

糖鎖組成を指標とするキャピラリー電気泳動による抗体分析

掛樋一晃

近畿大学薬学部 医薬品情報学研究室

06-6730-5880 (ext.3822) k_kakehi@phar.kindai.ac.jp

1. 緒言

組替え糖タンパク質性医薬品や培養細胞由来糖タンパク質性医薬品における構造解析や品質評価を行うにあたって留意すべき点は、これらの生物由来医薬品の成分を構造面から見た場合、不可避的な不均一性が存在することである。この不均一性は生物由来医薬品の製造面の特徴やタンパク質がその本体であるという 2 点に起因する。生物由来医薬品の不均一性の典型的な例として、その生産物が糖タンパク質である場合が挙げられるが、糖タンパク質中の糖鎖はタンパク質翻訳後に、複数の酵素の協調作業により 2 次的に生合成されるため、付加糖鎖の多様性と糖鎖組成の不均一性が避けられない。一方、糖タンパク質性医薬品ではその糖鎖が生物活性発現等に重要な役割を担っている場合が多い。したがって、糖タンパク質性医薬品の品質管理のパラメーターとして、糖鎖の評価は極めて重要である。特に最近のバイオ医薬品のフロンティア領域である抗体医薬品についてはその糖鎖構造が ADCC 活性を左右するとの報告がなされるなど糖鎖構造解析の重要性が高まっている。

糖タンパク質糖鎖の評価法としては高速液体クロマトグラフィー法、質量分析法等が汎用されているが、種々の異性体の存在により全ての糖鎖分子種を分離分析することは難しく、糖鎖構造または糖鎖組成比の変化の追跡法として高精度かつ高分解能の糖鎖プロファイリングが要求される。本報告では市販の抗体医薬品を試料として、3 アミノ安息香酸による蛍光標識糖鎖のキャピラリー電気泳動による糖鎖プロファイリング法について紹介する。

2. 方法

2.1 蛍光標識糖鎖の調製

抗体医薬品として市販の抗体医薬品 trastuzumab 及び rituximab を使用した。試料は精製水に対し透析後、凍結乾燥した。凍結乾燥試料はリン酸緩衝液に溶解し、N-グリカナーゼ F (PNGase F) を加え、37 °C で 12 時間酵素反応を行い、アスラパギン結合型糖鎖を切り離れた。切り離された糖鎖は 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) および 3-aminobenzoic acid (3AA) による還元的アミノ化反応により蛍光標識した。標識後、ゲルろ過により過剰試薬を除去し、レーザー励起蛍光検出器付キャピラリー電気泳動装置により分析した。

2.2 キャピラリー電気泳動による糖鎖分析

キャピラリー電気泳動装置には Beckman P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を使用した。

APTS 標識糖鎖の分析：キャピラリー、DB-1 キャピラリー(内径 50 μm 、有効長 20cm)；泳動用緩衝液、50 mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 7.0) /0.5 % PEG70000；印加電圧、20 kV；分析温度、25 ；検出、アルゴンレーザー励起蛍光検出 (Ex. 488 nm、Em.520 nm)。3AA 標識糖鎖の分析：キャピラリー、DB-1 キャピラリー(内径 100 μm 、有効長 20cm または 70cm)；泳動用緩衝液、100 mM Tris-ホウ酸緩衝液 (pH8.3) /10 % PEG70000；印加電圧、25 kV；分析温度、25 ；検出、ヘリウム-カドミウムレーザー励起蛍光検出(Ex. 325 nm、Em.405 nm)

3.結果

trastuzumab を APTS 法および 3AA 法を用いて蛍光標識し、標識糖鎖をキャピラリー電気泳動により分析した。同一試料を用いて繰り返し 6 回試料注入を行い、各標識法による電気泳動の再現性を評価した。その結果、糖鎖プロファイルとして両方法ともに IgG に特徴的な糖鎖構造である還元末端 GlcNAc に α 1-6Fuc 残基を有する複合型 2 本差糖鎖 I ~ IV を確認することができた (Fig.1 及び Fig.2)。

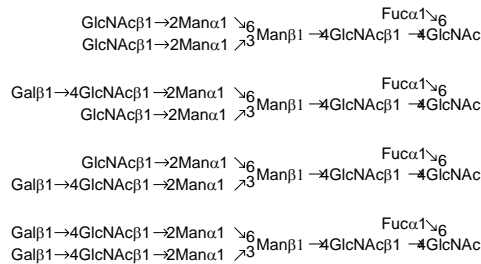


Fig. 1. Typical carbohydrate structures in IgGs.

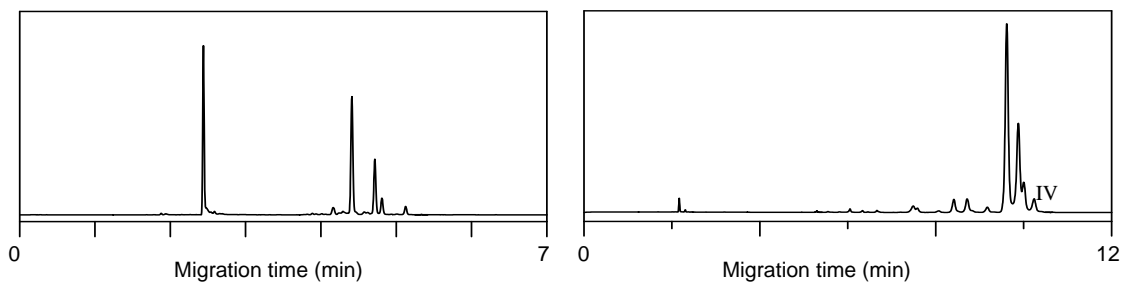


Fig. 2. Oligosaccharide maps of trastuzumab after derivatization with APTS (left) and 3-AA (right). Structures of peak I-IV are shown in Fig. 1.

また APTS 法及び 3AA 法における各ピーク面積百分率 (補正值) の相対標準偏差は両方法で 7% 以下となり良好な再現性を示した (Table 1)。さらに各糖鎖構造 I ~ IV の組成比は両方法でほぼ同等の結果を与えた。分離能に関して 3AA 標識法は APTS 標識法と比較し、特に非還元末端にガラクトースが 1 残基結合した構造異性体 (II 及び III) の分離が不十分であったが、分離条件について詳細に検討したところ、キャピラリーの有効長を長くすることで、APTS 標識化法と同等の分離を得ることができた (Fig.3)。続いて 3AA 標識法を用いて、

Table 1. Reproducibility of relative percentages of major peaks in APTS method (left) and 3-AA method (right).

Injection	Relative corrected peak area (%)							
	APTS Method				3-AA Method			
1	61.8	26.9	7.9	3.6	57.2	29.8	8.7	4.4
2	60.7	27.6	8.1	3.5	57.3	29.1	9.2	4.5
3	59.4	28.5	8.5	3.6	57.7	29.7	8.2	4.5
4	58.6	28.8	8.7	3.9	57.5	29.7	8.3	4.6
5	58.2	29.0	8.8	4.0	56.6	29.6	9.6	4.2
6	58.4	28.8	8.7	4.1	57.2	29.5	8.7	4.6
Mean	59.5	28.3	8.5	3.8	57.2	29.6	8.8	4.4
S.D.	1.5	0.8	0.3	0.3	0.4	0.2	0.5	0.1
R.S.D.(%)	2.5	3.0	4.1	6.6	0.6	0.8	6.1	3.2

Structures - as in Fig. 1.

抗体医薬品 rituximab 及び trastuzumab について、ロット間における糖鎖組成比の評価を行った結果を Table 2 に示す。

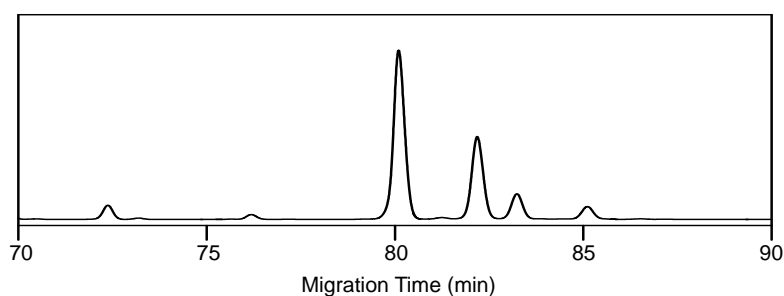


Fig. 3. Analysis of carbohydrate chains of trastuzumab after derivatization with 3-AA using 70 cm capillary.

rituximab 及び trastuzumab とともに Fig.1 に示す I ~ IV の糖鎖が主要な糖鎖として存在するものの、その組成比は rituximab 及び trastuzumab で大きく異なった。また各抗体医薬品にお

Table 2. Lot to lot analysis of two therapeutic antibody products (rituximab and trastuzumab) by 3-AA method.

Lot	Relative corrected peak area (%)							
	rituximab				trastuzumab			
a	37.5	30.5	15.5	16.5	55.8	26.3	11.4	6.5
b	43.4	37.2	9.9	9.5	56.5	27.9	10.5	5.0
c	43.1	36.4	10.4	10.1	53.7	28.6	12.6	5.1
d	47.1	36.0	9.4	7.5	57.6	26.5	10.8	5.0
e	46.4	35.8	9.6	8.1	55.1	30.3	9.2	5.4
f	42.1	33.3	12.8	11.8	55.9	29.1	10.3	4.8
g	42.3	37.5	10.4	9.8				
Mean	43.1	35.2	11.2	10.5	55.8	28.1	10.8	5.3
S.D.	3.2	2.5	2.2	3.0	1.3	1.5	1.1	0.6
R.S.D.(%)	7.3	7.0	19.8	28.8	2.4	5.4	10.4	11.5

Structures - as in Fig. 1.

いてロット間の糖鎖組成比は比較的良好に保たれていた。

4.考察

糖タンパク質性医薬品において、代謝の延長による投与間隔の延長あるいは生理活性の増強などを目的とした次世代型糖鎖改変医薬品の開発が急ピッチで進められている。このような環境では、糖鎖の精密な分析に基づく糖タンパク質医薬品のレギュレーションが要求される。我々はキャピラリー電気泳動を利用する抗体医薬品中の糖鎖分析法について詳細に検討し、キャピラリー電気泳動法が抗体医薬品中の糖鎖の分析法として満足できる性能を発揮することを示した。

我々が開発した 3AA 標識糖鎖と従来から利用されている APTS 標識された糖鎖をキャピラリー電気泳動法により分析する方法について検討し、3AA 法が APTS 標識法と同等の分離能ならびに再現性を有することが明らかとなった。3AA は高純度品の入手が容易であり、HPLC や MS 分析にも応用可能であるなどの利点があり、抗体医薬品をはじめとする糖鎖分析に基づく糖タンパク質性医薬品の評価に利用できる手法であると言える。

今回、我々は糖タンパク質性医薬品の品質評価法としてキャピラリー電気泳動を利用する糖鎖分析法について検討した。糖タンパク質糖鎖の解析に関する最近の進歩は目覚ましく、高感度かつ高分解能の分析法が続々と報告され、例えば現行日本薬局方に収載されているたんぱく質性医薬品の確認法などの中には再考を要する品目も散見される。

本発表ではそのような点も含めて、議論の材料を提供させて頂きたい。

5.参考文献

- S. Kamoda *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1050**, 211-216, 2004
- K. Nakajima *et al.*, *J. Proteome Res.*, **2**, 81-88, 2003
- K. Takechi *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **863**, 205-218, 1999