

シャルフローフィルトレーションで濃縮した。

それぞれの培養上清濃縮液を抗 FSH 抗体カラムにアプライし、280 nm の吸光度が 0.01 au 以下になるまで PBS で洗浄した後、2 M アルギニン溶液もしくは 2 M MgCl₂ 溶液で溶出し、1000 倍量の PBS に対し一昼夜透析した。

B.1.13 タンパク質濃度の測定

作製した組換えヒト FSH のタンパク質濃度は、BIAcore 3000 (GE Healthcare) を用いた SPR イムノアッセイで測定した。SPR 解析は、すべて 25°C で行った。

(1) センサーチップの作製

CM5 センサーチップ (GE Healthcare) に NHS (50 mM) / EDC (200 mM) 溶液 (50/50) を 7 分間、流速 10 μ L/min でインジェクトして活性化させた。活性化 CM5 センサーチップに 10 mM 酢酸緩衝液 pH6 に溶解した抗 FSH 抗体 (#3.22) を 70 μ L インジェクトして固定化させた後、1 M エタノールアミン 70 μ L でブロッキングした。

(2) 測定条件

HBS-EP buffer をランニング液とし、流速 20 μ L/min で試料 40 μ L をインジェクトした。結合量は、試料の注入開始 10 秒前のレゾナンスユニット (RU) から試料の注入終了 1 分後の RU を引いた値とした。各測定が完了した後、センサーチップを 20 μ L の 1 M citrate-NaOH buffer pH 2.2 をインジェクトして再生した。

(3) 検量線の作成

フォリスチム注 150 (Schering-Plough) 溶液の 2 倍希釈系列 (0.234~15 μ g/mL) を調製し、結合量を測定し、検量線を作成した。検量線から、Excel (Microsoft) で近似式を求めた。

B.1.14 還元アルキル化タンパク質の調製

PD 10 カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩した FSH (12 μ g) を 50 μ L の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解さ

せた。まず、この溶液に 2 μ L の 1 M dithiothreitol (DTT, 最終濃度 40 mM) を加えて 65°C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、4.8 μ L の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (最終濃度 96 mM) を加えて室温、暗所で 40 分間反応させて、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。反応終了後、PD 10 カラムを用いて脱塩し、還元アルキル化 FSH とした。

B.1.15 糖鎖の切り出し

還元アルキル化 FSH を凍結乾燥し、100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 50 μ L に懸濁させた後、5 ユニットの N-Glycosidase-F を加えて、37°C で 24 時間反応させて N 結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (最終濃度 60%) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C, 10,000 x g, 10 分間) によりタンパク質を除去した。遊離した N 結合型糖鎖を含む上清を Speed Vac により乾燥させて、糖鎖を回収した。

B.1.16 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を 250 μ L の 0.5 M NaBH₄ 溶液を加えて、糖鎖を溶解させた後、室温で 16 時間還元した。反応溶液を中和した後、糖鎖の回収は、グラファイトカーボン樹脂を固定相とした ENVI Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて行った。カートリッジは 1 mL の 100%アセトニトリル、1 mL の 45%アセトニトリル/5 mM AcONH₄ で洗浄後、1 mL の 5 mM AcONH₄ で 3 回洗浄した。試料溶液を注入して、糖鎖を樹脂に吸着させた。1 mL の 5 mM AcONH₄ で樹脂を洗浄した後、1.5 mL の 45%アセトニトリル/5 mM AcONH₄ 溶液で糖鎖を溶出させた。得られた溶液の Speed Vac 及び凍結乾燥により還元化糖鎖試料を調製した。

B.1.17 LC/MS

液体クロマトグラフィーは Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を使用した。溶離液は 2%アセトニトリルを含む 5 mM NH₄HCO₃ (A 溶媒) 及び 80%アセトニトリルを含む 5 mM NH₄HCO₃ (B 溶媒) を使用した。流速は 500 nl/min に設定した。質量分析装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) を接続した Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS) (装置名: LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードでデータを取得した。

分析に用いたカラム, グラジュエント条件, シングル MS 及び多段階 MS (MS/MS~MS/MS/MS/MS) 測定条件は, 以下の通りであった。

カラム: グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1×150 mm, 粒子径 5µm, Thermo Fisher Scientific)

トラップカラム: グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.3×5.0 mm, 粒子径 7 µm, Thermo Fisher Scientific)

グラジュエント条件: 8-50%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 60 分間)

シングル MS スキャンモード: FT-MS

MS/MS~MS/MS/MS/MS スキャンモード: IT-MS

スキャン範囲: m/z 800-2,000

キャピラリー温度: 200°C

スプレー電圧: 2.5ekV

MS/MS~MS/MS/MS/MS の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー): 25%

B.1.18 レポータージーンアッセイ

(1) アッセイ用細胞の調製

昨年度, 本研究で樹立した FSH レセプター

と CRE で発現制御されるルシフェラーゼ発現単位を有する CHO 細胞株 (CFL-C3 細胞) を用いた。

(2) 標準 FSH 溶液の調製

フォリスチム注 150 (Schering-Plough) を適量量り取り, 10 % F12 培養液 (Sigma) 1 mL で希釈し, 0.2, 1.0, 3.9, 15.6, 62.5, 250 および 1000 mIU/mL を含むように調製した。

(3) 試料溶液の調製

SPR イムノアッセイで測定したタンパク質濃度を基に, 組換え FSH を適量量り取り, 10 % F12 培養液 1 mL で希釈し, 0.2, 0.1, 0.39, 1.56, 6.25, 25 および 100 ng/mL を含むように調製した。

(4) ルシフェラーゼ活性の測定

CFL-C3 細胞を 10% F12 培養液で 2.0×10^5 個/mL に調製し, 48 ウェル細胞培養用マイクロプレート (Iwaki) に 200 µL ずつ播種 (4×10^4 個/well) し, CO₂ インキュベーターで 18~24 時間培養した。培養上清を除き, 標準 FSH 溶液および試料溶液を 200 µL 添加し, CO₂ インキュベーターで 4 時間培養した。

ルシフェラーゼ活性測定は, ピッカジーnde ユアルシーパンジーキット (Toyo Ink) を用いた。培養液を除き, ルシフェラーゼ活性測定用細胞溶解液を 45 µL 加え, 室温で 15 分間放置した後, 攪拌し, ルシフェラーゼ活性測定用溶液とした。ルシフェラーゼ活性測定用溶液 5 µL を 96 ウェル発光測定用マイクロプレートへ移し, ホタル・ルシフェラーゼ発光試薬を 45 µL 添加し, 発光測定用マイクロプレートリーダーで発光量を測定した。さらに, ウミシイタケ・ルシフェラーゼ発光試薬を 45 µL 添加し, 同様に発光量を測定した。

B.1.19 比活性の算出

ホタル・ルシフェラーゼ発光量をウミシイタケ・ルシフェラーゼ発光量で補正した後, FSH

無添加培養における発光量に対する相対比を算出した。Excel 2003 (Microsoft) のソルバーを用いて、5パラメータロジスティックモデルの近似式 $f(x)=\varepsilon+(\alpha/(1+(X/\delta)^{-\gamma}))^{\beta}$ を用い各変数 (α : Emax, β : 非対称因子, γ : 傾き, δ : EC₅₀, ε : Emin) をフィッティングさせた。算出されたパラメータ δ 値, すなわち EC₅₀ 値を比活性とした。

有意差検定は, Tukey の多重比較検定法を GraphPad Prism Version 5.02 用いて行った。

B.2 トラスツズマブに関する研究

B.2.1 トラスツズマブ発現ベクターの作製

トラスツズマブの H 鎖と L 鎖のアミノ酸配列は, 公開されている情報から得た。

シグナルペプチド配列は, ヒト遺伝子のデータベースに対し, トラスツズマブの H 鎖と L 鎖の各 N 末端部分と同じアミノ酸配列をコードする IgG を検索し, 同一のアミノ酸配列の上流に連なるシグナルペプチドとして機能することが期待されたアミノ酸配列を抽出し, 比較的出現頻度が高い配列を選択した。候補となったシグナルペプチド配列を付した可変領域のアミノ酸配列について, シグナルペプチド切断部位予測ソフトウェア (Genetics) で切断予想部位を確認し, 可変領域のアミノ酸配列を確定した。

上記のアミノ酸配列情報を基に可変領域の塩基配列を設計した。発現効率を高めるために, コーディング領域は, CHO 細胞に適したコドンを選択するなど, 設計したアミノ酸配列をコードする塩基配列を最適化するために最適化ソフトウェア Gene Optimizer (GENEART) を用いて決定した。また, 開始コドンの 5' 上流には, Kozak のコンセンサス配列を配置した。さらに, 作製した DNA 断片を発現ベクターにディレクショナルに組込むために, 各末端部分にユニークな制限酵素認識部位を追加した。

設計した塩基配列に基づき, 合成オリゴヌクレオチドのライゲーション法により, トラスツズマブの H 鎖可変領域と L 鎖可変領域をコードする DNA 断片を調製した。これらの DNA 断片は, H 鎖の定常領域を持つ発現ベクター pFUSE-CHIg-hG1 及び, L 鎖の定常領域を持つ発現ベクター pFUSE2-CLIg-hk1 (Lonza) にそれぞれクローニングした (以下, H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクター)。

B.2.2 トラスツズマブ安定発現株の樹立

トラスツズマブの H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクターを CHO 細胞に FuGENE HD (Promega) を用いて共導入した。導入条件は製品の添付文書に従って行った。遺伝子導入後, 10%ウシ胎仔血清を添加した F12 培地 (10% F12 培地) にゼオシン (100 µg/mL) およびブラストサイジン (10 µg/mL) を添加し, 10 日間セレクトし, 生じたコロニーからコロニーリフティング法でクローン化した。

各クローンの培養上清を回収し, SPR イムノアッセイでトラスツズマブ濃度を測定した。高発現株 TZM-2.5 については, リクローニングし, 再度 SPR イムノアッセイでトラスツズマブ濃度を測定し高発現株を得た。

B.2.3 培養工程

予備培養工程

CHO-TZM 細胞を, 10% F12 培地 (SIGMA) で 10 cm ディッシュに播種し, コンフルエントになるまで培養した。培養条件は, すべて 37°C, 5% CO₂ とした。

生産培養工程

生産培養は, 無血清培地, Select CHO 培地 (Becton, Dickinson and Company) あるいは FreeStyle CHO 培地 (GIBCO) を用いた。

予備培養したものを無血清培地で洗浄した後, 10 cm ディッシュあたり 6 mL の無血清培

地で1週間培養後、上清を回収した。

回収した培養上清は、350 x g, 15分間の遠心で clarification した後、ポアサイズ 0.45 μm のフィルターで濾過し、精製工程の出発材料とした。

B.2.4 精製工程

精製工程 1—濃縮

生産培養の上清を限外濾過膜 Vivaspin 20, 10 kDa MWCO (SARTORIUS) を用いて約 1/10 量まで濃縮した。濃縮液を回収し、遠心で不溶物を除去した。

精製工程 2—プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー

精製工程 1 の濃縮液を HiTrap MabSelect カラム(GE Healthcare) に流速 1 mL/min でアプライし、280 nm の吸光度が 0.01 au 以下になるまで PBS で洗浄した。0.1 M Glycine-HCl pH 3.0 で溶出し、2 M Tris-HCl pH 8.5 で pH 7.5 に調整した。さらに、ミリ Q 水で 2.5 mS/cm に調整した。

精製工程 3—陽イオン交換クロマトグラフィー

精製工程 2 の溶液を 50 mM Tris-HCl pH 7.5 で平衡化した HiTrap SP カラム (GE Healthcare) に流速 1 mL/min でアプライし、30分で 0.2 M NaCl を含むようになりアグラジェントで溶出した。280 nm の吸光度でモニターし、約 15分で溶出する主ピークを手動で分取した。

B.2.5 SPR イムノアッセイ

トラスツズマブの濃度は、BIAcore 3000 (GE Healthcare) を用いた SPR イムノアッセイで測定した。ランニング液は、10 mM HEPES buffer pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP buffer, GE Healthcare) を用い、25°C で行った。

(1) センサーチップの作製

CM5 センサーチップ (GE Healthcare) に 25 mM NHS / 100 mM EDC 溶液を 7 分間、流速 10 μL/min でインジェクトして活性化させた。活性化 CM5 センサーチップに 10 mM acetate buffer pH 6.0 に溶解した組換えヒト HER2 Fc 融合タンパク質を 70 μL インジェクトして固定化させた後、1 M エタノールアミン pH 8.5, 70 μL でブロッキングした。

(2) 測定条件

HBS-EP buffer で平衡化した後、流速 100 μL/min で試料 100 μL をインジェクトした。結合量は、試料の注入開始 10 秒前のレゾナンスユニット (RU) から試料の注入終了 1 分後の RU を引いた値とした。各測定が完了した後、センサーチップを 25 μL の 0.1 M Glycine-HCl buffer pH 2.4, 0.5 M NaCl をインジェクトして再生した。

(3) 検量線の作成

Harceptin (Roche) 溶液の希釈系列 (18.75 ~ 600 μg/mL) について結合量を測定し、Excel 2003 (Microsoft) で近似式を求め、検量線を作成した。

B.2.6 CHO 細胞由来タンパク質の定量

CHO 細胞由来タンパク質は、CHO Host Cell Protein ELISA Kit, 3rd Generation (CYGNUS) を用いた ELISA 法をメーカーのプロトコルに従って行った。キットに添付されている CHO 細胞由来タンパク質標準溶液を用い、得られた数値から Excel 2003 (Microsoft) で近似式を求め、検量線を作成した。

B.2.7 CHO 細胞由来 DNA の定量

(1) 測定条件

CHO 細胞由来 DNA は、Alu 配列を標的とした定量 PCR で定量した。反応試薬は、SYBR Green PCR Master Mix (Takara), Alu-F (5'-CCAGGCATTGGTGGCAC-3') 及び

Alu-R (5'-AGACAGGGTTTCTCTGT-3') を用い、テンプレートの希釈は、EASY Dilution (Takara) を用いた。qPCR は、変成：95°C、1分、アニーリング：58°C、1分、伸長反応：72°C、1分で40サイクル行い、2nd Derivative Maximum 法で Threshold Cycle (Ct) 値を算出した。

(2) 検量線の作成

CHO 細胞のゲノム DNA の希釈系列を標準物質とし、DNA 濃度を導出パラメータ、定量 PCR で得られた Ct 値を初期パラメータとして Excel 2003 (Microsoft) で近似式を求め、検量線とした。

B.2.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE は、10~20%アクリルアミドグラジエントゲル (BIO CRAFT) を用い、定法に従って行った。ゲルの染色は、クマシーブリリアントブルーを用いた。

B.2.9 インタクト解析

サンプル調製

市販品のトラスツズマブであるハーセプチン (10 µg/µL) 及び本研究で作製したトラスツズマブ (1.4 µg/µL) をそれぞれ水で希釈し、終濃度 1.0 µg/µL となるよう調整した。

LC/MS

液体クロマトグラフィー (LC) は、Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を用いた。溶離液は 0.1% ギ酸 (A 溶媒) 及び 90%アセトニトリルを含む 0.1%ギ酸 (B 溶媒) を使用した。流速は、0.6 µL/min に設定した。質量分析 (MS) 装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AB/MDS Sciex) を接続した Qq-TOF 質量分析装置 (Qstar Elite, AB/MDS Sciex) を使用し、ポジティブイオンモードでデータを取得した。抗体の分析で用いたカラム、グラジエント条件、MS 測定条件は、以下の通りであった。

脱塩カラム：MassPREP Micro desalting column (2.1×5.0 mm, 20 µm, Waters)

グラジエント条件：10-90% B 溶媒 (リニアグラジエント, 20 分間)

スキャン範囲： m/z 1,000-4,000

スプレー電圧：4.0 ekV

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来サンプル及び動物を使用していない。

C. 結果と考察

C.1 組換えヒト FSH に関する研究

C.1.1 ヒト FSH を高発現する CHO 細胞株の樹立

FSH は下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンで、女性では、卵巣に作用して卵胞成長、排卵、及びエストロゲン合成を促進させる。男性では、精巣セルトリ細胞に作用して精子形成を促す。ヒト FSH は 92 個のアミノ酸残基からなる α 鎖 1 分子、及び 111 個のアミノ酸残基からなる β 鎖 1 分子から構成される。FSH と同じ一次構造をもつ医薬品として、ホリトロピン アルファ (効能：ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)との併用で、視床下部または下垂体前葉の機能及び器質的障害に由来する低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症患者を対象とした精子形成を誘導する) とフォリトロピン ベータ (効能：体外受精などの生殖補助技術を受ける患者を対象とした複数卵胞発育のための調節卵巣刺激に適応される) が承認されている。FSH の α 鎖及び β 鎖にはそれぞれ 2 本の N 結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は血中半減期に影響する。FSH は、糖鎖の恒常性を保証する製造工程の設計や工程管理試験の策定のモデルとして適していると考えられたので、高発現が期待できるジヒドロ葉酸レダク

ターゼによる遺伝子増幅を利用した組換えヒト FSH 産生系を樹立することとした。

CHO-DG44 細胞にヒト FSH α 鎖発現ベクターおよび FSH β 鎖発現ベクターを共導入し、G418 およびメトトレキサート耐性株 10 クロウンを得た。各クロウンの FSH α 鎖および FSH β 鎖の発現量をリアルタイム PCR で解析し、高発現株 DGF-1.7 を得た (図 2)。DGF-1.7 細胞を 24 時間培養した上清について FSH レポータージーンアッセイを行った結果、200 IU/mL の FSH 活性が確認された。なお、この活性から含量を推定すると、組換え FSH であるフォリスチム 20 $\mu\text{g/mL}$ に相当する。また、ウェスタンブロットで確認した結果、予想された分子量が確認された (図 3)。

C.1.2 抗ヒト FSH 抗体を産生するハイブリドーマの樹立

FSH は、 α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーを形成しており、酸性条件で不安定であることが知られている。そこで、アフィニティー精製に適した抗体として、中性領域で溶出可能な抗体を樹立することを目指した。

ヒト下垂体から精製した FSH を抗原としてハイブリドーマを作製し、ELISA によって抗体産生を確認し、51 株の陽性クロウンを得た。さらに、BIACORE を用いて、アフィニティー精製用として中性領域のマグネシウム塩溶液で解離する抗体 (塩溶出可能抗体)、ウェスタンブロット用抗体として酸性条件化で解離する抗体 (酸溶出可能抗体) を産生するハイブリドーマクロウンをスクリーニングした結果、塩溶出可能抗体および酸溶出可能抗体を産生するクロウンが複数得られた。このうち抗体価が高かった 3 クロウンおよび 2 クロウンを再度クロウン化して、酸溶出可能抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#57-5、および塩溶出可能抗 FSH モノクローナル抗体産生ハ

イブリドーマ#37-4 を得た (表 1)。

抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#57-5 については、ウェスタンブロットに供し、検出可能であることを確認した (図 4)。

C.1.3 FSH 活性測定用のレポータージーンアッセイ用細胞株の樹立

FSH は、そのシグナルの下流に cAMP を生じるため、CRE の応答で活性を定量化することが可能であり、CRE 応答ルシフェラーゼを利用することでレポータージーンアッセイが可能となる。ルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.29 を CHO 細胞に導入し、ハイグロマイシン耐性株 48 クロウンを得た。ハイグロマイシン耐性株について、フォルスコリンによるルシフェラーゼ活性の誘導能を指標にスクリーニングした結果、CRE 応答ルシフェラーゼ発現株 CRE2 を得た (図 5)。

CRE2 細胞に FSH のレセプター遺伝子発現ベクター pCMV-FSHR-hRluc をさらに導入し、G418 耐性株 48 クロウンを得た。G418 耐性株について、FSH に依存してルシフェラーゼ活性が増加する株をスクリーニングし、FSH 応答ルシフェラーゼ発現株 CFL36 を得た (図 6)。

予備的な検討結果であるが、このレポーター細胞を用いて、FSH の応答をソルバーによる非線形解析で評価した結果、極めて良好なシグモイドの近似曲線が得られ、そのパラメータから本アッセイにより IC₅₀ 値が 20 mIU/mL (20 ng/mL 相当) 程度で FSH の検出が可能であることが確認された (図 7)。

C.1.4 組換えヒト FSH の作製

FSH のサブユニットは酸性条件で解離してしまうため、中性条件で溶出が可能な抗体として昨年度作製した抗 FSH 抗体 (#3.22) を抗 FSH 抗体カラム作製用として採用した。この抗体は、予備的な検討により、抗 FSH 抗体カラムとして使用したとき、2 M MgCl₂ 溶液で

FSH を溶出させることが確認されていたものである。しかし、SDS 存在下で安定性が低下し、サブユニットが解離することが確認されたことから、溶出された FSH が少なからず変性している可能性が懸念された。そこで、溶出条件を再検討した結果、2 M アルギニン溶液が変性を引き起こさず、効率的に溶出できることが明らかとなり、以降の溶出液として採用した (図 8)。

培養工程で血清添加培地を用いた FSH (FSH (+))、無血清培地を用いた FSH (FSH (-)) をそれぞれ 6 ロット製造した。培養状態が安定し、恒常的な製造が行われていると思われたロット 4~6 について以下の解析に供した。ロット 4~6 の各タンパク質濃度は、SPR イムノアッセイによって測定した (図 9, 表 2)。

C.1.5 糖鎖構造解析

FSH(+)及び FSH(-)から N-結合型糖鎖を切り出し、還元化糖鎖とした後、LC/MS 及び MS/MS~MS/MS/MS/MS により分析した。各糖鎖の構造は、FT-MS を用いたシングル MS スキャンにより測定された精密質量と MS/MS~MS/MS/MS/MS で検出されたフラグメントイオンの帰属により推定した。

図 10A は、FSH (+) 由来還元化糖鎖を分析したときのベースピーククロマトグラムである。ポジティブイオンモードで測定したスペクトルデータを用いて中性糖鎖を解析した結果、16 分にアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4), 18 分に 1 分子のフコース (Fuc) が付加したアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Fuc1Hex5HexNAc4), 19 分にアシアロ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6Hex NAc5) が溶出されていることが明らかとなった。また、21~30 分に溶出された主要糖鎖は、N-アセチルラクトサミンを有するアシアロ複合型 2~4 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4Lac1, Fuc1Hex6HexNAc5

Lac1, Fuc1Hex7Hex NAc6Lac1, Fuc1Hex8HexNAc7Lac1, Fuc1 Hex9HexNAc8Lac1,) であると推定された。一方、ネガティブイオンモードで測定したクロマトグラムを用いて酸性糖鎖の解析を行ったが、シアロ糖鎖は検出限界以下であった。

同様に、FSH (-) 由来還元化糖鎖の糖鎖構造解析を行った (図 10B)。中性糖鎖を解析した結果、FSH (+) と比較して、主要糖鎖の種類に違いはみられなかった。また、シアロ糖鎖は検出限界以下であった。

C.1.6 糖鎖分布

ポジティブイオンモードで検出された糖鎖の総ピーク面積に対する各糖鎖の面積百分率を算出して、FSH (+) 及び FSH (-) の糖鎖分布を比較した (図 11)。その結果、FSH (+) 及び FSH (-) とともに、アシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4) が全体の 25% を占めていることが明らかとなった。ついで、N-アセチルラクトサミンが付加した Hex5HexNAc4Lac1 及び Fuc1Hex8HexNAc7Lac1 の割合が高かった。両者の糖鎖プロファイルを比較した結果、顕著な差はみられなかった。

C.1.7 組換えヒト FSH の比活性

FSH のレポータージーンアッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法を開発し、有用性を評価した。SPR イムノアッセイで求めたタンパク質濃度を基に試験溶液を調製し、レポータージーンアッセイを行った。FSH のレポータージーンアッセイで得られた応答曲線を 5 パラメータロジスティックモデルにフィッティングさせることで EC₅₀ 値を求め、比活性を算出した。アッセイは、FSH(+)および FSH(-)の各ロット 4~6 について 2 回ずつ行い、血清添加群と無血清群について統計解析を行った結果、無血清培養で比活性が約 1.5 倍、有為 ($p < 0.05$) に増加していることが明らかと

なった (図 12). なお, ロット間の変動で有意差はなかった.

糖鎖プロファイリングおよび比活性の検討結果から, 組換えヒト FSH の培養工程を無血清化することにより, FSH のタンパク質部分の一次構造あるいは高次構造に違いが生じた結果, 活性が上昇したものと予想された. また, レポータージーンアッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法は, 生物活性評価法として有用であり, 同等性/同質性評価法や PAT としても利用できる可能性が示唆された.

C.2 トラストズマブに関する研究

C.2.1 トラストズマブ発現ベクターの作製

トラストズマブの H 鎖と L 鎖のアミノ酸配列は公開されているが, シグナルペプチド配列部分は公表されていないため, 独自に設計する必要があった. シグナルペプチドは, 任意の配列でも機能することが期待されたが, より適合した配列を選択することとし, ヒト遺伝子のデータベースから候補アミノ酸配列を抽出し, シグナルペプチド切断部位予測ソフトウェアで確認した. それらを統合して確定した可変領域のアミノ酸配列を基に, 高発現が期待される塩基配列を設計した (図 13A, 13B).

合成オリゴヌクレオチド/ライゲーション法により調製した H 鎖および L 鎖の可変領域をコードする DNA 断片を用い, H 鎖発現ベクター (図 14A) 及び L 鎖発現ベクター (図 14B) を作製した. インサート領域については塩基配列を解析し, 設計通りに正しく作製できていることを確認した.

さらに, CHO 細胞で一過性発現させ, プロテイン A カラムクロマトグラフィーで精製したトラストズマブと, 市販トラストズマブ製剤 (ハーセプチン) を SDS-PAGE で比較した結果, 期待される分子量を示すタンパク質が産生されることが確認され, 作製した発現ベクター

が機能することが示された (図 15).

C.2.2 トラストズマブ安定発現株の作製

H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクターを CHO 細胞に共導入し, ゼオシン及びブラストサイジン耐性となった 96 クローンを単離した. 各クローンの培養上清のトラストズマブ濃度を測定した (図 16). トラストズマブを最も高発現している株 (TZM-2.5 細胞) をリクローニングし, 最も高発現していた株 (TZM-2.5.4 細胞) を以下の実験に用いた.

TZM-2.5.4 細胞は, 無血清培地に順化されていないが, コンフルエントの状態であれば無血清であっても 2~3 週間維持できることが確認され, 抗体医薬品製造モデルの生産細胞として有用であると評価された.

C.2.3 培養工程

無血清培地として Select CHO 培地 (Becton, Dickinson and Company) 及び FreeStyle CHO 培地 (GIBCO) を用い, TZM-2.5.4 細胞を 1 週間培養した. 両培地とも, 死滅することなく, 維持することができた (図 17).

SPR イムノアッセイで培養上清中のトラストズマブ濃度を解析した結果, Select CHO 培地で 3.6 mg/L, FreeStyle CHO 培地で 3.0 mg/L となった. より高発現した Select CHO 培地を生産培地として選択した.

C.2.4 精製工程

精製工程 1—濃縮

限外濾過による濃縮において, トラストズマブの分子量が約 150 kDa であることを踏まえ 100 kDa MWCO の限外濾過膜を用いていたが, 回収率が 70%程度に留まった. 10 kDa MWCO に変更した結果, ほぼ 100%回収することが可能となった.

精製工程 2—プロテイン A クロマトグラフィー

プロテイン A カラムクロマトグラフィーに

は、抗体医薬品の製造に実績がある MabSelect のラボスケールタイプの HiTrap MabSelect カラムを用いた。

溶出は、0.1 M Glycine-HCl をベースとして、pH4.0 から順次0.2 ずつ低いものについて順次検討し、100%溶出される条件として pH 3.0 に決定した。

精製工程 3—陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオン交換クロマトグラフィーは、SP セファロースを採用し、ラボスケールタイプの HiTrap SP カラムを用いることとした。

精製工程 2 の溶液を本工程に適用するためには、pH 及び塩濃度を調整することが必要である。ラボスケールでは、透析あるいはゲル濾過による平衡化が一般的であるが、実生産スケールでは、塩基性溶液添加による中和と加水による希釈で調整する方法が一般的であることを踏まえ、本研究では、後者の方法を採用した。

C.2.5 トラスツズマブの定量

SPR イムノアッセイでトラスツズマブの濃度を測定する条件を決定し、ハーセプチンを標準物質として検量線を作製した。定量可能範囲は、37.5~600 ng/mL であった (図 18)。

C.2.6 CHO 細胞由来タンパク質の定量

ELISA で CHO 細胞由来タンパク質の濃度を測定するため、CHO 細胞由来タンパク質標準物質として検量線を作製した。定量可能範囲は、12~100 ng/mL であった (図 19)。

C.2.7 CHO 細胞由来 DNA の定量

定量 PCR で CHO 細胞由来 DNA の濃度を測定するため、CHO 細胞由来 DNA を用いて検量線を作製した。定量可能範囲は、10 pg/mL~10 µg/mL であった (図 20)。

C.2.8 SDS-PAGE

精製工程 2 のプロテイン A クロマトグラフィーで得られたサンプルと市販のトラスツズマ

ブ製剤であるハーセプチンを SDS-PAGE で比較した結果、非還元条件、還元条件ともに、見掛けの分子量は、ハーセプチンと一致していることが確認された (図 21)。

C.2.9 質量測定

ハーセプチンと本研究のトラスツズマブの質量を比較した。図 22 に、トラスツズマブの LC/MS により得られたデコンボリューションマスマスペクトルを示した。ハーセプチンと本研究のトラスツズマブで検出された主なアイソフォーム (ピーク 1-5) の質量は一致し、本研究のトラスツズマブのアミノ酸配列及び糖鎖構造は、ハーセプチンと一致することが示唆された。

なお、グライコフォームの分布には違いが観察された。すなわち、ハーセプチンではピーク 3 (G0F/G1F)、本研究のトラスツズマブではピーク 2 (G0F/G0F) が最も多いグライコフォームであると推定された。各ピーク高さの和 (ピーク 1-5 の和) に対する各ピーク高さの比率を求めたところ、ハーセプチンでは G0/G0F, G0F/G0F, G0F/G1F, G0F/G2F (または G1F/G1F), G1F/G2F でそれぞれ 3, 29, 38, 24, 6%, 本研究のトラスツズマブでは 3, 48, 33, 15, 2% であった (表 3)。

C.2.10 製造工程の評価

本研究で構築した製造工程の流れを図 23 にまとめた。100 mL スケールの培養で得た上清を 5 mL まで濃縮した。これを HiTrap MabSelect カラムにアプライし、0.1 M Glycine-HCl pH 3.0 で溶出した (図 24)。

さらに、pH と電気伝導度を調整後、HiTrap SP カラムにアプライし、塩化ナトリウムのリニアグラジエントで溶出した (図 25)。

表 4 に各精製工程における、トラスツズマブの回収率、宿主由来タンパク質、宿主由来 DNA の除去状況を示した。

D. 結論

本研究では、

- 1) 製造方法の開発・変更モデルとしてヒト組換え FSH の実験的製造システムを確立した.
- 2) LC/MS を用いて DG44 細胞より産生した FSH の糖鎖構造を解析し、目的とするアミノ酸と糖組成からなることを確認した.
- 3) レポーター遺伝子アッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法を開発し、生物活性評価法として有用であること、また、同等性/同質性評価法や PAT としても利用できる可能性が示唆された.
- 4) 製造方法の開発・変更モデルとしてトラスツズマブの実験的製造システムを確立した.
- 5) 本研究で作製したトラスツズマブは、LC/MS を用いた質量測定の結果、市販のトラスツズマブと同一の質量であったことから、目的とする一次構造と糖鎖構造をもつ抗体が得られたものと結論付けた.
- 6) BIACORE を用いたトラスツズマブ定量法、CHO 細胞由来タンパク質の定量法、CHO 細胞由来 DNA の定量法が確立され、製造工程を評価することが可能となった.

したがって、本研究で構築したヒト組換え FSH 及びトラスツズマブの試験的製造工程と各種解析法は、QbD に関する研究を推進するための重要なツールとなるものと期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石井明子, 多田 稔, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第 5 回) バイオ医薬品の生産用基材, ファームテクジャパン, 印刷中
- 2) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第 4

回) バイオ医薬品の不純物の評価 (2), ファームテクジャパン, 28 (4), 113-119 (2012)

- 3) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第 3 回) バイオ医薬品の不純物の評価 (1), ファームテクジャパン, 28 (3), 43-48 (2012)
- 4) 橋井則貴, 中澤志織, 川崎ナナ: 再生医療製品の品質評価におけるグライコミクス, 薬学雑誌, 132 (4), 395-530 (2012)
- 5) 中澤志織, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題—特性解析の新しい位置づけと重要性, レギュラトリーサイエンス学会誌, 2 (1), 21-30 (2012)
- 6) 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第 1 回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状, ファームテクジャパン, 27 (13), 99-104 (2011)

2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析. 第 7 回日本糖質科学コンソシアムシンポジウム, 大阪 (2009, 2)
- 2) 川崎ナナ: 臨床試験に向けたバイオ医薬品の品質管理. 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術集会, 東京 (2011, 9)
- 3) 川崎ナナ: バイオ医薬品開発動向と課題. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム, 札幌 (2012, 3)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 抗ヒト FSH 抗体の結合特性

| No. | Bound | 0.5 M NaCl | 4 M MgCl ₂ | pH 10 | pH 2 |
|------|-------|------------|-----------------------|-------|------|
| 37-4 | 124 | 33 | 85 | 0 | 3 |
| 57-5 | 226 | 6 | 3 | 1 | 189 |

表 2 各ロットのタンパク質濃度

| Culture Lot No. | Serum | Protein conc. (μg/ml) |
|-----------------|-------|-----------------------|
| 4 | + | 156 |
| 4 | - | 273 |
| | | |
| 5 | + | 117 |
| 5 | - | 222 |
| | | |
| 6 | + | 142 |
| 6 | - | 276 |

表 3 各糖鎖の存在比率 (%)

| | Peak 1 | Peak 2 | Peak 3 | Peak 4 | Peak 5 |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|
| 市販品 | 2.7 | 29.0 | 38.3 | 23.9 | 6.1 |
| 製造品 | 2.6 | 47.6 | 33.3 | 14.6 | 1.9 |

表 4 精製工程における目的物質と不純物の推移

| | TZM [μ g] | Recovery [%] | HCP [ng] | DNA [ng] |
|-----------|----------------|--------------|-----------|----------|
| Harvest | 540 | 100 | 6,100,000 | 927,000 |
| MabSelect | 119 | 22 | 480 | 16 |
| SP | 73 | 13 | 145 | 5 |

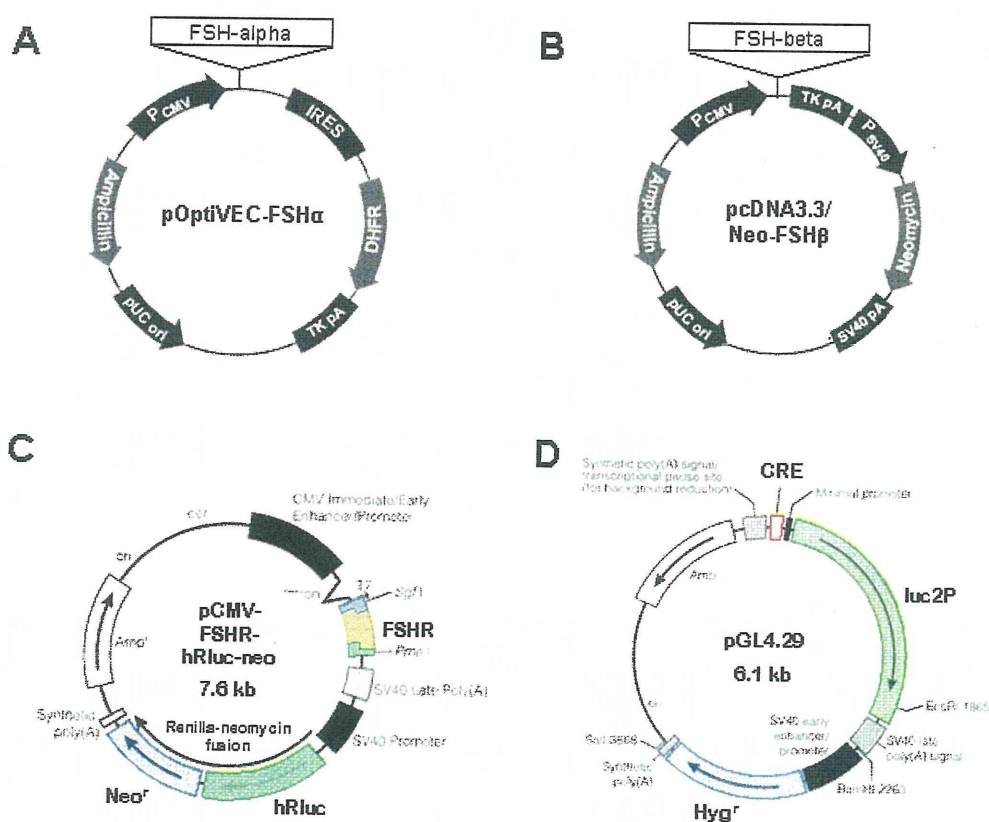


図 1 組換えヒト FSH に関する研究で用いた各種発現ベクターの構造

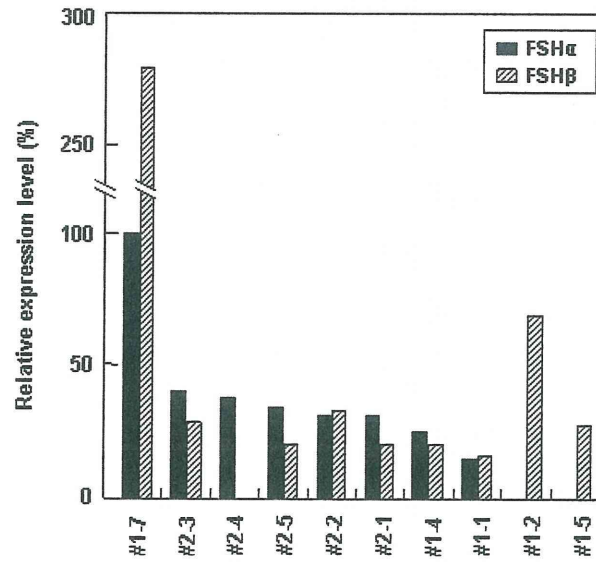


図2 各トランスフェクタントにおけるヒト FSH 遺伝子の発現量

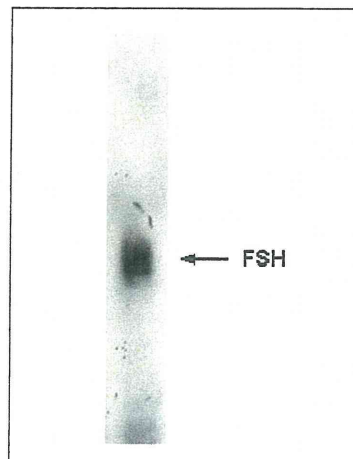


図3 DGF-1.7 の培養上清の抗 FSH 抗体を用いたウェスタンブロット

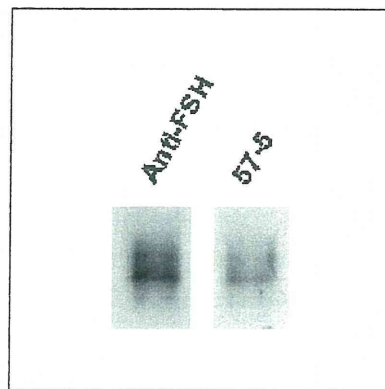


図4 ハイブリドーマ#57-5 の産生する抗体を用いた FSH のウェスタンブロット

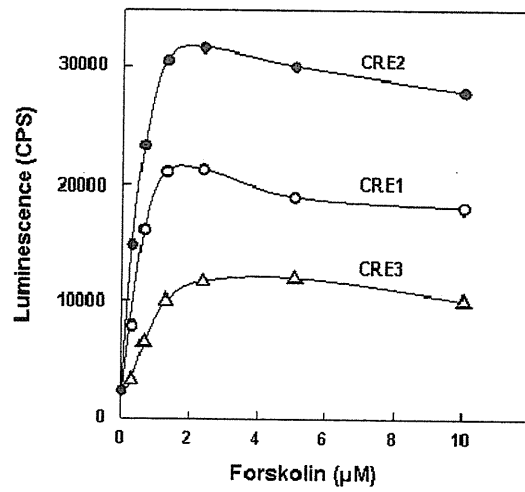


図5 CRE 応答発現株におけるフォルスコリンによるルシフェラーゼ活性の誘導

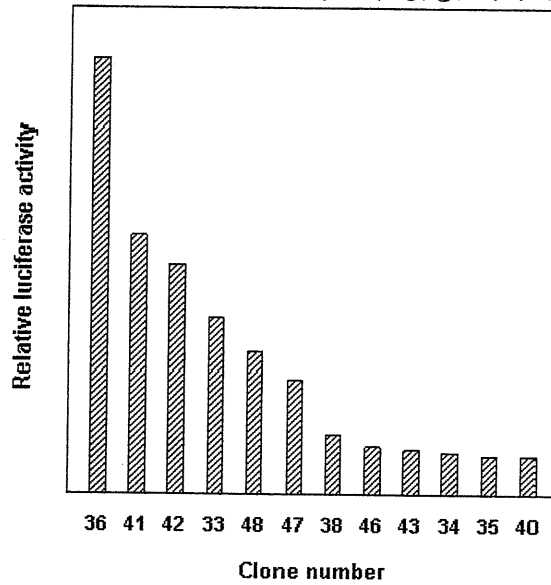


図6 CRE レポーターアッセイによる FSH 発現株の培養上清中の FSH 活性の測定

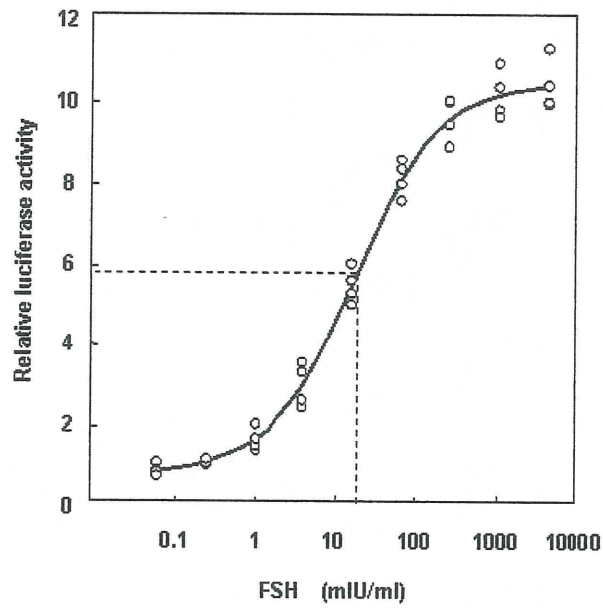


図7 FSH 応答ルシフェラーゼ活性の応答と近似曲線

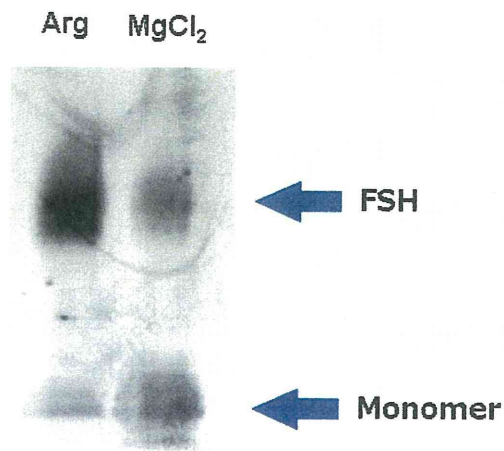


図8 ヒト組換え FSH の SDS-PAGE

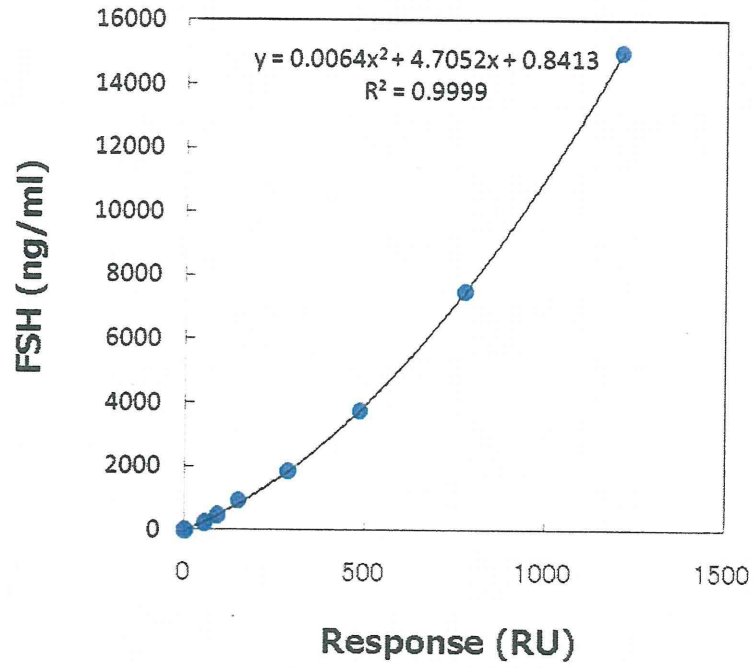


図9 SPRイムノアッセイによるFSHの検量線

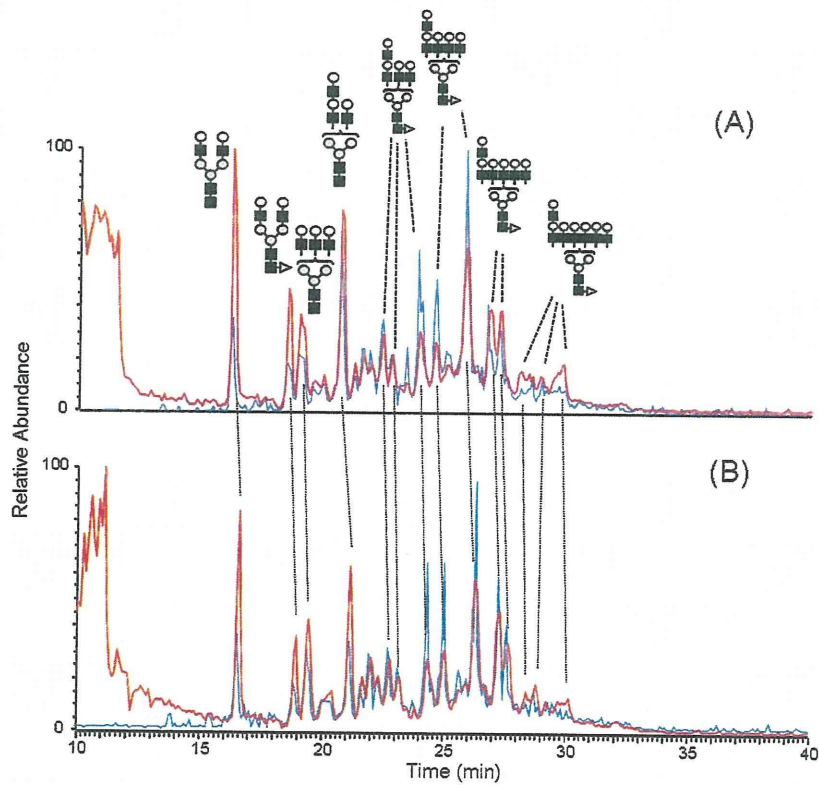


図10 LC/MSにより得られたDG44細胞由来FSHの糖鎖プロファイル
(A) 血清添加培地; (B) 無血清培地

赤線, ポジティブイオンモード; 青線, ネガティブイオンモード

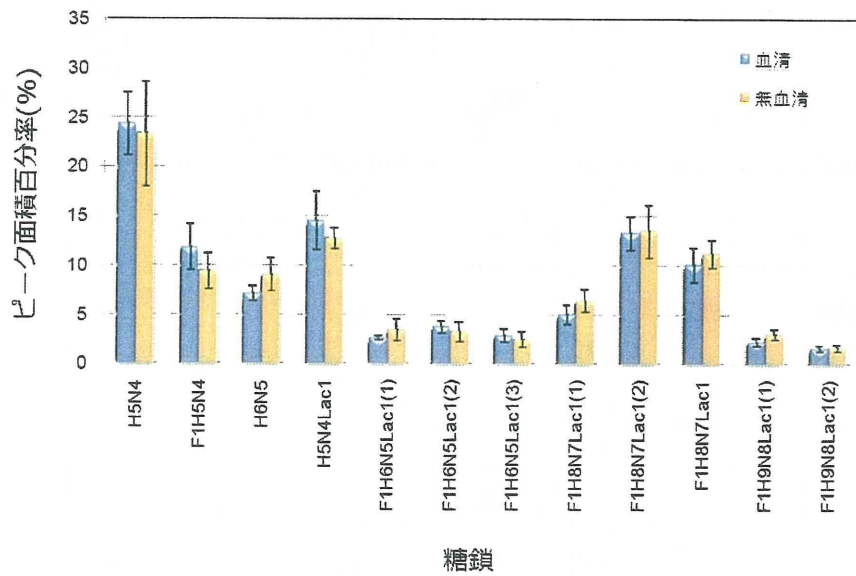


図 11 糖鎖分布の比較 (ポジティブイオンモード), n=4
 H, ヘキソース; N, N-アセチルヘキソサミン; F, フコース;
 Lac, N-アセチルラクトサミン.

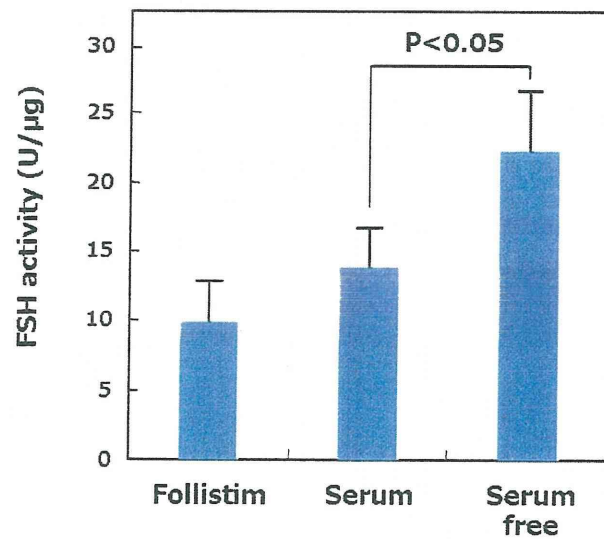


図 12 組換えヒト FSH の比活性の比較

EcoR I Kozak

10 20 30 40 50 60

GAGCTGGAATTCGCGACGATGGAAATTTGGCTGTCCCTGGGTGTTCTGGTGGCTATCCTG

M E F W L S W V F L V R I L

Signal Sequence

70 80 90 100 110 120

AAGGGCGTGCAGTCCGAGGTGCAGTGGTGAATCTGGCGGGGACTGGTGCAGCCTGGC

K G V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G

130 140 150 160 170 180

GGCTCCCTGAGACTGTCTTTGGCGCGCCTCCGGCTTCACATCAAGGACACCTACATCCAC

G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H

190 200 210 220 230 240

TGGTCCGACAGGCCCTGGAAAGGGCTGGAATGGTGGCCCGGATCTACCCACCAAC

W V R Q A P G K G L E W V A R I Y P T N

250 260 270 280 290 300

GGCTACACAGATACGCGACTCCGTAAGGGCGGTTCACATCTCCGCGGACACCTCC

G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S

310 320 330 340 350 360

AAGAACCCGCTACCTGCAGATGAATCCCTGCGGGCGAGGACACCGCCGTACTAC

K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y

370 380 390 400 410 420

TGTCACAGTGGGGAGGCGCGCTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTG

C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L

430 440

GTGACAGTGTCTCTGCTAGCGGTACC

V T V S S A S G T

Nhe I

図 13A トラスツズマブ H 鎖の可変領域のアミノ酸配列と塩基配列

Age I Kozak

10 20 30 40 50 60

GAGCTTACGGTTCCTCCAGATGACATGAGAGTGGCGCCAGCTCCTGGGCCCTGCTGCTG

M E M R V F A Q L L G L L L

Signal Sequence

70 80 90 100 110 120

CTGTGGCTGAGAGGCGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCTCCAGCCTCTCC

L W L R G A R C D I Q M T Q S P S S L S

130 140 150 160 170 180

GCCTCGCTGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGGGCTCCCGAGGAGTGAACACCGCC

A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A

190 200 210 220 230 240

GTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACTCCGCCCTCC

V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S

250 260 270 280 290 300

TTCCTGTACTCCGCGCTGCCCTCCCGTTCCTCCGGCTCCAGATCTGGCACCAGCTTCACC

F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T

310 320 330 340 350 360

CTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACTACTACTGCGCAGCAGCAGTAC

L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y

370 380 390 400 410

ACCACCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCANGGTAATTAATTAA

T T P P T F G Q G T K V E I K R T L I

BsiW I

図 13B トラスツズマブ L 鎖の可変領域のアミノ酸配列と塩基配列

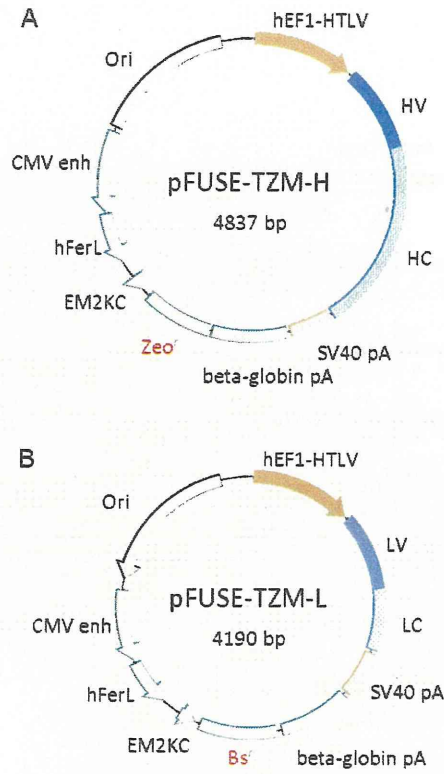


図 14 トラスツズマブ H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクター

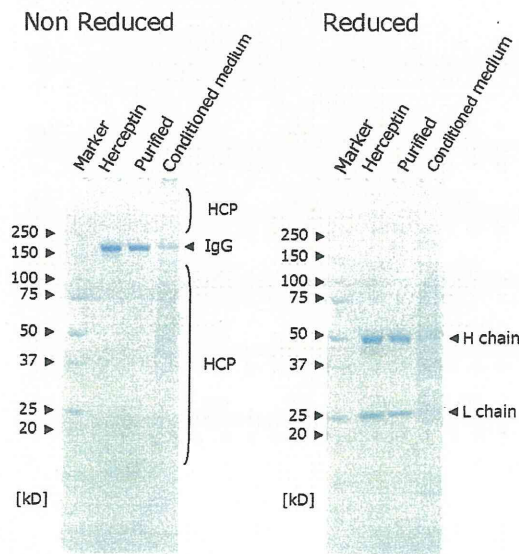


図 15 一過性発現で産生させたトラスツズマブの SDS-PAGE

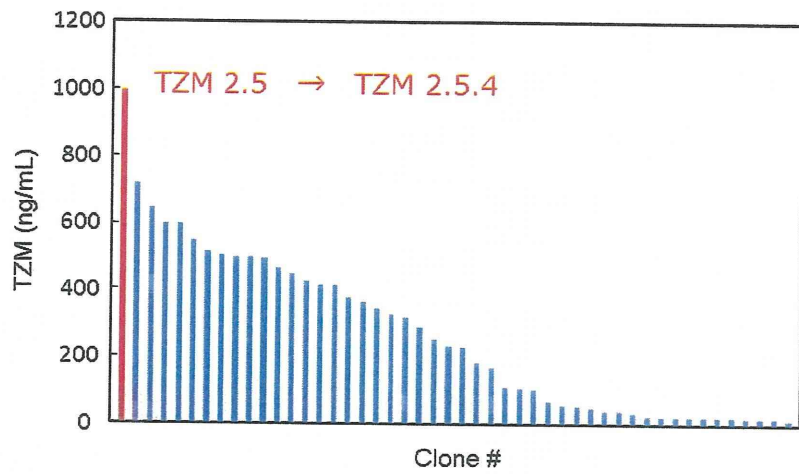


図 16 トラスツズマブ発現クローンにおけるトラスツズマブ発現量

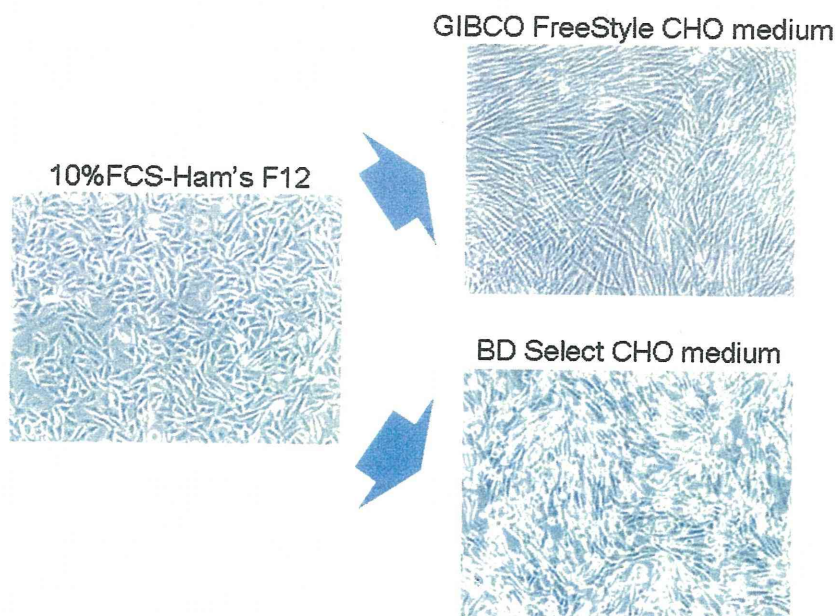


図 17 TZM-2.5.4 細胞の無血清培養における細胞像