

Contains Nonbinding Recommendations

Draft — Not for Implementation

514 Methods validation includes an assessment of the suitability of the analytical procedure. A validation
515 plan would have prespecified acceptance criteria for relevant validation parameters such as precision,
516 range, accuracy, specificity, detection limit, and quantitation limit. The proposed acceptance criteria for
517 these parameters would ensure that the analytical procedure is appropriate for its intended use. The
518 validation plan would assess whether a revised procedure is more susceptible than the original
519 procedure to matrix effects by process buffers/media, product-related contaminants, or other
520 components present in the dosage form. A plan would identify any statistical analyses that will be
521 performed and whether product testing to compare the two procedures is intended. The need and plan
522 for providing product testing to compare the two procedures could vary depending on the extent of the
523 proposed change, type of product, and type of test (e.g., chemical, biological).

524

525 When used for release or process control, use of the new revised analytical procedure should not result
526 in deletion of a test or relaxation of acceptance criteria that are described in the approved application.

527

D. Does FDA Have Specific Concerns About Changes in Manufacturing Equipment That Should Be Addressed in a Comparability Protocol?

529

530

531 Comparability protocols may be most useful if applicants are planning to change to equipment with a
532 different operating principal. Equipment changes are often made in conjunction with changes to the
533 manufacturing process. We recommend that you evaluate this type of change with respect to its effect
534 on the production process prior to deciding whether or not a comparability protocol would be
535 appropriate.

536

E. Does FDA Have Specific Concerns About Changing Manufacturing Facilities That Should Be Addressed in a Comparability Protocol?

537

538

539

540 The utility of a comparability protocol is often limited due to the scope of the change and the need, in
541 some cases, for an inspection. For example, a move to a new facility can involve many changes (e.g.,
542 new equipment, modified manufacturing process) that are difficult to prospectively identify as part of a
543 comparability protocol because the new facility is unknown or not constructed at the time the
544 comparability protocol is being considered. We recommend you consider carefully the appropriateness
545 of a comparability protocol for a facility change that involves many other changes.

546

547 We recommend a statement be included in the comparability protocol for changing manufacturing
548 facilities saying that a move to a different drug substance or drug product manufacturing site will be
549 implemented only when the site has a satisfactory CGMP inspection for the type of operation.
550 Furthermore, in the case of aseptically processed product, the statement would also indicate that a
551 move to a different facility or area (e.g., room or building on a campus) will be made only when the
552 specific facility or area has a satisfactory CGMP inspection (irrespective of the overall CGMP status for
553 the campus). For a move to another type of site (e.g., drug substance intermediate manufacturing site,

Contains Nonbinding Recommendations

Draft — Not for Implementation

554 testing laboratory), a statement would be included that the move to this site would not be implemented if
555 there were an unsatisfactory CGMP inspection for the site.¹⁵

556

557 **F. Can a Comparability Protocol Be Used for Container Closure System**
558 **Changes?**

559

560 In the past, applicants have used protocols for container closure system changes, and they can continue
561 to use them. A comparability protocol can be particularly useful for repetitive container closure system
562 changes.

563

564 **G. Can Implementation of or Changes in Process Analytical Technology (PAT) Be**
565 **Addressed in a Comparability Protocol?**

566

567 FDA anticipates that implementation of or changes in PAT could be addressed in a comparability
568 protocol. Early dialogue with FDA is encouraged. The FDA intends to publish a guidance on PAT in
569 the future.

570

571 **H. Can a DMF or VMF Be Cross-Referenced in an Applicant's Comparability**
572 **Protocol?**

573

574 A master file can be cross-referenced in a comparability protocol that provides for CMC changes (e.g.,
575 new manufacturer of drug substance, container resin). The protocol would include a commitment to
576 provide a letter authorizing the FDA to review the master file when a postapproval CMC change
577 implemented using the approved comparability protocol is reported to FDA. The comparability
578 protocol would also indicate the type of information (e.g., manufacturing and formulation information for
579 a plastic resin) that will be referenced in the master file and the information that you will provide such as
580 the studies you will perform to demonstrate the suitability of the new material (e.g., conformance to
581 approved specification, compatibility studies, stability studies).

582

583 **I. Can a Comparability Protocol Be Included in a DMF or VMF?**

584

585 A comparability protocol can be included in a master file. The protocol can be cross-referenced for
586 CMC changes. An applicant's submission must include a letter authorizing the FDA to review the
587 master file (e.g., 21 CFR 314.420(b)). Comparability protocols are product specific. Therefore, the
588 applicant's submission would provide a comparability protocol that augments the information provided
589 in the master file by specifying, for example, any additional studies that will be performed to demonstrate
590 suitability of the postchange material (e.g., conformance to approved specification, compatibility studies,

¹⁵ A satisfactory CGMP inspection is an FDA inspection during which (1) no objectionable conditions or practices were found (No Action Indicated (NAI)) or (2) objectionable conditions were found, but corrective action is left to the firm to take voluntarily and the objectionable conditions will not be the subject of further administrative or regulatory actions (Voluntary Action Indicated (VAI)).

Contains Nonbinding Recommendations

Draft — Not for Implementation

591 stability studies). The FDA ordinarily neither independently reviews master files nor approves or
592 disapproves submissions to a master file.



London, 30/07/2002

CPMP Ad-Hoc Working Group on (Pre)-clinical comparability of Biotechnology Products/3097/02

**COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS
(CPMP)**

**NOTE FOR GUIDANCE ON COMPARABILITY OF MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING
BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS DRUG SUBSTANCE**

ANNEX ON NON-CLINICAL AND CLINICAL CONSIDERATIONS

DISCUSSION IN THE AD HOC GROUP ON COMPARABILITY	January 2001 - June 2002
TRANSMISSION TO CPMP	July 2002
RELEASE FOR CONSULTATION	July 2002
DEADLINE FOR COMMENTS	January 2003

Note:

This draft Note for guidance has been released for 6-month consultation on 30 July 2002. Any comments should be sent to the *Ad-Hoc* Working Group on (Pre)-clinical comparability of Biotechnology Products secretariat at the EMEA (François Maignen telecopy +44 20 74 18 86 13) by 31 January 2003.

TABLE OF CONTENTS

1.	INTRODUCTION	2
2.	BACKGROUND	2
3.	CHANGE IN THE MANUFACTURING PROCESS OF A GIVEN PRODUCT	2
3.1	General considerations	3
3.1.1	Non-clinical considerations.....	3
3.1.2	Immunogenicity	4
3.1.3	Clinical considerations	4
3.1.3.1	Surrogate markers.....	4
3.2.1	Differences that can not be characterised.....	5
3.2.2	Differences that are well characterised.....	5
3.3	Clinical safety and pharmacovigilance requirements.....	5
3.4	Timing of the availability of the required non-clinical and/or clinical data.....	5
4.	PRODUCT “CLAIMED TO BE SIMILAR TO ANOTHER ONE ALREADY MARKETED”	6
4.1	First situation (the company chooses to develop the product on its own).	6
4.2	Second situation (The company claims that the product is similar to another one already marketed and chooses to demonstrate comparability).....	6
4.2.1	Non-clinical data	6
4.2.2	Immunogenicity	7
4.2.3	Clinical data.....	7
4.2.4	Safety.....	7
5.	IMMUNOGENICITY	7
5.1	Prediction of immunogenicity.....	7
5.2	Changes to the active substance and to the formulation	8
5.3	Investigation of immunogenicity	8
5.4	When to study immunogenicity?	8

1. INTRODUCTION

This document is an Annex to the “Note for guidance on comparability of medicinal products containing biotechnology-derived proteins as drug substance (CPMP/BWP/3201/00)”. It does not address other biological products. It should be read in conjunction with Part 3 of the Annex of Directive 2001/83/EC and current and future guidelines, especially those on:

- ICH topic E10 - Note for guidance on choice of control group in clinical trials (CPMP/ICH/364/96)
- ICH topic S6 - Note for guidance on Pre-clinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (CPMP/ICH/302/95)
- Note for guidance on clinical investigation of medicinal products in the treatment of diabetes mellitus (CPMP/EWP/1080/00)
- Note for guidance on the clinical investigation of recombinant Factor VIII and Factor IX products (CPMP/BPWG/1561/99)

2. BACKGROUND

In the Note for Guidance on Comparability of Medicinal Products containing Biotechnology-derived Proteins as Drug Substance two situations are indicated in which comparability might become an issue:

- When a change is introduced in the manufacturing process of a given product
- When a product is claimed to be similar to another one already marketed

In either case the company will have to demonstrate or justify that the ‘new’ and ‘original/reference’ products have similar profiles in terms of Quality, Safety and Efficacy. This might be a sequential process, beginning with quality studies (partial or comprehensive) and supported, as necessary, by non-clinical and/or clinical bridging studies.

The purpose of this document is to explore which non-clinical and clinical data will be required in these situations. The data requirements and timing of submission of these data will have to be judged on a case by case basis and will be guided by:

- The extent to which the product may be characterised
- The nature of the changes in the ‘new’ product compared to the ‘original’ product
- The observed/potential differences between the two products
- The clinical experience pertaining to the particular class of products

3. CHANGE IN THE MANUFACTURING PROCESS OF A GIVEN PRODUCT

In the note for guidance mentioned above, situations are indicated when, due to a change in the manufacturing process of a given product, an effect on efficacy and/or safety might be expected or cannot be ruled out (see paragraph 2.2 in the Note for Guidance on comparability of medicinal products containing biotechnology derived proteins as drug substance). It is assumed that the product’s physico-chemical properties and *in vitro/in vivo* biological activity are well characterised according to state of the art methods, but that these data in combination with lack of experience related to proposed changes in the manufacturing process are insufficient to exclude relevant changes in clinical efficacy and safety.

This document will mainly focus on the kind of non-clinical and/or human data needed in those cases. It should be remembered, however, that, in all situations, the company should justify that the change in the manufacturing process will not affect efficacy and/or safety of the product and that the data underpinning such justification will be assessed.

If a modification is detected during the comparability exercise, this either might imply a quality problem which might be resolved or it may indicate the need for further pre-clinical and/or clinical data.

Due to lack of experience and taking into consideration that this document gives general guidance it should be recognised that the product-specific data requirements will have to be judged on a case by case basis.

Changes to the conditions of manufacture may alter the profile of impurities, product-related impurities and product-related substances. The biological impact of these changes should be considered prior to administration of the product to man.

3.1 General considerations

In this section, issues are mentioned that should be considered when drafting and justifying a development plan to address efficacy and safety of the (possibly) changed product. Depending on the product and the (anticipated) change, the data package may consist of *in vitro* data, animal data or data in humans or a combination. The choice should be justified.

3.1.1 Non-clinical considerations

Data from non-clinical studies can provide useful pointers to potential therapeutic differences in the biological properties of a 'varied' version of a product compared with the 'original' product. In some cases it may be appropriate to undertake few or even no non-clinical studies, but in other situations a more detailed evaluation may be helpful. It is important to note that safety issues require a clear understanding of the product characteristics in order to design suitable study protocols. There will be some overlap between the quality and the non-clinical parts since some information is relevant, from a different perspective, for the characterisation of the biotechnology product as well as the design and evaluation of appropriate non-clinical studies. Sufficient information, or cross-referencing, should be supplied in the non-clinical section to justify the approach taken.

It is acknowledged that non-clinical studies can be of limited usefulness in the assessment of clinical safety, particularly in species-specific areas such as immunogenicity. However, non-clinical studies, when undertaken, should be comparative in nature and may be used to highlight differences between the 'varied' and 'original' products. Such studies may have a useful role in the preliminary assessment of safety at one or more points in the development process, thus enabling clinical studies, if needed, to be undertaken with greater confidence. The following approach may be considered and should be tailored to the specific product concerned on a case-by-case basis.

In vitro studies: A battery of receptor-binding studies, many of which may already be available from quality-related bioassays, should normally be undertaken in order to assess if any alterations in reactivity have occurred and to determine the likely causative factor(s).

In vivo animal studies: If there are specific uncertainties or concerns regarding safety *in vivo* studies in one or more suitable animal models may be considered. Greater reliance would be placed on results from studies in a species shown for the 'original' product to be a good model for man. Animal studies should be designed to maximise the information obtained and to compare 'original' and 'varied' products in the final formulation. In the general case and where the model allows, consideration should be given to monitoring a number of endpoints such as:

- a) Changes in pharmacokinetic parameters, e.g. clearance.
- b) The immune response, e.g. antibody titres, neutralising capacity, cross-reactivity.
- c) Areas of specific concern, e.g. respiratory, renal or cardiovascular parameters.
- d) Standard toxicological observations (in-life and post-mortem),

Ongoing consideration should be given to the use of emerging technologies. *In vitro* techniques such as epitope mapping, and 'real-time' binding or antigenicity assays may prove useful. The developing science of proteomics may present opportunities for comparing minor changes in biological response to pharmacologically active substances by monitoring qualitative and quantitative changes in the protein profile of biological fluids. Interpretation of such studies is an evolving science, but useful information may be obtained.

3.1.2 Immunogenicity

Immunogenicity must always be addressed by clinical data, unless clinically relevant immunogenicity can be excluded by other means (see 5-Immunogenicity)

3.1.3 Clinical considerations

In principle, the need for clinical efficacy and safety (other than immunogenicity) data should be approached as if data from confirmatory and comparative efficacy/safety studies were needed. Deviations from this conceptual level should therefore be justified. Important issues that should be taken into account when designing and justifying the clinical program include clinical experience gained with the 'original' product if relevant with respect to:

- The relationship between dose/exposure and efficacy/safety
- Whether a dynamic marker has been accepted as a surrogate marker for clinical efficacy/safety
- The relationship between dose/exposure and this surrogate marker
- Drug/receptor(s) interaction
- Disease-specific mechanisms of action
- Target organ(s) for activity
- Mode of administration
- Pharmacokinetic properties (including biological barriers of relevance)

3.1.3.1 Surrogate markers

Usually in clinical trials, efficacy is defined by a clinical endpoint. Sometimes surrogate markers are used. A dynamic marker is a surrogate marker for efficacy; if therapy-induced changes in that marker to a large extent can explain changes in clinical outcome.

Surrogate markers are usually more sensitive to changes in activity and can be assessed earlier than clinical endpoints and, therefore, may be more useful when comparability has to be shown with clinical data. However, as the goal of the comparative exercise is showing equivalence of the products, usually data are needed concerning the quantitative relationship between the surrogate and the clinical endpoint to enable defining and justifying the equivalence margin in terms of efficacy.

Research in surrogate endpoints is encouraged, though acknowledging that full validation of the surrogate is not an easy process.

There might be situations where the requirements with respect to formal validation are less stringent. Examples include absolute neutrophil count and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) or early viral load reduction in chronic hepatitis C and alpha interferons. No specific guidance can be given, but face validity and clear linkage between the marker and the disease under consideration are issues of importance. In cases where formal validation of the surrogate marker is missing, a comprehensive justification is expected taking into account the above-mentioned issues and regulatory scientific advice might be advisable.

3.2 Differentiation of requirements

As stated before, the kind of data required will depend on the product and the existing experience. A further differentiation may be possible however, based on the level of characterisation of the change. Two situations might be of interest:

- Differences that cannot be characterised in detail or cannot be detected, e.g. due to the complexity of the molecule, but are likely to be present a priori as a consequence of modifications of the production process.
- Differences from the 'original' product, either expected a priori or found during the comparability exercise, that are well characterised.

3.2.1 Differences that can not be characterised

If changes are likely to be present, but cannot be characterised, the efficacy and safety of the product need to be further characterised compared with the 'original' product.

Possible differences in efficacy should normally be investigated in studies with the highest probability of showing a difference (see ICH topic E10). The acceptable equivalence margin should be set taking into account clinical relevance and statistical considerations.

If surrogate markers are available, pharmacokinetic (PK)/pharmacodynamic (PD) studies may appropriately fulfil these requirements. Care should be taken in these cases to investigate a reasonable dose range to demonstrate assay sensitivity (see ICH topic E10). The choice of marker(s) should be justified and the delta defining equivalence should be pre-specified and justified.

If no surrogate markers are available and there are no relevant additional pre-clinical or clinical data, an equivalence trial, using clinical endpoints will be needed. Assay sensitivity has to be ensured in the design of the trial and the acceptable margin has to be defined and justified.

3.2.2 Differences that are well characterised

Due to the product-specific nature of possible changes in efficacy/safety, it is not possible to present detailed guidance, but, in general, well characterised differences may provide a background for a rational approach with respect to the need for clinical studies. Due to type and/or extent of a change, whether qualitative or quantitative, it may be possible to justify why, for example, only immunogenicity studies are of importance. In other cases where efficacy data are deemed necessary, well conducted and informative receptor interaction studies and a valid pharmacological rationale may support the use of bioequivalence as a surrogate for efficacy. A further differentiation in major and non-major differences might be helpful.

In case the difference is non-major and there is no change in *in vitro* biological activity, comparable bioavailability data and/or pharmacodynamic studies may be sufficient.

In case the difference is major, e.g. major changes in glycosylation pattern, or difference in *in vitro* activity, clinical equivalence studies will be necessary, unless otherwise justified.

In case a change occurs in the primary sequence of the active substance, this will normally be seen as a major and unacceptable quality problem, that cannot be solved by pre-clinical or clinical studies and falls outside the concept of comparability.

3.3 Clinical safety and pharmacovigilance requirements

On a case-by-case basis, the cycle of submission of the periodic safety update reports (PSURs) might be amended (restarted). On a systematic basis, a specific paragraph detailing the manufacturing changes is included in the PSURs. The possible consequences of the changes in the manufacturing process on the safety profile should be discussed in the relevant sections of the PSURs (e.g., immunogenicity in the "overall safety evaluation" section, possible lack of efficacy). Any commitment from the Company (follow-up measure or specific obligation) addressing a safety issue linked to the comparability exercise should be described in the report.

3.4 Timing of the availability of the required non-clinical and/or clinical data

Depending on the situation, data should be available before the variation is approved or after, as a post-marketing commitment.

Where there are non-clinical data relevant for the impact of the change on efficacy and/or safety of the product, these should be submitted before approval.

In principle, clinical data, if required, need to be available before approval. Depending on the product and the indication, approval might be based on pharmacodynamic data, provided that the clinical endpoint results will be provided after approval.

For immunological data see section 5.2 Changes to the active substance and to the formulation.

4. PRODUCT “CLAIMED TO BE SIMILAR TO ANOTHER ONE ALREADY MARKETED”

It is important to note that the concept of "comparability" as referred to in this Annex is a separate concept from that of "essential similarity" as referred to in Article 10(1)(a) of Directive 2001/83/EC. "Essential similarity" is assessed in accordance with its own, separate criteria and does not fall within the scope of this Annex.

In essence, the applicant will need to file a full application. However, two possible scenarios are foreseen:

- The company chooses to develop the product on its own.
- The company claims that the product is similar to another one already marketed and chooses to demonstrate comparability.

The company should justify its choice in the dossier and might want to contact the EMEA before starting the development of the product.

4.1 First situation (the company chooses to develop the product on its own).

In this situation, a full development programme is undertaken, taking into account the relevant guidelines concerning quality, safety and efficacy. Data should come from studies and experiments conducted with the product to be assessed. Data from the literature cannot be used to support efficacy and safety of the product, as no comparability exercise has been carried out in relation to a product already marketed.

In case the existing products have more than one indication, efficacy in all claimed indications will have to be shown, as extrapolation, based on literature data, will usually not be possible.

Sufficient safety data will be needed and immunogenicity should be studied (see section 5 Immunogenicity).

4.2 Second situation (The company claims that the product is similar to another one already marketed and chooses to demonstrate comparability).

In this situation, the company pursues to demonstrate that the product is comparable, in terms of quality, efficacy and safety to a marketed product. In this case, it may not be necessary to repeat all safety and efficacy studies if the applicant can demonstrate that 1) it is possible to characterise the product in detail with respect to physico-chemical properties and *in vitro* activity, and 2) comparability can be shown from a chemical-pharmaceutical perspective. For comparability testing, the same 'reference' product should be used for all three parts of the dossier.

In case the 'reference' product has more than one indication, the efficacy and safety of the new product has to be justified and if necessary demonstrated separately for each of the claimed indications. Justification will depend on e.g., clinical experience, available literature data for the 'reference', whether or not the same receptor(s) are involved in all indications, pre-clinical data and immunogenicity.

Safety data will be needed prior to marketing authorisation, but also post-marketing (see section 4.2.4 Safety) as possible differences might become evident later, even though comparability with regard to efficacy has been shown.

4.2.1 Non-clinical data

The company should take into consideration the "Note for Guidance on Pre-clinical Safety Evaluation of Biotechnology Derived Pharmaceuticals (CPMP/ICH/302/95)". All the points raised will need to be addressed in the dossier. Where a comparability exercise is conducted, the same considerations as in section 3.1.1 of this Annex apply. If there are other, case-specific safety concerns (e.g. relating to new excipients or local tolerance) these might be resolved by performing appropriate standard pre-clinical studies prior to administration of the new product to man in clinical trials. The approach taken will need to be fully justified.

4.2.2 Immunogenicity

Immunogenicity must always be addressed by clinical data, unless clinically relevant immunogenicity can be excluded by other means. If differences in the quantity or type of antibody are found, this has to be further investigated (see section 5 Immunogenicity).

4.2.3 Clinical data

The requirements depend on the type of product and the therapeutic areas Available guidelines should be followed.

Generally, demonstration of equivalence concerning bioavailability and pharmacodynamic action(s) using equivalent dosing will be required. As mentioned before, 'equivalence' has to be defined a priori and the choice of the pharmacodynamic parameter(s) justified.

In addition, clinical trials demonstrating equal efficacy will generally be necessary between the product to be assessed and the chosen 'reference'. The kind of trials, the duration and type of endpoint (e.g., clinical or surrogate see sections 3.1.3 Clinical considerations and 3.1.3.1 Surrogate markers) depend on experience, type of product, therapeutic area and the availability of accepted surrogate endpoints.

As for all equivalence designs, assay sensitivity (see ICH topic E10) has to be ensured. If this cannot be done or is shown to be not feasible, other designs should be explored and the consequences discussed with the authorities.

4.2.4 Safety

In principle when comparability is shown, the data for the 'reference' will also be relevant for the 'new' product. However, the experience gathered with biotechnology products shows that, although the efficacy is shown to be comparable, the product may exhibit different safety profiles (in terms of nature, seriousness, severity or incidence of adverse reactions). Pre-licensing, the database may be too small to pick up these differences. Therefore, the safety profile and the risk-benefit balance of these products will have to be monitored closely on an ongoing basis during the post-marketing phase.

In accordance with the current EU pharmacovigilance guidelines, less frequent submission of the PSURs may be requested by the applicant, as part of the application for a marketing authorisation. Such amendment of the cycle of submission will NOT be granted once a new "comparable" product is authorised.

In addition, the differences in terms of safety profile with the "reference" product should be discussed in the relevant sections of the PSURs.

Also, the compliance of the marketing authorisation holders with commitments (where appropriate) and their pharmacovigilance obligations will be closely monitored.

Therefore, pharmacovigilance systems (as defined in the current EU legislation) and procedures (as described in the current EU guidelines) to achieve this monitoring should be in place when a marketing authorisation is granted.

5. IMMUNOGENICITY

5.1 Prediction of immunogenicity

The factors triggering immune reactions against biotechnology-derived proteins are often not fully understood in individual cases. In general, however, the occurrence of immunogenicity is influenced by the properties of the immunogen, its molecular size and solubility, and adjuvants/carriers used in the formulation. Furthermore, host factors including genotype and concomitant diseases associated with immune dysregulation, previous exposure to other therapeutic proteins that might cause cross reactivity, could also play a part. The route of administration can modify the host immune reaction. The intravenous, intraperitoneal, oral, or aerosol route may favour tolerance whereas subcutaneous or intradermal administration may mimic an active immunisation. Repeated administration of an antigen will increase the likelihood of a strong immune response as compared to one-off treatment.

5.2 Changes to the active substance and to the formulation

A change in the manufacturing process may result in changes in glycosylation or protein folding. These changes may not always be detected by physicochemical methods, but may still cause a change in immunogenicity. Post-translational differences may occur between various expression systems although the genes themselves are identical. An additional complication is that the glycosylation pattern for the same protein may differ between tissues, and is dependent on cell cycle and hormonal status. Furthermore, the chemical process used for extraction and purification of the therapeutic protein may result in changes that can enhance immunogenicity. Similarly, changes in quality/quantity of impurities or excipients may affect immunogenicity. This is considered to be of special relevance for new products claiming comparability to licensed products. Some changes, such as neoepitopes induced by aggregation, may be observed after modification of the formulation and/or change in the storage conditions. These neoepitopes may induce immune responses in the patients.

5.3 Investigation of immunogenicity

The basic requirement is the measurement of antibodies to the product. The screening assays should be sensitive enough to detect low titre antibodies as well as antibodies to conformational and linear epitopes. These assays should also allow comparison of the product claiming comparability with the products of interest. In the planning of studies of immunogenicity, the predisposing factors for immunogenicity discussed above and the experience gained from existing products should be considered. The periodicity and timing of sampling for testing of antibodies should be justified, especially with regard to the levels of the free antigen.

If antibodies are detected, further immunological studies to characterise the antibodies and their implications on safety, efficacy and pharmacokinetic parameters are required. On the other hand, the value of antibody testing in the monitoring of the individual patient should be critically evaluated and recommended as a routine measure only if it can affect therapeutic decision-making.

5.4 When to study immunogenicity?

The issue of immunogenicity must always be considered when a claim of comparability is made, especially when repeated administration is proposed. Testing for antibody response is always necessary when a new biotechnological product is developed. The need for testing after changes have been made to the manufacturing process of an existing product should be assessed on a case-by-case basis. The type of the change, immunogenicity-related factors, and previous experience with similar changes to the same or related proteins are some of the factors to be taken into account. Immunological studies are expected if a detailed and reliable physico-chemical characterisation is not possible due to the complexity of the molecule and an impact on immunogenicity by the changes to the manufacturing process cannot be excluded.

In principle, major qualitative changes normally warrant immunogenicity studies pre-licensing. In view of the unpredictability of the onset and incidence of immunogenicity, post-marketing monitoring of antibodies at predetermined intervals may be required for at least one year after the release of a new biotechnological product.

生物薬品の特性・品質解析，品質評価法の検討

分担研究者： 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第1室長）

協力研究者： 太田美矢子 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官）

要 旨

これまで我々は、液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化-質量分析法(LC/ESI-MS)を用いた糖鎖プロファイリング法，及び糖ペプチドマッピング法を開発し，様々な糖タンパク質の構造解析に応用してきた。昨年度は，類似糖タンパク質のモデルとして起源の異なる3種類の遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン(EPO)を用いて，糖鎖プロファイリング，及び糖ペプチドマッピングが，国際的な重要課題となっているバイオテクノロジー応用医薬品の同等性/同質性評価法として有用であることを確認した。本年度は，生物薬品の特性・品質解析，品質評価法，及び同等性/同質性評価における糖鎖プロファイリング法，及び糖ペプチドマッピング法の有用性の拡大をめざして，EPO以外の糖タンパク質への応用，及び分析法の改良を行った。モデル糖タンパク質として，国内外で甲状腺癌の診断薬として期待されている遺伝子組換え型ヒト甲状腺刺激ホルモン(rTSH)，及びヒト脳下垂体由来甲状腺刺激ホルモン(pTSH)を用いた。その結果，糖鎖プロファイリング及び糖ペプチドマッピングを組み合わせることによって，rTSH及びpTSHの一次構造と糖鎖構造の違いを明らかにできること，また，糖鎖構造の詳細や部位特異的糖鎖の不均一性を解析できることを確認した。さらに，糖鎖プロファイリングにおいて，キャピラリーLC/ESI-四重極型/飛行時間型質量分析計(CapLC/ESI-Q/TOFMS)の導入は，分析の微量化，高分解能スペクトル測定，及びMS/MS自動測定による糖配列解析を可能とすることから，タンパク質性医薬品の特性・品質解析，品質評価，及び同等性/同質性評価法としての有用性の向上に役立つことが確認された。

A. 研究目的

バイオテクノロジーの進展は，様々なタンパク質を医薬品として設計・製造し，供給することを可能とした。しかし，多くの細胞内タンパク質にみられる糖鎖の付加を人為的に制御することは依然として困難である。糖鎖部分は，生物活性，体内動態，溶解性，及び安定性に寄与しているだけでなく，糖鎖抗原として，安全性にも影響を及ぼすことが知られている。従って，糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析，及び品質評価において，最終産物の

糖鎖構造を解析することは重要である。また，糖鎖付加は製造法の変更の影響を大きく受けることから，昨今の国際的重要課題の一つである製造方法変更時における同等性/同質性評価において，糖タンパク質の同等性/同質性評価がとりわけ大きな問題となっている。このような背景のもと，糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造を簡便・迅速に解析する技術の開発が国際的に望まれている。

我々はこれまで，糖タンパク質の構造解析法として，LC/MSを用いた糖鎖プロファイリング法，及び

糖ペプチドマッピング法を開発し、糖タンパク質の構造解析に応用してきた。すなわち、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS によって、糖鎖の分布と構造を明らかにし（糖鎖プロファイリング）、酢酸アンモニウム系移動相及び逆相 LC/MS を用いた糖ペプチドマッピングによって、糖鎖結合部位の同定、及び部位特異的糖鎖の不均一性の解析を行ってきた。

本研究の目的は、我々が開発した糖鎖プロファイリング法、及び糖ペプチドマッピング法を糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析、品質評価、及び同等性/同質性評価に応用すること、またその有用性を評価することである。昨年度は、起源の異なる3種類の EPO を類似糖タンパク質のモデルとして用い、糖鎖プロファイリング法及び糖ペプチドマッピング法が3種の EPO 間の糖鎖の構造と不均一性の差異を識別できることを確認し、糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価として有用性であることを示した。本年度は、糖鎖プロファイリング法、及び糖ペプチドマッピング法の有用性の拡大をめざして、EPO 以外の糖タンパク質への応用、及び分析法の有用性の向上を検討した。モデル糖タンパク質として、国内外で甲状腺癌の診断薬として期待されている遺伝子組換え型甲状腺刺激ホルモン (rTSH)、及びヒト脳下垂体由来甲状腺刺激ホルモン (pTSH) を用いた (Fig.1)。また、糖鎖プロファイリングにおいて、微量で高分解能スペクトル測定、及び自動 MS/MS 測定が可能な CapLC/ESI-Q/TOFMS を検討した。

B. 研究方法

1) 試料

pTSH, rTSH 及びトリプシンはシグマ社より購入した。N-グリコシダーゼ F (PNGase F) は Roche Diagnostic GmbH 社製を用いた。

2) 糖鎖の調製

TSH (100 µg) を 8 M グアニジン塩酸塩, 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 (360 µl) に溶解し、2-メルカプトエタノール 2.6 µl を加え、室温

で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 7.56 mg を試料溶解溶液 60 µl に溶かして試料溶液に加え、遮光下、室温にて 2 時間放置した。PD-10 カラムを用いて脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。還元カルボキシメチル化 TSH を 100 µl のリン酸緩衝液 (pH 6.4) に溶解し、2 単位の PNGaseF と 37 °C で 72 時間反応させて糖鎖を切り出した。70 % 冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿させ、上清を SpeedVac で減圧乾固した。糖鎖を 50 µl の水に溶解し、0.5 M NaBH₄ (50 µl) と反応させて糖アルコールとした。カーボンカートリッジ ENVI-Carb (Supelco) を用いて脱塩し、減圧乾固後、100 µl の水に溶解して試料溶液とした。

3) TSH のペプチド/糖ペプチドの調製

還元カルボキシメチル化した TSH (100 µg) を 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 8.0) 100 µl に溶かし、トリプシン (2 µg) を 2 µl の塩酸溶液 (pH 3.0) に溶解させたものを加えて、37 °C で 4 または 8 時間消化した。

4) 糖鎖プロファイリング

① HPLC :

装置 : Ultra-PlusII (Micro-Tech Scientific Inc.)

カラム : Hypercarb (Michrom BioResource 社製, 0.2 × 150 mm)

溶離液 A : 2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 8.5)

溶離液 B : 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 8.5)

グラジエントプログラム : B 液 2~40% (0~60 分)

流速 : 3 µl/分

② ESI-TOFMS, ESI-Q/TOFMS :

装置 : QSTAR (Applied Biosystems)

測定モード : ポジティブイオンモード

Ion source gas: 20

Curtain gas: 25

Ionspray voltage: 5500

Declustering potential: 50
Focusing potential: 275
Declustering potential 2: 15
Collision energy: 25
Collision gas: 5
スキャン範囲: m/z 800-2000

5) 糖ペプチドマッピング

① HPLC

HPLC 装置: Finnigan spectrasystem (p4000 pump,
UV2000, Finnigan 社)

分離カラム: Vydac C18 (2.1 x 250 mm, Vydac
社)

流速: 0.2 ml/min

検出波長: 206 nm

a) トリフルオロ酢酸 (TFA) 系溶離液

移動相 A: 0.05 % TFA

移動相 B: 0.05 % TFA を含むアセトニトリル
グラジエント: 移動相 B を 90 分間で 1-40 % に
上昇させた。

b) 酢酸アンモニウム系溶離液

移動相 A: 1 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B: 1 mM 酢酸アンモニウムを含む 80 %
アセトニトリル

グラジエント: 移動相 B を 60 分間で 1-25 % に
上昇させた後, 60-90 分で
25-50 % に上昇させた

② ESI-MS:

装置: ESI-トリプルステージ四重極型 MS/MS
システム TSQ-7000 (Finnigan 社)

測定モード: ポジティブイオンモード

シースガス: 70 psi

オグジュラリーガス: 10 unit

キャピラリー温度: 225 °C

マルチプライヤー: 1200 V

ESI 電圧: 4500V

スキャン範囲: m/z 400-2400

スキャン速度: 1 スキャン/4 秒

C. 研究結果

(1) 糖鎖プロファイリング

1) pTSH の糖鎖プロファイリング

TSH は甲状腺機能を調節している糖タンパク質性ホルモンの α 鎖 Asn52, Asn78, 及び β 鎖 Asn23 に N 結合糖鎖が結合している (Fig. 1). pTSH には非還元末端に硫酸基が結合した糖鎖が付加していることが報告されている。

pTSH から糖鎖を切り出すため, 前回 EPO から糖鎖を切り出した際に用いたものと同様の条件下で PNGaseF を作用させたが, 糖鎖を遊離させることはできなかった。これは TSH にはジスルフィド結合が多いためと考えられた。そこで, 還元カルボキシメチル化してから PNGase F を作用させることによって, 糖鎖を切り出すことに成功した。得られた糖鎖は, グラファイトカーボンカラムによってアノマーが分離されることを避けるために, NaBH₄ で還元して糖アルコールとして分析した。

昨年度実施した EPO 糖鎖のプロファイリングは, セミマイクロ LC/MS (内径 2.1 mm のカラムを使用) 及び ESI-トリプルステージ四重極型 MS/MS システムを用いて行ったが, 本年度は CapLC/ESI-Q/TOFMS を検討した。CapLC は内径 0.1-0.3mm 程度のカラムを用い, 流速 1-10 μ l/min 程度で目的物質の分離を行うことができるので, 微量分析に適しているシステムである。また, ESI-Q/TOFMS は TOFMS によって高分解能スペクトル測定を行うと同時に, 自動的に MS/MS 測定を行うことができるシステムで, 糖鎖の高分解能プロファイリングと自動糖配列解析が可能になることが期待される。我々は, 内径 0.2mm のグラファイトカーボンカラムを用いた CapLC と ESI-Q/TOFMS を組み合わせて, pTSH 糖鎖のプロファイリングを行った。

Fig. 2(A) は pTSH から切り出した糖鎖のプロファイルで, 複数の糖鎖が付加していることが確認された。昨年度用いたセミマイクロ LC では 1 回の分析に 20 μ g ものサンプルが必要であったが, 今回は 1 μ g のサンプルで糖鎖プロファイルを得ることができた。最も大きなピークであるピーク 7 のマススペクトル

を Fig. 3(A)に示す。 m/z 1028.34 のイオンが検出され、同位体ピークとの m/z 値の差が約 0.5 であることから、2価イオンであることが確認された。また、近傍に1アンモニウム付加体 (m/z 1039.33) 及び2アンモニア付加体 (m/z 1050.32) の2価イオンが検出された。これらの値からピーク7の糖鎖の分子量は 2054.68Da と算出された。[NeuAc][Hex]₄[HexNAc]-Core (理論分子量: 2054.73 Da ; 混成型糖鎖) 及び SO₃-[NeuAc][Hex][HexNAc]₃-Core (理論分子量: 2054.69 Da ; 硫酸化複合型糖鎖) が候補として考えられたが、TOFMSによる高分解能スペクトル測定の結果から硫酸化糖鎖と推定された。

ピーク7の詳細な糖鎖構造は自動的に測定されたプロダクトイオンスペクトルから明らかになった。まず、SO₃-HexNAc⁺ (m/z 284), HexNAc-HexNAc⁺ (m/z 407), SO₃-HexNAc-HexNAc⁺ (m/z 487) 及び HexNAc-HexNAc-Hex⁺ (m/z 596)のイオンが検出されたことから、コアの一方の Man に SO₃-HexNAc-HexNAc が結合している糖鎖であることが確認された (Fig. 3B)。また、NeuAc⁺ (m/z 292), Hex-HexNAc⁺ (m/z 366), NeuAc-Hex⁺ (m/z 453), NeuAc-Hex-HexNAc⁺ (m/z 657)が検出されたことから、もう一方の Man に NeuAc-Gal-GlcNAc が結合していることが示唆された。以上のことから、ピーク7は硫酸基が結合したモノシアロ複合型2本鎖糖鎖で、Fig. 3B に示す糖鎖であることが明らかになった。

ピーク7以外のピークは、それぞれの TOFMS 分析、及び MS/MS 分析から、Table 1 に示すように、主に硫酸基が結合した複合型2本鎖糖鎖で、一部混成型糖鎖が含まれることが示唆された。本分析条件において、混成型糖鎖は複合型糖鎖よりも速く溶出されること、また、硫酸化は溶出時間を短縮するが、シアル酸の結合は保持時間を長くさせる傾向があることが明らかとなった。

2) rTSH の糖鎖プロファイリング

pTSHと同様な操作によりrTSHから切り出した後還元した糖鎖をグラファイトカーボンカラム-CapLC/ESI-Q/TOFMSで分析した (Fig. 2B)。その結

果、rTSHとpTSHは糖鎖分布が異なることが明らかになった。最も大きなピークであるピーク4はpTSHで検出されたピーク7とほぼ同じ時間に溶出された。しかし、マススペクトルから分子量は2224.82と算出され、pTSHのピーク7とは異なる糖鎖で、その組成は[NeuAc]₂[Hex]₂[HexNAc]₂-Coreであることが明らかになった (Fig. 4A)。

ピーク4の詳細構造はMS/MS測定により明らかになった。Fig. 4Bは、ピーク4のプロダクトイオンスペクトルである。pTSHピーク7で検出されたSO₃-HexNAc⁺ (m/z 284), HexNAc-HexNAc⁺ (m/z 407), SO₃-HexNAc-HexNAc⁺ (m/z 487)等のイオンは検出されなかったが、NeuAc⁺ (m/z 292), Hex-HexNAc⁺ (m/z 366), NeuAc-Hex-HexNAc⁺ (m/z 454), NeuAc-Hex-HexNAc⁺ (m/z 657)が検出された。これらのBイオンと、その他一連のYイオンから、ピーク4はCHO細胞産生タンパク質等によく見られるジシアロ複合型2本鎖糖鎖、BiNA₂ (Fig. 4B)であることが示唆された。

ピーク4以外のピークはTOFMS、及びMS/MSから主にフコース結合または非結合複合型2または3本鎖シアロ糖鎖であることが示唆された (Table 2)。rTSHからはpTSHに認められた硫酸化糖鎖は検出されず、混成型糖鎖の割合も低かった。

以上のように糖鎖プロファイリング法は、pTSH及びrTSHに結合している糖鎖の違いを明らかにできることを確認した。また、CapLC/ESI-Q/TOFMSは、分析の微量化、高分解能スペクトル測定、及び糖配列分析を可能にすることを確認し、糖鎖プロファイリング法の有用性の向上に役立つことがわかった。

(2) 糖ペプチドマッピング

1) r-TSH の糖ペプチドマッピング

まず、本分析条件による様々な糖ペプチドの分離を確認する目的で、r-TSHをトリプシンで短時間 (37℃, 4時間) 消化して、未消化の糖ペプチドを含む糖ペプチド断片及びペプチド断片とし、ペプチドマッピングを行った。トリプシン消化により予想

されるペプチド断片を Fig. 1 に示す. Fig. 5A は移動相として TFA を用いた場合, また, Fig. 5B は酢酸アンモニウムを用いた場合に得られたペプチド/糖ペプチドマップである. 両者は明らかに異なった分離結果を示した.

TFA を用いて得られたペプチドマップ上の各ピークについて, 実測値と cDNA から予想されるペプチドの理論値を比較することによって, ピーク 1, 2, 4-7, 9-11, 及び 13-15 は翻訳後修飾を受けていないペプチドで, Table 3 に示すようなペプチド断片であることが確認された. また, ブロードなピーク, ピーク 8, 及び 12 にも, それぞれペプチド $\alpha 8$, 及び $\beta 8-1$ が含まれていることが明らかになった (Table 3).

ピーク 3, 8, 及び 12 はマスペクトルが複雑で, 複数のグリコフォームからなる糖ペプチドであることが示唆された (Fig. 6). 単糖の加算によって得られる糖鎖の理論分子量とペプチド部分の理論分子量の和を主なイオンの実測値と照合することによって, ピーク 3 は糖ペプチド $\alpha 6$ (α 鎖の Asn52 を含む糖ペプチド), $\alpha 9$ (Asn78), 及び糖ペプチド $\alpha 9-\alpha 10$ からなるピークと帰属され, 2つの糖ペプチドが混在していることが明らかになった. また, ピーク 8 は糖ペプチド $\alpha 8-\alpha 9$ 及び $\alpha 8-\alpha 10$ (α 鎖 Asn78) であること, ピーク 12 は糖ペプチド $\beta 3$ (β 鎖の Asn23) であることが確認された.

糖鎖構造については, α 鎖 Asn52 及び Asn78 にはフコースを含まないシアロ 2 及び 3 本鎖糖鎖 (BiNA₂, BiNA₁, TriNA₃, TriNA₂) が, β 鎖 Asn23 にはフコースを含む 2, 3 及び 4 本鎖型シアロ糖鎖 (FBiNA₂, FBiNA₁, FTriNA₃, FTriNA₂, FTetraNA₄) が結合していることが示唆された (Table 4, Table 4 に表示したグリコフォームの略語の糖鎖構造は Table 9 に記す).

酢酸アンモニウムを用いた場合は, TFA を用いた場合よりも多くのピークが検出された. マスペクトルから, ピーク 1, 2, 9, 10, 12-14, 及び 18-25 は Table 5 のように帰属された. これらのペプチドは TFA 及び酢酸アンモニウムのいずれによっても溶出されたが, その溶出順序は移動相によって異なることが明らかになった. Fig. 5C は, 酢酸アンモニウム

系溶離液を用いて得られたピークの中から, 分子量の大きい分子 (m/z 1000-2400) だけを取りだして描いたマスキロマトグラムで, 主に糖ペプチドの分布を表している (糖ペプチドマップ). 各ピークのマスペクトルを Fig. 7 に示す. 各イオンの m/z 値から, Fig. 5C のピーク c1-c3, c4-c6, c7-c11 及び c12-c14 (マスペクトルはそれぞれ Fig. 7A-C, 7D-F, 7G-K 及び 7L-N) は, それぞれ糖ペプチド $\alpha 6$ (α 鎖 Asn52), 糖ペプチド $\alpha 9$ と $\alpha 9-\alpha 10$ (Asn78), 糖ペプチド $\beta 3$ (β 鎖 Asn23), 及び糖ペプチド $\alpha 8-\alpha 9$ と $\alpha 8-\alpha 10$ (α 鎖 Asn78) であることが明らかになった (Table 6).

各糖ペプチドに結合する糖鎖の構造は Table 6 に示すように推定された. 酢酸アンモニウム溶離液を用いて糖ペプチドマッピングを行った場合, TFA 溶離液を用いた場合に確認された糖鎖以外の糖鎖の存在が確認された. α 鎖 Asn52 にはフコシル 2 本鎖 (FBiNA₂), Man を含む混成型糖鎖 (Hybrid(4) NA₁) の付加が示唆された. α 鎖 Asn78 には GlcNAc 1 分子多いフコシル 2 本鎖 (FBiGN₁NA₁) が, また, β 鎖 Asn23 には FTetraLac₁NA₄, FTetraNA₃, GlcNAc 1 分子多いシアル酸結合 2 本鎖糖鎖 (FBiGN₁NA_{3,4}, FBi(1)GN₁NA_{2,3}), 及び分子量の小さい糖鎖 (FCoreGN₁NA₂) などの付加が確認された. これらは, マイナー成分であるため, TFA 移動相を用いた場合は, 主イオンの妨害によって検出されなかったが, 酢酸アンモニウム移動相を用いた場合は, 主成分と分離されたため, 検出されたものと思われる.

以上のように, 酢酸アンモニウム溶離液を用いると, 4つの糖ペプチドグループは完全に分離され, さらに各グループは糖鎖の種類により細かく分離されることが明らかになった. また, これらのピークは, 結合しているシアル酸の数の多いものから順に溶出されていることがわかった. 以上のように, TFA による分離は, ペプチド部分に依存し, 糖鎖構造の影響を受けないが, 酢酸アンモニウムによる分離は, ペプチドのみならず糖鎖構造にも依存することが確認された.

2) rTSH と pTSH の糖ペプチドマップの比較

TSH を完全に消化できる条件 (トリプシン消化

37°C, 8 時間) によって rTSH 及び pTSH を完全に断片化し, 酢酸アンモニウム溶離液を用いたペプチドマッピングを行った. Fig. 8A 及び B はそれぞれ rTSH のペプチド/糖ペプチドマップ (TIC クロマトグラム, m/z 400-2400), 及び糖ペプチドマップ (マスキロマトグラム, m/z 1000-2400) を示し, Fig. 8C 及び D は pTSH のペプチド/糖ペプチドマップ, 及び糖ペプチドマップを示す. Fig. 8A 及び 8C は類似の溶出パターンを示したが, マススペクトル上には相違が認められた.

まず, 両者の N 末端ペプチド $\alpha 1$ はほぼ同じ位置に溶出されたが, m/z 値は異なっていた. すなわち, rTSH 由来 $\alpha 1$ の m/z 値は 1374.9³⁺, 及び 2061.9²⁺であったが, pTSH 由来 $\alpha 1$ の m/z 値は 1281.2³⁺, 及び 1921.0²⁺であった. これは, rTSH と pTSH の N 末端が異なること, すなわち, pTSH では N 末端の APD がプロセッシングされていることを示している (Fig. 1).

また, rTSH の C 末端ペプチドの $\beta 12$ はマススペクトル上 m/z 871.6⁺ のイオンとして確認することができたが, pTSH のペプチドマップ上では存在を確認できなかった. これは pTSH のペプチド $\beta 12$ がプロセッシングを受けて C 末端側の一部アミノ酸を欠損しているため検出されなかったものと考えられる.

さらに, pTSH と rTSH の糖ペプチドマップを比較すると, いずれも α 鎖 Asn52, Asn78 及び β 鎖 Asn23 の順に溶出されるという点では一致しているが, 各ピークを構成しているグリコフォームは全く異なっていることが明らかになった (Table 7, 8). すなわち, pTSH の α 鎖 Asn52 には主に複合型と混成型の硫酸化糖鎖, Asn78 には複合型の硫酸化及びシアロ糖鎖, また, β 鎖 Asn23 には複合型のフコシル硫酸化及びシアロ糖鎖が結合していることが明らかになった (Table 8). 尚, 結合している糖鎖の種類については, 糖鎖プロファイリングで得られた結果とほぼ一致した.

以上のように, 酢酸アンモニウム溶離液を用いた糖ペプチドマッピングは, rTSH 及び pTSH の一次構造及び部位特異的糖鎖の不均一性の違いを識別できることが明らかになった.

D. 考察

糖タンパク質の糖鎖部分の構造解析の重要性は先に述べた通りであるが, 糖鎖構造は複雑な上, 多様性に富んでいることから, その解析方法は複雑である. いかに簡便・迅速に, わずかの試料で多くの情報を得るかが国際的な課題とされている. そこで近年, 進展が目覚ましい質量分析法を取り入れた新しい分析法が, 国内外で数多く開発されるようになってきた. 現在, 糖鎖分析に用いられるイオン化法の主流は MALDI 法と ESI 法の 2 つである. それぞれに一長一短があるが, 我々は, 糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の解析には ESI 法が適していると考えている. その第一の理由は, 糖鎖の検出感度の違いにある. MALDI 法における糖鎖の感度はペプチドに比較して著しく低い. 多くの場合, 糖鎖を揮発性物質に誘導体化することで解決が試みられているが, 誘導体化における煩雑さ, 糖鎖の修飾, 定量的には回収できないなどの点を考慮すると, この過程を省略しても糖鎖を検出できる ESI 法の方が糖鎖含有タンパク質性医薬品の解析に適していると考えられる. 第二の理由として, ESI 法は LC とオンラインで結ぶことができるという点があげられる. 糖鎖には糖配列, 分岐構造, 及び結合様式の差異に基づく多くの異性体が存在するが, 質量分析法単独ではこれらを識別することはできない. 構造の違いに基づいて LC 部分で糖鎖を分離し, MS/MS 分析することによって, 詳細構造に関する情報を得ることができると思われる. また, LC における各糖鎖の溶出時間からもその構造を推定することができる. 以上の観点から我々は LC/ESI-MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法及び糖ペプチドマッピング法を開発し, 様々な糖タンパク質の構造解析に応用してきた.

昨年度本研究課題に参加した我々は, 独自の糖鎖プロファイリング法と糖ペプチドマッピング法を, 糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析, 品質評価, 及び同等性/同質性評価に役立てることができかどうかを評価した. 起源の異なる 3 種類の EPO をモデルとして用いて糖鎖プロファイリング, 及び糖ペプチドマッピングを行い, 糖鎖構造や部位特異的糖鎖の不均一性を識別できることを確認し,

特性・品質解析，品質評価はもちろんのこと，同等性／同質性評価法としても有用であることを明らかにした。

本年度は，本分析法の有用性の拡大を目指した。まず，モデル糖タンパク質として，生物活性における糖鎖の重要性が知られ，現在，国内外で甲状腺癌の診断薬として高く期待されている TSH を選択した。検討の結果，糖鎖プロファイリング及び糖ペプチドマッピングは EPO とは異なる糖鎖を多く結合している TSH においても有用であることが確認された。さらに，医薬品の研究開発段階において，特性解析に使用できる糖タンパク質の量は限られていることから，分析の微量化と，より多くの情報を得ることの重要性を考え，CapLC/ESI-Q/TOFMS の導入を検討した。その結果，CapLC はセミマイクロ LC/MS の 20 分の 1 のサンプル量で十分な糖鎖プロファイルを与えることが確認された。また，TOFMS 分析による高分解能スペクトル測定は，四重極 MS では困難であった[Fuc]₂ と[NeuAc]の識別は勿論のこと，[Man]₃ と SO₃[HexNAc]₂をも識別できることが確認された。さらに，これまでは MS と MSMS をそれぞれ別途分析する必要があったが，Q/TOFMS を用いることによって，一度の分析で両方のデータを得ることが可能となり，サンプルと分析時間を節約できることが確認された。今後，CapLC/ESI-Q/TOFMS を糖ペプチドマッピングにも応用していくことによって，糖鎖プロファイリングと糖ペプチドマッピングの組み合わせは，特性・品質解析，品質評価，及び同等性／同質性評価において益々威力を発揮するものと期待される。

E. 結論

- 1) 糖鎖プロファイリング法，及び糖ペプチドマッピングは，エリスロポエチンとは異なる糖鎖を有する TSH の特性・品質解析，品質評価，及び同等性／同質性評価においても有用であることが確認された。
- 2) 糖鎖プロファイリングにおける CapLC/ESI-Q/TOFMS の導入は，分析の微量化，高分解能スペクトル測定，及び糖配列解析を可

能とすることから，糖鎖プロファイリング法の糖タンパク質性医薬品の特性・品質解析，品質評価，及び同等性／同質性評価法としての有用性の向上に役立つことが確認された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M., and Hayakawa, T.: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, in press
- 2) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography /mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, **30**, 113-123 (2002)
- 3) Ohta, M., Kawasaki, N., Itoh, S., and Hayakawa, T.: Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products. *Biologicals*, **30**, 235-244 (2002)
- 4) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **968**, 89-100 (2002)
- 5) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., and Hayakawa, T.: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry:

Application to recombinant human thrombomodulin. *J. Chromatogr. A*, **978**, 141-152 (2002)

- 6) 太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫: 糖鎖含有タンパク質製剤の品質評価試験法に関する研究 (IV) エリスロポエチン製剤 その4. 衛研報告, **120**, 89-97 (2002)

2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 袁 進, 太田美矢子, 石井明子, 川西 徹, 早川堯夫: nanospray LC/ESI-MS による糖タンパク質糖鎖の微量分析法の開発. 第 75 回日本生化学会大会 (2002, 10) 京都
- 2) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 川西 徹, 早川堯夫: nanospray LC/ESI-MS/MS を用いた微量糖タンパク質の構造解析. 第 75 回日本生化学会大会 (2002, 10) 京都
- 3) 蜂須賀暁子, 中島 治, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 手島玲子, 早川堯夫, 澤田純一: OBCAM (オピオイド結合性タンパク) の精製と糖鎖構造解析. 第 75 回日本生化学会大会 (2002, 10) 京都
- 4) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子, 袁 進, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MS/MS を用いた N 結合糖鎖のプロファイリング及び糖配列解析. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎
- 5) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 蜂須賀暁子, 太田美矢子, 袁 進, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: Capillary LC/MS による電気泳動法で分離された糖タンパク質の N 結合型糖鎖解析. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎

- 6) 蜂須賀暁子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 治, 手島玲子, 早川堯夫, 澤田純一: OBCAM の各糖鎖結合部位における糖鎖構造解析. 糖鎖解析. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎

- 7) Jin Yuan, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Miyako Ohta, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Monosaccharide composition analysis of glycoproteins by pyridylation and capillary LC/MS. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし