令和７年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告書

組換えペプチド及び合成ペプチド医薬品の品質特性解析

研究分担者　橋井則貴　国立医薬品食品衛生研究所　生物薬品部　第一室長
研究協力者　西村仁孝　国立医薬品食品衛生研究所　生物薬品部　研究員

研究要旨
本研究では、ペプチド医薬品の品質特性の比較評価において重要なペプチド関連不純物のプロファイルの差異を明らかにする一環として、リラグルチド、グルカゴン及びテリパラチドを対象として既承認の遺伝子組換え製剤及び合成製剤のペプチド関連不純物の差異解析を行った。後発品、先発品、いずれの合成製剤からも、遺伝子組換え製剤に含まれない新規不純物ピークは検出されなかった。リラグルチドについては、0.1～0.5%のピーク数は合成製剤の方がやや多かった。また遺伝子組換え及び合成に関わらず、製品間で差異の認められた主なペプチド関連不純物は切断体であった。合成リラグルチド製剤で 0.5%を超えるピークが検出されたが遺伝子組換え製剤と共通し、且つ、遺伝子組換え製剤以下であった。

A.　研究目的

本邦では、遺伝子組換え技術を用いて製造されるペプチド（以下、「遺伝子組換えペプチド」）を有効成分とする製剤に対して、化学合成により製造される同一のペプチド（以下、「合成ペプチド」）を有効成分とする製剤を開発する場合、一般名が異なることに加え、不純物プロファイルが異なる等の理由から、当該製剤は新医薬品に分類されている。一方、近年の合成ペプチドの製造技術の向上、分析法の検出感度向上等の背景から、合成ペプチドを含有する製剤（合成製剤）を、遺伝子組換えペプチドを含有する製剤（遺伝子組換え製剤）に対する後発医薬品の位置づけで開発・製造販売承認申請することの可否に関する相談が一定数申し込まれている状況にある。米国ではグルカゴン、リラグルチド、ネシリチド、テリパラチド、及びテデュグルチドを対象として、遺伝子組換え製剤を参照品とする合成製剤の簡略化申請が可能か否かの判断基準がガイダンスで示され[1)]、既に複数品目の合成ペプチドが後発品として承認されている。同ガイダンスでは、共通するペプチド関連不純物は参照品となる遺伝子組換えペプチド製剤以下であること、新規ペプチド関連不純物については 0.5%を超える場合は後発品の承認申請枠に該当する ANDA（505(j)申請）を認めず、更に 0.5%以下であっても構造を同定するとともに、安全性及び有効性への影響が無いことを適切に説明することを後発品として承認申請するための条件としている。米国では具体的な数値基準を提示して不純物含量に関する判断基準を示している一方、本邦ではこれまでに議論が十分なされていない。そこで本研究では、遺伝子組換え製剤と同一の構造を有するペプチドを有効成分とする後発の合成製剤の承認審査の在り方を検討する一環として、遺伝子組換え製剤及び合成製剤を対象として、安全性の観点から、治療学的な同等性の判断基準の一つとなり得るペプチド関連不純物の差異解析を行ったので報告する。

B.　研究方法

B.1.　ペプチド製剤

リラグルチド、グルカゴン及びテリパラチドの市販製剤を使用した。遺伝子組換え製剤は全て国内流通品を使用した。リラグルチドの合成製剤は、米国において遺伝子組換え製剤の後発品として承認された 2 製剤を使用した。グルカゴン及びテリパラチドの合成製剤は、本邦で先発品として承認された製品を用いた。詳細については表 1 のとおりである。

B.2.　分析条件

各製剤の液体クロマトグラフィー-紫外可視分光検出（HPLC-UV）の分析条件は表 2 のとおりであった。また、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）は表 3 に従い行った。

B.3.　グルカゴン製剤の劣化試料の調製

不純物ピークを分取する為に、第十八改正日本薬局方 グルカゴン(遺伝子組換え) 各条 純度試験 類縁物質及びデスアミド体のシステム適合性システムの性能に従って劣化試料を調製した。具体的には、グルカゴン製剤を 0.01 mol/L 塩酸試液に溶かし、1 mL 中にグルカゴン 0.5 mg を含む液となるように調製した後、50℃で 48 時間加熱した。

C.　研究結果

1.　リラグルチド製剤のペプチド関連不純物の解析

(1)　HPLC-UV 分析

ビクトーザ®皮下注 18mg のインタビューフォーム（2025 年 11 月改訂（第 13 版））によると、リラグルチドの溶解度はアルカリ性では高いが、pH が 7 より低い場合は急激に低下し、pH4～5 で最低となる。通常、ペプチドの HPLC 及び LC-MS 分析では、酸性の移動相を用いた逆相クロマトグラフィーが利用されるが、その分析条件はリラグルチドに適さないことになる。そこで複数の HPLC 条件を検討し、最終的に移動相 A に 10 mM 酢酸アンモニウム（pH8.0）、移動相 B にアセトニトリルを使用し、分析カラムとして C4 カラムを用いる条件を採用することとした。ビクトーザ（遺伝子組換え製剤）及び Hikma（合成製剤）を HPLC-UV で分析してクロマトグラムを比較した結果、ビクトーザと比較して Hikma から新規のピークは検出されず、さらに全体的にビクトーザの不純物ピークが大きい傾向がみられた。ビクトーザと Lupin（合成製剤）を比較した結果、ビクトーザには含まれない新規のピークは検出されず、且つ殆どの不純物ピークは Lupin の方が小さく、Hikma と同様の傾向を示した。Hikma と Lupin の比較では、Hikma の不純物ピークの方が全体的に大きく、合成製剤によって不純物の含量が異なることが示された。不純物ピークの面積百分率を比較した結果、合成製剤について、ビクトーザと共通する 0.5%を超えるピークが 1 本、僅かに 0.1%を超えるピークが 4 本（Hikma）及び 3 本（Lupin）検出されたが、新規ピークは検出されなかった。

(2)　LC-MS 分析

次に HPLC-UV 分析において面積百分率（%）に差異の認められた主なピークの構造推定を LC-MS 分析により行った。図 1(A) は、Hikma 及び Lupin よりもビクトーザの方が高値を示したピーク 16 の解析結果である。ソフトウエアを利用した MS/MS スペクトルの解析により構造推定を行った結果、同ピークには脱アミド化ペプチド及び酸化ペプチドが含まれることが明らかとなった。同様にビクトーザの方が高値を示したピーク 48 及びピーク 35 について解析した結果、末端配列が欠失した切断体が、それぞれ 3 種類ずつ検出された（図 1(B), 図 1(D)）。また、ビクトーザよりも Hikma の方が僅かに高値を示したピーク 20 及び 50 からも末端配列が異なる切断体が検出された（図 1(C)）。

2.　グルカゴン製剤のペプチド関連不純物の解析

(1) HPLC-UV 分析

海外では、グルカゴン（遺伝子組換え）製剤の合成後発品が承認されているが、その入手ができなかったことから、合成製剤については国内に流通する合成後発品（ILS）を使用した。これらは、日本において独立して承認されたものであり、先発品と後発品の関係にあるものではない。HPLC 条件は、日局 グルカゴン(遺伝子組換え) 各条 純度試験 類縁物質及びデスアミド体の条件に準拠した[2]。遺伝子組換え製剤（ノボ）と ILS の HPLC-UV 分析により得られたクロマトグラムを比較した結果、一部のピークは ILS で大きくなる傾向がみられた。不純物ピークの面積百分率を比較した結果、0.1%を超えるピークは、ノボで 8 本、ILS で 10 本検出された一方、0.5%を超えるピークは両製剤ともに検出されなかった。また、ノボと比較して ILS から新規ピークは検出されなかった。

(2) LC-MS 分析

HPLC-UV 分析は、不揮発性の塩を使用した条件を採用しており、LC-MS 分析に適用できない。そこで、差異が認められ且つ分取が可能であった 3 本のピークについて、B.2.に示した LC-MS 条件により分析した。分取に際し、製剤中の不純物ピークは微量であったことから、日局グルカゴン(遺伝子組換え) 各条 純度試験 類縁物質及びデスアミド体のシステム適合性システムの性能で使用する加熱劣化処理試料からピークを分取した。ILS で高値を示したピーク 23 及び 31 と保持時間が一致するピーク A 及び B を分取後、LC-MS 分析を行った結果、ピーク A は 1～15 番目のアミノ酸残基、ピーク B は 1～9 番目のアミノ酸残基が欠失した切断体であることが明らかとなった（図 2）。また、ノボで高値を示したピーク 37（ピーク C）についても分析した結果、脱水物が主たる分子として含まれることを確認した。

3. テリパラチド製剤のペプチド関連不純物の解析

(1) HPLC-UV 分析

海外では、フォルテオ（遺伝子組換え製剤）の合成後発品が承認されているが、その入手ができなかったことから、合成製剤については国内に流通する合成先発品（テリボン）を使用した。テリボンは、日本において独立して承認されたものであり、先発品と後発品の関係にあるものではない。分析条件は FDA の研究グループが発表した論文に従った[3]。フォルテオを分析した結果、15 本の不純物ピークが検出された一方、モチダ（フォルテオのバイオ後続品）及びテリボンから一部のピークは検出されなかった。また、フォルテオは、モチダ及びテリボンよりも総じてピークが大きくなる傾向を示した。モチダとテリボンのクロマトグラムは概ね類似していた。不純物ピークの面積百分率を比較した結果、フォルテオのみ 0.5%を超える 4 本のピークが検出された。0.1%を超えたピークは、それぞれ 8 本（フォルテオ）及び 7 本（モチダ及びテリボン）であった。またフォルテオと比較してモチダ及びテリボンから新規ピークは検出されなかった。

(2) LC-MS 分析

各ピークに含まれる主な分子の構造推定を LC-MS 分析により行った。まず、15 本のピークの中でピーク 2 及び 3 について、どちらか一方に限定はできなかったものの、酸化体が含まれることが示唆された（図 3(A)）。なお、テリパラチドには Met と Trp が含まれるが酸化部位を特定できていない。次に、ピーク 4～6 を解析した結果、それぞれ切断体（ピーク 4）、酸化体と切断体（ピーク 5）、脱水した切断体（ピーク 6）が同定された（図 3(B)～(D)）。また、ピーク 9 からはテリパラチドの脱水物が検出された（図 3(E)）。0.1%を超えてはいないが、唯一テリボンの方が高値を示したピーク 13 からは脱アンモニア (NH_3, 17 Da) を示唆するペプチドが同定された（図 3(F)）。修飾部位は 6 及び 19 番目の Gln、又は 10、16 及び 33 番目の Asn が候補となりうるが部位の特定に至ってはいない。

以上の分析結果を表4に纏めた。リラグルチド、グルカゴン、及びテリパラチドのいずれの合成製剤からも新規ピークは検出されなかった。リラグルチドについては、0.1～0.5%のピーク数は合成製剤の方がやや多かった。3 品目共に差異の認められた主なペプチド関連不純物は切断体であった。リラグルチド合成製剤で 0.5%を超えるピークが検出されたが、遺伝子組換え製剤と共通し、且つ、遺伝子組換え製剤以下であった。ただし、今回評価を行った合成製剤はいずれも、今回評価を行った遺伝子組換え製剤の後発品として承認された製品ではなく、遺伝子組換え製剤と効能効果や用法用量が異なるものもあり、治療学的な同等性の検討の対象外である。リラグルチドについても、本研究で用いた遺伝子組換え製剤は日本での承認製品、合成製剤は米国での承認製品であり、日本と米国の遺伝子組換えリラグルチド製剤の比較（ブリッジング）データはないため、先発品と後発品としての評価がなされたものではない。

D.　考察

今回分析した試料には、治療学的な同等性が検証された遺伝子組換えペプチドと合成ペプチドの組合せは含まれていないが、現在、日本あるいは米国で上市されているペプチド製剤の不純物プロファイルを比較評価した結果を示すことができた。本成果は、今後、本邦において、遺伝子組換えペプチドを先発品とする合成ペプチド後発品の開発・承認審査の在り方を考える上で、極めて重要な知見になると考える。

遺伝子組換えと共通するピークの中に僅かに合成製剤の方が大きいピークが検出されたが、有意な差か否かは複数ロットの評価を踏まえて判断することが重要と思われる。HPLC-UV のピーク面積に基づき差異解析を行ったが、各ピークに複数成分が含まれる場合があり、不純物ごとの差異解析結果ではないことに留意が必要である。また、今回の構造解析では、構造中のアミノ酸残基が欠失した不純物の同定は実施できなかった。今後は、それらの解析に適切なデータベースを再構築した上で、再解析を行う予定である。

本研究では差異の認められた主なペプチド関連不純物は切断体であることを明らかにした一方で、これらが生じた原因を特定できていない。今後は加熱処理等をした劣化試料の分析を行い、不純物プロファイルの変化から、製造工程と保存中のどちらで生じるのかを考察することが肝要である。また、本研究では合成製剤で特異的に生じる可能性のある鏡像異性体を評価していないことから、今後は D/L-アミノ酸等の含量測定を検討することも重要である。

E.　結論

本研究では、3 品目のペプチド製剤について、遺伝子組換え製剤と合成製剤のペプチド関連不純物のプロファイルの特徴を明らかにした。後発品、先発品に関わらず、いずれの合成製剤からも遺伝子組換え製剤に含まれない新規不純物は検出されなかった。また合成製剤の方が遺伝子組換え製剤よりも不純物量が少ない傾向がみられた。今後は、複数ロットの分析、一部の不純物で差異が生じた原因の特定、及び D/L-アミノ酸等を含む構造異性体の評価を実施することが重要である。

F.　健康危険情報

なし

G.　研究発表

1.　論文発表

なし

2.　学会発表

なし

H.　知的財産権の出願・登録状況

1.　特許取得

なし

2.　実用新案登録

なし

3.　その他

なし

（参考資料）

1） US FDA. Guidance for Industry: ANDAs for Certain Highly Purified Synthetic Peptide Drug Products That Refer to Listed Drugs of rDNA Origin. 2021.

2） 第十八改正日本薬局方 グルカゴン(遺伝子組換え) 各条 純度試験 類縁物質及びデスアミド体.

3） Daniel A Weisz, et al., *J Pharm. Biomed. Anal.* 2025:255:116654. doi: 10.1016/j.jpba.2024.116654.

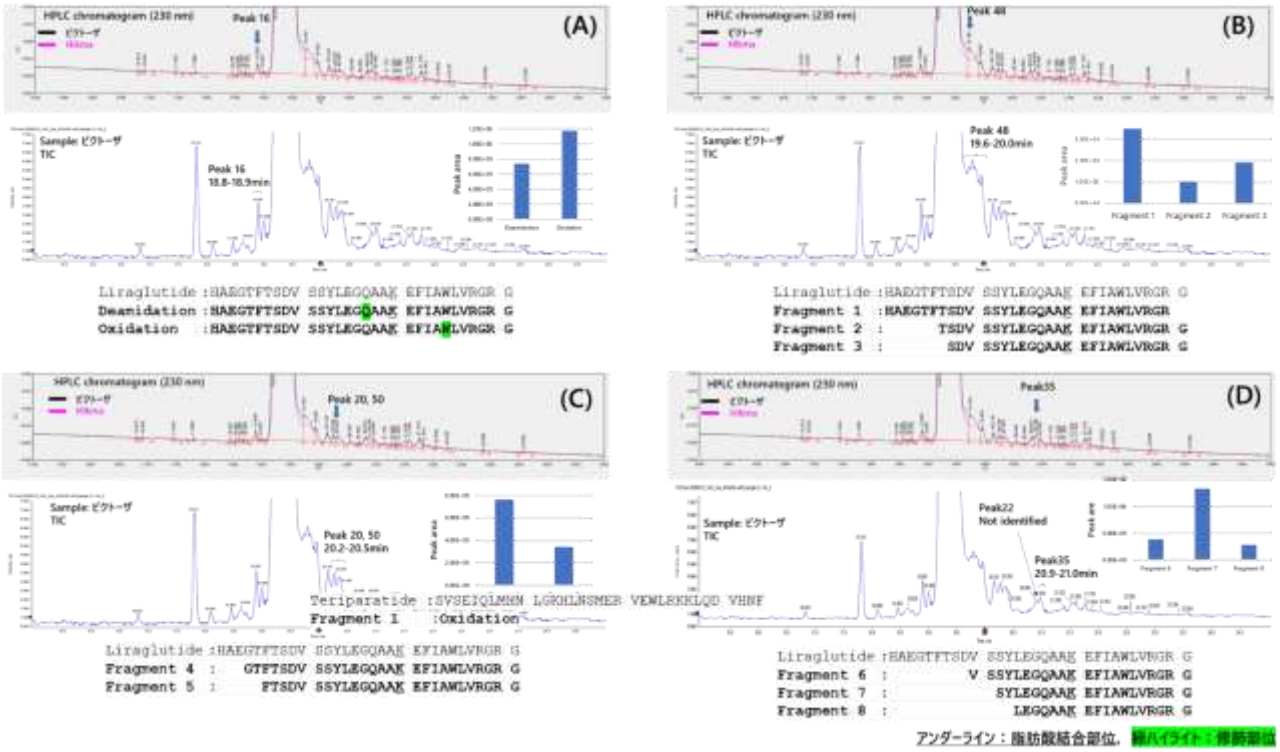


図 1. リラグルチド製剤のペプチド関連不純物の構造推定. ピーク 16(A), ピーク 48(B), ピーク 20,50(C), ピーク 35(D).

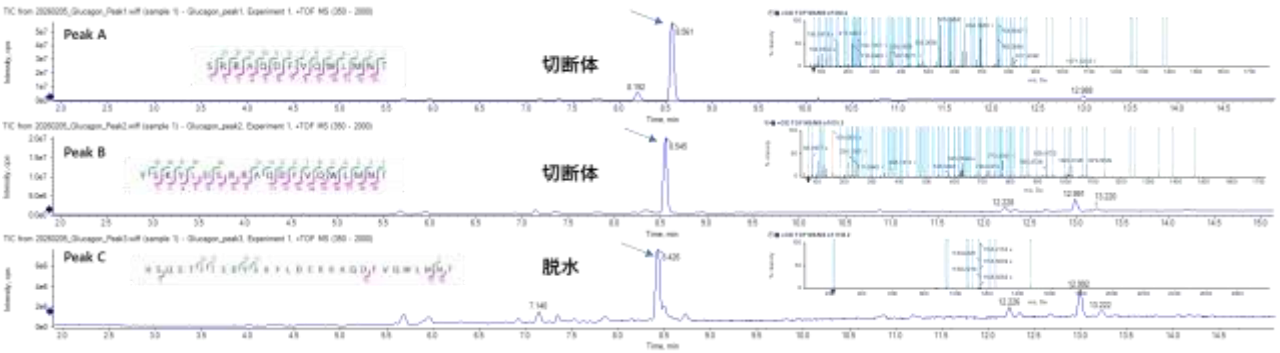


図 2. LC-MS 解析によるグルカゴン製剤由来不純物ピーク A-C の構造推定.

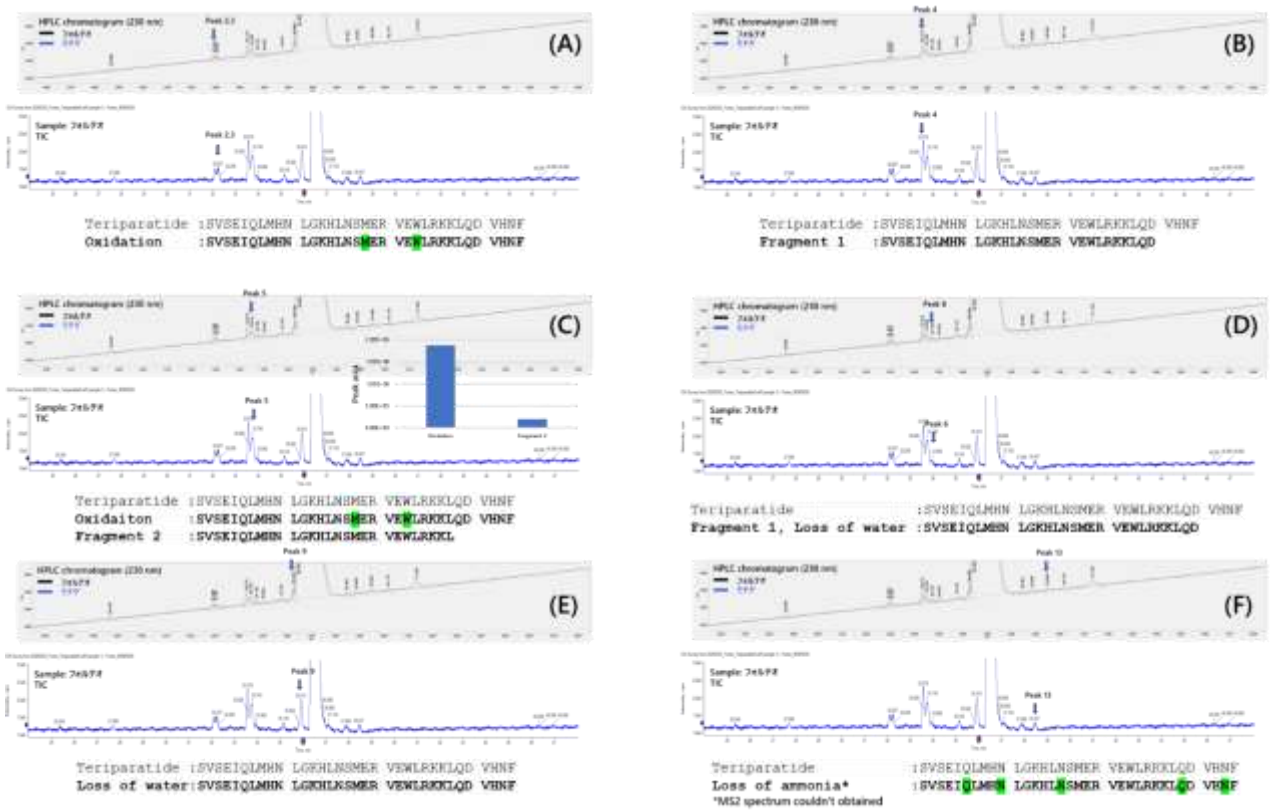


図 3. テリパラチド製剤のペプチド関連不純物の構造推定. ピーク 2,3(A), ピーク 4(B), ピーク 5(C), ピーク 6(D), ピーク 9(E), ピーク 13(F).

表 1. 本研究で使用したペプチド製剤

リラグルチド製剤：6 mg/mL

遺伝子組換え・合成	製品名	試料名	製造販売元	製造番号	使用期限
遺伝子組換え	ビクトーザ皮下注 18mg	ビクトーザ	ノボ ノルディスク ファーマ	PP5M599	2026 年 8 月
合成	Liraglutide Injection 18 mg/3 mL	Hikma*	Hikma Pharmacetuicals	3058240809	2027 年 1 月
合成	Liraglutide Injection 18 mg/3 mL	Lupin*	Lupin Pharmacetuicals	WB00094	2027 年 7 月

*米国で承認されている遺伝子組換えリラグルチドに対する後発品

グルカゴン製剤：0.5 mg/mL in 0.01 mol/L HCl, 1.1 単位/1 mL (PMDRS, 54(5),428-438 (2023)参照)

遺伝子組換え・合成	製品名	試料名	製造販売元	製造番号	使用期限
遺伝子組換え	グルカゴン G ノボ注射用 1 mg	ノボ	ノボ ノルディスク ファーマ	RJG8838	2027 年 11 月
合成	グルカゴン注射用 1 単位「ILS」	ILS*	ILS	G25051	2027 年 4 月

*国内で承認されている後発品であるが、先発品は既に販売中止

テリパラチド製剤：250 µg/mL(遺伝子組み換え)，141 µg/mL(合成)

遺伝子組換え・合成	製品名	試料名	製造販売元	製造番号	使用期限
遺伝子組換え	フォルテオ皮下注キット 600µg	フォルテオ	イーライリリー	D729482CE	2026 年 3 月
遺伝子組換え	テリパラチド BS 皮下注キット 600µg「モチダ」	モチダ*	持田製薬	1682	2027 年 5 月
合成	テリボン皮下注 28.2µg オートインジェクター	テリボン**	旭化成ファーマ	TEA124W	2026 年 8 月

*遺伝子組換えテリパラチド（フォルテオ）に対するバイオ後続品

**新薬として開発承認された製品

表 2. 液体クロマトグラフィー-紫外可視分光検出（HPLC-UV）条件

リラグルチド製剤	グルカゴン製剤 [2)]	テリパラチド製剤 [3)]
LC: H-Class (Waters) Column: Accura Triart Bio C4, 1.9 µm, 2.1×100 mm (YMC) Buffer A: 10 mM 酢酸アンモニウム (pH8.0) Buffer B: アセトニトリル Gradient: 2%B (0-2 min)，2-90%B (2-37 min) Frow rate: 0.3 ml/min UV: 230 nm Injection, 1.6 µL (10 µg)	LC: H-Class (Waters) Column: L-column C18, 3 µm, 3×150 mm (CERI) Buffer A: 120 mM リン酸緩衝液 (pH2.7) Buffer B: 40%アセトニトリル Gradient: 39%B (0-25 min)，39-88%B (25-29 min)，29-30%B (29-30 min) Frow rate: 0.5 ml/min UV: 214 nm Injection, 15 µL (7.5 µg)	LC: AQUITY Premier (Waters) Column: ACQUITY Peptide BEH C18 Column,1.7 µm, 130Å，2.1×150 mm (Waters) Buffer A: 0.1%ギ酸水 Buffer B: 0.1%ギ酸アセトニトリル Gradient: 10%B (0-10 min)，10-30%B (10-50 min) Frow rate: 0.3 ml/min UV: 230 nm Injection, 20 µL (遺伝子組み換え, 5 µg), 35.5 µL (合成, 5 µg)

2) 第十八改正日本薬局方 グルカゴン(遺伝子組換え) 各条 純度試験 類縁物質及びデスアミド体参照

3) J Pharm Biomed Anal. 2025 Mar 15:255:116654. doi: 10.1016/j.jpba.2024.116654.参照

表 3. 液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）条件

リラグルチド製剤	グルカゴン製剤	テリパラチド製剤
LC 条件: HPLC-UV と同様	LC: H-Class (Waters) Column: ACQUITY Peptide BEH C18 Column,1.7 µm, 130Å，2.1×150 mm (Waters) Buffer A: 0.1%ギ酸水 Buffer B: 0.1%ギ酸アセトニトリル Gradient: 2%B (0-1 min)，2-45%B (1-30 min) Frow rate: 0.3 ml/min Injection, 50 µL (分画ピーク溶液)	LC: H-Class (Waters) *その他は HPLC-UV と同一条件 Injection, 2 µL (遺伝子組み換え, 0.5 µg), 3.6 µL (合成, 0.5 µg)
MS: TripleTOF 6600+ (SCIEX)，Spray voltage: 4500V（Positive ion mode），*m/z* range: 350-2000 MS データ解析ソフトウエア: Molecule Profiler (SCIEX)		

表 4. 不純物プロファイルの差異解析結果要約

リラグルチド製剤

製剤	New peak	0.1-0.5%	>0.5%
ビクトーザ	–	1	1
Hikma	0	4	1
Lupin	0	3	1

製剤	Synthesis>rDNA 0.1-0.5%	Synthesis>rDNA >0.5%
Hikma	3	0
Lupin	3	0
備考	増加したピークはHikmaとLupinで共通（切断体を含む）	–

グルカゴン製剤

製剤	New peak	0.1-0.5%	>0.5%
ノボ	–	8	0
ILS	0	10	0

製剤	Synthesis>rDNA 0.1-0.5%	Synthesis>rDNA >0.5%
ILS	3	0
備考	切断体を含む	–

テリパラチド製剤

製剤	New peak	0.1-0.5%	>0.5%
フォルテオ	–	8	4
モチダ	0	7	0
テリボン	0	7	0

製剤	Synthesis>rDNA 0.1-0.5%	Synthesis>rDNA >0.5%
テリボン	1	0
備考	pGlu	–