

- accumulation. *J. Biochem.*, 146, 787-796 (2009)
- 12) Shibata, H., Nakano, T., Parvez, MA., Furukawa, Y., Tomoshi, A., Niimi, S., Arakai, N., and Higuti, T.: Triple combination of lower and longer alkyl gallates and oxacillin improve antibiotic synergy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2218-2220 (2009),
- 13) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英 RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望 医薬品研究 2009 vol. 40 No. 12 789-809
- 14) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英 治療用タンパク質の免疫原性 その1 医薬品研究 2009 vol. 40 No. 11 703-715
- 15) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英 治療用タンパク質の免疫原性 その2 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010 vol. 41 No. 5 390-400 (印刷中)
- 16) Niimi, S., Harashima, M., and Hyuga, M.: Current Status of Therapeutic Angiogenesis with Protein, Gene and Cell Therapy *Current Drug Therapy*, 4, 221-233 (2009).
- 17) 山口照英、内田恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保, *Pharmstage*, 9 (2), 1-5 (2009)
- 18) 内田恵理子、山口照英: 医薬品のウイルス安全性確保: 核酸増幅検査 (NAT) によるC型肝炎ウイルス検出の評価とNATによる高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発、*YAKUGAKU ZASSHI*, 130 (2), 163-169 (2010)
- 19) 内田恵理子: “バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験”、日本薬局方技術情報 2010 第15改正第一追補/第二追補対応、日本公定書協会編、じほう、東京(2010)、pp85-91
- 20) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Freeze-drying of proteins in glass solids formed by basic amino acids and dicarboxylic acids, *Chem Pharm Bull*, 57, 43-48 (2009)
- 21) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of ^{19}F -NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions, *Chem Pharm Bull*, 57, 61-64 (2009)
- 22) Hikaru Tanaka, Iyuki Namekata, Hideaki Nouchi, Koki Shigenobu, Toru Kawanishi, and Akira Takahara, New Aspects for the Treatment of Cardiac Diseases Based on the Diversity of Functional Controls on Cardiac Muscles: Diversity in the Excitation-Contraction Mechanisms of the Heart, *J. Pharmacol.Sci.*, 109, 327-333 (2009)
- 23) Iyuki Namekata, Yayoi Tsuneoka, Akira Takahara, Hideaki Shimada, Takahiko Sugimoto, Kiyoshi Takeda, Midori Nagaharu, Koki Shigenobu, Toru Kawanishi, Hikaru Tanaka: Involvement of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400, *J. Pharmacol.Sci.*, 110, 111-116 (2009)
- 24) Sakamoto, T., Matsubara, T., Sasakura, D., Takada, Y., Fujimaki, Y., Aida, K., Miura, T., Terahara, T., Higo, N.,

- Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Chemical mapping of tulobuterol in transdermal tapes using microscopic laser Raman spectroscopy, *Pharmazie*, **64**, 166-174 (2009)
- 25) Izutsu, K., Hiyama, Y., Yomota, C., Kawanishi, T.: Near-infrared analysis of hydrogen-bonding in glass- and rubber-state amorphous saccharide solids, *AAPS PharmSciTech*, **10**, 524-529 (2009)
- 26) Shibata, H., Saito, H., Yomota, C., Kawanishi, T.: Pharmaceutical quality evaluation of lipid emulsions containing PGE1: alteration in the number of large particles in infusion solutions, *Int J Pharm*, **378**, 167-176 (2009)
- 27) Sakamoto, T., Portieri, A., Taday, P. F., Takada, Y., Sasakura, D., Aida, K., Matsubara, T., Miura, T., Terahara, T., Arnone, D. D., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Detection of tulobuterol crystal in transdermal patches using terahertz pulsed spectroscopy and imaging, *Pharmazie*, **64**, 361-365 (2009)
- 28) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts, *Chem Pharm Bull*, **57**, 1231-1236 (2009)
- 29) 川西徹: バイオ後続品とは - 開発状況と規制について - 医薬ジャーナル **45**, 75-79 (2009)
- 30) 川西徹: バイオ後続品の評価 ファルマシア **45**, 553-558 (2009)
- 31) 川西徹: バイオ後発品 - 国内指針発出と今後の課題 PHARMSTAGE, **9**, 1-3 (2009)
- 32) Yukio Hiyama, Quality Topics Q-IWG: Quality Implementation Working Group, Proceeding of ICH Public Meeting: ICH Japan Symposium 2009, 114-122 (2009)
- 33) 檜山行雄、品質に関するトピックの動向、Q-IWG:品質実施作業部会、医薬品研究、**40**, 848-852 (2009)
- 34) Tsuyoshi Ando, Yukio Hiyama, Yoshihiro Matsuda, Tamiji Nakanishi, and Haruhiro Okuda, Inside ICH-MHLW: Working groups ramp up quality-based implementation, *Pharmaceutical Technology*, **33**, 72 (2009)

2. 学会発表

- 1) 山口照英: Japanese Regulatory Aspects on Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics. DIA Biosimilar Workshop, 2009年9月、ロンドン
- 2) 山口照英: Japanese Regulatory Aspects on Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics, "Current Advanced Statistical Issues in Clinical Trials—Biosimilars", International Symposium in Taiwan, 2009年10月、台湾
- 3) 山口照英: バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保について, 第7回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム、2009年12月、大阪
- 4) 山口照英: 局方・生物薬品各条のこれから, 第6回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム、2009年12月、東京
- 5) 山口照英: バイオ後続品の開発の動向と品質・安全性・有効性確保, 第10回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム、2010年1月、東京
- 6) 山口照英: 細胞・組織加工医薬品等の安全性・品質等の確保, 第9回ヒューマンサイ

- エンス研究資源バンクセミナー、2010年1月、大阪
- 7) 山口照英：遺伝子医薬品についての各国の規制当局の現状、第8回 遺伝子治療シンポジウム、2010年2月、大阪
 - 8) 川崎ナナ：糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析、第7回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム、2009年12月、大阪
 - 9) 豊田淑江、北川博子、石井明子、多田 稔、鈴木 琢雄、小林 哲、山口照英：血管内皮前駆細胞の機能解析-Early EPCを中心に 第9回日本再生医療学会総会、2010年3月、広島
 - 10) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬品とFcドメイン融合タンパク質医薬品における胎児性Fc受容体(FcRn)親和性の差異に関する検討 日本薬学会第130年会、2010年3月、岡山
 - 11) 多田 稔、伊藤さつき、川崎ナナ、石井 明子、鈴木 琢雄、小林 哲、豊田 淑江、山口照英：Notch リガンド糖タンパク質 Jagged1 の Allagille 症候群関連変異体の機能解析、第82回日本生化学大会、2009年10月、神戸
 - 12) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬品およびFcドメイン融合タンパク質医薬品のFc受容体(FcRn およびFcγRI)との結合特性比較、第82回日本生化学大会、2009年10月、神戸
 - 13) 北川博子、豊田淑江、石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、小林 哲、山口照英：血管内皮細胞であるEarly EPCの機能解析、第82回日本生化学大会、2009年10月、神戸
 - 14) 小林哲、鈴木琢雄、石井明子、川崎ナナ、山口照英：MALDI-TOF MSにおけるマトリックスの塩基性アミノ酸残基に対する影響、質量分析討論会、2009年5月、大阪
 - 15) 眞田由親、新村卓也、井関寛、内田恵理子、山口照英、小木美恵子：HL60細胞におけるDimethyl Sulfoxideによる分化誘導とc-mycの変化について、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜
 - 16) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析による探索、日本薬学会第130年会、2010年3月、岡山
 - 17) Yukio Hiyama, Quality Topics Q-IWG: Quality Implementation Working Group, ICH Tokyo Symposium 2009, 2009年6月、東京
 - 18) 檜山行雄、“ICH Q8「製剤開発」、Q9「品質リスクマネジメント」、Q10「医薬品品質システム」の背景など”、日本PDA製薬学会 教育コース「ICH Qトリオの内容解説」、2009年12月、東京
 - 19) 奥田晴宏、檜山行雄 ICH Q8, Q9, Q10におけるRTR、第九回医薬品品質フォーラムシンポジウム『リアルタイムリリースの実現に向けて』、2010年1月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1-1 日本で承認されている糖タンパク質医薬品(2010年1月現在)

G-CSF	レノグラスチム
M-CSF	ミリモスチム
インターフェロン	インターフェロン アルファ (NAMALWA)、インターフェロン アルファ (BALL-1)、インターフェロン ベータ、インターフェロン ベータ-1a、インターフェロン ガンマ-n1
エリスロポエチン	エポエチンアルファ、エポエチンベータ、ダルベポエチン アルファ
モノクローナル抗体	アダリムマブ、イブリツモマブ チウキセタン、インフリキシマブ、オマリズマブ、ゲムツズマブ オゾガマイシン、セツキシマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、バシリキシマブ、パリビズマブ、ベバシズマブ、リツキシマブ
受容体	エタネルセプト
卵胞刺激ホルモン	ホリトロピン アルファ、フォリトロピン ベータ
性腺刺激ホルモン	ヒト下垂体性性腺刺激ホルモン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、血清性性腺刺激ホルモン
第 VII 因子	エプタコグ アルファ
第 VIII 因子	オクタコグ アルファ、ルリオクタコグ アルファ
トロンボモジュリン	トロンボモジュリン アルファ
ウロキナーゼ	ウロキナーゼ
プロウロキナーゼ	ナサルプラーゼ
tPA	アルテプラーゼ、パミテプラーゼ、モンテプラーゼ
酵素	アガルシダーゼ アルファ、アガルシダーゼ ベータ、アルグルコシダーゼ アルファ、アルグルセラーゼ、イデュルスルファーゼ、イミグルセラーゼ、カリジノゲナーゼ、ガルスルファーゼ、ラロニダーゼ

表 1-2 主なエポエチン製剤

	INN		製剤名	メーカー	販売国
1	epoetin alfa	先行	EPOGEN	Amgen	米国
2	epoetin alfa	先行	Eprex	Jassen-Cilag	欧州
3	epoetin alfa	先行	エスポー	協和発酵キリン	日本
4	epoetin alfa	後続	Abseamed	Medice Arzneimittel	欧州
5	epoetin alfa	後続	Binocrit	Sandoz	欧州
6	epoetin alfa	後続	Epoetin alfa Hexal	Hexal Biotech	欧州
7	epoetin beta	先行	エポジン	中外製薬	日本
8	epoetin zeta	後続	Retacrit	Hospira	欧州
9	epoetin zeta	後続	Silapo	Stamda Arzneimittel	欧州
10	epoetin kappa	後続	エポエチンアルファ BS 注 JCR	日本ケミカルリサーチ	日本

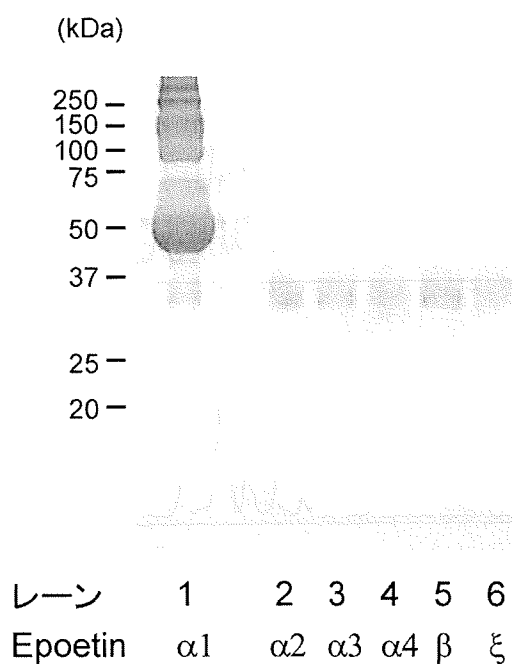


図 1-1 エポエチン製剤の SDS-PAGE

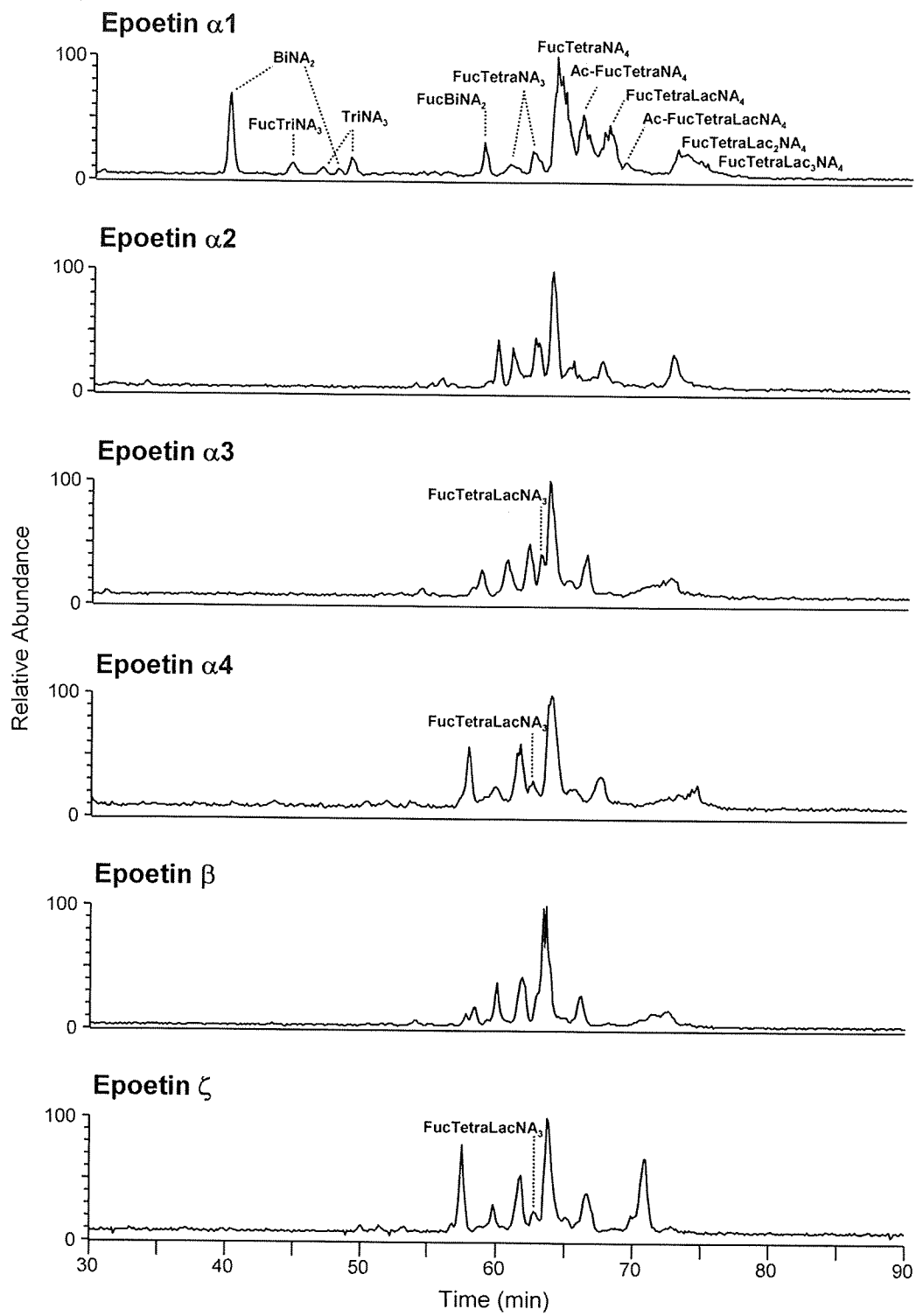


図 1-2 エポエチンの糖鎖プロファイル(ネガティブイオンモード)

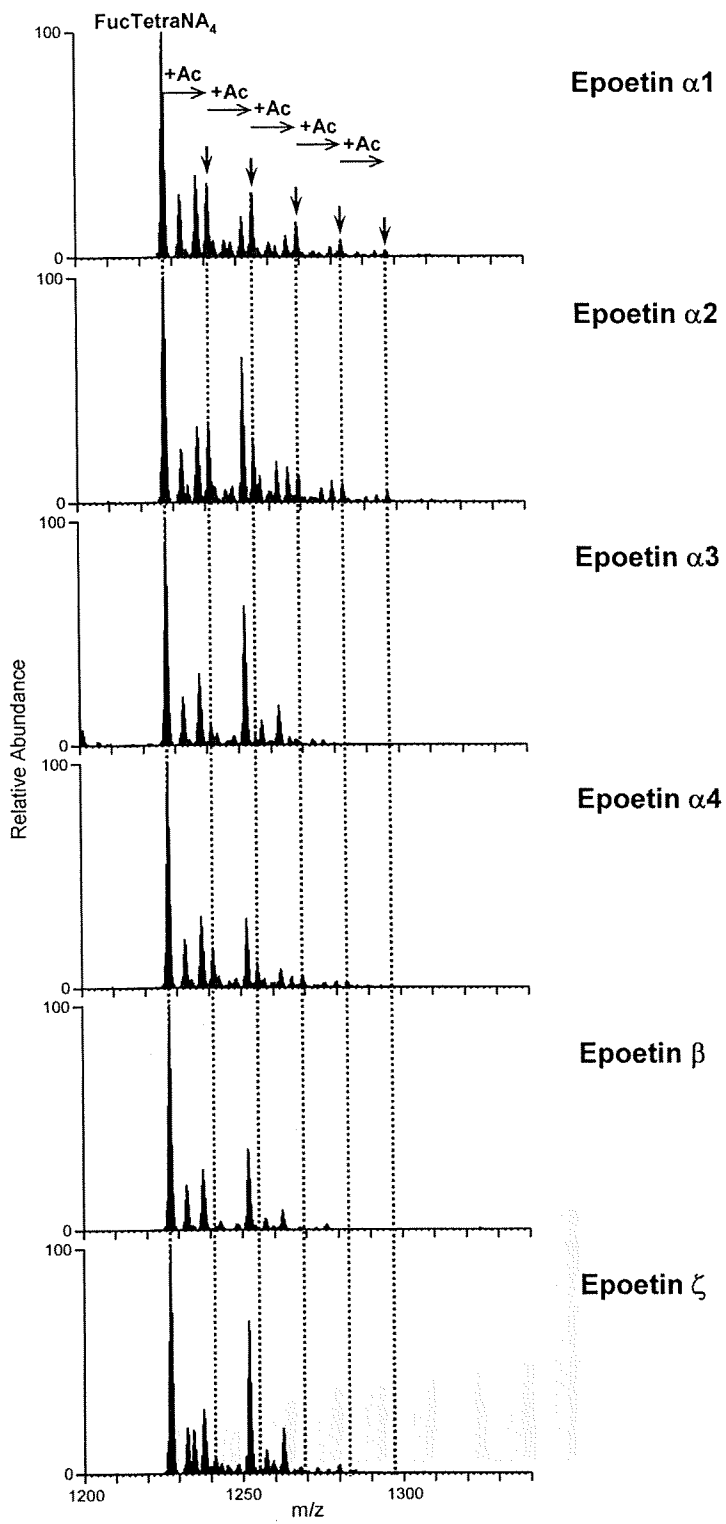


図 1-3 溶出時間 63-73 分のマスペクトル

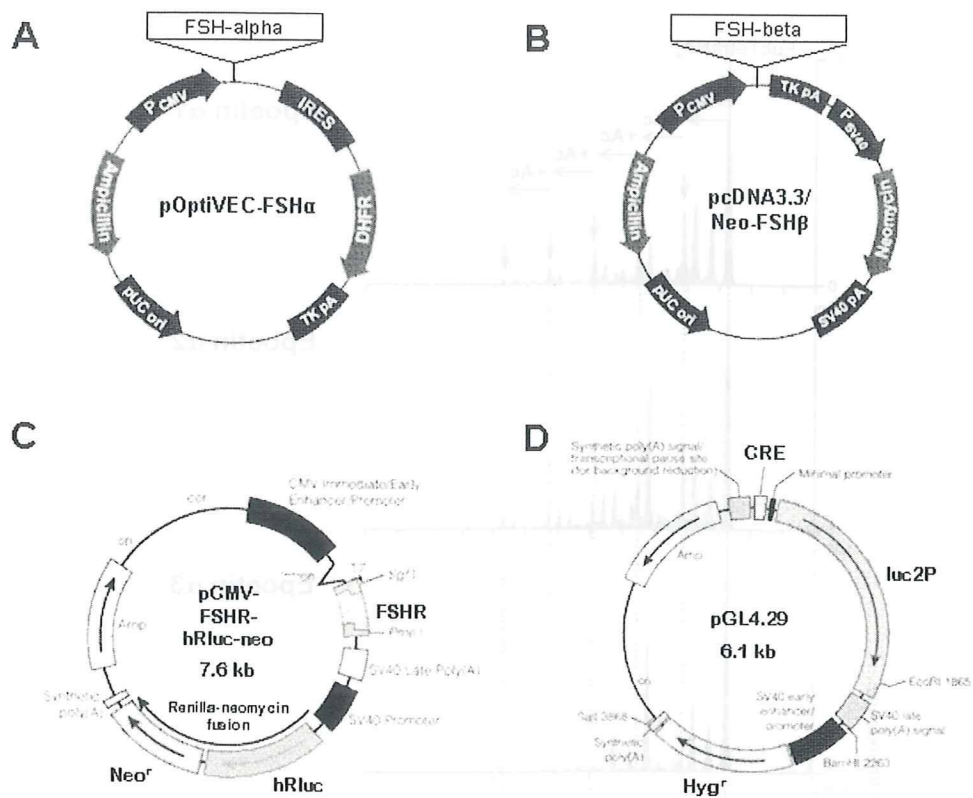


図 2-1 本研究で用いた発現ベクターの構造

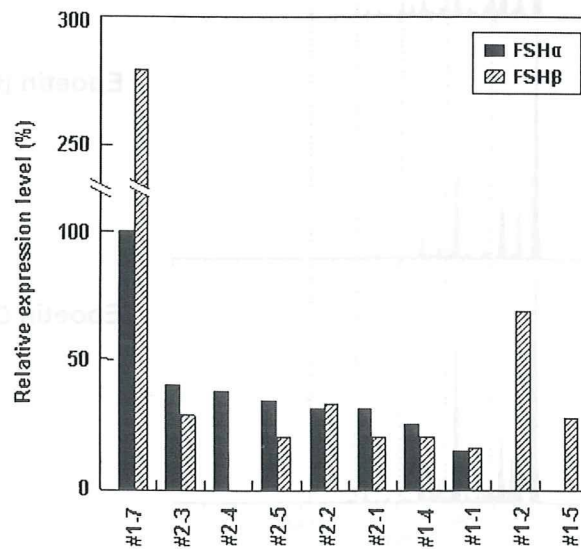


図 2-2 FSH 発現ベクター導入細胞におけるヒト FSH 遺伝子の発現量

ヒト FSHα 鎖発現ベクターおよび FSHβ 鎖発現ベクターを共導入した CHO-DG44 細胞に、G418 およびメトトレキサート耐性株 10 クローンについて FSHα 鎖および FSHβ 鎖の発現量をリアルタイム PCR で解析した。

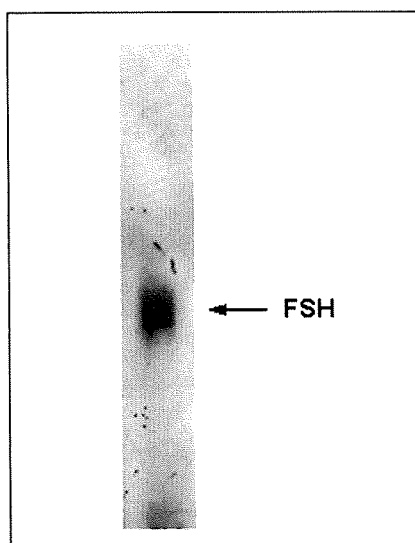


図 2-3 FSH 発現ベクター導入細胞 DGF-1.7 培養上清のウェスタンブロット
 DGF-1.7 の培養上清について非還元条件で電気泳動した後、1 次抗体を抗ヒト FSH 抗体（ハイブリドーマ#57-5）、2 次抗体を Cy5 標識抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光スキャナーで検出した。

表 2-1 抗ヒト FSH 抗体の結合特性

No.	Bound	0.5 M NaCl	4 M MgCl ₂	pH 10	pH 2
37-4	124	33	85	0	3
57-5	226	6	3	1	189

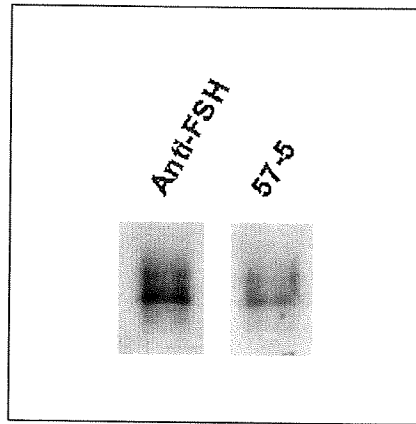


図 2-4 抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#57-5 による FSH のウェスタンブロット
 FSH (フォリスチム) を非還元条件で電気泳動した後、1 次抗体を市販の抗ヒト FSH 抗体 (Leinco Technologies) あるいは本研究で作製した抗ヒト FSH 抗体 (ハイブリドーマ#57-5 培養上清)、2 次抗体を Cy5 標識抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光スキャナーで検出した。

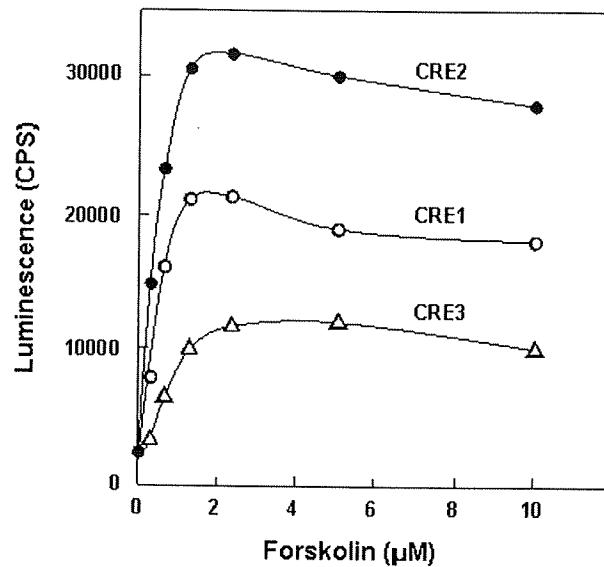


図 2-5 CRE 応答ルシフェラーゼ発現ベクター導入細胞株の選択
 フォルスコリンを添加して 6 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

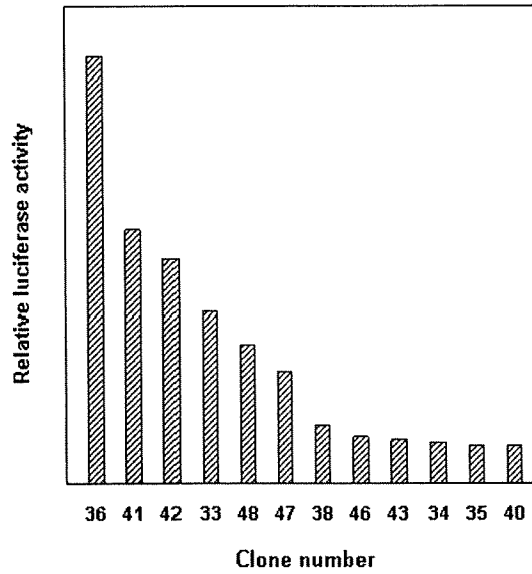


図 2-6 FSH 応答レポーター遺伝子アッセイ用細胞株の選択

FSH を 10mIU/ml となるように添加して 6 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

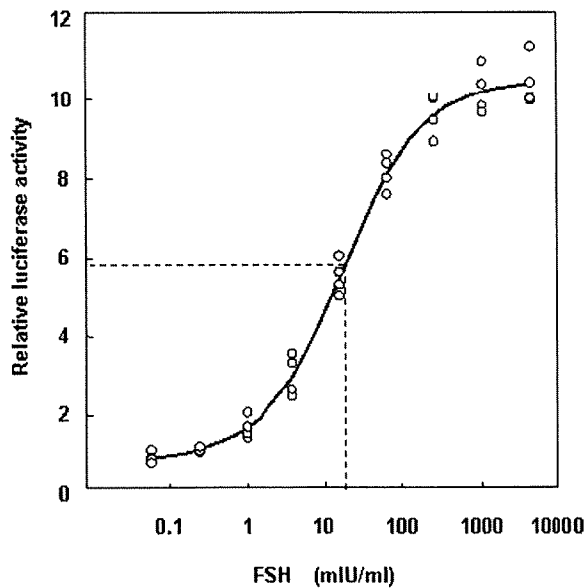


図 2-7 レポーター細胞による FSH 応答ルシフェラーゼ活性の応答と近似曲線

FSH を 4 IU から 9 段階の 4 倍希釈液をそれぞれ添加して 6 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した (白抜き丸)。ソルバーによる非線形解析を行い、シグモイドの近似曲線 (実線) を求めた結果、IC50 値は 20 mIU/ml であった。

表3 抗体医薬品及びFc融合タンパク質医薬品の承認状況

分類	名称	商品名	構造	標的	主な適応疾患	承認年		
						US	EU	Japan
マウス抗体								
	Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991
	Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	IgG1κ (MX-DTPA:90Y標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	2008
	Iodine 131 Tositumomab	Bexxar	IgG2aλ (I31I標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA
	Catumaxomab	Removab	mouse IgG2aκ (EpCAM), rat IgG2bλ (CD3)	EpCAM, CD3	癌性腹水	NA	2009	NA
キメラ抗体								
	Abciximab	ReoPro	IgG1 (Fab)	GPIIb/IIIa	心筋虚血	1994	NA	NA
	Rituximab	Rituxan	IgG1κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001
	Basiliximab	Simulect	IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002
	Infliximab	Remicade	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	1998	1999	2002
	Cetuximab	Erbix	IgG1κ	EGFR	頭頸部癌、結腸・直腸癌	2004	2004	2008
ヒト化抗体								
	Daclizumab	Zenapax	IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA
	Palivizumab	Synagis	IgG1κ	RSV F protein	RSウイルス感染	1998	1999	2002
	Trastuzumab	Herceptin	IgG1κ	HER2	転移性乳癌	1998	2000	2001
	Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	IgG4κ (カリアマイン結合)	CD33	急性骨髄性白血病	2000	NA	2005
	Alemtuzumab	Campath	IgG1κ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	NA
	Omalizumab	Xolair	IgG1κ	IgE	喘息	2003	2005	2009
	Efalizumab	Raptiva	IgG1κ	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA
	Bevacizumab	Avastin	IgG1	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007
	Natalizumab	Tysabri	IgG4κ	α4 integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA
	Pocilizumab	Actemra	IgG1	IL-6R	キャッスルマン病、関節リウマチ	2010	2009	2005
	Ranibizumab	Lucentis	IgG1κ Fab (48Kフラグメント)	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	2009
	Eculizumab	Soliris	IgG2/4κ	C5	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	NA
	Certolizumab pegol	Cimzia	Fab'+PEG	TNFα	重症クローン病	2008	2010	NA
ヒト抗体								
	Adalimumab	Humira	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2002	2003	2008
	Panitumumab	Vectibix	IgG2κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	2007	NA
	Golimimumab	Simponi	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2009	2009	NA
	Ustekinumab	Stelara	IgG1κ	IL12, IL23 p40	乾癬	2009	2009	NA
	Canakinumab	Ilaris	IgG1κ	IL-18	クリオピリン関連周期性症候群	2009	2009	NA
	Ofatumumab	Arzerra	IgG1κ	CD20	慢性リンパ性白血病	2009	NA	NA
融合タンパク質								
	Etanercept	Enbrel	TNFR + Fc	TNFα, LTα	関節リウマチ	1998	2000	2005
	Alefacept	Amevive	LFA3 + Fc	CD2	尋常性乾癬	2003	NA	NA
	Abatacept	Orencia	CTLA4 + Fc	CD80/CD86	関節リウマチ	2005	2007	NA
	Rilonacept	Arcalyst	IL-1 R + IL-1 RAcP + Fc	IL-1	クリオピリン関連周期性症候群	2008	2009	NA
	Romiplostim	NPLate	Fc+TPOアゴニストペプチド	TPO受容体	血小板減少性紫斑病	2008	2009	NA

NA: Not approved (未承認)

表4 抗体医薬品関連ガイドライン

FDA		
公表年	タイトル	範囲
1996	Guidance for industry: For the submission of chemistry, manufacturing, and controls information for a therapeutic recombinant DNA-derived product or a monoclonal antibody product for in vivo use	製造/品質
1997	Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use	製造/品質/非臨床/臨床
EMA		
公表年	タイトル	範囲
1987	Production and quality control of monoclonal antibodies of murine origin	製造/品質
1990	Production and quality control of human monoclonal antibodies	製造/品質
1991	Radiopharmaceuticals based on monoclonal antibodies 3AQ1a	製造/品質/非臨床/臨床
1994	Production and quality control of monoclonal antibodies 3AB4a	製造/品質
2004	Concept paper on the need to revise the guideline on production and quality control of monoclonal antibodies (3AB4a) CHMP/BWP/64/04	製造/品質
2007	Guideline on production and quality control of monoclonal antibodies and related substances (DRAFT) EMEA/CHMP/BWP/157653/2007	製造/品質
2008	Guideline on development, production, characterisation and specifications for monoclonal antibodies and related products EMEA/CHMP/BWP/157653/2007	製造/品質
2009	Concept paper on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies for in vivo clinical use EMEA/CHMP/BMWP/114720/2009	
2009	Concept paper on the revision of the guideline on radiopharmaceuticals based on monoclonal antibodies EMEA/CHMP/CVMP/362268/2009	製造/品質/非臨床/臨床
2009	Concept paper on the development of a guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies EMEA/CHMP/BMWP/632613/2009	非臨床/臨床

表5 エフェクター活性の増強を目的とした Fc 領域改変の例

開発	改変部位、技術	特徴	文献
Genentech	IgG1-S298A, E333A, K334A	ADCC 増強 (II ↓, IIIa ↑)	a
Xencor	IgG1-S239D, I332E	ADCC 増強 (IIIa/IIb ↑)	b, c
	IgG1-S239D, A330L, I332E	ADCC 増強、CDC 減弱 (IIIa/IIb ↑, C1q ↓)	b, d
	IgG1-G236A, S239D, I332E	ADCC 増強 (IIa/IIb ↑, IIIa ↑)	e
AME/Eli Lilly	IgG1-D280H, K290S, S298D	ADCC 増強 (IIb ↓, IIIa ↑)	f
Macrogenics	IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L	ADCC 増強 (IIa ↑, IIIa ↑)	g
Abgenix/Amgen	IgG1-K326A, E333A	CDC 増強、ADCC 維持 (C1q ↑)	h
	IgG1-K326W, E333S IgG2-E333S	CDC 増強、ADCC 消失 (C1q ↑)	h
協和発酵キリン	IgG1/IgG3 mixed isotype	CDC 増強、ADCC 維持 (C1q ↑)	i, j
	Fucose depletion from IgG1 oligosaccharide (FucT8(-/-) CHO)	ADCC 増強 (IIIa ↑)	i, k
GlycArt/Roche	Enrichment of Fucose-free mAb (GnTIII overexpression)	ADCC 増強	l
MIT	IgG1-S298G, T299A	糖鎖修飾を受けず ADCC 活性を維持	m
Univ. of Texas	IgG1-E382V, M428I (produced in E.coli)	FcγI を介した単球による 抗腫瘍活性	n

Strohl WR *et al.* Cur. Opin. in Biotech. 2009, 20:685-691 を参考に作成

* 特徴の項の括弧内は対象とする受容体あるいは補体との親和性の変化を記載している。

(IIIa/IIb ↑ は FcγRIIIa との親和性と FcγRIIb との親和性の比が増加したことを示す)

* 本表ではマクロファージ等による抗体依存性細胞食作用(ADCP)も ADCC 活性の一部として区別無く表記した。

- a) R.L. Shields, *et al.*, *J Biol Chem*, 276, 6591 (2001)
- b) G.A. Lazar, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4005 (2006)
- c) H.M. Horton, *et al.*, *Cancer Res*, 68, 8049 (2008)
- d) E.M. Bruckheimer, *et al.*, *Neoplasia*, 11, 509 (2009)
- e) J.O. Richards, *et al.*, *Mol Cancer Ther*, 7, 2517 (2008)
- f) J. Watkins, *et al.*, *Fc region variants. WO 2004/074455 A2*. 2004.
- g) J.B. Stavenhagen, *et al.*, *Cancer Res*, 67, 8882 (2007)
- h) E.E. Idusogie, *et al.*, *J Immunol*, 166, 2571 (2001)
- i) T. Kubota, *et al.*, *Cancer Sci*, 100, 1566 (2009)
- j) A. Natsume, *et al.*, *Cancer Res*, 68, 3863 (2008)
- k) T. Shinkawa, *et al.*, *J Biol Chem*, 278, 3466 (2003)
- l) C. Ferrara, *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 93, 851 (2006)
- m) S.L. Sazinsky, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20167 (2008)
- n) S.T. Jung, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 604

表6 エフェクター活性の減弱を目的とした Fc 領域改変の例

開発	改変部位、技術	特徴	文献
Alexion (Eculizumab)	IgG2/IgG4 キメラ	ADCC, CDC 減弱	a
Bristol-Meyers (Abatacept)	IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S	ADCC 減弱	b
Tolerx/GlaxoSmithKline (Otelixizumab)	IgG1-N297A	ADCC 減弱 (Fc 部の糖鎖の除去)	c
GlaxoSmithKline (Clenoliximab)	IgG4-S228P, L236E	ADCC, CDC 減弱	d
Ortho Biotech (huOKT3)	IgG1-L234A, L235A	ADCC, CDC 減弱 サイトカインストームの抑制	e
Protein Design Labs (visilizumab)	IgG2-V234A, G237A	ADCC, CDC 減弱 サイトカインストームの抑制	f
Wellcome Lab.	IgG4-L235A, G237A, E318A	ADCC 減弱	g
Merck	IgG2-H268Q, V309L, A330S, P331S (IgG2m4)	ADCC, CDC 減弱	h
MedImmune	IgG1-L234F, L235E, P331S	ADCC, CDC 減弱	i
Xencor	IgG1-S267E, L328F	抑制型FcγIIb への選択的結合	j

Strohl WR *et al.* Cur. Opin. in Biotech. 2009, 20:685-691 を参考に作成

- a) R.P. Rother, *et al.*, *Nat Biotechnol*, 25, 1256 (2007)
- b) P.M. Davis, *et al.*, *J Rheumatol*, 34, 2204 (2007)
- c) S. Bolt, *et al.*, *Eur J Immunol*, 23, 403 (1993)
- d) M.P. Reddy, *et al.*, *J Immunol*, 164, 1925 (2000)
- e) D. Xu, *et al.*, *Cell Immunol*, 200, 16 (2000)
- f) M.S. Cole, *et al.*, *Transplantation*, 68, 563 (1999)
- g) J.T. Hutchins, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11980 (1995)
- h) Z. An, *et al.*, *MAbs*, 1, 572 (2009)
- i) V. Oganessian, *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64, 700 (2008)
- j) S.Y. Chu, *et al.*, *Mol Immunol*, 45, 3926 (2008)

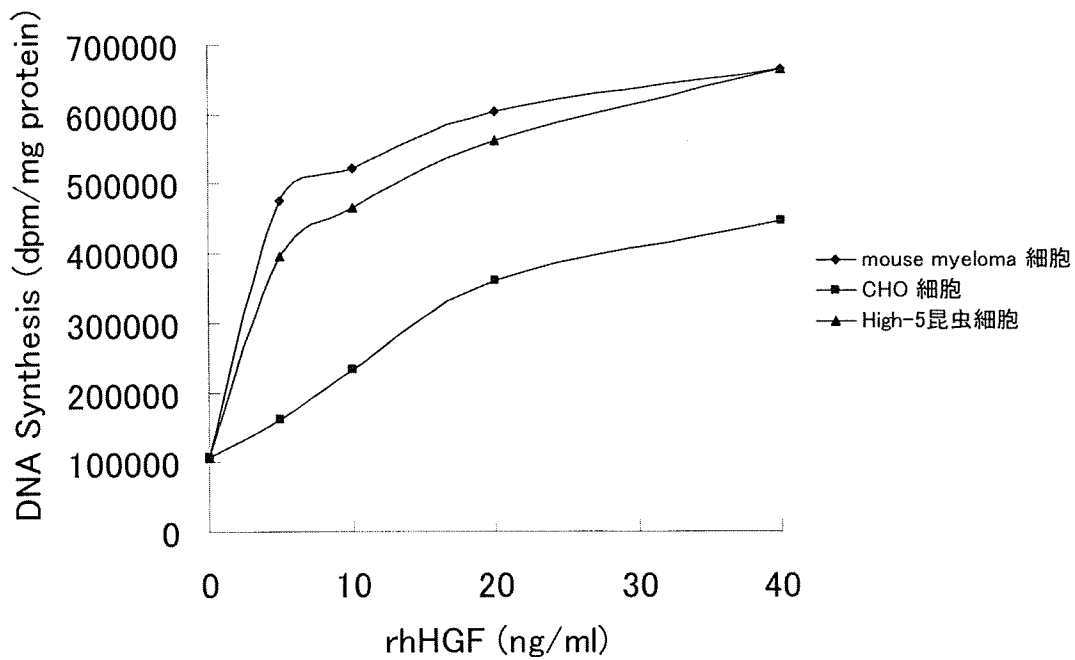


図3 初代培養ラット肝細胞における rhHGF による DNA 合成促進

表7 ELISA による rhHGF 抗原価の測定

	Mouse myeoloma 細胞	High-5 昆虫細胞	CHO 細胞
表示値	5 ug/ml	5 ug/ml	5 ug/ml
測定値	7.18 ug/ml	5.07 ug/ml	1.69 ug/ml
表示値/測定値	1.43	1.01	0.338

表8 表面プラズモン共鳴法を用いた rhHGF の rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質との結合能

	k_a (M^{-1}/S^{-1})	k_d (S^{-1})	K_d (nM)
Mouse myeloma 細胞	5.76×10^6	1.04×10^{-3}	0.18
High-5 昆虫 細胞	3.76×10^6	9.26×10^{-4}	0.25
CHO 細胞	2.19×10^6	5.90×10^{-3}	2.69

1 表9 製剤総則改正原案(第2版 委員会後修正確定版 100312)中の製剤特性試験の必要性の記述

2 1. 経口投与する製剤 Preparations for Oral Application

3 1-1-1. 口腔内崩壊錠 Orally Disintegrating Tablets/Orodispersible Tablets

4 (2) 本剤は、適切な崩壊性を有する。

5 2. 口腔内に適用する製剤 Preparations for Oro-mucosal Application

6 2-1. 口腔用錠剤 Tablets for Oro-mucosal Application

7 (4) 本剤は、適切な溶出性又は崩壊性を有する。

8 2-2. 口腔用スプレー剤 Sprays for Oro-mucosal Application

9 (3) 本剤のうちの定量噴霧式製剤は、別に規定するもののほか、適切な噴霧量の均一性を有する。

10 2-3. 口腔用半固形剤 Semi-solid Preparations for Oro-mucosal Application

11 (4) 本剤は、口腔粘膜に適用する上で適切な粘性を有する。

12 3. 注射により投与する製剤 Preparations for Injection

13 3-1. 注射剤 Injections

14 (1 2) 本剤のうち 100 mL 以上の注射剤用ガラス容器に用いるゴム栓は、別に規定するもののほか、輸液用ゴム栓試
15 験法〈7.03〉に適合する。

16 3-1-2. 埋め込み注射剤 Implants/Pellets

17 (4) 本剤は、適切な放出特性を有する。

18 3-1-3. 持続性注射剤 Prolonged Release Injections

19 (3) 本剤は、適切な放出特性を有する。

20 4. 透析に用いる製剤 Preparations for Dialysis

21 4-1. 透析用剤 Dialysis Agents

22 (3) 本剤のうち用時溶解して用いるものは、適切な製剤の均一性を有する。

23 5. 気管支・肺に適用する製剤 Preparations for Oral Inhalation

24 5-1. 吸入剤 Inhalations

25 5-1-1. 吸入粉末剤 Dry Powder Inhalers

26 (3) 本剤のうち定量吸入式の製剤は、適切な有効成分の送達量の均一性を有する。

27 (4) 本剤の有効成分の粒子は、空気力学的に適切な粒子径を有する。

28 5-1-3. 吸入エアゾール剤 Metered-Dose Inhalers

29 (3) 本剤は、適切な有効成分の送達量の均一性を有する。

30 (4) 本剤の有効成分の粒子は、空気力学的に適切な粒子径を有する。

31 6. 目に投与する製剤 Preparations for Ophthalmic Application

32 6-2. 眼軟膏剤 Ophthalmic Ointments

33 (7) 本剤は、眼組織に適用する上で適切な粘性を有する。

34 8. 鼻に適用する製剤 Preparations for Nasal Application

35 8-1. 点鼻剤 Nasal Preparations

36 (3) 本剤のうち、定量噴霧式製剤は、別に規定するもののほか、適切な噴霧量の均一性を有する。

37

38 9. 直腸に適用する製剤 Preparations for Rectal Application

39 9-1. 坐剤 Suppositories for Rectal Application

40 (5) 本剤は、適切な放出性を有する。

41 9-2. 直腸用半固形剤 Semi-solid Preparations for Rectal Application

42 (4) 本剤は、直腸に適用する上で適切な粘性を有する。

43 10. 膣に適用する製剤 Preparations for Vaginal Application

44 10-1. 錠剤 Tablets for Vaginal Use

45 (4) 本剤は、適切な放出性を有する。

46 10-2. 膣用坐剤 Suppositories for Vaginal Use

47 (5) 本剤は、適切な放出性を有する。

48 11. 皮膚などに適用する製剤 Preparations for Cutaneous Application

49 (1) 皮膚に適用する製剤には、皮膚を通して有効成分を全身循環血流に送達させることを目的とした経皮吸収型製
50 剤も含まれる。経皮吸収型製剤からの有効成分の放出速度は、通例、適切に調節される。

51 11-3. スプレー剤 Sprays for Cutaneous Application

52 (3) 本剤のうち、定量噴霧式製剤は、別に規定するもののほか、適切な噴霧量の均一性を有する。

53 11-4. 軟膏剤 Ointments

54 (3) 本剤は、皮膚に適用する上で適切な粘性を有する。

55 11-5. クリーム剤 Creams

56 (3) 本剤は、皮膚に適用する上で適切な粘性を有する。

57 11-6. ゲル剤 Gels

58 (3) 本剤は、皮膚に適用する上で適切な粘性を有する。

59 11-7. 貼付剤 Patches

60 (3) 本剤のうち経皮吸収型製剤は、別に規定するもののほか、製剤均一性試験法〈6.02〉に適合する。

61 (4) 本剤は、皮膚に適用する上で適切な粘着性を有する。

62 (5) 本剤のうち、放出速度を調節した製剤は、適切な放出特性を有する。

表10 第16改正日本薬局方製剤総則各条収載製剤で試験すべきとされている製剤特性のうち、一般試験法に収載されていない試験

試験する製剤特性	適用対象となる製剤	USP あるいはEPに収載されている関連一般試験法
溶出性	口腔用錠剤	
崩壊性	口腔内崩壊錠	
放出性	埋め込み注射剤、持続性注射剤、座剤、腔錠、臍用座剤	EP: DISINTEGRATION OF SUPPOSITORIES AND PESSARIES (2.9.2) (資料3)
放出特性	貼付剤(放出速度調節型)	
放出速度	経皮吸収型製剤(皮膚を通して有効成分を全身循環血流に送達するもの)	USP: DRUG RELEASE TRANSDERMAL DELIVERY SYSTEMS-GENERAL DRUG RELEASE STANDARDS<724> (資料4) EP: DISSOLUTION TEST FOR TRANSDERMAL PATCHES (2.9.4) (資料5)
製剤の均一性	透析用剤(用事溶解)、貼付剤(経皮吸収型)	
噴霧量の均一性	口腔用スプレー剤(定量噴霧式)、点鼻剤(定量噴霧式)、スプレー剤(定量噴霧式)	USP: AEROSOLS, NASAL SPRAYS, METERED-DOSE INHALERS, AND DRY POWDER INHALERS <601> (資料6) EP: PREPARATIONS FOR INHALATION: AERODYNAMIC ASSESSMENT OF FINE PARTICLES (2.9.18) (資料7)
送達量	吸入粉末剤(定量吸入式)、吸入エアゾール剤	
粒子径	吸入粉末剤、吸入エアゾール剤	
粘性	口腔用半固形剤、眼軟膏剤、直腸用半固形剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤	USP: VISCOSITY <911> (資料8)
粘着性	貼付剤	
輸液用ゴム栓試験法	注射剤	

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

医薬品規制の国際調和の推進による医薬品審査の迅速化のための基盤的研究

生物薬品の特性・品質解析，品質試験法の開発に関する研究

研究分担者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第一室室長
研究協力者 日向 昌司 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部主任研究官
研究協力者 伊藤さつき 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

研究要旨 製法変更及びバイオ後続品開発における糖タンパク質医薬品の糖鎖の類似性評価法として nanoLC/MS を利用できることを確認した。また，工程設計及び管理に利用可能な糖鎖恒常性評価技術を開発するためのモデルシステムとして，FSH 高発現株，精製用抗体，FSH 活性測定法を開発した。

A. 研究目的

日本では，これまでに多くの糖タンパク質が医薬品として承認されている（表 1-1）。糖鎖の構造と各糖鎖の結合の比率は製造方法によって変化すること，糖鎖の変化は有効性，安全性に影響を及ぼす場合があることから，製法変更及びバイオ後続品開発において，最終製品の糖鎖の類似性評価は重要である。一方，製剤の品質を対象とした ICH ガイドライン Q8 で導入された QbD アプローチが，バイオ医薬品の原薬製造をも対象とした Q11 に導入されようとしている。これは，バイオ医薬品原薬製造においても，品質を出来上がった製品について検証するのではなく，設計段階から確保しようとする考え方であり，この概念の下では，体系的に品質を確保することが立証されているデザインスペース内での運用は変更とみなされない。デザインスペースの設定には，製品と工程への理解，及び基礎となった製品と工程の開発研究が必要であり，原材料や中間体の品質や特性を適時に計測できる工程解析システム（PAT）の利用が提案されている。今後，糖タンパク質性バイオ医薬品の製造設計及び工程管理においても，糖鎖の恒常性を保証できる工程をいかに設定するか，また，糖鎖プロファイルの変化をいかに迅速

かつ詳細に評価するかが課題になってくると予想される。

我々はこれまで，nanoLC/MS を用いた微量かつ迅速糖鎖解析法を確立し，様々な糖タンパク質の糖鎖構造解析に応用してきた。そこで，本研究では，この方法を 1)最終製品の類似性評価，及び 2)製造工程における恒常性評価に応用することを検討した。最終製品の糖鎖類似性評価では，類似性の高い糖タンパク質の例として，日米欧で販売されているエポエチン アルファ先行品と欧州で承認されたエポエチン アルファ後続品を用いた。また，工程評価のためのモデルシステムを構築するために，FSH の実験的製造システムの構築を開始するとともに，FSH の活性測定法を開発した。

B. 研究方法

B.1 最終製品の類似性評価

B.1.1. 試薬

日欧米で販売されているエポエチン アルファ先行品及びエポエチン ベータ（便宜上 epoetin α 1, α 2, α 3, β とする。順不同）及び欧州で販売されているエポエチン アルファ後続品 3 製剤の一つ（epoetin α 4 とする），エポエチン ゼータ 2 製剤の一つ（epoetin ζ とする）を用いた。

B.1.2. 製剤からのエポエチンの精製

エポエチン製剤を電気泳動用サンプリングバッファーに溶解後、15%泳動ゲル(80×80×1 mm)を用いて、25 mM トリス塩酸塩、0.19 M グリシン、0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中 20 mA で泳動させた。分離されたエポエチンは、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) を用いて検出した。

B.1.3. 糖鎖の調製

SDS-PAGE ゲルよりエポエチンを含むバンドを切り取り、約 1 mm 角のゲル片にした後、30% アセトニトリルでゲル片を脱色した。さらにゲル片をアセトニトリルで脱水した後、アセトニトリルを除去し、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 μ l を加え、56°C で 1 時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後、55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 μ l を加え、室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除いた後、水でゲル片を洗浄し、50% アセトニトリルを用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。さらにゲル片に PNGase F (Roche Diagnostics GmbH) 5 unit を含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、200 μ l を加え、37°C で一晩消化した。消化後、水 300 μ l を加え、30 分間断続的に超音波を照射し、糖鎖を含む抽出液を回収した。合計 3 回の抽出を行い、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて乾固した後、0.25 M NaBH₄、200 μ l を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco) を用いて還元化糖鎖を精製した。

B.1.4. LC/MS

HPLC :

装置 : NanoFrontier nLC (日立)

カラム : Hypercarb (0.075×150 mm,
5 μ ThermoFisherScientific)

溶離液 A : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む 2%
アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

溶離液 B : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む 80%
アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~50% (110 分)

流速 : 200 nl/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ-FT
(ThermoFisherScientific)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 300°C

キャピラリー電圧 : 1.8 kV

スキャン範囲 (*m/z*) : 600-2,000

衝突エネルギー : 35%

測定方法 :

- ① Full MS¹ scan
(positive ion mode, 分解能 : 50000)
- ② Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)
- ③ Full MS¹ scan
(negative ion mode, 分解能 : 50000)
- ④ Data-dependent MS²⁻⁴ (negative ion mode)

B. 2. 製造工程評価

B.2.1 ヒト FSH α 鎖発現ベクターおよびヒト FSH β 鎖発現ベクターの作製

ヒト FSH α 鎖 (NM_000735) および FSH β 鎖 (NM_000510.2) の cDNA は、Origene 社より入手し、PCR 法でコーディング領域全長をそれぞれ増幅して断片を得た。PCR 法で調製したヒト FSH α 鎖断片および FSH β 鎖断片を、クローニングサイトで切断後末端をトポイソメラーゼ付加された発現ベクター、pOpti-VEC (Invitrogen) および pcDNA-3.3/Neo (Invitrogen) に組み込み、クロ