

品質評価のカギをにぎる

バイオ医薬品の 分析法

知って
おきたい

基礎



一歩
進んだ

応用

編集

津本浩平

東京大学
大学院工学系研究科

石井明子

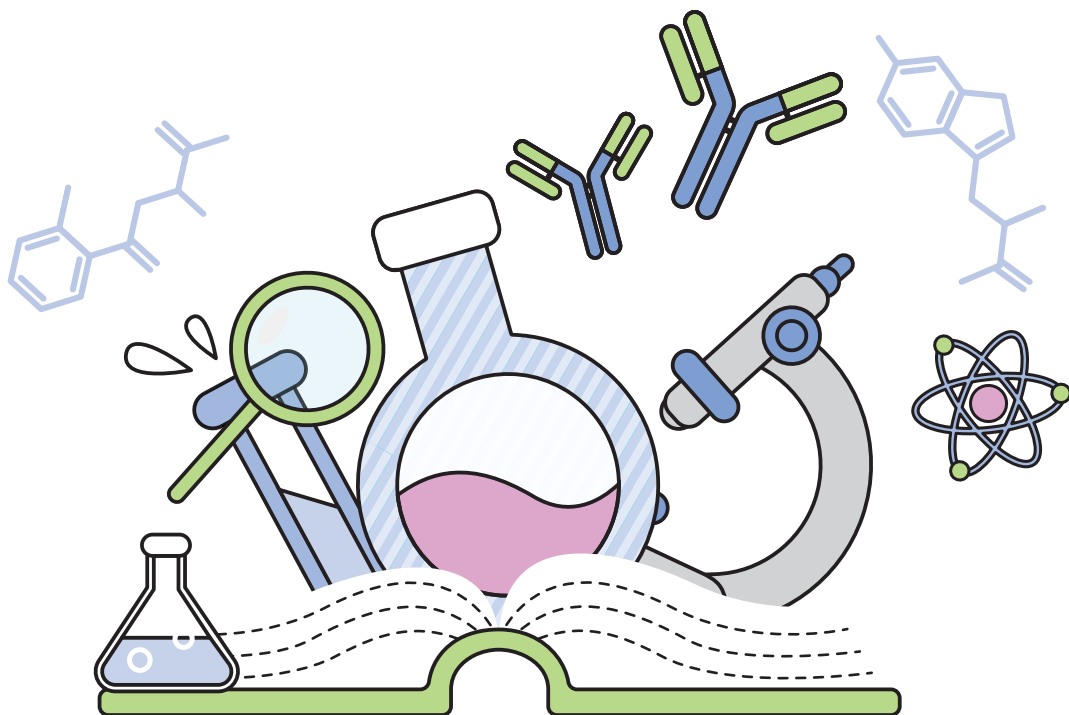
国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部

内山 進

大阪大学
大学院工学研究科

本田真也

産業技術総合研究所
バイオメディカル研究部門



じほう

I-2 抗体医薬品の事例で実際に 分析法・品質評価を考える

Case study for characterization and quality control of therapeutic monoclonal antibodies

1 はじめに

本節では、分析法に主眼をおいてバイオ医薬品の品質管理戦略構築の流れを概説し、各段階で活用される分析法について整理する。また、仮想の抗体医薬品を例に、分析法・品質評価について考察する。さらに、各種の分析法を品質管理に用いる際に不可欠な分析法バリデーション、および、分析法の開発やライフサイクルマネジメントに活用できる Analytical QbD についても述べる。

2 バイオ医薬品開発における 各分析法の利用

バイオ医薬品の品質特性は複雑であり、その開発過程において多様な分析法が用いられる。本項ではバイオ医薬品の開発を下記のカテゴリーに分けて考える。

- ①探索段階：目的とする機能をもつタンパク質を探索し、構造を最適化して、開発するタンパク質を絞り込む（非臨床試験開始まで）
- ②品質管理戦略の構築：特性解析を行い、得られた結果をもとに重要品質特性を特定し、製造工程管理や規格及び試験方法などからなる管理戦略を構築する（非臨床試験～臨床試験、市販製法確立まで）
- ③各ロットの品質管理：確立された管理戦略に従い、各ロットの品質評価を行う（臨床試験～市販後）
- ④同等性／同質性評価：開発期間中、あるいは市販開始後に、製造方法の変更が行われた場合、変更前後の製品の品質特性の類似性を評価する

表1に、各分析法の各段階・目的における利用の傾向についてまとめた。

(1) 探索段階

バイオ医薬品の開発では、生理活性タンパク質をも

とに構造を改変・最適化する場合や、抗体ライブラリーから開発候補抗体を選択し、これをもとに構造を改変・最適化する場合などがある。例えば、抗体医薬品では、図1 (p.8) に示すように、開発候補となる抗体を選択した後、有効性・安全性、製剤化、製造工程などを考慮して、分子設計や製剤設計を進める。

以下、悪性腫瘍に対する架空の抗体医薬品T-mAb、および、免疫系疾患に対する架空の抗体医薬品L-mAbを例に、開発において考慮すべき事項と用いる分析法を考察する。

具体例1：T-mAb

標的細胞の増殖抑制、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性、および補体依存性細胞傷害(CDC)活性をもつ抗腫瘍抗体、基本骨格ヒトIgG1、Fc領域のアミノ酸置換、糖鎖改変（糖転移酵素欠損CHO細胞で発現）、100mg/10mL溶液、バイアル製剤、点滴静注、4℃保存、有効期間3年

標的分子との結合性親和性、特異性（類似物質との交叉反応性）、細胞増殖の抑制効果、Fc γ 受容体結合性、ADCC活性、補体結合性、CDC活性、FcRn結合性などの生物活性評価を行い、候補抗体を選択する。T-mAbの開発に際しては、候補抗体の遺伝子配列から推定されるCDR領域の配列に、糖鎖修飾や脱アミド化されやすい配列、システインなど、品質管理を行ううえで注意すべき事項が増えるアミノ酸配列を有する候補抗体は排除することにする。また、候補抗体の選択の際には、信頼性に限界があるとされるが、免疫原性に関するリスクを低減するため、*in silico* T cell エピトープ解析、HLA結合性解析、*in vitro* T cell アッセイなどを行った結果も考慮する。

候補抗体の選択の際には、生物活性以外に、目標とする製剤中タンパク質濃度、保存条件・期間において、溶液中での安定性を確保するという視点も必要である。安定性を指標とする候補クローンの選択や、想定

表1 バイオ医薬品の品質評価・管理に用いられる主な評価項目と分析法

	目的	主な分析法	探索段階	品質評価・管理			備考	掲載節	
				特性解析	規格及び試験方法	同等性／同質性評価			
構造	アミノ酸組成	アミノ酸分析法	△	△	△	△		II-3	
	アミノ酸配列	ペプチドマップ法 (LC/MS)	○	○	×	○		II-3	
		ペプチドマップ法 (LC/UV)	×	○	○	○		II-3	
	末端アミノ酸配列	N末端解析法 (エドマン分解)	△	○	×	○	ペプチドマップ法で解析可能	II-3	
		C末端解析法 (酵素消化/アミノ酸分析)	△	○	×	○		II-3	
		ペプチドマップ法 (LC/MS)	○	○	×	○	II-3		
	スルフィドリル基	エルマン法	△	○	△	○		II-3	
	ジスルフィド結合	非還元および還元ペプチドマップ法	△	○	×	○		II-3	
	酸化	質量分析法 (LC/MS)	△	○	×	○		II-3	
	脱アミド	質量分析法 (LC/MS)	△	○	×	○		II-3, II-9	
		イオン交換HPLC (IEX-HPLC)	△	○	○	○		II-3	
		ゲルまたはキャピラリー等電点電気泳動法 (IEF)	△	○	△	○		II-3	
	糖化	質量分析法 (LC/MS)	△	○	×	○		II-3	
		ポロン酸アフィニティクロマトグラフィー	△	△	×	△		II-9	
ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元反応		△	△	×	△		II-9		
意図的な加工・修飾	質量分析法 (LC/MS)	○	○	△	○		—		
	疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)	○	○	○	○		II-11		
糖鎖構造	単糖分析	シアル酸	シアリダーゼ消化, 酸加水分解	HPAEC/PAD	△	○	○	○	II-5
			蛍光誘導体化 HPLC	△	○	○	○	II-5	
	中性糖, アミノ糖	酸加水分解	HPAEC/PAD	△	○	△	○	II-5	
			誘導体化 HPLC	△	○	△	○	II-5	
	オリゴ糖分析	N-結合型糖鎖	PNGase F消化	蛍光誘導体化 HPLC	○	○	○	○	II-5
				LC/MS等	○	○	×	○	II-5
				蛍光誘導体化 CE	○	○	△	○	II-5
		O-結合型糖鎖	化学的遊離	CE/MS等	○	○	×	○	II-5
				蛍光誘導体化 HPLC	△	○	×	○	II-5
				LC/MS等	△	○	×	○	II-5
	糖ペプチド分析	ペプチドマップ法 (LC/MS)	蛍光誘導体化 CE	△	○	×	○	II-5	
			CE/MS等	△	○	×	○	II-5	
	グリコフォーム分析	ゲルまたはキャピラリー等電点電気泳動法 (IEF)	質量分析法 (MS)	△	○	×	○	II-5	
			質量分析法 (MS)	△	○	×	○	II-5	
高次構造	2次構造	円偏光二色性スペクトル測定法 (CD)	○	○	×	○	II-3, II-4		
		フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法 (FT-IR)	△	△	×	○	II-3		
		蛍光スペクトル測定法	△	△	×	○	II-3, II-4		
		ラマンスペクトル測定法	△	△	×	○	II-3, II-4		

Part I バイオ医薬品とは、その分析とは

	目的	主な分析法	探索段階	品質評価・管理			備考	掲載節	
				特性解析	規格及び試験方法	同等性／同質性評価			
構造	高次構造 3次構造	X線結晶解析法	△	×	×	×		II-3, II-4	
		核磁気共鳴スペクトル測定法(NMR)	△	△	×	△		II-3, II-4	
		水素重水素交換質量分析法(HDX-MS)	△	○	×	○		II-3	
		示差走査熱量測定法(DSC)	○	○	×	○		II-6	
	4次構造	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE), キャピラリーSDSゲル電気泳動法(CE-SDS)	○	○	○	○		II-3	
		超遠心分析法(AUC)	○	△	×	△		II-4	
物理的・化学的性質	分子量・分子サイズ	サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)	△	○	○	○		II-3, II-11	
		サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱検出法(SEC-MALS)	△	○	△	○		II-9, II-11	
		SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE), キャピラリーSDSゲル電気泳動法(CE-SDS)	△	○	△	○		II-3, II-11	
		質量分析法(Intact MS)	△	○	×	○		II-3	
	分光学的性質	吸光度法(UV)	△	△	×	△		II-2, II-4	
		蛍光スペクトル測定法	△	△	×	△		II-4, II-6	
		静的光散乱法(SLS)	△	△	×	△		II-6	
		動的光散乱法(DLS)	△	△	×	△		II-6	
		示差走査熱量測定法(DSC)	△	△	×	△		II-6, II-12	
		温度走査蛍光測定法(DSF)	△	△	×	△		II-3, II-6, II-12	
	等電点	ゲルまたはキャピラリー等電点電気泳動法(IEF)	○	○	○	○		II-11	
	クロマトグラフィーパターン	イオン交換HPLC(IEX-HPLC)	○	○	○	○		II-11	
	pH	pH測定法	○	○	○	○		—	
	粘度	粘度測定法	○	○	○	○	製剤の評価	II-6	
	浸透圧	浸透圧測定法	○	○	○	○	製剤の評価	II-6	
	生物学的性質	結合性	酵素免疫測定法(ELISA)	○	○	○	○		II-7, II-8
			表面プラズモン共鳴法(SPR)	○	○	△	○		II-7, II-8
			バイオレイヤー干渉法(BLI)	○	○	△	○		II-7, II-8
			フローサイトメトリー	○	○	△	○		II-8
等温滴定型熱量計(ITC)			○	△	×	△		II-7, II-8	
免疫沈降法(IP)			△	△	×	△		II-7, II-8	
蛍光分光法(FRET, 蛍光偏光)			○	△	×	△		II-7, II-8	
超遠心分析法(AUC)			○	△	×	△		—	

規格及び試験方法におけるペプチドマップ法を用いた確認試験により管理する。

- ・**糖鎖構造**：培養工程のパラメータ管理と規格及び試験方法における糖鎖試験により管理する。糖鎖がCQAでないと考えられたL-mAbでは、糖鎖試験は設定しない。
- ・**凝集体**：工程での管理も必要であるが、保存中にも増加する場合があるので、原薬・製剤での規格及び試験方法を設定する。凝集体含量は有効期間を通じて、設定された規格値以下に維持される必要がある。
- ・**宿主細胞由来タンパク質（HCP）**：培養工程以降に増加する可能性がないため、工程内試験として設定する。HCP残存量は、有効成分に対する重量比（ng/mg）で表わされるが、安全性に対するHCPの影響は、測定されるHCPの残存量のみでなく、含まれるタンパク質の種類によっても異なると考えられるので、製法変更を行う際には、HCP分子種の変化にも留意する。
- ・**培地添加物**：製法開発の過程で、再現よく十分に除去できることが確認されたため、工程内試験や規格及び試験方法は設定せず、精製工程の工程パラメータで管理する。
- ・**容器からの溶出物（leachable）**：苛酷な条件での容器からの抽出物（extractable）の評価や、実際の製剤溶液を用いた溶出物の評価を行い、製剤容器からの溶出物が、有効期間を通じて有効性・安全性に影響しないレベルに保たれることを保証できる容器を用い、試験は設定しない。

(3) 各ロットの品質管理

上述のような流れで構築された管理戦略に基づき、各ロットの品質を評価し、規格に適合したものが出荷されることとなる。開発過程では、おおよそ第Ⅲ相臨床試験に入るまでに実製造の工程が開発され、品質管理戦略の構築も行ったうえで、各ロットの品質管理が行われる。工程内試験や規格及び試験方法に用いられる分析法は、**目的に合う分析性能をもつことを分析法バリデーションにより確認しておく必要がある**。また、品質保証には、各工程や試験の信頼性が重要であり、GMPに適合する施設、体制、文書化の体系のもとで、製造管理・品質管理を行う。

(4) 同等性／同質性評価

バイオ医薬品の品質は製造方法の影響を受けるため、開発過程あるいは市販後に、製造方法を変更する場合は、変更の前後で有効性・安全性に悪影響が生じるような変化がないことを確認し、それまでに実施した臨床試験結果が引き続き有効である状態を維持する必要がある。同等性／同質性評価の考え方は、**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もなう同等性／同質性評価について」**に示されている。

同等性／同質性評価では、規格及び試験方法が設定された試験項目のみでなく、より詳細な特性の解析が必要であり、さまざまな分析法が用いられる。

3 特性解析

特性解析は、品質管理略構築の最初の段階として重要であり、製造されたロットの品質特性について、さまざまな分析法を用いて解析する。分析にあたって必要な基礎知識を、本書「Ⅱ-2 タンパク質科学の基礎と取扱い」（p.21）にて解説する。

(1) 構造

構造解析では、有効成分がDNA配列から期待される一次配列を有したタンパク質であるか、意図的な加工・修飾操作から期待される構造を有したタンパク質であるかを確認する。また、タンパク質は、糖鎖修飾などの生合成過程で受ける翻訳後修飾に加えて、製造工程や保存中に酸化や脱アミド化などさまざまな化学修飾を受けるため、分子変化体の有無とその構造を可能な限り解析する。解析すべき項目としては、アミノ酸配列およびアミノ酸組成、末端アミノ酸配列、スルフヒドリル基およびジスルフィド結合、糖組成・糖鎖構造、糖化、酸化、脱アミド化などがあげられる。

アミノ酸配列や末端アミノ酸配列、糖化、酸化や脱アミド化などの化学修飾、意図的な加工・修飾は、ペプチドマップ法（LC/MS）により分析される。糖鎖は、タンパク質の安定性や生物活性、抗原性や体内動態に影響することが知られ、単糖分析、オリゴ糖分析、糖ペプチド分析およびグリコフォーム分析によって詳細に解析する。

構造解析の手法に関しては、「II-3 タンパク質の構造を知る」(p.30)、糖鎖構造の解析に関しては、「II-5 糖タンパク質の構造を知る」(p.53)に、分析法の詳細が紹介されている。

(2) 物理的・化学的性質

特性解析において明らかにすべき物理的・化学的性質には、分子量・分子サイズ、等電点、モル吸光係数などのほか、局所的構造や高次構造に関する情報を与える分光学的性質、分子不均一性の程度を示すクロマトグラフィーパターンなどが含まれる。

分子量・分子サイズは、サイズ排除クロマトグラフィーやSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、質量分析によって分析できる。二次構造や高次構造は、円偏光二色性スペクトル測定法(CD)、フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法(FT-IR)や核磁気共鳴スペクトル測定法(NMR)などによる解析が可能で、示差走査熱量測定を使った熱安定性や、高次構造の類似性の間接的な評価が可能な場合もある。分子不均一性として、液体クロマトグラフィーパターン(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、疎水性クロマトグラフィーなど)や電気泳動パターン(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、キャピラリーSDSゲル電気泳動法、キャピラリー等電点電気泳動法など)が解析される。製剤の特性解析では、pH、粘度、浸透圧なども解析すべき項目となる。

物理的・化学的性質のうち、分光学的性質の分析については、「II-4 分光学的性質を利用してタンパク質の構造を知る」(p.41)に各手法の詳細が紹介されている。

(3) 生物活性

生物活性とは、特定の生物学的効果を発揮するための特異的な機能やその程度を表す指標である。目的とする機能を有するタンパク質が得られていることは、生物活性の評価により確認する必要がある。また、バイオ医薬品に含まれる有効成分の構造は複雑で、構造・物理的・化学的性質の解析のみでタンパク質の高次構造を確定することは困難であるため、目的の高次構造を形成していることの確認には、生物活性の評価が必須となっている。生物学的試験には、生化学的試験(酵素反応速度の解析による生物活性の測定など)、結合性試験(リガンド-レセプターなどの結合活性の測定)、培養細胞を用いるバイオアッセイ(細胞レベル

での生化学的または生理学的応答などを測定)、動物を用いるバイオアッセイ(製品に対する生体の生物学的応答を測定)があげられる。

培養細胞を用いるバイオアッセイでは、目的物質による受容体リン酸化、細胞内情報伝達物質の産生、特異的遺伝子・タンパク質の発現調節、細胞増殖促進や細胞傷害活性、細胞内移行などが評価される。結合性試験には、酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光分光法や免疫沈降法のほか、表面プラズモン共鳴法、バイオレイヤー干渉法、等温滴定型熱量計などが用いられる。

生物活性の評価に関しては、「II-7 タンパク質の分子間相互作用」(p.78)、「II-8 タンパク質の活性」(p.87)に各手法の詳細が紹介されている。

(4) 免疫化学的性質

目的とするタンパク質であることの確認に、抗体との反応性を用いる場合や、タンパク質分子のさまざまなエピトープを認識する複数種類の抗体を用いた免疫化学的方法を利用して、タンパク質分子の特性を解析する場合がある。免疫化学的性質は、ICH Q6B「生物医薬品(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」であげられている特性解析項目であるが、最近では構造・物理的・化学的性質の解析手法が充実しているため、抗体を用いた解析が行われる例は少なくなっている。一方、抗体が目的物質の場合には、標的抗原に対する結合親和性、抗体が認識するエピトープ、抗原と類似したタンパク質に対する交差反応などが免疫化学的性質と位置付けられる。ただし、それらを「免疫化学的性質」と項目立てて説明するケースはあまりない。

(5) 不純物

原薬や製剤に含まれる不純物の変動は、製品の有効性・安全性に影響する可能性があるため、含まれる不純物を詳細に解析して、適切な製造工程を開発し品質管理戦略を構築する必要がある。バイオ医薬品の原薬や製剤に含まれる不純物には、「目的物質由来不純物」と「製造工程由来不純物」がある。

目的物質の分子変化体のうち、生物活性、有効性および安全性の点で目的物質に匹敵する特性をもつものを**目的物質関連物質**、目的物質に匹敵する特性をもたないものを**目的物質由来不純物**として考える。代表的な目的物質由来不純物には、凝集体や切断体があげら

Part II

タンパク質を見極めるための分析法

II-1 何を分析するのか

What are you going to analyze?

1 はじめに

バイオ医薬品の品質管理の考え方は化学合成医薬品と異なる。医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use；ICH）では、規格及び試験方法の設定について、それぞれのガイドラインが作られている。本節では、バイオ医薬品の品質管理において何が分析されているのか、品質を保証するためには何を分析すべきなのかを正しく理解するために、化学合成医薬品との相違を中心に関連する基本的事項を解説する。

2 バイオ医薬品を構成する成分

ICHガイドラインでは、バイオ医薬品の分子性状や生産工程の特殊性に鑑み、バイオ医薬品を構成する成分を「目的物質」、「目的物質関連物質」、「製造工程由来不純物」、「目的物質由来不純物」などの概念に分類し（図1）、この概念体系に照らしてバイオ医薬品の品質を管理することを促している¹⁾。

(1) 目的物質 (desired product)

バイオ医薬品は、生体による生合成過程を生産に利用していることから、分子構造上、多様なものが産生されることが多い。しかし、産生される複数の分子種に同等の生物活性があり、構造の不均一性が医薬品の安全性および有効性に悪影響を及ぼさないこともある。このようなバイオ医薬品の特徴を反映させるため

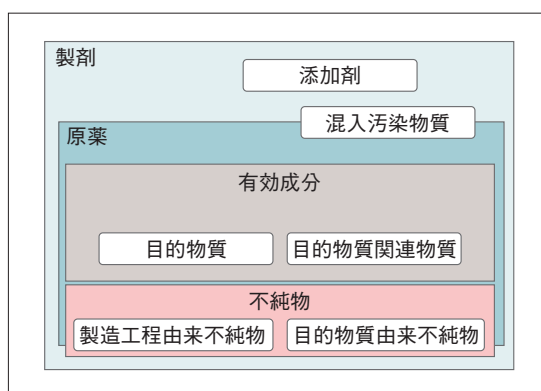


図1 バイオ医薬品を構成する成分の基本概念

に、「目的物質」という概念を導入する。目的物質は、バイオ医薬品における有効成分の一部であり、具体的には『①予期した構造を有するタンパク質、②DNA塩基配列から期待されるタンパク質、③しかるべき翻訳後修飾から期待されるタンパク質、あるいは④生物活性分子を生産するのに必要な、意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質』を指す。目的物質という概念の導入は、有効成分が不均一な混合物であることを許容することを可能にする。

(2) 目的物質関連物質 (product-related substances)

製造中や保存中に生成する目的物質の分子変化体で、目的物質に匹敵する生物活性などの特性を備え、製品の安全性および有効性に悪影響を及ぼさないものは「目的物質関連物質」とする。不純物としては扱わずに有効成分に含める。目的物質関連物質という概念の導入は、製造業者が意図せぬ構造の分子種も有効成分としてみなしうることを可能にする。

(3) 製造工程由来不純物 (process-related impurities)

目的物質、目的物質関連物質および添加剤（緩衝液成分も含める）以外の原薬または製剤中に存在する成分を「**不純物**」とする。このうち製造工程に由来するものを「**製造工程由来不純物**」とする。これには、培養工程に由来するもの（宿主細胞由来タンパク質や宿主細胞由来核酸など）、細胞培養液に由来するもの（抗生物質や培地成分など）、目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するもの（試薬類やクロマトグラフィ用担体からの漏出物など）、反応容器や保存容器等からの溶出物などが該当する。原薬中の製造工程由来不純物は、製造工程の適切な管理により最小限にする必要がある。

(4) 目的物質由来不純物 (product-related impurities)

不純物のうち、製造中や保存中に生成する目的物質の分子変化体であって、生物活性、有効性および安全性の点で目的物質に匹敵する特性をもたないものを「**目的物質由来不純物**」とする。これには、前駆体、凝集物、切断体、異性体、酸化体などが該当する。なお、上述の目的物質関連物質も目的物質の分子変化体である。したがって、目的物質の分子変化体であることのみから、それが目的物質関連物質であるのか目的物質由来不純物であるのかを直ちに判断することはできない。生物活性、有効性および安全性の評価によって、はじめて両者の区別が可能になる。

(5) 混入汚染物質 (contaminants)

原薬および製剤の製造工程には本来存在しないはずのもので、外来性の化学物質や生化学的な物質（微生物由来のプロテアーゼなど）、あるいは微生物類（マイコプラズマ、ウイルス、細菌など）を指す。汚染物質の混入は厳に避けなければならない。

(6) 添加剤 (excipient)

原薬や製剤に意図的に添加する成分で、そこで使用される量では薬理学的作用をもたないものを指す。

以上のなかで、目的物質、目的物質関連物質、および目的物質由来不純物は、バイオ医薬品に特有の概念である。品質管理においては、この概念体系を正しく

理解することが必要である。

3 バイオ医薬品の分子不均一性

前述のように、バイオ医薬品は、生体による生合成過程を生産に利用していることから、分子構造上、多様なものが産生されることが多い。結果として、目的物質は複数の分子種からなる不均一な混合物となる。これより、バイオ医薬品の品質管理においては、分子不均一性をいかに分析し評価するかが重要な課題となる²⁾。

(1) 不均一性の原因

バイオ医薬品を生産する際は、単一の化学構造の遺伝子を出発材料に用いる。しかし、生産細胞株の樹立、セルバンク化、培養、精製、製剤などの一連の製造工程を経て生産されたタンパク質が均一な物質として得られることはほとんどない。その理由の一つは**翻訳後修飾**である。**糖タンパク質のグリコフォーム**はその典型的な例である。その他、**変異**、**酵素消化**、**異性化**、**分解**などの生物学的あるいは化学的反応が生産細胞内外で生じうる。**変性**、**ミスフォールディング**、**凝集化**といった物理学的変化も起こりやすい。

元来、タンパク質は低分子化合物に比べ不安定であるので、**温度**、**光**、**振とう**、**吸着**、**pH**、**酸化剤**、**界面活性剤**などの影響を受けて比較的容易に変化する。また、生物を利用して生産していることから、時間変動やロット変動も比較的大きくなる。これらはすべて分子不均一性の原因になりうる。

上述のように、さまざまな理由でさまざまな分子変化体が生じる。これらのうち分子量、分子サイズの異なる分子種を**サイズバリエーション**と、電荷特性の異なる分子種を**チャージバリエーション**と総称することがある。**表1**に抗体医薬品で認められる主な分子変化体をまとめる。

(2) 不均一性の評価

医薬品開発において、有効成分が不均一であるという状況は安全性と有効性の確保のうえで好ましいことではないが、バイオ医薬品では不可避の事象として現状では看過されている。そこで、必要となるのがバイオ医薬品の有効成分を構成する目的物質の不均一性パ

II-4 分光学的性質を利用してタンパク質の構造を知る

Analyzing protein structures by spectroscopic methods

1 はじめに

本節では、分光学的性質を利用した分析法に関して紹介する。分光法 (spectroscopy)、分光光度法 (spectrophotometry)、あるいは分光学的測定法 (spectroscopic method) として分類される分析法は多数あるが、ここでは網羅性や科学的厳密性は横におき、バイオ医薬品の品質分析に利用される主な方法 (表1) について概説する。なお、本節の内容は筆者らの総説¹⁾ に加筆修正を施したものである。

タンパク質は、異なるコンフォメーション状態をとることができ、これらの状態は異なる物理化学的性質あるいは生物学的性質を示す。**分光学的測定法**は、タンパク質の高次構造 (二次構造、三次構造、および四次構造) のフィンガープリントを与えうることから、バイオ医薬品の確認、純度、安定性、同等性/同質性等の評価において重要な分析法と位置づけられる。分光学的測定法は、比較的安価で簡便に実施でき、総じて精度が高く再現性もよい。多検体のハイスループット分析に適用できるものもある。温度、pH、添加剤、接触材質が及ぼす高次構造への影響評価にも適している。

2 紫外可視吸収スペクトル測定法 (紫外可視分光光度法)

(1) 原理

紫外可視吸収スペクトル測定法は、約200~800 nmの電磁波を用いて、分子の電子遷移に由来する吸収を測定する手法である。吸収帯は測定分子に固有の化学構造と関連しており、スペクトル形状、特定の2つの波長における吸光度の比、および吸収極大波長 (λ_{\max}) での吸光度から、試料中に含まれる分子の定性や定量が可能となる。紫外可視領域の吸収帯から得られる構造情報は限られているが、操作が簡便であること、非標識測定のため測定後は試料を損ねることなく回収で

きることなどの利点があり、生体分子の濃度定量や液体クロマトグラフィーの検出としても用いられる。なお、特定波長での吸光度測定を紫外可視吸光度測定法とよび、本測定法と区別して扱う場合もある。

(2) タンパク質科学およびバイオ医薬品における利用

タンパク質分子の紫外吸収は、主にトリプトファン残基やチロシン残基などの芳香環とペプチド結合における電子遷移に由来する。また、色素タンパク質の多くは可視吸収を示す。測定対象のタンパク質が芳香環残基を含む場合、280 nm近傍に λ_{\max} をもち、その吸光度と対象タンパク質のモル吸光係数から、ランベルト-ベールの法則を用いて試料濃度が算出される。**モル吸光係数**は、アミノ酸組成分析または窒素定量法などによって得られた濃度既知のタンパク質試料を用いて、吸光度の実測値から決定することができる²⁾。また、厳密にはタンパク質の高次構造や溶媒環境等に依存して変化することが知られているものの、対象タンパク質のアミノ酸配列が既知の場合は、トリプトファン残基、チロシン残基およびジスルフィド結合の数から対象タンパク質の280 nmでのモル吸光係数を推定することが可能³⁾、これが実測値とよい近似を示すことから実務的には多用されている。

試料溶液に濁りがあると、散乱の影響で測定値が変動する場合がある。したがって、測定値が吸収のみから得られたものであると直ちに結論するのは早計で、**真の吸光度を評価するためには、散乱による影響がないかを常に確認することが必要である**。なお、この関係を逆に利用して、吸光度計を用いて試料溶液の濁度を評価することがある。ただし、この際に測定している現象は吸収でなく、得られた結果は真の吸光度でもないことを理解することが重要である。

バイオ医薬品の管理においては目的物質の物質量の定量に利用されることが多い。後述する「9 ガイドライン・薬局方との関係」を参照されたい。また、前述したように吸光度計を用いて原薬等の溶液の濁度を評価することもある。

表1 バイオ医薬品の品質分析に用いられる主な分光学的測定法

分析法	利用例	強み	弱み	ガイドラインとの関連
紫外可視吸収スペクトル測定法 (ultraviolet-visible spectroscopy)	・溶液中のタンパク質の濃度定量	・操作が簡便	・濁りを含む試料は前処理が必要	原薬および製剤の規格及び試験方法における物質量の評価等
蛍光スペクトル測定法 (fluorescence spectroscopy)	・三次構造の評価 ・芳香族アミノ酸側鎖の局所的構造変化 ・プローブを用いた疎水性表面の変化	・ $\mu\text{mol/L}$ オーダーの低濃度(少量)で測定可能 ・1回測定あたり数分* ・多検体/ハイスループット測定が可能(対応装置が必要)	・加熱による強度の減少など、構造変化によらないスペクトル変化に注意が必要	原薬および製剤の特性解析、安定性評価試験、および同等性/同質性評価試験における物理的・化学的性質(高次構造)の評価等
円偏光二色性スペクトル測定法 (circular dichroism spectroscopy)	・遠紫外領域は二次構造、近紫外領域は三次構造の評価 ・熱変性・凝集の検知	・特にヘリックス構造の変化に鋭敏 ・二次構造と三次構造の情報が同じ装置で得られる ・1回測定あたり数分*	・遠紫外領域の緩衝剤・添加剤成分の透過率が高いことが必要	
赤外吸収スペクトル測定法 (infrared spectroscopy)	・二次構造の評価 ・熱変性・凝集の検知	・特にベータ構造の変化に鋭敏 ・高い濃度(>100 mg/mL)での測定が可能 ・固体(凝集体など)も測定可能 ・1回測定あたり数分*	・水(H ₂ O)の強い吸収を避ける工夫が必要[短い光路長、高濃度、ATR、重水(D ₂ O)の使用]	
ラマンスペクトル測定法 (Raman spectroscopy)	・二次構造の評価 ・アミノ酸側鎖の局所的構造変化 ・色素タンパク質の構造変化	・水(H ₂ O)溶媒で測定可能	・溶媒や夾雑物からの蛍光が解析を妨げることがある	
核磁気共鳴スペクトル測定法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy)	・一次構造、二次構造、三次構造の評価 ・タンパク質の原子座標、分子ダイナミクス、微視的化学環境変化の評価	・高い構造分解能 ・一次元スペクトルの1回測定あたり数分以上(濃度による)* ・糖鎖の情報が含まれる	・二次元スペクトルの装置・時間的・実験・解析コストが高い ・高分子量のサンプルは困難	

*測定時間は目安であり、条件による。

(3) 測定の際のコツ・注意点

測定波長領域に吸収をもつ分子種の共存を確認する必要がある。この付近に吸収をもつタンパク質以外の生体分子には核酸が該当し、260 nmに λ_{max} をもつため、試料調製の工程で核酸の混入が疑われる場合はスペクトルの形状を確認する。また、微粒子やタンパク質の凝集体は、散乱によるみかけの吸光度の増加をもたらす原因となるため、試料の遠心分離処理またはフィルトレーションによる微粒子や凝集体の除去が必要となる。吸収帯から離れた波長(例えば、350 nm)の測定値がゼロになっているか否かを観測することで、散乱の影響の有無を確認することができる。より短波長側のペプチド結合に由来する吸収は、芳香環の

吸収に比べて大きいモル吸光係数を示すことから、より高い検出感度で試料を測定することが可能であり、遠紫外領域の吸収を用いた定量法も提案されている⁴⁾。その一方、この波長領域に吸収をもつ共役系化合物も少なくなく、緩衝剤や添加物として溶媒に含まれることも多いため、これらの共存が濃度定量に影響を与えることに十分注意する必要がある。

3 蛍光スペクトル測定法 (蛍光光度法)

(1) 原理

タンパク質に含まれる発色団(トリプトファン側鎖、

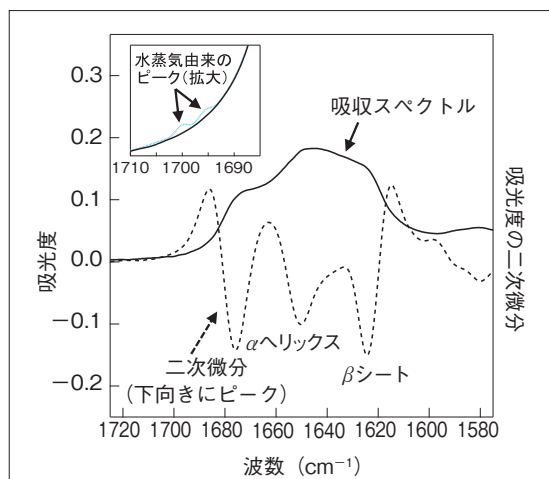


図4 タンパク質 (α + β 構造) の赤外吸収スペクトルの例

枠内は水蒸気由来のピークを含んだスペクトル (水色線) と重ねたもの。

は約 1650 cm^{-1} , β シートは約 $1620\sim 1640\text{ cm}^{-1}$, 無秩序構造は $1640\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ にみられることが多い²⁶⁾ (図4)。またペプチド間の水素結合が強いと低波数側に吸収がみられる²⁶⁾。フーリエ変換型赤外 (FT-IR) 分光器が主流であり、短時間で測定できるため多数の積算測定により高シグナルノイズ比が達成できる。透過法のほかに、臭化カリウム錠剤法、拡散反射法、減衰全反射 (ATR) 法などがある。

(2) タンパク質科学およびバイオ医薬品における利用

二次構造の変化の追跡に用いる。前述の CD スペクトルは α ヘリックスの同定に関して信頼性が高く、赤外吸収スペクトルは β シートの同定に関して信頼性が高い (β シートの吸収波数位置が他の二次構造の吸収波数位置と離れているため)。例えば、分子間 β シートを有するタンパク質凝集体の観測は赤外吸収スペクトルが適している。溶液でも固体でも測定可能で、タンパク質凍結乾燥品にも適用できる。水の赤外吸収がアミド I バンドと重なるため、溶媒に重水を用いることがある (重水の吸収帯は約 1200 cm^{-1} ²⁶⁾)。その際、重水によりペプチド基のアミドプロトンが重水素化されるとアミドバンドがシフトする。これを利用して重水素交換反応を追跡することもできる (重水素化ペプチド基のアミド I バンドはアミド I' バンドとよばれる)。帰属を文献で参照するときはその測定溶媒条件が水か重水か確認することが必要である。

バイオ医薬品においては、二次構造の物理的・化学的性質の特性解析の方法として利用されている [表1 (p.42), 表2 (p.44)]。IgG 抗体の赤外吸収分光分析の例では、 $1637, 1690\text{ cm}^{-1}$ が逆平行 β シートに帰属されている²⁷⁾。抗体のトラスツマブの先行バイオ医薬品であるハーセプチン[®]とそのバイオシミュラーの分析例では、二次微分スペクトルの視覚的な類似性が示され、分析的類似性を示す一つのデータとなっている⁹⁾。IgG 抗体の熱変性に伴って形成する凝集体の分子間 β シートは 1625 cm^{-1} に観測されている²⁸⁾。多検体ハイスループット測定法も開発されている²⁹⁾。

(3) 測定の際のコツ・注意点

水蒸気の赤外吸収が解析の妨げとなるため、装置内を乾燥空気等で満たす必要がある。アミド I バンドは幅広い1つの吸収帯にみえることが多いが、スペクトルの二次微分 (図4)、デコンボリューションにより、各二次構造由来の吸収ピークを分離して観測することができる。ただし、これらの処理は、微弱な残留水蒸気の吸収や測定ノイズを強調する (疑似ピークが発生するため注意を要する。水蒸気の影響は装置の試料室に乾燥空気や窒素を流し込むほか、あらかじめ測定した水蒸気のスペクトルに係数を掛け、タンパク質のスペクトルから差し引く処理をすることで軽減できる。 1696 cm^{-1} と 1700 cm^{-1} の水蒸気由来の鋭いピークを減じ、スペクトルが滑らかになるように係数を決めるとよい (図4)。アミド I バンドの測定に必要なタンパク質濃度は $1\sim 5\text{ mg/mL}$ 以上、透過法での光路長は水の赤外吸収 (約 1640 cm^{-1} ²⁶⁾) が強いいため、数 μm 、重水を用いる場合は $100\text{ }\mu\text{m}$ 程度まで可能である。測定・解析のノウハウは蛋白質科学会アーカイブ³⁰⁾ が参考になる。

6 ラマンスペクトル測定法

(1) 原理

物質に光を当てると散乱が起こる。散乱光には入射した光のエネルギーから振動エネルギー分だけ下げたエネルギーをもつ散乱光が含まれており、これがラマン散乱である。ラマン散乱の強度を波数 (ラマンシフトと記述される) に対してプロットしたものをラマン

スペクトルといい、振動スペクトルである。赤外吸収と原理が異なるため、赤外吸収では現れない振動スペクトルがラマン散乱では現れる（逆のケースもある）。官能基の振動モードは分子構造の変化や局所環境の変化に敏感である。赤外吸収では難しい低波数側の測定ができ、タンパク質の側鎖の情報が得られる点がラマンスペクトル測定法の利点である。液体でも固体でも測定できるため、タンパク質の凍結乾燥品、スプレードライ品、結晶にも適用できる。

(2) タンパク質科学およびバイオ医薬品における利用

タンパク質の主鎖骨格由来のアミドI, アミドIIIバンドピーク波数は二次構造を反映する。アミドIバンドの約 1655 cm^{-1} は α ヘリックス, 約 1670 cm^{-1} は β シートに帰属される³¹⁾。アミドIIIバンドは $1210\sim 1320\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れ, 例えば抗体のラマンスペクトルの約 1245 cm^{-1} のピークは β シートに帰属される³¹⁾。側鎖の振動モード^{32), 33)}, 例えば $510\sim 540\text{ cm}^{-1}$ のジスルフィド結合の振動はC-C-S-S-C-Cのコンフォメーション, 830 cm^{-1} と 850 cm^{-1} のチロシン側鎖の振動は水素結合の強さを反映する。 1340 cm^{-1} の強度に対する 1360 cm^{-1} の強度はトリプトファン側鎖の水への露出度合いの指標であり, 三次構造状態も推定できる。ラマンスペクトルは分子のフィンガープリントとして物質の同定, 比較にも使われる。

バイオ医薬品においては, Fc融合タンパク質の糖鎖の有無による高次構造の差を評価した報告がある³⁴⁾。チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の糖鎖が付加されたタンパク質と大腸菌由来の糖鎖が付加されていないタンパク質がラマン分光法で測定され, 両者ともアミドI, III, IVバンドの $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$, $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ のピークが β シートに帰属された。そして, 両者の $850\text{ cm}^{-1}/830\text{ cm}^{-1}$ の強度比, $1360\text{ cm}^{-1}/1340\text{ cm}^{-1}$ の強度比が一致することから, それぞれチロシン側鎖の水素結合環境とトリプトファン側鎖環境が一致していると解釈された。

(3) 測定の際のコツ・注意点

赤外吸収スペクトル測定法では水の強い吸収が妨げとなるが, 水のラマン散乱は弱いため, ラマンスペクトル測定法では水はそれほど妨害にならないという利点がある。しかし一方で, 紫外可視光を入射する場合,

溶媒と溶質, 夾雑物由来の蛍光が妨げになることがある（欠点）。その場合, 入射光の波長を変えるなどの工夫を要する。分散型ラマン装置に加え, FTラマン, 共鳴ラマン, 顕微ラマン装置があり, ラマン光学活性, 表面増強ラマンを利用した測定法もある。それぞれ装置および測定法によって感度は異なるが, 現在の分散型ラマン装置では mg/mL オーダーのタンパク質濃度が目安である。

7 核磁気共鳴スペクトル測定法

(1) 原理

核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定法は, 固有の核磁気モーメントをもつ原子核が, 外部磁場のもと, 周波数に共鳴してエネルギーを吸収・放出する現象を観測する手法である。有機化合物でNMRの測定対象となる原子核は, 検出感度の観点からスピン量子数 I の値が $1/2$ である ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P などが一般的であり, タンパク質を対象とした測定では ^1H , ^{13}C , ^{15}N が用いられる。NMRで得られる情報は多岐にわたり, 化学シフトから対象原子核の化学的環境が, スピン-スピン結合から化学結合のつながりに関する情報が, 核オーバーハウザー効果 (NOE) の強度から原子核間の距離情報が, 緩和時間から分子の運動性に関わる情報が得られ, これにより, タンパク質の高次構造解析や分子ダイナミクスなど高精度の解析が可能となる。その一方, 欠点として, 検出感度や分子量制限の点で他の分光学的手法に劣ることがあげられる。外部磁場下での基底状態と励起状態間の核磁気モーメントの占有率の差は, エネルギー差とボルツマン分布によって得られ, その値は, 高磁場下においても $10^{-4}\sim 10^{-5}$ 程度である。

(2) タンパク質科学およびバイオ医薬品における利用

構造解析法としてのNMRの大きな優位点は, 結晶作製に依存せず, 溶液中のタンパク質の高次構造を原子座標レベルで決定できる点である。高次構造解析では, まずNMRスペクトルに含まれる各々のピークの帰属が必要となる。低分子化合物に比べ, 高分子量タンパク質のNMRスペクトルは極めて複雑となり, こ

II-5 糖タンパク質の構造を知る

Glycosylation analysis of glycoprotein for development of biopharmaceuticals

1 はじめに

(1) 糖タンパク質バイオ医薬品の分類

これまでにわが国では、180品目を超えるバイオ医薬品が承認されている。糖鎖修飾は真核生物において普遍的な翻訳後修飾であることから、バイオ医薬品として利用されるタンパク質も糖タンパク質が多い。バイオ医薬品は、ホルモン・サイトカイン類、リソソーム酵素類、血液凝固系／線溶系因子類、抗体類、融合タンパク質、その他に分類することができる。糖タンパク質バイオ医薬品として、エリスロポエチン類、卵胞刺激ホルモン (FSH)、絨毛性性腺刺激ホルモン、リソソーム酵素、活性化血液凝固第VII因子、血液凝固第VIII因子、血液凝固第IX因子、抗体、Fc融合タンパク質などが利用されている。糖タンパク質でないのは、インスリン類、成長ホルモン、一部のインターフェロン、一部の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)

類、ヒト血清アルブミン、血液凝固第XIII因子Aサブユニットなどに限られる。

(2) バイオ医薬品の糖鎖構造

バイオ医薬品で知られている糖鎖修飾は、一般にN-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖である。

N-結合型糖鎖は、高マンノース型、混成型および複合型に分類される〔図1 (A)〕。N-結合型糖鎖は共通のトリマンノシルコア構造をもつ。高マンノース型では、糖鎖の非還元末端はマンノース (Man) 残基である。混成型では、トリマンノシルコアの α 1-3結合したMan残基にN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基が結合する。複合型糖鎖では、トリマンノシルコアの α 1-3および α 1-6結合のMan残基にGlcNAc残基が結合する。その数により二本鎖、三本鎖、四本鎖糖鎖とよばれる。GlcNAc残基には、さらにガラクトース (Gal) 残基、次にシアル酸残基が伸長する。

O-結合型糖鎖には、タンパク質に直接結合した単糖の種類により、O-N-アセチルガラクトサミン

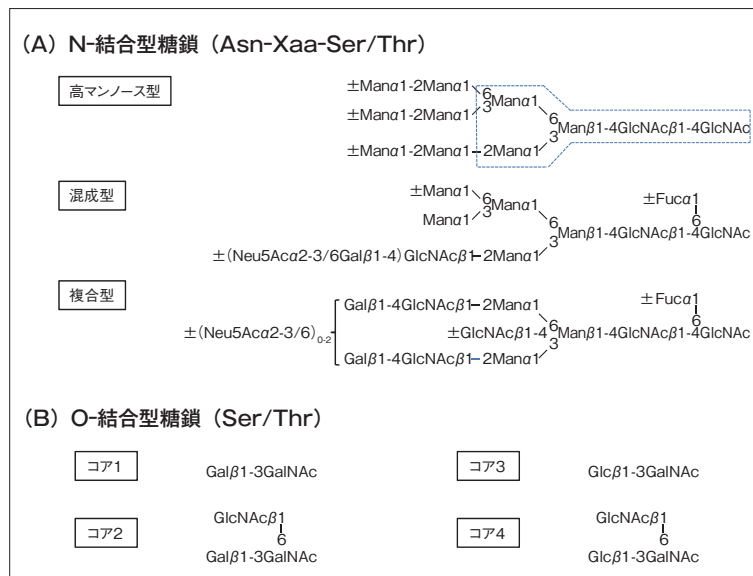


図1 一般的なN-結合型糖鎖構造およびO-結合型糖鎖コア構造

- (A) N-結合型糖鎖に共通するトリマンノシルコア構造を破線で囲む。N-結合型糖鎖は、高マンノース型、混成型および複合型に分類される。
- (B) O-結合型糖鎖 (ムチン型) の主要なコア構造を示す。

II-1

II-2

II-3

II-4

II-5

II-6

II-7

II-8

II-9

II-10

II-11

II-12

決定できる。

5 グリコフォーム分析

(1) 概要・用途

グリコフォーム分析は、糖タンパク質のまま糖鎖修飾の特徴を確認する方法である。シアル酸結合数による電荷の違いや、糖鎖修飾による質量の違いなどの分布に関する情報を得ることができる。シアル酸結合数は、薬物動態および生物活性に大きな影響を及ぼす場合が多く、電荷に基づいた分離手法である、等電点電気泳動、キャピラリー等電点電気泳動 (cIEF)、イメージングキャピラリー等電点電気泳動 (icIEF) [図7 (A)], イオン交換クロマトグラフィーなどが汎用される。サイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEは、糖鎖修飾の有無の確認に役立つ場合がある。また、分子量の比較的小さな糖タンパク質や糖鎖修飾の不均一性の低い糖タンパク質では、質量分析は質量の違いによるグリコフォームプロファイルを得ることができる⁵⁸⁾ので、特性解析で汎用されている [図7 (B), 図8]。

6 バイオ医薬品の品質評価・管理における糖鎖分析の活用

糖鎖分析は、有効性・安全性の確保を目標とした品質管理戦略の構築過程において、**特性解析における糖鎖修飾の解明**、**プロセスパラメータと糖鎖修飾の関連の解明**などに利用される。さらに、構築された品質管理戦略の一部となる規格及び試験方法として利用されるほか、製造工程の変更前後における同等性/同質性評価の際にも用いられる。

(1) 特性解析

バイオ医薬品の特性解析において、糖鎖修飾に関して単糖組成、糖鎖構造、結合部位、糖鎖占有率および部位ごとの糖鎖構造、グリコフォームの分布などを可能な範囲で明らかにする。糖鎖分析の結果は、糖鎖が有効性および安全性などに及ぼす影響についての検討結果とあわせ、管理すべき糖鎖構造とその許容範囲を決定するのに利用される。開発初期には、糖鎖修飾と有効性・安全性との関連は不明であるので、結合糖鎖

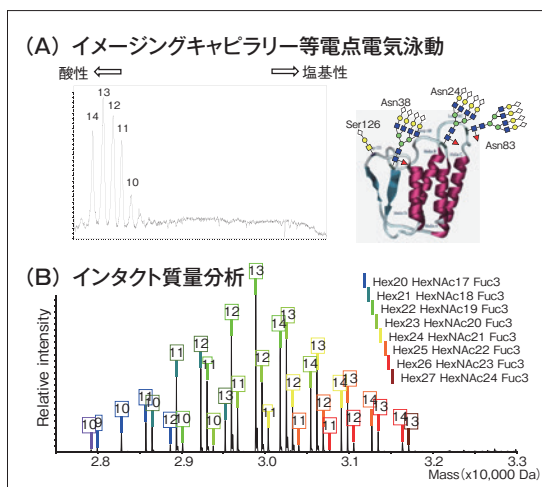


図7 エポエチンのグリコフォーム分析

- (A) 数字は推定結合シアル酸数を示す。
 (B) 結合している糖鎖の単糖組成を数字 (シアル酸結合数) と色 (その他の単糖組成) にて示す。
 エポエチンには3個のN-結合型糖鎖と1個のO-結合型糖鎖が結合する。
 (J Pharm Biomed Anal, 83 : 65-74, 2013 を一部改変。
 エリスロポエチンの立体構造のリボン図は, J Biol Chem, 269 : 22839-22846, 1994⁵⁹⁾ を参考に作成)

の特徴や有効性および安全性に影響すると考えられる糖鎖構造に関する既存の知見を活用して、分析法を選択する。

(2) 規格及び試験方法

糖鎖は有効性および安全性に関与しないと確認された場合を除き、一定の範囲内になるように管理すべき重要品質特性と考えられている。培養条件等のわずかな変動により糖鎖の不均一性は変化しやすいことから、また、N-結合型糖鎖の不均一性の変化の検出は特に難しいことではないので、規格及び試験方法により結合糖鎖の不均一性の恒常性の確認が行われることが多い。シアル酸修飾が生物活性や薬物動態等に大きな影響を及ぼす場合には、糖タンパク質全体のシアル酸修飾の程度を評価することを目的に、電荷に基づいたグリコフォーム分析が汎用される。

(3) バイオ後続品 (バイオシミラー)

バイオ後続品の開発では、先行品との品質比較試験により、品質特性に高い類似性を有することを示したうえで、非臨床・臨床試験による有効性・安全性の評価により、先行品との同等性/同質性を示すことが必要である。糖鎖修飾のパターンが高い類似性を示すよ

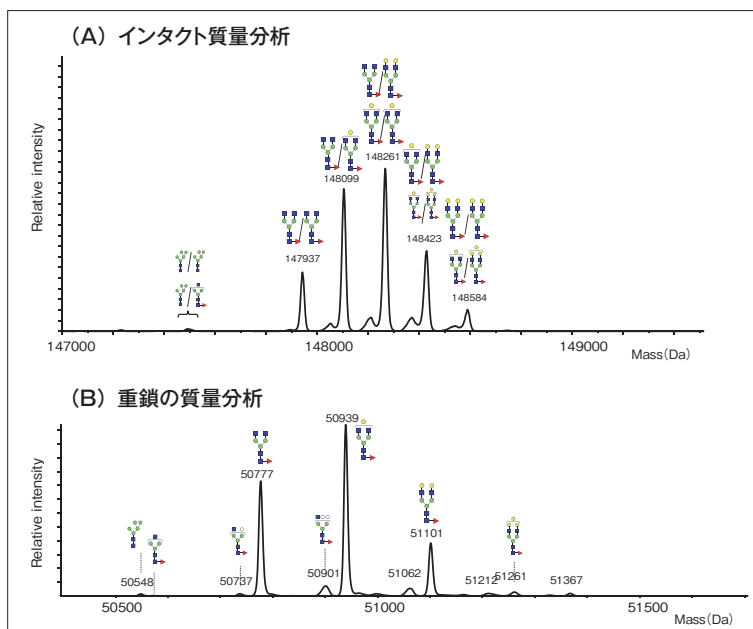


図8 抗体医薬品のグリコフォーム分析

マウスミエローマ細胞を使用して製造された抗体医薬品を分析した。

うにすることが、バイオ後続品の開発における課題の一つとなっている。しかし、糖鎖プロファイルが同一の医薬品を開発することは非常に困難である^{58), 60), 61)}。そこで、糖鎖修飾の違いについて考察し、有効性・安全性に与える糖鎖構造の特徴を明らかにし、糖鎖修飾のあるべき範囲を独自に設定することになる。

7 日米欧の各薬局方における糖鎖試験法

各局の糖鎖試験法の構成を図9に示す。日本薬局方では、糖鎖試験法の要件と試験法設定に有用な関連情報として、**一般試験法〈2.64〉糖鎖試験法、および参考情報「単糖分析およびオリゴ糖分析／糖鎖プロファイル法」**が記載されている。これらは、欧州薬局方 2.259 Glycan analysis of glycoproteins、および米国薬局方〈1084〉Glycoprotein and glycan analysis – general considerationsに相当するものとなっている。薬局方間で一部の記載の有無および記載の程度に違いがあるものの、糖鎖の特性解析および糖鎖試験設定に有用と考えられる事項、考慮すべき事項は示されており、考え方に大きな違いはない。日本薬局方参考情報において、単糖分析の有用な酸加水分解条件が記載されていることを除き、日本薬局方および欧州薬局方

には試験手順に関する記載はないが、米国薬局方では別に、一般試験法〈210〉Monosaccharide analysis、および〈212〉Oligosaccharide analysisが設定され、〈210〉では、シアル酸定量としてHPAEC/PADならびにDMB誘導体化LC/FLの分析手順が、〈212〉では、N-結合型糖鎖プロファイル法として、2-AB誘導体化およびHPAEC/FL、2-AB誘導体化およびHILIC/FL、ならびにAPTS誘導体化およびCE/LIFの分析手順が記載されている。〈212〉の分析手順は、抗体、リボヌクレアーゼB、フェチュインまたは α 1酸性糖タンパク質由来のN-結合型糖鎖に対してバリデートされており、最初に検討すべき条件として位置づけられ、個々の製品で検証後、または、最適化妥当性確認後、試験として使用することになる。しかしながら、糖鎖プロファイル法には多くの変法があるが、限られた方法しか記載されていないことから、今後の薬局方における分析法の記載の拡充が期待される。

本節は、「PHARM TECH JAPAN」に掲載された総説(原園景, 橋本則貴, 木吉真人, 石井明子・著)⁶²⁾をもとに改変したものである。