

バイオ医薬品の品質評価の紹介 ～ペプチドマッピング～

医薬事業本部 バイオ技術センター 中谷 圭吾・疋田 昌義

1 はじめに

近年、世界的にバイオ医薬品の市場が拡大しており、我が国では既に70品目を越える製品が臨床に使用されている。当社においても、数多くの医薬品メーカーからバイオ医薬品の品質評価試験を受託するようになった。今回、バイオ医薬品の特性解析、品質評価に関するガイドラインを示し、バイオ医薬品の確認試験の一方法であるペプチドマッピングについて紹介する。

バイオ医薬品とは、組み換えDNA技術又は細胞培養技術などのバイオテクノロジーと呼ばれる技術を応用して製造するタンパク質性医薬品のことである。バイオ医薬品は、原材料に生物起源のものを使用していること、ならびに製品が低分子ではなくタンパク質性の高分子であるため製造管理や品質においては、化学合成医薬品とは異なった対応が求められる。バイオ医薬品の試験法や評価方法については、いくつかの指針やガイドラインが出されている。品質面に関しては、表1に示すとおりICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）関連の品質ガイドラインとして発出されている（厚生労働省のホームページより引用）。また、我が国におけるバイオ医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成に関するガイドラインが公表されている¹⁾²⁾。バイオ医薬品に関する品質においても、安定性試験

から特性解析、規格試験法の設定まで、幅広く設定されている。項目の詳細は、各ガイドラインを参照されたい。

バイオ医薬品の多くは、有効成分が変化しやすいタンパク質であるため、その構造や品質については、表2に示すように物理的、化学的、免疫学的、

生物学的方法などを用いて多角的な解析が求められる。タンパク質はアミノ酸で構成されており、酵素消化により、いくつかのアミノ酸で構成されたペプチド断片が生じる。ペプチド単位で検討することは、構造解析において有効である。

表1 バイオ医薬品のICH品質ガイドライン

| コード名 | ガイドライン名 | 通知日 |
|---------|---|-----------|
| Q5A(R1) | ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価 | 2000.2.22 |
| Q5B | 組換えDNAを応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析 | 1998.1.6 |
| Q5C | 生物薬品（バイオテクノロジー応用製品／生物起源由来製品）の安定性試験 | 1998.1.6 |
| Q5D | 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）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析 | 2000.7.14 |
| Q5E | 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）の製造工程の変更にもなう同等性／同質性評価 | 2005.4.26 |
| Q6B | 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 | 2001.5.1 |
| Q7 | 原薬GMPのガイドライン | 2001.11.2 |

表2 バイオ医薬品の特性解析・品質規格

| | |
|-----------|---|
| 構造解析・構造確認 | <ul style="list-style-type: none"> ・アミノ酸配列 ・アミノ酸組成 ・末端アミノ酸配列 ・ペプチド分析、ペプチドマッピング ・スルフヒドリル基及びジスルフィド結合 ・糖組成・糖鎖構造 |
| 物理的・化学的性質 | <ul style="list-style-type: none"> ・分子量・分子サイズ ・アイソフォームパターン ・比吸光度（又はモル吸光係数） ・電気泳動パターン ・液体クロマトグラフィーパターン ・分光学的性質 |
| 免疫学的性質 | <ul style="list-style-type: none"> ・イムノアッセイ、免疫電気泳動法等 |
| 生物学的性質 | <ul style="list-style-type: none"> ・生物学的活性及び純度（比活性等）等 ・酵素の場合には、酵素化学的性質 ・モノクローナル抗体等については次の性質について必要に応じ検討する。 <ul style="list-style-type: none"> ・標的抗原に対する特異性 ・疑似抗原に対する交差反応性 ・モノクローナル抗体の組織学的結合性 ・標的細胞や生物学的作用が多様なものに関しては、それらについて可能な限り明らかにする。 |

2 ペプチドマッピング³⁾

ペプチドマッピングは、バイオテクノロジーを応用したバイオ医薬品の確認試験のひとつの方法であり、米国薬局方 (USP)、ヨーロッパ薬局方 (EP)、日本薬局方 (JP) 間で国際調和がなされたテーマのうちの一つである⁴⁾。

バイオ医薬品を化学的又は酵素的に消化してペプチド断片とし、その断片をHPLCなどで再現性よく分離確認する方法で、1個のアミノ酸の変化を確認できる試験法である。標準物質について同様に消化したものと比較することで、タンパク質の一次構造の確認や製造工程の恒常性の評価を行うことが可能である。

ペプチドマッピングは、タンパク質の指紋 (フィンガープリント) と表現することができ、酵素的又は化学的消化を受けて生成したペプチド断片から、様々な情報を得ることができる。

本法は以下の3段階の操作からなる。

ペプチド結合の切断

クロマトグラフィーによる分離

各ペプチドの分析と確認

2.1 ペプチド結合の切断

ペプチド結合を切断する方法には、トリプシンなどの酵素法と臭化シアン

などの化学法がある。いくつかの切断剤とその特異性を表3に示す。

ペプチド結合を切断する際、至適条件を設定する必要がある。以下に主な条件を示し、設定するための留意点を記した。

pH: 消化反応液のpHは、切断剤が機能するのに最適と考えられる値に調整する。

温度: ほとんどの切断反応は25 ~ 37 が適切であるが、反応温度が上昇すると変性を受けやすいタンパク質もあるので、その種類によって決定する必要がある。

反応時間: 再現性のあるマップを得、かつ不完全な消化を避けるため、至適反応時間を検討する。

切断剤の量: 反応時間を適度に短くするために、通常は過剰量の切断剤を用いるが、ペプチドマッピングのクロマトグラムパターンへの影響を避けるため、切断剤の使用は必要最小限に留める。

2.2 クロマトグラフィーによる分離

分離法は、試験するタンパク質に応じて選択する。ペプチドの分離に利用される主な方法を表4に示す。汎用されている逆相分配型高速液体クロマト

グラフィー (RP-HPLC) に影響を及ぼす項目を記し、留意点を示した。

分離用カラム: 個々のタンパク質に応じて選択するが、孔径10 nmあるいは30 nmのシリカ担体のカラムがタンパク質の分離に適している。小さなペプチドの分離には、直径3 ~ 10 μm の全多孔性シリカ粒子にオクチルシランが化学的に結合した充てん剤又はオクタデシルシランが化学的に結合した充てん剤が有効である。

表4 ペプチドの分離方法

- ・逆相分配型高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)
- ・イオン交換クロマトグラフィー (IEC)
- ・疎水的相互作用クロマトグラフィー (HIC)
- ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)
- ・SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)
- ・キャピラリー電気泳動 (CE)

移動相: 一般的に用いられるのは、水とアセトニトリルの混液に0.1%未満のトリフルオロ酢酸を加えた溶液である。また、pHを3.0 ~ 5.0の範囲で変えることにより、酸性アミノ酸残基を含むペプチドの分離を改善できるので、pHの選択において適応範囲の広いリン酸塩緩衝液が移動相によく用いられる。

良好な再現性を得るためには、通常カラムの温度を制御する必要がある。移動相の流速は、毎分0.1 ~ 2.0 mL、ペプチドの検出は、UV検出器を用いて200 ~ 230 nmの測定波長で行う。

ここで、当社で実施した酵素消化したバイオ医薬品のペプチドマップの実験例の一例を挙げる。アミノ酸165個からなる糖タンパク質であるエリスロ

表3 切断剤の例

| 種類 | 試薬 | 特異性 |
|-----|---|---|
| 酵素法 | トリプシン キモトリプシン | アルギニン、リジンのC末端側 疎水性アミノ酸 (ロイシン, メチオニン, アラニン, 芳香族アミノ酸) のC末端側 リジンのC末端側 |
| | リジルエンドペプチダーゼ (Lys-C エンドペプチダーゼ) グルタミンエンドペプチダーゼ (S. aureus 株 V8 由来) ペプチジル-Asp メタロエンドペプチダーゼ (エンドプロテアーゼ Asp-N) | グルタミン酸, アスパラギン酸のC末端側 アスパラギン酸のN末端側 |
| 化学法 | 臭化シアン 2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸 o-ヨードソ安息香酸 | メチオニンのC末端側 システインのN末端側 トリプトファン, チロシンのC末端側 |

ポエチン(遺伝子組換え)をトリプシンで酵素消化し、HPLCで分離したクロマトグラフを図1に示す。EPに収載されている試験条件を参考とした(表5)。

2.3 各ペプチドの分析と確認

ペプチドの分離度の確認は、クロマトグラフィーで使用される各種のパラメータ(ピーク間の分離度、ピークの最大幅、ピーク面積、テーリングファクター、カラム効率等)が利用できる。

判定方法は、最初に相対保持時間、ピーク強度、ピークの数、全体の溶出パターンなどを視覚的に比較する。次に、ピーク強度比の比較、更に試料の

消化物及び標準物質の消化物の1:1混合液のクロマトグラムのプロフィールを比較して、一致することを確認する。試料と標準物質のそれぞれの消化物のすべてのピークが同等の相対保持時間及び同等のピーク強度比を示すことにより、試料と標準物質との同一性が確認される。

ペプチドマッピングにおいて正確に同定された特定のピークについては、ピークの保持時間とピーク面積又はピーク高さに関して数値を比較することができる。ピーク面積は、ピーク面積積分法がベースラインの変動の影響を受けやすく誤差を生じやすいことさえ

考慮すれば、変動の比較的小さいピークを内標準として利用して計算することができる。代わりに、試料のすべてのペプチド断片のピーク高さの合計に対する各ピーク高さの比率を算出し、標準物質で得られる該当ピークの比率と比較することもできる。

3 インスリンのペプチドマッピング

インスリン(遺伝子組換え)は、アミノ酸51個からなるポリペプチドである。ペプチドマッピングによりヒト、ウシ及びブタインスリンを比較した実験例を挙げる(図2)。表6に示す条件で、各インスリンをグルタミンエンドペプチダーゼで酵素消化して生じる4種のペプチドフラグメントをHPLCで分析し、これらのピークの保持時間とピーク高さを比較した。図3に示すように、ウシ及びブタインスリンの構造はヒトインスリンとわずかに異なる。酵素消化により得られる4種のペプチドフラグメントにおいて異なるアミノ酸が含まれるフラグメント及びは、ヒトインスリンと保持時間のずれが認められ、1個のアミノ酸の違いをペプチドマッピングにより判別できることを当社で確認した(表7)。

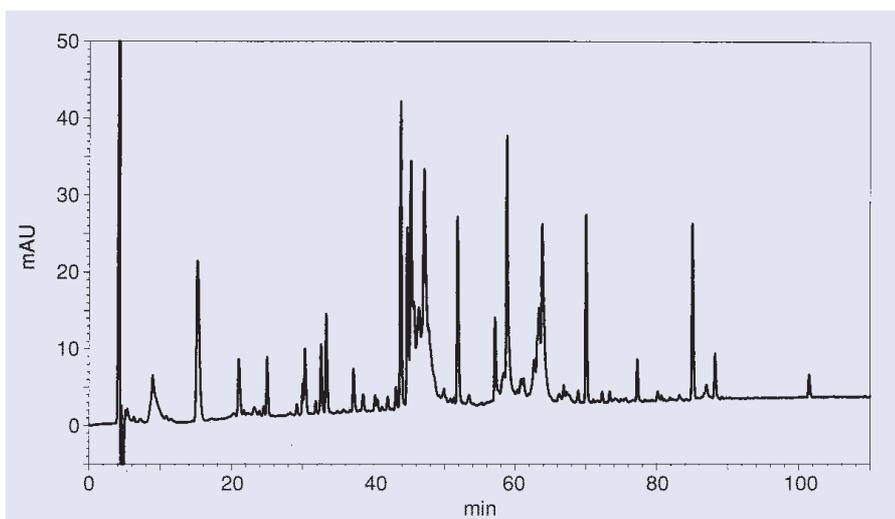


図1 トリプシン酵素消化後のエリスロポエチン(遺伝子組換え)のクロマトグラム

表5 酵素消化及びクロマトグラフィーの試験条件⁵⁾

| | | |
|----------|-------|---|
| 酵素消化 | 酵 素 | トリプシン |
| | pH | 8.5 |
| | 温 度 | 37 |
| | 反応時間 | 18時間 |
| HPLC試験条件 | カラム | C4カラム(4.6 mm x 250 mm) |
| | 溶 媒 | A. 0.06% TFA/水溶液 B. 0.06% TFA/90%アセトニトリル溶液 |
| | 濃度勾配 | (0 61%, B) / 125 min |
| | カラム温度 | 室温 |
| | 流 速 | 0.75 - 1.25 mL/min |
| | UV検出 | 214 nm |

4 おわりに

低分子化合物をもとにした化学合成医薬品の場合、通常、構造解析試験を利用すれば、有効成分の同一性を示すことは容易である。しかし、バイオ医薬品においては、高分子タンパク質の持つ複雑な構造、生物活性、不安定性等のため、有効成分の構造解析や理化

表6 酵素消化及びクロマトグラフィーの条件⁶⁾

| | | |
|----------|-------|--|
| 酵素消化 | 酵素 | グルタミンエンドペプチダーゼ |
| | pH | 7.8 |
| | 温度 | 25 |
| | 反応時間 | 6時間 |
| HPLC試験条件 | カラム | ODSカラム (4.6 mm x 100 mm) |
| | 溶媒 | A. 20% 硫酸アンモニウム/10%アセトニトリル溶液 B. 20% 硫酸アンモニウム/40%アセトニトリル溶液 |
| | 濃度勾配 | (10 70%, B) /60 min |
| | カラム温度 | 40 |
| | 流速 | 1.0 mL/min |
| | UV検出 | 214 nm |

学試験のみでは、目的とするバイオ医薬品の品質評価を示すことは困難であることが少なくない⁷⁾。品質評価試験のうちペプチドマッピングは、遺伝子

組換え医薬品のような高純度のタンパク質性医薬品の確認試験法として、一般的かつ確実な方法である。第十五改正日本薬局方収載品のうち、ペプチド

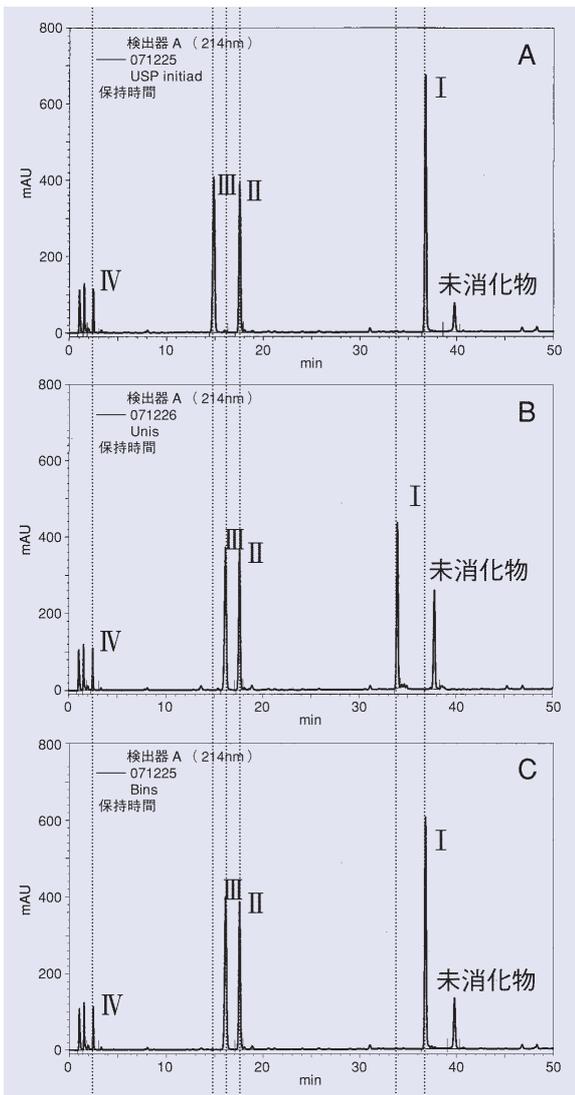


図2 インスリンの種差比較 (A: ヒト, B: ウシ, C: ブタ)

表7 各フラグメントの保持時間

| フラグメント | 保持時間 (分) | | |
|--------|----------|------|------|
| | ヒト | ウシ | ブタ |
| | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | 14.8 | 16.1 | 16.1 |
| | 17.5 | 17.6 | 17.5 |
| | 36.8 | 33.9 | 36.8 |

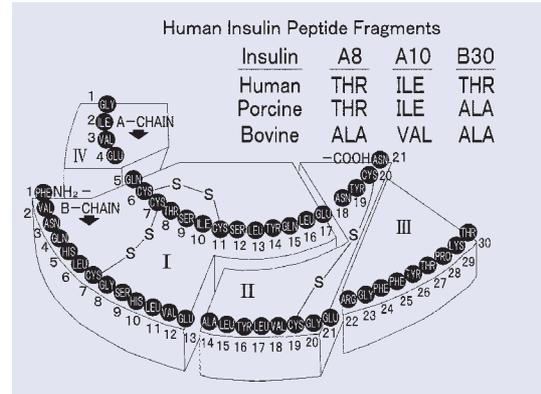


図3 ヒトインスリンフラグメントと種差で異なるアミノ酸⁶⁾

マッピングが規定されている品目は、ヒトインスリン (遺伝子組換え) とセルモロイキン (遺伝子組換え) のみであるが、EPでは、エリスロポエチン (遺伝子組換え) なども収載されている。

今回、ペプチドマッピングを中心に紹介したが、表2に示すようにバイオ医薬品の品質評価には、アミノ酸組成解析や糖鎖組成解析など多角的な分析が求められる。当社においても、顧客ニーズを調査しながら新しい評価方法を提案し、先端の技術を活用した高品質の分析を通じて、新薬創薬 (研究開発) に貢献していきたい。

文献

- 1) 薬審1第10号通知 (昭和63年6月6日) 「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」
- 2) 医薬審発第571号通知 (平成13年5月1日) 「生物製品 (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」
- 3) 第十五改正 日本薬局方解説書
- 4) 日米EU医薬品規制調和国際会議 (ICH)
- 5) European Pharmacopoeia 「Erythropoietin concentrated solution」
- 6) 日本薬局方 技術情報 2006
- 7) 「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」



中谷 圭吾
(なかたに けいご)
医薬事業本部
バイオ技術センター



疋田 昌義
(ひきた まさよし)
医薬事業本部
バイオ技術センター