

Fig. 1. Absorption of subcutaneously injected insulin. Insulin molecules in drug products exist mainly as hexamers. After subcutaneous injection, diluted hexamers dissociate to monomers to be absorbed by microvessels.

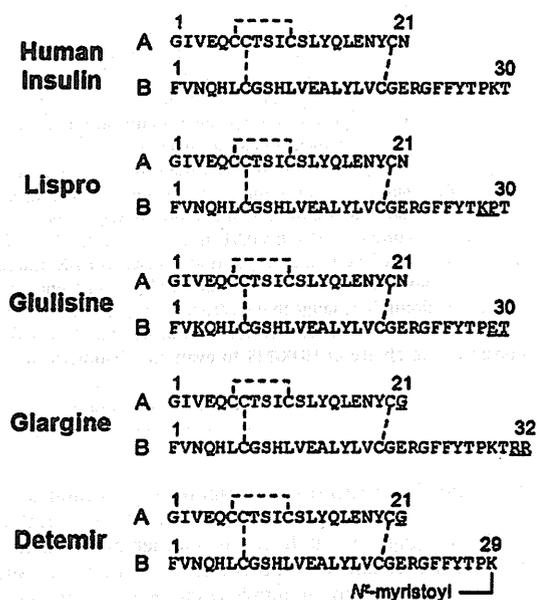


Fig. 2. Primary structures of insulin analogs we examined. Dashed lines represent disulfide bonds. Mutated residues are underscored.

Table 1
Human insulin and its analog products examined in this study.

Group	Analog	Onset of action	Duration of action	Molecular weight	pI	pH of drug product
Rapid	Human Insulin	30–60 min	4–12 h	5807.57	5.4	7.0–7.8
	Lispro	5–15 min	4–6 h	5807.57	5.65	7.0–7.8
	Glulisine	5–15 min	1–2.5 h	5822.58	5.1	7.0–7.8
Long	Glargine	2–4 h	20–24 h	6062.89	6.7	3.5–4.5
	Detemir	2 h ^a	6–24 h ^a	5916.82		7.2–7.6
Intermediate	NPH	2–4 h	10–16 h	5807.57		7.0–7.5
	NPL	1–2 h	10–16 h	5807.57		7.0–7.8

^a Dose dependent.

complex with protamine to suppress dissociation in subcutaneous tissue after injection. Human isophane insulin (neutral protamine

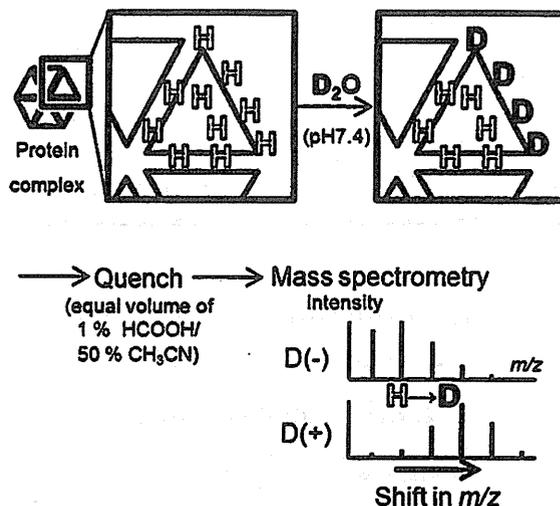


Fig. 3. Schematic model of HDX/MS. The protein sample is exposed to deuterated solvent and subjected to MS. Hydrogen atoms, without participating in hydrogen bonds or any other noncovalent bonds, are more easily exchanged with deuteriums. Exchanged deuteriums are detected as the shift in *m/z* value distributions.

Hagedorn, NPH)¹ and a lispro preparation containing protamine (neutral protamine lispro, NPL) belong to the intermediate-acting group.

Evaluation of oligomeric states of formulated insulin analogs is important to support their appropriate use. Previously, the oligomeric states of insulin analogs were determined by sedimentation velocity or static light scattering or were estimated by comparing their circular dichroism spectra under different conditions [15]. However, the oligomeric stability of these formulated insulin analogs have not been investigated because of the absence of convenient methods. Therefore, there is an increasing need for an easy, rapid, and accurate method to evaluate stability of the association state of insulin.

Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX/MS) is a known method to analyze structural fluctuations of proteins [16–18]. HDX/MS is based on the exchange reaction between hydrogens in proteins and deuteriums in the D₂O solvent. A protein sample is incubated in a D₂O solvent to incorporate deuteriums, and then the sample solution is mixed with an acidic reagent to suppress the HDX reaction. The number of incorporated deuteriums is calculated from the difference in the average mass obtained by liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) before and after the HDX reaction (Fig. 3). Deuteriums that were exchanged with amide hydrogens in the protein backbone are primarily detected by HDX/MS because hydrogens in protein side chain groups (e.g., –OH, –NH₂, –SH, –COOH, –CONH₂) have lower pK_a values, have higher exchange rates even after the addition of H⁺, and undergo a back-exchange reaction to lose deuteriums [19]. The exchange rate of each amide hydrogen depends on its interaction with the solvent [20–22]. A moiety with more structural fluctuations, which is not involved in an α-helix or a β-sheet, not packed in the hydrophobic core, and not trapped in other interactions, has more solvent accessibility. Thus, a moiety or molecule that interacts with the solvent further (e.g., a monomer vs. an oligomer) will gain more exchanged deuteriums [23].

¹ Abbreviations used: NPH, neutral protamine Hagedorn; NPL, neutral protamine lispro; HDX/MS, hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry; LC/MS, liquid chromatography mass spectrometry; HPLC, high-performance liquid chromatography; PCA, principal component analysis; DSL, dynamic light scattering.

HDX/MS can potentially be applied to estimate the stability of insulin oligomers.

In this study, we compared the HDX reactivity of insulin analog formulations with different oligomeric stability and different drug dispositions. We found correlations between their HDX kinetic parameters and their pharmacokinetic parameters. Here we demonstrate the usefulness of HDX/MS to evaluate oligomeric stability of insulin analog products and propose its potential use for predicting their onset and duration of action.

Materials and methods

Materials

Human insulin (Humulin R), insulin lispro (Humalog), NPH insulin (Humulin N), and NPL (Humalog N) were purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA). Insulin glargine (Lantus) and insulin glulisine (Apidra) were purchased from Sanofi–Aventis (Paris, France). Insulin detemir (Levemir Penfill) was purchased from Novo Nordisk (Bagsværd, Denmark). All compounds were provided at a concentration of 100 U/ml, approximately 3.5 mg/ml (0.61 mM). Ammonium acetate and formic acid were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Acetonitrile and D₂O were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

HDX/MS

Protein solutions were diluted 10-fold with 10 mM ammonium acetate in 90% D₂O (pH 7.4) and kept on ice during the HDX reaction because conducting the reaction at room temperature resulted in a very high exchange rate that made it difficult to successfully observe a time-dependent change. Final concentrations of insulin analogs were approximately 60 nM (0.35 mg/ml). At each time point, 50 µl of the reaction solution was mixed with an equal volume of ice-chilled formic acid/acetonitrile/water (1:49:50) to repress the exchange reaction; this step is called "quenching." Deuterated proteins were introduced into the mass spectrometer with the Paradigm MS4 HPLC (high-performance liquid chromatography) system (Michrom BioResources, Auburn, CA, USA) through

Table 2
Hydrodynamic diameters of insulin analogs in 10 mM ammonium acetate (pH 7.4).

	Concentration (µM)			
	15	30	60	120
Insulin	4.7 ± 0.1	5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Lispro	3.2 ± 0.4	3.6 ± 0.6	4.4 ± 0.2	4.6 ± 0.1
Glulisine	3.3 ± 0.6	3.7 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.3
Glargine	609.1 ± 42.8	284.2 ± 8.2	274.0 ± 28.0	4.9 ± 0.1
Detemir	13.2 ± 0.1	11.0 ± 2.9	6.2 ± 0.0	5.4 ± 0.1
Insulin/H ⁺			2.6 ± 1.0	

Note. Values are mean diameters (nm) ± standard deviations (n = 3).

Table 3
Relative volume in neutral buffer compared with that of human insulin in acidic solution.

	Concentration (µM)			
	15	30	60	120
Insulin	5.9	7.6	6.2	5.8
Lispro	1.9	2.8	5.1	5.5
Glulisine	2.1	2.9	5.4	5.3
Glargine	1.3 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁶	6.8
Detemir	131.6	77.2	14.0	9.2

Note. Relative volume (to insulin/H⁺) was calculated as (mean diameter of each analog at each concentration)³/(mean diameter of insulin/H⁺)³.

Table 4
HDX kinetics of insulin analogs.

	Number of exchangeable hydrogens				
	Maximum (D _∞)	(D ₀)	Slow (D _s)	Medium (D _i)	Fast (D _f)
Insulin	20.3	(11.9)	3.9	1.5	3.0
Lispro	24.5	(12.2)	7.3	2.6	2.5
Glulisine	24.7	(12.1)	7.2	2.6	2.8
Glargine	18.0	(10.1)	2.0	1.8	4.2
Detemir	19.9	(12.7)	3.3	1.6	2.5
NPH	16.4	(9.9)	1.0	1.8	3.6
NPL	16.9	(11.8)	1.3	2.0	1.8

Note. Shown are numbers of maximum exchangeable hydrogens and slow-exchanging ($k \leq 0.1 \text{ min}^{-1}$), intermediate-exchanging ($0.1 < k \leq 1$), or fast-exchanging ($k > 1.0$) hydrogens that were calculated on the basis of Eq. (1). D_i values of when $t = 0$ are in parentheses.

an L-column Micro trap column with C18 solid phase (Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan) at a flow rate of 50 µl/min over 10 min with 0.1% formic acid in 50% acetonitrile. Mass spectra were recorded using a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source (AMR, Tokyo, Japan). The conditions for MS analysis were as follows: an electrospray voltage of 2.5 kV in positive ion mode, a capillary temperature of 200 °C, and an *m/z* range of 1000 to 4000. The number of incorporated deuteriums was determined by subtraction of the weight-average molecular weights.

Calculation of kinetic parameters

The modeling and calculation of deuterium incorporation were done using Mathcad 14.0 software (PTC, Needham, MA, USA). Details of fitting with Eq. (1) are described in Results.

Size distribution measurements

Hydrodynamic diameter distributions were determined with the dynamic light scattering method by Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Insulin analog products were diluted with 10 mM ammonium acetate (pH 7.4) to 15, 30, 60, and 120 µM. Acidic solution of insulin for the control was prepared with Humulin R and a 9-fold volume of 0.1% formic acid, which had a final pH of 2.7 at 25.7 °C. Overnight equilibration was performed at 4 °C prior to measurements. The relative volume given in Table 3 was calculated as the cube of the ratio of the mean diameter to that of insulin/H⁺.

Multivariate analysis

Principal component analysis (PCA) was performed using SIM-CA-P⁺ software (Umetrics, Umeå, Sweden) with the PCA method. As the variables, the numbers of maximum exchangeable hydrogens (D_∞), and slow- and intermediate-exchanging hydrogens (D_s and D_i, respectively) (Table 4) were input. Before input, the variables were divided by the number of amide hydrogens in the main chains of each analog.

Results

Hydrodynamic diameter distributions of insulin analog products

To confirm the oligomeric states of insulin analogs used in this study, the particle size of four analogs (lispro, glulisine, glargine, and detemir) were measured by dynamic light scattering (DLS) after dilution of these analogs with an H₂O solvent of the same

composition as HDX solvent (Tables 2 and 3). As a control, an acidic solution of 60 μM human insulin (insulin/ H^+), in which insulin exists mainly as a mixture of monomers and dimers, was prepared [24]. At a high concentration (120 μM), the mean diameters of the four analogs obtained by DLS were similar to that of human insulin. In addition, their volumes calculated from the mean diameters were 6-fold larger than that of insulin/ H^+ (Table 3), suggesting that they could exist as hexamers at a high concentration.

At lower concentrations (15 and 30 μM), the mean diameters of the two rapid-acting analogs, lispro and glulisine, were smaller than the diameters at higher concentrations, although the diameter of human insulin remained roughly constant at all concentrations. These data indicate that the rapid-acting analogs dissociate more rapidly than human insulin. Glargine, with an isoelectric point of 6.7, showed an increase in diameter with a decrease in concentration by dilution with a neutral solvent, indicating the aggregation of glargine molecules. At lower concentrations (15 μM), detemir formed large particles approximately 130 times larger than insulin/ H^+ , possibly suggesting the association of detemir molecules at lower concentrations. These results are consistent with the prevailing oligomeric stability of insulin analogs except for detemir.

HDX/MS of human insulin and insulin analogs

First, to determine deuterium incorporation by human insulin as the standard, human insulin was subjected to the HDX reaction and LC/MS as described in Materials and Methods. To conduct exchange reaction under physiological pH conditions, we selected

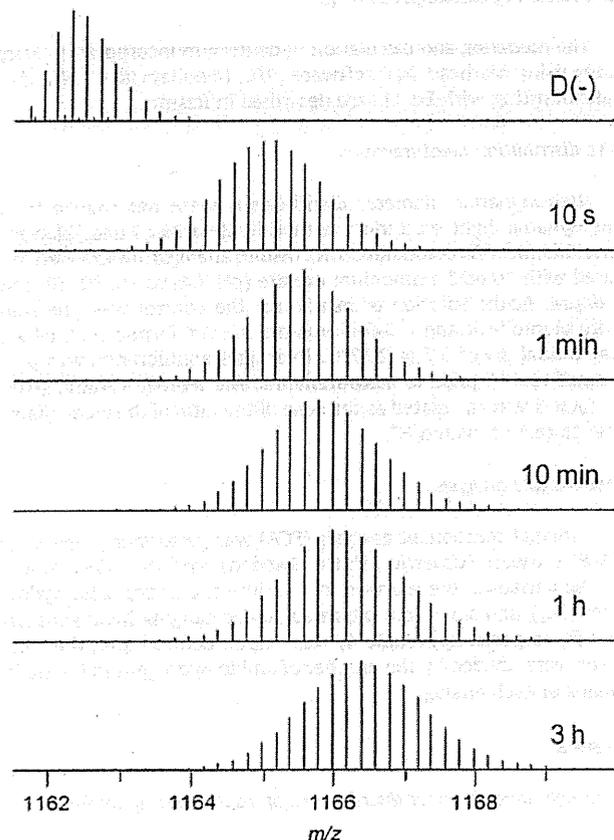


Fig. 4. Representative mass spectra of human insulin observed during the HDX procedure. The original spectrum of human insulin without deuterium label [D(-)] and spectra obtained at several time points of HDX reaction are shown.

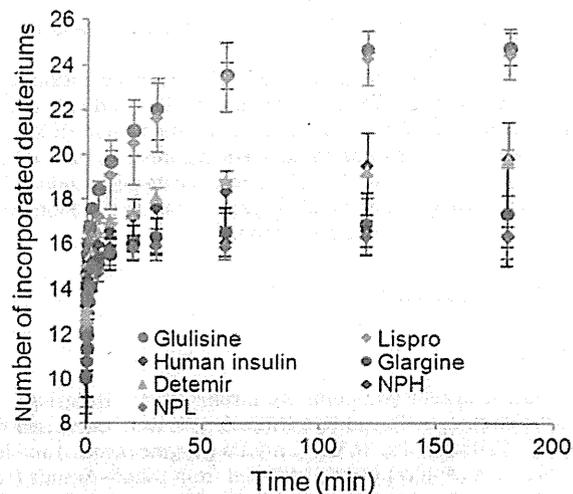


Fig. 5. Time-series plot of deuterium uptake by insulin analog products.

ammonium acetate buffer, one of the better buffers to mimic *in vivo* pH condition, considering applicability to the mass spectrometer. The time-dependent shift of the mass spectra and the number of incorporated deuteriums by human insulin are shown in Figs. 4 and 5 (red rhombus). The uptake was fast during the first 5 min, and approximately 80% of the incorporation was complete within the first minute. After 3 h of the HDX reaction, the number of incorporated deuteriums was 19.82 ± 1.64 (mean \pm standard deviation, $n = 4$).

Next, to determine whether the HDX reactivity of rapid-, long-, or intermediate-acting insulin analogs differed from that of human insulin, six analog products were examined (Fig. 5). Lispro and glulisine exhibited higher exchange reactivity than human insulin (24.48 ± 1.10 and 24.74 ± 0.70 , respectively, after a 3 h reaction, $n = 3$), but glargine showed lower exchange reactivity than human insulin (17.57 ± 0.42 after 3 h, $n = 3$), indicating its enhanced oligomeric stability. Similarly, two formulations of the intermediate-acting group, NPH and NPL, also had lower reactivity (16.32 ± 0.43 and 16.39 ± 1.03 , respectively, after 3 h, $n = 3$). Unlike the other analogs, detemir had a similar number of incorporated deuteriums as human insulin (19.84 ± 0.40 after 3 h, $n = 3$).

Kinetics of HDX reactivity of insulin analogs

To obtain further information on the oligomeric stability of insulin analogs, we investigated the kinetics of HDX reactions of human insulin and the insulin analogs. In general, HDX reactions of proteins can be modeled as a pseudo-first-order reaction [21], and exchangeable amide hydrogens are classified into three kinetic groups: fast-, intermediate-, and slow-exchanging hydrogens [25]. On these bases, we calculated the kinetics using Eq. (1), a tetranomial function of reaction time (t) defined by reaction rate constants of each hydrogen group (k_f , k_i , and k_s), denoting the maximum number of exchangeable hydrogen atoms by D_∞ , and the number of hydrogens of each kinetic group by D_f , D_i , and D_s . The latter three terms represent the hydrogens that have not been exchanged after a t -min reaction. We employed the tetranomial model because it gave higher values of Pearson correlation coefficients than modeling with three or five terms:

$$D_t = D_\infty - D_f \exp(-k_f t) - D_i \exp(-k_i t) - D_s \exp(-k_s t). \quad (1)$$

The sets of coefficients (D_f , D_i , D_s , and D_∞) and reaction rate constants (k_f , k_i , and k_s) that gave the highest Pearson correlation coefficients were sought by fitting the mean number of incorporated

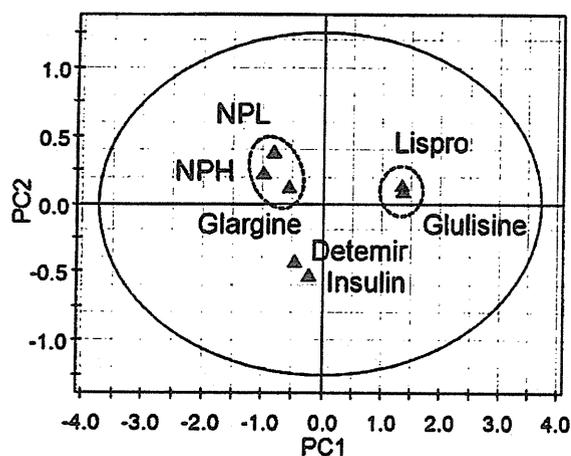


Fig. 6. The score plot for the PCA of the HDX kinetic parameters. Primary (PC1) and secondary (PC2) principal components are indicated.

deuteriums at every observed time point to Eq. (1). The resulting values for D_f , D_i , D_s , and D_∞ are shown in Table 4. The fast-acting group had the highest D_∞ , followed by the human insulin, long-acting, and intermediate-acting groups. Interestingly, the number of hydrogens that were already exchanged at the beginning of the HDX reaction (D_f when $t=0$) was not different among the respective groups, suggesting that differences in D_∞ originated from hydrogens that had lower exchange reaction rates and, therefore, were not exchanged during the first few seconds. Furthermore, D_s of the rapid-acting analogs were increased compared with those of the other groups. From these results, the number of D_s could be related to the difference in the overall HDX reactivity among insulin analogs.

PCA using HDX kinetic parameters of insulin analogs

We examined whether rapid-, long-, and intermediate-acting groups were distinguished by PCA using the HDX kinetic parameters, D_∞ , D_f , D_i , and D_s . The score plots for PC1 and PC2 are shown in Fig. 6. Lispro and glulisine were plotted at neighboring positions, distant from human insulin and other analogs. In addition, three preparations with a lower tendency for dissociation (i.e., glargine, NPH, and NPL) were plotted closely together. However, detemir was plotted near human insulin, not near analogs of the long-acting group. This result demonstrates that the insulin analogs with different pharmaceutical properties are distinguished by their HDX reactivity.

Pharmacokinetic parameters and HDX kinetics of insulin analogs

We analyzed the association between the HDX kinetic parameters and the actual pharmacokinetic parameters in humans. We compared previously reported values [11,26–32] of the maximum plasma concentrations (C_{max}) and the maximum drug concentration time (t_{max}) after subcutaneous injection with our kinetic parameters, D_∞ , D_s , D_i , and D_f (Table 5). Detemir, employing the affinity to albumin instead of the oligomeric stability for its longer action, was excluded. C_{max} had linear correlations with D_∞ and D_s ($r=0.88$ and $r=0.89$, respectively) (Fig. 7A). In addition, t_{max} correlated with reciprocals of D_∞ and D_s ($r=0.86$ and $r=0.96$, respectively) (Fig. 7B).

Table 5
Reported values of C_{max} and t_{max} .

Analog	C_{max} ($\mu\text{U/ml}$)	t_{max} (min)	Reference
Insulin	43.3	109	[26]
	35.8	97.5	[27]
	40.0	104	[28]
	46.0	92	[28]
	46.0	82	[29]
Lispro	51.1	101	[11]
	147.2	71	[30]
	81.0	71	[28]
	91.4	53	[11]
	73.0	57	[28]
Glulisine	92.0	83	[28]
	82.0	55	[29]
	18.9	180	[31]
Glargine	13.5		[32]
	20.0		[32]
	22.8	360	[31]
	21.3	200	[30]

Note. Shown are reported values of C_{max} and t_{max} in studies about insulin analog products [11,26–32]. Glargine's t_{max} was deduced from the time-concentration plot in Ref. [31].

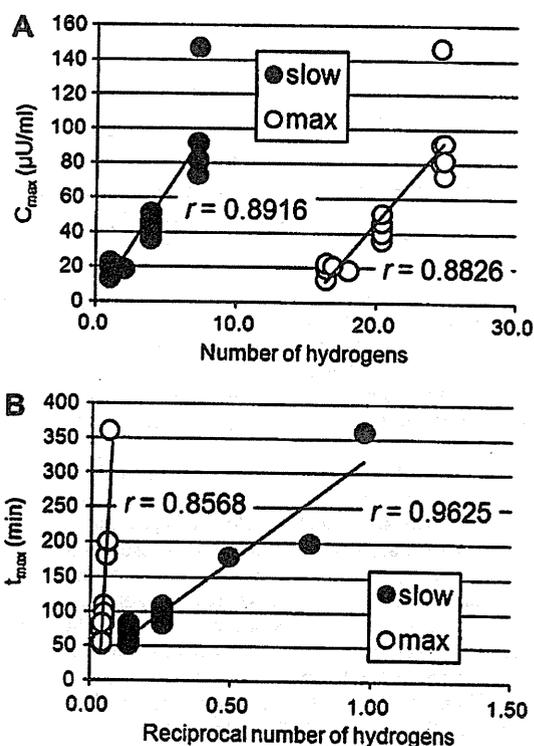


Fig. 7. Relations between HDX kinetic parameters and C_{max} (A) or t_{max} (B) values.

Discussion

Since insulin lispro was first sold in 1995 as an analog of recombinant human insulin, many insulin analog products have been marketed. Oligomeric stability of formulated analogs is important for controlling their onset and duration of action. In this study, we analyzed the oligomeric stability of formulated insulin analogs by HDX/MS, which is an analytical method to determine structural fluctuations of proteins, and we investigated relationships between the parameters of HDX kinetics and pharmacokinetics of the analogs.

We first measured the diameters of the formulated insulin analogs under the same conditions as the HDX reaction. The diameters of two rapid-acting analogs (lispro and glulisine), which have low oligomeric stability, were smaller than that of human insulin at low concentrations, although glargine, a long-acting analog, formed large aggregates with an increase in pH by neutralization (Fig. 4). These results are consistent with previous studies and provide evidence that rapid-acting analogs dissociate more easily than human insulin and glargine forms aggregates at physiological pH. Detemir, another long-acting analog, exhibited unique behavior. It did not form huge aggregates like glargine, but it had larger diameters with dilution; its mean diameters were 2- or 3-fold larger than those of human insulin. This would have resulted from the suggested complex of detemir hexamers mediated by their acyl chains [33,34].

Next, we determined the HDX reactivity of human insulin and insulin analogs of rapid-, long-, and intermediate-acting groups (Fig. 5). Lispro and glulisine incorporated more deuteriums than human insulin. On the other hand, glargine and two products of the intermediate-acting group (NPH and NPL) incorporated fewer deuteriums than human insulin. These results demonstrate that HDX reactivity of insulin analogs at neutral pH were associated with their oligomeric stability. Interestingly, detemir, in spite of its prolonged action, had exchange reactivity similar to that of human insulin. Considering the mechanism in which detemir hexamers associate, there could be little effect on the solvent accessibility of peptide moieties of detemir molecules even when their hexamers form a larger complex.

The PCA using kinetic parameters of the HDX reactions resulted in a distinction among the three groups (Fig. 6). Two analogs of the rapid-acting group, one long-acting preparation, and two intermediate-acting preparations were plotted at close positions. However, detemir was plotted far from the other analogs of long- and intermediate-acting groups and was closer to human insulin. This result was in agreement with the time-dependent incorporation of deuteriums (Fig. 4). We suggest that only four kinetic parameters (D_{∞} , D_f , D_i , and D_s) obtained by HDX/MS allow for discrimination of insulin analogs of different groups. In addition, PCA using the kinetic parameters could also be applicable to evaluate similarities in similar biological medicinal products of insulin analogs under development.

We analyzed the association between the HDX kinetic parameters and the actual pharmacokinetic parameters in humans. We compared previously reported values of C_{\max} and t_{\max} (Table 5) with our kinetic parameters (Table 4). This resulted in the correlations with D_{∞} and D_s shown in Fig. 7. These results suggest that D_{∞} and D_s could be useful as characteristic markers for prediction of C_{\max} and t_{\max} . In a previous study on HDX with human insulin and lispro reported by Chitta and coworkers [25], D_{∞} values were nearly equal to the total number ($D_f + D_i + D_s$) of amide deuteriums in the peptide backbone. However, in our study, the total number of D_f , D_i , and D_s was from 30% to 51% of D_{∞} , indicating that there could be some deuteriums left in side chains. Differences from the previous study could be caused by the difference in the temperature at which the HDX reaction was performed. In other words, continuous cooling through the entire procedure of HDX to moderate the exchange reaction in our study could account for the differences. Chitta and coworkers also reported a difference in D_i between human insulin and lispro [25], whereas in our study the only difference was observed in the D_s numbers. On ice, incubation could have switched some of the fast hydrogens to intermediate hydrogens and switched some of the intermediate hydrogens to slow hydrogens.

The concentration of insulin is a significant factor that affects the association and dissociation of insulin oligomer [24] and, thus, also affects the HDX reactivity [25]. When comparing the oligomeric

stability of insulin preparations by HDX/MS, one should be careful about sample concentration because the difference in HDX reactivity could attenuate if insulin concentration were too high to dissociate (or too low to form even dimer).

Finally, we demonstrated the utility and capability of the HDX/MS method for evaluating the oligomeric stability of insulin analog products. We also revealed relationships between some HDX kinetic parameters and pharmacokinetic parameters. We believe that our current method could be helpful in predicting the pharmacokinetics of insulin analogs.

Acknowledgment

This study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labour, and Welfare (Japan).

References

- [1] J. Brange, D.R. Owens, S. Kang, A. Volund, Monomeric insulins and their experimental and clinical applications, *Diabetes Care* 13 (1990) 923–954.
- [2] M.R. DeFelippis, R.E. Chance, B.H. Frank, Insulin self-association and the relationship to pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 18 (2001) 201–264.
- [3] J. Brange, A. Volund, Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 307–335.
- [4] J.A. Mayfield, R.D. White, Insulin therapy for type 2 diabetes: rescue, augmentation, and replacement of beta-cell function, *Am. Fam. Physician* 70 (2004) 489–500.
- [5] S.N. Charugulla, T.S. Kamat, K. Peetambaran, V.M. Thorat, Insulin analogues: an update, *Res. J. Krishna Inst. Karad* 2 (2009) 6–12.
- [6] NIH Daily Med, HUMULIN (insulin human) injection, solution (Eli Lilly and Company), 2011. Available from: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/druginfo.cfm?id=43212>>.
- [7] C. Binder, A theoretical model for the absorption of soluble insulin, in: P. Brunetti (Ed.), *Artificial Systems for Insulin Delivery*, Raven, New York, 1983, pp. 53–57.
- [8] C.J. Dunn, G.L. Plosker, G.M. Keating, K. McKeage, L.J. Scott, Insulin glargine: an updated review of its use in the management of diabetes mellitus, *Drugs* 63 (2003) 1743–1778.
- [9] O. Wintersteiner, H.A. Abramson, The isoelectric point of insulin, *J. Biol. Chem.* 99 (1993) 741–753.
- [10] T. Blundell, G. Dodson, D. Hodgkin, D. Mercola, Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology, *Adv. Protein Chem.* 26 (1972) 279–402.
- [11] Eli Lilly Canada, Humalog product monograph, 2011. Available from: <<http://www.lilly.ca/servlets/sfs?sessionid=26068A9C8C69DD8DCFB024A9D13FB97t=/documentManager/sfdoc.file.supply&e=UTF-8&i=1233164768976&l=0&s=254REX2uNLETASc&fileID=1299285990234>>.
- [12] European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use, *Apidra: European Public Assessment Report—Scientific Discussion*, 2011. Available from: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000557/human_med_000648.jsp&url=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d125#>.
- [13] G.B. Bolli, D.R. Owens, Insulin glargine, *Lancet* 356 (2000) 443–445.
- [14] U. Dashora, V. Dashora, Insulin glargine, *Int. J. Diabetes Dev. Countries* 20 (2000) 140–144.
- [15] D.L. Bakaysa, J. Radziuk, H.A. Havel, M.L. Brader, S. Li, S.W. Dodd, J.M. Beals, A.H. Pekar, D.N. Brems, Physicochemical basis for the rapid time-action of Lys²⁸Pro²⁹-insulin: dissociation of a protein–ligand complex, *Protein Sci.* 5 (1996) 2521–2531.
- [16] A. Hvidt, K. Linderstrøm-Lang, Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions, *Biochim. Biophys. Acta* 14 (1954) 574–575.
- [17] S.W. Englander, L. Mayne, Y. Bai, T.R. Sosnick, Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrøm-Lang, *Protein Sci.* 6 (1997) 1101–1109.
- [18] Y. Hamuro, S.J. Coales, M.R. Southern, J.F. Nemeth-Cawley, D.D. Stranz, P.R. Griffin, Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *J. Biomol. Tech.* 14 (2003) 171–182.
- [19] X. Yan, J. Watson, P.S. Ho, M.L. Deinzer, Mass spectrometric approaches using electrospray ionization charge states and hydrogen–deuterium exchange for determining protein structures and their conformational changes, *Mol. Cell. Proteomics* 3 (2003) 10–23.
- [20] S.W. Englander, D.B. Calhoun, J.J. Englander, N.R. Kallenbach, R.K. Liem, E.L. Malin, C. Mandal, J.R. Rogero, Individual breathing reactions measured in hemoglobin by hydrogen exchange methods, *Biophys. J.* 32 (1980) 577–589.
- [21] Z.Q. Zhang, D.L. Smith, Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, *Protein Sci.* 2 (1993) 522–531.
- [22] J.R. Engen, D.L. Smith, Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange MS, *Anal. Chem.* 73 (2001) 256A–265A.

- [23] H. Maity, W.K. Lim, J.N. Rumbley, S.W. Englander, Protein hydrogen exchange mechanism: local fluctuations, *Protein Sci.* 12 (2003) 153–160.
- [24] E.J. Nettleton, P. Tito, M. Sunde, M. Bouchard, C.M. Dobson, C.V. Robinson, Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry, *Biophys. J.* 79 (2000) 1053–1065.
- [25] R.K. Chitta, D.L. Rempel, M.A. Grayson, E.E. Remsen, M.L. Gross, Application of SIMSTEX to oligomerization of insulin analogs and mutants, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 1526–1534.
- [26] S.R. Mudaliar, F.A. Lindberg, M. Joyce, P. Beersden, P. Strange, A. Lin, R.R. Henry, Insulin aspart (B28 asp-insulin): a fast-acting analog of human insulin—absorption kinetics and action profile compared with regular human insulin in healthy nondiabetic subjects, *Diabetes Care* 22 (1999) 1501–1506.
- [27] A. Lindholm, J. McEwen, A.P. Riis, Improved postprandial glycemic control with insulin aspart: a randomized double-blind cross-over trial in type 1 diabetes, *Diabetes Care* 22 (1999) 801–805.
- [28] R.H. Becker, A.D. Frick, Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin glulisine, *Clin. Pharmacokinet.* 47 (2008) 7–20.
- [29] European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use, Apidra: European Public Assessment Report—Product Information. 2011. Available from: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000557/WC500025250.pdf>.
- [30] T. Heise, C. Weyer, A. Serwas, S. Heinrichs, J. Osinga, P. Roach, J. Woodworth, U. Gudat, L. Heinemann, Time-action profiles of novel premixed preparations of insulin lispro and NPL insulin, *Diabetes Care* 21 (1998) 800–803.
- [31] M. Lepore, S. Pampanelli, C. Fanelli, F. Porcellati, L. Bartocci, A.D. Vincenzo, C. Cordoni, E. Costa, P. Brunetti, G.B. Bolli, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous injection of long-acting human insulin analog glargine, NPH insulin, and ultralente human insulin and continuous subcutaneous infusion of insulin lispro, *Diabetes* 49 (2000) 2142–2148.
- [32] G.A. Brunner, G. Sendhofer, A. Wutte, M. Ellmerer, B. Søgaard, A. Siebenhofer, S. Hirschberger, G.J. Krejs, T.R. Pieber, Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of long-acting insulin analogue NN304 in comparison to NPH insulin in humans, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108 (2000) 100–105.
- [33] J.L. Whittingham, S. Havelund, I. Jonassen, Crystal structure of a prolonged-acting insulin with albumin-binding properties, *Biochemistry* 36 (1997) 2826–2831.
- [34] S. Havelund, A. Plum, U. Ribel, I. Jonassen, A. Vølund, J. Markussen, P. Kurtzhals, The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1498–1504.



【新連載】 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

Current state in analysis of physicochemical properties of biopharmaceuticals

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ

NORITAKA HASHII, AKIRA HARAZONO, NANA KAWASAKI

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

はじめに

バイオ医薬品は、糖尿病、肝炎、およびある種の血液関連疾患やがん治療などにおける標準的治療薬となっており、医療上の重要性は増す一方である。また、標準的治療法のない疾患への新たな治療法の提供、患者のQOLの向上、および医薬品産業の活性化を目標として、さらなる新規なバイオ医薬品の開発が進んでいる。新規なバイオ医薬品の早期実用化には、品質・安全性確保のための評価科学の進展が不可欠である。本シリーズでは、バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する現状を、物理的・化学的性質解析、生物学的性質解析・免疫化学的性質解析、不純物解析、外来性感染性物質安全性評価、製造工程評価、規格及び試験方法、免疫原性評価、および安定性評価等に分けて紹介する。

第1回は、バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析のための最新技術を、分析例を紹介しながら概説する。

1. 物理的・化学的性質解析

バイオ医薬品の有効性・安全性を確保するために、品質、すなわち、特性、製造方法、規格及び試験方法、安定性の評価は不可欠である。中でも特性は、製造工程開発/管理手法の開発や規格及び試験方法の設定の根拠となるものであり、開発段階では可能な限り広範囲かつ詳細に解析しなければならない。バイオ医薬品開発において明らかにすることが求められる特性は、構造・組成、物理的・化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質、および不純物などである。構造・組成と物理的・化学的性質を明確に区別することは難しいが、「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について(平成13年5月1日、医薬審発第571号厚生労働省医薬局審査管理課長通知)」では、解析すべき構造・組成として一次構造や糖鎖などの構造が、物理的・化学的性質については、分子量・分子サイズ、

表1 物理的・化学的性質解析の項目および主な分析法

特性解析	項目	主な分析法		
物理的 化学的性質	分子量・分子サイズ	MS, HPLC, 超速心分析法, SDS-PAGE		
	不均一性	目的物質	グリコフォーム	IEF, CE, HPLC, MS
		分子変化体	意図的修飾	HPLC, CE, LC/MS, LC/MS/MS
			ジスルフィド結合 ミスマッチ体	LC/MS, LC/MS/MS, HPLC, SDS-PAGE
			酸化体	LC/MS, LC/MS/MS
	脱アミド体および アスパラギン酸の異性体	HPLC, IEF, LC/MS, LC/MS/MS		
	高次構造解析	分光学的性質	NMR, X線結晶構造解析法, CD, FTIR	
構造安定性		DSC		

MS, 質量分析法; HPLC, 高速液体クロマトグラフィー法; SDS-PAGE, ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法; IEF, 等電点電気泳動法; CE, キャピラリー電気泳動法; LC/MS, 液体クロマトグラフィー/質量分析法; LC/MS/MS, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法; NMR, 核磁気共鳴法; CD, 円偏光二色性測定法; FTIR, フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法; DSC, 示差走査熱量測定法

不均一性を示す性質として高速液体クロマトグラフィー(HPLC)パターン、アイソフォームパターンおよび電気泳動パターン、ならびに高次構造等を示す性質として分光学的性質等が記されている(表1)。一次構造や糖鎖などの解析手法はほぼ確立されているといえるかもしれないが、物理的・化学的性質を解析するための新たな手法の開発は課題である。

2. 分子量・分子サイズ

分子量、分子サイズを解析する方法として、超速心分析法、サイズ排除クロマトグラフィー法、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法などが用いられてきた。現在では、質量分析(MS)法により、質量を測定することが多い。MSによりペプチドおよびタンパク質医薬品の質量を測定するとき留意すべき点は、第十六改正日本薬局方参考情報¹⁾にまとめられている。

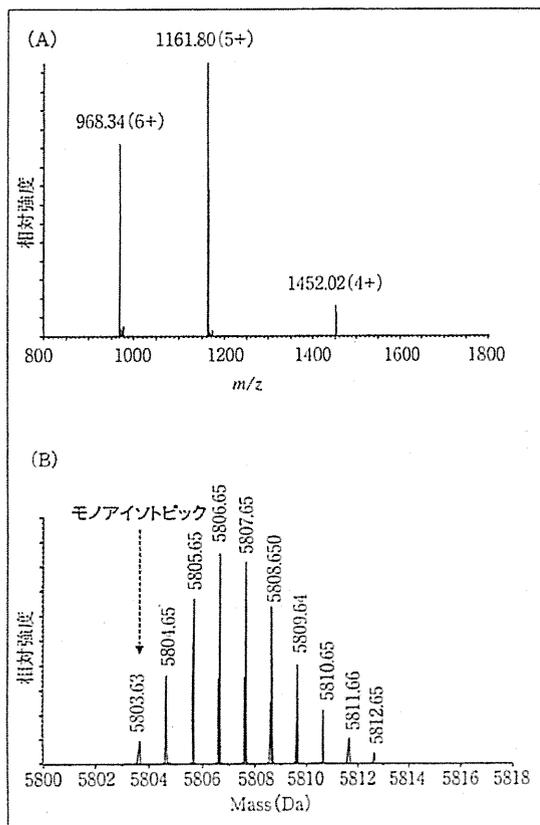


図1 ESI-MSによるヒトインスリンの質量測定
(A)マスマスペクトル、(B)デコンボリューションマスマスペクトル
MS装置、Qstar elite(Applied Biosystems)、 m/z 範囲、800~2,000

図1(A)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)-MSにより得られたヒトインスリンのマスマスペクトルである。ヒトインスリンは4~6価のイオンとして検出されている。図1(B)は、(A)のデコンボリューションマスマスペクトルであり、モノアイソトピックピークから質量(5803.6Da)を求めることができる。このようにMSは、従来の方法よりも、分子量に近い値を求めることができる。

3. 不均一性

バイオ医薬品は、細胞等の生合成過程を生産に利用しているため、分子構造上、不均一な分子種の集合体として産生される。これらの中で、DNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列を有し、かつ適切な翻訳後修飾を持つ分子種は「目的物質」とよばれる。目的物質であっても、不均一性をもつことがある。その代表例に、糖鎖の構造や結合位置の違いにより生じるグリコフォームがある。特性解析においては、糖鎖構造と活性等の関係を考慮しながら、適切な手法を用いてグリコフォームパターンを確認する必要がある。例えば、シアル酸結合医薬品の特性解析では、シアル酸結合数がタンパク質の血中半減期に影響することがあるので、シアル酸結合数に由来する不均一性プロファイル測定し、薬理プロファイルとの相関性を調べるのが望ましい。不均一性プロファイルを得る方法として、MS、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、および陰イオン交換クロマトグラフィー法などがある。

図2に、ESI-MSによって、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞産生ヒトエリスロポエチン(EPO)のグリコフォームを解析した例を示す。EPOは165個のアミノ酸からなる糖タンパク質であり、3カ所のN結合型糖鎖結合部位(Asn24, 38および83)と1カ所のO結合型糖鎖結合部位(Ser126)を有する。結合糖鎖の大部分はシアル酸付加糖鎖であり、そのシアル酸付加糖鎖の分布が活性に影響することが知られている²⁾。図2(A)はマスマスペクトルで、EPOは10~16価のイオンとして検出されている。図2(B)はデコンボリューションマスマスペクトルで、グリコフォームプロファイルと見なすことができるだろう。MSを用いたEPOのグリコフォーム解析より、①シアル酸付加数は11~14個であり、特に12および13個結合した分子種が多いこと、②アセチル化されたシアル

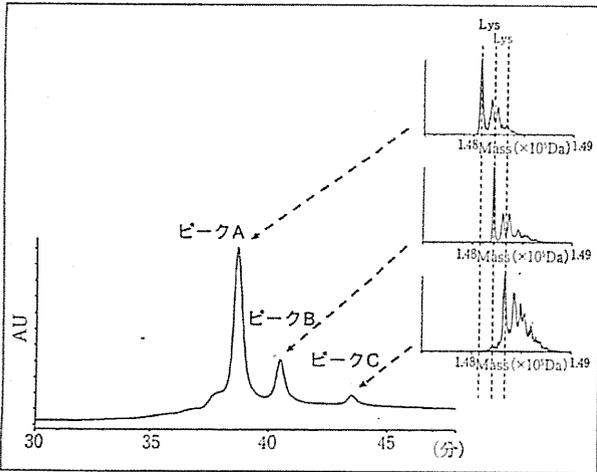


図3 CHO細胞産生ヒト抗体の不均一性解析
カラム, Agilent Bio MAb(0.1×50mm, 1.7mm); 流速, 0.8mL/分; UV, 280nm; A溶媒, 10mMリン酸ナトリウム水溶液(pH6.6); B溶媒, 500mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム水溶液(pH6.6); グラジエント条件, 5分間3%Bで流した後, 50分間かけて20%Bへ上昇させた。

性プロファイルを測定することが望ましい(目的物質由来不純物の解析手法については, 第3回で紹介する)。

分子変化体の解析例として, 弱酸性陽イオン交換クロマトグラフィーにより, CHO細胞産生ヒト抗体のH鎖のC末端リシン(Lys)残基の欠失に由来する不均一性を解析した例を示す(図3)。ここでは検出されたピークA~Cを分取した後, MSにより質量を確認することで, C末端Lys残基の個数を確認している(ピークA, Lys残基をもたない分子; ピークB, Lys残基を1分子もつ分子; ピークC, Lys残基を2分子もつ分子)。また, ピーク面積比から, C末端Lys残基結合数の異なる分子の分布を確認している(ピークA, 72%; ピークB, 20%; ピークC, 8%)。

4. 分光学的性質

分光学的性質は, 目的物質の高次構造情報を得るために解析される。主な分析法として, 核磁気共鳴法(NMR), X線結晶構造解析法, 円偏光二色性測定法(CD)およびフーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法(FTIR)などが用いられている。

NMRの測定法のうち, バイオ医薬品の高次構造解析に用いられる測定法は, 核オーバーハウザー効果(NOE)測定法であり, 水素結合の位置や原子間の空間的距離を明らかにすることができる⁵⁾。NMRは, 生体内

の環境に近い状態で試料を測定できる点で優れているが, 現在のNMR装置で測定可能なタンパク質は, 分子量3万程度とされている。一方, X線結晶構造解析法は, タンパク質の分子量に関係なく測定できることから高次構造解析に汎用されているが, 糖タンパク質の結晶化が難しいなどの技術的な課題や, 必ずしも生体内における高次構造を反映していない場合があることに留意する必要がある。タンパク質中の二次構造(α -ヘリックスや β -シート)の有無についてはCDやFTIRにより解析されることが多い。

5. 構造安定性

タンパク質の構造安定性を解析する手法として, 示差走査熱量計法(DSC)が知られている。DSCによりタンパク質の熱変性に伴う熱変化を測定することで, タンパク質の構造安定性を評価することができる。タンパク質の構造安定性は, 溶媒, pH, イオン強度および添加剤等により変化するので, バイオ医薬品の開発において, DSCは製剤処方最適化等に用いられることが多い。

バイオ医薬品の中には, サブユニットが会合し, 多量体を形成している品目も多いが, 多量体安定性を解析するための技術開発は発展途上である。そのため, 目的の多量体を形成しているか否か, その生物活性から推測されているのが現状である。多量体安定性が有効性・安全性に直接的に関係するバイオ医薬品の1つにインスリン製剤がある。遺伝子組換えヒトインスリン製剤は, 製剤中では主に六量体を形成しており, 投与後に皮下組織で拡散・希釈されることで, 六量体から二量体を経て単量体に解離し, 吸収された後に作用を発現する。多量体の安定性はインスリン単量体が血中に移行するまでの時間に影響を与えるものと考えられており, アミノ酸残基を置換して多量体安定性を変化させて作用発現時間や持続時間を調節した遺伝子組換えインスリンアナログ製剤が次々と開発されている。インスリンスペースリスプロ(リスプロ)は超速効型インスリンアナログであり, ヒトインスリンB鎖の28番目(B28)のProとB29のLys残基が置換されている。同じ超速効型に分類されるインスリングルリジン(グルリジン)は, B3のAsnおよびB29のLys残基がそれぞれLysおよびGlu残基に置換されている。これらの置換により多量体安定性が低下し単量体に解離

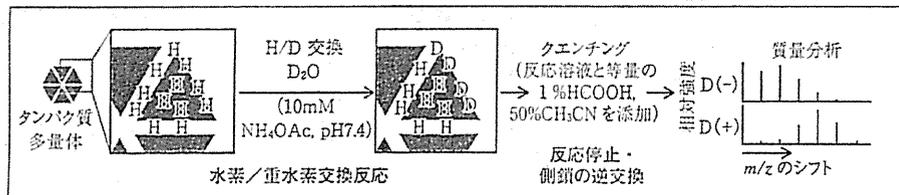


図4 HDX/MSによる多量体安定性解析の概要

重水中でタンパク質中の主鎖アミド水素原子(H)は、徐々に重水素(D)に置換される(HDX反応)。このとき、溶媒との接触の多い水素原子ほど速やかに置換される。交換された水素の数は質量の変化として質量分析計で検出される。交換反応性が特に高い官能基(-OH, -NH₂, -COOH, -SH, -CONH₂など)に取り込まれたDは、反応停止過程で加えられたH⁺により元に戻るため、最終的に検出されるのは主に主鎖のアミド基に取り込まれたDである。

しやすくなるため、超速効型インスリンアナログは速やかに作用を発現するとされている。持続型インスリンアナログであるインスリンスペースグラルギン(グラルギン)は、A21のAsnがGly残基に置換され、さらにB鎖のC末端に2分子のArg残基が付加されており、これらの置換によりグラルギンのpI(6.7)は他のインスリンアナログ(5~5.5)よりも高い。中性付近のpIをもつグラルギンは投与後、中性pHの皮下組織で析出するため六量体から単量体への解離が遅くなり、作用を持続すると考えられている。このように多量体安定性はインスリンアナログ製剤の有効性に影響を及ぼす重要な物理的・化学的性質の1つとなっており、簡便かつ迅速に多量体安定性の評価は重要である。

生体内のタンパク質は、柔軟性(揺らぎ)を保持した分子として存在しており、立体構造の揺らぎは多量体安定性に関係することが知られている。タンパク質の揺らぎ(動的構造)を解析する手法の1つとして、水素/重水素交換(HDX)反応とMSを組み合わせたHDX/MSがある^{6,7)}(図4)。重水中でタンパク質のアミド水素は徐々に重水素に交換される。交換された水素数は、反応溶液のpHを酸性(pH 2.5)に変えてHDX反応を停止した後、MSで分析することで質量変化数として確認することができる。一般に分子表面の溶媒と接触しやすいアミド水素ほど速く重水素に交換され、水素結合に関与する水素原子や分子内部に存在するアミド水素などの交換速度は遅いことから、HDX/MSにより多量体安定性の異なるインスリンアナログの揺らぎを比較できる。

図5は、超速効型、速効型、および持続型インスリンアナログ製剤のHDX/MSを行い、重水素交換数を時間に対してプロットした結果である⁸⁾。超速効型のリスプロおよびグルリジンはより多くの重水素を取り込み、持

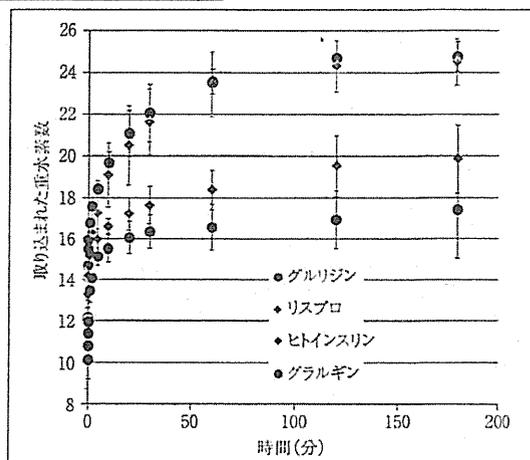


図5 インスリンアナログ製剤のHDX反応性

製剤原液を9倍容量の重水溶媒と混合して水上でHDX反応後、反応液と同容量の1%ギ酸/50%アセトニトリルで反応を停止させた。

トラップカラム, C18 trap; 溶媒, 0.1%ギ酸, 50%アセトニトリル; MS装置, LTQ-FT(Thermo Fisher Scientific); 流速, 50μL/分

研究開発・生産を支援する総合技術力 医薬品のCMC関連分析はTRCにお任せ下さい。

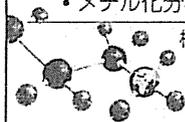
【申請資料の信頼性の基準(薬事法施行規則第43条)での
抗体医薬品, たんぱく質医薬品の特性解析】

1) たんぱく質部分

- アミノ酸組成分析
- 末端アミノ酸配列解析
-N末端(ブロッグN末端)及びC末端
- ペプチドマップの作成
- 全アミノ酸配列解析Technology & Trust
- ジスルフィド架橋位置の解析
- 分子量測定(質量分析, ゲルろ過, SDS-PAGE)
- CDスペクトルの測定

2) 糖部分

- 糖組成分析-中性糖, アミノ糖, シアル酸
- N-グリコシド型糖鎖の逆相, 陰イオン交換による糖鎖マップの作成
- 糖鎖マップ法によるN-グリコシド型糖鎖の構造解析
- N-及びO-グリコシド結合糖鎖の結合位置の解析
- メチル化分析, NMR測定



株式会社東レリサーチセンター・医薬営業部
http://www.toray-research.co.jp
〒103-0022 東京都中央区日本橋室町3-1-8
TEL:03-3245-5666 FAX:03-3245-5804

DM資料請求カードNo287

表2 HDXパラメータ

	水素交換数			
	D_{∞}	D_i	D_m	D_l
ヒトインスリン	20.3	3.9	1.5	3.0
リスプロ	24.5	7.3	2.6	2.5
グルリジン	24.7	7.2	2.6	2.8
グラルギン	18.0	2.0	1.8	4.2

フィッティングに使用した式 $D_t = D_{\infty} - D_i \exp(-k_i t) - D_m \exp(-k_m t) - D_l \exp(-k_l t)$ (D_i : 反応開始から t min後の交換数, t : 反応時間 (min), D_{∞} : 最大交換数, $D_l/D_m/D_s$: 各群由来の交換数, $k_l/k_m/k_s$: 各群の水素の反応速度定数 (min^{-1})). 各アナログの反応速度定数, $k_s \leq 0.1$, $0.1 < k_m \leq 1$, $k_l > 1$
 D_{∞} , 最大交換数; $D_l/D_m/D_s$, 交換速度が遅い/中間/速い水素数

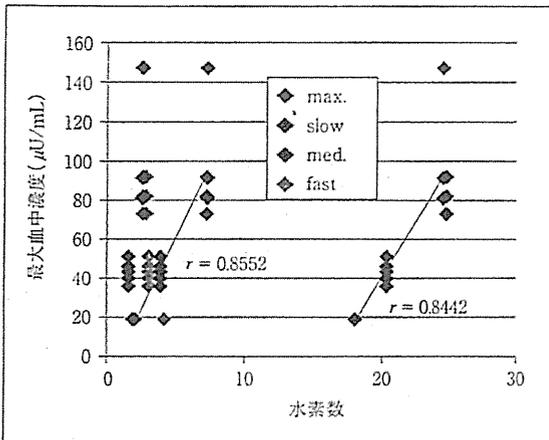


図6 HDXパラメータと最大血中濃度の相関性

Max., D_{∞} : slow/med./fast., $D_l/D_m/D_s$ (表2参照).
 最大血中濃度の値は, 以下の論文を参照した。
 Mudaliar *et al.* (1999) *Diabetes Care* 22 (9) : 1501-1506 ; Lindholm *et al.* (1999) *Diabetes Care* 22 (5) : 801-805; Becker *et al.* (2008) *Clin. Pharmacokinet.* 47 (1) : 7-20 ; EPAR "Product Information" (Apidra) ; Product Monograph (Humalog). Eli Lilly Canada; Heise *et al.* (1998) *Diabetes Care* 21 (5) : 800-803 ; Lepore *et al.* (2000) *Diabetes* 49 (12) : 2142-2148.

効型のグラルギンと中間型製剤の重水素取り込み数は少ない。インスリンアナログ製剤のHDX反応性から, 多量体安定性を確認することができる。また, HDX反応による重水素交換数の経時変化は, 擬一次反応速度式で表すこと(フィッティング)が可能であり, その式から重水素最大交換数や反応速度の異なる重水素数などのHDXパラメータを求めることができる(表2)。製剤間のHDXパラメータの比較から, HDX反応性の差には最大交換数 (D_{∞}) および交換速度の遅い水素数 (D_i) を反映していることがわかる。さらに, HDXパラメータは最大血中濃度と相関があることが示唆された(図6)。

おわりに

本稿では, バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状と最新技術について, 事例を紹介しながら概説した。近年, 生物活性, 血中安定性, 免疫原性および分子標的性の改善を目的とした改変・融合タンパク質, 糖鎖改変タンパク質, PEG化ペプチド・タンパク質, 細胞毒性が高い低分子化合物をカップリングさせた抗体医薬品など, 新しい分子構造をもつ医薬品が次々と開発されている。これらの医薬品には, 新規な構造および高度な不均一性をもち, ヒトでの薬理作用や安全性の予測が難しいものも少なくない。物理的・化学的性質解析は, ファーストインマン試験の安全性確保のためにも重要性が増していくものと予想される。

参考文献

- 厚生労働省: 第十六改正日本薬局方 (http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/3-24kokuji_index.htm).
- Yanagihara S, Taniguchi Y, Hosono M, Yoshioka E, Ishikawa R, Shimada Y, Kadoya T, Kutsukake K.: Measurement of sialic acid content is insufficient to assess bioactivity of recombinant human erythropoietin., *Biol Pharm Bull*, 33, 1596-1599 (2010)
- Maeda, E., Urakami, K., Shimura, K., Kinoshita, M. and Kakehi, K.: Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin, *J Chromatogr A*, 1217, 7164-7171 (2010)
- Moosmann, A., Christel, J., Boettinger, H. and Mueller, E.: Analytical and preparative separation of PEGylated lysozyme for the characterization of chromatography media, and *J Chromatogr A*, 1217, 209-215 (2010)
- Ohno, A., Kawasaki, N., Fukuhara, K., Okuda, H. and Yamaguchi, T.: Time-dependent changes of oxytocin using (1)H-NMR coupled with multivariate analysis: A new approach for quality evaluation of protein/peptide biologic drugs, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 57, 1396-1399 (2009)
- Hamuro, Y. *et al.*: Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *J Biomol Tech*, 14, 171-182 (2003)
- Chitta, R. K., Rempel, D. L., Grayson, M. A., Remsen, E. E. and Gross, M. L.: Application of SIMSTEX to oligomerization of insulin analogs and mutants, *J Am Soc Mass Spectrom*, 17, 1526-1534 (2006)
- Nakazawa, S., Hashii, N., Harazono, A. and Kawasaki, N.: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal Biochem*, 420 (1), 61-67 (2011)



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)

Evaluation of impurities in biopharmaceuticals part 1

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ

SHINGO NIIMI, AKIKO ISHII-WATABE, NANA KAWASAKI

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

はじめに

原薬や製剤に含まれる不純物は、製品の有効性・安全性に関わる重要品質特性の1つである。バイオ医薬品に含まれる不純物は、目的物質由来不純物と製造工程由来不純物に大別される。製法開発の際には、適切な分析技術を用いて原材料、工程中間体、原薬、あるいは製剤に含まれる不純物の種類と量を評価し、必要に応じて精製工程の不純物クリアランス能の評価を実施する必要がある。不純物の評価は、製造方法の確立や、製剤中に含まれる不純物の量が常に許容できるレベル以下になることを保証するための管理手法の構築に必須である。本稿では、目的物質由来不純物の分析と評価について概説する。なお、製造工程由来不純物については3月号、製造工程由来不純物としてのウイルス等外来性感染性物質については4月号で取り上げる。

1. 目的物質由来不純物の分析と評価

ICH Q6Bでは、目的物質由来不純物は、「目的物質の分子変化体(例えば、前駆体、製造中や保存中に生成される分解物・変化物)で、生物活性及び有効性の点で目的物質に匹敵する特性を持たないもの」と定義されている¹⁾。製造中や保存中に生成する目的物質の変化体であっても、生物活性があり、製品の安全性および有効性に悪影響を及ぼさず、目的物質に匹敵する特性を備えている分子変異体は目的物質関連物質とよばれる。目的物質由来不純物と目的物質関連物質の評価にあたっては、

まず、製造方法や目的物質の特性を考慮し、生じる可能性のある分子変化体の有無を検証する。分子変化体の存在が認められた場合は、構造および生物活性等を可能な限り明らかにする。目的物質由来不純物と目的物質関連物質のどちらに分類されるかは、少なくとも凝集体を除き、製品ごとに生物活性、安全性、有効性の観点から検討を行い判断すべきである。目的物質由来不純物について規格及び試験法を設定する際は、原薬の保存期間および通常の取り扱い中に増加がみられるか、製造工程および保存条件や取り扱いの適切な管理により制御が可能であるか等を考慮する必要がある。目的物質由来不純物と分類される可能性のある主な分子変異体は以下の通りである。

(1) ジスルフィド結合ミスマッチ体

ジスルフィド結合は、小胞体において、シャペロンおよび分子の正確なフォールディングに参与するprotein disulfide isomeraseの補助により形成される。ジスルフィド結合の形成が不完全なとき、共有結合凝集体の形成やタンパク質のミスフォールディングが起こる可能性がある²⁾ので、その有無を確認する。例えば、あるIgG1モノクローナル抗体には、V_H領域のCys22-Cys96ジスルフィド結合が形成されていない分子が混在しており、弱酸性陽イオン交換HPLCにより検出されることが報告されている。

ジスルフィド結合ミスマッチ体と思われる分子が見つかった場合は、ミスマッチ部位を解析することが望ましい。通常、システイン残基とシスチン残基の間で組換えが生じるのを防ぐために、非還元状態で存在するシステイン残基のチオール基をアルキル化する。ジスルフィド

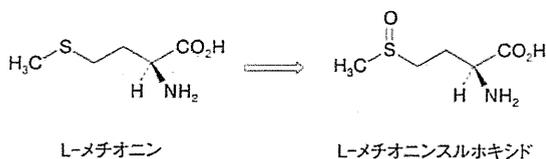
結合ミスマッチ体および標準物質について、非還元および還元状態でペプチドマッピングを実施し、得られたペプチドマップを比較することによりミスマッチの位置を特定する。

ジスルフィド結合ミスマッチ体が認められることが多いのは、IgG型の抗体医薬品である。あるIgG分子では、ジスルフィド結合のミスマッチにより抗原との親和性が低下し、結果的に活性が低下することが報告されている。IgG2ではヒンジ部のジスルフィド結合と可変部のジスルフィド結合は交換されやすく、ミスマッチ体を生じやすい。また、IgG4のヒンジ領域のH鎖間のジスルフィド結合は、他のサブクラスと比較して解離しやすいので、H鎖1分子L鎖1分子からなる二本鎖型を生じる可能性がある。

(2) メチオニン酸化体

タンパク質を構成するアミノ酸残基の中で、最も酸化されやすいものはメチオニン残基であり、メチオニンは酸化されて主にメチオニンサルフォキシドになる(図1)。メチオニン残基酸化体と非酸化体は、弱酸性陽イオン交換HPLCにより、分離可能な場合がある。また、酸化されたメチオニン残基は、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより同定できる。

メチオニン酸化物の生成は、酸化剤の存在、保存中の光の曝露、および温度上昇等により影響される。添加剤であるポリソルベートから自動酸化により生じたフリーラジカルが²⁾、酸化剤としてメチオニン酸化を亢進させた例や、ヒト化抗HER2モノクローナル抗体のFc領域のメチオニン残基が、強い光の曝露および温度の上昇によ



主な活性酸素

- | | |
|--------------|------------------------------|
| スーパーオキシド | ・O ₂ ⁻ |
| ヒドロキシルラジカル | ・HO |
| ヒドロペルオキシラジカル | ・HOO |
| アルコキシルラジカル | ・LO |

図1 メチオニンの酸化およびメチオニンの酸化に係わる一般的な活性酸素

り酸化された例が報告されている。

酸化体を目的物質由来不純物あるいは目的物質関連物質のどちらとして扱うべきかは、意図的に酸化体を作製し、生物活性等の変化を調べて判断する。メチオニン残基が酸化されることにより、高次構造が変化し、安定性の低下や生物活性の低下が引き起こされた例が報告されている。例えば、組換えヒトレプチンでは、1および69番目のメチオニン残基の酸化により、熱安定性が低下し、*in vitro*の生物活性が低下する。また、ヒト化およびヒトモノクローナル抗体では、メチオニン残基の酸化により、C_u2領域がプロテアーゼに切断されやすくなることが報告されている。

(3) 糖化体

糖化体とは、グルコースが非酵素的にタンパク質に付加したものである。グルコースのアルデヒド基が、タンパク質のN末端アミノ基やリシン残基のεアミノ基と Schiff塩基を形成した後、1,2-エミナルを経てアマドリ化合物を生成する(図2)。糖化体は、酵素結合ボロン酸免疫アッセイで定量可能であり、ボロン酸アフィニティークロマトグラフィーにより分離できる。また、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより、糖化されたアミノ酸残基を特定できる。

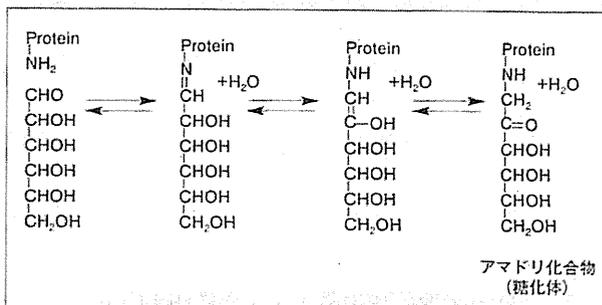


図2 糖化反応経路

(4) アスパラギンの脱アミド化、およびアスパラギン酸の異性化

アスパラギン残基の脱アミド化、およびアスパラギン酸の異性化は、非酵素的に起きる。アスパラギンはスクシンイミド中間体を経て、アスパラギン酸あるいはイソアスパラギン酸に変換される(脱アミド化)。L-アスパラギン酸も同様にスクシンイミド中間体を経て、イソアスパラギン酸またはD-アスパラギン酸に異性化する可

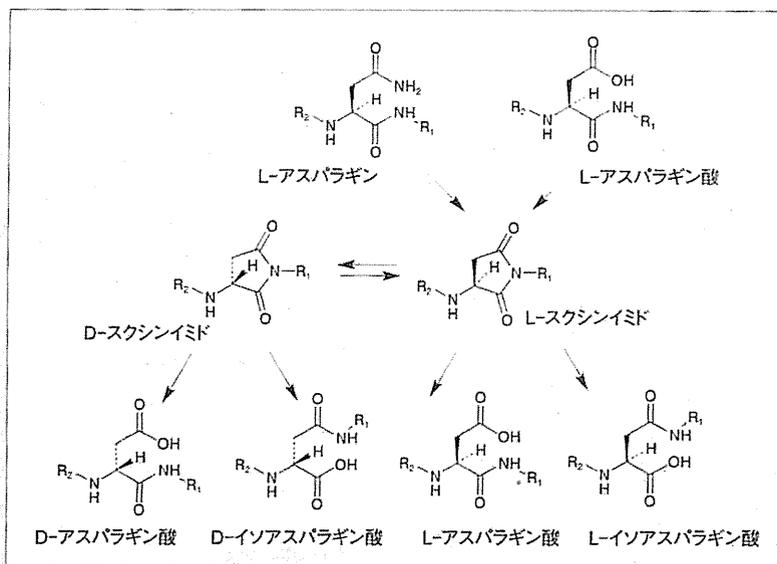


図3 アスパラギンの脱アミド化、およびアスパラギン酸の異性化²⁾

能性がある(図3)。保存温度が上昇すると、これらの反応が顕著に増加することが知られている。アスパラギン残基がアスパラギン酸残基やイソアスパラギン酸残基に変換されることによって、生物活性が低下する場合がある。例えば、可溶性CD4は、52番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に転換されることにより、活性が約60%低下する。可溶性IL-1受容体タイプIIは、317番目のイソアスパラギン酸残基への異性化により、活性が約30%低下する。また、ヒト化抗HER2モノクローナル抗体のCDR-L1の102番目のアスパラギン酸残基がイソアスパラギン酸残基へ変換されると、活性が12~30%に低下することが報告されている。

脱アミド体やイソアスパラギン酸残基へ変換された異性体と未変化体は疎水性相互作用HPLCにより、また、脱アミド体と未変化体は陽イオン交換HPLCにより分離可能な場合がある。イソアスパラギン酸はメチル化アッセイにより定量できる。脱アミド化されたアスパラギン残基、およびイソアスパラギン酸残基に変換されたアスパラギン残基の位置は、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより決定することができる。アスパラギン酸残基から変換されたイソアスパラギン酸残基の位置は、イソアスパラギン酸を消化できないAsp=Nを用いて得られた消化物のLC/MSによって確認する。

脱アミド体およびイソアスパラギン酸残基へ変換された分子変異体が目的物質由来不純物であるのか、または目的物質関連物質であるかは、例えば温度ストレスをか

けることによって意図的に作製した分子変異体の生物活性を測定し、判断できる場合がある。

(5) 切断体

切断体とは、目的物質の一部がプロテアーゼまたは熱ストレス等により切断されたものである。C末端アミノ酸残基がカルボキシペプチダーゼにより部分的にプロセッシングを受ける例は多く知られている。抗体医薬品のH鎖C末端リシン残基のように、C末端がプロセッシングされても、予想されたタンパク質と同程度の活性を持つ場合、目的物質として扱うことが多い。切断されることにより、活性等が変わる場合は、目的物質由来不純物として取り扱う。切断体はSDS-PAGEにより分離検出できる場合が多い。ただし、得られた各バンドのタンパク質含量と染色強度は比例しない場合があるので、切断体の相対含量を正確に求められないことに留意する。他にLC/MS、サイズ排除HPLC(SEC)、およびキャピラリー電気泳動などを用いて解析した例がある。切断体の構造は、MS等により可能な限り明らかにする。

(6) 電荷の異なる物質

混在する可能性のある目的物質不純物を予想できないとき、イオン交換HPLCにより酸性成分、主に目的物質を含む成分、塩基性成分に分け、酸性および塩基性成分に含まれる分子種の構造を解析するのも一考である。例えば、抗体医薬品の場合、酸性領域には切断体(Fab,

Fab欠損体), 糖化体, 脱アミド体, シアリル体等が, また, 塩基性領域には酸化体, 凝集体等が含まれる可能性がある。

(7) 糖鎖非付加体

糖鎖付加体と非付加体はSDSキャピラリー電気泳動により分離できる場合がある。糖鎖非付加体が目的物質由来不純物であるのか, または目的物質関連物質であるかは, 例えば, 糖鎖をペプチド-N-グリコシダーゼF等の処理により遊離させ, 遊離前後で活性等を多方面から比較することにより判断する。例えば, 抗体医薬品においては, 標的分子に対する作用の差異だけでなく抗体依存性細胞傷害活性および補体依存性細胞傷害活性に対する影響についても解析する必要がある。

(8) 凝集体

凝集体は免疫原性の原因となる可能性が懸念されるため, 目的物質由来不純物として取り扱う。製造工程において, 凝集体形成に関与する因子として, 温度, 培養(タンパク質発現), アンフォールディング/リフォールディング操作, 精製, 凍結融解, 攪拌およびせん断, 過工程における加圧, 乾燥等が考えられる。保存中に凝集体形成を促進する因子として, 温度, 光, 容器/栓等があげられる。容器/栓においては特に, 浸出する可能性のある金属, 抗酸化剤, 可塑剤, 潤滑剤およびそれらの分解物等が凝集体形成に影響する可能性があることに留意する。溶液に関する因子としては, pH, 緩衝液とその濃度, 賦形剤, タンパク質の濃度等があげられる。

凝集体は粒子径によりsubmicron (0.1~1 μ m), sub-visible (1~100 μ m), visible (\geq 100 μ m)に大きく分けられる。日本薬局方の注射剤の不溶性微粒子試験では, 10 μ mおよび25 μ m以上の凝集体を含む微粒子については限度値が設定されている。また, 凝集体は通常原薬および製剤においてSECによる試験法が設定されている。しかしながら, SECの排除限界は約40nmであり, それ以上の凝集体の測定は困難である。したがって, 約40nmから10 μ mの凝集体に関しては事実上規定されていないことになる。現在, 免疫原性を有する可能性が懸念されるこのような粒子径の凝集体をどのように管理および評価するかが, 世界的検討課題となっている^{5,6)}。

FDAは, 市販ロット, 安定性試験ロット, および臨床試験ロットに含まれる凝集体について, ①少なくとも

2種類の分析法を用いてsubvisible particleの量と大きさを定量する, ②複数のストレス条件を用いてsubvisible particleの形成されやすさを評価する, などの評価戦略を推奨している⁷⁾。凝集体評価のため, 特に, subvisible particleを質的および量的に解析できる手法の開発が急務である。

凝集体測定法として, SEC, 超遠心分析法, 流動場分離法, SDS-PAGE, 動的光散乱法, マイクロ・フロー・イメージングなどがある⁸⁾。現在, どの方法を組み合わせれば凝集体を最適に測定できるかについては, いまだ世界的に統一的な結論は得られていない。また, 特性解析か, 工程管理試験もしくは規格及び試験法に用いるかによっても適した方法は異なると思われる。以下に分析法の特徴をまとめる。装置の価格を比べると, SECはカラムを手持ちのHPLC装置に接続するだけなので比較的 lowコストであるが, その他の装置はかなり高額である。

SECは, 凝集体測定法として広く用いられているが, ①分離中にサンプルが希釈されることにより, 凝集体の解離および樹脂への吸着が生じ, 凝集体のサイズや含量が実際より小さく評価される可能性がある, ②検出器にUVを用いた場合, ダイナミックレンジが狭いため, 相対含量の低い凝集体が検出されない可能性がある(静的光散乱を用いることにより広範囲測定が可能になる), ③分子量の測定には標準物質を用いた補正曲線が必要である(動的光散乱を用いることにより標準物質は不要となる), ④測定できる粒子径の上限は約40nmであり, 抗体医薬品の場合, 三量体以上の凝集体を分離できない, などの短所がある。

超遠心分析法は, 沈降係数に基づいて分離する方法である。分子量の測定に標準物質を用いた補正曲線は不要であり, 最大約800nmの粒子径を有する凝集体まで高い分離能で分子量を測定できるため, 標準的な方法として用いられている。しかし, ①正確に分子量を測定するにはタンパク質濃度を低くする必要があり, 希釈の過程で凝集体が解離する可能性がある。②沈降速度法では2~6時間, 沈降平衡法では一晩遠心する必要があり, ハイスループットな方法ではない。③熟練した技術者が必要であり, データの解析は容易ではない。④感度は比較的 low, 凝集体の定量限界は抗体医薬品の場合, 1~2%である。

流動場分離法は拡散係数に基づいて分離する方法である。不溶性の凝集体も含め最大約10 μ mの粒子径を有す

る凝集体を、SECとほぼ同程度の分離能で定量できる。しかし、①サンプル注入時におけるサンプルの希釈により凝集体が解離する可能性がある、②最適な条件の設定が困難である、などの課題も残っている。

SDS-PAGEによる凝集体の解析では、還元および非還元の状態で行うことにより、非共有結合とジスルフィド結合を介した共有結合の凝集体を区別できるとされているが、非共有結合の凝集体はSDS化により解離する可能性もある。さまざまな大きさの凝集体を高い分離能で検出できるが、分離可能な分子サイズの上限はSECとほぼ同じである。また、定量的な解析は困難である。

動的光散乱法は、液体中の粒子がブラウン運動により拡散する速度を計測することにより粒子径およびその分布を測定するものである。不溶性の凝集体も含め最大約5 μ mの粒子径を有する凝集体を簡単な操作で測定可能であり、測定時間も約数分と短い。ダイナミックレンジが他の試験法に比べて広く、希釈せず測定できるので、

凝集体の解離を回避することができる。シグナル強度は粒子径に比例して増大するので、高分子量の凝集体の検出ほど有用である。しかし、①定量的な測定は困難である、②分離能は超遠心分析法およびSECよりも劣り、単量体と二量体の明瞭な分離は困難である、③タンパク質以外の微粒子の存在により測定が妨害される場合がある、および④粒子径は必ずしも分子量と比例しない場合があり、形状により影響を受ける、などの問題もある。

マイクロ・フロー・イメージングは映像として凝集体を測定する方法であり、1~400 μ mの粒子径を有する凝集体の濃度、大きさ、形状を測定できる。最も大きな特徴は、タンパク質の凝集体と非タンパク質性の粒子を識別できることである。また、形状に関する情報が入手できるなどの利点を有する一方で、①一部の粒子しか解析できない、②分離度は超遠心分離法よりも劣る、および③膨大な情報が得られるので、解析が必ずしも容易ではない、などの短所も持つ。

ヒト化モノクローナル抗体製剤の凝集体の測定を動的光散乱およびSECにより試みた例について示す。動的光散乱法で未処理の試料を測定したとき、抗体の約90%が粒子径約13nmの単量体として検出されたのに対し、攪

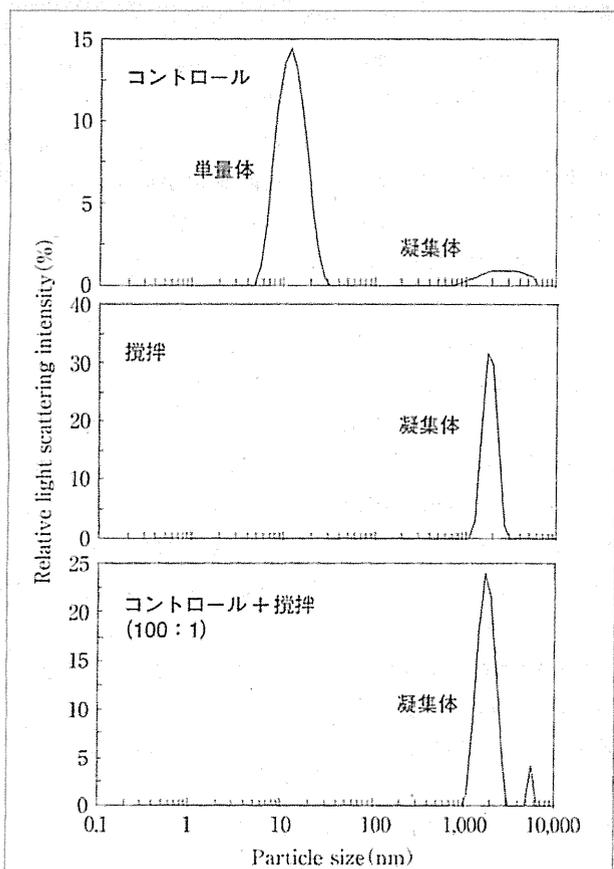


図4 動的光散乱によるヒト化モノクローナル抗体製剤の凝集体の測定
測定装置、Malvern社のZetasizer Nano-ZS

研究開発・生産を支援する総合技術力 医薬品関連分析はTRCにお任せ下さい。

生物医薬品の特性：不純物

- 製造工程由来不純物
 - a) 細胞基材由来 (イムノアッセイ、ハイブリダイゼーション等)
 - b) 細胞培養液由来 (LC/MS, GC/MS等)
 - c) 細胞培養以降の工程での不純物
- 目的物質由来不純物
 - a) 切断体 (HPLC, SDS-PAGE, ペプチドマッピング等)
 - b) 分子変化体 (キャピラリー電気泳動, MS, CD等)
 - c) 凝集物 (SEC, キャピラリー電気泳動等)

原薬、製剤中不純物

- 有機不純物 (HPLC, GC等)
- 残留溶媒 (GC, GC/MS等)
- 金属不純物 (局方試験, ICP-AES, ICP-MS)
- 分解生成物 (構造解析: NMR, MS等)

生体試料中の薬物濃度測定

- TK/PK測定 (低分子・バイオ医薬品)
分析法開発、分析法バリデーション、検体測定
医薬品医療機器総合機構 GLP適合性調査 評価A取得 (2010年12月)
- LC-MS/MSおよびELISA、ECL等による微量定量分析

株式会社東レリサーチセンター・医薬営業部

<http://www.toray-research.co.jp>

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町3-1-8

TEL:03-3245-5666 FAX:03-3245-5804

DM資料請求カード№67

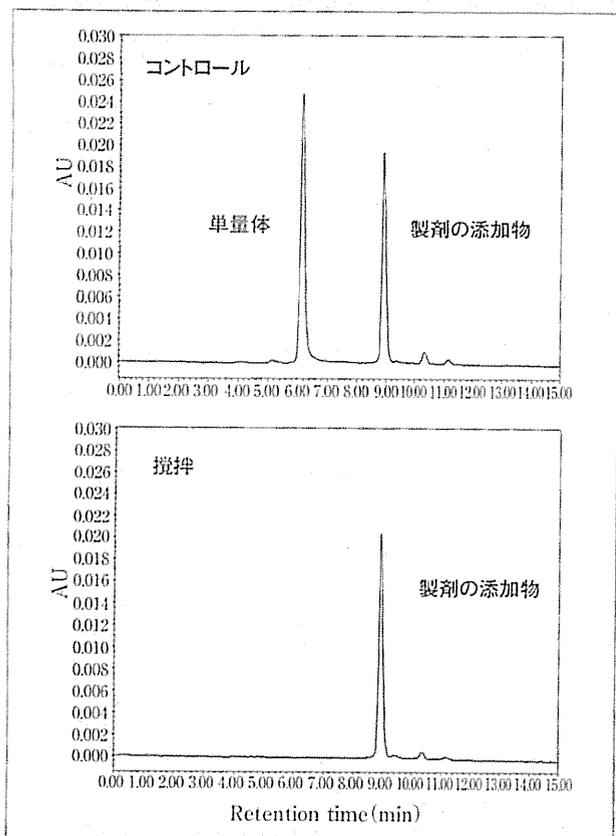


図5 SEC-HPLCによるヒト化モノクローナル抗体製剤の凝集体の測定
測定装置、ウオーターズ社のACQUITY BEH200, SEC, 1.7 μ mカラム

拌処理後は粒子径約1,900nmの凝集体しか検出されなかった(図4)。同一サンプルをSECにより測定した結果、未処理の試料では抗体のほとんどが6.2分に分子量約14万の単量体として検出されたのに対し、攪拌処理後の試料ではピークが検出されなかった(図5)。本結果は、動的光散乱により検出された粒子径1,900nmの凝集体は、SECでは測定できないことを示している。恐らく粒子径が大きすぎるため、カラムを通過できなかったことが原因と考えられる。また、未処理の試料と攪拌処理後の試料を100対1で混合し、動的光散乱により測定した結果、粒子径約1,800nmの凝集体は検出されたが、単量体は検出されなかった(図4)。本結果は、粒子径約1,800nmの凝集体は粒子径約13nmの単量体と比較して、少なくとも100倍以上高い感度で測定できることを示したものであり、凝集体を管理する方法としても適していることを示唆している。

おわりに

本稿では、バイオ医薬品の目的物質由来不純物の分析と評価について、事例を紹介しながら概説した。バイオ医薬品の原薬や製剤に含まれる目的物質由来不純物は、製品の有効性・安全性に関わる重要な品質特性の1つである。有効性および安全性確保の観点から許容できる目的物質由来不純物のレベルは、個々の製品および投与量等に依存しており一律に規定できない場合もある。その場合、最終的に非臨床試験・臨床試験の結果から判断せざるをえない。近年、分析技術の発達により高精度・高感度で目的物質由来不純物を測定することが可能となっている。目的物質由来不純物の適切な分析による評価は、有効で安全なバイオ医薬品の患者への提供に貢献するだけでなく、初回ヒト投与臨床試験の安全性確保にも極めて重要である。

参考文献

- 1) 平成13年5月1日医薬審発第571号生物薬品(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について(ICH Q6Bガイドライン)
- 2) Donbrow, M., Azaz, E., Pillersdorf, A.: Autoxidation of polysorbates. *J. Pharm. Sci.*, **67**(12), 1676-1681(1978)
- 3) Shimizu, T., Matsuoka, Y., Shirasawa, T.: Biological significance of isoaspartate and its repair system, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(9), 1590-1596(2005)
- 4) Rosenberg, A.S.: Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.*, **8**(3), E501-507(2006)
- 5) Carpenter, J. F., Randolph, T. W., Jiskoot, W., Crommelin, D. J., Middaugh, C. R., Winter, G., Fan, Y. K., Kirshner, S., Verthelyi, D., Kolzowski, S., Clouse, K. A., Swann, P. G., Rosenberg, A., Cherny, B.: Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: gaps that may compromise product quality. *J. Pharm. Sci.*, **98**(4), 1202-1205(2009)
- 6) Singh, S. K., Afonina, N., Awwad, M., Bechtold-Peters, K., Blue, J. T., Chou, D., Cromwell, M., Krause, H. J., Mahler, H. C., Meyer, B. K., Narhi, L., Nesta, D. P., Spitznagel, T.: An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics. *J. Pharm. Sci.*, **99**(8), 3302-21(2010)
- 7) Cherny, B.: Current Regulatory Considerations for the Assessment of Sub-Visible Particles. WCBP CMC Strategy Forum. A Practical Approach to the Analysis and Immunogenic Potential of Aggregates and Particles(2011)
- 8) den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., Jiskoot, W.: Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm. Res.*, **28**(4), 920-933(2010)

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)

Evaluation of impurities in biopharmaceuticals part 2

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ

SHINGO NIIMI, AKIKO ISHII-WATABE, NANA KAWASAKI

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

はじめに

原薬や製剤に含まれる不純物は、製品の有効性・安全性に関わる重要品質特性の1つである。バイオ医薬品に含まれる不純物は、目的物質由来不純物と製造工程由来不純物に大別される。製法開発の際には、適切な分析技術を用いて原材料、工程中間体、原薬、あるいは製剤に含まれる不純物の種類と量を評価し、必要に応じて精製工程の不純物クリアランス能の評価を実施する必要がある。不純物の評価は、製造方法の確立や、製剤中に含まれる不純物の量が常に許容できるレベル以下になることを保証するための管理手法の構築に必須である。本稿では、製造工程由来不純物の分析と評価について概説する。なお、製造工程由来不純物としてのウイルス等外来性感染性物質については、次号で取り上げる。

1. 製造工程由来不純物の分析と評価

製造工程由来不純物は、①細胞基材に由来するもの、②細胞培養液に由来するもの、ならびに③細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものの3つに分類される(表1)。また、製造工程中で迷入する微生物類等の混入汚染物質も、広義には製造工程由来不純物と位置付けられる。

製造工程由来不純物の評価では、まず、原薬や製剤中に残存あるいは混入する可能性がある不純物を考え、測定項目を決定する(図1)。宿主細胞の種類や精製方法によらず評価対象となる製造工程由来不純物には、宿主細胞由来タンパク質(host cell protein, HCP)、および宿主細胞由来DNAがある。その他の代表的な製造工程由来不純物としては、培地に添加されるインスリンやメト

表1 製造工程由来不純物の例

由来	不純物の例
細胞基材	HCP 核酸(例: 宿主ゲノム由来, ベクター由来, 総DNA)
細胞培養液	培地成分 添加物(例: インスリン, トランスフェリン, MTX) 血清由来成分(例: アルブミン) 抗生物質(例: テトラサイクリン, ゲンタマイシン) 細胞からの分泌物
抽出・分離・加工・精製工程	酵素 化学的・生化学的試薬(例: 臭化シアン, グアニジン, 酸化剤, 還元剤) 無機塩(例: 重金属, ヒ素, 非金属イオン) 溶媒 クロマトグラフ用担体 アフィニティークロマトグラフ用担体のリガンド(例: モノクローナル抗体, プロテインA) その他の漏出物

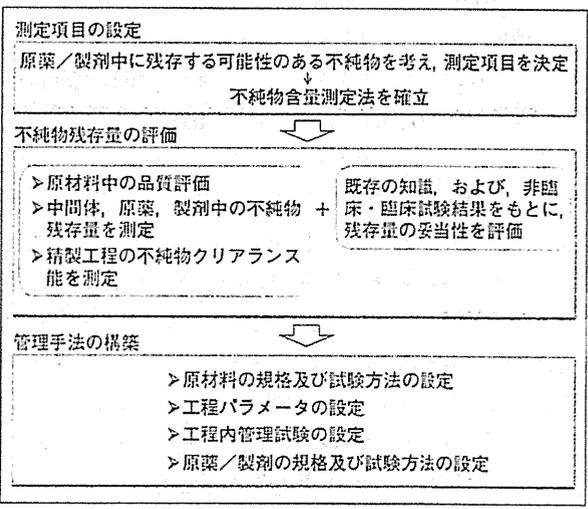


図1 製造工程由来不純物の評価の流れ

レキサート (Methotrexate, MTX), 抗体医薬品の製造工程でアフィニティーカラム担体用のリガンドとして用いられるプロテインA等があげられる。免疫反応の促進を含め、薬理作用を示す可能性のある不純物や、免疫原性を有する可能性のある不純物については、残存量の評価と管理に特に注意が必要である。

(1) 製造工程由来不純物の分析法

製造工程由来不純物の分析法は、定量試験あるいは限度試験として適切にバリデーションされていることが重要であり、検出限界が残存許容量以下であることが確認されている必要がある^{1,2)}。バイオ医薬品の不純物評価に汎用されるエンドトキシン試験、無菌試験、および微生物限度試験については、日本薬局方に一般試験法として収載されている。日本薬局方の試験法を用いる場合、バリデーションは不要である。以下に、代表的な製造工程由来不純物として、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来DNA、プロテインA、ならびにその他の主要な不純物の分析法を紹介する。

①HCP

HCPは、それ自身が免疫原となる可能性や、免疫応答を促進することが懸念される不純物である³⁻⁵⁾。しかしながら、最終製品においてHCPを完全に除去することは、現在の精製技術では極めて困難である。HCPの残存量に関する公式な許容値はないが、これまでに承認されているバイオ医薬品では、1~100ppmの場合が多い⁶⁾。しかし、HCP残存の安全性への影響は、宿主細胞の種類やHCPを構成するタンパク質の種類に加え、製品の用法用量によっても異なると考えられることから、製品ごとに許容値を設定する必要がある。例えば、組換え成長ホルモン (growth hormone, GH) であるソマトロピンのバイオ後続品Omnitrope[®]の最初の治験では、患者の最大60%で非中和抗GH抗体が産生され、患者のすべてで抗HCP抗体の産生が誘導された。その後、HCPをさらに除去することにより、抗GH抗体陽性患者の割合は他のGH製剤で報告されている程度に改善された。この場合、HCPは免疫原となるとともにアジュバントとして作用し、GHに対する抗体の産生誘導を促進したものである。

HCPの定量には、抗HCP抗体を用いたイムノアッセイが用いられる。Enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) が一般的であり、特殊な例として、HCP結合免疫リガンドアッセイなども用いられる。後者はビオチン標識した抗HCP抗体とフルオレセイン標識した抗HCP抗体を利用したサンドイッチイムノアッセイであり、ウレアーゼ標識した抗フルオレセイン抗体を2次抗体として用いる。結合した2次抗体の量は、ウレアーゼによる尿素の加水分解により生じるpH変化を光活性電位センサーで検出することにより測定する。大腸菌のHCPを定量したある報告では、ELISAでは、室内再現精度が9%、真度が91%、下限の定量限界が12.5ng/mL、測定範囲が12.5~200ng/mLであり、HCP結合免疫リガンドアッセイでは、室内再現精度が10%、真度が101%、下限の定量限界が5.0ng/mL、測定範囲が5.0~40ng/mLであった。

HCP定量では、広範なタンパク質性不純物を検出することが重要であり、試験に用いるポリクローナル抗体の調製にはさまざまな配慮が必要である。動物に免疫するHCPとしては、目的物質をコードする遺伝子を欠く細胞基材を生産培養と同様に培養した培養液から調製した試料、あるいは、培養液から目的物質と同様の精製工程により部分精製した試料を用いる場合が考えられる。前者あるいは後者を抗原として得られた抗HCP抗体を用いたHCPの測定系は、それぞれ、Multiproduct immunoassayあるいはProduct-specific immunoassayとよばれる⁶⁾。細胞培養液には分泌タンパク質だけでなく細胞内タンパク質も含まれる場合もあるので、細胞は実生産を想定して培養する。可能な限り、HCP以外のタンパク質を含まないように培養することも重要である。しかし、細胞の増殖および維持にタンパク質性因子が必要な場合は、HCPを抗タンパク質性因子抗体アフィニティーカラムで精製することも考慮する必要がある。部分精製した試料を用いる場合は、精製工程を経るにつれ、評価すべきHCPの種類も変わってくるので、どの段階まで精製した試料を動物に免疫するかは、回収率を考慮しケースバイケースで判断する。精製工程を変更した場合は、変更後の工程を取り入れて調製したHCPを抗原として得られた抗HCP抗体を調製し、新たにHCP定量法を構築する必要がある。抗HCP抗体が調製できていない段階では、市販の抗HCP抗体を用いることがあるかもしれないが、抗HCP抗体の調製に用いたHCP分子種の違いにより、独自に調製した抗HCP抗体を用いた場合よりもHCP値が低く測定される場合があることに