

- 126 • 製品において予測される変化を検出するための分析法の適切さ、及び試験
127 の結果
- 128 • 非臨床及び臨床上の経験に基づいた、品質特性と安全性及び有効性との関
129 係
- 130 製品の同等性／同質性を判断するにあたって、製造販売業者は、以下に例示するよう
131 事項を評価すること：
- 132 • 品質特性に関する適切な物理的・化学的性質及び生物学的性質の特性解析デ
133 ータ
- 134 • 製造工程のしかるべき段階において採取した適切なサンプル（中間体、原
135 薬、製剤など）の分析結果
- 136 • 当該タンパク質の変化・分解状況より製品間の差異の可能性に関する情報
137 を得るための、加速試験や苛酷試験データを含めた安定性データの必要性、
138 具体的には目的物質関連物質及び目的物質由来不純物における差異の可能
139 性
- 140 • 製造の恒常性を証明するために用いたロット
- 141 • これまで（単回もしくは複数の）製造工程変更を行った際にみられた品質
142 特性の変動と安全性、有効性との関係に関する知見を示す蓄積されたロッ
143 トデータ。すなわち、製造工程変更がもたらす結果について、製造経験を
144 考慮して、安全性及び有効性に関して許容できない影響が生じていないこ
145 とを確認すること。
- 146 上記のデータの評価に加えて、製造販売業者は、下記の事項も考慮すること：
- 147 • 製品の特性に影響を及ぼす製造工程中の重要管理事項：
- 148 例えば、変更された細胞培養工程によって生産された物質をしかるべく処理
149 できる下流工程の能力や、当該変更が下流工程の製品の品質に及ぼす影響な
150 ど
- 151 • 重要管理事項や工程内管理試験を含めたプロセス・コントロールの妥当
152 性：
- 153 製造工程変更後の工程のプロセス・コントロールについては、製品の品質を
154 確保・維持するための必要に応じた確認、一部修正、あるいは新たな設定
- 155 • 製剤の非臨床あるいは臨床上的特徴及び臨床適応症（2.5を参照）
- 156
- 157

158 2.2 品質に関する留意事項

159 2.2.1 分析法

- 160 製造工程変更前後の同等性／同質性評価作業に用いる試験の項目・内容は、慎重に
161 選定する必要がある。かつ、それらは当該製造工程変更によって生じる可能性のあ
162 る製品の品質特性上の変化を最大限検出できるよう最適化する必要がある。物理的
163 化学的性質や生物活性をすべて網羅するためには、同じ品質特性項目（例えば、分
164 子量、不純物、二次／三次構造などのそれぞれ）を評価する場合にも、複数の分析
165 方法を適用することが適切であろう。その場合、製造工程の変更によって生じる製

166 品の変化を最大限に検出できるように、それぞれ異なる原理に基づいた物理的・化学的／生物学的解析方法を採用して、同じ品質特性に関わる項目についてのデータを
167 収集する必要がある。
168

169 製造工程変更前の製品について設定した一連の分析方法が、分析法の限界（精度、
170 特異性、検出限界など）のため、また一部の製品では分子構造上の不均一性により
171 複雑さが増すため、製品の変化を検出することが困難な場合もありうる。したがっ
172 て、製造販売業者は以下の点について明らかにする必要がある：

- 173 ● 既存の試験法が、使用目的に対して変わらず適切であるか否か、あるいは
174 試験法を一部変更すべきか否か。例えば、製造工程の変更によって不純物
175 としての宿主細胞由来タンパク質プロファイルが変化した場合、これら不
176 純物の定量に用いた試験がその意図した目的にかなっていないことを確認す
177 べきである。新規の不純物を検出するために既存の試験を一部修正するの
178 が適当である場合もある。
- 179 ● 品質特性における変化を既存の方法では測定できないため、新たな試験を
180 追加する必要性。つまり、工程変更（例えば、新しい原材料の追加、クロ
181 マトグラフィーによる精製工程の一部変更）の結果として品質特性に変化
182 が生じた場合には、新たな分析手法を開発するのが適当であろう。その場
183 合、新たな方法としては、これまでの特性解析、あるいは既存のルーチン
184 試験（規格試験、工程管理試験等）に使用されていた分析方法に優る方法
185 を用いるのが適当であろう。

186 特性解析試験においては、必ずしもバリデートされた測定法を使用する必要はない
187 が、使用する測定法は科学的に理にかなったものであり、かつ、信頼できる結果を
188 得ることが可能な方法である必要がある。出荷試験に用いる測定法は、必要に応じて、
189 ICH ガイドライン（ICH Q2A、Q2B、Q5C、Q6B）に従ってバリデーションを
190 実施すること。

191 2.2.2 特性解析

192 ICH Q6B ガイドラインに記載されているように、適切な手法を用いた生物薬品（バ
193 イオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の特性解析には、物理的・化学
194 的性質、生物活性、免疫化学的性質（該当する場合）、純度、不純物、混入汚染物
195 質や物質が含まれる。

196 通常、承認申請時に実施した特性解析のすべてあるいはその一部（一部とした場合
197 は、その妥当性を説明する必要がある）を再度実施すれば変更前後の製品を直接比
198 較し、同等性・同質性を判断するのに必要なデータが得られる。ただし、追加的な
199 特性解析が必要な場合もある。例えば、製造工程変更後の製品の特性プロファイル
200 が非臨床試験及び臨床試験に用いた製品あるいはこれに相当する適切な物質（例え
201 ば、標準物質あるいは実生産ロット）でみられたプロファイルと異なる場合には、
202 その差異の意味を評価する必要がある。主たる臨床試験（pivotal clinical trial）に用
203 いられたロットの広範かつ綿密な特性解析は、以降の同等性／同質性評価作業にと
204 って有用な情報源となる。

205 同等性／同質性評価作業の実施にあたっては、下記の要素を重要なポイントとして
206 考慮する必要がある。

207 物理的・化学的性質

208 同等性／同質性評価作業のデザイン及び実施にあたり、ICH Q6B ガイドライン
209 に規定した目的物質（及びその変化体）の考え方を理解した上で行うこと。分子

- 210 構造上の不均一性の程度に関して、分子の複雑性を考慮すべきである。製造工程
211 変更後、当該製品において高次構造（二次構造、三次構造、四次構造）が維持さ
212 れていることの確認を試みる。高次構造に関する適切な情報が得られない場
213 合には、関連する生物活性の測定（下記の「生物活性」参照）によって高次構造
214 が維持されていることを示すことができる可能性もある。
- 215 生物活性
- 216 生物活性試験（バイオアッセイ）は、製品の品質特性を確認する際の様々な目的
217 に活用できる。例えば、特性解析、ロット分析、またときに臨床効果と関係する
218 ものとして有用であることがある。生物活性試験の限界（例えば、ばらつきの大き
219 さ）により、製造工程変更の結果として生じる変化が検出できない場合がある
220 ことを認識しておく必要がある。
- 221 生物活性試験を物理的・化学的試験の補完（例：高次構造解析の代替試験）として
222 用いる場合、適切な精度と正確性を有する生物活性試験は、製造工程変更後の製
223 品がそれ特有の高次構造を維持していることを確認するための手段となり得る。
224 しかし、物理的・化学的試験や生物活性試験が、高次構造が維持されていることを
225 確認するための方法として適切ではないと考えられる場合には、非臨床試験また
226 は臨床試験を実施するのが適切なこともある。
- 227 多様な生物活性を有する製品の製法が変更された場合、それらの生物活性を評価
228 するようにデザインされた一連の機能試験の実施を検討する必要がある。例えば、
229 あるタンパク質が、酵素活性及び受容体を介した活性を発現するという多機能性
230 に相応する領域を持っているような場合、関連する活性のすべてを評価するよう
231 考慮することが必要である。
- 232 多様な活性のうちのいずれかにおいて、臨床上の安全性や有効性との相関性が十分
233 に示されていない場合、あるいは作用機序が解明されていない場合、製造販売
234 業者は変更後の製品において非臨床あるいは臨床における作用が損なわれていな
235 いことを合理的に立証する方策を立てる必要がある。
- 236 免疫化学的性質：
- 237 免疫化学的性質が特性解析対象の一部である場合（例えば、抗体医薬品や抗体を
238 もとにした製品など）、その特異な免疫化学的性質に関して変更後の製品が同等
239 /同質であることを確認する必要がある。
- 240 純度、不純物、混入汚染物質：
- 241 目的物質に関する純度プロファイルの変化の有無を評価するためのデータが得ら
242 れるように分析手法の組み合わせを選定する必要がある。
- 243 変更後の製品の純度及び不純物プロファイルに変更前のそれとの差異が認められ
244 た場合、それが安全性及び有効性に及ぼす影響を検討する必要がある。新規不純
245 物が検出された場合、可能な範囲でこの不純物を同定し、特性を明らかにする必
246 要がある。不純物の種類と量如何で、製剤の安全性あるいは有効性へ有害な影響
247 がないことを確認するため非臨床試験あるいは臨床試験の実施が必要になるかも
248 しれない。
- 249 汚染物質の混入は厳に回避すべきである。必要に応じて、原薬や製剤の製造にお
250 ける工程内管理試験規格や処置基準値により適正に管理すべきである。新規汚染
251 物質については、品質、安全性、有効性への影響を評価、検討する必要がある。

252 2.2.3 規格及び試験方法

253 既存の原薬又は製剤の規格及び試験方法の試験項目及び分析方法だけでは、製造工程変
254 更の影響を判定するには通常は不適切であると考えられる。なぜなら、それらは製品の
255 特性を十分に解析するために選定されたものというより、むしろ日常的に品質を確認す
256 るために選定されているからである。製造販売業者は、製造工程変更後の規格及び試験
257 方法が製品の品質を確保するために適切であることを確認する必要がある。規格値/適
258 否の判定基準には合致しているが、これまでの製造実績データから逸脱する傾向を示す
259 結果が得られた場合は、製品に変化が生じている可能性が示唆されるので、新たな試験
260 や解析が必要となるかもしれない。製造工程変更前に設定された試験が変更後の製品の
261 恒常的なロット分析にもはや適切ではないことを示すデータが得られた場合は、試験の
262 変更、削除、または新たな試験の追加の必要性を考慮する必要がある。例えば、細胞培
263 養工程からウシ血清を除いた場合、関連する試験の必要性はなくなる。一方、規格値/
264 適否の判定基準を広げることは、正当な根拠がない限り一般に不適当と考えられる。製
265 造工程変更後に不純物プロファイルが変化し、新規不純物が比較的大量に存在する場合
266 は、この不純物に関する規格及び試験方法の設定が適切であることもある。製造工程変
267 更後の製品に対する規格と試験方法を検討する場合には、Q6B ガイドラインに定められ
268 ている規格及び試験方法の設定に関する一般的な原則、すなわち、バリデートされた製
269 造工程、特性解析試験、ロット分析データ、安定性データ、非臨床及び臨床データを考
270 慮することが重要である。

271 2.2.4 安定性

272 当該原薬の上流の製造工程が変更されたものも含め、たとえそれらが製造工程の些細な
273 変更でも、変更後の製品の安定性に影響する可能性がある。タンパク質の構造や純度及
274 び不純物プロファイルに変化をもたらす可能性のある製造工程変更の際には、製品の
275 安定性に及ぼす影響を評価すべきである。多くの場合、タンパク質は、緩衝液の組成、
276 処理及び保持条件、有機溶媒の使用などの変更による影響を受けやすい。さらに、安定
277 性試験によって、特性解析試験では容易に検出できなかったわずかな差異を検出できる
278 可能性もある。例えば、微量のタンパク質分解酵素の存在は、製品の長時間にわたる分
279 解によってのみ検出される場合がある。場合によっては、包装容器から溶出した二価イ
280 オンが、製造工程変更前の製品の安定性試験では検出されない微量のタンパク質分解酵
281 素を活性化し、製品の安定性プロファイルを変化させることもありうる。したがって、
282 一般的に、製造工程変更の影響を受ける可能性のある製品に関しては、製造工程変更
283 に伴い、適宜実保存時間安定性試験を開始すべきである。

284 加速及び苛酷試験は、変更前後の製品の分解プロファイルに関する情報を提供し、これ
285 により両者を直接的に比較するための有用な手段となる。このようにして得られた結果
286 は、さらに追加検討が必要となるような製品の変化を示唆することもある。またそれと
287 同時に、意図しない変化を排除するために製造工程及び保存中において管理すべき項目
288 を追加設定する必要性に関する判断材料を与えられたいと考えられる。選定した保存条件及び
289 管理項目が妥当であることを確認するために適切な検討を行う必要がある。

290 製造工程変更前後の比較を行うためのデータ取得を目的とした安定性試験の条件設定に
291 ついては、ICH Q5C 及び Q1A(R)ガイドラインを参照すること。

292 2.3 製造工程に関する留意事項

293 基準を満たす製品を恒常的に製造するためには、各種工程管理を含め製造工程を厳密に
294 規定し、その一定性を保つことが必要である。いかなる製造工程変更であっても、その
295 影響を評価するための方策は、当該工程、製品、製造工程に関して製造販売業者が有す
296 る知見及び経験、開発過程で得られたデータによって異なる。製造販売業者は、製造工

- 297 程変更後の工程管理が変更前の工程管理と比較して同等以上に効果的に製品の品質を保
298 証できることを確認する必要がある。
- 299 計画した製造工程変更がその下流工程へ与える影響、及びそれらの各工程に関連する品
300 質パラメータへ与える影響について（例えば、規格値／適否の判定基準、工程内規格、
301 工程内管理試験、操作の限界、そして場合によってはバリデーション／プロセス評価と
302 の関係で）慎重に検討することは極めて重要である。こうした検討は、どの試験を同等
303 性／同質性評価作業において実施すべきか、どの工程内管理試験、出荷試験時の規格値
304 ／適否の判定基準、あるいは分析方法を再評価すべきか、さらにどの工程が製造工程変
305 更により影響をうけないかを明らかにするのに役立つ。工程中の中間体の分析から製品
306 に生じる変化の可能性が示唆され、この変化を検出するために既存の試験方法が適切で
307 あるか評価しなければならないこともある。製造工程中の一部の工程を上記検討の対象
308 外とする場合には、その妥当性を示す必要がある。
- 309 製造工程の変更に伴い、関連する工程管理を再度設定し直す際には、新たな工程管理の
310 下での変更前後の製品が同等／同質であることを確認する必要がある。同等／同質であ
311 ることを示すためには、例えば、特定の間体が同等／同質であることを立証したり、
312 変更後の工程が製造工程由来不純物及び目的物質由来不純物（製造工程変更によって新
313 たらに生成したものも含め）を適切なレベルまで除去する能力を持つことを立証したりす
314 ることが有用であることが多い。承認済みの製品についての製造工程変更の妥当性は、
315 通常、実生産スケールで製造されたロットで得られたデータにより示される。
- 316 製造工程評価に際しては、当該工程や企図する変更の重要度、変更の箇所及び他の工程
317 への影響度、変更の種類と程度などの要素を考慮すべきである。この評価に役立つ情報
318 は、通常、いくつかの情報源から入手できる。そのようなものとしては、工程を設定し
319 ていく過程で得た知見、小規模でのプロセス評価／バリデーション試験、過去の製造工
320 程変更の経験、同様の操作を行う設備での経験、類似の製品での類似の製造工程変更、
321 文献などが挙げられる。外部からの情報もある程度は有用であるが、それは、製造工程
322 変更において評価対象となっている特定の製造工程及び特定の製品に関する情報に限
323 ったことである。
- 324 製造工程を変更した場合、（新しい管理項目もすべて含めて）各工程管理の連携により
325 変更後の工程も同等／同質の製品を製造できることを保証する必要がある。変更後の工
326 程は、必要に応じて再度プロセス評価やバリデーションを実施する必要がある。重要管
327 理事項及び工程内管理試験を含む工程内管理は、変更後の製造工程が十分に管理されて
328 おり、製品の品質が確保・維持されていることを保証するものである必要がある。通常、
329 それ以降（下流）の各工程の性能に影響が及ぶことがない場合や、それ以降の工程から
330 得られる中間体の品質に影響が及ぶことを示す証拠がないような変更の際には、再プ
331 ロセス評価／再バリデーションは、当該工程のみを対象とするものでよいと考えられる。
332 当該変更が二つ以上の工程に影響を及ぼすと考えられる場合には、その製造工程変更
333 に関してさらに広範囲な分析を実施し、それを受けたバリデーションを行うのが適切であ
334 る。
- 335 変更後の製造工程についての管理状態は下記の事項により示すことができる。ただし、
336 下記に限定されるわけではない：
- 337 • 原料、原材料、出発原料、試薬についての変更後の規格及び試験方法の設
338 定
- 339 • 変更後の細胞バンク及び製造終了時の細胞を用いた適切なバイオバーデン
340 やウイルス安全性試験
- 341 • 外来性感染性物質の除去（ウイルスクリアランス）

- 342 • 目的物質由来不純物あるいは宿主細胞由来残存 DNA 及びタンパク質などの
343 製造工程由来不純物の除去
- 344 • 純度レベルの維持
- 345 既承認の製品の製造工程変更の際しても、変更後に製造された適切な数のロットについ
346 て分析して、製造工程の恒常性を立証する必要がある。
- 347 製造工程変更及び管理方策の分析を円滑に進めるため、製造販売業者は変更前及び変更
348 後の製造工程をそれぞれ集約し、製造工程及び管理試験における変更内容が明確にわか
349 るように対照併記した説明書を作成する必要がある。

350 2.4 開発段階における製造工程変更時の同等性／同質性

351 開発段階においては、製剤の品質、安全性、有効性に影響を及ぼす可能性のある製造工
352 程の様々な変更が行われることが予想される。同等性／同質性評価作業は、通常、製造
353 工程変更前の製品を用いて得られた非臨床試験データ及び臨床試験データを変更後の製
354 品に転用し、その後の開発を円滑に進め、最終的には、製品の承認取得に役立たせるた
355 めに実施する。開発中の製品の同等性／同質性検討作業に影響を及ぼす要素としては、
356 製品開発のどの段階における製造工程変更であるか、バリデートされた分析手法がどの
357 程度利用できるのか、製品や製造工程に関する知見がどの程度あるかなどが挙げられる
358 が、これらの要素の影響度や考慮すべき度合いは、製造販売業者が当該工程に対してど
359 の程度の経験を有しているかにより左右される。

360 非臨床試験実施前の開発段階において製造工程変更が行われる場合には、一般的に同等
361 性／同質性評価の問題は生じない。なぜなら、引き続き開発を進める上で、変更後の製
362 品を用いた非臨床試験及び臨床試験が実施されるからである。非臨床試験及び臨床試験
363 の初期段階における製造工程変更では、製造工程変更前後の同等性／同質性試験は通常、
364 承認済み製品に対するものほど徹底したものではない。知見及び情報が蓄積され、分析
365 方法の開発が進むにつれ、一般に同等性／同質性評価作業はこれらの情報を活用してよ
366 り幅広なものになってゆく。開発後期に製造工程変更を行ったが、製品の承認取得へ向
367 けた新たな臨床試験の実施計画がないという場合には、製造工程変更前後の同等性／同
368 質性評価作業は、承認済み製品について製造工程変更を実施する場合と同程度に広範か
369 つ徹底的に実施される必要がある。品質特性に関する同等性／同質性試験の結果によ
370 っては、追加の非臨床試験あるいは臨床試験が必要になる場合もある。

371 開発段階において同等性／同質性評価作業を行うにあたっては、適切な評価手法を使用
372 する必要がある。開発段階では、分析法は必ずしもバリデートされていないかもしれな
373 いが、試験法及びデータは常に科学的に妥当なものであるとともに、信頼性及び再現性
374 のあるものでなければならない。開発初期では分析法に限界があるため、物理的・化学
375 的性質や生物学的性質に関する試験だけでは同等性／同質性を立証するには不十分かも
376 しれない。その場合、ブリッジング非臨床試験や臨床試験の実施が必要とされる場合も
377 ある。

378 2.5 非臨床試験及び臨床試験に関する留意事項

379 2.5.1 非臨床試験及び臨床試験を計画する際考慮すべき要素

380 製造工程変更前後の製品の同等性／同質性は、製造販売業者が本文書に概説した品質に
381 関する検討により保証できるのであれば、その検討のみに基づいて確定できる（2.2 参
382 照）。品質に関するデータにより同等性／同質性が確定できない場合、非臨床あるいは
383 臨床試験を追加することにより立証することが望ましい。同等性／同質性評価作業のた
384 めの非臨床試験や臨床試験の程度及び内容については、各種の要素を考慮してケース
385 バイケースで定められる。その際考慮の対象となる要素には以下のものがある。

386 品質に関する知見

- 387
- 388
- 389
- 390
- 製剤： 目的物質関連物質、不純物プロファイル、安定性及び添加物を含めた品質特性に関する製造工程変更前後の製品における差異の種類、内容、程度。例えば、新たな不純物については、その存在や許容量の是非に関する毒性試験が必要な場合もある。
 - 関連する工程内管理試験の結果を含めた新規製造工程に関するプロセス評価/バリデーション試験の結果
 - 同等性/同質性評価試験に用いた試験法の普遍性（有用性、入手可能性を含めて）、試験法としての能力・適格性と限界

395

396 製品の種類・特性と知見のレベル

- 397
- 398
- 399
- 400
- 401
- 402
- 403
- 不均一性や高次構造を含む製品の複雑さ： 理化学的試験法やインビトロの生物活性試験では構造や機能における差異をすべて検出できるとは限らない。
 - 構造活性相関や品質特性と安全性・有効性の関連性の強さ
 - 医薬品としてのタンパク質と内因性のタンパク質の関係及び免疫原性への影響/結果
 - 作用機序（未知か既知か、単一活性部位か複数の活性部位か）

404 製品に関する既存の非臨床及び臨床データ、臨床使用関連事項、医薬品の種類別

- 405
- 406
- 407
- 408
- 409
- 410
- 411
- 412
- 413
- 414
- 415
- 416
- 417
- 418
- 419
- 適応症/対象患者グループ： 製品間の差異に起因する影響は対象患者グループ間で変わり得る（例、意図しない免疫原性のリスク）。適応症毎に別々に結果を考慮することが適切かもしれない。
 - 用法・用量、投与経路等： 免疫原性のような、製品間の差異によりもたらされるなんらかの影響の結果としてのリスクは、短期間の投与に比較して長期間の投与で一段と高くなるであろう。皮下投与は静脈投与に比較して免疫原性の発現頻度を高める可能性がある。
 - 治療域/用量-反応曲線： 製品の治療域が広い場合と狭い場合とでは、製造工程変更前後の製品における変化が及ぼす影響が異なる可能性がある。急勾配あるいはベル型の用量-反応曲線を持つ製品の安全性、有効性は薬物動態やレセプター結合のマイナーな変化によって影響を受ける可能性がある。
 - 過去の経験（例えば免疫原性、安全性）： 既存の製品あるいは同じ医薬品分類に属する他の製品での経験、とりわけ、まれな有害作用、例えば免疫原性発現状況に関する経験などは参考になる。
 - 薬物動態と薬力学(PK/PD)の関係、分布、クリアランス

420

421 2.5.2 試験の種類

422 本文書で非臨床試験、臨床試験として言及する場合は、状況に応じて、薬物動態(PK)試験、薬力学(PD)試験、薬物動態/薬力学(PK/PD)試験、臨床有効性試験、各種安全性試験、免疫原性試験、医薬品安全性監視試験などを含んでいる。これらの試験の目的は、製造工程変更前後の製品の同等性/同質性評価に寄与することである。これらの試験が、直接的な同等性/同質性評価試験として適切な場合もある。

423

424

425

426

427

428 3.0 用語集

429 同等性／同質性評価ブリッジング試験：

430 現行の製造工程により製造された製剤で得られている既存のデータを、製造工程変更後
431 の工程により製造される製剤に利用できるようにするための非臨床試験あるいは臨床試
432 験。

433 同等／同質：

434 製造工程変更前後の製品が品質特性において高い類似性を有し、製剤の免疫原性を含む
435 安全性、あるいは有効性に有害な影響が生じていないことをいう。これは、製品の品質
436 特性の分析に基づき判断できることが多いが、非臨床試験や臨床試験のデータを勘案す
437 る必要がある場合もある。

438 同等性／同質性評価作業：

439 試験の設計、試験の実施、データの評価も含めて、製品が同等／同質であるか否かを検
440 討するための一連の作業。

441 品質特性：

442 製品の品質を現すのに相応しいものとして選択された分子特性又は製品特性であり、当
443 該製品の同一性、純度、力価、安定性及び外来性感感染性物質の安全性などを併せて規定
444 されるものである。規格及び試験方法で評価されるのは、品質特性から部分的に選択さ
445 れた一連の項目である。

446 4.0 参考文献

447 ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全
448 性評価 (Q5A)

449 組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析
450 (Q5B)

451 生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品／生物起源由来製品) の安定性試験 (Q5C)

452 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の
453 由来、調製及び特性解析 (Q5D)

454 生物薬品 (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
455 の設定 (Q6B)

456 原薬 GMP のガイドライン (Q7A)

457 分析法バリデーションに関するテキスト (Q2A)

458 分析法バリデーションに関するテキスト (実施方法) (Q2B)

459 コモン・テクニカル・ドキュメント (国際共通化資料) (M4Q)

460 安定性試験ガイドライン (Q1AR)

461 バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価 (S6)

462 臨床試験のための統計的原則 (E9)

463 臨床試験における対照群の選択とそれに関連する諸問題 (E10)

Art LeBlanc, MS, President, SICOR Pharmaceuticals, Inc
Robert L. Garnick, Ph.D., Senior Vice President, Regulatory Affairs, Quality, and Compliance, Genentech, Inc.
John Dingerdissen., Vice President, Worldwide Manufacturing, Global Biologics Supply Chain, Centocor, Inc.
Suzanne Sensabaugh, MS, MBA., VP, Regulatory Affairs and Quality, SICOR, Inc., Biotechnology Division
Mathias Hukkelhoven, Ph.D., Senior Vice President, Global Head of Drug Regulatory Affairs, Novartis
Pharmaceuticals Corp.
Robert Adamson, Ph.D., Vice President, BioPharmaceutical Process Development, Wyeth BioPharma

12:30 **Lunch** (on your own)

1:30 **Panel # 2 - Characterization Issues**
Panel Lead: Barry Cherney, Ph.D., CDER

Panel Members:

Lawrence Yu, Ph.D., CDER
Steven Moore, Ph.D., CDER
Andrew Chang, Ph.D., CBER
William Egan, Ph.D., CBER

Speakers: (90 minutes)

Robert Zeid , Principal Consultant, TLI Development
Arnon Chait, Ph.D., President, ANALIZA, Inc.
Christopher J. Holloway, Ph.D., Dr.rer.hum.biol.habil., Group Director of Regulatory Affairs and CSO, ERA
Consulting Group
Andy Jones, Ph.D., Staff Scientist, Formulation and Analytical Development, Genentech, Inc.
Vytautas Naktinis, Ph.D., Principal Consultant, PROBIOS p.e (20 minutes)
Walter W. Hauck, Ph.D., Statistical Consultant, USP, Professor, Thomas Jefferson University
Jacob R. Hartman, Ph.D., Director, Development, BioTechnology General (Israel)Ltd.
Charles Diliberti, Vice President, Scientific Affairs, Barr Laboratories Inc.

3:30 **Break**

3:45 **Panel # 3 - Potency and Surrogates for Efficacy and Safety**

Panel Lead: Janice Brown, M.S, CDER

Panel Members:

David Orloff, M.D., CDER
David Green, Ph.D., CDER
Patrick Swann, Ph.D., CDER
Drusilla Burns, Ph.D., CBER

Speakers: (40 minutes)

Linda Fryklund, Ph.D., Director, Medical and Scientific Affairs, Pfizer AB Sweden (30 minutes)
Patricia C. Weber, Ph.D., Chief Scientific Officer, ExSAR Corp.

4:55 **Closing Remarks**

Ajaz Hussain, Ph.D., Deputy Director,
Office of Pharmaceutical Science, CDER

5:00 **End of first day**

**Scientific Considerations Related to
Developing Follow-on Protein Products
Public Workshop
September 14-15, 2004**

AGENDA

Day 2 - September 15, 2004

8:00 **Introduction to Day 2**

Ajaz Hussain, Ph.D., Deputy Director,
Office of Pharmaceutical Science, CDER

8:15 **Panel # 4 - Immunogenicity Issues**
Panel Lead: Amy Rosenberg, M.D., CDER
Panel Members:
Dena Hixon, M.D., CDER
Elizabeth Shores, Ph.D., CDER
Basil Golding, M.D., CBER
Marjorie Shapiro, Ph.D., CDER
Alexandra Worobec, M.D., CDER

Speakers: (40 minutes)

Johanna Griffin, Ph.D., President, Procognia Inc.
Fredric G. Bader, Ph.D., Vice President, Process Sciences, Global Biologics Supply Chain, Centocor, Inc.
Terry Gerrard, Ph.D., President, TLG Consulting Inc.
Kenneth B. Seamon, Ph.D., Vice President, Global Regulatory Affairs, Amgen Inc.

9:15 **Break**

9:30 **Panel # 5 - Preclinical and Clinical Issues**
Panel Lead: Steven Kozlowski, M.D., CDER
Panel Members:
Marc Walton, M.D., CDER
Jeri El Hage, Ph.D., CDER
Dorothy Scott, M.D., CBER
David Green, Ph.D. CDER
Mercedes Serabian, M.S., DABT, CBER

Speakers: (50 minutes)

James D. Green, Ph.D., DABT, Senior Vice President, Preclinical and Clinical Development Sciences, Biogen Idec,
Hal Barron, M.D. F.A.C.C., Senior Vice President, Development, Genentech, Inc.
Don Baker, Ph.D., Vice President, Post Market Quality Management, Baxter BioSciences
Murray P. Ducharme, PharmD, FCCP, FCP, Vice President, PK/PD, MDS Pharma Services
John Greenwood, Director of Regulatory Affairs, GeneMedix plc

11:30

Ajaz Hussain, Ph.D., Deputy Director,
Office of Pharmaceutical Science, CDER

12:00 **End of Day 2**



MARRIOTT CRYSTAL GATEWAY • 1700 JEFFERSON DAVIS HIGHWAY • ARLINGTON, VA, USA

Co-sponsored by



ARLINGTON, VA FEBRUARY 14-16, 2005



FDA/DIA Scientific Workshop on Follow-on Protein Pharmaceuticals

COMMITTEE CHAIRPERSONS

CHI WAN CHEN, PHD, Deputy Director,
Office of New Drug Chemistry, CDER/FDA

CHRISTOPHER JONECKIS, PHD, Senior
Advisor to the Director, CDER/FDA

KEITH WEBBER, PHD, Acting Director,
Office of Biotechnology Products, CDER/FDA

PLANNING COMMITTEE MEMBERS - FDA

JANICE BROWN, MS, Chemistry Reviewer,
Office of New Drug Chemistry, CDER/FDA

BARRY CHERNEY, PHD, Deputy Director,
Division of Therapeutic Proteins, Office of Biotechnology
Products, CDER/FDA

KATHLEEN A. CLOUSE, PHD, Acting Deputy
Director, Office of Biotechnology Products, CDER/FDA

BLAIR FRASER, PHD, Deputy Division Director,
Office of New Drug Chemistry, CDER/FDA

DENA HIXON, MD, Associate Director for
Medical Affairs, Office of Generic Drugs, CDER/FDA

FRANK HOLCOMBE, PHD, Associate Director
for Chemistry, Office of Generic Drugs, CDER/FDA

STEVE KOZLOWSKI, MD, Acting Director,
Division of Monoclonal Antibodies, Office of
Biotechnology Products, CDER/FDA

STEPHEN MOORE, PHD, Chemistry Team
Leader, Office of New Drug Chemistry, CDER/FDA

AMY ROSENBERG, MD, Director, Division of
Therapeutic Proteins, Office of Biotechnology Products,
CDER/FDA

MARILYN WELSCHENBACH, PHD,
Senior Program Management Officer, Office of
Pharmaceutical Science, CDER/FDA

PLANNING COMMITTEE MEMBERS - INDUSTRY

THERESA L. GERRARD, PHD, President,
TLG Consulting, Inc.

GORDON JOHNSTON, RPH, MS, Vice
President, Regulatory Affairs, Generic Pharmaceutical
Association

ANTHONY S. LUBINIECKI, ScD, Vice President,
Technology Transfer & Project Planning, Centocor

GENE MURANO, PHD, Vice President, Regulatory
Affairs, Genentech, Inc.

SARA RADCLIFFE, MPH, Managing Director,
Scientific and Regulatory Affairs, Biotechnology Industry
Organization

MARIE A. VODICKA, PHD, Senior Director,
Biologics & Biotechnology, Pharmaceutical Research and
Manufacturers of America

WORKSHOP SUMMARY

This workshop will examine the scientific basis (including chemistry, manufacturing, and controls (CMC), pharmacology-toxicology, clinical pharmacology, and clinical aspects) for the assessment of the quality, safety, and efficacy of follow-on protein products.

The focus will be on recombinant and natural protein products that are directly administered to humans. Synthetic peptides, *in vitro* diagnostics, and devices will not be covered.

Plenary sessions will present scientific and technical issues and provide the framework for discussions in the breakout sessions. Breakout sessions will be focused on identifying risks and recommending the appropriate scientific information needed for evaluating follow-on protein products.

FDA's findings from this workshop will contribute to the scientific foundation for the development of regulatory guidance.

GOALS & OBJECTIVES

At the conclusion of this meeting, participants should be able to:

- ▶ Evaluate relevant terminology, e.g., interchangeability/noninterchangeability, sameness, similarity, and comparability, as it applies to protein products
- ▶ Describe the types of data needed to ensure the safety and efficacy of follow-on protein products, including:
 - chemistry, manufacturing, and controls information
 - preclinical and clinical studies, and conditions under which such studies are needed

TARGET AUDIENCE

This program is designed for:

- ▶ professionals working in pharmacology/toxicology, clinical pharmacology, and safety
- ▶ individuals conducting clinical research
- ▶ pharmaceutical manufacturers
- ▶ regulatory authorities
- ▶ FDA regulators

Interested members of the public not specified above are also encouraged to attend.

REGISTER ONLINE! www.diahome.org Monitor the website for the most current details.

DIA, 800 Enterprise Road, Suite 200, Horsham, PA 19044-3595, USA tel: +1 215 442 6100 fax: +1 215 442 6199 email: dia@diahome.org

Accreditation and Credit Designation

The Drug Information Association is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education to provide continuing medical education for physicians. The Drug Information Association designates this educational activity for a maximum of 16.75 category 1 credits toward the AMA Physician's Recognition Award. Each physician should claim only those credits that he/she actually spent in the activity.



The Drug Information Association and the Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, are accredited by the Accreditation Council for Pharmacy Education as providers of continuing pharmacy education. This program is designated for 16.75 contact hours or 1.675 continuing education units (CEUs). 286-601-05-019-L04



The Drug Information Association (DIA) has been reviewed and approved as an Authorized Provider by the International Association for Continuing Education and Training (IACET), 1620 I Street, NW, Suite 615, Washington, DC 20006. The DIA has awarded up to 1.7 continuing education units (CEUs) to participants who successfully complete this program.

If you would like to receive a statement of credit, you must attend the program and return the credit request and evaluation forms to the DIA. Statements of credit will be issued within 30 days of receipt of these forms.

Disclosure Policy: It is Drug Information Association policy that all faculty participating in continuing education activities must disclose to the program audience (1) any real or apparent conflict(s) of interest related to the content of their presentation and (2) discussions of unlabeled or unapproved uses of drugs or medical devices. Faculty disclosure will be included in the course materials.

Learning Objectives: At the conclusion of this meeting, participants should be able to:

- ▶ Evaluate relevant terminology, e.g., interchangeability/noninterchangeability, sameness, similarity, and comparability, as it applies to protein products
- ▶ Describe the types of data needed to ensure the safety and efficacy of follow-on protein products, including: chemistry, manufacturing, and controls information; preclinical and clinical studies, and conditions under which such studies are needed

This is a **preliminary program**. Speakers and agenda are subject to change without notice.

Updates will be available on DIA's website. Please monitor www.diahome.org for the most current information.

SUNDAY • FEBRUARY 13

6:00-8:00 PM REGISTRATION

MONDAY • FEBRUARY 14

7:00-8:00 AM REGISTRATION AND CONTINENTAL BREAKFAST

8:00-8:10 AM WELCOME AND OPENING REMARKS
Keith Webber, PhD
Acting Director, Office of Biotechnology Products
 CDER/FDA

8:10-8:30 AM KEYNOTE ADDRESS
Charles Cooney, PhD
Professor of Chemical and Biochemical Engineering
Co-Director, Sloan Program on the Pharmaceutical Industry
Massachusetts Institute of Technology
Acting Chair, CDER Advisory Committee for Pharmaceutical Science

8:30-9:00 AM BACKGROUND FOR WORKSHOP: TERMINOLOGY AND CONCEPTS

Steve Kozlowski, MD
Acting Director, Division of Monoclonal Antibodies,
Office of Biotechnology Products, CDER/FDA

9:00-10:30 AM SESSION 1

APPROACHES TO PRODUCT QUALITY ISSUES: PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION

CHAIRPERSON

Blair Fraser, PhD
Deputy Division Director, Office of New Drug Chemistry, CDER/FDA

SPEAKERS

William Hancock, PhD
Bradstreet Chair, BARNETT INSTITUTE OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS

Ram Sasisekharan, PhD
Professor of Biological Engineering, MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

Joerg Windisch, PhD
Global Head, Technical Development, NOVARTIS

10:30-11:00 AM REFRESHMENT BREAK

11:00 AM-12:30 PM SESSION 2

APPROACHES TO PHARMACOKINETICS/ PHARMACODYNAMICS (PK/PD) STUDIES

CHAIRPERSON

Dena Hixon, MD
Associate Director for Medical Affairs, Office of Generic Drugs, CDER/FDA

Statements made by speakers are their own opinion and not necessarily that of the organization they represent, or that of the Drug Information Association. Speakers and agenda are subject to change without notice. Audiovisual taping of any DIA workshop is prohibited without prior written consent from DIA.

SPEAKERS

- Hae-Young Ahn, PhD**
Pharmacologist, CDER/FDA
- Raja B. Velagapudi, PhD**
Director, Scientific Affairs, BARR LABORATORIES, INC.
- Mark Rogge, PhD**
Vice President of Development, ZYMOGENETICS

12:30-1:30 PM LUNCHEON

1:30-3:00 PM SESSION 3
BREAKOUT SESSIONS

The four concurrent breakout sessions listed below will be offered from 1:30-3:00 pm and again from 3:15-4:45 pm. This will enable participants to choose their preferred session topic in each time block.

■ BREAKOUT SESSION A

PHYSICAL CHEMICAL CHARACTERIZATION AND IMPURITIES

- ▶ Which product attributes should be evaluated?
- ▶ What are the capabilities and limitations of the available analytical tools to evaluate those identified product attributes?
- ▶ What are the appropriate standard(s) for the comparison of those identified product attributes.

MODERATORS

- Barry Cherney, PhD**
Deputy Director, Division of Therapeutic Proteins, Office of Biotechnology Products, CDER/FDA
- Stephen Moore, PhD**
Chemistry Team Leader, Office of New Drug Chemistry, CDER/FDA
- Andrew Chang, PhD**
Acting Deputy Director, Division of Hematology, CDER/FDA
- Charles Diliberti, PhD**
Vice President, Scientific Affairs, BARR LABORATORIES, INC.
- Reed Harris, PhD**
Director, Late Stages Analytical Development, GENENTECH, INC.

■ BREAKOUT SESSION B

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND IMPURITIES

- ▶ How can the clinical relevance of functional biological characterization studies (e.g., animal, cellular, binding assay) be established?
 - Under what circumstances can biological characterization studies be predictive of efficacy in humans and can this be used to justify limited clinical efficacy studies?
- ▶ What are the appropriate standard(s) for the comparison of biological activities?
- ▶ Based on biological characteristics, how can product-related impurities be distinguished from product-related substances and from the desired product? If a product-related substance can be identified/distinguished, can the acceptance criteria be wider for the follow-on product than that observed for the reference product.

MODERATORS

- Janice Brown, MS**
Chemistry Reviewer, Office of New Drug Chemistry, CDER/FDA
- Steve Kozlowski, MD**
Acting Director, Division of Monoclonal Antibodies, Office of Biotechnology Products, CDER/FDA
- Christopher Joneckis, PhD**
Senior Advisor to the Director, CDER/FDA
- Robin Thorpe, PhD**
Head, Division of Immunology and Endocrinology, NIBSC
- Inger Mollerup, PhD**
Vice President, NOVO NORDISK A/S, DENMARK

■ BREAKOUT SESSION C

PHARMACOLOGY-TOXICOLOGY STUDIES

- ▶ In which situation would animal studies be needed and why?

MODERATORS

- Jeri El-Hage, PhD**
Supervisory Pharmacologist, Division of Metabolic and Endocrine Drugs, CDER/FDA
- Mercedes Serabian, MS**
Toxicologist, CDER/FDA
- Joy Cavagnaro, PhD**
President, ACCESS BIO
- James D. Green, PhD, DABT**
Senior Vice President of Preclinical and Clinical Development Sciences, BIOGEN IDEC, INC.
- Andrea Weir, PhD**
Pharmacologist, CDER/FDA

■ BREAKOUT SESSION D

CLINICAL PHARMACOLOGY STUDIES

- ▶ What information does a PK study provide?
- ▶ What additional information of value would a PD study provide?
- ▶ What factors affect study design and establishment of acceptable limits for PK/PD comparison?

MODERATORS

- Dena Hixon, MD**
Associate Director for Medical Affairs, Office of Generic Drugs, CDER/FDA
- Hae-Young Ahn, PhD**
Pharmacologist, CDER/FDA
- Hong Zhao, PhD**
Pharmacology Reviewer, CDER/FDA
- Dave Parkinson, MD**
Vice President, Global Development Head, AMGEN INC.
- William Schwieterman, MD**
Founder, TEKGENICS, INC.

3:00-3:30 PM BREAKFAST SESSION

3:30-5:00 PM **SESSION 4**
BREAKOUT SESSIONS

The four concurrent breakout sessions listed previously will be repeated in this time block.

5:00-6:00 PM **RECEPTION**

TUESDAY • FEBRUARY 15

7:00-8:00 AM **REGISTRATION AND**
CONTINENTAL BREAKFAST

8:00-9:30 AM **OPENING REMARKS: REPORTS OF DAY 1**
BREAKOUT SESSIONS A, B AND C

Christopher Joneckis, PhD
Senior Advisor to the Director, CBER/FDA

9:30-10:45 AM **SESSION 5**

APPROACHES TO IMMUNOGENICITY STUDIES

CHAIRPERSON

Amy Rosenberg, MD
Director, Division of Therapeutic Proteins, Office of Biotechnology Products, CDER/FDA

SPEAKERS

Robin Thorpe, PhD
Head, Division of Immunology and Endocrinology, NIBSC
Huib Schellekens
UTRECHT UNIVERSITY, NETHERLANDS

10:45-11:15 AM **REFRESHMENT BREAK**

11:15-12:30 PM **SESSION 6**

APPROACHES TO CLINICAL SAFETY AND EFFICACY STUDIES

CHAIRPERSON

David Orloff, MD
Director, Division of Metabolic and Endocrine Drug Products, CDER/FDA

SPEAKERS

Jay P. Siegel, MD
President, Research & Development, CENTOCOR, INC.
Carole Ben-Maimon, MD
President and COO, DURAMED RESEARCH INC.

12:30-1:30 PM **LUNCHEON**

1:30-3:00 PM **SESSION 7**
BREAKOUT SESSIONS

The two concurrent breakout sessions listed below will be offered from 1:30-3:00 pm and again from 3:30-5:00 pm. This will enable participants to choose their preferred session topic in each time block.

■ BREAKOUT SESSION E

IMMUNOGENICITY STUDIES

- ▶ Can we define specific circumstances in which animal studies would be useful for predicting immunogenicity (including hypersensitivity) of protein therapeutics in humans? Are immunogenicity studies in animals useful in determining whether there are meaningful differences between two similar products?
- ▶ Follow on products must be similar to innovator products in terms of product safety, including immunogenicity. What clinical immunogenicity studies should be performed pre-approval and what studies should be done post-approval to ensure the similarity of the follow on to innovator in terms of immunogenicity?
 - What trial designs are appropriate for assessing immunogenicity of the follow on and how does risk, as defined below, factor into such designs?
 - For high risk products (i.e., life saving products, or products with endogenous counterparts that mediate unique biological functions?
 - For lower risk products (i.e., ameliorative products or products with endogenous counterparts that are biologically redundant)?
 - For products with a high probability of inducing hypersensitivity responses (i.e., foreign proteins)?

MODERATORS

Amy Rosenberg, MD
Director, Division of Therapeutic Proteins, Office of Biotechnology Products, CDER/FDA
Alexandra Worobec, MD
Medical Officer, CDER/FDA
Jay Lozier, MD, PhD
Senior Staff Fellow, CBER/FDA
Kathryn Stein, PhD
Vice President, Product Development and Regulatory Affairs, MACROGENICS
Theresa L. Gerrard, PhD
President, TLG CONSULTING, INC.

■ BREAKOUT SESSION F

CLINICAL SAFETY AND EFFICACY STUDIES

- ▶ In which situation would safety and/or clinical studies be needed and why?
- ▶ What factors should be considered in designing appropriate/relevant clinical studies?
- ▶ What concerns can be addressed via postmarketing surveillance as part of risk management?

MODERATORS

David Orloff, MD
Director, Division of Metabolic and Endocrine Drug Products, CDER/FDA
Marc Walton, MD
Director, Division of Therapeutic Internal Medicine Products, CBER/FDA

■ **BREAKOUT SESSION F** *continued*

Dorothy Scott, MD
Branch Chief, Laboratory of Plasma Derivatives, Division of Hematology, CBER/FDA

Dawn Viveash
Vice President, Regulatory Affairs, AMGEN INC.

Yaffit Stark, PhD
Senior Director, Global Clinical Research, TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.

3:00-3:30 PM REFRESHMENT BREAK

3:30-5:00 PM SESSION 8
BREAKOUT SESSIONS

The two concurrent breakout sessions listed previously will be repeated in this time block.

WEDNESDAY • FEBRUARY 16

7:30-8:30 AM REGISTRATION AND
CONTINENTAL BREAKFAST

8:30-10:00 AM OPENING REMARKS, REPORTS OF DAY 2
BREAKOUT SESSIONS D, E AND F
Chi-Wan Chen, PhD
*Deputy Director, Office of New Drug Chemistry,
CDER/FDA*

10:00-10:30 AM REFRESHMENT BREAK

10:30-10:45 AM BIO/PHARMA PERSPECTIVE

10:45-11:00 AM GEHA PERSPECTIVE

11:00-11:30 AM SUMMATION AND NEXT STEPS
Keith Webber, PhD
*Acting Director, Office of Biotechnology Products,
CDER/FDA*

11:30 AM-12:00 PM CLOSING REMARKS
Ajaz Hussain, PhD
*Deputy Director Office of Pharmaceutical Science,
CDER/FDA*

12:00 PM WORKSHOP ADJOURNED

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： 伊藤さつき （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

要 旨

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を開発し、様々な糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造解析や、国際的重要課題となっているバイオ医薬品の糖鎖部分の同等性/同質性評価に応用することを検討してきた。本年度は、リニアイオントラップMSと高分解能MSのハイブリッド型MSを利用することによって、精密かつよりインフォーマティブな糖鎖プロファイリング法を開発することに成功した。本分析法は、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードにおける高精度及び多段階MS測定によって、酸性糖鎖や中性糖鎖を含む多様な糖鎖の構造と分布を短時間で明らかにできるものであり、糖タンパク質性医薬品はもとより、細胞治療用医薬品が発現する微量糖タンパク質の糖鎖解析に応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用技術や再生医学の進歩に伴い、様々なバイオ医薬品や細胞治療用医薬品の開発が進んでいる。バイオ医薬品の本質や細胞治療用医薬品が発現するタンパク質の多くは糖タンパク質である。糖タンパク質の糖鎖部分は、活性等に影響を及ぼすだけでなく、糖鎖抗原として有効性や安全性にも影響を及ぼすことから、糖タンパク質関連医薬品においては、糖鎖部分の恒常性を確保することが重要であると考えられている。しかし、糖鎖付加は、人為的に制御することが困難である上、製造方法の影響を大きく受けることから、糖タンパク質性医薬品や細胞治療用医薬品の特性解析・品質評価、及び、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、最終産物の糖鎖の恒常性を評価することが必須となっている。そのため、糖タンパク質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も強く望まれている。

我々は、液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）を用いて、糖タンパク質の糖鎖解析法の開発を行ってきた。これまでに、グラファイトカーボンカラムを用いたLC（GCC-LC）によって糖鎖を分離し、オンラインESI-MSを用いて構造を解析する糖鎖プロファイリング法を開発し、糖タンパク質関連医薬品の特性解析、及び同等性/同質性評価に活用することを検討してきた。昨年の本研究では、安定同位体標識法を取り入れた定量的糖鎖プロファイリング法を開発し、糖鎖試験法としての可能性を示した。現在、さらに糖鎖プロファイリング法の改良と、有用性の拡大を目指しているところである。

質量分析計の技術革新は目覚ましく、高度な機器が次々と開発されている。特に近年紹介されたリニアイオントラップ質量分析計とフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計のハイブリッド型質量分析計（liner ITMS/FT ICRMS）は、高分解能MS測定とデータ依存的な多段階MSの同時分析が可能な機

器として注目を集めている。糖鎖解析分野においても、高分解能 MS によって正確な単糖組成情報が得られること、また、リニアイオントラップ MS を用いたポジティブ及びネガティブ両イオンモードによる多段階 MS (MSⁿ) によって、糖鎖配列情報が得られる可能性が高いことから、liner ITMS/FT ICRMS は、糖鎖構造解析の強力なツールとして期待されている。

そこで本年度は、liner ITMS/FT ICRMS を用いて、高分解能 MS 及び測定による、高精密かつよりインフォーマティブな改良型糖鎖プロファイリング法の開発を検討した。まず、市販の高マンノース型糖鎖、及びシアル酸結合及び非結合複合型糖鎖を糖タンパク質性医薬品のモデル糖鎖として用いて、糖鎖プロファイリングのための条件設定を行った。さらに、細胞組織発現糖タンパク質のモデルとしてラット脳 GPI アンカー型膜タンパク質 Thy-1 を選び、細胞治療用医薬品の特性・品質評価における改良型糖鎖プロファイリング法の可能性を探った。

B. 研究方法

1) モデル標準糖鎖の調製

市販の糖鎖 Man7/D1, Man7/D3, asialo-triantennary (Tri) (Oxford Glycosystems), trisialylated triantennary (TriNA₃), tetrasialylated tetraantennary (TetraNA₄) (Dionex Corporation), に 0.25M NaBH₄, 200 µl を加え、室温で 2 時間反応させて還元した後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Spelco) を用いて脱塩した。

2) ラット脳膜画分の調製

ラット脳 (生後 3 週齢, 湿重量約 1.4 g, 日本エスエルシーより購入) 1 匹分当たり冷アセトン 40 ml を加え、ポリトロン(1000 rpm)を用いて氷冷しながら 1 分間均質化した。遠心分離後 (3000rpm, 室温, 10 分), 上清を除去し, 再度, 冷アセトン 30 ml を加え同じ操作を繰り返した。遠心後, クロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v) 40 ml を加え, ポリトロン(1000 rpm)を用いて 1 分間均質化後, 室温で 1 時間放置した。遠心分離後 (3000rpm, 室温, 10 分),

上清を除去し, 再度, クロロホルム/メタノール混液 40 ml を加え, 10 秒間均質化後, 室温で 30 分放置した。遠心分離後, 沈殿をメタノールで 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4 (均質化用緩衝液) 30 ml を加え, ポリトロン(1000 rpm)を用いて 10 秒間均質化を行った。ラット脳 2 匹分をまとめて遠心分離し (10,000 ×g, 4°C, 20 分), 再度沈殿に均質化用緩衝液を加え (ラット脳, 2 匹分に対し 20 ml), ポリトロン(1000 rpm)を用いて 20 秒間均質化後, 10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 5 ml を加え, 4°C で一晩攪拌し, 膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離し (10,000 ×g, 4°C, 20 分), 上清を 37°C で 10 分間放置した後, 遠心分離し (3000 rpm, 30°C, 5 分), Triton X-114 相と水相に分離した。得られた Triton X-114 相に均質化用緩衝液を等容量加え洗浄し, 再び 37°C で 10 分間放置後, 遠心分離した (3000 rpm, 30°C, 5 分)。得られた Triton X-114 相に冷アセトンを 4 倍容量加え, -15°C で一晩放置後, 遠心分離し (3000 rpm, 4°C, 30 分), 膜画分を得た。

3) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の調製

得られた膜画分 (ラット脳 2 匹分) を 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 に懸濁し, PIPLC (Molecular Probe) 1 unit を加え, 37°C で約 18 時間消化した。50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 と全溶液の 1/4 倍容の 10% Triton X-114 を加え (最終 Triton X-114 濃度, 2%), 0°C に冷却後, よく攪拌した。反応溶液を 37°C に保温後, 遠心分離し (3000 rpm, 30°C, 5 分), Triton X-114/水相分離を行った。Triton X-114 相を除いた後, 水相に 10% Triton X-114・トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 を 1/4 倍容加えて洗浄した。水相に冷アセトンを 4 倍容加え, -15°C で一晩放置後, 遠心分離し (3000 rpm, 4°C, 60 分), 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を得た。

4) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の SDS-PAGE

可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を 2-メル

カプトエタノール及びヨードアセトアミドを用いて、還元カルボキシアミドメチル化後、12.5%泳動ゲル(80×80×1 mm)を用いて、25 mM トリス塩酸塩、0.19 M グリシン、0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中20 mA で泳動させた。分離された GPI アンカー型タンパク質は、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) を用いて検出した。

5) GPI アンカー型タンパク質の同定

SDS-PAGE で分離された GPI アンカー型タンパク質の主なバンドを切り取り、約 1mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルで脱色し、さらに50%アセトニトリルを用いて脱水後、乾燥ゲル片に0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0, 50 µl 及びトリプシン (質量分析用グレード, Trypsin Gold, Promega) 1 µg を加え、37°Cで一晩ゲル内タンパク質の消化を行った。50%アセトニトリル及び5%トリフルオロ酢酸水溶液(抽出溶液) 300 µl を加え、30分間断続的に超音波照射し、ペプチドを含む抽出液を回収した。再度、抽出を行った後、抽出液をすべて回収し、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac, Thermo Electron) を用いて濃縮した。そして、以下の条件で、得られたペプチドの LC/MS/MS 分析を行った。データ依存的に得られた MS/MS スペクトルを用いて、検索エンジン Mascot (MatrixScience) 及びデータベース MSDB によりタンパク質同定を行った。

HPLC :

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)
カラム: MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 3µ)
溶離液 A: 0.01%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液
溶離液 B: 0.01%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液
グラジエントプログラム:
B 液: 5~65% (0~20分)
流速: 2 µl/min

MS, MS/MS :

装置: Qstar Pulsar i (Applied Biosystem 社)
イオン化: nano-ESI
測定モード: ポジティブイオンモード
スプレー電圧: 2500V
スキャン範囲 (m/z):
Q/Tof-MS: 400-2,000
MS/MS: 100-2,000
コリジョンエネルギー: 50-80 eV

6) 還元化遊離糖鎖の調製 (Thy-1 のゲル内 PNGase F 消化, 遊離糖鎖の抽出, 遊離糖鎖の還元)

SDS-PAGE ゲルより Thy-1 を含むバンドを切り取り、約 1 mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルでゲル片を脱色した。さらにゲル片を50%アセトニトリルで脱水した後、50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2, 及び PNGase F (Roche Diagnostics GmbH) 3 unit を加え、37°Cで一晩消化した。消化後、水 300 µl を加え、30分間断続的に超音波を照射し、糖鎖を含む抽出液を回収した。合計3回の抽出を行い、抽出液をすべて回収し、凍結乾燥した。0.25M NaBH₄, 200 µl を加え、室温で2時間反応させた後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Spelco) を用いて還元化糖鎖を精製した。

7) 糖鎖の解析, LC/MS/MS

以下の条件で調製した還元化糖鎖の LC/MS/MS 分析を行った。

HPLC :

装置: Magic 2002 (Michrom BioResource 社)
カラム: MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 3µ)
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 9.6)
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 9.6)
グラジエントプログラム:
B 液: 5~30% (0~60分)

流速 : 2 μ l/min

Liner ITMS-FT ICRMS :

装置 : Finnigan LTQ FT™ (Thermo Electron 社)

イオン化 : nanoESI

キャピラリー温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 2.0 kV

スキャン範囲 (m/z) : 700-2,000

衝突エネルギー : 35%

測定方法 :

- ① Full MS scan (positive ion mode)
- ② Data-dependent MS² (positive ion mode)
- ③ Full MS scan (negative ion mode)
- ④ Data-dependent MS²(negative ion mode)
- ⑤ Data-dependent MS³(negative ion mode)
- ⑥ Data-dependent MS⁴(negative ion mode)
- ⑦ Data-dependent MS⁵(negative ion mode)
- ⑧ Data-dependent MS⁶(negative ion mode)

8) 略語

Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; Hex, ヘキソース; HexNAc, N-アセチルヘキソサミン; NeuAc, N-アセチルノイラミン酸

C. 結果と考察

(1) モデル糖鎖の GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMS

GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMS を用いて, 研究方法 7) に準じて, 中性及び酸性モデル糖鎖 (Man7/D1, Man7/D3, Tri, TriNA₃, TetraNA₄, 図 1) の一斉分析を行った. 図 2A 及び 2B は, FT ICRMS full MS scan で得られた糖鎖プロファイルの 2 次元(2D, 溶出時間対 m/z , ポジティブ及びネガティブイオンモード)及び 3 次元(3D)表示である. FT ICRMS によって得られた精密質量を基に算出された単糖組成から, 15, 17, 24, 33, 及び 35 分に溶出された主なピークは, それぞれ, Man7/D1, Man7/D3, TriNA₃ と TetraNA₄ の混合物, TetraNA₄ であることが分かった.

ポジティブ及びネガティブイオンモードにおける各糖鎖の検出強度を比較すると, 中性糖鎖である Man7/D1 及び Man7/D3 はポジティブイオンモード

で検出され, ネガティブイオンモードではわずかに検出されるのみであることが分かった. また, 酸性糖鎖である TriNA₃ 及び TetraNA₄ は, 主要な異性体はポジティブ及びネガティブ両イオンモードで検出されるが, 微量の異性体は, ネガティブイオンモードでのみ検出されることが確認された. 以上のことから多様な糖鎖を分析する場合, ポジティブ及びネガティブ両イオンモードで分析することが重要であることが明らかとなった.

糖鎖配列は, ポジティブ及びネガティブイオンモードで検出されたイオンの自動的 MSⁿ 分析結果を用いて解析した. 解析例として図 3A 及び B に, ポジティブイオンモードによる Man7/D1 及び Man7/D3 の MS/MS スペクトルを示す. m/z 457²⁺ 及び 913⁺, 並びに m/z 619²⁺ 及び 1237⁺ は, Man7/D1 のコア構造の α 1-6 及び α 1-3 結合 Man 鎖が主に解裂することによって生じた Man₃GlcNAcGlcNAcol(Y_{3c}) 及び Man₅GlcNAcGlcNAcol(Y_{3b}) である. また, m/z 538²⁺ 及び 1075⁺ のイオンは, Man7/D3 の α 1-6 及び α 1-3 結合 Man 糖鎖が主に解裂することによって生じた Man₄GlcNAcGlcNAcol(Y₃) イオンである. 図 3A では, m/z 619²⁺ 及び 1237⁺, 並びに m/z 456²⁺ 及び 913⁺ の相対強度が高く, 図 3B では, m/z 538²⁺ 及び 1075⁺ の相対強度が高いことが分かる. これらの結果から, 15 分及び 17 分に検出された Man7 は, それぞれ Man7/D1 及び Man7/D3 であると推定できた. このように, MS/MS 分析において, 構造に由来する特徴的なフラグメントイオンの強度を比較することによって, 異性体を識別できることが分かった.

シアロ糖鎖の配列解析にはネガティブイオンモードにおける MSⁿ が役立つことが分かった. TetraNA₄ の MSⁿ スペクトルを, 図 4A (MS² スペクトル, ポジティブイオンモード) 及び 4B (MS⁴ スペクトル, ネガティブイオンモード) に示す. ポジティブイオンモードでは, 糖鎖に特徴的な B イオン, m/z 454(B_{2x}⁺), 657(B_{3x}⁺), 1475(B_{4x}⁺), 1658(B₆²⁺), B/Y イオン, m/z 366(Man-GlcNAc⁺, Gal-GlcNAc⁺, GlcNAc-Man⁺), 527(GlcNAc-Man-Man⁺),