

# 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（活動3年間のまとめ）—

宮本朋美, 本田裕恵, 柳橋 努, 小島理恵子, 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, HONDA H, YANAGIBASHI T, KOJIMA R, OGASAWARA M,  
TAKAYAMA N, AIKAWA Y, KAWASHIRI C,

The Biological Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

#### 要 約

バイオ医薬品の品質評価において、バイオ後続品は、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等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。

本研究では、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法の習得と効率的な評価系の検討を目的として、エリスロポエチン製剤を題材に、比較試験として品質に係る物理的・化学的特性解析や有効性に係わる生物活性試験を実施してきた結果を報告する。

#### Summary

In characterization of biopharmaceuticals, it necessary to evaluate the comparability of biosimilar compared with reference biological product by: 1) structural analysis and comparative tests on physical and chemical properties; 2) comparative tests on biological activity.

The aim of this study to understand the characteristics of biopharmaceuticals, to learn of quality evaluation methods for biopharmaceuticals, and to examine of efficient evaluation systems. We used the erythropoietin preparations as a subject, and examined the physical and chemical properties related to quality, and bioactivity tests related to effectiveness. We will report the results of these comparative tests

#### 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、バイオ後続品は、その品質、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、製剤化工程により製造される。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不純物等（目的物質由来不純物、宿主由来タンパク質や培養液等に由来する工程由来不純物、ウイルス等混入汚染物質、等）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等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。エリスロポエチン製剤を題材に、先行バイオ医薬品とバイオ後続品、及び改良されたバイオベター品について実施してきた品質に係る物理的・化学的特性解析や有効性に係わる生物活性試験に関するこれまでの結果を報告する。

#### 被験製剤

局方標準品並びに先行バイオ医薬品、バイオ後続品として下記の市販製剤を使用した。また、先発バイオ医薬品と基本的に同じ効果をもたらすことが期待されるバイオ後続品に対し、先発薬より高い効果をもたら

す改良品として、販売承認を得るための非臨床、臨床のデータを完全に備えた生物製剤承認申請が必要とされるバイオベター品の市販製剤についても検討した。

- 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

## 方法及び結果

### 1. 物理的・化学的特性解析

#### 1-1. 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<sup>1)</sup>

被験物質 (0.54 µg/75 µL) に電気泳動用Sample Buffer Solution (2ME+) (Wako) 25 µLを加え、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 µL/well)。分子量範囲10-250 kDaの分子量マーカー (Precision Plus Protein Unstained Standards, Bio-Rad) を使用した。泳動後、染色試薬 (Oriole Fluorescent Gel Stain, Bio-Rad) の手順に準じてゲルを染色し、ケミルミイメージング装置 (FUSION-FX7, Vilber-Lourmat) により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 (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa) 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を認め、局方標準品並びに先行バイオ医薬品の分子量は、31.4-38.8 kDa並びに31.4-37.8 kDaと算出され、ほぼ同等であった。これらに比べ、バイオ後続品の泳

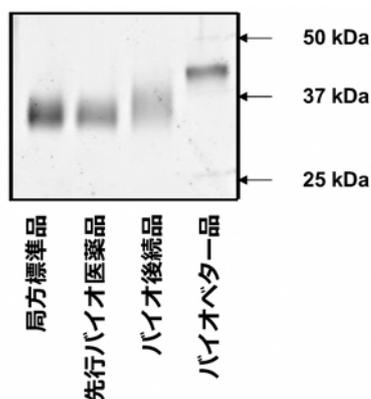


図1 SDS-PAGE像

動帯は数kDa高分子側の32.2-43.2 kDaとなり、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。一方、バイオベター品の分子量は40.9-45.5 kDaとなった。

#### 1-2. ウェスタンブロット法による製剤確認試験<sup>1)</sup>

被験物質 (0.54 µg/75 µL) に電気泳動用Sample Buffer Solution (2ME+) (Wako) 25 µLを加え、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 µL/well)。電気泳動後、セミドライ方式 (トランスブロットTurboシステム, Bio-Rad) によってPVDFメンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング試液 (5%スキムミルク in TNT buffer) で室温1時間ブロッキングし、一次抗体として3000倍希釈の抗ヒトEPO抗体 (Anti-human EPO Antibody (Rabbit), abcam, Cat #ab226956) を室温で2時間、二次抗体として5000倍希釈のHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, CST, Cat #7074S) を室温で1時間反応させ、ケミルミイメージング装置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免疫化学的に確認できた。

#### 1-3. 液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析計 (LC-TOF/MS) を用いたペプチドマッピング法による製剤確認試験

遠心式限外ろ過フィルター (Amicon Ultra, Merck) にて脱塩濃縮した先行バイオ医薬品及びバイオ後続品 (約10 µg/70 µL) に0.2 µg/µLのTrypsin

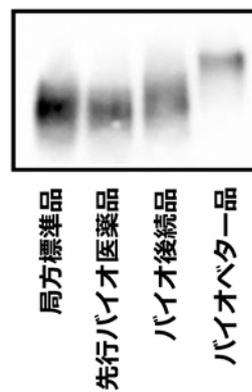


図2 ウェスタンブロット像

Gold (Promega) を 2  $\mu$ L 加え, 37°C で 12 時間以上加温後, 10% トリフルオロ酢酸溶液を 8  $\mu$ L 加えて反応を停止し, 試料溶液とした. 試料溶液 5  $\mu$ L を LC-TOF/MS (ブルカージャパン) で測定した. 得られたデータを解析ソフト (Biopharma Compass 及び Biotools,

ブルカージャパン) を用いて解析した.

<測定条件>

検出器: LC (LC-20A システム, 島津製作所),

TOF/MS (maXis II, ブルカージャパン)

カラム: Waters ACQUITY UPLC BEH C18

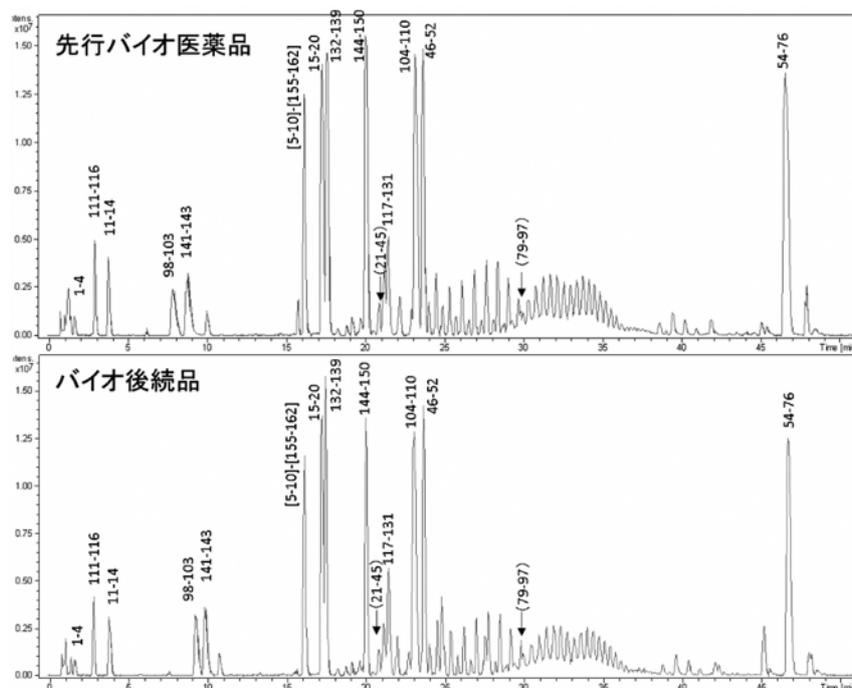


図3 ペプチドマッピングのベースピーククロマトグラム

表1 先行バイオ医薬品とバイオ後続品のトリプシン消化ペプチドの保持時間

Position	Sequence	先行RT (min)	後続RT (min)
1-4	APPR	1.70	1.67
5-10	LICDSR <sup>#1</sup>	16.18	16.15
11-14	VLER	3.86	3.85
15-20	YLLEAK	17.31	17.23
21-45	EAENTTTGCAEHCSLNENTTVPDTK <sup>#2, #2</sup>	(21.2-21.9)	(20.8-21.8)
46-52	VNFYAWK	23.70	23.70
53-53	R	-	-
54-76	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	46.52	46.68
77-97	GQALLVNSSQPWEPLQLHVD	(29.7-30.1)	(29.8-30.2)
98-103	AVSGLR	7.91	9.30
104-110	SLTTLLR	23.19	23.08
111-116	ALGAQK	2.98	2.87
117-131	EAISPPDAASAAPLR	21.53	21.54
	EAISPPDAASAAPLR	-	-
132-139	TITADTFR	17.61	17.50
140-140	K	-	-
141-143	LFR	8.74	9.88
144-150	VYSNFLR	20.10	20.03
151-152	GK	-	-
153-154	LK	-	-
155-162	LYTGEACR <sup>#1</sup>	16.18	16.15
163-165	TGD	-	-

#1, #2 ジスルフィド結合

N結合型糖鎖結合部位: N24, N38, N83

O結合型糖鎖結合部位: S126

Column, 130Å, 1.7 μm, 1 mm×100 mm  
 カラム温度：55℃, 流量：毎分0.1 mL  
 移動相A：0.1%ギ酸-水  
 移動相B：0.1%ギ酸-アセトニトリル

非還元下, トリプシン消化した試料溶液をLC-TOF/MSで分析したペプチドマッピングにおいて, 先行バイオ医薬品及びバイオ後続品は, 類似したクロマトグラムを示した(図3). 解析ソフトによりペプチド配列の精密質量の実測値を目的のタンパク質の理論値と照合した結果(表1), クロマトグラム上の主要ピークは, MS測定範囲以下(<300 Daモノアイソトピック質量)の短いペプチド(トリペプチド以下)を除いた, ヒトエリスロポエチンをトリプシン消化した時の糖鎖のないペプチド及びMSにおいてO-結合型糖鎖が外れたペプチドに帰属された. 一方, 糖鎖を含むペプチドでは糖鎖構造の不均一性から幅広いピーク形状となり, おおよその糖鎖の質量を加えたペプチド質量と実測値からどの付近のピークか推測できたが, 複雑なマススペクトルの各イオンを各糖ペプチドの理論値と照合するには至らなかった. しかしながら, 帰属できたピークの保持時間は, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品とでほぼ等しく, いずれもヒトエリスロポエチンタンパク質のアミノ配列及びLICDSRとLYTGEACRとのジスルフィド結合が確認出来た.

#### 1-4. キャピラリー等電点電気泳動による糖鎖プロファイル分析

前述同様に脱塩濃縮した先行バイオ医薬品及びバイオ後続品20 μL(約1 mg/mL)と87 μLのキャピラリー等電点電気泳動用試薬:cIEF gel(SCIEX), Pharmalyte 3-10及び25-5(GE), Arginine及びIminodiacetic acid(Sigma), SimpleSol(Protein simple), pI marker 3.38(Protein simple)及び5.5(SCIEX)を混合して泳動用試料とした. キャピラリー電気泳動装置(PA800plus, SCIEX)にて以下の条件により測定し, pI markerの等電点と移動時間より, 得られたピークの等電点を算出した.

<測定条件>

検出器: UV280 nm

キャピラリー: Neutral Capillary, 50 μm i.d.  
 ×有効長20 cm(SCIEX)

等電点電気泳動: サンプル導入25 psi 99.9 sec 加圧,  
 Focusing Step 20 kV 10 min,  
 Chemical Mobilization 30 kV 25 min

糖鎖の種類(シアル酸の結合数)によりpI 3.38-5.5の間に複数のピークが認められた. 分離があまりよくないため改良の余地はあるものの, 等電点を6つの領域に分けた時のピークのArea%を表2に示す. 先行バイオ医薬品とバイオ後続品で存在比に違いがあるものの, 同様のピークパターンを示し, 類似性は高かった.

表2 キャピラリー等電点電気泳動(Area%)

pI	Area%			
	先行バイオ医薬品 No.1	バイオ後続品 No.1 No.2 mean		
① >4.5	1.56	9.52	10.68	10.10
② 4.22-4.5	21.63	27.97	19.45	23.71
③ 4.04-4.22	19.56	15.34	22.78	19.06
④ 3.82-4.04	40.15	30.24	20.43	25.34
⑤ 3.75-3.82	9.51	7.75	9.31	8.53
⑥ <3.75	7.59	9.17	17.35	13.26
total	100.0	100.0	100.0	100.0

先行バイオ医薬品は, n=1, バイオ後続品は, n=2での測定

#### 1-5. 超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC)によるシアル酸含量測定

局方に準じて試料を調製した. 前述同様に脱塩濃縮した先行バイオ医薬品, バイオ後続品, バイオベター品, または局方標準品(約0.8 nmol/45 μL)に水酸化ナトリウム試液5 μLを正確に加え, 氷水中で90分間放置した後, 希酢酸5 μLを正確に加えた. この液に水45 μL及び水/酢酸(100)混液(27:8)100 μLをそれぞれ正確に加え, 80℃で210分間加温した. 冷後, この液に局方記載の蛍光試液200 μLを正確に加え, 遮光下, 60℃で2時間加温した. 冷後, この液に水酸化ナトリウム試液200 μLを正確に加えて試料溶液とした. 別に用時, 0.4 mmol/L N-アセチルノイラミン酸試液250 μLを正確に量り, 0.1 mmol/L N-グリコリルノイラミン酸試液20 μL及び水180 μLをそれぞれ正確に加えた溶液45 μLを同様に処理し, 標準溶液とした. 試料溶液及び標準溶液2 μLを正確にとりUHPLCにて測定した. 試料溶液のN-アセチルノイラミン酸のピーク面積 $A_{T1}$ 及びN-グリコリルノイラミン酸のピーク面積 $A_{T2}$ , 並びに標準溶液のN-アセチルノイラミン酸のピーク面積 $A_{S1}$ 及びN-グリコリルノイラミン酸のピーク面積 $A_{S2}$ より, シアル酸の含量(mol/mol) =  $(A_{T1}/A_{S1} \times 10 + A_{T2}/A_{S2} \times 1/5) /$  (採取した本品のモル数)を算出した.

先行バイオ医薬品とバイオ後続品(各2 Lots)のシアル酸含量(mol/mol)は, 先行バイオ医薬品(11, 11), バイオ後続品(10, 10)となり, 局方標準品(11)及びバイオベター品(16)であった. 先行バイ

オ医薬品及びバイオ後続品は、いずれも日局17エポエチンアルファのシアル酸含量規格（10–12 mol/mol）内であった。シアル酸の数が増加したバイオベター品のダルベポエチンアルファのシアル酸含量は、先行バイオ医薬品の約1.5倍だった。

## 2. 生物活性試験

### 2-1. フローサイトメトリー法によるマウス網状赤血球の増加を指標とした*in vivo*生物活性試験

日本薬局方の記載に準拠し、エリスロポエチン製剤の薬理活性（造血作用）を網状赤血球数の増加を指標に評価した。先行バイオ医薬品及びバイオ後続品より調製した0.5及び2 IU/animalの投与液0.2 mLをそれぞれICR系マウス（雌、5週齢、n=14）に3日間反復皮下投与した。陰性対照群には生理食塩液を同様に投与した（n=10）。最終投与後24時間にEDTA処理した毛細管を用いてマウスの尾より採血した。測定用チューブに血液5 µLを分取し、キャリブレーション用のマイクロビーズ（ビーズ径6.0 µm、濃度 $1.0 \times 10^8$ ビーズ/mL、Bacteria Counting Kit for flow cytometry, Life technologies, Cat #B7277）5 µL含むチアゾールオレンジ（濃度0.01 mg/mL、BD Retic-Count, Cat #349204）を1 mL添加して室温で30分間放置した。その後、自動細胞分析装置（BD FACSCantoII, 日本ベクトン・デッキンソン）を用い、ビーズを500個取り込んだ際のチアゾールオレンジ陽性細胞（網状赤血球）数を計数した。

測定結果を図4に示した。陰性対照群、先行バイオ医薬品0.5、2 IU投与群、バイオ後続品0.5、2 IU投与群の網状赤血球数は、それぞれ $2548 \pm 960$ ,  $3458 \pm 947$ ,  $5184 \pm 1268$ ,  $3435 \pm 635$ 及び $4469 \pm 604$  cells/µLとなり、先行バイオ医薬品及びバイオ後続品の2 IU投与群では、陰性対照群と比較し網状赤血球の有意な

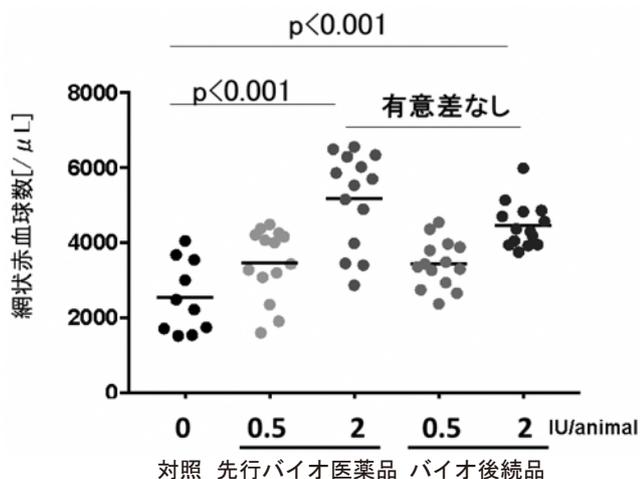


図4 エリスロポエチン製剤のマウスにおける造血作用

増加がみられた。また、先行バイオ医薬品とバイオ後続品の2 IU投与群の網状赤血球数に有意な差はみられなかった。よって、先行バイオ医薬品とバイオ後続品が同程度の造血作用を有することが示唆された。

### 2-2. エリスロポエチン受容体発現細胞の増殖を指標とした*in vitro*生物活性試験<sup>1)</sup>

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（ $2 \times 10^4$  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<sub>50</sub>値）を算出した。

結果、図5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<sub>50</sub>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<sub>50</sub>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。

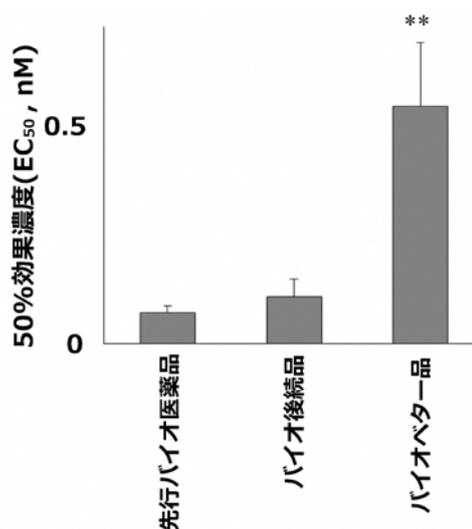


図5 細胞増殖における50%効果濃度

Each column represents the mean+SEM (n=10–15), \*\*p < 0.001 vs control, (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

### 2-3. 表面プラズモン共鳴法によるリガンド結合親和性を指標とした*in vitro*生物活性試験

エリスロポエチンは赤芽球系前駆細胞のエリスロポエチン受容体に結合することで前駆細胞の分化及び増殖を促して赤血球産生を促進する。今回、分子間相互作用解析装置を用い、表面プラズモン共鳴法により被験製剤のエリスロポエチン受容体との結合親和性を評価した。

捕捉用抗体の抗ヒトIgG-Fc抗体をHuman Antibody Capture Kit (GE Healthcare) によりセンサーチップ (CM5, GE Healthcare) に固定化した。アナライトとして、先行バイオ医薬品、バイオ後続品及びバイオベター品の0.117, 0.234, 0.469, 0.938, 1.875, 3.75, 7.5, 15及び30 nmol/Lの希釈溶液を調製した。作製したセンサーチップを分子間相互作用解析装置 (Biacore T200, GE Healthcare) に装着し、リガンド (エリスロポエチン受容体; ヒトFcキメラ組換え型, R&D systems) を捕捉後、調製した被験製剤の希釈溶液を用いてリガンドに対するアナライトの結合解離センサーグラムを取得した。カイネティクス解析及び平行線検定を実施し、被験製剤のエリスロポエチンと受容体との結合親和性を比較した。

カイネティクス解析の結果を表3に示した (n=

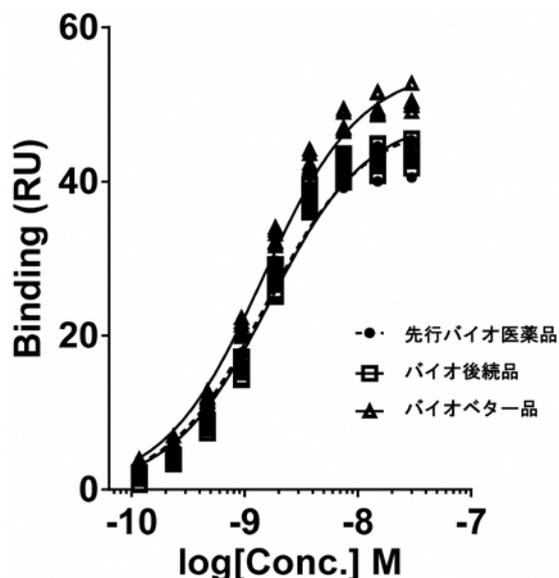


図6 結合量と対数濃度より得られたシグモイド曲線

9). 結合速度定数 ( $K_a$ ), 解離速度定数 ( $k_d$ ), 解離定数 ( $K_D$ ) 及び最大結合量 ( $R_{max}$ ) において、先行バイオ医薬品とバイオ後続品は類似する値を示し、両者の値に統計学的に有意な差はみられなかった。一方、バイオベター品は、それぞれの値について先行バイオ医薬品と統計学的に有意な差が認められ、 $K_D$ が大きくなったことから、結合親和性は低下した。また、結合量と対数濃度の個々のデータ (n=9) より得られたシグモイド曲線を図6に示す。バイオベター品は最大結合量が大きく明らかにグラフの形状が異なるため、先行バイオ医薬品とバイオ後続品との平行線検定の結果、50%結合濃度 ( $EC_{50}$ 値) はそれぞれ、 $1.361E-09$ ,  $1.389E-09$  (M) となり、その効力比は、1.021で統計学的に有意な差はみられなかった。

### 考察および総括

エリスロポエチン製剤を題材に、先行バイオ医薬品とバイオ後続品、及び改良されたバイオベター品について有効性に係わる生物活性試験や品質に係る物理的・化学的特性解析を実施した。

SDS-PAGEによる分子量測定、及びウェスタンブロットリング法による製剤確認試験の結果、先行バイオ医薬品 (エポエチンアルファ) とバイオ後続品 (エポエチンカプパ) は分子量に差が認められたものの、免疫化学的に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。分子量の違いが何に起因するのかを明らかにするため、ペプチドマップによる製剤確認試験や糖鎖プロファイルなどの特性解析を行った。

局方のペプチドマップによる確認試験では、非還元条件下、トリプシン処理した検体を液体クロマトグラフィーにより試験し、得られたクロマトグラムの比較により同一保持時間に同様のピークを検出することで確認する。本研究では検出をTOF/MSにし、得られたクロマトグラム上のピークをペプチド配列に帰属することにより、より多くの情報を得た。非還元条件下、トリプシン処理した検体をLC-TOF/MSによりペプチドマップを行い、糖鎖のないペプチド及びO-結合

表3 表面プラズモン共鳴法によるリガンド結合親和性のカイネティクス解析結果

	先行バイオ医薬品				バイオ後続品				バイオベター品			
	Ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	Rmax (RU)	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	Rmax (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	Rmax (RU)
Mean	8.48E+06	2.73E-04	3.26E-11	42.07	8.28E+06	2.53E-04	3.12E-11	42.77	5.30E+06	2.15E-04	4.07E-11	49.22
SD	5.68E+05	3.64E-05	5.30E-12	1.55	4.04E+05	3.16E-05	3.87E-12	1.25	1.70E+05	2.57E-05	5.28E-12	1.29
CV(%)	6.69	13.36	16.27	3.68	4.88	12.49	12.40	2.93	3.21	11.96	12.96	2.62

型糖鎖がはずれたペプチドは、数塩基の極短いペプチドを除いて全ての主要ピークに帰属ができ、帰属できた範囲において先行バイオ医薬品とバイオ後続品の一次構造は同じで、S-S結合部位も一致しており、ヒトエリスロポエチン製剤であると確認できた。この結果は、トリプシン処理したエリスロポエチンを質量分析によりペプチドマップを行った既存の報告<sup>2)</sup>と、糖鎖のついたペプチドを詳細に解析できなかった点を除き、矛盾していなかった。従って、先行バイオ医薬品とバイオ後続品との分子量の違いはペプチドマップで詳細に検討できなかった、結合している糖鎖の不均一性に起因すると考えられた。

そこで、キャピラリー等電点電気泳動 (CE) による糖鎖プロファイル分析を実施した。糖鎖の種類 (シアル酸の結合数) によりpI 3.38-5.5の間で複数のピークが認められた。等電点を6つの領域に分けた時のピークのArea%から、先行バイオ医薬品とバイオ後続品で存在比に違いがあるものの、同様のピークパターンを示し、類似性は高いと考えられた。なお、今回CEで得られたエリスロポエチンの等電点 (約3.7-4.5) は、これまでの報告<sup>3)</sup>の等電点 (約3.9-4.8) よりも低い。CEではタンパク質の凝集、沈殿により再現性が得られないことがあるため、可溶化剤として尿素を用いることが多い。既報でも尿素を用いているが、尿素には見かけ上のpI値変化を引き起こす陽性勾配ドリフトが起こり、本来の等電点よりも高くなる。今回、我々は尿素の欠点を改善した可溶化剤を用いたため、陽性勾配ドリフトがおこらず、既報よりも等電点が低くなったと考えられる。

一方、エリスロポエチン製剤は、シアル酸の結合数が増加すると、エリスロポエチン受容体への結合親和性は低下するものの血中半減期が延長し、*in vivo*での生物活性が向上することが知られている。従って、糖鎖プロファイルの違いがシアル酸含量の変化を伴う場合は、生物活性に影響することから、製剤中のシアル酸含量を測定した。その結果、先行バイオ医薬品及びバイオ後続品は、いずれも日局17エポエチンアルファのシアル酸含量規格 (10~12 mol/mol) 内であり、同程度のシアル酸を含有していることが明らかになった。なお、シアル酸の数が増加したバイオベター品のシアル酸含量は、先行バイオ医薬品の約1.5倍であり、シアル酸の最大結合数が先行バイオ医薬品の14個に対し、バイオベター品では22個であり、約1.6倍となっていることと矛盾しない。また、局方のHPLC法をUHPLC法に改良することにより、検出感度の向上と測定時間の短縮ができ、効率的な評価法を確立できた。

これらの物理的・化学的特性解析の結果、先行バイオ医薬品とバイオ後続品は、ウェスタンブロット法による免疫学的手法及びペプチドマッピングによる一次構造の分析により製剤中のヒトエリスロポエチンを確認することができた。結合している糖鎖の不均一性から、分子量や糖鎖プロファイルに違いがあるが、生物活性への関与が大きいシアル酸の結合数については、シアル酸含量が同程度のため生物活性に影響しないと考えられる。

実際に、マウスに製剤を投与し、網状赤血球の増加を指標とした*in vivo*生物活性試験では、先行バイオ医薬品とバイオ後続品は同程度の造血活性を有していた。また、エリスロポエチン受容体への結合親和性において、結合速度定数、解離速度定数、解離定数及び最大結合量のいずれも先行バイオ医薬品とバイオ後続品とで同程度であった。さらに、エリスロポエチン受容体発現細胞において、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す等、実施した生物活性試験において先行バイオ医薬品とバイオ後続品とは有効性に違いはなかった。

これらの結果を総合的に判断すると、物理的・化学的性質の比較では糖鎖構造の多様性による差異が認められるが、生物活性への関与が大きいシアル酸の含量は同程度であり、検討した*in vitro*及び*in vivo*の生物活性試験の比較ではいずれも同程度の結果が得られたことから、物理的・化学的品質の差異が有効性に影響を与えておらず、バイオ後続品は先行バイオ医薬品と同等/同質であると説明できる。なお、バイオ後続品の審査報告書を参考にすると、承認審査では認められた糖鎖構造の多様性に係る品質の差異が有効性・安全性に影響を与えないと判断する根拠を非臨床試験及び臨床試験の成績から説明するように求めている。また、糖鎖構造の多様性を管理するための品質規格も求められており、実際の同等性/同質性の評価においては、これらの項目を明らかにし、総合的な判断について説明できることが必要である。

最後に、3年間の生物部会活動を通して、局方の試験法の改良や生物活性試験における動物実験の代替法など、新たな評価系を検討することで、より効率的に多くの情報を得ることができた。一方、特性解析のうち、特にLC-TOF/MSを用いた解析では、MSの条件設定やデータの解析に熟練していないため、目的とした結果が十分に得られないこともあることが実感できた。

令和2年2月に最新の「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(薬生薬審発0204 第1号)が通知され、その中において、バイオ後続品の開

発に当たっては、先行バイオ医薬品の開発・承認以降の情報の蓄積や最新の科学技術を十分取り入れることが求められていることから、薬事研究会生物部会では、引き続きバイオ医薬品についてLC-TOF/MSを用いた解析等の物理的・化学的特性解析の習得を目指す予定である。

## 文 献

- 1) 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: 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 –, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 46, 24-27, 2019
- 2) 原園景: バイオ医薬品の品質特性解析における質量分析, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn, 64 (3) , 93-96, 2016
- 3) Ben Cowpera, Xiang Li, Lei Yub, Yong Zhou, W.H. Fanb, C.M. Raob: Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan., J. Pharm. Biomed. Anal., 153, 214-220, 2018