

バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の
製造販売承認申請書及びCTD第2部：品質に関する概括資料の記載例

国立研究開発法人日本医療研究開発機構

医薬品等規制調和・評価研究事業

「先進的製造・品質管理及び評価手法を反映した医薬品のライフサイクル

マネジメントに関する研究」バイオ分科会

令和4年10月

AMED バイオ分科会メンバー (五十音順：敬称略)

氏名	所属
青山道彦	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
五十嵐柳子	MSD 株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
石井明子	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 <座長>
臼井功二	ファイザー株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
内田和久	協和キリン株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会/神戸大学
大塚裕司	バイエル薬品株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
奥平真一	医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部
岐部真弓	日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
小島孝夫	アッヴィ合同会社/JPMA バイオ医薬品委員会
後藤かの子	医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部
坂本知昭	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 <化成品座長>
櫻井京子	医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部
佐藤昌之	第一三共株式会社 CMC 薬事部
篠崎 真	サノフィ株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
柴田寛子	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
杉江 裕	ブリistol・マイヤーズ スクイブ株式会社
鈴木幹雄	中外製薬株式会社/東薬工局方委員会
瀬川雅司	持田製薬株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
永井祐子	日本化薬株式会社/JBSA 開発・薬事検討委員会
中根サチ	バイエル薬品株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
中村祥子	医薬品医療機器総合機構 ワクチン等審査部
中山能雄	日本イーライリリー株式会社/JPMA 薬事委員会
早水健二	医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部
原田千智	ブリistol・マイヤーズスクイブ株式会社/JPMA 薬事委員会
船戸恵子	グラクソ・スミスクライン株式会社
古木健一朗	MSD 株式会社
宮内良子	メルクバイオフーマ株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
八木聡美	医薬品医療機器総合機構 新薬審査第四部
矢富丈博	持田製薬株式会社/JBSA 開発・薬事検討委員会
山口貴宏	旭化成ファーマ株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
山田正敏	日本化薬株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
大和友子	田辺三菱製薬株式会社/JPMA バイオ医薬品委員会
鷺尾幸生	アステラス製薬株式会社

(所属は令和3年度)

JPMA バイオ医薬品委員会 製造販売承認申請書および CTD モック作成 WG (敬称略)

氏名	所属
山口貴宏	旭化成ファーマ株式会社
平尾由貴	アステラス製薬株式会社
小島孝夫	アッヴィ合同会社
五十嵐柳子	MSD 株式会社
加藤正也	大塚製薬株式会社
内田和久	協和発酵キリン株式会社
杉原努	協和キリン株式会社
篠崎真	サノフィ株式会社
野々山輝	参天製薬株式会社
諸戸康志	塩野義製薬株式会社
矢野伸吾	大鵬薬品工業株式会社
原田健司	大日本住友製薬株式会社
大和友子	田辺三菱製薬株式会社
山田正敏	日本化薬株式会社
岐部真弓	日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
大塚裕司	バイエル薬品株式会社
小川博暢	一般財団法人 阪大微生物病研究会
近藤稲子	ブリistol・マイヤーズスクイブ株式会社
宮内良子	メルクバイオフーマ株式会社
瀬川雅司	持田製薬株式会社
古市将志	ヤンセンファーマ株式会社
名古屋欣司	ユーシービージャパン株式会社

令和 5 年 11 月 CTD 第 2 部 規格及び試験法の解説番号を修正

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販売承認申請書及びCTD第2部：品質に関する概括資料の記載例

前書き

全般

- 本モックアップは、「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）－」（公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、2018年5月）を参考に作成した。
- 本モックアップは、規制上の新たな要件を提案あるいは既存の規制要件の削除を意図するものではない。
- 本モックアップは、新薬承認申請経験がある申請者の製造販売承認申請書（承認申請書）及びCTD第2部：品質に関する概括資料（Module 2.3）の記載をこれに置き換えることを意図するものではない。
- Module 2.3に記載されない審査に必要な情報は、Module 3に記載されていることを前提としている。
- 各項には本モックアップを利用するにあたっての编者注及び解説を記載している。
 - ・ 编者注：承認申請書及び関連するModule 2.3の各項を読むにあたっての全般的な留意事項
 - ・ 解説：記載例の内容についての補足説明

製造方法

- 本モックアップは、現在のバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の新薬承認申請において、承認申請書及び関連するModule 2.3の項（2.3.S.2.2、2.3.S.2.3並びに2.3.S.2.4項）に記載する内容を例示したものである。また参考情報として2.3.S.2.6項の記載例も示す。
- 本モックアップは、ICH Q11ガイドラインの「より進んだ（enhanced）」手法で製法開発した事例に対するものであり、ICH Q12ガイドラインの「性能に基づく手法」に対するものではない。2.3.S.2.6項にて重要品質特性（CQA）に影響する工程パラメータを特定している。
- 承認申請書及び関連するModule 2.3の項に記載する内容は、当該品目の品質特性、適用した開発手法、開発研究及び製造を通して得られた情報や知識に依存する。本モックアップより多くの記述が必要となることもあり、また、本モックアップに記載のあるすべての項目の記載が求められるものでもない。
- 本モックアップでは、Module 2.3の製造方法（2.3.S.2.2項）及び原材料（2.3.S.2.3項）について承認申請書と同一の記載としている。現行、各社様々な記載事例があるが、一部変更承認申請対象事項・軽微変更届出対象事項の記号を含む製造方法及び原材料の記載は、審査上の大きな論点の一つであることから、承認申請書と同一の記載とすることにより、審査が円滑に進むことが期待される。
- 本モックアップでは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて以下の要領で生産されるモノクローナル抗体（名称：ジェーピーマブ）をモデルとしている。
 - ・ 培養プロセス：2,000 Lスケールフェドバッチ培養（シングルユース設備）
 - ・ 精製プロセス：3つのクロマトグラフィー工程（アフィニティークロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィー）、低pH処理工程、ウイルス除去ろ過工程を含む
 - ・ 原薬：100 mg/mL、pH7.0、処方入れ込み
 - ・ 製剤：原薬をそのままもしくは希釈して無菌ろ過充填を想定

規格及び試験方法

- 本モックアップは、現在のバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の新薬承認申請において、承認申請書及び関連するModule 2.3の項（2.3.S.4.1及び2.3.S.4.2項）に記載する内容を例示したものである。
- Module 3にSOPの添付又は試験方法の詳細が記載されていることを前提とした承認申請書及びModule 2.3の記載例である。本記載例に記載していなくても、実際に実施している操作及び設定しているパラメータもあることに留意し、重要な操作及びパラメータは記載する必要がある。

- 承認申請書の確認試験、糖鎖プロファイル、純度試験及び生物活性の記載は、規格及び試験方法の合理化に関する通知を参照した記載例である。
- **Module 2.3** として日本薬局方の記載方法に準じた記載例を示したが、承認申請書に記載した内容を網羅する記載であれば他の記載方法でも問題ない。

モックアップ作成にあたり参考にした資料・通知・ガイドライン

- 「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）－」（公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、2018年5月）
- 「改正薬事法に基づく医薬品等の製造販売承認申請書記載事項に関する指針について」（薬食審査発第0210001号、平成17年2月10日）
- 承認申請書記載例解説（厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）、平成17年3月23日、医薬品の製造方法等の変更に伴う品質比較に関する研究班）
- 「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」について（薬食審査発1214第1号、平成24年12月14日）
- ICH 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（医薬審第329号、平成12年2月22日）
- ICH 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）
- ICH 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）製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」について（医薬審第873号、平成12年7月14日）
- ICH 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ともなう同等性／同質性評価について（薬食審査発第0426001号、平成17年4月26日）
- ICH Q6A：新医薬品の規格及び試験方法の設定について（医薬審発第568号、平成13年5月1日）
- ICH 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（医薬審発第571号、平成13年5月1日）
- ICH Q7：原薬GMPのガイドラインについて（医薬発第1200号、平成13年11月2日）
- ICH Q8(R2)：製剤開発に関するガイドラインの改定について（薬食審査発第0628第1号、平成22年6月28日）
- ICH Q9：品質リスクマネジメントに関するガイドライン（薬食審査発第0901004号・薬食監麻発第0901005号、平成18年9月1日）
- ICH 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（薬食審査発0710第9号、平成26年7月10日）
- ICH Q12：「医薬品のライフサイクルマネジメントにおける技術上及び規制上の考え方に関するガイドライン」について（薬生薬審発1029第1号・薬生監麻発1029第1号、令和3年10月29日）
- ICH M4：「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」の一部改正について（薬食審査発第0701004号、平成15年7月1日）
- ICH M4Q：医薬品の承認申請のための国際共通化資料 コモン・テクニカル・ドキュメント CTD－品質に関する文書の作成要領に関するガイドライン（平成15年7月1日）
- 「医薬品の品質に係る承認事項の変更に係る取扱い等について」（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）
- 「バイオ医薬品の規格及び試験方法欄の記載の合理化について」（事務連絡、令和元年9月12日）

AMED Q12 バイオ分科会
2022年10月

目次

前書き	1
モックアップ作成にあたり参考にした資料・通知・ガイドライン.....	3
1. 承認申請書 記載例	5
1.1 製造方法	5
1.2 規格及び試験方法	13
2 CTD 第2部 記載例	27
2.3.S.2.2 製造方法及びプロセス・コントロール	27
2.3.S.2.3 原材料の管理	33
2.3.S.2.4 重要工程及び重要中間体の管理	41
2.3.S.2.6 製造工程の開発の経緯	42
2.3.S.4.1 規格及び試験方法	51
2.3.S.4.2 試験方法（分析方法）	52

1. 承認申請書 記載例

1.1 製造方法

编者注

以下の事項については、原薬及び製剤の特性及び開発の経緯等に基づき記載する。

- 目標値／設定値とするパラメータには一部変更承認申請対象事項の記号「《 》」又は軽微変更届出対象事項の記号「『 』」を、目標値／設定値以外の軽微変更届出対象事項には記号「“ ”」を最終製品の品質・安全性に与える影響を考慮して付す。なお、培地や緩衝液等の成分の濃度、pH、導電率等の一部変更承認申請対象事項及び軽微変更届出対象事項の区分については、品質への影響等に関する検討結果に基づき申請者が提示し、承認審査を経て確定する。
- 工程の中間体を保存する場合は、保存期間中の品質への影響を鑑み、申請者がリスクベースで保存温度、保存期間及び保存容器の記載要否を判断する。なお、記載にあたっては安定性試験結果等を踏まえる。
- 製造に用いる機材（培養容器及び保存容器等）がシングルユースの場合は申請者が品質等への影響を評価した上で、リスクベースで材質の記載要否を判断する。
- 各種カラムクロマトグラフィーによる精製工程について、製法の概要を示す上で必要なパラメータを記載する。線流速、分取条件等の各パラメータについては、申請者が品質への影響を評価した上で、リスクベースで記載の要否を判断する。また、樹脂を再生して使用する場合は、再利用回数はバリデートされた回数が必要に応じて記載する。
- 培地や緩衝液等の組成は別紙にて記載することも可能である。
- ろ過膜については Extractables 及び Leachables（溶出物及び浸出物）の評価結果や品質に与える影響により材質の記載要否を判断する。
- ウイルス不活化／除去工程におけるパラメータは実施されたウイルスクリアランス試験の条件の範囲内であることに留意して記載する。
- 工程内管理試験は工程毎に記載し、試験法のタイトル、試験原理及び判定基準を記載する。通常、試験原理は試験の概要が把握できるレベルで記載するが、試験法のタイトルで把握できる場合、記載は不要である。工程内管理試験は軽微変更届出対象事項にはできない。
- 工程内管理試験の通し番号は必須ではないが、本モックアップでは記載している。
- WCB 融解以降の製造に使用される培地については、組成・含量を承認申請書に記載する。培地組成の情報提示方法として原薬等登録原簿（マスターファイル）を利用することもできる。
- WCB の維持管理以降の製造所は GMP 適合性調査の対象であり、許可／認定が必要となる。

【連番】 001

【製造所の名称】 該当なし

【製造方法】

遺伝子発現構成体の作製

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 JP 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を作製した。ハイブリドーマの mRNA からヒト JP 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。

ジェーピーマブの重鎖をコードする cDNA 断片を、切断したプラスミド●●に結合し、プラスミド▲▲を作製した。別にジェーピーマブの軽鎖をコードする cDNA 断片を、切断したプラスミド○○に結合し、プラスミド■●を作製した。次に、プラスミド▲▲及びプラスミド■●をそれぞれ切断し、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。

（発現ベクター●●の構造を別紙図 1 に示す。）

マスター・セル・バンク（MCB）作製用細胞株の樹立

宿主細胞 CHO-XXX 株に○○法で発現ベクター●●を導入した。次に、■●を含まない無血清培地 X 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

含む無血清培地を用いて培養を行い、細胞を選択した。選択した細胞株 YYY をクローニングし、MCB 作製用細胞株 ZZZ を得て、●%のジメチルスルホキシド (DMSO) を含む無血清凍結用培地に懸濁し保存した。

MCB の調製

MCB 作製用細胞株 ZZZ を、培地 A (JP-Media A 又は同等品) を用いて培養した。拡大培養後、遠心分離し、●%の DMSO を含む培地 A (凍結用培地) に懸濁し調製した。この細胞懸濁液をバイアルに分注し、凍結して、MCB (ロット●●) を調製した。MCB (ロット●●) の特性解析試験及び純度試験を行った。(試験項目及び試験結果は別紙表 1 参照)

MCB の保管及び管理

MCB は液体窒素の気相で保存する。

MCB 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 (○%以上) を確認する。

MCB の更新

MCB は更新の予定はない。

ワーキング・セル・バンク (WCB) の調製

MCB (ロット●●) を、培地 A を用いて 37°C で培養した。拡大培養後、遠心分離し、●%の DMSO を含む培地 A (凍結用培地) に懸濁し調製した。この細胞懸濁液をバイアルに 1 mL ずつ分注し、凍結して、WCB (ロット▲▲) を保存した。WCB の特性解析試験及び純度試験を実施した。(試験項目及び試験結果は別紙表 2 参照)

【次の製造方法の連番】 002、003

【連番】 002

【製造所の名称】 JP Science

【製造方法】

WCB の更新

MCB (ロット●●) を、培地 A を用いて『37°C』で培養する。拡大培養後、遠心分離し、《●%》の DMSO を含む培地 A (凍結用培地) に懸濁し調製する。この細胞懸濁液をバイアルに 1 mL ずつ分注し、凍結して、WCB を保存する。WCB の特性解析試験及び純度試験を実施する。(WCB 更新時の試験項目及び判定基準は別紙表 3 参照)

【次の製造方法の連番】 003

【連番】 003

【製造所の名称】 JP Logistics

【製造方法】

WCB の保管及び管理

WCB は液体窒素の気相で保存する。

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 (○%以上) を確認する。

【次の製造方法の連番】 004

【連番】 004

【製造所の名称】 JP Biologics

【製造方法】

ジェーピーマブ原薬の製造

重要工程：生産培養、低 pH 処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、ウイルス除去ろ過

1) WCB 融解

凍結保存されている WCB のバイアル 1 本を融解する。

2) 種培養

融解した WCB の細胞を細胞播種密度が『 2×10^5 cells/mL』となるように培地 A を含む“250 mL”培養容器に加え、『37°C』で『100 時間』培養する。この培養液を同様に、容量“1 L”、“5 L”、“20 L”、“250 L”の培養容器を用いて、順次、『37°C』で『2~4 日間』培養する。

3) 拡大培養

前工程で得た培養液を細胞播種密度が『 2×10^5 cells/mL』となるように培地 A を含む“500 L”バイオリアクターに加え、『37°C』で『100 時間』培養する。培養中は培養液の pH が『7.0』となるよう、必要に応じて CO₂ ガスや水酸化ナトリウム溶液を加える。

4) 生産培養

前工程で得た培養液を細胞播種密度が『 2×10^5 cells/mL』となるように培地 B を含む 2,000 L バイオリアクターに加え、『37°C』、溶存酸素濃度『30%』で『340 時間』培養する。培養中は培養液の pH が『7.0』となるよう、必要に応じて CO₂ ガスや水酸化ナトリウム溶液を加える。また、グルコース濃度が『2 g/L』を下回らないようにグルコース溶液を添加する。培養開始『100 時間』以降、培地 F を毎日『40 L』添加する。消泡剤（製品名***又は同等品）を適宜添加する。
MCB 融解から生産培養終了までの継代数は●●以内である。

【工程内管理試験 1（培養終了時、未加工／未精製バルク）】

- (1) バイオバーデン：●●CFU/mL 未満
- (2) マイコプラズマ否定試験（培養法；欧州薬局方）：検出せず
- (3) 外来性ウイルス試験（指示細胞（MRC-5、Vero 及び CHO 細胞））：検出せず

5) ハーベスト

前工程で得た培養液をハーベストし、デプスフィルターでろ過して細胞を分離し、回収した液を精密ろ過フィルターでろ過する。得られた液の保存期間は最大“5 日間”とする。

6) アフィニティークロマトグラフィー

前工程液をベッド高《20 cm》のプロテイン A アフィニティークラム（JP-ProA Fast 又は同等品）にジューピーマブをレジン 1 L あたり《40 g》以下となるよう負荷する。緩衝液 1 で洗浄した後、緩衝液 2 で溶出し、280 nm の吸光度を連続的に確認し、目的物質を含む範囲（A280 = 《0.1 AU/cm》以上）を回収する（線流速『150 cm/h』）。

7) 低 pH 処理

前工程液を塩酸及び水酸化ナトリウム溶液で pH 3.2~3.7 に調整し、18~30°C で 60~240 分間保持する。水酸化ナトリウム溶液で pH を『5.5』に調整する。

8) 陽イオン交換クロマトグラフィー

前工程液を、緩衝液 3 で平衡化したベッド高《20 cm》の陽イオン交換カラム（JP-CEX High 又は同等品）にジューピーマブをレジン 1 L あたり《100 g》以下となるよう負荷する。緩衝液 3 で洗浄した後、緩衝液 4 で溶出し、280 nm の吸光度が《0.1 AU/cm》以上の画分を取得する（線流速『150 cm/h』）。

9) 陰イオン交換クロマトグラフィー

前工程液を注射用水で『2 倍』に希釈し、pH を『7.0』に水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整した後、緩衝液 5 で平衡化したベッド高《20 cm》の陰イオン交換カラム（JP-AEX Ultra 又は同等品）にジューピーマブをレジン 1 L あたり《150 g》以下となるように通液し、続けて緩衝液 5 を通液し（線流速『150 cm/h』）、280 nm の吸光度が《0.1 AU/cm》以上の画分を取得する。

10) ウイルス除去ろ過

前工程液をウイルス除去フィルター（Viral Block JP 20 又は同等品）でろ過する（負荷量 300 L/m² 未満、ろ過圧 100 kPa 未満）。

【工程内管理試験 2】使用後のウイルス除去フィルター完全性試験に適合する

11) 限外ろ過／透析ろ過

前工程液を、限外ろ過膜（分画分子量“30,000”）でジェーピーマブ濃度が『130 g/L』となるまで濃縮し、濃縮液をその『10 倍』を超える量の緩衝液 6 で透析ろ過置換する。

12) 調製

前工程液に《50%》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《1%》とする。

13) ろ過、充填

前工程液を“0.2 μm”のろ過膜でろ過し、テフロン製容器に充填する。

14) 試験、保管

ジェーピーマブ原薬の試験を行う。原薬は《-70°C》で保管する。

培地及び緩衝液の組成は別紙表 4～8 に示す。

【次の製造方法の連番】 005

【連番】 005

【製造所の名称】

ジェーピーマブ製剤の製造
(記載省略)

解説

- 本モックアップでは MCB 及び WCB の調製並びに特性解析試験は同じ製造所で実施され、WCB の保管管理（保管及び定期安定性試験）と更新（新しい WCB の調製及び特性解析試験）はそれぞれ別の製造所で実施される事例としている。
- 製造用細胞の安定性について、本モックアップでは *in vitro* 細胞齢の上限（MCB の融解から生産培養終了までの継代数で規定）を超えない管理をした例を示す。製造所の管理実態に合わせて WCB の融解からの日数や継代数等を規定する方法もある。
- 重要中間体がある場合は【製造方法】欄に「重要中間体：○○工程の中間体」等を記載する。本モックアップでは重要中間体はない記載例を示している。
- 工程内管理試験等で実施するマイコプラズマ否定試験については、本モックアップでは、欧州薬局方に従って実施している例を記載しているが、日局参考情報や生物学的製剤基準等の他の公定書に従って実施する場合もある。
- 本モックアップでは、低 pH 処理、陰イオン交換クロマトグラフィー及びウイルス除去ろ過をウイルスクリアランスに寄与する工程とした。また、ウイルス除去ろ過工程で用いるウイルス除去フィルターは製品名を記載した。
- 本モックアップでの充填前のろ過は、無菌ろ過ではなく、重要な工程ではない。
- 本モックアップでは宿主細胞以外のヒト又は動物に由来する原材料を使用していない例を示す。ヒト又は動物に由来する原材料を使用した場合は「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）の別添 3 を参照して記載する。

記載例：

（原材料の管理）

ブタペプトンは、健康なブタに由来するもので、●°C で ●分以上の加熱により病原体の不活化を行ったものである。

なお、反芻動物由来原料の使用にあたっては、反芻動物由来原料特有の各種通知が発出されているため、最新の通知を参照して記載する。

製造方法別紙

図1 発現ベクター●●の構造

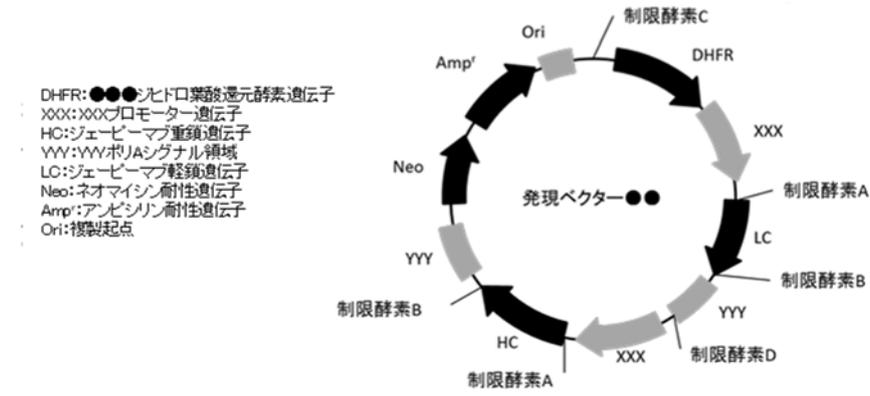


表1 MCB（ロット●●）の特性解析試験及び純度試験の試験項目並びに試験結果

試験項目	試験結果	
塩基配列	期待されるジェーピー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)	予想されるサイズのバンドを認めた	
DNAコピー数 (●●法)	細胞あたり約●●コピーの挿入を確認した	
確認試験（由来細胞の確認）	チャイニーズハムスター由来細胞のパターンと一致した	
無菌試験（日本薬局方）	陰性	
マイコプラズマ否定試験 (培養法・DNA染色法；欧州薬局方)	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 ⁺ L ⁻ 細胞)	感染性は認められなかった
	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)	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 (成熟マウス、乳飲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かった
	ハムスター抗体産生試験 (LCM、PVM、Reo3、Sendai Virus、SV5)	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)	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)	ウイルス混入を示す結果は認められなかった

表2 WCB (ロット▲▲) の特性解析試験及び純度試験の試験項目並びに試験結果

試験項目		試験結果
確認試験 (由来細胞の確認) (アイソザイム解析)		チャイニーズハムスター由来細胞のパターンと一致した
無菌試験 (日本薬局方)		陰性
マイコプラズマ否定試験 (培養法・DNA染色法; 欧州薬局方)		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	<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かった
	<i>In vivo</i> 試験 (成熟マウス、乳飲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かった

表3 WCB の更新時の特性解析試験及び純度試験の試験項目並びに判定基準

試験項目		判定基準
確認試験 (由来細胞の確認) バーコード試験法		チャイニーズハムスター由来細胞であることを確認する
無菌試験 (日本薬局方)		陰性
マイコプラズマ否定試験 (培養法・DNA染色法; 欧州薬局方)		検出しない
ウイルス試験	<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、乳飲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

表4 基礎培地 A 組成

成分	配合量
...	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地A■■g を水 1 L に溶解したときに含まれる組成)

表5 基礎培地 B の組成

成分	配合量
...	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地 B ■■g を水 1 L に溶解したときに含まれる組成)

表 6 基礎培地 F の組成

成分	配合量
• • •	■ ■ g
• • •	• • •
• • •	• • •

(基礎培地 F ■ ■ g を水 1 L に溶解したときに含まれる組成)

表 7 培地の組成

培地名	成分	濃度
培地 A	基礎培地 A • • • • • •	■ ■ g/L ■ ■ mg/L ■ ■ mg/L
培地 B	基礎培地 B 遺伝子組換えインスリン • • • • • • • • •	■ ■ g/L ■ ■ μg/L ■ ■ mg/L ■ ■ mg/L ■ ■ mg/L
培地 F	基礎培地 F • • • • • •	■ ■ g/L ■ ■ mg/L ■ ■ mg/L

表 8 緩衝液の組成

名称	組成
緩衝液 1	《200 mmol/L》塩化ナトリウム含有『20 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 5.5』
緩衝液 2	『20 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 3.0』
緩衝液 3	『50 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 6.5』
緩衝液 4	《300 mmol/L》塩化ナトリウム含有『50 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 6.5』、 導電率『25 mS/cm』
緩衝液 5	『100 mmol/L』塩化ナトリウム含有『50 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 7.0』、 導電率『20 mS/cm』
緩衝液 6	《100 mmol/L》塩化ナトリウム含有《50 mmol/L》リン酸緩衝液、『pH 7.0』

1.2 規格及び試験方法

【別紙規格】

【名称】：ジェーピーマブ（遺伝子組換え）

【製造方法】

【連番】：001

【製造所の名称】：製造方法欄に記載

【製造方法】

製造方法欄に記載

【貯蔵方法及び有効期間】

容器：気密容器

貯法： $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$

有効期間：12 箇月

【規格及び試験方法】

【試験名】：基原

【規格及び試験方法】

ジェーピーマブは、ヒト JP 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。ジェーピーマブは、チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される。ジェーピーマブは 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 (κ 鎖) 2 本で構成される糖タンパク質（分子量：約 155,000）である。

【規格及び試験方法】

【試験名】：構造式

【規格及び試験方法】

ジェーピーマブ（遺伝子組換え）のアミノ酸配列を [別紙図 1] に示す。

【規格及び試験方法】

【試験名】：分子式

【規格及び試験方法】

$\text{C}_{6536}\text{H}_{10096}\text{N}_{1736}\text{O}_{2054}\text{S}_{18}$ (タンパク質部分)

【規格及び試験方法】

【試験名】：含量規格

【規格及び試験方法】

本品は定量するとき、1 mL 当たり 90.0～110.0 mg のタンパク質を含む。

【規格及び試験方法】

【試験名】：性状

【規格及び試験方法】

本品は無色～微黄色の澄明又はわずかに乳白光の液である。

【規格及び試験方法】

【試験名】：確認試験

【規格及び試験方法】

(1) ペプチドマップ

試験方法：液体クロマトグラフィー、紫外吸光光度計

規格値／判定基準：標準溶液と同一の保持時間に同様のピークを認める。

分析方法

試験試料の調製：

試料溶液：

1. 本品（タンパク質として約 ■ mg）を凍結乾燥した後、XXX 緩衝液 ■ μL 及び ■ mmol/L ジチオスレイトール溶液 ■ μL を添加。

2. ■°Cで■分間静置。■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液■ μL を加え、暗所で■分間静置。
3. ■ mmol/L ジチオスレイトール溶液■ μL、■ mol/L トリス塩酸緩衝液■ μL 及びリシルエンドペプチダーゼ溶液■ μL を加え、37°Cで■時間静置。
4. トリフルオロ酢酸■ μL を添加。

標準溶液：ジェーピーマブ標準物質（タンパク質として■ mg）を用いて、試料溶液と同様に調製。

注入量：100 μL

試験条件：

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210 nm）

カラム：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（5 μm）、内径 4.6 mm、長さ 20 cm（〇〇社製 XXXX 又は同等品）^{<3>}

カラム温度：25°C付近

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 1 mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液で、主要な●本のピークが認められ、保持時間約 XX 分のピーク A と保持時間 YY 分のピーク B の分離度は 1.5 以上（別紙図 2）。

(2) イオン交換クロマトグラフィー

試験方法：液体クロマトグラフィー、紫外吸光光度計、ピークの保持時間

規格値／判定基準：試料溶液及び標準溶液から得られたクロマトグラムにおける主ピーク（0K ピーク）の保持時間は一致（別紙図 3）。

分析方法

試験試料の調製：

試料溶液：本品に移動相 A を添加（タンパク質として■ mg/mL）。

標準溶液：ジェーピーマブ標準物質に移動相 A を添加（タンパク質として■ mg/mL）。

試験条件

純度試験（1）イオン交換クロマトグラフィーの試験条件を準用。

システム適合性

システムの性能は純度試験（1）イオン交換クロマトグラフィーのシステム適合性を準用。

【規格及び試験方法】

【試験名】：pH

【規格及び試験方法】

●～●

【規格及び試験方法】

【試験名】：糖鎖プロファイル^{<4>}

【規格及び試験方法】

試験方法：酵素による N-結合型糖鎖の遊離、誘導体化、液体クロマトグラフィー、ピークの面積百分率

規格値／判定基準^{<5>}：フコシル化糖鎖●～●%、アフコシル化糖鎖●～●%、ハイマンノース

型糖鎖：●%以下。

フコシル化糖鎖 (%)

=フコシル化された糖鎖 (G0F、G0F-GlcNAc、G1F、G1'F、G1F-GlcNAc 及び G2F) のピーク面積の和/糖鎖のピーク面積の総和×100

アフコシル化糖鎖 (%)

=フコシル化されていない糖鎖 (G0 及び G0-GlcNAc) のピーク面積の和/糖鎖のピーク面積の総和×100

ハイマンノース型糖鎖 (%)

=ハイマンノース型糖鎖 (Man5) のピーク面積の和/糖鎖のピーク面積の総和×100

分析方法

試験試料の調製^{<6>}：

脱塩方法 (透析)

透析液：pH 7.2 のリン酸塩緩衝液

PNGase F による N-結合型糖鎖の遊離

遊離反応溶液：pH 7.2 のリン酸塩緩衝液にてタンパク質濃度約■ mg/mL に調製

PNGase F 添加量：本品タンパク質量約 1 mg 当たり ■ ユニット

反応条件：37°Cで■～■時間

遊離糖鎖の精製

限外ろ過ユニット：分画分子量■ kDa

操作：遊離反応後の液を限外ろ過した後、減圧乾固

2-アミノベンズアミド誘導体化反応液：精製した遊離糖鎖に 2-アミノベンズアミド誘導体化試液を、糖鎖遊離反応に用いた本品タンパク質量約 1 mg 当たり ■ μL 添加。

反応条件：65°Cで■～■時間

誘導体化糖鎖の精製

2-アミノベンズアミド誘導体化反応液にアセトンを■倍量添加し、遠心。沈殿物をアセトンで 2 回洗浄後、乾燥し、誘導体化糖鎖試料とする。

システム適合性試験用溶液：標準物質から上記の操作で調製した誘導体化糖鎖^{<7>}を調製溶液 (アセトニトリル/移動相 A 混液 (7:3)) で再調製した溶液。

試料溶液：誘導体化糖鎖試料を糖鎖遊離反応に用いた本品タンパク質量 1 mg 当たり ■ μL の調製溶液で溶解した液。

注入量：10 μL

試験条件：

検出器：蛍光光度計 (励起波長：330 nm、蛍光波長：420 nm)

カラム：カルバモイル基結合型シリカゲル (3 μm), 内径 4.6 mm、長さ 15 cm (〇〇社製 XXXX 又は同等品) ^{<3>}

カラム温度：40°C付近

移動相 A：ギ酸で pH 4.5 に調整したギ酸アンモニウム溶液 (■ g/L)

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 1.0 mL

面積測定範囲：試料注入後 10 分から 65 分の範囲

システム適合性^{<8>}, ^{<9>}

システムの性能：

システム適合性試験用溶液で、G0F、Man5、G1F、G1'F、G2F (それぞれ別紙図 4 のピーク 4、5、7、8 及び 9) の順に溶出し、それぞれの分離度が●以上

糖鎖プロファイルの代表的なクロマトグラム：別紙図 4 参照

【規格及び試験方法】

【試験名】：純度試験

【規格及び試験方法】

(1) イオン交換クロマトグラフィー

試験方法：

液体クロマトグラフィー、紫外吸光光度計、ピークの面積百分率

規格値／判定基準：

主ピーク（OK ピーク）●%以上、酸性領域●%以下、塩基性領域●%以下（別紙図 3 参照）

分析方法

試験試料の調製：

試料溶液：本品に移動相 A を加える（タンパク質として■ mg/mL）。

標準溶液：ジェーピーマブ標準物質に移動相 A を添加（タンパク質として■ mg/mL）。

検出の確認用溶液：標準溶液に移動相 A を添加（タンパク質として■ mg/mL）。

注入量：50 μL

試験条件：

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 210 nm）

カラム：液体クロマトグラフィー用弱酸性イオン交換樹脂（10 μm）、内径 4.0 mm、長さ 20 cm（○社製 XXXX 又は同等品）^{<3>}

カラム温度：25°C付近

移動相 A：無水リン酸二水素ナトリウム（■ g/L）、リン酸二水素ナトリウム一水和物（■ g/L）及び塩化ナトリウム（■ g/L）を含み pH 6.5 に調整した溶液^{<10>}

移動相 B：無水リン酸二水素ナトリウム（■ g/L）、リン酸二水素ナトリウム一水和物（■ g/L）及び塩化ナトリウム（■ g/L）を含み pH 6.5 に調整した溶液^{<10>}

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 1.0 mL

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^{<9>}

検出の確認：検出の確認用溶液で、主ピーク（OK ピーク）の SN 比は●以上^{<11>}

システムの性能：標準溶液で主ピーク（OK ピーク）、1K ピークの順に溶出し、その分離度は●以上

(2) サイズ排除クロマトグラフィー

試験方法：液体クロマトグラフィー、紫外吸光光度計、ピークの面積百分率

規格値／判定基準：

主ピーク●%以上、高分子量領域●%以下、低分子量領域●%以下（別紙図 5 参照）

分析方法

試験試料の調製：

試料溶液：本品に移動相を添加（タンパク質として■ mg/mL）。

システム適合性試験用溶液：分子量マーカー1 バイアルを移動相● mL で溶解。

検出の確認用溶液：ジェーピーマブ標準物質を用いて試料溶液と同様に調製した液（タンパク質として■ mg/mL）の移動相溶液（1→■）。

注入量：50 μL

試験条件：

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210 nm）

カラム：液体クロマトグラフィー用親水性シリカゲル（5 μm）、内径 8.0 mm、長さ 20 cm（〇〇社製 XXXX 又は同等品）^{<3>}

カラム温度：25°C 付近

移動相：無水リン酸水素二ナトリウム（■ g/L）、リン酸二水素ナトリウム一水和物（■ g/L）、及び塩化ナトリウム（■ g/L）を含み pH 6.5 に調整した溶液^{<10>}

流量：毎分 0.5 mL

面積測定範囲：試料注入後〇分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^{<12>}

検出の確認：検出の確認用溶液で、主ピークの SN 比は●以上^{<11>}。

システムの性能：システム適合性試験用溶液で、□、△の順に溶出し、その分離度は●以上。

（3）キャピラリーSDS 電気泳動法（非還元条件）

試験方法：キャピラリーSDS 電気泳動法、紫外吸光光度計、ピーク的面積百分率（各ピーク面積は移動時間で補正）

規格値／判定基準：主ピーク●%以上

分析方法

試験試料の調製：

試料溶液：

1. 本品溶液（タンパク質として約■ mg/mL）■ μL に非還元試料緩衝液■ μL 及び■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液■ μL を添加。

2. ■°C で■分間加温。

システム適合性試験用溶液：ジェーピーマブ標準溶液（タンパク質として■ mg/mL）をシステム適合性試験溶液とし、本液■ μL を用いて、試料溶液と同様に調製。

検出の確認用溶液：システム適合性試験用溶液（1→■）溶液■ μL を用いて、試料溶液と同様に調製。

試験条件：

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210 nm）

キャピラリー：フューズドシリカの毛細管、内径 50 μm、有効長 20 cm

カラム温度：25°C 付近

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：■ V

泳動時間：20 分間

システム適合性^{<12>}

検出の確認：検出の確認用溶液で、主ピークの SN 比は 10 以上^{<11>}。

システムの性能：システム適合性試験用溶液で、泳動プロファイルは参照エレクトロフェログラムと同様（別紙図 6 参照）。

（4）宿主細胞由来タンパク質

試験方法：酵素免疫測定法（ELISA）、可視吸光光度計、4 パラメーターロジスティック（4-PL）回帰

規格値／判定基準：● ppm（ng/mg）未満

分析方法

試験試料の調製：

試料溶液：本品 1 容量にブロッキング溶液■容量を添加^{<13>}。

各濃度の標準溶液：

1. 宿主細胞由来タンパク質標準物質にブロッキング溶液を添加（タンパク質として■ ng/mL）。
2. ■ ng/mL になるまでブロッキング溶液で■倍段階希釈。

操作方法：

1. 抗原抗体反応試験用プレートの各ウェルにヤギ抗 HCP 抗体溶液 100 μL を加え、2～8°Cで■時間以上静置。
2. 液を除いた後、洗浄溶液で洗浄^{<14>}。
3. ブロッキング溶液 200 μL を各ウェルに加え、室温で■時間静置。
4. 液を除いた後、洗浄溶液で洗浄^{<14>}。
5. 試料溶液及び各濃度の標準溶液を各々3 ウェルに 100 μL 分注し、室温で■時間振とうする。
6. 液を除いた後、洗浄溶液で洗浄^{<14>}。
7. ウサギ抗 HCP 抗体溶液 100 μL を各ウェルに加え、室温で■時間振とう。
8. 液を除いた後、洗浄溶液で洗浄^{<14>}。
9. ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体溶液 100 μL を各ウェルに加え、室温で■分間振とう。
10. 液を除いた後、洗浄溶液で洗浄^{<14>}。
11. 各ウェルに 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン液体基質 100 μL 添加。
12. 室温で溶液が青色に変色するまで■分間静置した後、0.5 mol/L 硫酸試液 100 μL を加えて反応を停止。
13. マイクロプレートリーダーにより波長 450 nm における吸光度を測定。

測定方法：

1. 標準溶液の各タンパク質濃度に対する吸光度の平均値を用い、4-PL 回帰により検量線を作成。
2. 検量線を用いて求めた試料溶液の宿主細胞由来タンパク質濃度の平均値から本品 1 mg タンパク質当たりの宿主細胞由来タンパク質量を求める。

システム適合性

検量線の決定係数（ R^2 値）：●以上。

各々の濃度の標準溶液における宿主細胞由来タンパク質濃度の相対標準偏差：●%以下。

試料溶液の吸光度：検量線の範囲内にある。

試料溶液の宿主細胞由来タンパク質量の相対標準偏差：●%以下。

【規格及び試験方法】

【試験名】：エンドトキシン

【規格及び試験方法】

● EU/mg 未満（比色法）^{<15>}

【規格及び試験方法】

【試験名】：微生物限度

【規格及び試験方法】

本品 10 mL 当たり、総好気性微生物数は● CFU 以下、総真菌数は● CFU 以下。

【規格及び試験方法】

【試験名】：生物活性（CDC 活性測定法）

【規格及び試験方法】

試験方法：生細胞数測定による CDC 活性測定、蛍光光度計、4-PL 回帰

規格値／判定基準：●～●%

分析方法

試験試料の調製：

試料溶液：本品に測定用培地を添加（タンパク質として■ mg/mL）。

標準溶液：ジェーピーマブ標準物質を用いて、試料溶液と同様に調製。

細胞懸濁液：

1. 凍結保存した Detect 細胞を融解。
2. 細胞溶液を遠心分離し、上澄液を吸引除去した後、測定用培地を加えて洗浄^{<14>}。
3. 1 mL 中に細胞数■×10⁵ 個になるように測定用培地を添加。

操作方法：96 ウェルのマイクロプレート 3 枚を用いる。

1. マイクロプレートの全ウェルに測定用培地 50 μL を分注。
2. 試料溶液及び標準溶液を各々3 ウェルに■ μL 分注し、順次 1 mL 中にタンパク質■ mg を含む液となるまで段階希釈する。ブランク列は操作しない。
3. マイクロプレートの全ウェルに細胞懸濁液 50 μL を分注。
4. 炭酸ガス濃度 5%の培養器内 37°Cで■分間静置した後、マイクロプレートの全ウェルに補体溶液 50 μL を分注し、更に炭酸ガス濃度 5%の培養器内 37°Cで■分間静置。
5. 静置後、レザズリン液 15 μL を全ウェルに添加し、炭酸ガス濃度 5%の培養器内 37°Cで、■時間培養。
6. 培養後、マイクロプレートリーダーを用い、励起波長 530~560 nm、測定波長 590 nm における蛍光光度を測定。

測定方法：

1. 各濃度における蛍光光度から 4-PL 回帰で解析し、標準溶液に対する試料溶液の効力比を求める。
2. プレートそれぞれから求めた効力比の幾何平均から、本品の標準物質に対する生物活性(%) を求める。

試験成立条件

標準溶液の曲線の形状：上側漸近線及び下側漸近線間に直線部分を有する S 字曲線

標準溶液の 4-PL curve の R² 値：■以上。

陰性対照の蛍光光度（ブランク列目）：下側漸近線を超えない。

標準溶液の下側漸近線に対する上側漸近線の比：■倍以上。

試料溶液の下側漸近線と標準溶液の下側漸近線の比：■~■。

試料溶液の上側漸近線と標準溶液の上側漸近線の比：■~■。

試料溶液の勾配と標準溶液の勾配の比：■~■。

それぞれの試料の効力比を自然対数変換した結果の標準偏差の幾何相対標準偏差：■%以下。

【規格及び試験方法】

【試験名】：定量法

【規格及び試験方法】

試験方法：紫外可視吸光度測定法、吸光度

タンパク質含量 (mg/mL) = $A_T / (1.38 \times I) \times \text{希釈率}$

A_T：試料溶液、280 nm

1.38：吸光係数（ジェーピーマブ 1 mg/mL 溶液の吸光度）

I：セル光路長 (cm)

分析方法

試験試料：本品を定量法緩衝液で希釈（波長 280 nm における吸光度：■~■）。

測定条件

測定波長：280 nm

対照：定量用緩衝液

【規格及び試験方法】

【試験名】：標準物質

【規格及び試験方法】

ジェーピーマブ一次標準物質

ジェーピーマブ原薬を用いて製する^{<18>}。

保管温度：●±5°C^{<1>}

ジェーピーマブ一次標準物質の規格及び試験方法^{<16>}

—以下省略—

ジェーピーマブ常用標準物質^{<17>}

必要に応じてジェーピーマブ原薬を用いて調製する^{<18>}。

保管温度：●±5°C^{<1>}

ジェーピーマブ常用標準物質の規格及び試験方法^{<16>}

—以下省略—

【規格及び試験方法】

【試験名】：試薬・試液^{<19>}

【規格及び試験方法】

2-アミノベンズアミド誘導体化試液：2-アミノベンズアミドをジメチルスルホキシド／氷酢酸混液（7：3）に溶解（50 mg/mL）。この液にシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加（63 mg/mL）。
3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン液体基質：3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンを含む溶液（■社製，製品番号XX，又は同等品）。

■ mmol/L ジチオスレイトール溶液：水1 mL中にジチオスレイトール● gを含む溶液。

■ mol/L トリス塩酸緩衝液：水1 mL中に2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール● g及びXXX■ gを含む溶液で、pH ●～●に調整する。

■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液：水1 mL中にヨードアセトアミド● gを含む溶液。

イスコフ改変ダルベッコ培地：イスコフ改変ダルベッコ液体培地（●●社製，製品番号 XXXXX，又は同等品）。

ウサギ抗HCP抗体溶液：宿主細胞由来タンパク質標準物質でウサギを免疫し、アフィニティークロマトグラフィーにて調製した抗体を、使用時にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液で希釈する。抗体は小分けして-60°C以下で保存する^{<20>}。

継代用培地：イスコフ改変ダルベッコ培地/ウシ胎児血清混液（9：1）にベンジルペニシリンカリウム 1.0×10^6 単位/mL添加ストレプトマイシン硫酸塩0.1 g（力価）/mL生理食塩液溶液を1%相当量添加し、ろ過滅菌する。

宿主細胞由来タンパク質標準物質：CHO細胞にジェーピーマブのL鎖遺伝子及びH鎖遺伝子を除いた発現プラスミドを導入した細胞の培養液から調製したタンパク質溶液。本品は小分けして-60°C以下で保存する^{<20>}。

洗浄溶液：ポリソルベート20（■社製，製品番号XX，又は同等品）のリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液（1→2000）。

測定用培地：pH■～■に調整したイスコフ改変ダルベッコ培地/1 mol/LのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸溶液/100 mg/mLウシ血清アルブミン（■社製，製品番号XX，又は同等品）溶液混液（97：2：1）。

定量法緩衝液：水1 mL中にXXX● g及びYYY■ gを含む溶液で、pH ●～●に調整する。

凍結用培地：ウシ胎児血清/ジメチルスルホキシド混液（9：1）。

非還元試料緩衝液：水1 mL中にラウリル硫酸ナトリウム● g及びXXX■ gを含む溶液で、pH ●～●に調整する。

ブロッキング溶液：リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液 1000 mL 中にウシ血清アルブミン（■社製，製品番号XX，又は同等品）● gを含む溶液。

分子量マーカー：1 バイアル中に□、△等を含むゲルろ過用分子量マーカー（●●社製，製品番号 XXXXX，又は同等品）。

ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体溶液：ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体溶液（■社製，製品番号XX，又は同等品）を、使用時にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液で希釈する。

補体溶液：ヒト補体を含む溶液（■社製，製品番号 XXXXX，又は同等品）。使用時に測定用培地で希釈する。ロット毎に試験を実施して、希釈率を決定する。

ヤギ抗 HCP 抗体溶液：宿主細胞由来タンパク質標準物質でヤギを免疫し、アフィニティークロマトグラフィーにて調製した抗体を、使用時にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液で希釈する。抗体は小分けして-60°C以下で保存する^{<20>}。

リシルエンドペプチダーゼ溶液：1 mL 中にリシルエンドペプチダーゼ● mgを含む溶液（●●

社製、製品番号 XXXXX、又は同等品)。

Detect 細胞：HS 抗原高発現細胞株 (ATCC. XXXXX)。凍結用培地に $\blacksquare \times 10^6$ 個/mL の濃度で懸濁し、凍結保存する。試験に使用する際は、細胞を融解した後、継代用培地にて $\blacksquare \sim \blacksquare$ 回の範囲で継代した細胞を用いる。

ジェーピーマブ標準物質：ジェーピーマブ常用標準物質を用いる。

PNGase F：PNGase F (●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品)。1 ユニットの単位は、国際単位である 1 IUB milliunit に等しい<21>。

SDS キャピラリー電気泳動緩衝液：ラウリル硫酸ナトリウム及び分子ふるいポリマーを含む緩衝液。

XXX 緩衝液：水 1 mL 中に塩酸グアニジン● g 及び XXX■ g を含む溶液で、pH ●～●に調整する。

【規格及び試験方法】

【試験名】：備考

【規格及び試験方法】

本規格及び試験方法は、別に規定するもののほか、日本薬局方の通則及び一般試験法を準用する。

解説

- 貯法

<1>：温度管理の実態に合わせて記載する。

- 基原

<2>：JAN において登録した内容を記載する。

- 確認試験：(1) ペプチドマップ

<3>：使用する分析カラムは、製品名を記載することが多い。

- 糖鎖プロファイル

<4>：各規格やシステム適合性で記載している詳細な糖鎖構成 (例：「フコシル化された糖鎖 (G0F、G0F-GlcNAc、G1F、G1'F、G1F-GlcNAc 及び G2F)」) は、本記載例作成の際に参考とした別紙 3 (原園ら、Vol.44, No.4, 357-361(2013) より転用) の例を基とした一例である。実際には、検出される糖鎖の種類、その溶出順序や分離は、抗体分子やその分析条件により異なり、各製品固有で最適な構成を決定する必要がある。

<5>：チャイニーズハムスター卵巣細胞では、シアル酸付加が少ないため、規格値として設定しない記載例としたが、マウス細胞を用いた場合は、必要に応じてシアル化糖鎖の規格値を設定することを考慮する必要がある。

<6>：本試料調製のように比較的複雑な手順の場合、合理化した箇条書きでの記載では手順の理解が難しいこともある。そのような場合は現状の承認書と同様の叙述形式による記載を行うことでよいが、そのような形式においても、濃度表記等の記載の合理化のコンセプトは適用可能であり、有効である。以下、叙述形式の合理化記載例：

試験試料の調製：

本品を、pH 7.2 のリン酸塩緩衝液に対する透析により脱塩を行い、pH 7.2 のリン酸塩緩衝液で希釈し、タンパク質濃度が約 \blacksquare mg/mL となるように調製する。この液 \blacksquare μ L あたり \blacksquare ユニットの PNGase F を加え、37°C で $\blacksquare \sim \blacksquare$ 時間反応させる。限外ろ過ユニット (分画分子量 \blacksquare kDa) により遊離糖鎖を精製し、減圧下で蒸発乾固する。残留物に、酵素消化反応に用いた本品タンパク質量 1 mg あたり \blacksquare μ L の 2-アミノベンズアミド誘導体化試液を加え、65°C で $\blacksquare \sim \blacksquare$ 時間加温する。反応終了後、放冷し、 \blacksquare 倍量のアセトンを加える。遠心分離・上澄液除去の操作を 2 回繰り返す、乾燥し、誘導体化糖鎖試料とする。

<7>：市販の誘導体化標準糖鎖を用いる場合には、試薬・試液の項に組成や規格等を記載する必要がある。

<8>：陰性対照については GMP での管理項目とすることを前提に、承認書に記載しない記載例とした。

<9>：日米欧三薬局方検討会議 (PDG) における一般試験法「液体クロマトグラフィー」の動

向に鑑み、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：(1) イオン交換クロマトグラフィー
<10>：pHの調整に特殊な溶液を使用しない場合は省略可能。
<11>：試験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可能。
<12>：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。
純度試験：(3) キャピラリーSDS電気泳動法（非還元条件）のシステム適合性も同様
- 純度試験：(4) 宿主細胞由来タンパク質
<13>：試験試料のタンパク質濃度で規定しても良い（“本品のタンパク質濃度が●● mg/mLになるようにブロッキング溶液を加える”等）。
<14>：洗浄回数を厳密に規定する必要がある場合は、洗浄回数を記載する。
- エンドトキシン
<15>：日局、米国薬局方又は欧州薬局方のうち、いずれの薬局方及びゲル化法、比濁法、比色法のうち、いずれの試験法によるものかを特定して記載する場合、試験方法は省略可（薬食審査発 0321 第1号）。
- 標準物質
<16>：試験項目は、原薬の試験項目に加えて特性解析（質量分析、N末端及びC末端アミノ酸配列等）を設定することも考慮する必要がある。原薬の試験項目と同じとする場合は、規格値をより厳しくする場合もある。
<17>：設定しない場合もある。
<18>：容器は安定性への影響を考慮し、必要に応じて記載する。
- 試薬・試液
<19>：試液は濃度記載とした。
<20>：更新する予定がある場合、更新基準を記載することが望ましい。
<21>：PNGase等、メーカーによりユニットの定義が異なる試薬については、同等品の検証を容易にするため、単位の定義を国際単位に合わせて記載する。

規格及び試験方法別紙

図1 アミノ酸配列

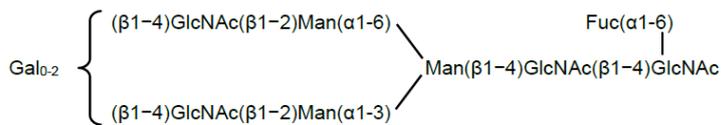
H鎖

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

L鎖

ELGMTQSPSS	VSASVGDRVT	ITCRASHSIS	TYLNWYQQKP	GKAPKLLIYA
ASSLQSGVPS	RFSGSGSGTD	FSLTINSLQP	EDFATYYCQQ	TFSPSGTFGQ
GTKVELKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	LYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEK				

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



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

C₆₅₃₆H₁₀₀₉₆N₁₇₃₆O₂₀₅₄S₄₈：147,395.62（タンパク質部分，4本鎖）

H鎖 C₂₂₅₁H₃₄₇₂N₅₉₄O₆₉₃S₁₈：50,520.39

L鎖 C₁₀₁₇H₁₅₈₀N₂₇₄O₃₃₄S₆：23,181.45

図2 ペプチドマップの代表的なクロマトグラム

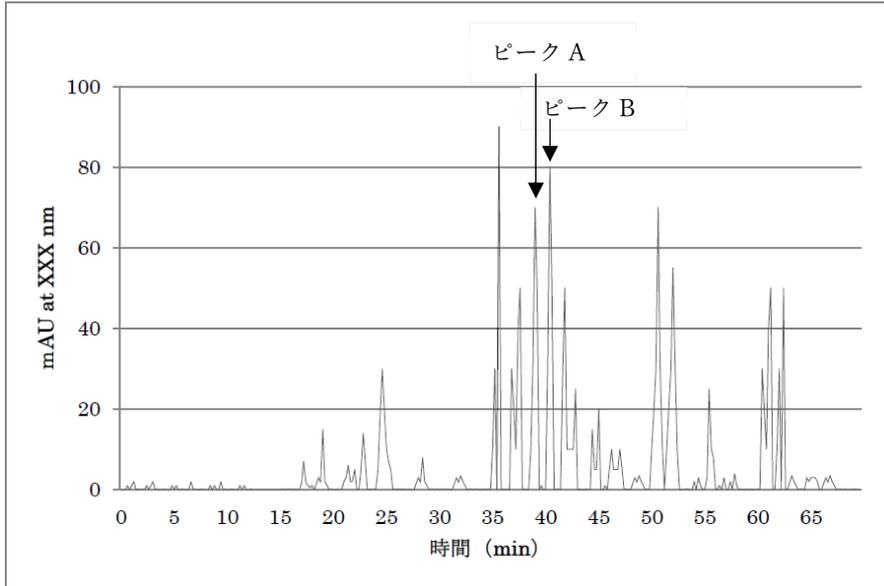


図3 イオン交換クロマトグラフィーの代表的なクロマトグラム

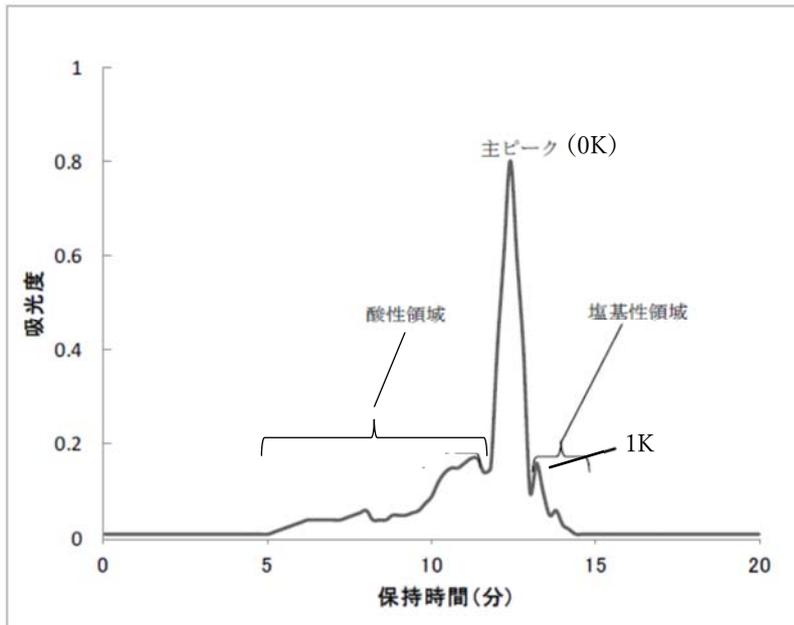
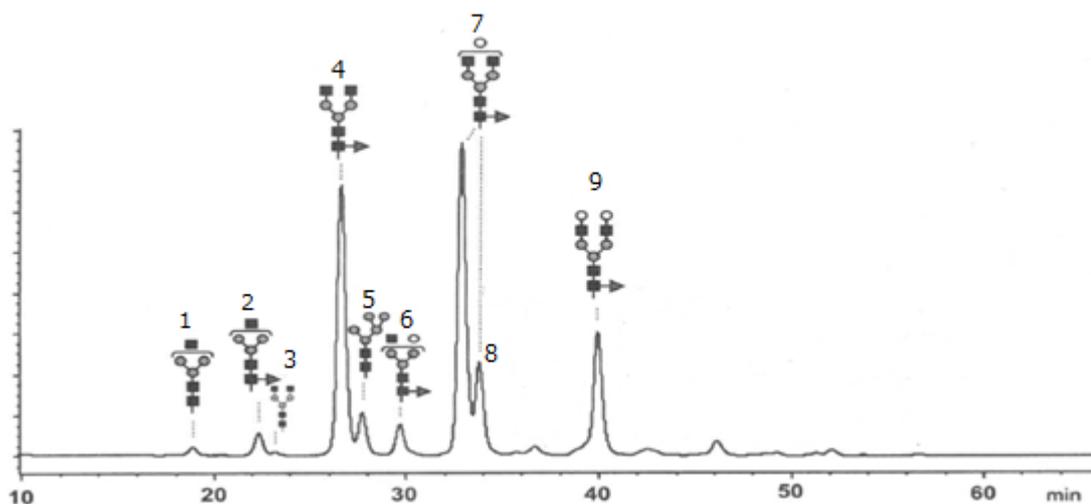


図4 糖鎖プロファイルの代表的なクロマトグラム



1: G0-GlcNAc, 2: G0F-GlcNAc, 3: G0, 4: G0F, 5: Man5, 6: G1F-GlcNAc
 7: G1F, 8: G1'F, 9: G2F

図5 サイズ排除クロマトグラフィーの代表的なクロマトグラム

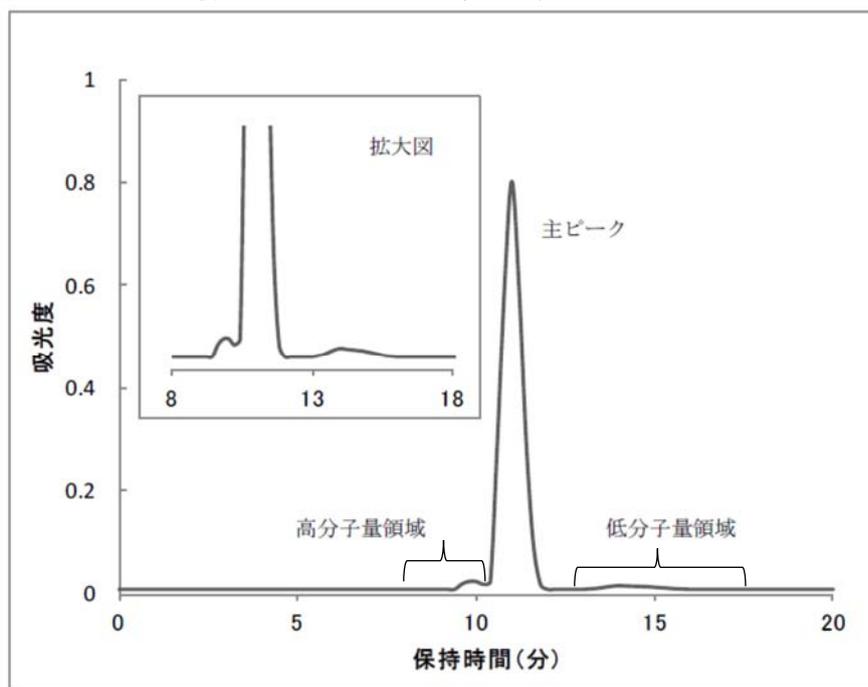
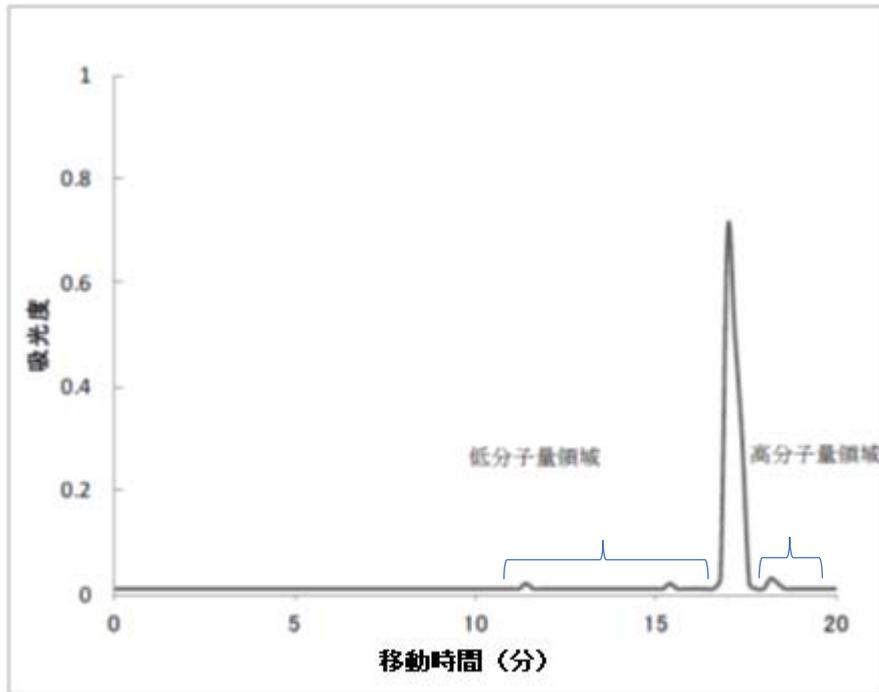


図6 キャピラリー電気泳動法（非還元）－参照エレクトロフェログラム



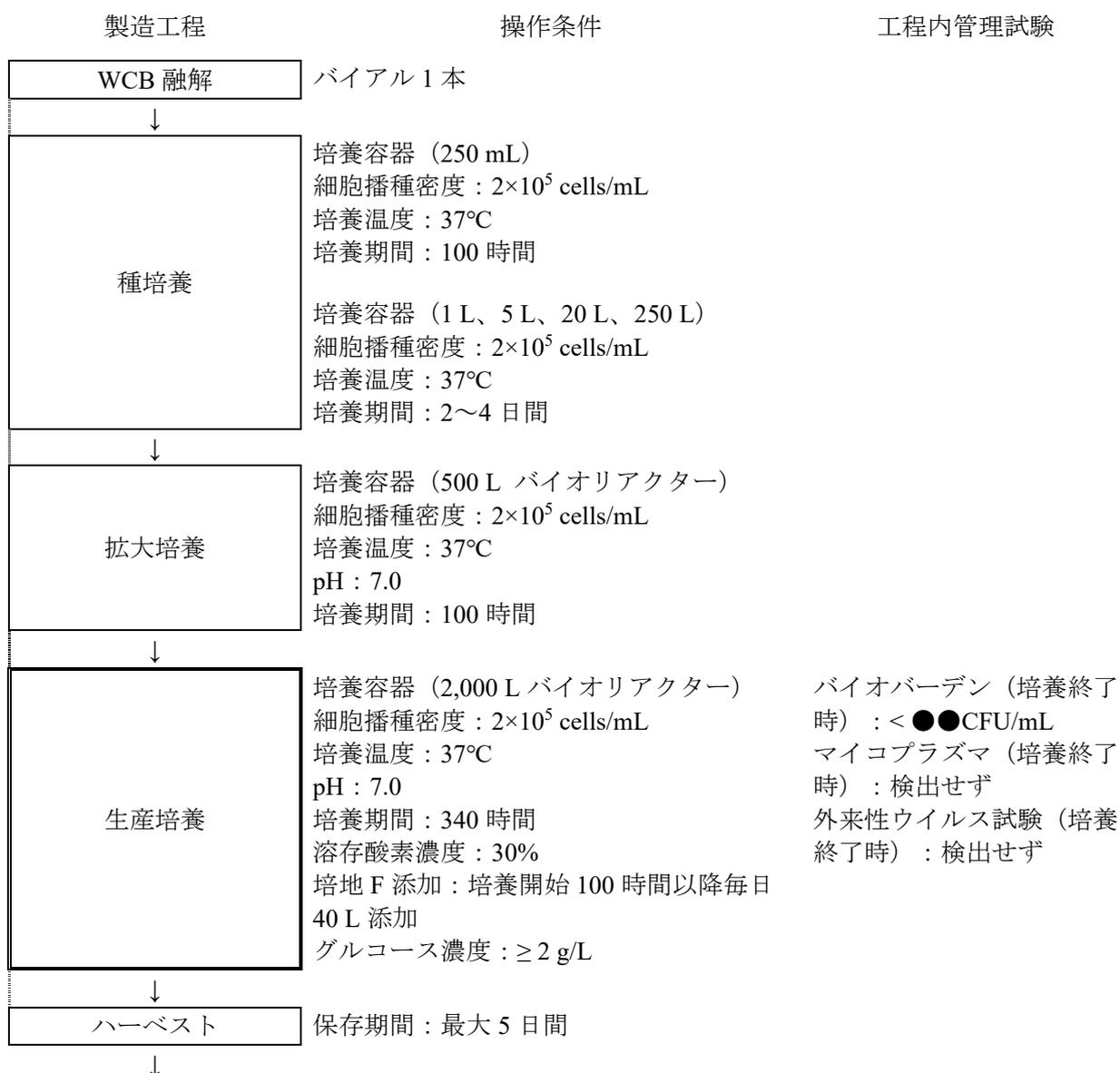
2 CTD 第2部 記載例

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、本項の記載内容は例示である。
- 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、フローチャートの記載は、例えば、1) 製造方法の概略を示す方法、2) 製造方法とほぼ同じ内容のフローチャートとする方法、3) 製造方法よりもフローチャートにより詳細を記載する方法等、多くの選択肢があるが申請者が判断すれば良い。本項では2) の記載例を示した。

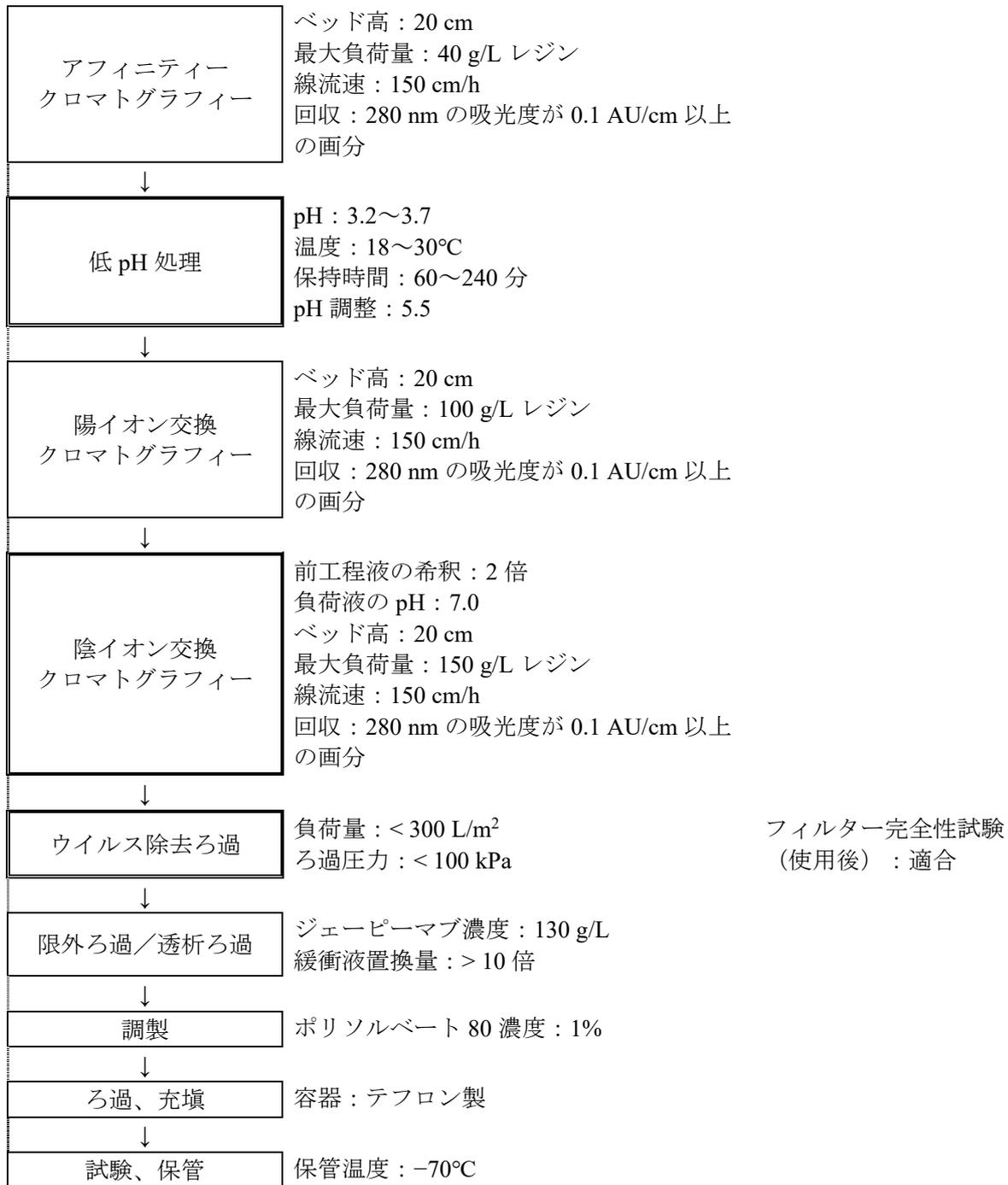
1. 製造フローチャート



製造工程

操作条件

工程内管理試験



解説 (製造フローチャート)

- 重要工程は二重線枠で表示した。

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。商業用原薬のロット・ナンバリング・システムが申請時に未確定の場合もありえるが、そのような場合は未定と記載する。

3. 製造方法

编者注

- 工程で管理する工程パラメータは、ICHガイドラインや通知で求めているパラメータ以外は製品毎、申請者毎にそれぞれ異なると考えられる。本モックアップの工程パラメータの項目や数値（例：培養期間）は記載例であり、推奨項目・推奨値ではない。

ジェーピーマブの製造方法を以下に示す。

製造工程で使用する培地の組成は表 2.3.S.2.3-5 に、緩衝液の組成は表 2.3.S.2.3-6 に示す。

1) WCB 融解

凍結保存されている WCB のバイアル 1 本を融解する。

2) 種培養

融解した WCB の細胞を細胞播種密度が『 2×10^5 cells/mL』となるように培地 A を含む“250 mL”培養容器に加え、『37°C』で『100 時間』培養する。この培養液を同様に、容量“1 L”、“5 L”、“20 L”、“250 L”の培養容器を用いて、順次、『37°C』で『2~4 日間』培養する。

3) 拡大培養

前工程で得た培養液を細胞播種密度が『 2×10^5 cells/mL』となるように培地 A を含む“500 L”バイオリアクターに加え、『37°C』で『100 時間』培養する。培養中は培養液の pH が『7.0』となるよう、必要に応じて CO₂ ガスや水酸化ナトリウム溶液を加える。

4) 生産培養

前工程で得た培養液を細胞播種密度が『 2×10^5 cells/mL』となるように培地 B を含む 2,000 L バイオリアクターに加え、『37°C』、溶存酸素濃度『30%』で『340 時間』培養する。培養中は培養液の pH が『7.0』となるよう、必要に応じて CO₂ ガスや水酸化ナトリウム溶液を加える。また、グルコース濃度が『2 g/L』を下回らないようにグルコース溶液を添加する。培養開始『100 時間』以降、培地 F を毎日『40 L』添加する。消泡剤（製品名***又は同等品）を適宜添加する。

MCB 融解から生産培養終了までの継代数は●●以内である。

【工程内管理試験 1（培養終了時、未加工／未精製バルク）】

- (1) バイオバーデン：●●CFU/mL 未満
- (2) マイコプラズマ否定試験（培養法；欧州薬局方）：検出せず
- (3) 外来性ウイルス試験（指示細胞（MRC-5、Vero 及び CHO 細胞））：検出せず

5) ハーベスト

前工程で得た培養液をハーベストし、デプスフィルターでろ過して細胞を分離し、回収した液を精密ろ過フィルターでろ過する。得られた液の保存期間は最大“5 日間”とする。

6) アフィニティークロマトグラフィー

前工程液をベッド高『20 cm』のプロテイン A アフィニティークラム（JP-ProA Fast 又は同等品）

にジェーピーマブをレジン 1 L あたり《40 g》以下となるよう負荷する。緩衝液 1 で洗浄した後、緩衝液 2 で溶出し、280 nm の吸光度を連続的に確認し、目的物質を含む範囲（A280 = 《0.1 AU/cm》以上）を回収する（線流速『150 cm/h』）。

7) 低 pH 処理

前工程液を塩酸及び水酸化ナトリウム溶液で pH 3.2～3.7 に調整し、18～30℃で 60～240 分間保持する。水酸化ナトリウム溶液で pH を『5.5』に調整する。

8) 陽イオン交換クロマトグラフィー

前工程液を、緩衝液 3 で平衡化したベッド高《20 cm》の陽イオン交換カラム（JP-CEX High 又は同等品）にジェーピーマブをレジン 1 L あたり《100 g》以下となるよう負荷する。緩衝液 3 で洗浄した後、緩衝液 4 で溶出し、280 nm の吸光度が《0.1 AU/cm》以上の画分を取得する（線流速『150 cm/h』）。

9) 陰イオン交換クロマトグラフィー

前工程液を注射用水で『2 倍』に希釈し、pH を『7.0』に水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整した後、緩衝液 5 で平衡化したベッド高《20 cm》の陰イオン交換カラム（JP-AEX Ultra 又は同等品）にジェーピーマブをレジン 1 L あたり《150 g》以下となるように通液し、続けて緩衝液 5 を通液し（線流速『150 cm/h』）、280 nm の吸光度が《0.1 AU/cm》以上の画分を取得する。

10) ウイルス除去ろ過

前工程液をウイルス除去フィルター（Viral Block JP 20 又は同等品）でろ過する（負荷量 300 L/m² 未満、ろ過圧 100 kPa 未満）。

【工程内管理試験 2】使用後のウイルス除去フィルターの完全性試験に適合する

11) 限外ろ過／透析ろ過

前工程液を、限外ろ過膜（分画分子量“30,000”）でジェーピーマブ濃度が『130 g/L』となるまで濃縮し、濃縮液をその『10 倍』を超える量の緩衝液 6 で透析ろ過置換する。

12) 調製

前工程液に《50%》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《1%》とする。

13) ろ過、充填

前工程液を“0.2 μm”のろ過膜でろ過し、テフロン製容器に充填する。

14) 試験、保管

ジェーピーマブ原薬の試験を行う。原薬は《-70℃》で保管する。

解説（製造方法全体）

- 工程名や機器の名称は、本モックアップの用語にこだわらず申請者が決めた用語を用いることで良い。ただし、局方やICHガイドライン等の公的な文書で使用されている用語については、その使用が望ましい。
- 本モックアップでは、製造方法について承認申請書と同一の記載としている。現行、各社様々な記載事例があるが、一部変更承認申請対象事項・軽微変更届出対象事項の記号を含む製造方法の記載は審査上の大きな論点の一つであることから、承認申請書と同一の記載とすることにより、審査が円滑に進むことが期待される。
- 本モックアップは社内管理の工程パラメータは記載しない記載例である。

解説（培養）

- 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2.3.S.2.3項に記載した。
- 設備のスケールは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等、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）。

- 製造用細胞の安定性について、本モックアップでは*in vitro*細胞齢の上限（MCBの融解から生産培養終了までの継代数で規定）を超えない管理をした例を示す。製造所の管理実態に合わせてWCBの融解からの日数や継代数等を規定する方法もある。
- 拡大培養における生細胞率は、本モックアップでは品質への影響が低い例として社内管理の工程パラメータとし、本項には記載しなかった。
- 生産培養で添加するものは消泡剤も含めすべて記載している。
- マイコプラズマ否定試験について、本モックアップは欧州薬局方に従って実施した場合の記載例である。日局参考情報や生物学的製剤基準等の他の公定書に従って実施する場合もある。
- ハーベストで得られた液等の工程中間体の管理方法（保存期間の設定等）は申請者が品質等への影響を評価・判断し必要に応じ記載する。本モックアップではハーベスト溶液の保存期間を最大5日間と規定して記載した。保存温度が品質に影響する場合は保存温度も記載する。

解説（精製）

- クロマトグラフィーのレジンの種類について、本モックアップでは「[商品名] 又は同等品」と記載した。
- クロマトグラフィー・カラムの高さは、平均的なベッド高さを記載するケース等があり、各申請者が判断すれば良い。
- クロマトグラフィー・カラムへの負荷量は、本モックアップでは「ジェーピーマブをレジン1Lあたり●g以下」と記載したが、厳密にはジェーピー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における分取条件について、本モックアップはパラメータを吸光度とする記載例であるが、カラム容量等を指標にした分取もある。
- 本モックアップでは、アフィニティークロマトグラフィーのクロマトグラフィー・カラムの平衡化や使用後のクロマトグラフィー・カラムの洗浄に関わるパラメータを社内管理の工程パラメータとし、本項には記載しなかった。Module 3にこれらのパラメータの詳細やパラメータの品質への影響評価を記載している前提である。
- 本モックアップの低pH処理の工程パラメータは、リスクマネジメントにおいて温度、pH、時間を幅で管理すると定めた場合の記載例である。
- 本モックアップの陰イオン交換クロマトグラフィーはフロースルーモードの記載例である。
- 本モックアップではウイルス除去ろ過で用いるウイルス除去フィルターの製品名を記載した。
- 本モックアップでは低pH処理、陰イオン交換クロマトグラフィー及びウイルス除去ろ過をウイルスクリアランスに寄与する工程とした。カラム樹脂の使用回数は実施されたウイルスクリアランス試験の結果に基づき必要に応じて規定する。
- 限外ろ過膜による濃縮の終点は、本モックアップでは濃度で規定したが、濃縮度（●●倍）で規定する場合もある。
- 本モックアップでは緩衝液置換量はダイアフィルトレーション法で実施した時の緩衝液の添加量を意味する。
- 1つの工程プール液を分割して精製する場合について、本モックアップでは社内管理の範囲とし、手順を記載しなかった。
- 工程内管理試験の判定基準の不等号の向きを、許容範囲側、ロットアウト側のいずれにするかは申請者の考え方に従う。
バイオバーデン： ●●CFU/mL未満（許容）、以上（ロットアウト）
- 本モックアップでの充填前のろ過は、無菌ろ過ではなく、重要な工程ではない。

4. 再加工

ウイルス除去ろ過工程で、ウイルス除去フィルターの完全性が確認できなかった場合には、再ろ過を行う。

解説（再加工）

- 本モックアップでは再加工を実施する例を示した。再加工については、既に承認申請書に記載されている事項であり、あらためて追記を求めるものではないとされているため、3項の製造方法（承認申請書と同一記載）には記載せず、本項にて記載している。

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、各申請者が 2.3.S.2.2 項もしくは 2.3.S.2.3 項に記載すればよい。
- MCB 及び WCB の製造過程で使用した培地について、培地組成（成分・濃度）の詳細情報の記載は必須ではないが、使用した培地を特定し、本項に記載する。WCB 融解以降の製造に使用される培地については培地組成（成分・濃度）を承認申請書及び本項に記載する。
- 培地の供給業者が組成を開示していない場合等、培地組成（成分・濃度）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。
- 製造工程においてシングルユースシステムを利用する場合は、シングルユース製品であることが分かるように本項に製品名等を記載することが望ましい。材質の記載はリスクベースで判断し、必要に応じて承認申請書及び 2.3.S.2.2 項に記載する。

ジェーピー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 A (JP-Media A)	培養工程	供給元規格
基礎培地B	培養工程	供給元規格
基礎培地F	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
・・・	・・・	・・・
JP2000 シングルユースリアクター	培養工程	供給元規格
塩化ナトリウム	精製工程	供給元規格
水酸化ナトリウム	精製工程	供給元規格
塩酸	精製工程	米国／欧州薬局方
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水和物	精製工程	医薬品添加物規格
塩化ナトリウム	精製工程	日本薬局方
JP-ProA Fast	精製工程	供給元規格
JP-CEX High	精製工程	供給元規格
JP-AEX Ultra	精製工程	供給元規格
・・・	・・・	・・・
ポリソルベート80	精製工程（調製工程）	日本薬局方
注射用水	精製工程（調製工程）	日本薬局方

培養工程で使用される培地及び精製工程で使用される緩衝液の組成は、表2.3.S.2.3-2～表2.3.S.2.3-6 に示す。

表2.3.S.2.3-2 基礎培地 A の組成

成分	配合量
...	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地A ■■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 B の組成

成分	配合量
...	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地B ■■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 F の組成

成分	配合量
...	■■ g
...	...
...	...

(基礎培地F ■■g を水 1 L に溶解したときに含まれる組成)

表 2.3.S.2.3-5 培地の組成

培地名	成分	濃度
培地 A	基礎培地 A	■■ g/L
	...	■■ mg/L
	...	■■ mg/L
培地 B	基礎培地 B	■■ g/L
	遺伝子組換えインスリン	■■ μg/L
	...	■■ mg/L
	...	■■ mg/L
	...	■■ mg/L
培地 F	基礎培地 F	■■ g/L
	...	■■ mg/L
	...	■■ mg/L

表 2.3.S.2.3-6 緩衝液の組成

名称	組成
緩衝液 1	《200 mmol/L》塩化ナトリウム含有『20 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 5.5』
緩衝液 2	『20 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 3.0』
緩衝液 3	『50 nmol/L』リン酸緩衝液、『pH 6.5』
緩衝液 4	《300 mmol/L》塩化ナトリウム含有『50 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 6.5』、導電率『25 mS/cm』
緩衝液 5	『100 mmol/L』塩化ナトリウム含有『50 mmol/L』リン酸緩衝液、『pH 7.0』、導電率『20 mS/cm』
緩衝液 6	《100 mmol/L》塩化ナトリウム含有《50 mmol/L》リン酸緩衝液、『pH 7.0』

解説（原薬の製造に使用される原材料）

- 表 2.3.S.2.3-1 には 2.3.S.2.2 項に記載した製造工程に関わる原材料を記載した。
- 本モックアップでは、2,000L バイオリアクターはシングルユースシステムを利用する例とした。
- 培地成分や緩衝液成分について、本モックアップでは濃度で表記したが、調製用タンクへの投入量（単位 g、L 等）で表記することも可能である。

2. 生物起源の原材料の管理

编者注：

- ヒト又は動物に由来する原材料を使用した場合は本項に記載する。詳細は 2.3.A.2 項に記載する。
- 本項の記載にあたり、生物由来原料基準（厚生労働省告示第 210 号、平成 15 年 5 月 20 日）、「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）等を参照する。

MCB や WCB の調製時を含め、ジェーピーマブ原薬の製造工程では宿主細胞以外の生物起源の原材料は使用していない。

解説（生物起源の原材料の管理）

- 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、本項には記載していない。
- 本モックアップでは宿主細胞以外のヒト又は動物に由来する原材料を使用していない例を示す。
- 製造工程においてヒト又は動物に由来する原材料を使用する場合の記載例を以下に示す。
（例）ジェーピーマブ原薬の製造工程で使用される原材料のうち、宿主細胞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り、生物由来原料基準（厚生労働省告示第 210 号、平成 15 年 5 月 20 日制定）に適合している。
ブタペプトン（原薬製造の培養工程の培地成分）
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（ウイルス等）を不活化するのに十分と考えられる。
なお、反芻動物由来原料の使用にあたっては、反芻動物由来原料特有の各種通知が発出されているため、最新の通知を参照して記載する。

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 JP 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を作製した。ハイブリドーマの mRNA からヒト JP 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。

ジェーピー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。別にジェーピー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■●を作製した。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。

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、ジェーピーマブの重鎖並びに軽鎖をコードする遺伝子の塩基配列を図 2.3.S.2.3-2 並びに図 2.3.S.2.3-3 に示す。

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巣由来の細胞株 CHO-XXX 株であり、■■から入手し、無血清培地に馴化した細胞である。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) MCB作製用細胞株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、■■を含まない無血清培地で培養し、遺伝子導入細胞を選択した。次に、遺伝子増幅のために MTX を含む無血清培地を用いて培養を行い、ジェーピーマブの産生量を指標として、細胞を選択した。ここで選択した細胞株 YYY を●●法でクローニングし、MCB 作製用細胞株 ZZZ を得て、●%の DMSO を含む無血清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) MCBロット●●の調製

MCB 作製用細胞株 ZZZ を、培地 A を用いて 37°C で培養した。拡大培養後、遠心分離し、●%の DMSO を含む培地 A (凍結用培地) に懸濁し、約● $\times 10^7$ 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し、凍結して、●●●本の MCB (ロット●●) を調製した。MCB は液体窒素の気相で保存する。

2) WCBロット▲▲の調製

MCB (ロット●●) を、培地 A を用いて 37°C で培養した。拡大培養後、遠心分離し、●%の DMSO を含む培地 A (凍結用培地) に懸濁して約● $\times 10^7$ 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 1 mL ずつ分注し、凍結して、●●●本の WCB (ロット▲▲) を調製した。

WCB は液体窒素の気相で保存する。

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●●) の特性解析試験及び純度試験の結果を表 2.3.S.2.3-7 及び表 2.3.S.2.3-8 に示す。

表 2.3.S.2.3-7 MCB ロット●●の特性解析試験の結果

試験項目	試験方法	試験結果
塩基配列	核酸増幅物について、ジェーピーマブ遺伝子の塩基配列を確認する	期待されるジェーピー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	予想されるサイズのバンドを認めた
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 (由来細胞の確認)	アイソザイムの電気泳動パターンを評価する	チャイニーズハムスター由来細胞のパターンと一致した

表 2.3.S.2.3-8

MCB ロット●●の純度試験の結果

試験項目	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（培養法・DNA染色法；欧州薬局方）	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 ⁺ L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、乳飲みマウス）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.2.3-9 に示す。

表 2.3.S.2.3-9

WCB ロット▲▲の特性解析試験及び純度試験の結果

試験項目	試験方法	試験結果	
確認試験（由来細胞の確認）	アイソザイムの電気泳動パターンを評価する	チャイニーズ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（培養法・DNA染色法；欧州薬局方）	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	<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、乳飲みマウス）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 2.3.S.2.2 項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 の特性解析試験及び純度試験の結果を表 2.3.S.2.3-10 及び表 2.3.S.2.3-11 に示す。

表 2.3.S.2.3-10 CAL の特性解析試験の結果

試験項目	試験方法	試験結果
塩基配列	核酸増幅物について、ジェーピーマブ遺伝子の塩基配列を確認する	期待されるジェーピー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	予想されるサイズのバンドを認めた
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	チャイニーズハムスター由来細胞のパターンと一致した

表 2.3.S.2.3-11 CAL の純度試験の結果

試験項目	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 (培養法・DNA 染色法；欧州薬局方)	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 ⁺ L 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、乳飲みマウス) 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 (セル・バンクの特性解析試験及び純度試験)

- 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) 及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。
- 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) 及び両指向性 (amphotropic) が知られる。本モックア

ップでは異種指向性及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⁺L細胞を用いた感染性試験を示した。

- 逆転写酵素活性：Mg⁺⁺依存性とMn⁺⁺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⁺⁺依存性逆転写酵素活性が陽性を示すことがあるので得られた結果を報告する。
- 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*試験の記載例を示したが、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：PCR法）を使用することもできる。
- 確認試験（細胞由来）：本モックアップでは初めのMCB/WCBロット及びCALではアイソザイム試験を、WCB更新時（下記の5）セル・バンクの更新方法参照）は別の試験法を使用する記載例とした。なお、ICH Q5Dガイドライン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使用可能である。

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

ジェーピー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塩基配列、DNA の挿入・欠失、DNA コピー数を調べた結果、表 2.3.S.2.3-10 に示すとおり、期待された塩基配列が確認され、MCB と同等の DNA コピー数が認められた。従って、ジェーピー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、以下に示す試験を実施し、適格性を判断する。

試験項目及び判定基準

- ・細胞の生存率：○%以上を確認する。

5) セル・バンクの更新方法

MCB については、現時点で更新予定はない。

WCB は必要に応じて更新し、WCB の調製方法は WCB ロット●●の調製方法に準ずる。調製した WCB は表 2.3.S.2.3-12 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.2.3-12 WCB 更新時の特性解析試験及び純度試験

試験項目		判定基準
確認試験（由来細胞の確認）		チャイニーズハムスター由来細胞であることを確認する
無菌試験（日本薬局方）		陰性
マイコプラズマ否定試験（培養法・DNA 染色法；欧州薬局方）		検出しない
ウイルス試験	<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、乳飲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

2.3.S.2.4 重要工程及び重要中間体の管理

1. 重要工程

以下の工程を重要工程に設定した。

- 生産培養：ジェーピーマブを産生させる培養工程であるため。
- 低pH処理：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ため。
- 陰イオン交換クロマトグラフィー：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ため。
- ウイルス除去ろ過：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ため。

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 原薬製造工程の工程内管理試験

対象工程	試験項目	許容基準
生産培養（培養終了時、未加工／未精製バルク）	バイオバーデン	●●CFU/ mL 未満
	マイコプラズマ否定試験（培養法・DNA 染色法；欧州薬局方）	検出せず
	外来性ウイルス試験（指示細胞：MRC-5、Vero 及び CHO 細胞）	検出せず
ウイルス除去ろ過	ウイルス除去フィルターの完全性試験	適合する

解説（重要工程及び重要中間体の管理）

- 重要工程の設定の考え方は申請者毎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（生産培養）、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（低 pH 処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、ウイルス除去ろ過）を重要工程と設定した記載例を示した。
- 本モックアップでは、工程内管理試験は生産培養工程とウイルス除去ろ過工程に設定した。工程内管理試験は申請者が品質等への影響及び必要性を評価・判断し設定する。工程内管理試験とはせず、原薬規格として管理する方法もある。
- 本モックアップは重要中間体がない場合の記載例である。重要中間体がある場合は当該工程及び中間体の名称を記載すると共に、重要中間体と判断した理由、品質及び管理方法（工程内管理試験、保管条件及び安定性評価結果等）を示す。

2.3.S.2.6 製造工程の開発の経緯

编者注

- 本項には ICH M4Q ガイドラインで 2.3.S.2.6 項に記載を求められている原薬ロットに関する事項、製造プロセスの変更内容、製法変更前後の同等性／同質性の評価について記載する。なお、参考として、承認申請書に記載した原薬製造工程に至るまでの開発経緯の重要品質特性、工程特性解析等も記載した。
- 同等性／同質性評価における試験項目については、規格試験及び特性解析試験の中から品質の変化を鋭敏に捉えられる試験を選択する。原薬の特性や変更の内容を踏まえ、変更の品質への影響を多面的に評価することが重要である。
- 同等性／同質性評価では各種試験の分析結果に加えて、安定性評価、非臨床試験等を併せて、同等性を評価するケースもある。
- 同等性／同質性評価に使用されるロットに関しては、開発初期から開発後期までの幅広いロットが含まれる場合がある。そのため、評価したロット毎に、試験項目に違いが生じることが想定され、すべてのロットに対して画一的な評価が実施できないケースがある。

1. 開発の経緯

ジェーピーマブ原薬の開発においては、商業用生産並びに処方を確立するため、〇〇から購入した CHO-XXX 細胞株を宿主細胞として、目的遺伝子の導入、セル・バンクの作製、製造プロセス（培養工程、精製工程）の検討、製造スケールの変更及び製造場所の変更とこれらに伴う製造プロセスの最適化が実行された。開発した原薬製造プロセスの概要並びに主なプロセスの変更内容を表 2.3.S.2.6-1 に示す。

表 2.3.S.2.6-1 開発した原薬製造プロセス並びに主なプロセス変更の内容

パラメータ	プロセス A	プロセス B	プロセス C
生産培養スケール	500 L	2,000 L	2,000 L
製造場所	製造所 A	製造所 B	製造所 C
用途	非臨床	臨床試験第 I 相、第 II 相、非臨床	臨床試験第 III 相、商業用、非臨床
セル・バンク	MCB	WCB	WCB
拡大培養 培養容器	100 L プラスチック製 バック	500 L バイオリアクター	500 L バイオリアクター
生産培養 培養容器	500 L バイオリアクター	2,000 L シングルユース バイオリアクター	2,000 L シングルユース バイオリアクター
アフィニティークロマト グラフィー レジソ	レジソ A	JP-ProA Fast	JP-ProA Fast
陰イオン交換クロマトグ ラフィー 線流速	X cm/h	X cm/h	150 cm/h
ウイルス除去フィルター 面積	X m ²	Y m ²	Y m ²
XXX

2. 原薬の同等性／同質性評価

ジェーピーマブ原薬製造における製造プロセス等の変更に伴う品質への影響を評価するため、表 2.3.S.2.6-2 に示す試験項目に基づき、同等性／同質性評価を実施した。また、試験に使用したロット及び試験の結果を表 2.3.S.2.6-3 に示す。試験の結果から、製造プロセス等の変更は原薬の品質に影響を与えず、これら変更前後の原薬の品質は同等／同質であると判断した。

表 2.3.S.2.6-2 原薬の同等性／同質性評価の試験項目

試験項目
性状
確認試験 (ペプチドマップ)
確認試験 (イオン交換クロマトグラフィー)
pH
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)
純度試験 (サイズ排除クロマトグラフィー)
純度試験 (キャピラリーSDS 電気泳動法 (非還元条件))
純度試験 (宿主細胞由来タンパク質)
エンドトキシン (JP 比色法)
微生物限度
生物活性 (CDC 活性測定法)
定量法 (タンパク質含量)
キャピラリー等電点電気泳動法
キャピラリーSDS 電気泳動法 (還元条件)
宿主細胞由来 DNA
残留プロテイン A
フリーチオール基含量
Binding ELISA
単糖組成分析
フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法
• • •

表 2.3.S.2.6-3 原薬の同等性／同質性評価の試験結果

製造ロット	ロット A	ロット B	ロット C	ロット D
製造スケール	500 L	2,000 L	2,000 L	2,000 L
製造プロセス	プロセス A	プロセス B	プロセス C	プロセス C
製造場所	製造所 A	製造所 B	製造所 C	製造所 C
製造日	XXX	YYY	ZZZ	WWW
用途	非臨床	臨床試験第 I 相、第 II 相、 非臨床	非臨床（エンジニアリン グバッチ）	臨床試験第 III 相
結果				
性状	・・・	・・・	・・・	・・・
確認試験（ペプチドマップ）	・・・	・・・	・・・	・・・
確認試験（イオン交換クロマトグラフィー）	・・・	・・・	・・・	・・・
pH	・・・	・・・	・・・	・・・
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）	・・・	・・・	・・・	・・・
純度試験（サイズ排除クロマトグラフィー）	・・・	・・・	・・・	・・・
純度試験（キャピラリーSDS 電気泳動法 （非還元条件））	・・・	・・・	・・・	・・・
純度試験（宿主細胞由来タンパク質）	・・・	・・・	・・・	・・・
エンドトキシン（JP 比色法）	・・・	・・・	・・・	・・・
微生物限度	・・・	・・・	・・・	・・・
生物活性（CDC 活性測定法）	・・・	・・・	・・・	・・・
定量法（タンパク質含量）	・・・	・・・	・・・	・・・
キャピラリー等電点電気泳動法	・・・	・・・	・・・	・・・
キャピラリーSDS 電気泳動法（還元条件）	・・・	・・・	・・・	・・・
宿主細胞由来 DNA	・・・	・・・	・・・	・・・
残留プロテイン A	・・・	・・・	・・・	・・・
フリーチオール基含量	・・・	・・・	・・・	・・・
Binding ELISA	・・・	・・・	・・・	・・・
単糖組成分析	・・・	・・・	・・・	・・・
フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法	・・・	・・・	・・・	・・・
・・・	・・・	・・・	・・・	・・・

解説（同等性／同質性）

- 同等性／同質性評価における試験項目として、本モックアップでは、規格試験法に加えて特性解析を実施した例を記載した。

3. 原薬の品質管理戦略

ジェーピーマブ原薬の品質及び原薬製造プロセスの稼働性能を保証するため、以下に示すようにジェーピーマブ原薬に関する品質管理戦略を策定した。

まず安全性及び有効性に与える影響を考慮したリスクベースアプローチにより原薬の重要品質特性（Critical Quality Attribute、CQA）を選定し、次に過去の製造実績をもとに各製造工程におけるプロセス性能指標の設定を行った。製造工程中の各工程パラメータについて工程特性解析を行い、各製造工程の CQA 及びプロセス性能指標に与える影響を評価することで、各工程パラメータの重要度、並びにその許容範囲を設定した。

1) 重要品質特性の選定

ジェーピーマブ原薬に要求される品質を維持するために、原薬製造工程で適切な範囲で管理すべき CQA を、安全性及び有効性に与える影響を考慮したリスクベースアプローチにより選定した。選定された CQA 及び管理戦略を表 2.3.S.2.6-4 に示す。

表 2.3.S.2.6-4 原薬の CQA 及び管理戦略

CQA	管理戦略
宿主細胞由来タンパク質	規格及び試験方法、製造方法
宿主細胞由来 DNA	プロセス・バリデーション／プロセス評価、製造方法
残留プロテイン A	プロセス・バリデーション／プロセス評価
工程由来不純物 X	プロセス・バリデーション／プロセス評価
凝集体	規格及び試験方法、製造方法
低分子量成分	規格及び試験方法、製造方法
チャージバリエーション	規格及び試験方法、製造方法
糖鎖プロファイル	規格及び試験方法、製造方法
生物活性	規格及び試験方法、製造方法
含量	規格及び試験方法、製造方法
エンドトキシン	規格及び試験方法、原材料、製造方法
バイオバーデン	工程内管理、規格及び試験方法、製造方法、原材料
外来性ウイルス	工程内管理、製造方法、原材料
マイコプラズマ	工程内管理、原材料
.....

<CQA の管理戦略>

- 規格及び試験方法：原薬規格試験で管理する。
- プロセス・バリデーション／プロセス評価：PPQ（Process Performance Qualification）製造で恒常性の評価を完了する。商業用生産では管理しない。
- 工程内管理：商業用生産の工程内で管理する。
- 製造方法：製造工程パラメータを適切に管理する。
- 原材料：原材料（セル・バンク含む）で管理する。

2) 工程特性解析

ジェーピーマブ原薬の製造プロセスの頑健性を評価し、工程パラメータの CQA 及びプロセス性能指標への影響度と許容範囲を設定するために工程特性解析を実施した。初めに、欠陥モード影響解析等によるリスクアセスメントを実施し、評価する工程パラメータを選定した。選定された工程パラメータに対して通常の工程操作範囲の外側に解析範囲を設定し、その範囲で工程パラメータが変動したときに、CQA 及びプロセス性能指標に与える影響を評価した。工程解析試験は、一時一事法 (One factor at a time) や複数パラメータを組み合わせた実験計画法 (Design of Experiments) 等の手法を用いて実施した。得られた工程特性解析の結果より、各工程パラメータの重要度の判定及び許容範囲の設定を行った。

- 培養工程

培養工程（種培養、拡大培養、生産培養及びハーベスト）における工程パラメータと CQA 及びプロセス性能指標の関係を表 2.3.S.2.6-5 に示す。

表 2.3.S.2.6-5 工程パラメータと CQA 及びプロセス性能指標の関係

工程	工程パラメータ	分類 ¹	解析範囲 (許容範囲)	CPP とした／しなかった理由
種培養	細胞播種密度	-	○-○ (△-△)	プロセス性能指標（細胞増殖）に影響し、以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しないため、CPP としなかった。
	培養温度	-	○-○ (△-△)	同上
	培養期間	-	○-○ (△-△)	同上
拡大培養	細胞播種密度	-	○-○ (△-△)	同上
	培養温度	-	○-○ (△-△)	同上
	pH	-	○-○ (△-△)	同上
	培養期間	-	○-○ (△-△)	同上

1 :- は CPP ではないことを示す

表 2.3.S.2.6-5 工程パラメータと CQA 及びプロセス性能指標の関係 (続き)

工程	工程パラメータ	分類 ¹	解析範囲 (許容範囲)	CPP とした/しなかった理由
生産培養	細胞播種密度	-	○-○ (△-△)	プロセス性能指標 (細胞増殖) に影響し、以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しないため、CPP としなかった。
	培養温度	CPP	○-○ (△-△)	CQA (チャージバリエーション、糖鎖プロファイル) に影響するため CPP とした。
	pH	CPP	○-○ (△-△)	CQA (チャージバリエーション) に影響するため CPP とした。以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しない。また、逸脱の検討結果から、pH ●-●の範囲で短時間 (○時間未満) の逸脱は許容できる。
	培養期間	CPP	○-○ (△-△)	CQA (生物活性、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA、凝集体) に影響するため CPP とした。以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しない。○-○時間の範囲内では CQA に影響しない。
	溶存酸素濃度	-	○-○ (△-△)	プロセス性能指標 (細胞増殖) に影響するが、以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しないため、CPP としなかった。
	グルコース濃度	-	○-○ (△-△)	プロセス性能指標 (細胞増殖) に影響するが、以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しないため、CPP としなかった。
	培地 F 添加開始タイミング	CPP	○-○ (△-△)	CQA (チャージバリエーション、糖鎖プロファイル) に影響するため CPP とした。以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しない。○-○の範囲内では CQA に影響しない。
	1 回あたりの培地 F 添加量	CPP	○-○ (△-△)	CQA (チャージバリエーション、糖鎖プロファイル) に影響するため CPP とした。以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しない。○-○の範囲内では CQA に影響しない。
ハーベスト	保存期間	CPP	最大○日 (△日以内)	CQA (生物活性、凝集体) に影響するため CPP とした。以降の工程が適切に管理された場合、CQA に影響しない。○日以内では CQA に影響しない。

1: - は CPP ではないことを示す

● 精製工程

精製工程（低 pH 処理及び陰イオン交換クロマトグラフィー）における工程パラメータと CQA 及びプロセス性能指標の関係を表 2.3.S.2.6-6 に示す。

表 2.3.S.2.6-6 工程パラメータと CQA 及びプロセス性能指標の関係

工程	工程パラメータ	分類 ¹	解析範囲 (許容範囲)	CPP とした/しなかった理由
低 pH 処理	pH	CPP	○-○ (△-△)	外来性ウイルスを不活化するために重要なパラメータであるため、CPP とした。
	保持時間	CPP	○-○ (△-△)	外来性ウイルスを不活化するために重要なパラメータであるため、CPP とした。
	温度	CPP	○-○ (△-△)	外来性ウイルスを不活化するために重要なパラメータであるため、CPP とした。
	調整後 pH	CPP	○-○ (△-△)	CQA (凝集体) に影響するため CPP とした。ただし、解析範囲 (○-○) の範囲であれば CQA には影響しない。
陰イオン交換 クロマトグラフ ィー	負荷液調整のための希 釈率	CPP	○-○ (△-△)	CQA (宿主細胞由来タンパク質) に影響するため CPP とした。ただし、解 析範囲 (○-○) の範囲であれば CQA には影響しない。
	負荷液の pH	CPP	○-○ (△-△)	CQA (宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA) に影響するため CPP とした。ただし、解析範囲 (○-○) の範囲であれば CQA には影響しない。
	ベッド高	CPP	○-○ (△-△)	CQA (宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA) に影響するため CPP とした。
	最大負荷量 (g/L-レジ)	CPP	○-○ (△-△)	CQA (宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA) に影響するため CPP とした。
	線流速 (cm/h)	-	○-○ (△-△)	プロセス性能指標 (収率) に影響するが、CQA (宿主細胞由来タンパク質、 宿主細胞由来 DNA) には影響しないため、CPP としなかった。
	ピーク回収開始 (AU/cm)	CPP	○-○ (△以上)	CQA (宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA) に影響するため CPP とした。
	ピーク回収終了 (AU/cm)	CPP	○-○ (△以上)	CQA (宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA) に影響するため CPP とした。

1 :- は CPP ではないことを示す

解説（製造工程の開発の経緯）

- 本モックアップでは、工程特性解析試験の結果は、培養工程及び精製工程（低 pH 処理及び陰イオン交換クロマトグラフィー）を代表例として記載した。
- 工程中間体の管理方法（保存期間等）は品質への影響を考慮して規定するが（2.3.S.2.2 項解説参照）、本モックアップでは、ハーベストで得られた液を長期間保存すると不純物が増加する事例として、ハーベストで得られた液の保存期間を CPP とした。
- 本モックアップでは、CPP のうち、解析範囲（○ー○）内では CQA に影響しないことが確認され、通常の工程操作は確認された範囲よりも狭い範囲内で行うもの、また、本工程以降の工程が適切に管理された場合に CQA に影響しないものについては、リスクが低いとみなして軽微変更届出対象事項に分類した（承認申請書参照）。変更カテゴリーは、当該品目の管理戦略や、当該パラメータの変更に伴う製品品質に対する潜在的リスクも考慮して判断する。

2.3.S.4.1 規格及び試験方法

ジェーピーマブ原薬の規格を表 2.3.S.4-1 に示す。

表 2.3.S.4-1 ジェーピーマブ原薬の規格

試験項目		規格
性状		無色～微黄色の澄明又はわずかに乳白光の液
確認試験	(1) ペプチドマップ	標準溶液と同一の保持時間に同様のピークを認める
	(2) イオン交換クロマトグラフィー	試料溶液及び標準溶液から得られた主ピーク (OK) の保持時間は一致する
pH		●～●
糖鎖プロファイル		フコシル化糖鎖：●～●% アフコシル化糖鎖：●～●% ハイマンノース型糖鎖：●%以下
純度試験	(1) イオン交換クロマトグラフィー	主ピーク (OK ピーク)：●%以上 酸性領域：●%以下 塩基性領域：●%以下
	(2) 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
	(3) キャピラリーSDS 電気泳動法 (非還元条件)	主ピーク：●%以上
	(4) 宿主細胞由来タンパク質	● ppm (ng/mg) 未満
エンドトキシン (JP 比色法)		● EU/mg 未満
微生物限度		総好気性微生物数：● CFU/10 mL 以下 総真菌数：● CFU/10 mL 以下
生物活性 (CDC 活性測定法)		●～●%
定量法 (タンパク質含量)		90.0～110.0 mg/mL

2.3.S.4.2 試験方法（分析方法）

ジェーピーマブ原薬の規格及び試験方法は以下のとおりである。

2.3.S.4.2.1 含量規格

本品は定量するとき、1 mL 当たり 90.0～110.0 mg のタンパク質を含む。

2.3.S.4.2.2 性状

本品は無色～微黄色の澄明又はわずかに乳白光の液である。

2.3.S.4.2.3 確認試験

2.3.S.4.2.3.1 ペプチドマップ

本品及びジェーピーマブ標準物質につき、タンパク質として約■ mg に対応する量を取り、凍結乾燥した後、XXX 緩衝液■ μL を加え、更に■ mmol/L ジチオスレイトール溶液■ μL を加えた後、■°C で■分間静置する。次に、■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液■ μL を加え、暗所で■分間静置した後、■ mmol/L ジチオスレイトール溶液■ μL を加える。この液に■ mol/L トリス塩酸緩衝液■ μL 及びリシルエンドペプチダーゼ溶液■ μL を加え、37°C で■時間静置した後、トリフルオロ酢酸■ μL 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 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 210 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 20 cm のステンレス管に 5 μm 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。（○社製 XXXX 又は同等品）<3>

カラム温度：25°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）

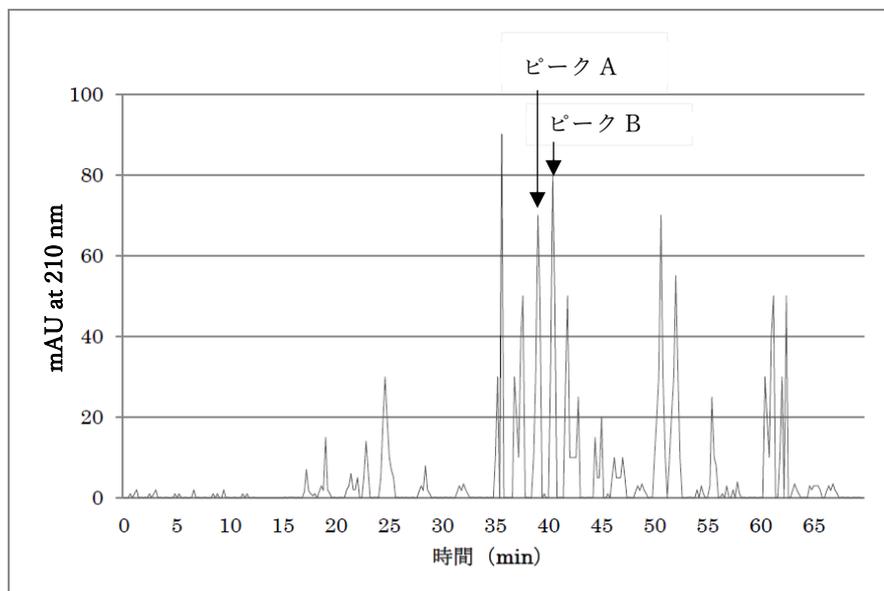
流量：毎分 1 mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液 100 μL につき、上記の条件で操作するとき、主要な●本のピークが認められ、保持時間約 XX 分のピーク A と保持時間 YY 分のピーク B の分離度は 1.5 以上で

ある (図 2.3.S.4-1)。

図 2.3.S.4-1 ペプチドマップの代表的なクロマトグラム



2.3.S.4.2.3.2 イオン交換クロマトグラフィー

本品及びジェーピーマブ標準物質の適量を取り、1 mL 中にタンパク質 ■ mg を含む液となるよう移動相 A を加え、試料溶液及び標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 50 μ 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とき、試料溶液及び標準溶液から得られたクロマトグラムにおける主ピーク (OK ピーク) の保持時間は一致する。

試験条件

純度試験 (1) イオン交換クロマトグラフィー (0) の試験条件を準用する。

システム適合性

システムの性能は純度試験 (1) イオン交換クロマトグラフィーのシステム適合性を準用する。

2.3.S.4.2.4 pH

●～●

2.3.S.4.2.5 糖鎖プロファイル^{4,6}

本品につき、タンパク質 ■ μ g に対応する量を取り、pH 7.2 のリン酸塩緩衝液に対する透析により脱塩を行う。この液に pH 7.2 のリン酸塩緩衝液を加え、1 μ L 中にタンパク質 ■ μ g を含む液となるように調製する。この液 ■ μ L をとり、■ ユニットの PNGase F を加え、37°C で ■～■

時間保温する。限外ろ過ユニット（分画分子量 ■ kDa）により遊離糖鎖を精製し、減圧下で蒸発乾固する。残留物に、■ μL の 2-アミノベンズアミド誘導体化試液を加え、65°C で ■～■ 時間保温する。反応終了後、放冷し、アセトン ■ mL を加え、よく混和する。毎分 15000 回転で ■ 分間遠心分離した後、上澄液を除く。この操作を 2 回繰り返す、乾燥する。アセトニトリル/移動相 A 混液（7:3） ■ μL に溶かし、試料溶液とする。別に標準物質^{<7>}及び pH 7.2 のリン酸塩緩衝液を同様の方法で操作し、それぞれシステム適合性試験用溶液及び陰性対照とする。試料溶液、システム適合性試験用溶液及び陰性対照 10 μL を正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定する。次式により試料溶液のフコシル化糖鎖（%）、アフコシル化糖鎖（%）及びハイマンノース型糖鎖（%）を求めるとき、それぞれ ●～●%、●～●%及び●%以下^{<5>}である。

フコシル化糖鎖（%）

=フコシル化された糖鎖（G0F、G0F-GlcNAc、G1F、G1’F、G1F-GlcNAc 及び G2F）のピーク面積の和/糖鎖のピーク面積の総和×100

アフコシル化糖鎖（%）

=フコシル化されていない糖鎖（G0 及び G0-GlcNAc）のピーク面積の和/糖鎖のピーク面積の総和×100

ハイマンノース型糖鎖（%）

=ハイマンノース型糖鎖（Man5）のピーク面積の和/糖鎖のピーク面積の総和×100

試験条件

検出器：蛍光光度計（励起波長：330 nm、蛍光波長：420 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に 3 μm の液体クロマトグラフィー用カルバモイル基結合シリカゲルを充填する。（○○社製 XXXX 又は同等品）^{<3>}

カラム温度：40°C 付近の一定温度

移動相 A：ギ酸で pH 4.5 に調整したギ酸アンモニウム ● g/L 溶液

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 1.0 mL

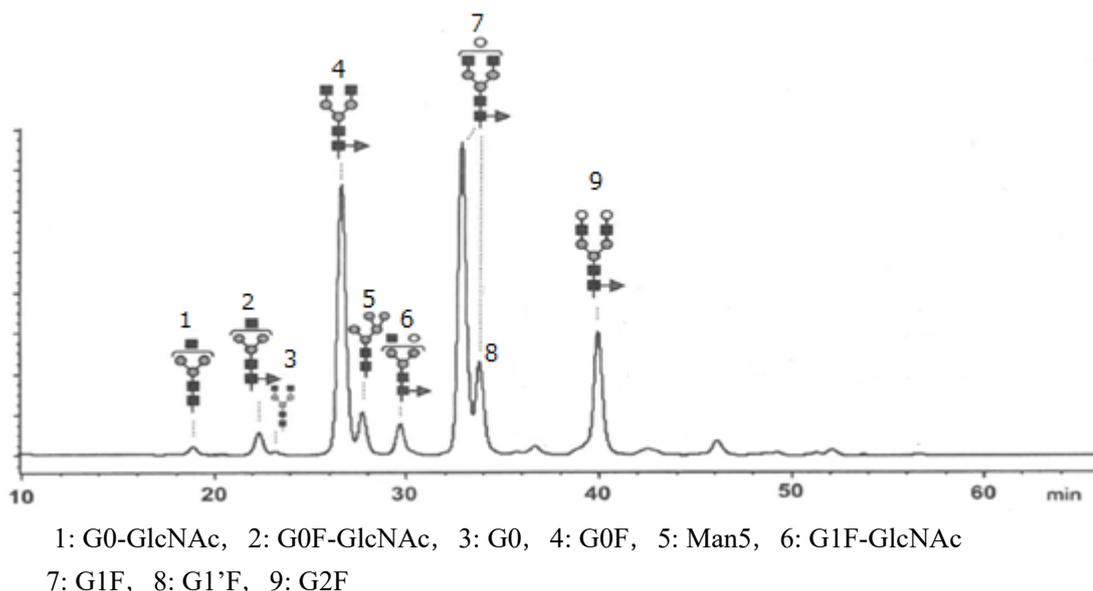
面積測定範囲：試料注入後 10 分から 65 分の範囲

システム適合性^{<9>}

システムの性能：陰性対照 10 μL につき、上記の条件で試験を行うとき、面積測定範囲にピークを認めない。システム適合性試験用溶液 10 μL につき、上記の条件で試験を行うとき、G0F、Man5、G1F、G1’F、G2F（それぞれ図 2.3.S.4-2 のピーク 4、5、7、8 及び 9）の順に溶出し、そ

れぞれの分離度は●以上である。

図 2.3.S.4-2 糖鎖プロファイルの代表的なクロマトグラム



2.3.S.4.2.6 純度試験

2.3.S.4.2.6.1 イオン交換クロマトグラフィー

本品の適量を取り、1 mL 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 μ 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、酸性領域は●%以下、塩基性領域は●%以下である（図 2.3.S.4-3 参照）。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 210 nm）

カラム：内径 4.0 mm、長さ 20 cm のポリエーテルエーテルケトン管に 10 μ m の液体クロマトグラフィー用弱酸性イオン交換樹脂を充填する。（〇〇社製 XXXX 又は同等品）^{<3>}

カラム温度：25°C 付近の一定温度

移動相 A：無水リン酸二水素ナトリウム（■ g/L）、リン酸二水素ナトリウム一水和物（■ g/L）及び塩化ナトリウム（■ g/L）を含み pH 6.5 に調整した溶液。^{<10>}

移動相 B：無水リン酸二水素ナトリウム（■ g/L）、リン酸二水素ナトリウム一水和物（■ g/L）及び塩化ナトリウム（■ g/L）を含み pH 6.5 に調整した溶液。^{<10>}

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 1.0 mL

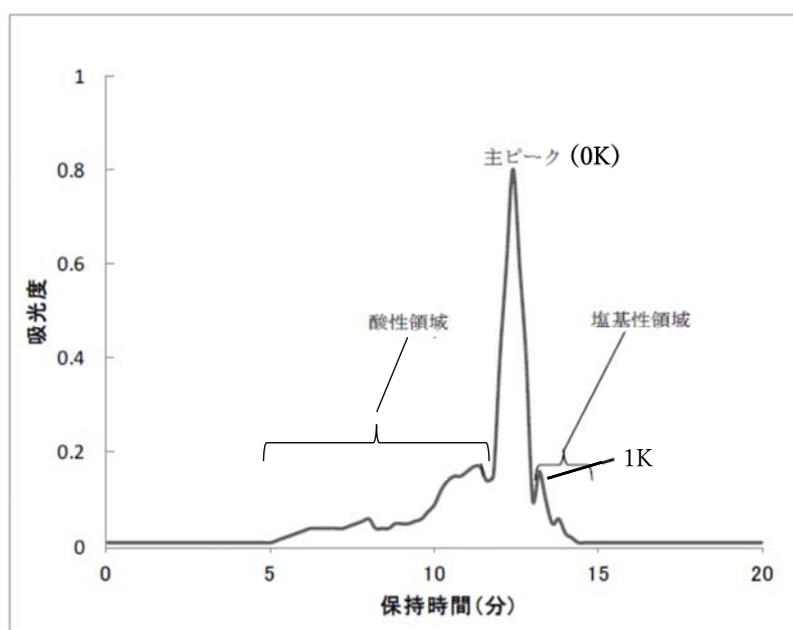
面積測定範囲：溶媒ピークの後から主ピークの保持時間の約 2 倍の範囲

システム適合性^{<9>}

検出の確認：ジェーピーマブ標準物質に、タンパク質として■ mg/mL になるように移動相 A を加え標準溶液とする。標準溶液に、タンパク質として■ mg/mL になるように移動相 A を加え検出の確認用溶液とする。検出の確認用溶液 50 μL 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。<11>

システムの性能：システム適合性試験溶液 50 μL 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.4-3 イオン交換クロマトグラフィーの代表的なクロマトグラム



2.3.S.4.2.6.2 サイズ排除クロマトグラフィー

本品の適量を取り、1 mL 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 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、高分子量領域は●%以下、低分子量領域は●%以下である。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 210 nm）

カラム：内径 8.0 mm、長さ 20 cm のステンレス管に 5 μm 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。（〇〇社製 XXXX 又は同等品）^{<3>}

カラム温度：25°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/L）、リン酸二水素ナトリウム一水和物（■ g/L）、及び塩化ナトリウム（■ g/L）を含み pH 6.5 に調整した溶液。^{<10>}

流量：毎分 0.5 mL

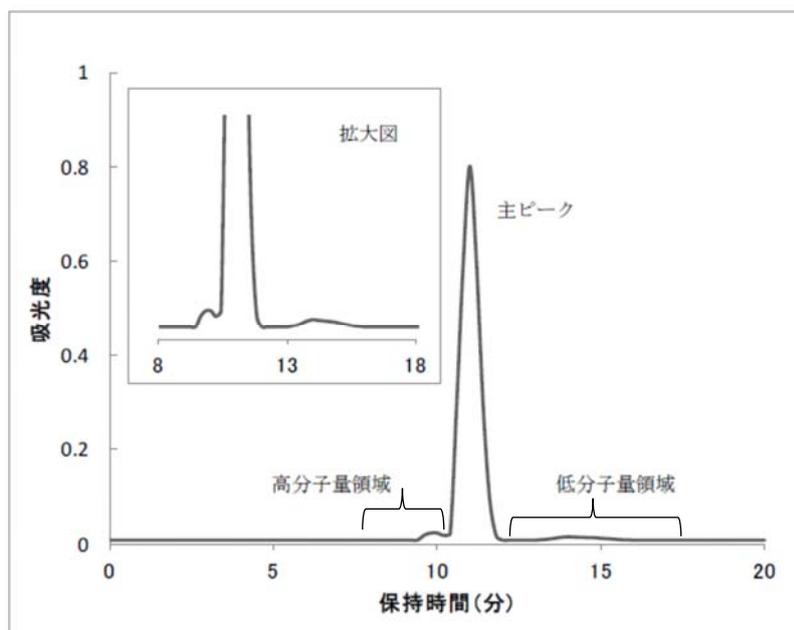
面積測定範囲：試料注入後〇分から主ピークの保持時間の約 2 倍の範囲

システム適合性^{<9>}

検出の確認：ジェーピーマブ標準物質に、タンパク質として ■ mg/mL になるように移動相を加える。この液 50 μL 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。^{<11>}

システムの性能：分子量マーカー 1 バイアルに移動相 ■ mL を加える。この液 50 μL 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 ● 以上である。

図 2.3.S.4-4 サイズ排除クロマトグラフィーの代表的なクロマトグラム



2.3.S.4.2.6.3 キャピラリーSDS 電気泳動法（非還元条件）

本品の適量を取り、1 mL 中にタンパク質約 ■ mg を含む液となるよう水を加える。この液 ■ μL をとり、非還元試料緩衝液 ■ μL 及び ■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液 ■ μL を加えた後、■°C

で■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 210 nm）

キャピラリー：内径 50 μm、有効長 20 cm 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：電氣的導入法（■ V で■秒）

電気泳動：■ V

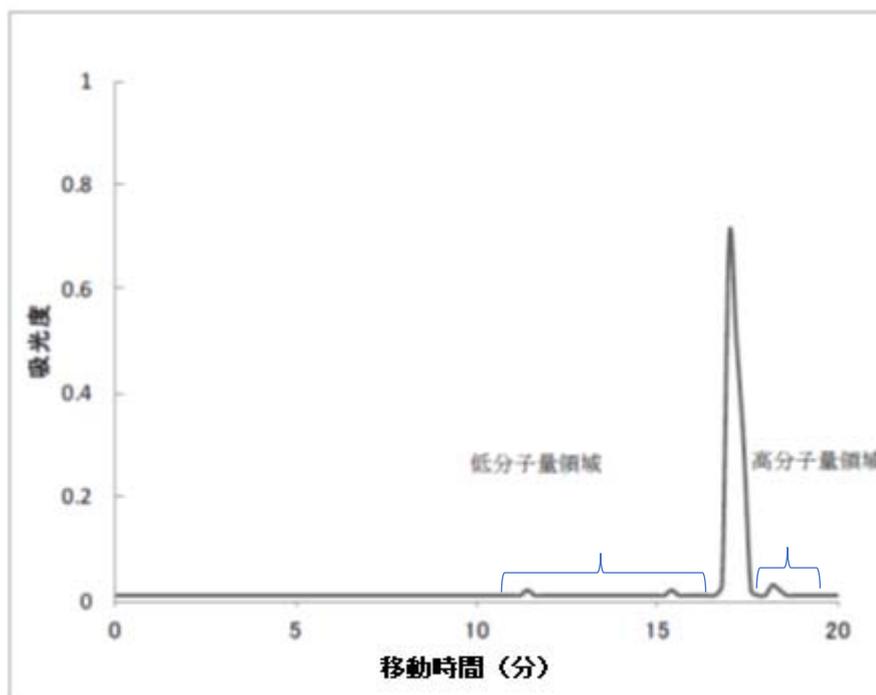
泳動時間：20 分間

システム適合性^{<12>}

検出の確認：ジェーピーマブ標準物質の適量を取り、1 mL 中にタンパク質■ mg を含む液となるよう水を加え、システム適合性試験溶液とする。システム適合性試験溶液に水を加え■倍希釈する。この液■ μL をとり、非還元試料緩衝液■ μL 及び■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液■ μL を加えた後、■°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、主ピークの SN 比は 10 以上である。^{<11>}

システムの性能：システム適合性試験溶液■ μL をとり、非還元試料緩衝液■ μL 及び■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液■ μL を加えた後、■°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、泳動プロファイルが参照エレクトロフェログラムと同等であることを確認する。

図 2.3.S.4-5 参照エレクトロフェログラム



2.3.S.4.2.6.4 宿主細胞由来タンパク質

本品の適量を取り、■倍量のブロッキング溶液を加え、試料溶液とする^{<13>}。別に、宿主細胞由来タンパク質標準物質適量を量り、1 mL中にタンパク質■ ngを含む液となるようにブロッキング溶液を加え、更に1 mL中にタンパク質■ ngを含む液となるまで●倍段階希釈を行い、各濃度の標準溶液とする。抗原抗体反応試験用プレートの各ウェルにヤギ抗HCP抗体溶液100 μLを加え、2~8°Cで■時間以上静置した後、液を除き、洗浄溶液を用いて洗浄操作を行う^{<14>}。次にブロッキング溶液200 μLを各ウェルに加え、室温で■時間静置する。この液を除き、洗浄溶液を用いて洗浄操作を行う^{<14>}。試料溶液及び各濃度の標準溶液100 μLずつを量り、3ウェルずつ分注し、室温で■時間振とうする。液を除いた後、洗浄溶液を用いて洗浄操作を行う^{<14>}。次にウサギ抗HCP抗体溶液100 μLを各ウェルに加え、室温で■時間振とうし、液を除いた後、洗浄溶液を用いて洗浄操作を行う^{<14>}。次にペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体溶液100 μLを各ウェルに加え、室温で■分間振とうする。液を除いた後、洗浄溶液を用いて洗浄操作を行う^{<14>}。各ウェルに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン液体基質100 μLを加え、室温で溶液が青色に変色するまで■分間静置した後、0.5 mol/L硫酸試液100 μLを加えて反応を停止する。マイクロプレートリーダーにより波長450 nmにおける吸光度を測定し、標準溶液の各タンパク質濃度に対する吸光度の平均値を用い、4パラメーターロジスティック (4-PL) 回帰により検量線を作成する。検量線を用いて求めた試料溶液の宿主細胞由来タンパク質濃度の平均値から本品1 mgタンパク質当たりの宿主細胞由来タンパク質量を求めるとき、● ppm (ng/mg) 未満である。

洗浄操作：各ウェルに洗浄溶液■ μL を加えて、洗浄溶液を除く。さらに同じ操作を■回以上繰り返す。

システム適合性

検量線の決定係数 (R^2 値) は●以上である。

各々の濃度の標準溶液における宿主細胞由来タンパク質濃度の相対標準偏差は●%以下である。

試料溶液の吸光度が検量線の範囲内にあり、試料溶液の宿主細胞由来タンパク質濃度の相対標準偏差が●%以下である。

2.3.S.4.2.7 エンドトキシン

● EU/mg 未満 (比色法による) ^{<15>}

2.3.S.4.2.8 微生物限度

本品 10 mL 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。

2.3.S.4.2.9 生物活性

本品及びジェーピーマブ標準物質の適量を取り、それぞれ 1 mL 中にタンパク質■ mg を含む液となるように測定用培地を加えて試料溶液及び標準溶液とする。96 ウェルのマイクロプレート 3 枚を用いる。マイクロプレートの全ウェルに測定用培地 50 μL を分注する。次に 1 列目の 2~4 ウェルに試料溶液及び 5~7 ウェルに標準溶液を■ μL ずつ加える。次いで 1 列目から■ μL とり、2 列目に入れ、順次 1 mL 中にタンパク質■ mg を含む液となるまで段階希釈する。ブランク列は操作しない。凍結保存した Detect 細胞を融解する。細胞溶液を遠心分離し、上澄液を吸引除去した後、測定用培地を加えて洗浄する。洗浄操作を 2 回以上繰り返した後、1 mL 中に細胞数■ $\times 10^5$ 個になるように測定用培地を加え、細胞懸濁液とする。マイクロプレートの全ウェルに細胞懸濁液 50 μL を分注する (ただし、1 行目と 8 行目のウェルは試験に用いない)。炭酸ガス濃度 5% の培養器内 37°C で、■分間静置した後、マイクロプレートの全ウェルに補体溶液 50 μL を分注し、更に炭酸ガス濃度 5% の培養器内 37°C で、■分間静置する。静置後、レザズリン液 15 μL を全ウェルに添加し、炭酸ガス濃度 5% の培養器内 37°C で、■時間培養する。培養後、マイクロプレートリーダーを用い、励起波長 530~560 nm、測定波長 590 nm における蛍光光度を求める。

各濃度における蛍光光度から、4-PL 回帰式で解析し、標準溶液に対する試料溶液の効力比を求める。

プレートそれぞれから求めた効力比の幾何平均から、本品の標準物質に対する生物活性 (%) を求める時、●~●%である。

試験成立条件

標準溶液の曲線の形状：上側漸近線及び下側漸近線間に直線部分を有するS字曲線であることを確認する。

標準溶液の4-PL curveの R²値が■以上である。

陰性対照の蛍光光度（プレートのブランク列）が下側漸近線を超えない。

標準溶液の下側漸近線に対する上側漸近線の比が■倍以上である。

試料溶液の下側漸近線と標準溶液の下側漸近線の比が■～■である。

試料溶液の上側漸近線と標準溶液の上側漸近線の比が■～■である。

試料溶液の勾配と標準溶液の勾配の比が ■～■である。

それぞれの試料の効力比を自然対数変換した結果の標準偏差の幾何相対標準偏差が■%以下である。

2.3.S.4.2.10 定量法

本品の適量を取り、波長 280 nm 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 × I) × 希釈率

1.38：吸光係数（ジェーピーマブ 1 mg/mL 溶液の吸光度）

I：セル光路長（cm）

2.3.S.4.2.11 試薬・試液^{<19>}

2-アミノベンズアミド誘導体化試液：2-アミノベンズアミドをジメチルスルホキシド／氷酢酸混液（7：3）に溶解（50 mg/mL）。この液にシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加（63 mg/mL）。

3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン液体基質：3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンを含む溶液（■社製、製品番号XX、又は同等品）。

■ mmol/L ジチオスレイトール溶液：水1 mL中にジチオスレイトール● gを含む溶液。

■ mol/L トリス塩酸緩衝液：水1 mL中に2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール● g及びXXX■ gを含む溶液で、pH●～●に調整する。

■ mmol/L ヨードアセトアミド溶液：水1 mL中にヨードアセトアミド● gを含む溶液。

イスコフ改変ダルベッコ培地：イスコフ改変ダルベッコ液体培地（●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品）。

ウサギ抗HCP抗体溶液：宿主細胞由来タンパク質標準物質でウサギを免疫し、アフィニティークロマトグラフィーにて調製した抗体を、使用時にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液で希釈する。抗体は小分けして-60℃以下で保存する。^{<20>}

継代用培地：イスコフ改変ダルベッコ培地／ウシ胎児血清混液（9：1）にベンジルペニシリンカリウム 1.0×10^6 単位/mL添加ストレプトマイシン硫酸塩0.01 g(力価)/mL生理食塩液溶液を1%相当量加えた後、ろ過滅菌する。

宿主細胞由来タンパク質標準物質：CHO細胞にジェーピーマブのL鎖遺伝子及びH鎖遺伝子を除いた発現プラスミドを導入した細胞の培養液から調製したタンパク質溶液。本品は小分けして -60°C 以下で保存する。<20>

洗浄溶液：ポリソルベート20（■社製、製品番号XX、又は同等品）のリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液（1→2000）。

測定用培地：pHを■～■に調整したイスコフ改変ダルベッコ培地／1 mol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸溶液／100 mg/mLウシ血清アルブミン（■社製、製品番号XX、又は同等品）溶液混液（97：2：1）。

定量法緩衝液：水1 mL中にXXX● g及びYYY■ gを含む溶液で、pH ●～●に調整する。

凍結用培地：ウシ胎児血清／ジメチルスルホキシド混液（9：1）。

非還元試料緩衝液：水1 mL中にラウリル硫酸ナトリウム● g及びXXX■ gを含む溶液で、pH ●～●に調整する。

ブロッキング溶液：リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液1000 mL中にウシ血清アルブミン（■社製、製品番号XX、又は同等品）● gを含む溶液。

分子量マーカー：1バイアル中に□、△等を含むゲルろ過用分子量マーカー（●●社製、製品番号XXXXX、又は同等品）。

ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体溶液：ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体溶液（■社製、製品番号XX、又は同等品）を、使用時にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液で希釈する。

補体溶液：ヒト補体を含む溶液（■社製、製品番号XXXXX、又は同等品）。使用時に測定用培地で希釈する。ロット毎に試験を実施して、希釈率を決定する。

ヤギ抗 HCP 抗体溶液：宿主細胞由来タンパク質標準物質でヤギを免疫し、アフィニティークロマトグラフィーにて調製した抗体を、使用時にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液で希釈する。抗体は小分けし -60°C 以下で保存する。<20>

リシルエンドペプチダーゼ溶液：1 mL 中にリシルエンドペプチダーゼ● mg を含む溶液（●●社製、製品番号XXXXX、又は同等品）。

Detect 細胞：HS 抗原高発現細胞株（ATCC. XXXXX）。凍結用培地に■ $\times 10^6$ 個/mL の濃度で懸濁し、凍結保存する。試験に使用する際は、細胞を融解した後、継代用培地にて■～■回の範囲で継代した細胞を用いる。

PNGase F：PNGase F（●●社製、製品番号XXXXX、又は同等品）。1 ユニットは、国際単位である1 IUB milliunit に等しい。<21>

SDS キャピラリー電気泳動緩衝液：ラウリル硫酸ナトリウム及び分子ふるいポリマーを含む緩衝液。

XXX 緩衝液：水1 mL中に塩酸グアニジン● g 及びXXX■ g を含む溶液で、pH ●～●に調整する。