

(川西資料3の関連部分：p28-29の仮訳)  
FDA・ヒトでの使用を目的としてモノクローナル抗体の製造と試験に関して配慮すべきポイント：Point to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use) 1997年2月28日公布

「製造方法が変更されたモノクローナル抗体医薬品の同等性／同質性試験」

## 1. 概論

モノクローナル抗体の臨床試験を行っている間にも、しばしば製品の製造方法は変更される。製造方法の変更前に得られた前臨床および臨床データを、変更後の臨床試験および／または承認申請を支持するために用いようとするとき、申請者は、以前の製法による製品と新しい製法による製品が同等であることを証明するための評価試験の計画を立てなければならない。フェーズ3試験の間あるいは終了後に導入された製造工程のスケールアップの場合（一般的な製造法の変更のあるなしにかかわらず）でも、同様の考慮がなされなければならない。

臨床試験早期において製造工程の変更が行われた場合は、同等性／同質性評価の試験計画は、製品の開発計画の中に組み入れられなければならない。この計画については CBER と協議すべきであるが、適切な時期に、審査をうけるために CBER に提出されるべきである。

工程管理試験の規格値／適否の判定基準は製造方法の変更あるいは工程のスケールアップによって影響を受ける可能性があるため、適切な改定がなされるべきである。同様に、影響をうけるすべてのステップの（ウィルスクリアランス試験、混入物や迷入物の除去のような）プロセスの検証は、製造工程が変更された後に繰り返されるべき

である。工程のスケールアップの場合、カラムの配列やサンプル容量とベッド容量の間の比率は、できる限り変更前の工程に近い値を保つべきである。このことはこれらの値がクロマトグラフィーの工程に決定的な影響をもつような工程（たとえば、限外ろ過クロマトグラフィー）の場合、特に重要である。

## 2. 製品の同等性／同質性のインビトロの証明

一般に、製造方法が変更されたり、工程のスケールアップが行われた製品が製造された時には、理化学的特性解析試験とインビトロ機能試験の結果によって、さらに追加データ（例えば前臨床データおよび／または臨床データ）が必要とされるかについて決定され、指示が出るだろう。製造法の変更の前後の製品について、理化学的、免疫学および生物学的同等性／同質性を調べるための試験プロトコールには、製品の同等性／同質性に関する個々の試験における許容範囲および許容基準をあらかじめ設定しておくべきである。

（特定の生物試験のような）定量的試験では、試験の誤差の正確な推定法を用意すべきである。新しく採用した製造方法の再現性を示すために、平行して複数のロットについて比較されるべきである。モノクローナル抗体の同等性／同質性のインビトロ生化学的特性試験では、たくさんの異なった手法によって二つの製品についてそれぞれ比較されるべきである。適切に保存された以前の製造ロットのサンプルが、比較のために用いられるべきである。技術的には、還元条件および非還元条件の SDS-PAGE、ウェスタンブロット、限外ろ過クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動、質量分析、糖含量および組成を含む糖鎖分析、ペプチドマッピング、あるいはその他の適切な試験が含まれる。インビトロ機能試験では、抗体の生物学的機能の特性解析を目的としたアッセイが含まれるべきである（例えば結合、細胞毒性、エピトープ修飾等）。可能なときに、二つの製品の親和性の比較を行う

ことは、とくに推奨される。

### 3. 動物実験

生化学的試験によって製品の違いが示されたり、製品に有意な違いがある可能性を除外できないときに、データの種類およびインビトロアッセイのタイプ、製造方法の変更の内容と観察された製品間の違いの内容によるが、適切な動物モデルを用いた比較試験プログラム(薬物動態、その他)が、ヒトでの臨床試験の代わりに有効となるかもしれない。ヒトの体内でのモノクローナル抗体の生体内分布に対する抗原との結合の寄与の程度にもよるが、動物を用いた薬物動態試験は有用な情報を提供してくれるかもしれない。同等性/同質性を評価するために必要と思われる動物を用いた毒性試験の範囲は、おのおのの製品の安全性プロファイル、製造工程の変更の大きさ、純度、構造、あるいはインビトロ活性の違いの有無によって変わるだろう。申請者は動物実験による二つの製品の同等性/同質性評価試験の計画について、CBER と話し合うか、あるいは CBER にそのような試験計画を提案するか、どちらかが推奨される。提案されたプログラムは、生化学データという点から適切であるとともに、統計的な配慮がなされるべきである。

### 4. 製造方法の変更を支持するための臨床研究

製造工程の変更、あるいはスケールアップを行う際には、以下のような場合、臨床的同等性評価が必要となるかもしれない。

- a. 製品の活性について、分析的試験では適切に評価しえない場合
- b. 生化学的、あるいは生物学的試験で製品に違いが示される場合
- c. 動物試験によって、製品間で薬物動態等に有意な違いが明らかにされる場合
- d. 製品の剤形変更によってバイオアベイラビリティに影響が及ぶ場合。この場合、一般

的には臨床の薬物動態試験の必要性が指摘される

製品の生化学的特性および/または生物学的特性において観察された変化の性質と程度によるが、薬物動態試験、安全性試験、および/または有効性試験が要求されるかもしれない。

(川西資料4の日本語仮訳)

CPMP 文書： バイオテクノロジー応用タンパク質を含んだ医薬品の同等性／同質性に関するガイダンスノート (2002年3月施行)

## 1. はじめに

### 1. 1 目的

バイオテクノロジーを利用して製造した医薬品(原薬および製剤)の製造方法の変更はしばしば行われる。製造方法の変更の主な理由としては、製品の品質の改善、生産量および世界的規模での生産効率の改善、あるいは各工程の経済効率の改善等があげられる。このような変更は医薬品の開発段階でされることもあれば、認可後に行われることもある。いろいろな開発段階で変更はなされるが、製品の物理的・化学的特性や生物学的特性へ製造方法の変更が影響を及ぼさないことを確認するため、変更された工程によって製造された製品と従前の製造方法による製品との比較が必要となる。これら製品の特性(主として工程内管理の規格値／適否の判定基準および出荷規格によって表わされた)は製品の品質、安全性、有効性のよってきたる基礎であり、最も重要なポイントである。そのような製品の特性の変化は、製品の安全性、有効性プロファイルの変化に直結する可能性がある。したがって、同等性／同質性の検討作業は製造工程の変更に引き続いて行われるべきものである。

このガイダンスノートは開発の非常に早い時期(つまり前臨床試験前および予備的な安全性評価のための初期の臨床試験前)に工程の変更が行われた場合にはあてはまらない。

もう一つの要件として、バイオテクノロジー応用製品の販売承認申請において、製造業者が既に販売されている製品と同等であることを主張する際の同等性／同質性の検討作業の必要性を考察する必要がある。

どのような工程の変更であろうとも、同等性／

同質性の比較検討に関する戦略(すなわち、段階的なアプローチ)は同じであるべきである。このアプローチにおいては、以下のパラメーターの検討がキーポイントと考えられる：1) 製品の特性解析； 2) 製造工程の検証； 3) 出荷データ； 4) 安定性試験； さらにより広い意味での 5) 前臨床試験および臨床試験。

### 1. 2 適用範囲

このガイドラインは組換え DNA 技術およびハイブリドーマ技術を用いて得られたタンパク質を含む医薬品の同等性／同質性の検討作業を扱うものである。したがって、この文書に採用され説明される原則は、タンパク質、ペプチド、それらの誘導体、およびそれらが成分として含まれる製品に適用すべきである。これらタンパク質は組換え細胞培養発現系によって製造され、高度に精製することが可能で、適切な一連の分析法によって特性解析が可能なものである。この文書で概説されている原理と論点は、このガイダンスノートでカバーされないその他の生物薬品の評価においても、一つの考え方として応用が可能かもしれない。

このガイダンスノートで言及している "Comparability" "同等性／同質性" の概念は、Council Directive 65/65/EEC の Article 4.8.a で言及されている "essential similarity" とは異なる概念であることに注意すべきである。"Essential similarity" は別のクライテリアのもとで評価されるべきものであり、このガイダンスノートの適用範囲内のもではない。

### 1. 3 同等性／同質性の検討作業

同等性・同質性の検討作業とは、二つの製品が品質、安全性、有効性からみて同様のプロファイルを有することを確認する作業をいう。品質、安全性、有効性の観点から同等／同質であるという結論は、(部分的あるいは包括的な)品質に関する

る研究によって導き出されるものであるが、ブリッジング前臨床／臨床研究による支持が必要な場合もある。

同等性／同質性の検討作業、および同質性／同等性の主張は2つの場合の適用が考えられる。

- (1) 製造業者（あるいは関係する業者）が自らの製造工程の変更を行った場合
- (2) すでに市販されている製品と同様であると主張する製品の場合

## 2. 製品の製造工程が変更された場合の同等性／同質性の検討作業

「はじめに」で触れたように、製品のライフサイクルにおいて製造工程の変更は製造業者にとってめずらしいことではない。そのような変更は開発段階（2.2.1）で導入される場合もあるし、申請承認後に導入される場合もある。変更が加えられた時の開発段階がどの段階にあらうとも、導入された変更が 1) 製品の品質にどの程度影響するか、2) 安全性および有効性にどの程度影響するか、について評価することは製造業者の責任である。

この章には、同等性／同質性の検討作業を計画する際にキーとなる要素、および必要とされる研究の範囲を示す。

### 2. 1 同等性／同質性評価を行うにあたって考慮すべきポイント

同等性／同質性評価においては、品質、安全性、有効性の3つの評価基準を網羅し、相互に関連させながら全体を一セットとして考察すべきものである。

実際、製造工程になされたいかなる変更も、製品の品質、安全性、有効性に影響を及ぼす可能性がある。製造工程の変更は多種類ある。補遺 I には製造工程に導入される最もよく行われる変更例をあげた。規制上では製剤上の変化を主要なも

のとマイナーなものに分類している。しかしながら、マイナーと分類される変更でさえ、製品の品質を変化させる可能性もあるので、この分類は同等性／同質性の検討作業の方策としては適当ではないかもしれない。

導入した変更の品質、安全性、有効性への影響の程度によって、同等性／同質性の検討作業は以下のような様々に異なったレベルまでの組合せで行われることが想定される：

- ・導入した変更に関する製造工程の厳密な検証のみの検討で終わる
- ・工程内管理、安定性データ、製品の分析および生物学的特性解析のような様々な品質クライテリアにまで及ぶ
- ・品質上のクライテリアに基づいてすべて明らかにすることができず、さらにインビボ安全性／有効性プロファイルに関して明らかにする必要がある

したがって、同等性／同質性試験の範囲は以下の要因に依存する

- ・変更がなされた時の製品の開発段階
- ・製品の物理的・化学的・生物学的特性、および純度への変更の影響に関する品質クライテリアについての考慮
- ・製品特性の変化を検出するための分析方法の適格性および有用性
- ・前臨床試験あるいは臨床経験全体に基づいた、品質クライテリアと安全性および有効性試験結果との相互の関係

#### 2. 1. 1 変更が導入された際の開発段階

同等性／同質性の検証作業は、開発段階あるいは承認後において製造方法が変更された際に実行されるべきものである。言うまでもないことであるが、変更が開発段階の非常に早期になされた場合（つまり前臨床試験の前、事前に安全性を評価するための初期臨床試験の前）は、同等性／同質性に関する基本的な問題は生じない。

## 2. 1. 2 品質上のクライテリアの考慮

当該構成分子の複雑さは、同等性／同質性を議論する際に、重要なクライテリアとして考慮しなければならないものである。実際、分子の物理的・化学的性質（例えば一次構造から四次構造、配列の長さ、糖鎖の程度と性質といった翻訳後修飾、N末端とC末端の修飾）によっては、製品を正確に定義することが困難な場合もありえるので、解析には分子の様々な物理的・化学的性質（サイズ、荷電、溶解性等）および生物学的性質を利用した多様な解析技術を用いる必要がある。

多くの場合、生物学的プロセスに本来備わっている多様性によって、最終製品は様々な分子（目的物質関連物質）の混合物からなっている。この分子多様性は製品のインピボでの作用を評価する際、考慮しなければならない点ではあるが、バッチ間の同一性の保証の視点でも解析されるべき特性である。製品の複雑さに関する同等性／同質性の検討は、分子多様性ゆえにより困難なものとなる。「規格に関するガイダンスノート：生物医薬品（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（ICH-Q6Bガイドライン）」では、原薬および製剤の規格は、前臨床および臨床試験に用いられたバッチの品質以外にも、クローニング法、発現およびクローニングの一定性、すべての特性解析、製造工程の検証および一定性、安定性データを含む、すべての品質管理法の結果を考慮して設定しなければならないと規定している。場合によっては、認可されている規格を充たすことを示すことでは十分ではなく、タンパク質の構造、不純物プロファイル、生物活性についての追加データも必要になるかもしれない。

したがって、ある製造工程を変更するときの初期のアプローチとして、規格設定の基礎となる以下のパラメータがキーポイントと考えられる。すなわち、1) 特性解析研究、2) 検証された製造工程、3) 出荷データ、4) 安定性データ、さらにより広い

視点では、5) 前臨床および臨床経験、である。

## 2. 1. 3 利用できる分析法の適格性

分子が本来持っている複雑な分子多様性を考慮すると、製造業者が選択した分析法は（その領域の進歩をすべて反映した方法であっても）バイオテクノロジー応用医薬品の特性のわずかな変化をも検出することが可能と保証することは時によって困難である。しかしながら、品質評価に関係するすべてのパラメーターにおいて、製造方法の変更の前後の製品間で区別がつかないことを製造業者が示したと認められれば、分子に変化がないことを提示したことになる。

製造工程に導入される変更がいかなるものであろうと、製造業者は総合的な品質管理プログラムをつくり、変更の前後の製品の同等性／同質性を評価するための一連の適切な分析法が用意されていることを示すべきである。用いられる分析法の検証がどの程度必要であるかは、変更が行われる開発段階のタイミングに依存する。製造方法の変更の影響がどんなであれ、原薬と製剤の規格と同様、製造方法の適格な評価は、適切な分析法によって可能となる。したがって用いる分析方法によって、製造方法の変更によって生じる変化をどの程度まで検出することが可能であるかを明確にすることが重要である。

## 2. 1. 4 安全性および有効性クライテリアの考慮

原薬や製剤の規格は、前臨床試験および臨床試験に用いられたバッチを用いて得られたデータに基づいて定めるべきである。このことは、採用された規格は、インピボでの製品の使用によって検証されており、またインピボでの使用のために検証されるべきであることを意味する。

製造工程の変更が（原薬あるいは製剤の）規格および／または工程内管理の規格値／適否の判定基準に影響を及ぼしたときは、同等性／同質性の検討作業は品質面のみに限ることができるの

か、あるいは品質面のみの検討では不十分で、安全性および有効性クライテリアをも含んだ検討が行われるべきかを考えるべきである。品質面で違いが生じたことが証明されたり、疑われる場合は、少なくとも免疫原性のような特定の特性に関して、適切な前臨床研究および臨床研究を行うことが、同等性・同質性を示すための明確な方法と考えられる。

この点で、製造方法の変更に伴う製品の変化を評価するためになされる前臨床試験および臨床試験の性質と範囲は、分子に関して得られている情報の範囲、作用機序、および既に得られているインピボでの挙動についての経験を考慮することにより確認され、デザインされなければならない。

## 2. 2 製造工程の変更に依存した製品間の同等性／同質性の検討作業のストラテジー

原薬あるいは製剤の製造方法を変更したとき、製造業者が同質性／同等性の検討作業を行う際、あてはめるべき2つの異なったアプローチがある。

- a) 当初の仮説として、導入した変更は製品の品質クライテリアへ影響しないとするアプローチである。この場合、変更前と比較して、変更後においても工程内管理の規格値／適否の判定基準および／または出荷データにおいて変化がないことが保証されなければならない。用いる分析方法が構成分子の変化を検出する目的に十分な感度があるならば、同等性／同質性の検討作業は受け入れられる。構成分子の差異を見出すためには、日常的な分析方法が不十分であるのならば、(開発初期段階に) 特性解析研究で用いたより強力な解析方法も用いられるべきである。分析結果が予想される品質の判定基準にあわなければ、完全な検証プログラムを行うべきである(以下を参照)。
- b) 当初の仮説として、導入した変更は製品の品質クライテリアに影響をおよぼすとするアプ

プローチである。この場合、製品の特性の変化について、製品の特性、バッチ間の一定性、安定性に特に力点をおいてフルセットの検証データにより検討する。加えて、安全性および有効性に関して、製造方法の変更の潜在的な影響力を考察する必要がある。

変更が導入される工程のレベルに応じて、いくつかの工程内管理(モニタリング、フォローアップ)が、最終製品に向かう工程のすべての段階において、順次行われる必要がある。

### 2. 2. 1 品質クライテリア(原薬および製剤の規格、および工程内管理の規格値／適否の判定基準)に影響を及ぼさない変更

この場合、同等性／同質性の検討作業の対象は導入された変更部分にとどまりうる。製造業者は導入された変更に焦点を絞って、適切な連続したバッチ(工程内管理の規格値／適否の判定基準および出荷規格)から得られた結果によって、導入された製造方法の変更が品質の判定基準に影響を及ぼさないことを示すべきである。導入した変更の程度によることであるが、安定性データの必要性も除外されうる。このような変更の場合は原薬／製剤の品質に影響するのではないかという疑いは招かないし、安全性／有効性についての疑問も呼び起こさない。

このケースは以下のような製造方法の変更の場合あてはまるかもしれない: 試薬の供給先の変更、添加剤の供給先の変更、その他。そのような場合、もしも一つのバッチに関して品質に違いが見出された場合は、その違いが導入された製造法の変更に直接リンクしていることの証明がなされるべきである。

### 2. 2. 2 原薬および／または製剤の規格には影響しないが工程内管理の規格値／適否の判定基準に影響がでるような変更

製造方法の変更に伴って、出荷規格(原薬およ

び製剤)では変化はみられなかったが、変更した工程において再現性を保証するために工程内管理の規格値/適否の判定基準については変更を加える必要がある場合。この場合、適切な連続したバッチに関して得られたデータが以下のことを示さなければならない：1) 製造工程に一定性がある；2) 出荷規格は変更なしのままである。加えて、安定性の検討が開始され、いくつかの(原薬及び/または製剤)バッチのデータが必要である。この場合、3.1で言及するように、導入された変更は、既に確立された安全性/有効性についての知見に疑問は呈さない。

分析に用いられる方法は構成分子の構造のわずかな違いをも検出するに十分な感度を有するならば、この同等性/同質性の検討作業は受け入れられる。日常的な試験がわずかな変化を検出するに不適当と考えられるときは、(開発初期段階で行われた)特性解析試験で用いられたようなより強力な方法を用いて追加実験を行うべきである。

2.2.3 品質クライテリア(原薬および/または製剤の規格と工程内管理の規格値/適否の判定基準)に影響を及ぼすが安全性/有効性には影響はないと考えられる変更

同等性/同質性の検討は以下のような作業に基づく：

- 一 品質：適切な数の連続的なバッチの分析による製造工程の検証、および安定性データ。さらに、フルセットの特性解析研究(日常的に用いられている分析方法にとどまらず。開発の初期段階に用いられた解析方法/手段も含む)に基づいて規格は再考察され、変更が加えられなければならない。
- 一 安全性/有効性：分子レベルでの同一性(分子多様性および不純物プロファイルをも含んで)という視点において確認された分子の変化に注目して、安全性および有効性からの視点から影響がないことが製造業者によって考察さ

れ、証明される。

2.2.4 品質クライテリア((原薬および/または製剤規格と工程内管理)に影響し、安全性/有効性にも影響が予想される変更

品質クライテリアに影響がでることが明らかになったような変更について、製品の安全性/有効性にも影響する可能性が科学的に考えられる場合は、製品の安全性/有効性の保証を目的とした、追加的前臨床試験および/または臨床試験が必要になるかもしれない。

臨床試験の終了時あるいは市販後に手に入れることができる製品の臨床効果と品質特性との関係についての情報の範囲に考慮しながら、製造業者は適切な臨床試験プロトコールに基づいて、安全性/有効性への影響に関するデータを作成すべきである。配慮すべき内容は個々の製品によって変わるが、製造業者が直面するそれぞれの状況に応じて、プロトコールとしては1)適切かつ適正と評価されたブリッジング研究、あるいは2)より精細な研究、のいずれかの方法が用いられるであろう。

3. 既に市販されている製品と同様であるとして申請された製品に関する同等性/同質性の検討作業

この場合、申請した製造業者は自らの製造工程に関して必要なすべての情報を有しているとはいえ、既に市販されている製品の品質との比較を可能にするようなすべての情報にアクセスすることはできない。実際、発現ベクターシステム、製造・精製工程、施設・設備、分析方法等は、他の製造業者と異なっていると思われるが、後発申請業者は、違いがどの程度であるかを評価することはできない。

ほとんどの場合、分子量、等電点、生物活性等、分子の物理的・化学的性質および生化学的性質が掲載されている薬局方などへの公表データとの

比較となる。しかしながら、本ガイドラインで説明しているように、原薬および製剤の試験および特性解析に基づいた比較のみでは、バイオテクノロジー応用タンパク質の品質、安全性、有効性の評価に必要な解析としては不十分である。

したがって、このケースは最も複雑なケースといえる。そのため、精細な同等性／同質性の評価作業が要求される。前臨床および／または臨床ブリッジング研究の程度は、原薬および製剤の性質、分子構造の複雑さ、(不純物や安定性を含め、場合によっては製剤の剤形をも含めた)参照物質との比較データによって左右される。

#### 4. 結論

同等性／同質性の評価作業において考慮すべき点は以下のとおりである：

- 1) 分子の複雑さ
- 2) 製造工程に導入された変更のタイプ
- 3) 品質、安全性および有効性への影響

それぞれの製品の状況に応じて、製造工程の変更が分子特性および一定性に及ぼす影響について段階的なアプローチで検討すべきである。その際、科学技術の進歩を考慮した柔軟なアプローチがとられるべきである。既に市販されている製品と同等であるとして申請された製品については、同等性／同質性の証明には前臨床薬理／毒性、および臨床安全性／有効性に関連する問題を検討するためのブリッジング研究が必要となる。これらの検討で同等性／同質性を示すことができない場合は、すべての前臨床および臨床データが必要になるであろう。

### 補遺 1

#### 製造工程の変更のタイプ

製造工程の変更には様々なタイプがある。  
その例を以下にあげる

#### 製剤加工と充填

- 添加剤
- 装置
- 製造プロトコールの変更
- 秤
- 製造場所／施設の変更あるいは追加
- 出荷条件

#### 製剤

- バッチの定義
- 出荷有効期限
- 容器包装システム
- 出荷条件
- 貯蔵条件

#### 発現系

- マスターセルバンク
  - 既存のセルラインあるいはイニシヤルクロンから得られた新しいバンク
  - 原材料の変更
  - 貯蔵条件
- ワーキングセルバンク
  - 製造方法の変更：原材料（例えば発酵）、新しい製造法
  - 貯蔵条件

#### 発酵／培養工程

- 原材料：新しい供給先、規格、原材料の追加／変更／削除、培養液の組成
- 細胞培養条件：pH、酸素、温度、時間、モード
- 発酵／細胞培養のスケール
- 発酵場所／施設の変更／追加



## 精製工程

カラム／樹脂の変更：カラムサイズ、供給  
先、洗浄条件、貯蔵条件

試薬：新しい供給先、規格、原材料の交換

精製プロトコール：特定の段階の追加、交  
換、除去

ダウンストリーム工程のスケール

精製場所／施設の変更／追加  
装置

## 原薬

バッチの定義、プールの方法

出荷有効期限

容器／包装システム

出荷条件

貯蔵条件

## PRODUCTION AND QUALITY CONTROL OF MONOCLONAL ANTIBODIES

Guideline Title	Production And Quality Control Of Monoclonal Antibodies
Legislative basis	Directive 75/318/EEC as amended
Date of first adoption	See previous titles/other references
Date of entry into force	This version adopted December 1994 July 1995
Status	Last revised December 1994
Previous titles/other references	Originally published as two guidelines: <i>Production and Quality Control of Human Monoclonal Antibodies</i> (July 1990) and <i>Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies of Murine Origin</i> (June 1987). The previous reference of the combined version was III/5271/94
Additional Notes	This guideline outlines the requirements for murine, human and engineered monoclonal antibodies for therapeutic (including ex vivo application) and in vivo diagnostic use in humans. It concerns the application of Part 2, sections A, B, C, D and E of the Annex to Directive 75/318/EEC as amended with a view to the granting of a marketing authorisation for a new medicinal product.

## CONTENTS

1. INTRODUCTION
2. POINTS TO CONSIDER IN MANUFACTURE
3. SOURCE CELLS
4. CELL LINE PRODUCING THE MONOCLONAL ANTIBODY
5. CELL LINE PRODUCING THE RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODY
6. CELL BANK SYSTEM
7. CHARACTERISATION OF THE MONOCLONAL ANTIBODY

# PRODUCTION AND QUALITY CONTROL OF MONOCLONAL ANTIBODIES

## 1. INTRODUCTION

In this document the requirements for murine, human and engineered monoclonal antibodies for therapeutic (including *ex vivo* application) and *in vivo* diagnostic use in humans are outlined. Monoclonal antibodies intended for use in the purification of other products should be shown to be pure and free from adventitious agents by the methods described. Monoclonal antibodies to be used for diagnostic purposes *in vitro* are not the concern of this note for guidance.

Monoclonal antibodies are antibodies with a defined specificity derived from cloned cells or organisms. They can be obtained from immortalised B lymphocytes that are cloned and expanded as continuous cell lines (murine and human monoclonal antibodies) or from rDNA-engineered mammalian or bacterial cell lines (engineered monoclonal antibodies).

Important considerations for the clinical use of monoclonal antibodies include the possible unintentional immunological cross-reactivity of the antibody with human tissue antigens other than those desired, and the possible presence of viruses in the products.

### 1.1 Monoclonal antibodies of murine origin

Murine monoclonal antibodies are obtained from murine hybridomas produced by fusion of B-lymphocytes from immunised mice or rats with murine myeloma cells.

A general problem with the therapeutic use of murine monoclonal antibodies in man is the possible induction of antibodies in the recipient against murine immunoglobulin (human anti murine antibody or HAMA response). This may result in adverse reactions and limit the duration of effective antibody therapy. In addition the *in vivo* half life of murine monoclonal antibodies is relatively short. It may be prudent to minimise the murine protein load administered to the patient by the use of a parental myeloma cell lines which does not itself synthesise immunoglobulin chains.

### 1.2 Human monoclonal antibodies

The advantages of human monoclonal antibodies over murine monoclonal antibodies are that human recipients are less likely to develop antibodies against them (although anti-idiotypic and possibly anti-allotypic antibodies may still be produced) and that human antibodies are likely to have the full range of biological functions, such as those of the Fc region which may be species specific. There may be other advantages such as selection of a subclass of antibody with particular properties.

Murine monoclonal antibodies are almost always prepared using cell lines (hybridomas) made by fusion of lymphocytes from an immunised donor with myeloma cells. This is not the case for human monoclonal antibodies as, despite encouraging early reports, there is still no really satisfactory human myeloma fusion partner. As a result, a major difficulty with the production of human monoclonal antibodies has been the generation of hybridoma lines of acceptable stability. It is also difficult in many cases to obtain antigen-primed

lymphocytes suitable for fusion. In view of this, a number of alternative strategies have been devised for production of human monoclonal antibodies. These are:

- a) Fusion of human lymphocytes (usually peripheral blood or lymph-node derived) with a murine myeloma or hybrid human-murine myeloma line. This procedure is essentially similar to the hybridoma technique used to produce murine monoclonal antibodies, but presents some technical problems in that a lower fusion efficiency is usually found and human chromosomes are lost preferentially. This procedure may be regarded as a compromise due to the absence of a suitable human myeloma fusion partner.
- b) Transformation of human lymphocytes with Epstein-Barr virus (EBV). This procedure has been used for many years to produce continuous, rapidly growing human B cells.
- c) Fusion of human B-lymphocytes with a human lympho-blastoid B-cell line.
- d) Fusion of an EBV-transformed human B-lymphocyte line with a mouse myeloma cell line.

Other methods for generating stable lines secreting human antibodies may be developed or exploited in future.

### 1.3. Engineered monoclonal antibodies

An alternative approach to circumvent the HAMA response, the limited duration of effective murine antibody therapy and several manufacturing problems in the production of human monoclonal antibodies is the production of so called chimeric and humanised monoclonal antibodies using recombinant DNA (rDNA) technology and eukaryotic gene expression methods. Both types of rDNA-engineered monoclonal antibodies contain human sequences. In chimeric antibodies the variable heavy and light chain domains of a human antibody are replaced by those of a rodent (usually murine) antibody, which possesses the desired antigen specificity. In humanised antibodies only the three short hypervariable sequences (complementarity determining regions or CDR's) of the rodent variable domains for each chain are engineered into the variable domain framework of a human antibody producing mosaic variable regions. Humanised antibodies contain a minimum of rodent sequence.

Suitable cells for expression of the rDNA monoclonal antibody genes are mammalian cell lines such as immunoglobulin non-producing myeloma cell lines, that are capable of high-level expression of exogenous heavy and light chain genes and the glycosylation, assemblage and secretion of functional antibodies.

Engineered monoclonal antibodies may have the advantages of decreased immunogenicity, enhanced in vivo circulating half life in combination with optimised specificity and effector functions.

Certain aspects of the control requirements likely to apply to rDNA derived chimeric and humanised monoclonal antibody usage will be similar to those already described for products derived by rDNA technology (Note for guidance *Production and Quality Control of Medicinal Products derived by rDNA Technology*) with which the applicants should be familiar. These control requirements concern e.g. status of the rDNA within the host cell, expression regulation and stability of the expression system and the purification procedure.

## 2. POINTS TO CONSIDER IN MANUFACTURE

Several of the requirements relating to establishments in which biological products are manufactured (e.g. WHO technical Report series 822, 1992: Annex 1 Good Manufacturing Practices for Biological Products) apply to the manufacture of monoclonal antibodies. Additional information can be found in WHO technical Report Series 822, 1992: Annex 3 Guidelines for Assuring the Quality of Monoclonal Antibodies for use in Humans. Manufacturers should also refer to the EU Guide for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. Attention is drawn to the following points.

### 2.1. Production process

Many of the general requirements for the quality control of biological products, such as potency, abnormal toxicity testing, freedom from contaminants, stability and freedom from detectable levels of antibiotics will apply to monoclonal antibodies. It is undesirable to use agents which are known to provoke sensitivity reactions in certain individuals such as, for example, penicillin or other beta-lactam antibiotics.

### 2.2. Biological materials used in the production

Any reagents of biological origin (e.g. sheep erythrocytes, foetal calf serum, bovine serum albumin, human transferrin, insulin, trypsin) used in the generation of the monoclonal antibody producing cell line and/or during routine production, should be free of microbial contamination such as mycoplasma, fungi and bacteria. Special consideration should be given to possible viral contamination and tests for relevant viruses should be performed, e.g. trypsin should be tested for porcine parvovirus.

Bovine sera should be checked and found negative for potentially dangerous viruses (at least bovine diarrhoea virus, infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza 3). In addition, bovine sera and other bovine derived biologicals should comply with the requirements in the note for guidance *Minimising the Risk of Transmitting Agents causing Spongiform Encephalopathy via Medicinal Products*.

The following points, set out below, should be considered.

## 3. SOURCE CELLS

Whenever possible, murine tissue and animals used as source materials should be shown to be free of viruses as indicated in Annex I (a), table 2.

Monoclonal antibodies obtained from human cells present particular concerns regarding safety. Human monoclonal antibodies for use in humans are currently unique in that they are often derived from cells which are likely immortalised by the deliberate introduction of EBV, a potential human pathogen. They are likely to be obtained from a transformed human cell line which is potentially oncogenic. Evidence of contamination with viruses originating from the donor is cause for concern, as they will by definition be viruses capable of infecting humans. Cells from human origin should be shown free of viruses indicated in Annex I (a) table 3.

### 3.1 Characterisation of non-specific cells

#### 3.1.1 Feeder cells

Whenever appropriate, the origin of feeder cells used should be defined. Feeder cells should be derived from SPF (specific pathogen free) animals or cell seed stocks shown to be free of microbial contamination such as mycoplasma, bacteria and fungi and special consideration should be given to possible exogenous viral contamination.

#### 3.1.2 Fusion partner(s)

The fusion partner used (e.g. myeloma, human lymphoblastoid B-cell line) should be fully described and documented. The source, name and characteristics of the parental cell line should be given. It should be shown that the cell line is a pure culture and is not contaminated with cells of other types. If possible the cell line used as fusion partner should be selected as one which does not synthesise any immunoglobulin chains. Cryopreserved samples of the cell line used as fusion partner should be retained in case retrospective investigations become necessary.

#### 3.1.3 Host cell for the expression of the recombinant monoclonal antibody

A description of the starting host strain or cell line should be provided including the history of the strain or cell line, its identification characteristics and potential viral contaminants. Special attention should be given to the possibility of unintended cross-contamination with other cell lines or viruses not endogenous to a particular cell line.

The cell line used should not synthesise any endogenous immunoglobulin chains before and after transfection.

Cryopreserved samples of the host cell line should be retained in case retrospective investigations become necessary.

### 3.2 Generation and characterisation of the specific parental cell (murine and human monoclonal antibodies)

The source of the immune parental cells should be documented. If an immunogen has been deliberately used, information on its source and preparation and on the immunisation procedure should be provided.

If the immune parental cells are derived from a human donor, information concerning the health of the donor should be provided. Any relevant clinical data on the donor must be reported, especially data on possible virological infections. Preferably, the description of the state of health of the donor should cover a period of some months before and after derivation to establish that blood borne viruses such as HIV, hepatitis B and hepatitis C were not in the process of incubation. If these conditions can not be completely fulfilled, this should be justified and it should be demonstrated that the cell bank system is devoid of any relevant viruses (e.g. HIV 1/2, HBV, HCV).

For the production of monoclonal antibodies of major therapeutic value it may be necessary to use cells potentially contaminated by a virus. In such a case, it will be necessary to look at the possible detection of the virus in the cell bank and to add one or more steps dedicated to inactivate this virus in the processing of monoclonal antibody.

## **4. CELL LINE PRODUCING THE MONOCLONAL ANTIBODY**

### **4.1. Generation of the cell line**

A complete description of the production of the cell line secreting the monoclonal antibody should be provided including details of cell fusion, EBV transformation and cloning procedures where appropriate. Sufficient data should be given to allow an assessment of the efficiency of the cloning procedure.

Agents used in the fusion and selection procedure should be described (e.g. PEG).

### **4.2. Characterisation of the cell line**

The characteristics of the monoclonal antibody producing cell line should be detailed. These should include the specificity, class and, where appropriate, subclass of the immunoglobulin secreted, together with any distinguishing features, such as isoenzyme/immunochemical markers. The production of immunoglobulin chains originating from the fusion partner should be determined. The antibody secretion should be stable in respect to both the type of antibody (class switch) and level of expression up to and beyond the population doublings used for routine production. Appropriate precautions should be taken to avoid cross-contamination with other cells.

## **5. CELL LINE PRODUCING THE RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODY**

### **5.1 Cloning and characterisation of the DNA coding for the non-specific part of the recombinant mAb**

For both chimeric and humanised monoclonal antibody a description of the origin, isolation and cloning strategy of the heavy and the light chain genes should be provided. In addition the following information is required:

- i) the introduced framework residue substitutions in humanised monoclonal antibodies to improve the CDR conformation (where applicable).
- ii) a justification of the choice of the immunoglobulin isotype.
- iii) a characterisation of the human constant domain genes (e.g. by restriction endonuclease maps).

### **5.2 Selection, cloning and characterisation of the DNA coding for the specific part of the recombinant mAb**

The origin of the hybridoma cell line and the characteristics of the rodent monoclonal antibody used should be described.

A description of the cloning of the rodent heavy and light chain variable region genes from the hybridoma cell line and the characterisation of the coding regions of the cloned genes should be provided. For humanised monoclonal antibodies a description of the identification, the method of isolation, either by cloning or synthesis, and the characterisation of the rodent CDR genes for both heavy and light chain should be provided.

### 5.3 Construction of the gene coding for the recombinant mAb

A description of the strategy followed either to join the rodent variable fragment to the human constant region, or, in the case of humanised antibody, to insert the rodent CDR genes into the human framework region sequences, is required. This documentation should include:

- i) cell lines and vectors used in the generation of the monoclonal antibody, and a description of the expression vectors used for the transfection of rDNA antibody genes into the mammalian host cell line, including the origin, structure and selection markers.
- ii) for both the heavy and light chain expression vectors the nucleotide sequences of the genes of interest and the flanking control regions. A detailed map indicating the regions which have been sequenced during construction and those deduced from the literature should be given. All the junction regions created by ligation during construction should be confirmed by sequencing.
- iii) a clear identification of all known expressed sequences.
- iv) an indication of any additional modifications.

### 5.4 Generation of the cell line expressing the recombinant monoclonal antibody

In addition to the documentation concerning the starting host strain or cell line, the following information is required:

- i) the methods used for introducing the vector into the host cell, the selection and cloning of the transformants.
- ii) the status of the vectors within the host.
- iii) a detailed study using various restriction enzymes and Southern blot analysis providing convincing data on the integrity in the host cell. Useful information is provided on the expression system by Northern blot analysis.
- iv) a detailed description of the strategy by which expression of the relevant gene is promoted and controlled (during production).

### 5.5 Genetic stability

The stability of the host/vector genetic and phenotypic characteristics should be investigated up to and beyond the population doubling level or generation number expected during full scale production. Such stability studies should provide detailed information on:

- i) gene copy number in relation to productivity of the culture.
- ii) characterisation of the monoclonal antibody. Analysis at the protein level and/or DNA level can be envisaged. Whichever method is used, it should be validated and the detection limit should be given.
- iii) the level and consistency of expression of both the heavy and light chain.



## **6. CELL BANK SYSTEM**

### **6.1 Establishment of the cell bank system (MCB and MWCB)**

It is essential that production is based on a well defined cell bank system. This will normally involve a Master Cell Bank (MCB) and a Manufacturer's Working Cell Bank (MWCB). During the establishment of the cell bank no other cell lines should be handled simultaneously in the same laboratory suite or by the same persons. The origin, form, storage, use, and details of life expectancy at the anticipated rate of use must be described in full for all cell banks. New working cell banks should be fully characterised.

Samples of the working cell bank should be retained until at least after the expiry date of the resulting final lot.

### **6.2 Control of virological and microbial contamination**

The various cell levels, including MCB, MWCB and PPCB (Post Production Cell Bank; see 6.5) should be examined for adventitious agents (viral, bacterial, fungal or mycoplasmal). Special attention should be given to viruses which can commonly contaminate the species from which the cell line has been derived. Appropriate tests to demonstrate the absence of virus contamination as described in Annex I should be performed.

Certain cell lines contain endogenous viruses, e.g. retroviruses, which may not readily be eliminated. Furthermore, potential viral contamination may take the form of complete viral genomes or subgenomic fragments resulting in the expression of infectious viral particles. Therefore the possibility of mutations of endogenous viruses during prolonged culture should be considered. The presence of sequences from viral genomes may not disqualify use of the cells, but any exogenous viral nucleic acid found should be identified. If the heterohybridoma approach is used for construction of the antibody secreting cell line the cell bank should be examined for the presence of murine and human viruses.

A cell line which produces any infectious virus capable of infecting human cells would be acceptable only in exceptional circumstances. All products derived from such lines would have to be considered on a case by case basis. If the cell line secretes infectious virus, appropriate precautions should be taken to protect personnel involved in production from infection.

There is special concern about the use of cell lines transformed by the deliberate introduction of EBV for the production of human monoclonal antibodies. Despite the fact that EBV transformed human B cells in general do not secrete viral particles these cells contain complex copies of the viral genome and EBV sequences should be sought by PCR or by co-cultivation with suitable indicator cell lines.

### **6.3 Characterisation**

A critical part of quality control will involve the full characterisation of cells. The identity of the cells should be established by distinguishing markers of the cell, such as specific isoenzyme and immunological features, and phenotypic characterisation.

If the EBV transformation procedure is used alone for the generation of a cell line for the production of human monoclonal antibodies difficulties can arise in the cloning procedure. It is therefore essential that manufacturers show convincing evidence that the cell line is monoclonal.

## 6.4 Secretion of cytokines

Manufacturers should be aware that lymphocytes and/or feeder cells can secrete a number of biological mediators which have diverse functions and may cause adverse effects when administered to humans. Consideration should be given to the ability of the production process to remove immune mediators such as interferons and other cytokines.

## 6.5 Establishment of the post production cell bank

For validation purposes a post production cell bank should be established. For single harvest production 10 or more population doublings beyond the maximum population doubling level used for routine production should be used. For multiple harvest production at a time which exceeds the total length of the cultivation period by one third is suggested.

## 7. CHARACTERISATION OF THE MONOCLONAL ANTIBODY

The monoclonal antibody should be characterised thoroughly. This characterisation must include both biochemical/physico-chemical and biological/immunological properties of the antibody. In addition the specificity and crossreactivity of the monoclonal antibody should be assessed.

### 7.1 Biochemical/physico-chemical characterisation

The biochemical/physico-chemical properties of the antibody should be described in detail. At least the following parameters should be determined: class, subclass (when appropriate) and light-chain composition, molecular weight and either N- and C-terminal amino acid sequence, secondary and tertiary structure.

### 7.2 Biological/immunological characterisation

The immunological properties of the antibody should be described in detail. Therefore the biological/immunological characterisation should include: antigenic specificity including the characterisation of the epitope the antibody recognises, binding capacity, ability for complement binding and activation, cytotoxic properties, antibody dependent cytotoxicity, ability to modify relevant antigens, capacity to stimulate immunocompetent cells and the ability to induce secretion of cytokines or other mediators.

### 7.3 Specificity and crossreactivity

The analysis should include the determination of unintentional reactivity with or cytotoxicity for human tissues distinct from the intended target, and cross-reactivity with a range of human tissues (listed in Annex II) by immunohistochemical procedures.

## 8. PRODUCTION

In vitro production is the preferred method of production. During the last few years the technology for in vitro production of monoclonal antibodies has been considerably improved. In vitro production of monoclonal antibodies offers a high degree of control and

standardisation and has important advantages over *in vivo* production with respect to viral safety, consistency of production and the absence of contaminant immunoglobulins in the crude harvest. *In vitro* production in serum free medium is also now feasible. Another advantage of this method of production is the considerable reduction of animal usage. Manufacturers should be aware of Directive 86/609/EEC concerning the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

If *in vivo* production is chosen it must be justified by the manufacturer.

A clear definition of a "batch" of product for further processing should be provided. A production batch should normally originate from a fresh ampoule of the MWCB. Details of the culture with the in-process controls should be provided. Criteria for rejection of the harvests and premature termination of the culture should be defined.

## **8.1 *In vitro* production**

For each production run, the presence, extent and nature of any microbial contamination in the culture vessels immediately prior to all harvesting must be thoroughly examined. Detailed information to confirm the adequate sensitivity of the methods used to detect contamination should be provided and acceptable limits of contamination set. The bulk culture fluid should be shown to be free from mycoplasmal, mycotic and bacterial contamination and should be tested for the presence of viruses using a general test involving inoculation into suitable cell substrates (see Annex I, b).

The composition and source of the cell culture medium used for production should be recorded. If animal serum-derived additives are used, they should be shown to be free from adventitious agents (See 2.2.).

Ideally not more than one cell line should be cultivated simultaneously in the same production area. If other cell lines are cultivated in parallel, records must be kept of the cell lines handled and evidence presented for the absence of cross contamination between them.

### ***8.1.1 Single harvest production***

The maximum permitted generation number for production should be defined and should be based on information concerning the stability of the cell line or the up to and beyond the level of production. Data on consistency of growth of the culture and on the maintenance of yield within specified limits should be presented. Appropriate monitoring of the cell line characteristics at the end of the production cycles should also be undertaken. Evidence should be provided that the yield does not vary beyond defined limits and that the nature and quality of the product does not change with respect to specific parameters.

### ***8.1.2 Multiple harvest production***

The period of continuous cultivation should be specified and this should be based on information concerning the stability of the system and consistency of the product up to and beyond this limit. Monitoring of the production system is necessary throughout the life of the culture. The required frequency and type of monitoring will depend upon several factors including the nature of the expression system and monoclonal antibody, as well as the total length of the period of continuous cultivation undertaken. The acceptance of harvests for further processing should be clearly linked to the schedule of monitoring applied. Evidence

should be provided that the yield does not vary beyond defined limits and that the nature and quality of the monoclonal antibody does not change with respect to specific parameters.

## 8.2 In vivo production

In vivo production should comply to the additional requirements set below.

### 8.2.1 *Characterisation of the animals used*

The strain and origin of the animals used for production should be specified, together with their genotype and age. They should be from a closed, specific pathogen-free (SPF) colony which is routinely monitored for those viruses listed in Annex I Table 2. The long term records of the breeding colony in respect of freedom from viral contamination should be considered in relation to the reliability of maintenance of the colony. Evidence should also be presented that animals are maintained under SPF conditions at all times during transfer and use.

### 8.2.2 *Harvest and handling of ascitic fluid*

Each production batch should originate from a fresh ampoule of the MWCB. The maximum permissible number of serial passages in vivo during normal production should be defined and restricted: justification of this limit should include information concerning the yield of monoclonal antibody and the stability of the hybridoma characteristics on in vivo passage up to beyond that used in production. Indefinite passage in animals is not acceptable. A scheme of priming, inoculation and harvesting should be provided.

The number of animals and the procedure used to prepare the bulk ascitic harvest should be given in detail. Full details should be provided on any substances used to pre-treat mice or rats to facilitate growth of hybridomas. Description, volume and concentration of cell inoculum should be given. Data concerning the titre of the antibody in and storage conditions of the bulk ascitic fluid should be provided (e.g. temperature, duration, details of any proteolytic enzyme inhibitors added). Particular attention should be paid to the degree and nature of any microbial contamination (bacterial, mycotic and mycoplasmal) in the bulk ascitic fluid. Testing procedures capable of detecting all of the murine viruses listed in Annex I Table 2 should be performed, as indicated in Annex I(a) and (b), on at least the first five bulk harvests of the product. However, it may be expected that general testing methods for viruses may be sufficient as experience of production is gained. Consequently, after the first five production runs, general testing for viruses, limited to those described in Annex I (b), may be considered adequate. Any infectious agent should be identified and tests for viruses in Group I Table 2 should be negative. If the source of mice is changed to a different colony or supplier, tests described in Annex I(a) should be performed on at least the first five bulk harvests to re-establish consistency of freedom from contaminant agents.

## 8.3 Virological aspects: in-process controls

The bulk harvest should be tested for the presence of viruses using a general test involving inoculation into suitable cell substrates as described in procedures given in Annex I (b).