

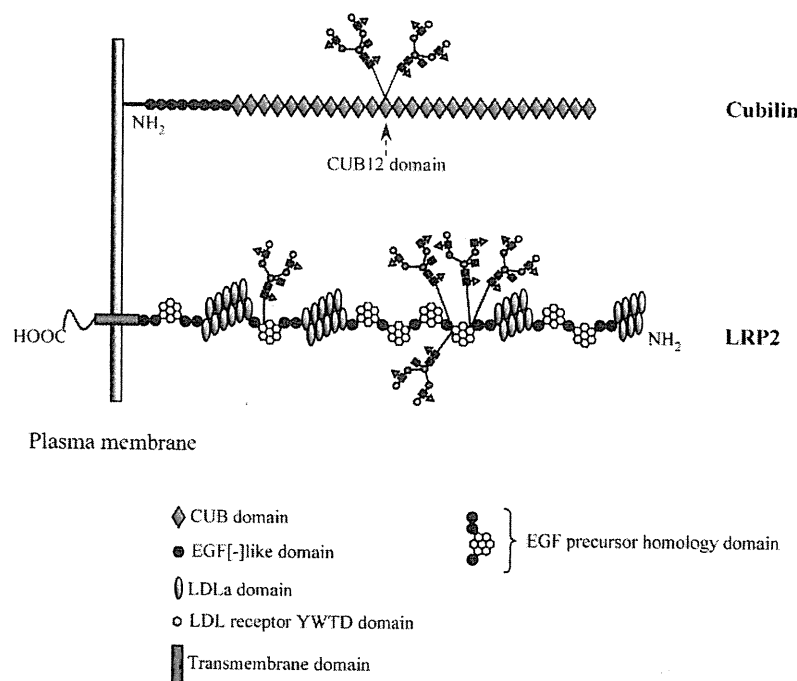


Figure 8. Location of Le^x-conjugated oligosaccharides on cubilin and LRP2. CUB, C1r/C1s, Uegf, and bone morphogenic protein-1; LDLa, Low-density lipoprotein receptor domain class A.

factor (EGF) precursor homology domains, which are associated with pH-dependent ligand dissociation. A previous study demonstrated the linkage of high-mannose-type and bi- and triantennary complex-type oligosaccharides bearing core fucose and bisecting GlcNAc. But there have been no reports on the presence of Le^x-conjugated oligosaccharides in rat kidney LRP2.⁵³ Interestingly, all of the Le^x-conjugated oligosaccharides we found were located in the EGF precursor homology domains (Asn¹⁴⁹⁷, Asn¹⁶⁷⁶, Asn¹⁷³³ and Asn³⁴⁴⁸). Furthermore, heterogeneity of glycosylation on Asn¹⁴⁹⁷ was observed (Figure 8).

The cadherin 16, H2-K(k) protein and alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N) were also identified as Le^x-conjugated glycoproteins. Cadherin 16 is a kidney-specific cadherin that is associated with Ca²⁺-dependent cell–cell adhesion.⁵⁴ The H2-K(k) protein, which is a mouse-specific histocompatibility antigen (H-2 antigen), is involved in the presentation of foreign antigens to the immune system. Alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N) is a trans-membrane protein that is expressed predominantly in intestinal mucosa and kidney tissue.^{55,56} It was reported that this enzyme is involved in several biological events such as tumorigenesis and immune system.⁵⁷ These proteins were unknown to be Le^x-conjugated proteins.

Using the present method, we successfully identified 14 Le^x-conjugated glycopeptides (12 peptides). Some peptides were found to be glycosylated with different Le^x-conjugated oligosaccharides (glycopeptides 5 and 6; glycopeptides 12 and 13). In most cases only a peptide carrying a major oligosaccharide was identified as a Le^x-conjugated glycopeptide. Minor Le^x-conjugated glycopeptides were not subjected to MS/MS/MS in the first run because they were less intense. Such minor glycopeptides might be identified by an additional run in which the glycopeptides identified in the first run are excluded. In addition, our method tended to fail in the identification of glycopeptides having high molecular mass (>4500 Da), glyco-

peptides detected as triply charged ions, and glycopeptides containing triantennary oligosaccharides. These glycopeptides yielded a smaller number of peptide-related ions, which was insufficient for further CID, and database search analysis resulted in false-positive proteins, for example, a peptide not containing *N*-glycan consensus sequences. Using a conventional approach that included LC–MS/MS of the PNGase F-treated tryptic digest, we found two additional Le^x-expected peptides. One was a high molecular mass peptide (3002 Da) containing a triantennary oligosaccharide, and the other was a peptide detected as sodium adducts in our method. The conventional approach has the advantage of peptide sequencing, but does not allow confirmation of the Lewis-motif in the oligosaccharide. Unlike the classical glycomic approaches that are used for the comprehensive analysis of glycopeptides, our method focused only on Lewis-conjugated glycopeptides. Accordingly, it could be applicable to the identification and screening of glycoproteins carrying target glycan-motifs.

Acknowledgment. This study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, by the Core Research for the Evolutional Science and Technology Program (CREST), and by the Japan Science and Technology Corp (JST).

References

- (1) Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- (2) Helenius, A.; Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **2001**, *291*, 2364–2369.
- (3) Zak, I.; Lewandowska, E.; Gnyp, W. Selectin glycoprotein ligands. *Acta Biochim. Pol.* **2000**, *47*, 393–412.
- (4) Feizi, T.; Gooi, H. C.; Childs, R. A.; Picard, J. K.; Uemura, K.; Loomes, L. M.; Thorpe, S. J.; Hounsell, E. F. Tumour-associated and differentiation antigens on the carbohydrate moieties of mucin-type glycoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* **1984**, *12*, 591–596.

- (5) Kannagi, R.; Izawa, M.; Koike, T.; Miyazaki, K.; Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 377–384.
- (6) Hada, T.; Kondo, M.; Yasukawa, K.; Amuro, Y.; Higashino, K. Discrimination of liver cirrhosis from chronic hepatitis by measuring the ratio of Aleuria aurantia lectin-reactive serum cholinesterase to immunoreactive protein. *Clin. Chim. Acta* **1999**, *281*, 37–46.
- (7) Sutton-Smith, M.; Morris, H. R.; Grewal, P. K.; Hewitt, J. E.; Bittner, R. E.; Goldin, E.; Schiffmann, R.; Dell, A. MS screening strategies: investigating the glycomes of knockout and myodystrophic mice and leukodystrophic human brains. *Biochem. Soc. Symp.* **2002**, *105*–115.
- (8) Taniguchi, N.; Ekuni, A.; Ko, J. H.; Miyoshi, E.; Ikeda, Y.; Ihara, Y.; Nishikawa, A.; Honke, K.; Takahashi, M. A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes. *Proteomics* **2001**, *1*, 239–247.
- (9) Morelle, W.; Michalski, J. C. Glycomics and mass spectrometry. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 2615–2645.
- (10) Morelle, W.; Canis, K.; Chirat, F.; Faïd, V.; Michalski, J. C. The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics* **2006**, *6*, 3993–4015.
- (11) Hagglund, P.; Matthiesen, R.; Elortza, F.; Hojrup, P.; Roepstorff, P.; Jensen, O. N.; Bunkenborg, J. An enzymatic deglycosylation scheme enabling identification of core fucosylated N-glycans and O-glycosylation site mapping of human plasma proteins. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 3021–3031.
- (12) Alvarez-Manilla, G.; Atwood, J. 3rd; Guo, Y.; Warren, N. L.; Orlando, R.; Pierce, M. Tools for glycoproteomic analysis: size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with N-linked glycosylation sites. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 701–708.
- (13) Zhao, J.; Qiu, W.; Simeone, D. M.; Lubman, D. M. N-linked glycosylation profiling of pancreatic cancer serum using capillary liquid phase separation coupled with mass spectrometric analysis. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1126–1138.
- (14) Kyselova, Z.; Mechref, Y.; Al Bataineh, M. M.; Dobrolecki, L. E.; Hickey, R. J.; Vinson, J.; Sweeney, C. J.; Novotny, M. V. Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1822–1832.
- (15) Zamfir, A.; Seidler, D. G.; Schonherr, E.; Kresse, H.; Peter-Katalinic, J. On-line sheathless capillary electrophoresis/nanoelectrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2010–2016.
- (16) Karlsson, N. G.; Wilson, N. L.; Wirth, H. J.; Dawes, P.; Joshi, H.; Packer, N. H. Negative ion graphitised carbon nano-liquid chromatography/mass spectrometry increases sensitivity for glycoprotein oligosaccharide analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2282–2292.
- (17) Kawasaki, N.; Ohta, M.; Itoh, S.; Hyuga, M.; Hyuga, S.; Hayakawa, T. Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals* **2002**, *30*, 113–123.
- (18) Kremmer, T.; Szollosi, E.; Boldizsar, M.; Vincze, B.; Ludanyi, K.; Imre, T.; Schlosser, G.; Vekey, K. Liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of human serum acid alpha-1-glycoprotein. *Biomed. Chromatogr.* **2004**, *18*, 323–329.
- (19) Thomsson, K. A.; Karlsson, H.; Hansson, G. C. Sequencing of sulfated oligosaccharides from mucins by liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4543–4549.
- (20) Kawasaki, N.; Ohta, M.; Hyuga, S.; Hyuga, M.; Hayakawa, T. Application of liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the analysis of the site-specific carbohydrate heterogeneity in erythropoietin. *Anal. Biochem.* **2000**, *285*, 82–91.
- (21) Schmid, D.; Behnke, B.; Metzger, J.; Kuhn, R. Nano-HPLC-mass spectrometry and MEKC for the analysis of oligosaccharides from human milk. *Biomed. Chromatogr.* **2002**, *16*, 151–156.
- (22) Maslen, S.; Sadowski, P.; Adam, A.; Lilley, K.; Stephens, E. Differentiation of isomeric N-glycan structures by normal-phase liquid chromatography-MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8491–8498.
- (23) Yuan, J.; Hashii, N.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Kawanishi, T.; Hayakawa, T. Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 145–152.
- (24) Lawrence, R.; Olson, S. K.; Steele, R. E.; Wang, L.; Warrior, R.; Cummings, R. D.; Esko, J. D. Evolutionary differences in glycosaminoglycan fine structure detected by quantitative glycan reductive isotope labeling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33674–33684.
- (25) Ridlova, G.; Mortimer, J. C.; Maslen, S. L.; Dupree, P.; Stephens, E. Oligosaccharide relative quantitation using isotope tagging and normal-phase liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 2723–2730.
- (26) Harazono, A.; Kawasaki, N.; Kawanishi, T.; Hayakawa, T. Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS. *Glycobiology* **2005**, *15*, 447–462.
- (27) Itoh, S.; Kawasaki, N.; Harazono, A.; Hashii, N.; Matsuishi, Y.; Kawanishi, T.; Hayakawa, T. Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multistage tandem mass spectrometry: analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1094*, 105–117.
- (28) Satomi, Y.; Shimonishi, Y.; Hase, T.; Takao, T. Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2983–2988.
- (29) Wührer, M.; Catalina, M. I.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J. Chromatogr., B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *849*, 115–128.
- (30) Stadlmann, J.; Pabst, M.; Kolarich, D.; Kunert, R.; Altmann, F. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics* **2008**, *8*, 2858–2871.
- (31) Picariello, G.; Ferranti, P.; Mamone, G.; Roepstorff, P.; Addeo, F. Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* **2008**, *8*, 3833–3847.
- (32) Hirabayashi, J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 35–40.
- (33) Taketa, K. Characterization of sugar chain structures of human alpha-fetoprotein by lectin affinity electrophoresis. *ibarahp@oka.urban.ne.jp. Electrophoresis* **1998**, *19*, 2595–2602.
- (34) Kuno, A.; Kato, Y.; Matsuda, A.; Kaneko, M. K.; Ito, H.; Amano, K.; Chiba, Y.; Narimatsu, H.; Hirabayashi, J. Focused Differential Glycan Analysis with the Platform Antibody-assisted Lectin Profiling for Glycan-related Biomarker Verification. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 99–108.
- (35) Madera, M.; Mechref, Y.; Klouckova, I.; Novotny, M. V. Semiautomated high-sensitivity profiling of human blood serum glycoproteins through lectin preconcentration and multidimensional chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2348–2363.
- (36) Yang, Z.; Hancock, W. S.; Chew, T. R.; Bonilla, L. A study of glycoproteins in human serum and plasma reference standards (HUPO) using multilectin affinity chromatography coupled with RPLC-MS/MS. *Proteomics* **2005**, *5*, 3353–3366.
- (37) Zhao, J.; Simeone, D. M.; Heidt, D.; Anderson, M. A.; Lubman, D. M. Comparative serum glycoproteomics using lectin selected sialic acid glycoproteins with mass spectrometric analysis: application to pancreatic cancer serum. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1792–1802.
- (38) Hashii, N.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Hyuga, M.; Kawanishi, T.; Hayakawa, T. Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: analysis of glycan structural alteration in cells. *Proteomics* **2005**, *5*, 4665–4672.
- (39) Hashii, N.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Harazono, A.; Matsuishi, Y.; Hayakawa, T.; Kawanishi, T. Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 3315–3321.
- (40) Carr, S. A.; Huddleston, M. J.; Bean, M. F. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 183–196.
- (41) Harazono, A.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Hashii, N.; Ishii-Watabe, A.; Kawanishi, T.; Hayakawa, T. Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2006**, *348*, 259–268.
- (42) Ueda, T.; Shimada, E.; Urakawa, T. The clinicopathologic features of serum CA 19-9-positive colorectal cancers. *Surg. Today* **1994**, *24*, 518–525.
- (43) Nakagoe, T.; Sawai, T.; Tsuji, T.; Jibiki, M.; Ohbatake, M.; Nanashima, A.; Yamaguchi, H.; Yasutake, T.; Ayabe, H.; Tagawa, Y. Differences in release mechanisms and distributions for sialyl Le(a) and sialyl Le(x) antigens in colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2000**, *7*, 289–295.

- (44) Harvey, D. J.; Mattu, T. S.; Wormald, M. R.; Royle, L.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. "Internal residue loss": rearrangements occurring during the fragmentation of carbohydrates derivatized at the reducing terminus. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 734–740.
- (45) Mattu, T. S.; Royle, L.; Langridge, J.; Wormald, M. R.; Van den Steen, P. E.; Van Damme, J.; Opdenakker, G.; Harvey, D. J.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15695–15704.
- (46) Brull, L. P.; Kovacic, V.; Thomas-Oates, J. E.; Heerma, W.; Haverkamp, J. Sodium-cationized oligosaccharides do not appear to undergo 'internal residue loss' rearrangement processes on tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1520–1532.
- (47) Franz, A. H.; Lebrilla, C. B. Evidence for long-range glycosyl transfer reactions in the gas phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 325–337.
- (48) Ma, Y. L.; Vedernikova, I.; Van den Heuvel, H.; Claeys, M. Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 136–144.
- (49) Wührer, M.; Koeleman, C. A.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M. Mass spectrometry of proton adducts of fucosylated N-glycans: fucose transfer between antennae gives rise to misleading fragments. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1747–1754.
- (50) Christensen, E. I.; Birn, H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2001**, *280*, F562–573.
- (51) Yamashita, K.; Hitoi, A.; Tateishi, N.; Higashi, T.; Sakamoto, Y.; Kobata, A. The structures of the carbohydrate moieties of mouse kidney gamma-glutamyltranspeptidase: occurrence of X-antigenic determinants and bisecting N-acetylglucosamine residues. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *240*, 573–582.
- (52) Habib, G. M.; Shi, Z. Z.; Cuevas, A. A.; Lieberman, M. W. Identification of two additional members of the membrane-bound dipeptidase family. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1313–1315.
- (53) Morelle, W.; Haslam, S. M.; Ziak, M.; Roth, J.; Morris, H. R.; Dell, A. Characterization of the N-linked oligosaccharides of megalin (gp330) from rat kidney. *Glycobiology* **2000**, *10*, 295–304.
- (54) Wendeler, M. W.; Praus, M.; Jung, R.; Hecking, M.; Metz, C.; Gessner, R. Ksp-cadherin is a functional cell-cell adhesion molecule related to LI-cadherin. *Exp. Cell Res.* **2004**, *294*, 345–355.
- (55) Barnes, K.; Walkden, B. J.; Wilkinson, T. C.; Turner, A. J. Expression of endothelin-converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its localization in rat hippocampus. *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 570–577.
- (56) Lucius, R.; Sievers, J.; Mentlein, R. Enkephalin metabolism by microglial aminopeptidase N (CD13). *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 1841–1847.
- (57) Luan, Y.; Xu, W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 639–647.

PR9000527

Current Topics

New Era of Glycoscience: Intrinsic and Extrinsic Functions Performed by Glycans

The Significance of Glycosylation Analysis in Development of Biopharmaceuticals

Nana KAWASAKI,* Satsuki ITOH, Noritaka HASHII, Daisuke TAKAKURA, Yan QIN, Xiaoyu HUANG, and Teruhide YAMAGUCHI

Division of Biological Chemistry & Biologicals, National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Received October 24, 2008

Many glycoproteins and glycosaminoglycans are approved for clinical use. Carbohydrate moieties in biopharmaceuticals affect not only their physicochemical properties and thermal stability, but also their reactivity with their receptors and circulating half-life. Modification of glycans is one target of drug design for enhancement of efficacy. Meanwhile, there have been reports of serious adverse events caused by some carbohydrates. It is crucial to maintain the constancy of carbohydrate moieties for the efficient and safe use of glycosylated biopharmaceuticals. On the other hand, for scientific, safety-related, and economic reasons, changes in the manufacturing process are frequently made either during the development or after the approval of new biopharmaceuticals. Furthermore, the development of biosimilar glycoprotein products has been attempted by different manufacturers. Changes in pharmaceutical manufacturing processes possibly cause alteration of glycosylation and raise concerns about alteration of their quality, safety, and efficacy. In this review we provide some current topics of glycosylated biopharmaceuticals from the viewpoints of efficacy, safety, and the manufacturing process and discuss the significance of glycosylation analysis for development of biopharmaceuticals.

Key words glycoprotein; glycosaminoglycan; biopharmaceutical; efficacy; safety; manufacturing process

1. INTRODUCTION

Many biological molecules containing carbohydrates are approved for clinical use in Japan (Table 1). In the beginning, most therapeutic glycoconjugates were naturally occurring glycoproteins and glycosaminoglycans (GAGs) derived from human and healthy animal tissues, such as gonadotropins from human urine, and heparins from the porcine intestine. Recombinant glycoproteins, including erythropoietin and tissue plasminogen activator (tPA), have been developed as copies of native human glycoproteins since the early 1990s in Japan. In many cases their carbohydrate moieties were different from the original human ones. Carbohydrate moieties in glycoproteins affects not only their physicochemical properties and thermal stability but also their reactivity with their receptors and circulating half-life.¹⁾ Modification of carbohydrate moieties is one target of drug design to enhance the efficacy of the original ones. Meanwhile, there have been reports from around the world of serious adverse events caused by carbohydrate-related drugs. For the efficient and safe use of glycoprotein/GAG products, it is necessary to maintain the structures and heterogeneity of carbohydrate moieties in glycosylated biopharmaceuticals.

On the other hand, carbohydrate moieties in biotechnology-derived drugs are variable when the manufacturing process is changed. For scientific, safety-related and economic reasons, it has become common for companies to change the manufacturing process for their approved products. Furthermore, biosimilar glycoprotein products, which are manufactured by different companies, have been developing in many regions.^{2,3)} One of the main issues for the devel-

Table 1. Glycosylated Biopharmaceuticals in Japan

Origin	Japanese accepted name
Granulocyte-colony stimulating factor	Lenograstim
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	Mirimostim
Interferon	Interferon Alfa (NAMALWA), Interferon Alfa (BALL-1), Interferon Beta, Interferon Beta-1a, Interferon Gamma-n1
Erythropoietin	Epoetin Alfa, Epoetin Beta, Darbepoetin Alfa
Monoclonal antibody	Ibritumomab Tiuxetan, Basiliximab, Infliximab, Rituximab, Cetuximab, Gemtuzumab, Ozogamicin, Palivizumab, Tocilizumab, Trastuzumab, Bevacizumab, Adalimumab
Receptor	Etanercept
Follicle stimulating hormone	Follitropin Alfa, Follitropin Beta
Gonadotropin	Human Menopausal Gonadotropin, Human Chorionic Gonadotropin, Serum Gonadotropin
Factor VII	Eptacog Alfa (Activated)
Factor VIII	Octocog Alfa, Ruriocog Alfa
Thrombomodulin	Thrombomodulin Alfa
Urokinase	Urokinase
Pro-urokinase	Nasaruplase
Tissue-plasminogen activator	Alteplase, Montepilase, Parniteplase
Enzymes	Kallidinogenase, Agalsidase Alfa, Agalsidase Beta, Alglucosidase Alfa, Alglucerase, Idursulfase, Imiglucerase, Laronidase, Galsulfase
Heparins	Heparin Sodium, Heparin Calcium, Parnaparin Sodium, Dalteparin Sodium, Enoxaparin Sodium, Reviparin Sodium
Hyaluronate	Sodium Hyaluronate
Chondroitin sulfate	Chondroitin sulfate

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: nana@nihs.go.jp

opment of biosimilar products is how to assure the similarity of carbohydrate moieties between the biosimilar products and the reference products.

In this review we provide some current topics of glycosylated biopharmaceuticals in terms of efficacy, safety, and manufacturing process and discuss the significance of glycosylation analysis in the development of biopharmaceuticals.

2. ROLE OF CARBOHYDRATES ON EFFICACY

Glycosylation in some biopharmaceuticals is crucial for their biological activity. Lysosomal storage diseases are characterized by deficiencies of lysosomal enzymes that degrade the glycoconjugates, such as mucopolysaccharides and glycolipids, and consequent cellular damages by their accumulated metabolites.⁴⁾ For use in enzyme-replacement therapy against lysosomal storage diseases, several recombinant glycoprotein products have been approved, namely *agalsidase alfa* and *agalsidase beta* for Fabry's disease, *alglucosidase alfa* for Pompe's disease, and *laronidase*, *idursulfase*, and *galsulfase* for mucopolysaccharidosis I, II, and VI, respectively.^{4–8)} These drugs contain *N*-linked oligosaccharides attached to mannose 6-phosphate (M-6-P), and the secreted enzymes are transported to an acidified prelysosomal compartment through the M-6-P receptor.^{9,10)} The carbohydrate residue is essential for lysosomal targeting and to exhibit complete enzyme activity in lysosomes. *Imiglucerase* is an analog of human β -glucocerebrosidase, which is used for the treatment of Gaucher's disease. This glycoprotein is produced by recombinant DNA technology and exoglycosidase treatment to expose mannose residues in *N*-linked oligosaccharides. The carbohydrate modification facilitates incorporation of this drug into macrophages through mannose-binding receptors.¹¹⁾ These recombinant lysosomal enzymes have achieved dramatic therapeutic effects against the lysosomal storage diseases.

Several human glycoprotein analogs whose carbohydrates are modified to enhance their efficacy have been developed in recent years. Erythropoietin is a glycoprotein containing three *N*-glycans and one *O*-glycan, and sialylation on its non-reducing ends is closely associated with its circulating half-life.¹²⁾ *Darbepoetin alfa* is an erythropoietin analog to which two additional *N*-glycans are attached by replacement of five amino acid residues.¹³⁾ The modification of glycosylation prolongs the half-time of this analog compared to its native form. Similar genetic engineering for improvement of half lives has been successfully attempted in antithrombotic drugs. T-PA consists of finger, epidermal growth factor (EGF), kringle1, kringle2 and catalytic domains, and three *N*-glycans. High-mannose type oligosaccharides at the kringle1 domain and EGF domain are related to the short circulation half-life of t-PA.¹⁴⁾ Extension of half-life in blood has been achieved by eliminating the kringle1 domain from human t-PA and replacing one amino acid residue (*pamiteplase*).¹⁵⁾ These improvements have contributed to reducing the frequency and dose of administration.

Recombinant monoclonal antibodies, which have been successfully used in the treatment of cancers and immune diseases, might be the next target of drug design by glyco-engineering. Several anti-tumor monoclonal antibodies that contain a constant region derived from immunoglobulin

(Ig) G have antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), and removal of a fucose (Fuc) residue from *N*-linked oligosaccharides at the constant region causes the enhancement of ADCC.^{16,17)} A non-fucosylated IgG-derived antibody is expected to improve the therapeutic effects of these anti-tumor pharmaceuticals.

Glycosylation has also been used for the site-selective modification of proteins with polyethylene glycol (PEGylation).¹⁸⁾ In the GlycoPEGylation method, sialic acid covalently substituted with polyethylene glycol (PEG) can be enzymatically transferred to *O*-glycans at serine or threonine positions in proteins produced in *Escherichia coli*. This strategy has overcome the problems of the previous PEGylation, which provided a heterogeneous mixture of PEG positional isomers. There is increasing interest in utilization and modification of glycans in the development of biopharmaceuticals.

3. IMPACT OF CARBOHYDRATES ON SAFETY

Some glycans have caused serious adverse events in clinical stages. Heparin is a highly sulfated GAG composed of a disaccharide unit, β 1-4 linked α -D-glucosamine and α -D-iduronic acid or β -D-glucuronic acid (averaging 2.5 sulfate groups per disaccharide). In 2007–2008, a serious adverse event associated with *heparin sodium*, including over eighty deaths, occurred in the United States (US).¹⁹⁾ Over-sulfated chondroitin sulfate (OSCS), which consists of fully sulfated β 1-3 linked α -D-*N*-acetylgalactosamine (GalNAc) and a β -D-glucuronic acid unit, was identified as the contaminant in the heparin sodium that had caused hypersensitivity reactions.^{20,21)} It has been reported that OSCS activated the kinin-kallikrein system and induced generation of C3a and C5a, potent anaphylatoxins derived from complement proteins. The contaminated heparin sodium was distributed to at least twelve countries and raised concern about a shortage of heparin products. For ensuring the safety of heparin products, pharmacopoeias in Japan, the US and EU immediately amended their heparin sodium monograph to confirm the absence of OSCS by ¹H-NMR and/or capillary electrophoresis (Fig. 1A). This adverse event has left concerns about the safety of GAGs and motivated the development of a sensitive and selective analytical method for GAGs products all over the globe (Fig. 1B).

An alternative concern for a carbohydrate-related adverse event is immunogenicity of nonhuman glycan motifs. The galactose- α 1,3-galactose (Gal(α 1-3)Gal) motif is known as one of the major problems in the transplantation of organs from pigs to humans.²²⁾ Mouse myeloma cell lines, which are often used for production of recombinant glycoproteins, also expresses the Gal(α 1-3)Gal motif in *N*-linked oligosaccharides. Recently, a high prevalence of hypersensitivity reactions was reported in patients who had been injected with *cetuximab*, which is produced in mouse myeloma cells.²³⁾ This chimeric mouse-human antibody is attached to *N*-linked oligosaccharide containing the Gal(α 1-3)Gal motif at the Fab region.²⁴⁾ It is reported that IgE antibodies against the Gal(α 1-3)Gal motif had been present in serum before therapy, and these antibodies caused hypersensitive reactions after cetuximab treatment. Another immunogenic nonhuman glycan is *N*-glycolylneuraminic acid (NeuGc), a sialic acid.²⁵⁾

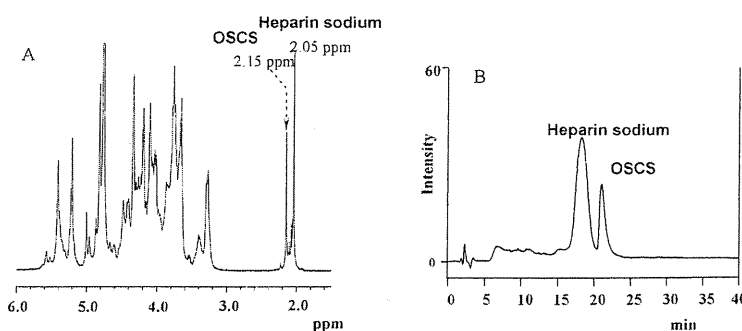


Fig. 1. ¹H-NMR Spectra (A) and Anion-Exchange Chromatogram (B) of Heparin Sodium Containing 10% OSCS

¹H-NMR spectrum was obtained at 298 K using a 500 MHz JEOL JNM-ECA500 instrument equipped with a 5-mm filed gradient tunable probe with standard JEOL software. Chemical shifts were referenced to the signal of 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-*d*₄ acid sodium salt (TSP) as internal standard (0.00 ppm). Anion-exchange chromatogram was obtained using TSKgel DEAE-5PW (21.5 mm I.D. × 15 cm, 10 μm) at a flow rate of 1.0 ml/min at 40 °C. The UV detector was set at 230 nm. GAGs were eluted by a linear gradient of 0–100% B buffer (buffer: A, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); B, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 2 M NaCl) within 40 min.

Since Varki *et al.* reported the incorporation of NeuGc into human embryonic stem (ES) cells through the animal serum and the feeder layer, contamination of cell therapy products with NeuGc has become a serious issue in clinics.²⁶⁾ These reports imply the significance of glycan analysis in recombinant glycoprotein products and risk assessment of nonhuman glycans.

4. ALTERATION OF CARBOHYDRATES BY CHANGES IN EXPRESSION SYSTEM AND MANUFACTURING PROCESS

In addition to recombinant technology using mammalian cells, a transgenic technique has been also focusing on large-scale production of therapeutic glycoproteins.^{27,28)} Antithrombin III is an anticoagulant factor, and a freeze-dried preparation of human antithrombin III has been approved for treatment of disseminated intravascular coagulation and thrombogenic tendencies. In 2006, the European Medicine Agency (EMA) authorized the marketing of *antithrombin alfa*, a recombinant human antithrombin III produced from the milk of transgenic goats. Detailed structural analysis revealed that these two glycoproteins were structurally identical except for a difference in glycosylation.²⁷⁾ An alternative approach for the large-scale and low-cost production of biopharmaceuticals is the use of transgenic plants.²⁹⁾ Plant cells express nonhuman glycans, such as Fuc (α1-3) *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), xylose (Xyl) (β1-2) GlcNAc and Gal (β1-3) GlcNAc at the reducing-end of complex-type *N*-linked oligosaccharides. Currently, plant glyco-engineering, including modification of glycosyltransferases, is developing to overcome limitations in the production of glycoprotein products.³⁰⁾

For various scientific, safety-related and economic reasons, changes in manufacturing processes for biopharmaceuticals are often attempted during the development phase and after marketing authorization. Meanwhile recombinant glycoprotein products that have been claimed to be similar to a reference medical product already authorized (biogeneric/biosimilar/follow-on biologics) have been approved by different manufacturers. The changes in the manufacturing process possibly cause the alteration of glycosylation in the glycoprotein products and consequent changes in quality, efficacy and safety. The first biosimilar glycosylated pharmaceutical, *epo-*

etin alfa, was approved in the EU recently. According to the Japanese guidelines for the biosimilar products, the applicants have to submit some efficacy and safety study data but not all if they can show the data on structural properties and physicochemical/biological similarity between the authorized and biosimilar products. One of the challenging issues in the development of biosimilar glycoprotein products is a comparison of glycosylation between the authorized products and the new entry biosimilar products.

Using some *epoetin* products, we have studied the possibility of several analytical methods for comparison of the glycosylation between closely related biopharmaceuticals. Commercially available *epoetin* products (products A–D) were electrophoresed, and *N*-linked oligosaccharides were released from bands at 30 kDa by an in-gel glycopeptidase F digestion (Fig. 2A). The resulting oligosaccharides were reduced with NaBH₄ and subjected to LC/MS. In Fig. 2, *International nonproprietary names (INN)* of *epoetins* contained in the products A–C and D are tentatively named as *epoetin α* and *β*, respectively. Products A and B are marketed in country X, while products C and D are manufactured and distributed in country Y. Figure 2B shows the total ion chromatograms of *N*-linked oligosaccharides released from four *epoetin* products, and the mass spectra acquired from the most intense peaks (peak *z*_{1–4}) are shown in Fig. 2C. The *m/z* values of the most intense ions (*m/z* 1226.8) and a series of triply charged ions with *m/z* 14 spacing pattern reveal that the most abundant glycan in *epoetin* products are a tetrasialyl fucosylated-tetraantennary oligosaccharide in common but there are tangible differences in acetylation of sialic acids between products A–C (*epoetin α*) and product D (*epoetin β*) (Fig. 2C). Even among *epoetin α* products there were some significant differences, such as the non-fucosylated oligosaccharides that were found in *epoetin α* products in country X (products A and B) but not in country Y (product C). The latest analytical technology allows us to evaluate the similarity of the glycosylation of closely related biopharmaceuticals.^{31,32)}

5. CONCLUSION

As described above, glycosylation in most biopharmaceuticals affects their efficacy and safety, and the glycosylation is dependent on the manufacturing process and the expres-

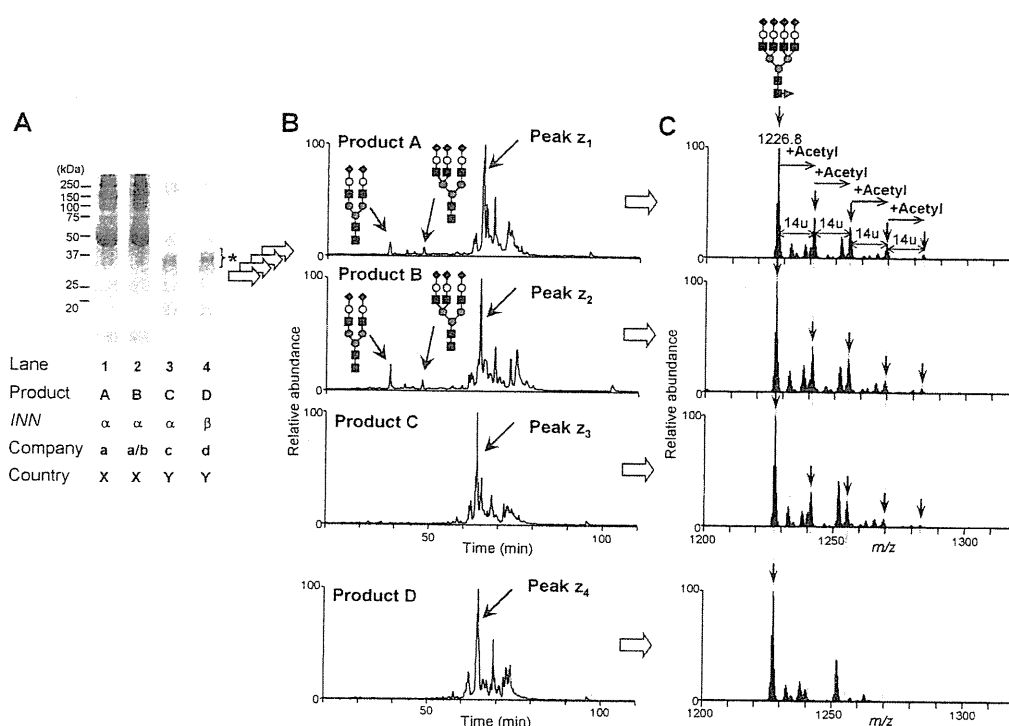


Fig. 2. Glycosylation Analysis of Epoetin Products

(A) SDS-PAGE images. Sample: lane 1, product A; lane 2, product B; lane 3, product C; lane 4, product D. (B) *N*-glycan profiles of products A–D acquired by LC/MS in the negative ion mode. (C) Mass spectra of peaks z_1 – z_4 . Product: A, an epoetin α product manufactured/distributed by company a in country X; B, an epoetin α product manufactured/distributed by company a and distributed by company b in country X; C, an epoetin α product manufactured/distributed by company c in country Y; D, an epoetin β product manufactured/distributed by company d in country Y. INN of products A–C, and D are tentatively named as epoetin α and epoetin β , respectively. Symbols: ●, Man; ○, Gal; ■, GlcNAc; ▲, Fuc; ◆, NeuAc. * Bands of epoetins. LC: instrument, nanoFrontier nLC system (Hitachi High-Technologies Corporation); column, graphitized carbon (0.075×150 mm, ThermoFisher Scientific); flow rate, 200 nL/min; buffer A, 5 mM ammonium acetate with 2% acetonitrile (pH 9.6); buffer B, 5 mM ammonium acetate with 80% acetonitrile (pH 9.6); gradient condition, 5–35% B (110 min). MS: instrument, LTQ-TF (ThermoFisher Scientific); electron voltage, 2.0 kV (negative ion mode).

sion system. Physicochemical and biological characterization of such glycosylation is crucial at various stages, namely the development of new biotherapeutic glycoproteins, the establishment of changes in the manufacturing process, and the development of biosimilar products. Appropriate glycan testing must be adopted if the carbohydrate moiety influences safety and efficacy of the pharmaceutical. Furthermore, an *in vivo* assay could be replaced by the glycan test if the glycan profile is strongly associated with *in vivo* activity. Advances in analytical techniques for carbohydrate moieties are expected to facilitate the development of biopharmaceuticals.

Acknowledgments The work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

REFERENCES

- Varki A., *Glycobiology*, **3**, 97–130 (1993).
- Schellekens H., *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1357–1359 (2004).
- Schneider C. K., Kalinke U., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 985–990 (2008).
- Hopwood J. J., Bate G., Kirkpatrick P., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 101–102 (2006).
- Lee K., Jin X., Zhang K., Copertino L., Andrews L., Baker-Malcolm J., Geagan L., Qiu H., Seiger K., Bamgrover D., McPherson J. M., Edmunds T., *Glycobiology*, **13**, 305–313 (2003).
- Kishnani P. S., Nicolino M., Voit T., Rogers R. C., Tsai A. C., Waterson J., Herman G. E., Amalfitano A., Thurberg B. L., Richards S., Davison M., Corzo D., Chen Y. T., *J. Pediatr.*, **149**, 89–97 (2006).
- Wraith J. E., Clarke L. A., Beck M., Kolodny E. H., Pastores G. M., Muenzer J., Rapoport D. M., Berger K. I., Swiedler S. J., Kakkis E. D., Braakman T., Chadbourne E., Walton-Bowen K., Cox G. F., *J. Pediatr.*, **144**, 581–588 (2004).
- Wraith J. E., Scarpa M., Beck M., Bodamer O. A., De Meirleir L., Guffon N., Meldgaard Lund A., Malm G., Van der Ploeg A. T., Zeman J., *Eur. J. Pediatr.*, **167**, 267–277 (2008).
- Dahms N. M., Lobel P., Kornfeld S., *J. Biol. Chem.*, **264**, 12115–12118 (1989).
- Van der Ploeg A. T., Kroos M. A., Willemsen R., Brons N. H., Reuser A. J., *J. Clin. Invest.*, **87**, 513–518 (1991).
- Van Patten S. M., Hughes H., Huff M. R., Piepenhagen P. A., Waire J., Qiu H., Ganesa C., Reczek D., Ward P. V., Kutzko J. P., Edmunds T., *Glycobiology*, **17**, 467–478 (2007).
- Higuchi M., Oh-eda M., Kuboniwa H., Tomonoh K., Shimonaka Y., Ochi N., *J. Biol. Chem.*, **267**, 7703–7709 (1992).
- Egrie J. C., Dwyer E., Browne J. K., Hitz A., Lykos M. A., *Exp. Hematol.*, **31**, 290–299 (2003).
- Rijken D. C., Otter M., Kuiper J., van Berkel T. J., *Thromb. Res. Suppl.*, **10**, 63–71 (1990).
- Oikawa K., Kamimura H., Watanabe T., Miyamoto I., Higuchi S., *Thromb. Res.*, **101**, 493–500 (2001).
- Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N., Shitara K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466–3473 (2003).
- Kanda Y., Yamada T., Mori K., Okazaki A., Inoue M., Kitajima-Miyama K., Kuni-Kamochi R., Nakano R., Yano K., Kakita S., Shitara K., Satoh M., *Glycobiology*, **17**, 104–118 (2007).
- DeFrees S., Wang Z. G., Xing R., Scott A. E., Wang J., Zopf D., Gouty D. L., Sjöberg E. R., Panneerselvam K., Brinkman-Van der Linden E. C., Bayer R. J., Tarp M. A., Clausen H., *Glycobiology*, **16**, 833–843 (2006).
- MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.*, **57**, 124–125 (2008).
- Kishimoto T. K., Viswanathan K., Ganguly T., Elankumaran S., Smith S., Pelzer K., Lansing J. C., Sriranganathan N., Zhao G., Galcheva-Gargova Z., Al-Hakim A., Bailey G. S., Fraser B., Roy S., Rogers-

- Cotrone T., Buhse L., Whary M., Fox J., Nasr M., Dal Pan G. J., Shriver Z., Langer R. S., Venkataraman G., Austen K. F., Woodcock J., Sasisekharan R., *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2457—2467 (2008).
- 21) Guerrini M., Beccati D., Shriver Z., Naggi A., Viswanathan K., Bisio A., Capila I., Lansing J. C., Guglieri S., Fraser B., Al-Hakim A., Gunay N. S., Zhang Z., Robinson L., Buhse L., Nasr M., Woodcock J., Langer R., Venkataraman G., Linhardt R. J., Casu B., Torri G., Sasisekharan R., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 669—675 (2008).
 - 22) Sandrin M. S., Vaughan H. A., Dabkowski P. L., McKenzie I. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 11391—11395 (1993).
 - 23) Chung C. H., Mirakhor B., Chan E., Le Q. T., Berlin J., Morse M., Murphy B. A., Satinover S. M., Hosen J., Mauro D., Slebos R. J., Zhou Q., Gold D., Hatley T., Hicklin D. J., Platts-Mills T. A., *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1109—1117 (2008).
 - 24) Qian J., Liu T., Yang L., Daus A., Crowley R., Zhou Q., *Anal. Biochem.*, **364**, 8—18 (2007).
 - 25) Higashi H., Naiki M., Matuo S., Okouchi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 388—395 (1977).
 - 26) Martin M. J., Muotri A., Gage F., Varki A., *Nat. Med.*, **11**, 228—232 (2005).
 - 27) Edmunds T., Van Patten S. M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J. M., Cole E. S., *Blood*, **91**, 4561—4571 (1998).
 - 28) Jongen S. P., Gerwig G. J., Leeftang B. R., Koles K., Mannesse M. L., van Berkel P. H., Pieper F. R., Kroos M. A., Reuser A. J., Zhou Q., Jin X., Zhang K., Edmunds T., Kamerling J. P., *Glycobiology*, **17**, 600—619 (2007).
 - 29) Reggi S., Marchetti S., Patti T., De Amicis F., Cariatì R., Bembi B., Fogher C., *Plant Mol. Biol.*, **57**, 101—113 (2005).
 - 30) Kisung Ko M.-H. A., Song M., Choo Y.-K., Kim H. S., Ko K., Joung H., *Mol. Cells*, **25**, 494—503 (2008).
 - 31) Ohta M., Kawasaki N., Itoh S., Hayakawa T., *Biologicals*, **30**, 235—244 (2002).
 - 32) Kawasaki N., Ohta M., Itoh S., Hyuga M., Hyuga S., Hayakawa T., *Biologicals*, **30**, 113—123 (2002).

早期臨床開発段階での バイオ医薬品の品質・安全性確保

山口 照英 石井 明子
国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

Quality and safety issues of biotechnological products used in early clinical studies

Teruhide Yamaguchi Akiko Ishii-Watabe
Division of Biological Chemistry and Biologicals National Institute of Health Sciences

Abstract

In the last decade, an increasing number of second-generation (engineered) protein products such as humanized monoclonal antibodies, fusion proteins or chemically modified proteins, have been developed. In the development of such products, selection of the optimal product from several candidates is a critical step. However, the pharmacological effects and safety profiles of these non-natural protein products in humans are difficult to predict. In addition, non-clinical study data on these products are not sufficient, due to species specificity or technical limitations. Therefore, early exploratory clinical studies might be one possible approach for improving the development success rate of engineered protein products.

To ensure the quality and safety of biotechnological products, the following two hurdles must be overcome : 1) establishing a robust manufacturing process and 2) setting specifications based on data from product characterization and non-clinical/clinical studies. In the early development stage, however, the production process might not be fully established or information for setting the specifications might be limited. Here we discuss approaches for ensuring the quality and safety of biotechnological investigational products used for early and exploratory clinical studies. One of the indispensable tests is the viral safety evaluation of the master cell bank and unprocessed bulk. Studies on biological properties and the potency of products using human cell/tissue preparations should be useful for predicting the safety profile of the products. When the manufacturing process of the investigational product has been changed, comparability studies should provide sufficient assurance that no resulting product differences will have an adverse impact on the product characteristics. The discussions herein will hopefully be useful in current efforts to develop new biotechnological products.

Key words

biotechnological products, quality, safety, manufacturing process, IND

Rinsho Hyoka (Clinical Evaluation) 2009 ; 36 : 611-27.

1. 序論

21世紀に入ってバイオ医薬品の開発は急速に広がっており、特に抗体医薬品や改変タンパク質医薬品など、旧来のバイオ医薬品とは異なる製品の開発が進んでいる。第二世代のバイオ医薬品とも言えるこれらの製品では、同時に複数の医薬品候補分子について開発が進められることが多く、適切な医薬品候補分子の選択が開発戦略において重要な位置を占めている。しかし、天然型のタンパク質医薬品と異なり、非天然型のタンパク質医薬品ではヒトにおける薬理作用や免疫反応性などの安全性の予測が容易ではないことに加え、タンパク質医薬品全般に言えることであるが標的分子との相互作用の種特異性が高いことなどにより、動物モデルでの評価では開発候補品の選択に十分な有効性や安全性の情報が得られないことも多い。一方で、医薬品開発において、開発候補品の特性に関する知識や、治療標的の妥当性について、より早くヒトのデータを入手することが有益な場合があることが認められている¹⁾。このような背景のもと、バイオ医薬品開発の効率化を目指して、臨床試験を早期に実施して開発候補品のヒトでの安全性や有効性を評価していくことが検討され始めており、臨床開発初期に用いるバイオ医薬品について如何に品質や安全性を確保していくかが大きな課題となっている*。

化学薬品に関しては、通常のフェーズⅠ試験の前段階に限定的な投与量で実施される早期探索的臨床試験を含め開発初期における品質・安全性確保の要件について様々な議論が行われ、その一つとしてマイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンスも公表されている。しかし、バイオ医薬品の品質・安全性確保に求められる要件は、高分子のもつ複雑な物質特性、不安定性、品質の一定性を確保するための原薬製造工程の恒常性の重要

性、さらには、ウイルス等の感染因子に対する安全性確保など、化学薬品とは大きく異なっている。そのため、化学薬品の品質・安全性確保の手法をそのままバイオ医薬品に応用することは適切ではない。

バイオ医薬品の品質・安全性確保は、1) 頑健な製造方法の構築と工程管理法の確立、2) 製品の特性解析・非臨床試験・臨床試験・安定性試験結果などに基づいた規格及び試験方法の設定等により達成される。承認申請製品の品質・有効性・安全性確保を目指して、バイオ医薬品開発はステップバイステップで進められるものであり、開発ステージの進行とともに、製法や品質特性、安全性に関するデータが蓄積されていくものである。従って、臨床開発初期、すなわち治験開始に当たって求められるデータと承認申請データパッケージとして求められる要件は自ずと異なってくる。バイオ医薬品の臨床開発の初期段階では、製法や各種試験法が十分に確立されていないことも少なくない。しかしその一方で、前述のように抗体医薬品などでは同時に複数の候補品について開発を進めていることも多く、同時平行して開発が進められる複数の開発候補品について、承認時と同様のデータを得るには膨大なリソースと時間が必要である。このようなバイオ医薬品開発の特色を考慮したときに、臨床開発初期の段階で求められる安全性評価や、安全性を担保するための品質評価・製法等について考察することは、バイオ医薬品開発の効率化や成功率向上のためにも有用であると考えられる。

承認申請要件としてのバイオ医薬品の品質・安全性確保についてはこれまで十分に議論が重ねられているが、バイオ医薬品の臨床開発初期における品質・安全性に関する議論は十分とは言えない状況である。欧米では治験薬の品質・安全性確保に関するガイドラインの整備が進められており、我が国においてもバイオ医薬品開発推進のため、

* 治験に用いられる医薬品候補物質は薬事法上の「医薬品」ではないが、本稿では治験に用いられるものを含めてバイオ医薬品と記載する。

議論を進めることが望まれる。本稿では、臨床開発初期におけるバイオ医薬品の品質・安全性確保に関する議論の端緒として、バイオ医薬品の開発、製法と品質特性、安全性について概説した上で、製法と品質特性の観点から臨床開発初期（主としてフェーズⅠ）におけるバイオ医薬品の品質・安全性評価に関する試案を考察した。また、バイオ医薬品の早期探索的臨床試験についても考察を加えた。

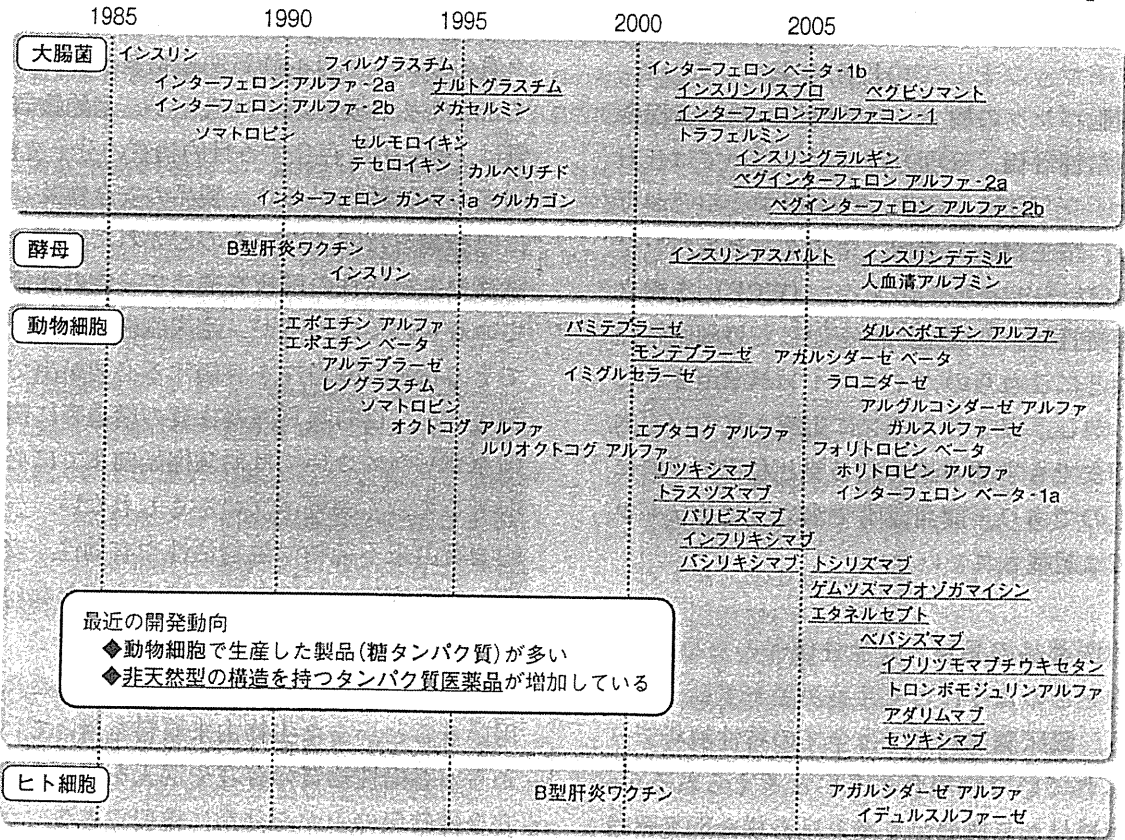
2. バイオ医薬品の開発

1980～90年代のバイオ医薬品開発では、大腸菌やCHO細胞等に目的とするタンパク質の遺伝子を導入してヒト有用タンパク質のコピーを製造する、いわゆる天然型タンパク質製品が主であった。これまでにインスリンや成長ホルモン、エリスロポエチンなど数多くの有用タンパク質が開発され、疾病治療に不可欠な存在となっている。そ

の後21世紀に入って、それまでの天然型製品に加えて、抗体医薬品や改変タンパク質医薬品など非天然型組換えタンパク質製品の開発が急速に進んできている（Fig. 1）。現在、各社のパイプラインに存在するバイオ医薬品の多くも非天然型製品であることから、今後もこのような開発傾向が続くものと推定される。

一般的にバイオ医薬品の製法開発では、遺伝子組換えにより作製した目的タンパク質発現細胞の様々なクローンから、最も生産性が高く、かつ製造期間を通じて安定した製造を行える生産細胞を選択することが行われる。従来の多くのバイオ医薬品は、有用な生物活性を持つ生体由来タンパク質を見出し、天然のタンパク質と同一の一次構造をもつ製品を大量に製造することを目指してきており、目的とするタンパク質に関してはそれほど大きな選択の幅があったわけではなかった。このような場合、より適切な翻訳後修飾やタンパク質の安定性などを考慮することはあっても、わず

Fig. 1 Approval year of biotechnological products in Japan, and cell substrates used for their production



な例外を除いて一次構造の異なる改変タンパク質製品を開発することはまれであった。

一方、現在最も活発に開発が進められている抗体医薬品や改変タンパク質医薬品では、一次構造の異なる一連の候補群から最適な製品を開発するといったストラテジーがよく取られており、このために早期に臨床試験を実施し、ヒトでの有効性や安全性に最も優れた製品を早い時期に選択することが開発を効率よく進める上で有用と考えられている。従って、本稿で考察しようとしている臨床開発初期における製品群の品質・安全性確保の合理的手法は、従来のバイオ医薬品はもとより、これから開発が進む非天然型のバイオ医薬品を効率的に開発するために重要であると言える。

2.1 バイオ医薬品の製法と品質特性

バイオ医薬品の承認申請時に必要な品質・安全性・有効性に関するデータについては、品質特性解析、非臨床試験、臨床試験に関連するICHガイドライン²⁻⁸⁾を始め様々な国内指針や基準^{9, 10)}が出されている。これらのガイドラインや基準は承認申請時ばかりでなく、バイオ医薬品開発におけるロードマップとしての役割も果たしている。例えば細胞バンクの樹立、特性解析、製造工程全体での恒常性評価、管理方法などについてはICHガイドライン (Q5A, Q5D) を参照することが可能であり、宿主細胞の選択、マスターセルバンク (MCB) /ワーキングセルバンク (WCB) を樹立した際の特性解析、製造期間を通じての細胞特性の評価などにこれらのガイドラインが準用されている。しかし、ガイドラインに記載されている内容はあくまでも承認申請時に必要となるデータに関するものであり、開発段階で求められるデータについては記載されていない。

バイオ医薬品の品質・安全性確保のためには、品質特性をどのようにとらえるかがまず第一に重要である。臨床開発初期では全ての特性解析データが得られていない場合も多いと考えられるが、複数の候補品から開発品を絞り込む様な開発戦略

をとる場合に、多くの候補品はドロップアウトしていくことになるため、全ての候補品についてどこまで品質特性を明らかにしておくべきかが製品開発の迅速化につながる重要なポイントである。以下に、バイオ医薬品の特性と臨床開発初期における品質・安全性確保において特に配慮すべき点を述べる。

化学薬品と異なり、バイオ医薬品は非常に複雑な高分子であり、目的タンパク質やその関連物質からなる不均一性を持つことから、有効成分に関しては不均一性の解析をどの程度行っておくべきかが重要なポイントとなる。抗体医薬品などの糖タンパク質製品では糖鎖の不均一性や特定の糖鎖構造が有効性や安全性に大きく影響することもあり、不均一性を含めた糖鎖構造を明らかにすることが品質特性のみならず体内動態や生物活性への影響を予測するために非常に重要である。従って、糖鎖構造が有効性・安全性に影響する製品では、開発初期においても安全性や有効性に関連する特定の構造の糖鎖の存在や存在比率を明らかにしておく必要がある。

また、バイオ医薬品の品質特性は、目的タンパク質のみならず目的物質関連物質や不純物も含めてとらえる必要がある (Fig. 2)。目的物質関連物質は、製品中に存在する目的物質の分子変化体で、同等の生物活性があり、製品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさないものとされている。非臨床試験や生物活性の解析を通じて一定の評価はされているものではあるが、臨床試験の結果を踏まえてその判断の妥当性を評価する必要が出てくる場合もある。目的物質関連物質の構造等に関する詳細なデータについては治験開始前までに必ずしも取得しておく必要はないかもしれない。一方、目的物質由来不純物は生物活性や有効性、安全性に関して目的物質に匹敵する特性を持たないものであり、含量等の評価が必要である。

さらに、バイオ医薬品は、製造に生きた細胞を用いること、また生物由来原料を用いていることから、感染性物質の存在や混入を否定することが安全性確保の上から非常に重要である。ウイルス

等の感染性物質は微量でも重大な安全性上の問題を
生じさせる可能性があることから、被験者の安全
性確保のため治験初期の製品であっても、十分
な解析を行いその存在を否定しておかなくてはな
らない。ただし、必ずしも複数のロットを用いた
検討である必要は少なく、開発初期では治験に用
いるロットについての試験が実施されていればよ
いと考えられる。また、製品の安定性に関しては、
最低限目的とする臨床開発期間での安定性を担保
するデータが得られていればよいと考えられる。

バイオ医薬品の品質・安全性確保のためには品
質特性解析のみならず、頑健性の高い製造方法の

構築と、品質の恒常性を担保するための適切な工
程管理法の確立も重要である (Fig. 3)。これは、1)
培養工程の変動が組換えタンパク質産生細胞の特
性に影響するなど、製造方法の違いにより糖鎖な
どの不均一性が大きく変化する可能性があること、
2) バイオ医薬品のような複雑な高分子製品では
ロットごとに品質特性の全てを明らかにすること
が困難であること、3) 特に、各ロットに含まれる
不純物の全てを試験することは現実的でない上、
微量でも免疫原性に影響を与える可能性があるな
どの理由による。従って、製造工程の中で特に品
質に影響を与えると考えられる重要工程では、重
要中間体を設定して工程内管理試験を行うことが

Fig. 2 Drug substance of biotechnological products

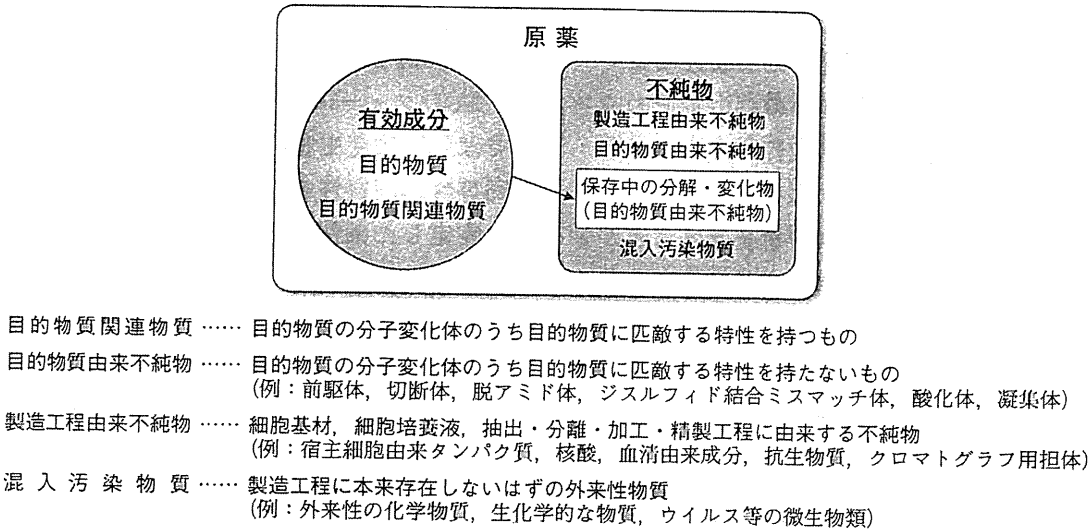
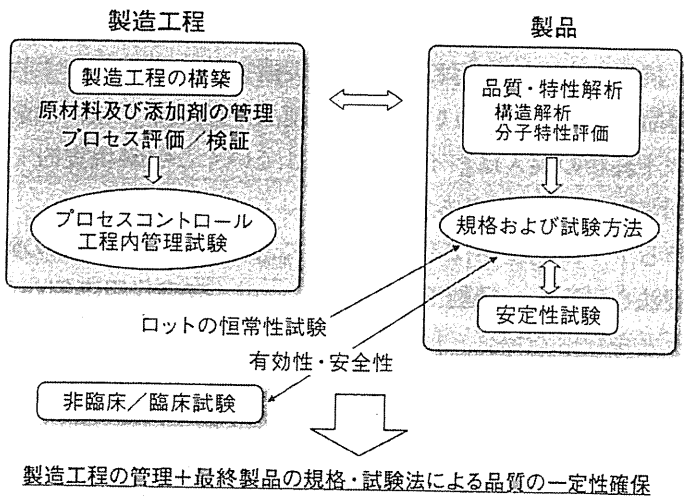


Fig. 3 Elements for ensuring product quality and consistency of biotechnological products



有用である (Fig. 3)。

ただしバイオ医薬品の品質・安全性確保に必要なこれらの要素のうち、臨床開発初期では、治験薬の製造に用いるセルバンクに関する解析データや使用する治験薬の特性解析データを取得しておくことが望ましいが、品質の恒常性に関するデータまでは必須ではないであろう。

バイオ医薬品の開発において、製造方法や関連する試験法などは、最終的に臨床効果を評価する試験を実施するまでに確定する必要があるが、開発過程では、品質の向上や生産効率改善といった様々な要因により製造工程の見直しが行われている。例えば、シアル酸の付加が体内動態に大きく影響することが知られている糖タンパク質製品では、血中半減期が想定される期間よりも短い場合に、より最適なシアル酸付加がされるようなシードセルの再選択やシアル酸付加率の高い画分のみを選択的に精製するような精製工程の変更が行われることも想定される。しかし培養工程や精製工程の変更は品質特性に大きな影響を及ぼすことがあり、例えば不純物の除去効率を改善するためのカラム工程の追加により、異なる不均一性プロファイルを持つ目的タンパク質が得られるようになる可能性もあるため注意が必要である。また、初期の臨床試験で被験者に治験薬に対する抗体の出現が見られるケースもあり、その大きな要因として宿主細胞由来タンパク質のアジュバント効果に関与していると考えられる例が知られている¹¹⁾。製法の見直し・変更により宿主細胞由来不純物を低減化することによって、抗体産生を引き起こさないようにしたとされる製品もある¹²⁾。こういったアジュバント効果を持つ不純物の混入はバイオ医薬品の安全性確保における大きな課題であり、古くから検討が行われている¹³⁾。開発途中に不純物の低減化を目的として製法を見直し、精製工程の追加や培養工程の変更などを行った場合、目的とする不純物の低減化のみを評価するだけでなく、品質特性そのものの評価が必要となる。

このようにバイオ医薬品開発の特徴として、開

発途中において製法変更等がしばしば行われることがあげられる。品質や生産効率の点で問題が生じない場合でも開発の進展に伴って製造スケールの拡大が行われるが、製造スケールの拡大により製品の品質特性が変化することもあることから、開発途中における製法変更とその影響評価はバイオ医薬品には避けられない課題である。製法変更を行った場合に、旧製法で得られた製品の品質評価や非臨床試験、臨床試験のデータを承認申請データとして用いるためには、ICH Q5E ガイドライン「生物製品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の製造工程の変更にとりまなう同等性/同質性評価」に従った新旧製品の同等性/同質性評価が必要となる (Fig. 4)。従って、製法変更や同等性/同質性評価のことも念頭に、開発ステージの進行に合わせて必要とされるデータを取得していくことが合理的と考えられる。FDA のフェーズ I 用治験薬の cGMP ガイドラインでは、製法変更を行う場合を想定し、旧製品との同等性/同質性を評価するために治験初期の製品を安定した条件で保存しておくことが望ましいとされている。

上記の点を考慮すると、臨床開発初期に求められるデータが、臨床開発後期あるいは承認申請において必要となるデータパッケージとして求められるデータとは異なることは当然と考えられる。すなわち、臨床開発の初期では、治験中の被験者の安全性確保を最優先とすることは言うまでもないが、品質の恒常性や試験法のバリデーションについては必ずしも求められないと思われる。また、製造方法の頑健性や工程管理試験などは、開発候補品が確定した後、治験の進行にともなって確立していくことが現実的であろう。

2.2 バイオ医薬品の安全性ーバイオ医薬品の有害作用事例からの考察

バイオ医薬品の投与により生じる有害作用には、有効成分に起因するものと、不純物に起因するものがある。ここでは、バイオ医薬品の有害作用の事例やバイオ医薬品に特徴的な安全性の懸念事項

についてまとめることにより、臨床開発初期における安全性確保において考慮すべき事項について考察する。

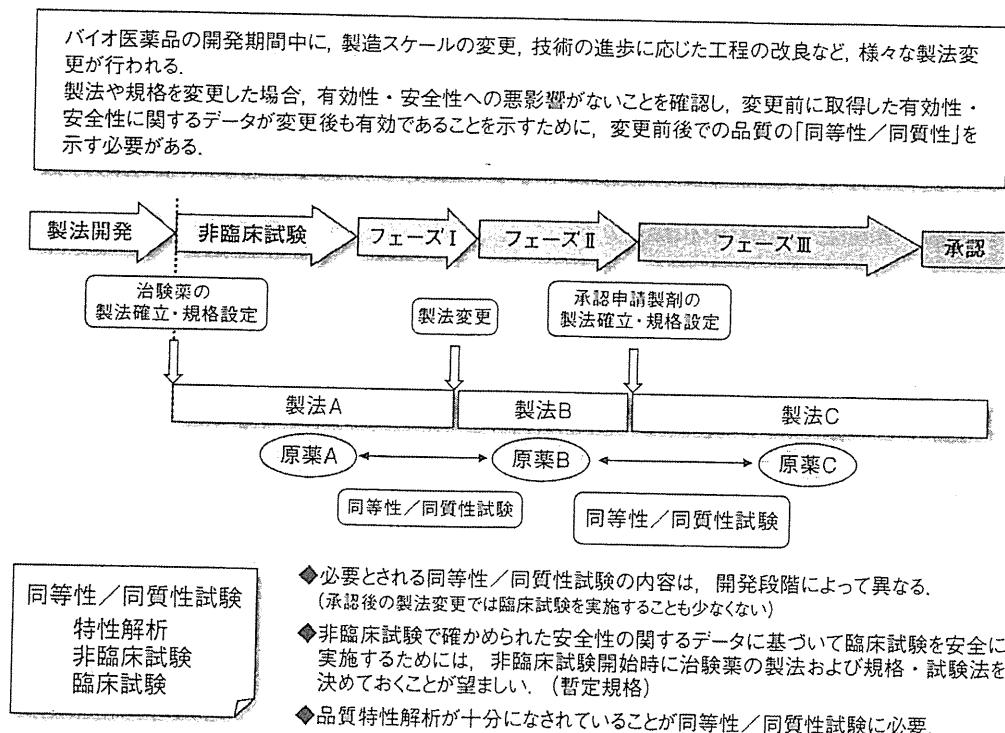
バイオ医薬品の有効成分に起因する有害作用として、1) インスリンによる低血糖やt-PAによる出血傾向、リツキシマブによるHBV再活性化に伴う劇症肝炎など、有効成分の過剰な薬理作用によるもの、2) インターフェロンによる発熱、ムロモナブ-CD3 (OKT3) によるサイトカイン放出反応のように有効成分が複数の薬理作用を持つことに起因するもの、あるいは3) TNF α 阻害薬による結核の再燃のように標的分子が複数の生理活性を持つことに起因するものなどがあげられる。このような有効成分そのものによる有害作用は、ある程度発生が避けられず、目的とする臨床効果と有害作用発生のリスクとベネフィットを勘案しながら開発を進めるか、あるいは臨床試験に当たって適切なモニタリングを行うことにより、有害作用がみられた場合にその重篤化を避けるようにするといった対応が求められている。ただし、これらの有害作用の多くはその製品開発の段階からある

程度予測されている場合が多く、予め対処が可能なケースも多い。

従って、有効成分そのものに由来する有害作用が想定されるバイオ医薬品の臨床開発に際しては特に、①有効成分について得られている様々な情報、さらには②ヒト細胞を用いた解析を含む非臨床試験などから推測されるヒトにおける標的、目的とする薬理作用、非特異的な作用などを考慮した試験デザインが求められるであろう。投与量を考える上では、臨床効果と密接に関連した生物活性を定量的に評価し得る適切な生物学的試験法が確立されていることが重要となる。

ただし、改変タンパク質医薬品や抗体医薬品では、文献等の情報が豊富にある場合は稀であり、特性解析や非臨床試験では検出できなかった作用がヒトで生じる可能性もある。特定の受容体に対する抗体医薬品を開発しようとする場合に、*in vitro*での阻害作用やノックアウト動物での文献情報等が安全性評価の参考になる場合もあると想定されるが、ヒトにおける*in vivo*での作用に関する予測性の限界や種による差異などがあることを十

Fig. 4 Process change and comparability studies during the development of biotechnological products



分に認識しておく必要がある。また、TGN1412による事故でも明らかになったように、霊長類を用いた非臨床試験のデータもヒトでの作用を予測するには不十分な場合がある。特にOKT3やTGN1412のようにアゴニスト作用を有する製品ではサイトカイン放出に起因するインフュージョン反応が起こる危険性について特に配慮が必要であろう。

さらに、有効成分のみならず不純物に起因する有害作用に注意を払う必要がある。次節(2.3)で詳しく述べるが、初期の臨床試験では投与量が限られているものの、ウイルス等の感染性因子の混入は、少量でも重大な影響を及ぼすことがあるため、安全性確保における最も重要な課題である。

また、生産基材として用いる大腸菌や酵母由来の不純物がアジュバント効果を持つことが知られており、不純物が製品の免疫原性増強に関わることがある。非天然型バイオ医薬品の場合は生体でない分子であるため免疫原性は目的物質の構造と関わる問題でもあるが、投与された医薬品に対する抗体が産生された場合、薬効の減弱という問題のみならず、生体内タンパク質との交差反応により生体内タンパク質の作用阻害が生じた場合は、重篤な有害作用につながる危険がある。既承認バイオ医薬品での経験から、組換えタンパク質の一次構造がヒトタンパク質と完全に一致していても、投与された患者にある頻度で抗体が生じることが知られている¹⁴⁾。例えばエリスロポエチン製剤では、製剤中の不純物が原因となって中和抗体が産生され、内在性のエリスロポエチンまでもが中和されて重篤な有害作用が生じた例が知られている¹⁵⁾。また、目的物質由来不純物である凝集体が存在すると抗体が生じやすいことが多くのタンパク質で報告されている¹⁶⁾。患者における医薬品に対する抗体の産生には、医薬品側の要因のみでなく、患者側の要因も関わるため複雑である。例えば、第Ⅷ因子を欠損している患者では医薬品として投与されるヒト第Ⅷ因子に対する免疫反応が生じ抗体が産生されやすい¹⁷⁾。バイオ医薬品の免疫原性評価については、2006年にEMAからガイ

ドラインが出されており、臨床開発初期での安全性確保に関連して参考にできる点も多い¹⁸⁾。

・ 医薬品の投与に伴い生じる懸念があるインフュージョン反応にも不純物が関与している場合がある。例えば、酵母を用いて生産された製品では、患者が酵母由来タンパク質に対する抗体を持っている場合にインフュージョン反応が生じる可能性がある。目的タンパク質に非ヒト型糖鎖が結合している場合に、これに対するIgEを有する患者でインフュージョン反応が生じる例も知られている¹⁹⁾。

不純物が関与する安全性上の問題を解決するには、不純物含量を一定以下にする製法を確立することが有用である。宿主細胞由来タンパク質等の不純物については混入量に関する定められた基準がないが、同一の宿主細胞を用いた製品開発の経験が参考になると思われる。宿主細胞由来DNAの混入量については、WHOのガイドラインで10 ng/doseが上限とされている¹⁹⁾。

2.3 臨床開発初期におけるバイオ医薬品の品質・安全性確保の要点と欧米における規制の動向

前節(2.2)で述べたようにバイオ医薬品の臨床開発初期段階での最も重要なポイントはウイルス等の感染性因子に対する安全性確保である。血液製剤によるHIVやHCVの感染事例を持ち出すまでもなく、ウイルスによる汚染は被験者の安全性確保に重大な影響を与えてしまう。また、感染によっては被験者の健康被害のみならず公衆衛生の観点からも重大な事態を招きかねない²⁰⁾。

ただし、これまで細胞培養技術や組換えDNA技術を用いたバイオ医薬品でウイルス感染による有害事象の報告はない。この大きな要因として、血液製剤での事故を他山の石としてバイオ医薬品の開発当初からウイルス安全性確保のために様々な取り組みが行われてきたことがあげられる。その取り組みの一つが、ICHのバイオワーキンググループにより取りまとめられたウイルス安全性ガイドライン(Q5A)に基づいた原材料や製造工程、

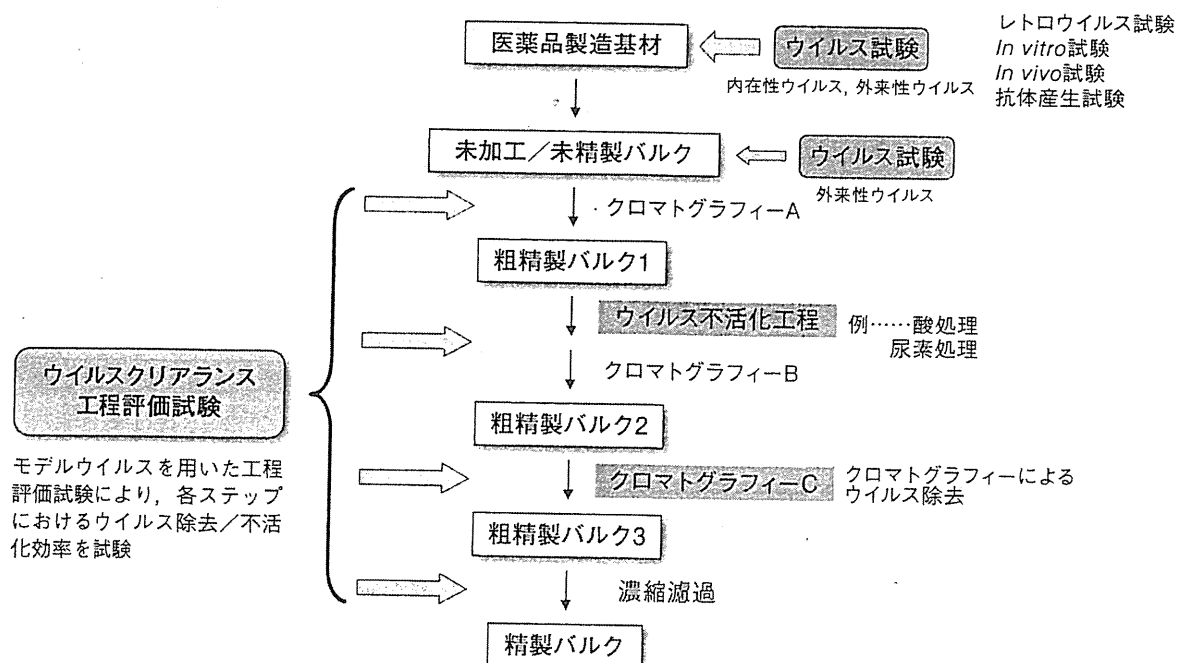
製品での試験である (Fig. 5). また我が国では、原材料のウイルス安全性確保として生物由来原料基準により上乗せの規制がかけられている。その他、日本薬局方参考情報「日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件」や関連通知等に基づく様々な取り組みにより安全性確保が図られている²¹⁾。しかしながら、求めている対策やデータが承認申請時を基準に書かれているために、臨床開発初期ステージでの要件として求めると過剰な要求になってしまう。そのため例えば、被験者の安全性確保の観点から十分と考えられる安全性確保対策を講じた上で、承認申請時に求められる複数ロットの試験や、工程評価試験法のバリデーションなど、開発ステージの進展に応じて整備していく事項に関しては、開発初期では必ずしも必要とはされないと考えて差支えないであろう。

このような観点から、開発初期において求められるウイルス安全性や他の感染性物質に対する安全性確保をまとめたのがFig. 6である。開発初期においても基本的な考え方はICH Q5Aガイドラインの記載と変わりはなく、治験に用いる製品の原材料および治験薬の製造工程の解析による安全

性評価を柱とするべきである。マスターセルバンク (MCB) や治験薬の未加工/未精製バルクのウイルス試験は必須となるであろう。ウイルスクリアランス工程評価試験に関しては、治験薬の製造工程のウイルスクリアランス能に関する評価は必要と考えられるが、臨床開発初期ではウイルスクリアランス工程評価試験法のバリデーションまでは必須とされないであろう。また、ウイルスクリアランス試験やセルバンクのウイルス試験の多くが専門の委託試験として実施されているが、適切に評価された社内データの活用も可能であろう。また未加工/未精製バルクのウイルス試験の3ロットの試験は最終的な臨床試験の開始までに行えばよいと考えられる。

その他の要素として、ウイルス試験に関して開発企業の経験等を参考にすることも有用と思われる。例えば、既承認製品と同様の工程を用いる場合には、その経験を参考にすることも可能であろう。あるいは、同一の宿主細胞を用いて生産された製品が既に承認申請されている様なケースでは、承認を受けた製品と同一宿主細胞を用いて新たな製造を行う場合に、既承認製品で実施されたウイ

Fig. 5 Virus safety evaluation for biotechnological products



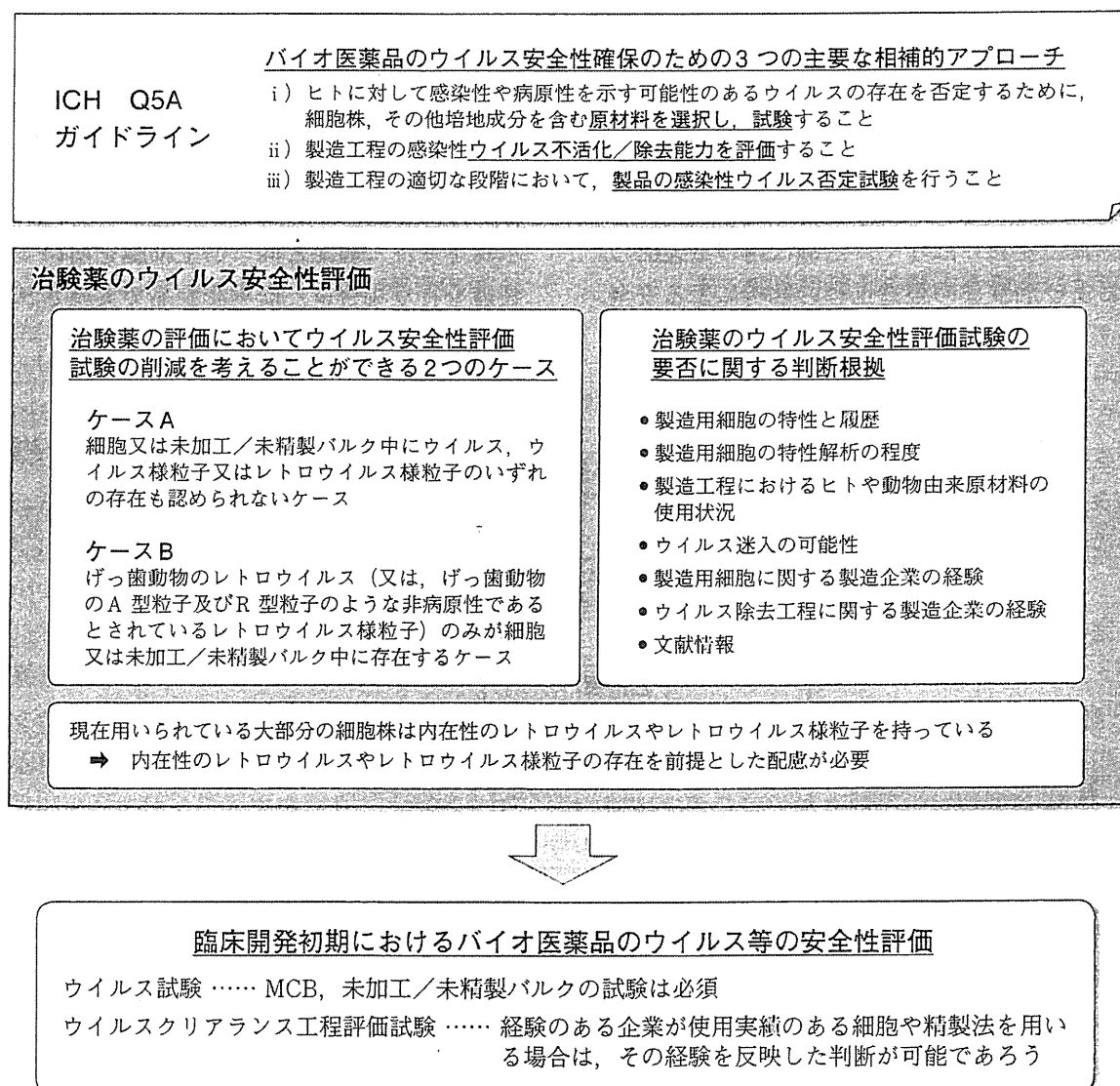
ルス安全性試験を参考とすることができるであろう。非常に頑健性のある精製工程（ウイルス除去ナノフィルトレーション等）での経験値は、他の製品の製造においても参考とすることができると考えられる。すなわち、一定の要件を満たす治験薬においては、ウイルスクリアランス工程評価試験の削減が可能なケースも想定される。

ウイルス安全性に関する要件を含め、製法関連のデータとして治験開始時に求められるデータについての試案を Table 1 に示す。セルバンクに関しては、感染性因子の他、遺伝子コピー数などの遺伝子構成体に関する試験、あるいは細胞純度や

細胞特性解析試験を実施しておくことが望ましい。ただ、細胞バンクの評価としての目的タンパク質発現の安定性試験や核型分析については、同じ細胞基材の使用経験などを参考に、臨床初期までにデータを明らかにしておくことは必ずしも必要ではないであろう。

製品の特性解析試験に関しては、目的タンパク質の構造解析、物理的・化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質（抗体が目的物質の場合は抗原等との結合特性）の解析、純度、製造工程由来不純物、目的物質由来不純物、混入汚染物質、物質質量等の解析を実施すると共に、治験開始時には暫定

Fig. 6 Virus safety evaluation for biotechnological products used in early clinical studies



値でも規格・試験法を設定しておく必要がある。マイコプラズマ、無菌、ウイルス否定試験などは必須項目と考えられる。不純物に関しては、同一の宿主細胞や類似の精製工程により製造される製品の開発を既に行っている場合、有用な参考情報とすることができる場合がある。一方、規格試験法の分析法のバリデーション、目的物質関連物質

と目的物質由来不純物の単離および特性解析、貯法および有効期間の設定などは治験開始時までに明らかにしておくことは必ずしも求められないであろう。

治験薬に関する海外のガイドラインを Table 2 に示す。FDA は、1995 年にフェーズ I 試験に用いられる治験薬に関するガイダンスを公表している。

Table 1 Process evaluation and product characterization of biotechnological products used in early clinical studies (DRAFT)

	製法関連	製品関連
治験開始までに実施すべき試験	◆セルバンク ・導入遺伝子を含むプラスミド全長の塩基配列 ・純度…<u>内在性及び外来性ウイルスに関する試験</u> - マイコプラズマ否定試験 - 他の細胞株の混入に関する試験 (MCB, WCB, CAL について検討) ・遺伝子発現構成体のコピー数、挿入と欠失、組込み部位の数 ・プラスミドの保持率 (染色体外発現の場合) ・特性解析 (アイソザイム解析等による由来する種の確認等) ◆未加工/未精製バルク：外来性ウイルス試験 ◆精製工程：ウイルスクリアランス工程評価試験 (バリデーションは含まず)	◆治験薬の特性解析 ・構造 ・物理的・化学的性質 ・生物学的性質 ・免疫化学的性質 (抗体が目的物質の場合は抗原等との結合特性) ・純度 ・製造工程由来不純物 ・目的物質由来不純物 ・混入汚染物質 ・物質量等 ◆規格・試験法を設定 (暫定値でも可)
治験開始までに必須とされない試験	◇細胞バンクの評価としての目的タンパク質発現の安定性試験や核型分析 ◇未加工/未精製バルクの 3 ロットの外来性ウイルス試験 ◇プロセスコントロール：重要工程の選定、工程内管理試験の設定等	◇規格試験法としての分析法のバリデーション ◇目的物質関連物質と目的物質由来不純物の単離および特性解析 ◇安定性：貯法および有効期間の設定

Table 2 Guidelines on quality and safety of biotechnological products used in clinical studies

	公表年	ガイドライン
FDA	1995 年	フェーズ I 臨床試験に用いられる治験薬の申請に関するガイダンス Guidance for Industry Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase 1 Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products
	2006 年	早期探索的臨床試験に関するガイダンス Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers Exploratory IND Studies
	2008 年	フェーズ I 治験薬の cGMP に関するガイダンス Guidance for Industry cGMP for Phase 1 Investigational Drugs
EMA	2007 年	ヒト初回投与臨床試験におけるリスクの同定と低減のための方策に関するガイドライン Guideline on Strategies to Identify and Mitigate Risks for First-in-Human Clinical Trials with Investigational Medicinal Products EMA/CHMP/SWP/28367/07
	2008 年	バイオ治験薬の品質に関するコンセプトペーパー Concept Paper on a Guideline on the Chemical and Pharmaceutical Quality Documentation Concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials EMA/CHMP/BWP/466097/2007
	2008 年	バイオ治験薬のウイルス安全性に関するガイドライン Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products EMA/CHMP/BWP/398498/2005

また臨床試験の早期実施に関する最近の動向を反映して、2006年には早期探索的臨床試験に関するガイダンスを公表している。これらのガイダンスでは適用範囲にバイオ医薬品が含まれているが、具体的な要件については述べられていない。また、2008年には治験薬製造のためのcGMPガイダンスも公表しているが、その中では、バイオ医薬品については特性解析のみによってバイオ医薬品の品質を規定することが困難であり、品質の担保においては製法の恒常性、頑健性が重要であることが述べられている。さらに最も重要な要件として、治験薬のウイルス安全性等の感染因子の伝播を防止する対策があげられている。

EMAでは英国で起こったTGN1412の事故を受け、ヒト初回投与臨床試験におけるリスクの同定と低減のための方策に関するガイドラインを2007年に公表した。また、2008年に治験段階でのバイオ医薬品の品質全般に関するコンセプトペーパーを公表した。治験薬に求められるウイルス安全性に関してはガイドラインの検討が先行して行われ、2006年にはガイドライン案が公表され、2008年にはその最終版が公表された。EMAのウイルス安全性に関するガイドラインは、臨床開発段階の製品についてウイルス安全性確保の要件を明らかにしようとしたものであり、開発ステージの進行とそれに伴うウイルス安全性のデータの取り扱いや、核酸増幅検査（NAT）などの新たなウイルス安全性試験の活用などについて述べられており、治験開始時まで必要とされるウイルス安全性試験データについて参考となる。

以上のように、欧米の規制当局においても、治験早期におけるバイオ医薬品の要件としては、ウイルス等の安全性確保が最も重要とされている。

3. バイオ医薬品の早期探索的臨床試験に関する一考察

化学薬品では早期探索的臨床試験の実施による臨床開発の迅速化を目指した動きが活発化しており、マイクロドーズ臨床試験に関してはガイドン

スも出されている。しかし、このような早期探索的臨床試験がバイオ医薬品に適用可能かも含めて、今後の検討が必要と考えられる。ここでは、バイオ医薬品の早期探索的臨床試験の適用により得られると考えられる情報と限界について考察すると共に、TGN1412事故の教訓も含め安全性確保について考察してみたい。

本稿の最初に述べたように、バイオ医薬品は生体成分をできる限り忠実に人工的にコピーした製品と抗体や改変タンパク質の様な非天然型の製品に分類できる（抗体医薬も自己成分に対する抗体は自己抗体産生細胞を除去する免疫制御機構により排除されることから非天然型と考えることが可能である）。天然型タンパク質製品に関しては、生体での存在量（血中濃度）や作用機構が十分に明らかにされている場合には、安全域の推定や初期投与量の設定は比較的容易であろう。

これに対して、非天然型タンパク質製品に関しては生体での作用を予測することが困難である場合が多い。特にアゴニスト作用がある場合には、ヒトでの作用予測において慎重を期すべきである。TGN1412のみならず、OKT3等でも免疫系細胞が活性化され、サイトカイン放出反応が起こる例が知られている²²⁾。非天然型製品については、天然型製品に比べ製品の生体での作用の十分な予測が難しく、臨床試験で有害作用が生じるリスクが高いといえる（Fig. 7）。当然、こういった非天然型製品の開発において非臨床試験として動物を用いた毒性試験や薬理試験が実施されるであろうが、タンパク質医薬品では種差もあり、動物での毒性や薬理作用をヒトに外挿できない場合も少なくない。霊長類を用いた試験でもヒトとの作用に差異があることがTGN1412でも報告されている²³⁾。

また、化学薬品に比べバイオ医薬品は巨大で複雑な構造を持つことから、体内動態の解析においては、試験の設定や試験によって得られた情報の解釈を慎重に行うべきである。すなわち、バイオ医薬品の体内動態を解析する場合に、そのデータの解釈に際してはタンパク質という複雑な分子を解析するという限界に注意を払う必要がある。例