

Contaminants, which include all adventitiously introduced materials not intended to be part of the manufacturing process (e.g. microbial species, endotoxins) should be strictly avoided and/or suitably controlled. Where non-endotoxin pro-inflammatory contaminants, such as peptidoglycan, are suspected, the use of additional testing, such as the monocyte activation test, should be considered.

4.3.5. Quantity

Quantity should be determined using an appropriate physicochemical and/or immunochemical assay.

It should be demonstrated that the quantity values obtained are directly related to those derived using the biological assay. When this correlation exists, it may be appropriate to use measurement of quantity rather than the measurement of biological activity in the product labelling and manufacturing processes, such as filling.

4.4. SPECIFICATIONS

Specifications are one part of a total control strategy designed to ensure product quality and consistency, and when tested, the product should be in compliance with its specification. Specifications should be set and take into account relevant quality attributes identified in characterisation studies. Selection of tests to be included in the specifications is product specific. The rationale used to establish the acceptable range of acceptance criteria should be described. Acceptance criteria should be established and justified taking into account data obtained from lots used in preclinical and/or clinical studies, data from lots used for demonstration of manufacturing consistency, data from stability studies and relevant development data, in accordance with ICH Q6B.

4.4.1. Identity

The identity test(s) should be highly specific and should be based on unique aspects of the product's molecular structure and/or other specific properties (e.g. peptide map, anti-idiotypic immunoassay, or other appropriate method). Considering the great similarity of the constant domains of different antibodies, more than one test (physicochemical, biological and/or immunochemical) may be necessary to establish identity, and such test(s) should be able to discriminate other antibodies that may be manufactured in the same facility.

4.4.2. Purity and impurities

As noted in the characterisation section, monoclonal antibodies may display a complex purity/impurity profile that should be assessed by a combination of orthogonal methods, and for which individual and/or collective acceptance criteria should be established for relevant product-related variants. For example, separation methods based on charge heterogeneity should be considered to quantitatively and qualitatively monitor charge variants.

Chromatographic and/or electrophoretic methods capable of detecting product truncation, dissociation and polymerisation should be included, and quantitative limits should be proposed for these, as appropriate.

Particular attention should be paid to the demonstration of the suitability of the analytical methods used to control multimers and aggregates.

Considering that glycosylation may have an impact on the pharmacokinetics of the product, and may modulate its immunogenic properties, appropriate acceptance criteria should be considered for this attribute. In addition, such control will further confirm the consistency of the product.

As a consequence, tests and acceptance limits for relevant glycosylation structures should be carefully considered (e.g. relative amounts of G0, G1 and/or G2 of Fc fragments, levels of galactosylation, fucosylation and sialylation) taking into account the intended and potential impact of this attribute on the biological activity in the context of the clinical situation (e.g. the presence of functional effector functions not being required for the intended mechanism of action, Fab glycosylation).

The control of relevant process-related impurities should be included in the control strategy. In some situations, and where appropriately demonstrated, their control may be performed on an intermediate product, at an appropriate process step. Routine testing may not be necessary for some impurities for which the process has been demonstrated to achieve high reduction levels. Control of residual protein A, HCP, residual DNA and other potential culture or purification residues are typically part of the drug substance specification, as appropriate. In addition, such control provides valuable information on process consistency and performance.

4.4.3. Potency

Potency is the quantitative measure of biological activity based on an attribute of the product which is linked to the relevant biological properties. A relevant potency assay should be part of the specifications for drug substance and/or drug product, and should ideally reflect the biological activity in the clinical situation.

For antibodies for which the clinical activity is only dependent on binding/neutralising properties, a potency assay that measures binding to the target (i.e. binding assay) may be deemed acceptable, if appropriately justified. Where effector functions are relevant for clinical activity, a cell-based bioassay or another assay that takes effector functions into account should be performed. A combination of two separate methods, one measuring the specificity and one giving an indication of an effector function (e.g. complement activation, C1q binding, Fc gamma receptor binding) may be acceptable if a cell-based assay is not feasible or if the combination of two methods gives more precise results.

Although the two types of potency assays (binding or cell-based) often yield comparable results, these assays cannot be deemed interchangeable, because there are product attributes that may not affect binding to target (e.g. glycosylation, fragmentation) but may affect further signalling or receptor expression.

Specific activity (biological activity per mass) is of considerable value to demonstrate consistency of production.

4.4.4. Quantity

The quantity of the drug substance, usually based on protein content (mass), should be determined using an appropriate assay.

4.4.5. General tests

Appearance, solubility, pH, osmolality, extractable volume, sterility, bacterial endotoxins, stabiliser and water, should be assessed where appropriate.

Visible and sub-visible particulate matter in drug product should comply with the requirements set forth in the European Pharmacopoeia.

5. MONOCLONAL ANTIBODY-RELATED PRODUCTS

In addition to intact, non-modified monoclonal antibodies, the scientific principles described in this document can be applied to other monoclonal antibody related products, such as antibody fragments (including single-chain variable fragment (scFv)), fusion proteins, conjugated monoclonal antibodies, bispecific antibodies and radiolabelled antibodies. However, their applicability will be determined on a case-by-case basis, based on the specific properties of the product.

Additional monoclonal antibody-related product specific annexes will progressively be developed and will be made available on the EMEA website, as appropriate.

6. REFERENCES

- ICH Q5A (R1) "Viral safety Evaluation of Biotechnology Products derived from Cell Lines of Human or Animal Origin" (CPMP/ICH/295/95)
- ICH Q5B "Analysis of the Expression Construct in Cell Lines used for Production of r-DNA derived Protein Products" (CPMP/ICH/139/95)
- ICH Q5D "Derivation and Characterisation of Cell Substrates used for Production of Biotechnological/Biological Products" (CPMP/ICH/294/95)
- ICH Q5E "Comparability of Biotechnological/Biological Products subject to Changes in their Manufacturing Process" (CPMP/ICH/5721/03)
- ICH Q6B "Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products" (CPMP/ICH/365/96)
- Note for Guidance on "Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Products" (EMEA/410/01)
- Guideline on "Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins" (CHMP/BMWP/14327/06)
- Guideline on "Strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products" (EMEA/CHMP/SWP/28367/2007)
- Ph. Eur. Monograph on "Monoclonal antibodies for human use" (2031)
- Ph. Eur. Monograph on "Human normal Immunoglobulin" (0338)
- Ph. Eur. Monograph on "Parenteral preparations" (0520); 2.9.19. Particulate contamination: sub-visible particles (20919)
- Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the "Community code relating to medicinal products for human use", as amended

ANNEX 1 - Suggested list of human tissues to be used for immunohistochemical or cytochemical investigations of cross reactivity of monoclonal antibodies.

This list should reflect the specificity of the antibody and its particular use.

- Tonsil, thymus, lymph node;
- Bone marrow, blood cells;
- Lung, liver, kidney, bladder, spleen, stomach including underlying smooth muscle, intestine,
- Pancreas, parotid, thyroid, parathyroid, adrenal, pituitary;
- Brain, peripheral nerve;
- Heart, striated muscle;
- Ovary, testis;
- Skin;
- Blood vessels.

生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の開発に関する研究

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 原園 景 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官

研究要旨 低分子量ヘパリンは、EU ではバイオ後続品として扱われているが、日本では後発品として扱われており、すでに複数の同一一般名称(JAN)を持つ低分子量ヘパリンが後発品として販売承認されている。低分子量ヘパリンは不均一性が高く、直接構造特性や品質特性を明らかにすることが困難であることから、先行品と後続品/後発品における構造特性の類似性評価は重要である。また、2007年秋に主に米国で発生したヘパリンナトリウムの有害事象に関連して、低分子量ヘパリンにおいてもその他のムコ多糖類の混入を評価することの必要性が国際的に議論されている。本研究では、低分子量ヘパリンを酸加水分解した後、高性能陰イオン交換クロマトグラフィー-パルス電気化学検出法（HPAEC-PAD）を行うことにより、低分子量ヘパリン間の還元末端及び非還元末端の構造、平均分子量に関する類似性を評価できること、並びにコンドロイチン硫酸エステル/デルマトン硫酸エステル等の混入を検出できることを見出した。

A. 研究目的

ヘパリンは、ウロン酸（イズロン酸またはグルクロン酸）とグルコサミンが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合した2糖繰り返し構造に平均2.5個の硫酸エステル基が結合した酸性ムコ多糖である。ヘパリンは、アンチトロンビンIIIと結合することによって、第Xa因子などの凝固因子を阻害し、血液凝固阻止作用を示すことから、血液透析その他の体外循環装置使用時の抗凝固剤として、世界各国で広く用いられている。低分子量ヘパリンは、ヘパリンを種々の方法により低分子化したものであり、ヘパリンに見られる第IIa因子（トロンビン）への結合性が低いことから、出血傾向の副作用が少ない抗凝固剤として利用されている。低分子量ヘパリンとして、国内ではパルナパリンナトリウム、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム、及びエノキサパリンナトリウムが承認されている。これらはINN及びJANの本質記載において、還元末端及び非還元末端の構造や分子量分布が

異なるものとして区別されている（表1）。

低分子量ヘパリンは、欧州ではバイオ後続品として扱われており、EMAが定めるバイオ後続品評価ガイドライン対象医薬品である。これに対して日本では、低分子量ヘパリンは後発品として扱われており、複数の業者により製造された同一一般名称(JAN)を持つ低分子量ヘパリンがすでに後発品として販売承認されている。低分子量ヘパリンは不均一性が高く、直接構造特性を明らかにすることが困難であることから、先行品と後続品/後発品における構造特性の類似性評価は重要である。また、2007年秋に主に米国で発生したヘパリンナトリウムの有害事象に関連して、低分子量ヘパリンにおいてもその他のムコ多糖類の混入を評価することの必要性が国際的にも議論されている。

そこで、本研究では、低分子量ヘパリンの類似性を確認する方法、及びその他のムコ多糖類の混入を評価する方法として、酸加水分解により低分

子量ヘパリンを単糖及びオリゴ糖とし、HPLCを行う方法を検討した。酸加水分解物のHPLCとして、糖を誘導体化することなく分離・検出できる高性能陰イオン交換クロマトグラフィー-パルス式電気化学検出法 (HPAEC-PAD) を用いた。低分子量ヘパリンとして、バルナバリン2製品、ダルテバリン2製品、レビバリン1製品及びエノキサバリンナトリウム1製品を分析した。

B. 研究方法

1. 試薬

L-フコース (Fuc) 及び D-マンノース (Man) はフルカより、D-ガラクトサミン (GalN) 及び D-グルコサミン (GlcN) は生化学工業より、D-ガラクトース (Gal) 及び D-マンノサミン (ManN) はナカライテスクより、2,5-アンヒドロ-D-マンニトール (2,5anhMan-ol), L-イズロン酸 (IdoA) はトロントリサーチケミカルより、D-キシロース、D-グルクロン酸 (GlcA), 50%水酸化ナトリウム溶液及びトリフルオロ酢酸 (TFA) は、和光純薬より購入した。

バルナバリンナトリウムはローヘパ注 (味の素) 及びミニヘパ注 (伊藤ライフサイエンス)、ダルテバリンナトリウムはダルテバリンナトリウム静注 (メルク製薬) 及びダルテバン静注 (日医工)、レビバリンナトリウムはクリバリン注 (アボット ジャパン)、並びにエノキサバリンナトリウムはクレキサ皮下注キット (サノフィー・アベンティス)) を購入して使用した。

その他の試薬は、入手できる高純度のもを用いた。

2. 酸加水分解

100 IU 相当量の各低分子量ヘパリンをアセトン沈殿し、沈殿物を 400 μ l の 2 N TFA, 2 N 塩酸又は 4 N 塩酸に溶解し、100°C で、指定した時間加熱した後、遠心減圧乾燥した。メタノールを 100 μ l 加え、遠心減圧乾燥した。水 400 μ l に溶解し、水で適当に希釈し、0.5 IU に相当する量を

HPAEC-PAD に供した。

3. HPAEC-PAD の方法

HPAEC-PAD 装置は、ICS-3000 ion Chromatography system (Dionex Co.)を用いた。カラムは CarboPac™ PA1 ((Dionex Co., 4 X 250 mm) をガードカラム (4 X 50 mm) と共に使用した。試料はループを用いて 75 μ l 注入し、流速 1.0 ml/min で、20 分間 16 mM NaOH を用いてイソクラティック溶出した後、5 分かけて 100 mM NaOH へ変更し、その後 30 分間に酢酸ナトリウム濃度を 0 から 500 mM に直線的に上げるグラジエント条件で溶出させた。5 分間 500 mM の酢酸ナトリウムを含む 100 mM 水酸化ナトリウムでカラムを洗った後、16 mM の水酸化ナトリウム溶液に戻し、20 分間平衡化した後、次の試料の測定を行った。

PAD の電圧の条件は、1 サイクルを 0.5 秒とし、0 から 0.4 秒まで 0.1 V とした後、0.41 秒に -2 V とし、-0.42 秒まで -0.2 V とした後、0.43 秒に 0.6 V と上げ、0.44 秒に -0.1 V とし 0.5 秒まで -0.1 V とした。電圧は直線的に変化させた。0.2 秒から 0.4 秒の間の電流を積分し、検出値とした。

4. ウロン酸の定量

ウロン酸の定量はカルバゾール硫酸法にて行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので、特に配慮していない。

C. 結果

(1) 低分子量ヘパリンの酸加水分解条件の検討

予め標準物質を用いて、HPAEC-PAD により GalN, ManN, GlcN, GlcA 及び IdoA はそれぞれ約 9.5, 10.5 分, 11.5 分, 38.5 分及び 41 分に溶出されることを確認した (図 1a)。つぎに、バルナバ

ン製品1を用いて、低分子量ヘパリンの加水分解条件を検討した。図1b-d, 図1e-g及び図1h-jは、それぞれバルナバリン製品1を2N TFA, 2N HCl及び4N HClに溶解し、4, 8, 及び12時間100℃で加熱して得られた分解物のHPAEC-PADパターンである。いずれの加水分解条件でもGlcNに相当するピークは強く観測されたが、GlcA及びIdoAに相当するピークはわずかしこ観測されなかった。2N TFAによる加水分解では、加熱時間が長いほどGlcNのピークは大きくなる傾向があった(図2a)。また、36分から38分にGlcN, GlcA及びIdoA以外の複数のピークが観測され、もっとも目立つ37.5分のピークは、8時間前後で最大になることがわかった(図2b)。2N HClを用いた酸加水分解でも、GlcNのピーク面積は時間の経過とともに増加すること(図2a)、また、36~38分のピークは、8時間で減少することが確認された。4N HClを用いた場合は、GlcNのピーク面積は4時間で最大になり、12時間加熱しても変化がないこと、また、36~38分に目立ったピークは検出されないことが確認された。さらに、2N及び4N HClを用いた場合には、約54分頃にTNFを用いた場合には検出されないピークが溶出されることが分かった。

以上のように、2N TFAを用いた場合、HClを用いた場合と比べて多くのピークが比較的強く観測されること、及び8~12時間の加水分解により37.5分のピークが最大となることから、以後、低分子量ヘパリンを2N TFAに溶解し、100℃で12時間加熱する条件を用いることにした。別に単糖を2N TFA中100℃で12時間加熱しても、GalN及びGlcNは分解しないこと、また、GlcA及びIdoAの残存率はそれぞれ約65%及び55%であることを確認した(図2c)。

(2) 各種低分子量ヘパリン酸加水分解物のHPAEC-PADパターン

各種低分子量ヘパリンを2N TFA中100℃で12時間加熱して得られた分解物のHPAEC-PADパタ

ーンを図3に示す。各低分子量ヘパリンとも、GlcNに相当するピーク及び37.5分のピークが強く観測された。

バルナバリン製品1及び2のパターンは類似していたが、わずかな違いが認められた。即ち、バルナバリン製品1には、ManNの溶出位置(10.5分)に小さなピークが認められたが、製剤2ではほとんど認められなかった。また、バルナバリン製剤2ではGalNに相当するピークが強く観測され、そのピーク面積はバルナバリン製剤1の約3.7倍であった。ManNは原料であるヘパリンナトリウムを製造する過程で、還元末端のGlcNACが異性化したもの、また、GalNは、ヘパリンナトリウムの製造工程で製造工程由来不純物として混入したデルマタン硫酸エステルに由来するものと考えられた。

ダルテバリン2製品はほぼ同一のパターンを示した。また、6分、32.5分前後及び34分前後に、バルナバリン及びエノキサバリンからは検出されないピークが検出された。6分のピークは2,5-anhMan-olの溶出位置に相当していたことから(データ非表示)、還元末端の2,5-anhMan-olと推定された。34分前後のピークは、2,5-anhMan-olにウロン酸が結合した二糖と推定された(未確認)。

レビバリンからも、ダルテバリンと同様に6分、34分前後及び41分に、それぞれ還元末端の2,5-anhMan-ol, 2,5-anhMan-olにウロン酸が結合した二糖(推定)及びidoAに相当するピークが検出された。これら3つのピークのピーク面積のGlcNのピーク面積に対する割合をダルテバリンと比較すると、いずれもダルテバリンよりも大きくなっていることが確認された。レビバリンにおいて末端由来の糖と考えられた6分、34分前後及び41分のピークの比率が高くなっていたことは、レビバリンの平均分子量が(約4,000)がダルテバリンの平均分子量(約5,000)よりも小さいことを反映していると考えられた。

エノキサバリンのクロマトグラムでは、他の低

分子量ヘパリンの酸加水分解物に認められる 41 分の idoA に相当するピークは僅かしか認められなかった。これは、エノキサバリンの非還元末端の主要な構造が 4 位に二重結合が入った構造 (α -threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸 ($\Delta 4$ 不飽和ウロン酸)) であること、及びヘパリン鎖内部の IdoA はほとんど遊離されないか、されても分解されてしまうことを示唆していると思われる (α -threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸の溶出位置は未確認)。また、10.5 分に ManN に相当するピークや、ほぼボイド容量の約 2 分に他の低分子量ヘパリンには観測されていないピークが認められた。エノキサバリンには、還元末端に ManNAc や 1,6-アンヒドロ環構造を持つ分子が含まれていることが報告されており、これらのピークは、1,6-アンヒドロ環構造をもつ GlcN や ManN である可能性が示唆された。

カルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸を標準として各低分子量ヘパリンのウロン酸を定量したところ、バルナバリン製品 1 及び 2、ダルテバリン製品 1 及び 2、レビバリン及びエノキサバリンの 1 IU 当たりのウロン酸の量は、それぞれ 4.7 μ g, 5.0 μ g, 3.5 μ g, 3.5 μ g, 4.3 μ g 及び 4.5 μ g であった。つぎに、酸加水分解後 HPAEC-PAD により得られた 2,5-anhMan-ol, GalN, ManN, GlcN, Gal, GlcA 及び IdoA 並びに、比較的強く観測された peak1-7(図 3)のウロン酸 1 nmol 当たりのピーク面積比を求めたところ表 2 に示す値が得られた。相対標準偏差は、一部の強度の低いピークや分離が不十分なピーク (IdoA 等) を除き、10% 以内であった ($n = 3$)。バルナバリン製品 2 の GlcN のピーク比は、バルナバリン製品 1 よりも若干小さくなったが、これは GalN が混入していたからと考えられた。また、Peak7 のピーク面積は、バルナバリン製品 1 及び 2、ダルテバリン製品 1 及び 2 並びにレビバリンではほぼ同程度であり、還元末端の構造とは関係しないことが示唆された。

さらに、加水分解効率を調べる目的で、ピーク

面積より GlcN を定量したところ、バルナバリン製品 1 及び 2、ダルテバリン製品 1 及び 2、レビバリン及びエノキサバリンのウロン酸 1 nmol 当たりの遊離 GlcN は、それぞれ 119, 105, 86, 84, 86 及び 94 pmol であった (データ非表示)。ウロン酸と GlcN が 1:1 で含まれていると仮定した場合、本酸加水分解条件により、全体の約 10 % 程度の GlcN が遊離してきたことが分かった。

D. 考察

低分子量ヘパリンは、硫酸エステル化の位置と程度、あるいはウロン酸の種類などが異なる分子の混合物であり、直接構造を明らかにすることは困難である。従って、低分子量ヘパリンを後続品/後発品として開発するにあたって、先行品との構造特性の類似性を評価することが重要となる。本研究では、低分子量ヘパリンを酸加水分解産物とし、HPAEC-PAD によって得られたクロマトグラムのパターンを比較することにより、JAN の異なる低分子量ヘパリンの識別、及び同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンの構造特性の類似性評価が可能かどうかを検討した。

糖鎖の加水分解法として一般的に用いられる TFA 及び HCl を用いた条件を検討したところ、いずれの酸加水分解条件でも、GlcN のピークは観測されたが、ウロン酸 (GlcA 及び IdoA) のピークはわずかしか観測されなかった。これは、ヘパリン類のウロン酸は、負電荷と (脱硫酸化又は脱アセチル化後の) グルコサミンの正電荷の相互作用により酸加水分解に対して安定化されること、及び酸性溶液中で脱炭酸を起こしたり、ラクトン環を形成したりすることが原因と考えられた。それでも、2 N TFA 中 100°C で 8~12 時間加水分解する条件によって、ある程度の単糖やオリゴ糖を検出することができたこと、また、比較的多くのピークが得られたことから、本研究では、TFA による酸加水分解を選択した。

バルナバリン、ダルテバリン、レビバリン及びエノキサバリンの酸加水物の HPAEC-PAD パター

ンを比較したところ、それぞれ末端構造や平均分子量に応じた特徴的なパターンを示すことが明らかになった。また、同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンの HPAEC-PAD パターンは類似していることも確認された。HPAEC-PAD は、酸加水分解で得た糖を誘導体化することなく高感度で検出できること、また、操作が簡便であることから、先行品と後続品/後発品の類似性評価に利用可能と思われる。

低分子量ヘパリンの原料であるヘパリンは、ブタ小腸より精製されるが、製造工程由来不純物として、デルマタン硫酸エステルが混入することが知られている。また、2007 年秋～2008 年春、主に米国において、ヘパリンナトリウムを使用した患者に、ヘパリンナトリウムに混入された高度に硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル(OSCS)による有害事象が発生した際、低分子量ヘパリン製剤にも OSCS が混入されていることが明らかとなり、国際的な問題となった。デルマタン硫酸エステルも OSCS も、ヘパリンには含まれない GalNAc を構成成分とすることから、日局を含む各国関係機関では、ヘパリン純度試験法としての単糖分析に高い関心を持っている。本研究で得られた結果は、単糖分析がヘパリンや低分子量ヘパリンの純度試験法として利用できることを示唆するものであり、加水分解条件検討の結果等は、今後の日局各条ヘパリンナトリウム等の純度試験法整備に応用できるものと期待される。

E. 結論

低分子量ヘパリンを酸加水分解し、HPAEC-PAD を行うことにより、同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンの還元末端及び非還元末端の構造、及び平均分子量の類似性を評価できること、並びにデルマタン硫酸エステル/コンドロイチン硫酸エステル等の混入を検出できることが明らかとなった。

F. 研究業績

1. 誌上発表

1. Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T. The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.* In press
2. Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T. Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 2008; 20, 97-116.
3. 川崎ナナ：ヘパリン問題と日局一部改正。フアルマシア, 44, 1167-1171 (2008)
4. 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹：薬の名前。ステムを知れば薬がわかる。第 24 回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 1605-1611 (103-109) (2008)
5. 蜂須賀暁子, 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹：薬の名前。ステムを知れば薬がわかる。第 28 回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 2515-2523 (2008)

2. 学会発表

1. 原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英：低分子量ヘパリンの酸加水分解及び HPAEC-PAD を用いた確認試験及び純度試験法の検討。日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009 年 3 月) 予定
2. 秦 艶, 橋井則貴, 川崎ナナ, 山口照英：強陰イオン交換 HPLC を用いたヘパリンナトリウム確認試験及び限度試験に関する研究。日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009 年 3 月) 予定
3. Nana Kawasaki, Low Molecular Mass Heparins in the Japanese Pharmacopoeia. 2nd Workshop on the characterization of

Heparin products ストラスブール(2008, 6, 20)

実用新案登録 なし
 その他 該当事項なし

表1. 各低分子量ヘパリンの本質の比較

	由来	分解方法	質量平均分子量	重合度 (n)	二糖当たりの硫酸基	主成分の構造	
						非還元末端	還元末端
バルナバリン	ブタ小腸粘膜	過酸化水素及び酢酸第二銅	4500~6500	4~21	2.0~2.4	2- <small>α</small> -スルホヘキサピラノシド	2-デオキシ-2-スルファミノ- <small>α</small> - <small>D</small> -グルコース
ダルテリリン	ブタ小腸粘膜	亜硫酸	約5000	4~21	2.0~2.5	2- <small>α</small> -スルホヘキサピラノシド	6- <small>α</small> -スルホ-2,5-アンピドロ-マンニトール
レピバリン	ブタ小腸粘膜	亜硫酸	約4000		約2.1	2- <small>α</small> -スルホヘキサピラノシド	6- <small>α</small> -スルホ-2,5-アンピドロ-マンニトール
エノキサリリン	ブタ小腸粘膜	ベンジルエステル誘導体のアルカリ分解	約4500	3~22	約2	4-デオキシ-2- <small>α</small> -スルホ- <small>α</small> - <small>D</small> -グルコース	2-デオキシ-2-スルファミノ- <small>α</small> - <small>D</small> -グルコース*

* 他に、2-デオキシ-2-スルファミノ-6-α-スルホ-D-マンノース、2-デオキシ-2-スルファミノ-1,6-アンピドロ-グルコース及び2-デオキシ-2-スルファミノ-1,6-アンピドロ-マンノースが存在する。

表2 各低分子量ヘパリンのHP AEC-PADプロファイル中に観測されたいくつかのピークのウロン酸 1 mmol当たりのピーク面積(n = 3)

低分子量ヘパリン	バルナバリン1		バルナバリン2		ダルテバリン1		ダルテバリン2		レピバリン		エノキサリリン	
	Peak Area (nL X min)											
	Average	% RSD	Average	% RSD	Average	% RSD	Average	% RSD	Average	% RSD	Average	% RSD
Peak 1											134	6.9
2,5-anHep-01					206	2.7	301	3.8	539	2.2		
GalN	55	1.9	192	0.9	34	2.0	47	6.1	14	9.6	5	44.8
ManN	96	1.9	13	3.1					6	7.6	207	2.9
Sial	3040	3.9	2679	3.7	2152	4.9	2188	6.1	2187	3.6	2402	1.8
Gal	21	2.8	40	3.8	27	3.2	36	5.0	32	7.5	92	8.7
Peak 2					134	5.0	117	5.2	201	1.7		
Peak 3					130	2.9	96	3.5	157	1.3		
Peak 4	277	6.1	179	4.8	161	5.1	164	7.2	145	5.7	144	3.9
Peak 5	202	8.3	204	2.7	140	4.2	156	6.4	183	6.0	258	1.8
Peak 6	303	3.4	281	3.1	212	4.8	213	6.4	206	2.8	402	0.8
Peak 7	2196	1.0	1931	0.4	2180	2.5	2188	4.0	2333	1.2	1647	0.3
Gal	60	4.6	36	0.6	76	3.1	82	5.1	88	6.0	31	6.5
IdoN	146	7.5	174	7.9	119	20.5	126	15.7	240	5.7	44	27.9

* 各ピークは図3を参照する。

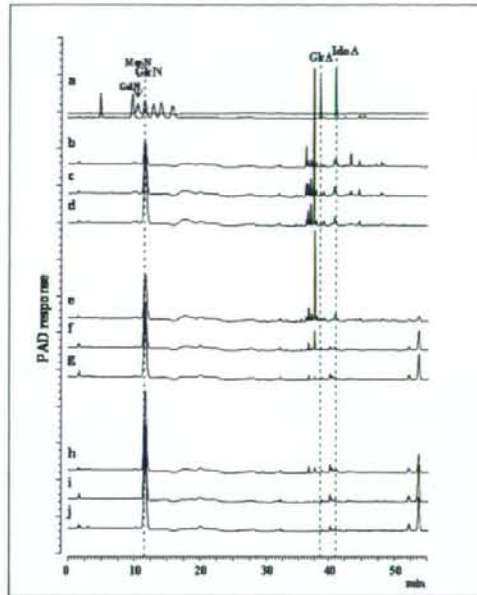


図1 各種条件で酸加水分解したときの低分子量ヘパリン(バルナバリン製品1)のHPAEC-PADパターン
 (a) 単糖標準物質(上段 ManN, 下段 Fuc, GalN, GlcN, Gal, Glc, Xyl, GlcA及びIdoA). (b-d) バルナバリン製
 品1を2 N TFA存在下, 100°Cで4時間, 8時間及び12時間加熱. (e-g) 2 N HCl存在下, 100°Cで4時間, 8時間及び
 12時間加熱. (h-j) 4 N HCl存在下, 100°Cで4時間, 8時間及び12時間加熱.

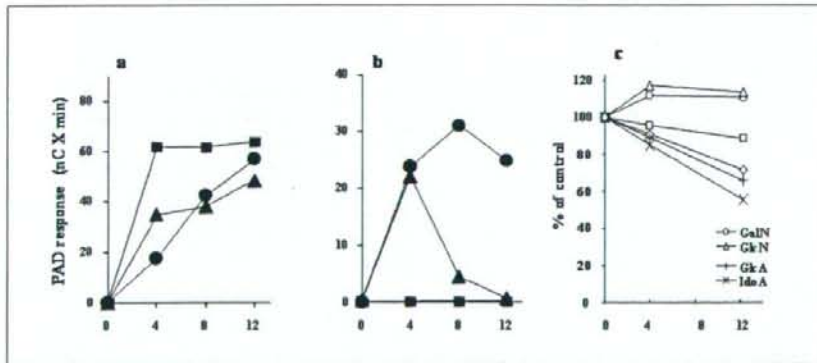


図2 ピーク面積の経時変化

バルナバリンを2 N TFA(●), 2 N HCl(▲)又は4 N HCl(■)存在下, 100°Cで加熱したときのGlcNのピーク
 (a) 及び37.5分のピーク(b)のピーク面積の経時変化. (c) 各単糖を2 N TFA存在下, 100°Cで加熱したとき
 のそれぞれのピーク面積の経時変化.

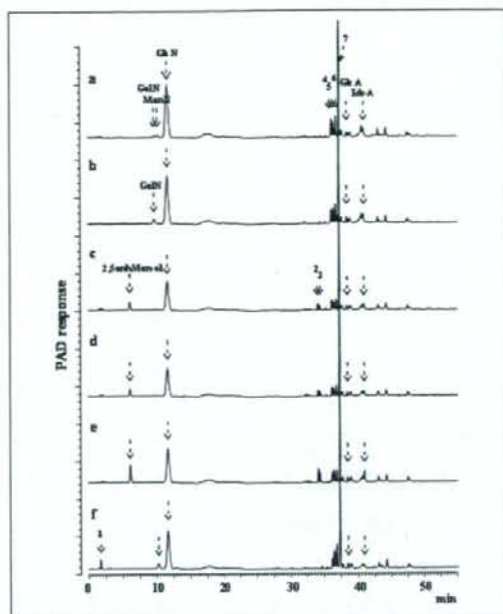


図3 各種低分子量ヘパリンの2 N TFA存在下、100°C、12時間加水分解したときのHPAEC-PADパターン
 (a) バルナバリン1, (b) バルナバリン2, (c) ダルテバリン1, (d) ダルテバリン2, (e) レビバリン, (f) エノキサバリン

トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の
品質評価等に関する研究

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長
研究協力者 多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員
研究協力者 鈴木琢雄 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

トランスジェニック植物を用いて製造される組換えタンパク質性医薬品について、製品開発の現状と、品質・安全性の評価に関する規制環境整備の国際的動向を調査検討した。海外では、ウキクサで生産されたインターフェロンなどがフェーズⅡ臨床試験に進んでおり、次世代の組換えタンパク質生産方法として、トランスジェニック植物の利用が実用化に近付いていることがうかがわれる。EUでは、2006年にトランスジェニック植物を用いて生産されたバイオ医薬品有効成分の品質に関するガイドライン案が公表されたことに続いて、2008年にその最終版が公表された。EUのガイドラインでは、トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質性医薬品の生産は、独自の工程管理システムの構築を必要とする栽培・収穫・初期加工からなる第1フェーズと、他の組換えタンパク質性医薬品の製法と共通した取扱いが可能である出発原料調製以降の第2フェーズに分けられることが明示されている。微生物や動物細胞を用いて製造される組換えタンパク質性医薬品では十分な特性解析と品質管理がなされるセル・バンクを出発原料として工程管理が行われるのに対して、トランスジェニック植物を用いた生産系では、出発原料調製までにトランスジェニック・バンクから複数の工程を経ることになる。生産期間を通じて適格な出発原料が供給されるよう、栽培条件の変動があっても目的物質の発現量や特性に影響が生じにくい優れた生産用植物株を樹立してトランスジェニック・バンクを作製すると共に、製造の第1フェーズの管理手法を確立することが重要である。

A. 研究目的

近年、タンパク質性医薬品の製造方法をめぐって、安全性のさらなる向上と製造コスト削減を求める動きが強くなり、これらの要件を満足しうる方法としてトランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質生産が注目されている。トランスジェニック植物を用いたタンパク質生産では、血清等の動物由来原料を用いる際

の安全性上の重要課題である感染性物質混入に関する対策を軽減することができるとされている。また、高価な培地成分や特殊な動物細胞培養設備に代わり、比較的安価な植物栽培による生産が可能であるため、製造コストを大幅に削減することができるとも言われている。海外ではトランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質の中に、既にフェーズⅡ臨床

試験の段階にまで開発が進んだものがあり、医薬品としての実用化も遠くないと思われるが、これまでにヒトの医薬品として承認された実績がないため、製造されたタンパク質の品質・安全性確保が今後の課題である。

トランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質における医薬品としての品質・安全性確保のための基本的な考え方は、微生物や動物細胞を用いて製造された従来の組換えタンパク質性医薬品と変わらない。しかし、植物では、タンパク質の翻訳後修飾がヒトや動物と異なること、微生物や動物にはない成分が含まれること、環境から混入する可能性のある混入汚染物質の種類が異なることなどから、植物に特有の問題に注意して評価を行う必要がある。すなわち、トランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質性医薬品の品質特性解析においては、目的タンパク質の翻訳後修飾、製造工程由来不純物、および混入汚染物質に関する評価が特に重要であると考えられる。また、トランスジェニック植物を用いた生産系で課題となる事項としては、バンキングシステムの確立と植物から出発原料（医薬品製造基材）調製に至る工程の管理手法の確立があげられる。

本年度は、トランスジェニック植物を用いて生産された組換えタンパク質性医薬品について、開発状況を調査するとともに、品質・安全性の評価に関する規制環境整備の国際的動向を明らかにするため、EMEA から公表されたガイドラインに関する検討を行った。さらに、トランスジェニック・バンク作製および出発原料調製に至る工程について、適格な出発原料の供給のために求められる要件を考察した。

B. 研究方法

製品開発状況に関しては、学術雑誌に掲載された論文¹⁾、およびトランスジェニック植物で製造した組換えタンパク質性医薬品を開発している企業からの公開情報を参考に調査を行

った。また、EMEA から公表されたガイドライン“Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMEA/CHMP/BWP/48316/2006; 24 July 2008)”²⁾をもとに、規制環境の整備に関する国際動向を検討した。バイオ医薬品の製造に関連するICH ガイドライン (Q5A「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性評価」、Q5B「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」、Q5D「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) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」)も適宜参考にした。

C. 研究結果

C.1. トランスジェニック植物を用いて生産される組換えタンパク質性医薬品の開発動向

トランスジェニック植物を用いて生産された組換えタンパク質性医薬品の開発動向を Table 1 に示す。ベニバナ種子で生産されたインスリンの臨床試験が開始されるなど、新たな開発の動きがある一方で、開発企業が倒産したという情報がある製品 (非ホジキンリンパ腫ワクチン) や、開発企業のホームページが閉鎖され開発が中断された可能性が高い製品 (胃リパーゼ、ラクトフェリン) がある。

現在フェーズ II 以降の臨床試験が進められているのは、抗 *S. mutans* 抗体とインターフェロン アルファ-2b である。抗 *S. mutans* 抗体は糖タンパク質であるが、植物に特有の糖鎖構造などが大きな問題にならないと考えられる口腔内投与製剤としての開発が行われている。インターフェロン アルファ-2b やフェーズ I/II 臨床試験が行われているインスリンは注射剤であるが、糖鎖を持たないタンパク質である。注射剤では、これまでに医薬品として有

効性が確認され、臨床応用されているタンパク質を有効成分とする製品での開発が先行していると言える。トランスジェニック植物で製造される組換えタンパク質性医薬品に特有の投与形態である可食植物で生産されたワクチン類については最近の動向に関する情報がなく、開発が進んでいない様子である。以下に、開発が進んでいる品目に関する概要を記載する。

C.1.1 抗 *S. mutans* 抗体³⁾

抗 *S. mutans* 抗体 CaroRx™ は、抗原結合部位が IgG 由来であるが、その他の部分は分泌型 IgA の構造を持つ分泌型 IgA/G キメラ分子であり、H鎖が IgG 由来の C_γ1, C_γ2 と IgA 由来の C_α2, C_α3 からなる IgA/G キメラ 2 分子と J鎖および secretory component から構成される。遺伝子組換えと交配により作製された組換えタバコを用いて生産され、破碎と凍結融解により調製した葉の抽出物から精製される。CaroRx™ は、う蝕関連菌 *S. mutans* の表面にある接着タンパク質に結合するため、*S. mutans* の歯への接着を防ぐ働きを持つ。用法としては、クロルヘキシジンによる口腔内の殺菌を行った後、2~3 週間の間に CaroRx™ を口腔内に数回適用する。これにより、6 ヶ月から 1 年の間、口腔内での *S. mutans* 繁殖を防ぐことができるとされている。分泌型 IgA/G と IgG の比較では、分泌型 IgA/G の方が口腔内への滞留性が高く、抗原への結合も強いとされている。

C.1.2 インターフェロン アルファ-2b⁴⁾

ウキクサで生産されたインターフェロン アルファ-2b (Locteron®) では、生分解性ポリマーを用いた徐放性製剤としての開発が進められており、長時間作用型のインターフェロン製剤である PEG 化インターフェロン (PEG イントロン®) あるいはアルブミンとインターフェロンの融合タンパク質 (Albuferon®) を対

照とした試験が行われている。Locteron® にはインターフェロンあるいは PEG 化インターフェロンにみられる投与後の血中濃度の急激な上昇がなく、副作用を回避できる可能性がある他、血中濃度の持続性が高く、ベグイントロンでは週 1 回の投与が必要であるのに対して、2 週間に 1 回の投与でよいとされている。有効成分であるインターフェロン アルファ-2b (BLX-833) については、イントロンを対照薬としたフェーズ I が実施済みとなっている。ウキクサを用いた生産系では、目的タンパク質が根から分泌されることから、植物組織を破碎する必要がなく、溶液の状態でも目的タンパク質を含む画分を得られることが利点であろう。ウキクサは閉鎖系での栽培が可能であり、製造施設は GMP に適合しているとされている。

これまで、組換えタンパク質性医薬品の薬物動態 (PK) プロファイル改良は、ヒトインスリン製剤の他は主として、アミノ酸配列の改変や PEG 修飾、あるいは IgG の Fc ドメインとの融合タンパク質作製などのように、目的タンパク質の構造改変/修飾により行われてきた。Locteron® の開発は、組換えタンパク質の生産にトランスジェニック植物を用いることに加えて、新規な DDS 技術を応用して PK プロファイル改良を図るという点でも、新しいタイプの組換えタンパク質性医薬品であると言える。

C.1.3 インスリン⁵⁾

ベニバナで生産されるインスリンの第 I/II 相臨床試験は、2008 年 12 月に英国で開始された。試験は既承認のインスリン 2 製剤を対照薬とした生物学的同等性評価試験として行われており、バイオシミラー製品としての承認申請を念頭に開発が進められている可能性が考えられる。ベニバナ種子の発現系では、目的タンパク質を oleosin との融合タンパク質として種子中の oil body に局在させることにより、目的タンパク質の前駆体である融合タンパク質

を植物組織から容易に抽出できるよう工夫がなされている。さらに、oleosin と目的タンパク質の間に組み込まれた配列を認識するプロテアーゼ等で融合タンパク質を処理することにより、目的タンパク質を切断して水相に移行させることができるデザインになっており、夾雑タンパク質が少ない状態で目的タンパク質を含む画分を得ることができるとされている。生産用のベニバナの栽培は屋外の圃場で行われるようであり、field GMP production の標準業務手順書を作成中であるとされている。

C.1.4 改変型グルコセレブロシダーゼ⁶⁾

トランスジェニック植物ではなく培養細胞を利用したものであるが、組換えニンジン細胞を用いて生産されているグルコセレブロシダーゼでは、フェーズⅢ臨床試験が開始されている。植物細胞を用いて生産された組換えタンパク質性医薬品で上市されたものはこれまでになく、新しい生産系である。組換えニンジン細胞で作られているグルコセレブロシダーゼ (plant-derived glucocerebrosidase: pdGCD) は、産生されたタンパク質が液胞に貯留されるよう、植物に特異的な液胞貯留シグナル配列 DLLVDTM を C 末端に付加したタンパク質として生産されている。既承認のグルコセレブロシダーゼ (セラザイム®) は、CHO 細胞で産生させたヒト β -グルコセレブロシダーゼを、シアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ及びヘキソサミニダーゼで処理することにより糖鎖末端がマンノースになるよう糖鎖をトリミングして作製されている。糖鎖末端をマンノースにすることは、酵素がマクロファージのマンノース受容体に結合して、薬効発現部位である細胞内のリソソームに取り込まれるために必須である。pdGCD では、液胞に存在する酵素の作用により糖鎖末端がマンノースとなるため、発現された目的タンパク質に糖鎖のトリミング処理を施す必要がない。既承認のグルコ

セレブロシダーゼとは一次構造が異なる別のタンパク質であるが、文献では、酵素活性や高次構造はセラザイムと同様であり、安全性に関する問題はないとされている⁷⁾。植物の特色を活かした組換えタンパク質の製造方法であると言える。生産コストの点で利点があるものと思われる。

C.2. トランスジェニック植物由来タンパク質医薬品の品質に関するガイドラインの整備状況

トランスジェニック植物で生産される組換えタンパク質性医薬品の品質に関するガイドラインとしては、2002 年に FDA から公表されたガイダンス案 “Guidance for industry: Drugs, biologics, and medical devices derived from bioengineered plants for use in humans and animals”⁸⁾と、2008 年に EMEA から公表されたガイドライン “Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants”²⁾がある。我が国には、トランスジェニック植物由来タンパク質医薬品の品質に特化したガイドラインはなく、今後検討する必要があると思われる。

EMEA ガイドラインでは、適用対象が安定的に遺伝子導入された高等植物 (種子植物) に限定されているが、植物を用いた組換えタンパク質発現系では、コケや緑藻等の植物が用いられる他、一過性発現系が用いられることもある。EMEA ガイドラインはおそらく、単細胞あるいはそれに近い植物では、従来の微生物や動物細胞の培養系における品質確保の方策を応用して考えやすいこと、一過性発現系では品質・安全性確保のための方策として、別途考慮すべき事項が生じること等から、それらをガイドラインの適用対象外とすることによって、焦点を絞って議論を進めたものと思われる。

2008 年 7 月に公表された EMEA ガイドラ

インに関しては、2006年にガイドライン案 (DRAFT) が公表されており、ガイドライン案では、下記の4点について特にコメントが求められていた⁹⁾。

- ・トランスジェニック植物関連の用語
- ・バンキングシステム
- ・一般的な製造の戦略
- ・栽培、収穫、初期加工へのガイダンス

それぞれの問いかけに対して寄せられたコメントと、回答およびガイドラインへの反映の概要を Table 2 に記す¹⁰⁾。コメントはいずれも Pharma-Planta (欧州および南アフリカの産学連携団体) からのものであり、バンキングに関する記載は概略に止めることや、初期の製造工程を GACP (Good Agricultural Collection System) に適合することでよいとする意見が出されている。これらの意見に対しては、農作物の栽培と医薬品生産では求められる要件が異なることを理由に、全ては受け入れられない旨、回答されている。

ガイドライン案では、製造関連事項について、「一般的な製造方法」、「栽培、収穫、初期加工」、「下流加工」と項立てされていたが、最終版では、「栽培、収穫、初期加工」が「製造の第1フェーズ: First production phase」に、「下流加工」が「製造の第2フェーズ (下流加工): Second production phase (downstream processing)」に変更された。EMA ガイドラインに示されているように、栽培、収穫、初期加工からなる製造の第1フェーズでは、GMPに対応することが難しい場合もあり、独自の管理システムの構築が必要である。これに対して、出発原料調製以降の製造の第2フェーズでは、細胞培養により製造される組換えタンパク質性医薬品における品質管理システムと同様の考え方が可能である。

以下に、EMA ガイドラインの概要を示す。

Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMA / CHMP / BWP / 48316 / 2006) 24 July, 2008

安定的に遺伝子導入された高等植物を用いて製造される生物学的有効成分の品質に関するガイドライン

目次

1. 緒言
2. 適用対象
3. 関連法規と留意事項
4. ガイドライン
 - 4.1 遺伝子組換え体の作製
 - 4.1.1 宿主植物
 - 4.1.2 導入遺伝子および遺伝子発現構成体
 - 4.1.3 最初の形質転換体の作出
 - 4.1.4 最終的な形質転換体の樹立
 - 4.1.5 遺伝子組換え体のバンキングシステム
 - 4.2 製造工程関連事項
 - 4.2.1 一般的な製造方法
 - 4.2.2 製造の第1フェーズ
 - 4.2.3 製造の第2フェーズ (下流加工)
 - 4.3 有効成分の品質管理
 - 4.3.1 特性解析
 - 4.3.2 規格及び試験方法
 - 4.4 感染性物質による汚染の防止
 - 4.4.1 非ウイルス性感染性物質
 - 4.4.2 ウイルスおよびウイルス様粒子
 - 4.4.3 伝達性海綿状脳症 (TSE) 関連事項

概要

組換えタンパク質の製造方法として長年にわたって確立されてきた原核生物、酵母、動物細胞培養を補完し得る方法として、トランスジェニック植物を用いる技術が台頭してきた。本

文書では、この新しい技術を用いて生産される有効成分の品質確保に必要な方策に関するガイダンスを提示する。

1. 緒言

本ガイドラインの主な目的は、既存の他の生産システムにおける品質ガイダンスの内容を、トランスジェニック高等植物を用いたシステムに特有の課題に適合させることである。

バイオテクノロジーを応用して生産された他の有効成分の場合と同様、製造工程とその管理は、トランスジェニック植物により生産された有効成分の品質プロファイルに大きく影響する。さらに、トランスジェニック植物を用いた生産の経験は限られているため、開発研究の実施にあたって慎重な対応が求められる。

安定的に遺伝子導入する方法としては、パーティクルガン法、マイクロインジェクション、アグロバクテリウム法(核内遺伝子への遺伝子導入)、および、クラミドモナス法(葉緑体遺伝子への遺伝子導入)等がある。土壌や水生環境で生育すること、強固な細胞壁が存在すること、翻訳後修飾パターン(糖鎖修飾を含む)が他の真核生物と異なること等が、植物の特徴である。これらの特徴が有効成分の品質・安全性・有効性プロファイルに影響することは明らかである。

2. 適用対象

本ガイドラインの適用対象は、高等植物の核または色素体ゲノムに安定的に導入された1つあるいは複数の遺伝子から発現される生物学的有効成分の品質(感染性物質の安全性評価を含む)に関する事項である。本文書では、高等植物とは、種子植物(裸子植物および被子植物)に属するものを指す。一過性に遺伝子が導入された植物を用いた生産や植物細胞の培養による生産は、本ガイドラインの適用対象外とする。

本ガイドラインは主として、トランスジェニック植物を用いて生産され、非経口投与されるものに適用する。経口的に投与されるものについては、本ガイドラインの全てが当てはまる訳ではないが、同様の基本的な原則は適用される。

3. 関連法規と留意事項

本ガイドラインは、理事会指令 Directive 2001/83/EC の緒言と一般的原則(4)、補足 I の第 1 部第 3 節、さらに該当する EMEA CHMP ガイドラインを参考にして読むこと。EMEA Herbal Medicinal Products Committee (HMPC)のガイドラインは、本ガイドラインとは異なる形で植物の利用に言及したものであるが、参考にできるところもある。

遺伝子導入された高等植物を用いて製造された生物学的有効成分を含む医薬品は、Regulation (EC) No 726/2004 の補遺の適用対象に入り、その規制に定められたような中央認可方式によって市販許可が与えられている場合は、EU 域内でのみ市販されることになる。

トランスジェニック植物を用いた製造システムで用いられる封じ込め方法は、環境からトランスジェニック植物を守ることによる医薬品の品質確保と、トランスジェニック植物から環境を守ることによる環境保護のそれぞれの領域において機能すると考えられる。EU 内で導入遺伝子を持つ植物組織の栽培あるいは加工に責任を持つ製造業者は、地域の GMO と他の環境規制、特に Directive 2001/18/EC に従わなければならない。封じ込めのための方策は、トランスジェニック植物の直接の消費あるいは食物連鎖への意図しない放出により、ヒトや動物が意図的にあるいは事故によりトランスジェニック植物を摂取することを防ぐものでなければならない。

4. ガイドライン

4.1 遺伝子組換え体の作製

4.1.1 宿主植物

申請者は、宿主植物の表現型／遺伝子型の種類と安定性、管理可能な環境下での日常的な栽培への適合性、外来因子（例：植物ウイルス／ウイロイド、カビ）の感染に対する感受性／耐性、タンパク質の翻訳後修飾パターン等の事項を考慮して、遺伝子導入に用いた宿主植物の選択に関してその妥当性を記載する必要がある。

選択した植物については、分類学に関する文献を引用して、科、属、種、亜種、栽培品種、一般的な名称を明示する。植物の糖鎖修飾パターンや成長特性、耐性の改変のように、宿主植物自身の特性が改変されることもある。そのような場合は、改変された宿主植物の樹立について詳細に記載し、用いられた方法も説明すること。

宿主植物が、二次代謝産物（例えば、薬理活性を持つアルカロイドや配糖体）のようにヒトに有害な可能性のある成分を産生することが知られている場合は、適切な精製法を開発し、リスクアセスメントを提示すること。

4.1.2 導入遺伝子および遺伝子発現構成体

製造業者は、タンパク質をコードする塩基配列の起源を記載する必要がある。DNA配列の改変は全て明らかにして記載すること。

最初の形質転換体を得るために用いられた遺伝子導入法が適切であることを示し、遺伝子発現構成体の構築についても詳細に記載すること。アグロバクテリウムのような微生物による遺伝子導入法を用いた場合は、用いたシステムの起源、履歴、生物学的特性に関する完全な文書を提示すること。遺伝子発現構成体に関しては、複製起点、選択マーカー、レポーター遺

伝子、プロモーター、エンハンサー、リーダー／ターゲット配列などの各要素の起源と機能を記載すること。プラスミドの構成要素の詳細なマップと注釈付きの全長配列を、構築の段階で配列を解析した領域と文献から引用した領域が分かるような形で示すこと。目的遺伝子のコーディング領域とベクターに挿入されているコーディング領域近傍の塩基配列について、ベクターとの境界部位より上流を含めて決定すること。プラスミドにコードされる他の発現タンパク質についても記載すること。宿主植物の特性を制御あるいは改変するために導入あるいは改変される目的遺伝子以外の遺伝子（例えば、糖転移酵素の発現や阻害に影響する因子、播種性に影響する因子）について、情報を記載し、説明すること。

4.1.3 最初の形質転換体の作出

形質転換の方法と用いた試薬・機器を記載すること。最初の、あるいは、最終的に得られた形質転換体について、導入または修飾された遺伝子の状態を適切に記載すること。これには、少なくとも、目的の配列、挿入された部位および数、単純反復配列、逆方向反復配列、インサート配列、インサート近傍領域、挿入の連結部位、形質転換の工程での残存物に関する情報（例：アグロバクテリウムの感染後の運命）を含むこと。

4.1.4 最終的な形質転換体の樹立

形質転換により作出された最初の形質転換体は通常、最終的なあるいは生産用の形質転換体を得るために何世代かにわたって栽培される。販売承認申請においてこれらは、最初の形質転換体を T0、続く世代については T1、T2、T3 等、製造用の形質転換体を T_p とするが、適宜、他の命名法も使用可能であろう。これらの工程については、全ての操作、用いた試薬と培地に関する情報を含めて、詳細に記載するこ

と。

形質の優れた植物株 (elite line) を製造工程で用いる場合は、その正当性を示し、主な組換え株に関して詳細に記載すること。交配操作に関して詳細に記載すると共に、作出した植物株の性質に交配操作が与える影響を明らかにして記載すること。

4.1.5 遺伝子組換え体のバンキングシステム

他に正当と判断されるものがなく、可能であれば、バッチ間の一定性を確保するための戦略にバンキングシステムを含むこと。製造の戦略に応じて、生産株と elite line の双方のバンクが必要であろう。医薬品製造基材のバンキングシステムやバイオ医薬品の生産に用いられる材料に関する基本原則は CHMP ガイドラインに記載されているので、トランスジェニック植物由来有効成分の生産システムを考える際に考慮すること。

したがって製造業者は、長期の保管が可能で、多くの回数の製造に対して一定の品質を保った十分量の出発原料を供給可能なマスターおよびワーキング・トランスジェニック・バンクを、最終的な形質転換体から作製する必要がある。これらのバンクは、長期にわたる供給を確保するために十分な規模で作製すること。

マスターおよびワーキング・トランスジェニック・バンクを作製・樹立・維持した過程は、明確に記載すること。マスター・トランスジェニック・バンクおよびワーキング・トランスジェニック・バンクの特性解析と品質試験に適用される方法には、評価対象となっている特定のトランスジェニック植物の事情に応じ、CHMP が採用したガイドラインに定められた原則を考慮すること。マスター・トランスジェニック・バンク作製に用いられる植物材料は、遺伝子型と表現型が十分に解析されている必

要がある。導入遺伝子に起因するジーンサイレンシング活性や多形質発現効果のように、生産用作物に影響し、結果として有効成分の品質や安全性に影響するような全ての特性を明らかにするために、マスター・トランスジェニック・バンク作製に用いられる材料の特性解析は、植物学、園芸学、農学、および、植物化学的な性質に関する非形質転換体との比較を含めて実施される必要がある。

この解析には、導入遺伝子 (例えば、配列、完全性、挿入部位、コピー数、マーカー配列の運命)、遺伝子発現 (組織/器官特異性、調節、発現量)、植物のジーンサイレンシング効果、他のタンパク質の過剰発現、倍数性、核型の分析を含むこと。

バンク化されたものの安定性を検証し、結果に基づいて以下のことを明らかにすること。

- ・ 容器と包装の規格および試験方法
- ・ 貯法
- ・ 有効期限

4.1.6 遺伝的安定性

最初の形質転換体の段階から収穫時点まで、生産システムの遺伝的安定性を明らかにすること。安定性は、継代された作物のデータを含めて決定すること。定められた栽培条件での植物齢の限界を規定すること。遺伝的安定性試験は、栽培期間中の工程管理から得られる補足的なデータと、有効成分のバッチの品質試験結果によって補完する必要がある。販売承認申請書の中でこれらの事項を相互に関連付けることが重要である。

4.2 製造工程関連事項

4.2.1 一般的な製造方法

全て生物学的有効成分において、生産システムとその管理は、生産の一定性と生産される製