

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖の高機能化のための解析・制御・管理システムの開発
3. 研究開発代表者：公立大学法人 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 川崎 ナナ
4. 研究開発の成果

【目的】

現在上市されているタンパク質医薬品の多くは糖タンパク質である。糖タンパク質には、一つまたは複数の糖鎖結合部位が存在し、それぞれの結合部位に結合している糖鎖の構造には、多様性が存在することが多い（マイクロ不均一性）。また、同一部位に糖鎖が結合している分子と、結合していない分子が混在していることもある。糖鎖の構造とその割合（不均一性）は、安定性、溶解性、生物活性、体内動態、血中半減期、及び免疫原性などに影響する可能性があることから、糖鎖を最適化し、それを保持することは重要である。しかし、糖鎖の不均一性は、培養条件などの製造方法に依存して変動することから、糖タンパク質医薬品の品質管理においては、その目標とする糖鎖不均一性を保持するための製造方法や、確認するための試験方法、あるいはその組み合わせを講じることが求められる。

本研究開発の目的は、糖タンパク質バイオ医薬品の開発・製造において、糖鎖の最適化、及びその制御・管理を可能にするシステムを開発することである。横浜市大、三井情報社、及び Thermo 社がシステム開発に必要なデータを取得し、木原財団が糖タンパク質バイオ医薬品を試験的に製造する。本年度は、主に、システム開発に不可欠なモデル抗体（トラスツズマブ様抗体）の製造とデータ取得を行った。

【実験】

1) トラスツズマブ様抗体発現 CHO 細胞のリサーチセルバンク (RCB) 作製

TOTO 株式会社の特許技術（特許 4998814 号）を活用して作製したトラスツズマブ様抗体発現 CHO 細胞の細胞ストックを作製した。ストックからの細胞の培養における細胞の状態を示すデータ（細胞増殖曲線、生存率、抗体発現力価）がこれまでの培養実績値と同等であることを確かめ、当該細胞ストックを RCB とした。

2) トラスツズマブ様抗体の試験的製造

RCB から起眠してフラスコレベルで試験培養を行った。培養上清からプロテイン A 精製によりトラスツズマブ様抗体を取得した。

3) LC/MS によるトラスツズマブ様抗体のペプチドマッピング

トラスツズマブ様抗体を、キモトリプシン、トリプシン、エンドプロテイナーゼ Asp-N、エンドプロテイナーゼ Glu-C、エラスターゼ等で消化し、LC/MS/MS で測定した。

【結果と考察】

図 1 は、トラスツズマブ様抗体の各種酵素消化物の LC/MS/MS により取得した代表的クロマトグラム(左)、及びプロダクトイオンスペクトル(右)である。データベース検索エンジンを用いて、得られたプロダクトイオンと、トラスツズマブの一次構造から予想されるプロダクトイオン等を照合した。その結果、アミノ酸配列に関して、シーケンスカバレッジが H 鎖で 96%、また、L 鎖で 100%一致することを確認できた。これにより、システム開発に必要な基盤が構築されたことが確認された。

今後、培養条件等を変化させることによって、様々な糖鎖構造を持つトラスツズマブ様抗体を製造し、糖鎖の最適化、制御、管理につながるシステムの開発を行う予定である。

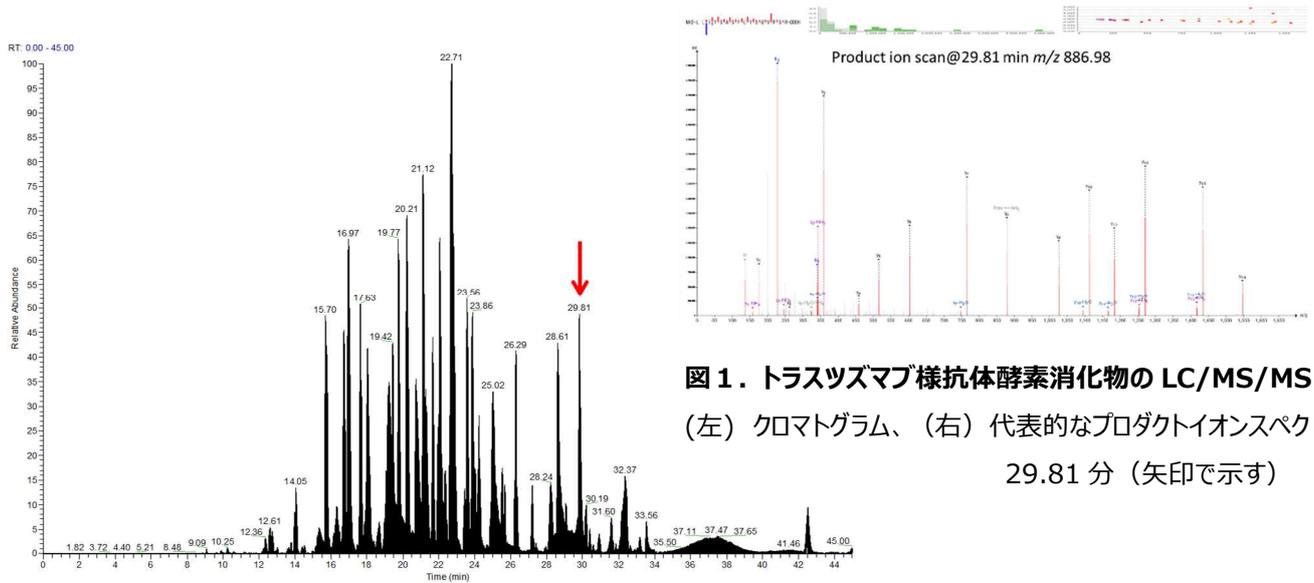


図 1. トラスツズマブ様抗体酵素消化物の LC/MS/MS
 (左) クロマトグラム、(右) 代表的なプロダクトイオンスペクトル
 29.81 分 (矢印で示す)

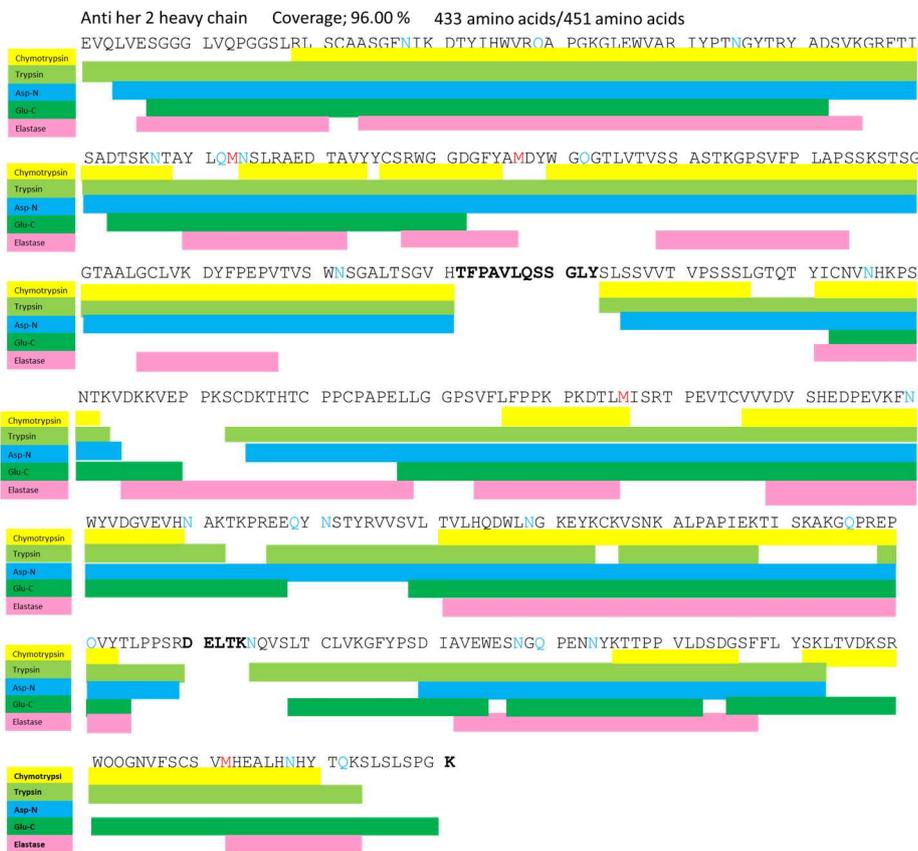


図 2. トラスツズマブ様抗体の
 ペプチドマッピングの結果
 (上) H鎖
 (下) L鎖
 黄色: キモトリプシン
 黄緑: トリプシン
 青: AspN
 緑: GluC
 桃色: エラスターゼ

