

剤の不溶性微粒子試験法、製剤均一性試験法、崩壊試験法、溶出試験法)について、日局、USP、EPの取り込み状況を再確認した。その結果、試験法については国際調和が大きく進捗したものの、各局とも規制上の運用が長年行われて来た試験法であり、様々な製品への適用という点では、依然として相違が大きいことが確認された。今後さらなる努力が必要と考えられる。

#### D.6 国際調和された医薬品品質システムの導入-実践の国際調和に関する研究

2010年4月から2011年1月までのICHの実施作業部会(Q-IWG)のQ&A作成および教育ワークショップの実施と課題について報告した。Q-IWGにおける、Q&A及び教育資料作成を通じ、技術面のみならず行政面においても相乗的な国際調和の進展が期待される。

#### D.7 臨床試験における海外の規制状況の調査研究

欧米における販売承認の更新、条件付き販売承認、市販後臨床試験等の監視のための方策等に関する規制及びその運用状況を調査し、我が国での制度のあり方について検討した。欧州における販売承認の更新制度は着実に運用されてきているが、個別品目ベースでの適時の安全対策との関係を含めて、その意義を継続して評価していく必要がある。米国では、近年、市販後試験に対するFDAの監視権限の強化が図られ、関連規則やガイドラインが逐次整備されてきている。我が国においても、医薬品の適正使用の推進及び安全対策の強化の一環として、既承認医薬品の承認内容の見直しをより積極的、機動的に行っていくことは重要な作業であり、今後、米国の状況等も参考にしながら、関連規制の見直しが検討されるべきであろう。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 参考文献及び資料

##### 1. 参考文献

- 1) McCamish, M., and G. Woollett. 2011. Worldwide experience with biosimilar development. *MAbs* 3:209-217.
- 2) Shapiro, M. A. 2010. Regulatory Perspectives and Exoectations of Fc Effector Function Assesment. In *AAPS National Biotechnology Conference*.
- 3) Shibata-Koyama, M., S. Iida, A. Okazaki, K. Mori, K. Kitajima-Miyama, S. Saitou, S. Kakita, Y. Kanda, K. Shitara, K. Kato, and M. Satoh. 2009. The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology* 19:126-134.
- 4) Shashidharamurthy, R., F. Zhang, A. Amano, A. Kamat, R. Panchanathan, D. Ezekwudo, C. Zhu, and P. Selvaraj. 2009. Dynamics of the interaction of human IgG subtype immune complexes with cells expressing R and H allelic forms of a low-affinity Fc gamma receptor CD32A. *J Immunol* 183:8216-8224.
- 5) Bruhns, P., B. Iannascoli, P. England, D. A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daeron. 2009. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-3725.
- 6) Richards, J. O., S. Karki, G. A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J. R. Desjarlais. 2008. Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer*

Ther 7:2517-2527.

- 7) Regulation (EC) No.726/2004 of the European parliament and the council of 31 March 2004. (EC 規則 No.726/2004)
- 8) Directive 2001/83/EC of the European parliament and the council of 6 November 2001. (EC 指令 2001/83)
- 9) Commission regulation (EC) No.507/2006 of 29 March 2006 on the conditional marketing authorization for medicinal products for human use falling within the scope of Regulation (EC) No.726/2004 of the European Parliament and of the Council. ( EC 規則 No.507/2006)
- 10) Guideline on the scientific application and the practical arrangements necessary to implement commission regulation (EC) No.507/2006 on the conditional marketing authorization for medicinal products for human use falling within the scope of regulation (EC) No.726/2004. EMEA Dec 2006.
- 11) Guidance for Industry: Reports on the status of postmarketing study commitments – Implementation of Section 130 of the Food and Drug Administration Modernization Act of 1997. US FDA. Feb 2006.
- 12) Federal Register. Vol.75, No.216, Nov 9, 2010.
- 13) Search: Postmarket Requirements and Commitments for Human Drugs. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/pmc/index.cfm>

## 2. 添付資料

- 川西資料1. 日局 注射剤の不溶性微粒子試験法 (6.07)
- 川西資料2. USP PARTICULATE MATTER IN

## INJECTIONS<788>

- 川西資料3. EP PATCULATE CONTAMINATION: SUB-VIASIBLE PARTICLES (2.9.19)
- 川西資料4. 日局 製剤均一性試験法 (6.02)
- 川西資料5. USP: UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS <905>
- 川西資料6. EP: UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS(2.9.40)
- 川西資料7. 日局 崩壊試験法 (6.09)
- 川西資料8. USP DISINTEGRATION <701>
- 川西資料9. EP DISINTEGRATION OF TABLETS AND CAPSULES (2.9.1)
- 川西資料10. 日局 溶出試験法 (6.10)
- 川西資料11. USP DISSOLUTION <711>
- 川西資料12. EP DISSOLUTION TEST FOR SOLID DOSAGE FORMS (2.9.3)
- 檜山資料 1 ICHQ8Q9Q10 QIWG 教育研修資料 ( <http://www.jpma.or.jp/about/board/ich/explanation/ich100715.html>)
- 教育資料番号 0 事例研究
- 教育資料番号 1 Welcome 講演
- 教育資料番号 2 ICHQ8Q9Q10 の相乗効果
- 教育資料番号 3 開発事例
- 教育資料番号 4 審査における留意点
- 教育資料番号 5 製造および品質システム
- 教育資料番号 6 GMP 査察
- 教育資料番号 7 デザインスペース
- 教育資料番号 8 管理戦略
- 教育資料番号 9 品質システム
- 教育資料番号 10 品質リスクマネジメント
- 教育資料番号 11 Q-IWG アップデート(東京)
- 檜山資料 2 タリン会議運営委員会への報告
- 檜山資料 3 ICH Q-IWGによる 2010年 11月現在の Q&A (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>)
- 檜山資料 4 福岡会議の運営委員会への報告

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Akiko Ishii-Watabe, Yoshiro Saito, Takuo Suzuki, Minoru Tada, Maho Ukaji, Keiko Maekawa, Kouichi Kurose, Nahoko Kaniwa, Jun-ichi Sawada, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi, Takako Eguchi Nakajima, Ken Kato, Yasuhide Yamada, Yasuhiro Shimada, Teruhiko Yoshida, Takashi Ura, Miyuki Saito, Kei Muro, Toshihiko Doi, Nozomu Fuse, Takayuki Yoshino, Atsushi Ohtsu, Nagahiro Saijo, Tetsuya Hamaguchi, Haruhiro Okuda, Yasuhiro Matsumura: Genetic polymorphisms of *FCGR2* encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab. Pharmacokine* 25(6), 578-587 (2010)
- 2) Yamaguchi, T., Arato, T. Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics in Japan. *Biologicals*, in press,
- 3) Arato, T., Yamaguchi, T. Experience of reviewing the follow-on biologics including Somatropin & EPO in Japan. *Biologicals*, in press,
- 4) Urayama, T., Sapsutthipas, S., Tsujikawa, M., Yamashita, A., Nishigaki, H., Ibrahim, M.S., Hagiwara, K., Yunoki, M., Yasunaga, T., Yamaguchi, T., Ikuta, K.: Full-Length Sequences of One Genotype 4 and Three Genotype 3 Hepatitis E Viruses in Fecal Samples from Domestic Swine in Japan. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 11-19 (2010)
- 5) 石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、川西 徹、山口照英、川崎ナナ: 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn *日本薬理学会誌* 136(5), 280-4 (2010)
- 6) 石井明子、川崎ナナ: バイオ治療薬の品質安全性確保 *ファームテクジャパン* 16, 69-80 (2010)
- 7) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 川崎ナナ: 治療用タンパク質の免疫原性 その3、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41(9), 726-735 (2010)
- 8) 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, 41(5), 390-400 (2010)
- 9) Gotoh, Y., Ishizuka, Y., Matsuura T., Niimi S.: Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges, *Biomacromolecules* (in press)
- 10) K. Nishimura, M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, T. Kobayashi, H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi and M. Nakanishi: Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/ expression system ideal for cell reprogramming, *J. Biol. Chem*, 286, 4760-4771 (2011)
- 11) Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols, *Int J Pharm*, 389, 107-113, (2010)
- 12) Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins

- to human neonatal FcR, *J Immunol.*, **184**, 1968-76 (2010)
- 13) H. Shibata, C. Saito, C. Yomota, T. Kawanishi, Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie*, **651**, 251-253 (2010)
- 14) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada, Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids, *J. Pharm. Sci.* **99**, 4710-4719 (2010)
- 15) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T.: Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **878**, 1466-1470 (2010)
- 16) Izutsu, K. I., Yomota, C., Kawanishi, T., Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose., *J Pharm Sci* (in press)
- 17) Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T., Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP., *In J. Pharm.*, **407**, 111-118 (2011)
- 18) 川西 徹: バイオ後続品の開発状況とその評価、*ジェネリック研究*, **4**, 5-18 (2010)
- 19) 川西 徹: 製剤総則の改正、*薬局* **62**, 2598-2605 (2011)
- 20) 川西 徹: 製剤試験法、*薬局* **62**, 2654-2657 (2011)
- 21) 檜山行雄、医薬品規制国際調和会議 Q-IWG の活動、*PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, **11(2)**, 56-61(2010)
- 22) 檜山行雄、欧州 (エストニア・タリン市) における ICH 教育研修会を終えて、*医薬品医療機器レギュトリーサイエンス*, **41**, 756-768(2010)
- 23) 山口照英:細胞治療薬の開発と創薬支援技術. *Bio Industry.* **27**, 6-17 (2010)

## 2. 学会発表

- 1) 多田稔、石井明子、鈴木琢雄、斎藤嘉朗、川崎ナナ: FCGRT 遺伝子多型解析により見出された Neonatal Fc receptor (FcRn) 変異体の機能解析」 *BMB2010* (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010.12)
- 2) 多田稔、石井明子、鈴木琢雄、豊田淑江、川崎ナナ: 複合体形成能に着目した抗 TNF $\alpha$  抗体医薬品の生物活性評価に関する研究 *日本薬学会第 131 年会* (2010.12)
- 3) 原島 瑞、日向昌司、関泰一朗、有賀豊彦、川崎ナナ、新見伸吾 初代培養肝細胞において Annexin A3 は細胞周期阻害因子である P16<sup>INK4A</sup> の発現を抑制することにより肝細胞増殖を促進する *第 83 回 日本生化学会大会、神戸* (2010.12)
- 4) 内田恵理子、古田美玲、鈴木和博、佐藤功栄、岩田明子、山口照英: 抗体医薬品のウイルス安全性確保のためのウイルス除去カラムの開発、*第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)*, 2010 年 12 月、神戸
- 5) 古田美玲、内田恵理子、豊田淑江、中西真人、西村健、大高真奈美、山口照英: 持続発現型センダイウイルスベクターの CGD 遺伝子治療への応用、*第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)*, 2010 年 12 月、神戸
- 6) 檜山行雄、“ICH Q8、Q9、Q10 の実践導入について”平成 23 年 1 月 11 日大阪医薬品協会技術委員会講演 *大阪薬業年金会館ホール*

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

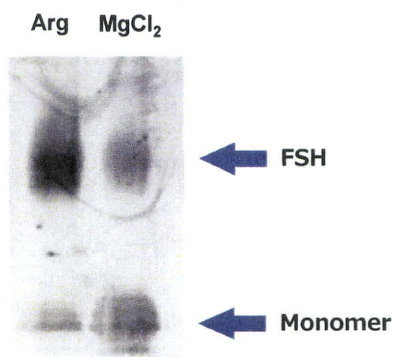


図1 ヒト組換えFSHのSDS-PAGE  
抗FSH抗体カラムから2 Mアルギニン、  
もしくは2 M MgCl<sub>2</sub>で溶出した。

表1 各ロットのタンパク質濃度

Culture Lot No.	Serum	Protein conc. (µg/ml)
4	+	156
4	-	273
5	+	117
5	-	222
6	+	142
6	-	276

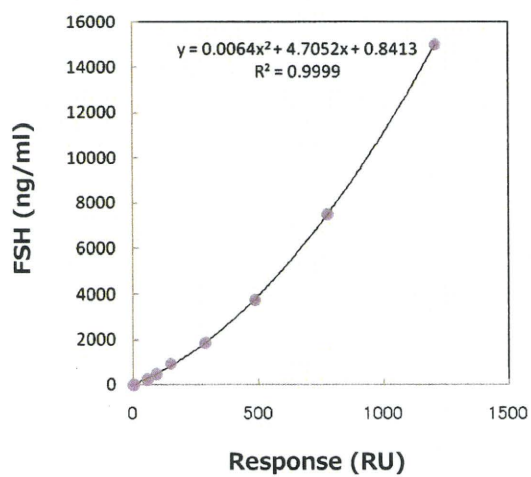


図2 SPRイムノアッセイによるFSHの検量線

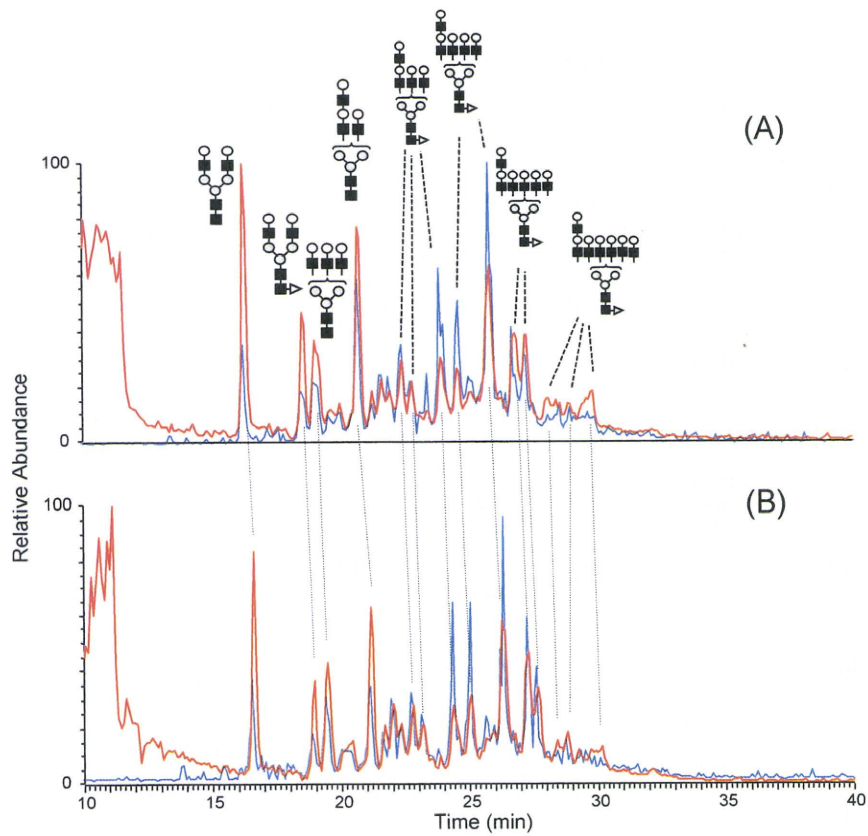


図3 LC/MSにより得られたDG44細胞由来FSHの糖鎖プロファイル  
 (A), 血清添加培地; (B), 無血清培地  
 赤線, ポジティブイオンモード; 青線, ネガティブイオンモード

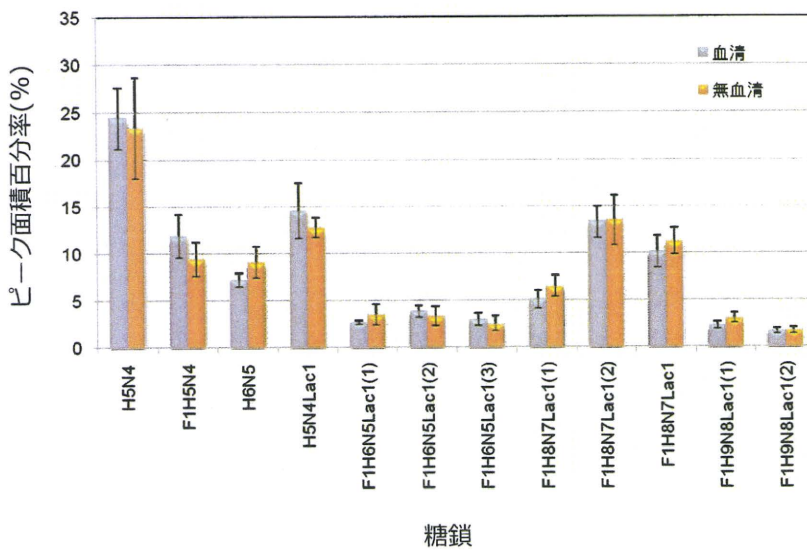


図4 糖鎖分布の比較 (ポジティブイオンモード), n=4  
 H, ヘキソース; N, N-アセチルヘキソサミン; F, フコース;  
 Lac, N-アセチルラクトサミン.

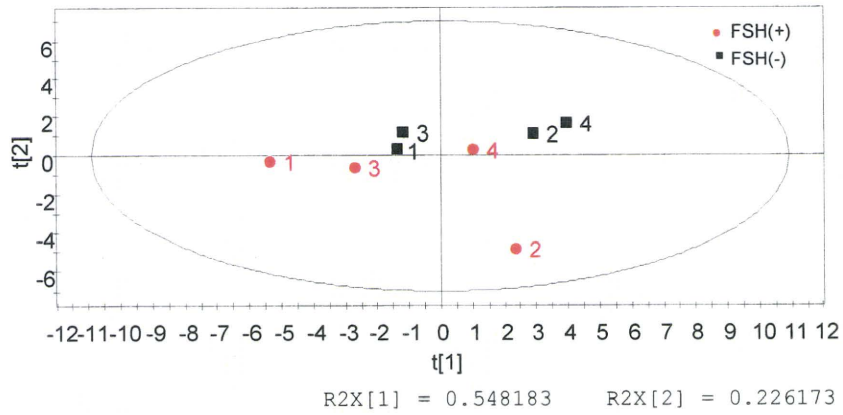


図5 PCAによるFSH(+)とFSH(-)の区別

FSH(+), 血清添加培地で培養したDG44細胞から産生されたFSH  
 FSH(-), 無血清培地で培養したDG44細胞から産生されたFSH (n=4)

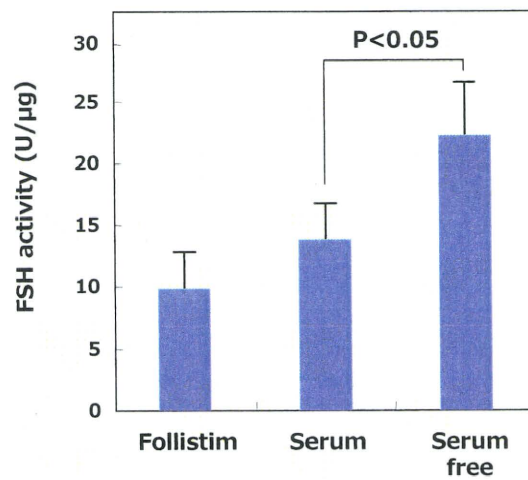


図6 組換えヒトFSHの比活性の比較

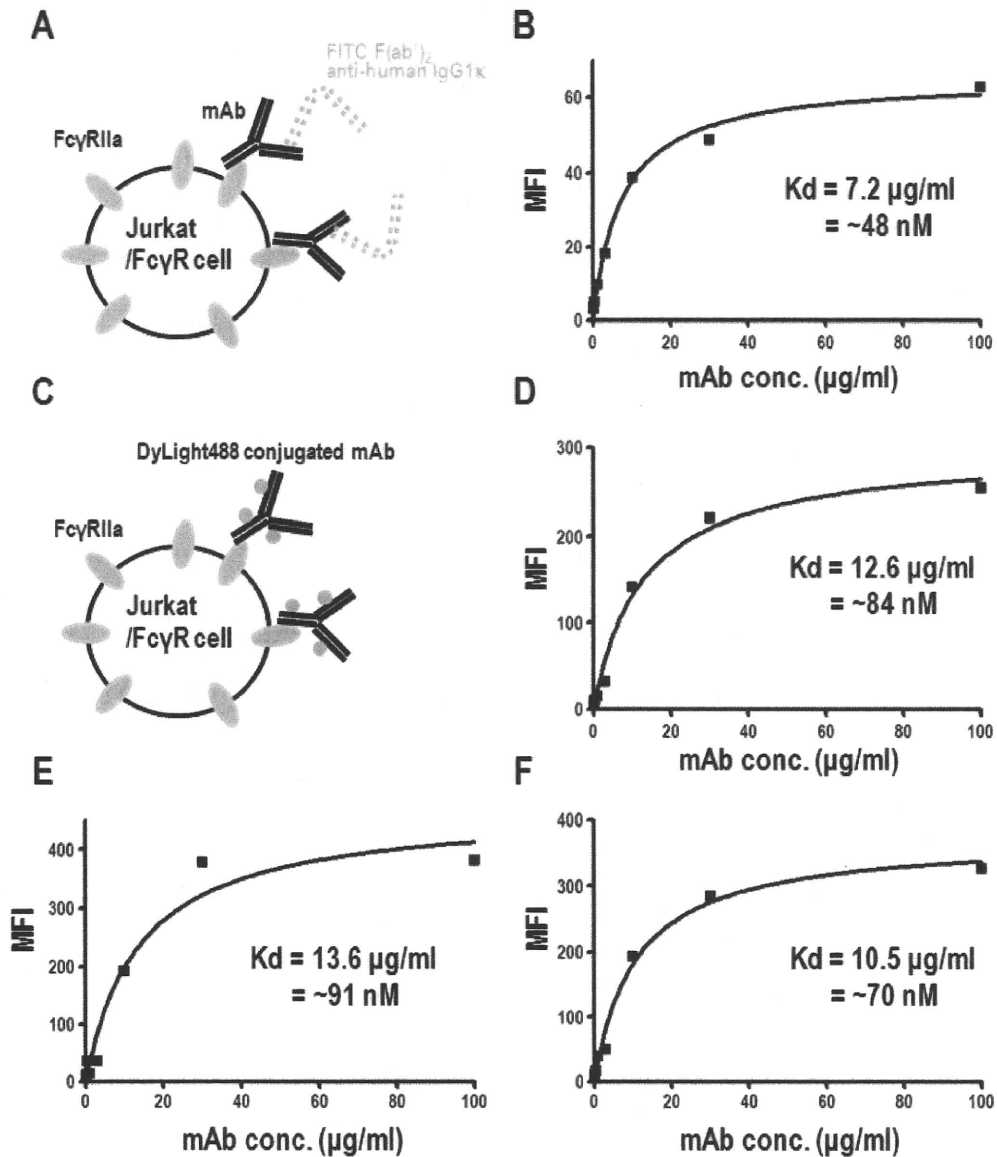


図7 Fcγ受容体発現細胞株を用いた cell-based の結合実験

A : 蛍光標識二次抗体を用いた結合実験の模式図

B : Jurkat/FcγR1a に対する Adalimumab および FITC 標識二次抗体を用いた結合実験

C : DyLight488 標識抗体医薬品を用いた結合実験の模式図

D : Jurkat/FcγR1a に対する DyLight488 標識 Adalimumab の結合実験

E : Jurkat/FcγR1a に対する DyLight488 標識 Infliximab の結合実験

F : Jurkat/FcγR1a に対する DyLight488 標識 Golimumab の結合実験



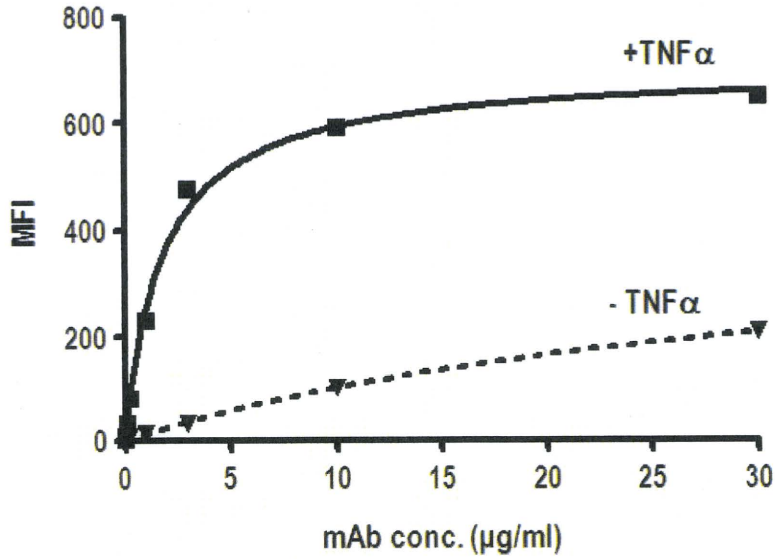


図8 Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa に対する TNF $\alpha$ -Adalimumab 複合体の結合

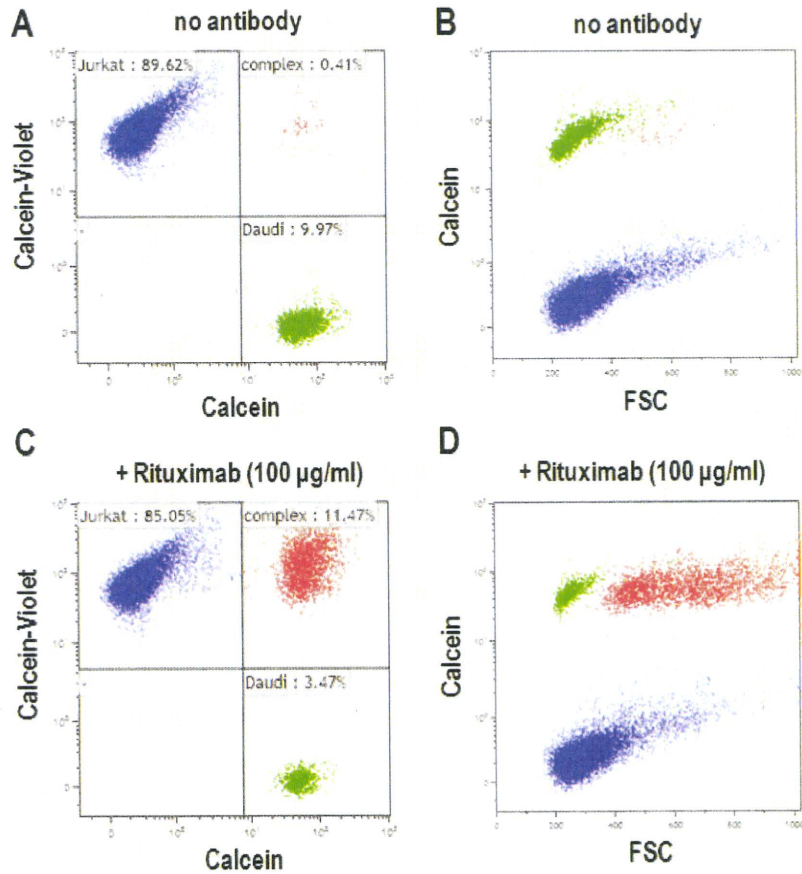


図9 Rituximab による Daudi 細胞と Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa 細胞の架橋

Rituximab 非存在下 (A,B) および存在下 (C,D) における細胞集団の蛍光強度のドットプロット。標的細胞 (Daudi) 単独を緑色、エフェクター細胞 (Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa) 単独を青色、両者が架橋されたもの (complex) を赤色で示した。

表 2 各細胞集団の割合と平均蛍光強度(MFI)

	% of total	Calcein MFI	Calcein-Violet MFI
Jurkat	85.05	0.29	72.25
Daudi	3.47	47.92	0.07
Complex	11.47	58.45	130.89

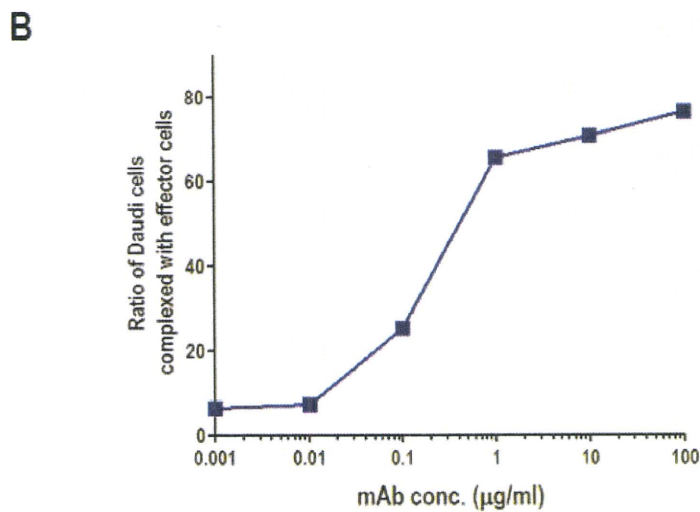
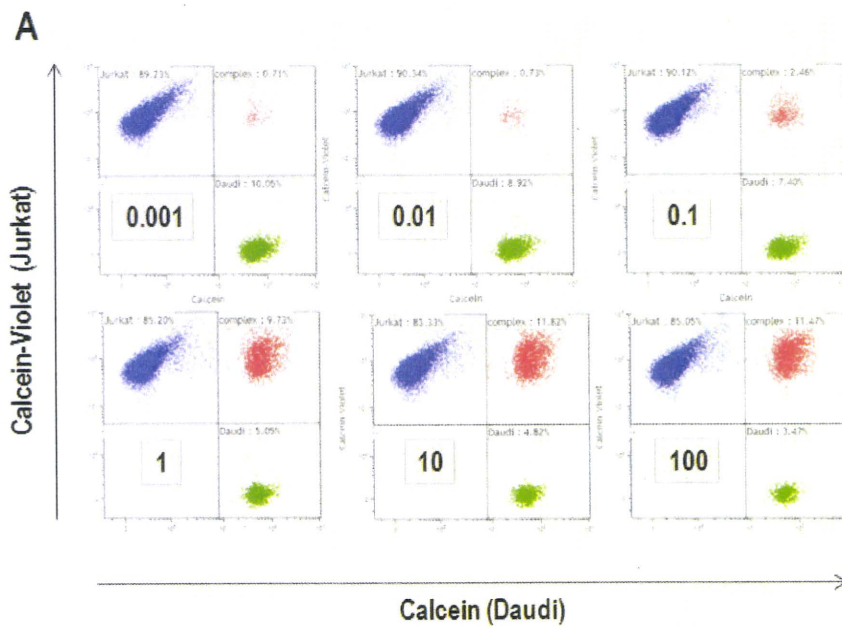


図 10 Rituximab による Bridging Assay

A : Rituximab の添加濃度 (µg/ml) を変化させた際のドットプロット

緑色—Daudi 細胞、青色—Jurkat/FcγRIIIa 細胞、赤色—架橋された細胞

B : 抗体濃度に依存した架橋細胞の割合の変化

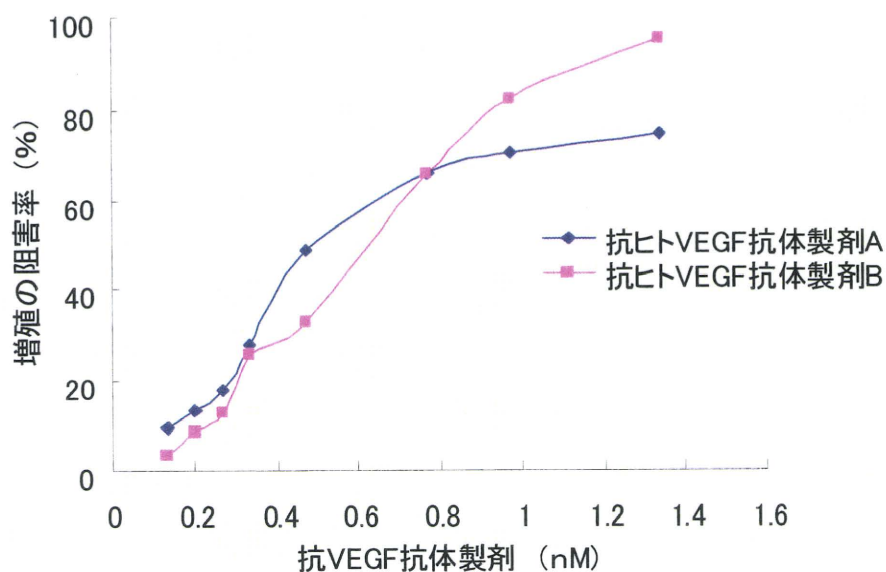


図 11 VEGF による HUVEC の増殖促進に対する抗ヒト VEGF 抗体製剤による阻害

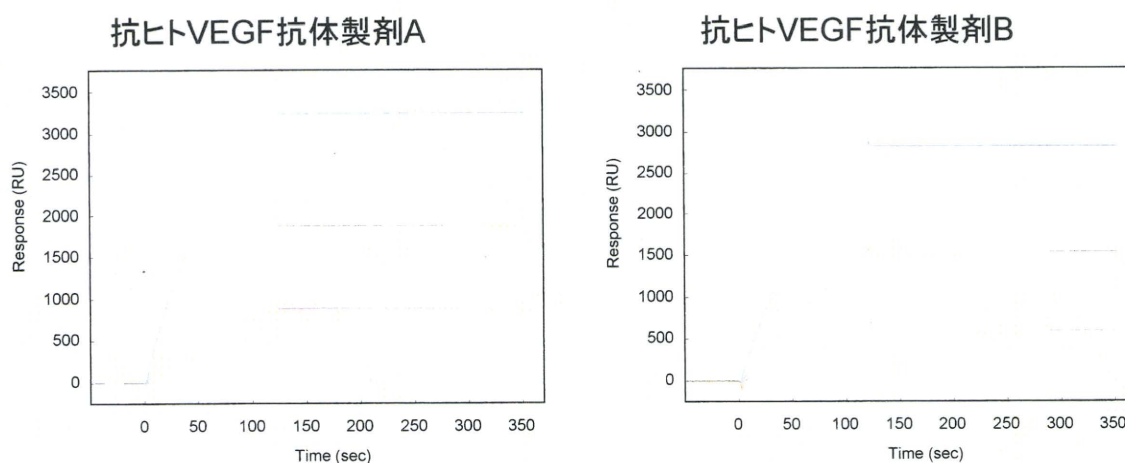


図 12 共鳴プラズモン共鳴法を用いた抗ヒト VEGF 抗体製剤の VEGF に対する結合のセンサーグラム

表 3 表面プラズモン共鳴法を用いた抗ヒト VEGF 抗体製剤の VEGF に対する結合能

	$k_a$ ( $\times 10^4$ ) $M^{-1}s^{-1}$	$k_d$ ( $\times 10^{-7}$ ) $s^{-1}$	KD (pM)
抗ヒトVEGF抗体A製剤	2.81	7.40	26.3
抗ヒトVEGF抗体B製剤	4.60	1.84	400

表4 CHMPによる販売承認の更新状況

2010年	更新が了承された品目数		
	合計	期限なし	5年後に再更新
1月	1	1	0
2月	6	4	2
3月	1	0	1
4月	3	3	0
5月	4	3	1
6月	10	8	2
7月	7	6	1
8月	—	—	—
9月	6	5	1
10月	2	1	1
11月	2	1	1
12月	5	5	0
合計	47	37	10

表5 米国における市販後臨床試験の実施状況

		NDA (化成品)	BLA (生物製剤)
PMRs	予定通り進行	372/405 (91.5%)	88/96 (92%)
	予定変更	33/405 (8.5%)	8/96 (9%)
PMCs	予定通り進行	867/978 (89%)	244/325 (75%)
	予定変更	111/978 (11%)	81/325 (25%)

(2009年9月30日データ)

表6 米国における市販後臨床試験実施状況の内訳 (PMC)

PMCsの状況		NDA (化成品)	BLA (生物製剤)
予定通り進行	保留中	449/867 (46%)	82/244 (25%)
	実施中	147/867 (15%)	84/244 (26%)
	提出済	271/867 (28%)	78/244 (24%)
	小計	867 (89%)	244 (75%)
予定変更	遅延	100/111 (10%)	79/81 (24%)
	中止	11/111 (1%)	2/81 (1%)
	小計	111 (11%)	81 (25%)
合計		978	325

(2009年9月30日データ)

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	部長
研究協力者	橋井 則貴	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	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	栗林 亮佑	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	研究員

**研究要旨** バイオ医薬品の製法変更およびバイオ後続品の製法開発における参照品との同等性/同質性評価法，並びにデザインスペース設計に資する PAT を開発することを目的とし，組換えヒト FSH をモデルとした実験的製造システムを構築した．無血清培地及び血清添加培地で FSH を調製し，LC/MS を用いて糖鎖プロファイルと比較したところ，両者に大きな差異は認められなかったが，市販の FSH 製剤の糖鎖プロファイルとは明らかに異なることが確認された．レポーター遺伝子アッセイ/SPR イムノアッセイを利用した比活性測定法を開発し，比活性を比較した結果，無血清培養で調製した FSH は，血清添加培地で調製した FSH より比活性が約 1.5 倍高いことが確認された．糖鎖比較法や比活性測定法は，製法開発時の有用なツールとなることが確認された．

**A. 研究目的**

日本では，これまでに多くの遺伝子組換えタンパク質が医薬品として承認されている．これらバイオ医薬品の製造においては，様々な理由により，製法がしばしば変更される．また，近年，既承認薬製造会社とは異なる会社により，異なる製法で製造されるバイオ後続品の開発が活発化している．製法変更やバイオ後続品開発では，ICH Q5E に示されているような参照品との同等性/同質性評価が求められる．

一方，原薬製造においても，体系的に品質を確保することが立証された範囲内での運用であれば，パラメーターの変更は製造方法の変更とみなされないデザインスペースの考えが導入されようとしている．デザインスペースの設定には，製品と工程の理解，および基礎となった製品と工程開発研究，並びに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) の開発が必要となる．すなわち，バイオ医薬品の製造設計及び工程管理においても，構造や活性の恒常性を確保しうる工程を設定するためには，工程パラメーターを変動させたときの構造や活性の変化を迅速かつ詳細に評価しうる PAT の開発が不可欠である．

我々は，バイオ医薬品の特性・品質解析，品質試験法の開発に関する研究の一貫として，バイオ医薬品の同等性/同質性評価，並びに PAT の開発を行っている．昨年度，FSH の実験的製造システムの構築に着手するとともに，FSH の活性測定法を開発した．本年度は，実験的製造システムを完成させるとともに，無血清化モデル組換えヒト FSH を調製し，糖鎖プロファイルを測定した．さらに，PAT 及び同等性/同質性評価法として利用することを目的に，FSH のレポーター遺伝子アッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法を開発し，

無血清化による比活性の変動を詳細に比較した。

## B. 研究方法

### B.1 組換えヒト FSH の作製

#### B.1.1 抗 FSH 抗体カラムの作製

昨年度、本研究で樹立した抗 FSH 抗体を産生するハイブリドーマ (#3.22) を CD Hybridoma 培養液 (Invitrogen) で培養し、遠心分離で得た培養上清を濾過、濃縮した。培養上清濃縮液を HiTrap Protein G カラム (GE Healthcare) にアプライし、PBS で洗浄した後、0.1 M Gly-HCl pH 3.0 で溶出、直ちに 0.1 M HEPES pH 9.0 で中和した。1000 倍量の PBS に対し一昼夜透析し、抗体溶液とした。

NHS-activated HiTrap カラム (GE Healthcare) を 1 mM HCl で洗浄した後、抗体溶液を添加し、30 分間室温で放置した。PBS で洗浄した後、エタノールアミン溶液を添加し、室温で 30 分間ブロッキングした。再度、PBS で洗浄し、抗 FSH 抗体カラムとした。

#### B.1.2 培養工程

昨年度、本研究で樹立した組換えヒト FSH を安定に高発現する CHO-DG44 細胞株 (DGF1 細胞) を、10%ウシ胎仔血清を添加した Opti-CHO 培地 (S 培地) (Invitrogen)、あるいは無血清の Opti-CHO 培地 (SF 培地) に  $1 \times 10^6$  個/mL で播種し、3~4 日間、8 % CO<sub>2</sub> の気流下、37°C、125 rpm で旋回培養した。

培養液を回収し、350 x g、15 分間遠心分離し、培養上清と細胞を分離した。回収した細胞は、S 培地あるいは SF 培地に再懸濁後、細胞数を計測し、次の培養に用いた。この培養工程を 6 回繰り返し、ロット 1~6 とした。

#### B.1.3 精製工程

回収した培養上清は、6000xg、10 分間、遠心分離し、上清をポアサイズ 0.45  $\mu$ m のフィルター (Millipore) で濾過した後、限外濾過

膜 PELXL (Millipore) を用いたタンジェンシヤルフローフィルトレーションで濃縮した。

それぞれの培養上清濃縮液を抗 FSH 抗体カラムにアプライし、280 nm の吸光度が 0.01 au 以下になるまで PBS で洗浄した後、2 M アルギニン溶液もしくは 2 M MgCl<sub>2</sub> 溶液で溶出し、1000 倍量の PBS に対し一昼夜透析した。

#### B.1.4 タンパク質濃度の測定

作製した組換えヒト FSH のタンパク質濃度は、BLAcore 3000 (GE Healthcare) を用いた SPR イムノアッセイで測定した。SPR 解析は、すべて 25°C で行った。

##### (1) センサーチップの作製

CM5 センサーチップ (GE Healthcare) に NHS (50 mM) / EDC (200 mM) 溶液 (50/50) を 7 分間、流速 10  $\mu$ L/min でインジェクトして活性化させた。活性化 CM5 センサーチップに 10 mM 酢酸緩衝液 pH6 に溶解した抗 FSH 抗体 (#3.22) を 70  $\mu$ L インジェクトして固定化させた後、1 M エタノールアミン 70  $\mu$ L でブロッキングした。

##### (2) 測定条件

HBS-EP buffer をランニング液とし、流速 20  $\mu$ L/min で試料 40  $\mu$ L をインジェクトした。結合量は、試料の注入開始 10 秒前のレゾナンスユニット (RU) から試料の注入終了 1 分後の RU を引いた値とした。各測定が完了した後、センサーチップを 20  $\mu$ L の 1 M citrate-NaOH buffer pH 2.2 をインジェクトして再生した。

##### (3) 検量線の作成

フォリスチム注 150 (Schering-Plough) 溶液の 2 倍希釈系列 (0.234~15  $\mu$ g/mL) を調製し、結合量を測定し、検量線を作成した。検量線から、Excel (Microsoft) で近似式を求めた。

## B.2 組換えヒト FSH の糖鎖構造解析

### B.2.1 還元アルキル化タンパク質の調製

PD 10 カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩した FSH (12  $\mu$ g) を 50  $\mu$ L の 8 M グアニ

ジン-HCl/0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。まず、この溶液に 2  $\mu$ L の 1 M dithiothreitol (DTT, 最終濃度 40 mM) を加えて 65°C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、4.8  $\mu$ L の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (最終濃度 96 mM) を加えて室温、暗所で 40 分間反応させて、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。反応終了後、PD 10 カラムを用いて脱塩し、還元アルキル化 FSH とした。

### B.2.2 糖鎖の切り出し

還元アルキル化 FSH を凍結乾燥し、100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 50  $\mu$ L に懸濁させた後、5 ユニットの N-Glycosidase-F を加えて、37°C で 24 時間反応させて N 結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (最終濃度 60%) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C, 10,000 x g, 10 分間) によりタンパク質を除去した。遊離した N 結合型糖鎖を含む上清を Speed Vac により乾燥させて、糖鎖を回収した。

### B.2.3 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を 250  $\mu$ L の 0.5 M NaBH<sub>4</sub> 溶液を加えて、糖鎖を溶解させた後、室温で 16 時間還元した。反応溶液を中和した後、糖鎖の回収は、グラファイトカーボン樹脂を固定相とした ENVI Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて行った。カートリッジは 1 mL の 100%アセトニトリル、1 mL の 45%アセトニトリル/5 mM AcONH<sub>4</sub> で洗浄後、1 mL の 5 mM AcONH<sub>4</sub> で 3 回洗浄した。試料溶液を注入して、糖鎖を樹脂に吸着させた。1 mL の 5 mM AcONH<sub>4</sub> で樹脂を洗浄した後、1.5 mL の 45%アセトニトリル/5 mM AcONH<sub>4</sub> 溶液で糖鎖を溶出させた。得られた溶液の Speed Vac 及び凍結乾燥により還元化糖鎖試料を調製した。

### B.2.4 LC/MS

液体クロマトグラフィーは Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を使用した。溶離液は 2%アセトニトリルを含む 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (A 溶媒) 及び 80%アセトニトリルを含む 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (B 溶媒) を使用した。流速は 500 nL/min に設定した。質量分析装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) を接続した Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS) (装置名: LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードでデータを取得した。

分析に用いたカラム、グラジュエント条件、シングル MS 及び多段階 MS (MS/MS~MS/MS/MS/MS) 測定条件は、以下の通りであった。

カラム: グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1×150 mm, 粒子径 5 $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific)

トラップカラム: グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.3×5.0 mm, 粒子径 7  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific)

グラジュエント条件: 8-50%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 60 分間)

シングル MS スキャンモード: FT-MS

MS/MS~MS/MS/MS/MS スキャンモード: IT-MS

スキャン範囲: *m/z* 800-2,000

キャピラリー温度: 200°C

スプレー電圧: 2.5ekV

MS/MS~MS/MS/MS/MS の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー): 25%

### B.2.5 主成分分析 (PCA)

各糖鎖のピーク面積百分率に関する情報を用いて、多変量解析ソフト Simca-P+ (Umetrics) により、第 2 主成分まで計算して PCA を行った。

## B.3 ヒト組換え FSH の比活性の評価

### B.3.1 レポータージーンアッセイ

#### (1) アッセイ用細胞の調製

昨年度、本研究で樹立した FSH レセプターと CRE で発現制御されるルシフェラーゼ発現単位を有する CHO 細胞株 (CFL-C3 細胞) を用いた。

#### (2) 標準 FSH 溶液の調製

フォリスチム注 150 (Schering-Plough) を適量量り取り、10% F12 培養液 (Sigma) 1 mL で希釈し、0.2, 1.0, 3.9, 15.6, 62.5, 250 および 1000 mIU/mL を含むように調製した。

#### (3) 試料溶液の調製

SPR イムノアッセイで測定したタンパク質濃度を基に、組換え FSH を適量量り取り、10% F12 培養液 1 mL で希釈し、0.2, 0.1, 0.39, 1.56, 6.25, 25 および 100 ng/mL を含むように調製した。

#### (4) ルシフェラーゼ活性の測定

CFL-C3 細胞を 10% F12 培養液で  $2.0 \times 10^5$  個/mL に調製し、48 ウェル細胞培養用マイクロプレート (Iwaki) に 200  $\mu$ l ずつ播種 ( $4 \times 10^4$  個/well) し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 18~24 時間培養した。培養上清を除き、標準 FSH 溶液および試料溶液を 200  $\mu$ l 添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 4 時間培養した。

ルシフェラーゼ活性測定は、ピッカジーンデュアルシーパンジーキット (Toyo Ink) を用いた。培養液を除き、ルシフェラーゼ活性測定用細胞溶解液を 45  $\mu$ l 加え、室温で 15 分間放置した後、攪拌し、ルシフェラーゼ活性測定用溶液とした。ルシフェラーゼ活性測定用溶液 5  $\mu$ l を 96 ウェル発光測定用マイクロプレートへ移し、ホタル・ルシフェラーゼ発光試薬を 45  $\mu$ l 添加し、発光測定用マイクロプレートリーダーで発光量を測定した。さらに、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ発光試薬を 45  $\mu$ l 添加し、同様に発光量を測定した。

### B.3.2 比活性の算出

ホタル・ルシフェラーゼ発光量をウミシイタケ・ルシフェラーゼ発光量で補正した後、FSH 無添加培養における発光量に対する相対比を算出した。Excel (Microsoft) のソルバーを用いて、5 パラメーターロジスティックモデルの近似式  $f(x) = \varepsilon + (\alpha / (1 + (X/\delta)^{-\gamma}))^{\beta}$  を用い各変数 ( $\alpha$ : Emax,  $\beta$ : 非対称因子,  $\gamma$ : 傾き,  $\delta$ : EC<sub>50</sub>,  $\varepsilon$ : Emin) をフィッティングさせた。算出されたパラメーター  $\delta$  値、すなわち EC<sub>50</sub> 値を比活性とした。

有意差検定は、Tukey の多重比較検定法を GraphPad Prism Version 5.02 用いて行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来サンプル及び動物を使用していないため、配慮を要しない。

## C. 結果と考察

### C.1 組換えヒト FSH の作製

FSH のサブユニットは酸性条件で解離してしまうため、中性条件で溶出が可能な抗体として昨年度作製した抗 FSH 抗体 (#3.22) を抗 FSH 抗体カラム作製用として採用した。この抗体は、予備的な検討により、抗 FSH 抗体カラムとして使用したとき、2 M MgCl<sub>2</sub> 溶液で FSH を溶出させることが確認されていたものである。しかし、SDS 存在下で安定性が低下し、サブユニットが解離することが確認されたことから、溶出された FSH が少なからず変性している可能性が懸念された。そこで、溶出条件を再検討した結果、2 M アルギニン溶液が変性を引き起こさず、効率的に溶出できることが明らかとなり、以降の溶出液として採用した (図 1)。

培養工程で血清添加培地を用いた FSH (FSH (+))、無血清培地を用いた FSH (FSH (-)) をそれぞれ 6 ロット製造した。培養状態



が安定し、恒常的な製造が行われていると思われたロット 4~6 について以下の解析に供した。ロット 4~6 の各タンパク質濃度は、SPR イムノアッセイによって測定した (表 1)。

## C.2 組換えヒト FSH の糖鎖プロファイル

### C.2.1 糖鎖構造解析

FSH(+)及び FSH(-)から N-結合型糖鎖を切り出し、還元化糖鎖とした後、LC/MS 及び MS/MS~MS/MS/MS/MS により分析した。各糖鎖の構造は、FT-MS を用いたシングル MS スキャンにより測定された精密質量と MS/MS~MS/MS/MS/MS で検出されたフラグメントイオンの帰属により推定した。図 3A は、FSH (+) 由来還元化糖鎖を分析したときのベースピーククロマトグラムである。ポジティブイオンモードで測定したスペクトルデータを用いて中性糖鎖を解析した結果、16 分にアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4), 18 分に 1 分子のフコース (Fuc) が付加したアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Fuc1Hex5HexNAc4), 19 分にアシアロ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5) が溶出されていることが明らかとなった。また、21~30 分に溶出された主要糖鎖は、N-アセチルラクトサミンを有するアシアロ複合型 2~4 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4Lac1, Fuc1Hex6HexNAc5 Lac1, Fuc1Hex7HexNAc6Lac1, Fuc1Hex8 HexNAc7Lac1, Fuc1Hex9HexNAc8Lac1,) であると推定された。一方、ネガティブイオンモードで測定したクロマトグラムを用いて酸性糖鎖の解析を行ったが、シアロ糖鎖は検出限界以下であった。

同様に、FSH (-) 由来還元化糖鎖の糖鎖構造解析を行った (図 3B)。中性糖鎖を解析した結果、FSH (+) と比較して、主要糖鎖の種類に違いはみられなかった。また、シアロ糖鎖は検出限界以下であった。

### C.2.2 糖鎖分布

ポジティブイオンモードで検出された糖鎖

の総ピーク面積に対する各糖鎖の面積百分率を算出して、FSH (+) 及び FSH (-) の糖鎖分布を比較した (図 4)。その結果、FSH (+) 及び FSH (-) とともに、アシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4) が全体の 25%を占めていることが明らかとなった。ついで、N-アセチルラクトサミンが付加した Hex5HexNAc4Lac1 及び Fuc1Hex8HexNAc7Lac1 の割合が高かった。両者の糖鎖プロファイルを比較した結果、顕著な差はみられなかった。

### C.2.3 PCA

各糖鎖の面積百分率の情報を用いて PCA を行った。図 5 は、第 1 主成分を X 軸、第 2 主成分を Y 軸としたときのスコアプロットである。第 2 主成分により、FSH (+) と FSH (-) が僅かに分離する傾向がみられたが、両者を区別することはできなかった。

これらの結果から、CHO-DG44 細胞を細胞基材として FSH を調製する場合、培養液中の血清の有無は、FSH の糖鎖プロファイルに影響を与えないことが示唆された。

現在我が国では、ヒト遺伝子組換え FSH を有効成分とする医薬品として、ホリトロピンアルファとフォリトロピンベータが承認されている。これら FSH の主要糖鎖は、シアル酸が 1~4 分子付加した複合型 2~4 本鎖糖鎖であることが報告されている。先に我々も、LC/MS を用い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を解析し、ラクトサミンリピートのないシアル酸結合糖鎖が主な糖鎖であることを確認している。ホリトロピンアルファとフォリトロピンベータはいずれも CHO 細胞由来 FSH であるが、本研究で調製した FSH は CHO 細胞の垂株である CHO-DG44 細胞由来であり、細胞基材の違いにより糖鎖プロファイルが異なること、また、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法は、その差異を確認できることが示唆された。

### C.3 組換えヒト FSH の比活性

FSH のレポータージーンアッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法により、比活性を詳細に比較した。SPR イムノアッセイで求めたタンパク質濃度を基に試験溶液を調製し、レポータージーンアッセイを行った。FSH のレポータージーンアッセイで得られた応答曲線を 5 パラメータロジスティックモデルにフィッティングさせることで EC<sub>50</sub> 値を求め、比活性を算出した。アッセイは、FSH(+)およびFSH(-)の各ロット4~6について2回ずつ行い、血清添加群と無血清群について統計解析を行った結果、無血清培養で比活性が約 1.5 倍、有為 (p<0.05) に増加していることが明らかとなった (図 6)。なお、ロット間の変動で有意差はなかった。

糖鎖プロファイリングおよび比活性の検討結果から、組換えヒト FSH の培養工程を無血清化することにより、FSH のタンパク質部分の一次構造あるいは高次構造に違いが生じた結果、活性が上昇したものと予想された。また、レポータージーンアッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法は、製法変更および製法開発における参照品との同等性/同質性評価法として確立するために、バリデーションを行

うことが課題となった。

### E. 結論

- 1) 製造方法の開発・変更モデルとして FSH の実験的製造システムを確立した。
- 2) LC/MS を用いて DG44 細胞より産生した FSH の糖鎖構造を解析したところ、培地に添加した血清の影響は見られなかったが、他の細胞基材で産生された FSH とは明らかな違いが認められた。LC/MS は、同等性/同質性評価法として利用できる可能性がある。
- 3) レポータージーンアッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法を開発し、FSH の比活性を測定したところ、無血清培地で産生させると比活性が 1.5 倍に増加することが明らかになった。本比活性測定法は、同等性/同質性評価法や PAT として利用できる可能性が示唆された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 各ロットのタンパク質濃度

Culture Lot No.	Serum	Protein conc. (µg/ml)
4	+	156
4	-	273
5	+	117
5	-	222
6	+	142
6	-	276

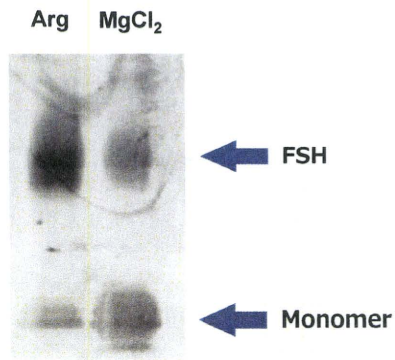


図1 ヒト組換えFSHのSDS-PAGE  
抗FSH抗体カラムから2 Mアルギニン、  
もしくは2 M MgCl<sub>2</sub>で溶出した。

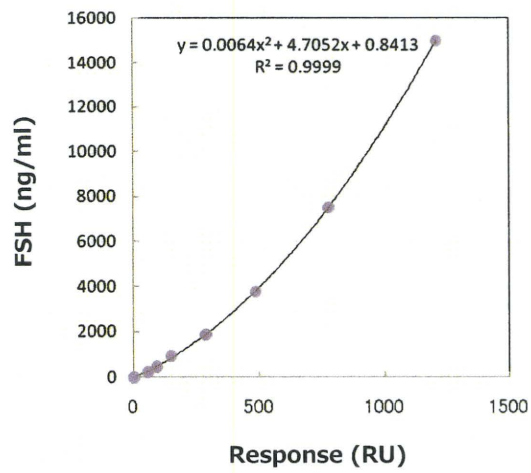


図2 SPRイムノアッセイによるFSHの検量線

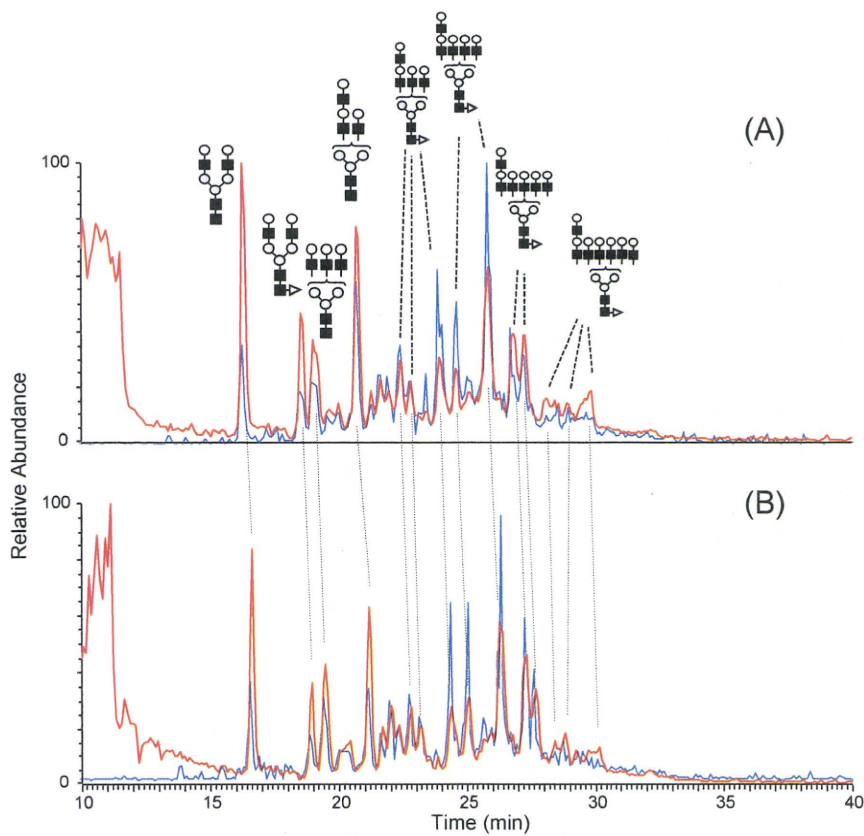


図3 LC/MSにより得られたDG44細胞由来FSHの糖鎖プロファイル  
 (A), 血清添加培地; (B), 無血清培地  
 赤線, ポジティブイオンモード; 青線, ネガティブイオンモード

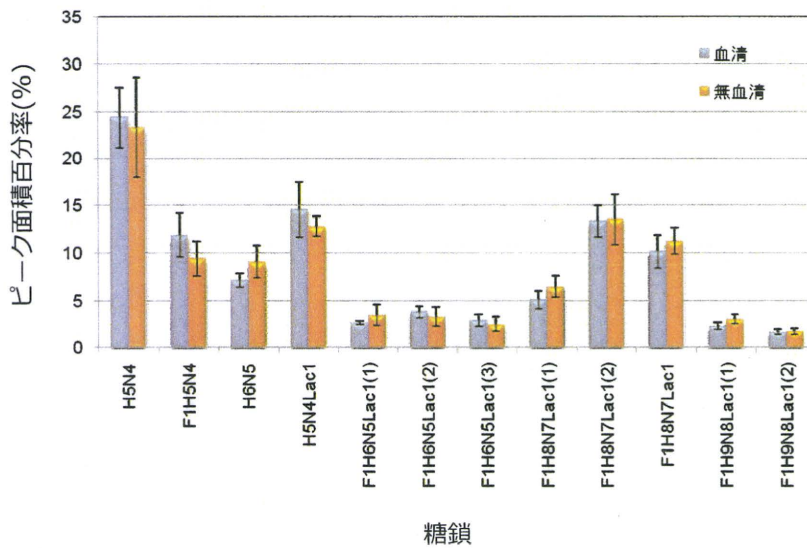


図4 糖鎖分布の比較 (ポジティブイオンモード), n=4  
 H, ヘキソース; N, N-アセチルヘキソサミン; F, フコース;  
 Lac, N-アセチルラクトサミン.