

円滑な進捗に引き続き協力するとともに、今後の活用の方向への提案が必要となっている。その際、世界の薬局方を先導する役割を果たすような方向性を提案することが重要と考える。一方薬局方間での国際活動として、世界薬局方国際会議においてGPhPの作成が開始されたが、日局の国際的な役割を果たす意味からも積極的な関与が必要と考える。

国際調和、あるいは相互受入の状況を作るには、一層の努力と時間が必要と考えられるものの、これを目指す過程においても、日本薬局方の諸外国への発信を積極的に行うことが重要と考えられる。具体的にいえば、英語版の速やかな発行、および英語版を日本語版に匹敵するように質的な向上をはかるべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai-Kato K, Ishikura K, Oshima Y, Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A, Yamaguchi T, Nishiyama N, Kataoka K, Kawanishi T, Okuda H: Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers, *Int J Pharm.* 423, 401–409 (2012)
- 2) Ohno A, Kawanishi T, Okuda H, Fukuhara K: A new approach to characterization of insulin derived from different species using 1H-NMR coupled with multivariate analysis, *Chem Pharm Bull.* 60, 320-324 (2012)
- 3) Sakai-Kato K, Nanjo K, Kawanishi T, Okuda H: Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites, *Chem. Pharm. Bull.* 60, 391-396 (2012)
- 4) Shibata H, Saito H, Kawanishi T, Okuda H, Yomota C: Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats, *Chem Pharm Bull.* 60, 967-975 (2012)
- 5) Shibata H, Saito H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H: Alterations in the detergent-induced membrane permeability and solubilization of saturated phosphatidylcholine/cholesterol liposomes: effects of poly(ethylene glycol)-conjugated lipid, *Chem Pharm Bull.* 60, 1105-1111 (2012)
- 6) Shibata H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H: Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions, *Biol Pharm Bull.* 35, 2081-2087 (2012)
- 7) Un K, Sakai-Kato K, Oshima Y, Kawanishi T, Okuda H: Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes, *Biomaterials.* 33, 8131-8141 (2012)
- 8) Sakamoto T, Portieri A, Arnone D D, Taday P F, Kawanishi T, Hiyama Y: Coating and Density Distribution Analysis of Commercial Ciprofloxacin Hydrochloride Monohydrate Tablets by Terahertz Pulsed Spectroscopy and Imaging, *J Pharm Innov.* 7, 87-93 (2012)
- 9) 川西 徹:第16改正日本薬局方製剤総則における「経口投与される製剤」および「口腔内に適用する製剤」ー口腔内崩壊錠の位置づけー ファームテックジャパン. 28, 20-25 (2012)
- 10) ○川西徹 日本薬局方の今とこれから ファルマシア 48, 119-123 (2012)
- 11) ○川西徹 医薬品の品質を巡る話題ー化学合成医薬品に関わるレギュラトリーサイエンスーレギュラトリーサイエンス誌 2, 67-73 (2012)
- 12) Sakamoto, T. Fujimaki, Y., Takada, Y., Aida, K., Terahara, T., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging, *J Pharm Biomed Anal* 74, 14-21 (2013)
- 13) Koide, T., Nagato, T., Kanou, Y., Matsui, K., Natsuyama, S., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Detection of component segregation in granules

- manufactured by high shear granulation with over-granulation conditions using near-infrared chemical imaging, *Int J Pharm* 441, 135-145 (2013)
- 14) Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Kawanishi, T., Randolph, T. W., Carpenter, J. F.: Impact of heat treatment on miscibility of proteins and disaccharides in frozen solutions, *Eur J Pharm Biopharm* 85, 177-183 (2013)
- 15) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuhara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda, Y., Okuda, H.: Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components, *Biomaterials* 35, 1347-1358 (2013)
- 16) ○川西 徹: 革新的医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究 衛研報 131, 2-6 (2013)
- 17) ○川西 徹, 清原 孝雄, 檜山 行雄, 津田 重城: 今後の日本薬局方の新しい流れ, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44, 790-801 (2013)
- 18) ○奥田晴宏: 国内で流通している医薬品におけるサプライチェーンの国際化と品質保証, 薬剤学74(5) 341-344 (2014)
- 19) ○奥田晴宏, 檜山行雄: 化学薬品の局方収載の現状と課題, レギュラトリー学会誌 4(2) 139-147 (2014)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

バイオ医薬品の工程開発・管理並びに規格及び試験法に関する研究

研究分担者：川崎 ナナ（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長）

研究要旨

バイオ医薬品の工程開発・管理、並びに規格及び試験法に関する課題として、薬物動態や薬理作用への影響を考慮した糖鎖管理、頑健性の高い宿主由来タンパク質（HCP）管理、及び新規な特性を反映した一般名の命名がある。本研究では、第一に、血中抗体安定性評価技術を開発する一環として、血中の抗体医薬品の回収を目的とした抗体親和性ペプチド固定化ゲル充填スピンカラムを作製した。第二に、HCPとして残存する可能性のあるタンパク質をショットガンプロテオミクスの手法により同定した。第三に、biologicals and biotechnological substancesにおいて、最近設定・変更されたpre-stemや命名ルールについて調査した。

キーワード：バイオ医薬品、品質管理、糖鎖、HCP、名称

研究協力者

橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第一室長

日向 昌司 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部主任研究官

栗林 亮佑 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部研究員

方法として、血中から回収した抗体をプロテアーゼで消化した後、糖ペプチドをMSで解析する方法と、回収した抗体からPNGaseFにより糖鎖を切り出した後、誘導体化した糖鎖を解析する方法がある。血中の抗体医薬品の回収方法としては、抗体特異的リガンドが用いられる場合が多いが、特異性は高いものの回収率が低いことや、CDR領域に内因性のリガンドや抗薬物抗体が結合している抗体医薬品を回収できないことなどの課題が残されている。また、抗体ごとに抗体特異的リガンド結合担体を準備する必要があり、分析方法を確立するまでに長時間を要することなども課題である。

A. 研究目的

バイオ医薬品の工程開発・管理、並びに規格及び試験法に関する課題として、薬物動態や薬理作用への影響を考慮した糖鎖管理、頑健性の高い宿主由来タンパク質（HCP）管理、及び新規な特性を反映した名称のあり方がある。

糖鎖は、血中半減期や薬理作用に影響することが知られており、医薬品ごとに血中半減期や薬理作用に影響する糖鎖の構造及び確保すべき糖鎖の範囲や分布を明らかにすることは、糖鎖の管理方法及び基準を設定するために重要である。近年開発が進む抗体医薬品では、糖鎖と血中安定性の関係を評価する

HCPの管理には、主に抗HCP抗体を用いたサンドイッチELISAなど、免疫学的手法が用いられている。免疫学的手法は高感度であることから、限度試験として優れた手法であるが、適切な抗体を準備する必要がある。HCPは、複数種類のタンパク質の集合体であるため、すべてのタンパク質を測定できる抗体を用いることが望ましいが、残存可能性のあるタンパク質の種類も、それらタンパク質のリスクの大き

さも明らかになっておらず、抗体の妥当性を評価することが困難である。

医薬品の一般名は、国際保健機関（WHO）の国際医薬品一般名専門家協議（INN専門家協議）が決める国際一般名（international nonproprietary name, INN）に基づいて各国が決める。日本では、医薬品医療機器総合機構（PMDA）の専門協議の決定に基づいて日本医薬品一般名称（Japanese accepted name, JAN）が決められる。WHOのINN専門家協議は、医薬品の活性本体のINNを決める際に、医薬品を分類するためのステム（stem）を決め、原則としてステムを用いてINNを命名する（“医薬品の名前 ステムを知らばクスリがわかる”、宮田直樹 編著、じほう、東京（2013）より）。生物製品のステムは、化学構造、由来、薬理作用や効能・効果、及び標的とする生体分子すべてを考慮して設定される。現在、生物製品には20種類のステムと、5つ（アンチトロンビン類、遺伝子治療用医薬、インスリン類、インターフェロン類、下垂体ホルモン類）の命名スキームが設定されている。しかし、バイオテクノロジーの進展は、新規なタイプのバイオ医薬品の創製を可能とし、既存のステムや命名スキームでは命名が困難なケースも生じている。INN専門家協議は、そのような新規なバイオ医薬品に対して、pre-stemの設定や命名ルールの設定・見直しなどを通じて、適切に命名できるように取り組んでいる。しかし、これらの設定・変更は必ずしも国内関連機関に十分に浸透されていないようである。

このような背景を踏まえ、本研究では、第一に、血中抗体安定性評価技術を開発する一環として、抗体親和性ペプチドと、それを固定化させたゲルを用いたスピナラムを作製し、血漿試料から抗体医薬品を回収するためのカラムとしての応用可能性を検証した。第二に、HCPとして残存する可能性のあるタンパク質をショットガンプロテオミクスの手法により同定した。第三に、biologicals and biotechnological substances（生物製品及び核酸医薬品）について、最近設定・変更されたpre-stemや命名ルールについて調査した。

B. 研究方法

B.1 糖鎖管理のための薬物動態評価法の開発—抗体医薬品のグリコフォームと体内安定性について

B.1.1 試薬等

抗体として、muromonab-CD3 (Johnson & Johnson)、palivizumab (MedImmune)、omalizumab (Genentech)、daclizumab (Roche)、cetuximab (ImClone)、trastuzumab (Genentech)、adalimumab (Abbott)、infliximab (Johnson & Johnson)、インフリキシマブ (田辺製薬、Osaka, Japan) 及びgolimumab (Johnson & Johnson) を使用した。トリプシン (Trypsin Gold、Mass spectrometry Grade) は、Promega (Madison, WI, USA) より購入した。ペプチドライブラリー作製のTNF- α は、Miltenyi Biotech (Tokyo, Japan) より購入した。合成親和性ペプチド (CGSGSGSIAVSYQTK) は東レリサーチセンター (Kanagawa, Japan) から購入した。ヒト血漿及び脱塩カラム (PD MiniTrap G-25 カラム) は、それぞれKAC corporation (Kyoto, Japan)、及びGE Healthcare (Tokyo, Japan) より購入した。

B.1.2 抗体固定化ゲルの作成

モデルとして3種類の抗TNF- α 抗体 (アダリムマブ、インフリキシマブ、及びゴリムマブ) を用いて、0.5Mリン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した (1.0 μ g/ μ L)。その抗体溶液 (100 μ L) を10mgの抗体固定化用ゲル (TSKgel Tresyl- 5PW、東ソー、Tokyo, Japan) に加え、室温で一晩振とうさせた (ゲルの活性基はトレシル基でリガンドのアミノ基又はチオール基と反応)。200 μ Lの0.5M NaClでゲルを洗浄した後、100 μ Lの0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) で未反応の活性基をブロッキングし、抗体固相化ゲルを作製した (図1A)。

B.1.3 TNF- α 由来ペプチドライブラリーの作成

精製水で1.0 μ g/ μ Lに調製したTNF- α (10 μ L) にトリプシン (1 μ L) を加え、37 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートし、得られたTNF- α 由来トリプシン消化物をペプチドライブラリーとした。

B.1.4 抗体と結合するペプチドの選別

TNF- α 由来ペプチドライブラリーを乾燥後、精製水 (100 μ L) で再溶解した後、抗TNF- α 抗体固相化ゲルを加え、室温で一晩振とうさせた。抗体に結合しないペプチドを除去するために、400 μ Lの25mM酢酸アンモニウム (pH 7.0) でゲルを洗浄した。抗体固相化ゲルに結合しているペプチドを300 μ Lの0.5M酢酸 (pH 2.5) で溶出・乾燥させて、抗体親和性ペプチドを得た。

B.1.5 ペプチド同定

ペプチド同定に用いたLC/MS及びLC/MS/MS等の条件は以下のとおりであった。

(1) LC

装置 : Paradigm MS4 (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA)

トラップカラム : L-column ODS (0.3 \times 5 mm、5 μ m、化学物質評価研究機構)

分析カラム : L-column ODS (0.075 \times 150mm、3 μ m、化学物質評価研究機構)

移動相 : バッファーA、0.1%ギ酸 / 5%アセトニトリル、バッファーB、0.1%ギ酸 / 90%アセトニトリル

グラジエント条件 : 5 - 65% (Bバッファー) 45分間

流速 : 300 nL/min

(2) MS

装置 : LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

スプレー電圧 : 2.5 kV

電極 : ポジティブイオンモード

MSスペクトルの取得 : フルスキャンモード (測定範囲 : m/z 400-2,000)

MS/MSスペクトルの取得 : データ依存的なプロダクトイオンスキャンモード

(3) データベース検索

検索ソフト : BioWorks 3.1 (Thermo Fisher Scientific)

データベース : UniProtデータベース

B.1.6 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)

電気泳動ゲルは、グラジュエントゲル (e-PAGEL、18ウェル、厚さ1.0mm、グラジュエント5% - 20% ; ATTO, Tokyo, Japan) を用いた。

ローディングバッファー及び泳動バッファーの組成は以下の通りであった。

ローディングバッファー :

- 0.5M Tris-HCl (pH6.8) 1.25mL
- SDS (Wako, Osaka, Japan) 0.2g
- グリセロール (Wako) 2 mL
- ブロモフェノールブルー (Wako) 少量
- 精製水 : 6.75 mL

泳動バッファー :

- Tris (Sigma Aldrich, MO, USA) 3 g
- グリシン (Wako) 14.4g
- SDS (Wako) 1 g
- 精製水 1 L

10 μ Lのローディングバッファーに10 μ Lのサンプル溶液を添加・混合して、試料溶液とし、その13.5 μ Lをゲルに注入した。ゲル染色は、SYPRO Rudy Protein Gel Stain (Life Technologies, CA, USA) で行い、Typhoon 9400 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) でバンドを確認した。

B.1.7 抗体親和性ペプチド固定化スピンカラムの作製

抗体親和性ペプチドを0.5Mリン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解して、ペプチド溶液 (1.0mg/mL) を調製した。そのペプチド溶液 (100 μ L) を10mgの抗体固定化用ゲル (TSKgel Tresyl-5PW、Tosoh) に加え、室温で一晩振とうさせた。200 μ Lの0.5M NaClでゲルを洗浄した後、100 μ Lの0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) を加えて、室温で30分間のインキュベーションにより、未反応の活性基をブロッキングした。得られた抗体親和性ペプチド固相化ゲルをUltrafree-MC (0.5mL、0.22mm filter、Millipore) に

移して、抗体を回収するための簡易スピンカラムを作製した（図1B）。

B.1.8 ヒト血漿からのgolimumab回収

10 μ Lのgolimumab水溶液（1.0 μ g/ μ L）に90 μ Lのヒト血漿を加えて調製したサンプル溶液を、抗体親和性ペプチド固定化ゲルに添加した。転倒操作により、十分にゲルと溶液を混合した後、遠心分離（5000 \times g）を行い、未吸着画分を回収した。次に、300 μ Lの洗浄バッファーの添加、混合、及び遠心分離操作を3回繰り返すことにより、ゲルを洗浄した。ペプチドに吸着したgolimumabは、300 μ Lの溶出バッファー（0.1%*n*-octylglucoside添加PBS、pH7.4）の添加、混合及び遠心分離操作を3回繰り返すことにより、吸着画分として回収した。

B.2 HCP管理手法の開発

B.2.1 精製トラスツズマブの調製

予備培養工程

0.18% Pluronic F-68（SIGMA）を添加したOpti-CHO培地（GE Healthcare）に、 2.0×10^5 cells/mLとなるようにトラスツズマブを安定発現するCHO細胞株（DGT13-4細胞）を播種し、4日間、巡回培養（125rpm、37 $^{\circ}$ C、8% CO₂気流下）した。

生産培養工程

生産培養は、0.18% Pluronic F-68を添加したOpti-CHO培地に、 2.0×10^5 cells/mLとなるようにDGT13-4細胞を播種し、1週間、巡回培養（125rpm、37 $^{\circ}$ C、8% CO₂気流下）した。馴化培地を回収し、350xg、15分間の遠心分離後、上清をろ過フィルター（0.22 μ m、Millipore）で清澄化し、精製工程の出発材料とした。

精製工程1－濃縮

生産培養の上清を限外ろ過（Pellicon XL 50kDa、Millipore）で、約1/10量となるまで濃縮した。

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の濃縮液について、平衡化・洗浄バッファー（50mM Tris-HCl pH 7.5、0.25M NaCl）で平衡化したプロテインAカラム（HiTrap MabSelect、GE

Healthcare）に流速1 mL/minでアプライし、280nmの吸光度が0.01au以下になるまで平衡化・洗浄バッファーで洗浄した。溶出バッファー（0.1M Gly-HCl pH 3.0）で溶出した後、中和バッファー（2M Tris-HCl pH 8.5）でpH 7.5に調整し、さらに、ミリQ水で2.5mS/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の溶液について、低塩濃度トリスバッファー（50mM 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0.2M NaClを含むトリスバッファーとなるリニアグラジエントで溶出した。280nm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、精製トラスツズマブを得た。各溶出液のHCP濃度は、ELISA Kit（CHO HCP ELISA kit 3G、CYGNUS）を用いて測定した。

B.2.2 CHO-DG44細胞の馴化培地の調製

0.18% Pluronic F-68を添加したDG44培地（GE HealthcareS）に、 2.0×10^5 cells/mLとなるようにCHO-DG44細胞を播種し、1週間、巡回培養（125rpm、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂気流下）した。馴化培地を回収し、350xg、15分間の遠心分離後、上清をろ過フィルター（0.22 μ m）で清澄化した。限外ろ過（Pellicon XL 10kDa、Millipore）で、約1/20量となるまで濃縮し、馴化培地濃縮液とした。

B.2.3 トラスツズマブに吸着して残存するHCP量の評価

低吸着チューブ6本に、それぞれ馴化培地濃縮液400 μ Lを取り、精製トラスツズマブ100 μ L及び低塩濃度トリスバッファー100 μ Lをそれぞれ3本ずつ添加後、氷中で30分間放置し、スパイクサンプル及びコントロールサンプルとした。

各サンプルをプロテインAカラムに流速1 mL/minアプライし、10分間洗浄した。溶出バッファーで溶出した後、中和バッファーでpH 7.5に調整した。各溶出液のHCP濃度は、ELISA Kitを用いて測定した。

B.2.4 ショットガン解析

精製トラスツマブ約100 μ gを凍結乾燥した後、7M guanidine-HCl pH 8.6、0.5M Tris-HCl、5mM EDTAに再溶解した。DTT溶液を添加し、65°Cで30分間インキュベートした。さらに、ヨード酢酸溶液を添加し、室温で40分間反応させた。脱塩カラム (PD MiniTrap G-25、GE Healthcare) で脱塩し、凍結乾燥した。消化バッファー (50mM Tris-HCl pH8.5) に再溶解し、トリプシンを添加した後、37°Cで16時間インキュベートした。遠心乾燥させ、0.1%ギ酸で溶解し、ショットガン解析に供した。

液体クロマトグラフィー (LC) は、Paradigm MS4 (Michrom BioResources) に逆相カラム (L-Column、0.075mm \times 150mm、粒子径 3 μ m、化学物質評価研究機構) を接続して用いた。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。LC及びMSの測定条件は以下の通りである。

A溶媒：0.1%ギ酸、2%アセトニトリル水溶液

B溶媒：0.1%ギ酸、90%アセトニトリル水溶液

グラジエント：5-65% B溶媒、リニア、50分間または120分

流速：0.3 μ L/min

スキャン範囲： m/z 400-2,000

スプレー電圧：4.0 eKV

検出されたマススペクトル、マスマススペクトルについて、検索エンジン SEQUEST (Proteome Discoverer, Thermo Fisher Scientific) を用いてマウスのタンパク質データベース (Swiss-Prot) に対して検索を行い、含有するものと考えられるタンパク質を推定した。

B.2.5 ヌル細胞の培養上清の調製

本研究では、遺伝子を導入していないCHO-DG44細胞株 (ヌル細胞) を用い、昨年度モデルとして開発したトラスツマブ生産システムと同様の工程により調製した。0.1% Pluronic F-68を添加したDG44培地 (GE Healthcare) に、 2.0×10^5 cells/mLとなるよう

にヌル細胞を播種し、7日間、巡回培養 (125rpm、37°C、5% CO₂気流下) した。馴化培地 (CM) を回収し、3000rpm、20分間の遠心分離後、上清をろ過フィルター (0.22 μ m) で清澄化した。限外ろ過 (Pellicon XL 10kDa、Millipore) で、約1/50量となるまで濃縮し、CM濃縮液とした。CM濃縮液のHCP (CM-HCP) 濃度は、Protein Assay kit (Bio-rad) を用いて測定した。

B.2.6 PrAカラムに吸着して残存するHCP量の評価

CM濃縮液 5 mLをPrAカラム (HiTrap MabSelect、GE Healthcare) に流速 1 mL/minでアプライし、15分間、洗浄液 (50mM Tris-HCl pH7.5、0.5 M NaCl) で洗浄した。溶出バッファー (0.1M Gly-HCl pH 3.0) で溶出した後、中和バッファー (2M Tris-HCl pH 8.5) でpH 7.5に調整した。PrA溶出液のHCP (PrA-HCP) 濃度は、ELISA Kit (Cygnus Technologies) を用いて測定した。

B.2.7 PrAカラムに吸着して残存するHCP量の2次元電気泳動による評価

CM濃縮液及びPrA溶出液について、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) を用いて脱塩処理を行い、2% IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare) を含んだDeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) に再懸濁し2次元電気泳動のサンプルとした。Immobiline Dry Strip (pH 3-10, GE Healthcare) にアプライし、500Vで1時間、1000Vで1時間、8000Vで2時間泳動した。平衡化バッファーで、30分間平衡化した後、SDS-PAGEを行った。ゲルはSYPRO Rubyで染色した。

B.3 名称ルールの変更に関する調査研究

WHOのINN専門家協議が発行している International Nonproprietary Names (INN) for biologicals and biotechnological substances (a review) 2014・1版、及び r-INN 情報 (<http://www.who.int/medicines/services/inn/publication/en/index.html>より入手可能)、

“医薬品の名前 ステムを知ればクスリがわかる”、

宮田直樹 編著. じほう、東京 (2013) を調査した。

C. 結果と考察

C.1 糖鎖管理のための薬物動態評価法の開発—抗体医薬品のグリコフォームと体内安定性について

C.1.1 抗TNF- α 親和性ペプチドのスクリーニング、及びペプチドの同定

図2に、本研究で実施した抗体親和性ペプチドのスクリーニング法を示した。adalimumab、infiximab及びgolimumabを固定化したゲルとトリプシン消化により調製したTNF- α 由来ペプチドライブラリーを混合後、ゲルを洗浄し、抗体親和性ペプチドを回収した。回収した親和性ペプチドを40 μ Lの精製水に溶解させ、質量分析用の試料とした後、LC/MSによりマススペクトルを取得した(図3A-3C)。検出されたペプチド由来イオンについて、データ依存的プロダクトイオンスキャン及びデータベース検索によりペプチド同定を行った。図3Dはペプチド1のマススペクトル及びMS/MSスペクトルである。データベース検索の結果、IAVSYQTKと同定された。ペプチド同定結果を表1に要約した。図3A-3Cに示したペプチド1、2、3、4、及び5は、それぞれTNF- α の83-90、7-32、33-44、16-31、及び91-98番目のアミノ酸配列に相当するペプチドと同定された。ペプチド1及び5は、3種類の抗体に共通して親和性を示すペプチドであった。一方、ペプチド2及びペプチド3は、adalimumab及びgolimumabに特異的なペプチドであった。ペプチド4は、infiximab及びgolimumabに共通したペプチドであった。次に、TNF- α の立体構造を考慮したとき、これらの親和性ペプチド候補が内側と外側のどちらに位置するのかを、過去の文献(Nagahira, K., *et al.*, Immunol Lett. 1995, 46, 135-41)を参考に検討した(図4)。その結果、ペプチド2、3及び4は内側、ペプチド1及び5は外側の領域のペプチドであることが示唆された。本研究では、外側に位置するペプチドを抗体が結合するペプチド配列と想定し、ペプチド1を親和性ペプチドとして用いることにした。

C.1.2 ペプチド1を用いた抗体親和性ペプチド固定化カラムの作製

カラムを作成するとき、直接、ペプチドを充填ゲルに結合させると、親和性ペプチドの結合部位付近に抗体がアクセスしにくくなり、親和性が低下する可能性がある。そこで、その立体障害を防ぐことを目的として、ペプチド1のN末端側にリンカー配列(CGSGSGGS)を付加させることとした。その「リンカー配列—ペプチド1」を化学合成し、抗体親和性ペプチドとして用いて(図1A)、B.1.7に示した方法に従って、抗体親和性ペプチド固定化スピンカラムを作製した。

C.1.3 洗浄条件の検討

(1) 洗浄バッファの種類及び塩濃度の検討

抗体親和性ペプチド固定化ゲルを用いて、より操作が簡単なスピンカラムを作製し、使用する洗浄バッファを決めるために、25mM酢酸アンモニウム(AcONH₄) (pH7.0)、150mM AcONH₄ (pH7.0)、及びPBS (pH7.4)を洗浄バッファとして使用したときの抗体回収率を比較した。モデル抗体として、抗TNF- α 抗体のgolimumabを使用した。10 μ Lのgolimumab水溶液(1.0 μ g/ μ L)に90 μ Lの洗浄バッファを加えて試料溶液とした。未吸着画分、洗浄画分、及び吸着画分の回収方法は、B.1.8に記述した方法に従った。未吸着画分、洗浄画分、及び溶出画分の一部を分取して、SDS-PAGEを行った。図5Aは、洗浄バッファとして、25mM AcONH₄ (pH7.0)を用いたときのSDS-PAGEの結果である。未吸着画分、及び洗浄画分ではgolimumab由来のバンドは検出されず、吸着画分のみバンドが検出された(回収率、100%)。一方、図5(B)及び5(C)に示したように、150mM AcONH₄ (pH7.0)、及びPBSを用いたときは、いずれもgolimumabは洗浄画分に分画され、回収は困難であった(回収率、0%)。これらの結果から、親和性ペプチドに結合したgolimumabは、150mM程度の塩を含む洗浄バッファを用いると回収は困難であるが、25mM AcONH₄ (pH7.0)をバッファとして用いることで回収できることが示唆された。

(2) 洗浄バッファーpHの検討

pH5.0、8.0、9.0及び10.0の25mM AcONH₄を洗浄バッファーとして、本カラムによるgolimumabの回収率を検証した(図6)。洗浄バッファーとして、pH 5.0及び8.0の25mM AcONH₄を用いたとき、pH 7.0のときと同様に回収率は100%であった。一方、25mM AcONH₄ (pH9.0) を使用したとき、golimumabの一部は洗浄画分に分画され、回収率は、40%程度であった。さらに25mM AcONH₄ (pH10.0) では、すべて洗浄画分に分画された。以上のことから、洗浄バッファー (25mM AcONH₄) のpHを5~8に調節することで、golimumabを回収できることが明らかとなった。

C.1.6 抗体親和性ペプチド固定化カラムによるその他の抗体医薬品の回収

本カラムのgolimumab以外の抗体医薬品 (muromonab-CD3、palivizumab、omalizumab、daclizumab、cetuximab、trastuzumab、adalimumab、及びinfliximab) への適用可能性を検証した(図7)。10 μ Lの各抗体医薬品の水溶液 (1.0 μ g/ μ L) に90 μ Lの洗浄バッファーを加えて調製した試料溶液をカラムに注入後、未吸着画分、洗浄画分、及び吸着画分を回収し、SDS-PAGEにより回収率を算出した。25mM AcONH₄ (pH7.0) を洗浄バッファーとして用いたとき、daclizumab (図7D、7I) は、高い回収率 (97%) を示したが、その他の抗体医薬品の回収率は、ばらつきがみられ、いずれも低値 (72%~0%) であった。一方、25mM AcONH₄ (pH5.0) を洗浄バッファーとして用いたとき、マウスIgG2a抗体であるmuromonab-CD3の回収率は低値 (56%) であったが(図7A、7I)、その他の抗体医薬品の回収率は、いずれも85%以上と向上した。以上の結果から、洗浄バッファーのpHを最適化することで、様々な抗体医薬品を回収できる可能性が示唆された。

C.1.7 抗体親和性ペプチド固定化カラムにより回収したgolimumabの添加回収率、及び純度の確認

Golimumab (100 μ g/mL) を添加した血漿、及び血

漿のみを試料として、それぞれの吸着画分を回収した後、golimumab、及び血漿のコントロールとともにSDS-PAGEを行った。図8A~8Dは、pHを5.0、6.0、7.0、及び8.0に調製した洗浄バッファー (25mM AcONH₄) を使用したときの結果である。低pHの洗浄バッファーを用いる程、吸着画分の血漿由来タンパク質量に増加する傾向がみられ、逆に、高pHのバッファーで洗浄すると、血漿由来タンパク質の吸着量を低減できることが示唆された。次に、150~170kDa付近に検出されたgolimumabのバンドから、添加回収率、及び純度を算出した(図9)。その結果、添加回収率、及び純度ともに、pH8.0の洗浄バッファーを使用したときに、良好な値を示した (添加回収率、103%; 純度、73%)。以上の結果から、血漿から特異的にgolimumabを回収するための洗浄バッファーとして、25mM AcONH₄ (pH8.0) が適していることが明らかとなった。

C.2 HCP管理手法の開発

C.2.1. 精製トラスツズマブに残存するHCPの同定の試み

精製抗体に残存するHCPをショットガン解析で同定する試みとして、トラスツズマブをモデルとして、プロテインAカラムクロマトグラフィー精製トラスツズマブ及び陽イオン交換クロマトグラフィー精製トラスツズマブを用いた。

ELISAで測定されたHCP残存量は、プロテインAカラムクロマトグラフィー精製トラスツズマブで約1000ppm、陽イオン交換クロマトグラフィー精製トラスツズマブで約10ppm未満であった。ショットガン解析で、少なくとも100ppm程度の検出感度が期待されたが、トラスツズマブ由来ペプチドのみが検出され、HCPと思われるペプチドは検出されなかった。

本実験の結果は、量的に主要なペプチドが優先的に検出され、量的順位が低いHCPが検出されなかったことに起因すると考えられた。そこで、残存するHCPのみを分離し、同定する方策を取ることとした。

C.2.2 プロテインA精製トラスツズマブに吸着して残存するHCP量の評価

原薬に残存するHCPは、目的物質と類似した物理化学的性質を有する、あるいは、精製基材に結合しやすい性質を有すると考えられてきた。このような考えから、欧州薬局方では、部分精製で残存するHCPを免疫学的検出のための抗体作製の抗原として用いることを推奨している。

本研究においても予備的な検討として、抗体との結合特異性の観点から抗体医薬品の初期の精製工程に多用されているプロテインAカラムクロマトグラフィー工程に着目し、トラスツズマブを発現していないCHO-DG44細胞の培養上清を出発材料として、実験的製造と同条件でプロテインAカラムクロマトグラフィー工程を実施した。その結果、トラスツズマブの残存HCP量に比べ、HCPのみで行った精製工程後の残存HCP量は、少ない傾向を示した。また、ある種の抗体医薬品では、抗体医薬品にHCPが吸着することを示唆する報告があった (*Biotechnol. Prog.*, 24, 1115-21, 2008)。したがって、トラスツズマブにおいてもHCPが吸着し、プロテインAカラムクロマトグラフィー工程で残存するHCPの一部となることが予想された。そこで、本研究では、トラスツズマブに吸着するHCPの存在を検証するために、トラスツズマブのスパイクによるHCPの挙動を解析した。

CHO-DG44細胞の馴化培地濃縮液に精製トラスツズマブを添加したスパイクサンプルとコントロールサンプルをプロテインAカラムにアプライし、トラスツズマブ製造システムで確立した条件に従って溶出し、それぞれHCP濃度を測定した結果、コントロールサンプルと比較して、スパイクサンプルの溶出面分のHCP濃度は、約2倍高かった (図10)。

本実験で用いた精製トラスツズマブは、高度に精製されており、残存するHCP量は極めて微量 (10ppm未満) である。したがって、精製トラスツズマブの添加により観察されたHCP量の増加は、トラスツズマブの添加後に吸着したHCPが、トラスツズマブとともに回収されたものと考えられる。

C.2.3 培養上清中及びプロテインAカラムに残存するHCPの2次元電気泳動による解析

前述したように原薬に残存するHCPは、目的物質と類似した物理化学的性質を有するか、あるいは、精製基材に結合しやすい性質を有すると考えられてきた。このような考えから、欧州薬局方では、モック細胞の培養上清を部分精製して残存するHCPを免疫学的検出のための抗体作製の抗原として用いることを推奨している。しかし、残存するHCPが、どのようなタンパク質であるかについては、これまで十分な検討がなされていなかった。

そこで、残存性HCPが、培養上清と質的に異なるのかを検証するために、抗体医薬品の初期の精製工程に多用されているプロテインAカラムクロマトグラフィー工程に着目し、残存性HCP (PrA-HCP) を回収し、培養上清のHCPとの差異を2次元電気泳動で検証した。その結果、培養上清のHCP (CM-HCP) とPrA-HCPの泳動パターンは明らかに異なっていることが明らかとなり、特定のHCP種が残存していることが示唆された (図11)。

C.2.4 培養上清中及びプロテインAカラムに残存するHCPの2次元電気泳動による解析

CM-HCP (40ng相当) とPrA-HCP (20ng相当) について、ショットガンプロテオミクスの手法による解析を行った。各サンプルについて、LC-MS/MSでMSスペクトル、MS/MSスペクトルの測定を3回実施した。得られたMSスペクトルデータについて、CHO細胞のゲノム情報を基に構築されたタンパク質データベース (CHO refseq protein Fasta) に対して検索した結果、CM-HCPから1612個、PrA-HCPから322個のペプチドが同定された。これらのペプチドをコードするタンパク質のうち、1回の解析において、2個以上のペプチドが同定されたタンパク質については、当該タンパク質が同定されたものとした。その結果、CM-HCPから237個、PrA-HCPから50個のタンパク質が同定され、PrA-HCPからのみ同定されたタンパク質は、25個であった。また、半定量ではあるが、主要なペプチドのピーク面積から推定した相対的なタンパク質含量を比較した結果、CM-HCPと

PrA-HCPの両方から検出された25個のタンパク質の量比 (PrA-HCP/CM-HCP) は、タンパク質ごとに異なることが明らかとなり、HCP種ごとに残存しやすさが異なることが示唆された (表2)。

ショットガンプロテオミクスの手法による解析で注意すべき点として、ペプチド断片の組み合わせのみでタンパク質の存在を判断している点が挙げられる。これに関連した事項の一つに、外来タンパク質の混入に留意する必要がある。PrA-HCPからのみ同定された25個のタンパク質のうち12個については、*keratin*であったことは注意すべき事項と考えた。*Keratin*は、コンベンショナルな実験室においては、実験者に由来する脱落皮膚片として環境中に飛散しており、サンプル調製中に混入する恐れがあることが知られている。今回の解析は、コンベンショナルな実験室実施していることから、同定されたタンパク質が混入によるものかを検討するために、ヒトのタンパク質データベース (Swiss-Prot-Human) に対する検索を試みた。CHO細胞の由来動物であるハムスターとヒトにおいては、*keratin*の相同性が高いものの、一部に異なる配列が存在する。この違いを利用して検討した結果、*Keratin*と同定されたうち2個のタンパク質については、CHO細胞に特徴的な配列の*keratin*由来ペプチドが検出されていたことから、残存性HCPと判断した。一方、他の10個の*keratin*については、ヒト*keratin*と共通した配列を持つペプチドから同定されていたものでCHO由来であるか断定できなかったが、ヒトデータベースに対する検索でヒトに特徴的な配列を有するペプチドが新たに同定されたことから、精製操作あるいは解析操作過程で混入したヒト*keratin*を検出したものと判断し、残存HCPリストから除外した。したがって、今回実施したショットガンプロテオミクスの手法による解析の結果、PrA-HCPから40個のHCPが同定され、このうちPrA-HCPからのみ同定されたHCPは、15個と結論付けた (図12)。

本研究で実施した解析において、CM-HCPと比べてPrA-HCPの同定数は少なかった。しかし、PrA-HCPからのみ同定されたHCPが、15個であった点は、特筆できる。これらのHCPは、培養上清中の含量が少

なかったため同定されなかったが、プロテインAカラムクロマトグラフィーで残存性HCPが濃縮された結果、検出されたものと考えられる。2次元電気泳動のパターンの差異と合わせて考えると、培養上清中のHCPの一部が、カラム基材等に吸着性で残存していることが示唆される。すなわち、管理すべきHCPは、残存性HCPであると結論付けられる。したがって、HCPのMRMを行うための定量用ペプチドのMSスペクトル情報を得るための解析ソースとして、部分精製により得た残存性HCPを用いることは有用であると考えられた。また、ショットガンプロテオミクスの手法による解析で得られたペプチド情報を基とし、MRMを用いたHCPの管理手法の開発が、今後の課題となった。

C.3 名称ルールの変更に関する調査研究

C.3.1 核酸医薬品

命名ルールの変更について調査し、核酸医薬品に2つのpre-stem、すなわち、アプタマーを示す「-*apt*-」、及びsmall interfering RNAの「-*siran*-」が追加されたことを確認した。これまで核酸医薬品のステムとしてはアンチセンス「-*rsen*」しか設定されておらず、アンチセンス以外の核酸医薬品は他のステムを用いて命名されてきた。たとえば、日本で唯一承認されている核酸医薬品であるペガプタニブ *pegaptanib* は、結果的に名称の中に*apt*を含んではいるが、命名の基本となるステムは、血管新生阻害の「-*anib*」である。今後は「-*rsen*」に加え、新たに2つのpre-stemが適用されることになり、名称から、作用機序だけでなく、骨格が核酸であることも読み取れるようになる。尚、核酸医薬品の中にはToll like receptorのアゴニスト作用を持ち、アジュバントとして利用される医薬品が「-*tolimod*」を用いて命名されているが、このサブステムから核酸医薬品であることを読み取るのは難しいと思われる。現在、「-*apt*」、「-*siran*」、「-*tolimod*」を用いて命名されている医薬品として、以下の品目がある。

-*apt* :

egaptivon pegol, emapticap pegol, lexaptrepid pegol,

olaptosed pegol, pegaptanib,

-siran:

asvasiran, bamosiran, bevasiranib, patisiran, revusiran

-tolimod:

agatolimode, entolimod, rintatolimod,

C.3.2 抗体医薬品

「-*mab*」はモノクローナル抗体 (monoclonal antibody) を表すステムである。モノクローナル抗体は、接頭辞、サブステムA、サブステムB及びステム「-*mab*」を用いて命名される。サブステムAは標的分子を表す(表3)。2009年にサブステムAが見直され、細菌類「-*b(a)-*」、心臓血管系「-*c(i)-*」菌類「-*f(u)-*」、インターロイキン類「-*k(i)-*」、免疫調整分子「-*l(i)-*」、神経系分子「-*n(e)-*」、骨「-*s(o)-*」、腫瘍「-*t(u)-*」、トキシン「-*tox(a)-*」及びウイルス「-*v(i)-*」が設定されたところであるが、2014年版には、骨格筋量に関する成長因子及び受容体を表すサブステムとして「-*gr(o)-*」が設定されている。このサブステは抗悪性腫瘍治療などを目的とした抗成長因子抗体には使用されない。「-*gr(o)*」を持つ抗体として、アクチビンタイプII受容体を標的とした*bimagrumab*が収載された。

C.3.3 受容体

「-*cept*」は、受容体分子 (receptor molecule) に共通のステムである。受容体のターゲット分子を示すサブステムを接中辞として「-*cept*」の前に挿入する。これまで設定されていた接中辞は表4の(1)から(6)に示す6つであったが、新たに表2の(7)~(12)が追加された。多様な分子をターゲットとする医薬品が開発されていることが窺える。現在21品目が収載されているが、5品目 (*onercept*、*pegsunercept*、*mirococept*、*bifarcept*、*alvicept sudotox*) 以外の品目は、いずれも体内安定性を延長させるため、IgGのFc部分との融合タンパク質として開発されている。

C.3.4 ペプチド

ペプチドを示すステム「-*tide*」は様々な品目に用いられているが、サブステムが明確に示されているものは多くない。その中で、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 類縁体に「-*glutide*」が、また、免疫化剤(ワクチン)に「-*motide*」が設定された。「-*glutide*」及び「-*motide*」を持つ医薬品として、以下のものが収載されている。

-*glutide*:

albiglutide, dulaglutide, elsiglutide, liraglutide, semaglutide, taspoglutide, teduglutide

-*motide*:

abecomotide, alicdamotide, amilomotide, asudemotide, disomotide, elpamotide, latromotide, ovemptide, pradimotide, tanurmotide, tecemotide, tertomotide, tiplimotide, trempamotide, zastumotide

C.3.5 融合タンパク質

遺伝子組換え技術や免疫原性予測技術の進展は、ターゲット分子が異なる2つのタンパク質を融合し、複数の薬理的特徴をもつ医薬品を創り出すことを可能とした。また、抗体医薬品で得られた臨床実績は、細胞毒性が強いなどの安全性上の問題により開発が中断されていた低分子化合物を、抗体薬物複合体という形で新たに展開させることを可能にした。このような融合タンパク質及び抗体薬物複合体の開発動向に合わせて、命名ルールがいくつか見直されたようである。

(1) アルブミン融合タンパク質

血中半減期の延長を目的として、アルブミンと他のタンパク質を融合させた医薬品が開発されており、これらはアルブミンを表す接頭辞「*alb-*」とそのタンパク質のステムを用いて命名される。現在までに以下の5品目がこのルールに基づいて命名されている。

alb- & -cog

albutrepenonacog alfa : 血液凝固第IX因子アナログとの融合

alb & -interferon

albinterferon alfa-2b : インターフェロン アルファ-2bとの融合

alb & -tide

albenatide : エキセナチドアナログとの融合

albiglutide : GLP-1アナログとの融合

Others (-al- & -grastim)

balugrastim : G-CSFアナログとの融合

(2) Fc融合タンパク質

初期のFc融合タンパク質は、エタネルセプトのように、主に受容体タンパク質にFc部分を融合させたものであった。当時は、受容体「-cept」を用いて命名されていたが、Fcとの融合は、受容体タンパク質に留まらず、表5のように様々なタンパク質親和性ペプチドとのFc融合タンパク質が開発された。その都度、親和性ペプチドの特性を考慮したステムを用いて命名されてきたが、名称からはFc融合タンパク質であることが読み取れなかった。Fc部分の重要性を考慮し、INN専門家協議は、Fc融合タンパク質には接頭辞として「ef-」を用いることとした。表6は「ef-」を用いて命名されたINNである。「-grastim」、「-octocog」, 「-nonacog」など由来を示すステムと組み合わせて命名されているので、由来や構造が理解しやすくなっている。

(3) 抗体薬物複合体

抗体薬物複合体は2語式で命名される。一語目は抗体で、抗体命名ルールに基づく。二語目は薬物で、2014年現在、「-dotin」及び「-tansine」をステムとする薬物が収載されている。「-dotin」は、有糸分裂阻害作用を有するモノメチルアウリスタチンEをもつ薬物に用いられ、抗体薬物複合体として収載されている薬物は現在のところベドチン*vedotin*のみである

(図13)。「-tansine」は*maitansine*誘導体に用いられ、リンカーの異なる*mertansine*、*ravtansine*及びエムタリンシン*emtansine*が収載されている(図14)。「-dotin」及び「-tansine」を持つ抗体薬物複合体は以下の通りである。

-mab & -dotin :

brentuximab vedotin, *enfortumab vedotin*,
lifastuzumab vedotin, *pinatuzumab vedotin*,
polatuzumab vedotin, *sofituzumab vedotin*,
denintuzumab vedotin

-mab & -tansine:

anetumab ravtansine, *cantuzumab ravtansine*,
coltuximab ravtansine, *indatuximab ravtansine*,
cantuzumab mertansine,
lorvotuzumab mertansine,
trastuzumab emtansine,
(H26)

D. 結論

- 1) 抗体医薬品親和性ペプチド固定化スピンカラムを用いることで、様々な抗体医薬品を簡便かつ迅速に高収率で回収できることが明らかとなった。また、血漿中の*golimumab*を特異的かつ高収率で回収できることが確認された。本カラムは、血中抗体医薬品の糖鎖を解析するための前処理方法として有用である。
- 2) プロテインAカラムクロマトグラフィー工程において、部分精製で残存HCPを回収する際には、目的物質である抗体医薬品に吸着するHCPに留意する必要がある。
- 3) ショットガンプロテオミクスの手法による解析を実施し、いくつかの残存性HCPを同定した。今後、定量用ペプチドプローブリストを作成する予定である。
- 4) INNの命名ルールに以下のpre-stem及びサブステムが追加されたことが確認された。最近のバイオ医薬品開発動向を反映したものと思われる。

- pre-stemの設定
 - ・ 「-apt」 アプタマー
 - ・ 「-siran」 siRNA
- サブシステムの追加
 - ・ 「-ba-」 B細胞活性化因子受容体
 - ・ 「-fri-」 frizzled受容体
 - ・ 「-na-」 インターロイキン-1 受容体
 - ・ 「-ta-」 CTLA-4受容体
 - ・ 「-taci-」 transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
 - ・ 「-ter-」 TGF受容体
 - ・ 「-gr(o)-」 抗体医薬品の標的、
 - ・ 「-glutide」 GLP-1類縁ペプチド、「-motide」 がんワクチン、
 - ・ 「-alb-」 アルブミン融合タンパク質、「-ef-」 Fc融合タンパク質
 - ・ 「-mab&-dotin」 抗体薬物複合体（モノメチルアウリスタチンE類）
 - ・ 「-mab&-tansine」 抗体薬物複合体（マイタニンシン類）

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryosuke Kuribayashi, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Nana Kawasaki: Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/ mass spectrometry with a column-switching system. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 67-68, 1-9 (2012)
- 2) Shiori Nakazawa, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Nana Kawasaki: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 420 (1), 61-7 (2012)
- 3) 川崎ナナ:生物薬品の局方収載の現状と課題 (Current Status and Issues of Biologicals in

Japanese Pharmacopoeia), レギュラトリーサイエンス学会誌, 2014, 4(2): 149-154.

- 4) 川崎ナナ: 8. バイオ後続品の品質評価の現状と課題, 特集1 バイオシミラーの今後のあるべき姿〜ジェネリック医薬品も視野に〜, 医薬ジャーナル, 2014, 50(5): 91(1375)-96(1380).
- 5) 奥田晴宏, 川崎ナナ: “16.7その他の医薬品と関連物質”, IV編 有機・高分子化学品/材料, 16章医薬品, 編集委員長 辰巳 敬, 第7版化学便覧応用化学編, 公益社団法人日本化学会, 丸善出版株式会社, 東京, 2014, pp.1079-1084
- 6) 石井明子, 川崎ナナ: “2節バイオ医薬品(組換えタンパク質医薬品)の品質関連規制と対応の留意点”, 第13章 細胞培養製品の品質に関する規制・ガイドラインへの対応, 《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, 株式会社技術情報協会, 東京, 2014, pp.523-532

2. 学会発表

- 1) 栗林亮佑, 橋井則貴, 原園景, 川崎ナナ: カラムスイッチング法と液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた抗体医薬品の不均一性迅速解析法. BMSシンポジウム (2012, 11, 19) 東京
- 2) 中澤志織, 橋井則貴, Joomi Ahn, 廣瀬賢治, 川崎ナナ: 水素/重水素交換質量分析によるヒトインスリンアナログの多量体安定性解析. BMSシンポジウム (2012, 11, 19) 東京
- 3) 川崎ナナ: バイオ医薬品の新しい品質管理戦略と展望. BMSシンポジウム (2012, 11, 19) 東京
- 4) 川崎ナナ: バイオ医薬品のFIH試験の課題. レギュラトリーサイエンス学会第1回学術大会シンポジウム. (2012, 9, 2-3) 東京
- 5) Hashii, N., Kuribayashi, R., Kawasaki, N.: Alteration of glycan profile during early-stage of mesenchymal stem cell differentiation. 19th International Mass Spectrometry Conference, (2012, 9, 15-21) Kyoto

- 6) Nakazawa, S., Hashii, N., Kawasaki, N.: Analysis of interaction between TNF-alpha and anti-TNF-alpha agents by hydrogen deuterium exchange/mass spectrometry. 19th International Mass Spectrometry Conference, (2012, 9, 15-21) Kyoto
- 7) Nakazawa, S., Ahn, J., Hashii, N., Hirose, K., Kawasaki, N.: Local dynamics analysis of human insulin and a rapid-acting insulin analog by hydrogen deuterium exchange/mass spectrometry. ASMA
- 8) 川崎ナナ：バイオ医薬品の品質管理. クオリティ・バイ・デザインと質量分析. BMSコンファレンス (2013.7.8-10) (宮崎市)
- 9) 橋井則貴：抗体医薬品高親和性ペプチドカラムの開発とバイオアナリシスへの応用. 第61回質量分析総合討論会 (2013. 9) (つくば市)
- 10) Hyuga, M., Takakura, D., Hashii, N., Ishii, A., Niimi, N., Kawasaki, N.: Shotgun proteomics of residual host cell derived proteins in Protein A chromatography eluate, Measurement of Residual Host Cell Protein and DNA in Biotechnology Products Workshop (2013.6)(Rockville, MD, USA)
- 11) 川崎ナナ：バイオ医薬品のQbDアプローチ開発, 2014, 製材機械技術学会第24回大会
- 12) 川崎ナナ：躍進する抗体医薬品—現状と課題, 2014, 第58回日本薬学会関東支部大会
- 13) 川崎ナナ：バイオ医薬品の開発・製造と質量分析, 2014, 第11回日本質量分析学会 北海道談話会・講演会
- 14) 川崎ナナ：バイオ後続品の現状と課題, 2014, 日本ジェネリック医薬品学会第8回学術大会
- 15) 川崎ナナ：バイオシミラーの類似性評価における課題, 2014, 第3回DIA CMCフォーラム

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 抗TNF- α 抗体親和性ペプチド同定結果

Peptide	配列	位置	<i>m/z</i>	Charge state	Observed MW (monoisotopic)	Theoretical MW (monoisotopic)
Peptide 1	IAVSYQTK	83-90	455.26	2 ⁺	908.51	908.50
Peptide 2	TPSDKPVAHVVANPQAEGLQWLNR	7-32	728.65	4 ⁺	2910.60	2910.52
Peptide 3	ANALLANGVELR	33-44	620.86	2 ⁺	1239.72	1239.69
Peptide 4	VVANPQAEGLQWLNR	16-31	911.99	2 ⁺	1821.98	1821.95
Peptide 5	VNLLSAIK	91-98	429.28	2 ⁺	856.56	856.55

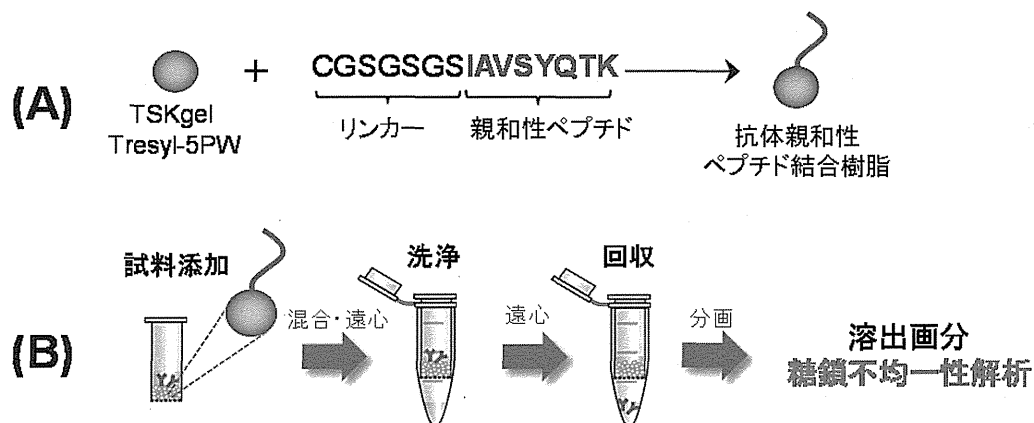


図 1. (A) 抗体親和性ペプチド樹脂の調製、(B) 抗体親和性ペプチド樹脂を充填した簡易カラムによる抗体の回収・濃縮法

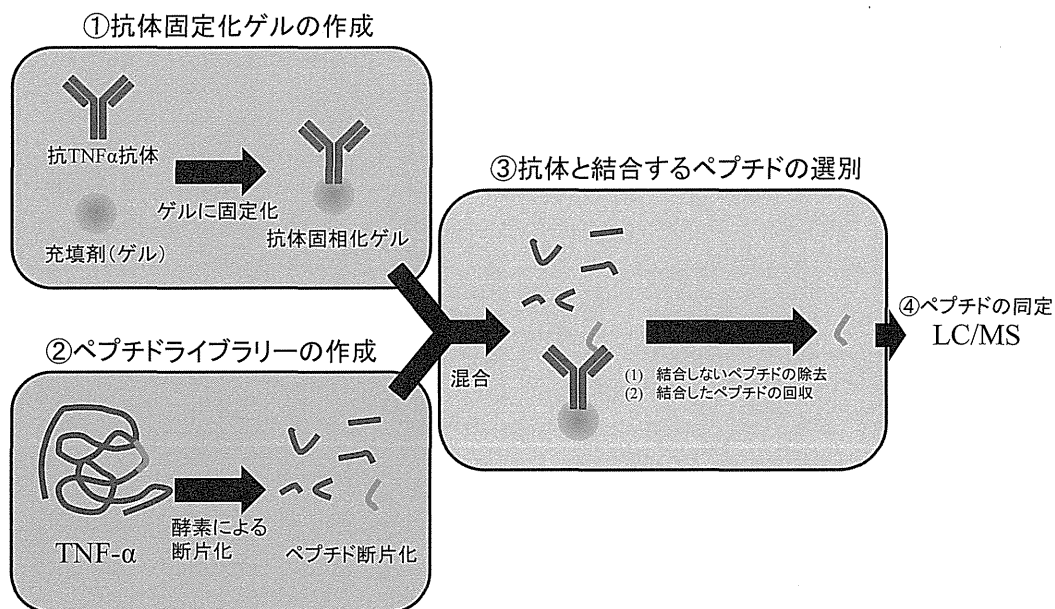


図 2. 親和性ペプチドのスクリーニング法

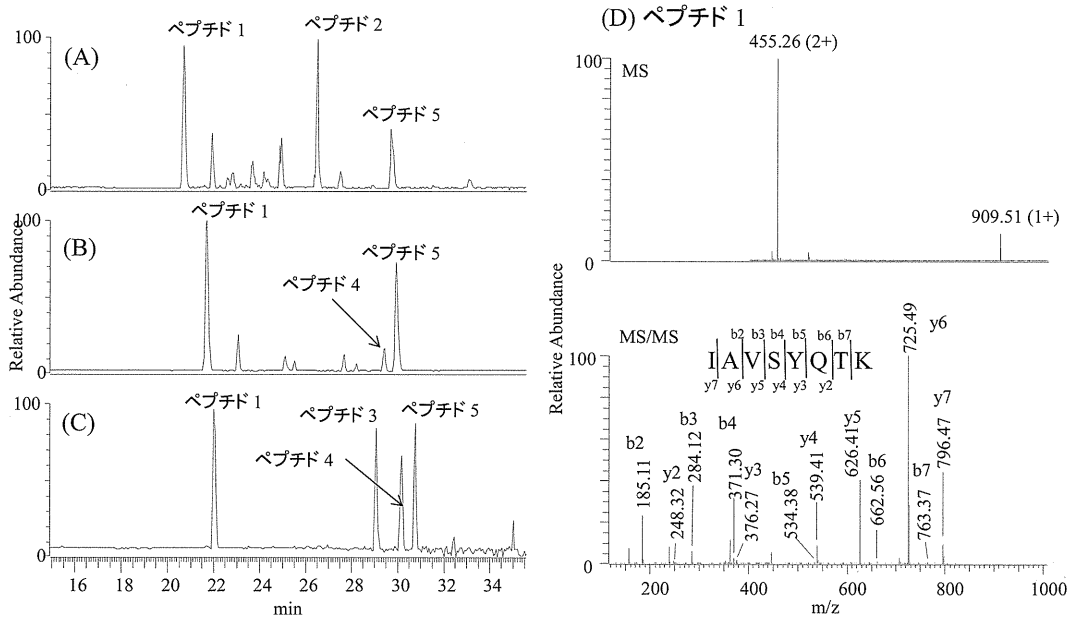


図3. LC/MS及びデータベース検索によるTNF- α 由来親和性ペプチドの同定
 LC/MSにより取得されたアダリムマブ (A)、インフリキシマブ (B)、
 及びゴリムマブ (C) 親和性ペプチドのトータルイオンカレントクロマトグラム。
 (D)、ペプチドの一次構造決定例。上段、ペプチド1のMSスペクトル；
 下段、MS/MSスペクトル、及びデータベース検索によるプロダクトイオンの帰属結果。

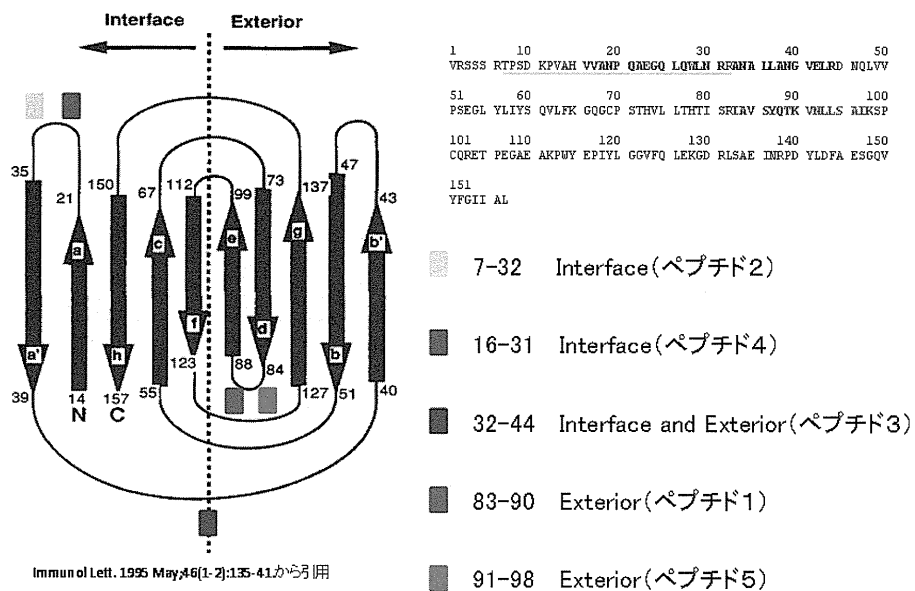


図4 同定したTNF- α 由来ペプチドの位置

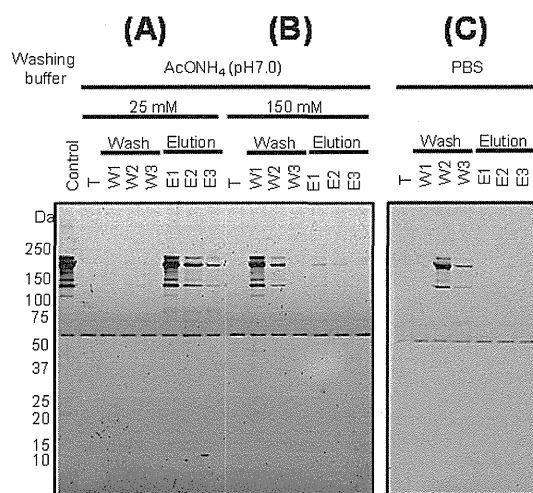


図5. 洗浄条件の検討(1)。洗浄バッファー：(A)、25mM AcONH₄ (pH 7.0)；(B)、150mM AcONH₄ (pH7.0)；(C)、PBS。サンプル、golimumab 10mg；溶出バッファー、0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS；T、未吸着画分；W1-W3、洗浄画分；E、吸着画分。各フラクションは、300mlずつ分取した。

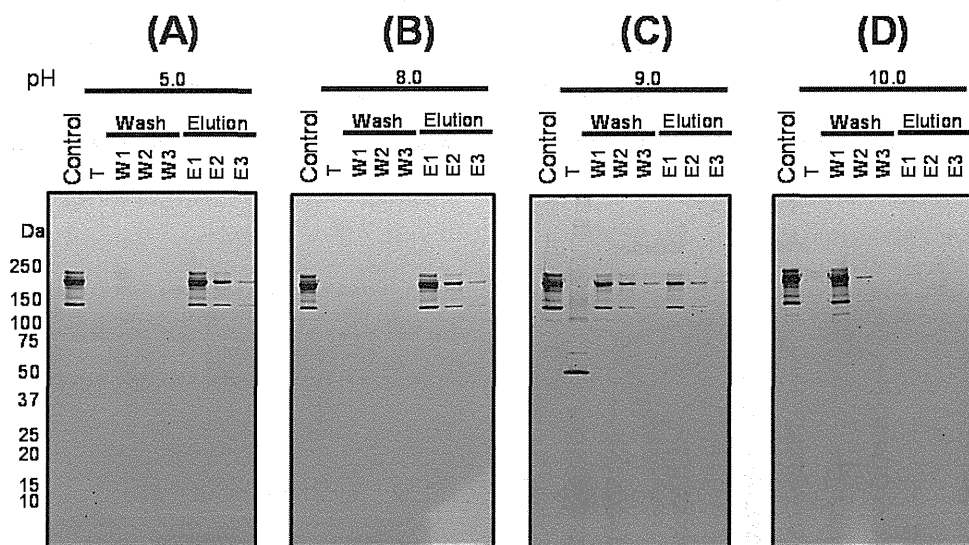


図6 洗浄条件の検討(2)。洗浄バッファー：25mM AcONH₄ pH 5.0 (A)；pH8.0 (B)；pH9.0 (C)；pH10.0 (D)。サンプル、golimumab 100mg；溶出バッファー、0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS；T、未吸着画分；W1-W3、洗浄画分；E、吸着画分。各フラクションは、300mlずつ分取した。

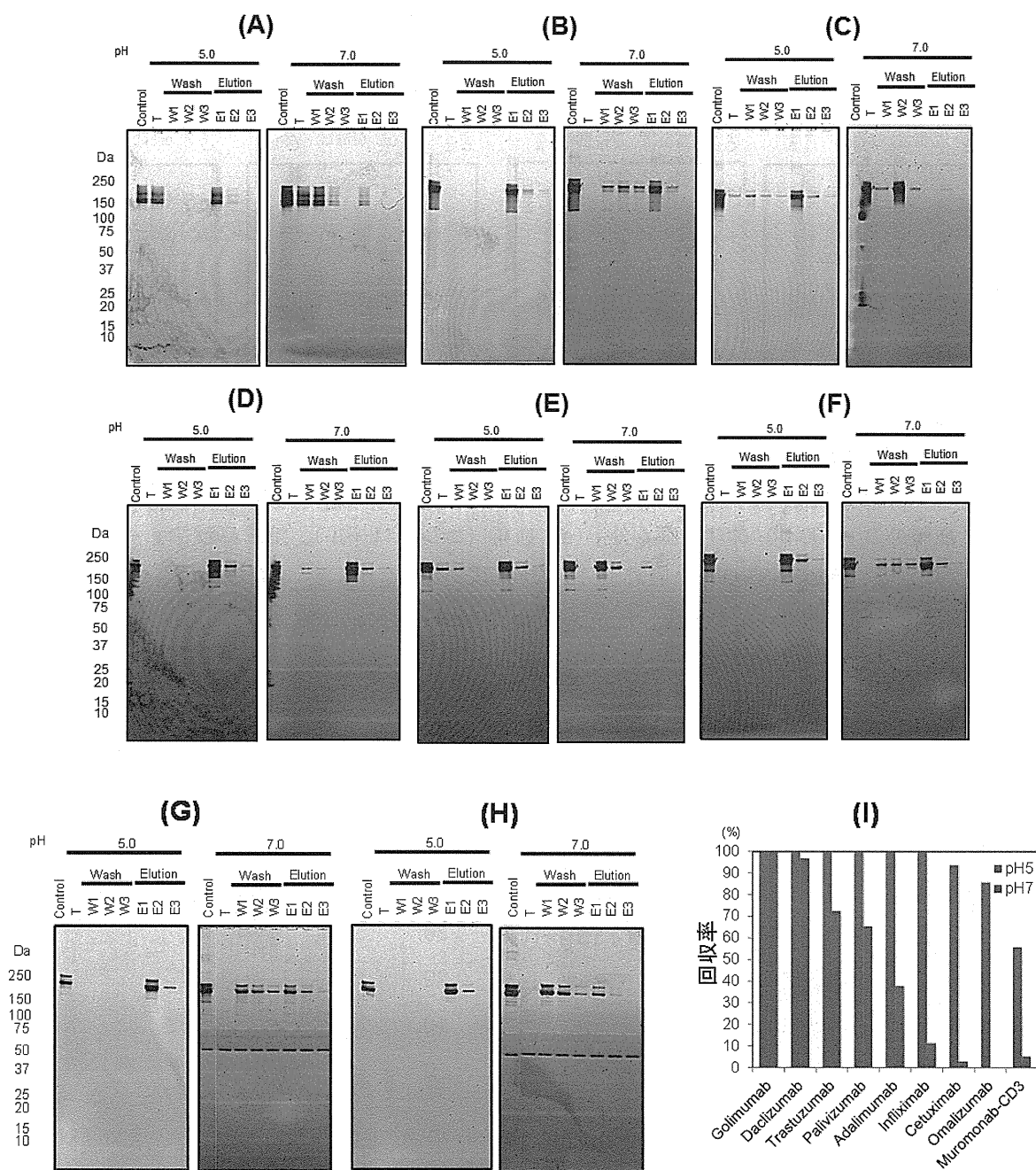


図7. 抗体親和性カラムを用いた抗体医薬品の回収。洗浄バッファーとして、25mM AcONH₄ pH5.0、及び pH7.0を使用した。サンプル (100mg) : (A)、muromonab-CD3 ; (B)、palivizumab ; (C)、omalizumab ; (D)、daclizumab ; (E)、cetuximab ; (F)、trastuzumab ; (G)、adalimumab ; (H)、infliximab. (I)、回収率の要約。溶出バッファー、0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS ; T、未吸着画分 ; W1-W3、洗浄画分 ; E、吸着画分。各フラクションは、300mlずつ分取した。回収率は、未吸着画分、洗浄画分、及び溶出画分のバンドの総体積に対する溶出画分のバンドの体積の比率 (%) として算出した。

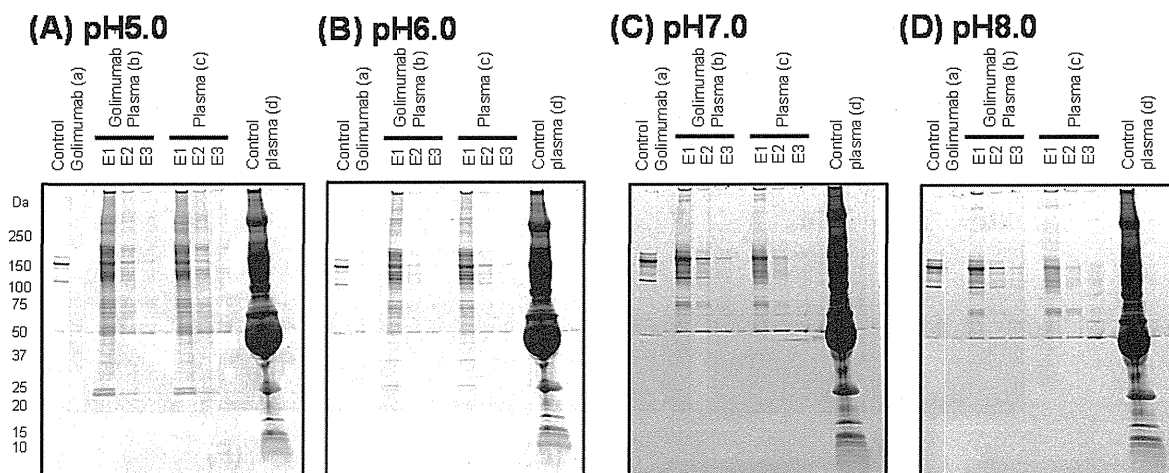


図8 特異性の確認。洗浄バッファー：25mM AcONH₄ pH 5.0 (A)；pH6.0 (B)；pH7.0 (C)；pH8 (D)。サンプル：(a)、golimumab (コントロール)；(b)、golimumab (10mg) を添加した血漿 (100ml) の溶出画分；(c)、血漿のみ (100ml) の溶出画分；(d) 血漿 (コントロール)。溶出バッファー、0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS；T、未吸着画分；W1-W3、洗浄画分；E、吸着画分。各フラクションは、300mlずつ分取した。(a)、コントロールのgolimumab。

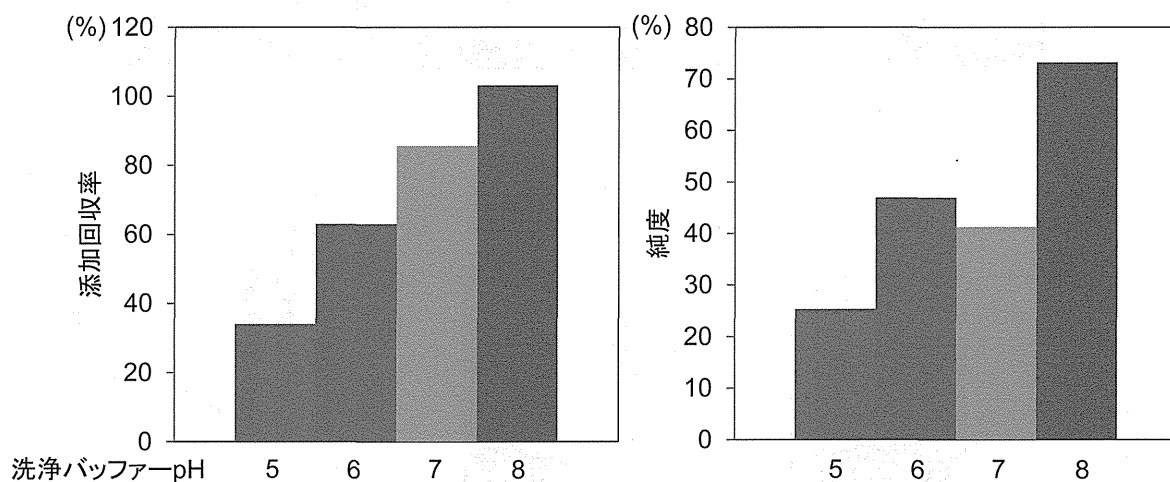


図9 golimumabを血漿に添加したとき (100mg/ml, 100ml) の添加回収率及び純度。(A) 添加回収率 [(b) 抗体バンド体積 - (c) 抗体バンド体積] / (a) バンド体積 (%)]、及び (B) 純度 [(b) 抗体バンド体積 - (c) 抗体バンド体積] / (b) バンド体積 (%) は、図8のSDS-PAGEの結果に基づき算出した。