

バイオ医薬品の品質評価 — バイオ後続品の同等性／同質性の検討 —

宮本 朋美、松永 孝之、本田 裕恵、柳橋 努、小笠原 勝、
高山 信幸、相川 幸彦、川尻 千賀子、薬事研究会生物部会

Quality evaluation of biopharmaceuticals — Examination of Comparability of biosimilar —

MIYAMOTO T, MATSUNAGA T, HONDA H, YANAGIBASHI T,
OGASAWARA M, TAKAYAMA N, AIKAWA Y, KAWASHIRI C,
The Biological Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

バイオ後続品は、遺伝子組み換え技術や細胞培養技術により産生されるタンパク質を製剤化するため、従来の低分子化合物医薬品と異なり、先行バイオ医薬品との同一性を実証することが困難である。そのため、①構造解析や物理的・化学的性質に関する比較試験、②生物活性に関する比較試験等により、先行バイオ医薬品との同等性／同質性を評価する必要がある。

本研究では、エリスロポエチン製剤（先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品及び局方標準品）を題材として、バイオ医薬品の特徴を理解し、バイオ医薬品の品質評価方法の習得と効率的な評価系を検討した。今回、エリスロポエチンの物理的・化学的試験による品質評価方法として、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるエリスロポエチン製剤の分子量測定及びウェスタンブロットリング法による製剤確認試験を実施したところ、いずれも単一で幅広い泳動帯を認め、局方標準品、先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品の分子量は、各々、31.4–38.8, 31.4–37.8, 32.2–43.2, 40.9–45.5 kDa と算出され、標準品及び先行バイオ医薬品の分子量はほぼ同等であった。これらに比べ、バイオ後続品の泳動帯は数 kDa 高分子側に認め、これはバイオ後続品であるエポエチンアルファ BS 注の審査報告書の記載内容と一致した。

また、効率的な生物活性試験代替評価系の検討を目的として、ヒトエリスロポエチン受容体 (hEPO-R) 発現細胞の増殖を指標とする *in vitro* 生物活性試験を実施し、各製剤の 50% 細胞増殖濃度 (EC₅₀ 値) を算出した結果、先行バイオ医薬品とバイオ後続品の活性に差異がなく、同程度の細胞増殖促進能を示した。一方、hEPO-R への結合親和性が低いバイオベター品は、これらの製剤よりも弱い細胞増殖促進能を示し、先行情報と一致する試験結果であった。

Summary

It's difficult that follow-on biologics, which manufactured by proteins made by DNA recombination technology and cell culture technology are prove identity with the preceding biopharmaceutical unlike conventional low molecular-medicines. Therefore, it is necessary to evaluate the equivalence/homogeneity with prior biologics by (1) structural analysis, comparative tests on physical and chemical properties, and (2) comparative tests on biological activity.

In this study, we examined the quality evaluation and efficient evaluation methods for biopharmaceuticals using erythropoietin medicine (the preceding biomedicine, biosimilar, bio-better and standard product of Japanese Pharmacopoeia) as base materials. SDS-polyacrylamide electrophoresis for measuring the molecular weight and a formulation test by western blotting were performed as the quality evaluation by physical chemical test of erythropoietin medicine. As results, single and wide band were detected, and each molecular weight of standard product, preceding biomedicine, biosimilar and bio-better were calculated with 31.4 to 38.8, 31.4 to 37.8, 32.2 to 43.2 and 40.9 to 45.5 kDa respectively. The molecular weight of the standard product and the preceding biomedicine was equal mostly. The electrophoresis band of biosimilar was higher several kDa compared with these, and it matched with the content described in the examination report of the Epoetin alfa BS.

In addition, *in vitro* bioactivity test evaluating the proliferation of cells with human erythropoietin receptor (hEPO-R) was examined for efficient biological activity test alternative evaluation system. The 50% cell growth concentration (EC₅₀) of each medicine manufacturing was calculated. There was not any difference in the cell proliferation activities of ED50s of preceding biomedicine and biosimilar. On the other hand, Biobetter with low affinity to hEPO-R showed weaker activity than these. This result matched the previous information.

緒 言

バイオ後続品とは、「国内で既に新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等／同質の品質、安全性及び有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」のことを指す。一般に、品質、安全性及び有効性について、先行バイオ医薬品との比較から得られた同等性／同質性を示すデータ等に基づき開発することができる。

バイオ後続品は、先行バイオ医薬品とは異なる細胞基材、遺伝子発現構成体、培養・精製工程、製剤化工程を用いて製造される。そのために、①構造・組成、②物理的・化学的性質、③生物学的性質、④免疫学的性質、⑤不純物（目的物質由来不純物、宿主由来タンパク質や培養液などに由来する工程由来不純物、ウイルス等混入汚染物質等）などについて明らかにすることが求められる。また、先行バイオ医薬品との比較試験：①構造解析や物理的・化学的性質に関する比較試験、②生物活性に関する比較試験などにより先行バイオ医薬品との同等性／同質性を示す必要がある。

薬事研究会生物部会においては、平成29年から3カ年の研究計画で、バイオ医薬品の特徴を理解するとともに、バイオ医薬品の品質評価方法の習得と効率的な評価系の検討を目的として共同研究を開始した。昨年度はエリスロポエチン製剤を用いて、エリスロポエチン受容体への結合親和性試験および *in vivo* 生物活性試験を実施した。本年度（平成30年度）は、物理的・化学的試験による品質評価方法として、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるエリスロポエチン製剤の分子量測定及びウェスタンブロッティング法による製剤確認試験を実施した。また、マウスにおける網状赤血球測定（日本薬局方）では、スループット性が低い等の課題があることから、効率的な生物活性試験代替評価系の検討を目的として、*in vitro* 生物活性試験を実施した。

方法及び結果

1. 被験製剤

- 局方標準品：エポエチンアルファ標準品
- 先行バイオ医薬品：エポエチンアルファ（エスポー）、協和発酵キリン
- バイオ後続品：エポエチンカッパ（エポエチンアルファBS）、キッセイ薬品 JCR ファーマ
- バイオベター品：ダルベポエチンアルファ（ネスプ）、協和発酵キリン

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分子量測定

先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品並びに局方標準品（0.54 μg）を含む溶液 100 μL を 95℃ で 5 分間加熱し、12% ポリアクリルアミドゲルにアプライした（15 μL/well）。分子量マーカーとして、分子量範囲 10–250 kDa のマーカー（Precision Plus Protein Unstain Standards、Bio-rad）を使用した。泳動後、ゲルを染色し（Oriole Fluorescent Gel Stain、Bio-rad）、ケミルミイメージング装置（FUSION-FX7、Vilber-Lourmat）を用いて化学発光の撮影を行った。分子量マーカーの各バンドの分子量及び移動度から算出した一次回帰式を用いて各サンプルで観察されたバンドの分子量を算出した。

結果、図1に示すようにいずれも単一で幅広い泳動帯が認められ、局方標準品、先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品の分子量は、各々、31.4–38.8、31.4–37.8、32.2–43.2、40.9–45.5 kDa と算出され、標準品及び先行バイオ医薬品の分子量はほぼ同等であった。これらに比べ、バイオ後続品の泳動帯は数 kDa 高分子側に認め、これはエポエチンアルファ BS 注の審査報告書の記載内容と一致した。

表1 新有効成分含有医薬品、バイオ後続品、後続医薬品（ジェネリック医薬品）の比較

定義	新有効成分含有医薬品	バイオ後続品	後続医薬品
	既承認医薬品及び日本薬局方に定められている医薬品のいずれにも有効成分として含有されていない成分を有効成分として含有する医薬品。	新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等／同質の品質、安全性及び有効性を有する医薬品。	先発医薬品と同一の有効成分を同一量含み、同一経路から投与する製剤で、効能・効果、用法・用量が原則的に同一であり、先発医薬品と同等の臨床効果・作用が得られる医薬品。
申請時期	新規	先行バイオ医薬品の特許期間、再審査期間終了後	先発医薬品の特許期間、再審査期間終了後

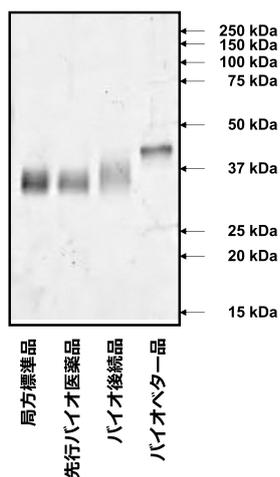


図1 SDS-PAGE 像

3. ウェスタンブロッティング法による製剤確認試験

局方標準品, 先行バイオ医薬品, バイオ後続品, またはバイオベター品 (0.54 μg) を含む溶液 100 μL を 95°C で 5 分間加熱し, 12% ポリアクリルアミドゲルにアプライした (15 $\mu\text{L}/\text{well}$). 電気泳動後, セミドライ方式によってメンブレンに転写した. メンブレンをブロッキングし, 一次抗体として抗ヒト EPO 抗体 (Anti-human EPO Antibody (Rabbit), abcam, #ab226956) を, 二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, CST, #7074S) を反応させ, ケミルミイメージング装置 (FUSION-FX7, Vilber-Lourmat) を用いて化学発光撮影によりバンドを検出した.

結果, 図 2 に示すように局方標準品及び各被験製剤で単一の幅広い泳動帯を認めた. 先行バイオ医薬品の泳動帯は標準品と同様の泳動パターンを示し, バイオ後続品の泳動帯は先行バイオ医薬品と比較してより高分子側に認められた. 先行バイオ医薬品とバイオ後続品は移動度が異なるものの, ヒトエリスロポエチン製剤であることが確認できた.

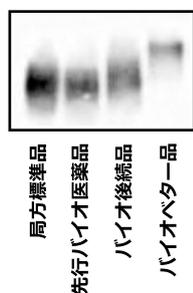


図2 ウェスタンブロット像

4. エリスロポエチン製剤の *in vitro* 生物活性試験

ヒトエリスロポエチン受容体 (hEPO-R) 発現細胞の増殖を指標に, エリスロポエチン製剤の生物活性を評価

した. 細胞増殖は, テトラゾリウム塩 (WST-1) を用い細胞全体の脱水素酵素活性を指標として解析した. 96 穴プレートにヒト赤白血病由来 TF-1 細胞を播種し (2×10^4 cells/well), 段階希釈した被験製剤 (0.0032 - 2 nM) 存在下で 3 日間培養した. 細胞懸濁液 100 μL に WST-1 溶液 10 μL を添加し, 3 時間培養後, 吸光度を測定した (450 nm / 対照 690 nm). 得られた吸光度より増殖曲線を作成し, 50% 細胞増殖濃度 (EC_{50} 値) を算出した.

結果, 図 3 に示すように先行バイオ医薬品, バイオ後続品並びにバイオベター品の EC_{50} 値は, 各々, 0.069, 0.105, 0.524 nM と算出された. 先行バイオ医薬品とバイオ後続品の EC_{50} 値に有意差は認められず, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品は同程度の細胞増殖促進能を示した. 一方, バイオベター品は, 先行バイオ医薬品及びバイオ後続品より弱い細胞増殖促進能を示した. バイオベター品は, 先行バイオ医薬品と比較して hEPO-R への結合親和性が低いことが報告されており, 本試験結果は先行情報と一致した.

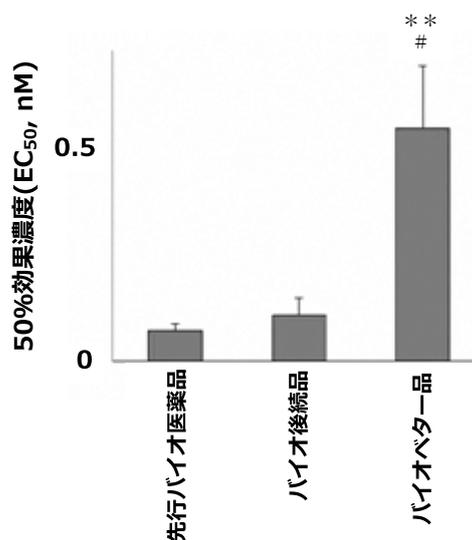


図3 細胞増殖における 50% 効果濃度
データは平均値+標準偏差で示した (n=11-13)
**p < 0.01 vs 先行バイオ医薬品, # p < 0.01 vs バイオ後続品 (one way ANOVA followed by Tukey's test)

考察および総括

SDS-PAGE による分子量測定, 及びウェスタンブロッティング法による製剤確認試験を実施した結果, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品は分子量に差が認められたものの, ヒトエリスロポエチン製剤であることを確認することができた. 次年度, シアル酸含量の測定, ペプチドマップ, 糖鎖プロファイルなどの特性解析を行い, エリスロポエチン製剤の同等性/同質性を検証する.

日本薬局方において, エリスロポエチン製剤の生物活

性は、マウスを用いた *in vivo* 試験によって評価することが記載されている。しかし、*in vivo* 生物活性試験では、①動物を使用することによる低いスループット性、②動物愛護の観点からの代替法の必要性、③設備などの初期投資に費用がかかる、などの問題点が挙げられる。そこで我々は、培養細胞を用いた *in vitro* 評価系が、品質管理方法の一つとして *in vivo* 生物活性試験の代替法となる可能性があるか検討した。hEPO-R 発現細胞の増殖を指標にした *in vitro* 生物活性試験を実施した結果、先行バイオ医薬品エとバイオ後続品は同程度の細胞増殖促進能を示し、バイオベター品は、それらより弱い促進能を示した。本試験結果は、インタビューフォームや審査報告書などの先行情報と一致した。本試験によって生物活性の相違を反映した結果を簡便に得ることができたため、*in vitro* 生物活性試験は、通常業務での品質管理方法の一つとして利用できる可能性が示唆された。