

バイオ医薬品の不純物である宿主細胞由来タンパク質の分析技術の現状と課題

日向昌司

Current status and challenges of analytical methods for host cell proteins (HCPs) present as impurities in biopharmaceuticals

Masashi Hyuga

Host cell proteins (HCPs) are process-related impurities in biopharmaceuticals. The concern for HCPs in biopharmaceuticals is that HCPs not only induce anti-HCP antibodies, but also act as adjuvants to promote the development of anti-drug antibodies. In addition, proteases that digest products and lipases, which digest the components of pharmaceuticals, affect the stability of biopharmaceuticals. Therefore, when developing manufacturing processes, it is necessary to verify the efficiency of HCP removal in the purification process. HCPs should also be monitored for in-process testing and drug substance testing. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using anti-HCP polyclonal antibodies (HCP-ELISA) are the gold standard method for quantitative analysis of HCP. In recent years, proteomics using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) has been explored as an important orthogonal method of HCP analysis that allows the identification and quantification of individual HCPs. This paper outlines the current status and challenges of HCP analytical methods.

Keywords: 宿主細胞由来タンパク質；バイオ医薬品；ELISA；LC/MS/MS

1. はじめに

バイオ医薬品は、微生物や哺乳動物細胞等の宿主細胞に目的物質の遺伝子を導入して強制的に発現させることにより製造されるため、不純物として宿主細胞由来タンパク質 (HCP) を考慮する必要がある。HCPは、宿主細胞が産生するタンパク質の混合物で、測定方法によるが、精製前の工程で数百種類以上検出される。通常、ほとんどのHCPは、精製工程で除去されるが、僅かに残留することがある。バイオ医薬品に残留したHCPは、免疫反応を引き起こすだけでなく、抗薬物抗体を誘導するアジュバント様作用を持つ可能性がある。また、酵素活性を持つHCPが、目的物質や製剤の処方成分を分解することで、安定性に影響する場合がある。したがっ

て、バイオ医薬品の製法開発において、各精製工程のHCP除去能力や原薬のロット分析によりHCPが恒常的に除去できていることを検証する必要がある。また、製造において、工程内試験や原薬の純度試験を設定することにより、適切にHCP量を管理する必要がある¹⁾。

標準的なHCP試験法は、酵素免疫測定法 (ELISA) が用いられている。また、近年、従来のHCP測定法を補完しうる重要な分析技術として、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いたプロテオミクスの応用が検討されている。

本稿では、標準的なHCP測定法をはじめ、開発中の代表的なHCP分析技術の現状と課題について概説する。

2. 代表的なHCP分析技術

2.1 HCP-ELISA²⁻⁴⁾

原薬のHCP残留量は、目的物質1 mgあたりナノグラムのオーダー未満となることが目安とされており、大量の目的物質中の複数のHCP種を測定することは容易でない。ELISAは、この測定が可能な分析技術であるが、数百種類の各HCP種に対するELISAを個別に確立する

To whom correspondence should be addressed:
Masashi Hyuga; Division of Biological Chemistry and
Biologicals, National Institute of Health Sciences, 3-25-
26 Tonomachi, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan;
Tel: +81-44-270-6515; Fax: +81-44-270-6517; E-mail:
mhyuga@nihs.go.jp

ことは実務上現実的ではない。そこで、全てのHCP種をまとめて測定するELISA (HCP-ELISA) が、標準的なHCP測定法として採用されており、日本薬局方の参考情報に指針が示されている¹⁾。

1) 測定方法の確立

HCP-ELISAを実施するためには、バイオ医薬品に混在すると考えられる全てのHCP種を抗原として動物に免疫することで、全てのHCP種と反応するポリクローナル抗体を調製する必要がある。例えば、CHO細胞を宿主細胞として分泌タンパク質として目的物質を生産する場合は、目的物質の遺伝子を導入していないCHO細胞の培養上清に含まれるタンパク質を抗原とする。また、この抗原を標準物質とし、得られた抗HCPポリクローナル抗体を捕捉抗体及び検出抗体としてサンドイッチELISAを確立する (図1)。

新たにHCP-ELISAを確立するためには、数ヶ月から年単位の準備期間を要するため、CHO細胞や大腸菌など開発済の測定キットが入手可能である場合は、開発初期の製法開発において、「汎用試験法」として活用されている。ただし、製造に用いる宿主細胞 (亜株など) や培養条件 (培養液, 温度, 期間) の違いによって、抗原のプロファイルに差異が生じる可能性があるため、概ね臨床試験に移行する段階までには、製造と同様の条件で

調製したHCPを抗原とする抗HCP抗体を用いたHCP-ELISAを「製品特異的試験法」として確立することが望ましい。

バイオ医薬品の精製工程の開発において、残留HCPを限りなく減らす条件が検討されるため、原薬の段階ではHCP-ELISAの定量下限に到達することもある。定量下限となった場合、通常、高度に精製されていると考えられるが、HCP-ELISAの場合、抗体の性能に依存した測定漏れが生じた結果、残留量を過小評価する可能性に留意する必要がある。

2) HCP-ELISAに用いる抗HCP抗体の評価

HCP-ELISAで測定漏れが発生する原因として、各HCP種の抗原量や免疫原性に差異に加え、免疫に用いる動物の個体差によって、各HCP種に対する抗体の産生に差異が生じる。したがって、HCP-ELISAに用いる抗HCP抗体の性能について、抗原カバー率を評価する必要がある。

抗HCP抗体のカバー率は、二次元電気泳動とウエスタンブロットを用いる手法 (2D-WB法) が標準的な評価法として採用されており、日本薬局方の参考情報に指針が示されている¹⁾。2D-WB法は、HCPを二次元電気泳動法で分離した後、ゲルの総タンパク質染色と抗HCP抗体を用いたウエスタンブロット染色で得たスポットパ

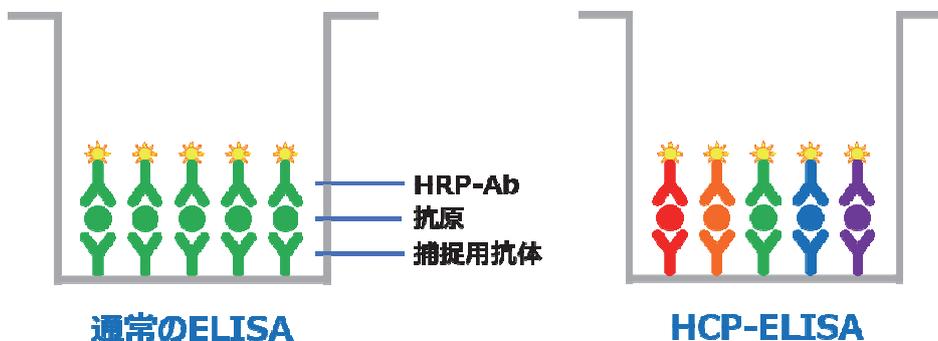
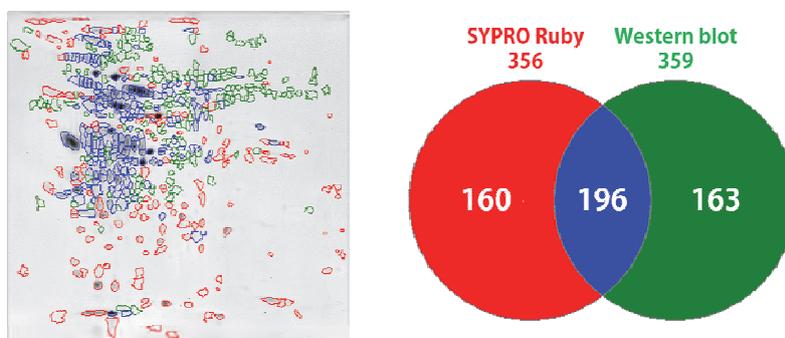


図1 HCP-ELISAの模式図



$$\frac{\text{WBスポット数 } 359}{\text{全スポット数 } 519 (356+359-196)} \times 100 = 69\%$$

図2 2D-WB法による抗原カバー率の評価

ターンを比較し、総タンパク質染色のスポット数に対するウエスタンブロットで検出されたスポット数の割合を抗原カバー率として算出する(図2)。

カバー率は高いことが望ましいが、下限値は設定されていない。実際、全てのHCPに対する抗体を漏れなく検出することが可能なポリクローナル抗体を作製することは容易でないが、カバーされるHCPの電荷や分子量について、特定の範囲に漏れがないことを確認することで、全体の除去状況を推定することが可能な抗体であると判断する場合もある。

2D-WB法の原理的な課題として、HCPが還元剤とSDSで変性されているため、ネイティブなHCPを測定するHCP-ELISAとは抗体の反応性が異なる可能性に留意が必要である。一方、ネイティブなHCPに対する抗体反応性を評価することが可能な手法として、抗HCP抗体を固定化したカラムを用いて抗HCP抗体結合性HCPを回収し、2D法で比較する分析技術も提案されているが、結合力が強い抗体に結合したHCPが回収されない可能性が指摘されている。

現在、抗HCP抗体の新しい評価法として、LC/MS/MSを用いたプロテオーム解析技術の応用が期待されており、2.2の3)において記述する。

3) HCP-ELISAのバリデーション

HCP-ELISAのバリデーションは、HCP標準物質を用いた直線性、定量範囲、真度、精度といった分析法バリデーションに準じて実施する。HCP-ELISAにおいては、これらの項目に加えて、試料の「希釈直線性」の検討が重要である。

通常のELISAでは、試料の希釈率に関わらず定量範囲内の測定値であれば定量値が一定となるが、定量上限を大きく超えた場合、フック効果による測定値の低下が生じることがあるため、試料の希釈直線性を評価する必要がある。一方、HCP-ELISAにおいては、定量範囲内で低い測定値であっても、希釈率によって算出される定量値が一定とならない場合があり、原薬など、精製された試料で生じやすいことが知られている。複数のHCP種を同時に測定するHCP-ELISAに特有の現象で、各HCP種に対する抗体量が十分でないことに起因するものと考えられている。したがって、HCP-ELISAを用いた試験法を設定する場合は、測定対象となる試料について、希釈直線性が得られる希釈倍数の範囲をあらかじめ確認し、適切な希釈倍数と測定値の算出方法を手順書に定めておく必要がある。

4) HCP-ELISAにおける測定値の考え方

残留HCPは、培養工程や精製工程の違いでプロファイルが異なること、HCP-ELISAの抗HCP抗体の性能に依存して測定値は容易に変動しうること、さらに、投与

経路、投与量、投与頻度、対象疾患など、様々な要因がHCPに起因する有害事象の発生に影響すると考えられる。したがって、HCPの限度値を一律に設定することはできず、具体的な限度値は公式に提示されていない。

HCPの限度値については、製造工程や原薬における除去状況の一定性が確認され、医薬品の安定性に影響がないことや臨床において有害事象と関連しないことが裏付けられた場合、それらの試験に用いた製造ロット等のHCPの測定値に基づいて個別に設定する必要がある。

一方、目的物質1mg当たりHCP含量が100ng未満(100ppm、あるいは、100ng/mgと記載される)であることが精製方法の妥当性を裏付ける根拠として説明されることがある⁶⁾。引用を繰り返されるなど、根拠が不明なケースもあるが、Eatonの論文⁷⁾が発端となっているようである。この総説では、「検出感度が1~100ppmである」との記述に留まっており、「限度値として10ppmを目標とすべき」と明記されている。「100ppm」は、公知のように扱われているが、同一の試料であっても、測定方法や測定条件によって測定値は一定ではないことを踏まえると、精製工程を開発する際の目安に過ぎず、HCPの有効性・安全性に対する影響を排除する根拠とはならない。

2.2 LC/MS/MSを用いたHCP分析技術

HCP-ELISAは、全体の除去状況を把握できる有用な測定手法であるが、個々のHCP種の含量は測定できない。また、個々のHCP種に対するレスポンスは低いため、残留したHCP種が少なくなった場合、過小評価されることがある。さらに、すべてのHCP種がカバーできていないため、測定漏れが生じうることも想定される。このような背景から、LC/MS/MSを用いたタンパク質の同定解析技術、定量解析技術、HCP-ELISAを補完する有用なHCP分析技術として応用することが提案されている。

1) LC/MS/MSを用いたHCP分析技術の特徴

LC/MS/MSを用いたHCP分析技術は、プロテオミクスで培われた解析技術を応用して実施されている。プロテオーム解析技術を用いることで、多種多様のHCPを一回の測定で網羅的に同定することや定量することが可能である。ただし、インタクトの状態での解析ではなく、トリプシンなどの消化酵素を用いて断片化されたペプチドを解析し、そのデータからタンパク質の存在や含量を推定する技術であることを理解しておく必要がある。また、ペプチドの同定には、解析対象となるHCP等の一次構造のデータベースが必要である。

2) 試料調製方法

プロテオーム解析技術は、数千種類のタンパク質の混

合物について、各タンパク質を同定し定量することが可能であり、HCPの分析技術として応用することについて、特段の技術的課題はないものと可能と考えられていた。しかしながら、原薬に残留するHCP量に対し、目的物質は数万から数百万倍量であるため、質量分析におけるイオン化が抑制される現象（イオンサプレッション）が発生することで、測定値を著しく低下させることが明らかになっている。したがって、微量の残留HCPを適切に測定するためには、目的物質に由来するペプチドを減らすことが有効であり、いくつかの試料調製条件が提案されている。

A. 目的物質の排除法

いわゆる免疫沈降法に代表されるように、目的物質に対する抗体を用いることで、目的物質を特異的に排除することが提案されている。また、抗体医薬品であればProtein Aなど、目的物質に対する親和性を有する物質を用いることもできる。

ただし、残留HCPが極めて微量であるため、除去処理操作における非特異的吸着により、HCPが減少することがある。また、弱いながらも目的物質に親和性を有する一部のHCP種は、精製工程で目的物質に乗って残留することからヒッチハイカーHCPと呼ばれており、除去処理操作の際、目的物質とともに排除される可能性に留意する必要がある。これまでに様々な除去処理条件が提案されているが、コンセンサスが得られた条件はなく、現在も研究開発が続いている。

B. 目的物質の消化抑制法

抗体医薬品に限定される方法であるが、IgGが構造的に強固であり、未変性ではプロテアーゼ消化に対して抵抗性である特徴を生かしたインタクト消化法が提案されている。通常、確実に消化させるために、消化前に還元ア

ルキル化を実施するが、インタクト消化法は、消化後に還元アルキル化を実施する。また、通常の消化条件では、IgGが部分的に消化されるため、酵素量や消化時間を削減するなど、最適化が検討されている。

ただし、IgGと同様に、一部のHCP種は消化に対して抵抗性であること確認されており、これらのHCP種はインタクト消化法で検出されにくい。また、インタクト消化法では多くのHCP種は不完全な消化となるため、元のHCP含量を適切に反映しないことや、酵素活性、温度、時間の影響で変動しやすいことが確認されており留意が必要である。

インタクト消化法は、上記のような懸念があるが、目的物質の排除法のような前処理工程がなく、簡便な手法であるため、全体のHCPの除去状況をモニタリングする場合など、目的によっては極めて有用であると考えられる。

3) LC/MS/MSを用いた抗HCP抗体の評価への応用

抗HCP抗体は、動物に免疫して血清から調製するため、一定期間ごとに再調製することが必要となる場合がある。免疫に用いる動物の個体差によって、ロット間でHCP-ELISAのレスポンスに差異が生じることがあり、同等性の評価が必要である。通常、2D-WB法を用いて、スポットの類似性の比較に留まっていた。

2.1の2)において、抗HCP抗体の評価法について記述したが、抗HCP抗体結合性HCPをLC/MS/MSを用いて同定・定量する新しい抗HCP抗体評価技術も開発されつつある。これまでに様々な除去処理条件が提案されているが、コンセンサスが得られた条件はなく、現在も研究開発が続いている。我々がAMED 創薬基盤推進研究事業の研究班で実施している成果の一部を紹介したい。この方法の特長は、実際のHCP-ELISAでの測定条件で

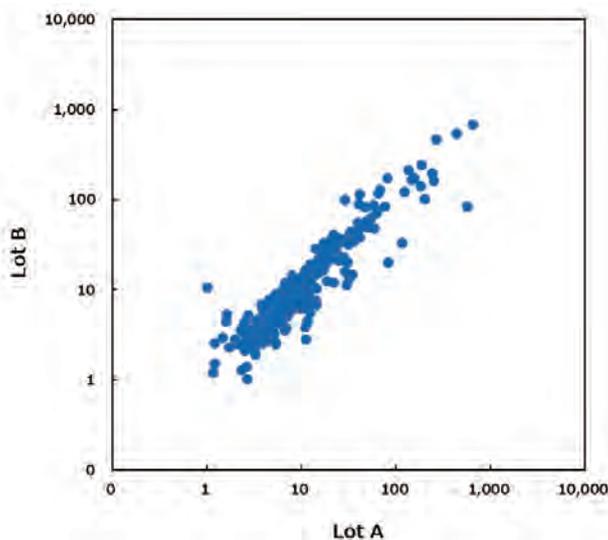


図3 抗HCP抗体のロット間の比較

プレートに結合するHCPを試料とし、LC/MS/MSを用いて同定・定量を行っていることである。その結果、モデルとして用いた二つのロットについて解析された各HCP種の相対定量値の相関を示すことで、個々のHCP種に対する抗体の反応性の同等性が示せることが確認された(図3)。

3. 品質及び有効性・安全性に及ぼすHCP種

これまでに、HCPがバイオ医薬品の品質及び有効性・安全性に及ぼす影響について、免疫原性が高いHCPや、目的物質や製剤の成分を分解しうるHCPに関する知見が蓄積されてきており、リスクの高いHCP (problematic HCP) としてリスト化されている⁷⁾。

免疫原性が高い HCPとしては、Phospholipase B-like 2 (PLBL2), Clusterinなどが報告されている^{8,9)}。これらのHCPの残留が懸念される場合は、臨床試験において、抗HCP抗体、抗薬物抗体や中和活性の誘導などについてモニタリングし、有害事象の発生に留意すべきである。

目的物質の分解に関わる代表的なHCPとしては、Cathepsin Dなどのプロテアーゼがあり、目的物質を分解して薬効を低下させるだけでなく、凝集体の形成を惹起することで免疫原性を生じさせることが懸念されている¹⁰⁾。また、Lysosomal phospholipase A2などのリパーゼは、製剤に添加されている界面活性剤であるポリソルベートの加水分解で遊離脂肪酸を生じ、凝集体の生成を惹起するため、バイオ医薬品の安定性に影響する¹¹⁾。

Problematic HCPは、製法開発の段階で十分に除去されていることが望ましいことは論を待たない。また、ELISAやLC/MS/MSを用いたHCP分析技術で、Problematic HCPを個別に測定することも可能である。ただし、Problematic HCPでさえ許容される基準値は設定されていないため、測定結果の解釈が課題となっている。免疫原性に関わるHCPについては、知見を積み重ねることで、一定の目安を設定する議論が可能となることを期待したい。一方、リパーゼ類による製剤の安定性に関する課題については、実験による検証が可能な事象であるため、今後具体的な評価結果に基づいた限度値の設定が可能となるものと期待される。

4. おわりに

現在、LC/MS/MSを用いたHCP分析技術は開発途上であり、HCP-ELISAに替わるHCP試験法として実装するためには、更なる検討が必要である。一方、現時点の測定技術レベルであっても、HCP-ELISAを補完する情報を得ることは可能で、今後、技術指針を提示するなど、

活用を推進する必要がある。

謝辞

本特論は、AMED 創薬基盤推進研究事業(課題番号: 24ak0101188j0203)のサポートで産学官の共同研究で実施した研究成果の一部が含まれている。また、石井生物薬品部長をはじめ、研究班に参画いただいた多くの先生方との意見交換の成果を踏まえて執筆したもので、深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 第十八改正日本薬局方, 参考情報, 宿主細胞由来タンパク質試験法 (G3-9-172)
- 2) 日向昌司, 石井明子: Pharm Stage 2022;22(6):13-16.
- 3) 日向昌司: “バイオ医薬品の製剤安定化/高品質化のための不純物の規格設定と評価・管理手法”, サイエンス&テクノロジー, 東京, pp.131-41 (2022)
- 4) 日向昌司: “有効性・安全性確保のためのバイオ医薬品の品質管理戦略 第2版”, (株)じほう, 東京, pp. 102-110 (2020)
- 5) Zhu-Shimoni J, Yu C, Nishihara J, Wong RM, Gunawan F, Lin M, Krawitz D, Liu P, Sandoval W, Vanderlaan M: Biotechnol Bioeng. 2014; 111(12): 2367-79. doi: 10.1002/bit.25327.
- 6) Eaton LC.: J Chromatogr A. 1995; 705(1): 105-14. doi: 10.1016/0021-9673(94)01249-e.
- 7) Jones M, Palackal N, Wang F, Gaza-Bulsecu G, Hurkmans K, Zhao Y, Chitikila C, Clavier S, Liu S, Menesale E, Schonenbach NS, Sharma S, Valax P, Waerner T, Zhang L, Connolly T: Biotechnol Bioeng. 2021; 118(8): 2870-2885. doi: 10.1002/bit.27808.
- 8) Fischer SK, Cheu M, Peng K, Lowe J, Araujo J, Murray E, McClintock D, Matthews J, Siguenza P, Song A: AAPS J. 2017; 19(1): 254-263. doi: 10.1208/s12248-016-9998-7.
- 9) Jawa V, Joubert MK, Zhang Q, Deshpande M, Hapuarachchi S, Hall MP, Flynn GC: AAPS J. 2016; 18 (6): 1439-1452. doi: 10.1208/s12248-016-9948-4.
- 10) Bee JS, Tie L, Johnson D, Dimitrova MN, Jusino KC, Afdahl CD: Biotechnol Prog. 2015; 31(5): 1360-9. doi: 10.1002/btpr.2150.
- 11) Dixit N, Salamat-Miller N, Salinas PA, Taylor KD, Basu SK: J Pharm Sci. 2016; 105(5): 1657-1666. doi: 10.1016/j.xphs.2016.02.029.