

Urokinase Alfa が記載されている。

INN及びJANに記載されている *Urokinase* (ウロキナーゼ) は、「A plasminogen activator isolated from human sources」と定義されている。我が国で承認されている *Urokinase* は、ヒト尿から精製した高分子量ウロキナーゼ(分子量約 54,000)で、急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解剤として適応されている。これに対して米国で承認されている *Urokinase* は、尿由来ではなく、組織培養(新生児腎細胞由来)型のウロキナーゼで、分子量 28,000~34,000 の低分子量ウロキナーゼである。糖鎖部分だけでなく、ペプチド部分も異なるため、国内では *Urokinase (tissue culture)* として区別することもあるが、このような名称をもつ *Urokinase* は INN にも JAN にも記載されていない。*Urokinase Alfa* は遺伝子組換え型糖タンパク質で、非ヒト哺乳動物由来細胞で産生された高分子量ウロキナーゼである。*Urokinase* と *Urokinase Alfa* はヒト由来と非ヒト細胞由来糖タンパク質であることから、糖鎖は大きく異なることが予想される。

C. 3. I. 7 低分子量ヘパリン

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 B1→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(トロンピン)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 *Prnamarin Sodium* (パルナパリンナトリウム)、*Dalteparin Sodium* (ダルテパリンナトリウム)、*Reviparin Sodium* (レビパリンナトリウム)、及び *Enoxaparin Sodium* (エノキサパリンナトリウム)が承認されている。INNには他にも低分子量ヘパリンが記載されており、これらは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2)。

C. 3. II 糖鎖構造の違いによって区別されている代表的糖タンパク質及び多糖類の糖鎖構造解析

C. 3. II. 1 フォリトロピン アルファ及びベータ製剤の糖鎖プロファイルの比較

フォリトロピン アルファとベータはいずれも CHO 細胞で産生された糖タンパク質で、両者の糖鎖構造の違いは明らかにされていない。そこで、市販のゴナールエフ注射液及びフォリスチム注射液を購入し、SDS-PAGE で添加剤等から目的物質を分離した後、LC/MS を用いて糖鎖プロファイルの比較を行った。

図1は SDS-PAGE の泳動図である。α 鎖及び β 鎖のバンドをまとめて切り取り、それぞれのゲルに PNGase F を作用させて N-結合型糖鎖を切り出した。LC 上でアノマーが分離されるのを避けるため、還元末端を NaBH₄ で還元した後、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS により糖鎖プロファイリングを行った。

図 2A 及び B は、フォリトロピン アルファ及びベータに由来する N-結合型糖鎖のプロファイルである。上段は positive ion 測定で得られたプロファイル、また、下段は negative ion 測定で得られた糖鎖プロファイルである。フォ

リトロピン アルファ及びベータの糖鎖のプロファイルはよく似ていることが明らかになった。主な糖鎖の構造は、MS/MS スペクトルから、図 3 中に示すように推定された。その結果、フォリトロピン アルファ及びベータの主な糖鎖はいずれも、シアル酸が結合していない 2 本鎖コンプレックス型糖鎖であることが明らかになった。その他に、3 本鎖のコンプレックス型糖鎖や、N-結合型糖鎖のトリマンノシルコア構造に Fuc が結合した 2 本鎖及び 3 本鎖のコンプレックス型糖鎖が存在することが判った。また、シアル酸が 1 または 2 個結合した 2 本鎖のコンプレックス型糖鎖も存在しており、シアル酸が結合した糖鎖の割合は、フォリトロピン ベータよりもフォリトロピン アルファの方がやや高い傾向にあることが明らかになった。

C. 3. II. 2 低分子量ヘパリンの構造特性の比較

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 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、構造的によく似た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、同一 JAN を持つ低分子量ヘパリン間の類似性の確認、異なる JAN を持つ低分子量ヘパリンの識別、並びにその他のムコ多糖類の混入を調べることを目的として、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 を行った後、クロマトグラムを比較した。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、パルナパリン 2 製品、ダルテパリン 2 製品、レビパリン 1 製品及びエノキサパリンナトリウム 1 製品を分析した。

C. 3. II. 2. (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、13 分、38.5 分及び 41 分に溶出されることを確認した (図 4a)。つぎに、パルナパリン製品 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 4b-d、図 4e-g 及び図 4h-j は、それぞれパルナパリン製品 1 を 2 N TFA、2 N HCl 及び 4 N HCl に溶解し、4、8、及び 12 時間 100°C 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か観測されなかった。2 N 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 5a)。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。2 N 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 5b)、また、36~38 分のピークは、8 時間で降減少することが確認された。4 N 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ることが確認された。さらに、2N 及び 4 N 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、2 N 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 2 N 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 2 N 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 5c)。

C. 3. II. 2. (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 6 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。

パルナパリン製品 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、パルナパリン製品 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、パルナパリン製剤 2 では GalN に相当するピークが強く観測され、そのピーク面積はパル

ナパリン製剤 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。

ダルテパリン 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、パルナパリン及びエノキサパ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)。

レビパリンからも、ダルテパリンと同様に 6 分、34 分前後及び 42.5 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。これらの 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パリンと比較すると、いずれもダルテパリンよりも大きくなっていることが確認された。2 NTFA を用いた加水分解条件では、末端側の糖が遊離される傾向があることから、レビパリンにおいて末端由来と考えられる 6 分、34 分前後及び 42.5 分のピークの比率が高くなっていたことは、レビパリンの平均分子量が(約 4,000)がダルテパリンの平均分子量(約 5,000)よりも小さいことを反映していると考えられた。

エノキサパ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 42.5 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、エノキサパリンの

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 (Δ^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、されても分化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。エノキサパリンには、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、パルナパリン製品 1 及び 2、ダルテパリン製品 1 及び 2、レビパリン及びエノキサパリンの 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 peak 1-7 (図 6) 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 3 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 ($n=3$)。パルナパリン製品 2 の GlcN のピーク比は、パルナパリン製品 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、Peak 7 のピーク面積は、パルナパリン製品 1 及び 2、ダルテパリン製品 1 及び 2 並びにレビパ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、パルナパリン製品 1 及び 2、ダルテパリン製品 1 及び 2、レビパリン及びエノキサパリンのウロン酸 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。

C. 3. III 考察

C. 3. III. I. INN 及び JAN において糖鎖構造の違いによって区別されている品目の基原及び糖鎖構造関する調査

INN には、アミノ酸配列が同一でグリコフォーム分布が異なる品目として、*Agalsidase*、*Antithrombin*、*Epoetin*、*Follitropin*、*Nasaruplase*、及び *Urokinase* が記載されていることがわかった。*Agalsidase*、*Epoetin*、及び *Follitropin* は、記載時期が比較的最近で、早くから遺伝子組換え型が開発されていること、また、グリコフォームが異なる品目の開発時期が近いことから、INN 記載時に *Alfa* や *Beta* として区別されたものと推察される。これに対して、*Antithrombin*、*Nasaruplase*、*Urokinase* は、遺伝子組換え型が開発される以前にすでに医薬品として利用されていた品目が存在する糖タンパク質で、後に遺伝子組換え型が開発されたため、*Antithrombin Alfa*、*Nasaruplase Beta*、及び *Urokinase Alfa* として区別されたものと思われる。現在、新規記載される遺伝子組換え型タンパク質性医薬品の多くは糖タンパク質であるが、最初に記載される品目に予め *Alfa* がつけられている例は

Darbepoetin Alfa など二十数品目しかない。現在、糖鎖工学の発展に伴う糖鎖改変体などの開発が進んでおり、アルファが収載されていない品目に、ベータが命名される例が出てくることが予想される。今後、糖タンパク質には予めアルファをつけるなどの工夫が必要になってくるかもしれない。

C. 3. III. II 糖鎖構造の違いによって区別されている代表的糖タンパク質及び多糖類の糖鎖構造解析

C. 3. III. II.1 フォリトロピン アルファ及びベータの糖鎖プロファイルの比較

グリコフォーム分布の違いを解析する方法の一つとして、遊離糖鎖のプロファイリングが挙げられる。糖鎖プロファイリング法としてこれまで、2-アミノピリジンや2-アミノベンザミドによる糖鎖の標識と HPLC を組み合わせた方法や、HPAEC-PAD が利用されてきた。我々は、より情報量が豊富な LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法を開発し、3種類のエポエチン原薬や、2種類の甲状腺刺激ホルモンの糖鎖プロファイリングに応用してきた。さらに最近では、SDS-PAGE と nanoLC/MS を導入することによって、夾雑物を含む微量糖タンパク質の分析が可能となり、注射液等製剤への応用も可能となった。本研究では、その改良型糖鎖プロファイリング法を用いて、糖鎖分布の違いが明らかにされていない CHO 細胞由来のフォリトロピン アルファとベータの N結合型糖鎖のプロファイルと比較した。その結果、シアル酸の結合に若干の違いはあるが、フォリトロピン アルファ及びベータの糖鎖構造はほぼ共通していることが明らかとなった。

分担研究者らは別の厚生労働科学研究事業（ヒトゲノム・再生医療等研究事業「細胞組織

利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発研究」主任研究者山口照英）において、細胞の培養条件を変更すると、アジア糖鎖部分を含めて、細胞の糖鎖プロファイルが大きく変わることを見出し報告している（平成18年度分担研究報告書）。これらの分析結果は、同一細胞由来糖タンパク質のグリコフォームを定義したり、同種細胞由来糖タンパク質のグリコフォームを区別したりすることの難しさを示唆しているものといえよう。

C. 3. III. II.2 低分子量ヘパリンの構造特性の比較

低分子量ヘパリンは、硫酸エステル化の位置と程度、及び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℃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。

パルナバリン、ダルテバリン、レビバリン及びエノキサパリンの酸加水物の 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。

C. 3. IV 我が国におけるバイオ医薬品の本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造等、並びに分子式及び分子量の記載にあたって考慮すべき事項や要素

糖鎖構造の違いにより名称が異なる医薬品の調査研究及び糖鎖部分の解析によって、命名と定義づけの難しさが明らかになった。しかし、そうであっても、名称、本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造、並びに分子式及び分子量は、医薬品の定義に係わる重要な事項であり、また、医療用医薬品の添付文書やインタビューフォーム等を通じて公表されることも多いので、正確に分かりやすい表現で提供されるべきである。日本では、医薬品の一般的名称(Japanese accepted name、JAN)は医薬品医療機器総合機構の医薬品名称専門協議 (JAN 専門協議) で審議され、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知により公表される。JAN 申請もしくは届出者は、平成 18 年 3 月 31 日付薬食発第 0331001 号厚生労働省医薬食品局長通知及び平成 18 年 3 月 31 日付薬食審査発第 0331001 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知に示されている医薬品の一般的名称の取り扱いに関する事務手続き等に従って、申請書もしくは届出書に必要事項を記入し、厚生労働省医薬食品局長宛提出する。申請書及び届出書の作成方法は、それぞれ平成 18 年 3 月 31 日の薬食審査発第 0331003 号中の【別添 2 医薬品一般的名称命名申請書作成上の注意】及び【別添 3 医薬品一般的名称届出書 (INN 収載品目) 作成上の注意】に示されており、申請/届出品目の名称、化学名又は本質記載、化学構造式又はアミノ酸配列等、CAS 登録番号、薬理作用を記載することとされている。

バイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)の本質及びアミノ酸配列等の記載方法に対する基本的方針は、平成3年5月2日付薬新薬第23号厚生省薬務局新医薬品課長通知で示され、それ以来記載方法に大きな変更はなかった。その一方で、バイオ医薬の開発は急速に進歩し、多種多様な製品開発が行われるようになってきた。特に最近は、改変型、断片型、修飾型、融合型、あるいはそれらの複合型など複雑な構造特性を有するバイオ医薬品の開発が進み、天然型ペプチドやタンパク質、あるいは一部の改変を想定して作成された当時の記載方法では構造特性を表現することが難しくなっている。また、当時は糖鎖構造解析技術が現在のように進歩しておらず、糖鎖の記載方法については触れられていない。このような科学進歩や製品開発の多様化に対応できるようにするためには、バイオ医薬品の本質及びアミノ酸配列、及び糖鎖構造等記載方法の充実化を図る必要があると考えられる。また、JANの本質記載やアミノ酸配列等、並びに分子式及び分子量の記載方法は、日本薬局方(日局)における基原、アミノ酸配列等、並びに分子式及び分子量の記載方法といくつかの点で異なっており、今後、JANから日局へ移行されるバイオ医薬品が増えることを考えると、日局の記載方法との整合性を考慮することが重要かと思われる。そこで、INN、米国及びEUにおける本質、アミノ酸配列等、糖鎖構造、並びに分子式及び分子量の記載方法を調査することによって、我が国におけるバイオ医薬品の本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造等、並びに分子式及び分子量の記載にあたって考慮すべき事項や要素について考察した。

C. 3. IV. 1 本質記載

(1) 本文には、由来及び構造情報を記載し、製造方法の詳細や遺伝子情報の記載は最小限に留める

本文には、ペプチド/タンパク質等の由来や構造情報を記載し、有効性・安全性等に特に影響がない限り、製造方法や遺伝子情報に関する記載は最小限に留めてよいと考える。例えば、最終産物に含まれないシグナルペプチドや、mRNAの由来組織は本質記載に記す必要はない。また、DNAの種類(例えば合成DNA、ゲノムDNA、またはcDNA等)に関する記載は今後省略してよいだろう。

(2) 本文は、「●は、・・・」で始める。ここで●は、該当品目のJANを意味する

これまでJANの本質は、「ヒト肝細胞のmRNAに由来するヒトxxxxx cDNAの発現により、チャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される…個のアミノ酸残基(C H N O S ;分子量:…;…)」からなる糖たん白質(分子量:約~,000)」のように、「・・・からなるたん白質」や「・・・からなるペプチド」で終わる1文で記載するのが一般的であった。しかし、最近では、改変型、断片型、修飾型、融合型、もしくはそれらを組み合わせた複雑な構造特性を有するバイオ医薬品が開発されるようになり、従来の記載方法で構造特性を表現することが難しくなっている。一方、第16改正日局原案作成要領において基原の書きだしは「本品は・・・」とするとされており、基原、構造、活性、及び含量等を含む多くの情報を複数の文に分けて記載することが可能になっている。そこで、JANの本質記載においても、日局の基原の記載方法に準じ、「●は、・・・(●は、該当品目のJANを意味する)」で書きだすこととし、必要に応じて本質記載を複数の文に分けてもよいこととするのが適切と考えられる。以下に、

具体的な記載方法を示す。

- (3) 本文には、1) 基原 ①製造方法 (抽出、合成、又は遺伝子組換え等)、②由来、及び型 (天然型、類縁型、又は融合型等)、③改変、断片、修飾、及び/又は融合等の内容; 2) 基材 (産生細胞); 3) 構造 (アミノ酸残基数、サブユニット数、及び分子量 (不均一性が高い場合)) を記す

1) 基原

① 製造方法

従来通り、申請/届出品目が天然から抽出したもので、合成品、もしくは遺伝子組換え技術によって製造したものであることを明らかにする。細胞・組織から抽出した場合は、「ヒトリンパ芽球で産生される」あるいは「ヒト尿に由来する」のように細胞の種類や由来組織等が明確になるように記載する。合成型、及び遺伝子組換え型の場合は、それぞれ「合成」及び「遺伝子組換え」と記載し、さらに②及び③に示すような構造情報を記載する。表1の①に製造方法の記載例を示す。

② 由来、及び型

合成または遺伝子組換え型の場合は、ペプチド/タンパク質等の由来と型を明らかにする。ここで型とは、天然型、類縁型、及び融合型を意味する。天然型とは、天然に存在するペプチド/タンパク質等と同一のアミノ酸配列を有し、改変や修飾が施されていないものを指す。類縁型とは、ある一つのペプチド/タンパク質のアミノ酸配列の一部を改変したもの、断片に相当するもの、あるいは修飾したものを指す。融合型とは、2つ以上のペプチド・タンパク質の全体もしくは一部分から構成されているものを指す。表1の②に由来及び型の記載例を示す。

a. 天然型

天然型の場合は、「ヒト成長ホルモンで」、または「組織プラスミノゲンアクチベータで」のようにペプチド/タンパク質等の由来を明らかにする。多型が知られている場合は、「□の多型の主要なバリエーションの一つで」のように記載する。また、第 VIII 因子やインターフェロンアルファのように複数のアイソフォームが存在する場合は、「△の主要なアイソフォームで」、あるいは「△のアイソフォームの一つで」のように記載するのが望ましい。

b. 類縁型

類縁型の場合は、「ヒト成長ホルモンの類縁体で」、または「ヒト組織プラスミノゲンアクチベータの類縁体で」のように、何の類縁体であるかを明らかにする。さらに下の③に示すように、改変・修飾あるいは断片化等の内容について説明する。

c. 融合型

融合型の場合は、「ヒト IgG1 の Fc ドメインとヒト α 受容体からなる融合タンパク質」のように、構成している成分を明確にする。モノクローナル抗体の場合は、抗体の型がわかるように「ヒト化モノクローナル抗体」や「キメラモノクローナル抗体」のように記載する。

③ 置換、断片、修飾、及び/又は構成成分等の説明

類縁型の場合は、以下の a~c に示すように、置換したアミノ酸、相当するアミノ酸の位置、あるいは修飾方法等について説明する。また、融合タンパク質の場合は、以下の d に示すように、構成ペプチド/タンパク質について説明する。尚、一部の分子にのみ生じた意図しない修飾で、有効性・安全性等に特に影響しない場合は、本質記載に記載する必要はない (2. アミノ酸配列、糖鎖構造、及びその他の修飾等を参

照)。(例：N末端のプロテグリン形成、C末端のプロセッシング)。表1の③に置換、断片、修飾、及び又は融合に関する説明の例を示す。

a. 置換

アミノ酸残基の一部が置換されたペプチド/タンパク質の場合は、置換された位置と置換後のアミノ酸残基がわかるように、「A鎖の5番目のAsnがSerに、B鎖の8番目のThrがProに置換されている」もしくは「Fcドメインの300、305及び310番目のアミノ酸残基がSerに置換されている」のように記載する。

b. 断片

あるペプチドやタンパク質の一部分からなるペプチド/タンパク質の場合は、「ヒト成長ホルモンの101~191番目のアミノ酸残基に相当する」、「組織プラスミノゲンアクチベータのクリングル2ドメイン及びセリンプロテアーゼドメインからなる」、もしくは「〇〇抗体のFab断片からなる」のように、そのペプチド・タンパク質が元のペプチド/タンパク質のどの部分に相当するかを記載する。

c. 修飾

脂質、合成化合物、PEG、あるいは改変糖鎖等が共有結合しているペプチド/タンパク質の場合は、修飾物質の種類(化学名、分子式及び分子量等)、結合数、主な結合位置、並びに結合方法等を記載する。例えば、「平均2本のメトキシポリエチレングリコール(平均分子量5,000)が共有結合している(主な結合部位：Lys5、Lys15)」、「20番目のLysにパルミチン酸が結合している」、もしくは「H鎖のAsn305にフコース非結合糖鎖が結合している」のように記載する。

d. 融合

2つ以上のペプチド/タンパク質の全体もしくは一部が融合した形で構成されるペプチド/

タンパク質の場合は、各ペプチド/タンパク質の由来と、それぞれが最終産物のどの部分に相当するかを説明する。例えば、ヒト化モノクローナル抗体、及びFcドメインと受容体の一部からなる融合タンパク質の場合は、それぞれ「マウス抗ヒトCD▲抗体の相補性決定部、並びに□鎖を含むヒトIgG1のフレームワーク部及び定常部からなる」、及び「1~133番目はヒトCD28の細胞外領域、また134~356番目はヒトIgG1のFc領域からなる」のように記載する。

2) 基材

従来通り、糖タンパク質の場合は、「チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される」、「△酵母により産生される」、「マウスミエローマ(NSO)細胞により産生される」のように細胞の種類を記載する。尚、産生細胞のサブラインは記載する必要はない。また、ペプチドやタンパク質の場合は原則として細胞を記載しない。表1の④に記載例を示す。

3) 構造

構造情報として、従来通り、アミノ酸残基数、鎖数及びサブユニットの数を記載する。モノマーの場合は、「…個のアミノ酸残基からなるタンパク質」、ホモダイマーの場合は、「…個のアミノ酸残基からなるサブユニット2分子から構成されるタンパク質」、また、ヘテロダイマーの場合は、「…個のアミノ酸残基からなるA鎖及び…個のアミノ酸残基からなるB鎖から構成されるタンパク質」のように記載する。抗体の場合は、「…個のアミノ酸残基からなるL鎖2分子及び…個のアミノ酸残基からなるH鎖2分子から構成される糖タンパク質」と記載する。

分子量が均一なペプチド、タンパク質（修飾ペプチド、修飾タンパク質、糖ペプチド、及び糖タンパク質を含む）の分子式及び分子量は、分子式及び分子量欄に記載し、本質記載には記載しないこととする（3. 分子式及び分子量参照）。分子量が不均一なペプチド、タンパク質（例：糖ペプチド、糖タンパク質、修飾ペプチド、及び修飾タンパク質等）の場合は、分子全体の分子量を適正に反映する方法、例えば、理化学分析（質量分析法、超遠心分析法、電気泳動法、サイズ排除クロマトグラフィー等）による測定値、あるいは、アミノ酸部分の理論分子量に修飾部分の化学分析等による分子量測定値を加えた値を、“約 35,000”のように記載すればよい（百位以下の桁は四捨五入）。分子量の根拠は、理化学的研究に関する資料の中で説明する。尚、測定値と理論的な値に大きな差があるときは、測定方法を記載することが望ましい。表1の⑤に記載例を示す。

C. 3. IV. 2 アミノ酸配列、糖鎖構造、及びその他の修飾等

(1) アミノ酸配列及び翻訳後修飾の位置

第16改正日局原案作成要領に準じ、概ね20アミノ酸残基以下のペプチドは3文字で表記する。また、概ね21アミノ酸残基を超えるペプチド・糖ペプチドは1文字で表記し、50残基で改行する。

意図せず生じた翻訳後修飾等は、本質記載ではなく、脚注に翻訳後修飾されているアミノ酸残基と翻訳後修飾の種類を記載することとする。対象となる主な翻訳後修飾として、N末のアセチル化やピログルタミン酸形成、C末のプロセシング、糖鎖付加などが挙げられる。また、一部の分子にのみ生じた修飾は「Gln1：ピロ

グルタミン酸形成（部分的）」や「N100：糖鎖付加（部分的）」のように記載する。

(2) ジスルフィド結合

ポリペプチド鎖内ジスルフィド結合は、システイン残基を「C-C」を用いてなるべく線同士が交差しないように結ぶ。ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合は、「A鎖 Cys10-B鎖 Cys15」や「C300：ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合」のように記載する。

(3) 糖鎖構造

糖鎖は、代表的な数個の糖鎖の構造を結合位置ごとに記載するのが望ましい。糖鎖の有無や糖鎖構造が活性等に影響しない場合は、結合の割合が多い数個の糖鎖を記載すればよい。また、糖鎖の構造が活性等に影響する場合は、結合数の多い糖鎖を数個と活性等に寄与する代表的糖鎖構造を数個記載する。部位ごとの糖鎖構造が明らかでない場合はまとめて記載してよいものとする。

(4) その他の翻訳後修飾

脂質、合成化合物、またはPEG等が結合している場合は、その構造及びペプチド/タンパク質への結合方法がわかるように記載する。

C. 3. IV. 3 分子式及び分子量

(1) 対象

1) 均一なペプチド/タンパク質

分子量及び分子式が均一なペプチド及びタンパク質の場合は、分子式及び分子量欄に分子式及び分子量を記載する。修飾ペプチド、修飾タンパク質、糖ペプチド、もしくは糖タンパク質等で、修飾の種類及び結合数が均一な場合は、修飾もしくは糖鎖付加された分子の分子式及び分子量を記載する（例 N末のアセチル化、C末のアミド化、アシル基付加など）。意図せず生じた部分的修飾は、修飾されていないもの

として計算する(例:N末の部分的ピログルタミン酸形成、C末の部分的プロセシングなど)。

2) 不均一なペプチド/タンパク質

糖ペプチド、糖タンパク質、修飾ペプチド、あるいは修飾タンパク質(例:PEG化タンパク質)等で、分子式及び分子量が不均一な場合は、日局に準じ、ペプチドもしくはタンパク質部分の分子式及び分子量を記載する。

単純タンパク質であっても、分子式及び分子量が不均一な場合は、分子式及び分子量記載欄に分子式及び分子量を記載する必要はない(例:インターフェロンアルファ、第VIII因子等)

(2) 計算方法

分子量は、最新の原子量表を使って分子式から理論分子量を計算した後、小数点以下3桁目で四捨五入して計算する。

N末端、C末端、及び側鎖は非解離状態で計算する。

分子全体の分子式は、ジスルフィド結合をS-Sとして計算する。サブユニットの分子式は、ポリペプチド鎖内ジスルフィド結合をS-Sとして計算し、ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合をSH(還元型)として計算する。

C. 3. IV. 4 記載例

(1) 置換型合成ペプチドの例 (表4における分類:①b、②b、③a、④a、⑤a)

オキシトシンの8番目のLeu残基がLysに置換された合成ペプチドの場合、本質記載は以下ようになる。アミノ酸配列は3文字で表記し、C末端のアミド結合とジスルフィド結合を記載する。分子量及び分子式はアミド結合及びジスルフィド結合したものとして計算する。

本質記載:

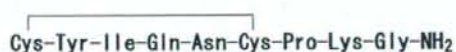
[英名]

• is a synthetic human oxytocin analog in which Leu at position 8 is substituted by Lys. • is a peptide consisting of 9 amino acid residues.

[日本名]

•は、合成ヒトオキシトシン類縁体で、8番目のLeuがLysに置換されている。•は、9個のアミノ酸残基からなるペプチドである。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合:



分子式及び分子量:



(2) 断片型遺伝子組換えペプチドの例 (①c、②b、③b、④a、⑤a)

ヒト成長ホルモンの101番目から191番目のアミノ酸配列と同じ配列をもつ遺伝子組換えペプチドの場合、本質記載及びアミノ酸配列は以下の通りとなる。アミノ酸配列は1文字で表記する。

本質記載:

[英名]

• is a recombinant human growth hormone analog which corresponds to amino acids 101-191 of human growth hormone. • is a peptide consisting of 91 amino acid residues.

[日本名]

•は、遺伝子組換えヒト成長ホルモンの類縁体で、ヒト成長ホルモンの101~191番

目のアミノ酸に相当する。●は、91個のアミノ酸残基からなるペプチドである。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合：

LVYGASDSNV YDLLKDLLEEG IQTLNMRLED GSPRTGGIFK QTYSKFDTNS
 HNDDALLKNY GLLYCFRKM DKVETFLRIV QCRSVEGSG F

分子式及び分子量：

$C_{455}H_{708}N_{122}O_{145}S_5$: 10,367.55

(3) 断片型・置換型・修飾型遺伝子組換えタンパク質 (均一) の例 (①c、②b、③a、b 及び c、④a、⑤a)

ヒト成長ホルモンの 51~191 番目のアミノ酸配列と同じ配列を持つ遺伝子組換えタンパク質で、N 末端側から 90 番目のアミノ酸残基が Ser に置換され、20 番目の Lys 残基にミリスチン酸が結合している場合、本質記載は以下のようなになる。アミノ酸配列等には、一次構造及びジスルフィド結合に加えて、ミリスチン酸の結合位置及び構造を記載する。この類縁体の分子式及び分子量は均一なので、分子式及び分子式はミリスチン酸が結合しているものとして計算する。

本質記載：

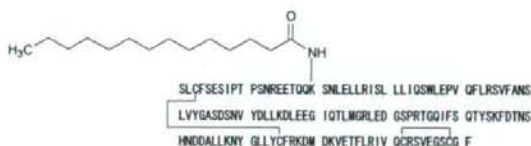
[英名]

● is a recombinant human growth hormone analog corresponding to amino acids 51-191 of human growth hormone, whose Lys at position 90 is substituted by Ser, and whose Lys at position 20 is myristoylated. ● is a modified protein consisting of 141 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒト成長ホルモンの類縁体で、ヒト成長ホルモンの 51~191 番目のアミノ酸に相当し、90 番目の Lys 残基が Ser に置換され、20 番目の Lys 残基がミリスチル化されている。●は、141 個のアミノ酸残基からなる修飾タンパク質である

アミノ酸配列、ジスルフィド結合、及び修飾



分子式及び分子量：

$C_{723}H_{1135}N_{189}O_{225}S_6$: 16,267.27

(4) 改変型・修飾 (PEG 化) 型遺伝子組換え 2 本鎖ペプチド (不均一) の例 (①c、②b、③a 及び c、④a、⑤b)

インスリンをモデルに、PEG 化されたペプチド/タンパク質の記載方法を考える。インスリンは A 鎖及び B 鎖からなる 2 本鎖ペプチドである。モデルペプチドの A 鎖 10 番目及び B 鎖 15 番目のアミノ酸残基は Lys に置換され、平均 2~3 個の PEG が共有結合している。PEG 化予想部位は A 鎖の N 末端 Gly と 10 番目の Lys、並びに B 鎖の N 末端の Phe と 15 及び 29 番目の Lys である。この PEG 化インスリンの本質記載は以下のようなになる。この分子は不均一であるので、本質記載に分子量を約 〇〇と記載する。また、分子量に幅がある場合は、〇~〇のように幅記載してもよいものとする。分子式及び分子量欄には、ペプチド部分全体、及び A 鎖と B 鎖のペプチド部分の分子式

及び分子量を記載する。A鎖の分子式及び分子量は、鎖内ジスルフィド結合はS-Sとして、また鎖間ジスルフィド結合は還元型(SH)として計算する。ペプチド部分全体は、すべてジスルフィド結合しているものとして計算する。アミノ酸配列、PEG化部位及びPEGの構造を記載する。

本質記載：

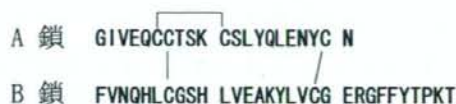
[英名]

● is a recombinant human insulin analog in which Ile10 in the A-chain and Leu15 in the B-chain are substituted by Lys, and to which an average of 2 to 3 polyethylene glycol polymers (molecular weight: ca. 5,000) are covalently bound (probable attachment sites: A-chain: Gly1, Lys10; B-chain: Phe1, Lys15, Lys29). ● is a pegylated peptide (molecular weight: ca. 15,000 - 20,000) whose peptide moiety is composed of a A-chain consisting of 21 amino acid residues and a B-chain consisting of 30 amino acid residues.

[日本名]

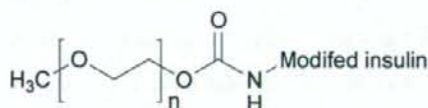
●は、遺伝子組換えヒトインスリンの類縁体で、A鎖Ile10及びB鎖Leu15がLysに置換され、平均して2~3個のポリエチレングリコール(平均分子量:約5,000)が結合している(主な結合位置:A鎖Gly1、Lys10;B鎖Phe1、Lys15、Lys29)。●は、21個のアミノ酸残基からなるA鎖及び30個のアミノ酸残基からなるB鎖から構成されるPEG化ペプチド(分子量:約15,000~20,000)である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合



A鎖 G1、A鎖 K10、B鎖 F1、B鎖 K15、B鎖 K29 : PEG化部位

PEG結合



分子式及び分子量：

$C_{257}H_{385}N_{67}O_{77}S_6$: 5,837.60 (ペプチド部分)

A鎖 $C_{99}H_{154}N_{26}O_{35}S_4$: 2,396.70

B鎖 $C_{158}H_{235}N_{41}O_{42}S_2$: 3,444.94

(5) 遺伝子組換え糖タンパク質の例 (①c、②a、④b、⑤a)

インターフェロンガンマの2箇所を高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖が結合している場合、本質記載には産生細胞と分子量を記載する。分子量及び分子式欄には、ペプチド部分の分子式及び分子量を記載する。また、一次構造の脚注に糖鎖結合部位を示し、別に部位毎の主な糖鎖構造を示す。

本質記載：

[英名]

● is a recombinant human interferon gamma, which is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca.21,000) consisting

of 146 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒトインターフェロンガンマで、チャイニーズハムスター卵巣細胞から産生される。●は、146 個のアミノ酸からなる糖タンパク質(分子量: 約 21,000)である。

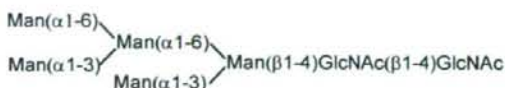
アミノ酸配列:

CYCDPPYVKE AENLKYYFNA GHSDVADNGT LFLGILKNWK EESDRKIMQS
QIVSFYFKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN
YSVTDLNVQR KAIHELIVQM AELSPAATG KKRKSQLFR GRRASQ

K28、K100: 糖鎖結合部位

主な糖鎖の推定構造:

N28



N100



分子量及び分子式:

C₇₆₁H₁₂₀₆N₂₁₄O₂₂₅S₆: 17,145.41(タンパク質部分)

(6) 遺伝子組換えヒト抗体の例 (①c、②c、③d、④b、⑤b)

ヒト抗体の場合、本質記載には以下のように、相補性決定部の由来とフレームワーク及び定常部の由来をサブクラス (IgG1~4) 及び L 鎖 (κ 鎖または λ 鎖) を含めて記載する。キメラ型の場合は、可変部の由来と定常部の由来をサブクラス (IgG1~4) 及び L 鎖 (κ 鎖または λ 鎖) を含めて記載する。N 末端のプログ

ルタミン酸形成や C 末端のプロセシングのように意図しない修飾が一部の分子に生じている場合は、本質記載ではなく、一次構造の脚注に K459: プロセシング (部分的) のように記載する。分子式及び分子量は、修飾されていないものとして計算する。

本質記載:

[英名]

● is a recombinant humanized monoclonal antibody composed of complementarity-determining regions derived from mouse anti-human O monoclonal antibody and framework regions and constant regions derived from human IgG1. ● is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca.155,000 - 160,000) composed of 2 H-chain (□1-chain) molecules consisting of 459 amino acid residues each and 2 L-chain (□-chain) molecules consisting of 214 amino acid residues each.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体であり、マウス抗ヒト抗体の相補性決定部、並びにヒト IgG1 のフレームワーク及び定常部からなる。●は、CHO 細胞により産生される。●は、459 個のアミノ酸残基からなる H 鎖(□1 鎖) 2 分子及び 214 個のアミノ酸残基からなる L 鎖(□鎖) 2 分子で構成される糖タンパク質(分子量: 約 155,000~160,000)である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合:

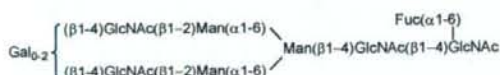
ELGMTQSPSS VSASVGDRTV ITCRASHSIS TYLWNYDQKP GKAPKLLIYA
 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FSLTINSLOP EDFATYTCGG TFSPSGTGGG
 GTKVELKRTV AAPSVFIFPP SDEGLKSGTA SVVQLLNIFY PREAKVQWKV
 DNALDQSGNSQ ESVTEGDSKD STYLSSTLT LSKADYKHK LYACEVTHGG
 LSSPVTKSFN RGEK

EVOLVESGGG LVOPGGSLRL SCAASGFTFT SYMNSVVRQA PGKLEWVAN
 IKQEGSEKTY VDATKGRFTI TRDNAKNSLY LQMSLRAED TAVYYCAREF
 ESTMTSNAD YFFYFMDVWG KGTITVTVSSA STKGPSVFLP APSKSTSGG
 TAALGQLVKD YFPEPVTVM NSGALTSQVH TFPAYLQSSG LYSLSVVTV
 PSSSLGTQTY IGVNHPKPSN TKVDKRVKPEK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP
 SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 TKPREEDYNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKYSNKAL PAPIEKTISK
 AKGQPREPVY YTLPPSREEM TKNDVSLTCL VKGFYPSDIA VEVESNGQPE
 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ GQNVFSCSVN HEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

H 鎖 E1 : 部分的ピログルタミン酸 ; H 鎖 N309 : 糖鎖結合 ; H 鎖 K459 : 部分的プロセシング ;

L 鎖 C214 - H 鎖 C232、 H 鎖 C238 - H 鎖 C238、 H 鎖 C241 - H 鎖 C241 : ジスルフィド結合

主な糖鎖の推定構造 :



分子量及び分子式 :

C₆₅₃₆H₁₀₀₉₆N₁₇₃₆O₂₀₅₄S₄₈ : 147,395.62

(タンパク質部分、4本鎖)

H 鎖 C₂₂₅₁H₃₄₇₂N₅₉₄O₆₉₃S₁₈ : 50,520.39

L 鎖 C₁₀₁₇H₁₅₈₀N₂₇₄O₃₃₄S₆ : 23,181.45

(7) 遺伝子組換え改変型融合型二量体(ホモ)糖タンパク質の例 (①c、②c、③a 及び d、④b、⑤c)

N 末端側は受容体タンパク質の細胞外領域に由来し、C 末端側は Fc ドメインに由来する融合タンパク質で、N 末端側から 147 番目の

アミノ酸が Ser 置換されている場合、本質記載は以下になる。この融合タンパク質の6箇所に糖鎖が結合しており、その内シアル酸結合糖鎖は活性に影響するものとする。アミノ酸配列とは別に糖鎖結合部位毎に代表的な糖鎖の推定構造を記載し、シアリル糖鎖が結合している3箇所については、シアル酸が結合していることがわかるように記載する。分子式及び分子量は単量体及び二量体について記載する。

本質記載 :

[日本名]

●は、遺伝子組換え融合糖タンパク質であり、1~133番目はヒトCD28の細胞外領域、また134~356番目は改変型ヒトIgG1のFcドメインからなり、147番目のアミノ酸残基がSerに置換されている。●は、マウスミエローマ(NS0)細胞から産生される。●は、356個のアミノ酸残基からなるポリペプチド2分子から構成される糖タンパク質(分子量:約90,000)である。

[英名]

● is a recombinant fusion glycoprotein composed of an extracellular domain of human CD28 in positions 1 - 133 and modified Fc domain of human IgG1 at positions 134 - 356, and whose amino acid residue at position 147 is substituted by Ser. ● is produced in mouse myeloma (NS0) cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca. 90,000) composed of 2 polypeptide molecules consisting of 356 amino acid residues each.

子であり、H鎖がIgG由来のC γ 1、C γ 2とIgA由来のCa2、Ca3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。

C.4.1.2 インターフェロン アルファ-2b [3]

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。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、溶液の状態での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。

C.4.1.3 インスリン [4]

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.4.2. 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”²⁾と、2008年にEMA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”³⁾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。

FDA のガイダンス案は、米国農務省 USDA と共同で作成され、安定発現系および一過性発現系を用いて組換え植物により生産された医薬品、生物製品、医療用具、動物薬を対象に、宿主および原材料植物の特性について明らかにすべき事項、環境に関する留意事項、製造方法関連の留意事項、前臨床試験における留意事項等について記載されている。USDA と共同で策定されているため、圃場栽培に関する規制、封じ込め、食料あるいは飼料用作物への混入防止に関することが詳しく記載されている。

本分担報告書では、FDA ガイダンス文書にある“drugs”は“医薬品”、“biologics”は“生物製品”と訳したが、drugs と biologics の意味するところは、製品の特性ではなく、FDA の CDER の規制対象製品としての drugs、CBER の規制対象製品としての biologics であると思われる。ガイダンスドラフトが公表された 2002 年には、CBER が組換えタンパク質性医薬品を取り扱っていたが、2003 年に制度が変更され、現在では CDER が組換えタンパク質性医薬品を取り扱っている。

2008 年に公表された EMEA のガイドラインでは、一過性発現系については対象外とされ、安定発現系を用いて組換え植物により生産された有効成分の品質・安全性関連事項を対象に、組換え体作製について明らかにすべき事項、製造方法関連の留意事項、有効成分の品質管理、感染性物質による汚染の防止等について記載されている。宿主植物の種類としては、高等植物に限定されており、また、有効成分の投与経路としては、非経口投与されるものが適用対象とされている。

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。

- ・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表 6 に記す。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、回答された。

上記のように、EMEA と FDA のガイドラインの主な相違点は二つある。第一に、EMEA ガイドラインでは、適用対象となる生産宿主を安定的に遺伝子導入された高等植物に限定しているのに対して、FDA ガイダンスでは、安定発現系の他に一過性発現系についても適用対象としている点である。また、FDA ガイダンスでは、植物種については特に規定していない。第二に、トランスジェニック植物を利用して製造される医薬品に独特の形態である可食植物を利用したいわゆる食べるワクチン(未加工の野菜や果実を経口投与するもの)について、有効成分の品質に関するガイドラインである EMEA ガイドラインでは全く記載がないのに対して、FDA ガイダンスでは、製法と工程に関連する留意事項などについて記載している

点である。

これらの観点で、我が国におけるガイドライン策定を想定して適用範囲を考察すると、発現系に関しては、一過性発現系はウイルスベクターの使用に関連した安全性確保や製品の品質管理が極めて難しいと考えられるため、安定発現系に限定することが現実的であると思われる。生産宿主となる植物種に関しては、コケや緑藻など、医薬品生産に適した特色を持つ種子植物以外の植物も開発されてきており、将来的には、生産宿主が高等植物に限定されるものではないと予想されるため、高等植物に限定しない形でよいと思われる。可食植物を利用した製品を考慮した内容にすべきかについては、我が国では、粘膜免疫に関して優れた基礎研究が行われており、抗原タンパク質のデザインなど、製品開発につながる有用な基礎的知見が得られてくる可能性があることに加えて、花粉症対策のイネなどの食べるワクチンの研究開発も行われているため、ガイドラインあるいはその補遺の適用対象とすることが望まれるであろう。すなわち、今後、“安定的に遺伝子導入された組換え植物株に由来する製品の品質・安全性”に関するガイドラインを考えていくことが望ましいと思われる。

以下に、FDA ガイダンス案の概要を示す。

Guidance for Industry: Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals (DRAFT GUIDANCE) Sep 2002

遺伝子組換え植物に由来するヒトまたは動物用の医薬品、生物製品、医療機器に関する企業向けガイダンス

目次

- I. 緒言
 - A. 目的および適用対象
 - B. 規制当局の責任範囲
- II. 宿主および原材料植物の特性解析
 - A. 一般的留意事項
 - B. 宿主植物
 - C. 遺伝子導入された原材料植物
- III. 環境に関する留意事項
 - A. 一般的留意事項
 - B. 国家環境政策法 (NEPA)
 - C. 封じ込め法
- IV. 製法と工程に関連する留意事項
 - A. 一般的留意事項
 - B. 未加工の果実あるいは野菜からなる製品に関する特別な留意事項
 - C. FDA および USDA の関連法規
 - D. 製造方法
 - E. 製品の特性解析
 - F. 製品の安定性
- V. ヒトに用いられる医薬品生産用組換え植物由来製品の臨床段階での留意事項
 - A. 一般的留意事項
 - B. 不純物の評価
 - C. アレルゲン性
 - D. 免疫原性
- VI. FDA 規制対象製品の臨床試験、および、USDA 規制対象製品の承認前試験

I. 緒言

I-A. 目的および適用対象

本文書は、FDA あるいは USDA による規制を受ける中間体、タンパク質性医薬品、医療用具、新規な動物薬、家畜用生物製品を含む生物起源由来医薬品（以下、規制対象製品 “regulated products” と記載）の製造における

組換え植物または組換え植物由来原料の利用に関して、米国医薬食品局（FDA）と米国農務省（USDA）が共同で策定したものである。本文書では、ヒトに用いられる非タンパク質性の医薬品、生薬、アレルゲン（21CFR680.1）は取り扱い対象としない。しかし、医薬品用の組換え植物が非タンパク質性製剤の製造に用いられる場合、宿主あるいは原材料植物の特性解析や環境への配慮に関しては、本文書に記載されている内容を応用できる。組換え植物を用いてヒト用の非タンパク質性医薬品を製造することを計画している場合は、医薬品開発の早い段階で FDA の生物製品評価研究センター（CBER）に相談することを勧める。本文書の目的として、“医薬品生産用組換え植物 bioengineered pharmaceutical plant”とは、生物学的製品または医薬品をコードする遺伝子を発現するように組換え DNA 技術を用いて操作された植物を意味する。

本文書では、“you”は、スポンサー、製造業者、認可を受けた人、および、申請者を指し、“we”は、FDA あるいは USDA/動植物検疫局（APHIS）/獣医生物学センター（CVB）を指す。

本文書では、新しい動物薬の研究、および、FDA に提出する研究新薬（IND）申請、研究医療機器（IDE）、バイオロジクス許可申請書（BLA）、新薬承認申請（NDA）、動物用新薬申請書（NADA）、市販前承認申請（PMA）、510（k）、あるいは、USDA に提出する米国の家畜用生物学的製剤承認申請（VBPLA）の作成の際に、言及すべき重要な科学的問題と情報について概説する。本文書では、ヒトまたは動物での使用、あるいは、臨床における診断システムの構成要素としての利用のために組換え植物を用いて製造された製品の安全性と有効

性を示すために考慮すべきことを述べる。

さらに、本文書では、医薬品生産用組換え植物、あるいは、規制対象製品の発現のための遺伝子を含む組換えベクターを感染させた植物で生産される全ての医薬品製造工程に必須の、環境への配慮と封じ込め方法について述べる。

さらに、本文書は、FDA あるいは USDA による規制を受ける製品の製造のための原材料として医薬品生産用組換え植物を利用する場合に特異的なことについて言及している。したがって、他の発現系と共通である多くの事項については焦点をあてていない。製品が複雑で多様であるため、一つの文書で全ての事項に事前に対処することはできない。製品に関するその他の特定の課題については、FDA あるいは USDA の他の文書を参照すること。

APHIS にあるバイオテクノロジー規制課（BRS）が、医薬品生産用組換え植物および感染性を有する植物用ベクターの輸入と州間の移動、ならびに、それらの環境（例：グリーンハウス、実験室、発酵槽のような封じ込め施設の外）への放出について、監督していることを知っておく必要がある。監督の対象となる活動をする場合は、APHIS/BRS から事前に許可を得なければならない（7CFR340）。許可申請のためのガイダンスは、USDA/APHIS の web サイト <http://www.aphis.usda.gov/biotech>、あるいは、USDA/APHIS/BRS への文書での照会により得られる。本文書は、植物の認可プロセスについては記載しない。

I-B. 規制当局の責任範囲

FDA は、治療、予防、診断を目的として医薬品生産用組換え植物を用いて製造されるヒト用の生物製品、ヒトあるいは動物用の医薬品に関する規制を行う。ヒトに投与される生物起