

CTD-第2部（モジュール2）：  
品質に関する概括資料のモックアップ  
（記載例）

—抗体医薬品を対象としたモジュール2.3 モックアップ（記載例）—

2018年5月

（公財）ヒューマンサイエンス振興財団

## I. はじめに

ICH M4 ガイドライン、いわゆる CTD (コモンテクニカルドキュメント) ガイドラインが 2000 年にステップ 4 となり、国内でも「新医薬品の製造又は輸入の承認申請に際し承認申請書に添付すべき資料の作成要領について」(医薬審発第 899 号、平成 13 年 6 月 21 日)が発出されました。

(その後、幾つかの改定がなされておりますので、最新の CTD ガイドラインについては独立行政法人 医薬品医療機器総合機構のホームページをご参照ください。)

国内の製造販売承認申請における品質領域の審査においては、モジュール 2.3 品質に関する概括資料 (Quality overall summary: QOS) が現在でも審査において重要な資料と位置づけられていますが、CTD ガイドラインが最初に発出された 2001 年当時は、モジュール 2.3 をどのように記載すればよいのか分からないという声が聞かれました。そのような状況において、品質に関する概括資料の具体的な記載例 (モックアップ) が、(社) 東京医薬品工業協会、大阪医薬品協会及び (財) ヒューマンサイエンス振興財団により作成され 2002 年に公表されました (2002 年に厚生労働省 医薬局審査管理課事務連絡、平成 14 年 8 月 13 日)。

その後、CTD 形式での申請資料による承認品目も増え、企業側でも CTD 形式の申請資料作成の経験も集積されていると考えられます。

上記のモジュール 2.3 モックアップの内、新規生物薬品のモックアップは、仮想の増殖因子を対象として、(財) ヒューマンサイエンス振興財団の CTD-Q 実装検討グループメンバーにより作成されたものです。今回、**新規生物薬品モックアップのアップデート版**として、**抗体医薬品を対象としたモジュール 2.3 モックアップ**を (公財) ヒューマンサイエンス振興財団で検討し、添付のとおり作成しましたのでお知らせいたします。

今回、モジュール 2.3 モックアップのアップデート版として抗体医薬品を対象としたモックアップを作成した背景は以下の通りです。

- ・ 2002 年のオリジナルのモックアップ公表後、各社の申請経験が蓄積されたことから、その経験に基づきモックアップ内容を充実させることが有用であると考えたため。
- ・ 新規生物薬品の申請品目として抗体医薬品の数が増え、「抗体医薬品の品質評価のガイダンス」(薬食審査発 1214 第 1 号、平成 24 年 12 月 14 日)が発出された中で、抗体医薬品のモジュール 2.3 の記載例を示すことが有用であると考えられたため。

なお、オリジナルのモックアップと同様、本モックアップの内容は、あくまでも創作されたものであり、申請資料として全体的な整合性が取れていない部分があることをお断りしておきます。また、本モックアップは CTD 各セクションの記載例/参考例をまとめたものにすぎず、個々の品目の承認審査に必要な内容のすべてを網羅しているものではありません。また、例示されている項目がすべて必要ということでもないことをご理解下さい。申請者の方々においては、本モックアップを参考とし、申請する個々の品目毎に適切な形で活用していただきたいと思っております。

2018 年 5 月

公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

本モックアップの作成を担当した者は以下のとおりです。(五十音順)

公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団、バイオ医薬検討ワーキンググループ

(○：ワーキンググループ・リーダー)

赤津 裕一	日本化薬 (株)
五十嵐 柳子	MSD (株)
石田 誠司	第一三共 (株) (現在、(株) そーせい)
大内 和枝	協和発酵キリン (株)
大村 武史	中外製薬工業 (株)
○久保寺 美典	中外製薬 (株)
瀬川 雅司	持田製薬 (株)
高塚 慎也	田辺三菱製薬 (株)
田中 祥吾	中外製薬工業 (株)
永岩 耕太	旭化成ファーマ (株) (現在、サノフィ (株))
中澤 秀夫	協和発酵キリン (株)
野沢 由子	ノバルティスファーマ (株)
増田 由美子	第一三共 (株)
三上 忠	バイオジェン・アイデック (株) (現在、一般財団法人 化学及血清療法研究所)
村上 公基	ファイザー (株)
柳田 哲博	中外製薬 (株)

## II. 新規生物薬品モックアップ、抗体医薬品版の作成にあたって

本モックアップの事例設定にあたっては、遺伝子組換え細胞を用いて製造されるモノクローナル抗体を有効成分とする下記の注射剤を想定しました。

- ・ 物質名：ヒューツムマブ（遺伝子組換え）
- ・ 特性：ヒトモノクローナル抗体、IgG1
- ・ 作用機序：エフェクター分子を介した細胞傷害活性を期待する抗体医薬品
- ・ 宿主細胞：CHO 細胞
- ・ 原薬：約 100 mg/mL
- ・ 製剤：100 mg/2 mL

原薬の製造工程については、ICH Q11 ガイドラインに記載されている Enhanced approach ではなく、現時点で企業側の経験が集積されている Traditional approach による開発を想定した記載例としました。

記載例の充実を図るため、S.2.6 製造工程の開発経緯としては、非臨床試験用原薬から商用原薬まで多くの製造方法の開発を行った例を記載しました。また、S.5 標準品又は標準物質としては、一次標準物質と常用標準物質を設定する記載例に加え、一次標準物質のみを設定する記載例も併記しました。加えて、製剤（2.3.P）としては液剤と凍結乾燥製剤の例を併記しました。

各セクションでは、本モックアップを読むにあたっての编者注（留意事項）及び解説を記載しています。

- ・ 编者注：個々の CTD セクションを読むにあたって全般的な留意事項を記載しています。
- ・ 解説：記載例の内容について補足説明を記載しています。

ヒューマンサイエンス振興財団では過去、オリジナルのモジュール 2.3 モックアップ(2002 年)を基に CTD 第 1 部承認申請書イメージについて検討しています（参考資料参照）。今回のモジュール 2.3 でも、承認申請書（モジュール 1.2）に記載する情報のイメージ部分を水色マーカー／網掛けで示しました。加えてその解説を「M1.2 解説」として記載しています。なお、承認申請書の情報のイメージ部分はあくまでも、申請者が申請時に承認申請書に記載する情報のイメージを示しており、承認レベルを表しているわけではないことをご理解ください。

### <CTD-Q 関連通知>

- Q2A：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（平成7年7月20日 薬審第755号）
- Q2B：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（平成9年10月28日、医薬審第338号）
- Q3C：医薬品の残留溶媒ガイドラインについて（平成10年3月30日、医薬審第307号）
- Q3D：医薬品の元素不純物ガイドラインについて（平成27年9月30日、薬食審査発0930第4号）
- Q5A：「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について（平成12年2月22日、医薬審第329号）
- Q5B：組換えDNA技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について（医薬審第3号、平成10年1月6日）
- Q5C：生物薬品（バイオテクノロジー応用製品／生物起源由来製品）の安定性試験について（平成10年1月6日、医薬審第6号）
- Q5D：「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）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」について（平成12年7月14日、医薬審第873号）
- Q5E：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）の製造工程の変更にもなう同等性／同質性評価について（平成17年4月26日、薬食審査発第0426001号）
- Q6B：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（平成13年5月1日、医薬審発第571号）
- Q7a：原薬GMPのガイドラインについて（平成13年11月2日、医薬発第1200号）
- Q8：製剤開発に関するガイドラインの改定について（平成22年6月28日、薬食審査発第0628第1号）
- Q11：原薬の開発と製造（化学薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）ガイドラインについて（平成26年7月10日、薬食審査発0710第9号）

### <参考資料>

- HS レポート No.43 CTD 第1部承認申請書イメージ(製造・規格)に関する説明会 記録
- HS レポート No.68 「生物薬品の承認書製造方法欄記載についての実態アンケート」に関する説明会

### III. 抗体医薬品を対象としたモジュール 2.3 モックアップ（記載例）

#### 目次

2.3. 緒言 .....	3
2.3.S 原薬（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	4
2.3.S.1 一般情報（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	4
2.3.S.1.1 名称 .....	4
2.3.S.1.2 構造 .....	5
2.3.S.1.3 一般特性 .....	7
2.3.S.2 製造（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	8
2.3.S.2.1 製造業者 .....	8
2.3.S.2.2 製造方法及びプロセス・コントロール .....	9
2.3.S.2.3 原材料の管理 .....	22
2.3.S.2.4 重要工程及び重要中間体の管理 .....	33
2.3.S.2.5 プロセス・バリデーション／プロセス評価 .....	35
2.3.S.2.6 製造工程の開発の経緯 .....	42
2.3.S.3 特性（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	49
2.3.S.3.1 構造その他の特性の解明 .....	49
2.3.S.3.2 不純物 .....	70
2.3.S.4 原薬の管理（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	71
2.3.S.4.1 規格及び試験方法 .....	71
2.3.S.4.2 試験方法（分析方法） .....	73
2.3.S.4.3 試験方法（分析方法）のバリデーション .....	82
2.3.S.4.4 ロット分析 .....	88
2.3.S.4.5 規格及び試験方法の妥当性 .....	92
2.3.S.5 標準品又は標準物質（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	97
2.3.S.6 容器及び施栓系（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	107
2.3.S.7 安定性（ヒューツムマブ、HS 製薬） .....	108
2.3.S.7.1 安定性のまとめ及び結論 .....	108
2.3.S.7.2 承認後の安定性試験計画の作成及び実施 .....	109
2.3.S.7.3 安定性データ .....	110
2.3.P 製剤（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	113
2.3.P.1 製剤及び処方（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	113
2.3.P.2 製剤開発の経緯（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	114
2.3.P.2.1 製剤成分 .....	114
2.3.P.2.2 製剤 .....	114
2.3.P.2.3 製造工程の開発の経緯 .....	114

2.3.P.2.4	容器及び施栓系 .....	114
2.3.P.2.5	微生物学的観点からみた特徴 .....	114
2.3.P.2.6	溶解液や使用時の容器／用具との適合性 .....	114
2.3.P.3	製造（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	115
2.3.P.3.1	製造者 .....	115
2.3.P.3.2	製造処方 .....	116
2.3.P.3.3	製造工程及びプロセス・コントロール .....	117
2.3.P.3.4	重要工程及び重要中間体の管理 .....	121
2.3.P.3.5	プロセス・バリデーション／プロセス評価 .....	121
2.3.P.4	添加剤の管理（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	122
2.3.P.5	製剤の管理（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	123
2.3.P.6	標準品及び標準物質（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	123
2.3.P.7	容器及び施栓系（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	123
2.3.P.8	安定性（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	123
2.3.A	その他 .....	124
2.3.A.1	製造施設及び設備（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg） .....	124
2.3.A.2	外来性感染性物質の安全性評価（ヒューツムマブ） .....	125
2.3.A.3	添加剤 .....	130

### 2.3. 緒言

申請する医薬品の、販売名、原薬の一般名、企業名、剤形、含量及び投与経路は下表のとおりである。

販売名	コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg
原薬の一般名	ヒューツムマブ（遺伝子組換え）
原薬の製造業者	HS 製薬株式会社
製剤の製造業者	HS 製薬株式会社
剤形	注射剤
含量	100 mg/2.0mL
投与経路	静脈内注射

#### 解説

ICH M4 (CTD) ガイドラインの 2.3 緒言の例示には「申請に係る適応症」と記載されているが、CMC の情報ではないことから本モックアップでは記載していない。

## 2.3.S 原薬（ヒューツムマブ、HS 製薬）

### 2.3.S.1 一般情報（ヒューツムマブ、HS 製薬）

#### 2.3.S.1.1 名称

编者注：ヒト抗体の例示です。

#### 1. 国際一般名（INN）

-----umab

#### 2. 一般的名称（JAN）

一般的名称

（日本名）

ヒューツムマブ（遺伝子組換え）

（英名）

-----umab (Genetical Recombination)

化学名又は本質

（日本名）

ヒューツムマブは、ヒト HS 抗原に対する遺伝子組換えヒト IgG1 モノクローナル抗体である。ヒューツムマブは、チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される。ヒューツムマブは、459 個のアミノ酸残基からなる H 鎖（ $\gamma$ 1 鎖）2 本及び 214 個のアミノ酸残基からなる L 鎖（ $\kappa$  鎖）2 本で構成される糖タンパク質（分子量：約 155,000<sup>①</sup>）である。

（英名）

-----umab is a recombinant human monoclonal IgG1 antibody against XXX. -----umab is produced in Chinese hamster ovary cells. -----umab is a glycoprotein (molecular weight: ca. 155,000) composed of two H-chains ( $\gamma$ 1-chains) consisting of 459 amino acid residues each and two L-chains ( $\kappa$ -chains) consisting of 214 amino acid residues each.

#### 3. 会社又は研究所コード

HS-2014, rMAb xxx

#### 4. CAS 番号

XXXXXXXXXX

#### 解説

- ① JAN に関する通知（薬食審査発第 0313001 号、平成 21 年 3 月 13 日、「医薬品の一般的名称の取扱いに関する事務手続等について」の一部改正について）では分子量が幅記載されていますが、約 155,000 のような幅記載ではない事例もあることから、本モックアップでは後者の記載例としています。

## 2.3.S.1.2 構造

### 1. 化学構造

ヒューツムマブは、遺伝子組換えヒト IgG1 モノクローナル抗体であり、459 個のアミノ酸残基からなる H 鎖 ( $\gamma$ 1 鎖) 2 本及び 214 個のアミノ酸残基からなる L 鎖 ( $\kappa$  鎖) 2 本で構成される。H 鎖 309 番目の Asn に N 型結合糖鎖の結合位置を有する。ヒューツムマブの L 鎖及び H 鎖のアミノ酸配列を図 2.3.S.1.2-1 に、主な糖鎖構造を図 2.3.S.1.2-2 に示す。

図 2.3.S.1.2-1 ヒューツムマブのアミノ酸配列

#### H 鎖

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFT	SYWMSWVRQA	PGKGLEWVAN
IKQEGSEKTY	VDA TKGRFTI	TRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREF
ESTMTSVNAD	YYYFYMDVWG	KGTTVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKRVEPK	SCDKTHTCPP	CPAPELLGGP
SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK
TKPREEQYNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK
AKGQPREPQV	YTLPPSREEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE
NNYKTTPPVL	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ
KSLSLSPGK				

図 2.3.S.1.2-1

ヒューツムマブのアミノ酸配列 (続)

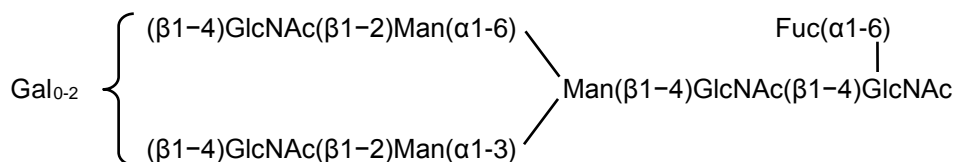
L鎖

ELGMTQSPSS	VSASVGDVRT	ITCRASHSIS	TYLNWYQQKP	GKAPKLLIYA
ASLQSGVPS	RFSGSGSGTD	FSLTINSLQP	EDFATYYCQQ	TFSPSGTFGQ
GTKVELKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYKHK	LYACEVTHQG
LSSPVTKSFN	RGEC			

H鎖 E1 : 部分的ピログルタミン酸 ; H鎖 N309 : 糖鎖結合 ; H鎖 K459 : 部分的プロセッシング  
 L鎖 C214—H鎖 C232, H鎖 C238—H鎖 C238, H鎖 C241—H鎖 C241 : ジスルフィド結合

図 2.3.S.1.2-2

ヒューツムマブの主な糖鎖構造



Fuc : フコース, Gal : ガラクトース, GlcNAc : N アセチルグルコサミン, Man : マンノース

2. 分子量及び分子式

C<sub>6536</sub>H<sub>10096</sub>N<sub>1736</sub>O<sub>2054</sub>S<sub>48</sub> : 147,395.62 (タンパク質部分, 4 本鎖)

H鎖 C<sub>2251</sub>H<sub>3472</sub>N<sub>594</sub>O<sub>693</sub>S<sub>18</sub> : 50,520.39

L鎖 C<sub>1017</sub>H<sub>1580</sub>N<sub>274</sub>O<sub>334</sub>S<sub>6</sub> : 23,181.45

解説

本モックアップで記載したアミノ酸配列は、JANに関する通知（薬食審査発第 0313001 号、平成 21 年 3 月 13 日）のヒト化抗体のアミノ酸配列をそのまま利用しました。

### 2.3.S.1.3 一般特性

ヒューツムマブの一般特性を表 2.3.S.1.3-1 に示す。

表 2.3.S.1.3-1 ヒューツムマブの一般特性

特性	ヒューツムマブ
構造	2.3.S.1.2 参照
分子量	約 150,000 Da
吸光係数	280 nm における E (1%, 1cm) は 13.8 であった。
等電点	約 7.4
生物活性	ヒューツムマブは、HS 抗原を発現する◎癌細胞株 XX-XX を使った機能性評価において CDC 活性を検出した。

#### 解説

CTD一品質に関する概括資料の原薬／製剤のモックアップ（記載例）」（2002年、（社）東京医薬品工業協会、大阪医薬品協会、（財）ヒューマンサイエンス振興財団）では、2.3.S.1.3 一般特性の内容が、2.3.S.1.2 構造の内容と重複していたので、本改訂版では内容を整理しました。

## 2.3.S.2 製造（ヒューツムマブ、HS 製薬）

### 2.3.S.2.1 製造業者

编者注：

- 2社以上で製造する場合には、分担の範囲を記載する。
- 規格試験及び重要な工程内管理試験を実施する外部試験機関はこの項に記載する。

HS 製薬株式会社（培養、精製、保管、試験）

東京都千代田区岩本町 2-22-2

IW 分析センター（外部試験機関 マイコプラズマ否定試験）

〇〇県〇〇町 1-2-3

#### 解説

##### S2.1 製造業者

- 製造業者名は、製造業許可証（又は外国製造業者認定証）と同じ記載とすることが望ましい（半角や全角の扱いは申請者の判断となる）。住所は丁目や番地、号などを省略した簡略記載もできる。本社住所の記載は必要ない。
- 原薬製造に使用するセル・バンクの保管施設は、通常、原薬の製造施設と同じであると考えられるため、本モックアップでは分けて記載していない。また、セル・バンクの更新施設は、将来更新前に決定されるので、本モックアップでは記載していない。
- ICH Q5D に例示されている「MCB や WCB の遠隔施設での分割保存」は社内管理事項にあたるため、その分割保存施設の情報を、本セクションに記載することは必須ではない。2社以上で製造する場合には、分担の範囲を簡潔に記載する。

##### M1.2 解説

- 初回申請時において将来の MCB、WCB の更新施設が決定していることは、通常、稀であると考えられるが、MCB、WCB の更新施設について、M1.2 への記載を PMDA から求められている事例があり、各社各様の対応をしている。そのようなケースの対応の一例としては、将来の MCB/WCB 更新施設が未定である場合、M1.2 に MCB/WCB 更新施設を「未定」、もしくは「更新の予定無し」と記載する。
- 規格試験を外部の試験施設で行う場合には、当該施設は外部試験機関として扱い、この項に記載する。
- 工程内管理試験の実施において、すべての試験項目について M1.2 に記載する必要は必ずしもなく、重要な工程内管理試験（例えばマイコプラズマ否定試験）を M1.2 に記載する。M1.2 に記載した工程内管理試験のうち、外部試験機関を M1.2 に記載する／しないは申請者が判断する。

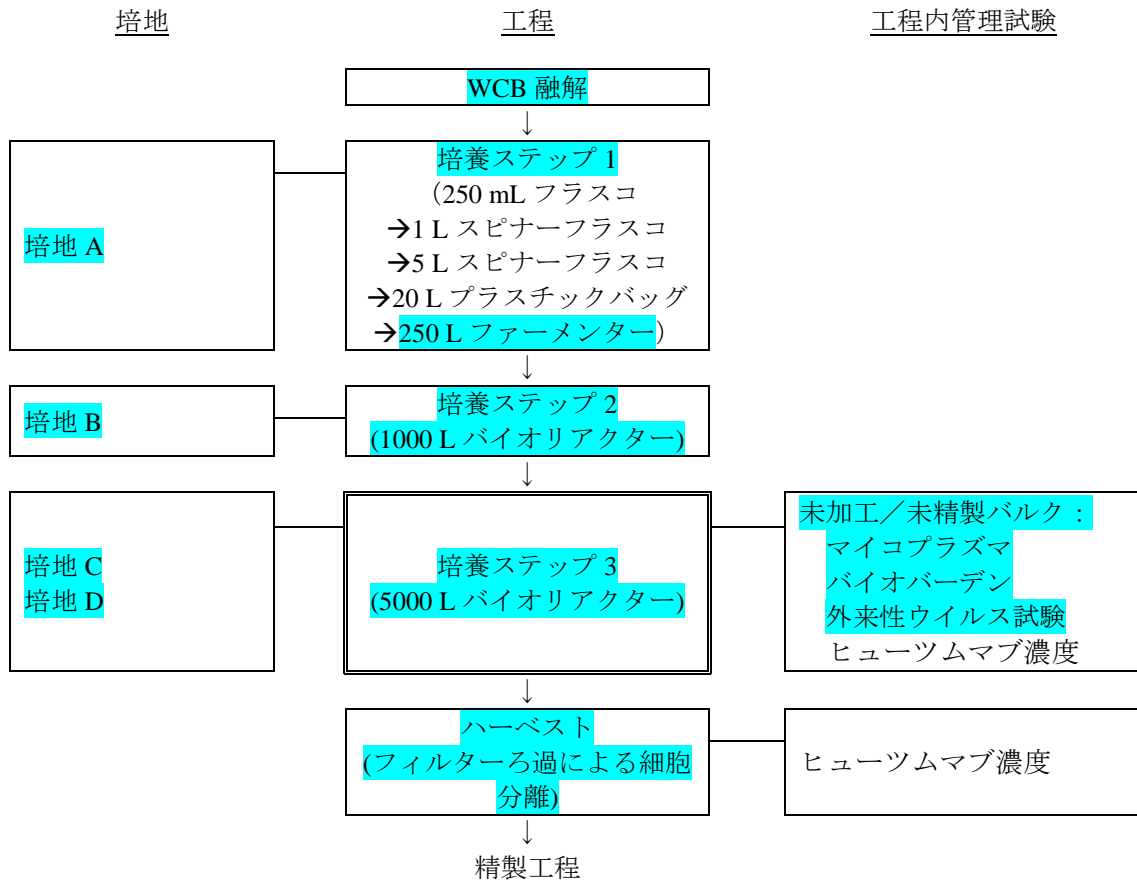
### 2.3.S.2.2 製造方法及びプロセス・コントロール

编者注：

- 各社の各抗体医薬品の製造方法及びプロセス・コントロールは、それぞれ異なるので、本セクションの記載方法もケースバイケースである。
- 以下で示す製造フローチャートでは、「工程内管理試験」として規格値又は適否の判定基準、もしくは処置基準で管理される工程内管理試験を記載している。加えて、それらの基準値を持たないモニタリングをテキスト部分（3項，4項）に含めた記載例となっている。本セクション（S.2.2）へ記載する工程内管理試験の選択方法は製造業者ごとに考え方が異なることがありえる。
- 本セクションは ICH Q11 ガイドラインに記載されている Enhanced approach ではなく Traditional approach に基づき記載している。

1. 製造フローチャート

1) 細胞培養及びハーベスト

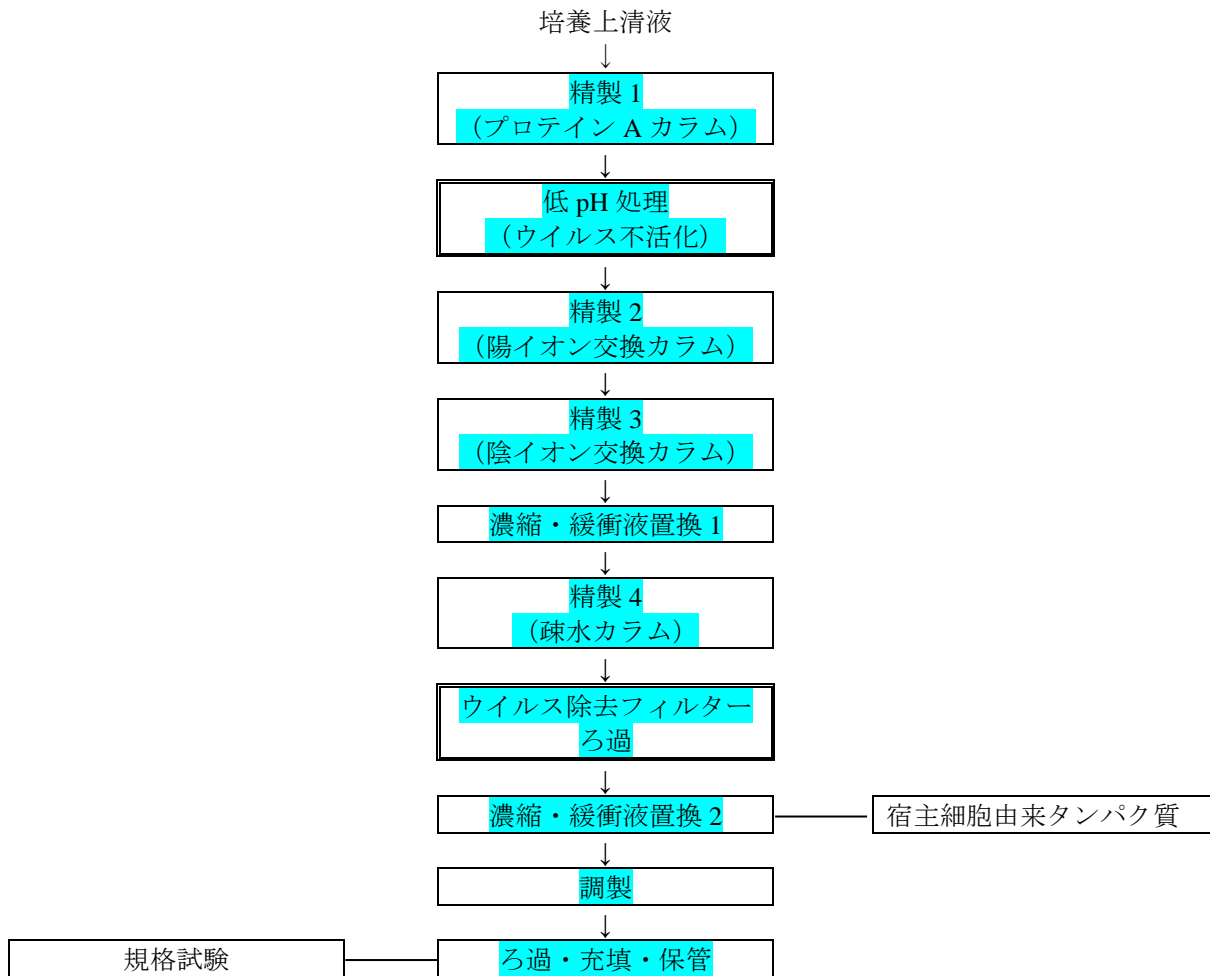


重要工程：

2) 精製工程

工程

工程内管理試験



重要工程：

解説 (製造フローチャート)

- 製造方法の内容はフローチャートとテキストで記載される。フローチャートとテキストの項目の順番（どちらを先に書くか、培養と精製を一体とするか、培養と精製を分けるか等）は申請者が判断すれば良い。また、フローチャートとテキストの関係、例えば、1) フローチャートで製造方法の概略を示しテキストで内容を説明する方法、2) ほぼ同じ内容のフローチャートと製造方法とする方法、3) フローチャートにより詳細を記載しテキストは重要な内容を記載する方法等、多くの選択肢があるが、申請者が判断すれば良い。本モックアップでは、1)の例示をしたが、2)のフローチャートの例として、別図（18ページ参照）のような記載も可能である。

## 2. ロット及びスケール

ロットの定義、ロット番号のナンバリング・システムの詳細は 3.2.S.2.2 参照。

### 解説 (ロット及びスケール)

ロットの定義、ロット・ナンバリング・システムの情報は、Module 3 に含め Module 2.3 では省略した記載例である。申請時では、商用原薬のロット・ナンバリング・システムが未確定の場合もありえる。そのような場合は、未定と記載する。

## 3. 細胞培養及びハーベスト

编者注：

- 一部変更承認申請対象事項／軽微変更届出対象事項のカッコ付けは承認申請書 (M1.2) のみに必要であり、CTD (M2.3, M3) では不要であるため、本モックアップでは記載していない。
- 培養工程で管理する工程パラメータの種類は、ICH ガイドラインや通知で求めているパラメータ (例：医薬品製造のためのイン・ビトロ細胞齢の上限値) 以外は、製品・製造業者でそれぞれ異なると考えられる。従って、本モックアップ中の工程パラメータも項目や数値 (例えば、培養期間) はあくまでも記載例であり、推奨項目・推奨値ではない。
- 培養工程で使用する培地の組成に関する情報は、本モックアップでは S.2.2 に記載したが、S.2.3 に記載するケースもある。

### 1) 細胞培養工程

細胞培養で使用する培地の組成を表 2.3.S.2.2-1 に示す。

#### ① 培養ステップ 1

凍結保存されている WCB バイアル 1~複数本中の細胞を融解し、その液を培地 A (表 2.3.S.2.2-1) を含む 250 mL フラスコへ加え、37°C で 2~4 日間培養する。その培養液を新しい培地 A を含む 250 mL フラスコへ加え、37°C で 2~4 日間培養することを繰り返す。

250 mL フラスコ中の培養液を、培地 A を含む 1 L スピナーフラスコへ加え 37°C で 2~4 日間培養する。この培養液を 1L スピナーフラスコ、5L スピナーフラスコ、20L プラスチックバッグ、250 L フェーメンターを用いて、順次、拡大培養する (培養温度：37°C、培養期間：2~4 日間)。

培養ステップ 1 では、培養液を試料として、細胞生存率、細胞密度をモニタリングする。

#### ② 培養ステップ 2

250 L フェーメンター中の細胞密度が  $\bullet \times 10^6$  cells/mL 以上となった時点で培養液を初発細胞密度が約  $\bullet \times 10^6$  cells/mL となるよう、約 900 L の培地 B (表 2.3.S.2.2-1) を含む

1000 L バイオリアクターへ加え、 $37 \pm X^{\circ}\text{C}$ 、溶存酸素●●%（設定値）で2~4日間培養する。培養液の pH が7付近となるよう、必要に応じて  $\text{CO}_2$  ガスや水酸化ナトリウム溶液を加える。

培養ステップ2では、培養液を試料として、細胞生存率、細胞密度をモニタリングする。

③ 培養ステップ3 [重要工程]

1000 L バイオリアクター中の細胞密度が $\bullet \times 10^6$  cells/mL 以上となった時点で培養液を初発細胞密度が約 $\bullet \times 10^6$  cells/mL となるよう、約4500 L の培地 C（表 2.3.S.2.2-1）を含む5000 L バイオリアクターへ加え、 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、溶存酸素●●%（設定値）で8-12日間培養する。培養液の pH が7付近となるよう、必要に応じて  $\text{CO}_2$  ガスや水酸化ナトリウム溶液を加える。培養●日目以降、必要に応じ培地 D（表 2.3.S.2.2-1）を添加する。培養液中のヒューツムマブ量が X.X mg/mL 以上である時点でハーベスト工程に移行する。

医薬品製造のためのイン・ビトロ細胞齢の上限値は、MCB 融解時を起点として●●●日である。

培養ステップ3では、ハーベスト前の培養液（未加工／未精製バルク）を試料として、以下の工程内管理試験を行う。

- (1) マイコプラズマ：「マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA 染色法）」に準じ試験する（適否の判定基準：陰性）。
- (2) バイオバーデン：生菌数試験を行う（処置基準：10 CFU/10 mL 未満）
- (3) 外来性ウイルス試験：*in vitro* 試験を行う（適否の判定基準：検出しない）
- (4) ヒューツムマブ濃度：アフィニティークロマトグラフィーでヒューツムマブ濃度を測定する（処置基準：X.X mg/mL 以上）

表 2.3.S.2.2- 1

## ヒューツムマブ原薬の培養工程で使用する培地の組成

培地名	成分	濃度
培地 A	基礎培地 AB <sup>1)</sup> 遺伝子組換えインスリン メトトレキサート ・・・ ・・・	■■ g/L ■■ μg/L ■■ mmol/L ■■ g/L ■■ g/L
培地 B	基礎培地 AB <sup>1)</sup> 遺伝子組換えインスリン ・・・ ・・・	■■ g/L ■■ μg/L ■■ g/L ■■ g/L
培地 C	基礎培地 CCC <sup>2)</sup> 遺伝子組換えインスリン ブタペプトン ・・・ ・・・	■■ g/L ■■ μg/L ■■ mg/L ■■ mg/L ■■ mg/L
培地 D	基礎培地 DDD <sup>3)</sup> ・・・ ・・・	■■ g/L ■■ mg/L ■■ mg/L

<sup>1)2)3)</sup> 基礎培地の組成は 2.3.S.2.3 参照

## 2) ハーベスト工程

培養ステップ 3 終了後、全培養液をハーベストし、フィルターろ過（デプスフィルトレーション）にて細胞を分離し、回収した液を孔径○○ μm のフィルターでろ過して培養上清液を得る。

工程内管理試験：培養上清液を試料としてアフィニティークロマトグラフィーでヒューツムマブ濃度を測定する。（処置基準：X.X mg/mL 以上）

## 解説

## 3. 培養

- ・ 培養の記載において、培養ステップ 1、2、3 の用語を使用しているが、特にこれらの用語の使用を要求しているものではない。例えば、種培養、播種培養、生産培養や、前培養や本培養など、申請者が決めた用語を用いることで良い。機器の名称についても同様であり、例えば、培養に供する機器を、培養タンク、培養装置、バイオリアクター、ファーメンター等申請者が決めた用語を用いることで良い。
- ・ 機器のスケール等についても、どのようなスケールで作業を行うかを示すことが主目的であり、申請者が決めたスケールを記載する（培養容器のスケールであれば表示ス

ケール、使用可能な最大スケール、使用不可能な部分を含めた空間容量など、培養液容量としてのスケールであれば標準的に使用する培養液のスケールを申請者が判断し記載する。また、その数値は前述の目的に沿ったおおよその量を示す。

- 本モックアップでは培養スケールとして、培養槽スケールのみを記載した工程（培養ステップ 1）と、培養槽スケールに加え培養液の容量を記載した工程（培養ステップ 2、3）を示した記載例とした。
- 工程パラメータ値の記載方法としては、幅記載（例：37±2℃，35～39℃）以外に、上下限記載（例：≤39℃），目標値／設定値（例：37℃）での記載など、ケースバイケースと考えられる。（工程パラメータ値の記載方法が，M2.3 と承認申請書 M1.2 では異なるケースもありえる。）
- 本モックアップでは培養温度で幅記載していないものと幅記載してあるものがある。前者は装置の制約上、設定値記載したもの、後者は温度幅管理できる装置を使用している記載例である。
- 用語の自由度は、培養に限らず、製造方法及びその他の項目においても、同様である。ただし、局方や ICH など公的な文書で使用されている用語については、その使用が必要な場合や望ましいとされる場合もある。
- 未加工／未精製バルクに対する工程内管理試験として、マイコプラズマ否定試験、バイオバーデン（生菌数試験）、外来性ウイルス試験を設定した記載例とした。未加工／未精製バルクの外来性ウイルス試験については、本モックアップでは lot-to-lot で試験する記載例としたが、ICHQ5A に記載されているとおり「以降の各製造バッチ中の外来性ウイルスについても、製造業者が引き続き評価するための計画を作成することが望まれる。」ことを考慮し、試験の範囲、程度及び頻度（定期的な試験）が決定される。
- 未加工／未精製バルクのマイコプラズマ否定試験として培養法及び DNA 染色法の組み合わせを例示したが、代わりに NAT 法も使用できる（日本薬局方参考情報を参照のこと）。

#### 4. 精製工程

精製工程で使用する緩衝液の組成を表 2.3.S.2.2-2 に示す。

##### 1) 精製 1（プロテイン A カラム）

培養上清液を、リン酸緩衝液 1 で平衡化したベッド高 25 cm のプロテイン A アフィニティカラム（〔商品名〕又は同等品）にヒューツムマブをカラム 1 L あたり 30 g 以下となるよう負荷する。

リン酸緩衝液 1 で洗浄した後、酢酸緩衝液 1 でヒューツムマブを溶出する（線速度 150 cm/h）。OD280nm=X.X 以上の分画を取得する。

精製 1 では、収率、バイオバーデンをモニタリングする。

- 2) 低 pH 処理 (ウイルス不活化) [重要工程]  
精製 1 の工程液を 5 mol/L 酢酸で pH 3.6 以下とし、15°C 以上で 60 分以上保持する。● mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 5.0 とし、デプスフィルターでろ過する。
- 3) 精製 2 (陽イオン交換カラム)  
低 pH 処理ステップで得られた工程液を 2 または 3 分割し、酢酸緩衝液 2 で平衡化したベッド高 25 cm の陽イオンカラム ([商品名] 又は同等品) にヒューツムマブを線速度 150 cm/h で、カラム 1 L あたり 30 g 以下となるよう負荷する。カラムの 5 倍量の酢酸緩衝液 2 で洗浄した後、酢酸緩衝液 3 を初期液とし、酢酸緩衝液 4 濃度が 80% となるまで直線濃度勾配でヒューツムマブを溶出する (線速度 150 cm/h)。OD280nm=X.X 以上から分取を開始し OD280nm=Y.Y 以下となった時点で分画を終了する。以上の操作を分割数に応じて繰り返す。  
精製 2 では、収率、バイオバーデンをモニタリングする。
- 4) 精製 3 (陰イオン交換カラム)  
精製 2 の工程液を、リン酸緩衝液 2 で平衡化したベッド高 25 cm の陰イオン交換カラム ([商品名] 又は同等品) にヒューツムマブをカラム 1 L あたり 150 g 以下となるように通液し、続けてリン酸緩衝液 2 を通液し (線速度: 150 cm/h)、OD280nm=X.X 以上の分画を取得する。  
精製 3 では、収率、バイオバーデンをモニタリングする。
- 5) 濃縮・緩衝液置換 1  
精製 3 の工程液を、限外ろ過膜 (分画分子量約 30,000) で 1/10 までに濃縮した後、濃縮液の 5 倍量のトリス緩衝液 1 で緩衝液置換する。  
本工程では、収率をモニタリングする。
- 6) 精製 4 (疎水カラム)  
濃縮・緩衝液置換 1 の工程液を、トリス緩衝液 1 で平衡化したベッド高 30 cm の疎水カラム ([商品名] 又は同等品) にヒューツムマブをカラム 1 L あたり 20 g 以下となるよう負荷する。トリス緩衝液 2 で洗浄した後、トリス緩衝液 3 でヒューツムマブを溶出する (線速度 100 cm/h)。OD280nm=X.X 以上の分画を取得する。  
精製 4 では、収率、バイオバーデンをモニタリングする。
- 7) ウイルス除去フィルターろ過 [重要工程]  
精製 4 の工程液をウイルス除去フィルター ([商品名] 又は同等品) でろ過し (負荷量 300 L/m<sup>2</sup>以下、●MPa 以下)、トリス緩衝液 4 で洗浄する。ウイルス除去フィルターの完全性を確認する。ろ液は必要に応じて、5°C で●●時間保持可能である。  
本工程では、収率をモニタリングする。

8) 濃縮・緩衝液置換 2

ウイルス除去フィルターろ過の工程液を、限外ろ過膜（分画分子量約 30,000）で 1/5 までに濃縮した後、濃縮液の ■ 倍量のリン酸緩衝液 2 で緩衝液置換及び濃縮しヒューツムマブ濃度を約 100 mg/mL とする。

工程内管理試験：

①ELISA 法で工程液中の宿主細胞由来タンパク質（Host cell protein [HCP]）含量を測定する（処置基準：■■ ng/mg 以下）。

本工程では収率をモニタリングする。

9) 調製

濃縮・緩衝液置換 2 の工程液に 10% ポリソルベート 80 溶液を添加し、ポリソルベート 80 の濃度を 0.5% とする。● mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.3 とする。

10) ろ過・充填・保管

調製ステップの工程液をろ過（孔径 0.2 μm）し、1 L プラスチック製容器に充填する。-20°C で保管する。

表 2.3.S.2.2- 2

ヒューツムマブ原薬の精製工程で使用する緩衝液の組成

名称	組成
リン酸緩衝液 1	20 mmol/L リン酸緩衝液、pH 7.5
酢酸緩衝液 1	100 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 3.6
酢酸緩衝液 2	50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0
酢酸緩衝液 3	10 mmol/L 塩化ナトリウム、 50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0
酢酸緩衝液 4	1 mol/L 塩化ナトリウム、 50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0
リン酸緩衝液 2	30 mmol/L リン酸緩衝液、pH 6.5
トリス緩衝液 1	1.8 mol/L 硫酸アンモニウム、20 mmol/L トリス塩酸緩衝液、pH 7.5
トリス緩衝液 2	1.2 mol/L 硫酸アンモニウム、20 mmol/L トリス塩酸緩衝液、pH 7.5
トリス緩衝液 3	◆◆ mmol/L 塩化ナトリウム、20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 pH 7.5
トリス緩衝液 4	◆◆ mmol/L トリス塩酸緩衝液、pH 7.5

## 5. 再加工

ウイルス除去フィルターろ過でフィルターの完全性が確認できなかった場合には、総ろ過回数3回を上限に再ろ過を行う。

### 解説

#### 4. 精製

- ・ クロマトグラフィーのレジンの種類を、本モックアップでは「[商品名] 又は同等品」との記載方法で示した。別の記載方法としては、官能基及び基材の組合せがある（例：プロテイン A を結合させたセファロース担体）。
- ・ ウイルス除去フィルターの種類を、本モックアップでは「[商品名] 又は同等品」との記載方法で示し、その孔径を示さなかった。これは、メーカーやフィルターの機能に伴い、孔径値を公表していないケースがあるためである。一方、孔径情報が公開されている場合は、孔径を記載し商品名を記載しない方法も取りえる。
- ・ クロマトグラフィー・カラムの高さとして、平均的なベッド高さを記載するケース、またはカラム（外筒）の高さ（カラム高）を記載するケースなどがあり、各申請者が判断すればよい。
- ・ クロマトグラフィー・カラムへの負荷量を、「ヒューツムマブをカラム 1 L あたり ● g 以下」と記載したが、厳密にはヒューツムマブ以外の不純物を含むタンパク質の重量値であることを理解した上での記載である。
- ・ クロマトグラフィーステップにおける分取条件を本モックアップでは記載することとし、パラメータとして吸光度（OD）での記載例を示した。分取条件として、カラム容量（CV）などを指標にした分取がありえる。また、分取条件が製品品質に重要ではないクロマトグラフィー工程もありえる。
- ・ 精製 3：陰イオン交換クロマトグラフィー：フロースルー・モード（結合—溶出モードではない）の記載例である。
- ・ 低 pH 処理（ウイルス不活化）の工程パラメータの記載法として、本モックアップでは、ワーストケース（上限もしくは下限）の記載例を示した。別の記載方法としては、製品標準書に記載されている目標値／設定値を申請資料に記載する場合もある。
- ・ 1 つの工程プール液を分割して精製する場合の記載方法については、GMP の範囲として記載しない方法も可能である。本モックでは分割数を記載する例示とした。
- ・ 工程内管理試験の処置基準値の不等号の向きを、許容範囲側、処置を必要とする範囲側のいずれにするかは、製造業者ごとの考え方に従う。

### M1.2 解説

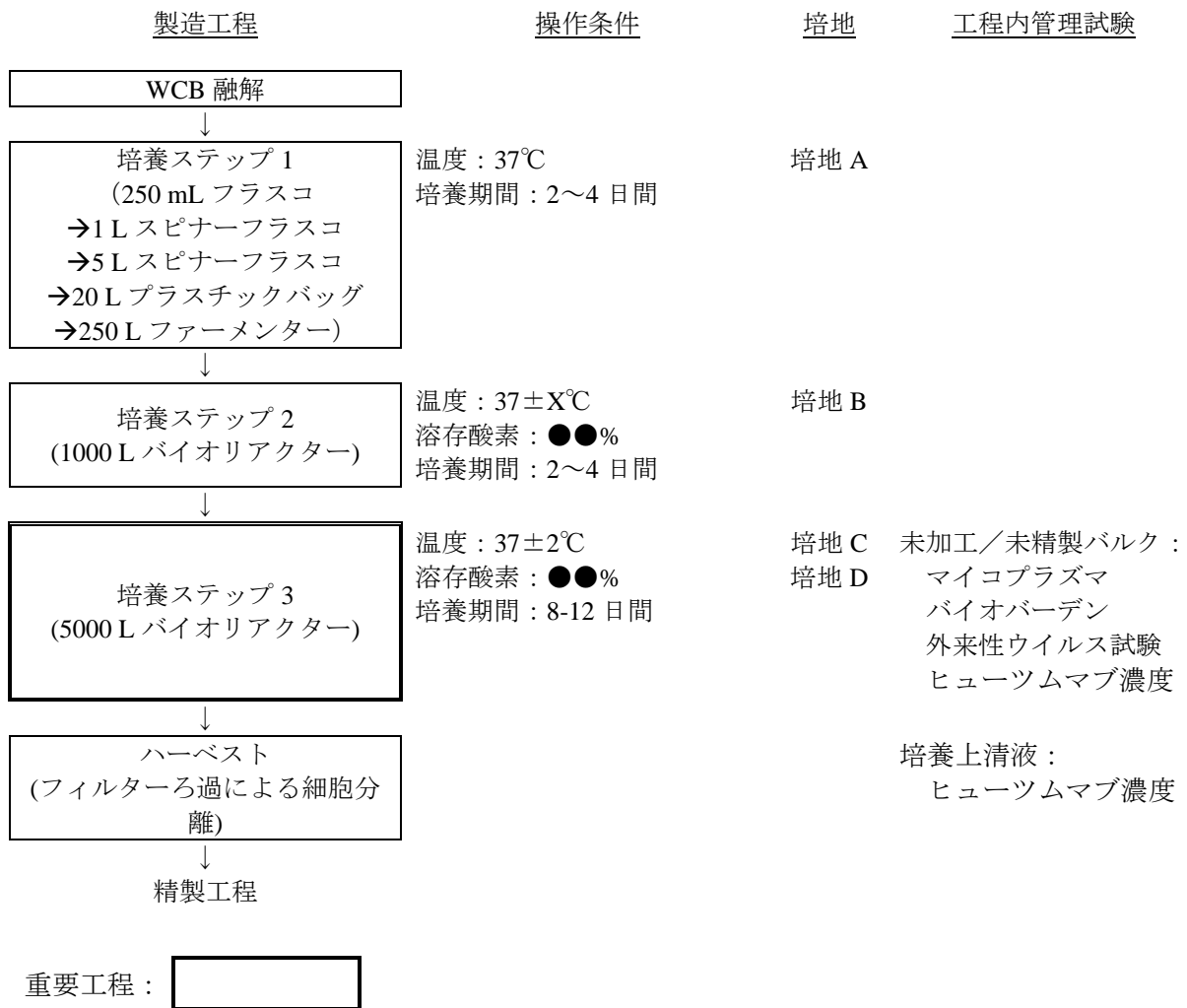
- ・ 工程内管理試験

本モックアップでは、M2.3 に記載した工程内管理試験すべてを M1.2 に記載するのではなく、「規格値／適否の判定基準を持つ工程内管理試験」（培養ステップ 3 のマイコプラズマ否定試験と外来性ウイルス試験）と、「処置基準を持つ工程内管理試験」の内、申請者が

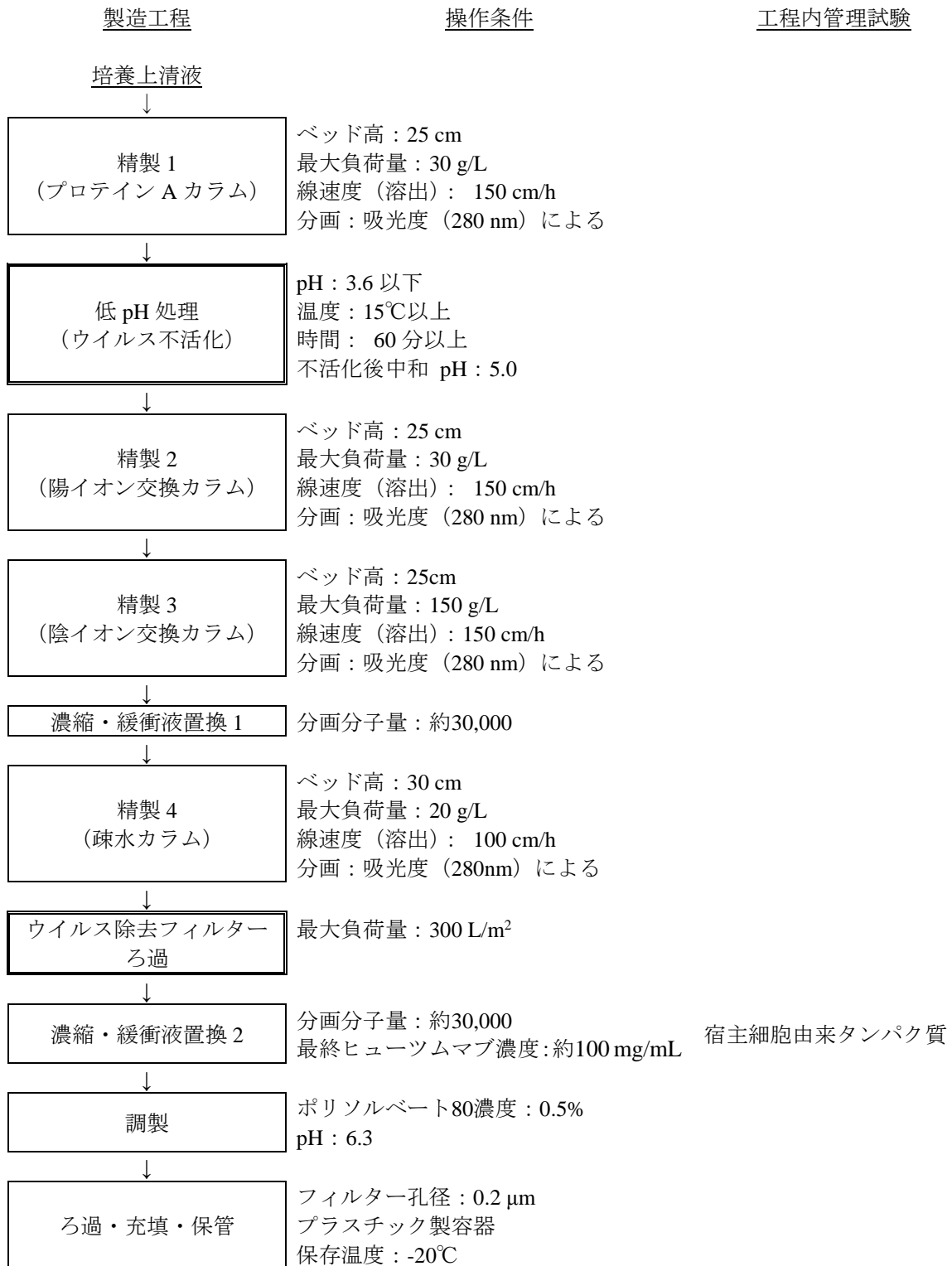
品質管理の視点で重要と判断した試験（培養ステップ3のバイオバーデン）のみを M1.2 に記載する例示とした。一方、培養ステップ3のヒューツムマブ濃度等も「処置基準を持つ工程内管理試験」であるが、社内管理の位置づけの試験であるため申請者が M1.2 に記載しないと判断した例示となっている。

- 工程液の保持（ウイルス除去フィルターろ過工程）について  
通常、保持条件は社内 GMP 管理のため、申請者が M1.2 に記載しないと判断した例示とした。

図 細胞培養及びハーベスト



## 図 精製工程



重要工程：

### 2.3.S.2.3 原材料の管理

#### 1. 原薬の製造に使用される原材料

编者注：

- ・ 培地及び緩衝液の組成の情報は、申請者が S.2.2 もしくは S.2.3 に記載すればよい。
- ・ 基礎培地組成の情報提示方法としてマスターファイルを利用することもできる。

ヒューツムマブ原薬の製造工程で使用される原材料は、受入れ基準に適合することを確認された後、原薬の製造に使用される。原薬の製造に使用される原材料を表 2.3.S.2.3-1 に示す。

表 2.3.S.2.3- 1 原薬の製造に使用される原材料

原材料名	使用される工程	グレード
基礎培地 AB	培養工程	供給元規格
基礎培地 CCC	培養工程	供給元規格
基礎培地 DDD	培養工程	供給元規格
遺伝子組換えヒトインスリン	培養工程	供給元規格
メトトレキサート	培養工程	供給元規格
ブタペプトン	培養工程	供給元規格
・・・	・・・	・・・
酢酸ナトリウム	精製工程	供給元規格
酢酸	精製工程	供給元規格
塩化ナトリウム	精製工程	供給元規格
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	精製工程	供給元規格
硫酸アンモニウム	精製工程	供給元規格
精製水	培養工程・精製工程	社内規格
リン酸水素ナトリウム水和物	精製工程	日本薬局方
リン酸二水素ナトリウム	精製工程	医薬品添加物規格
ポリソルベート 80	精製工程（調製ステップ）	日本薬局方
水酸化ナトリウム	精製工程（調製ステップ）	日本薬局方
注射用水	精製工程（調製ステップ）	日本薬局方

培養工程で使用される基礎培地の組成については、表 2.3.S.2.3-2～表 2.3.S.2.3-4 に示す。

表 2.3.S.2.3- 2 基礎培地 AB の組成

成分	濃度
L-アスパラギン	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地 AB の■■g を水 1 L に溶解したときに含まれる組成)

表 2.3.S.2.3- 3 基礎培地 CCC の組成

成分	濃度
L-ロイシン	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地 CCC の■■g を水 1 L に溶解したときに含まれる組成)

表 2.3.S.2.3- 4 基礎培地 DDD の組成

成分	濃度
グルコース	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地 DDD の■■g を水 1 L に溶解したときに含まれる組成)

**解説**

- 培地組成：基礎培地の組成（成分・濃度）の情報の申請資料への記載は、日本特有の要件である。基礎培地組成の情報は申請資料に記載する、もしくはマスターファイルの制度を利用する。
- 添加剤：日局に記載されていないが、USP/NF、EP に記載されている水和物を使用する場合、本項では「米国／欧州薬局方(準拠)」と記載する（例：リン酸水素二ナトリウム・7水和物）。

## 2. 生物起源の原材料の管理

编者注：

セル・バンク調製に使用した宿主細胞自体の情報は3項に記載し、本項に記載していないが、セル・バンクに使用したヒト又は動物に由来する原材料の情報はこの項に記載した。

ヒューツムマブ原薬の製造工程で使用される原材料の内、セル・バンク以外のヒト又は動物に由来する原材料は以下のとおりである。以下の生物起源の原材料は、生物由来原料基準（平成26年9月26日制定（厚生労働省告示第375号））に適合していると考えられる。

### ブタペプトン

ブタペプトンは、健康なブタに由来するもので、その製造工程では●℃で●分以上の加熱を含む。この処理条件は、外来性感染性物質（ウイルスなど）を不活化するのに十分と考えられる。

### 解説

本項の記載においては、生物由来原料基準（平成26年9月26日制定（厚生労働省告示第375号））及び「生物由来原料基準の運用について」（薬食審査発1002第1号，薬食機参発1002第5号（平成26年10月2日））を参照のこと。TSEの不活化条件についてはEMAガイダンス「Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products」（EMA/410/01 Rev. 3, 2011）も参照できる。

### 3. 細胞基材の起源、履歴及び作製

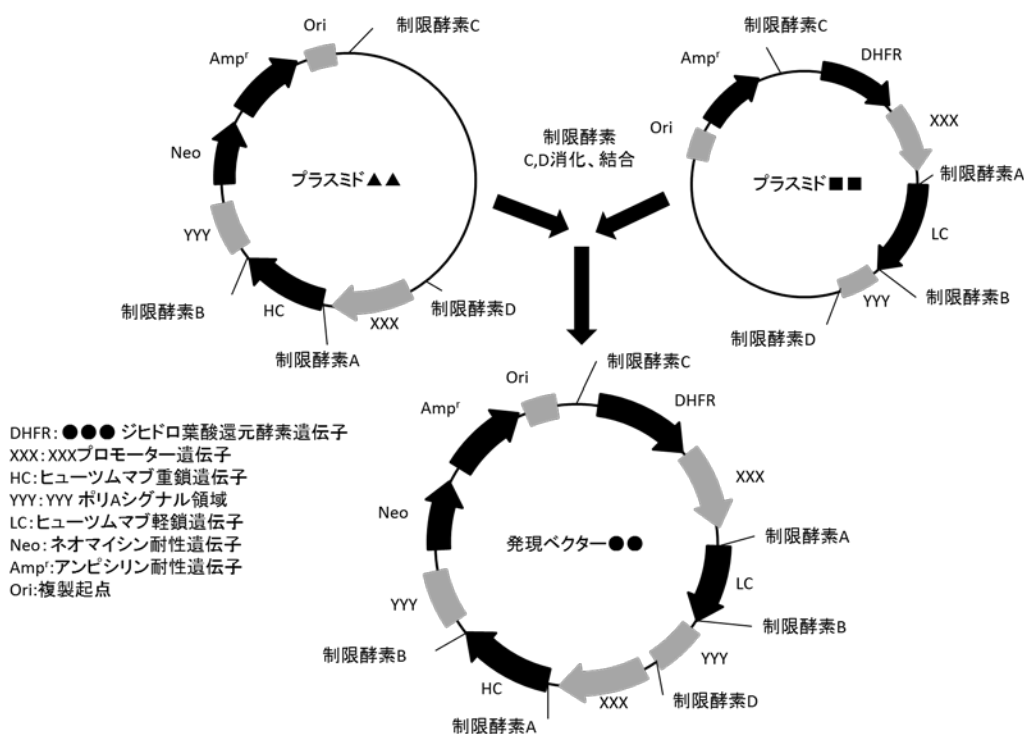
#### 1) 遺伝子発現構成体

マウス抗体遺伝子を欠損させ、ヒト抗体遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを、ヒト HS 抗原で免疫し、その脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を融合させることによりハイブリドーマが作製された。ハイブリドーマの mRNA からヒト HS 抗原に対する IgG1 の重鎖及び軽鎖をコードする cDNA 断片を作製した。

発現ベクター●●の構造及び作製フローを図 2.3.S.2.3-1 に示す。ヒューツムマブの重鎖をコードする cDNA 断片を、[制限酵素 A] 及び [制限酵素 B] で切断したプラスミド●●に結合し、プラスミド▲▲を作製した。別にヒューツムマブの軽鎖をコードする cDNA 断片を、[制限酵素 A] 及び [制限酵素 B] で切断したプラスミド○○に結合し、プラスミド■●を作製する。次に、プラスミド▲▲及びプラスミド■●をそれぞれ、[制限酵素 C] 及び [制限酵素 D] で切断し、軽鎖をコードする cDNA 断片を含む DNA 断片及び重鎖をコードする cDNA 断片を含む DNA 断片を結合させて、発現ベクター●●を作製した。

ヒューツムマブの重鎖、軽鎖をコードする遺伝子の DNA 塩基配列をそれぞれ図 2.3.S.2.3-2、図 2.3.S.2.3-3 に示す。

図 2.3.S.2.3-1 遺伝子発現構成体の構造及び作製フローチャート



#### 解説

DHFR: ●●●ジヒドロ葉酸還元酵素の●●●部は動物種名が入ることをイメージしています。

図 2.3.S.2.3-2 ヒューツムマブ重鎖をコードする遺伝子の DNA 塩基配列

1001	1100
XXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX	
	X X X X X X X X X X X X X
1101	1200
XXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX	
X X X X X X X X X X E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A	

(以下, 略)

図 2.3.S.2.3-3 ヒューツムマブ軽鎖をコードする遺伝子の DNA 塩基配列

(図 2.3.S.2.3-2 と同様)

2) 宿主細胞

宿主細胞は、◎◎らにより樹立されたチャイニーズハムスター卵巢由来の細胞株 CHO-XXX 株であり、■■から入手した。CHO-XXX 株は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を欠損しており、ヒポキサンチン及びチミジン要求性の特性を有する。

3) マスター・セル・バンク (MCB) 作製用細胞株, ロット ZZZ の調製

宿主細胞 CHO-XXX 株に○○法で発現ベクター●●を導入した。次に、■■を含まない培地 X (●%のウシ胎児血清を含む) で培養し、遺伝子導入細胞を選択した。次に、遺伝子増幅のためにメトトレキサート (MTX) を含む培地 X (●%のウシ胎児血清を含む) を用いて培養を行い、ヒューツムマブの産生量を指標として、細胞を選抜した。ここで選抜した細胞株 YYY を●●法でクローニングし、MCB 作製用細胞株 ZZZ を得て、●%のウシ胎児血清及び●%のジメチルスルホキシドを含む凍結用培地に懸濁し保存した。

#### 4. セル・バンクシステム、特性解析及び試験方法

##### 1) マスター・セル・バンク (MCB) ロット●●の調製

MCB 作製用細胞株ロット ZZZ を、●%のウシ胎児血清を含む F-12 培地を用いて 37°C で培養した。拡大培養後、遠心濃縮し、●%のウシ胎児血清及び●%のジメチルスルホキシドを含む F-12 培地 (凍結用培地) に懸濁し、約●×10<sup>7</sup> cells/mL の濃度に調整した。この細胞懸濁液を●mL プラスチックバイアルに分注、凍結し、●●●本の MCB (ロット●●) を調製した。

なお、ウシ胎児血清 (米国、オーストラリア、ニュージーランド産) は、生物由来原料基準に適合するものを使用した。

MCB は液体窒素タンク内で保存する。

##### 2) ワーキング・セル・バンク (WCB) ロット●●の調製

MCB (ロット●●) を、無血清の培地 A (表 2.3.S.2.2-1 参照) を用いて 37°C で培養した。拡大培養後、遠心濃縮し、●%のジメチルスルホキシドを含む無血清培地 A (凍結用培地) に懸濁して約●×10<sup>7</sup> cells/mL の濃度に調整した。この細胞懸濁液を●mL プラスチックバイアルに分注、凍結し、●●●本の WCB (ロット●●) を調製した。

WCB は液体窒素タンク内で保存する。

##### 3) セル・バンクの特性解析試験及び純度試験

###### ① MCB

MCB (ロット●●) の特性解析試験、純度試験の結果をそれぞれ表 2.3.S.2.3-5、表 2.3.S.2.3-6 に示す。

表 2.3.S.2.3-5 MCB ロット●●の特性解析試験結果

試験項目／分析方法	試験方法	試験結果
DNA 塩基配列	核酸増幅物について、ヒューツムマブ遺伝子の塩基配列を確認する	期待されるヒューツムマブ遺伝子の塩基配列と一致した
DNA の挿入・欠失の確認	サザンブロット法にて、DNA の制限酵素 (●●) 消化パターンを解析する	ヒューツムマブ遺伝子に挿入・欠失を認めなかった
DNA コピー数	●●法にて、細胞あたりの DNA コピー数を測定する。	細胞あたり約●●コピーの挿入を確認した。
確認試験 (細胞由来)	アイソザイムの電気泳動パターンを評価する	ハムスター由来細胞のパターンと一致した

表 2.3.S.2.3-6 MCB ロット●●の純度試験結果

試験項目／分析方法	試験方法	試験結果	
無菌試験	無菌試験法（日本薬局方）	陰性	
マイコプラズマ否定試験	マイコプラズマ否定試験（日本薬局方 参考情報）：培養法・DNA 染色法	マイコプラズマの混入は検出されなかった	
ウイルス試験	感染性試験	感受性細胞（ミンク S <sup>+</sup> L <sup>-</sup> 細胞）を用いて、レトロウイルスの感染性について調べる	感染性は認められなかった
	電子顕微鏡観察	電子顕微鏡によりレトロウイルス及びレトロウイルス様粒子の存在を調べる	CHO 細胞で存在を知られた A 型, C 型レトロウイルス様粒子以外のウイルス及びウイルス様粒子は検出されなかった
	逆転写酵素活性	逆転写酵素活性を調べる	逆転写酵素活性は認められなかった
	<i>In vitro</i> 試験	指示細胞 (MRC-5、Vero 及び CHO 細胞) に接種し、それぞれ、細胞変性及び血球凝集を調べる	ウイルス混入を示す結果は認められなかった
	<i>In vivo</i> 試験	動物（成熟マウス、乳のみマウス）及び発育鶏卵に接種し、動物の健康状態及び鶏胚の状態を観察する	ウイルス混入を示す結果は認められなかった
	抗体産生試験	ウイルスフリーのハムスターに接種し飼育後、血清中のウイルス（LCM、PVM、Reo3、Sendai Virus、SV5）に対する抗体レベルを測定する。	ウイルス混入を示す結果は認められなかった
	ウシウイルス試験	指示細胞（Bovine turbinate、Vero 細胞）に接種し、それぞれ、細胞変性及び血球凝集を調べる	ウイルス混入を示す結果は認められなかった
	ブタウイルス試験	指示細胞（Vero 細胞）に接種し、それぞれ、細胞変性及び血球凝集を調べる	ウイルス混入を示す結果は認められなかった

② WCB

WCB（ロット●●）の特性解析試験及び純度試験の結果を表 2.3.S.2.3-7 に示す。

表 2.3.S.2.3-7 WCB ロット●●の特性解析試験・純度試験結果

試験項目／分析方法	試験方法	試験結果
確認試験（細胞由来）	アイソザイムの電気泳動パターンを評価する	ハムスター由来細胞のパターンと一致した
無菌試験	無菌試験法（日本薬局方）	陰性
マイコプラズマ否定試験	マイコプラズマ否定試験（日本薬局方 参考情報）：培養法・DNA 染色法	マイコプラズマの混入は検出されなかった
<i>In vitro</i> 試験	指示細胞（MRC-5、Vero 及び CHO 細胞）に接種し、それぞれ、細胞変性及び血球凝集を調べる	ウイルス混入を示す結果は認められなかった
<i>In vivo</i> 試験	動物（成熟マウス、乳のみマウス）及び発育鶏卵に接種し、動物の健康状態及び鶏胚の状態を観察する	ウイルス混入を示す結果は認められなかった

③ 医薬品製造のために *in vitro* 細胞齢の上限にまで培養された細胞（CAL）の特性解析試験及び純度試験

WCB ロット●●から S.2.2 に記載した製造条件で培養し、生産培養工程後の細胞（MCB 融解時を起点として *in vitro* 細胞齢：培養期間〇〇日）を CAL として調製した。この CAL の特性解析試験、純度試験の結果をそれぞれ表 2.3.S.2.3-8、表 2.3.S.2.3-9 に示す。

表 2.3.S.2.3-8 CAL の特性解析試験結果

試験項目／分析方法	試験方法	試験結果
DNA 塩基配列	核酸増幅物について、ヒューツムマブ遺伝子の塩基配列を確認する	期待されるヒューツムマブ遺伝子の塩基配列と一致した
DNA の挿入・欠失の確認	サザンブロット法にて、DNA の制限酵素 (●●) 消化パターンを解析する	ヒューツムマブ遺伝子に挿入・欠失を認めなかった
DNA コピー数	●●法にて、細胞あたりの DNA コピー数を測定する。	細胞あたり約●●コピーの挿入を確認した。
確認試験 (細胞由来)	アイソザイムの電気泳動パターンを評価する	ハムスター由来細胞のパターンと一致した

表 2.3.S.2.3-9 CAL の純度試験結果

試験項目／分析方法	試験方法	試験結果	
無菌試験	無菌試験法 (日本薬局方)	陰性	
マイコプラズマ否定試験	マイコプラズマ否定試験 (日本薬局方 参考情報) : 培養法・DNA 染色法	マイコプラズマの混入は検出されなかった	
ウイルス試験	感染性試験	感受性細胞 (ミンク S <sup>+</sup> L <sup>-</sup> 細胞) を用いて、レトロウイルスの感染性について調べる	感染性は認められなかった
	電子顕微鏡観察	電子顕微鏡によりレトロウイルス及びレトロウイルス様粒子の存在を調べる	CHO 細胞で存在を知られたレトロウイルス様粒子以外のウイルス及びウイルス様粒子は検出されなかった
	逆転写酵素活性	逆転写酵素活性を調べる	逆転写酵素活性は認められなかった
	<i>In vitro</i> 試験	指示細胞 (MRC-5、Vero 及び CHO 細胞) に接種し、それぞれ、細胞変性及び血球凝集検出せず	ウイルス混入を示す結果は認められなかった
	<i>In vivo</i> 試験	動物 (成熟マウス、乳のみマウス) 及び発育鶏卵に接種し、動物の健康状態及び鶏胚の状態を観察する	ウイルス混入を示す結果は認められなかった

## 解説

- ウイルス試験 *in vitro* 試験：指示細胞としてヒト由来細胞 (MRC-5)、霊長類由来細胞 (Vero) および生産細胞に近い細胞株 (CHO) を用いた記載例である。細胞株由来や混入の可能性のあるウイルス種類を考慮し、他の指示細胞を使用する、もしくは他の試験法 (例：ウイルス種特異的な PCR 法) を設定することもできる。
- ウイルス試験 *in vitro* 試験：ICH Q5A (医薬審 第 329 号、平成 12 年 2 月 22 日) では「細胞変性及び 血球凝集 を判定法とするウイルス検査を実施すること。」と記載されているが、下線部は ICH Q5A 原文より「血球吸着」の誤訳と考えられる。
- レトロウイルス感染性試験：レトロウイルスの宿主域として同種指向性 (ecotropic)、異種指向性 (xenotropic)、多指向性 (polytropic) および両指向性 (amphotropic) が知られる。本モックアップでは異種指向性および両指向性レトロウイルスを検出する試験法としてミンク S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> 細胞を用いた感染性試験を示した。
- 逆転写酵素活性：Mg<sup>++</sup>依存性と Mn<sup>++</sup>依存性の逆転写酵素活性を試験する場合、CHO 細胞由来成分により Mn<sup>++</sup>依存性逆転写酵素活性が陽性を示すことがある。よって逆転写酵素活性試験の判定基準を記載する際は、Mn<sup>++</sup>依存性逆転写酵素活性について「検出せず」ではなく「報告する (Report)」と記載しても良い。
- 抗体産生試験：本モックアップでは CHO 細胞が宿主であることから、ハムスター抗体産生試験を示している。他の抗体産生試験 (マウス抗体産生試験等) を併用することもある。
- ブタウイルス試験：本モックアップでは *in vitro* 試験の例示をしたが、原材料の履歴やリスクアセスメント結果に伴い、ブタウイルス試験を実施しない、もしくは他の試験法 (例えば、PCR 法) を使用することもできる。
- 確認試験 (細胞由来)：ICH Q5D において細胞種の確認試験の例示としてアイソザイム分析が示されているが試薬の供給の問題により、アイソザイム分析に代わる方法への移行が進められている (例えば、DNA フィンガープリンティング法、バーコード法)。本モックアップでは初めの MCB/WCB ロットおよび CAL の段階ではアイソザイム試験をしたが、将来の更新時は別の試験法を使用する記載例とした。なお、ICH Q5D に記載されているとおり、セル・バンクの確認試験として目的タンパク質の発現を調べる試験も利用可能である。

#### 4) セル・バンクの安定性

##### ① 医薬品製造のための培養期間中の安定性

ヒューツムマブ原薬を製造するための培養期間中の安定性を評価するため、CAL 中の遺伝子発現構成体の DNA 塩基配列を調べた結果、表 2.3.S.2.3 - 8 に示すとおり、期待された DNA 塩基配列が確認された。従って、ヒューツムマブ原薬の製造のための培養期間中、本細胞は安定であることが確認された。

##### ② 保存中の安定性

MCB 及び WCB のバイアルを、使用時又は少なくとも●年に 1 回の頻度で融解し、細胞の生存率をモニターする。

5) セル・バンクの更新方法

MCB の調製方法は、MCB 作製用細胞株ロット○○もしくは既存の MCB を用いて MCB ロット●●の調製方法に準ずる (5.1 項、参照)。WCB の調製方法は、WCB ロット●●の調製方法に準ずる。調製した MCB、WCB はそれぞれ表 2.3.S.2.3 - 10、表 2.3.S.2.3 - 11 の試験を行い、判定基準に適合した場合に使用できる。

表 2.3.S.2.3-10 MCB 更新時の特性解析試験及び純度試験

試験項目／分析方法	判定基準	
確認試験 (細胞由来)	ハムスター細胞由来であることを確認する	
無菌試験	陰性	
マイコプラズマ否定試験	検出しない	
ウイルス試験	感染性試験	ウイルス混入を示す結果は認められない
	電子顕微鏡観察	CHO 細胞で存在を知られたレトロウイルス様粒子以外のウイルス及びウイルス様粒子を検出しない
	逆転写酵素活性	ウイルス混入を示す結果は認められない
	<i>In vitro</i> 試験 (指示細胞: MRC-5、Vero 及び CHO 細胞)	ウイルス混入を示す結果は認められない
	<i>In vivo</i> 試験 (成熟マウス、乳のみマウス及び発育鶏卵)	ウイルス混入を示す結果は認められない
抗体産生試験 (HAP)	ウイルス混入を示す結果は認められない	

表 2.3.S.2.3-11 WCB 更新時の特性解析試験及び純度試験

試験項目／分析方法	判定基準	
ハムスター細胞の確認	ハムスター由来細胞であることを確認する	
無菌試験	陰性	
マイコプラズマ否定試験	検出しない	
ウイルス試験	<i>In vitro</i> 試験 (指示細胞: CHO 細胞)	ウイルス混入を示す結果は認められない
	<i>In vivo</i> 試験 (成熟マウス)	ウイルス混入を示す結果は認められない

解説

5)セル・バンクの更新方法

WCB 更新時のウイルス試験で使用する指標細胞、動物種の数 は ICH Q5A に準じた。

## 2.3.S.2.4 重要工程及び重要中間体の管理

编者注：

- 重要工程の設定の考え方は、製造業者／申請者ごとに異なると考えられる。本モックアップでは、申請者が①産生される目的タンパク質の品質特性に大きく影響する工程，②外来性感染性物質であるウイルスを不活化／除去する目的で設定した工程を重要工程と設定した記載例を示している。
- 本セクションは ICH Q11 ガイドラインに記載されている Enhanced approach ではなく Traditional approach に基づき記載している。

### 1. 重要工程

#### 1) 培養ステップ 3

ヒューツムマブを産生させる培養工程であることから、重要工程に設定した。

#### 2) 低 pH 処理（ウイルス不活化）

潜在的なウイルスを不活化することを意図して設定した工程であることから、重要工程に設定した。

#### 3) ウイルス除去フィルターろ過

潜在的なウイルスを除去することを意図して設定した工程であることから、重要工程に設定した。

### 2. 工程内管理試験

製品品質の管理の一環として、表 2.3.S.2.4-1 に示す工程内管理試験を設定した。

表 2.3.S.2.4-1 ヒューツムマブ原薬製造工程の工程内管理試験

対象工程／対象試料	試験項目	許容基準
培養ステップ 3 (未加工／未精製バルク)	マイコプラズマ否定試験 (培養法、DNA 染色法)	適否の判定基準：陰性
	バイオバーデン (生菌数試験)	処置基準：10 CFU/10 mL 未満
	外来性ウイルス試験 ( <i>in vitro</i> 試験)	適否の判定基準：検出しない
	ヒューツムマブ濃度 (アフィニティークロマトグラフィー)	処置基準：X.X mg/mL 以上
ハーベスト (培養上清液)	ヒューツムマブ濃度 (アフィニティークロマトグラフィー)	処置基準：X.X mg/mL 以上
濃縮・緩衝液置換 2	宿主細胞由来タンパク質 (ELISA 法)	処置基準：■■■ ng/mg 以下

### 3. 重要中間体

該当なし

#### 解説

- 重要工程：ICH M4 ガイドラインの M2.3.S.2.4 に重要工程（Critical step）という用語が使用され、その後、平成 17 年 2 月 10 日通知（薬食審査発第 0210001 号）において重要工程は「品質に影響のある工程で、原薬が規格に適合することを保証するために事前に決定した管理値以内で操作される必要のある工程条件、試験、その他関連あるパラメータを含む工程をいう。」と定義された。この重要工程の定義は、CTD においては欧米にはない日本特有の考え方が含まれており、海外での Critical step と国内での重要工程との間で、定義や申請資料上での記載方法について違いがある。
- 重要工程の設定方法：重要工程の設定においては、不純物・ウイルスの著しい除去が確認されている工程などを申請者の判断で選択することもできる。
- 重要中間体：製造工程中で単離・長期保存される中間体。

## 2.3.S.2.5 プロセス・バリデーション/プロセス評価

编者注

- 本セクションは ICH Q11 ガイドラインに記載されている Enhanced approach ではなく Traditional approach に基づき記載している。

### 1. 製造工程の恒常性

#### 1) 細胞培養工程

ヒューツムマブ原薬の培養工程の恒常性を、実生産スケール（生産培養スケール：5000 L）で評価した。培養ステップ 1 及び培養ステップ 2 は拡大培養を目的とする工程であり、製品品質に直接影響を及ぼさないと考えられることから、本セクションでは試験結果を示していない（培養ステップ 1 及び培養ステップ 2 の試験結果は 3.2.S.2.5 参照）。製品品質に影響を及ぼしうる培養ステップ 3 の工程内管理試験の結果を表 2.3.S.2.5-1 に示す。

得られた結果及び S.4.4 ロット分析の結果より、ヒューツムマブの細胞培養工程の良好な恒常性が確認された。

表 2.3.S.2.5-1 培養ステップ 3（スケール：5000L）の試験結果

対応する原薬ロット番号	マイコプラズマ (適否の判定基準： 陰性)	バイオバーデン (処置基準： 10 CFU/10 mL 未満)	外来性ウイルス (適否の判定基準： 検出せず)	ヒューツムマブ濃度 (処置基準： X.X mg/mL 以上)
XXX	陰性	2 CFU/10 mL	検出せず	0.4 mg/mL
YYY	陰性	0 CFU/10 mL	検出せず	0.4 mg/mL
ZZZ	陰性	0 CFU/10 mL	検出せず	0.3 mg/mL

#### 2) ハーベスト

ハーベスト・ステップの工程内管理試験の結果を表 2.3.S.2.5-2 に示す。得られた結果より、ハーベスト・ステップは、良好な恒常性が確認された。

表 2.3.S.2.5-2 ハーベスト・ステップの試験結果

対応する原薬ロット番号	ヒューツムマブ濃度 (処置基準：X.X mg/mL 以上)
XXX	0.4 mg/mL
YYY	0.3 mg/mL
ZZZ	0.3 mg/mL

#### 3) 精製工程

ヒューツムマブ原薬の精製工程について、実生産スケールでプロセス評価を実施した。各精製ステップの収率とバイオバーデンの試験結果をそれぞれ表 2.3.S.2.5-3、表 2.3.S.2.5-4 に示す。また、濃縮・緩衝液置換ステップの工程内管理試験の結果として宿主細胞由来タ

ンパク質（HCP）とヒューツムマブ濃度の結果を表 2.3.S.2.5-5 に示す。

得られた結果より、ヒューツムマブの精製工程は、良好な恒常性が確認された。

表 2.3.S.2.5-3 精製工程各ステップの収率の結果

対応する原薬 ロット番号	収率 (%)							
	プロテイン A カラム	ウイルス不活 化工程	陽イオン交換 カラム	陰イオン交換 カラム	濃縮・緩衝液 置換 1	疎水カラム	ウイルス除去 フィルターろ 過	濃縮・緩衝液 置換 2
XXX	■■	■■	■■	■■	■■	■■	■■	■■
YYY	■■	■■	■■	■■	■■	■■	■■	■■
ZZZ	■■	■■	■■	■■	■■	■■	■■	■■

表 2.3.S.2.5-4 精製工程各ステップのバイオバーデンの試験結果

対応する原薬ロット番号	バイオバーデン (CFU/mL)			
	プロテイン A カラム	陽イオン交換カラム	陰イオン交換カラム	疎水カラム
XXX	■	■	■	■
YYY	■	■	■	■
ZZZ	■	■	■	■

表 2.3.S.2.5-5 濃縮・緩衝液置換 2 ステップの工程内管理試験 (HCP) の結果

対応する原薬ロット番号	HCP (ng/mg) (処置基準 : XX ng/mg 以下)
XXX	■■
YYY	■■
ZZZ	■■

## 2. 不純物の除去状況

### 1) 目的物質由来不純物

各工程液をサイズ排除クロマトグラフィー分析し、得られた高分子量領域及び低分子量領域のレベルを表 2.3.S.2.5-6 に示す。高分子領域のレベルは◎◎ステップと△△ステップで再現良く低減し、原薬中では○～○%であった。低分子量領域のレベルは◎◎ステップと△△ステップ及び◆◆ステップで再現良く低減し、原薬中では○～○%であった。以上より、ヒューツムマブの製造工程は適切に管理することにより、これらの目的物質由来不純物を再現良く低減できることが確認された。

表 2.3.S.2.5-6 各工程液におけるサイズ排除クロマトグラフィー分析による高分子量領域及び低分子量領域のレベル

工程液	原薬ロット XXX		原薬ロット YYY		原薬ロット ZZZ	
	高分子量領域 (%)	低分子量領域 (%)	高分子量領域 (%)	低分子量領域 (%)	高分子量領域 (%)	低分子量領域 (%)
プロテイン A カラム	○○	○○	○○	○○	○○	○○
陽イオン交換カラム	○○	○○	○○	○○	○○	○○
陰イオン交換カラム	○○	○○	○○	○○	○○	○○
濃縮・緩衝液置換 2	○○	○○	○○	○○	○○	○○
原薬	○○	○○	○○	○○	○○	○○

### 2) 製造工程由来不純物

#### ① 宿主細胞由来 DNA

各工程液中の DNA 量を○○法で測定した結果を表 2.3.S.2.5-7 に示す。DNA は培養上清液中では◎◎×10<sup>x</sup>～◎◎×10<sup>x</sup> pg/mg であったが、○○ステップ、△△ステップ及び◎◎ステップで再現良く低減し、原薬中では定量限界未満であった。以上より、ヒューツムマブの製造工程は適切に管理することにより、DNA を再現良く低減できることが確認された。

表 2.3.S.2.5-7 各工程液における宿主細胞由来 DNA の残存量

工程液	宿主細胞由来 DNA (pg/mg)		
	原薬ロット XXX	原薬ロット YYY	原薬ロット ZZZ
培養上清液	○○	○○	○○
プロテイン A カラム	○○	○○	○○
陰イオン交換カラム	○○	○○	○○
濃縮・緩衝液置換 2	<○○	<○○	<○○
原薬	<○○	<○○	<○○

## ②宿主細胞由来タンパク質

各工程液中の宿主細胞由来タンパク質量を ELISA 法で測定した結果を表 2.3.S.2.5-8 に示す。宿主細胞由来タンパク質量は培養上清液中では◎◎×10<sup>x</sup>~◎◎×10<sup>x</sup> ng/mg であったが、○○ステップ、△△ステップ及び◎◎ステップで再現良く低減し、原薬中では○~◎ng/mg であった。以上より、ヒューツムマブの製造工程は適切に管理することにより、宿主細胞由来タンパク質を再現良く低減できることが確認された。

表 2.3.S.2.5-8 各工程液における宿主細胞由来タンパク質の残存量

工程液	宿主細胞由来タンパク質 (ng/mg)		
	原薬ロット XXX	原薬ロット YYY	原薬ロット ZZZ
培養上清液	○○	○○	○○
プロテイン A カラム	○○	○○	○○
陽イオン交換カラム	○○	○○	○○
陰イオン交換カラム	○○	○○	○○
疎水カラム	○○	○○	○○
濃縮・緩衝液置換 2	○○	○○	○○
原薬	○○	○○	○○

## ③プロテイン A

プロテイン A は、精製工程のプロテイン A カラム樹脂から漏出する不純物である。各工程液中のプロテイン A 量を ELISA 法で測定した結果を表 2.3.S.2.5-9 に示す。プロテイン A クロマトグラフィー画分で◎~◎ng/mg であったプロテイン A は、○○ステップ及び◎◎ステップで再現良く低減し、原薬中では定量限界未満であった。以上より、ヒューツムマブの製造工程は適切に管理することにより、プロテイン A を再現良く低減できることが確認された。

表 2.3.S.2.5-9 各工程液におけるプロテイン A の残存量

工程液	プロテイン A (ng/mg)		
	原薬ロット XXX	原薬ロット YYY	原薬ロット ZZZ
プロテイン A カラム	○○	○○	○○
陽イオン交換カラム	○○	○○	○○
陰イオン交換カラム	○○	○○	○○
濃縮・緩衝液置換 2	< ○○	< ○○	< ○○
原薬	< ○○	< ○○	< ○○

## ④遺伝子組換えインスリン

遺伝子組換えインスリンは培養工程で使用する培地の成分である。各工程液中のインスリン量を ELISA で測定した。結果を表 2.3.S.2.5-10 に示す。インスリンは培養上

清液中では◎◎ng/mg であったが、○○ステップと△△ステップで再現良く低減し、原薬中では定量限界未満であった。以上より、ヒューツムマブの製造工程は適切に管理することにより、インスリンを再現良く低減できることが確認された。

表 2.3.S.2.5-10 各工程液における遺伝子組換えインスリンの残存量

工程液	遺伝子組換えインスリン (ng/mg)		
	原薬ロット XXX	原薬ロット YYY	原薬ロット ZZZ
培養上清液	○○	○○	○○
プロテイン A カラム	<○○	<○○	<○○
原薬	<○○	<○○	<○○

⑤ メトトレキサート

メトトレキサートは培養工程で使用する培地の成分である。各工程液中のメトトレキサート量を GC-MS で測定した。結果を表 2.3.S.2.5-11 に示す。メトトレキサートは培養上清液中では◎◎pg/mg であったが、○○ステップで再現良く低減し、原薬中では定量限界未満であった。以上より、ヒューツムマブの製造工程は適切に管理することにより、メトトレキサートを再現良く低減できることが確認された。

表 2.3.S.2.5-11 各工程液におけるメトトレキサートの残存量

工程液	メトトレキサート (pg/mg)		
	原薬ロット XXX	原薬ロット YYY	原薬ロット ZZZ
培養上清液	○○	○○	○○
プロテイン A カラム	<○○	<○○	<○○
原薬	<○○	<○○	<○○

解説

- 本モックアップでは、目的物質由来不純物、製造工程由来不純物の精製工程における除去状況の記載例を示した。一方、リスクアセスメント結果（例えば、精製工程中で除去されなくとも原薬中の不純物残存量が安全なレベルであることを説明する）を示すことにより必ずしも実測データがなくても良い場合がある。
- 目的物質関連物質を完全に分類することは科学的な限界があるため、本モックアップでは目的物質関連物質の特定をしない記載例としている。

### 3. 再加工

精製工程のウイルス除去フィルターろ過ステップでは、フィルターの完全性試験が不成立の場合などに再ろ過する。そこでウイルス除去フィルターろ過ステップの再ろ過回数について、適格性を確認済みのスケール・ダウン・モデルで検討した。その結果、再ろ過 3 回まで、試験した試験項目の範囲内では変化を認めなかった（表 2.3.S.2.5-16）。

表 2.3.S.2.5-16 ウイルス除去フィルターの再ろ過結果

再ろ過回数	収率 (%)	サイズ排除クロマトグラフィー			生物活性 CDC 活性測定法 (Unit/mg)
		主ピーク (%)	高分子量領域 (%)	低分子量領域 (%)	
0	〇〇	xx. x	x. x	x. x	xx
1	〇〇	xx. x	x. x	x. x	xx
2	…	…	…	…	…
3	〇〇	xx. x	x. x	x. x	xx

脚注 1) 回数 0 はウイルス除去フィルターろ過前の画分の結果

## 2.3.S.2.6 製造工程の開発の経緯

编者注

本セクションは ICH Q11 ガイドラインに記載されている Enhanced approach ではなく Traditional approach に基づき記載している。

### 1. 製造工程の開発経緯

ヒューツムマブの製造工程の開発経緯の概略を表 2.3.S.2.6-1 に示す。

毒性試験及び臨床第 I 相試験用の原薬の製造方法として製法 A が設定された。次に、臨床第 II 相試験用の原薬の製造方法として製法 B が設定された。臨床第 III 相試験用原薬の製造方法として製法 C1 が設定され、それをスケールアップすることで商用原薬の製造方法として C2 が設定された。

製法 A から製法 B への主な変更点は、以下のとおりである：

- 製造施設を施設 A から施設 B へ変更した。
- 製造に使用するセル・バンクを MCB から WCB に変更した。
- ハーベストの方法を生産性向上のために遠心分離からフィルターろ過に変更した。

製法 B から製法 C1 への主な変更点は、以下のとおりである：

- 培養ステップ 3 のスケールを 1000L から 2000L に変更し、合わせて培養ステップ 1、培養ステップ 2、精製工程のスケールも変更した。
- 培養ステップ 3 で使用する培地を培地 Z から培地 C に変更した。
- 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーの樹脂を生産性向上のために変更した。
- 原薬の保存温度を  $-70^{\circ}\text{C}$  から  $-20^{\circ}\text{C}$  に変更した。
- 不純物除去能の向上のために疎水カラムクロマトグラフィー工程を追加した。また、その上流に濃縮・緩衝液置換の工程を追加した。

製法 C1 から製法 C2 への主な変更点は、以下のとおりである：

- 製造施設を施設 B から施設 C へ変更した。
- 培養ステップ 3 のスケールを 2000L から 5000L に変更し、合わせて培養ステップ 1、培養ステップ 2、精製工程のスケールも変更した。

原薬組成は、全ての製造方法（製法 A～製法 C2）を通じて変更はなかった。

表 2.3.S.2.6-1 ヒューツムマブの製造方法の開発経緯の概要

製造方法	製法 A	製法 B	製法 C1	製法 C2
用途	毒性試験／臨床第 I 相試験	臨床第 II 相試験	臨床第 III 相試験	商用生産
製造施設	サイト A	サイト B	サイト B	サイト C
製造に使用するセル・バンク	MCB (ロット〇〇)	WCB (ロット〇〇)		
培養ステップ 1	培地 A を用いた細胞培養			
培養ステップ 2	培地 B を用いた 300 L バイオリアクターでの培養	培地 B を用いた 500 L バイオリアクターでの培養	培地 B を用いた 1000 L バイオリアクターでの培養	
培養ステップ 3	培地 Z を用いた 1000 L バイオリアクターでの細胞増殖	培地 C を用いた 2000 L バイオリアクターでの生産培養	培地 C を用いた 5000 L バイオリアクターでの生産培養	
ハーベスト	遠心、ろ過による細胞分離	フィルターろ過による細胞分離		
精製 1	プロテイン A カラムクロマトグラフィー			
低 pH 処理	低 pH 処理によるウイルス不活化			
精製 2	陽イオン交換カラムクロマトグラフィー			
精製 3	陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (樹脂 A)	陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (樹脂 B)		
濃縮緩衝液置換	(実施せず)		実施	同左
精製 4	(実施せず)		疎水カラムクロマトグラフィー	
ウイルス除去フィルターろ過	ウイルス除去フィルターによるろ過			
濃縮・緩衝液置換	実施	同左		
調製	実施	同左		
ろ過・充填	最終ろ過、充填及び-70°C で保存		最終ろ過、充填及び-20°C で保存	

## 2. 原薬の同等性／同質性評価

### 1) 製法 A の原薬ロット及び製法 B の原薬ロットの同等性/同質性

製法 A で製造した原薬ロット□□□と、製法 B で製造した原薬ロット◆◆◆を表 2.3.S.2.6-2 に示した試験により同等性／同質性を評価した。その結果、製法変更は製品品質に特段の影響を与えておらず、製法 A 及び製法 B の原薬は同等／同質であると判断された。

表 2.3.S.2.6-2 製法 A 及び製法 B の原薬の同等性／同質性評価

試験項目	原薬ロット□□□ (製法 A)	原薬ロット◆◆◆ (製法 B)
性状	●	◇
ペプチドマップ	●	◇
等電点電気泳動	●	◇
エドマン法による N 末端アミノ酸分析	ELG	ELG
pH	6.3	6.3
糖鎖プロファイル：アフコシル糖鎖 (%)	●	◇
イオン交換クロマトグラフィー：主ピーク (%)	●	◇
サイズ排除クロマトグラフィー：主ピーク (%)	●	◇
キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)：主ピーク (%)	●	◇
宿主細胞由来 DNA (pg/mg)	●	◇
宿主細胞由来タンパク質 (ng/mg)	●	◇
プロテイン A (ng/mg)	●	◇
生物活性 (CDC 活性測定法) (Unit/mg)	●	◇
含量 (mg/mL)	102	97

2) 製法 B の原薬ロット及び製法 C1 の原薬ロットの同等性/同質性

製法 B で製造した原薬ロット◇◇◇と、製法 C1 で製造した原薬ロット■■■を表 2.3.S.2.6-3 に示した試験により同等性/同質性を評価した。その結果、製法変更は製品品質に特段の影響を与えておらず、製法 B 及び製法 C1 の原薬は同等/同質であると判断された。

表 2.3.S.2.6-3 製法 B 及び製法 C1 の原薬の同等性/同質性評価

試験項目	原薬ロット◇◇◇ (製法 B)	原薬ロット■■■ (製法 C1)
性状	●	◇
ペプチドマップ	●	◇
等電点電気泳動	●	◇
pH	6.3	6.3
糖鎖プロファイル：アフコシル糖鎖 (%)	●	◇
イオン交換クロマトグラフィー：主ピーク (%)	●	◇
サイズ排除クロマトグラフィー：主ピーク (%)	●	◇
キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)：主ピーク (%)	●	◇
宿主細胞由来 DNA (pg/mg)	●	◇
宿主細胞由来タンパク質 (ng/mg)	●	◇
プロテイン A (ng/mg)	●	◇
生物活性 (CDC 活性測定法) (Unit/mg)	●	◇
含量 (mg/mL)	99	102

3) 製法 C1 の原薬ロット及び製法 C2 の原薬ロットの同等性/同質性

製法 C1 で製造した原薬ロット■■■と、製法 C2 で製造した原薬ロット▲▲▲を表 2.3.S.2.6-4 に示した試験により同等性/同質性を評価した。その結果、製法変更は製品品質に特段の影響を与えておらず、製法 C1 及び製法 C2 の原薬は同等/同質であると判断された。

表 2.3.S.2.6-4 製法 C1 及び製法 C2 の原薬の同等性／同質性評価

試験項目	原薬ロット ■■■ (製法 C1)	原薬ロット □□□ (製法 C1)	原薬ロット ▲▲▲ (製法 C2)	原薬ロット ▽▽▽ (製法 C2)	原薬ロット △△△ (製法 C2)
性状	●	●	◇	◇	◇
ペプチドマップ	●	●	◇	◇	◇
等電点キャピラリー電気泳動	●	●	◇	◇	◇
pH	6.3	6.2	6.2	6.3	6.3
糖鎖プロファイル：アフコシル糖鎖 (%)	●	●	◇	◇	◇
イオン交換クロマトグラフィー：主ピーク (%)	●	●	◇	◇	◇
サイズ排除クロマトグラフィー：主ピーク (%)	●	●	◇	◇	◇
キャピラリー電気泳動法（非還元条件）：主ピーク (%)	●	●	◇	◇	◇
宿主細胞由来 DNA (pg/mg)	●	●	◇	◇	◇
宿主細胞由来タンパク質 (ng/mg)	●	●	◇	◇	◇
プロテイン A (ng/mg)	●	●	◇	◇	◇
生物活性 (CDC 活性測定法) (Unit/mg)	●	●	◇	◇	◇
含量 (mg/mL)	99	101	102	100	101

### 3. 管理戦略の開発の経緯

治験薬用ヒューツムマブ原薬の規格の開発履歴の概要を表 2.3.S.2.6-5 に示す。

表 2.3.S.2.6-5 原薬規格の開発履歴

試験項目		製法 A 原薬の規格	製法 B 原薬の規格	製法 C1 原薬の規格	製法 C2 原薬の規格
性状		無色～微黄色の澄明 又はわずかに白濁し た液	無色～微黄色の澄明 又はわずかに白濁し た液	無色～微黄色の澄明 又はわずかに白濁し た液	無色～微黄色の澄明 又はわずかに白濁し た液
確認試験	ペプチドマップ	報告	標準物質と同一の保 持時間に同様のピー クを認める	標準物質と同一の保 持時間に同様のピー クを認める	常用標準物質と同一 の保持時間に同様の ピークを認める
	等電点電気泳動法	報告	—	—	—
	CDC 活性	ヒューツムマブ濃度 に依存する用量反応 曲線を認める	—	—	—
pH		5.5～7.0	5.5～7.0	5.8～6.8	5.8～6.8
糖鎖プロファイル：G0 (%)		報告	報告	G0：●%以下	G0：●%以下
純度試験	<u>イオン交換クロマトグラフィー</u>				
	主ピーク (%)	●%以上	●%以上	●%以上	●%以上
	酸性領域 (%)	報告	報告	●%以下	●%以下
	塩基性領域 (%)	報告	報告	●%以下	●%以下
	<u>サイズ排除クロマトグラフィー</u>				
	主ピーク (%)	●%以上	●%以上	●%以上	●%以上
高分子量領域 (%)	報告	●%以下	●%以下	●%以下	
低分子量領域 (%)	報告	報告	●%以下	●%以下	

表 2.3.S.2.6-5 原薬規格の開発履歴（続）

試験項目	製法 A 原薬の規格	製法 B 原薬の規格	製法 C1 原薬の規格	製法 C2 原薬の規格
キャピラリー電気泳動法（非還元条件） 主ピーク（%）	報告	●%以上	●%以上	●%以上
宿主細胞由来タンパク質（ng/mg）	報告	≦●	≦●	—*
宿主細胞由来 DNA（pg/mg）	報告	≦●	≦●	—
プロテイン A（ng/mg）	報告	≦●	≦●	—
エンドトキシン	<▲	<▼	<■	<●
微生物限度	≦●	≦●	≦■	≦▲
生物活性（CDC 活性測定法）（Unit/mg）	■～■ Unit/mg	▲～▲ Unit/mg	●～● Unit/mg	●～● Unit/mg
含量（mg/mL）	85～115 mg/mL	90～110 mg/mL	90～110 mg/mL	90～110 mg/mL

\*宿主細胞由来タンパク質は、工程内管理試験として設定した（2.3.S.2.2 参照）

解説

表 2.3.S.2.6-5 : ICH Q11 ガイドライン「製造工程の開発に伴う関連の管理戦略の変更については、3.2.S.2.6 の章に簡潔に記述する。」を考慮し、本セクションに開発段階の規格の変遷を記載したが、S.4.4 バッチ分析に記載することもできる。

## 2.3.S.3 特性（ヒューツムマブ、HS 製薬）

### 2.3.S.3.1 構造その他の特性の解明

编者注：

- ・ 本項は記載のあくまで例示であり、個々の品目の承認審査に必要な内容の全てを記載しているものではなく、また例示された内容がすべて必要ということではない。個々の品目ごと、申請者の考え方に沿って、適切な内容を記載すること。
- ・ 抗体医薬品の特性解析アプローチの考え方については、ICH Q6B ガイドライン（医薬審発第 571 号、平成 13 年 5 月 1 日「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」）、「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」（平成 24 年 12 月 14 日、薬食審査発 1214 第 1 号）を参照のこと。

ヒューツムマブ一次標準物質ロット PRS-1（2.3.S.5 参照）を用いて特性解析試験を実施した。

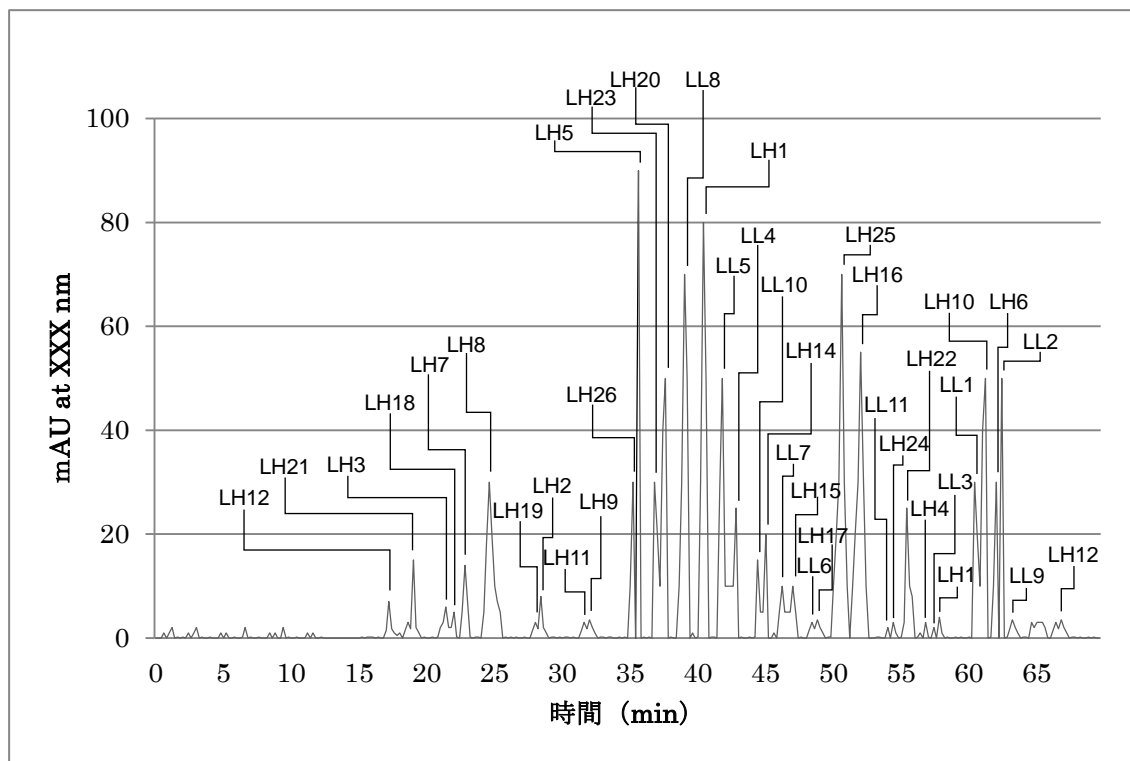
#### 1. 一次構造

##### 1) ペプチドマップ

ジチオスレイトール及びヨードアセトアミドにより還元アルキル化した後、リシルエンドペプチダーゼ（Lys-C）及びペプチジル-ASP メタロエンドペプチターゼ（Asp-N）により酵素消化を行い、消化物を逆相カラム接続 LC/MS により分析した。

図 2.3.S.3.1-1 及び図 2.3.S.3.1-2 に、消化物のクロマトグラムと各ピークの帰属及びヒューツムマブの Lys-C 酵素消化によって得られることが予想されるペプチド断片（太字は MS により同定されたペプチド断片）を示す。表 2.3.S.3.1-1 及び表 2.3.S.3.1-2 に各断片の構造及び理論分子量、実測値を示す。図 2.3.S.3.1-3 及び図 2.3.S. 2.3.S.3.1-4 並びに表 2.3.S.3.1-3 及び表 2.3.S.3.1-4 に Asp-N 酵素消化における同様の結果を示す。得られた結果より、遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列と一致することを確認した。

図 2.3.S.3.1-1 Lys-C 酵素消化ペプチドマップクロマトグラム



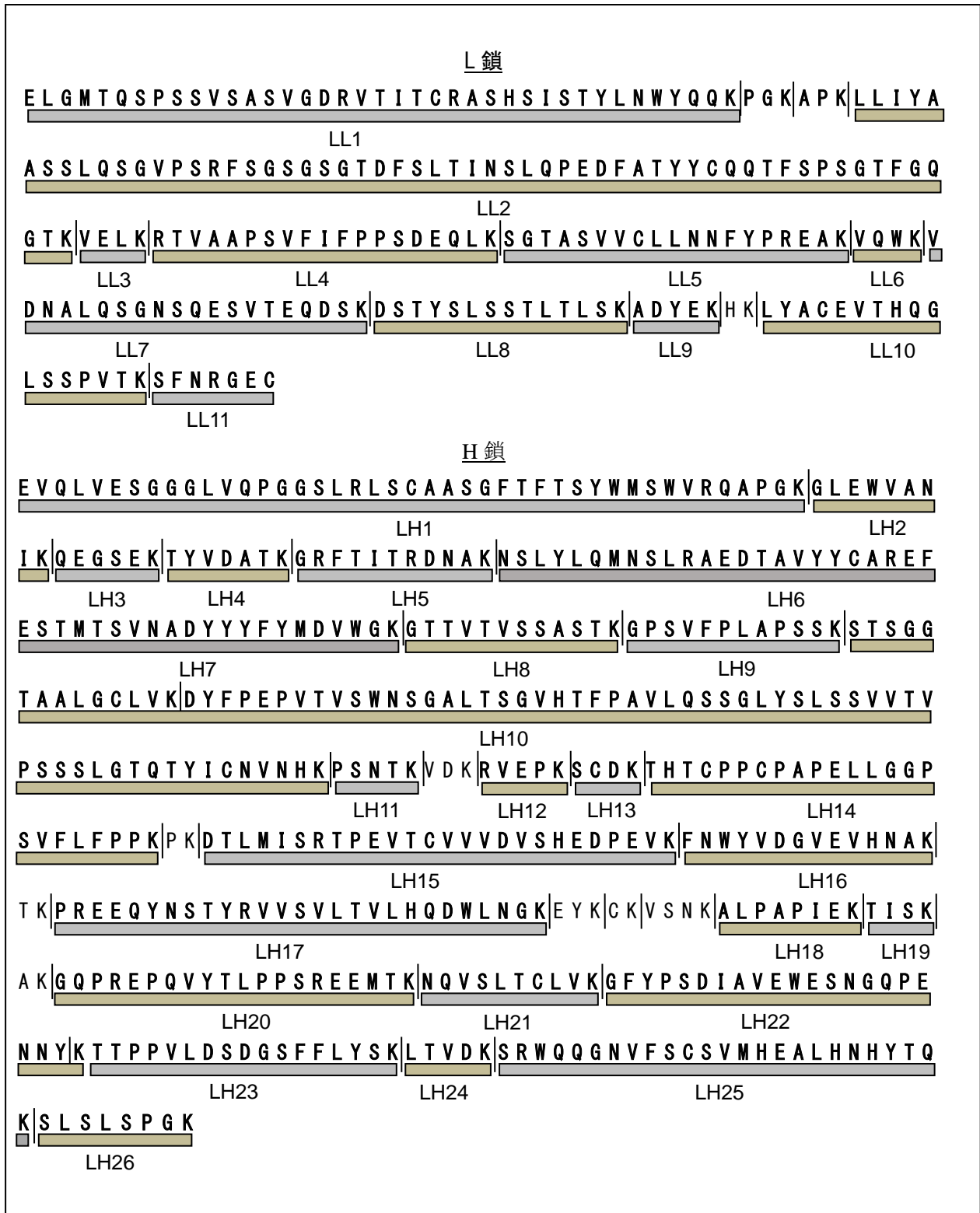


表 2.3.S.3.1-1 Lys-C 消化ペプチドマップの LC/MS 分析結果 (軽鎖)

ピーク	ペプチド断片	理論分子量	実測値
LL1	E <sup>1</sup> -K <sup>39</sup>	4287.1	4287.1
LL2	L <sup>45</sup> -K <sup>103</sup>	6100.9	6100.9
LL3	V <sup>104</sup> -K <sup>107</sup>	487.3	487.3
LL4	R <sup>108</sup> -K <sup>126</sup>	2101.1	2101.1
LL5	S <sup>127</sup> -K <sup>145</sup>	2068.0	2068.0
LL6	D <sup>146</sup> -K <sup>149</sup>	599.3	599.3
LL7	S <sup>150</sup> -K <sup>168</sup>	2135.0	2135.0
LL8	V <sup>169</sup> -K <sup>173</sup>	1501.8	1501.8
LL9	A <sup>174</sup> -K <sup>178</sup>	624.3	624.3
LL10	V <sup>191</sup> -K <sup>207</sup>	1831.9	1831.9
LL11	V <sup>208</sup> -C <sup>214</sup>	811.3	811.3

表 2.3.S.3.1-2 Lys-C 消化ペプチドマップの LC/MS 分析結果 (重鎖)

ピーク	ペプチド断片	理論分子量	実測値
LH1	E <sup>1</sup> -K <sup>43</sup>	4543.2	4543.2
LH2	G <sup>44</sup> -K <sup>52</sup>	1028.6	1028.6
LH3	Q <sup>53</sup> -K <sup>58</sup>	676.3	
LH4	T <sup>59</sup> -K <sup>65</sup>	796.4	
LH5	G <sup>66</sup> -K <sup>76</sup>	1277.7	1277.7
LH6	N <sup>77</sup> -K <sup>121</sup>	5407.4	5407.4
LH7	G <sup>122</sup> -K <sup>133</sup>	1137.6	1137.6
LH8	G <sup>134</sup> -K <sup>145</sup>	1185.6	1185.6
LH9	S <sup>146</sup> -K <sup>158</sup>	1263.7	1263.7
LH10	D <sup>159</sup> -K <sup>217</sup>	6128.0	6128.0
LH11	P <sup>218</sup> -K <sup>222</sup>	545.3	545.3
LH12	R <sup>226</sup> -K <sup>230</sup>	627.4	627.4
LH12	S <sup>231</sup> -K <sup>234</sup>	451.2	451.2
LH14	T <sup>235</sup> -K <sup>258</sup>	2504.3	2504.3
LH15	D <sup>261</sup> -K <sup>286</sup>	2897.4	2897.4
LH16	F <sup>287</sup> -K <sup>300</sup>	1676.8	1676.8
LH17	P <sup>303</sup> -K <sup>328</sup>	3230.7	3230.7
LH18	A <sup>339</sup> -K <sup>346</sup>	837.5	837.5
LH19	T <sup>347</sup> -K <sup>350</sup>	447.3	447.3
LH20	G <sup>353</sup> -K <sup>362</sup>	2342.2	2342.2
LH21	N <sup>363</sup> -K <sup>372</sup>	1103.6	1103.6
LH22	G <sup>373</sup> -K <sup>404</sup>	2543.1	2543.1
LH23	T <sup>405</sup> -K <sup>421</sup>	1171.9	1171.9
LH24	L <sup>422</sup> -K <sup>426</sup>	574.3	574.3
LH25	S <sup>427</sup> -K <sup>451</sup>	2986.4	2986.4
LH26	S <sup>452</sup> -K <sup>459</sup>	787.4	787.4

図 2.3.S.3.1-3 Asp-N 酵素消化ペプチドマップクロマトグラム

(図：省略)

図 2.3.S.3.1-4 Asp-N 酵素消化ペプチドマップアミノ酸配列

(図：省略)

表 2.3.S.3.1-3 Asp-N 消化ペプチドマップの LC/MS 分析結果 (重鎖)

(表：省略)

表 2.3.S.3.1-4 Asp-N 消化ペプチドマップの LC/MS 分析結果 (重鎖)

(表：省略)

#### 解説

本モックアップでは、ペプチドマップで得られた各ペプチド断片のアミノ酸配列を、遺伝子配列から推測される各ペプチド断片の分子量と LC/MS 分析結果の比較により同定した記載例である。各ペプチド断片のアミノ酸配列を MS/MS 分析により同定する場合もある。

#### 2) N 末端及び C 末端アミノ酸

##### ① N 末端アミノ酸

還元条件下の Lys-C 消化ペプチドマップ - タンデム質量分析 (MS/MS 分析) により、H 鎖及び L 鎖の N 末端グルタミンの約 90% がピログルタミル化していることを確認した。

##### ② C 末端アミノ酸

還元条件下の Lys-C 消化ペプチドマップ - MS/MS 分析により、H 鎖の C 末端の Lys

は約 90%が欠失していることを確認した。また、Gly-Lys の欠失体を部分的に認めた。

## 2. 高次構造

### 1) ジスルフィド結合及びスルフヒドリル基

#### ① ジスルフィド結合

還元条件下及び非還元条件下の Lys-C 消化ペプチドマップ - MS/MS 分析の結果、L 鎖内及び H 鎖内ジスルフィド結合がそれぞれ 2 及び 3 カ所 (L 鎖 : Cys23-Cys88、Cys134-Cys194、H 鎖 : Cys22-Cys96、Cys156-Cys212、Cys273-Cys333)、H 鎖間及び H 鎖-L 鎖間ジスルフィド結合がそれぞれ 2 及び 1 カ所 (H 鎖 Cys238-H 鎖 Cys238、H 鎖 Cys241-H 鎖 Cys241、L 鎖 Cys214-H 鎖 Cys232) 存在することを確認した。

図 2.3.S.3.1-5 Lys-C 酵素消化ペプチドマップ (還元条件)

(図 : 省略)

図 2.3.S.3.1-6 Lys-C 酵素消化ペプチドマップ (非還元条件)

(図 : 省略)

表 2.3.S.3.1-5 Lys-C 酵素消化ペプチドマップ (還元条件) 分析結果

(表 : 省略。記載項目としては例えば期待される Cys 残基に関するピーク ID、ペプチド断片と Cys の位置、理論分子量、実測値又はジスルフィド結合に関するピーク ID、S-S 結合位置、理論分子量、実測値などが考えられる)。

表 2.3.S.3.1-6 Lys-C 酵素消化ペプチドマップ (非還元条件) 分析結果

(表 : 省略)

#### ② スルフヒドリル基

5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いた比色定量法 (エルマン反応) によって定量した結果、1 mol あたり 0.3~0.5 mol の遊離スルフヒドリル基が含まれていることを確認した。

## 2) フーリエ変換赤外吸収スペクトル

フーリエ変換赤外吸収スペクトル分析の結果、 $1630\text{ cm}^{-1}$ に極大を認め、IgG に特徴的な $\beta$ シート主体の構造を確認した。

図 2.3.S.3.1-7 フーリエ変換赤外吸収スペクトル



## 3) 遠紫外及び近紫外円偏光二色性スペクトル

遠紫外円偏光二色性スペクトル分析の結果、 $217\text{ nm}$ に負の極大、 $198\text{ nm}$ に正の極大1を認め、IgG に特徴的な $\beta$ シート主体の構造を確認した。

近紫外円偏光二色性スペクトル分析の結果、トリプトファンによる  $295\text{ nm}$  の極大波長、トリプトファン及びチロシンによる  $285\text{ nm}$  の極大波長、フェニルアラニン及びチロシンによる  $255\text{ nm}$  と  $280\text{ nm}$  の間の微細なピーク、ジスルフィド結合による全体的に負のシグナルを認め、IgG に特有なスペクトルであることを確認した。

図 2.3.S.3.1-8 遠紫外円偏光二色性スペクトル

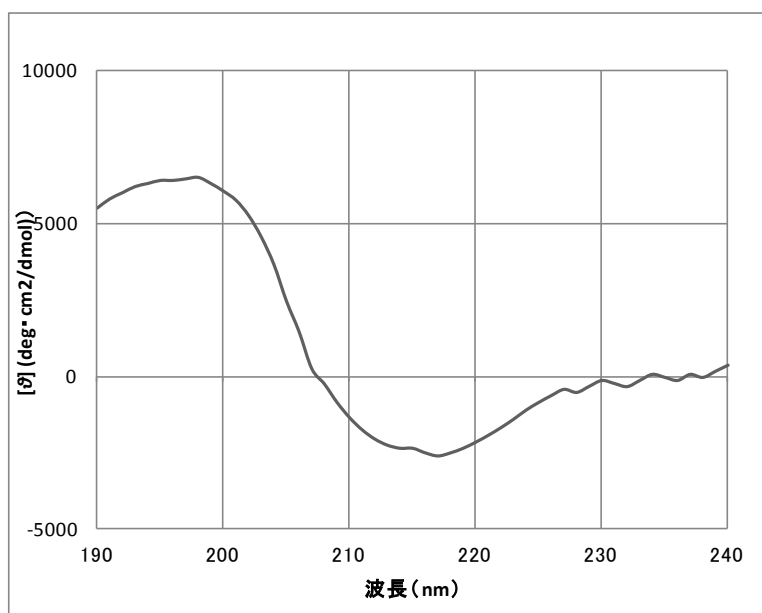
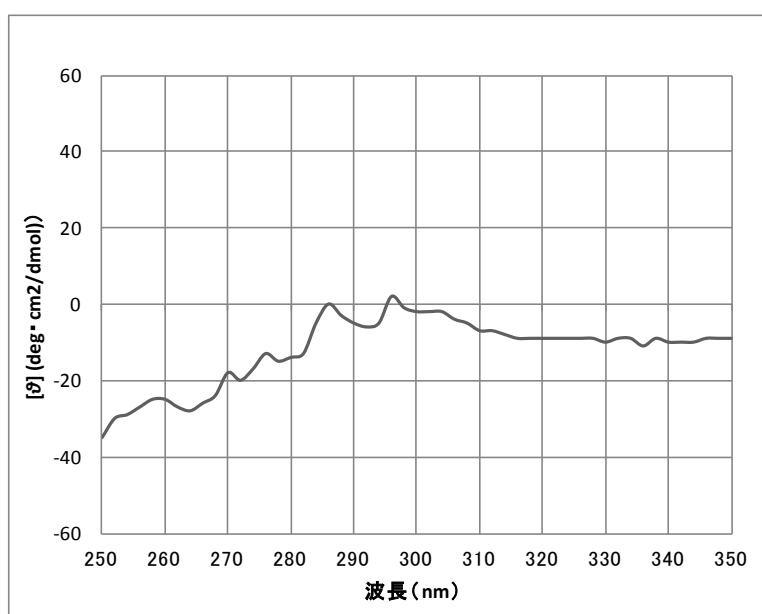


図 2.3.S.3.1-9 近紫外円偏光二色性スペクトル



**解説**

本モックアップでは高次構造の分析法として複数の方法（フーリエ変換赤外吸収スペクトル、遠紫外及び近紫外円偏光二色性スペクトル）を例示したが、分析法は開発者が適切に選択して記載する。

### 3. 糖鎖構造

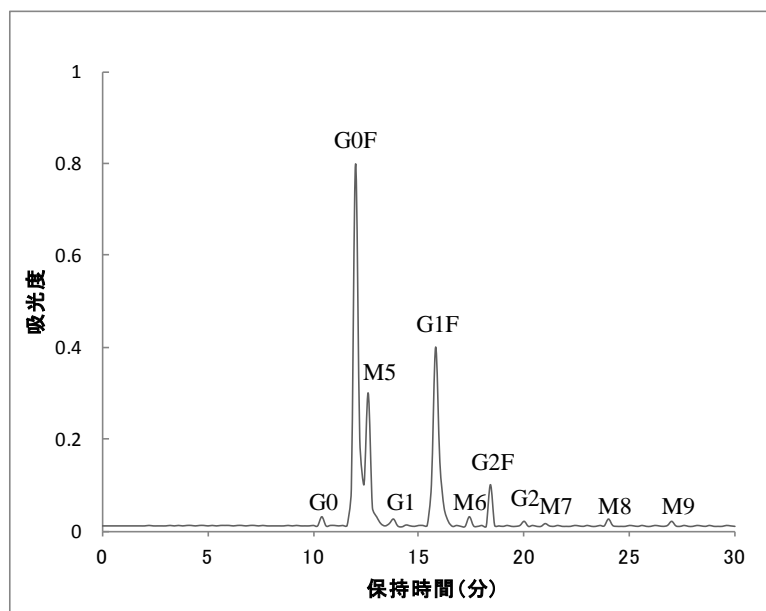
#### 1) N 結合型糖鎖

H 鎖の CH2 ドメインの 1 箇所コンセンサス配列 (Asn309-Ser-Thr) を有している。

還元条件下の Lys-C 消化ペプチドマップ分析及び SDS-キャピラリー電気泳動 (CE-SDS) により、H 鎖の 99% が 309 番目の Asn 残基に N 結合型糖鎖修飾を受けていることを確認した。

ペプチド N-グリコシダーゼ F (PNGase F) 処理による遊離糖鎖を 2-アミノベンズアミド (2-AB) で誘導体化し、誘導体を順相 HPLC/MS で分析した。主な糖鎖構造は以下に示す末端にガラクトースが 0~2 個付加した複合型二本鎖フコシル化糖鎖 G0F、G1F、G2F であり、全糖鎖構造に対する割合はそれぞれ約●%、●%、●%であった。またフコースが結合していないアフコシル糖鎖 (G0、G1、G2 糖鎖) 及びハイマンノース型糖鎖 (M5~M7) が確認され、全糖鎖構造に対する割合はそれぞれ●%以下、●%以下 (うち●%は M5) であった。(図 2.3.S.3.1-10、図 2.3.S.3.1-11)

図 2.3.S.3.1-10 糖鎖 HPLC クロマトグラム





## 2) O 結合型糖鎖

還元条件下の Lys-C 消化ペプチドマップ分析及び HPAEC/PAD により、O 結合型糖鎖修飾が存在しないことを確認した。

## 3) シアル酸

PNGase F 処理による遊離糖鎖を 2-AB で誘導体化し、誘導体を順相 HPLC/MS で分析した結果、N-アセチルノイラミン酸を有する糖鎖を検出した。また、単糖組成分析により N-アセチルノイラミン酸の含量はヒューツムマブ 1 mol あたり約● mol であった。

N-グリコリルノイラミン酸は検出されなかった。

## 4. 物理的・化学的性質

### 1) 分子量

エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-TOF/MS) の結果、150119 Da、149962 Da 及び 149806 Da のピーク、PNGase F 処理したものは 147350 Da のピークを認め、アミノ酸配列及び糖鎖構造から予想される理論分子量と一致した(図 2.3.S.3.1-12～図 2.3.S.3.1-15)。

還元アルキル化後 PNGase F 処理したものは 50473 Da、23169 Da のピークを認め、重鎖及び軽鎖の予想される理論分子量と一致した。

図 2.3.S.3.1-12 マススペクトル (糖鎖除去前)

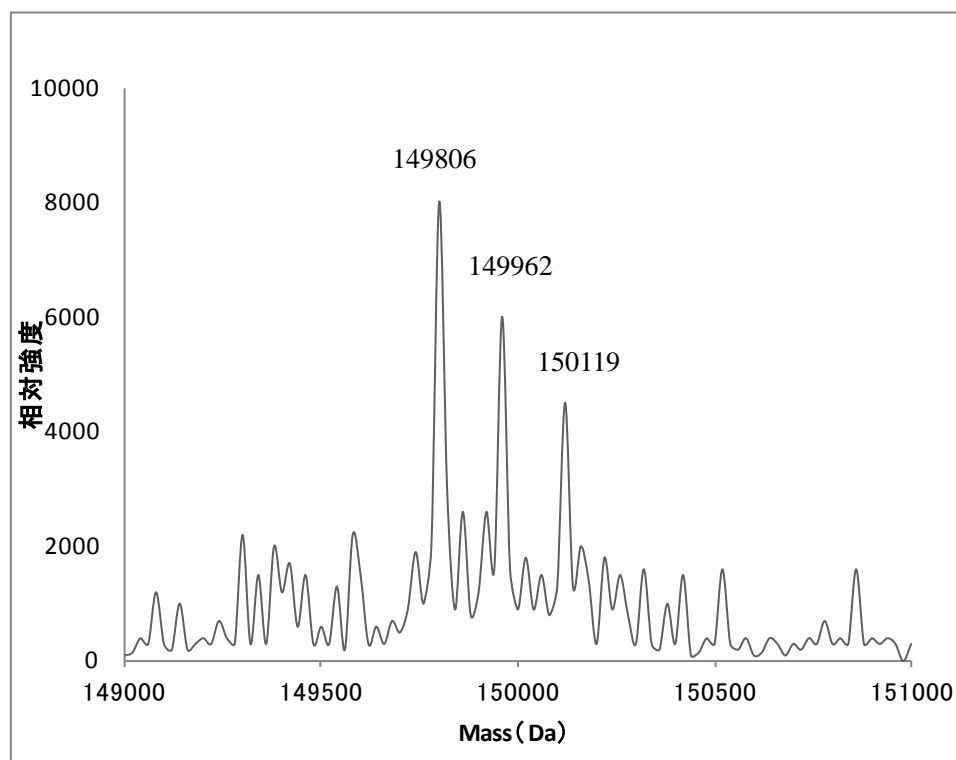


図 2.3.S.3.1-13 マスペクトル (糖鎖除去後)

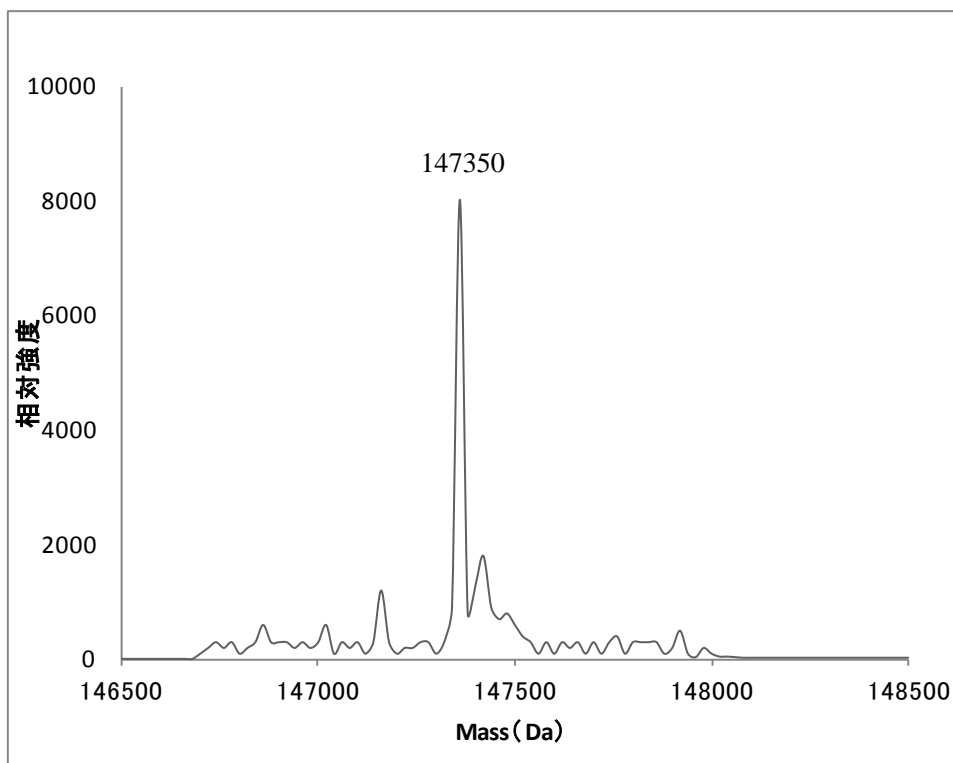


図 2.3.S.3.1-14 マスペクトル (還元アルキル化後、重鎖)

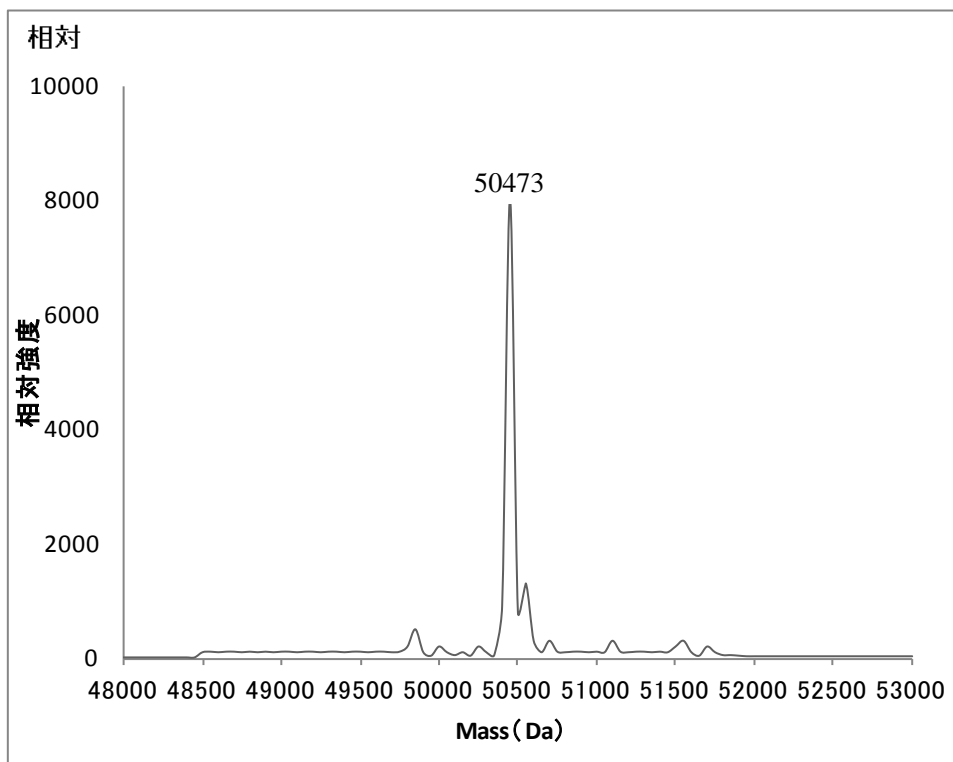


図 2.3.S.3.1-15 マススペクトル（還元アルキル化後、軽鎖）

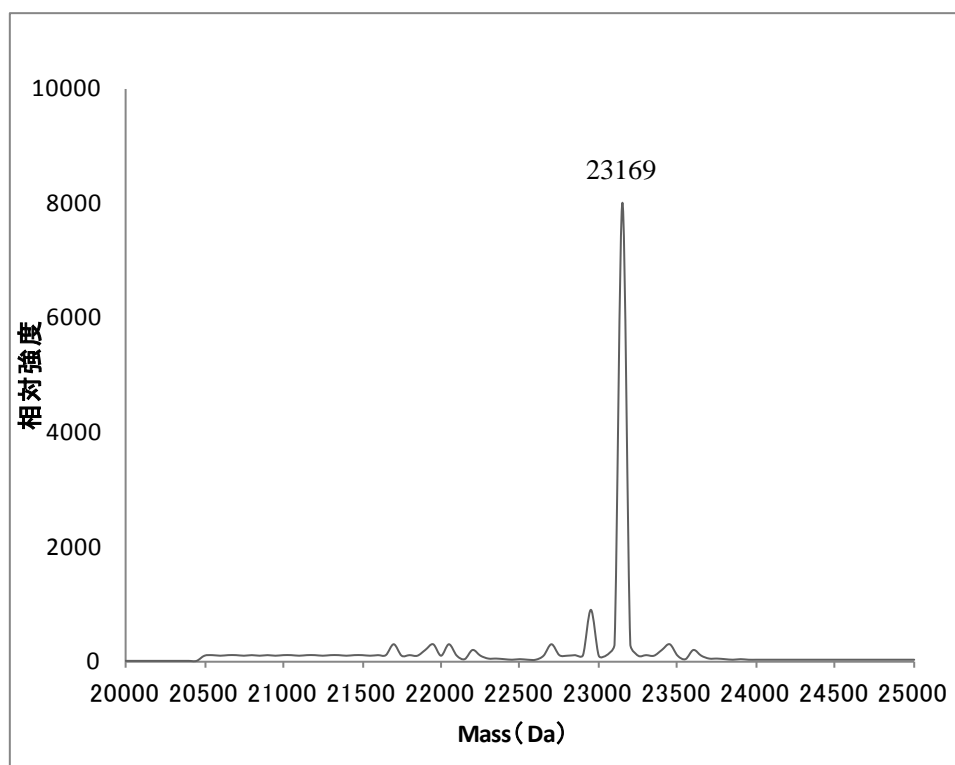


表 2.3.S.3.1-7 質量分析結果

条件	分子種	理論分子量(Da)	実測値(Da)
—	G0F 負荷体	149809	149806
—	G1F 負荷体	149966	149962
—	G2F 負荷体	150122	150119
PNGase F 処理	糖鎖除去体	147353	147350
還元アルキル化	重鎖の糖鎖除去体	50477	50473
PNGase F 処理	軽鎖の糖鎖除去体	23172	23169

## 2) 電気泳動

### ①SDS-キャピラリー電気泳動

非還元条件下では、面積百分率●%の単量体の主ピーク及び●%の高分子量体、それぞれ●%未満の低分子量体の2本のマイナーピークを認めた（図 2.3.S.3.1-16）。

還元条件下では、重鎖及び軽鎖の2本の主ピーク及び糖鎖の結合していない重鎖のピーク（面積百分率●%）を認めた（図 2.3.S.3.1-17）。

図 2.3.S.3.1-16 SDS-キャピラリー電気泳動フェログラム (非還元条件)

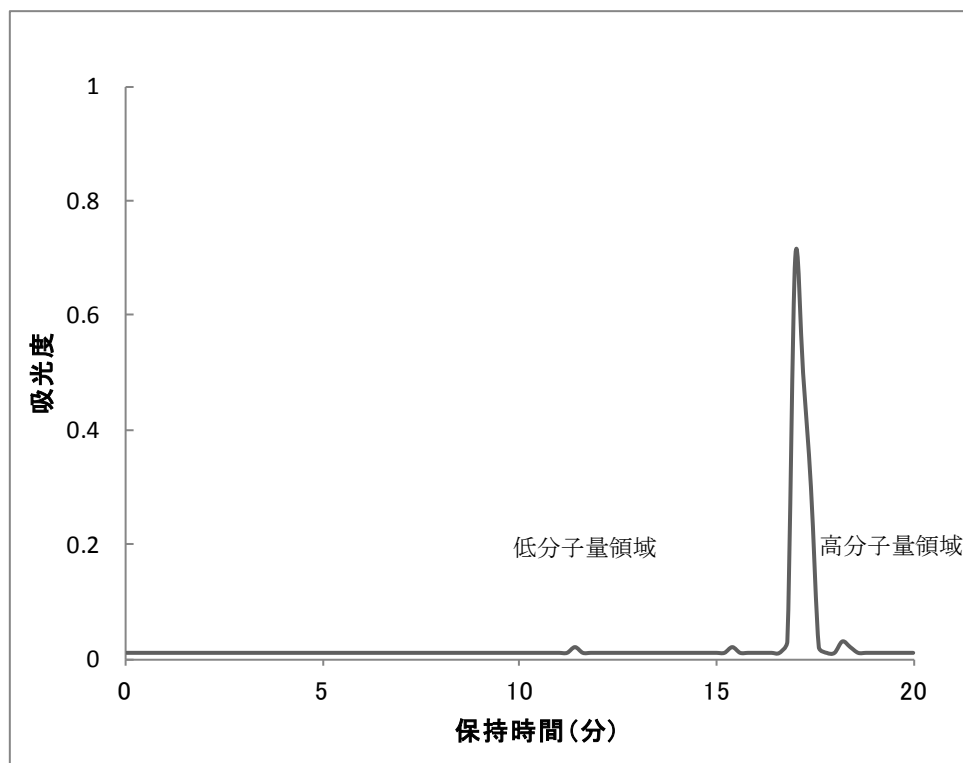
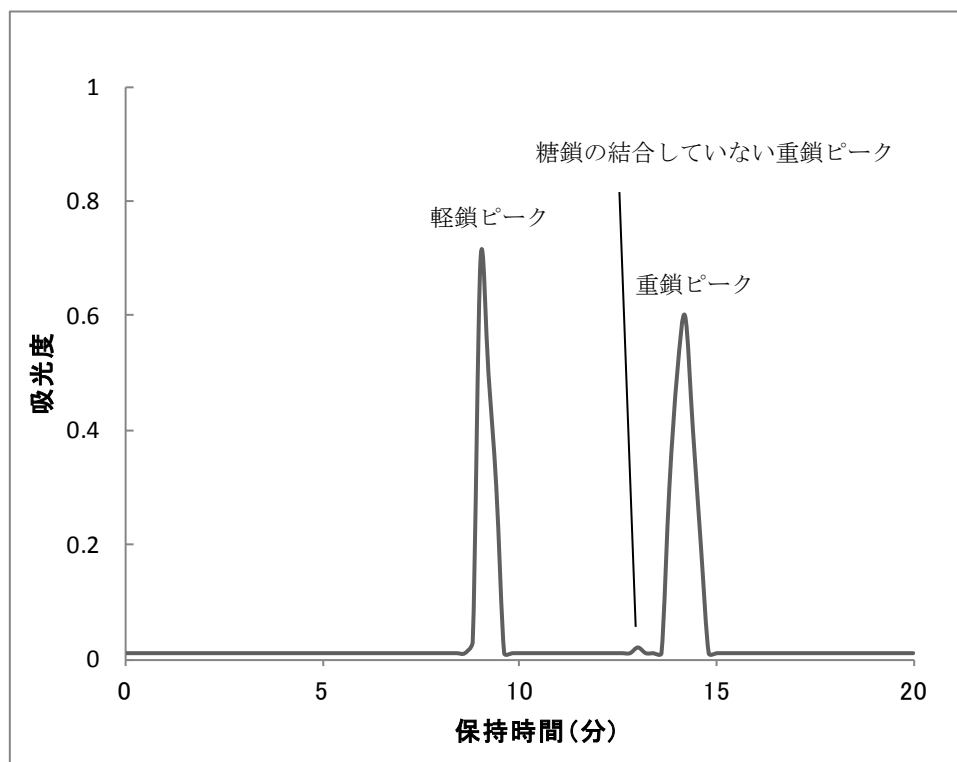


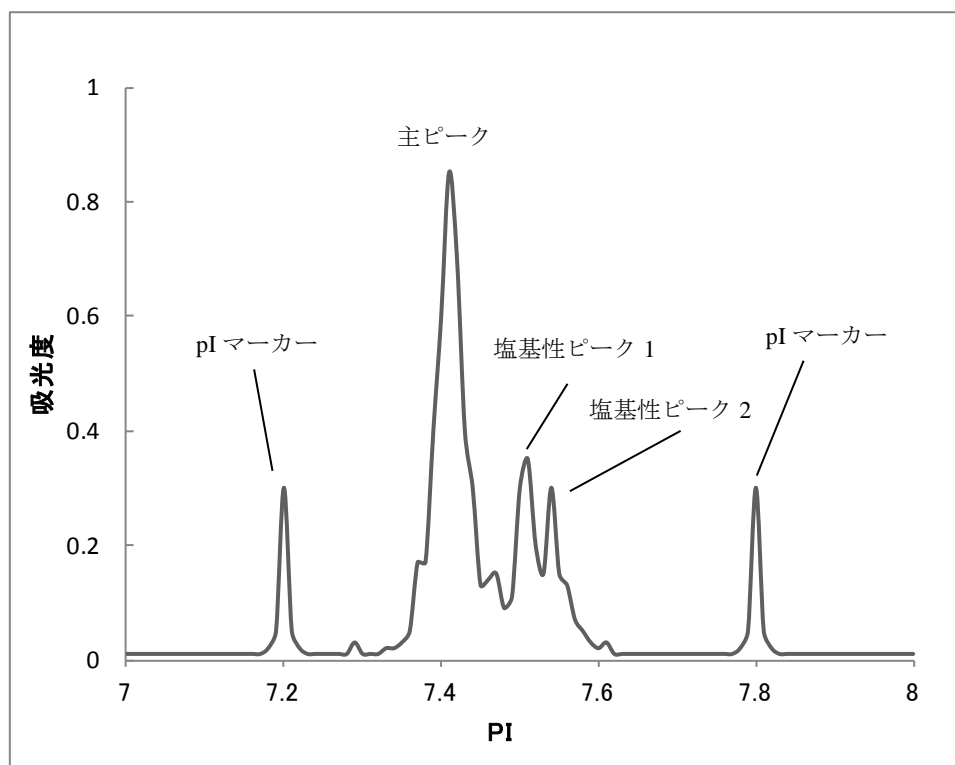
図 2.3.S.3.1-17 SDS-キャピラリー電気泳動フェログラム (還元条件)



## ②キャピラリー等電点電気泳動

主ピーク及び2本の塩基性ピークを認め、その面積百分率の割合はおよそ●%、●%、●%であった(図 2.3.S.3.1-18)。等電点はそれぞれ 7.40、7.51 及び 7.54 であった。塩基性ピーク 1、塩基性ピーク 2 の生物活性はそれぞれヒューツムマブの●%、●%であった。

図 2.3.S.3.1-18 キャピラリー等電点電気泳動フェログラム



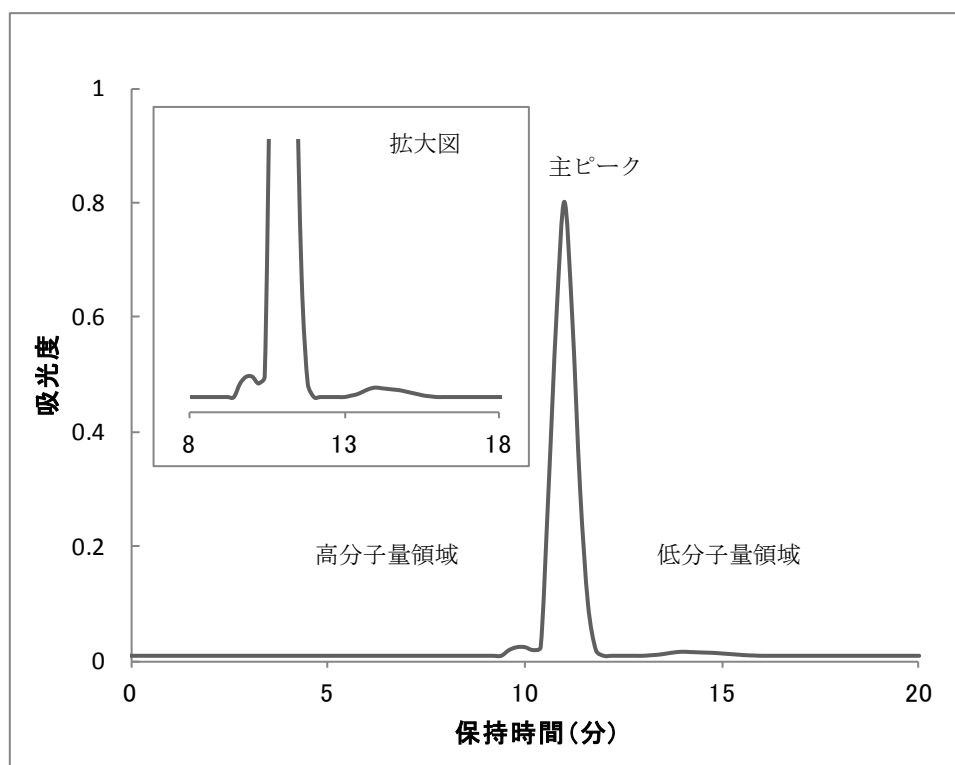
## 3) 液体クロマトグラフィー

### ①サイズ排除クロマトグラフィー

面積百分率●%の単量体の主ピーク及び面積百分率●%の高分子量体ピーク、面積百分率●%の低分子量体ピークを認めた(図 2.3.S.3.1-19)。高分子量体に含まれる成分は主に 2 量体であった。低分子量体に含まれる成分は切断された重鎖と軽鎖と推察された(3.2.S.3.1 参照)。

高分子量体の画分の生物活性はヒューツムマブの●%であった(3.2.S.3.1 参照)。

図 2.3.S.3.1-19 サイズ排除クロマトグラフィークロマトグラム

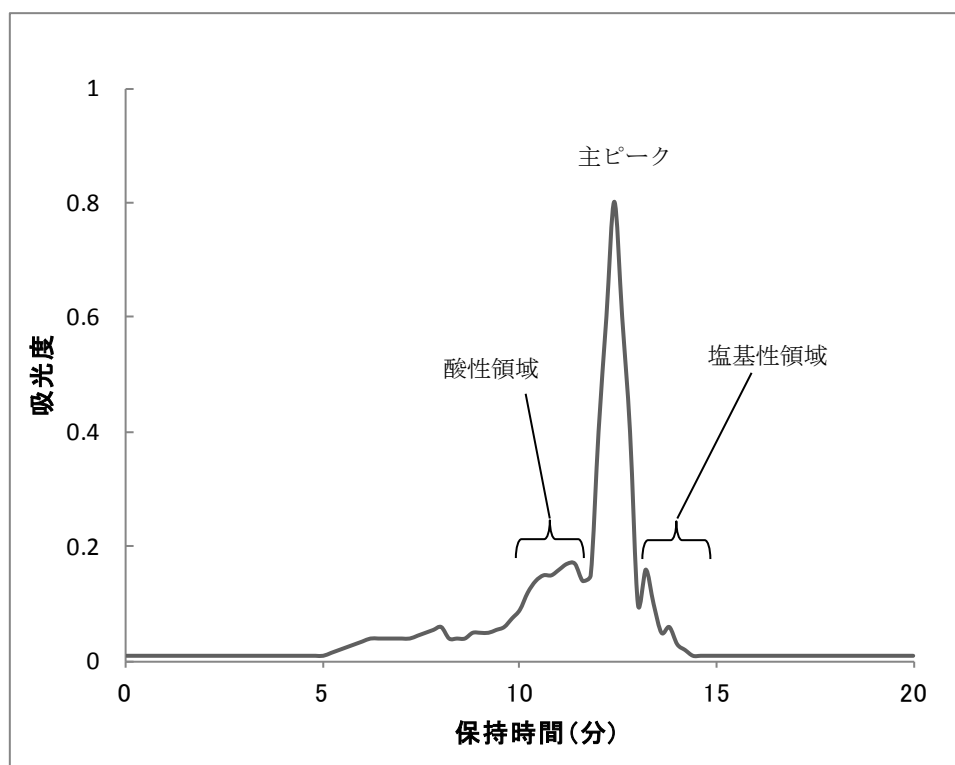


②陽イオン交換クロマトグラフィー

面積百分率●%の主ピーク及び面積百分率●%の酸性領域，●%の塩基性領域を認めた(図 2.3.S.3.1-20)。

酸性領域を解析した結果，脱アミド体、●%の断片体を含むことが確認された(3.2.S.3.1 参照)。また，塩基性領域に H 鎖 C 末端の Lys 及び Gly-Lys 欠失体を含むことを確認した(3.2.S.3.1 参照)。脱アミド体、欠失体を含む画分の生物活性はそれぞれヒューツムマブの 70%、80%であった(3.2.S.3.1 参照)。

図 2.3.S.3.1-20 陽イオン交換クロマトグラフィークロマトグラム



4) その他

① 吸光係数

吸光係数 (E1%, 1 cm (280 nm)) は 13.8 であった。

## 5. 生物学的性質

### 1) 結合特性

#### ① HS 抗原への結合性

HS 抗原への結合を酵素免疫測定 (ELISA) 法により評価した。ヒューツムマブは用量依存的に HS 抗原への結合性を示し、50%結合濃度は XX  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった (図 2.3.S.3.1-21)。

表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた HS 抗原結合キネティクス解析を行った結果 (図 2.3.S.3.1-22)、平衡解離定数 ( $K_D$ ) は XX  $\text{nmol}/\text{L}$  であった。

図 2.3.S.3.1-21 HS 抗原への結合性用量相関図

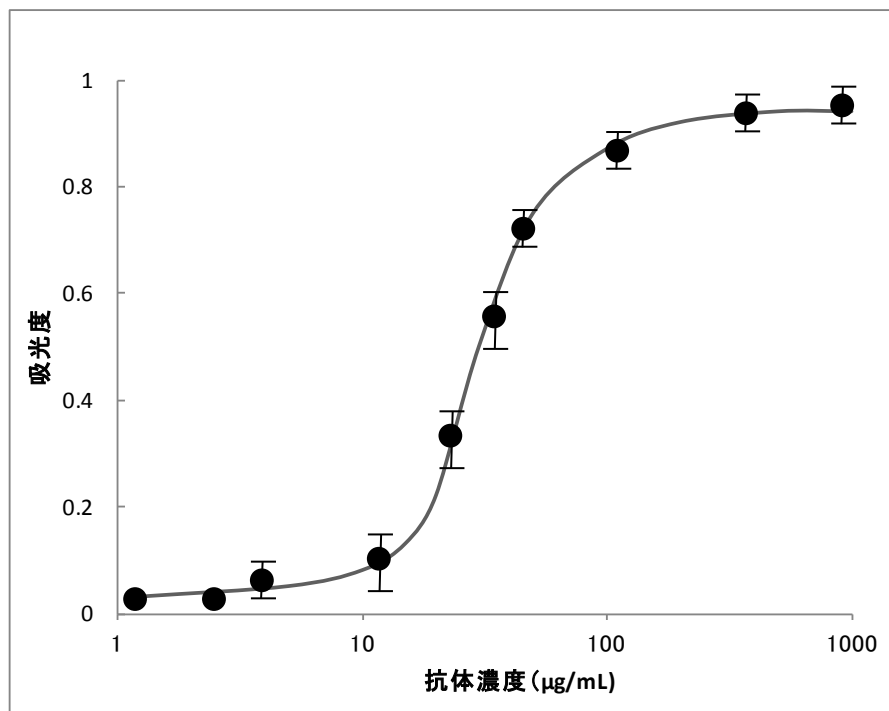
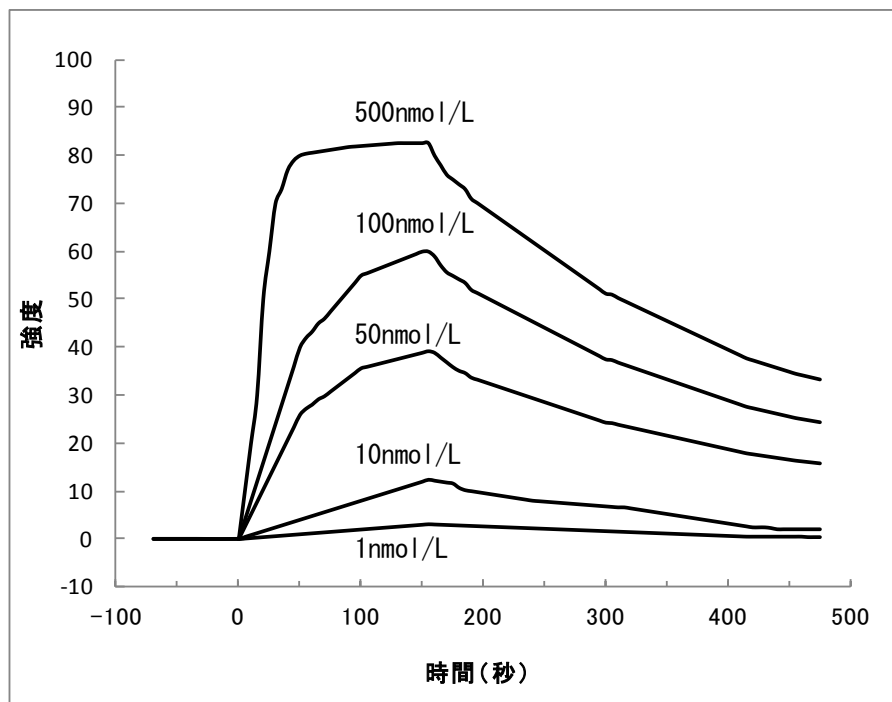


図 2.3.S.3.1-22 HS 抗原への結合反応

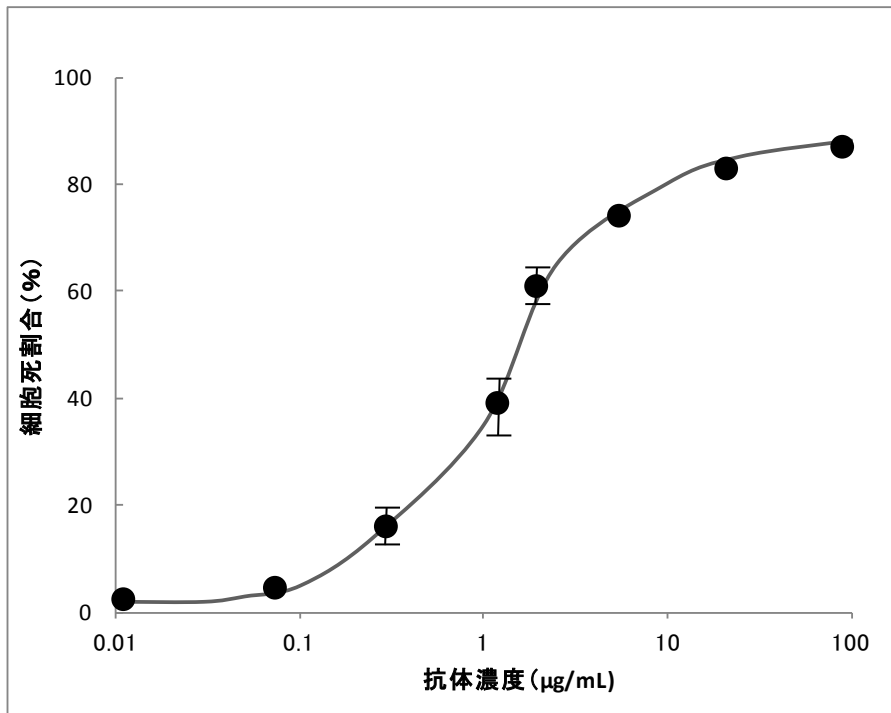


## 2) 機能的特性

### ①補体依存性細胞傷害 (CDC)

CDC 活性を、レサズリンを用いた蛍光光度法で測定した。補体存在下において、ヒューツムマブと HS 抗原を発現する◎癌細胞株 XX-XX を培養した。ヒューツムマブは XX  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から◎癌細胞株 XX-XX の細胞傷害を引き起こし、XX  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で最大に達し、CDC 活性が検出された (図 2.3.S.3.1-23)。

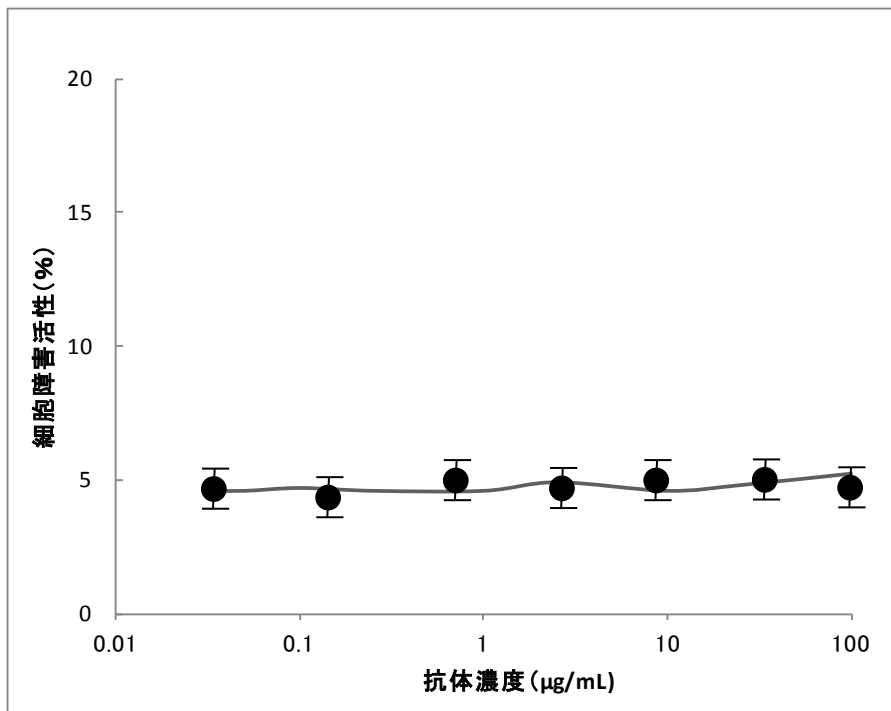
図 2.3.S.3.1-23 CDC 活性 用量相関図



(2) 抗体依存性細胞傷害 (ADCC)

ADCC 活性を  $^{51}\text{Cr}$  遊離法で測定した。ヒト末梢血単核球 (PBMC) 存在下において、ヒューツムマブと HS 抗原を発現する〇〇細胞を培養した。ヒューツムマブは XX  $\mu\text{g/mL}$  までの濃度で〇〇細胞の濃度依存的な細胞傷害を引き起こさず、ADCC 活性は検出されなかった (図 2.3.S.3.1-24)。

図 S.3.1-24 ADCC 活性 用量相関図



#### 解説

- 機能的特性評価のための試験は、抗体医薬品や抗原の特性、期待される薬効等を踏まえて、設定される。今回のモックアップでは、エフェクター分子を介した細胞傷害活性を期待する抗体医薬品を想定しているため、ADCC 活性及び CDC 活性を評価項目に選定した。
- 本モックアップでの ADCC 活性及び CDC 活性の測定方法は例示であり、申請者が設定した測定方法を記載することで良い。また、生物学的性質は抗体の特性に依存し、抗体毎で異なるため、各試験項目の測定結果も例示である。

### 2.3.S.3.2 不純物

编者注：

- 抗体医薬品の目的物質のような複雑な高分子では、目的物質関連物質と目的物質由来不純物を明確に区別することは、科学的に限界がある場合もある。本モックアップでは目的物質関連物質と目的物質由来不純物の両者を明確に区分できないケース（例：イオン交換クロマトグラフィー上のピーク領域，など）としての記載例を示す。

原薬中のヒューツムマブに由来する類縁物質（イオン交換クロマトグラフィー）及び不純物（サイズ排除クロマトグラフィーの高分子量領域及び低分子量領域）の試験結果は、2.3.S.4.4 を参照のこと。

原薬中の製造工程由来不純物については、エンドトキシン及びバイオーバーデン（微生物限度）の試験結果は、2.3.S.4.4 参照のこと。原薬中の宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA、プロテイン A、遺伝子組換えインスリン、メトトレキサートの試験結果は、2.3.S.2.5 を参照のこと。

#### 解説

- 残留溶媒：本モックアップの原薬製造方法で使用している溶媒で、ICH Q3C ガイドライン（平成 10 年 3 月 30 日 医薬審第 307 号）に該当する溶媒は、精製工程の上流で使用する酢酸（クラス 3 の溶媒）のみである。本モックアップの原薬製造方法を考慮すると、原薬中の酢酸残留量は十分低いと推察されることから、本モックアップでは残留溶媒の記載例を示していない。
- 元素不純物：ICH Q3D ガイドライン（平成 27 年 9 月 30 日，薬食審査発 0930 第 4 号）では、「バイオテクノロジー応用原薬までのステップにおいて元素不純物の特別な管理は一般的に必要とされない。」と説明されている。また、本モックアップの製造工程には金属元素を意図的に添加する修飾工程は存在しない。よって、本モックアップの S.3.2 では元素不純物の記載例を示していない。

## 2.3.S.4 原薬の管理（ヒューツムマブ、HS 製薬）

编者注：試験項目、試験方法、規格値及び試験結果の桁数や有効数字等は、あくまで例示であり、日本薬局方等を参考に記載する。

### 2.3.S.4.1 規格及び試験方法

ヒューツムマブ原薬の規格及び試験方法の概略を表 2.3.S.4.1-1 に示す。

表 2.3.S.4.1-1 ヒューツムマブ原薬の規格

試験項目		規格値
性状		無色～微黄色の澄明又はわずかに白濁した液
確認試験	ペプチドマップ	常用標準物質と同一の保持時間に同様のピークを認める
pH		5.8～6.8
糖鎖プロファイル		アフコシル糖鎖 (G0) : ●%以下
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク : ●%以上 酸性領域 : ●%以下 塩基性領域 : ●%以下
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク : ●%以上 高分子量領域 : ●%以下 低分子量領域 : ●%以下
	キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク : ●%以上
エンドトキシン		●EU/mg 未満
微生物限度		総好気性微生物数 : ● CFU/10 mL 以下 真菌数 : ● CFU/10 mL 以下
生物活性 (CDC 活性測定法)		●～● Unit/mg
含量		90～110 mg/mL

#### 解説

- 規格及び試験方法の設定内容  
試験項目、分析方法及び規格値は例示であり、必要十分なものを示しているものではない。
- 性状  
澄明性における英語の opalescent の訳語として「白濁」を使用した。これに限定するものではない。
- ペプチドマップ  
規格値の表記は一例であり、多様な表記があり得る。また、試料溶液と標準溶液を混合し

た溶液について試験を実施する場合や、ペプチドマップで得られるピークのうち特徴的な一部のピークのみについて規格値を設定する場合も考えられる。

- 純度試験で用いるピークの名称

各種クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動で使用するピーク名は一例であり、これに限定するものではない。

## 2.3.S.4.2 試験方法（分析方法）

编者注：

- 本項は、「医薬品の品質に係る承認事項の変更に係る取り扱い等について」（薬生薬審発 0309 第 1 号，薬生監麻発 0309 第 1 号，平成 30 年 3 月 9 日）発出以前の第 1 部承認申請書「規格及び試験方法」のとおりに記載することをイメージした。
- QOS 中の規格及び試験方法における句読点は，本モックアップで使用している「，」と「.」又は「，」と「。」のいずれも使用可能である。
- システム適合性：試験法を考慮して適宜設定する。

ヒューツムマブ原薬の規格及び試験方法は以下のとおりである。

### 1. 含量規格

本品は定量するとき，1mL 当たり 90～110mg のタンパク質を含む。

### 2. 性状

本品は無色～微黄色の澄明又はわずかに白濁した液である。

### 3. 確認試験：ペプチドマップ

本品及びヒューツムマブ標準物質につき，タンパク質として■mg に対応する量を取り，凍結乾燥した後，XXX 緩衝液■ $\mu$ L を加え，更に■mmol/L ジチオスレイトール溶液■ $\mu$ L を加えた後，■ $^{\circ}$ C で■分間おく。次に，■mmol/L ヨードアセトアミド溶液■ $\mu$ L を加え，暗所で■分間おいた後，■mmol/L ジチオスレイトール溶液■ $\mu$ L を加える。この液に■mol/L トリス塩酸緩衝液■ $\mu$ L 及びリシルエンドペプチダーゼ溶液■ $\mu$ L を加え，37 $^{\circ}$ C で■時間おいた後，トリフルオロ酢酸■ $\mu$ L を加え，試料溶液及び標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 100 $\mu$ L につき，次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い，両者のクロマトグラムを比較するとき，同一の保持時間に同様のピークを認める。

#### 試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210nm）

カラム：内径 4.6mm，長さ 20cm のステンレス管に 5 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：25 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

移動相 A：水／トリフルオロ酢酸混液（1000：1）

移動相 B：アセトニトリル／トリフルオロ酢酸混液（1000：1）

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

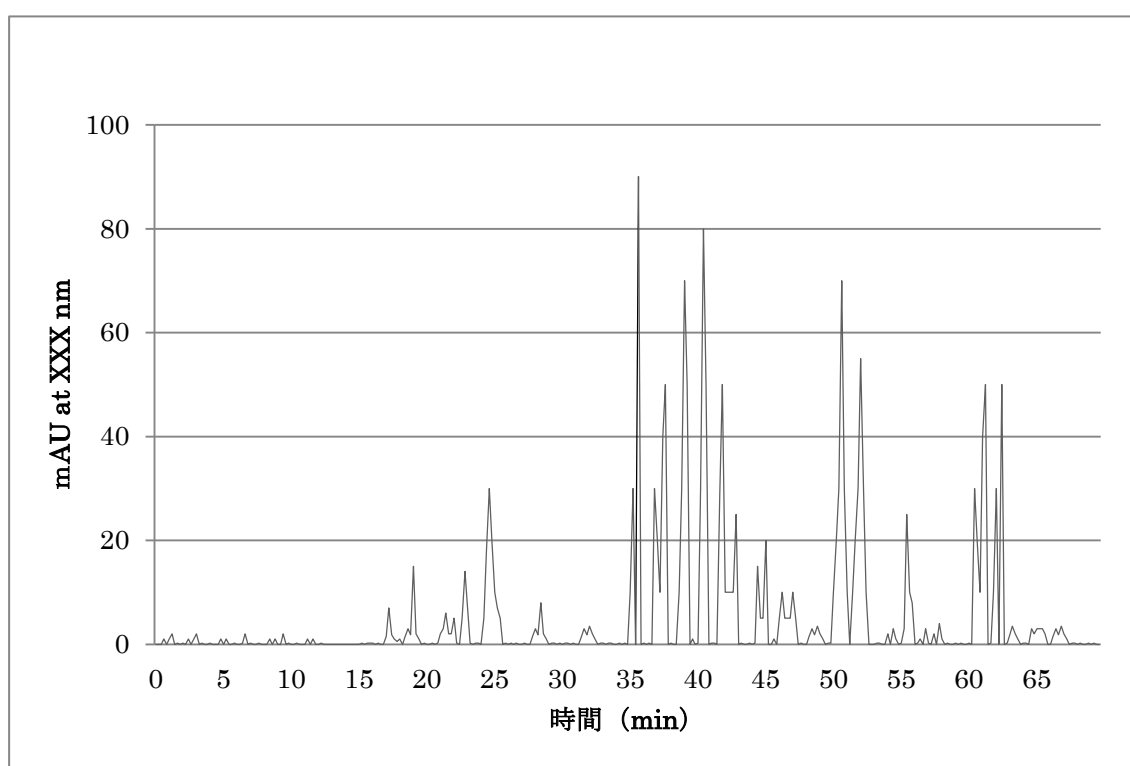
注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～■ (略)	■→■ (略)	■→■ (略)

流量：毎分 1mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液 100  $\mu$ Lにつき、上記の条件で操作するとき、保持時間約 XX 分のピークと保持時間約 YY 分のピークの分離度は 1.5 以上である。

図 2.3.S.4.2-1 確認試験（ペプチドマップ）のクロマトグラムの一例



標準溶液：常用標準物質ロット RS-1

4. pH  
5.8～6.8

5. 糖鎖プロファイル

本品の適量を取り、溶媒を酵素処理用緩衝液に置換し、全量が ■  $\mu$ L となるまで濃縮する。この液にペプチド-N-グリコシダーゼ溶液 ■  $\mu$ L を加えて 37°C で ■～■ 時間静置する。薄めたトリフルオロ酢酸 (1→XXX) ■  $\mu$ L を加えた後、蒸発乾固する。次に、2-アミノベンズアミド ■ mg をジメチルスルホキシド/酢酸 (100) 混液 (■：■) ■ mL に溶かし、この液にシアノ水素化ホウ

素ナトリウム ■mg を溶かす。この液 ■μL を蒸発乾固後の残留物に加え、65℃で ■～■時間静置し、冷後、水、水/酢酸 (100) 混液 (■ : ■) 及びアセトニトリルで平衡化した試薬除去フィルターに全量を滴加した後、アセトニトリル及びアセトニトリル/水混液 (■ : ■) で洗浄する。次に、水 ■mL を滴加し、溶出する 2-アミノベンズアミド標識糖鎖溶液を回収し、溶媒を減圧下蒸発乾固した後、移動相 A/移動相 B 混液 (■ : ■) ■mL を加え、試料溶液とする。試料溶液 50 μL につき、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、面積百分率法によりアフコシル糖鎖の量を求めるとき、●%以下である。

#### 試験条件

検出器：蛍光光度計（励起波長：330nm, 蛍光波長：420nm）

カラム：内径 4.0mm, 長さ 20cm のステンレス管に 5 μm の液体クロマトグラフィー用アミド化シリカゲルを充填する。

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相 A：■mol/L ギ酸溶液に ■mol/L アンモニア溶液を加えて pH を ■ に調整する。

移動相 B：アセトニトリル

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～■ (略)	■→■ (略)	■→■ (略)

流量：毎分 0.5mL

面積測定範囲：試料溶液注入後 ■分間

#### システム適合性

システムの性能：糖鎖標準溶液 ■mg をとり、アセトニトリル/水混液 (■ : ■) ■mL に溶かし、システム適合性試験用溶液とする。システム適合性試験用溶液 50 μL につき、上記の条件で操作するとき、XXXX, アフコシル糖鎖の順に溶出し、その分離度は 1.5 以上である。

#### 6. 純度試験 (1) イオン交換クロマトグラフィー

本品の適量をとる、1mL 中にタンパク質 ■mg を含む液となるよう移動相 A を加え、試料溶液とする。試料溶液 50 μL につき、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、面積百分率法によりそれらの量を求めるとき、主ピークは●%以上、酸性領域は●%以下、塩基性領域は●%以下である。

#### 試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 210nm）

カラム：内径 4.0 mm，長さ 20cm のポリエーテルエーテルケトン管に 10  $\mu$  m の液体クロマトグラフィー用陽イオン交換樹脂を充填する。

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相 A：無水リン酸水素二ナトリウム ■g，リン酸二水素ナトリウム一水和物 ■g 及び塩化ナトリウム ■g を水に溶かして ■mL とし，リン酸を加えて pH6.5 に調整した後，さらに水を加えて ■mL とする。

移動相 B：無水リン酸水素二ナトリウム ■g，リン酸二水素ナトリウム一水和物 ■g 及び塩化ナトリウム ■g を水に溶かして ■mL とし，リン酸を加えて pH6.5 に調整した後，さらに水を加えて ■mL とする。

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～■ (略)	■→■ (略)	■→■ (略)

流量：毎分 1.0mL

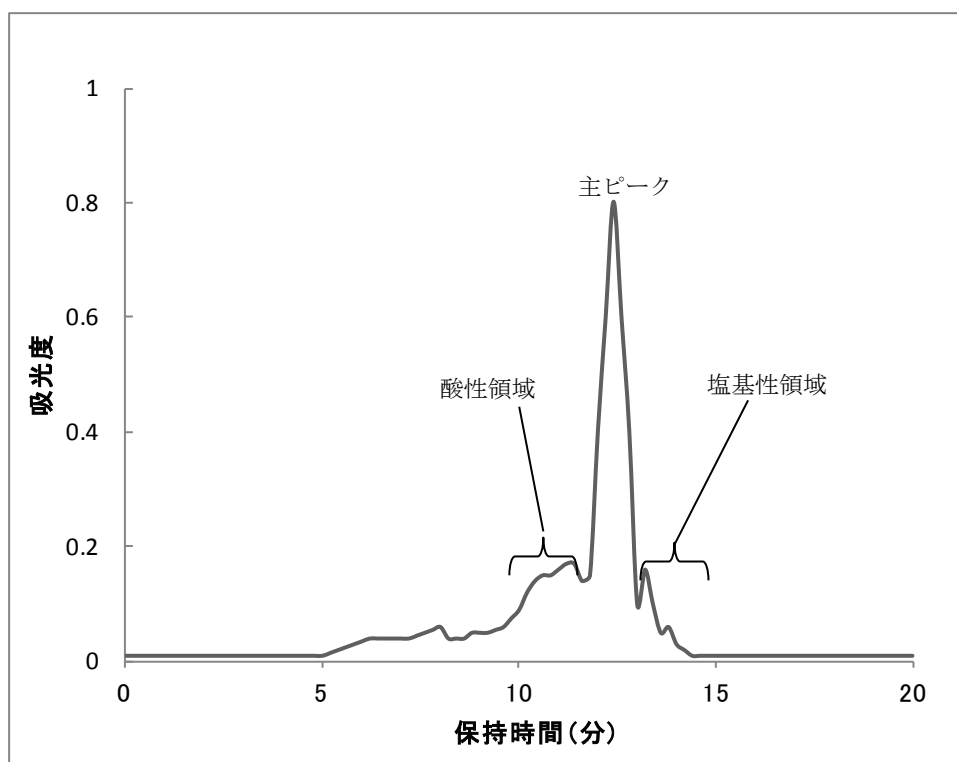
面積測定範囲：溶媒ピークの後から主ピークの保持時間の約 2 倍の範囲

#### システム適合性

検出の確認：ヒューツムマブ標準物質の適量を取り，1mL 中にタンパク質 ■mg を含む液となるよう移動相 A を加え，システム適合性試験用溶液とする。システム適合性試験用溶液 50  $\mu$  L につき，上記の条件で操作するとき，主ピークの SN 比は ● 以上である。

システムの性能：システム適合性試験用溶液 50  $\mu$  L につき，上記の条件で操作するとき，0K ピーク，1K ピークの順に溶出し，その分離度は ● 以上である。

図 2.3.S.4.2-2 代表ロット●●のイオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラム



#### 7. 純度試験 (2) サイズ排除クロマトグラフィー

本品の適量を取り、1mL 中にタンパク質■mg を含む液となるよう移動相を加え、試料溶液とする。試料溶液 50 $\mu$ L につき、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、面積百分率法によりそれらの量を求めるとき、主ピークは●%以上、高分子量領域は●%以下、低分子領域は●%以下である。

##### 試験条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長 210nm）

カラム：内径 8.0mm、長さ 20cm のステンレス管に 5 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用親水性シリカゲルを充填する。

カラム温度：25 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

移動相：無水リン酸水素二ナトリウム■g、リン酸二水素ナトリウム一水和物■g 及び塩化ナトリウム■g を水に溶かして■mL とし、必要ならばリン酸を加えて pH6.5 に調整する。

流量：毎分 0.5mL

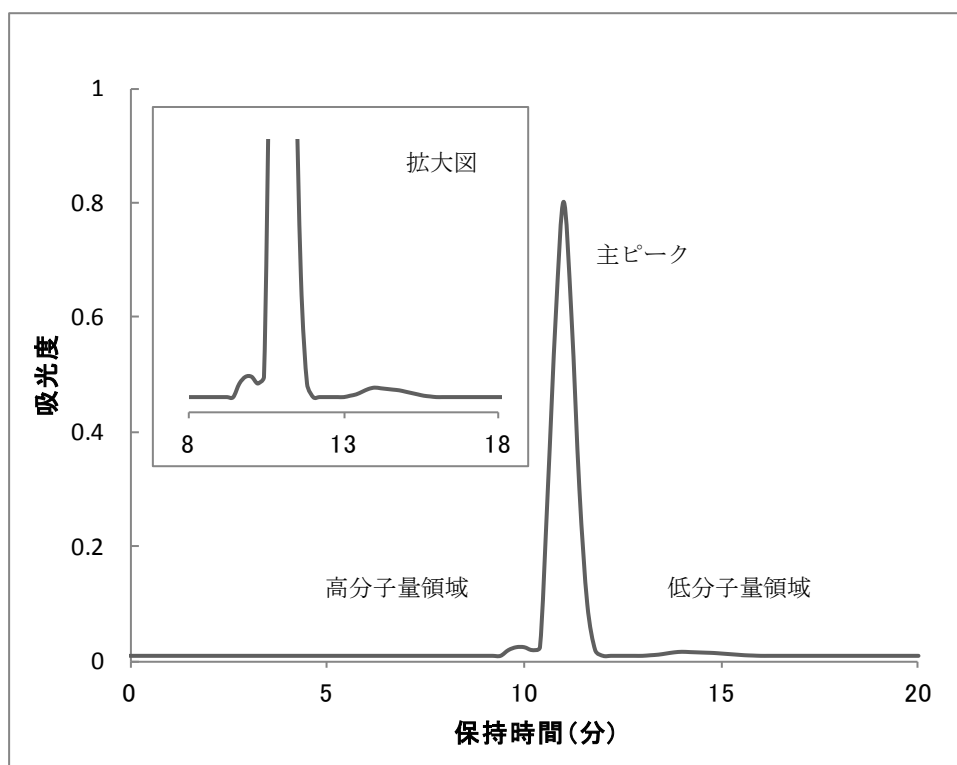
面積測定範囲：溶媒ピークの後から主ピークの保持時間の約 2 倍の範囲

##### システム適合性

検出の確認：ヒューツムマブ標準物質の適量を取り、1mL 中にタンパク質■mg を含む液となるよう移動相 A を加える。この液 50 $\mu$ L につき、上記の条件で操作するとき、ヒューツムマブピークの SN 比は●以上である。

システムの性能：分子量マーカー溶液 50  $\mu$ Lにつき，上記の条件で操作するとき，□，△の順に溶出し，その分離度は 1.5 以上である。

図 2.3.S.4.2-3 代表ロット●●のサイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラム



#### 8. 純度試験 (3) キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)

本品の適量を取り，1mL 中にタンパク質  $\blacksquare$  mg を含む液となるよう水を加える．この液  $\blacksquare$   $\mu$ L をとり，非還元試料緩衝液  $\blacksquare$   $\mu$ L 及び  $\blacksquare$  mmol/L ヨードアセトアミド溶液  $\blacksquare$   $\mu$ L を加えた後，70°C で  $\blacksquare$  分間加温し，試料溶液とする．試料溶液につき，次の条件でキャピラリー電気泳動法により試験を行う．試料溶液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し，各ピークの移動時間で除したピーク面積を用いて面積百分率法によりピークの量を求めるとき，主ピークは●%以上である．

##### 試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 210nm）

キャピラリー：内径 50  $\mu$ m，有効長 20cm のフューズドシリカの毛細管

キャピラリー温度：25°C 付近の一定温度

泳動液：SDS キャピラリー電気泳動緩衝液

試料導入法：電気的導入法

電気泳動： $\blacksquare$  ボルト

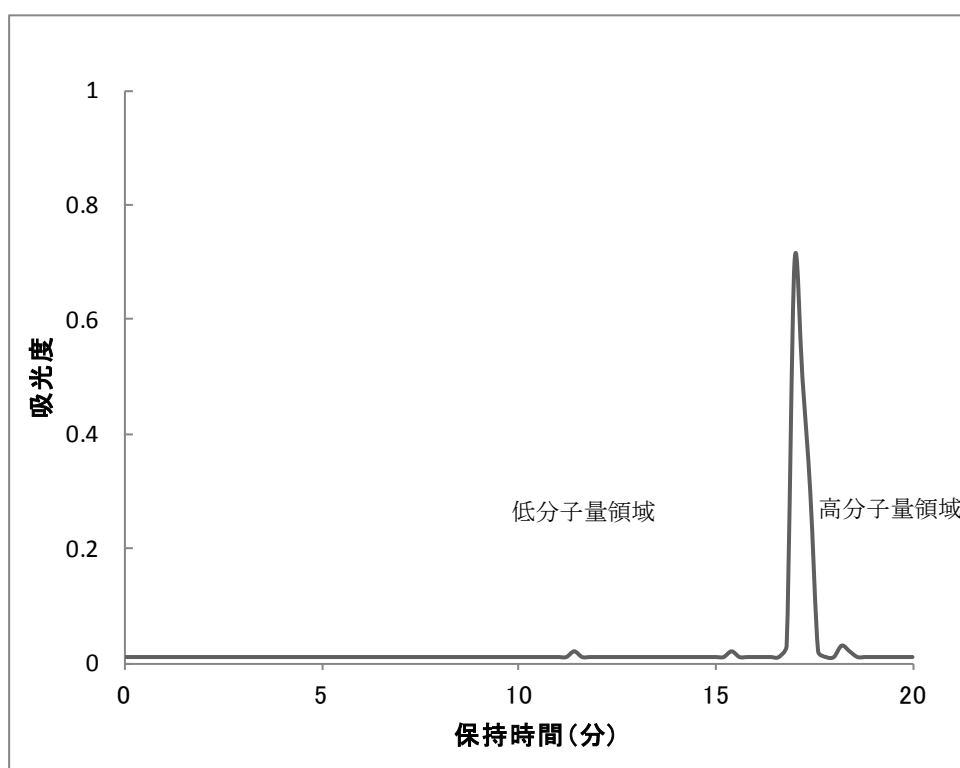
泳動時間：15 分間

##### システム適合性

検出の確認：ヒューツムマブ標準物質の適量を取り，1mL 中にタンパク質 ■mg を含む液となるよう水を加える．この液 ■ $\mu$ L をとり，水 ■ $\mu$ L を加える．この液 ■ $\mu$ L をとり，非還元試料緩衝液 ■ $\mu$ L 及び ■mmol/L ヨードアセトアミド溶液 ■ $\mu$ L を加えた後，70°C で ■分間加温する．この液につき、上記の条件で操作するとき、ヒューツムマブの SN 比は 10 以上である．

システムの性能：ヒューツムマブ標準物質の適量を取り，1mL 中にタンパク質 ■mg を含む液となるよう水を加える．この液 ■ $\mu$ L をとり，非還元試料緩衝液 ■ $\mu$ L 及び ■mmol/L ヨードアセトアミド溶液 ■ $\mu$ L を加えた後，70°C で ■分間加温する．この液につき、上記の条件で操作するとき、標準エレクトロフェログラム（図 2.3.S.4.2-4 参照）と溶出プロファイルが同等であることを確認する．

図 2.3.S.4.2-4 代表ロット ●● のエレクトロフェログラム



9. エンドトキシン

●EU/mg 未満

10. 微生物限度

本品 10mL 当たり，総好気性微生物数は ●CFU 以下，総真菌数は ●CFU 以下である．

11. 生物活性

本品及びヒューツムマブ標準物質の適量を取り，それぞれ 1mL 中にタンパク質 ■mg を含む液となるよう生物活性試験培地を加え，試料原液及び標準原液とする．試料原液及び標準原液につ

き、希釈用マイクロプレート上で生物活性試験培地を加えて■, ■, ■, ■, ■, ■, ■及び■ $\mu$ g/mLの2倍階希釈系列を作成し、試料希釈系列及び標準希釈系列とする。◆細胞を解凍し、リン酸塩緩衝生理食塩液を用いて洗浄した後、生物活性試験培地適量に懸濁して細胞数及び生存率を測定し、1mL中に◆細胞■ $\times 10^6$ 個含まれるよう試験培地を加え、◆細胞懸濁液とする。試験用マイクロプレートの■～■列に試料溶液系列及び標準溶液系列の各液■ $\mu$ Lをそれぞれ3穴に加え、空試験として■列に試験培地■ $\mu$ Lを加えた後、各穴に◆細胞懸濁液■ $\mu$ Lを加える。■ $^{\circ}$ Cで■分間静置した後、各穴に補体溶液■ $\mu$ Lを加え、更に■ $^{\circ}$ Cで■分間静置する。各穴にアラマーブルー溶液■ $\mu$ Lを加え、■ $^{\circ}$ Cで■～■分間振り混ぜる。各穴の液につき、蛍光光度法により試験を行い、励起波長 530nm、蛍光波長 590nm における蛍光強度を測定する。解析ソフトを用いて、標準希釈系列の蛍光強度から4パラメータロジスティック回帰により検量線を作成し、本品の相対力価を求め、次式により本品の生物活性を求めるとき、●～● Unit/mg である。

本品の生物活性 (Unit/mg) = 相対力価  $\times$  ヒューツムマブ標準物質の生物活性 (Unit/mg)

#### システム適合性

(略)

#### 12. 定量法

本品の適量を取り、波長 280nm における吸光度が■～■となるよう定量法緩衝液を加え、試料溶液とする。試料溶液につき、定量用緩衝液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により、波長 280 nm における吸光度  $A_T$  を測定する。

タンパク質含量 (mg/mL) =  $A_T / (1.38 \times l) \times$  希釈倍率

1.38 : 吸光係数 (ヒューツムマブ 1 mg/mL 溶液の吸光度)

$l$  : セル光路長 (cm)

#### 13. 試薬・試液

(略)

#### 解説

- 全般

記載例であり、不整合や現実的ではない記述が含まれている可能性がある。

- 糖鎖プロファイル、純度試験 (イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー)

PDG における一般試験法「液体クロマトグラフィー」の動向を鑑み、面積百分率法による試験ではシステムの再現性は設定していない。

- 純度試験（イオン交換クロマトグラフィー，サイズ排除クロマトグラフィー）  
システム適合性の検出の確認として，試料溶液と同濃度に調製した標準溶液から得られるサブピークが，予め規定する範囲内であることを確認する方法も考えられる。
- 純度試験（キャピラリー電気泳動法（非還元条件））  
面積百分率法による液体クロマトグラフィーを用いた試験と同様に，システムの再現性は設定していない。
- 生物活性  
測定結果の解析方法は，申請者の考え方に基づいて用いる統計解析法を設定する。試験の有効性（成立条件）の判定方法を「システム適合性」としたが，用語は一例である。また，判定方法の内容は試験方法や測定結果の解析方法等により多様であるため，例示していない。
- 試薬・試液  
試薬・試液の項を立てずに，各試験それぞれの箇所に記載する方法もある。市販の試薬等の製品名は将来変更される可能性がある場合、「[製品名] 又は同等品」と記載できる。

### 2.3.S.4.3 試験方法（分析方法）のバリデーション

编者注：

以下の灰色マーカー部分は、ICH Q2 ガイドラインに準じて試験したことを申請者側が強調したい場合の記載例である。

「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」（平成7年7月20日 薬審第755号）及び「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」（平成9年10月28日 医薬審第338号）に基づき、表2.3.S.4.3-1に示す試験項目について分析法バリデーションを実施した。なお、性状及びpHは日本薬局方通則及び一般試験法に準拠するため、バリデーションは実施しなかった。エンドトキシンは反応干渉因子試験を実施した。微生物限度は製品存在下での測定法の適合性により評価した。

以上のとおり分析バリデーションを実施し、試験方法が適切であることを確認した。

表 2.3.S.4.3-1 各試験項目で実施したバリデーション

試験項目 \ 分析法パラメータ	特異性	直線性	真度	併行精度	室内再現精度	検出限界	定量限界	範囲
確認試験（ペプチドマップ）	○	—	—	—	—	—	—	—
糖鎖プロファイル	○	○	○	○	○	—	○	○
純度試験 IEX	○	○	○	○	○	○	○	○
純度試験 SEC	○	○	○	○	○	○	○	○
純度試験 CE-SDS/非還元	○	○	○	○	○	○	○	○
生物活性（CDC 活性測定）	○	○	○	○	○	—	—	○
含量	—	○	○	○	○	—	—	○

○：バリデーションを実施した項目

—：バリデーションを実施しなかった項目

各試験項目における分析法バリデーション結果は以下の通り。

表 2.3.S.4.3-2 確認試験（ペプチドマップ）のバリデーション結果

分析能パラメータ	実施内容	結果
特異性	ブランク、△△マブ及びヒューツムマブ原薬を測定	ヒューツムマブは特徴的なプロファイルを示した。△△マブとは異なるプロファイルを示した。

表 2.3.S.4.3-3 糖鎖プロファイルのバリデーション結果

分析能パラメータ	実施内容	結果
特異性	ヒューツムマブ原薬及びブランク溶液を測定	ヒューツムマブ原薬で糖鎖由来のピークを認めた。ブランク溶液では、各糖鎖の溶出位置にピークを認めなかった。
直線性	● ~ 120 % の 5 水準を測定	GOF : 相関係数: 0.9●●、y 切片: ●●● (95 % CI●●● ~ ●●●)、残差平方和: ●●● G0 : ... その他合計 : ...
真度	80 ~ 120 % の 3 水準を 3 回繰り返し測定	G0 : ●% (95 % CI ● ~ ●%) その他合計 : ...
併行精度	ヒューツムマブ原薬を 6 回繰り返し測定	G0 : 標準偏差: ● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差: ●% その他合計 : ...
室内再現精度	●●、●●及び●●を変動要因とした 6 条件でヒューツムマブ原薬を測定	G0 : 標準偏差: ● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差: ●% その他合計 : ...
定量限界	●%水準を 3 回繰り返し測定	●%
範囲		ヒューツムマブ原薬濃度として 80 ~ 120 %

表 2.3.S.4.3-4 純度試験 イオン交換クロマトグラフィーのバリデーション結果

分析能パラメータ	実施内容	結果
特異性	ヒューツムマブ原薬及びブランク溶液を測定	ブランク溶液では、ヒューツムマブ由来のピークの溶出位置にピークを認めなかった。
直線性	● ~ 120 % の 5 水準を測定	相関係数 : 0.9●● y 切片 : ●●● (95 % CI ●●● ~ ●●●) 残差平方和 ●●●●
真度	50 ~ 150 % の 3 水準を 3 回繰り返し測定	●% (95 % CI ● ~ ●%)
併行精度	ヒューツムマブ原薬を 6 回繰り返し測定	主ピーク : 標準偏差: ● (90 % CI ● ~ ●%) 相対標準偏差: ● % 酸性領域 : ... 塩基性領域 : ...
室内再現精度	●●、●●●及び●●●を変動要因とした 6 条件でヒューツムマブ原薬を測定	主ピーク : 標準偏差: ● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差: ● % 酸性領域 : ... 塩基性領域 : ...
検出限界	●%水準を 3 回繰り返し測定	●%
定量限界	●%水準を 3 回繰り返し測定	●%
範囲		● ~ ●%

表 2.3.S.4.3-5 純度試験 サイズ排除クロマトグラフィーのバリデーション結果

分析能パラメータ	実施内容	結果
特異性	ヒューツムマブ原薬及びブランク溶液を測定	ブランク溶液では、ヒューツムマブ由来のピークの溶出位置にピークを認めなかった。
直線性	● ~ 120%の 5 水準を測定	相関係数：0.9●● y 切片：●●● (95 % CI ●●● ~ ●●●) 残差平方和：●●●
真度	50 ~ 150%の 3 水準を 3 回繰り返し測定	●% (95 % CI ● ~ ●%)
併行精度	ヒューツムマブ原薬を 6 回繰り返し測定	主ピーク： 標準偏差：● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●% 高分子量領域：… 低分子量領域：…
室内再現精度	●●、●●●及び●●●を変動要因とした 6 条件でヒューツムマブ原薬を測定	主ピーク： 標準偏差：● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●% 高分子量領域：… 低分子量領域：…
検出限界	●%水準で 3 回繰り返し測定	●%
定量限界	●%水準で 3 回繰り返し測定	●%
範囲		● ~ ●%

表 2.3.S.4.3-6 純度試験 キャピラリー電気泳動法（非還元条件）のバリデーショ結果

分析能パラメータ	実施内容	結果
特異性	ヒューツムマブ原薬及びブランク溶液を測定	ブランク溶液では、ヒューツムマブ由来のピークの移動時間にピークを認めなかった。
直線性	● ~ 120 % の 5 水準を測定	相関係数：0.9●● y 切片：●●● (95 % CI ●●● ~ ●●●) 残差平方和：●●●
真度	50 ~ 150 % の 3 水準を 3 回繰り返し測定	●% (95 % CI ● ~ ●%)
併行精度	ヒューツムマブ原薬を 6 回繰り返し測定	主ピーク： 標準偏差：● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●%
室内再現精度	●●、●●及び●●を変動要因とした 6 条件でヒューツムマブ原薬を測定	主ピーク： 標準偏差：● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●%
検出限界	●%水準で3回繰り返し測定	●%
定量限界	●%水準で3回繰り返し測定	●%
範囲		● ~ ●%

表 2.3.S.4.3-9 生物活性（CDC 活性測定法）のバリデーショ結果

分析能パラメータ	実施内容	結果
特異性	ヒューツムマブ原薬及びブランク溶液を測定	ヒューツムマブ原薬は細胞傷害活性を示した。ブランク溶液は細胞障害活性を示さなかった。
直線性	●~●Unit/mL の 5 水準（通常 の分析の 70~130%相当）を測定	相関係数：0.9●● y 切片：●●● (95 % CI ●●● ~ ●●●) 残差平方和：●●●
真度	●~●Unit/mL の 3 水準（通常 の分析の 70~130%相当）を測定	●% (95 % CI ● ~ ●%)
併行精度	ヒューツムマブ原薬を 6 回繰り返し測定	標準偏差：● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●%
室内再現精度	●●、●●及び●●を変動要因 とした 6 条件でヒューツムマブ原薬を測定	標準偏差：● (90 % CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●%
範囲		●~●Unit/mg

表 2.3.S.4.3-10 含量のバリデーション結果

分析能パラメータ	実施内容	結果
直線性	●~●mg/mL の 5 水準（通常の分析の 80~120%相当）を測定	相関係数：0.9●● y 切片：●●● (95%CI ●●● ~ ●●●) 残差平方和：●●●
真度	●~●mg/mL の 5 水準（通常の分析の 80~120%相当）を測定	● % (95%CI ● ~ ●%)
併行精度	ヒューツムマブ原薬を 6 回繰り返し測定	標準偏差：● (90%CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●%
室内再現精度	●●、●●及び●●を変動要因とした 6 条件でヒューツムマブ原薬を測定	標準偏差：● (90%CI ● ~ ●) 相対標準偏差：●%
範囲		ヒューツムマブ原薬として 80~120 mg/mL

**解説**

- ・ 表 2.3.S.4.3-1：この表のように全試験の分析能パラメータをまとめることは必須ではない。
- ・ 表 2.3.S.4.3-2（ペプチドマップ）： 特異性の結果として「ヒューツムマブは特徴的なプロファイルを示した。」と記載しているが、これは他のタンパク質／抗体が同施設で製造・試験されているケースをイメージしたものである。抗体医薬品は製品間で構造の類似性が高いことから、他の抗体と識別が可能なように特異性が求められる場合がある。

### 2.3.S.4.4 ロット分析

表 2.3.S.4.4-1 原薬のロット分析

ロット番号	DS-P001	DS-0001	
製造スケール	1000 L	1000 L	
製造方法	製法 A	製法 A	
製造日	20YY/MM/DD	20YY/MM/DD	
製造場所	サイト A	サイト A	
用途	安定性試験、XXXX	標準物質 (ST-1)、毒性試験、臨床第 I 相試験、XXXX	
試験項目	分析結果	分析結果	
性状	微黄色でわずかに白濁した液	無色澄明の液	
確認試験	ペプチドマップ	ヒューツムマブ由来ペプチドのピークを認めた	ヒューツムマブ由来ペプチドのピークを認めた
	等電点電気泳動法	pI ●, ▲及び■付近に 3 本のバンドを認めた	pI ●, ▲及び■付近に 3 本のバンドを認めた
	CDC 活性	ヒューツムマブ濃度に依存する用量反応曲線を認めた	ヒューツムマブ濃度に依存する用量反応曲線を認めた
pH	6.2	6.4	
糖鎖プロファイル	G0 : ●%	G0 : ●%	
純度試験	イオン交換 クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%
	サイズ排除 クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%
	キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク : ●%	主ピーク : ●%
	宿主細胞由来タンパク質	● ng/mg	● ng/mg
	宿主細胞由来細胞 DNA	● pg/mg	● pg/mg
	プロテイン A	● ng/mg	● ng/mg
	エンドトキシン	●EU/mg 未満	●EU/mg 未満
微生物限度	TAMC : ● CFU/10 mL	TAMC : ● CFU/10 mL	
	TYMC : ● CFU/10 mL	TYMC : ● CFU/10 mL	
生物活性 (CDC 活性測定法)	● Unit/mg	● Unit/mg	
含量	99 mg/mL	104 mg/mL	

表 2.3.S.4.4-1 原薬のロット分析（続）

ロット番号		DS-0002	DS-0010	DS-0011
製造スケール		1000 L	1000 L	1000 L
製造方法		製法 B	製法 B	製法 B
製造日		20YY/MM/DD	20YY/MM/DD	20YY/MM/DD
製造場所		サイト B	サイト B	サイト B
用途		標準物質 (ST-2)、XXXX	臨床第Ⅱ相試験、一次標準物質 (PRS-1)、XXX	常用標準物質 (RS-1)、XXXX
試験項目		分析結果	分析結果	分析結果
性状		微黄色澄明の液	無色澄明の液	無色澄明の液
確認試験	ペプチドマップ	標準物質ロット ST-1 と同様のバンドパターンを示した	標準物質ロット ST-2 と同様のバンドパターンを示した	一次標準物質ロット PRS-1 と同様の溶出パターンを示した
	等電点電気泳動法	標準物質ロット ST-1 と同様のバンドパターンを示した	—	—
	CDC 活性	ヒューツムマブ濃度に依存する用量反応曲線を認めた	—	—
pH		6.3	6.4	6.5
糖鎖プロファイル		G0 : ●%	G0 : ●%	G0 : ●%
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%
	キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク : ●%	主ピーク : ●%	主ピーク : ●%
	宿主細胞由来タンパク質	● ng/mg	● ng/mg	● ng/mg
	宿主細胞由来細胞 DNA	● pg/mg	● pg/mg	● pg/mg
	プロテイン A	● ng/mg	● ng/mg	● ng/mg
	エンドトキシン		●EU/mg 未満	●EU/mg 未満
微生物限度		TAMC : ●CFU/10 mL TYMC : ●CFU/10 mL	TAMC : ●CFU/10 mL TYMC : ●CFU/10 mL	TAMC : ●CFU/10 mL TYMC : ●CFU/10 mL
生物活性 (CDC 活性測定法)		● Unit/mg	● Unit/mg	● Unit/mg
含量		99 mg/mL	104 mg/mL	98 mg/mL

表 2.3.S.4.4-1 原薬のロット分析（続）

ロット番号		DS-0013	DS-0014
製造スケール		2000 L	2000 L
製造方法		製法 C1	製法 C1
製造日		20YY/MM/DD	20YY/MM/DD
製造場所		サイト B	サイト B
用途		安定性試験 XXXX	臨床第Ⅲ相試験 安定性試験 XXXX
試験項目		分析結果	分析結果
性状		無色でわずかに白濁した液	無色澄明の液
確認試験	ペプチドマップ	常用標準物質ロット RS-1 と同様の溶出パターンを示した	常用標準物質ロット RS-1 と同様の溶出パターンを示した
pH		6.3	6.2
糖鎖プロファイル		G0 : ●%	G0 : ●%
純度試験	イオン交換 クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%
	サイズ排除 クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%
	キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク : ●%	主ピーク : ●%
	宿主細胞由来タンパク質	● ng/mg	● ng/mg
	宿主細胞由来細胞 DNA	● pg/mg	● pg/mg
	プロテイン A	● ng/mg	● ng/mg
エンドトキシン		●EU/mg 未満	●EU/mg 未満
微生物限度		TAMC : ●CFU/10 mL TYMC : ●CFU/10 mL	TAMC : ●CFU/10 mL TYMC : ●CFU/10 mL
生物活性 (CDC 活性測定法)		● Unit/mg	● Unit/mg
含量		99 mg/mL	101 mg/mL

表 2.3.S.4.4-1 原薬のロット分析（続）

ロット番号		DS-0017	DS-0018	DS-0019
製造スケール		5000 L	5000 L	5000 L
製造方法		製法 C2	製法 C2	製法 C2
製造日		20YY/MM/DD	20YY/MM/DD	20YY/MM/DD
製造場所		サイト C	サイト C	サイト C
用途		安定性試験 XXXX	安定性試験 XXXX	安定性試験 XXXX
試験項目		分析結果	分析結果	分析結果
性状		無色澄明の液	微黄色澄明の液	無色澄明の液
確認試験	ペプチドマップ	常用標準物質ロット RS-1 と同様の溶出パターンを 示した	常用標準物質ロット RS-1 と同様の溶出パターンを 示した	常用標準物質ロット RS-1 と同様の溶出パターンを 示した
pH		6.2	6.4	6.3
糖鎖プロファイル		G0 : ●%	G0 : ●%	G0 : ●%
純度試験	イオン交換 クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%	主ピーク : ●% 酸性領域 : ●% 塩基性領域 : ●%
	サイズ排除 クロマトグラフィー	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%	主ピーク : ●% 高分子量領域 : ●% 低分子量領域 : ●%
	キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク : ●%	主ピーク : ●%	主ピーク : ●%
	宿主細胞由来タンパク質	● ng/mg	● ng/mg	● ng/mg
	宿主細胞由来細胞 DNA	● pg/mg	● pg/mg	● pg/mg
	プロテイン A	● ng/mg	● ng/mg	● ng/mg
エンドトキシン		●EU/mg 未満	●EU/mg 未満	●EU/mg 未満
微生物限度		TAMC : ● CFU/10 mL TYMC : ● CFU/10 mL	TAMC : ● CFU/10 mL TYMC : ● CFU/10 mL	TAMC : ● CFU/10 mL TYMC : ● CFU/10 mL
生物活性 (CDC 活性測定法)		● Unit/mg	● Unit/mg	● Unit/mg
含量		102 mg/mL	100 mg/mL	101 mg/mL

TAMC : 総好気性微生物数、TYMC : 総真菌数

## 2.3.S.4.5 規格及び試験方法の妥当性

### 1. 規格及び試験方法の妥当性

規格の設定にあたっては、商用製法である C2 製法で製造した 3 ロットと C1 製法で製造した 2 ロットを加えた計 5 ロットの試験結果 (2.3.S.4.4 参照)、分析法バリデーションの結果 (2.3.S.4.3 参照) 及び安定性試験の結果 (2.3.S.7 参照) を考慮した。

#### 1) 性状

ロット分析結果及び安定性試験の結果を考慮し、ヒューツムマブ原薬の性状の規格を「無色～微黄色の澄明又はわずかに白濁した液」と設定した。

#### 2) 確認試験 (ペプチドマップ)

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの試験結果 (2.3.S.4.4 参照) は、すべて「常用標準物質と同一の保持時間のところに同様のピークを認める」であった。よって、規格の適否の判定基準を「常用標準物質と同一の保持時間のところに同様のピークを認める」と設定した。

#### 3) pH

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの試験結果は 6.2～6.4 であった (2.3.S.4.4 参照)。以上より、pH の規格を「5.8～6.8」と設定した。

#### 4) 糖鎖プロファイル

ヒューツムマブの主な作用機序は、HS 抗原発現細胞に結合し、補体依存性細胞傷害により HS 抗原発現細胞の増殖を阻害することである (Xxxxx et al. 2005)。エフェクター機能はヒューツムマブの作用機序の一部であり、アフコシル糖鎖の割合と生物活性の関係性が報告されている (Yyyyy et al.2006)。そこで、ヒューツムマブの糖鎖プロファイル分析において、アフコシル糖鎖の中で最も割合の高い G0 マイナス F を対象として規格を設定した。

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの糖鎖プロファイル分析におけるアフコシル糖鎖「G0 マイナス F」の試験結果は、●～●%であった (2.3.S.4.4 参照)。平均+3×標準偏差=▲%と、分析法のバラツキ (2.3.S.4.3 参照) を考慮し、アフコシル糖鎖 (G0 マイナス F) の規格値を「●%以下」と設定した。

#### 5) 純度試験

##### (1) イオン交換クロマトグラフィー

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの試験結果 (2.3.S.4.4) の解析結果を下表に示す。以下の結果と安定性試験結果 (2.3.S.7) を考慮し、主ピーク、酸性領域及び塩基性領域の規格値をそれぞれ●%以上、●%以下、●%以下と設定した。

ロット分析結果	ヒューツムマブ原薬 5 ロットのイオン交換クロマトグラフィー試験結果		
	主ピーク (%)	酸性領域(%)	塩基性領域(%)
最小値	■	■	■
最大値	■	■	■
平均値	■	■	■
標準偏差	■	■	■

(2) サイズ排除クロマトグラフィー

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの試験結果 (2.3.S.4.4) の解析結果を下表に示す。以下の結果と安定性試験結果 (2.3.S.7) を考慮し、主ピーク、高分子量領域及び低分子量領域の規格値をそれぞれ●%以上、●%以下、●%以下と設定した。

ロット分析結果	ヒューツムマブ原薬 5 ロットのサイズ排除クロマトグラフィー試験結果		
	主ピーク (%)	高分子量領域(%)	低分子量領域(%)
最小値	■	■	■
最大値	■	■	■
平均値	■	■	■
標準偏差	■	■	■

(3) キャピラリー電気泳動 (非還元条件)

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの試験結果 (2.3.S.4.4) の解析結果を下表に示す。以下の結果と安定性試験結果 (2.3.S.7) を考慮し、主ピークの規格値を●%以上と設定した。

ロット分析結果	ヒューツムマブ原薬 5 ロットのキャピラリー電気泳動試験結果
	主ピーク (%)
最小値	■
最大値	■
平均値	■
標準偏差	■

6) エンドトキシン

日本薬局方参考情報「エンドトキシン規格値の設定」に示された K/M 値の式に基づき、ヒューツムマブのエンドトキシン規格値を算出すると以下のとおりとなる。

$$\frac{5.0 \text{ (EU/kg)}}{\text{YYY (mg)}} = \text{X.X (EU/mg)}$$

加えて、試験法のバラツキを考慮した安全係数(●)を考慮し、ヒューツムマブ原薬のエンドトキシンの規格値を「ヒューツムマブのタンパク質 1 mg 当たり □ EU 未満」と設定した。

#### 7) 微生物限度

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの試験結果は 0~5 CFU/10 mL であった (2.3.S.4.4 参照)。ヒューツムマブ原薬の微生物限度の規格値は、総好気性微生物数、真菌数それぞれ、● CFU/10 mL 以下と設定した。

#### 8) 生物活性 (CDC 活性測定法)

この生物活性試験 (CDC 活性測定法) の分析法バリデーション結果 (2.3.S.4.3) から、室内再現精度は●~●%であった。ヒューツムマブ原薬のロット分析結果は、□~□ Unit/mg の範囲であった (2.3.S.4.4 参照)。

以上の結果と安定性試験の結果を考慮し、ヒューツムマブの生物活性の規格値は、●~● Unit/mg と設定した。

#### 9) 含量

ヒューツムマブ原薬 5 ロットの含量の試験結果は 99~102 mg/mL であった。また、この試験結果を用いて製造実績のバラツキ (平均値 ± 3×標準偏差) を算出したところ、96.6~103.4 mg/mL であった。以上よりヒューツムマブ原薬の製造実績と試験法のバラツキ、及び安定性試験の結果を考慮し、含量の規格値を「90~110 mg/mL」として設定した。

## 2. 規格及び試験方法として採用しなかった項目

### 1) 宿主細胞由来タンパク質

製造工程中でヒューツムマブ濃度が最も高く、宿主細胞由来タンパク質を最も感度良く測定できる濃縮・緩衝液置換 2 工程において工程内管理試験として設定したため、原薬の規格試験としては設定しなかった。

### 2) 宿主細胞由来 DNA

製法 A~製法 C2 の原薬ロット全体を通じて、宿主細胞由来 DNA 含量は一貫して低く (約●pg/mg 以下)、あるいは定量限界未満であった。加えて、宿主細胞由来 DNA は精製工程において恒常的に除去されていることが確認された (2.3.S.2.5 参照)。

したがって、原薬で宿主細胞由来 DNA の規格設定は必要ないと判断した。

### 3) プロテイン A

製法 A～製法 C2 の原薬ロット全体を通じて、プロテイン A 含量は一貫して定量限界未満 (<●ng/mg) であった。また、プロテイン A は精製工程において恒常的に除去されることが確認された (2.3.S.2.5 参照)。したがって、原薬でプロテイン A の規格設定は必要ないと判断した。

#### 解説

- 性状  
規格設定根拠として製造実績 (ロット分析) を使用した記載例を示した。
- pH  
規格設定根拠として製造実績 (ロット分析) を使用した記載例を示した。規格設定根拠として処方設計等を入れることも考えられる。
- 糖鎖プロファイル  
規格設定根拠として製造実績 (ロット分析) とその統計解析値、および分析方法のバラツキを使用した記載例を示した。  
参考文献：通常、Module 3 (ここでは 3.2.S.4.5) に参考文献の詳細な情報は記載されていると考えられる。Module 2.3 から Module 3 への電子上のリンク付けは必須ではないと考えられる。  
統計解析値に基づく規格値設定：十分な数の製造実績 (ロット分析結果) が無い場合は、規格値設定に統計解析法を用いることは困難な場合がある。統計解析法には複数の方法 (例えば、平均値±●×標準偏差、信頼区間など) があり、その選択は申請者の考えかたに基づく。  
統計解析値は表で記載することも、文章のみで記載することもできる。本記載例は後者である。
- イオン交換クロマトグラフィー  
規格設定根拠として製造実績 (ロット分析) とその統計解析値、分析法のバラツキ、および安定性試験結果を使用した例を示した。
- サイズ排除クロマトグラフィー  
規格設定根拠として製造実績 (ロット分析) とその統計解析値、および安定性試験結果を使用した例を示した。
- キャピラリー電気泳動  
規格設定根拠として製造実績 (ロット分析) とその統計解析値、および安定性試験結果を使用した例を示した。
- エンドトキシン  
規格設定根拠として日本薬局方の参考情報、および商用施設での製造実績 (ロット分析) を使用した例である。
- 微生物限度  
規格設定根拠として商用施設での製造実績 (ロット分析) を使用した例を示した。

- 生物活性

規格設定根拠として分析法のバラツキ（特に **Cell-based assay** は理化学試験と比較しバラツキが大きいので）,安定性試験結果を使用した例である。

- 含量

規格設定根拠として製造実績（ロット分析）とその統計解析値、および安定性試験結果を使用した例を示した。

### 2.3.S.5 標準品又は標準物質（ヒューツムマブ、HS 製薬）

编者注：一次標準物質のみ設定し、常用標準物質を設定しないことも可能であるので、両方を設定するケースと一次標準物質のみを設定するケースの記載例を示す。

#### 一次標準物質及び常用標準物質をそれぞれ設定する場合の記載例

#### 1. 一次標準物質

一次標準物質は、一次標準物質及び常用標準物質の更新時並びにヒューツムマブ原薬及び製剤の規格試験で使用する。

##### 1) 現行一次標準物質

現行一次標準物質は、ヒューツムマブ原薬を pH▲の○ mol/L △△△緩衝液で希釈して調製した。特性解析、並びに規格及び試験方法の結果を表 2.3.S.5-1 に示す。

表 2.3.S.5-1 一次標準物質の分析結果

ロット番号		PRS-1	
原薬ロット番号		DS-0010	
原薬製造方法		製法 B	
原薬製造日		20YY/MM/DD	
標準物質調製日		20YY/MM/DD	
試験項目		分析結果	
性状		無色澄明の液	
確認試験	ペプチドマップ	一次標準物質 ST-2 と同様の溶出パターンを示した	
pH		6.5	
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%	
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%	
	キャピラリー電気泳動法（非還元条件）	主ピーク：●%	
生物活性（CDC 活性測定法）		● Unit/mg	
含量		20.4 mg/mL	
特性解析	一次構造	ペプチドマップ MS による全アミノ酸配列確認	2.3.S.3.1 構造及び特性の項参照
	電荷不均一性	イオン交換クロマトグラフィー	2.3.S.3.1 構造及び特性の項参照

糖鎖分析	液体クロマトグラフィー	2.3.S.3.1 構造及び特性の項参照
------	-------------	----------------------

2) 一次標準物質の更新

一次標準物質は、ヒューツムマブ原薬を pH▲の○mol/L△△△緩衝液で希釈して調製し、表 2.3.S.5-2 の試験を行い、規格値に適合することを確認し、また、特性解析（■■■及び▲▲▲）により更新前の一次標準物質と同様であることを確認する。性状、確認試験、pH、純度試験、生物活性及び含量の試験方法は、ヒューツムマブ原薬の規格及び試験方法に準じ、標準物質は更新前の一次標準物質を使用する。

表 2.3.S.5-2 一次標準物質の規格

試験項目	規格値
性状	無色澄明の液
確認試験	ペプチドマップ 更新前の一次標準物質と同様の溶出パターンを示す
pH	5.8～6.8
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー 主ピーク：●%以上 酸性領域：●%以下 塩基性領域：●%以下
	サイズ排除クロマトグラフィー 主ピーク：●%以上 高分子量領域：●%以下 低分子量領域：●%以下
	キャピラリー電気泳動法（非還元条件） 主ピーク：●%以上
生物活性（CDC 活性測定法）	●～● Unit/mg
含量	18.0～22.0 mg/mL

解説

本モックアップでは一次標準物質を更新するケースの記載例を示している。一次標準物質を更新しない場合は、その旨を記載する。

3) 安定性

－60℃以下で保存し、リテスト期間を2年とする。

解説

標準物質のリテスト期間又は有効期間は社内の GMP で管理される事項であるため、M2.3 への記載は必ずしも必要ないと考えられるが、本モックアップでは記載する場合の例を示している。（常用標準物質も同様である）

## 2. 常用標準物質

常用標準物質は、ヒューツムマブ原薬及び製剤の規格試験で使用する。

### 1) 現行常用標準物質

現行常用標準物質は、ヒューツムマブ原薬を pH▲の○ mol/L △△△緩衝液で希釈して調製した。

規格及び試験方法の結果を表 2.3.S.5-3 に示す。

表 2.3.S.5-3 常用標準物質の分析結果

ロット番号	RS-1	
原薬ロット番号	DS-0011	
原薬製造方法	製法 B	
原薬製造日	20YY/MM/DD	
標準物質製造日	20YY/MM/DD	
試験項目	分析結果	
性状	無色澄明の液	
確認試験	ペプチドマップ	一次標準物質ロット PRS-1 と同様の溶出パターンを示した
pH	6.5	
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%
	キャピラリー電気泳動法（非還元条件）	主ピーク：●%
生物活性（CDC 活性測定法）	● Unit/mg	
含量	21.0 mg/mL	

2) 常用標準物質の更新

常用標準物質は、ヒューツムマブ原薬を pH▲の○ mol/L△△△緩衝液で希釈して調製し、表 2.3.S.5-4 の試験を行い、規格値に適合することを確認する。性状、確認試験、pH、純度試験、生物活性及び含量はヒューツムマブ原薬の規格及び試験方法に準じ、標準物質は一次標準物質を使用する。

表 2.3.S.5-4 常用標準物質の規格

試験項目	規格値	
性状	無色澄明の液	
確認試験	ペプチドマップ	
pH	5.8～6.8	
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%
	キャピラリー電気泳動法（非還元条件）	主ピーク：●%
生物活性（CDC 活性測定法）	●～● Unit/mg	
含量	18.0～22.0 mg/mL	

3) 安定性

- 60℃以下で保存し、有効期間を 2 年とする。

### 3. 開発時の標準物質

開発時に使用した標準物質の分析結果を表 2.3.S.5-5 に示す。

表 2.3.S.5-5 開発時の標準物質の分析結果

標準物質ロット番号		ST-1	ST-2
原薬ロット番号		DS-0001	DS-0002
原薬製造方法		製法 A	製法 B
原薬製造日		20YY/MM/DD	20YY/MM/DD
標準物質製造日		20YY/MM/DD	20YY/MM/DD
用途		XXX	YYY
試験項目		出荷試験結果	出荷試験結果
性状		無色澄明の液	微黄色澄明の液
確認 試験	ペプチドマップ	(試験せず)	ヒューツムマブ由来ペプチドのピークを認めた
	等電点電気泳動法	pI ●, ▲及び■付近に3本のバンドを認めた	(試験せず)
	CDC 活性	ヒューツムマブ濃度に依存する用量反応曲線を認めた	(試験せず)
pH		6.3	6.3
純度 試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%
	キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク：●%	主ピーク：●%
生物活性 (CDC 活性測定法)		● Unit/mg と設定した	● Unit/mg
含量		20.4 mg/mL	18.8 mg/mL

表 2.3.S.5-5 開発時の標準物質の分析結果（続）

標準物質ロット番号		ST-1	ST-2
特性 解析	一次構造： ペプチドマップ MS によるアミノ 酸配列確認	ヒューツムマブであることを 確認した	ロット ST-1 と同様であ った
	電荷不均一性： イオン交換クロマトグラフィー	H 鎖 C 末端にリシンが 0~2 個付加したアイソフォーム (K0、K1 及 K2) の割合は ●%、●%及び●%であった	ロット ST-1 と同様のパ ターンを示した
	糖鎖分析： 液体クロマトグラフィー	末端にガラクトースが 0~2 個付加したフコシルバイアン テナリー型糖鎖 (G0F、G1F 及 び G2F) が全糖鎖の●%、アフ コシル糖鎖 (G0) は●%であ った	ロット ST-1 と同様のパ ターンを示した

一次標準物質のみを設定し（常用標準物質を設定しない）、及びその組成が原薬と同じ場合の記載例（その他、標準物質の安定性を記載しない例）

1. ヒューツムマブ標準物質

ヒューツムマブ標準物質は、ヒューツムマブ標準物質の更新時並びにヒューツムマブ原薬及び製剤の規格試験で使用する。

1) 現行の標準物質

現行のヒューツムマブ標準物質は、ヒューツムマブ原薬を分注したものである。特性解析、並びに規格及び試験方法の結果を表 2.3.S.5-1 に示す。

表 2.3.S.5-1 ヒューツムマブ標準物質の分析結果

ロット番号		PRS-1	
原薬ロット番号		DS-0010	
原薬製造方法		製法 B	
原薬製造日		20YY/MM/DD	
標準物質調製日		20YY/MM/DD	
試験項目		分析結果	
性状		無色澄明の液	
確認試験	ペプチドマップ	2.3.S.3.1 構造及び特性の項参照	
pH		6.4	
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%	
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%	
	キャピラリー電気泳動法（非還元条件）	主ピーク：●%	
生物活性（CDC 活性測定法）		● Unit/mg	
含量		104 mg/mL	
特性解析	一次構造	ペプチドマップ MS によるアミノ酸配列確認	2.3.S.3.1 構造及び特性の項参照
	電荷不均一性	イオン交換クロマトグラフィー	2.3.S.3.1 構造及び特性の項参照
	糖鎖分析	液体クロマトグラフィー	2.3.S.3.1 構造及び特性の項参照

2) ヒューツムマブ標準物質の更新

ヒューツムマブ原薬を分注しヒューツムマブ標準物質を調製する。ヒューツムマブ標準物質は表 2.3.S.5-2 の試験を行い、規格値に適合することを確認し、また、特性解析（■■■及び▲▲▲）により更新前のヒューツムマブ標準物質と同様であることを確認する。性状、確認試験、pH、純度試験、生物活性及び含量はヒューツムマブ原薬の規格及び試験方法に準じ、標準物質は更新前のヒューツムマブ標準物質を使用する。ヒューツムマブ標準物質は-60℃以下で保存する。

表 2.3.S.5-2 ヒューツムマブ標準物質の規格

試験項目	規格値
性状	無色～微黄色の澄明の液
確認試験	ペプチドマップ 更新前の一次標準物質と同様の溶出パターンを示す
pH	5.8～6.8
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー 主ピーク：●%以上 酸性領域：●%以下 塩基性領域：●%以下
	サイズ排除クロマトグラフィー 主ピーク：●%以上 高分子量領域：●%以下 低分子量領域：●%以下
	キャピラリー電気泳動法（非還元条件） 主ピーク：●%以上
生物活性（CDC 活性測定法）	●～● Unit/mg
含量	90～110 mg/mL

3) 開発時の標準物質

開発時に使用した標準物質の分析結果を表 2.3.S.5-3 に示す。

表 2.3.S.5-3 開発時の標準物質の分析結果

標準物質ロット番号		ST-1	ST-2
原薬ロット番号		DS-0001	DS-0002
原薬製造方法		製法 A	製法 B
原薬製造日		20YY/MM/DD	20YY/MM/DD
標準物質製造日		20YY/MM/DD	20YY/MM/DD
用途		XXX	YYY
試験項目		出荷試験結果	出荷試験結果
性状		無色澄明の液	微黄色澄明の液
確認試験	ペプチドマップ	(試験せず)	ヒューツムマブ由来ペプチドのピークを認めた
	等電点電気泳動法	pI ●, ▲及び■付近に 3 本のバンドを認めた	(試験せず)
	CDC 活性	ヒューツムマブ濃度に依存する用量反応曲線を認めた	(試験せず)
pH		6.3	6.3
純度試験	イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%	主ピーク：●% 酸性領域：●% 塩基性領域：●%
	サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%	主ピーク：●% 高分子量領域：●% 低分子量領域：●%
	キャピラリー電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク：●%	主ピーク：●%
生物活性 (CDC 活性測定法)		● Unit/mg と設定した	● Unit/mg
含量		104 mg/mL	98 mg/mL
特性解析	一次構造： ペプチドマップ MS/MS による N 末端アミノ酸分析	H 鎖 N 末端のアミノ酸配列： EVQLVES	ロット ST-1 と同様であった
	電荷不均一性： イオン交換クロマトグラフィー	H 鎖 C 末端にリシンが 0~2 個付加したアイソフォーム (K0, K1 及 K2) の割合は●%、●%及び●%であった	ロット ST-1 と同様のパターンを示した
	糖鎖分析： 液体クロマトグラフィー	末端にガラクトースが 0~2 個付加したフコシルバイアンテナリー型糖鎖 (G0F, G1F 及び G2F) が全糖鎖の●%、アフコシル糖鎖 (G0) は●%であった	ロット ST-1 と同様のパターンを示した

## 解説

- 一次標準物質と常用標準物質  
一次標準物質と区別して常用標準物質を設定することは必須ではないため、設定する場合としない場合の記載例を示した。
- 標準物質の調製  
標準物質は、原薬を希釈して調製する場合と希釈しない場合の記載例を示した。
- 標準物質の更新  
一次標準物質の更新時に規格及び試験方法に加えて追加の特性解析を実施する場合の記載例を示した。  
生物活性を「Units/mg」のようなタンパク質重量あたりの単位表記で規定する場合は、標準物質の更新に伴う生物活性のずれ（ドリフト）は小さいと考えられる。一方、生物活性を標準物質に対する相対力価（百分率）で規定する場合には、標準物質の更新による活性値のドリフトに留意する必要がある。
- 安定性  
リテスト期間又は有効期間が設定されている場合の記載例を示したが、その他にも、標準物質の安定性データの掲載、安定性試験結果に基づき有効期間を随時延長する等、多様な記載方法が可能である。  
原薬・製剤と異なり、標準物質では有効期間ではなくリテスト期間も設定できる。
- 開発時の標準物質の分析結果  
「出荷試験結果」とは、リテスト試験の結果ではなく初回分析時の結果であることを示している。

### 2.3.S.6 容器及び施栓系（ヒューツムマブ、HS 製薬）

ヒューツムマブ原薬の保存において使用される容器及び施栓系は以下のとおりである。

- ・容器：1L プラスチック容器（材質：ポリエチレン）
- ・プラスチック製キャップ（材質：ポリプロピレン）

#### 解説

社内管理として実施される以下の情報は M3 に記載する前提で、本 M2.3 モックアップではその記載を省略している。

- ・容器及び施栓系の規格及び試験方法
- ・使用方法（使用前の殺菌／滅菌方法）：S.2.2 か A.1 に記載する
- ・容器の適格性の情報

## 2.3.S.7 安定性（ヒューツムマブ、HS 製薬）

### 2.3.S.7.1 安定性のまとめ及び結論

ヒューツムマブ原薬について、長期保存条件、加速条件及び苛酷条件における安定性検討を実施した。以下の安定性試験では、ヒューツムマブ原薬の製造で使用している容器と同じ材質の容器を使用した。

#### 1. 長期保存試験（-20℃）

パイロットスケールで製造したヒューツムマブ原薬 3 ロット（Lot No. XXX, YYY, ZZZ）について、100 mL プラスチック容器中で-20℃、12 カ月間での長期保存における安定性を検討した。すべての試験結果は試験開始時と比較して変化を認めず、判定基準を満たした。

#### 2. 加速試験（5℃）

ヒューツムマブ原薬（Lot No. XXX, YYY, ZZZ）について、100 mL プラスチック容器中で 5℃、●カ月間での保存における安定性を検討した。すべての試験結果は試験開始時と比較して変化を認めなかった。

#### 3. 苛酷試験（25℃）

ヒューツムマブ原薬（Lot No. XXX）を 15 mL プラスチック容器中で 25℃、▲カ月での安定性を検討した。サイズ排除クロマトグラフィーでは、単量体のピーク面積百分率が 1%減少した。イオン交換クロマトグラフィーでは、主ピークのピーク面積百分率が 20%減少した。その他の試験項目では試験開始時と比較して変化は認められなかった。

#### 4. 結論

以上の試験結果より、ヒューツムマブ原薬の保存温度及び有効期間を-20℃、12 カ月と設定した。

#### 解説

- ICH Q1A ガイドラインでは原薬の苛酷試験について、曝光及び酸化条件での安定性について確認することとなっているが、バイオテクノロジー応用医薬品を対象とした ICH Q5C ガイドラインでは必要要件とされていない。バイオ医薬品の原薬は通常、溶液で凍結保存されることから、曝光条件での安定性試験は必須ではないと考えられ、申請者が必要に応じ社内担保データとして取得する。

### 2.3.S.7.2 承認後の安定性試験計画の作成及び実施

パイロットスケールで製造したヒューツムマブ原薬3ロット (Lot No. XXX, YYY, ZZZ) の長期保存試験は継続中であり, その試験計画は表 2.3.S.7.2-1 のとおりである。

また, ICH Q5C ガイドラインに従い, 実生産スケールで製造したヒューツムマブ原薬3ロットの長期保存試験を実施予定であり, その試験計画は表 2.3.S.7.2-1 のとおりである。

表 2.3.S.7.2-1 安定性試験計画 (-20°C)

試験項目	保存期間 (カ月)							
	0	3	6	9	12	18	24*	36*
性状	+	+	+	+	+	+	+	+
pH	+		+		+	+	+	+
イオン交換クロマトグラフィー	+	+	+	+	+	+	+	+
サイズ排除クロマトグラフィー	+	+	+	+	+	+	+	+
キャピラリー電気泳動	+	+	+	+	+	+	+	+
たん白質含量	+	+	+	+	+	+	+	+
生物活性	+	+	+	+	+	+	+	+

\*社内判断で実施する／しないを決定する。

#### 解説

pH の 3 カ月と 9 か月は、開発段階の知識に基づいたマトリキシング法により、測定しない安定性試験計画となっている。

### 2.3.S.7.3 安定性データ

表 2.3.S.7.3-1	原薬ロット XXX の長期保存試験 (−20°C)
表 2.3.S.7.3-2	原薬ロット YYY の長期保存試験 (−20°C)
表 2.3.S.7.3-3	原薬ロット ZZZ の長期保存試験 (−20°C)
表 2.3.S.7.3-4	原薬ロット XXX の加速試験 (5°C)
表 2.3.S.7.3-5	原薬ロット YYY の加速試験 (5°C)
表 2.3.S.7.3-6	原薬ロット ZZZ の加速試験 (5°C)
表 2.3.S.7.3-7	原薬ロット XXX の苛酷試験 (25°C)

表 2.3.S.7.3-1 原薬ロット XXX の長期保存試験 (−20±x°C)

項目	規格	保存期間 (カ月)				
		0	3	6	9	12
性状	無色～微黄色の澄明又はわずかに白濁した液	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
pH	5.8～6.8	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク：●%以上 酸性領域：●%以下 塩基性領域：●%以下	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
サイズ排除クロマトグラフィー	主ピーク：●%以上 高分子量領域：●%以下 低分子量領域：●%以下	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
キャピラリー電気泳動	主ピーク：●%以上	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
たん白質含量	90～110 mg/mL	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
生物活性	●～● Unit/mg	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■

(中略)

表 2.3.S.7.3-4 原薬ロット XXX の加速試験 (5±3°C)

項目	保存期間 (カ月)			
	0	X	X	X
性状	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
pH	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
イオン交換クロマトグラフィー	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
サイズ排除クロマトグラフィー	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
キャピラリー電気泳動	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
たん白質含量	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
生物活性	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■

(中略)

表 2.3.S.7.3-7 原薬ロット XXX の苛酷試験 (25±2°C)

項目	保存期間 (週)			
	0	X	X	X
性状	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
pH	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
イオン交換クロマトグラフィー	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
サイズ排除クロマトグラフィー	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
キャピラリー電気泳動	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
たん白質含量	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
生物活性	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■

## 2.3.P 製剤（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

### 2.3.P.1 製剤及び処方（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

编者注：

過量充填している／いないケースなどにより、本セクションの記載方法については様々なケースがありえる。

#### ① 液剤のケース

本品は、ヒューツムマブを有効成分とする pH 6.3 の液をガラスバイアル（5mL）に充填した製剤である。本品の処方は表 2.3.P.1-1 のとおりである。

表 2.3.P.1-1 製剤処方

成分	規格	配合目的	1 バイアル 当たりの分量
ヒューツムマブ（遺伝子組換え）	自社規格 (2.3.S.4 参照)	有効成分	100 mg
リン酸水素ナトリウム水和物	日本薬局方	緩衝剤	X.X mg
リン酸二水素ナトリウム	医薬品添加物規格	緩衝剤	X.X mg
水酸化ナトリウム	日本薬局方	pH 調節剤	適量
ポリソルベート 80	日本薬局方	界面活性剤	X.X mg
■■■	日本薬局方	安定剤	XX mg
注射用水	日本薬局方	溶剤	全量 2.0 mL

#### ② 凍結乾燥製剤のケース

本品は、ヒューツムマブを有効成分とする液をガラスバイアル（10mL）に充填した凍結乾燥製剤である。本品の処方は表 2.3.P.1-1 のとおりである。

表 2.3.P.1-1 製剤処方

成分	規格	配合目的	1 バイアル当たりの分量 (表示量)
ヒューツムマブ（遺伝子組換え）	自社規格 (2.3.S.4 参照)	有効成分	100 mg
リン酸水素ナトリウム水和物	日本薬局方	緩衝剤	X.X mg
リン酸二水素ナトリウム	医薬品添加物規格	緩衝剤	X.X mg
水酸化ナトリウム	日本薬局方	pH 調節剤	XX mg
ポリソルベート 80	日本薬局方	界面活性剤	X.X mg
■■■	日本薬局方	安定剤	XX mg
精製白糖	日本薬局方	賦形剤	50 mg

## 2.3.P.2 製剤開発の経緯（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

### 2.3.P.2.1 製剤成分

（略）

### 2.3.P.2.2 製剤

（略）

### 2.3.P.2.3 製造工程の開発の経緯

（略）

### 2.3.P.2.4 容器及び施栓系

（略）

### 2.3.P.2.5 微生物学的観点からみた特徴

（略）

### 2.3.P.2.6 溶解液や使用時の容器／用具との適合性

（略）

## 2.3.P.3 製造（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

### 2.3.P.3.1 製造者

编者注：

- ・ 本ケースは、複数の会社で製造工程を分担することを前提にしている。分担する工程がある場合には、その業者及び分担する工程を明記する。自社で一貫製造及び試験・出荷する場合は、分担工程の記載は簡略化できる。
- ・ 以下の記載例は P.3.2-P.3.3 項の液剤／凍結乾燥製剤の 2 ケースのうち、液剤の場合を示している。

**製造：**薬液調製、無菌濾過、充填、巻き締め、保管

製造業者の名称：HS 製薬株式会社 世田谷工場

製造業者の住所：東京都世田谷区上用賀 X-XX-X

**製造：**包装、表示

製造業者の名称：●●製薬株式会社

製造業者の住所：神奈川県川崎市○○区●●X-XX-X

**品質試験**

試験施設の名称：□□製薬株式会社 試験センター

試験施設の住所：東京都渋谷区●●X-XX-X

### 2.3.P.3.2 製造処方

本品の実生産スケールにおける標準仕込み量は●－■ L を予定している。本品の製造処方を表 2.3.S.P.3.2-1 に示す。

#### ①液剤のケース

表 2.3.S.P.3.2-1 製造処方

成分	● L 当たりの仕込み量	■ L 当たりの仕込み量
○○マブ（遺伝子組換え）	XX g	XX g
リン酸水素ナトリウム水和物	XX g	XX g
リン酸二水素ナトリウム	XX g	XX g
水酸化ナトリウム	XX g	XX g
ポリソルベート 80	XX g	XX g
■■■	XX g	XX g
注射用水	全量● L	全量■ L

#### ②凍結乾燥製剤のケース

表 2.3.S.P.3.2-1 製造処方

成分	● L 当たりの仕込み量	■ L 当たりの仕込み量
○○マブ（遺伝子組換え）	XX g	XX g
リン酸水素ナトリウム水和物	XX g	XX g
リン酸二水素ナトリウム	XX g	XX g
水酸化ナトリウム	XX g	XX g
ポリソルベート 80	XX g	XX g
■■■	XX g	XX g
精製白糖	XX g	XX g
注射用水	全量● L	全量■ L

#### M1.2 解説

- 標準仕込み量は、申請者の考え方にに基づき、幅記載もしくは代表的な値を記載する。

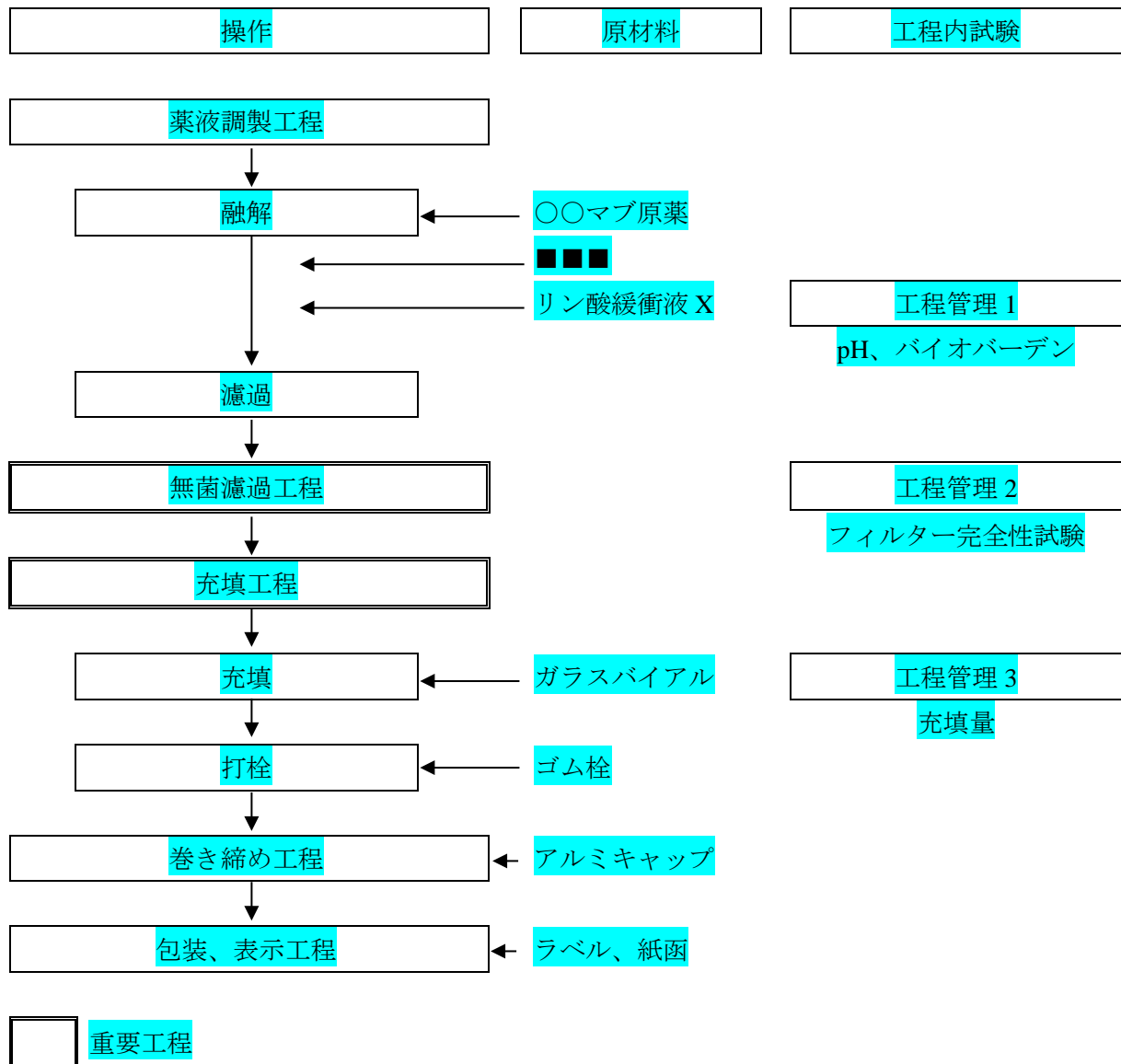
### 2.3.P.3.3 製造工程及びプロセス・コントロール

#### 1. 製造工程流れ図

本品の製造工程の流れ図を図 2.3.P.3.3-1 に示す。

##### ①液剤のケース

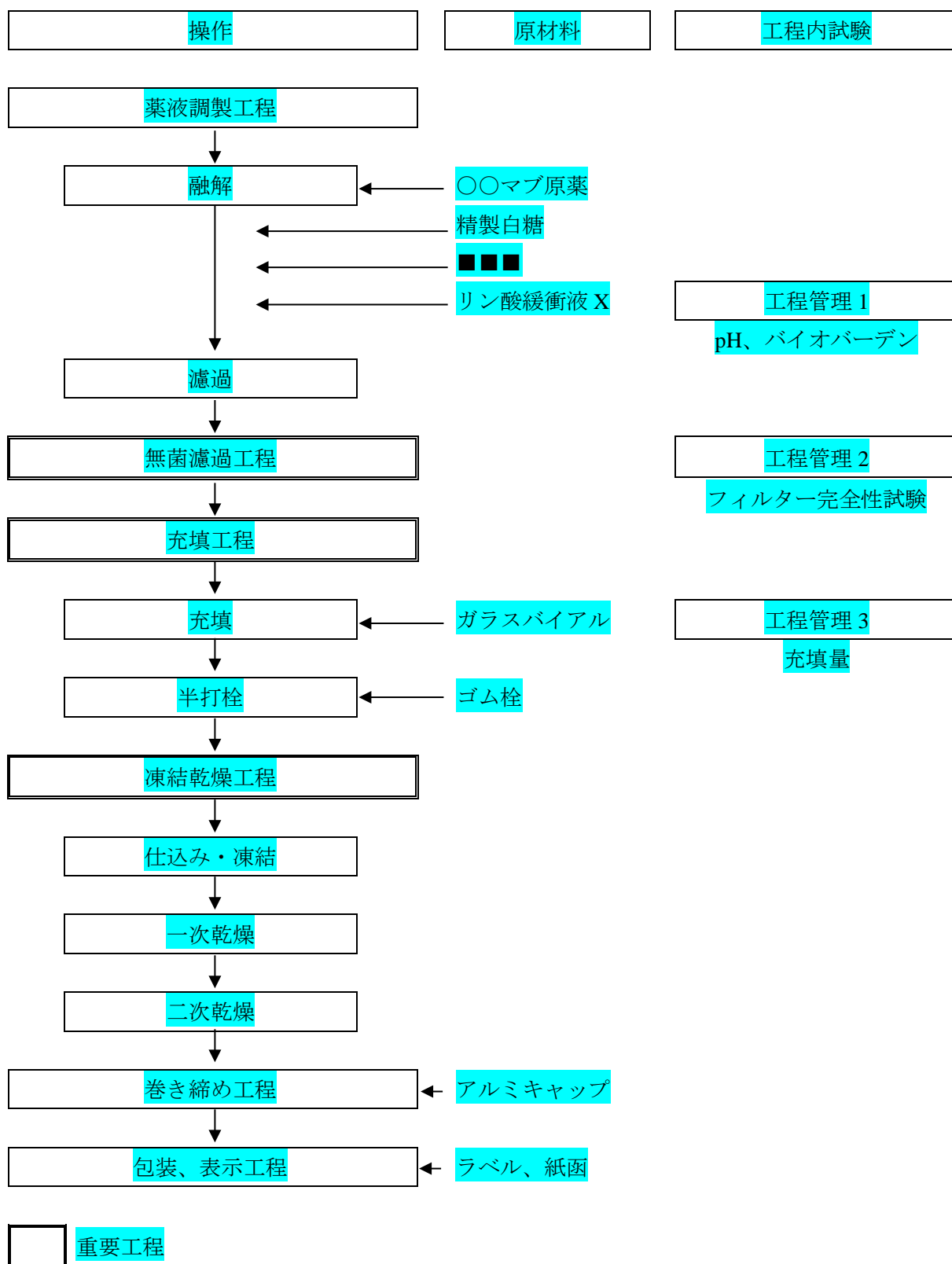
図 2.3.P.3.3-1 製剤の製造工程流れ図



②凍結乾燥製剤のケース

図 2.3.P.3.3-1

製剤の製造工程流れ図



## 2. 製造方法

(以下は標準仕込み量 ■■■ L の場合の製造方法である)

### ①液剤のケース

#### 1) 薬液調製工程

■■■をリン酸緩衝液 X (2.3.S.2.3 参照) で溶解した液を調製する。原薬を融解した後、●● L タンクに加える。この液に先に調製した■■■液を加え、終濃度が 50 mg/mL ヒューツムマブ、●● mg/mL ■■■となるよう調製し、均一化するまで攪拌する。工程内管理としてこの液の pH、バイオバーデン (生菌数試験) を測定し、それぞれ pH ●～●の範囲内であること、 $\leq$  ●CFU/●mL であることを確認する。

この液を孔径 0.2  $\mu$ m の親水性フィルターでろ過し、蒸気滅菌済みのタンクに受ける。

#### 2) 無菌濾過工程 (重要工程)

前工程の液を、孔径 0.2  $\mu$ m の [材質] 製フィルターで無菌濾過する。工程内管理としてフィルターの完全性試験を行い、適合することを確認する。

#### 3) 充填工程 (重要工程)

薬液を、洗浄・乾燥滅菌済みの無色ガラスバイアル (容量●mL、日局適合) にクリーンブース内にて充填機を用いて充填する (工程内管理: 充填液量●● $\pm$ ● mL)。薬液充填バイアルを、洗浄・蒸気滅菌済みゴム栓 (材質: \*\*\*)、日局適合) で打栓する。

#### 4) 巻き締め工程

打栓済みバイアルをキャップ巻き締め機を用いてアルミニウムキャップで巻き締める。

#### 5) 包装工程

ラベルを貼付し、紙函に入れる。

### ②凍結乾燥製剤のケース

#### 1) 薬液調製工程

精製白糖、■■■をリン酸緩衝液 X (2.3.S.2.3 参照) で溶解した液を調製する。原薬を融解した後、●● L タンクに加える。この液に先に調製した■■■液を加え、終濃度が 50 mg/mL ヒューツムマブ、●● mg/mL ■■■、25 mg/mL 精製白糖となるよう調製し、均一化するまで攪拌する。工程内管理としてこの液の pH、バイオバーデン (生菌数試験) を測定し、それぞれ pH ●～●の範囲内であること、 $\leq$  ●CFU/●mL であることを確認する。

この液を孔径 0.2  $\mu$ m の親水性フィルターでろ過し、蒸気滅菌済みのタンクに受ける。

#### 2) 無菌濾過工程 (重要工程)

前工程の液を、孔径 0.2  $\mu$ m の [材質] 製フィルターで無菌濾過する。工程内管理としてフィルターの完全性試験を行い、適合することを確認する。

3) 充填工程（重要工程）

薬液を、洗浄・乾燥滅菌済みの無色ガラスバイアル（容量● mL、日局適合）にクリーンブース内にて充填機を用いて充填する（工程内管理：充填液量●●±● mL）。薬液充填バイアルを、洗浄・蒸気滅菌済みゴム栓（材質：\*\*\*、日局適合）で半打栓する。

4) 凍結乾燥工程（重要工程）

(1) 仕込み・凍結

凍結乾燥機の棚温を●℃とした後、集積した半打栓バイアルを入庫し、棚温●℃で●時間凍結する。

(2) 一次乾燥

真空度●で、棚温が●℃から●℃になるまで●時間かけて昇温した後、棚温●℃で●時間、一次乾燥する。

(3) 二次乾燥

一次乾燥終了後、●℃まで●時間かけて昇温する。その後、真空度●Pa（●●mbar）で●時間、二次乾燥する。

(4) 全打栓・取り出し

窒素を用い、●Paまで復圧し、全打栓後、湿度●%以下の圧縮空気で大気圧まで復圧する。

5) 巻き締め工程

打栓済みバイアルをキャップ巻き締め機を用いてアルミニウムキャップで巻き締める。

6) 包装工程

ラベルを貼付し、紙函に入れる。

#### 2.3.P.3.4 重要工程及び重要中間体の管理

(略)

#### 2.3.P.3.5 プロセス・バリデーション／プロセス評価

(略)

## 2.3.P.4 添加剤の管理（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

编者注：

本ケースでは、すべての添加剤が日本薬局方又は医薬品添加物規格等に準拠している場合を示している。従って、3.2.P.4.2～3.2.P.4.4 に相当する情報の概要の記載は必要ないため、記載していない。

添加剤が日本薬局方等に準拠しない場合は、その規格及び試験方法、分析法のバリデーション結果、規格及び試験法の妥当性の記載が必要となる。

本製剤に用いられる添加剤の規格を表 2.3.P.4-1 に示す。新規添加剤に該当する添加剤はない。また、ヒト又は動物起源の添加剤は使用していない。

表 2.3.P.4-1 添加剤の規格

成分	規格
リン酸水素ナトリウム水和物	日本薬局方
リン酸二水素ナトリウム	医薬品添加物規格
水酸化ナトリウム	日本薬局方
精製白糖（凍結乾燥製剤のケース）	日本薬局方
塩酸	日本薬局方
ポリソルベート 80	日本薬局方
■■■	日本薬局方
注射用水	日本薬局方

2.3.P.5 製剤の管理（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

（略）

2.3.P.6 標準品及び標準物質（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

（略）

2.3.P.7 容器及び施栓系（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

（略）

2.3.P.8 安定性（コウタイイヤクヒン点滴静注 100mg）

（略）

## 2.3.A その他

### 2.3.A.1 製造施設及び設備（コウタイイラクヒン点滴静注 100mg）

#### 1. 製造施設

##### 原薬の製造施設

HS 製薬株式会社 岩本工場

#### 2. 製造設備

原薬の主要な製造設備をそれぞれ表 2.3.A.1-1 に示す。詳細な情報は 3.2.A.1 を参照のこと。

表 2.3.A.1-1 原薬の製造に使用する主要な設備

工程	装置
培養ステップ 1	250L ファーマンター
培養ステップ 2	1000L バイオリアクター
培養ステップ 3	5000L バイオリアクター
精製 1（プロテイン A カラム）	カラム及びクロマトグラフィー装置
精製 2（陽イオン交換カラム）	カラム及びクロマトグラフィー装置
精製 3（陰イオン交換カラム）	カラム及びクロマトグラフィー装置
精製 4（疎水カラム）	カラム及びクロマトグラフィー装置
濃縮・緩衝液置換 1	透析／限外ろ過装置
濃縮・緩衝液置換 2	透析／限外ろ過装置

#### 解説

- 本モックアップでは、バイオ医薬品で重要な原薬の製造施設及び設備の情報のみを記載し、製剤の製造施設及び設備の情報は記載しなかった。
- 主要な設備としては、主に固定の設備で、且つ製品品質に影響を及ぼしうるものを例示した。

## 2.3.A.2 外来性感染性物質の安全性評価（ヒューツムマブ）

### 1. 非ウイルス性感染性物質

#### 1) 細胞基材の安全性評価

MCB、WCB における非ウイルス性感染性物質の評価結果を表 2.3.A.2-1 に示す。

表 2.3.A.2-1 細胞基材の非ウイルス性感染性物質の評価結果

被験物質	試験項目	許容基準	試験結果
MCB ロット○○	無菌試験	陰性	陰性
	マイコプラズマ否定試験	検出しない	検出せず
WCB ロット○○	無菌試験	陰性	陰性
	マイコプラズマ否定試験	検出しない	検出せず

#### 2) 未加工／未精製バルク、原薬及び製剤の非ウイルス性感染性物質に関する管理方法

未加工／未精製バルクの全ロットにおいて、工程内管理試験として生菌数試験及びマイコプラズマ否定試験を実施する（2.3.S.2.2 参照）。

原薬の全ロットにおいて、規格試験として生菌数試験及びエンドトキシン試験を実施する（2.3.S.4 参照）。

製剤の全ロットにおいて、規格試験として無菌試験及びエンドトキシン試験を実施する（2.3.P.5 参照）。

#### 3) その他の原材料の非ウイルス性感染性物質に関する管理方法

製造工程で使用する細胞培養用培地は、孔径 0.2  $\mu$  m 以下のフィルターでろ過滅菌後、使用する。

生物起源の原材料に関する情報は、2.3.S.2.3 参照。

## 2. ウイルス性感染性物質

### 1) 細胞基材の安全性評価

MCB、WCB 及び CAL におけるウイルス性感染性物質の評価結果を表 2.3.A.2-2 に示す。

表 2.3.A.2-2 細胞基材のウイルス性感染性物質の評価結果

被験物質	試験項目	許容基準	試験結果	
MCB ロット○○	レトロウイルス及び 内在性ウイルス 試験	感染性試験	検出しない	検出せず
		電子顕微鏡観察	CHO 細胞で存在を 知られた A 型、C 型 レトロウイルス様 粒子以外のウイル ス粒子を認めない	CHO 細胞で存在を 知られた A 型、C 型 レトロウイルス様 粒子以外のウイル ス粒子を認めな かった
		逆転写酵素活性	検出しない	検出せず
	非内在性ウイルス 又は外来性ウイル ス試験	<i>In vitro</i> 試験 <sup>a)</sup>	検出しない	検出せず
		<i>In vivo</i> 試験 <sup>b)</sup>	検出しない	検出せず
		ウシウイルス試験 <sup>c)</sup>	検出しない	検出せず
		ブタウイルス試験 <sup>d)</sup>	検出しない	検出せず
抗体産生試験：HAP		検出しない	検出せず	
WCB ロット○○	非内在性ウイルス 又は外来性ウイル ス試験	<i>In vitro</i> 試験 <sup>a)</sup>	検出しない	検出せず
		<i>In vivo</i> 試験 <sup>b)</sup>	検出しない	検出せず
CAL	レトロウイルス及び 内在性ウイルス 試験	感染性試験	検出しない	検出せず
		電子顕微鏡観察	CHO 細胞で存在を 知られた A 型、C 型 レトロウイルス様 粒子以外のウイル ス粒子を認めない	CHO 細胞で存在を 知られた A 型、C 型 レトロウイルス様 粒子以外のウイル ス粒子を認めな かった
		逆転写酵素活性	検出しない	検出せず
	非内在性ウイルス 又は外来性ウイル ス試験	<i>In vitro</i> 試験 <sup>a)</sup>	検出しない	検出せず
		<i>In vivo</i> 試験 <sup>b)</sup>	検出しない	検出せず

a) *In vitro* 試験で使用した細胞：MRC-5、Vero、CHO

b) *In vivo* 試験で使用した動物：乳飲みマウス、成熟マウス及び発育鶏卵

c) ウシウイルス試験で使用した細胞：Bovine turbinate、Vero

d) ブタウイルス試験で使用した細胞：Vero

2) 未加工／未精製バルクの安全性評価

未加工／未精製バルクの全ロットにおいて、工程内管理試験として外来性ウイルス試験を実施する（2.3.S.2.2 参照）。

未加工／未精製バルクの3ロットについて外来性ウイルス試験（*in vitro* 試験）を実施した結果を表 2.3.A.2-3 を示す。また、下表の未加工／未精製バルク3ロット中のレトロウイルス様粒子数を透過型電子顕微鏡で評価した結果◆×10<sup>6</sup>、▼×10<sup>6</sup>、●×10<sup>6</sup>粒子数/mLであった。

表 2.3.A.2-3 未加工／未精製バルクの外来性ウイルス試験の結果

未加工／未精製バルク	試験項目	許容基準	試験結果
ロット〇〇	外来性ウイルス試験 ( <i>in vitro</i> 試験) a)	検出しない	検出せず
ロット〇〇		検出しない	検出せず
ロット〇〇		検出しない	検出せず

a) *In vitro* 試験で使用した細胞：MRC-5、Vero、CHO

3) その他の原材料の安全性評価

細胞培養工程で使用するブタペプトンは、健康なブタに由来し、その製造方法の熱処理条件においてウイルスが不活化されると考えられる。

4) ウイルスクリアランス試験

① モデルウイルスの選択

ヒューツムマブの精製工程のウイルススクリアランス試験において、モデルウイルスとして MuLV、MMV 及び Reo3 を使用した。これらのウイルスの特徴を表 2.3.A.2-4 に示す。

表 2.3.A.2-4 ウイルスクリアランス試験に使用したモデルウイルス

ウイルス	科	ゲノム	外被	サイズ (nm)
マウス白血病ウイルス (MuLV)	レトロウイルス	RNA	有	80-110
マウスマイニュートウイルス (MMV)	パルボウイルス	DNA	無	18-24
レオウイルス 3 型 (Reo3)	レオウイルス	RNA	無	60-80

② スケール・ダウン・モデルの妥当性

ウイルススクリアランス試験に使用するスケール・ダウン・モデルの適格性について、評価した結果、妥当と判断された。スケール・ダウン・モデルの適格性に関する情報は 3.2.A.2 参照。

③ ウイルスクリアランス試験結果

ヒューツムマブの表●の精製工程で MuLV、MMV 及び Reo3 の不活化及び除去が確認さ

れた。試験結果を表 2.3.A.2-5 に示す。MuLV は、精製工程中での総クリアランス値は  $\geq 18.1$  であった。また、低 pH 処理工程におけるウイルス不活化を経時的に評価した結果を表 2.3.A.2-6 に示す。

表 2.3.A.2-5 ヒューツムマブ精製工程のウイルスクリアランス

工程	クリアランス能 (Log reduction value)					
	MuLV		MMV		Reo3	
プロテインAクロマトグラフィー	4.5 <sup>a)</sup>	4.2 <sup>b)</sup>	1.5 <sup>a)</sup>	1.6 <sup>b)</sup>	3.0 <sup>a)</sup>	2.5 <sup>b)</sup>
低 pH 処理 <sup>c)</sup>	4.4	4.5	—	—	—	—
陰イオン交換カラムクロマトグラフィー	3.5 <sup>a)</sup>	3.8 <sup>b)</sup>	3.0 <sup>a)</sup>	2.9 <sup>b)</sup>	3.0 <sup>a)</sup>	3.5 <sup>b)</sup>
ウイルス除去フィルターろ過	>6.1	>6.0	4.0	4.2	>6.1	>5.9
総クリアランス値 <sup>d)</sup>	>18.1		8.4		>11.4	

—：試験せず

- a) 新しい樹脂での試験
- b) 再使用した樹脂での試験
- c) 図 2.3.A.2-6 の保持時間 60 分のデータ参照
- d) 各工程での 2 回の試験の内、小さい LRV 値を合計した

図 2.3.A.2-6 低 pH 処理工程 (pH 3.6、15°C) のウイルス不活化

保持時間 (分)	クリアランス能 (Log reduction value)	
	MuLV	
	試験 1	試験 2
0	—	—
10	3.5	3.7
30	4.0	4.2
60	4.4	4.5
120	4.5	4.6

#### ④レトロウイルスのリスクアセスメント評価

レトロウイルスが患者に投与されるリスクアセスメントを、以下のとおり計算した。患者へ投与されるヒューツムマブの最大量は□□□mg と予想され、それは培養上清液として▲▲▲ mL に相当する。また、未加工/未精製バルク中のレトロウイルス様粒子数を電子顕微鏡で測定した結果の内の最大値である● $\times 10^6$ 粒子数/mL を計算に使用した。

ヒューツムマブ 1 投与量に相当する未加工/未精製バルクに含まれるレトロウイルス

様粒子数は、(▲▲▲mL) × (●×10<sup>6</sup>粒子数/mL) = ▽▽個 と想定される。MuLV の精製工程での総クリアランス値 ≥ 18.1 を用いると、本製剤の 1 投与量当たり 10<sup>-x.x</sup>個未満の粒子を含むこととなる。

#### 解説

- ・ 表 2.3.A.2-1、非ウイルス性感染性物質，細胞基材の安全性評価：未加工・未精製バルクで生菌数試験及びマイコプラズマ否定試験を実施しているので，CAL の試験は実施していない記載例である。
- ・ 1.3)生物起源の原材料に関する情報は，2.3.S.2.3 や 2.3.A.2 及び対応する Module 3 に記載する。S.2.3 と A.2 での記載情報量のバランスは，申請者が判断すればよい。
- ・ 表 2.3.A.2-2：ICH Q5A ガイドラインに記載されているとおり，CAL でウイルス試験 (*in vitro*, *in vivo*) を実施していれば，WCB でのウイルス試験 (*in vitro*, *in vivo*) は必須ではない。本モックアップでは，WCB でのウイルス試験 (*in vitro*, *in vivo*) を実施した記載例を示したが，これは開発者が ICH Q5A ガイドラインの要件を超えて自主的に試験をした例である。
- ・ 4)ウイルスクリアランス試験，表 2.3.A.2-5：
  - 低 pH 処理ステップで MMV、Reo3 を評価しなかった理由：ウイルス不活化を期待できない工程であることが開発経験上，分かっていたので試験を省略した例である。
  - すべてのクロマトグラフィー工程でウイルスクリアランス試験を実施せず，クリアランスが期待できる工程のみを特性解析した例である。
  - クロマトグラフィー工程の 2 回の繰り返し試験として，本モックアップでは新しい樹脂と再使用した樹脂それぞれの結果を例示したが，これ以外の組合せもありうる。
- ・ 4)ウイルスクリアランス試験，表 2.3.A.2-6：
  - ウイルス不活化工程の試験結果を，不活化曲線として図で表す方法もあるが，本モックアップでは表形式での記載例を示した。

### 2.3.A.3 添加剤

本品は新規添加剤を使用していない。

**CTD-第2部（モジュール2）：  
品質に関する概括資料のモックアップ  
（記載例）**

—抗体医薬品を対象としたモジュール2.3  
モックアップ（記載例）—

発行日：平成30年5月7日

発行：公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団  
〒101-0032

東京都千代田区岩本町2-11-1

ハーブ神田ビル

電話 03(5823)0361 / FAX 03(5823)0363

（財団事務局 担当 井口 富夫）

印刷：タナカ印刷株式会社

〒135-0023

東京都江東区平野2-2-39

発行元の許可なくして無断転載・複製を禁じます。