

図10 トラスツズマブのスパイクによる残存HCP量の影響

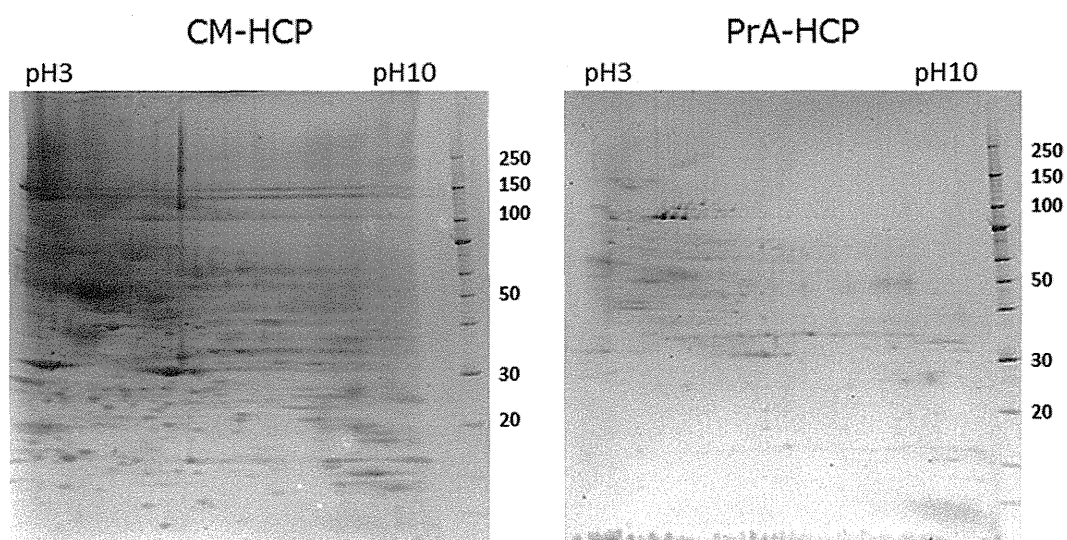


図11 2次元電気泳動によるHCPの比較。

培養上清のHCP (CM-HCP、300 μ g) とプロテインAカラムクロマトグラフィーの残存性HCP (PrA-HCP、10 μ g) について2次元電気泳動で分離し、SYPRO Rubyで検出した。

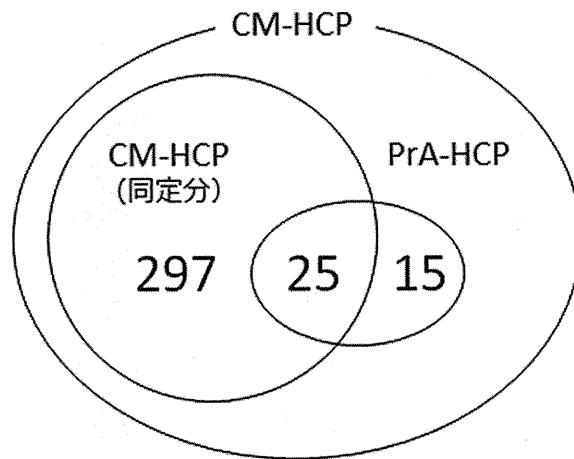


図12 同定されたタンパク質数を示したベン図。

培養上清のHCP (CM-HCP) として237個、プロテインAカラムクロマトグラフィーの残存性HCP (PrA-HCP) として40個のタンパク質が同定された。このうち、PrA-HCPからのみ同定されたタンパク質は、15個であった。

表 2 同定されたタンパク質のリスト (1/4)

Accession	Description	XCoverage	Z#FSMs	Maximun Area		Ratio	CM-HCP identified #	PrA-HCP identified #	CM-HCP		
				CM-HCP	PrA-HCP				1	2	3
354500555	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 6A [Cricetulus griseus]	18.03	106				0	9	0	0	0
354502621	PREDICTED: nuclease-sensitive element-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	19.58	65				0	4	0	0	0
354479720	PREDICTED: desmoplakin [Cricetulus griseus]	5.02	56				0	8	0	0	0
354498558	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 42 [Cricetulus griseus]	14.16	49				0	6	0	0	0
354500381	PREDICTED: serine protease HTRA1-like [Cricetulus griseus]	14.47	38				1	2	1	1	1
354504022	PREDICTED: myosin-9 [Cricetulus griseus]	6.70	31				0	7	0	0	0
354471168	PREDICTED: lysyl oxidase homolog 4 [Cricetulus griseus]	20.05	16				0	5	0	0	0
354480050	PREDICTED: histone H1.2-like [Cricetulus griseus]	11.79	16				0	3	0	0	0
354477991	PREDICTED: charged multivesicular body protein 4b-like [Cricetulus griseus]	16.81	15				0	3	0	0	0
354485076	PREDICTED: junction plakoglobin [Cricetulus griseus]	8.32	15				0	3	0	0	0
354488183	PREDICTED: matrix metalloproteinase-19 [Cricetulus griseus]	11.24	9				1	2	1	1	1
354472325	PREDICTED: tubulointerstitial nephritis antigen [Cricetulus griseus]	11.18	9				0	3	0	0	0
354469338	PREDICTED: EMILIN-1 [Cricetulus griseus]	5.41	6				0	2	0	0	0
354498145	PREDICTED: lysyl oxidase homolog 3 [Cricetulus griseus]	8.39	6				0	2	0	0	0
354508080	PREDICTED: myosin-9-like, partial [Cricetulus griseus]	15.60	4				0	2	0	0	0
354500563	PREDICTED: hypothetical protein LOC100752858 [Cricetulus griseus]	9.10	87				1	7	1	0	1
354508182	PREDICTED: hypothetical protein LOC100767830, partial [Cricetulus griseus]	13.93	31				0	2	0	0	0
354508072	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10-like, partial [Cricetulus griseus]	17.27	33				0	5	0	0	0
354498554	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 14-like [Cricetulus griseus]	22.57	119				0	9	0	0	0
354498556	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 16-like [Cricetulus griseus]	24.47	101				0	9	0	0	0
354498560	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 17 [Cricetulus griseus]	15.28	63				0	7	0	0	0
354505985	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 2 oral-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	7.87	51				0	4	0	0	0
354500571	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 5-like [Cricetulus griseus]	33.00	142				0	16	0	0	0
354500573	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 71 [Cricetulus griseus]	3.91	12				0	2	0	0	0
354504763	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 75-like [Cricetulus griseus]	10.22	54				0	7	0	0	0
354484753	PREDICTED: granulins isoform 2 [Cricetulus griseus]	55.74	307	9.53666	8.77267	9.20	12	5	12	11	12
354483018	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein [Cricetulus griseus]	20.17	207	6.02565	3.40466	5.65	4	32	3	2	4
354468511	PREDICTED: high mobility group protein 81-like [Cricetulus griseus]	31.82	118	2.69966	1.07767	3.99	6	6	6	6	6
354484377	PREDICTED: high mobility group protein 82-like [Cricetulus griseus]	18.56	36	4.76765	1.20766	2.53	3	5	1	2	3
354505689	PREDICTED: lactadherin-like, partial [Cricetulus griseus]	18.06	28	1.42866	3.11166	2.18	2	2	2	2	2
354494385	PREDICTED: fibronectin isoform 3 [Cricetulus griseus]	25.29	245	1.54166	3.34366	2.17	10	25	7	10	10
354495632	PREDICTED: nidogen-1-like, partial [Cricetulus griseus]	63.03	287	3.84066	7.07266	1.84	16	20	16	16	15
354488129	PREDICTED: nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like [Cricetulus griseus]	41.86	54	1.66866	2.97666	1.78	5	3	5	5	5
354473313	PREDICTED: metalloproteinase inhibitor 2-like [Cricetulus griseus]	44.76	108	2.70166	4.22866	1.57	5	4	5	4	4
354501005	PREDICTED: lactadherin-like, partial [Cricetulus griseus]	30.46	27	4.42165	6.71065	1.52	4	2	3	4	3
354490982	PREDICTED: nidogen-1-like, partial [Cricetulus griseus]	44.42	212	8.80866	1.03267	1.17	13	10	13	13	9
354502803	PREDICTED: nucleolin [Cricetulus griseus]	20.60	119	4.33666	4.81566	1.11	10	7	8	9	10
354482553	PREDICTED: thrombospondin-1 [Cricetulus griseus]	11.20	58	1.30566	8.01565	0.61	6	3	4	5	6
354478507	PREDICTED: peroxidasin homolog [Cricetulus griseus]	13.29	50	2.19266	1.10866	0.51	5	6	3	5	4
354477555	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: plasminogen activator inhibitor 1-like [Cricetulus griseus]	25.37	34	2.34766	6.22465	0.27	5	2	4	3	5
354472939	PREDICTED: extracellular matrix protein 1-like [Cricetulus griseus]	29.48	77	2.82366	6.86465	0.24	10	2	9	10	10
354497139	PREDICTED: procollagen C-endopeptidase enhancer 1 [Cricetulus griseus]	35.47	72	4.14366	1.00166	0.24	8	2	8	8	8
354501828	PREDICTED: protein CYR61 [Cricetulus griseus]	31.22	27	1.85066	4.46565	0.24	4	2	3	3	4
354497282	PREDICTED: actin, cytoplasmic 2-like, partial [Cricetulus griseus]	52.30	159	8.94166	1.65766	0.19	12	5	12	12	10
354473282	PREDICTED: galectin-3-binding protein-like [Cricetulus griseus]	34.84	82	4.44266	6.70065	0.15	9	2	9	9	9
354499945	PREDICTED: alpha-anolase [Cricetulus griseus]	51.52	228	2.80467	2.94566	0.11	14	2	13	14	14
349501082	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Cricetulus griseus]	62.76	202	2.40667	2.23766	0.09	10	6	9	10	8
354486063	PREDICTED: clusterin-like [Cricetulus griseus]	34.16	240	3.90067	2.44466	0.06	11	7	10	10	11
354473486	PREDICTED: pyruvate kinase isozymes M1/M2-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	62.34	320	2.49367	1.27766	0.05	23	5	23	23	23
354494438	PREDICTED: sulfated glycoprotein 1 [Cricetulus griseus]	52.68	298	2.23367	5.90665	0.03	23	2	18	23	22
354471469	PREDICTED: chondroitin sulfate proteoglycan 4 [Cricetulus griseus]	36.89	478				46	0	46	44	45
350539823	heat shock cognate 71 kDa protein [Cricetulus griseus]	59.44	322				25	1	24	23	25
354494109	PREDICTED: legumain [Cricetulus griseus]	44.98	303				13	0	11	13	13
346227155	elongation factor 2 [Cricetulus griseus]	51.17	281				28	1	25	28	25
354468711	PREDICTED: cathepsin 2 [Cricetulus griseus]	61.11	242				13	0	13	13	13
346986359	elongation factor 1-alpha 1 [Cricetulus griseus]	47.40	203				12	1	11	11	12
350540646	phosphoglycerate kinase 1 [Cricetulus griseus]	55.40	157				14	0	11	14	14
350540064	heat shock protein HSP 90-alpha [Cricetulus griseus]	36.15	155				16	1	16	16	16
354496071	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase A isoform 1 [Cricetulus griseus]	62.91	147				12	0	11	12	12
354476740	PREDICTED: lysosomal protective protein isoform 2 [Cricetulus griseus]	34.65	141				13	0	10	12	11
354467411	PREDICTED: transketolase-like [Cricetulus griseus]	43.98	139				12	0	9	13	13
354481801	PREDICTED: N-(4)-beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	58.38	137				9	0	9	9	9
354474198	PREDICTED: glypican-3-like [Cricetulus griseus]	27.86	133				13	0	12	13	13
354479029	PREDICTED: heat shock protein HSP 90-beta-like [Cricetulus griseus]	36.60	120				15	1	14	14	15
346227178	L-lactate dehydrogenase A chain [Cricetulus griseus]	62.05	118				12	0	12	11	12

* ヒト由来のkeratinと判断されたタンパク質については、グレーで示した。

表2 同定されたタンパク質のリスト (2/4)

354503280	PREDICTED: annexin A2-like, partial [Cricetulus griseus]	66.08	113					12	1	11	12	12
354474409	PREDICTED: SPARC-like [Cricetulus griseus]	44.63	108					12	0	10	12	10
354507493	PREDICTED: cathepsin L1-like [Cricetulus griseus]	31.53	108					9	0	9	9	9
354500481	PREDICTED: filamin-A [Cricetulus griseus]	17.30	98					19	0	16	17	19
354485253	PREDICTED: adipocyte enhancer-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	20.96	98					13	0	13	10	13
350537423	78 kDa glucose-regulated protein [Cricetulus griseus]	30.28	95					12	1	11	12	12
354496812	PREDICTED: annexin A1-like [Cricetulus griseus]	46.24	94					12	0	11	11	12
354500404	PREDICTED: metalloproteinase inhibitor 1-like [Cricetulus griseus]	49.75	93					8	0	8	7	8
354485381	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: amyloid beta A4 protein [Cricetulus griseus]	30.77	92					14	0	11	12	14
354487462	PREDICTED: thioredoxin reductase 1, cytoplasmic [Cricetulus griseus]	30.77	92					11	0	10	11	11
354496408	PREDICTED: galactin-1-like [Cricetulus griseus]	64.44	92					6	0	6	6	5
354477852	PREDICTED: follistatin-related protein 1-like [Cricetulus griseus]	46.08	91					11	0	9	10	11
350537945	peroxiredoxin-1 [Cricetulus griseus]	63.82	89					8	0	5	8	8
354482483	PREDICTED: vimentin [Cricetulus griseus]	30.26	88					14	0	11	12	14
354476371	PREDICTED: dystroglycan [Cricetulus griseus]	15.20	87					7	0	7	7	7
354486886	PREDICTED: suprabasin-like [Cricetulus griseus]	39.04	86					15	0	15	12	12
354480699	PREDICTED: latent-transforming growth factor beta-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	16.20	86					13	0	13	11	11
354467379	PREDICTED: complement C1r-A subcomponent [Cricetulus griseus]	24.69	78					10	0	8	10	9
354496841	PREDICTED: insulin-like growth factor-binding protein 4-like [Cricetulus griseus]	50.39	77					7	0	6	7	7
354481556	PREDICTED: prelamin-A/C-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	30.66	75					14	0	11	14	14
354472141	PREDICTED: alpha-actinin-1 [Cricetulus griseus]	23.95	70					14	0	13	14	12
354467325	PREDICTED: calcium-dependent serine proteinase-like [Cricetulus griseus]	20.58	69					7	0	7	7	7
354502765	PREDICTED: nucleobindin-2-like [Cricetulus griseus]	39.05	68					10	0	7	10	9
354472638	PREDICTED: neural cell adhesion molecule 1 [Cricetulus griseus]	20.75	66					12	0	10	12	9
354471594	PREDICTED: cathepsin B-like [Cricetulus griseus]	34.22	66					9	0	7	8	9
346421354	calreticulin [Cricetulus griseus]	28.30	66					6	0	5	6	6
354507428	PREDICTED: dipeptidyl peptidase 2-like [Cricetulus griseus]	24.51	64					8	0	7	8	7
354483044	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like [Cricetulus griseus]	50.00	63					7	0	7	7	7
354479921	PREDICTED: elongation factor 1-beta-like [Cricetulus griseus]	29.78	63					6	0	6	6	6
354466994	PREDICTED: phosphatidylethanolamine-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	51.87	61					6	0	5	5	6
354468863	PREDICTED: actin, alpha skeletal muscle-like [Cricetulus griseus]	16.98	61					5	1	5	5	4
354478924	PREDICTED: tropomyosin alpha-3 chain-like isoform 3 [Cricetulus griseus]	33.06	60					9	0	7	9	7
354496917	PREDICTED: calmodulin-like [Cricetulus griseus]	24.91	59					5	0	4	5	5
354465044	PREDICTED: rab GDP dissociation inhibitor beta-like [Cricetulus griseus]	45.62	58					10	0	9	10	10
354469007	PREDICTED: rho GDP-dissociation inhibitor 1-like [Cricetulus griseus]	42.16	56					7	0	7	5	6
354489184	PREDICTED: lysosomal alpha-glucosidase-like [Cricetulus griseus]	20.97	55					10	0	8	7	10
350537543	glutathione S-transferase P 1 [Cricetulus griseus]	44.29	53					7	0	6	7	7
354500373	PREDICTED: nucleophosmin-like [Cricetulus griseus]	32.92	53					6	1	6	5	5
354498951	PREDICTED: epididymal secretory protein E1-like [Cricetulus griseus]	24.83	53					3	1	3	3	3
354473830	PREDICTED: tropomyosin alpha-1 chain-like [Cricetulus griseus]	28.52	52					9	0	9	8	7
354471198	PREDICTED: phosphoglycerate mutase 1-like [Cricetulus griseus]	26.50	52					7	0	5	5	7
354475571	PREDICTED: NSFL1 cofactor p47-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	29.84	51					7	0	7	7	7
354495391	PREDICTED: SOS acidic ribosomal protein P2-like [Cricetulus griseus]	81.74	50					5	0	5	5	4
354484889	PREDICTED: 14-3-3 protein beta/alpha-like [Cricetulus griseus]	38.21	49					7	0	7	6	7
354506568	PREDICTED: calyculin-1 [Cricetulus griseus]	19.45	48					8	0	8	7	7
354501786	PREDICTED: cofilin-1-like [Cricetulus griseus]	40.36	48					5	0	5	5	4
354465012	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5-like [Cricetulus griseus]	12.07	47					8	0	6	8	8
354495983	PREDICTED: ribonuclease T2-like [Cricetulus griseus]	32.05	43					4	0	4	4	4
354490988	PREDICTED: dickkopf-related protein 3-like [Cricetulus griseus]	35.92	42					8	0	8	8	6
354505868	PREDICTED: glutathione S-transferase Y1-like [Cricetulus griseus]	35.32	42					7	0	6	5	7
354496335	PREDICTED: cathepsin D [Cricetulus griseus]	22.79	42					5	0	5	5	5
354487474	PREDICTED: endoplasmic [Cricetulus griseus]	10.59	39					6	0	5	6	6
354478439	PREDICTED: nucleoside diphosphate kinase B-like [Cricetulus griseus]	34.21	39					4	0	4	4	4
354483082	PREDICTED: aldose reductase-like [Cricetulus griseus]	26.27	38					5	0	5	4	3
354478441	PREDICTED: nucleoside diphosphate kinase A-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	69.74	36					8	0	6	8	7
354504887	PREDICTED: cornifin-A-like [Cricetulus griseus]	47.79	36					3	0	2	3	2
354499529	PREDICTED: tyrosine-protein kinase receptor UFO [Cricetulus griseus]	11.23	35					5	0	4	5	4
354502651	PREDICTED: 14-3-3 protein theta-like [Cricetulus griseus]	34.29	34					6	0	5	6	6
354489742	PREDICTED: thioredoxin-like [Cricetulus griseus]	61.45	34					4	0	4	4	4
354475521	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: lipoprotein lipase [Cricetulus griseus]	24.95	33					7	0	6	5	7
354474350	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like [Cricetulus griseus]	39.35	32					6	0	6	6	5
354501655	PREDICTED: tripeptidyl-peptidase 1-like [Cricetulus griseus]	23.27	32					6	0	4	6	3
354499497	PREDICTED: protease SET-like [Cricetulus griseus]	21.29	31					5	0	4	4	5
354498717	PREDICTED: N-acetylglucosamine-6-sulfatase [Cricetulus griseus]	26.82	30					6	0	6	6	6
354466320	PREDICTED: superoxide dismutase [Cu-Zn]-like [Cricetulus griseus]	14.88	30					2	0	2	2	2
350539695	protein disulfide-isomerase [Cricetulus griseus]	17.68	29					6	0	3	5	6
354508126	PREDICTED: 14-3-3 protein epsilon-like, partial [Cricetulus griseus]	60.00	29					5	0	2	5	4

表2 同定されたタンパク質のリスト (3/4)

354506076	PREDICTED: glutathione S-transferase omega-1-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	27.92	28					5	0	5	4	5
354506128	PREDICTED: osteopontin-like [Cricetulus griseus]	29.00	28					5	0	5	4	5
354479537	PREDICTED: deoxyribonuclease-2-alpha-like [Cricetulus griseus]	19.66	27					5	0	5	5	4
354485875	PREDICTED: adenyl cyclase-associated protein 1-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	21.94	27					5	0	4	5	4
354496607	PREDICTED: annexin A5-like [Cricetulus griseus]	29.91	27					4	0	4	4	4
354496734	PREDICTED: elongation factor 1-delta-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	27.40	27					4	0	4	4	4
354473981	PREDICTED: gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like [Cricetulus griseus]	23.58	27					3	0	3	2	3
354487034	PREDICTED: macrophage-capping protein-like [Cricetulus griseus]	33.24	26					6	0	6	6	4
354476131	PREDICTED: transgalin-2-like [Cricetulus griseus]	34.67	26					5	0	5	4	4
354484391	PREDICTED: 14-3-3 protein zeta/delta-like [Cricetulus griseus]	24.90	26					4	0	3	4	3
354483990	PREDICTED: 14-3-3 protein eta-like [Cricetulus griseus]	33.86	25					6	0	6	4	4
354490697	PREDICTED: transmembrane glycoprotein NMB-like [Cricetulus griseus]	12.95	25					5	0	4	4	5
354475919	PREDICTED: sulfhydryl oxidase 1 [Cricetulus griseus]	9.13	25					4	0	3	4	4
354491066	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: plectin [Cricetulus griseus]	4.29	24					6	0	5	6	6
354488159	PREDICTED: proliferation-associated protein 204-like [Cricetulus griseus]	19.04	24					6	0	4	5	4
354495466	PREDICTED: G-protein coupled receptor 56 [Cricetulus griseus]	11.77	24					5	0	5	3	3
354505958	PREDICTED: phosphoserine aminotransferase isoform 2 [Cricetulus griseus]	17.07	24					4	0	4	3	3
350538125	protein disulfide-isomerase A3 [Cricetulus griseus]	17.43	23					4	0	4	4	4
354492431	PREDICTED: nuclear migration protein nudC-like [Cricetulus griseus]	27.83	22					6	0	3	5	6
354494567	PREDICTED: laminin subunit beta-1 [Cricetulus griseus]	11.21	22					6	0	4	5	4
354469648	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like [Cricetulus griseus]	35.06	22					5	0	2	5	2
354508098	PREDICTED: WNT1-inducible-signaling pathway protein 1-like [Cricetulus griseus]	46.88	22					4	1	4	3	3
354502560	PREDICTED: protein DJ-1-like [Cricetulus griseus]	29.10	22					3	0	3	3	3
354504493	PREDICTED: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating-like [Cricetulus griseus]	12.01	22					3	0	2	3	3
354472995	PREDICTED: proteasome subunit beta type-4-like [Cricetulus griseus]	23.48	22					3	0	2	3	3
354472764	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1-like [Cricetulus griseus]	14.29	21					4	0	4	4	4
354507625	PREDICTED: WNT1-inducible-signaling pathway protein 1-like, partial [Cricetulus griseus]	28.57	21					3	0	2	2	3
354472673	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-like [Cricetulus griseus]	17.70	21					3	0	3	3	2
354493316	PREDICTED: elongation factor 1 gamma [Cricetulus griseus]	12.13	21					3	0	3	3	2
354504095	PREDICTED: arylsulfoxidase A [Cricetulus griseus]	15.44	21					3	0	3	2	2
354507007	PREDICTED: alcohol dehydrogenase class-3-like [Cricetulus griseus]	25.94	20					4	0	3	4	4
354502310	PREDICTED: ferritin heavy chain, partial [Cricetulus griseus]	23.41	20					4	0	4	2	2
350539641	stress-induced-phosphoprotein 1 [Cricetulus griseus]	9.02	20					3	0	3	3	3
354468731	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-7-like [Cricetulus griseus]	13.09	20					3	0	3	3	3
354493494	PREDICTED: 5-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase-like [Cricetulus griseus]	19.08	20					3	0	3	2	3
354482849	PREDICTED: cellular nucleic acid-binding protein isoform 2 [Cricetulus griseus]	36.47	19					5	0	4	5	4
354474405	PREDICTED: ganglioside GM2 activator-like [Cricetulus griseus]	21.47	19					2	0	2	1	1
350538257	peroxiredoxin-2 [Cricetulus griseus]	45.96	18					5	0	3	5	2
354484885	PREDICTED: WNT1-inducible-signaling pathway protein 2-like [Cricetulus griseus]	33.20	18					4	1	4	3	4
350539727	heterochromatin protein 1 gamma [Cricetulus griseus]	16.39	18					3	0	3	2	2
354490016	PREDICTED: protein S100-A11-like [Cricetulus griseus]	27.00	18					2	0	2	2	2
354483485	PREDICTED: decorin-like [Cricetulus griseus]	20.44	17					4	0	2	4	3
354467339	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4-like [Cricetulus griseus]	16.98	17					4	0	4	3	3
354475591	PREDICTED: cystatin-C-like [Cricetulus griseus]	22.86	17					2	0	2	2	2
354488751	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P1-like [Cricetulus griseus]	32.35	17					2	0	2	2	2
354488691	PREDICTED: thimet oligopeptidase-like [Cricetulus griseus]	8.88	16					4	0	4	3	2
354470990	PREDICTED: peroxiredoxin-6-like, partial [Cricetulus griseus]	21.00	16					3	0	2	3	3
354480148	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-7-like isoform 3 [Cricetulus griseus]	16.98	16					2	0	2	2	2
354481584	PREDICTED: hepatoma-derived growth factor-like [Cricetulus griseus]	20.35	16					2	0	1	2	2
354481833	PREDICTED: acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like [Cricetulus griseus]	14.36	16					2	0	1	2	2
354481232	PREDICTED: radixin [Cricetulus griseus]	10.12	15					4	0	3	4	2
354497025	PREDICTED: prosta glandin reductase 1-like [Cricetulus griseus]	22.80	15					3	0	2	2	3
354470665	PREDICTED: calumenin [Cricetulus griseus]	15.24	15					3	0	2	2	3
354497793	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0-like [Cricetulus griseus]	15.03	15					3	0	3	3	2
354500485	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit S1 [Cricetulus griseus]	7.71	15					2	0	2	2	2
354501814	PREDICTED: protein FAM3C-like [Cricetulus griseus]	15.42	15					2	0	2	2	2
354471447	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-4-like [Cricetulus griseus]	15.33	15					2	0	2	1	2
354491739	PREDICTED: poly(rC)-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	28.37	14					5	0	2	3	5
354465636	PREDICTED: impertin-5-like [Cricetulus griseus]	8.42	14					5	0	5	2	3
354492323	PREDICTED: moesin [Cricetulus griseus]	12.90	14					4	0	2	4	4
354494273	PREDICTED: purine nucleoside phosphorylase-like [Cricetulus griseus]	30.81	14					4	0	4	2	3
354504153	PREDICTED: GTP-binding nuclear protein Ran-like [Cricetulus griseus]	14.81	14					3	0	2	3	3
354467010	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P0-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	16.56	14					3	0	3	2	2
354480165	PREDICTED: 60S ribosomal protein L12-like [Cricetulus griseus]	15.38	14					3	0	2	2	2
354842428	tubulin alpha-1C chain [Cricetulus griseus]	11.14	13					3	0	2	2	3
354507964	PREDICTED: 14-3-3 protein gamma-like, partial [Cricetulus griseus]	15.76	13					2	0	2	2	2
354484911	PREDICTED: syndecan-4-like [Cricetulus griseus]	28.22	12					4	0	2	2	4

表2 同定されたタンパク質のリスト (4/4)

354468793	PREDICTED: leukocyte elastase inhibitor A [Cricetulus griseus]	12.66	12						3
350538007	proliferating cell nuclear antigen [Cricetulus griseus]	15.33	12						2
354479983	PREDICTED: malate dehydrogenase, cytoplasmic-like [Cricetulus griseus]	14.97	12						2
354481358	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3-like [Cricetulus griseus]	30.52	12						2
354503829	PREDICTED: protein CTLA-2-beta-like [Cricetulus griseus]	33.00	12						2
354480275	PREDICTED: protein CREG1-like [Cricetulus griseus]	19.09	12						2
354491897	PREDICTED: nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	15.31	11						4
350540068	low-density lipoprotein receptor [Cricetulus griseus]	6.09	11						3
354488503	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like [Cricetulus griseus]	12.15	11						2
354478166	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A6-like [Cricetulus griseus]	10.00	10						3
354476481	PREDICTED: semaphorin-3B [Cricetulus griseus]	8.01	10						3
354476647	PREDICTED: acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A-like [Cricetulus griseus]	11.74	10						2
354494845	PREDICTED: lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma [Cricetulus griseus]	10.65	10						2
354472158	PREDICTED: enhancer of rudimentary homolog [Cricetulus griseus]	26.92	10						2
354476736	PREDICTED: phospholipid transfer protein [Cricetulus griseus]	12.78	9						3
354477936	PREDICTED: adenosylhomocysteinase [Cricetulus griseus]	13.89	9						3
354470785	PREDICTED: acid ceramidase-like [Cricetulus griseus]	10.38	9						3
354480675	PREDICTED: hypothetical protein LOC100760484 [Cricetulus griseus]	9.14	9						3
350538667	sialidase-1 [Cricetulus griseus]	11.95	9						2
354466878	PREDICTED: amyloid-like protein 2-like [Cricetulus griseus]	3.56	9						2
354503661	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 [Cricetulus griseus]	9.69	9						2
354495692	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-6-like, partial [Cricetulus griseus]	24.09	8						3
354497813	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-5-like [Cricetulus griseus]	21.99	8						3
354488115	PREDICTED: tissue factor pathway inhibitor-like [Cricetulus griseus]	15.05	8						2
354475135	PREDICTED: hsp90 co-chaperone Cdc37-like [Cricetulus griseus]	13.98	8						2
350539633	beta-2-microglobulin [Cricetulus griseus]	10.92	8						2
354477958	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 6 [Cricetulus griseus]	19.59	8						2
354501914	PREDICTED: beta-glucuronidase [Cricetulus griseus]	6.64	8						2
354506235	PREDICTED: pigment epithelium-derived factor-like [Cricetulus griseus]	9.52	8						2
354478868	PREDICTED: glucosylceramidase [Cricetulus griseus]	6.80	8						2
354480589	PREDICTED: ran-specific GTPase-activating protein-like [Cricetulus griseus]	10.00	8						2
354487679	PREDICTED: lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase-like [Cricetulus griseus]	10.33	8						2
354504707	PREDICTED: sialate O-acetyltransferase-like [Cricetulus griseus]	9.27	8						2
354475788	PREDICTED: galectin-3-like [Cricetulus griseus]	21.84	7						4
354489619	PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic-like [Cricetulus griseus]	12.80	7						3
354501876	PREDICTED: F-actin-capping protein subunit alpha-1-like [Cricetulus griseus]	12.90	7						2
354495381	PREDICTED: transaldolase [Cricetulus griseus]	10.68	7						2
350537691	aldose reductase-related protein 2 [Cricetulus griseus]	12.34	7						2
354489573	PREDICTED: profilin-1-like [Cricetulus griseus]	18.57	7						2
354475851	PREDICTED: acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B-like [Cricetulus griseus]	11.07	7						2
354486298	PREDICTED: proteasome subunit beta type-1-like [Cricetulus griseus]	15.42	7						2
354502777	PREDICTED: ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 [Cricetulus griseus]	3.38	6						3
354468505	PREDICTED: WD repeat-containing protein 1-like [Cricetulus griseus]	11.17	6						3
354474965	PREDICTED: glutathione reductase, mitochondrial-like [Cricetulus griseus]	8.70	6						2
354477950	PREDICTED: glutathione synthetase-like [Cricetulus griseus]	6.12	6						2
354475471	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: inorganic pyrophosphatase-like [Cricetulus griseus]	10.48	6						2
354496954	PREDICTED: TAR DNA-binding protein 43-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	20.34	6						2
354478378	PREDICTED: protein S100-A6-like [Cricetulus griseus]	39.33	6						2
354494229	PREDICTED: SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein-like [Cricetulus griseus]	27.19	6						2
354489228	PREDICTED: glyoxalase domain-containing protein 4-like [Cricetulus griseus]	8.05	5						2
354485597	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-1-like [Cricetulus griseus]	10.27	5						2
354485879	PREDICTED: palmitoyl-protein thioesterase 1-like [Cricetulus griseus]	16.34	5						2
350537471	hypoxia up-regulated protein 1 [Cricetulus griseus]	3.00	5						2
354479086	PREDICTED: PC4 and SFRS1-interacting protein-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	11.14	5						2
354466759	PREDICTED: c-C motif chemokine 2-like [Cricetulus griseus]	11.89	4						2
354474875	PREDICTED: LIM and SH3 domain protein 1-like [Cricetulus griseus]	23.79	4						2
354484233	PREDICTED: microtubule-associated protein 4 [Cricetulus griseus]	3.32	4						2
350540096	lysosome-associated membrane glycoprotein 1 [Cricetulus griseus]	5.65	3						2
354506607	PREDICTED: reticulocalbin-3-like [Cricetulus griseus]	12.92	3						2
354497505	PREDICTED: putative phospholipase B-like 2 [Cricetulus griseus]	4.27	3						2
354488693	PREDICTED: small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha-like [Cricetulus griseus]	8.28	3						2
354467683	PREDICTED: mammalian ependymin-related protein 1-like [Cricetulus griseus]	7.77	3						2
354485024	PREDICTED: synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog, partial [Cricetulus griseus]	10.73	2						2

表3 サブシステムAが示す標的部位等

	～2009年	2009年	2014年
細菌類	-ba(c)-	-b(a)-	-b(a)-
心臓血管系	-ci(r)-	-c(i)-	-c(i)-
菌類		-f(u)-	-f(u)-
骨格筋量に関する成長因子及び受容体			-gr(o)-
IL類		-k(i)-	-k(i)-
免疫調節分子	-li(m)-	-l(i)-	-l(i)-
神経系分子		-n(e)-	-n(e)-
骨	-os- ^{*1}	-s(o)-	-s(o)-
トキシン		-tox(a)-	-tox(a)-
腫瘍	-tu(m)-	-t(u)-	-t(u)-
ウイルス	-vi(r)-	-v(i)-	-v(i)-
炎症性病変	-le(s)-		

表4 受容体由来医薬品のステムと由来

	stem	受容体の由来	医薬品INN
1	-ner-	TNF- α 阻害薬	<i>baminercept, etanercept, lenercept, onercept*, pegsunercept*</i>
2	-lefa-	リンパ球機能関連抗原3 (LFA-3)	<i>alefacept</i>
3	-co-	補体受容体	<i>mirococept*</i>
4	-far-	インターフェロン受容体	<i>Bifarcept*</i>
5	-vir-	抗ウイルス受容体	<i>alvircept sudotox*</i>
6	-ber-	血管内皮成長因子受容体	<i>aflibercept, conbercept</i>
7	-ba-	B細胞活性化因子受容体	<i>briobacept</i>
8	-fri-	frizzled受容体	<i>ipafricept</i>
9	-na-	インターロイキン-1受容体	<i>rilonacept</i>
10	-ta-	CTLA-4受容体	<i>abatacept, belatacept</i>
11	-taci-	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor	<i>atacicept</i>
12	-ter-	TGF受容体	<i>dalantercept, luspatercept, ramatercept, sotatercept</i>

*Fc融合タンパク質ではない

表5 受容体以外のFc融合タンパク質
(-efが設定される以前にINNに収載された品目)

INN	タンパク質の由来
<i>asfotase alfa</i>	組織非特異性アルカリホスファターゼ
<i>blisibimod</i>	B細胞活性化因子 (BAFF) 結合ペプチド
<i>dulaglutide</i>	GLP-1
<i>romiplostim</i>	トロンボポエチン受容体結合ペプチド
<i>torapset</i>	Pセレクトリン糖タンパク質リガンド
<i>trebananib</i>	アンジオポエチン2結合ペプチド

表6 受容体以外のFc融合タンパク質
(-efが設定後にINNに収載された品目)

INN	タンパク質の由来
<i>eflapegrastim</i>	G-CSF
<i>efmoroctocog alfa</i>	血液凝固第VIII因子
<i>eftrenonacog alfa</i>	血液凝固第IX因子

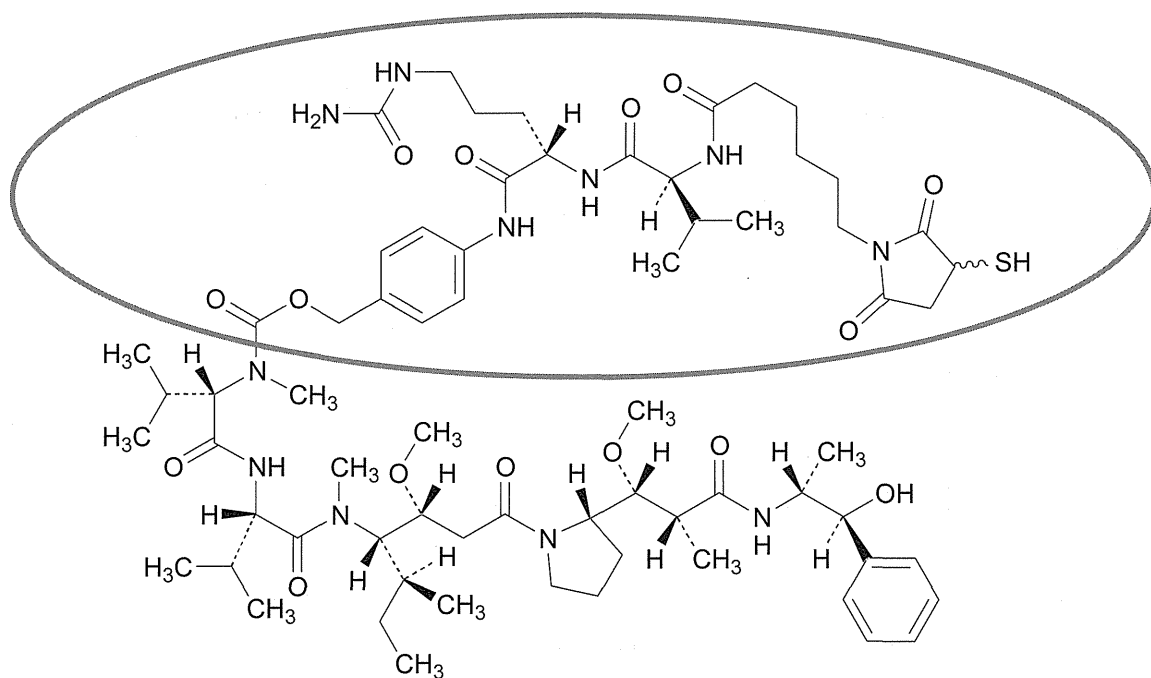


図13 ベドチンの構造
(リンカー部分を○で示す)

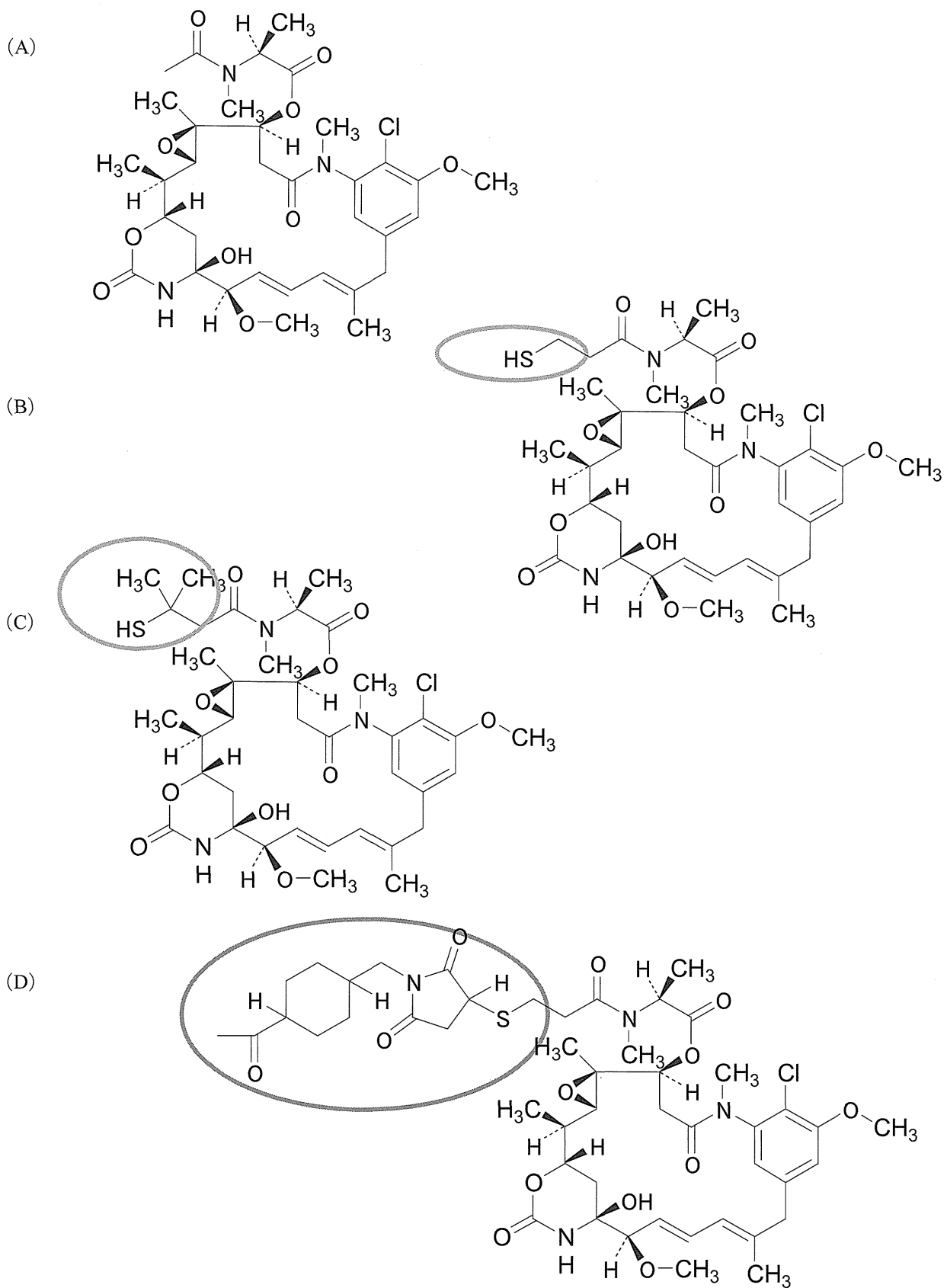


図14 maitansin、mertansin、ravsansin、エムタンシンemtansinの構造
(リンカー部分を○で囲む)

医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の国際調和の推進に係わる研究 ーバイオ医薬品の品質特性評価手法に関する研究ー

研究分担者：橋井 則貴（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長）

研究要旨

抗体は付加糖鎖の構造の違いにより、血中のクリアランス速度が異なることが示唆されている。抗体医薬品の血中における糖鎖不均一性と血中安定性の関係性を解明することは、管理すべき糖鎖の特定、及びその糖鎖の管理基準/許容範囲を設定のための有益な科学的根拠となる。本研究では、血中抗体医薬品の糖鎖不均一性解析技術を開発する一環として、抗体親和性ペプチドの開発、及び本ペプチド固定化カラムの作製を行い、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。

キーワード：糖鎖不均一性、血中安定性、抗体親和性ペプチド

A. 研究目的

遺伝子組換え技術により製造される抗体には、主糖鎖であるフコシル化複合型二本鎖の他に、数パーセント程度の高マンノース型糖鎖が付加している。高マンノース型糖鎖をもつ抗体は、肝臓の肝類洞内皮細胞及びマクロファージ等に発現しているマンノースレセプターを介して除去されやすいことが知られている。また、ある種のFc融合タンパク質では、Fc部分の糖鎖には変化がみられず、非還元末端がN-アセチルグルコサミンの糖鎖が融合タンパク質部分に付加した分子種が、マンノースレセプターを介して、速やかに除去されることも報告されている。糖鎖は、抗体関連医薬品の血中安定性に関係することから、抗体医薬品の血中における糖鎖不均一性の変化と血中安定性の関係性を解明することは、管理すべき糖鎖の特定、及びその糖鎖の管理基準/許容範囲を設定のための有益な科学的根拠になると考えられる。

投与された抗体医薬品の糖鎖不均一性解析方法としては、血中から回収した抗体をプロテアーゼで消化した後、糖ペプチドを質量分析（MS）で解析する

ケースと、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液体クロマトグラフィー（LC）、MS、あるいはLC/MSにより解析するケースがある。

血中の抗体医薬品の回収方法として、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、相補性決定領域（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る、分析方法を確立するまでに長時間を要することもある。

そこで本研究では、まず、TNF- α 由来ペプチドを用いた新規の抗体親和性ペプチドの開発を行った。つぎに、その抗体親和性ペプチドを固定化させたゲルを充填した操作が簡便なスピンカラムを作製し、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応用可能性を検証した。さらに、抗体親和性ペプチドの高次構造解析及び抗体の相互作用部位の解析についても行った。

B. 研究方法

B. 1. 抗体

抗体として、muromonab-CD3 (Johnson & Johnson)、palivizumab (MedImmuneA)、omalizumab (Genentech)、daclizumab (Roche)、cetuximab (ImClone)、trastuzumab (Genentech)、adalimumab (Abbott)、infiximab (Johnson & Johnson)、及びgolimumab (Johnson & Johnson) を使用した。ヒト血漿は、KAC corporation より購入した。

B. 2. 抗体固定化ゲルの作成

3種類 of 抗体 (adalimumab、infiximab、及び golimumab) を0.5Mリン酸水素二カリウムバッファ (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 of 抗体固定化用ゲル (TSKgel Tressyl-5PW、東ソー) 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 of 0.5M NaClでゲルを洗浄した後、100 μ L of 0.1M Tris-HClバッファ (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。

B. 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°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. 4. 抗体結合性ペプチドの選別

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、抗体固相化ゲルに加え、室温で一晩振とうした。抗体に結合しないペプチドを除去するために、400 μ L of 25mM酢酸アンモニウム (pH 7.0) でゲルを洗浄した。抗体結合性ペプチドは、300 μ L of 0.5M酢酸 (pH 2.5) で溶出・乾燥させて、回収した。

B. 5. 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として、図 1 Aに示すペプチドを使用した。そのペプチドの化学合成品 (アミノ

酸配列 : CGSGSGSIAVSYQTK) を東レリサーチセンターから購入した。抗体親和性ペプチドを0.5Mリン酸水素二カリウムバッファ (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 of 抗体固定化用ゲル (TSKgel Tressyl-5PW、東ソー) に加え、室温で一晩振とうさせた。200 μ L of 0.5M NaClでゲルを洗浄した後、100 μ L of 0.1M Tris-HClバッファ (pH 8.0) を加えて、室温で30分間のインキュベートにより、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, MA, USA) 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。

B. 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) を用いた。

ローディングバッファ及び泳動バッファの組成は以下の通りであった。

ローディングバッファ :

- 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) 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 : 6.75mL

泳動バッファ :

- 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 of ローディングバッファに10 μ L of 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) で行い、Typhoon 9400 (GE Healthcare) でバンドを確認した。

B. 7. LC/MSによるペプチド同定

ペプチド同定に用いたLC/MSの条件は以下のとおりであった。

① LC

装置：Paradigm MS4 (Michrom Bioresources)

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

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

移動相A：0.1%ギ酸／2%アセトニトリル

移動相B：0.1%ギ酸／90%アセトニトリル

グラジェント条件：5–65% (移動相B) 45分間

流速：300nL/min

② MS

装置：LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific)

スプレー電圧：2.5kV

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. 8. ヒト血漿中からのgolimumab回収

10 μLのgolimumab水溶液 (1.0 μg/μL) に90 μL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、ゲルと溶液を十分に混合した後、遠心分離 (5000×g) を行い、未吸着画分を回収した。次に、300 μLの洗浄バッファの添加、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 μLの溶出バッファ (0.1% *n*-octylglucoside 添加PBS、pH 7.4) 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を回収した (図1B)。

B. 9. 円二色性 (CD) スペクトル

下記の装置及び条件により、CDスペクトルを測定

した。

装置：日本分光J720

波長：190–260nm

Scanning：20nm/min

Response time：1 sec., Width：1.0nm

B. 10. 水素重水素交換反応/質量分析 (HDX/MS)

① サンプル溶液

抗体親和性ペプチド (1 mg/mL) 及びgolimumab (1 mg/mL) を含む25mM酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.0) をサンプル溶液とした。

② コントロール溶液

Golimumab (1 mg/mL) の25mM酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.0) をコントロール溶液とした。

③ クエンチバッファ

予冷 (4 °C) した100mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP-HCl、Sigma-aldrich) 及び4M guanidine-HCl (Thermo Fisher Scientific) を含む溶液をクエンチバッファとして使用した。なお、クエンチバッファのpHは、HDX反応溶液と等量混合したときに2.5となるように調整した。

④ HDX反応

サンプル溶液及びコントロール溶液の各3 μLに57 μLの25mM酢酸アンモニウム重水溶液 (pD 6.6) を加えて混和した後、1、5、10、30及び60分間、15°Cでインキュベートした。所定時間インキュベートした後、CTC PAL sample manager (LEAP Technologies) を用いて、50 μLの反応溶液と50 μLのクエンチバッファを混合することで反応を停止させた。なお、0時間のHDX反応には、25mM酢酸アンモニウム水溶液 (pH 7.0) を用いた。

⑤ LC/MSによるオンラインペプシン消化

クエンチ後、CTC PAL sample managerを用いて50 μLの溶液をLC/MSに注入した。LC/MSは以下の装置及び条件で行った。

MS装置：SynaptG2-S Q-ToF mass spectrometer (Waters)

Electrospray voltage：2.5kV (positive ion mode)

Trap collision energy：4.0V

Sampling cone：40V

Source temperature：80°C

Desolation temperature : 175°C

Mass range : m/z 100-2500

MS^E collision energies ramping : 15~45V

LC装置 : nanoACQUITY UPLC system (Waters)

ペプシンカラム : Poroszyme Immobilized Pepsin Cartridge (2.1×30mm, Applied Biosystems)

オンラインペプシン消化 : ギ酸溶液 (pH 2.5) を移動相とし、流速100 μ L/minで、15°C、2分間、サンプル溶液またはコントロール溶液を通過させることによりペプシン消化を行った。

分離カラム : ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.0×100mm, 1.7 μ m, Waters)

ペプチドの分離 : 0.1%ギ酸溶液 (移動相A) 及び90%アセトニトリルを含むギ酸溶液 (移動相B) を用いて、流速40 μ L/min、8~50%移動相Bのリニアグラジュエント (10分間) で、重水素交換したペプチドを分離・溶出させた。

⑥ ペプチドの同定及び重水素化率の算出

GolimumabのH鎖及びL鎖のアミノ酸配列を含むin-houseのデータベースを用いて、ProteinLynx Global Server 2.5.2 (Waters) により、ペプチドを同定した。重水素化率の計算は、DynamX 2.0 software (Waters) で行った。

⑦ X線結晶構造との重ね合わせ

HDX/MS解析によりサンプルとコントロールで差のみられたペプチドについて、Protein Workshop software (RCSB Protein Data Bank) を用いて、IgGのX線結晶構造との重ね合わせを行った。IgGのX線結晶構造として、RCSB Protein Data Bankに登録されている1 hzhを使用した。

(倫理面への配慮)

市販の抗体医薬品及びヒト血漿を試料として用いているため、特には配慮を必要としない。

C. 結果と考察

C.1. 抗体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、抗体親和性ペプチドのスクリーニング方法を示す。抗体として、adalimumab、infiximab及び

golimumabを用いた。抗体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、ゲルを洗浄した後、抗体に結合した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てMS用試料を調製し、LC/MSによりマスペクトルを取得した (図3 A-3 C)。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3 Dはペプチド1のマスペクトル及び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3 A-3 C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。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であると想定し、ペプチド1を用いることにした。

C.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1 (A)、B.5.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. 3. 抗体親和性ペプチド固定化カラムの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充填したカラムで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) (pH 7.0)、150mM AcONH₄ (pH 7.0)、及びPBS (pH 7.4) 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検討した。モデル抗体として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は、B. 8. に記載した方法に従った。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4 (A) は、洗浄バッファとして、25mM AcONH₄ (pH 7.0) 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4 (B) 及び4 (C) に示したように、150mM AcONH₄ (pH 7.0)、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。これらの結果から、洗浄バッファとして25mM AcONH₄ (pH 7.0) を用いることで、golimumabの回収率に影響を与えることなく洗浄できることが示唆された。

C. 4. 抗体親和性ペプチド固定化カラムの洗浄バッファpHの検討

pH 5.0、8.0、9.0及び10.0の25mM AcONH₄を洗浄バッファとして、本カラムによるgolimumabの回収率を確認した (図5)。洗浄バッファとして、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 (pH 9.0) 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 (pH 10.0) では、すべて洗浄画分に分画された。洗浄バッファ (25mM AcONH₄) のpHを5~8に調節することで、

golimumabを回収することができることが明らかとなった。

C. 5. 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infiximab) への適用可能性を検証した (図6)。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た後、SDS-PAGEにより回収率を検証した。25mM AcONH₄ (pH 7.0) を洗浄バッファとして用いたとき、daclizumab [図6 (D)、6 (I)] 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、0~72%とばらつきがみられるものの、いずれも低値であった。一方、25mM AcONH₄ (pH 5.0) を洗浄バッファとして用いたとき、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6 (A)、6 (I)]、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。洗浄バッファのpHを最適化することで、本カラムにより様々な抗体医薬品を回収できる可能性が示唆された。

C. 6. 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7 (A) ~7 (D) は、pHを5.0、6.0、7.0、及び8.0に調製した洗浄バッファ (25mM AcONH₄) を使用したときの結果である。低pHの洗浄バッファを用いる程の洗浄バッファを用いる、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付近に検出されたバンドをgolimumabの主バンドと仮定して、添加回収率、及び純度を算出した (図8)。その結果、

添加回収率、及び純度ともに、pH 8.0の洗浄バッファを使用したときに、良好な値を示した（添加回収率、103%；純度、73%）。以上の結果から、本カラムを用いて血漿から特異的にgolimumabを回収する場合、洗浄バッファとしては25mM AcONH₄ (pH 8.0) が適していることが明らかとなった。

C. 7. 抗体親和性ペプチドの二次構造の解析

抗体親和性ペプチドはTNF- α の83~90番目のアミノ酸配列 (IAVSYQTK) にリンカー配列 (CGSGSGS) を結合させたペプチドである。TNF- α は、A、A'、B、B'、C~Gまでの10本の β -strand構造を有しており、ペプチド1 (IAVSYQTK) の配列は、C-D loopに相当する。C-D loopは、一部の抗TNF- α 抗体の conformational epitopeの一つであること、またTNF- α 受容体の相互作用部位であることが報告されており、結合に重要な配列であることが示唆されている。そこで、抗体親和性ペプチドの構造的特徴を明らかにするために、CDスペクトル測定により、二次構造の解析を行った。一般に、 α -helixが構造中に存在するとき、208及び222nmにネガティブピークが検出される。 β -sheetを有する場合は、195~200nm付近にポジティブピーク、216~218nm付近にネガティブピークが検出される。また、 β -turn (I型) が構造中に存在するときは210及び220nmにネガティブピーク、また190nm付近にポジティブピークが検出される。 β -turn (II型) が構造中に存在するときは200~210nm付近にポジティブピーク、220~225nm付近にネガティブピークが検出される。図9には、25mM酢酸アンモニウム溶液 (pH 5~7) を用いて調製した100 μ M抗体親和性ペプチド溶液のCDスペクトルを示した。いずれのスペクトルも205nm付近にポジティブピーク、220nm付近にネガティブピークが観測され、構造中に β -turn (II型) が存在する可能性が示唆された。 β -turn (II型) 構造は4つのアミノ酸残基で構成され、ほとんどの場合、その配列中にグリシンが含まれる。抗体親和性ペプチドのリンカー部分には、3個のグリシン残基が存在することから、リンカー部分を含めて β -turn (II型) 構造を形成していると考えられる。抗体親和性ペプチド中のIAVSYQTK配列は、抗

TNF- α 抗体やTNF- α 受容体との特異的な相互作用に関係する配列であるが、前述したように、本親和性ペプチドは、抗TNF- α 抗体以外の抗体とも結合するペプチドである。すなわち、本ペプチドが抗TNF- α 抗体のCDR領域と相互作用するとは考えにくい。この特異性の変化は、リンカーを結合させたことによる高次構造の変化に起因しているものと考えられる。また、pH 7のバッファを用いたとき、ポジティブピークが減少した。このことから、抗体親和性ペプチドは、pH 5及び6よりもpH 7のバッファを用いたとき、ゆらぎが大きくなることが示唆された。C. 5. で示したように、pH 5のバッファを使用したときに最も回収率が良好であったことを考慮すると、抗体との相互作用には、溶液中で安定して β -turn (II型) 構造が形成されることが重要であるものと考えられる。図10には、バッファとして、25mM酢酸アンモニウム (pH 5.0)、150mM酢酸アンモニウム (pH 7.0)、及びPBSを用いたときのCDスペクトルを示した。バッファ中のイオン強度が高くなるとゆらぎが大きくなることが示唆された。

以上の結果、抗体親和性ペプチドと抗体との相互作用では、バッファのpHを下げる、及びイオン強度を低くすることが重要であることが明らかとなった。

C. 8. 抗体親和性ペプチド結合部位の特定

抗体親和性ペプチドのIAVSYQTK配列は、ある種の抗TNF- α 抗体のepitopeと部分的に一致するが、前述したようにCDR以外の領域で抗体と相互作用しているものと考えられる。そこで、HDX/MSにより、抗体のモデルとしてgolimumabを用いて、抗体親和性ペプチドの結合部位の特定を試みた。図11 (A) 及び11 (B) は、それぞれL鎖及びH鎖のdifferential plotである。Differential plotは、サンプル間の重水素取込数の差を可視化したグラフであり、縦軸はコントロール (golimumab) とサンプル (peptide+golimumab) 間のペプチド毎の重水素取込数の差 (Da) をあらわす。また、横軸は同定されたペプチドであり、左側がN末端に近いペプチド、右側がC末端に近いペプチドである。重水素取込数の差が正值のときは、抗体

親和性ペプチドとの相互作用により、重水素取込数が減少した領域であることを示している。解析の結果、領域A及びBで重水素取込数に顕著な減少がみられた。図11 (C) はL鎖で差のみられた3種類のペプチド (137-162、141-162及び145-162) の deuterium uptake plotである。いずれのペプチドも抗体親和性ペプチドの添加により重水素取込数が減少していることが確認された。これらの3種類のペプチドとオーバーラップするペプチドについて重水素取込数を確認した結果、137-144のペプチドでは有意差が認められなかったことから、L鎖における抗体親和性ペプチドとの相互作用領域は、145-162 (EAKVQWKVDNALQSGNSQE) であると考えられた。同様に、H鎖についても解析を行った。その結果、図11 (D) に示した124-150及び124-150のペプチドで重水素取込数が有意に減少していた。オーバーラップするペプチド (124-135) では有意差が認められなかったことから、H鎖における抗体親和性ペプチドとの相互作用領域として、136-151 (PLAPSSKSTSGGTAAL) の領域を特定した。これらの相互作用領域について、X線結晶構造との重ね合わせを行った。L鎖145-162及びH鎖136-151は、それぞれCL領域及びCH1領域に位置すること、また、いずれも β -strand構造を一部含むことが明らかとなった (図12)。

以上の結果、抗体親和性ペプチドは、抗体の変域領域、CH2及びCH3領域とは相互作用していないことが示唆された。抗体のアフィニティー精製等に用いられるプロテインAはCH2領域に結合することから、本研究で検討した抗体親和性ペプチドは、プロテインAとは異なる相互作用により抗体と結合することが明らかとなった。

D. 結論

抗体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 を高収率で回収できることが確認された。

抗体親和性ペプチドは、pH 5 ~ 6 の 25mM

AcONH₄バッファー中で、 β -turn (II型) 構造をとること、抗体のCL領域及びCH1領域に結合すること、既存の抗体親和性分子とは異なる相互作用により抗体と結合することが明らかとなった。

本抗体親和性ペプチドカラムは、血中抗体医薬品の糖鎖不均一性解析する際の、新規抗体回収方法として利用できる可能性が示唆された。

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) Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N: Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30;28(8), 921-932 (2014)

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) 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
- 4) Shiori Nakazawa, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki:
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
- 5) Shiori Nakazawa, Joomi Ahn, Noritaka Hashii, Kenji Hirose, Nana Kawasaki: Local dynamics analysis of human insulin and a rapid-acting insulin analog by hydrogen deuterium exchange/mass spectrometry. ASMA
- 6) 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
- 7) 橋井則貴. 高分子LC/MSバイオアナリシスの現状と課題について. 第27回バイオメディカル分子科学シンポジウム帝京大学(2014.8)(板橋)

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	m/z	Charge state	Observed MW (monoisotopic)	Theoretical MW (monoisotopic)
Peptide 1	I A VSYQTK	83-90	455.26	2 ⁺	908.51	908.50
Peptide 2	TPSDKPV A HVVANPQAEGQLQWLNR	7-32	728.65	4 ⁺	2910.60	2910.52
Peptide 3	ANALLANGVELR	33-44	620.86	2 ⁺	1239.72	1239.69
Peptide 4	VVANPQAEGQLQWLNR	16-31	911.99	2 ⁺	1821.98	1821.95
Peptide 5	VNLLSAIK	91-98	429.28	2 ⁺	856.56	856.55

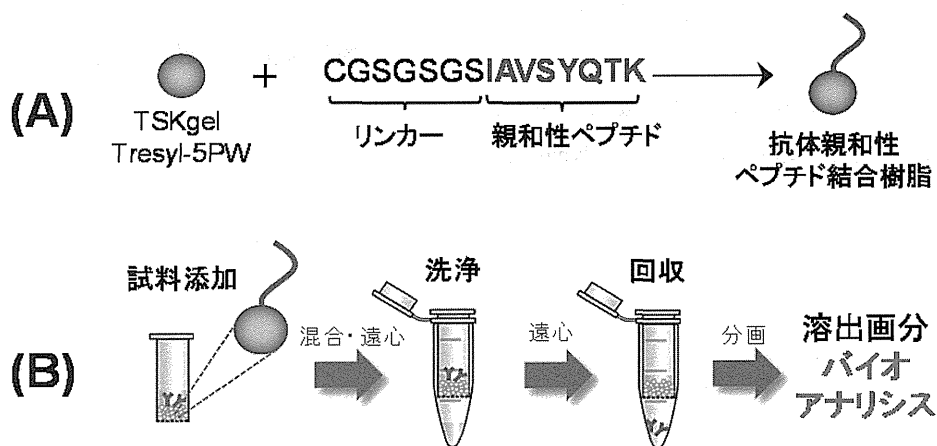


図1. (A) 抗体親和性ペプチド樹脂の調製、(B) 抗体親和性ペプチド樹脂を充填した簡易カラムによる抗体の回収・濃縮方

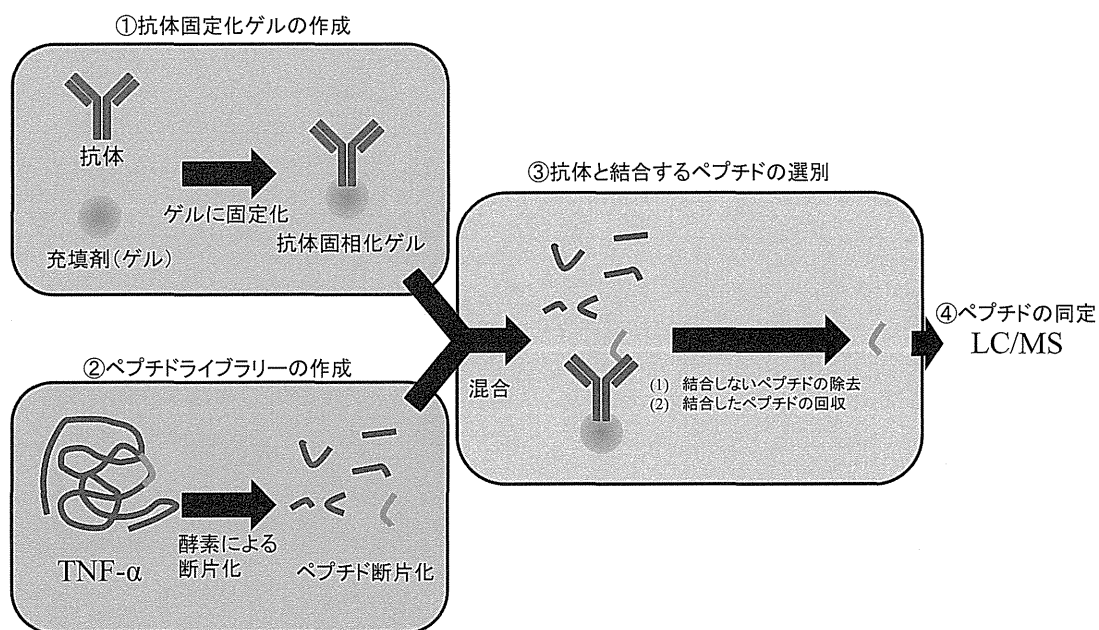


図2. 抗体親和性ペプチドのスクリーング法

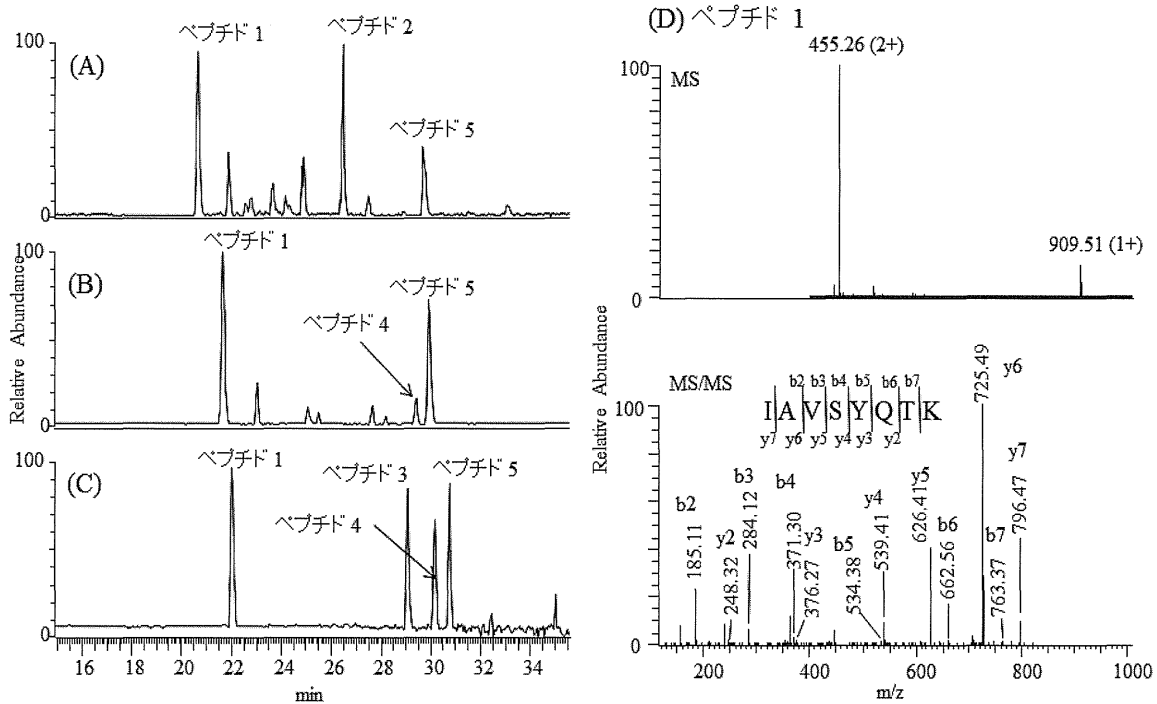


図3. LC/MS及びデータベース検索によるTNF- α 由来親和性ペプチドの同定

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。

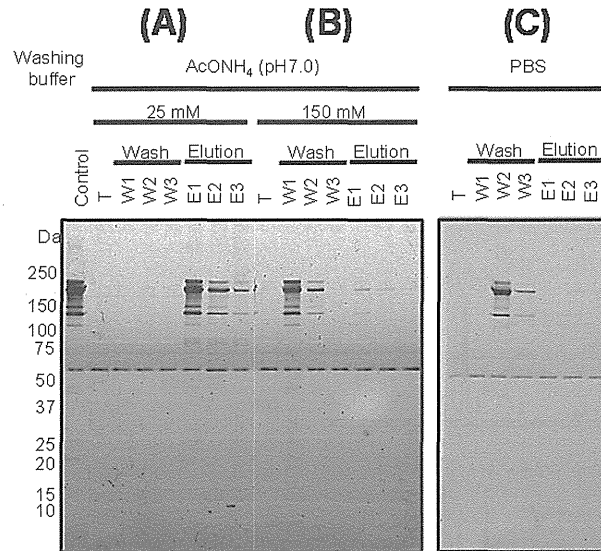


図4. 洗浄条件の検討 (1)。洗浄バッファー：(A)、25mM AcONH₄ (pH7.0)；(B)、150mM AcONH₄ (pH7.0)；(C)、PBS。サンプル、golimumab 10 μ g；溶出バッファー、0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS；T、未吸着画分；W1-W3、洗浄画分；E、吸着画分。各フラクションは、300 μ lずつ分取した。

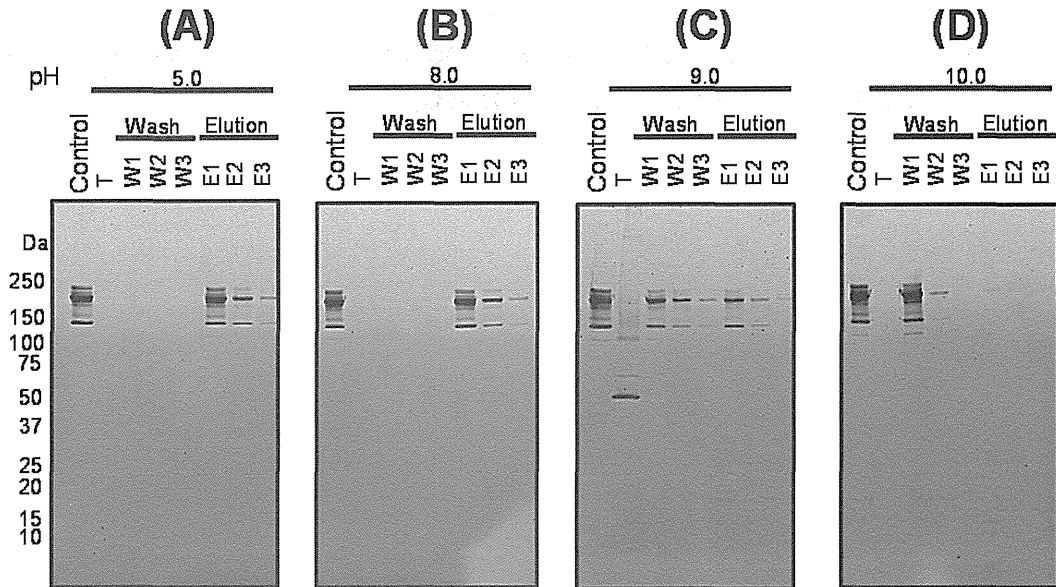


図5. 洗浄条件の検討 (2)。洗浄バッファー：25mM AcONH₄ pH5.0 (A)；pH8.0 (B)；pH9.0 (C)；pH10.0 (D)。サンプル、golimumab 100 μ g；溶出バッファー、0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS；T、未吸着画分；W1-W3、洗浄画分；E、吸着画分。各フラクションは、300 μ lずつ分取した。