# 日本医療研究開発機構　　創薬基盤推進研究事業
# 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：先端的バイオ医薬品の最適な実用化促進のための CMC 分野における創薬基盤技術の高度化に関する研究

Studies on advanced technologies in CMC field of innovative biopharmaceuticals to promote their efficient development

研究開発実施期間：令和 4 年 4 月 15 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：石井明子

Akiko Ishii-Watabe

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals, Director

## II 研究開発の概要

本研究では、先端的バイオ医薬品の最適な実用化を促進するための CMC 領域における創薬基盤技術として、製薬企業からのニーズ調査に基づき、バイオ創薬の過程で特に問題となる不純物である(1)タンパク質凝集体／不溶性微粒子及び(2)宿主細胞由来タンパク質の評価法、並びに、有効成分に関連した特性の評価法として(3)高分解能質量分析を用いたインタクト分析法及び(4)新規標識試薬を用いた O 結合型糖鎖解析法に焦点をあて、各品質特性評価技術の開発・標準化を行った。加えて、分析法開発において今後、国際的に標準的に活用されると見込まれる分析法 Quality by Design (QbD)に関するケーススタディを行い、実装に向けた留意点をまとめた。以下に、各課題の成果を記す。

(1)タンパク質凝集体／不溶性微粒子評価法

先端的バイオ医薬品の品質確保のために適切な管理戦略を構築するには、製造工程中や保存中に生じる凝集体及び不溶性微粒子の特性、例えばサイズ、分布、粒子数、形状及び由来を詳細に解析する必要がある。本研究では、サブミクロン～ミクロン領域の微粒子の高度測定技術の開発・標準化を行い、管理戦略構築に必要な技術要件を明確化することを目的に、i）サブミクロン領域の微粒子を対象とした 3 次元ホモダイン光検出（3D-HLD）法の開発、ii）分光学的手法を使ったミクロン領域の微粒子の評価法の確立、iii）SI トレーサブルな新規粒子標準試料を使った精度管理の高度化を試みた。

i) 3D-HLD 法：従来は評価が困難であったサブミクロン粒子の評価法確立を目指し、1 年目に適切な検体量や

測定体積などに関する検討を行い、標準測定プロトコルを作成した。確立したプロトコルに従ってモデル凝集体試料を測定し、サブミクロン粒子濃度について良好な直線性および再現性が得られることを確認した。2 年目は、市販バイオ医薬品 9 種類を、サブミクロン粒子を対象とした 3D-HLD 法とナノ粒子トラッキング解析（NTA）法、およびミクロン粒子を対象としたフローイメージング（FI）法を用いて測定した。その結果、3D-HLD 法で得られる結果は、NTA 法および FI 法で得られる結果と高い相関を示した。3 年目は、プレフィルドシリンジ製剤で問題となるシリコン油滴の検出について定量性を評価した。これにより、3D-HLD 法はタンパク質凝集体だけでなくシリコン油滴も定量可能であることが示された。これらの結果から、3D-HLD 法はバイオ医薬品に含まれるサブミクロン粒子の定量法として利用可能であることが示された。

ii) ミクロン領域の評価法 : ラマン分光法を対象に、モデル凝集体や市販製剤を凝集体及び不溶性微粒子の分析条件及び解析方法の最適化を行った。各機関で構築された評価法を使って、不溶性異物の原因分析における測定・解析時の留意点の抽出を目的とした多機関共同測定を行った。共通試料として、モデル凝集体試料の他、ポリスチレン標準粒子やホウケイ酸ガラス粒子などを測定したところ、粒子の厚みの薄い凝集体ではスペクトルの取得が難しいこと、シリコン油滴の明確なスペクトルが得られないケースが認められ、観察試料の調製方法などに課題があることが分かった。

iii) 新規標準試料 : 2 種類の新規標準試料、試料 A 及び試料 B について、それぞれ FI 法及び NTA 法で測定したところ、いずれの試料も粒子径の代表値は SI トレーサブル粒子分布法で値付けされた粒径とほぼ同じであり、バイオ医薬品の粒子計測で用いられる分析法に適用できることを確認した。システム適合性試験（SST）における活用可能性については、試料 A は FI 法の粒子径と粒子数濃度の計測における再現性の確保に、試料 B は NTA 法の粒子径の計測における再現性の確保に、それぞれ有望であることを示した。また、従来の標準ポリスチレン（PS）粒子との比較解析から、試料 A と試料 B がいずれも標準 PS 粒子に比べて粒径分布幅や粒子径測定の併行精度の点で優位性を有することを実証した。以上の検討により、新規標準試料の技術仕様を定量的に確定すると共に、従来の標準 PSL 粒子に対して SST 活用の点で充分な互換性と優位性を有することを明らかにした。そこで次に、これら新規標準試料の多機関共同測定を行った。試料 A について FI 法と光遮蔽法で測定したところ、全体的に新規標準試料の光学的特性が反映された結果が得られた。また、試料 A の特性値が得られるよう各機関で測定パラメータを調節することで、粒子径や粒子濃度について機関間差を小さくできることが分かった。試料 B については、動的光散乱法で測定し、10 mM NaCl で分散した場合は、全ての機関で値付けされた値の範囲内の粒子径が得られることを明らかにした。さらに、試料 B を粘度や屈折率の高い溶媒に分散して分析法を検討することで、実試料の分析で生じる測定上の問題を解決するのに役立つ情報が得られることを示した。以上の結果から、新規標準試料は、バイオ医薬品製剤に含まれる微粒子計測の精度管理の高度化に有用と考えられた。

最終年度において、i)～iii)の検討結果と、アンケートを使った実態調査結果を踏まえ、凝集体及び不溶性微粒子の管理戦略構築に関する考え方を文書にまとめた（AAPS J, 2025,27,75）

(2)宿主細胞由来タンパク質（HCP）の評価法

バイオ医薬品の不純物である HCP を網羅的に同定・定量する評価技術として液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）を用いたプロテオミクス解析技術について検討し、以下の成果を得た。

i) HCP 測定に適した試料調製技術についてモデル試料の測定結果を評価した結果、各 HCP の回収率やイオンサプレッションの解消率に差異があるため、測定対象となる試料や評価目的に適した試料調製技術を選択する必要があることを明らかにした。

ii) New Peak Detection 法を活用した網羅的な HCP 測定技術についてモデル試料を用いて検討した結果、製造中間

体も含めた HCP 及び目的物質に由来するペプチドの解析結果を含めるなど、より網羅的なイオンライブラリの作成が重要であること、また、モデル HCP を用いた解析結果を踏まえた判定条件の策定が必要であることを明らかにした。

iii) 本研究の成果や海外における研究報告等を参考に、LC/MS を用いた HCP 分析技術を工程内試験あるいは規格及び試験方法として実装するための要点について整理した文書を作成した。

(3)高分解能質量分析を用いたインタクト分析法

トラスツズマブをモデル試料として、各種電荷プロファイル法、LC/MS を用いたペプチドマップ法及びインタクト MS の分析条件の最適化を行い、それぞれの分析法間の比較を行った。キャピラリー等電点電気泳動（cIEF）においては、検出手法がイメージングと移送で電荷プロファイルに少し差がある傾向があったものの、装置タイプ内では同様の結果が得られた。イオン交換クロマトグラフィ（IEX）において、塩グラジエントと pH グラジエントで同様の電荷プロファイルが得られること、cIEF では IEX より酸性バリアント（%）が多い傾向があることを確認した。トラスツズマブを各種条件で強制劣化させ、ペプチドマップ分析を行ったところ、中性及びアルカリ処理において、主に軽鎖 N30 の脱アミド化及び重鎖 D102 のイソアスパラギン酸形成が生じることを確認した。pH グラジエント IEX から推測された軽鎖 N30 脱アミド化、重鎖 isoD102 形成の修飾率(%)と、ペプチドマップで得られた修飾率（%）を比較したところ良好な相関が得られ、両方法の結果は概ね相関することを確認した。インタクト MS においては主要なグリコフォームについては概ね評価可能であること、ノイズの少ないマススペクトルがその後のデータ解析において重要であること及び適切なデコンボリューションパラメーターの設定方法を確認した。以上により、各種インタクト分析法における分析法の最適化を行い、実施における留意事項をまとめた。

(4)新規標識試薬を用いた O 結合型糖鎖解析法

本研究は、O 結合型糖鎖の迅速かつ高感度な検出法の開発を目的として実施した。従来の O 型糖鎖分析法では、糖鎖の Peeling 反応による分解や過剰試薬の除去操作の煩雑さ、さらには感度の低さといった課題が存在した。そこで本研究では、Peeling 反応を抑制し、かつ高感度で抽出操作不要な蛍光性糖鎖標識試薬を新たに設計することにより、これらの課題を克服することを目指した。

着目したのは、1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone（PMP）が還元末端糖と定量的に反応する特性と、ピレンが分子間で近接したときにのみ発する長波長のエキシマー蛍光である。このエキシマー蛍光は、未反応のピレンが示すモノマー蛍光とは異なる波長で観測されるため、糖と反応したか否かを蛍光の違いで識別できる点が利点である。そこで、PMP とピレンをアルキル鎖で連結した新規標識化合物 MPPP（C3）を設計し、さらにアルキル鎖の長さを変化させた誘導体（C1～C11）やリンカー部分に様々な官能基を導入した化合物も合成した。

これらの試薬と GalNAc を NaOH 存在下、70℃で反応させたところ、LC-MS により糖との反応生成物を確認することができ、またエキシマー蛍光も観察された。未反応試薬はモノマー蛍光を示し、生成物はエキシマー蛍光を示すことが明確に区別できた点は、感度と選択性の両面で大きな進展であった。さらに、蛍光強度がアルキル鎖の長さに依存することも明らかとなり、分子設計と蛍光応答性の関係性が初めて系統的に評価された。

以上の成果をもとに、本試薬群は新規蛍光性糖鎖標識試薬としての有用性が認められ、参画企業と共同で特許出願を行った（特開 2024-063770）。

(5)分析法 QbD

分析法 QbD の活用を通じた品質管理の高度化の一環として、分析法 QbD を利用したバイオ医薬品の分析法開発の具体例を示すことを目的に、目標分析プロファイル（ATP）設定とリスクアセスメントを中心にケーススタディを行った。ATP 設定に関しては、バイオ医薬品の品質特性のうち代表的なものとして、高分子量体・断片体、HCP、生物活性を対象として取り上げた。各品質特性の測定に用いる分析技術として、高分子量体・断片体についてはサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、HCP については HCP 総量の定量を目的とした酵素免疫測定法（ELISA）、生物活性については結合 ELISA を選択した。リスクマネジメントに関しては、各分析法について、分析法操作パラメータの抽出、CNX 分類及び欠陥モード影響解析を用いたリスクスコア付けを行い、リスクの高いパラメータについてリスク低減策を講じ、再度リスク評価を行った結果を示した。ICH Q14 付属書に示された事例等では主に承認申請時を想定した記載がなされているのに対し、本ケーススタディでは開発初期からの検討事項を考慮した点が特徴である。ケーススタディを通じて作成した事例について、解説と共に総説を作成した。

In this study, based on the survey for pharmaceutical companies, four types of innovative technologies used in CMC field of biopharmaceuticals (*i.e.*, evaluation of protein aggregates, HCP, O-glycan, and intact analysis method) were developed to promote the efficient development of next-generation biopharmaceuticals. Examples for implementation of analytical QbD approach for biopharmaceuticals were also created.

(1)Evaluation of Protein Aggregates/Subvisible Particles

In this study, we attempted to: i) develop a three-dimensional homodyne light detection (3D-HLD) method for particles in the submicron range, ii) establish an evaluation method for particles in the micron range using spectroscopic techniques, and iii) improve precision management using new SI-traceable particle standard samples.

i) 3D-HLD: To establish a method for evaluating submicron particles quantitatively, which have been difficult to evaluate in the past, we established a standard measurement protocol and measured several commercial drug products. The 3D-HLD measurement results of commercial drug products corelated with those obtained by NTA and FI methods, which indicates that the 3D-HLD method is useful as a quantitative method in the submicron range.

ii) Micron range evaluation: Issues and points to note when measuring and analyzing insoluble foreign matters were identified, such as the difficulty of obtaining spectra from thin aggregates of particles and preparing the observation samples, such as the filters used by conducting a multi-laboratory evaluation mainly with microscopic Raman and microscopic FT-IR.

iii) New standard particles: We developed two types of new standard particles, and showed the superiority over existing standard particles in terms of particle distribution as well as repeatability. The results of multi-laboratory measurements indicated that using the new standard particle could reduce the differences among laboratories, and that measuring the new standard particles dispersed in higher viscosity and refractive index solution could bring information to solve the problems occurred in the actual sample measurement. Our results indicate that the new standard particles are useful for improving the accuracy control of particle measurement in biopharmaceutical preparations.

(2) Evaluation of host cell proteins (HCP) analysis

A study was conducted to apply proteomic analysis using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) for HCP analysis, and the following results were obtained. i) Selecting the appropriate sample preparation technique for HCP analysis requires consideration of the sample to be measured and the purpose of evaluation. ii) It is necessary to prepare a more comprehensive ion library for the proper implementation of New Peak Detection workflow and establish the acceptance criteria for selecting new peaks using model HCPs. iii) Based on the results of this study, a document was prepared on the key points for performing HCP analysis using LC/MS as the test method.

(3) Intact analysis methods utilizing high-resolution mass spectrometry

Using trastuzumab as a model, analytical conditions were optimized for charge profiling, peptide mapping using LC/MS, and intact MS. Comparisons were conducted across the analytical methods. In capillary isoelectric focusing (cIEF), while slight differences in charge profiles were observed between imaging and conventional cIEF, similar results were obtained within the same equipment type. For ion exchange chromatography (IEX), comparable charge profiles were obtained by both salt- and pH-gradient IEX. cIEF tended to show a higher percentage of acidic variants compared to IEX. Forced degradation of trastuzumab under various conditions revealed that deamidation of light chain N30 and isoD formation of heavy chain D102 primarily occurred under neutral and alkaline treatments. When modification rates (%) of light chain N30 deamidation

and heavy chain isoD102 formation, estimated from pH-gradient IEX, were compared with those obtained by peptide mapping, strong correlation was observed. In intact MS, major glycoforms were able to be reliably evaluated. For data analysis, it was confirmed that low noise in mass spectra and setting appropriate deconvolution parameters were important.

(4) Development of a fluorescent glycan labeling reagent using excimer fluorescence

This study developed a novel fluorescent labeling reagent for O-linked glycans, addressing issues with peeling reactions and low sensitivity in conventional methods. By combining PMP's reactivity with sugars and pyrene's excimer fluorescence, the researchers designed MPPP compounds that differentiate unreacted and labeled species via distinct fluorescence. Reactions with GalNAc confirmed excimer fluorescence and product formation by LC/MS. The fluorescence intensity varied with alkyl chain length, revealing structure–function relationships.

(5) Analytical QbD

As part of the advancement of quality control through the use of analytical QbD, we conducted case studies focusing on target analytical profile (ATP) setting and risk assessment to show specific examples of analytical procedure development for biopharmaceuticals. Regarding ATP setting, we focused on high molecular weight species/fragment, HCP, and biological activity as representative quality attributes of biopharmaceuticals. As analytical techniques to measure each quality attribute, size exclusion chromatography was selected for high molecular weight/fragment, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the total amount of HCP for HCP, and binding ELISA for biological activity were selected. A review for implementation of analytical QbD with interpretation of each step on the examples was created.