSF Aのベースピーククロマトグラムを示し、下段に未修飾あるいは糖鎖修飾されたペプチド(G126-F140, O結合型糖鎖修飾アミノ酸であるT133を含む)の抽出イオンクロマトグラムを示した。括弧内の数字はイオン価数を示す。

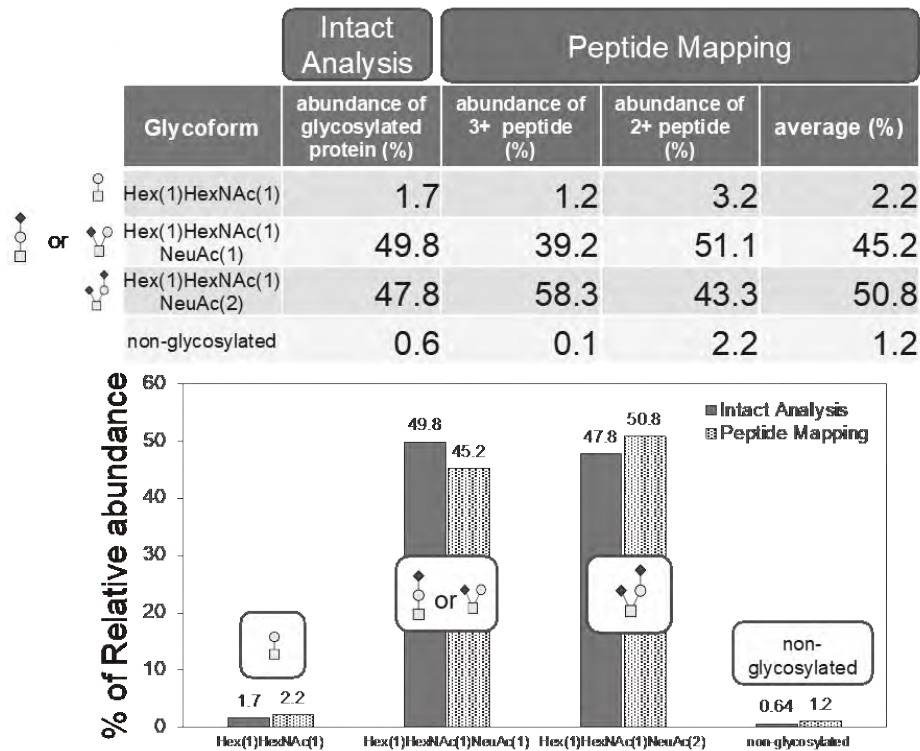


図9 インタクト解析とPeptide MappingによるレノグラスチムのGlycoform比較

インタクト解析またはペプチドマッピングの結果から算出したG-CSF DのO結合型糖鎖修飾の割合（上）とその値をグラフにしたもの（下）。ペプチドマッピングでは2価と3価のペプチドが観測された（図8）ため、その平均値（average）を最終的な存在比（abundance）とした。

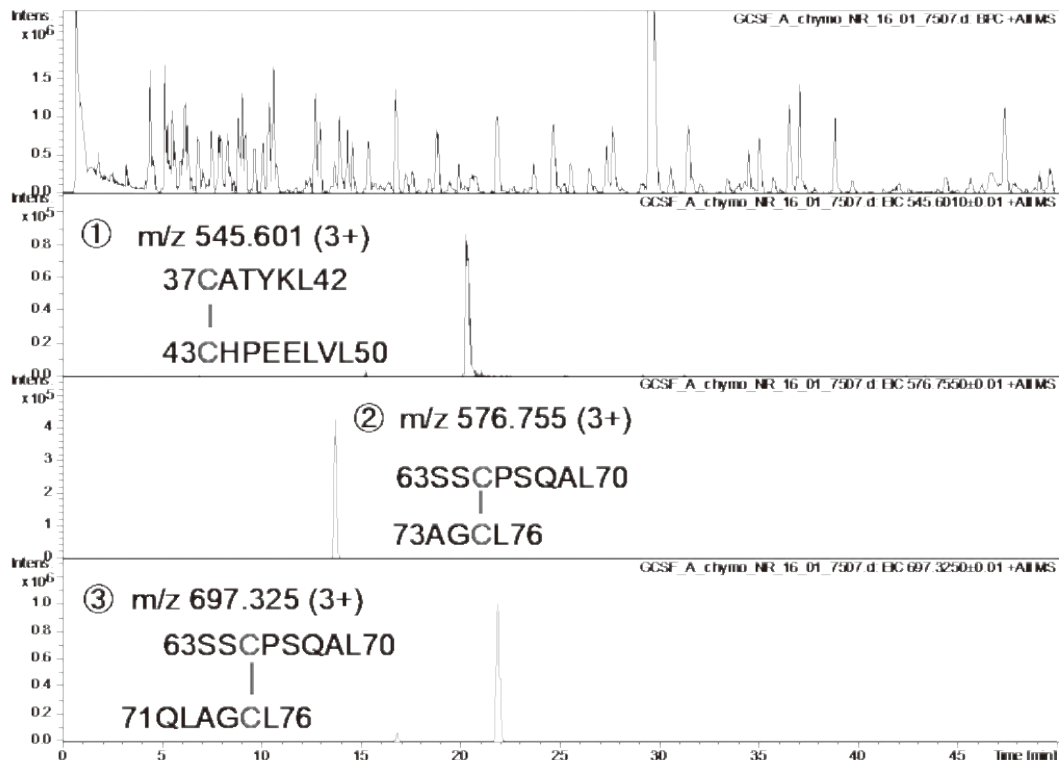


図10 ジスルフィド結合を含むジペプチドの検出

非還元下でキモトリプシン処理したG-CSF Aのベースピーククロマトグラム（最上段）と、ジスルフィド結合を含む3つのジペプチドの抽出イオンクロマトグラム（①-③）。①はC37-C43、②③はC65-C75のジスルフィド結合を保持している。

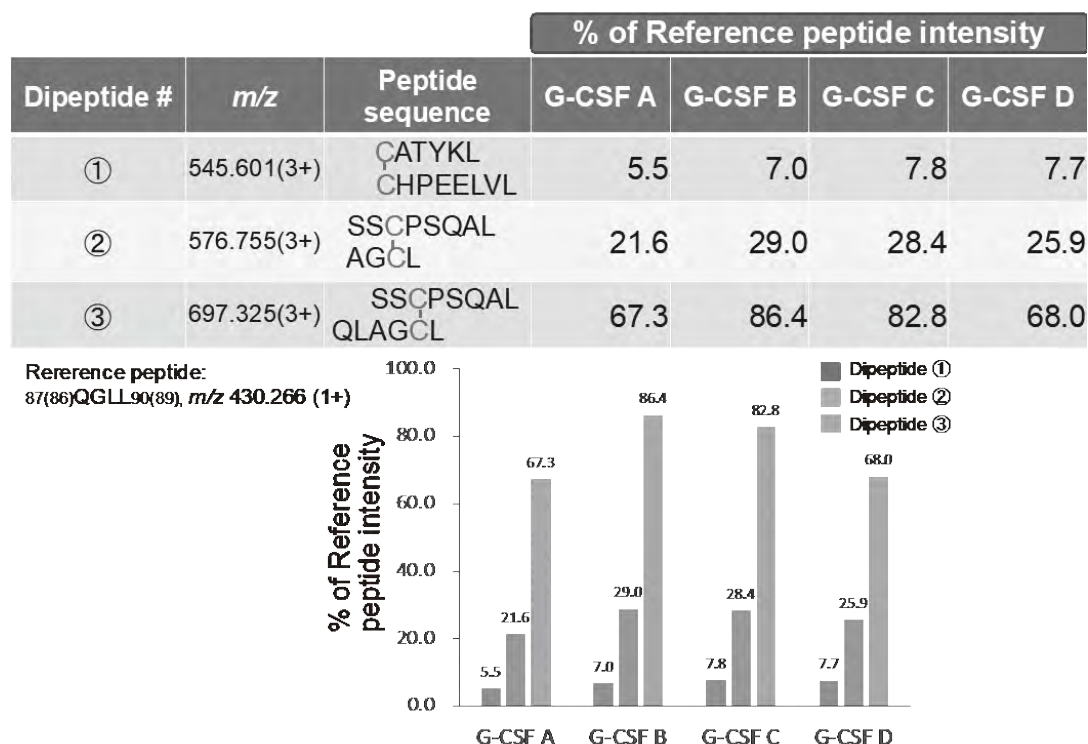


図11 G-CSF製剤中のジスルフィド結合を含むジペプチドの強度比

G-CSF製剤において検出された3つのジスルフィド結合を含むジペプチド (①-③) のReferenceペプチドに対するイオン強度比 (上) とその値をグラフにしたもの (下), ペプチドマッピングの結果, G-CSF A-Dに共通して最もイオン強度の高かったペプチドをReferenceペプチドとした。

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) , et al. NIST Interlaboratory Study on Glycosylation Analysis of Monoclonal Antibodies: Comparison of Results from Diverse Analytical Methods. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19:11-30.
- 4) Zhao J, et al. Analysis of NIST Monoclonal Antibody Reference Material Glycosylation Using the LC-MS/MS-Based Glycoproteomic Approach. *J Proteome Res*. 2021;20:818-830.
- 5) 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) <https://www.pref.toyama.jp/1285/kurashi/kenkou/iryou/1285/research/manual.html>
- 6) 高橋ら, G-CSF製剤の歴史, *Drug Delivery System*, 2017, 32-2.
- 7) Lu HS, et al. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on stability and biological activity. *Arch Biochem Biophys*. 1999;362: 1-11.
- 8) Ahmed KE, et al. Complete sequencing of the recombinant granulocyte-colony stimulating factor (filgrastim) and detection of biotinylation by mass spectrometry. *Amino Acids*. 2010;38:1043-9.