

**Fig. 5.** N-linked oligosaccharide profile of the monoclonal antibody product. LC, nanoFrontier nLC system (Hitachi High-Technologies); Column, Hypercarb (150 × 0.075 mm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific); flow rate, 200 nl/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 9.6); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 9.6); gradient condition, 5–50% B (110 min); MS, LTQ-FT; electron voltage, 1.8 kV (positive ion mode).

**Table 1.** Peak area ratios of N-linked oligosaccharides and glycopeptides of monoclonal antibody product

Peak No.	Deduced structure	Peak area ratio <sup>a</sup>	
		Oligosaccharide	Glycopeptide
a		4.4	8.4
b		47.9	52.1
c		3.4	2.4
d		1.8	10.6
e		24.5	23.1
f		8.3	
g		6.4	3.3
h		1.8	—
i		1.6	—

<sup>a</sup> Peak area of each peak/total peak area.

by glycan profiling was higher than that determined by MS performed for the released glycopeptides.

## 2) FSH

FSH, a pituitary hormone, stimulates the growth of

## 2) FSH

下垂体ホルモンである FSH は、女性では、卵巣に作用して卵胞成長を促進させ、男性では、精巣セルトリ細胞に作用して精子形成を促す。ヒト FSH は 92 個のアミノ酸残基から

graafian follicles in the ovaries and enhances sperm development in the sertoli cells. Human FSH is composed of an  $\alpha$ -chain consisting of 92 amino acid residues and a  $\beta$ -chain consisting of 111 amino acid residues. The  $\alpha$ -chain of human FSH is similar to those of the human luteinizing hormone, human chorionic gonadotropin (hCG), and human thyrotropin. N-linked oligosaccharides are attached to 2 sites each on the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains, and these linkages are associated with the half-life of FSH in the blood (15,16). Follitropin Alfa and Follitropin Beta, whose amino acid sequences are identical to that of human FSH, are approved drugs in Japan; they are produced in CHO cells by using biotechnological techniques and consist of alfa and beta glycoforms, respectively. In Japan, Epoetins and Agalsidases are also distinguished in terms of the differences in their glycoform constituents. By performing glycan profiling, we compared Follitropin Alfa and Follitropin Beta with regard to the differences in glycosylation.

The desired proteins were isolated from additives in the products by performing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Further, glycan profiling was performed for N-linked oligosaccharides that were obtained in bands on the gel at the position corresponding to the molecular weight of FSH (Fig. 6) (9).

なる $\alpha$ 鎖1分子と111個のアミノ酸残基からなる $\beta$ 鎖1分子から構成されている。 $\alpha$ 鎖は黄体形成ホルモン、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG)、及び甲状腺刺激ホルモンに共通である。 $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖にそれぞれ2本のN結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は血中半減期に影響する(15,16)。日本では、ホリトロピン アルファ及びフォリトロピン ベータが承認されている。これらはCHO細胞で産生された糖タンパク質で、それぞれアルファグリコフォーム及びベータグリコフォームからなる。このように糖鎖の違いによって異なる医薬品として区別されている医薬品は、国内では他にエポエチンとアガルシダーゼがある。我々は、糖鎖プロファイリングによって、ホリトロピン アルファとフォリトロピン ベータの糖鎖の違いを調べた。

SDS-PAGEによって製剤中の賦形剤から目的タンパク質を分離し、FSHの分子量に相当するバンドからN結合型糖鎖を切り出して糖鎖プロファイリングを行った(Fig. 6) (9)。ホリトロピン アルファ及びフォリトロピン ベータに結合している糖鎖は、主に2本鎖糖鎖(±シアル酸)で、結合している糖鎖の種類にはあまり大きな違いは見られなかった。糖鎖の違いでこの2つの品目を区別するためには、定量的解析を行う必要があるだろう。今後、バイオ後続品開発における糖鎖の同等性・同質性の評価に、このような簡単な精製と

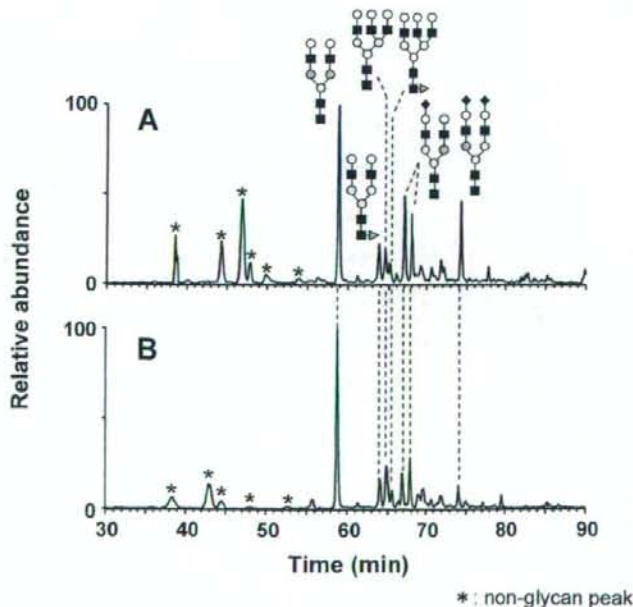


Fig. 6. N-linked oligosaccharide profiles of Follitropin Alfa (A) and Beta (B). Analytical condition: see Fig. 5.

Most of the glycans identified in both Follitropin Alfa and Follitropin Beta were biantennary oligosaccharides (containing or lacking sialic acid), and only a slightly significant difference was noted between the 2 drugs with regard to the variety in their glycan content. Quantitative analyses would be required to distinguish these drugs in terms of the degree of glycosylation. The simple isolation procedure described above, along with microanalysis, may facilitate comparative assessments of glycoproteins for the development of biosimilar or follow-on biological products.

#### D. Relative quantification of glycans

Although stable isotope-labeled compounds are generally used for quantification by MS, it is difficult to obtain isotope-labeled forms of all types of glycans due to the wide diversity of glycans. However, isotope-labeled oligosaccharides prepared from glycoprotein standards could be used for relative quantification during glycan characterization. We have previously developed a method for quantitative glycan profiling that involves the use of deuterium-labeled 2-amino pyridine, which is one of the common reagents used for glycan derivatization (24). Recently, other research groups have reported alternative methods involving deuterium labeling (25-27).

The strategy adopted for quantitative glycan profil-

微量分析が役立つかもしれない。

#### D. 糖鎖の比較定量

MSによる定量解析には通常、安定同位体標識物質が用いられるが、糖鎖は種類が多いので、すべての同位体標識糖鎖をそろえるのは困難である。しかし、糖タンパク質医薬品の糖鎖試験では、その医薬品標準物質から切り出した糖鎖を同位体で標識して比較定量に用いてもよいと考えられる。我々は、糖鎖標識化試薬として国内で最も汎用性の高い2-アミノピリジンの重水素置換体を用いた比較定量法を開発している(24)。最近、他の研究グループからも別の重水素置換法が報告されている(25-27)。

Fig. 7に、2-アミノピリジン重水素置換体を用いた糖鎖比較定量法の概略を示す。試料から切り出した糖鎖は重水素

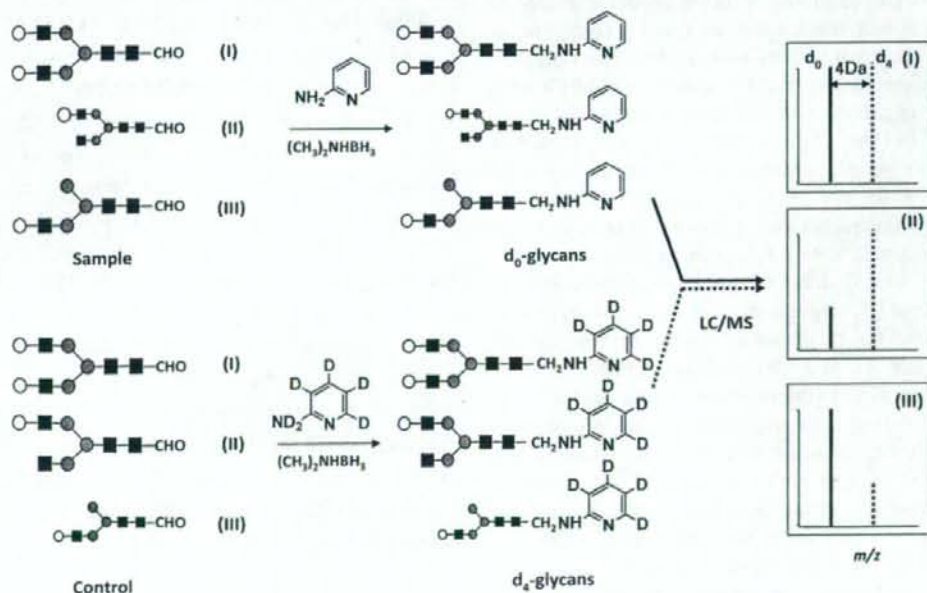


Fig. 7. The quantitative glycan profiling by using the stable isotope tagging method and LC/MS. (I) sample = control, (II) sample < control, (III) sample > control.



ing using deuterium-labeled 2-amino pyridine is illustrated in Fig. 7. Non-deuterium-labeled PA glycans ( $d_0$ -PA glycans) are derived from oligosaccharides that are released from a sample glycoprotein by tagging the oligosaccharides with non-deuterium-labeled 2-amino pyridine. Oligosaccharides derived from a glycoprotein standard are treated with deuterium-labeled 2-amino pyridine to produce tetra-deuterium-labeled glycans ( $d_4$ -PA glycans). A mixture of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA glycans prepared from equal amounts of glycoproteins is subjected to LC/MS, and the glycans are detected as paired ions that differ by 4 Da. Although the  $d_0$ - and  $d_4$ -PA glycans are eluted at slightly different time points, the molecular ratios of individual glycans released from the sample and standard glycoproteins are calculated from the peak-area ratios of the protonated  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans. This method was applied for the differential analysis of N-linked oligosaccharides obtained from human-derived hCG and recombinant hCG.

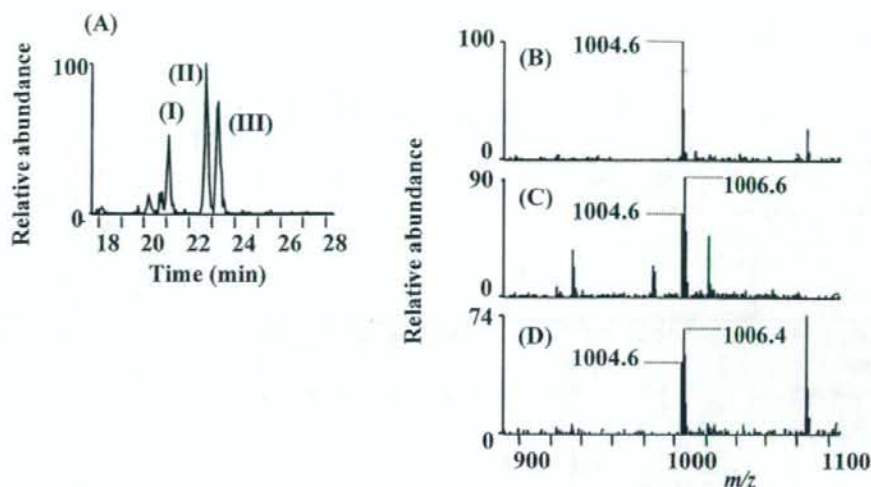
#### 1) hCG

HCG is a glycoprotein hormone composed of an  $\alpha$ -chain, which is identical to that of FSH, and a  $\beta$ -chain consisting of 145 amino acid residues (28,29). HCG derived from the urine of healthy pregnant women is marketed in Japan, and choriongonadotropin alfa, which possesses the same amino acid sequence as hCG but different glycoforms than those of human origin, has been approved in the United States. N-linked oligosaccharides of human origin and those obtained from a recombinant protein were derivatized to  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans and subjected to relative quantification (24). Both types of hCGs were predominantly attached to sialylated biantennary oligosaccharides, but they differed significantly with regard to some of their glycan constituents. The mass chromatogram obtained for one of the glycans—a monosialylated biantennary oligosaccharide—is shown in Fig. 8A. Three predominant isomers were found in the chromatogram. Figure 8B, C, and D shows the mass spectra obtained for peaks I, II, and III, respectively. Protonated molecules of both the  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans were found in the mass spectra of peaks II and III, and their peak-area ratios suggested that these glycans were linked to the human-derived hCG to a greater extent than they were to the recombinant hCG. In contrast, only  $d_0$ -PA glycans were found in the mass spectrum of peak I; this suggested that this isomer was attached only to recombinant hCG. It is difficult to detect such isomeric differences by performing MS alone or even LC/MS for glycopeptides. Quantitative glycan profiling could be used in tests for characterizing the glycans in glycoprotein-based substances.

未置換 2-アミノピリジンで標識し、ピリジリアミノ化糖鎖未置換体 ( $d_0$ -PA 糖鎖) とする。一方、標準糖タンパク質から切り出した糖鎖は、重水素置換 2-アミノピリジンで標識してピリジリアミノ化糖鎖 4 重水素置換体 ( $d_4$ -PA 糖鎖) とする。等量のタンパク質から調製した  $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖を混合し、LC/MS を用いて糖鎖プロファイリングを行うと、 $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖は質量 4 Da 異なる一対のプロトン化分子として検出される。 $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖の保持時間は僅かにずれるが、 $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖のプロトン化分子のピーク面積比から、サンプルと標準タンパク質間の個々の糖鎖の量比を求めることができる。以下に、この方法をヒト由来 hCG と遺伝子組換え hCG の N 結合型糖鎖の差異解析に応用した例を示す。

#### 1) hCG

hCG は、FSH と同一のアミノ酸配列を持つ  $\alpha$  鎖と 145 個のアミノ酸残基からなる  $\beta$  鎖 1 分子から構成される糖タンパク質である (28,29)。国内では健康な妊婦尿から抽出された hCG が販売されている。また、米国では、CHO 細胞で産生され、アミノ酸配列が hCG と同一で、糖鎖部分がヒト由来 hCG とは異なる choriongonadotropin alfa が承認されている。我々は、ヒト由来 hCG 及び遺伝子組換え hCG から切り出した N 結合型糖鎖をそれぞれ  $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖として、比較定量を行った (24)。いずれの hCG においても主な N 結合型糖鎖はシアル酸が結合した 2 本鎖糖鎖であったが、一部の糖鎖に有意な違いが認められた。その中の一つであるモノシアリル 2 本鎖糖鎖のマスプロファイルグラムを Fig. 8A に示す。主に 3 種類の異性体が存在することがわかった。ピーク I ~ III のマススペクトルをそれぞれ Fig. 8B ~ D に示す。ピーク II 及び III のマススペクトルには  $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖のプロトン化分子が確認され、ピーク面積比から、この糖鎖は組換え型よりもヒト由来 hCG に多いことが確認された。これに対してピーク I のマススペクトルには  $d_0$ -PA 糖鎖しか観測されなかったことから、この糖鎖異性体は、遺伝子組換え hCG にしか結合していないことが明らかになった。このような異性体間の差異は、MS 単独による糖鎖解析、もしくは糖ペプチドの LC/MS では見つけることが難しく、今回の結果は、糖タンパク質医薬品の糖鎖試験における定量的糖鎖プロファイリングの糖鎖試験法としての可能性を示唆するものといえよう。



**Fig. 8.** (A) (24) Mass chromatogram of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA monosialylated complex type biantennary. (B)-(D) Mass spectra of peaks (I)-(III), respectively. Intensity of the most intense ion at each scan is taken as 100%. LC, Magic 2002 HPLC system (Michrom BioResources); column, Hypercarb (150  $\times$  0.2 mm, 5  $\mu$ m); flow rate, 2  $\mu$ l/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 8.5); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 8.5); gradient condition, 5–20% B (20 min), 20–70% B (15 min), 70–95% B (5 min); MS, TSQ7000 (Thermo Fisher Scientific); electrospray voltage, 1.5 kV (negative ion mode).

### E. Application to glycomics

Glycomics is the study of a set of glycans in cells and tissues. Investigations to identify disease-associated glycans may lead to the development of more efficient diagnostic techniques and drugs, and such investigations are therefore attracting considerable attention (30–32). The methodology proposed here for the structural characterization of glycoprotein-based substances could have applications in glycomics. Here, we demonstrate the use of LC/MS for glycomics, simultaneous glycosylation analysis of major serum glycoproteins, and differential analyses of mice with systemic lupus erythematosus (SLE) and control mice with regard to the degree of glycosylation in kidney glycoproteins.

#### 1) Simultaneous glycosylation analysis of serum glycoproteins

Most proteins in serum are glycosylated, and the glycan moieties in some glycoproteins are known to be altered in certain diseases. For instance, the Gal content of N-linked oligosaccharides present in IgG decreases in patients with chronic articular rheumatoid arthritis (33–35) and Crohn's disease (36). In some types of cancer, acute-phase proteins, including haptoglobin, undergo fucosylation and branching (37–42). An LCA-reactive  $\alpha$ -fetoprotein is used as a highly sensitive and specific

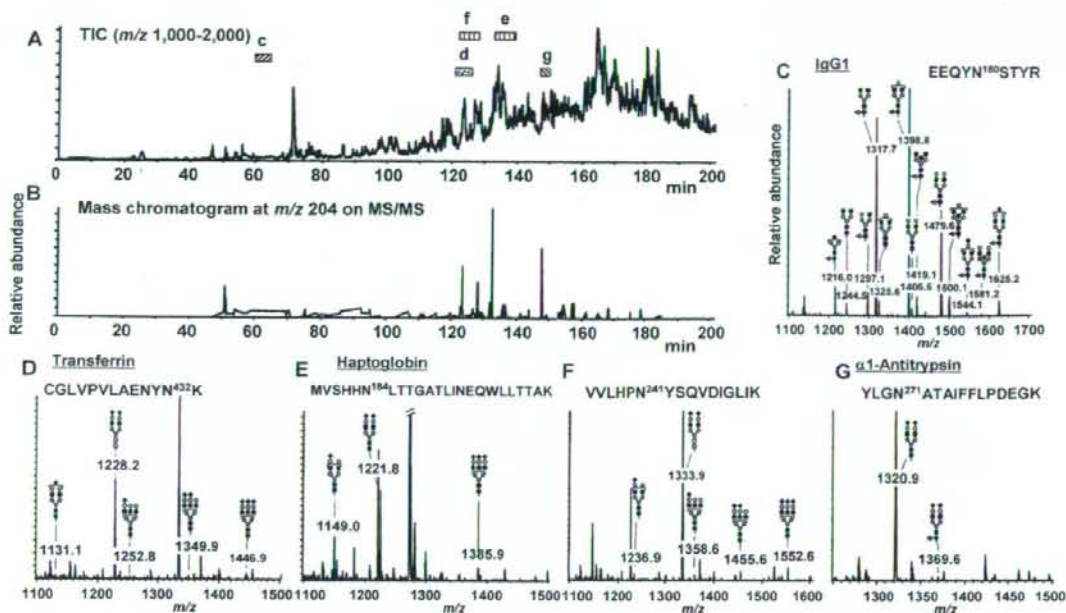
### E. グライコムクスへの応用

グライコムクスは、細胞や組織などに存在する糖鎖セットを解析する研究である。中でも、疾患関連糖鎖の解析は、より効果的な診断や新規医薬品開発につながる可能性があり、高い関心を集めている(30–32)。本稿で紹介してきた糖タンパク質医薬品の構造特性解析技術は、グライコムクスにも応用可能である。ここでは、LC/MSをグライコムクスに応用した例として、血清中の主な糖タンパク質の糖鎖を一斉に解析した例と、全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスとその対照マウスの腎臓糖鎖の差異解析を行った例を紹介する。

#### 1) 血清糖タンパク質由来糖ペプチドの一斉分析

血清中のタンパク質の多くは糖鎖付加を受けており、その中のいくつかの糖タンパク質の糖鎖は、疾患に伴って変化することが知られている。例えば、慢性関節リウマチ(33–35)やクローン病(36)では、IgGに結合しているN結合型糖鎖のガラクトース含量が減少することが知られている。また、種々の癌において、ハプトグロビンなどの急性期タンパク質と呼ばれるタンパク質の糖鎖のフコシル化や分岐化が進むことが観察されている(37–42)。さらに、LCAレクチン結合性の $\alpha$ フェトプロテインは、高感受特異的な肝癌マーカーとして利





**Fig. 9.** LC/MS/MS of tryptic digest of human serum (45). (A) TIC ( $m/z$  1,000–2,000). (B) Mass chromatogram ( $m/z$  204) obtained by the data-dependent MS/MS. (C) Mass spectra of IgG1 (P01857), EEQYN<sup>180</sup>STYR; (D) transferrin (P02787) CGLVPVLAENY<sup>432</sup>K; (E) haptoglobin (P00738), MVSHHN<sup>184</sup>LTTGATLINEQWLLTTAK; (F) haptoglobin, VVLHPN<sup>241</sup>YSQVDIGLIK; (G)  $\alpha$ 1-antitrypsin (P01009), YLGN<sup>271</sup>ATAIFFLPDEGK. LC, Paradigm MS4 HPLC system; Column, MonoCap High-Resolution 750 (750  $\times$  0.2 mm, GL Sciences); flow rate, 2  $\mu$ l/min; A buffer, 0.1% formic acid/2% acetonitrile; B buffer, 0.1% formic acid/90% acetonitrile; gradient condition, 5–65 % B (180 min); MS, Qstar pulsar i (Applied Biosystems); electrospray voltage, 1.7 kV (positive ion mode).

biomarker for the diagnosis of liver cancer (43,44). We simultaneously analyzed site-specific glycosylation in some serum glycoproteins by direct injection of tryptic serum into the LC/MS system (45).

Commercially available human serum (5  $\mu$ l), from which most of the albumin had been removed with the use of an albumin-removal kit, was carboxymethylated and digested with trypsin. Figure 9A and 9B shows the total-ion chromatogram (TIC) observed in a single MS scan of tryptic serum and the mass chromatogram of a carbohydrate-distinctive ion ( $m/z$  204) obtained by performing a data-dependent MS/MS (7, 46–48). Acquisition of the glycopeptide's MS data was confirmed in most of the peaks appearing in the mass chromatogram. The peptide moiety of each glycopeptide was deduced by performing a database search for the fragments that arose in the MS/MS and/or by comparing the calculated mass with the theoretical mass of [peptide + H]<sup>+</sup> or [peptide + HexNAc + H]<sup>+</sup>. Figure 9C–G shows the representative mass spec-

用されている(43,44)。我々は、血清のトリプシン消化物を直接 LC/MS システムに注入することによって、血清中のいくつかの糖タンパク質の部位特異的糖鎖を一斉に解析した(45)。

市販のヒト血清 5  $\mu$ l からアルブミン除去キットを用いてアルブミンを除去し、還元カルボキシメチル化した後トリプシンで消化した。Fig. 9A 及び 9B はそれぞれ、トリプシン消化物のシングル MS スキャンによって得られた TIC、及びデータ依存的 MS/MS で生じた糖鎖特異的のイオン HexNAc<sup>+</sup> ( $m/z$  204) のマス chromatogram を示したものである(7,46–48)。Fig. 9B で現れたピーク位置にはほぼ糖ペプチドの MS データが取り込まれていた。各糖ペプチドのペプチド部分は、MS/MS で生じたフラグメントのデータベース検索、もしくは、[peptide + H]<sup>+</sup> または [peptide + HexNAc + H]<sup>+</sup> の  $m/z$  値を理論値と照合することによって推定した。代表的な糖ペプチドのマススペクトルを Fig. 9C ~ G に示す。Fig. 9C は IgG1 由来のペプチド EEQYN<sup>180</sup>STYR のマススペクトルで、

tra of glycopeptides in tryptic serum. Figure 9C shows the mass spectrum of EEQYN<sup>186</sup>STYR derived from IgG1, which contains the protonated molecules of agalactosyl, mono- and digalactosyl biantennary oligosaccharides. Figure 9D shows the mass spectrum of CGLVPVLAENY N<sup>432</sup>K derived from transferrin. Its major glycan peak was assigned to disialylated biantennary oligosaccharides, and the minor peaks were assigned to monosialylated biantennary and trisialylated triantennary oligosaccharides. Figure 9E and F shows the mass spectra of glycopeptides derived from haptoglobin. Most of the glycans were determined to be biantennary and triantennary oligosaccharides, and few were fucosylated glycans. The mass spectrum of an  $\alpha$ 1-antitrypsin glycopeptide (YLG<sup>N</sup><sup>271</sup>ATIAFFLPDEGK) is shown in Fig. 9G; a disialylated biantennary oligosaccharide was detected in this glycopeptide. The carbohydrate structures predicted in the present simultaneous analysis were almost identical to those predicted in previous studies, wherein isolated glycoproteins or glycopeptides were subjected to site-specific glycosylation analyses (20, 49). Advances in analytical techniques involving LC/MS have enabled site-specific glycan profiling to be performed without the need for the purification of individual glycoproteins.

## 2) Differential analysis of glycans in the kidney glycoproteins of mice with SLE and control mice

SLE is an autoimmune disease that is characterized by chronic and systemic diseases such as kidney failure, arthritis, and erythema. Murine models of SLE, wherein the mice naturally develop glomerular nephritis as an SLE-related condition, are widely used to clarify the pathogenic mechanisms underlying the development of SLE (50-52). MRL/MpJ-lpr/lpr (MRL-lpr) mice, which are commonly used in murine models of SLE, lack the gene encoding the Fas antigen that is associated with apoptosis; this results in the escape of autoreactive lymphocytes into the thymus and an increase in immune-complex deposition. Mizuochi et al reported that the serum IgG of MRL-lpr mice contains elevated amounts of glycans lacking a Gal residue (53). Further,  $\alpha$  mannosidase-II ( $\alpha$ M-II)-deficient mice have been reported to suffer from diseases associated with SLE, including kidney failure (54,55). Changes in the degree of glycosylation and the content of mannose-binding lectin may be associated with the development of SLE-associated diseases in this murine model (56-58). By using the isotope-tagging method, we compared glycosylation of proteins in the disordered kidneys of the MRL-lpr mice with those in the normal kidneys of control mice (59).

N-linked oligosaccharides were isolated from the kidneys of the MRL-lpr mice affected with glomerular nephritis and derivatized to d<sub>0</sub>-PA-glycans. A mixture of

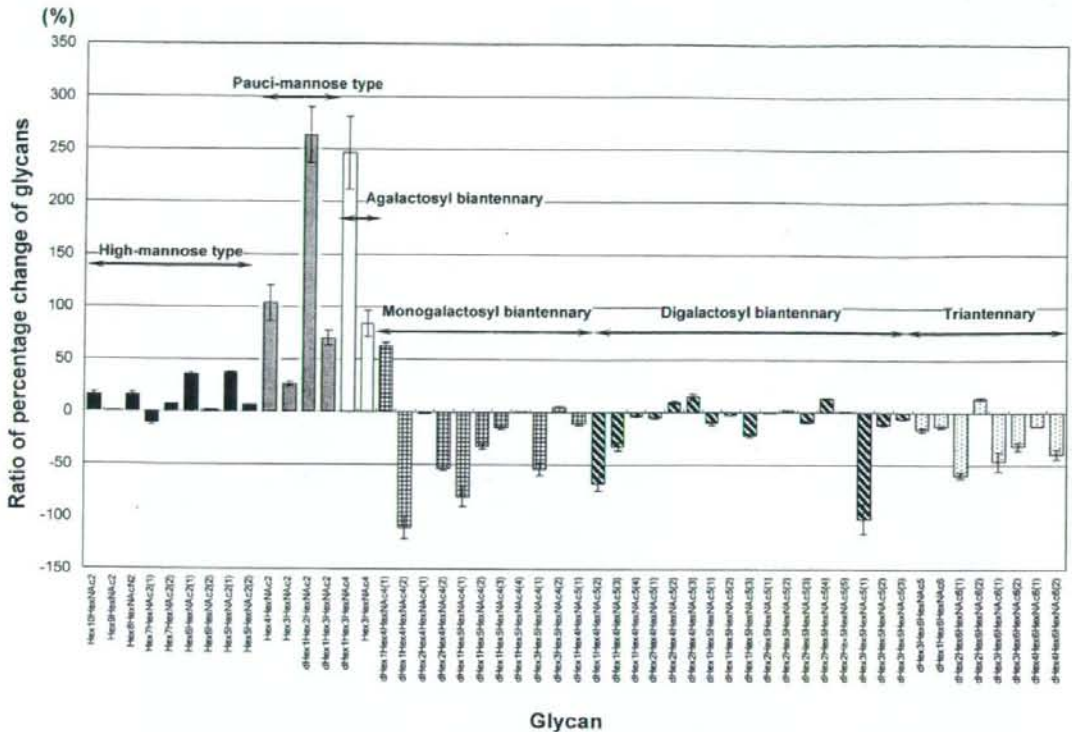
ガラクトースが0~2個結合した2本鎖糖鎖が観測された。Fig. 9Dはトランスフェリン由来のペプチド CGLVPVLAENY N<sup>432</sup>K のマススペクトルで、主な糖鎖としてジシアリル2本鎖糖鎖が、またその他のマイナー糖鎖としてモノシアリル2本鎖及びトリシアリル3本鎖糖鎖が結合していた。Fig. 9E及びFは、ハプトグロビン由来糖ペプチドのマススペクトルである。ハプトグロビンの主な糖鎖は2本鎖及び3本鎖糖鎖で、フコシル化糖鎖はほとんど認められなかった。Fig. 9Gは、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン由来のペプチド YLG<sup>N</sup><sup>271</sup>ATIAFFLPDEGK のマススペクトルで、ジシアリル2本鎖糖鎖が主に結合していた。この一斉分析によって推定された糖鎖構造は、個々の糖タンパク質を単離して解析された過去の報告にはば一致した(20, 49)。このように、LC/MSを用いた糖鎖解析技術の進展によって、タンパク質を単離することなく糖鎖結合部位ごとの糖鎖のプロファイルを明らかにすることが可能になってきた。

## 2) SLE モデルマウスと対照マウスの腎臓糖鎖の差異解析

SLEは自己免疫性疾患の一つで、腎臓機能低下、関節炎、紅斑など全身性症状を呈する慢性疾患である。発症機構を解明するため、ヒトSLE様症状を自然発症する様々なモデルマウスを使った研究が進められている(50-52)。その中の一つであるMRL-lpr/lpr (MRL-lpr)マウスは、アポトーシスに関与するFas抗原遺伝子が欠損している。MRL-lprマウスの血清には、ガラクトースが欠失した2本鎖糖鎖を持つIgGが増加していることが知られている(53)。また、 $\alpha$ -マンノシダーゼIIを欠損したマウスではSLE様の糸球体腎炎を発症することが報告されている(54,55)。これらのモデルマウスにおけるSLE様症状の発症には、糖鎖構造の変化やマンノース結合レクチンが関与している可能性が指摘されている(56-58)。我々は、糖鎖の比較定量法を用いて、SLEモデルマウスと対照マウスの腎臓の糖鎖プロファイルを比較した(59)。

糸球体腎炎を発症しているモデルマウスMRL-lprの腎臓からN結合型糖鎖を切り出し、d<sub>0</sub>-PA糖鎖とした。これに、対照マウス(MRL-+/+)腎臓から調製したd<sub>0</sub>-PA糖鎖を混合して定量的糖鎖プロファイリングを行った。Fig. 10は、d<sub>0</sub>及びd<sub>4</sub>-PA糖鎖のピーク面積比を示したものである。SLEモデルマウスでは、バウチマンノース型糖鎖(60-62)やガラクトースが欠損した低分子量の比較的単純な構造を持つ糖鎖が増加し、ガラクトースやフコースが複数結合した複雑な構造





**Fig. 10.** Rate of percentage change in  $d_0/d_4$ -glycans (59). Each value is the average from three biological repeats. The error bars correspond to the standard deviation. LC, Magic 2002 HPLC system; Column, Hypercarb (150 × 0.2 mm, 5  $\mu$ m); flow rate, 2  $\mu$ l/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 9.6); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 9.6); gradient condition, 5–45% B (90 min); MS, LTQ-FT; electrospray voltage, 2.0 kV (positive ion mode); resolution of FTMS, 50,000.

$d_0$ -PA glycans and  $d_4$ -PA glycans that was prepared from the kidneys of the control mice (MRL-+/+) was subjected to quantitative glycan profiling. The peak-area ratios of the  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans are shown in Fig. 10. The differential analysis performed for the SLE-model mice revealed an increase in the number of low-molecular-mass glycans exhibiting a simple structure, such as pauci-mannose-type oligosaccharides (60–62), and of complex oligosaccharides lacking Gal residues, accompanied by a decrease in the number of complex glycans containing multiple Fuc and Gal residues. These results suggest that the number of N-glycans synthesized during the early stage of the N-glycan biosynthetic pathway increases, while that of N-glycans synthesized during the late stage decreases in mice with SLE. Our present findings may be attributed to some alteration in the biosynthetic pathway of N-glycans. Such changes in the degree of glycosylation may induce an aber-

をもつ糖鎖は減少していることが明らかになった。このことは、N結合型糖鎖合成過程の後期に生成される成熟した糖鎖は減少し、合成初期の未成熟な糖鎖が増えていることを示している。これらの結果は、糖鎖生成過程に変化が生じていることを示唆している。このような糖鎖の変化は、SLEモデルマウスにおける異常な免疫反応や腎臓障害に関係があるのかもしれない。



rant immune response and kidney disorders in mice with SLE.

#### F. Issues to be addressed in future

We have outlined the glycosylation analysis-related issues that should be considered for the manufacture of glycoprotein products, and we have discussed the potential applications of MS for the characterization, quality testing, and comparative assessment of glycoprotein-based products. For accurate evaluation of glycoprotein products by MS, it is necessary to clarify the applicability of MS to glycosylation analysis and to establish relevant methods for the MS-based analysis of glycosylation. In particular, a general glycosylation analysis protocol that is not influenced by the type of mass spectrometer and software used is required. Furthermore, the harmonization of methodologies adopted for MS-based glycosylation analysis among the United States, European Union, and Japan would aid drug-discovery research worldwide.

#### Acknowledgment

The present study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

#### References

1. <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/new/h19pharmaceutical.html> (Accessed 4, F., 2008). 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構ホームページ.
2. 宮田直樹 (2006) 第1回 Pharm. Tech. Japan. 22, 39-43
3. Hase, S. (1994) Methods Enzymol. 230, 225-237
4. Jackson, P. (1991) Anal Biochem. 196, 238-244
5. Hardy, M. R. and Townsend, R. R. (1994) Methods Enzymol. 230, 208-225
6. Zaia, J. (2004) Mass Spectrom Rev. 23, 161-227
7. Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2005) Glycobiology. 15, 447-462
8. Sandra, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., Stals, I. and Claeysens, M. (2004) J Am Soc Mass Spectrom. 15, 413-423
9. Itoh, S., Kawasaki, N., Hashii, N., Harazono, A., Matsuishi, Y., Hayakawa, T. and Kawanishi, T. (2006) J Chromatogr A. 1103, 296-306
10. Wührer, M., Koeleman, C. A., Hokke, C. H. and Deelder, A. M. (2005) Anal Chem. 77, 886-894
11. Itoh, S., Takakura, D., Kawasaki, N. and Yamaguchi, T. (in press) The Protein Protocols Handbook
12. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英 (2007) 抗体医薬の最前線.
13. Harris, R. J., Leonard, C. K., Guzzetta, A. W. and Spellman, M. W. (1991) Biochemistry. 30, 2311-2314
14. Pohl, G., Kenne, L., Nilsson, B. and Einarsson, M. (1987) Eur J Biochem. 170, 69-75
15. 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイード, 徳永裕司, 春日井勲, 早川亮夫 (1994) 医薬品研究 25, 405-425
16. 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイード, 徳永裕司, 春日井勲, 早川亮夫 (1994) 医薬品研究 25, 501-523
17. 一瀬白帝 (血栓・止血・血管学, 血栓症抑圧のために), 中外医学社
18. Domon, B. and Costello, C. E. (1988) Glycoconjugate J. 5, 397-409
19. Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. and Presta, L. G. (2002) J Biol Chem. 277, 26733-26740
20. Wada, Y., Azadi, P., Costello, C. E., Dell, A., Dwek, R. A., Geyer, H., Geyer, R., Kakehi, K., Karlsson, N. G., Kato, K., Kawasaki, N., Khoo, K. H., Kim, S., Kondo, A., Lattova, E., Mechref, Y., Miyoshi, E., Nakamura, K., Narimatsu, H., Novotny, M. V., Packer, N. H., Perreault, H., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G., Reinhold, V. N., Rudd, P. M., Suzuki, A. and Taniguchi, N. (2007) Glycobiology. 17, 411-422
21. Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T. (2002) J Chromatogr A. 968, 89-100
22. Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M. and Hayakawa, T. (2003) Anal Biochem. 316, 15-22
23. Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T. (2000) Anal Biochem. 285, 82-91
24. Yuan, J., Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2005) J Chromatogr A. 1067, 145-152

#### F. 今後の課題

本稿では、糖タンパク質医薬品開発における重要課題の中から糖鎖関連事項を取り上げて概説するとともに、構造特性解析、糖鎖確認試験及び同源性・同質性評価におけるMSの可能性を示した。MSを糖タンパク質医薬品評価により幅広く活用していくためには、MSが糖鎖解析にどこまで適用可能なかを明確にし、開発メーカー、装置のタイプ、あるいは解析ソフト等に影響されない標準的分析方法を整備する必要がある。さらに、米国、EU及び我が国の間で糖鎖解析法をハーモナイズしていくことは、世界規模での創薬研究推進に大きく寄与することになるだろう。

#### 謝辞

本稿で紹介した内容は、厚生労働科学研究費補助金の研究成果の一部である。

25. Alvarez-Manilla, G., Warren, N. L., Abney, T., Atwood, J., 3rd, Azadi, P., York, W. S., Pierce, M. and Orlando, R. (2007) *Glycobiology*, **17**, 677–687
26. Kang, P., Mechref, Y., Kyselova, Z., Goetz, J. A. and Novotny, M. V. (2007) *Anal Chem*, **79**, 6064–6073
27. Bowman, M. J. and Zaia, J. (2007) *Anal Chem*, **79**, 5777–5784
28. Kobata, A. (1988) *J Cell Biochem*, **37**, 79–90
29. Gervais, A., Hammel, Y. A., Pelloux, S., Lepage, P., Baer, G., Carte, N., Sorokine, O., Strub, J. M., Koerner, R., Leize, E. and Van Dorsselaer, A. (2003) *Glycobiology*, **13**, 179–189
30. Wada, Y. (2007) *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*, **13**, 101–103
31. Faid, V., Chirat, F., Seta, N., Foulquier, F. and Morelle, W. (2007) *Proteomics*, **7**, 1800–1813
32. Miyamoto, S. (2006) *Curr Opin Mol Ther*, **8**, 507–513
33. Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K. and et al. (1985) *Nature*, **316**, 452–457
34. Parekh, R. B., Roitt, I. M., Isenberg, D. A., Dwek, R. A., Ansell, B. M. and Rademacher, T. W. (1988) *Lancet*, **1**, 966–969
35. Omtvedt, L. A., Royle, L., Husby, G., Sletten, K., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., Dwek, R. A. and Rudd, P. M. (2006) *Arthritis Rheum*, **54**, 3433–3440
36. Dube, R., Rook, G. A., Steele, J., Brealey, R., Dwek, R., Rademacher, T. and Lennard-Jones, J. (1990) *Gut*, **31**, 431–434
37. Thompson, S., Dargan, E. and Turner, G. A. (1992) *Cancer Lett*, **66**, 43–48
38. Turner, G. A. (1995) *Adv Exp Med Biol*, **376**, 231–238
39. Otake, Y., Fujimoto, I., Tanaka, F., Nakagawa, T., Ikeda, T., Menon, K. K., Hase, S., Wada, H. and Ikenaka, K. (2001) *J Biochem (Tokyo)*, **129**, 537–542
40. Kossowska, B., Ferens-Sieczkowska, M., Gancarz, R., Passowicz-Muszynska, E. and Jankowska, R. (2005) *Clin Chem Lab Med*, **43**, 361–369
41. Comunale, M. A., Lowman, M., Long, R. E., Krakover, J., Philip, R., Seeholzer, S., Evans, A. A., Hann, H. W., Block, T. M. and Mehta, A. S. (2006) *J Proteome Res*, **5**, 308–315
42. Okuyama, N., Ide, Y., Nakano, M., Nakagawa, T., Yamanaka, K., Moriwaki, K., Murata, K., Ohigashi, H., Yokoyama, S., Eguchi, H., Ishikawa, O., Ito, T., Kato, M., Kasahara, A., Kawano, S., Gu, J., Taniguchi, N. and Miyoshi, E. (2006) *Int J Cancer*, **118**, 2803–2808
43. Aoyagi, Y. (1995) *Glycoconj J*, **12**, 194–199
44. Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., Kiriya, S., Sone, Y., Hayashi, K., Katoh, H., Endoh, T., Sassa, T. and Satomura, S. (1999) *J Hepatol*, **30**, 125–130
45. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T. (2008) *J Chromatogr. B*, **869**, 20–30
46. Carr, S. A., Huddleston, M. J. and Bean, M. F. (1993) *Protein Sci*, **2**, 183–196
47. Huddleston, M. J., Bean, M. F. and Carr, S. A. (1993) *Anal Chem*, **65**, 877–884
48. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Ishii-Watabe, A., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2006) *Anal Biochem*, **348**, 259–268
49. Fujii, S., Nishiura, T., Nishikawa, A., Miura, R. and Taniguchi, N. (1990) *J. Biol. Chem*, **265**, 6009–6018
50. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S. (1992) *Nature*, **356**, 314–317
51. Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. and Nagata, S. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 1756–1760
52. Merino, R., Iwamoto, M., Fossati, L. and Izui, S. (1993) *J Immunol*, **151**, 6509–6516
53. Mizuochi, T., Hamako, J., Nose, M. and Titani, K. (1990) *J Immunol*, **145**, 1794–1798
54. Chui, D., Sellakumar, G., Green, R., Sutton-Smith, M., McQuistan, T., Marek, K., Morris, H., Dell, A. and Marth, J. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 1142–1147
55. Green, R. S., Stone, E. L., Tenno, M., Lehtonen, E., Farquhar, M. G. and Marth, J. D. (2007) *Immunity*, **27**, 308–320
56. Trouw, L. A., Seelen, M. A., Duijs, J. M., Wagner, S., Loos, M., Bajema, I. M., van Kooten, C., Roos, A. and Daha, M. R. (2005) *Mol Immunol*, **42**, 731–740
57. Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R. B. and Jensenius, J. C. (1994) *Immunol Today*, **15**, 67–74
58. Lhotta, K., Wurzner, R. and Konig, P. (1999) *Nephrol Dial Transplant*, **14**, 881–886
59. Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T. *Immunology (in press)*
60. Hase, S., Okawa, K. and Ikenaka, T. (1982) *J Biochem*, **91**, 735–737
61. Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and Marz, L. (1994) *Arch Biochem Biophys*, **308**, 148–157
62. Natsuka, S., Adachi, J., Kawaguchi, M., Nakakita, S., Hase, S., Ichikawa, A. and Ikura, K. (2002) *J Biochem*, **131**, 807–813

Received on February 24, 2008, accepted on May 7, 2008



Profile of the Authors



**Nana Kawasaki** graduated from the department of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University in 1984. She is a member of the division of Biological Chemistry and Biologicals at National Institute of Health Sciences. Her current research focuses on a development of evaluation methods for glycoprotein products by mass spectrometry.



**Satsuki Itoh** graduated from the Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University in 1995 (MS). She has worked at the Division of Biological Chemistry & Biologicals, the National Institute of the Health Sciences since 2000. She received her Ph.D. degree from Osaka University in 2007. She investigates the glycosylation of glycoproteins by mass spectrometry.



**Noritaka Hashii** is a research scientist of National Institute of Health Sciences (NIHS). He received his Ph.D. from Josai University under the supervision of Prof. Seiichi Kondo in 2003. His current research interests are structural analyses of carbohydrates such as N-, O-linked oligosaccharides and glycosaminoglycans by mass spectrometry.



**Akira Harazono** graduated from the department of Physiological Chemistry, Kyoto University in 1995 and received a Ph.D. at Kyoto University in 2002. His recent research focuses on study of quality test for peptide/protein products.



**Daisuke Takakura** graduated in the Bioscience Course in 2002 at the Azabu University and received his PhD in 2007 from the same university. From 2007, he held a post-doctoral position at the Division of Biological Chemistry Biologicals in National Institute of Health Sciences.

Profile of the Authors



**Dr. Teruhide Yamaguchi** graduated from Biology at Kobe University in 1976. He is the director of the division of Biological Chemistry and Biologicals at National Institute of Health Sciences, and is engaged in investigating the safety, quality and efficacy of biologics. He is member of the Pharmaceutical and Food Affairs Council in Japan and is contributing to review quality aspects of registration applications of new drugs. He is also contributing to ICH activity as the member of Gene Therapy EWG.



## 第 3 項 バイオ医薬品における規格設定・試験法の考え方

### 1 バイオ医薬品の品質確保における「規格及び試験方法」の位置づけ<sup>1)</sup>

医薬品の「規格及び試験方法」は、試験項目、用いる分析方法、及びその方法で試験したときの規格値 / 適否の判定基準(数値で表した限度値又は範囲、あるいはその他の基準)を示したものであり、原薬、製剤又はこれらの製造工程における中間体が、それぞれの使用目的にかなっていると判定するために必要な要素をセットにして定めたものである。即ち、「規格及び試験方法」は、原薬及び製剤の品質特性の網羅的な解析というより、むしろ医薬品の安全性及び有効性確保を目的とした品質の一定性確保のために選択した試験項目、試験方法及び規格値 / 適否の判定基準のセットと考えるべきである。

このように「規格及び試験方法」設定の目的は医薬品の品質及びその恒常性の確保にあるが、特にバイオ医薬品の場合は、例えば不純物や混入物質の管理など、製品で測定するよりむしろ原材料の試験あるいは製造工程での管理による方が合理的と考えられる場合が少なくない。したがって、製品の恒常性の確保は、「規格及び試験方法」のみならず、原材料の試験<sup>24)</sup>、製造工程の評価 / 検証に裏付けされた工程内管理、さらには GMP の遵守<sup>25)</sup>等の各要素が相補って達成されると考えるべきである。

### 2 バイオ医薬品の規格及び試験方法の設定に関連する事項

#### 2-1 特性解析

バイオ医薬品において適切な「規格及び試験方法」の設定に先立ち、まず開発段階で原薬や製剤あるいは中間体について広範かつ詳細な特性解析(物理的・化学的性質、生物活性、免疫化学的性質、純度及び不純物に関する解析など)を実施して、バイオ医薬品の品質プロファイルを明かにしておく必要がある。このような詳細な特性解析は、品質に影響を及ぼす可能性のある製法変更があった場合にも必要に応じて実施される。

##### 2-1-1 バイオ医薬品の構成成分の分類と特徴(図 1)

タンパク質性バイオ医薬品は、生体による生合成過程を生産に利用していることから、有効成分においても本質的に分子構造上不均一なものが産生される可能性がある。例えば翻訳後修飾が想定されるケースでは、医薬品有効成分は糖タンパク質におけるグリコフォームのように翻訳後

修飾を受けた多様な分子種の混合物となり、おのおのの分子種は、同等の生物活性を示す場合がある。このような物質的な特徴を考慮して、バイオ医薬品では、有効成分を「目的物質」と称し、以下のようにそれぞれの物質群に応じた定義を与えている。

- 1) 抗体等：予期した構造を有するタンパク質
- 2) 単純タンパク質：DNA 塩基配列から期待される構造を有するタンパク質
- 3) 糖タンパク質等：しかるべき翻訳後修飾から期待されるタンパク質
- 4) 修飾/改変タンパク質等：生物活性分子を生産するのに必要な意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質

さらに製造中や保存中に生成する目的物質の分子変化体で、目的物質に匹敵する生物活性(目的物質の70%程度以上の生物活性が目安)等の特性を備え、製品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさない物質は、不純物とせず「目的物質関連物質」と称し、有効成分に含む。

一方、目的物質、目的物質関連物質、及び添加剤以外の原薬及び製剤中に存在する成分を「不純物」とするが、不純物は目的物質の分子変化体で生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質に匹敵する特性をもたない「目的物質由来不純物」と、製造工程に由来する不純物である「製造工程由来不純物(製造用細胞に由来する宿主細胞由来タンパク質や宿主細胞由来DNA、あるいは細胞培養液に由来する抗生物質や培地成分、目的物質の抽出、分離、精製に由来する試薬・試液類やクロマトグラフ担体からの漏出物)」に分類される。

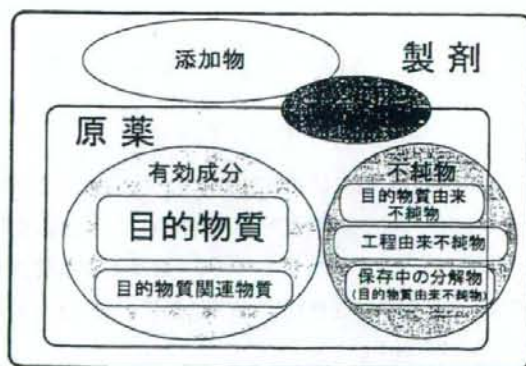


図1 バイオ医薬品の構成成分

### 2-1-2 物理的・化学的性質

バイオ医薬品の物理的・化学的性質の解析には、通常、構造解析・構造確認、物理的・化学的性質の測定が含まれる。前者としては、目的物質に関するアミノ酸配列、アミノ酸組成、末端アミノ



酸配列、ペプチドマップ、スルフヒドリル基及びジスルフィド結合の分析、糖組成・糖鎖構造の分析等が含まれる。目的の高次構造を形成していることは、通常、その生物活性の測定によって間接的に確認されるが、X線構造解析、NMR等による高次構造情報が望まれる場合もある。一方後者としては、分子量・分子量サイズ、アイソフォームパターン、比吸光度、電気泳動パターン、液体クロマトグラフィーパターン、分光学的性質等の分析が含まれる。

2-1-1で触れたように、タンパク質性医薬品では、目的物質においても分子構造上不均一である製品が少なくない。しかし個々の分子種を分離し、生物活性や有効性及び安全性を評価することは困難なことが多く、また医薬品としての利用を考えると個々の生物学的特性データまでも求めることは必ずしも必要ない。そこで、品質確保上で必須な解析として、目的物質がどのような不均一性のパターンを示すかを調べ、不均一性の程度およびプロファイルを明らかにする。次に、これが非臨床試験及び臨床試験で有効性及び安全性を確認する際に用いたロットにおけるパターンと一致すること、さらに製造ロット毎にも不均一性のパターンに恒常性があることを確認することとする。

次いで、目的物質関連物質についても物理的・化学的特性を明らかにするとともに、製品において不均一性があり、そのパターンが非臨床試験及び臨床試験に用いた製品でみられていたパターンと異なる場合には、その変化がどのような意味を持つかについて評価する。

### 2-1-3 生物活性

タンパク質性バイオ医薬品においては、有効成分における不均一性がある製品、あるいは高次構造が物理的・化学的分析手法のみでは確定できない製品が多い。このような場合、特性解析プロファイルを確立する上で、生物学的性質の評価は必要不可欠といえる。生物活性は、特定の生物学的効果を発揮するための特異的な機能やその程度を表す生物学的性質である。

生物活性を測定するための生物学的試験(バイオアッセイ)例としては、

- ・ 動物を用いるバイオアッセイ(製品に対する生体の生物学的応答を測定)
- ・ 培養細胞を用いるバイオアッセイ(細胞レベルでの生化学的又は生理学的応答を測定)
- ・ 生化学的試験(酵素反応速度の解析による生物活性の測定や、免疫学的相互作用により引き起こされる生物学的応答を測定)
- ・ その他(リガンド-レセプター結合試験等)

が挙げられる。

当該医薬品の生物活性を定量的に表す尺度として通常力価(単位は「単位」)が用いられる(一方、タンパク質量は物質質量(単位は「質量」)で表される)。力価測定に用いられる生物活性は臨床上期待される作用と同様あるいは類似のものである必要は必ずしもないが、臨床上期待する作用と生

物学的試験における活性との相関は、薬力学試験又は臨床試験において確認しておく必要がある。生物学的試験の結果は、「国際標準品」又は「国内標準品」が入手可能で、かつ当該試験に適切である場合には、標準品を基に検定した活性単位で表す。公的標準品が存在しない場合は、特性解析した「自家標準物質」を確立しておき、製造ロットの試験結果は自家単位で報告する。

#### 2-1-4 免疫化学的性質

抗体が目的物質の場合には、精製抗原及び抗原の特定の領域と抗体との結合試験を行い、可能な限り、アフィニティ(1価の抗原結合部位と1価のエピトープ(抗原決定基)との間での結合の強さ)、アビディティ(多価抗体と多価抗原との結合の強さ)、免疫反応性(交差反応性を含む)を決定する。更に、関連するエピトープを有する標的分子を生化学的に明らかにし、可能ならばエピトープ自身も明確にする。

#### 2-1-5 純度、不純物、混入汚染物質

##### ・ 純度

タンパク質性バイオ医薬品には、生体の合成系を利用した製造工程により生産されるという特徴と、独特な分子特性があり、原薬が数種類の分子種あるいは分子変化体を含んでいることがある。これらの分子種の中で、上述したように目的物質、あるいは目的物質関連物質に該当する物質について、可能な限り構造を明らかにするとともに、特性解析を行う。目的物質と目的物質関連物質は、有効成分とみなされる。

##### ・ 不純物

不純物には目的物質由来不純物と製造工程由来不純物があるが、構造が明らかにできるもの、部分的に特性解析できるもの、同定できないものなどがある。不純物がそれなりの量、生成する場合には、可能な範囲でそれらの特性解析を行う。できれば、生物活性についても評価する必要がある。

##### ・ 混入汚染物質

医薬品中の「混入汚染物質」とは、製造工程には本来存在しないはずのもので、外来性の化学物質や生化学的な物質(例えば、微生物由来プロテアーゼ)あるいは微生物類のようなものすべてを指す。汚染物質の混入は厳に避けるべきであるが、混入が止むをえない場合は、適切な工程内管理試験の規格値/適否の判定基準や処置基準値あるいは原薬及び製剤の規格及び試験方法により適正に管理する必要がある<sup>9)</sup>。



## 2-1-6 物質量

物質量は、通常、タンパク質量として測定される生物薬品にとって重要な要素であるので、適切な試験法(通例、理化学的な原理を持つ方法)を用いて測定する。物質量に基づく定量値が、生物学的試験法を用いて得られた値と直接関連していることを証明できる場合もある。このような相関があれば、製造工程のうち充填のような工程では、生物活性よりも、むしろ物質量を尺度として用いる方が適切な場合もある。

## 2-2 標準品及び標準物質

新有効成分含有医薬品を承認申請する際においては、国際標準品又は国内標準品が利用できる場合はほとんどない。承認申請時まで、製造業者は、代表的な製造ロットでかつ臨床試験に用いた検体を代表するロットから調製し、適切に特性解析した「自家一次標準物質」を確立する。生産ロットの試験に用いる「自家常用標準物質」は、この一次標準物質を基に検定する。国際標準品又は国内標準品が利用でき、かつ適切であれば、これを基に標準物質を検定する。生物学的試験及び理化学試験の両方に同一の標準物質を使用することが望ましいが、別々の標準物質が必要な場合もある。また、目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物に対して、それぞれの標準物質を個別に確立する必要がある場合もある。標準物質については、調製方法、規格及び試験方法、保存条件についても定める。

## 2-3 工程内管理

### 2-3-1 「規格および試験方法」と工程内管理との関係

製造工程の適切な設計及び工程が有する能力の把握は、品質の恒常性が確保され、規格及び試験方法に適合する原薬あるいは製剤を製造することができる製造工程を確立するために必要な方策の一部である。不純物のうち、あるものについては、効果的なプロセスコントロールにより許容できるレベル内に収まっているか、あるいは容認できるレベル以下まで効率的に除去できることを適切な検討によって実証していれば、原薬や製剤を対象とする試験は必ずしも必要ではなく、かつ規格及び試験方法に含めなくてもよい場合がある。

### 2-3-2 工程内管理試験における規格値 / 適否の判定基準及び処置基準値

工程内管理試験は、重要品質特性に影響が及びやすい段階や、製造工程が一定に保たれていることを確認するに適した段階で実施する。工程内管理試験の結果は、「処置基準値」として社内記録の扱いにするか、「規格値 / 適否の判定基準」として公的な報告の対象とするか、いずれかになる。工程内管理試験を実施することにより、原薬や製剤の段階で「規格および試験方法」による試

験を実施する必要がなくなる可能性がある。

### 2-3-3 原材料及び添加剤の規格及び試験方法

原薬(又は製剤)の製造に使用する原材料の品質は、その使用目的にかなった基準を満たす必要がある。生物由来原材料又は試薬に関しては、慎重な評価を行って有害な内在性感染性物質あるいは外来性感染性物質の有無を確認しなければならない場合がある。

製剤化の際に(場合によっては、原薬に)使用する添加剤及び容器/施栓系の品質は、薬局方に規格及び試験方法があり、かつそれが適切である場合には、薬局方の基準を満たす必要がある。薬局方に収載されていない添加剤に関しては、適切な規格及び試験方法を設定する必要がある。

## 3 バイオ医薬品の「規格及び試験方法」の設定にあたって考慮すべきポイント

規格及び試験方法の項目は、医薬品の特性解析を目的として選択するというより、むしろ品質の確認を旨として選択する。したがって、規格及び試験方法として特定の品質特性についての試験を採択したり除外したりする根拠及びその妥当性を明確にする必要がある。規格及び試験方法を設定するにあたって考慮すべき主要なポイントは以下の通りである。

- (1) 製造工程：規格及び試験方法は、製造の一定性を立証するために使用したロットから得られたデータに基づいて設定される必要がある。規格及び試験方法を製造工程と関連付けて考えることは重要なことであり、特に、目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物については重要である。製造工程の変更や保存中の分解物・変化物の生成により、不均一性パターンが非臨床試験及び臨床試験に用いた製品でのパターンと異なってしまうことがある。その場合には、その変化がどのような意味を持つかについて評価する必要がある<sup>7)</sup>。
- (2) 原薬及び製剤の安定性：原薬及び製剤の分解・変化は、保存中に生じる可能性があるが、規格及び試験方法を設定する際には、これらについても考慮する。バイオ医薬品は本質的に複雑な分子であるため、安定性面での特性をそれだけで明らかにすることができるような安定性評価試験法やパラメータはない。したがって、当該医薬品の同一性、純度及び力価の変化などを総合的に捉えることができる安定性評価指標を定め<sup>8)</sup>、この安定性評価指標に基づいて実施した試験の結果を考慮して、規格及び試験方法を設定する。
- (3) 非臨床試験及び臨床試験に使用したロット：規格及び試験方法で設定する適否の判定基準は、非臨床試験及び臨床試験に使用したロットから得られたデータに基づくべきである。また実生産で製造される医薬品の品質は、非臨床試験及び臨床試験に使用したロット



トの品質に相当するものである必要がある。

- (4) 規格及び試験方法に用いる分析方法：バイオ医薬品の品質特性は、様々な分析法により評価できるが、分析法が違えば結果も異なる。医薬品開発の過程においては、医薬品の開発状況と平行して分析法が発達していくことも希ではない。このため、開発中に得られたデータが、承認・許可の時点で提出したデータと相関していることを確認することが重要である。

## 4 バイオ医薬品の「規格及び試験方法」の内容

規格及び試験方法に採用する項目及び試験法の選択は、製品により異なるが、設定した規格値/適否の判定基準の適合範囲の設定根拠を明らかにする必要がある。

原薬又は製剤の段階で試験を実施するより、むしろ製造段階で試験を実施する方が適切で、かつ受け入れられる場合もある。その場合、試験結果は、工程内管理試験の規格値/適否の判定基準の対象と考えるべきである。

### 4-1 原薬の規格及び試験方法

後述の試験及び規格値/適否の判定基準に係わる項目は、通例、すべての原薬において設定されるべきものである。原薬では、適宜、薬局方の試験(例えば、エンドトキシン試験)を行う。これらに加えて、原薬ごとに必要とされる規格値/適否の判定基準を設定する。

#### 4-1-1 外観・性状

原薬の物理的状态(例えば、固体、液体)及び色を定性的に規定する。

#### 4-1-2 確認試験

確認試験は、その原薬に極めて特異的である必要がある。また、分子構造上の特徴やその他の特有の性質に基づいて設定する必要がある。定性的なものでよいが、同一性を確認するためには、2種類以上の試験(理化学試験、生物学的試験、免疫化学的試験)を設定することが望ましい。

#### 4-1-3 純度と不純物

生物製品の絶対的な純度を決定するのは困難であり、また、得られた結果は用いた試験方法に依存する。このため、原薬の純度は、通例、複数の分析方法を組合せて評価する。分析方法を選択し、最適化する際には、目的物質、目的物質関連物質及び不純物を相互に分離することに重点

を置く。

目的物質関連物質については、それぞれ個別の若しくは総量での規格値を設定する必要がある。不純物(製造工程由来不純物及び目的物質由来不純物)に関する規格値も同様に、それぞれ個別に若しくは総量で設定する必要がある。不純物によっては、適切な工程管理を行うことにより、規格値の設定の必要がなくなるものもある。

目的物質あるいは目的物質関連物質において不均一性がみられる製品では、不均一性のパターンの類似性を評価する試験として設定する場合もある。

#### 4-1-4 力価

バイオ医薬品の原薬の規格及び試験方法には、通常定量法として、適切なバリデートされた力価試験が必要である。しかし、適切な力価試験を製剤について設定していれば、原薬の段階での定量的な評価には、代替試験法(理化学的試験法や生物学的試験法)でも十分な場合がある。また、比活性の測定により、更に有用な情報が得られる場合もある。

一方、以下のような条件が整った場合は、定量法に関して、生物活性試験を理化学的試験に置き換えてもよいと考えられている。

- ・ 理化学的方法により、高次構造に関する情報を含めて、当該医薬品に関する十分な物理的・化学的情報が得られ、かつ生物活性との適切な相関が証明されていること。
- ・ 十分に確立された製造実績があること。

定量法に理化学的試験が採用されているバイオ医薬品の例としては、日局ヒトインスリン(遺伝子組換え)がある。

#### 4-1-5 物質質量

通例タンパク質量(質量)で表される原薬の物質質量は、適切な定量法を用いて測定する。物質質量(タンパク質量)の測定には標準品・標準物質を必要としない場合もある。製品の製造が力価に基づいて行われる場合には、別途あえて物質質量(タンパク質量)の測定をする必要はない。

#### 4-2 製剤の規格及び試験方法

後述の試験及び規格値/適否の判定基準に係わる項目は、通例、すべての製剤において設定される。剤形について薬局方に関連する規定がある場合、それらの規定が適用される。薬局方に収載されている代表的な試験法には、無菌試験、エンドトキシン試験、微生物限度試験、実容量試験、不溶性微粒子試験及び不溶性異物検査、製剤均一性試験、並びに凍結乾燥製剤に対する含湿度試