LC/QTOF-MSによるフィルグラスチムバイオ後続品の定性・成分分析

松村健吾^{1,2}, 大谷祐基¹, 大村友博¹, 米澤 淳¹, 津田真弘¹, 池見泰明¹
中川俊作¹, 今井哲司¹, 中川貴之¹, 矢野育子¹, 吉貴達寛², 松原和夫^{*1}
京都大学医学部附属病院薬剤部¹, 京都薬科大学臨床腫瘍学分野²

Qualitative Component Analysis of Filgrastim Biosimilars by LC/QTOF-MS

Kengo Matsumura^{1,2}, Yuki Otani¹, Tomohiro Omura¹, Atsushi Yonezawa¹,
Masahiro Tsuda¹, Yasuaki Ikemi¹, Shunsaku Nakagawa¹, Satoshi Imai¹,
Takayuki Nakagawa¹, Ikuko Yano¹, Tatsuhiko Yoshiki² and Kazuo Matsubara^{*1}
*Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Kyoto University Hospital¹,
Department of Clinical Oncology, Kyoto Pharmaceutical University²*

〔 Received March 18, 2016 〕
〔 Accepted July 6, 2016 〕

Many biosimilars have been launched recently, however, a precise analytical method to evaluate their characteristics has not been developed. In this study, we established a new qualitative analysis technology for biomedicines using liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC/QTOF-MS), and assessed the original product and 4 biosimilars of filgrastim. Three peaks (Peak 1-3) appeared in total ion chromatogram by LC/QTOF-MS in the original brand-named drug. Filgrastim appeared as the main peak (Peak 1), and its molecular weight was calculated to be 18798.96 ± 0.02 . When the original product was reduced by dithiothreitol, the molecular weight was 18802.19 ± 0.47 , which was identical to the theoretical value based on amino acid sequence. These results indicate that it is possible to measure and distinguish molecular weights of untreated and reduced forms of filgrastim by LC/QTOF-MS. In addition, main peaks from all products including biosimilars showed exactly the same mass spectra and calculated molecular weights, suggesting that the main components (filgrastim) in these 4 products were considered to be qualitatively equal. On the other hand, the area ratios of 2 secondary peaks (Peaks 2 and 3) against the main peak (Peak 1) in 2 biosimilars were higher than those in the original product. The calculated molecular weights in Peaks 2 and 3 corresponded to that of polysorbate 80, which was one of the additives in the formulation. In conclusion, LC/QTOF-MS is a useful technique for qualitative component analysis of biomedicines.

Key words — filgrastim, biosimilar, liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, qualitative analysis

緒 言

バイオ医薬品の開発は、遺伝子組換え技術の向上と共に近年飛躍的な成長を遂げている。一方で、バイオ医薬品の開発には莫大な費用がかかり、薬価が高額であることから、患者への経済的負担や医療費の増大が課題となっている。このような社会的背景に伴いバイオ後続品の開発も数多く進んでいる。バイオ後続品とは、「国内で既に新有効

成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等／同質の品質、安全性、有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」と定義されており、¹⁾2016年3月現在、本邦ではインスリン、ソマトロピン、エポエチンアルファ、フィルグラスチム、インフリキシマブのバイオ後続品が承認されている。バイオ後続品は、先行品の特許期間が終了後に発売される点については後

*〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

発医薬品と同様であり、国が施策として進める医療費削減にも貢献する可能性が謳われている (<http://www5.cao.go.jp/keizai-shimon/kaigi/cabinet/2015/decision0630.html>, 2016年3月18日; http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/iryou/kouhatu-iyaku/, 2016年3月18日)。バイオ後続品分野で先行している欧州では、2006年にバイオ後続品（欧州および米国ではバイオシミラーと呼ぶ）として初めてソマトロピン（遺伝子組換え）が承認され、2015年8月現在、6種類19製剤のバイオ後続品が承認されている。また、米国においても2015年3月にバイオ後続品として初めてフィルグラスチムが承認された。今後、ますますバイオ後続品は市場シェアを拡大すると考えられる。

高分子化合物であるバイオ医薬品は、製造工程において細胞培養技術を用いるため、アミノ酸配列は同じであるが、糖鎖付加や酸化等の修飾が異なる複数の構造体からなる。²⁾従って、低分子化合物である後発医薬品と異なってバイオ後続品は先行バイオ医薬品と全く同じ物を製造することができない。そのため、バイオ後続品の製造販売承認要件は先行バイオ医薬品に準ずる厳格な条件（非臨床試験として薬理試験、毒性試験、臨床試験として薬物動態・薬力学試験、有効性評価、安全性評価）が課せられている。^{1, 3, 4)}しかし、タンパク質への糖鎖付加やリン酸化などの修飾やその立体構造に関する情報は乏しい。

第十六改正日本薬局方では、フィルグラスチム（遺伝子組換え）の確認試験は sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法と液体クロマトグラフィー法、純度試験として液体クロマトグラフィーによる試験法が記載されており、⁵⁾バイオ後続品でもそれに準じた試験が行われている。バイオ医薬品のような高分子化合物の場合、高次構造の変化や糖鎖修飾などが薬効に影響を与えることが知られており、^{6, 7)}一次構造の変化（糖鎖修飾、アセチル化等）について精密質量分析計などを用いて簡便に解析することができれば、製剤学的な品質を担保できる有用なツールとなり得る。そこで我々は、現在日本で使用されているバイオ後続品のなかで最も多くの製剤が承認されてい

るフィルグラスチムを例に取り、近年性能の進歩が著しい四重極飛行時間型質量分析計（LC/QTOF-MS）を用いてその定性・成分分析法（LC/QTOF-MS法）について検討し、フィルグラスチム先行品とバイオ後続品の成分について比較を行った。

方 法

1. 試料

フィルグラスチム（遺伝子組換え）注射液は、2012年に1製剤、2013年に1製剤（これら2製剤は2社ずつが共同販売という形をとっている）、2014年にも1製剤が承認されている。試料として、本邦で承認されているフィルグラスチム先行品（先行品）および2013年5月末時点で国内承認されているフィルグラスチムバイオ後続品4製剤（製品A～Dとする）を希釈せずに用いた。

2. 還元処理

試料にジチオトレイトール（dithiothreitol: DTT, ナカライテスク(株), 京都）を添加して終濃度1 mMにし、37℃で45分反応させた。その後2%ギ酸を用いて反応を停止させ、分析を行った。

3. LC/QTOF-MS 分析

測定機器には Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS システム（Agilent Technologies, Santa Clara, USA）を用いて、カラムは ZORBAX 300SB-C18 2.1×50 mm（粒子径 3.5 μm: Agilent Technologies）を使用した。移動相は 0.1%ギ酸水溶液(A)とアセトニトリル(B)のグラジュエント混液（B% 0–10分：0→10%, 10–12分：10→90%, 12–12.1分：90→10%）とし、流速を 0.3 mL/min, カラム温度は 40℃とした。QTOF-MS システムは以下の条件に設定して測定を行った。ポジティブモード, Drying gas (N₂): 12 L/min, 350℃, Sheath gas: 12 L/min, 400℃, Nebulizer gas: 60 psig, Capillary: 3500 V, Skimmer: 65 V, Octopole RF: 750 V, Fragmentor: 350 V（高分子量測定モード, m/z: 300–3200), 100 V（低分子量測定モード, m/z: 100–1700）。質量の補正には m/z: 921 および 1221（HP-921 and HP-1221, Agilent Technologies）を用いた。

4. データ処理

多価イオン高分子で特徴的な複数の m/z のピークからなるマスペクトルに基づきゼロ電荷スペクトルである質量を計算するデコンボリューションおよび面積を求める自動積分は、Agilent Mass Hunter (Agilent Technologies) を使用し、Maximum Entropy 法で算出した。先行品とバイオ後続品における含有成分比の比較には Dunnett の多重比較検定を用い、有意水準 5% 未満で有意差があるものとし、差の信頼区間は 95% とした。⁸⁾ 測定機器の再現性と正確性の評価には二元配置の分散分析を用いて評価した。

結 果

1. 測定機器の再現性と正確性の評価

測定機器の再現性と正確性を担保するため、先行品を 1 日 5 回 (Time A~E), 4 日間 (Day 1~4) 測定し、主成分フィルグラスチムのピークに関して、求められる質量について日間変動および日内変動の確認を行った。その結果、因子が時間もしくは日のどちらの場合においても測定質量に差は認められなかった (表 1)。

2. 還元処理

フィルグラスチムは分子内にジスルフィド結合を 2 つ持つ (図 1)。LC/QTOF-MS が、還元処理前後での質量差を検出できるか否か検討するため、未処理の試料および DTT による還元処理後の試料について、主成分の質量を算出した。表 2 に示す通り、還元処理した試料では、理論質量値と同等の値が算出されることを確認した。

3. 先行品およびバイオ後続品の比較解析

先行品およびバイオ後続品 (バイオ後続品 A~D) について測定質量に違いの有無を検証するため、無処理で LC/QTOF-MS による質量分析を行った (図 2)。すべての製品において、トータルイオンクロマトグラム上では 3 つのピークが認められ、それぞれの retention time (RT) は 6.8 min (ピーク 1: 主成分ピーク), 8.6 min (ピーク 2: 副次ピーク), 9.3 min (ピーク 3: 副次ピーク) であった (図 2A)。本研究では別ロットを用いて比較したが、ロット間での差は認められなかった (data not shown)。また、主成分のピーク面積は、バイオ後続品 A~D において先行品とほぼ同等であった。一方、副次ピーク面積は、バイオ後続品 C, D については先行品とほぼ同等であったが、バイオ後続品 A, B については先行品と比較してピーク面積が大きかった。

次に、ピーク 1 におけるマスペクトルを作成したところ、先行品、バイオ後続品 A~D のすべての製品においてスペクトルは同様の結果となった (図 2B)。さらに、デコンボリューションにより測定質量を算出した結果、バイオ後続品 A~D の測定質量は先行品と同じ 18798 となった (図 2C)。

MTPLGPASSL PQSFLKCLE QVRKIQGDGA ALQEKLQATY KLCHPEELVL
 LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH SGLFLYQGILL QALEGISPEL
 GPTLDTLQLD VADFATTIWQ QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG
 GVLVASHLQS FLEVSYRVLR HLAQP

図 1 フィルグラスチムのアミノ酸構造
(実線: ジスルフィド結合)

表 1 測定機器の再現性と正確性

因子	例数	測定質量	自由度	平均平方	F 値	P 値
日内	Time A	4	18798.93 ± 0.16	4	0.09	0.99
	Time B	4	18799.24 ± 0.60			
	Time C	4	18798.91 ± 0.20			
	Time D	4	18798.89 ± 0.20			
	Time E	4	18798.90 ± 0.20			
日間	Day 1	5	18799.07 ± 0.01	3	0.14	1.55
	Day 2	5	18799.07 ± 0.01			
	Day 3	5	18798.72 ± 0.02			
	Day 4	5	18799.03 ± 0.60			

先行品を 1 日 5 回 4 日間測定し、測定質量を算出した。(二元配置の分散分析)

表 2 還元処理した際の各製剤の測定質量（n = 6）

還元処理	先行品	バイオ後続品 A	バイオ後続品 B	バイオ後続品 C	バイオ後続品 D
無	18798.96 ± 0.02	18799.05 ± 0.05	18799.05 ± 0.07	18799.05 ± 0.07	18799.04 ± 0.05
有	18802.19 ± 0.47	18802.65 ± 0.11	18802.65 ± 0.07	18802.46 ± 0.16	18802.69 ± 0.11

(参考) 還元型フィルグラスチム
製剤の理論質量

還元数	理論質量
0	18798.61
1	18800.63
2	18802.64

フィルグラスチム製剤を DTT 処理にて 45 分間還元処理し、ピーク 1 に相当する保持時間でデコンボリューションすることにより、測定質量を算出した。ジスルフィド結合を還元すると水素が 2 個付加されることになる。DTT: dithiothreitol

図 2 フィルグラスチム製剤のクロマトグラム

先行品およびバイオ後続品を $m/z = 300\text{--}3200$, Fragmenter: 350 v で質量分析した。(A) トータルイオンクロマトグラム, (B) $RT = 6.8$ min におけるマススペクトル, (C) デコンボリューション結果。RT: retention time

4. 主成分ピークの解析

先行品およびバイオ後続品 A～D について、主成分ピークのマススペクトルからデコンボリューションによる測定質量を求め、それぞれの製品の測定質量について差の 95% 信頼区間を求めた (表 3)。先行品の測定質量は 18798.93 ± 0.16 と算出され、バイオ後続品 A, B, C および D の測定質量は、それぞれ 18799.20 ± 0.43 , 18799.25 ± 0.59 , 18799.28 ± 0.58 および 18799.30 ± 0.59 であった。

表 3 先行品とバイオ後続品の測定質量と平均値の差 95% 信頼区間 (n = 4)

製剤名	測定質量	差の 95% 信頼区間
先行品	18798.93 ± 0.16	—
バイオ後続品 A	18799.20 ± 0.43	$-0.421 \sim 0.956$
バイオ後続品 B	18799.25 ± 0.59	$-0.369 \sim 1.009$
バイオ後続品 C	18799.28 ± 0.58	$-0.344 \sim 1.034$
バイオ後続品 D	18799.30 ± 0.59	$-0.316 \sim 1.061$

各製剤の主成分のデコンボリューション結果から算出された測定質量から、先行品とバイオ後続品の平均値の差 95% 信頼区間を算出した。

また、差の信頼区間については、最も差が大きかったもので-0.316~1.061の範囲であった。なお、フィルグラスチムはアミノ酸残基数175個で分子式は $C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$ であり、分子量は18798.61であることから、このピークをフィルグラスチムと判断した。

5. 副次ピークの解析

製剤間でピーク面積に違いが認められた2つの副次ピーク（ピーク2および3）について解析を行った（表4）。バイオ後続品C、Dのピーク2および3の相対含有成分比は先行品と比較して有

意な差は認められなかったが、バイオ後続品AおよびBのピーク2と3の含有成分比は先行品と比較して有意に高い値であった。低分子量測定モードでの測定時においても、高分子量測定モードまで含めた測定で認められたピーク2および3と同じRTにピークが認められた（ピーク2'および3'）（図3A）。そこで、これらのピークに含まれる成分のマススペクトルを確認したところ、ピーク2'、ピーク3'の測定質量の差はどれも44となった。また、マススペクトルの形状が等間隔にピークが現れる特徴的な形をしていた（図3B、

表4 先行品とバイオ後続品における副次ピーク（ピーク2およびピーク3）の含有成分比（n=6）

製剤名	含有成分比（ピーク2）	相対標準偏差（%）	含有成分比（ピーク3）	相対標準偏差（%）
先行品	18.9 ± 0.7	3.9	12.8 ± 0.8	6.2
バイオ後続品				
A	28.1 ± 0.1 ***	0.3	24.5 ± 1.8 ***	7.4
B	27.2 ± 1.0 ***	3.6	25.3 ± 2.0 ***	7.7
C	18.8 ± 0.6	3.3	14.5 ± 1.0	6.7
D	19.2 ± 0.6	3.0	13.6 ± 0.7	5.0

各製剤における含有成分比および相対標準偏差を求めた。含有比はトータルイオンクロマトグラムよりピーク2、ピーク3のピーク面積をピーク1のピーク面積で除した（Dunnettの多重比較検定，*** $P < 0.001$ ）。

図3 フィルグラスチム製剤のマススペクトル

先行品およびバイオ後続品を $m/z = 100-1700$, Fragmenter: 100 v で質量分析した。(A) トータルイオンクロマトグラム, (B) ピーク2'のマススペクトル, (C) ピーク3'のマススペクトル。

3C). 試薬用ポリソルベートでも同様に確認したところ、質量差 44 のマススペクトルを得られた (data not shown).

考 察

今回分析に用いた四重極飛行時間型質量分析計 LC/QTOF-MS について、機器の再現性および正確性を確認するためにフィルグラスチム先行品を用いて日内変動および日間変動を確認した。LC/QTOF-MS 法では 1 日 5 回の測定を 4 日間検討したところ、変動は認められなかった。従来のペプチドマッピング等での解析では、タンパク質をトリプシン等で消化して解析を行う。^{9,10)} 従って、もともと存在する小さな分解の有無を解析することが難しい。また、消化のプロセスの差により結果に影響が出ることが考えられる。LC/QTOF-MS 法は、消化を必要としない。Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS システムは 10,000 以上の分解能を有し、 m/z : 921, 1221 のリファレンスを同時に流して常に補正することで、測定誤差は 0.0005% 以内と報告されている。¹¹⁻¹³⁾ 従って、検出された m/z 値が 2,000、質量が 20,000 程度となるフィルグラスチムの質量分析は十分に可能である。以上より、本分析機器によるフィルグラスチム質量分析は再現性および正確性の担保できる測定系であると考えられた。

ジスルフィド結合は、タンパク質が高次構造を成し機能を発揮する上で重要である。LC/QTOF-MS を用いた本手法において、ジスルフィド結合の有無にかかわる質量差を測定できるのか検討するため、フィルグラスチムを還元処理し分析を行った。フィルグラスチムは糖鎖が存在せず、ジスルフィド結合を 2 カ所有する (図 1)。¹⁴⁾ これらが完全に還元された場合の理論質量は、水素原子量を 1.008 として、 $18798.61 + 4 \times 1.008 = 18802.64$ である。今回、DTT を用いて還元処理したところ、先行品の還元後の測定質量は 18802.19 ± 0.47 であった。また、同様の結果はバイオ後続品 A~D でも確認された。従って、LC/QTOF-MS による分析は、フィルグラスチム製剤を還元処理した際のジスルフィド結合の質量差も検出できた。このことは、LC/QTOF-MS が今後増加するバイオ医

薬品の微細構造変化を検出できることを示しており、バイオ医薬品の製剤間での糖鎖修飾の違いなどの測定への応用が期待できる。

LC/QTOF-MS 法を用いて、フィルグラスチム製剤の先行品とバイオ後続品の比較解析を実施した。トータルイオンクロマトグラムを比較した結果、共に 3 つのピークが確認された。主成分ピーク (ピーク 1) のそれぞれの測定質量は、デコンボリューション解析の結果、すべて同じであると判断された。さらに、先行品と後続品の測定質量、RT およびクロマトグラムの形状から、先行品とバイオ後続品 A~D に確認されたピーク 1 は主成分のフィルグラスチム (理論質量 = 18798.61) であり、先行品とバイオ後続品の含有する主成分はジスルフィド結合の有無を含めて同質であると考えられた。

トータルイオンクロマトグラムにおける 2 つの副次ピーク (ピーク 2 および 3) について先行品と比較したところ、バイオ後続品 C と D はどちらのピークも先行品と同等のピーク面積となったが、バイオ後続品 A および B の場合、いずれのピークにおいても先行品よりもピーク面積が大きくなり、表 4 に示すように含有成分比についても先行品と比較して有意に高かった。低分子量測定モードを検討したところ、高分子量測定モードと同じ RT に同様のピーク (ピーク 2' および 3') が確認され、それぞれのマススペクトルから各質量を算出すると、各ピーク間での測定質量差がすべて 44 となった。フィルグラスチムの添付文書に記載のある添加物の 1 つであるポリソルベート 80 の繰り返し構造の質量が 44 であること (図 4)、

図 4 ポリソルベートの構造式

$w + x + y + z = \text{約 } 20$ である。RCO⁻ はポリソルベート 80 では主としてオレイン酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}^-$)。ただし、その他の脂肪酸も含む。

繰り返し構造が得られたマススペクトルの形状が等差間隔のピークを示したことから、試薬用ポリソルベートでも質量差 44 のマススペクトルを得られたことを考慮すると、このピークはポリソルベート 80 であることが示唆された。先行品およびバイオ後続品の添付文書によると、バイオ後続品 A と B は、先行品およびバイオ後続品 C と D と比較して添加剤のポリソルベート 80 の量が多いことが記載されており（グラン注射液添付文書改訂第 20 版，協和発酵キリン株式会社，2014；フィルグラスチム BS 注添付文書改訂第 5 版，日本化薬株式会社，2014；フィルグラスチム BS 注添付文書改訂第 2 版，持田製薬株式会社，2014）ピーク面積比とポリソルベート 80 の含有量比は一致しなかったが、そのピーク面積比と含有量比の傾向は今回の結果とも一致している。LC/QTOF-MS 法は主成分のみならず、添加物の比較にも有用であることが示唆された。

以上、LC/QTOF-MS を用いたフィルグラスチム製剤の解析により、フィルグラスチム先行品とそのバイオ後続品にはジスルフィド結合も含め、主たる成分に差異がないことが定性的に示された。LC/QTOF-MS 法は、高分子医薬品を定性解析する上で再現性が高く、有用な手段であることが示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の【医薬品等規制調和・評価研究事業】および JSPS 科研費の支援を受けて実施した。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) 2009年3月，薬食審査発第0304007号，厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(厚生労働省)。

- 2) Schiestl M, Stangler T, Torella C, Cepeljnik T, Toll H, Grau R, Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals, *Nat Biotechnol*, 2011, **29**, 310-312.
- 3) 石井明子, 原園 景, 川崎ナナ, バイオ後続品／バイオシミラーに関する国内外の規制動向と品質評価, *Pharm Tech Japan*, 2013, **29**, 23-42.
- 4) 2009年3月，薬食審査発第0304004号，厚生労働省医薬食品局長通知「バイオ後続品の承認申請について」(厚生労働省)。
- 5) 2011年3月24日，厚生労働省告示第65号，第十六改正日本薬局方（厚生労働省）。
- 6) Raju TS, Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs, *Curr Opin Immun*, 2008, **20**, 471-478.
- 7) Kanda Y, Yamane-Ohnuki N, Sakai N, Yamano K, Nakano R, Inoue M, Misaka H, Iida S, Wakitani M, Konno Y, Yano K, Shitara K, Hosoi S, Satoh M, Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC, *Biotechnol Bioeng*, 2006, **94**, 680-688.
- 8) 木村康浩, 大浜 修, 土井穂波, 柴田ゆうか, 木平健治, 注射用セファゾリンナトリウム製剤の先発医薬品と後発医薬品における品質比較, *医療薬学*, 2008, **34**, 573-577.
- 9) Jones MD, Merewether LA, Clogston CL, Lu HS, Peptide map analysis of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: elimination of methionine modification and nonspecific cleavages, *Anal Biochem*, 1994, **216**, 135-146.
- 10) Lu HS, Boone TC, Souza LM, Lai PH, Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor, *Arch Biochem Biophys*, 1989, **268**, 81-92.
- 11) Zhou JL, Qi LW, Li P, Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 2009, **1216**, 7582-7594.
- 12) Lacorte S, Fernandez-Alba AR, Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food, *Mass Spectrom Rev*, 2006, **25**, 866-880.
- 13) Ferrer I, Thurman EM, Fernández-Alba AR, Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by LC/TOF-MS, *Anal Chem*, 2005, **77**, 2818-2825.
- 14) 2013年1月，フィルグラスチム審査報告書（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）。