

日本医療研究開発機構  
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
(国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術開発)  
事後成果報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）次世代抗体医薬品の実用化に向けた品質評価及び管理手法に関する技術的研究  
（英語）Technical research on quality evaluation and control methods for the practical application of next-generation antibody drugs.

研究開発実施期間：令和 3 年 7 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）石井明子  
（英語）Akiko Ishii-Watabe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長  
（英語）National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals,  
Director

## II 研究開発の概要

近年、IgG 型の抗体に加え、二重特異性抗体、一本鎖抗体、一本鎖多価抗体、コンジュゲート抗体など、多様な構造の抗体が開発されている、また、製造技術についても、新しい細胞基材の利用や連続生産等の新技術の活用等、先端的な技術の導入が図られている。様々な構造改変による高機能化を図った次世代抗体医薬品や新規な製造技術を用いて開発される抗体の実用化には、製造工程や品質評価技術がプラットフォーム化された従来の抗体医薬品と異なり、その特徴に応じた評価技術確立が必要である。政府の統合イノベーション戦略推進会議で決定されたバイオ戦略では、抗体医薬品等に関する基礎基盤／応用、橋渡し／実用化支援に関する研究開発を推進することが述べられている他、日本製薬工業協会の政策提言では、産学官連携で推進する最先端の研究や技術の高度化が必要であるとして、クライオ電子顕微鏡を用いたタンパク質構造解析技術の高度化や超高磁場 NMR の整備が求められるなど、次世代抗体医薬品の実用化に向けた技術確立については、政府および産業界からも要請がなされている。また、医療費の高騰が問題とされているため、医療経済の観点から、先端技術の導入による低コスト製造の実現も実用化に向けた重要な課題となる。

本研究では、次世代抗体の構造や製法に関する特徴を考慮し、次世代抗体の実用化推進に貢献できる品質評価手法に関する技術的研究を行った。具体的には、(1) 品質評価手法に関する技術的研究として、①LC/MS を用いた Multi-Attribute Method (MAM) による化学構造の一斉分析法、②ラマン分光法による高濃度製剤の特性解析法、③非標識 NMR や④クライオ電顕による高次構造解析法の確立、⑤製剤処方 of 迅速評価法、⑥コンジュゲート抗体

の品質評価法の構築等に関する検討を行い、各技術開発研究を行うと共に、新技術の利用に関する考え方について規制科学的な観点も含めて検討した。また、(2)得られた成果を迅速に実用化に反映させるため、教育資材の開発を行い講習に活用した。これまでに、各分析法の開発と次世代抗体評価への応用を進め、プロジェクト内で製造された次世代抗体試料の解析を行ったことに加え、LC/MS と NMR について解析結果の相互利用による統合的解析を進める等、当初計画に沿った成果が得られた。また、日本の抗体創薬研究のこれまでの実績と、本研究課題全体の成果、創薬力強化に関する最近の国内動向等を整理し、日本の現在地と今後の課題、方向性について、総説原稿を作成し、投稿に向けた準備を進めた。以下に各課題の成果概要を示す。

## (1) 品質評価手法に関する技術的研究

### ①LC/MS

MAM 前処理の自動化：自動分注装置を用いて、還元アルキル化、脱塩、及び酵素消化等の前処理工程を自動化するとともに、従来型 IgG1 抗体を対象とした MAM のプラットフォーム技術として利用できることを確認した。

MAM 分析性能評価基準：複数 MS メーカーとの共同研究を行い、MAM 分析における LC/MS システムの変更が可能であることを明らかにした。さらに、質量精度等を評価対象とした MAM の分析性能評価基準を考案した。

次世代抗体の MAM 最適化：連携課題で創製された RI 標識用ペプチドコンジュゲート抗体及び scFv-Fc 抗体を対象として、MAM の前処理条件を最適化した。また、モニタリングする修飾ペプチドの選定方法を一般化することを目的として、脱アミド化及び酸化が生じやすいアミノ酸残基を特定するための劣化試料調製方法を考案した。

MAM 応用可能性評価：RI 標識用ペプチドコンジュゲート抗体の MAM 分析により、コンジュゲート数と酸化のしやすさに相関性がみられることを見出した。また、scFv-Fc 抗体の CDR に酸化を受けやすい Met が存在することを明らかにした。本研究結果を踏まえて、MAM を次世代抗体にも適用できることを実証した。

### ②ラマン分光法

様々な IgG 型抗体に関するラマンスペクトル測定を実施したところ、芳香族アミノ酸に由来するラマンバンドにて、高濃度条件によって生じる抗体の会合性に関するスペクトル変化が観察されることを明らかにした。さらに、これらのラマンバンド変化は、生化学バッファー条件および製剤バッファー条件においても、解析可能な安定したらスペクトルが観察された。そこで緩衝剤および添加剤の種類や濃度を検討し、様々な溶液条件下でのラマンスペクトル測定を実施し、これらを統計的に解析することで、個々の抗体に関する物性、および溶媒環境の違いによる会合性変化を定量的に評価した。その結果、高濃度条件下においても、各抗体の会合性に関する品質評価が再現性よく解析できることに成功した。さらに、この解析技術をベースに次世代型の改変抗体 scFv-Fc および scDb-Fc に対するラマン測定を実施し、ラマン分光法の汎用性について評価を行った。その結果、IgG 型抗体と比較して改変抗体は物性における不安定性が明確に観察された。このようにラマン分光法による高濃度溶液に対して抗体の品質を分析できる手法の開発に成功した。

### ③非標識 NMR

本課題は、非標識 NMR を基盤とした抗体医薬の高次構造および品質評価法の確立を目的として、5 年間にわたり研究開発を推進したものである。研究期間を通じて、リツキシマブ、トラスツズマブ、モガムリズマブをモデル抗体とし、非標識条件下における NMR 計測条件の最適化に成功した。特に、ヒト IgG1 抗体 Fc 領域に由来するメチル基 NMR 信号の完全帰属を達成し、当初設定したマイルストーンの数値目標をすべて満たした。

この成果を基盤として、Fc 糖鎖のフコースおよびガラクトース残基の違いや、メチオニン残基の酸化に伴う高次構造変化を部位特異的に検出することを可能とした。とりわけ、メチオニン酸化については、残基レベルかつ立体特異的な定量評価を初めて実現し、抗体構造変化の理解を大きく前進させた。さらに、光 CIDNP NMR を抗体解析へ導入することで、芳香族残基の溶媒露出環境を非標識条件下で高感度に評価可能であることを示した。

加えて、ヒト IgG4 抗体 Fc 領域への展開や、LC-MS をはじめとする他手法との相関解析を通じて、本手法が特定

抗体に依存しない汎用的な抗体品質評価基盤となり得ることを明らかにした。これらの成果は Journal of American Chemical Society や Analytical Chemistry などの国際的に評価の高い学術誌に発表されており、本課題において非標識 NMR を基盤とした抗体品質評価法が確立されたことを示す重要な成果である。以上より、本課題の研究開発は計画を十分に上回る進展を遂げたと総括できる。

#### ④ クライオ電顕

リツキシマブ、モガムリズマブ、トラスツズマブの3つのモデル抗体について、負染色法を用いて電子顕微鏡解析を行った。得られた二次元像から抗体医薬品のヒンジ領域の Flexibility を明らかにし、抗体 Fab と Fc との角度の定量的解析手法を確立した。さらに、CH2 ドメインは明瞭でなく Flexibility が高かったことから、本手法を用いて抗体分子のドメイン単位での Flexibility を評価できる可能性を示唆していた。抗体分子の三次元像の構築を行い、Fc が屈折した Y 字構造を示した。分子の大きさは X 線結晶構造解析の結果と合致しており、本手法によってドメインの数や向きなどの詳細な観察が可能であることが示された。これらの結果は、次世代抗体の開発で特に重要となる、製法変更前後の同等性/同質性の評価や、先行品/後続品の比較に有用である可能性を示す結果であった。抗体分子をグリッド内に氷包埋する手法を開発するため、アポフェリチン-ProteinA-抗体複合体を用いて電子顕微鏡による解析を行い、三者が複合体として共存している様子が観察できた。これまでの本次世代抗体班での取り組みに加えて、日本における抗体医薬品の承認状況や、今後の抗体医薬品の動向、課題などをまとめた総説を執筆した。

#### ⑤ 製剤処方評価

次世代抗体は、薬物などの低分子を IgG に共有結合させた ADC、低分子抗体、二重特異性抗体、等があるが、一般的に安定性が低く、凝集が生じやすい。これまでの研究から、製造中や保管中に突発的に発生する凝集には界面が関係することが明らかとなってきたことから界面での抗体の性質を反映する評価法を取り入れ、また、開発ステージと処方決定のタイムラインを考慮すると迅速な処方開発が必要である点を考慮し、開発候補の次世代抗体の製剤化条件を迅速に最適化する手法の開発に取り組んだ。次世代抗体を含む 10 種類の抗体について、処方を 12 種類変化させて 3 日程度の振とうストレスにより凝集誘導を試みた。また、全ての処方条件について、抗体の物理化学的性質として、構造安定性を反映する変性中点温度 (T<sub>m</sub>)、コロイド安定性を反映する B22、および界面安定性を反映する吸着量、を測定した。振とうストレスの結果、10 種類の抗体は、処方変化に応じて凝集が起こる抗体 (応答群) と処方を変化させても凝集がほとんど起こらない抗体 (非応答群) に分類されることを見出した。ここで、非応答群の抗体は pH や塩の選択肢が幅広く、比較的自由に処方を決定可能となることが分かった。一方、応答抗体は処方探索が必要となるが、応答群に分類される抗体は、T<sub>m</sub> を指標とした処方開発が有効であることが分かった。また、重要なことに、振とう試験での凝集体発生量と 40℃での保管試験における凝集体発生量には良い相関があった。さらに、2~8℃での保管安定性とも良い相関があった。以上、本事業を通じて、長期安定性を反映する、振とう試験を中心とした次世代抗体の迅速製剤処方評価法の開発に成功した。

#### ⑥ コンジュゲート抗体

コンジュゲート抗体は一般に薬物等の搭載数/搭載部位が不均一であり、そのプロファイルが抗体の動態、安定性等に影響し、品質管理が困難となる場合がある。そのような背景から、薬物等の搭載数/搭載部位を均一化したコンジュゲート抗体の作製法が研究されており、薬物修飾部位の違いがコンジュゲート抗体の有効性などに影響する可能性が報告されている。しかしながら、部位特異的な薬物修飾がコンジュゲート抗体の品質に及ぼす影響は理解が十分ではなく、評価すべき点や評価方法も確立されていない。本研究では、低分子化合物を搭載した抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugates, ADCs)、及び低分子化合物と異なる特性を有する分子 (ポリ糖鎖) を搭載したコンジュゲート抗体 (lysosome-targeting chimaeras, LYTACs) に関し、搭載部位を均一化したコンジュゲート抗体を作成し、搭載分子×修飾部位の違いがコンジュゲート抗体の特性に与える影響の評価を試みた。

検討の結果、ADC の品質特性にリンカー構造と修飾部位の組み合わせが影響すること (Aoyama M et al. *Bioconjug. Chem.* 2024)、生物活性などの一部の品質特性に関して、ADCs と LYTACs で部位特異的修飾による影響が異なることを明らかとした。

#### ⑦次世代抗体試料の提供

次世代バイオ医薬品製造技術研究組合 (MAB 組合) が参画する本プロジェクトの他課題との連携により、臨床試験を目指した従来型抗体、次世代抗体の中から提供可能な形態の次世代抗体もしくはその中間産物を CHO-MK 細胞で製造し、品質評価に用いる試料として評価機関に提供した。また MAB 組合が参画する国産細胞課題との連携において、CHO-MK 細胞との比較を実施する目的として、標準細胞として米国 NIST が開発、販売する NISTCHO 細胞を入手し、培養して作成したリサーチセルバンクの一部を大阪集中研に提供した。

#### (2) ホワイトペーパーや教育資材の作成と活用

##### ・ ホワイトペーパー

国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術としてプロジェクトで取り組んでいる細胞基材の効率的な実用化に貢献するため、バイオ医薬品の製造に用いる細胞基材の樹立に関する留意事項、特に、近年、議論されている細胞基材のクローナリティ及び産生物のシークエンスバリエーションの評価方法及び管理の考え方について留意すべき事項を取りまとめ、日本 PDA 学術誌 GMP とバリデーションで公表した。また、創薬技術全般におけるデジタル技術の進展を踏まえ、CMC 分野を中心に欧米規制当局の対応状況を調査し、本邦における今後の課題を考察し、化学工学誌で公表した。さらに、日本における次世代抗体医薬品を含む抗体医薬品の開発承認状況と、本研究課題での取り組みにより得られた成果全般について、海外学術誌に投稿予定の総説原稿を作成した。

##### ・ 教育資材の作成と活用

本課題を担当する神戸大学では、教材の作成を主体に、BCRET では、講習の実施を主体に連携して活動した。本プロジェクトの各研究を参考に国内外の次世代抗体医薬品に関する製造方法及び品質評価手法についての情報・ニーズ調査等を行い、①「ADC 抗体」と②「多重多価抗体」及び③「バイオ医薬品の製剤化」に関する教材・実習プログラムを作成した。①と③は社会実装し、製薬会社の社員を中心に実習講習を①は 3 回、③は 1 回実施した。①では、ペイロードに毒物を使用する代わりに蛍光物質を用いて安全に実習を行えるようにした。③では、バッファーや保管条件による多量体化や微粒子の生成を分析機器で検出確認できるのが特徴。「品質評価法に関する検討」チームで構築された次世代抗体医薬品の評価方法や「次世代抗体試料の調製」チームで得られた製造工程に関する知見は、直ぐに教材作成に反映すべき内容は多くなかったが、今後、精査して教材として活用する。

#### **Technical research on quality evaluation and control methods for the practical application of next-generation antibody drugs.**

In this study, considering the characteristics and manufacturing processes of next-generation antibodies, we conducted technical research on quality evaluation methods to facilitate their practical application. In addition, to ensure the prompt reflection of our findings in practical use, we developed educational materials and utilized them in training sessions.

#### **Technical research on analytical procedures of next generation mAbs**

##### ① LC/MS

We successfully established an automated sample preparation system for MAM analysis. Our system can also be used as a platform technology for MAM analysis of IgG-type mAbs. A collaborative study with

MS vendors showed sufficient compatibility among their LC/MS systems. Based on our analytical data, we proposed acceptance criteria of analytical performance for MAM analysis. In addition, the MAM analysis using our system was applicable to next generation antibodies containing peptide-conjugated mAb.

### ② Raman spectroscopy

Raman spectroscopy measurements were performed on various IgG antibodies, revealing spectral changes in the Raman bands derived from aromatic amino acids that are associated with antibody association under high-concentration conditions. In addition, we succeeded in reproducibly analyzing the quality assessment of each antibody's association even under high-concentration conditions. Furthermore, based on this analytical technique, Raman measurements were performed on next-generation modified antibodies, scFv-Fc and scDb-Fc, to evaluate the versatility of Raman spectroscopy. The results clearly demonstrated that, compared to IgG-type antibodies, the modified antibodies exhibited instability in their physical properties.

### ③ Unlabeled NMR

This project aimed to establish unlabeled NMR-based methods for higher order structural characterization and quality evaluation of antibody therapeutics over a five year research period. Using rituximab, trastuzumab, and mogamulizumab as model antibodies, NMR measurement conditions under unlabeled conditions were successfully optimized. In particular, complete assignment of methyl NMR signals from the Fc region of human IgG1 antibodies was achieved, fulfilling all predefined milestone targets.

Based on these results, the method enabled site specific detection of higher order structural changes caused by differences in Fc glycan fucosylation and galactosylation, as well as methionine oxidation. Notably, residue level and stereospecific quantitative evaluation of methionine oxidation was realized for the first time, greatly advancing the understanding of antibody structural changes. Furthermore, the introduction of photo CIDNP NMR demonstrated that solvent exposure of aromatic residues can be sensitively evaluated under unlabeled conditions.

In addition, expansion to the Fc region of human IgG4 antibodies and correlation analyses with LC-MS and other techniques revealed that this approach can serve as a generic antibody quality evaluation platform independent of specific antibody species. These achievements, published in leading journals such as the Journal of the American Chemical Society and Analytical Chemistry, demonstrate that this project established a robust unlabeled NMR-based methodology, with progress exceeding the original research plan.

### ④ Cryo-electron microscopy

Using the negative staining method, we revealed the flexibility of the hinge region, and CH2 domain. Also, we established a quantitative approach to measure the angles between Fab and Fc domains. The constructed 3D structure demonstrated a bent Y-shaped conformation of a whole antibody, suggesting that our approach may be useful for evaluating comparability before and after manufacturing process changes, as well as for similarity between reference products and biosimilar products, which are particularly important in the development of next-generation antibody therapeutics. In addition, we prepared a comprehensive review summarizing the efforts in this next-generation antibody research

group and future perspectives regarding antibody therapeutics in Japan.

#### ⑤ Rapid method for formulation development

Next-generation antibodies, including ADCs, antibody fragments, and bispecific antibodies, often show high agitation-induced aggregation propensity. We developed a rapid formulation optimization strategy for such candidates. Ten antibodies, including next-generation formats, were evaluated under 12 different formulation conditions. Aggregation propensity was assessed after short-term agitation stress. The antibodies were categorized into two groups based on their sensitivity to formulation changes. The non-responsive group was insensitive to formulation conditions and could be formulated with a relatively high degree of freedom. The responsive group showed marked formulation-dependent aggregation and required more careful screening. For the responsive group, conformational stability represented by  $T_m$  was an effective indicator for formulation development. Importantly, aggregate formation after agitation correlated well with that after quiescent storage at 40 ° C. These results support a rapid formulation optimization strategy centered on agitation testing.

#### ⑥ Conjugated antibody

We generated the site-specific antibody-drug conjugates (ADCs) and site-specific poly-glycan conjugates (lysosome-targeting chimeras, LYTACs) with different linker structures and different conjugation sites, and evaluated the impact of conjugation sites on their characteristics. Our data revealed that combination of conjugation site and linker structures affected their characteristics, and the impacts of conjugation sites on their characteristics including biological functions were different between ADCs and LYTACs.

#### ⑦ Manufacturing of engineered mAb samples

For other researchers in this project, the MAB association has provided next-generation antibodies or their intermediates aiming at clinical trials using original CHO-MK cells. In addition, NIST-CHO cells developed by NIST were obtained as standard cells for comparison with original cells, and the RCB was provided to the MAB Osaka Intensive Research Center.

(2) Preparation of white papers and educational materials and their application for training

- White Paper

We have summarized and published the key considerations, including regulatory requirements, for the establishment of cell substrates used in the manufacturing of next-generation antibody therapeutics. This summary incorporates technological advancements made since the ICH Q5B and Q5D guidelines. Furthermore, in light of progress in digital technology, we have identified and published challenges regarding the manufacturing and quality control of next-generation antibodies and other biopharmaceuticals. Currently, we are drafting a review article that summarizes the development and approval of antibody therapeutics in Japan alongside the initiatives undertaken by this research group.

- Development of educational program and their application

Kobe University and BCRET collaborated to develop educational programs for next-generation

biopharmaceuticals, focusing on material creation and practical training. Based on global manufacturing and quality assessment surveys, we established curricula for ADCs, multispecific antibodies, and biopharmaceutical formulation. Notably, the ADC training utilized fluorescent substances instead of toxic payloads for safety.