

Xevo™ G3 QToF プラットホームでのバイオシ ミラーモノクローナル抗体医薬品の比較へのペ プチドマッピングおよびマルチ特性分析（ MAM）ワークフローの適用

Kellen DeLaney, Samantha Ippoliti, Lisa Reid, Owen Cornwell, Ying Qing Yu, Emma Harry, Mark Towers

Waters Corporation

要約

バイオシミラーモノクローナル抗体（mAb）がますます注目される中で、このような製品の特性解析プロセスの効率化が強く望まれています。急速に成長する市場において、確信を持ってペプチド特性の特定および定量が行えるデータを得られる装置や、規制に対応しつつ分析を加速し、自動化できるデータ解析パイプラインが、結果を得るのに不可欠です。新規の Xevo G3 QToF プラットホームに ACQUITY™ Premier UPLC™ システムを組み合わせることで、頑健で信頼性の高いバイオ医薬品タンパク質の分析が可能になります。アプリベースの規制対応 waters_connect™ インフォマテイクスプラットフォームにより、取り込みから分析まで合理化されたデータ管理が実現します。このような統合ツールにより、特性解析や特性モニタリングなど、効率的なバイオ医薬品ワークフローの開発が可能になります。

この試験では、バイオシミラーモノクローナル抗体の特性解析およびモニタリングに waters_connect と Xevo G3 QToF を組み合わせて使用できることを実証しています。4 種のインフリキシマブサンプル（イノベーターおよび 3 種のバイオシミラーを含む）の脱アミド化、酸化、リジンクリッピング、グリコシル化などの製品特性を調べるため、これらのサンプルのペプチドマップを分析しました。規制対応 waters_connect ソフトウェア内の Peptide MAM アプリを使用して、各モノクローナル抗体間の相対存在量の差異を定量しました。イノベーターおよびバイオシミラー 1 種について、ターゲット特性についての苛酷試験も実施し、各モノクローナル抗体の熱ストレスに対する重要品質特性（

CQA) を特定しました。得られた結果から、waters_connect によるデータ取り込みおよび解析を組み込んだ Xevo G3 QToF プラットホームが、モノクローナル抗体の生物学的類似性を確立するためのペプチドマッピングによる比較ワークフローに適したプラットフォームであることがわかりました。

アプリケーションのメリット

- イノベーターおよびバイオシミラーモノクローナル抗体のカバー率の高いペプチドマッピングおよび信頼性の高いペプチド特性の特定および定量
- ペプチドマッピングデータの取り込み、解析、レビューの効率化のための規制対応アプリベースの統合ワークフロー
- 生物学的類似性を確立するための、低濃度ペプチド特性の再現性の高い定量

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) の特許切れに伴い、規制機関によりますます多くのバイオシミラー製品が承認されています。競争が激しくなるバイオシミラー医薬品の市場において、バイオシミラーをイノベーター医薬品と比較して特性解析するプロセスの効率化が求められています。バイオシミラーの特性解析には、安全性、有効性、安定性の鍵となるさまざまな製品特性を確信を持って同定および定量できるワークフローが必要になります。バイオシミラー製品はイノベーター製品の有効成分と非常に類似していますが、臨床的に有意な影響が生じない限り、製造法の違いによる特性の違いがある可能性があります。バイオシミラーの特性解析および比較のための代表的な手段の1つとして、ペプチドマッピングを使用した翻訳後修飾の分析が挙げられます。モノクローナル抗体の酵素消化および液体クロマトグラフィー (LC) 質量分析 (MS) によるペプチドフラグメントの分析により、一次配列の確認およびプロダクトのばらつきがある部位の特定が行えます。データ解析に関して、従来の特性解析アプローチよりもハイスループットな、複数のサンプルにわたってターゲット特性の定量を行うマルチ特性分析 (MAM) の人気がますます高まっています。個別の特性に対して複数の補完性のある分析手法を用いる代わりに、MAMにより、LC-MSを使用して、複数のサンプルにわたって多数の特性を直接モニターできます¹。

Xevo G3 QToF 質量分析計を waters_connect インフォマティクスプラットフォームで動作させることで (図 1)、バイオ医薬品ワークフローを実行するための効率化されたソリューションになります。Xevo G3 QToF は、新しくなったイオン光学系により、ペプチドの移送および包括的な定量機能が最適化されており、バイオ医薬品の特性解析およびモニタリングのいずれにおいても目的に適合しています。規制対応した waters_connect プラットホームで、サンプル登録からデータ解析およびレビューに至るまでのワークフロー全体を処理でき、統合された UNIFI™ アプリ (ペプチドマッピング)、サイエン斯拉イブラリー (特性ライブラリー)、Peptide MAM アプリ (ターゲット特性モニタリングおよび

び新規ピーク検出)により、特性解析およびモニタリングワークフローのシームレスな統合が可能になります。この試験では、インフリキシマブおよび3種のバイオシミラー医薬品 (Inflectra®、Avsola®、Renflexis®) のペプチドマップ特性解析およびモニタリングにおけるこの統合ワークフローの有効性を実証しています。ペプチドマップを4種のモノクローナル抗体について比較して重要品質特性 (CQA) を同定し、苛酷試験においてイノベーターおよびバイオシミラー1種をモニターして、再現性のよい結果が得られました。



図 1. Xevo G3 QToF プラットホームおよび規制対応したアプリベースのデータ取り込み、解析、レビュー、レポート作成のための統合型 *waters_connect* インフォマティクス

実験方法

サンプルの説明

イノベーター (Remicade®) およびバイオシミラー (Inflectra) を含むインフリキシマブのサンプルを、37 °C で0週間 (ストレスなし)、1週間、または2週間インキュベートしました。他の2種のバイオシミラー (Avsola および Renflexis) を含むすべてのサンプルを、還元、アルキル化、脱塩、トリプシン消化し、0.1% ギ酸で酸性にしました。最終濃度は 0.16 µg/µL と測定されました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY Premier UPLCシステム-BSM 設定
検出:	ACQUITY Premier TUV、10 mm 分析フローセル、 $\lambda = 214 \text{ nm}$
バイアル:	MaxPeak™ HPS を採用した QuanRecovery™ バイアル (製品番号: 186009186)
カラム:	ACQUITY Premier CSH™ 130 Å C18 1.7 μm 、2.1 × 100 mm
カラム温度:	60 °C
サンプル温度:	8 °C
注入量:	2 μL
流速:	0.200 mL/分
移動相 A:	0.1% ギ酸水溶液 (LC-MS グレード)
移動相 B:	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液 (LC-MS グレード)
グラジエント:	50 分で 1 ~ 35 %B のグラジエント (合計実行時間 80 分)

MS 条件

MS システム:	Xevo G3 QTof
イオン化モード:	ESI+
取り込み範囲:	m/z 100 ~ 2000

キャピラリー電圧:	2.2 kV
コリジョンエネルギー:	低エネルギー: 6 V 高エネルギーランプ: 20 ~ 50 V
コーン電圧:	20 V
イオン源温度:	120 °C
脱溶媒温度:	350 °C
コーンガス:	35 L/時間
脱溶媒ガス:	600 L/時間
インテリジェントデータキャプチャー (IDC) :	低 (5)

データ管理

データの取り込みおよび解析には、UNIFI アプリ (バージョン 1.9.12.7) およびPeptide MAM アプリ (バージョン 1.0.0.3) を搭載した waters_connect インフォマティクス (バージョン 2.1.1.13) を使用しました。

結果および考察

バイオシミラーのイノベーター製品との同等性を保証するには、徹底的な特性解析が不可欠です。今回、インフリキシマブおよび承認済みバイオシミラーの厳密な同等性分析に、統合型 waters_connect プラットホームで動作する Xevo G3 QTof が適していることを実証しました。それぞれのバイオシミラーはイノベーターと同一のアミノ酸配列を有しますが、プロダクトバリエーションのプロファイルにおける差が、医薬品の安全性、安定性、有効性に影響を及ぼす可能性があります。

バイオシミラー間の差についての情報を得るために、各インフリキシマブ製品のペプチドマップを比較しました。トリプシン消化サンプルを、ACQUITY Premier UPLC と組み合わせた Xevo G3 QTof で、MS^E データインディペンデントフラグメンテーションを使用して分析し、ペプチドを同定して修飾部位を特定しました。waters_connect 内の UNIFI

アプリのペプチドマッピングワークフローにより、4種のインフリキシマブ製品それぞれについて、質量誤差 5 ppm 未満で 95% を超えるシーケンスカバー率が達成できました。さらに、注入間再現性が優れていることが実証され、ピーク強度の相対標準偏差は 5% 未満でした。この優れた再現性が図 2A に見られ、Remicade の 3 回繰り返し注入の重ね描きクロマトグラムはほぼ完全に重なっています。

図 2B からわかるように、それぞれのモノクローナル抗体サンプルのクロマトグラムは非常に類似していますが、プロダクトバリエーションの相対存在量には顕著な差が観察されました。4 製品にわたって 47 箇所の修飾が特定されました。これには、6 箇所の酸化、12 箇所の脱アミド化、28 箇所の N-グリコシル化、そして C 末端リジンの切断が含まれます。ペプチドのネイティブ型および酸化型について、高エネルギー MS^E スペクトルの例を図 3 に示します。割り当てられたフラグメントイオンの高いカバー率により、信頼性の高いペプチドの同定、および y イオン系列から明らかのように、メチオニン中の修飾部位の特定が可能になっています。waters_connect 中の Peptide MAM アプリを使用して、修飾の相対存在量の差が定量されました。このソフトウェアにより、waters_connect エコシステム内に留まったままで、複数のサンプルにわたる UNIFI アプリのペプチドマッピングワークフローで特定された製品品質特性のリストのターゲット定量が可能になります。

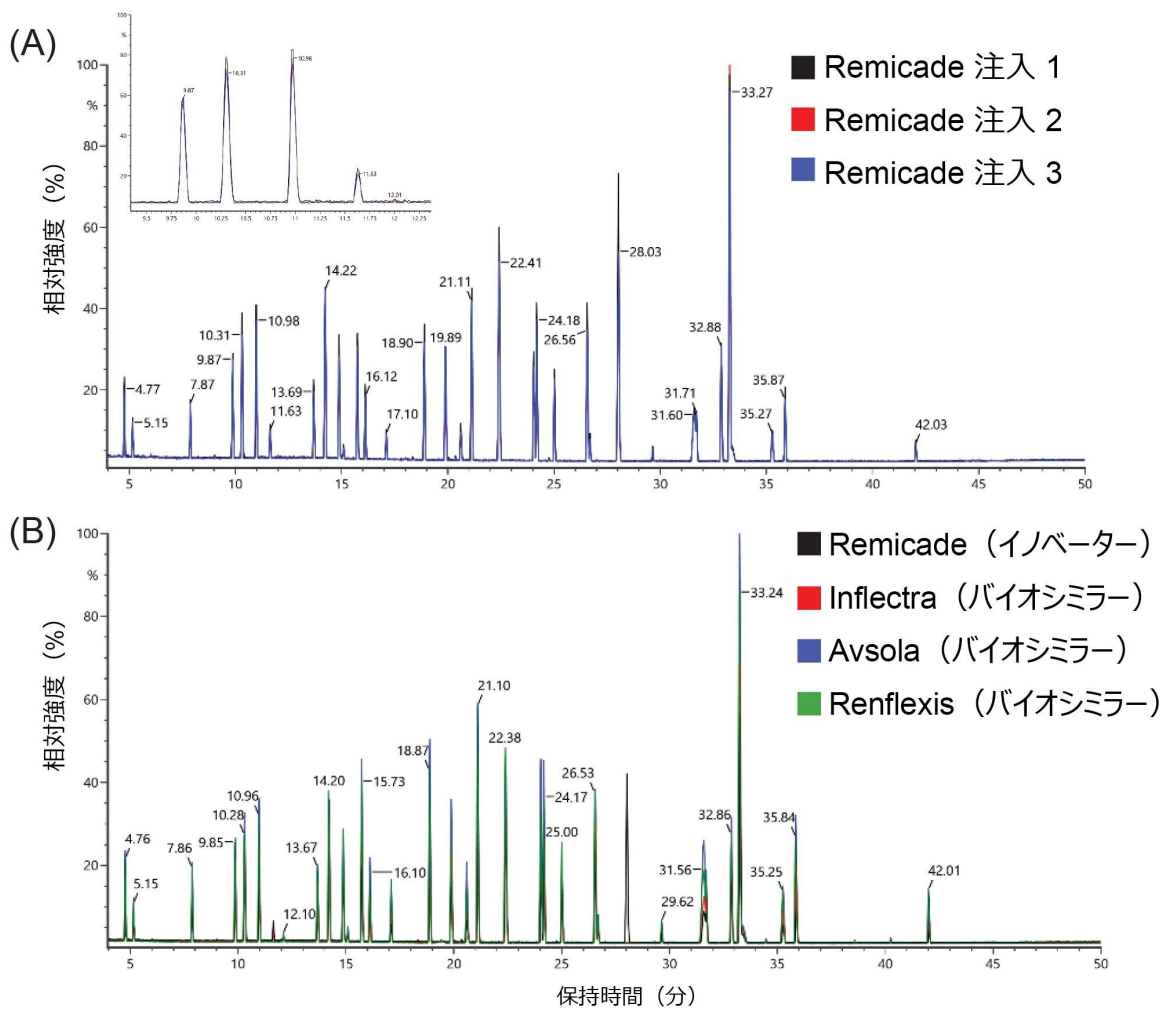


図 2. モノクローナル抗体消化物のベースピークイオン (BPI) クロマトグラムの重ね描き: (A) ピークがほぼ完全に重なっているイノベーター (Remicade) サンプルの繰り返し注入、(B) ペプチドマッピングプロファイルが類似していることを示すイノベーターおよび 3 種のバイオシミラーの注入。

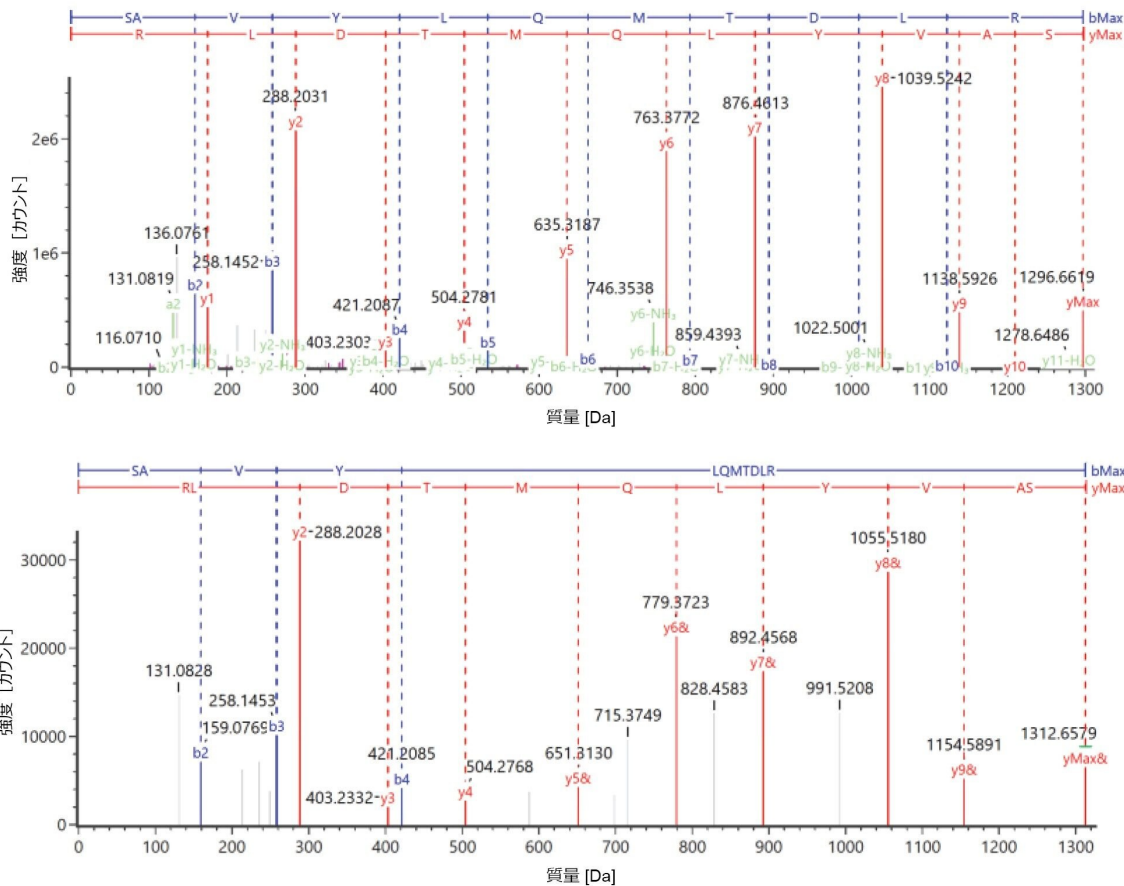


図 3. HT11 ペプチドの高エネルギー MS^E スペクトル: (上) 未修飾型、(下) 酸化型

定量結果をレビューする前に、Peptide MAM ワークフローの一環として、システム適合性分析を実施しました。このステップでは、既知のペプチドサンプルを間欠的に注入して評価することで、分離および質量検出を行う装置並びに自動データ解析ルーチンで許容可能な予測通りの結果がこのシステムで生成されていることを確認します。特性モニタリングには厳密な分析が必要であるため、このプロセスは結果の信頼性を高めるために重要です。システム適合性注入には、MassPREP™ ペプチド混合液（製品番号: [186002337](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html) <

[https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html)

[mixture.html](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html)>) を使用しました。図 4B に、質量誤差およびピーク幅を含め、複数の注入にわたるペプチドデータの追跡を 2 例示しています。繰り返し注入にわたる値の可視化により、時間の経過による異常やシステムのドリフトを簡単に特定できます。図 4C に 4 つのシステム適合性パラメーターすべてを示しており、サンプルシーケンスの全期間にわたってプラットフォームの質量精度が高く (±1.5 ppm 以内)、再現性が優れていることが反映されています。Xevo G3 QToF では再現性が高い結果が得られるため、サンプル間の微妙な傾向が容易に区別できるようになるとともに、最も低濃度のプロダクトバリエーションについて意味のある結果を得るのに必要な繰り返しの数が減ることで、時間と費用を

節約できます。

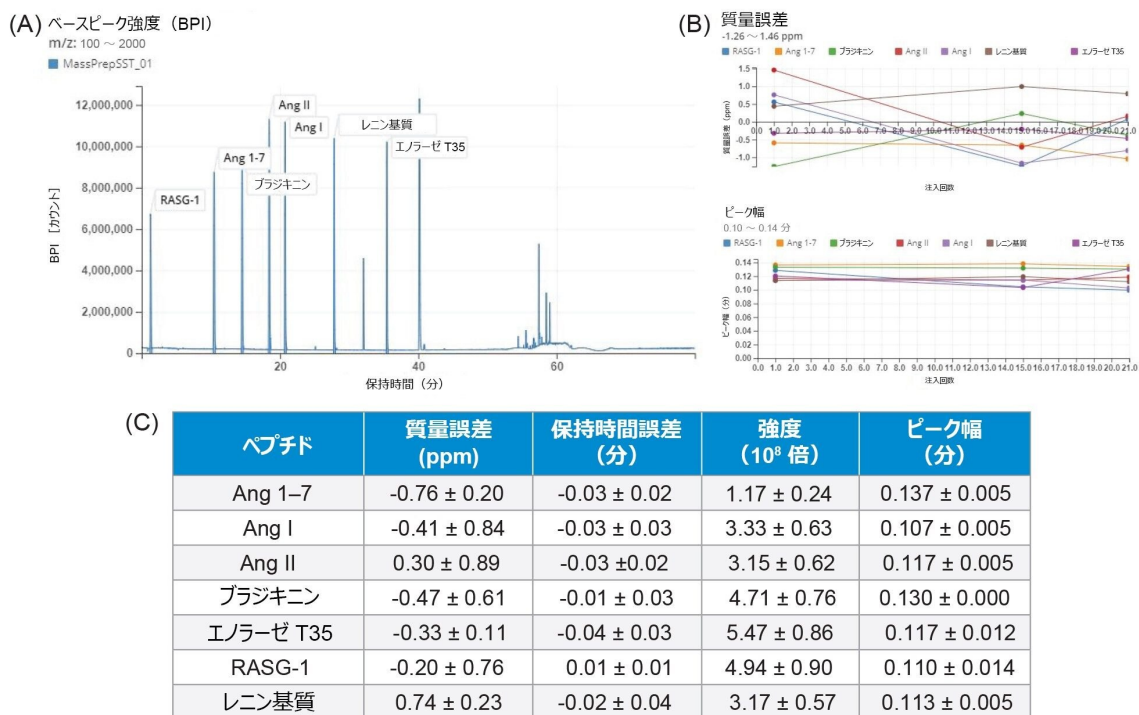


図 4. Peptide MAM アプリでデータ解析を行った MassPREP ペプチド混合液のシステム適合性の結果。(A) クロマトグラムの例、(B) 各ピークについて複数の注入にわたって追跡した、値、質量誤差、ピーク幅の例、(C) モニターした各ピークのすべての適合性パラメーター。

Peptide MAM アプリで測定されたターゲットペプチド特性の相対的定量値を平均すると、モニターした特性について相対標準偏差が 2.0% 未満になりました。アプリでの結果表示の例を図 5 に示します。分かりやすい棒グラフで示すことにより、それぞれのターゲット特性について、データの迅速な評価が可能になります。

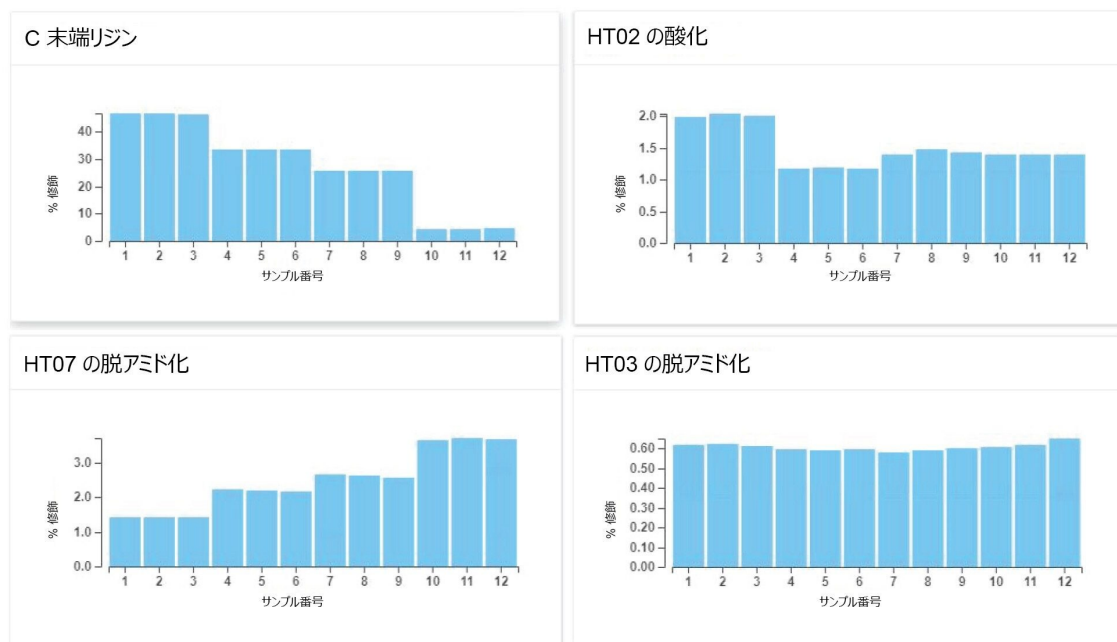


図 5. モニターした4つの特性（C末端リジン、HT02の酸化、HT07の酸化、HT03の脱アミド化）の結果を示す Peptide MAM アプリの棒グラフ。各注入に、1～3は Remicade、4～6は Inflectra、7～9は Avsola、10～12は Renflexis とラベルが付いています。

酸化ペプチドおよび脱アミド化ペプチド、並びにC末端リジン結合体化の定量結果を図6に示します。モニターした6箇所の酸化部位すべてにおいて、インフリキシマブ製品間で見分けられる差がありました。例えば、重鎖のトリプシンペプチドである（HT）02、HT11、およびHT03の部位の1つではイノベーターの方が酸化の割合が高いのに対し、HT22ではバイオシミラー2種（AvsolaおよびRenflexis）の方が酸化の割合が高いことがわかりました。

脱アミド化の差はこれほど顕著ではありませんでした。モニターした12の脱アミド化のうち、バイオシミラー間で大きな差が見られたのは2つのみでした。そのうち、HT07では3種のバイオシミラーで脱アミド化の割合が高く、HT38の部位の1つでは、RemicadeおよびRenflexisと比較して、InflectraおよびAvsolaの方が脱アミド化の割合が低くなっていました。

C末端リジンの切断は、バイオ医薬品生産で一般的な修飾であり、受容体結合に影響を与える可能性があるため、この修飾の程度も定量しました⁴。図6に示すように、リジンをクリッピングの程度はバイオシミラー間で特にばらつきが大きく、切断されずにペプチドに残っている割合はRenflexisで最も小さいことがわかります。

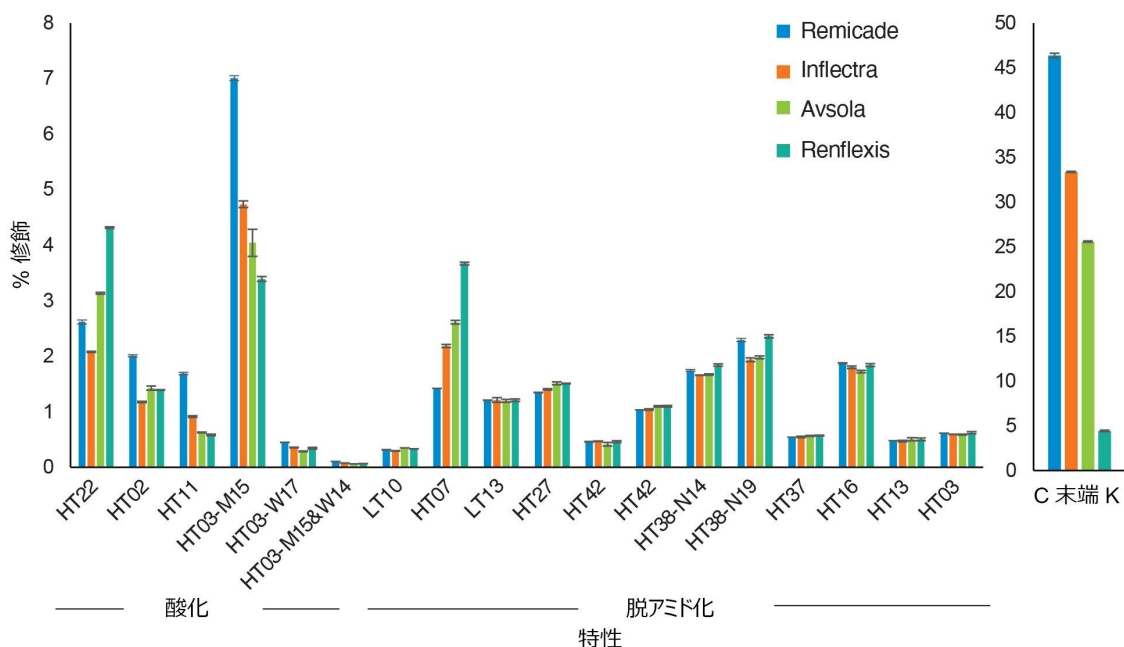


図 6. イノベーターと 3 種のバイオシミラーの間でのペプチド特性（酸化、脱アミド化、C 末端リジン結合体化）の相対的存在量。エラーバーは 3 回の繰り返し注入に基づく標準偏差を示します。複数の修飾部位があるペプチドでは、修飾アミノ酸が示されています。H: 重鎖、L: 軽鎖、T: トリプシンペプチド。

さまざまな N-グリコバリエーションの割合から、製造および細胞株の違いが原因と考えられる、インフリキシマブ製品間のばらつきがあることがわかりました⁵。図 7 に、HT26 ペプチドの 28 種の N-グリコフォームの相対存在量を、高存在量（相対存在量が約 2% 超）、低存在量（相対存在量が約 2% 未満）、および免疫原性（N-グリコリルノイラミン酸（NeuGc）またはガラクトース- α -1,3-ガラクトース（ α -gal）のいずれかを含む糖鎖）、の 3 つのグループに分けて示しています。

4 種のモノクローナル抗体すべてにおいて、FA2 と FA2G1 が最も顕著なグリコフォームで、すべての型のペプチドの合計存在量のうち約 50% と約 30% をそれぞれ占めていました。ただし、正確な相対存在量はモノクローナル抗体ごとに異なり、Avsola では、FA2 の存在量が最も高く、FA2G1 の存在量が最も低いことがわかりました。逆に Inflectra では、FA2 の存在量が最も低く、FA2G2 の存在量が最も高いことがわかりました。

免疫原性グリコフォームは、Remicade および Inflectra の方が Avsola および Renflexis よりも存在量が高いことがわかりました。これは細胞株の違いから予測された通りで、Remicade および Inflectra はマウス細胞株に由来するのに対し、Avsola および Renflexis はチャイニーズハムスター卵巣細胞株に由来します。

低存在量のグリコフォームは、4 種のモノクローナル抗体の間で対照的な相対存在量を示しました。例えば、A1、

M5A1G1、FM5A1、A1G1 は Remicade で最も高い相対存在量を示したのに対し、A2G1 および M6 は Renflexis で、A2G1 は Inflectra で最も高い相対存在量を示しました。グリコシル化の差は、望ましい免疫反応または望ましくない免疫反応を誘発する薬物の能力に影響を及ぼす可能性があるため、特記されます。

ペプチドマップの比較に加えて、イノベーターおよびバイオシミラー 1 種 (Inflectra) の苛酷試験も行いました。苛酷試験の実験は、バイオ医薬品開発における分析法の開発、投薬形態の決定、不純物の同定、有効期間の計算、バイオシミラー製品の分解経路の比較に関する情報を得る上で重要です^{6,7}。熱、化学的、機械的などのストレスをかけることにより、意図的にタンパク質分解が加速され、不純物レベルが高まるため、タンパク質の有効性および免疫原性への影響に関する情報が得られます。このような試験により、製品の効力、有効性、安全性にとって非常に重要なペプチド特性である CQA の同定が可能になります。

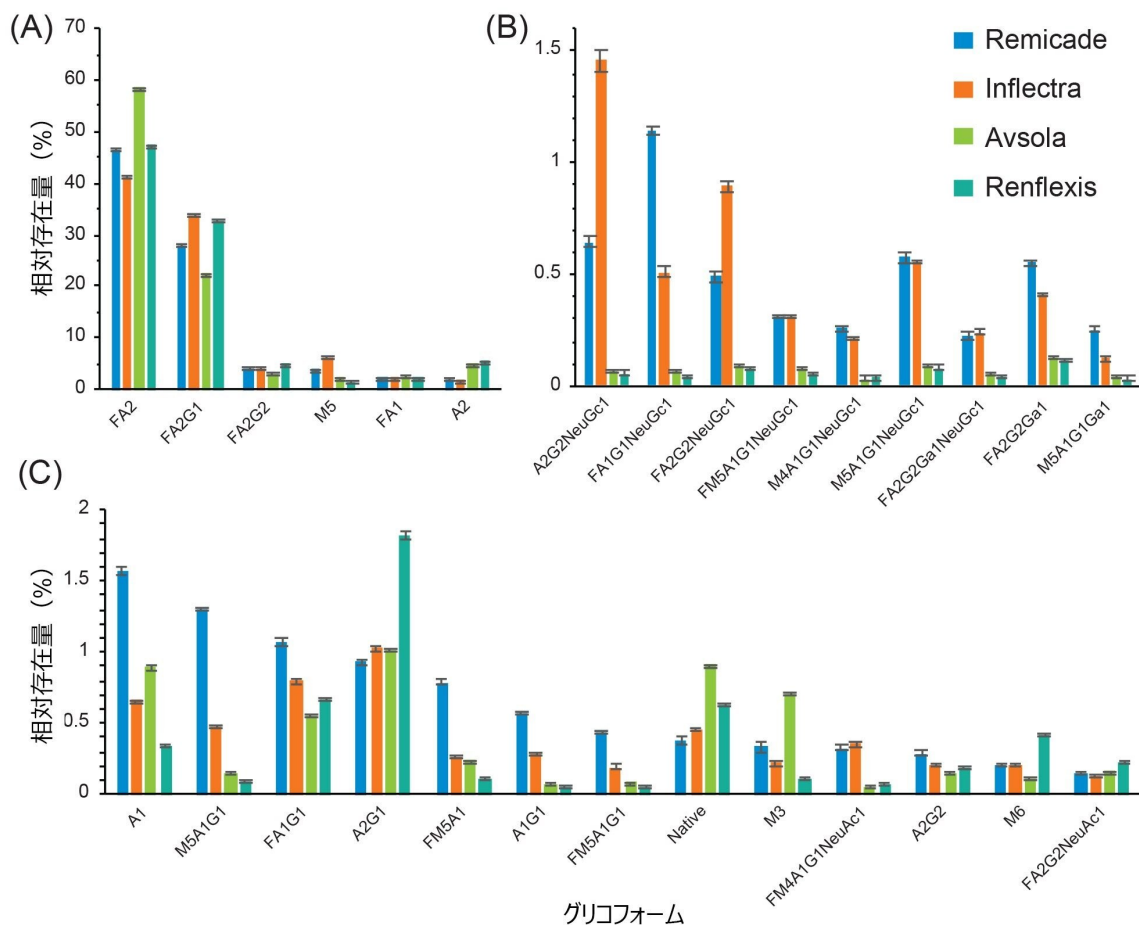


図 7. イノベーターおよび 3 種のバイオシミラーにわたるグリコシル化重鎖ペプチド HT26 の相対存在量 : (A) 高存在量のグリコフォーム、(B) 免疫原性グリコフォーム、(C) 低存在量のグリコフォーム。グリコフォームはオックスフォード表記法に基づいてラベル付けしています。エラーバーは 3 回の繰り返し注入に基づく標準偏差を示します。

Peptide MAM アプリを使用して、苛酷試験中の Remicade および Inflectra の CQA の変化をモニターしました。サンプルに 1 ~ 2 週間の温度ストレスを与えてから分析を行い、ストレスを与えていないサンプルと比較しました。図 8 に、Inflectra および Remicade の、ストレスを与えていない (コントロール) サンプルと、2 週間ストレスを与えたサンプルのミラープロットを示します。ミラープロットでは、クロマトグラムは一見似ており、主なピークに明らかな差は見られませんが、図 9 でわかるように、MAM アプリにより、複数の CQA にわずかな差が確認されました。CQA の多くが、苛酷処理サンプルでレスポンスの上昇を示しましたが、イノベーターとバイオシミラーの間では、すべての CQA が一貫した上昇を示したわけではありません。例えば、HT22 および HT02 の酸化は、Remicade の 2 週間処理サンプルでは減少していましたが、Inflectra の 2 週間処理サンプルでは増加していました。他の CQA では、2 種のバイ

オシミラーの間で一貫した結果になりました。例えば、HT07 および HT38 の脱アミド化は、いずれのモノクローナル抗体においても 1 週間および 2 週間苛酷処理サンプルの両方で徐々に増加していました。苛酷処理サンプルでは、グリコフォームの相対存在量やリジンクリッピングの相対存在量に大きな差は見られませんでした（データは示していません）。複数のバイオシミラー間で製品のばらつきに同様のパターンがあるとは予想されず、いかなる差でも、分子の機能および安全性プロファイルに対する潜在的な影響を判定するためにリスク評価を行います。

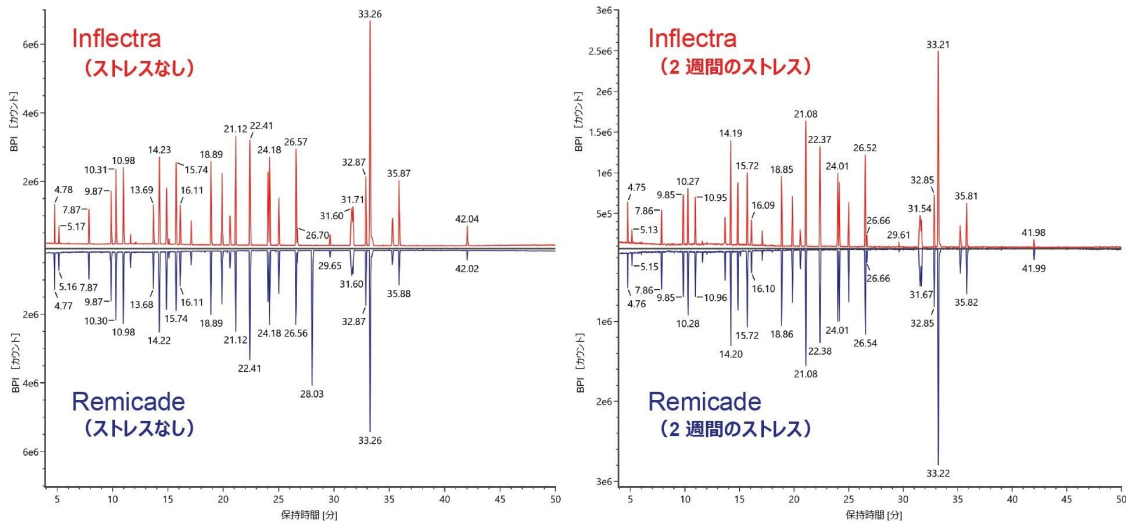


図 8. *Inflectra* と *Remicade* の両方で、（左）ストレスを与えていないサンプルと（右）2 週間の高温ストレスを与えたサンプルとを比較したミラープロット

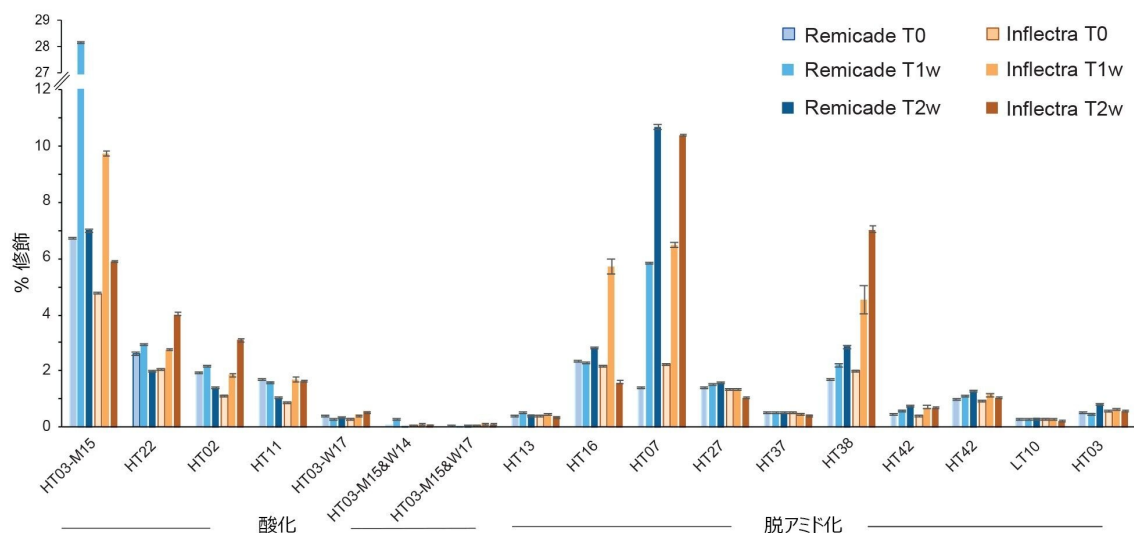


図 9. 各ストレス条件での Remicade および Inflectra の酸化ペプチドおよび脱アミド化ペプチドの相対存在量（ストレスなし = T0、1 週間のストレス = T1w、2 週間のストレス = T2w）。エラーバーは 3 回の繰り返し注入に基づく標準偏差を示します。複数の修飾部位があるペプチドでは、修飾アミノ酸が示されています。H: 重鎖、L: 軽鎖、T: トリプシンペプチド。

結論

バイオシミラーモノクローナル抗体の安全性と有効性を確保し、イノベーターでの経験に基づいて後続製品の臨床での負担を軽減するためには、徹底的な特性解析が非常に重要です。規制対応した waters_connect インフォマティクスを採用した Xevo G3 QToF プラットホームにより、効率化されたペプチドマッピングおよびペプチド MAM ワークフローを通じて、製品特性の頑健で効率の良い分析が可能になります。この試験では、一次構造の特性解析にこのプラットフォームを使用することで、インフリキシマブサンプル（イノベーターおよび 3 種のバイオシミラー）において高いシーケンスカバー率を達成しました。統合型 UNIFI アプリおよび Peptide MAM アプリにより、ペプチド特性の同定、相対的定量を行い、4 種のモノクローナル抗体製品間の比較を行いました。さらに苛酷試験では、潜在的な CQA が特定され、定量されました。これらの結果により、バイオシミラーのペプチドマップによる特性解析および特性モニタリングワークフローに、Xevo G3 QToF が、waters_connect でのデータ取り込みおよび解析と共にシームレスに使用できることが実証されました。

参考文献

1. Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A. Development of a Quantitative Mass Spectrometry Multi-Attribute Method for Characterization, Quality Control Testing, and Disposition of Biologics. *mAbs*. *Taylor and Francis*, 2015 Aug, 7(5), 881–890.
2. Ranbaduge N, Yu YQ. A Streamlined Compliant Ready Workflow for Peptide-Based Multi-Attribute Method (MAM). *Waters Application Note*: [720007094](#), 2020 December.
3. Ranbaduge N, Yu YQ. Intelligent Data Capture (IDC) Enables Optimal Xevo G2-XS Data Acquisition and Processing for Multi-Attribute Method (MAM) Studies. *Waters Application Note*: [720007441](#), 2021 December.
4. Faid V, Leblanc Y, Berger M, Seifert A, Bihoreau N, Chevreux G. C-terminal Lysine Clipping of IgG1: Impact on Binding to Human FcγRIIIa and Neonatal Fc Receptors. *Eur J Pharm Sci*. 2021 Jan, 159, 105730.
5. Duivelshof BL, Jiskoot W, Beck A, Veuthey J, Guillarme D, D' Atri V. Glycosylation of Biosimilars: Recent Advances in Analytical Characterization and Clinical Implications. *Analytica Chimica Acta*. 2019 Dec, 1089, 1–18.
6. Haw A, Wiggenhorn M, van de Weert M, Garbe JHO, Mahler H, Jiskoot W. Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci*. 2012 March, 101(3), 895–913.
7. Pisupati K, Benet A, Yian Y, Okbazghi S, Kang J, Ford M, Saveliev S, Sen KI, Carlson E, Tolbert TJ, Ruotolo BT, Schwendeman SP, Schwendeman A. Biosimilarity Under Stress: A Forced Degradation Study of Remicade® and Remsima™. *mAbs*. *Europe PMC*, 2017 Aug, 9(7), 1197–1209.

ソリューション提供製品

[Xevo G3 QToF </nextgen/jp/ja/products/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html>](https://www.waters.com/nextgen/jp/ja/products/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html)

[ACQUITY Premier システム <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)

[ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

[UNIFI 科学情報システム <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー](#)
[環境設定](#)