

において参照すべき規制文書としては、ICH 品質ガイドラインが第一にあげられる。このうち化学合成医薬品については、ICH-Q6A が規格および試験法の設定、ICH-Q3シリーズが不純物（残留溶媒を含む）評価、ICH-Q1シリーズが安定性評価、ICH-Q4B が主要な品質一般試験法、ICH-Q2 が分析法バリデーションを扱い、原薬 GMP を扱った ICH-Q7 を含めて、開発時あるいは承認申請に当たって必要な品質面の要件の基準が示されている。これら化学合成医薬品品質ガイドランスの適用対象をみると、ICH-Q6A では小分子量化学合成ペプチドは適用可能とされているが、高分子量のペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドは適用対象から外されている。またペプチド、オリゴヌクレオチドは ICH-Q3 シリーズの適用対象から外されている。このことは、これらペプチド性医薬品あるいは核酸医薬の多くは、化学合成で製造されるものが多いとはいえ、既に準備されている化学合成医薬品ガイドラインとは別途の配慮が必要とみなされていることの反映である。一方これらの医薬品の有効成分は比較的分子量が大きく、物質的にも生体成分と共通しており、タンパク質性医薬品を中心とした生物薬品のガイドラインをベースにするという考えもあるかもしれない。しかし、生物薬品の品質ガイドラインである ICH-Q5 シリーズおよび ICH-Q6B でも、合成ペプチド及びポリペプチドや DNA を成分とする医薬品は適用対象から外されている。

このように化学合成された分子量が比較的大きいペプチド性医薬品、あるいは核酸医薬品を適用対象とした品質面での規制ガイドラインはなく、規制に当たっては個別の製品ごとの判断にゆだねられている状況にある。特に核酸医薬品については承認された製品はまだ少なく、世界を見渡しても品質評価にあたっての基本的要件をまとめた文書はみあたらない。したがって、これら先端の医薬品の開発環境を整備するという意味からも、レギュラトリーサイエンスの課題として取り上げる意義は大きい。即ちこれらの医薬品の開発経験者

と規制関係者が開発段階から情報交換を行い、開発に際して考慮が必要な要件を随時まとめておくことは、これら医薬品の臨床応用を早期に実現する上でも大きな推進力となる。

ペプチド性医薬品の品質評価は、①有効成分の生物作用がアミノ酸一次構造で一義的に決定されるのか、あるいはタンパク質性医薬品と同様に生物作用が異なるような複数の高次構造を持ちうるのか、②生体内で特別な生物作用を発現するような構造の有無、③有効成分および不純物の生物作用の種特異性の有無、および動物を用いた非臨床試験のヒト作用の予測性の有無、④免疫原性の有無、等の特性の違いによって、整理されると思われる。

一方核酸医薬品（＝オリゴヌクレオチド医薬品）の品質評価においては、アンチセンス、リボザイム、デコイ、siRNA、アプタマー等、その作用メカニズムに応じた配慮が品質評価においても必要になると思われる。またアプタマーなど高い標的特異性をもたせた医薬品については、ヒト型タンパク質性医薬品同様にヒト細胞系を用いた生物学的特性解析が品質評価においても重要になるかもしれない。また核酸医薬品の多くは、臨床応用に際しては DDS 製剤化が必要となり、DDS 製剤としての品質評価も必要となる。

以上、ペプチド性医薬品と核酸医薬品の品質評価について、筆者が要点と考えている点について触れた。これらに加えて、先端の医薬品の品質評価の重要な視点としては、ヒト初回臨床試験に先立って確認しておくべき品質特性の整理が重要であり、レギュラトリーサイエンスの格好のテーマになると思われる。視点としては、①ヒト試験の安全性確保に関わる品質特性は何か、②ヒト初回臨床試験以降、承認申請に至るまでの開発過程の中で一定性の確保を図るべき品質特性は何か、の二つがあげられる。

6. おわりに

以上、化学合成医薬品を中心に、医薬品品質分野のレギュラトリーサイエンスにおける課題例をあげ、考察を加えた。本稿にあげた課題例は筆者が個人的見解として選択したものであり、これら以外にも様々な課題がある。今後これらの課題についてレギュラトリーサイエンス学会において産官学で意見交換、情報交換が行われ、医薬品の適切な規制に結びつく成果が生まれることを期待する。

文 献

- 1) <http://www.nihs.go.jp/drug/PhForum/>
- 2) http://www.nihs.go.jp/dbcb/Biologics_forum/bioforum-9.html
- 3) <http://www.nihs.go.jp/doc/rs/index.html>
- 4) McLean R, McDonald B, The New York Times, 2007年5月6日
- 5) Kishimoto TK, et al., N Engl J Med. 2008; 358: 2457-2467
- 6) 川西 徹. 製剤機械技術ハンドブック第2版, 製剤機械技術研究会編. 2010; 943-949.
- 7) 科学技術基本計画. 平成23年8月23日閣議決定.
- 8) 医療イノベーションの進め方. 平成23年10月内閣官房医療イノベーション推進室.



バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第3回)

バイオ医薬品の不純物の評価(1)

Evaluation of impurities in biopharmaceuticals part 1

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ

SHINGO NIIMI, AKIKO ISHII-WATABE, NANA KAWASAKI

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

はじめに

原薬や製剤に含まれる不純物は、製品の有効性・安全性に関わる重要品質特性の1つである。バイオ医薬品に含まれる不純物は、目的物質由来不純物と製造工程由来不純物に大別される。製法開発の際には、適切な分析技術を用いて原材料、工程中間体、原薬、あるいは製剤に含まれる不純物の種類と量を評価し、必要に応じて精製工程の不純物クリアランス能の評価を実施する必要がある。不純物の評価は、製造方法の確立や、製剤中に含まれる不純物の量が常に許容できるレベル以下になることを保証するための管理手法の構築に必須である。本稿では、目的物質由来不純物の分析と評価について概説する。なお、製造工程由来不純物については3月号、製造工程由来不純物としてのウイルス等外来性感染性物質については4月号で取り上げる。

1. 目的物質由来不純物の分析と評価

ICH Q6Bでは、目的物質由来不純物は、「目的物質の分子変化体(例えば、前駆体、製造中や保存中に生成される分解物・変化物)で、生物活性及び有効性の点で目的物質に匹敵する特性を持たないもの」と定義されている¹⁾。製造中や保存中に生成する目的物質の変化体であっても、生物活性があり、製品の安全性および有効性に悪影響を及ぼさず、目的物質に匹敵する特性を備えている分子変異体は目的物質関連物質とよばれる。目的物質由来不純物と目的物質関連物質の評価にあたっては、

まず、製造方法や目的物質の特性を考慮し、生じる可能性のある分子変化体の有無を検証する。分子変化体の存在が認められた場合は、構造および生物活性等を可能な限り明らかにする。目的物質由来不純物と目的物質関連物質のどちらに分類されるかは、少なくとも凝集体を除き、製品ごとに生物活性、安全性、有効性の観点から検討を行い判断すべきである。目的物質由来不純物について規格及び試験法を設定する際は、原薬の保存期間および通常の取り扱い中に増加がみられるか、製造工程および保存条件や取り扱いの適切な管理により制御が可能であるか等を考慮する必要がある。目的物質由来不純物と分類される可能性のある主な分子変異体は以下の通りである。

(1) ジスルフィド結合ミスマッチ体

ジスルフィド結合は、小胞体において、シャペロンおよび分子の正確なフォールディングに関与するprotein disulfide isomeraseの補助により形成される。ジスルフィド結合の形成が不完全なとき、共有結合凝集体の形成やタンパク質のミスフォールディングが起こる可能性があるため、その有無を確認する。例えば、あるIgG1モノクローナル抗体には、V_H領域のCys22-Cys96ジスルフィド結合が形成されていない分子が混在しており、弱酸性陽イオン交換HPLCにより検出されることが報告されている。

ジスルフィド結合ミスマッチ体と思われる分子が見つかった場合は、ミスマッチ部位を解析することが望ましい。通常、システイン残基とシスチン残基の間で組換えが生じるのを防ぐために、非還元状態で存在するシステイン残基のチオール基をアルキル化する。ジスルフィド

結合ミスマッチ体および標準物質について、非還元および還元状態でペプチドマッピングを実施し、得られたペプチドマップを比較することによりミスマッチの位置を特定する。

ジスルフィド結合ミスマッチ体が認められることが多いのは、IgG型の抗体医薬品である。あるIgG分子では、ジスルフィド結合のミスマッチにより抗原との親和性が低下し、結果的に活性が低下することが報告されている。IgG2ではヒンジ部のジスルフィド結合と可変部のジスルフィド結合は交換されやすく、ミスマッチ体を生じやすい。また、IgG4のヒンジ領域のH鎖間のジスルフィド結合は、他のサブクラスと比較して解離しやすいので、H鎖1分子L鎖1分子からなる二本鎖型を生じる可能性がある。

(2) メチオニン酸化体

タンパク質を構成するアミノ酸残基の中で、最も酸化されやすいものはメチオニン残基であり、メチオニンは酸化されて主にメチオニンスルホキシドになる(図1)。メチオニン残基酸化体と非酸化体は、弱酸性陽イオン交換HPLCにより、分離可能な場合がある。また、酸化されたメチオニン残基は、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより同定できる。

メチオニン酸化物の生成は、酸化剤の存在、保存中の光の曝露、および温度上昇等により影響される。添加剤であるポリソルベートから自動酸化により生じたフリーラジカルが²⁾、酸化剤としてメチオニン酸化を促進させた例や、ヒト化抗HER2モノクローナル抗体のFc領域のメチオニン残基が、強い光の曝露および温度の上昇によ

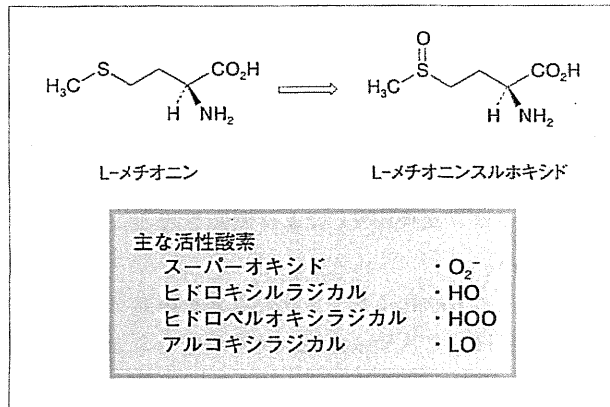


図1 メチオニンの酸化およびメチオニンの酸化に係わる一般的な活性酸素

り酸化された例が報告されている。

酸化体を目的物質由来不純物あるいは目的物質関連物質のどちらとして扱うべきかは、意図的に酸化体を作製し、生物活性等の変化を調べて判断する。メチオニン残基が酸化されることにより、高次構造が変化し、安定性の低下や生物活性の低下が引き起こされた例が報告されている。例えば、組換えヒトレプチンでは、1および69番目のメチオニン残基の酸化により、熱安定性が低下し、*in vitro*の生物活性が低下する。また、ヒト化およびヒトモノクローナル抗体では、メチオニン残基の酸化により、C_H2領域がプロテアーゼに切断されやすくなることが報告されている。

(3) 糖化体

糖化体とは、グルコースが非酵素的にタンパク質に付加したものである。グルコースのアルデヒド基が、タンパク質のN末端アミノ基やリシン残基のεアミノ基と Schiff塩基を形成した後、1,2-エミナールを経てアマドリ化合物を生成する(図2)。糖化体は、酵素結合ボロン酸免疫アッセイで定量可能であり、ボロン酸アフィニティークロマトグラフィーにより分離できる。また、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより、糖化されたアミノ酸残基を特定できる。

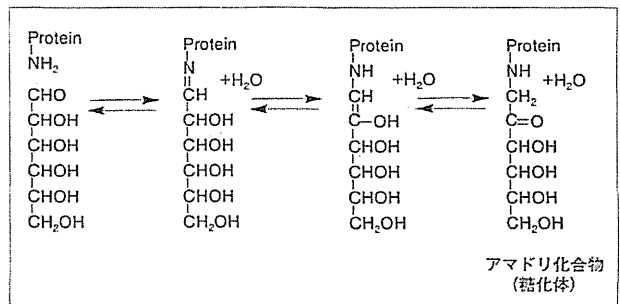


図2 糖化反応経路

(4) アスパラギンの脱アミド化、およびアスパラギン酸の異性化

アスパラギン残基の脱アミド化、およびアスパラギン酸の異性化は、非酵素的に起きる。アスパラギンはスクシンイミド中間体を経て、アスパラギン酸あるいはイソアスパラギン酸に変換される(脱アミド化)。L-アスパラギン酸も同様にスクシンイミド中間体を経て、イソアスパラギン酸またはD-アスパラギン酸に異性化する可

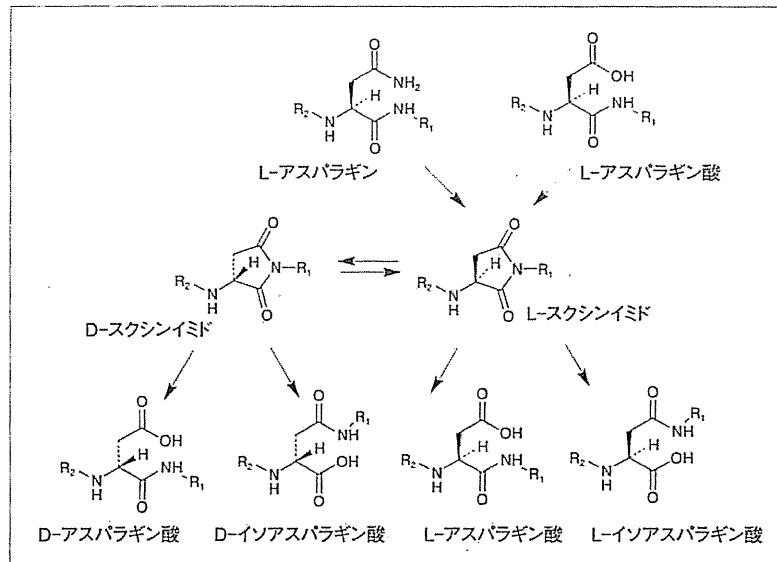


図3 アスパラギンの脱アミド化, およびアスパラギン酸の異性化²⁾

能性がある(図3)。保存温度が上昇すると、これらの反応が顕著に増加することが知られている。アスパラギン残基がアスパラギン酸残基やイソアスパラギン酸残基に変換されることによって、生物活性が低下する場合がある。例えば、可溶性CD4は、52番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に転換されることにより、活性が約60%低下する。可溶性IL-1受容体タイプIIは、317番目のイソアスパラギン酸残基への異性化により、活性が約30%低下する。また、ヒト化抗HER2モノクローナル抗体のCDR-L1の102番目のアスパラギン酸残基がイソアスパラギン酸残基へ変換されると、活性が12~30%に低下することが報告されている。

脱アミド体やイソアスパラギン酸残基へ変換された異性体と未変化体は疎水性相互作用HPLCにより、また、脱アミド体と未変化体は陽イオン交換HPLCにより分離可能な場合がある。イソアスパラギン酸はメチル化アッセイにより定量できる。脱アミド化されたアスパラギン残基、およびイソアスパラギン酸残基に変換されたアスパラギン残基の位置は、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより決定することができる。アスパラギン酸残基から変換されたイソアスパラギン酸残基の位置は、イソアスパラギン酸を消化できないAsp-Nを用いて得られた消化物のLC/MSによって確認する。

脱アミド体およびイソアスパラギン酸残基へ変換された分子変異体が目的物質由来不純物であるのか、または目的物質関連物質であるかは、例えば温度ストレスをか

けることによって意図的に作製した分子変化体の生物活性を測定し、判断できる場合がある。

(5) 切断体

切断体とは、目的物質の一部がプロテアーゼまたは熱ストレス等により切断されたものである。C末端アミノ酸残基がカルボキシペプチダーゼにより部分的にプロセッシングを受ける例は多く知られている。抗体医薬品のH鎖C末端リシン残基のように、C末端がプロセッシングされても、予想されたタンパク質と同程度の活性を持つ場合、目的物質として扱うことが多い。切断されることにより、活性等が変わる場合は、目的物質由来不純物として取り扱う。切断体はSDS-PAGEにより分離検出できる場合が多い。ただし、得られた各バンドのタンパク質含量と染色強度は比例しない場合があるので、切断体の相対含量を正確に求められないことに留意する。他にLC/MS、サイズ排除HPLC (SEC)、およびキャピラリー電気泳動などを用いて解析した例がある。切断体の構造は、MS等により可能な限り明らかにする。

(6) 電荷の異なる物質

混在する可能性のある目的物質不純物を予想できないとき、イオン交換HPLCにより酸性成分、主に目的物質を含む成分、塩基性成分に分け、酸性および塩基性成分に含まれる分子種の構造を解析するのも一考である。例えば、抗体医薬品の場合、酸性領域には切断体(Fab,

Fab欠損体)、糖化体、脱アミド体、シアリル体等が、また、塩基性領域には酸化体、凝集体等が含まれる可能性がある。

(7) 糖鎖非付加体

糖鎖付加体と非付加体はSDSキャピラリー電気泳動により分離できる場合がある。糖鎖非付加体が目的物質由来不純物であるのか、または目的物質関連物質であるかは、例えば、糖鎖をペプチド-N-グリコシダーゼF等の処理により遊離させ、遊離前後で活性等を多方面から比較することにより判断する。例えば、抗体医薬品においては、標的分子に対する作用の差異だけでなく抗体依存性細胞傷害活性および補体依存性細胞傷害活性に対する影響についても解析する必要がある。

(8) 凝集体

凝集体は免疫原性の原因となる可能性が懸念されるため、目的物質由来不純物として取り扱う。製造工程において、凝集体形成に関与する因子として、温度、培養(タンパク質発現)、アンフォールディング/リフォールディング操作、精製、凍結融解、撹拌およびせん断、ろ過工程における加圧、乾燥等が考えられる。保存中に凝集体形成を促進する因子として、温度、光、容器/栓等があげられる。容器/栓においては特に、浸出する可能性のある金属、抗酸化剤、可塑剤、潤滑剤およびそれらの分解物等が凝集体形成に影響する可能性があることに留意する。溶液に関する因子としては、pH、緩衝液とその濃度、賦形剤、タンパク質の濃度等があげられる。

凝集体は粒子径によりsubmicron (0.1~1 μm)、sub-visible (1~100 μm)、visible (≥100 μm)に大きく分けられる。日本薬局方の注射剤の不溶性微粒子試験では、10 μmおよび25 μm以上の凝集体を含む微粒子については限度値が設定されている。また、凝集体は通常原薬および製剤においてSECによる試験法が設定されている。しかしながら、SECの排除限界は約40 nmであり、それ以上の凝集体の測定は困難である。したがって、約40 nmから10 μmの凝集体に関しては事実上規定されていないことになる。現在、免疫原性を有する可能性が懸念されるこのような粒子径の凝集体をどのように管理および評価するかが、世界的検討課題となっている^{5,6)}。

FDAは、市販ロット、安定性試験ロット、および臨床試験ロットに含まれる凝集体について、①少なくとも

2種類の分析法を用いてsubvisible particleの量と大きさを定量する、②複数のストレス条件を用いてsubvisible particleの形成されやすさを評価する、などの評価戦略を推奨している⁷⁾。凝集体評価のため、特に、subvisible particleを質的および量的に解析できる手法の開発が急務である。

凝集体測定法として、SEC、超遠心分析法、流動場分離法、SDS-PAGE、動的光散乱法、マイクロ・フロー・イメージングなどがある⁸⁾。現在、どの方法を組み合わせれば凝集体を最適に測定できるかについては、いまだ世界的に統一的な結論は得られていない。また、特性解析か、工程管理試験もしくは規格及び試験法に用いるかによっても適した方法は異なるとと思われる。以下に分析法の特徴をまとめる。装置の価格を比べると、SECはカラムを手持ちのHPLC装置に接続するだけなので比較的 lowコストであるが、その他の装置はかなり高額である。

SECは、凝集体測定法として広く用いられているが、①分離中にサンプルが希釈されることにより、凝集体の解離および樹脂への吸着が生じ、凝集体のサイズや含量が実際より小さく評価される可能性がある、②検出器にUVを用いた場合、ダイナミックレンジが狭いため、相対含量の低い凝集体が検出されない可能性がある(静的光散乱を用いることにより広範囲測定が可能になる)、③分子量の測定には標準物質を用いた補正曲線が必要である(動的光散乱を用いることにより標準物質は不要となる)、④測定できる粒子径の上限は約40 nmであり、抗体医薬品の場合、三量体以上の凝集体を分離できない、などの短所がある。

超遠心分析法は、沈降係数に基づいて分離する方法である。分子量の測定に標準物質を用いた補正曲線は不要であり、最大約800 nmの粒子径を有する凝集体まで高い分離能で分子量を測定できるため、標準的な方法として用いられている。しかし、①正確に分子量を測定するにはタンパク質濃度を低くする必要があり、希釈の過程で凝集体が解離する可能性がある。②沈降速度法では2~6時間、沈降平衡法では一晩遠心する必要があり、ハイスループットな方法ではない。③熟練した技術者が必要であり、データの解析は容易ではない。④感度は比較的 low、凝集体の定量限界は抗体医薬品の場合、1~2%である。

流動場分離法は拡散係数に基づいて分離する方法である。不溶性の凝集体も含め最大約10 μmの粒子径を有す

る凝集体を、SECとほぼ同程度の分離能で定量できる。しかし、①サンプル注入時におけるサンプルの希釈により凝集体が解離する可能性がある、②最適な条件の設定が困難である、などの課題も残っている。

SDS-PAGEによる凝集体の解析では、還元および非還元の状態で行うことにより、非共有結合とジスルフィド結合を介した共有結合の凝集体を区別できるとされているが、非共有結合の凝集体はSDS化により解離する可能性もある。さまざまな大きさの凝集体を高い分離能で検出できるが、分離可能な分子サイズの上限はSECとほぼ同じである。また、定量的な解析は困難である。

動的分散法は、液体中の粒子がブラウン運動により拡散する速度を計測することにより粒子径およびその分布を測定するものである。不溶性の凝集体も含め最大約5 μm の粒子径を有する凝集体を簡単な操作で測定可能であり、測定時間も約数分と短い。ダイナミックレンジが他の試験法に比べて広く、希釈せず測定できるので、

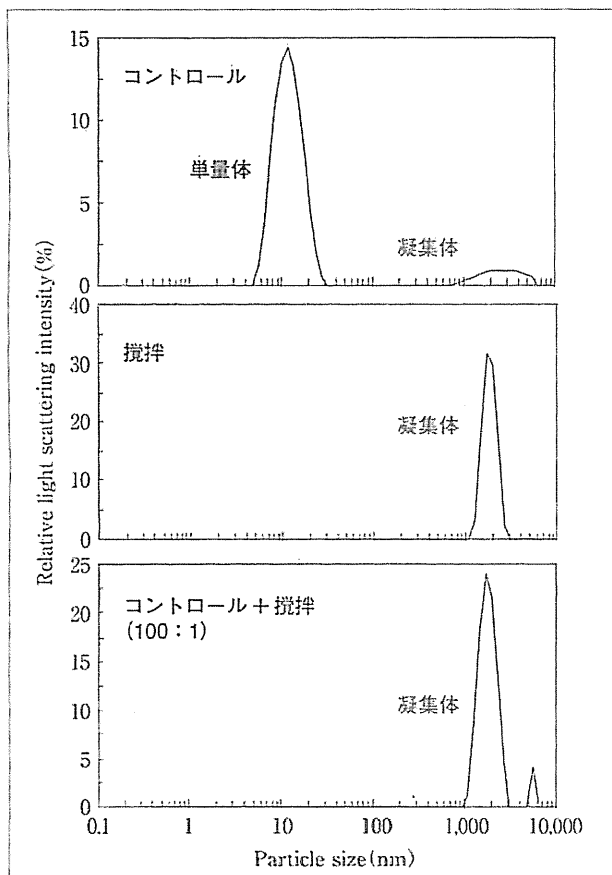


図4 動的分散によるヒト化モノクローナル抗体製剤の凝集体の測定
測定装置、Malvern社のZetasizer Nano-ZS

凝集体の解離を回避することができる。シグナル強度は粒子径に比例して増大するので、高分子量の凝集体の検出ほど有用である。しかし、①定量的な測定は困難である、②分離能は超遠心分析法およびSECよりも劣り、単量体と二量体の明瞭な分離は困難である、③タンパク質以外の微粒子の存在により測定が妨害される場合がある、および④粒子径は必ずしも分子量と比例しない場合があり、形状により影響を受ける、などの問題もある。

マイクロ・フロー・イメージングは映像として凝集体を測定する方法であり、1~400 μm の粒子径を有する凝集体の濃度、大きさ、形状を測定できる。最も大きな特徴は、タンパク質の凝集体と非タンパク質性の粒子を識別できることである。また、形状に関する情報が入手できるなどの利点を有する一方で、①一部の粒子しか解析できない、②分離度は超遠心分離法よりも劣る、および③膨大な情報が得られるので、解析が必ずしも容易ではない、などの短所も持つ。

ヒト化モノクローナル抗体製剤の凝集体の測定を動的分散法およびSECにより試みた例について示す。動的分散法で未処理の試料を測定したとき、抗体の約90%が粒子径約13nmの単量体として検出されたのに対し、攪

研究開発・生産を支援する総合技術力 医薬品関連分析はTRCにお任せ下さい。

生物医薬品の特性：不純物

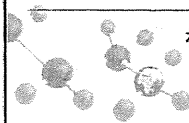
- 製造工程由来不純物
 - a) 細胞基材由来 (イムノアッセイ、ハイブリダイゼーション等)
 - b) 細胞培養液由来 (LC/MS, GC/MS等)
 - c) 細胞培養以降の工程での不純物
- 目的物質由来不純物
 - a) 切断体 (HPLC, SDS-PAGE, ペプチドマッピング等)
 - b) 分子変異体 (キャピラリー電気泳動, MS, CD等)
 - c) 凝集体 (SEC, キャピラリー電気泳動等)

原薬、製剤中不純物

- 有機不純物 (HPLC, GC等)
- 残留溶媒 (GC, GC/MS等)
- 金属不純物 (局方試験, ICP-AES, ICP-MS)
- 分解生成物 (構造解析: NMR, MS等)

生体試料中の薬物濃度測定

- TK/PK測定 (低分子・バイオ医薬品)
分析法開発, 分析法バリデーション, 検体測定
医薬品医療機器総合機構 GLP適合性調査 評価A取得 (2010年12月)
- LC-MS/MSおよびELISA, ECL等による微量定量分析



株式会社東レリサーチセンター・医薬営業部
http://www.toray-research.co.jp
〒103-0022 東京都中央区日本橋室町3-1-8
TEL:03-3245-5666 FAX:03-3245-5804

DM資料請求カード№67

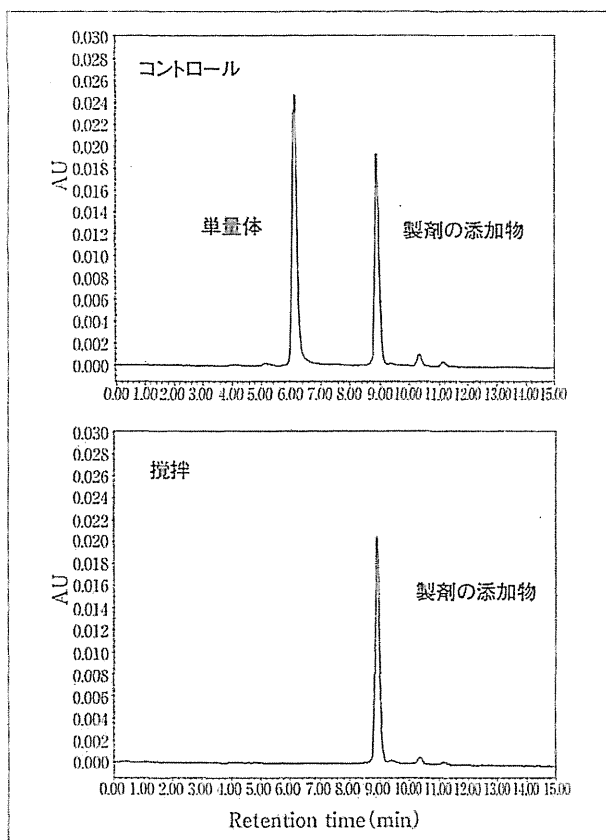


図5 SEC-HPLCによるヒト化モノクローナル抗体製剤の凝集体の測定
測定装置: ウォータース社のACQUITY BEH200, SEC, 1.7 μ mカラム

拌処理後は粒子径約1,900nmの凝集体しか検出されなかった(図4)。同一サンプルをSECにより測定した結果、未処理の試料では抗体のほとんどが6.2分に分子量約14万の単量体として検出されたのに対し、攪拌処理後の試料ではピークが検出されなかった(図5)。本結果は、動的光散乱により検出された粒子径1,900nmの凝集体は、SECでは測定できないことを示している。恐らく粒子径が大きすぎるため、カラムを通過できなかったことが原因と考えられる。また、未処理の試料と攪拌処理後の試料を100対1で混合し、動的光散乱により測定した結果、粒子径約1,800nmの凝集体は検出されたが、単量体は検出されなかった(図4)。本結果は、粒子径約1,800nmの凝集体は粒子径約13nmの単量体と比較して、少なくとも100倍以上高い感度で測定できることを示したものであり、凝集体を管理する方法としても適していることを示唆している。

おわりに

本稿では、バイオ医薬品の目的物質由来不純物の分析と評価について、実例を紹介しながら概説した。バイオ医薬品の原薬や製剤に含まれる目的物質由来不純物は、製品の有効性・安全性に関わる重要な品質特性の一つである。有効性および安全性確保の観点から許容できる目的物質由来不純物のレベルは、個々の製品および投与量等に依存しており一律に規定できない場合もある。その場合、最終的に非臨床試験・臨床試験の結果から判断せざるをえない。近年、分析技術の発達により高精度・高感度で目的物質由来不純物を測定することが可能となっている。目的物質由来不純物の適切な分析による評価は、有効で安全なバイオ医薬品の患者への提供に貢献するだけでなく、初回ヒト投与臨床試験の安全性確保にも極めて重要である。

参考文献

- 1) 平成13年5月1日医薬審発第571号生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について(ICH Q6Bガイドライン)
- 2) Donbrow, M., Azaz, E., Pillersdorf, A.: Autoxidation of polysorbates. *J. Pharm. Sci.*, **67**(12), 1676-1681(1978)
- 3) Shimizu, T., Matsuoka, Y., Shirasawa, T.: Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(9), 1590-1596(2005)
- 4) Rosenberg, A.S.: Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.*, **8**(3), E501-507(2006)
- 5) Carpenter, J.F., Randolph, T.W., Jiskoot, W., Crommelin, D.J., Middaugh, C.R., Winter, G., Fan, Y.K., Kirshner, S., Verthelyi, D., Kolzowski, S., Clouse, K.A., Swann, P.G., Rosenberg, A., Cherny, B.: Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: gaps that may compromise product quality. *J. Pharm. Sci.*, **98**(4), 1202-1205(2009)
- 6) Singh, S.K., Afonina, N., Awwad, M., Bechtold-Peters, K., Blue, J.T., Chou, D., Cromwell, M., Krause, H.J., Mahler, H.C., Meyer, B.K., Narhi, L., Nesta, D.P., Spitznagel, T.: An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics. *J. Pharm. Sci.*, **99**(8), 3302-21(2010)
- 7) Cherny, B.: Current Regulatory Considerations for the Assessment of Sub-Visible Particles, WCBP CMC Strategy Forum. A Practical Approach to the Analysis and Immunogenic Potential of Aggregates and Particles(2011.1)
- 8) den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., Jiskoot, W.: Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm. Res.*, **28**(4), 920-933(2010)

バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第4回)

バイオ医薬品の不純物の評価(2)

Evaluation of impurities in biopharmaceuticals part 2

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ

SHINGO NIIMI, AKIKO ISHII-WATABE, NANA KAWASAKI

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

はじめに

原薬や製剤に含まれる不純物は、製品の有効性・安全性に関わる重要品質特性の1つである。バイオ医薬品に含まれる不純物は、目的物質由来不純物と製造工程由来不純物に大別される。製法開発の際には、適切な分析技術を用いて原材料、工程中間体、原薬、あるいは製剤に含まれる不純物の種類と量を評価し、必要に応じて精製工程の不純物クリアランス能の評価を実施する必要がある。不純物の評価は、製造方法の確立や、製剤中に含まれる不純物の量が常に許容できるレベル以下になることを保証するための管理手法の構築に必須である。本稿では、製造工程由来不純物の分析と評価について概説する。なお、製造工程由来不純物としてのウイルス等外来性感染性物質については、次号で取り上げる。

1. 製造工程由来不純物の分析と評価

製造工程由来不純物は、①細胞基材に由来するもの、②細胞培養液に由来するもの、ならびに③細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものの3つに分類される(表1)。また、製造工程中で迷入する微生物類等の混入汚染物質も、広義には製造工程由来不純物と位置付けられる。

製造工程由来不純物の評価では、まず、原薬や製剤中に残存あるいは混入する可能性がある不純物を考え、測定項目を決定する(図1)。宿主細胞の種類や精製方法によらず評価対象となる製造工程由来不純物には、宿主細胞由来タンパク質(host cell protein, HCP)、および宿主細胞由来DNAがある。その他の代表的な製造工程由来不純物としては、培地に添加されるインスリンやメトト

表1 製造工程由来不純物の例

由来	不純物の例
細胞基材	HCP 核酸(例: 宿主ゲノム由来, ベクター由来, 総DNA)
細胞培養液	培地成分 添加物(例: インスリン, トランスフェリン, MTX) 血清由来成分(例: アルブミン) 抗生物質(例: テトラサイクリン, ゲンタマイシン) 細胞からの分泌物
抽出・分離・ 加工・精製工程	酵素 化学的・生化学的試薬(例: 臭化シアン, グアニジン, 酸化剤, 還元剤) 無機塩(例: 重金属, ヒ素, 非金属イオン) 溶媒 クロマトグラフ用担体 アフィニティークロマトグラフ用担体のリガンド(例: モノクローナル抗体, プロテインA) その他の漏出物

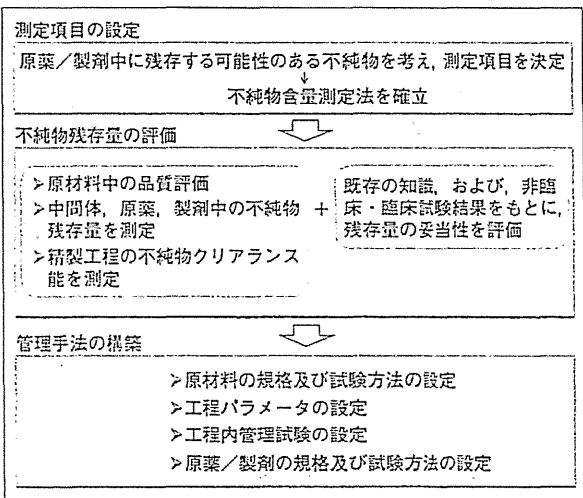


図1 製造工程由来不純物の評価の流れ

レキサート (Methotrexate, MTX), 抗体医薬品の製造工程でアフィニティーカラム担体用のリガンドとして用いられるプロテインA等があげられる。免疫反応の促進を含め、薬理作用を示す可能性のある不純物や、免疫原性を有する可能性のある不純物については、残存量の評価と管理に特に注意が必要である。

(1) 製造工程由来不純物の分析法

製造工程由来不純物の分析法は、定量試験あるいは限度試験として適切にバリデーションされていることが重要であり、検出限界が残存許容量以下であることが確認されている必要がある^{1,2)}。バイオ医薬品の不純物評価に汎用されるエンドトキシン試験、無菌試験、および微生物限度試験については、日本薬局方に一般試験法として収載されている。日本薬局方の試験法を用いる場合、バリデーションは不要である。以下に、代表的な製造工程由来不純物として、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来DNA、プロテインA、ならびにその他の主要な不純物の分析法を紹介する。

① HCP

HCPは、それ自身が免疫原となる可能性や、免疫応答を促進することが懸念される不純物である³⁻⁵⁾。しかしながら、最終製品においてHCPを完全に除去することは、現在の精製技術では極めて困難である。HCPの残存量に関する公式な許容値はないが、これまでに承認されているバイオ医薬品では、1~100ppmの場合が多い⁶⁾。しかし、HCP残存の安全性への影響は、宿主細胞の種類やHCPを構成するタンパク質の種類に加え、製品の用法用量によっても異なると考えられることから、製品ごとに許容値を設定する必要がある。例えば、組換え成長ホルモン (growth hormone, GH) であるソマトロピンのバイオ後続品Omnitrope[®]の最初の治験では、患者の最大60%で非中和抗GH抗体が産生され、患者のすべてで抗HCP抗体の産生が誘導された。その後、HCPをさらに除去することにより、抗GH抗体陽性患者の割合は他のGH製剤で報告されている程度に改善された。この場合、HCPは免疫原となるとともにアジュバントとして作用し、GHに対する抗体の産生誘導を促進したものである。

HCPの定量には、抗HCP抗体を用いたイムノアッセイが用いられる。Enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) が一般的であり、特殊な例として、HCP結合免疫リガンドアッセイなども用いられる。後者はビオチン標識した抗HCP抗体とフルオレセイン標識した抗HCP抗体を利用したサンドイッチイムノアッセイであり、ウレアーゼ標識した抗フルオレセイン抗体を2次抗体として用いる。結合した2次抗体の量は、ウレアーゼによる尿素の加水分解により生じるpH変化を光活性電位センサーで検出することにより測定する。大腸菌のHCPを定量したある報告では、ELISAでは、室内再現精度が9%、真度が91%、下限の定量限界が12.5ng/mL、測定範囲が12.5~200ng/mLであり、HCP結合免疫リガンドアッセイでは、室内再現精度が10%、真度が101%、下限の定量限界が5.0ng/mL、測定範囲が5.0~40ng/mLであった。

HCP定量では、広範なタンパク質性不純物を検出することが重要であり、試験に用いるポリクローナル抗体の調製にはさまざまな配慮が必要である。動物に免疫するHCPとしては、目的物質をコードする遺伝子を欠く細胞基材を生産培養と同様に培養した培養液から調製した試料、あるいは、培養液から目的物質と同様の精製工程により部分精製した試料を用いる場合が考えられる。前者あるいは後者を抗原として得られた抗HCP抗体を用いたHCPの測定系は、それぞれ、Multiproduct immunoassayあるいはProduct-specific immunoassayとよばれる⁶⁾。細胞培養液には分泌タンパク質だけでなく細胞内タンパク質も含まれる場合もあるので、細胞は実生産を想定して培養する。可能な限り、HCP以外のタンパク質を含まないよう培養することも重要である。しかし、細胞の増殖および維持にタンパク質因子が必要な場合は、HCPを抗タンパク質性因子抗体アフィニティーカラムで精製することも考慮する必要がある。部分精製した試料を用いる場合は、精製工程を経るにつれ、評価すべきHCPの種類も変わってくるので、どの段階まで精製した試料を動物に免疫するかは、回収率を考慮しケースバイケースで判断する。精製工程を変更した場合は、変更後の工程を取り入れて調製したHCPを抗原として得られた抗HCP抗体を調製し、新たにHCP定量法を構築する必要がある。抗HCP抗体が調製できていない段階では、市販の抗HCP抗体を用いることがあるかもしれないが、抗HCP抗体の調製に用いたHCP分子種の違いにより、独自に調製した抗HCP抗体を用いた場合よりもHCP値が低く測定される場合があることに

注意する。用いた抗HCP抗体が、原薬に含まれるHCPを偏りなく検出できていることを示すために、HCPの電気泳動後のタンパク質染色像とウエスタンブロッティング結果の比較が有用である。

抗HCP抗体の調製に際しては、タンパク質の種類により動物における抗体の産生されやすさが異なることも、考慮すべき事項の1つである。例えば、動物にHCPを免疫後、ある程度初期の段階で誘導された抗HCP抗体を用いてアフィニティーカラムを作製し、アフィニティーカラムを素通りしたHCP画分を再度免疫原として用いることにより、幅広いHCPに対する抗体が得られる可能性がある。また、一般的に低分子量のHCPに対する抗体は産生されにくいいため、試験に適した抗HCP抗体を得るためには、SECにより分取した低分子量画分を免疫原として用いることが有用な場合もあるかもしれない。

HCP残存と製品の安全性との関連については、HCP画分に含まれるタンパク質のヒトタンパク質との相同性、および生物学的活性の点から考える必要がある。動物細胞由来HCPのように、ヒトタンパク質との相同性が比較的高いHCPに関しては、製剤投与後に生物活性を示す可能性や、抗HCP抗体が産生されて生体内ヒトタンパク質に交差反応し、標的となったヒトタンパク質の機能に影響を及ぼす可能性が否定できない。一方、ヒトタンパク質との相同性が低い大腸菌等に由来するHCPでは、抗HCP抗体の産生が起こりやすいため、繰り返した投与時の過敏症発現に関わる可能性がある。

どのような種類のHCPが生物学的活性を有するかについては不明の点が多いが、サイトカインおよびケモカインファミリー、ヒートショックプロテインはその候補かもしれない。最近のゲノム配列の報告によると、ヒトとマウスで全遺伝子の約80%が相同性を有することが明らかになっている。また、CHO K1細胞では13,374種類の遺伝子がヒトと共通している。したがって、理論的には非ヒト哺乳類細胞由来のHCPがヒトに投与された場合に機能し、安全性に影響する可能性がある。

②宿主細胞由来DNA

樹立された動物由来細胞株(Continuous cell line)に由来するDNAに関しては、残余の宿主DNAが腫瘍原性を有する可能性が懸念されていた。しかし、宿主細胞由来DNAが腫瘍原性を示すリスクは、ウイルスゲノムを導

入してワクチンを生産するような場合を除いて、過去に懸念されていたよりはるかに低く、WHOではDNAは一般的な不純物として分類できるとの議論もなされている⁷⁾。実際、これまでに、残存DNAによる発がんや感染はヒトでは報告されていない⁸⁾。WHOからは、宿主細胞由来DNAの限度値として10ng/doseという数値が示されている⁹⁾。ただし、この値は腫瘍原性のリスクがより低いと考えられる微生物、二倍体細胞、初代培養細胞には適用されない。二倍体細胞、初代培養細胞については、適切なバリデーションのデータが得られていれば、原薬を対象とした規格及び試験方法を設定してDNA残存量が許容値以下であることを示す必要は必ずしもないと筆者は考える。微生物由来DNAにおいてCpG配列が免疫原性増強効果を持つという報告もあり、残存許容量は製品に応じて設定すべきである。

DNAの検出法としては、感度の点から、ハイブリダイゼーション法、DNA結合免疫リガンドアッセイ、定量的PCRが適しているとされている^{8,10)}。その他に、蛍光色素であるPicoGreenなどを二重鎖DNAに挿入させ検出する方法も利用されている。検出可能なDNA量は、ハイブリダイゼーション法では6pg、DNA結合免疫リ

ベルテック社
クリーンルーム用製品
DEC-AHOL®-WFI 70% (70% IPA)
STER-AHOL®-WFI 70% (70% 変性エタノール)



特徴

- GMPに基く製造設備
- USP 注射用水(WFI)で希釈
- 0.2µmフィルター透過
- ダブルバッグ包装
- γ線照射滅菌済
- 各種証明書をLot#毎に発行
- 納品毎に添付
(分析試験・無菌性試験
γ線照射・LAL Test)
- 豊富なバリデーションデータ



試供品あります。

その他、様々な滅菌・消毒・洗浄剤や器材消耗品、モニタリングシステム等の製品がラインナップ化されています。

カタログのご請求、お問合せは下記までお願いします。

テクノケミカル 株式会社

〒113-0021 東京都文京区本駒込 1-27-9
TEL: 03-3947-7310 FAX: 03-3947-7306

HP: www.technochemical.com
E-mail: info@technochemical.com

DM資料請求カード№63

グンドアッセイでは3pg, 定量的PCRでは1pg以下, PicoGreenを用いた方法では5pgとされる。宿主細胞由来DNAは, 異なる塩基配列を持つDNA断片の集合体であるため, 設定した方法により被験試料中のDNA量を適切に評価できていることを示す必要がある。また, 試料中のタンパク質の消化やDNAの抽出等の前処理が必要な場合は, 添加回収実験によりDNAの回収率を確認し, 前処理方法の妥当性を示す。DNA結合免疫リグンドアッセイを除き, 標準DNAは, 宿主細胞を製品と同様に培養して調製し, アガロースゲル電気泳動によりサイズを確認しておく。

ハイブリダイゼーション法では, 宿主細胞から調製したDNAをプローブ作製用鋳型とする。配列非特異的な方法であるが, 宿主細胞DNAに特異的である。ハイブリダイゼーション法は, 頑健性及精度が十分でないとする報告もある。検出されるのは50bp以上のDNAである。

DNA結合免疫リグンドアッセイは, ビオチン標識した一本鎖DNA結合タンパク質およびウレアーゼ標識した抗一本鎖DNA抗体を利用したイムノアッセイであり, 原理はHCP結合免疫リグンドアッセイと同じである¹⁴⁾。本アッセイは, 真度が優れているとされる。配列非依存的な方法であり, 原薬を得るまでの工程あるいは測定の際の操作中に混入された宿主細胞以外のDNAも検出されることに注意が必要である。また, 検出されるのは600bp以上のDNAであり, 80bp以下のDNAにより反応が阻害されることにも注意が必要である。

定量的PCR法では, 精製工程における宿主細胞のゲノム由来の総DNAの除去を反映できると考えられる特定の遺伝子領域を増幅することにより定量する。増幅されるDNAフラグメントは150bp以上とすることが推奨されている。選択したプライマーの妥当性について, 増幅された遺伝子産物の塩基配列と予測される塩基配列を比較することにより検証する必要がある。宿主細胞として樹立された動物由来細胞株を用いる場合は, 最終的な特定のDNAの除去率とWHOが推奨している宿主細胞由来DNAの限度値である10ng/doseとの関連を示すことが望ましいと筆者は考える。本法はハイブリダイゼーション法と比較して定量的検出限界と頑健性が改善され, 低濃度DNA測定の精度が高いとされる。今後, 宿主細胞由来DNAの定量において定量的PCR法の利用は増加することが予測される。

③プロテインA

プロテインAをリグンドとするアフィニティークロマトグラフィーでは, 目的物質の溶出の際に, 一部のプロテインAが目的物質とともに溶出されることがあるため, その後の工程では, 製造工程由来不純物としての評価が必要である。プロテインA残存に伴うリスクとしては, 異種タンパク質であるプロテインAに対する免疫応答が起る可能性や, プロテインAがサイトカイン受容体を活性化して炎症反応を惹起する可能性等が考えられる。

プロテインAの評価には抗プロテインA抗体を用いたELISAが用いられる。プロテインAは目的物質である抗体と高い親和性を有するため, 共存する目的物質による反応阻害に注意が必要である。界面活性剤やキレート試薬, あるいは酸性溶液を用いた前処理によりプロテインAを目的物質と解離させて測定する方法が報告されている。

④その他の主要な不純物

MTXは, 免疫定量法, 逆相HPLC等により定量できる。ゲンタマイシンは, ELISA, 免疫定量法等により定量できる。ウシ血清アルブミンやインスリン等タンパク質は, ELISAにより測定できる。免疫定量法として, 蛍光偏光免疫測定法を使用する人が多い。

蛍光偏光免疫測定法の原理について, MTXの測定を例に説明する。MTXを蛍光標識したものはフリーで存在すると, 溶液中で活発な回転運動を行っているため, 偏光励起光(485nm)を当てて生じる蛍光の偏光度は小さくなる。一方, 抗MTX抗体と結合した蛍光標識MTXは分子量が大きいため溶液中での回転運動が抑制され, 偏光励起光を当てて生じる蛍光の偏光度は大きくなる。試料中のMTXと蛍光標識MTXは抗MTX抗体に対し競合するため, 既知濃度の標準液の蛍光偏光度から標準曲線を作成し, 試料の蛍光偏光度を測定することにより試料中のMTX濃度を求めることができる。測定したい物質に対応した各種キットが市販されている。

(2) 製造工程由来不純物の評価に関する考え方

製造工程由来不純物の評価では, 原薬や製剤中に残存あるいは混入する可能性がある不純物を考え, 測定項目を決定し, これをもとに, (1)原材料の評価, (2)工程中間体や原薬あるいは製剤中の不純物の評価, および, (3)精製工程の不純物クリアランス能の評価を実施する

(図1)。(1)原材料の評価は、製造工程に持ち込まれる不純物に関する管理のために必須であり、原材料についても必要に応じて規格及び試験方法を設定する。原薬あるいは製剤に混入する可能性のある各不純物は、(2)工程中間体や原薬あるいは製剤中の不純物の評価、および、(3)精製工程の不純物クリアランス能の評価の結果をもとに、①工程パラメータ、②工程内管理試験、③原薬あるいは製剤の規格及び試験方法、のいずれかにより管理されることになる。不純物について必ずしも原薬あるいは製剤の規格及び試験方法が必要でないことは、ICH Q6Bガイドライン¹⁾にも明記されており、不純物のうち、効果的な工程管理により許容できるレベル内に収まっていることを適切な方法によって実証していれば、原薬や製剤を対象とする規格及び試験方法に含めなくてもよい場合がある。

残存する不純物の量が安全性確保の観点から許容できるレベルであるか否かについては、非臨床・臨床試験結果および既承認製品での経験や文献・ガイドラインの情報等の既存の知識を基に考える。例えば、構造が既知の不純物は、既知の毒性情報と原薬および製剤中残存量から評価が可能である。また、構造が同定できないHCPのような不純物についても、目的物質の構造や製造工程が類似した既承認製品に関して蓄積された知識を活用して、評価が可能な場合も考えられるかもしれない。不純物評価の結果、不純物残存量が恒常的に許容量以下になっていないと考えられた場合は、製造方法を改良し、不純物残存量を低減化する必要がある。

①原材料の評価

精製や修飾工程で用いられる試薬・試液類は、目的を達成した後は、それ自身が製造工程由来不純物となり得る。PEG化試薬に含まれる残留溶媒の評価のように、各試薬・試液の受け入れ試験においても必要に応じて不純物評価を実施する。

②工程中間体、原薬、製剤における不純物の評価

原薬や製剤のみならず、工程中の中間体についても被験試料に含め、適切な分析技術を用いて不純物含量の評価を行う。製造工程のどの段階の試料を用いて評価を実施すべきか否かは、不純物の種類によって異なる。例えば、培地成分のように、除去された後に総量が増加する可能性のない不純物に関しては、工程のある段階で恒常

的に残存許容量以下になることが示されれば、それ以降の工程中間体や原薬での評価は不要である。一方、エンドトキシンや微生物のように、製造工程の最終段階まで混入の可能性を考えなければならないものについては、原薬や製剤を対象とした評価が必要となる。

③精製工程の不純物クリアランス能の評価

不純物の管理手法を考える際には、原材料、中間体、原薬、製剤中の不純物量測定その他、実験室スケールでの添加回収実験等による不純物クリアランス試験が有用な場合がある。不純物クリアランス試験は、不純物の除去効率に影響する工程パラメータの特定や、求められる不純物除去効率を達成し得る工程パラメータの範囲設定による製造工程の最適化の検討のためにも利用される。また、不純物クリアランス試験の結果が、不純物について規格値を設定しない根拠にできることもある。

④製造工程由来不純物の評価の実例

バイオ医薬品原薬の開発過程において評価対象とされた製造工程由来不純物の種類、および選択された不純物管理手法に関する実例として、医薬品医療機器総合機構から公表されている審査報告書の中から、関連する情報を抜粋したものを表2に示す。審査報告書の記載が実際に実施された不純物評価のすべてではないと考えられるが、不純物の管理手法が個々の製品に応じて選択されていることがわかる。

エンドトキシンは、大腸菌を宿主とする場合は細胞基材に由来する製造工程由来不純物として、それ以外の場合も混入汚染物質として、製剤中の混入量を管理する必要がある。表2は原薬に関するものであるが、大腸菌を宿主とする製品以外においても、原薬を対象としてエンドトキシンの混入を評価・管理しているケースが多いことがわかる。バイオ医薬品では、製剤で新たに評価が必要となる製造工程由来不純物として想定されるものはあまりなく、審査報告書の実例においても、規格及び試験方法としてエンドトキシンと無菌試験がほぼすべての製品で設定されているのみである。

表2 製造工程由来不純物評価項目と管理手法選択の例(審査報告書からの抜粋)

製造工程	目的物質	原薬 製造工程由来不純物の管理		
宿主細胞	基原	工程での恒常的な除去の実証	工程内管理試験の設定	原薬の規格試験の設定
大腸菌	成長ホルモン		精製工程 エンドトキシン バイオバーデン	HCP 宿主細胞由来DNA 残留溶媒(アセトニトリル) 尿素 エンドトキシン
	PEG化成長ホルモンアナログ		PEG化前の中間体 総DNA量 HCP エンドトキシン 微生物限度試験	エンドトキシン 微生物限度試験
	副甲状腺ホルモン[1-34]	宿主細胞由来DNA エンドトキシン トリプシン DHFRフラグメント テトラサイクリン アセトニトリル 残留金属 残留陽イオン 残留陰イオン グリシン		大腸菌由来ポリペプチド
酵母	尿酸オキシダーゼ	宿主細胞由来DNA		HCP バイオバーデン エンドトキシン
	HPVワクチン	宿主細胞由来DNA HCP 脂質 炭水化物		エンドトキシン 無菌
動物細胞 (CHO細胞)	リソソーム酵素	DNA グリセロール ■セファロース ■キレートセファロース		HCP エンドトキシン
	血液凝固第IX因子	宿主細胞由来不純物 HCP 宿主細胞由来DNA PACE-SOL ProFIX 培地由来不純物 PVA MTX インスリン ビタミンK1 ヒドロコルチゾン ブトレシン セレン 精製工程由来不純物 イミダゾール 銅イオン EDTA	培養工程 微生物限度 マイコプラズマ 外來性ウイルス	エンドトキシン 微生物限度試験
	ヒト化抗VEGF抗体	HCP DNA MTX ゲンタマイシン インスリン 培地成分 残留溶媒 プロテインA		エンドトキシン
	CTLA4-Fc融合タンパク質	MTX インスリン		HCP DNA Protein A MCP-1様タンパク質 重金属 遊離チオール エンドトキシン 微生物限度試験

おわりに

本稿では、バイオ医薬品の製造工程由来不純物の分析と評価について、事例を紹介しながら概説した。バイオ医薬品の原薬や製剤に含まれる製造工程由来不純物は、製品の安全性に関わる重要な品質特性の1つである。安全性確保の観点から許容できる不純物のレベルは、個々の製品および投与量等に依存しており一律に規定できない場合もある。その場合は、最終的に非臨床試験・臨床試験の結果から判断せざるを得ない。近年、分析技術の発達により高精度・高感度で不純物を測定することが可能となっている。バイオ医薬品の製造工程由来不純物の適切な分析による評価は、有効で安全なバイオ医薬品の患者への提供に貢献するだけでなく、初回ヒト投与臨床試験の安全性確保にも極めて重要である。

参考文献

- 1) 平成7年7月20日 薬審第755号 分析法バリデーションに関するテキスト(実施項目)について(ICH Q2Aガイドライン)
- 2) 平成9年10月28日 医薬審第338号 分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について(ICH Q2Bガイドライン)

- 3) CPMP position statement on host cell proteins (HCP) impurities, routine testing versus validation studies. 1997 [cited; Available from : HYPERLINK "http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003322.pdf" http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003322.pdf]
- 4) Wang, X., Hunter A. K., Mozier N. M.: Host cell proteins in biologics development: identification, quantification and risk assessment, *Biotechnol bioeng.*, 103(3), 446-58(2009)
- 5) Huang, L. Y., Dumontelle J. L., Zolodz M., Deora A., Mozier N. M., Golding B.: Use of toll-like receptor assays to detect and identify microbial contaminants in biological products, *Clin microbiol.*, 47(11), 3427-34(2009)
- 6) Champion, K., Madden, H., Dougherty, J., Shacter, E.: Defining your product profile and maintaining control over It, Part 2, *BioProcess International.*, 3(8), 52-7(2005)
- 7) WHO Expert Committee on Biological Standardization: Highlights of the 46th meeting, October 1996, in *WHO Weekly Epidemiological Record.*, 72, 141-145(1997)
- 8) United States Pharmacopoeia, General Information <1130>Nucleic acid-based techniques-Approaches for detecting trace nucleic acids (residual DNA testing), *WHO Technical Report Series.*, 878, 19-56(1998)
- 9) Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J.: WHO study group on cell substrates for production of biologics, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007, *Biologicals.*, 36(3), 203-211(2008)
- 10) http://www.nihonmdc.com/pages/reagents/thresh_dna.html

直打用賦形薬

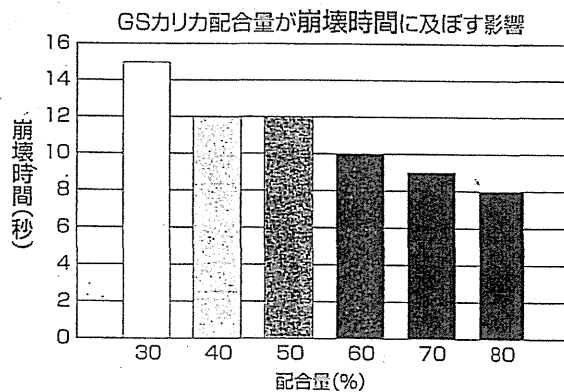
無水リン酸水素カルシウムGS (GSカリカ)

特長

- 崩壊時間——“極めて早い崩壊”(速崩壊)
- 混合均一性——良好
- 直打——連続打錠可能
- 小型の錠剤——可能
- JP/USP/EP——3局対応

錠剤1錠中(200mg)の成分	
成分名	割合(%)
アセトアミノフェン	5
GSカリカ	30 40 50 60 70 80
結晶セルロース	61 51 41 31 21 11
クロスカルメロースナトリウム	3
ステアリン酸マグネシウム	1

打錠条件:φ8 200mg錠 打錠圧力:10KN



コメント: GSカリカ30%配合処方で崩壊時間15秒の早い崩壊を示す。GSカリカ配合量の増加に伴い、崩壊時間はより短くなる。



協和化学工業株式会社

東京都中央区日本橋室町 3-4-7 TEL.03-6202-3011

DM資料請求カード№12

特集 (バイオリジクス)

**バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題
ーバイオ医薬品の開発, 製造, 及び臨床試験の
安全性確保における特性理解の重要性ー**

**The Recent Topic of the Quality and Safety
of Biopharmaceuticals**

**-Importance of Understanding the Properties and Characteristics
of Novel Biopharmaceuticals from Development
through Manufacturing and Safety Clinical Trials-**

中澤 志織, 橋井 則貴, 鈴木 琢雄, 多田 稔,
石井 明子, 川崎 ナナ*

Shiori NAKAZAWA, Noritaka HASHII, Takuo SUZUKI, Minoru TADA,
Akiko ISHII and Nana KAWASAKI

Abstract

Biopharmaceuticals are of great clinical importance and have become powerful therapeutic agents for hepatitis, diabetes, some blood disorders, and cancers. The continuing development of novel biopharmaceuticals is expected to provide new treatments for a number of diseases for which there is currently no cure, and to improve patient quality of life. Regulatory authorities have announced ICH guidelines and draft guidelines for the development of biopharmaceuticals, such as S6(R1) and Q11, as well as draft guidance on requirements for the use of materials in first-in-human administration (FIH). The draft Q11 indicates that an understanding of the properties or characteristics of new substances is crucial for identifying critical quality attributes for process development and control strategies. S6(R1) and draft guidance on FIH recommend sufficient characterization of new biopharmaceuticals that possess novel structures, multiple functions, and molecular-targeting properties for safety in clinical trial. There is a great need for the development of methods with which to characterize new biopharmaceuticals from development through manufacturing, and to predict their modes of action and safety appropriately.

抄 録

バイオ医薬品は、肝炎、糖尿病、及びある種の血液関連疾患やがん領域において標準的治療薬となっており、その医療上の重要性は増す一方である。治療法のない疾患への新たな治療法の提供やQOLの向上を目的として、新規な医薬品開発への期待はさらに高まっている。規制側からも、ICH Q11案、ICH S6(R1)案、並びに「治験対象医薬品ヒト初回投与試験の安全性に関するガイダンス (FIH) 案」などが立て続けに示された。Q11案では、重要品質特性を特定するために、徹底した特性解析が重要であること、また、S6(R1)案及びFIH案においても、新規な分子構造、複合型機能、及び高い分子標的性を有するバイオ医薬品及びその被験薬の安全性確保には、特性への十分な理解が不可欠であることが示された。新規なバイオ医薬品の研究開発から生産に至る過程において、作用機構と安全性の予測につながる新たな特性解析法の開発の必要性が高まっている。

Key words: biopharmaceuticals, quality, safety, critical quality attributes characterization

1. はじめに

バイオ医薬品は、糖尿病、肝炎、及びある種の血液関連疾患やがん治療における標準的治療薬となっており、医療上の重要性は増す一方である。さらに最近では、標準的治療法のない疾患への新たな治療法の提供、投与間隔の延長、及び毒性の低減を目的として、様々な改変・修飾・融合型タンパク質、糖鎖改変タンパク質、及び細胞毒性が高い低分子化合物の分子標的性を高めた薬物結合抗体など、新規な医薬品が次々と開発されており、バイオ医薬品への期待は高まるばかりである。

規制側からも平成22年から23年にかけて、「ICH Q11 (原薬の開発と製造に関するガイドライン) 案」¹⁾、「ICH S6(R1) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価に関するガイドライン案」²⁾、並びに「治験対象医薬品ヒト初回投与試験の安全性に関するガイダンス (案)」³⁾などが立て続けに示された。いずれもパブコメを終了し、現在、議論が深められているところである。これらは、品質管理、非臨床安全性評価、及び臨床試験の安全性確保に関するガイドラインで、適用される開発ステージが異なっている。しかし、いずれも新規な分子構造、複合型機能、並びに高い分子標的性を有するバイオ医薬品の開発において、製品の特性を十分に理解することが重要であることを示している。本稿では、これらのガイド

ライン案における特性解析の位置づけと重要性を概説するとともに、バイオ医薬品の品質・安全性確保に対する我々の取り組みを紹介する。

2. 品質管理における特性解析の重要性

ICH Q11案は、「より進んだアプローチ」すなわちクオリティバイデザイン (QbD) に基づく原薬の開発と製造に対する考え方を示したガイドライン案で、化学薬品だけでなくバイオ医薬品も対象とされている。ICH Q11案の特徴は、バイオ医薬品原薬においても、重要品質特性 (Critical quality attribute; CQA) を早期に特定し、CQA に基づく製造工程開発とライフサイクル全般に適用できる管理戦略を構築すべきとしていることである。CQA とは、有効性・安全性を確保するために、適切な限度内、範囲内、また分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質であり、製造工程/管理手法を開発するための要となる。

バイオ医薬品に共通のCQAとして、目的物質由来不純物であり、免疫原性との関連性が指摘されている凝集体、製造工程由来不純物である宿主由来タンパク質やDNA、並びに外来性感染性物質であるウイルス、プリオン、マイコプラズマ及び細菌などが挙げられるだろう。医薬品や製造方法ごとにCQAとなり得る品質特性として、例えば抗体医薬品の場合、N末端ピログルタミン酸、

C末端 Lys 残基の有無、脱アミド体、Met 残基酸化体及びグルコース付加体などの分子変体体、糖鎖、ジスルフィド結合、製造工程由来不純物プロテインAなどが考えられる。また、インスリン類縁体では多量体安定性が、PEG 化サイトカインや薬物結合抗体では、修飾分子の結合位置と結合数なども CQA の候補となるかもしれない。これらの CQA 候補が、CQA であるか否かは、徹底した特性解析、安定性試験、非臨床試験、及び臨床試験結果に基づいて判断され、開発ステージが進むにつれ見直されるとされている。

しかし、バイオ医薬品は構造が複雑で不均一な分子の集合体であり、長い複雑な工程を経て製造されるので、CQA 候補はあまりにも多く複雑で、特定は容易ではないだろう。また、デザインスペース⁴⁾を設定するためには、CQA が適切と想定される限度内、範囲内、また分布内にあるロットを多数用意し、有効性・安全性への影響を検証する必要がある。このとき、臨床試験により検証することは合理性に欠け、動物の使用も、3R (Reduce, Refine, Replace) の原則に準じて最小限にすべきである。製法によって特性が変動しやすいバイオ医薬品の製造・管理において、ICH Q11が示す方向性、すなわち CQA に基づきデザインスペースを設定し、ライフサイクル全般に適用できる管理戦略を構築することは魅力的に映る。しかし、それを実行に移すためには、特性解析法、とりわけ有効成分の体内動態 (Pharmacokinetics)、及び薬力学 (Pharmacodynamics) を考慮し、体内動態制御や薬理作用に関連する生体分子との相互作用に着目した薬理作用・安全性予測法の開発が不可欠であろう。

3. 安全性確保における特性解析の重要性

バイオ医薬品による有害反応は、薬理作用の過剰発現や、未知の薬理作用に関連した変化によるものであることが多い。被験薬の主薬理的作用及び副次的薬理作用に関する知見は、ヒトでの安全性を推測する上でも重要である。多くのバイオ医

薬品は高い種特異性を示すため、薬理試験においても³⁾、毒性試験においても⁵⁾、ヒトに類似した反応性を示す適切な動物種を選択することが肝要である。非臨床試験の実施にあたっては、適切な動物種を選択するためだけでなく、ヒトと動物間の薬理作用や毒性の差異を推定するために、バイオ被験薬の生物学的性質を十分に理解しておく必要がある。特に、細胞を用いて、薬理作用標的及び受容体への結合親和性、及び占有率、効果の持続時間及び用量-反応関係を検討することは有用である^{2,3)}。また、薬理学的反応性が適切でない動物種を用いた毒性試験からは、誤った結論が導かれる可能性があるため、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験により、被験薬の安全性を評価することが奨励されている^{2,3)}。融合タンパク質など複合型機能を有する被験薬に対しては、それぞれの機能を評価するのに適した複数の試験を実施する必要があるだろう。このように、種特異性の高いバイオ医薬品の開発では、薬理作用や安全性評価のための試験計画の設定や試験の妥当性の判定、あるいは安全性に対する直接的な評価として、有効成分の特性解析の重要性が高まっている。

4. 薬理作用・安全性予測を指向した特性解析法の開発

新規な構造、複合型機能、及び高い特異性を有するバイオ医薬品の被験薬の安全性、並びに市販後製品の有効性・安全性を確保するため、薬理作用と安全性の予測を見据えた新たな評価系の確立をめざす我々の取り組みを紹介する。

4.1 インスリンアナログ製剤の多量体安定性評価と体内動態予測

インスリンは、21個のアミノ酸残基からなるA鎖と30個のアミノ酸残基からなるB鎖からなる2本鎖タンパク質で、皮下注射用製剤中では主に六量体を形成している。投与後に皮下組織で希釈され、四量体、二量体を経て単量体に解離し、毛細血管内に吸収されその作用を発現する。イン

表1 ヒトインスリン及びそのアナログ製剤

型	アナログ	作用発現時間	作用持続時間	分子量	pI	製剤の pH
速攻型	ヒトインスリン	30-60分	4-12時間	5807.57	5.4	7.0-7.8
超速効型	リスプロ	5-15分	4-6時間	5807.57	5.65	7.0-7.8
	グルリジン	5-15分	1-2.5時間	5822.58	5.1	7.0-7.8
持効型	グラルギン	2-4時間	20-24時間	6062.89	6.7	3.5-4.5
	デテミル	2時間*	6-24時間*	5916.82		7.20-7.60
中間型	NPH	2-4時間	10-16時間	5807.57		7.0-7.5
	NPL	1-2時間	10-16時間	5807.57		7.0-7.8

*用量依存

スリンの多量体安定性は、作用の発現時間と持続時間を左右することから、CQA の一つに位置づけられるべき特性である。

患者の血糖値を適切に保つために、作用時間の異なる様々なインスリンアナログやインスリン製剤が開発・販売されている(表1)。超速効型のインスリン リスプロ(リスプロ)、インスリン グルリジン(グルリジン)はいずれも、多量体安定性が低下するよう一次構造が改変されたアナログである。中間型イソフェンインスリン(NPH)及び中性プロタミンリスプロ(NPL)は、インスリン類に六量体構造を安定化する塩基性タンパク質プロタミンを加えた製剤である。持効型インスリン グラルギン(グラルギン)は、皮下投与後に凝集体を形成することにより、血管への吸収が遅延されたアナログであり、インスリン デテミル(デテミル)は、多量体安定性とは異なる機構、すなわち、ミリストイル化により皮下組織や血中での血清アルブミンとの結合を促し、毛細血管への吸収や遊離を抑えたアナログである。多量体安定性は、作用時間の異なるアナログ製剤の設計に利用されているが、現在のところ、製剤中の多量体安定性は実験動物を用いた生物活性から推測しているにすぎない。

多量体安定性の評価

タンパク質の主鎖アミド水素やアミノ酸側鎖官能基の水素は、常に溶媒中の水素と交換してい

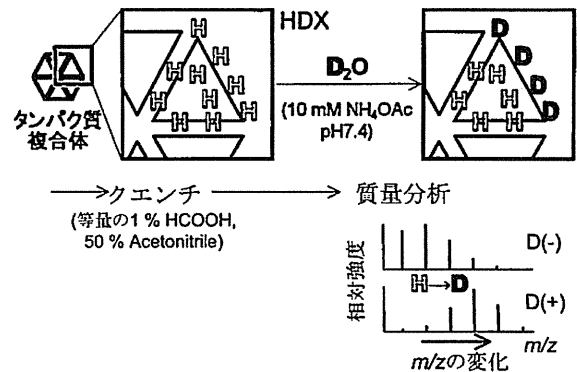


図1 HDX/MSによる多量体安定性解析の概要

タンパク質溶液を重水溶媒(中性)で希釈してHDX反応を行った後、酸を加えて反応を抑制した後、質量を測定する。タンパク質側鎖と末端アミノ酸の-OH、-NH₂、-SH、-COOH、-CONH₂など低いpKa値を持つ水素原子は、酸性条件下でも比較的高い交換反応性を保つため、逆交換反応により重水素を失った状態で観測される。一方、タンパク質主鎖アミド結合の水素と交換した重水素は、そのまま観測される。アルキル鎖やベンゼン環は容易にはHDX反応を起こさない。

る。同一官能基内では、分子内・分子間相互作用に関与しない水素原子ほど、速やかに交換される。交換される水素の数は高次構造の柔軟さや、溶媒からのアクセスのしやすさを反映するので、単量体は多量体よりも、より多くの水素を交換すると予想される。多量体タンパク質を重水に溶解すると、多量体安定性に依存して重水素が取り込まれ、その数はタンパク質の質量の変化として検出される(図1、水素/重水素交換質量分析法、HDX/MS)⁶⁻⁸⁾。表1の各種インスリンアナログ製剤についてHDX/MSを行い、取り込まれた重水

素数を時間ごとにプロットすると、図2の通りとなった⁹⁾。ヒトインスリンに比して、リスプロとグルリジンは、より速く・より多くの重水素を取り込み、中間型製剤のNPHとNPL、並びに持効型のグラルギンは重水素取り込みが遅く、取り込み数も少なかった。多量体形成とは異なる機序を利用した持効型デテミルの交換反応性は、ヒトインスリンと同程度であった。HDX反応性により、多量体安定性を評価することが可能となった。

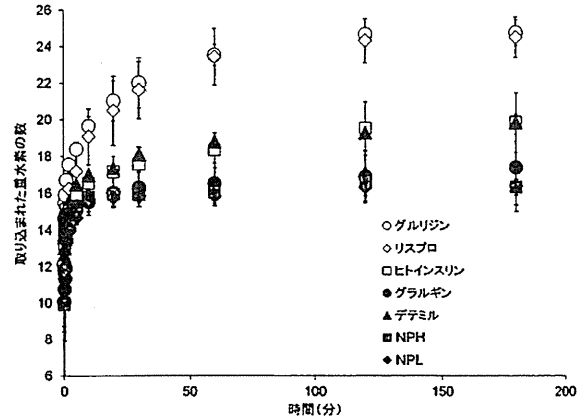


図2 インスリンアナログ製剤のHDX反応性
各製剤原液を9倍容量の重水溶媒と混合して氷上でHDX反応を行った後、反応液と同容量の1%ギ酸/50%アセトニトリルで反応を抑制させた後、MSにより質量を測定した。
分析条件：トラップカラム，C18トラップカラム；溶媒，0.1%ギ酸，50%アセトニトリル；MS装置，LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific)；流速，50μl/分。

速度論的評価に基づく体内動態予測

HDX反応による重水素の取り込みは一般に、擬一次反応で表すことができる¹⁰⁾。一次反応では、反応時間 t 経過後の出発物質 A の残存量 A_t は $A_t = A_0 \cdot \exp(-kt)$ (A_0 : 反応時間 $t = 0$ の時の A_t , k : 反応速度定数) と表されるので、交換し得る最大の重水素数を D_∞ とおくと、時間 t 経過後に未だ交換せずに残っている水素数は $D_\infty \cdot \exp(-kt)$ で表される。さらに、HDX/MSで交換が観測されるインスリンの水素原子を交換反応の速い群・中速度の群・遅い群の3群に分けられると仮定し、それぞれに属する水素数を D_f , D_i , D_s と、各々の反応速度定数を k_f , k_i , k_s とおくと、反応開始から時間 t 経過後の重水素取り込み数 D_t は次の式で表すことができる。

$$D_t = D_\infty - D_f \cdot \exp(-k_f t) - D_i \cdot \exp(-k_i t) - D_s \cdot \exp(-k_s t) \quad (式1)$$

時間ごとの取り込み重水素数の実測値を基に式1を用いてフィッティングを行うと、各群の水素原子の数と反応速度定数を求めることができる。表2は図2での重水素数の測定値から求められた、各反応速度群に属する水素原子の数である。インスリンアナログ製剤間の最大交換数 D_∞ の大小関係は、図2の分子全体でのHDX反応性の傾向と一致しているが、交換し得る水素原子の中でも特に、交換反応の遅い群 (D_s , $k \leq 0.1 \text{ min}^{-1}$) の寄与が強いことがわかる。

デテミルを除く6つのアナログ製剤では、これ

表2 HDXパラメータ

	各群の水素原子数			
	最大 (D_∞)	遅い (D_s)	中速度 (D_i)	速い (D_f)
ヒトインスリン	20.3	3.9	1.5	3.0
リスプロ	24.5	7.3	2.6	2.5
グルリジン	24.7	7.2	2.6	2.8
グラルギン	18.0	2.0	1.8	4.2
デテミル	19.9	3.3	1.6	2.5
NPH	16.4	1.0	1.8	3.6
NPL	16.9	1.3	2.0	1.8

らの速度論的パラメータとヒトへの皮下投与時の体内動態パラメータ(文献値, 表3)との間に相関関係を見出すことができる⁹⁾。すなわち、最大交換数 (D_∞) と交換反応の遅い水素数 (D_s) は共に、作用時間の目安のひとつである最大血中濃度 (C_{\max}) との間に直線相関があることがわかる(図3A)。また、 D_∞ , D_s の逆数と最大血中濃度到達時間 (t_{\max}) の間にも、直線相関の関係が認められる(図3B)。このように我々は、HDX反応性を指標とすることにより、インスリンの多量体安定性に基づく体内動態の差異を予測できること