

# Similis Bio - バイオプロセッシングおよび開発におけるバイオシミラーモノクローナル抗体（mAb）候補のマルチ特性モニタリングのための合理化された mAb サブユニット LC-MS ワークフロー

---

Samantha Ippoliti, Jared Young, Katy McNally, Caitlin Hanna, Ying Qing Yu, Bradley Prater, Mark Wrona, Emma Harry

Waters Corporation, Similis Bio

## 要約

このアプリケーションノートでは、プロセス開発を支援するためにバイオシミラー mAb 候補をイノベーターと比較してスクリーニングするための、バイオリアクターサンプルのプロテイン A 精製および LC-MS mAb サブユニット分析の自動化の実現可能性を実証するための Similis Bio と Waters Corporation™ の共同研究についてまとめます。この分析法には、C 末端リジンバリエーションや他のサブユニット（LC および Fd'）固有の修飾などのその他の翻訳後修飾（PTM）に加えて、薬物動態やエフェクター機能活性に影響を及ぼすことが知られているレベルの N 結合型オリゴ糖鎖を、定量的に評価するのに十分な感度および精度があることが実証されました。このようなサブユニット mAb LC-MS モニタリング分析法は、バイオ医薬品企業やバイオ製造組織における mAb のバイオプロセッシング、開発、品質管理を支援するために利用できます。

## アプリケーションのメリット

- 細胞培養サンプルの ProA 精製およびその後の Andrew+™ ピペッティングロボットを使用した FabRICATOR™ サブユニット消化

- 初心者でも簡単に操作できるように設計されたベンチトップ型 TOF MS である BioAccord™ LC-MS システムを活用して、LC-MS 取り込みを簡素化
- データインテグリティを確保するためのコンプライアンス対応機能を備えた waters\_connect™ Intact Mass アプリを利用した、自動データ取り込みおよび分析の合理化
- この mAb サブユニット LC-MS 分析法を使用して、Fab 修飾部位と Fc 修飾部位の特定が可能に
- mAb サブユニット LC-MS ワークフローの結果と遊離 N 型糖鎖アッセイの結果の間の実証済みの直交性

---

## はじめに

さまざまな疾患に対して、より安価で効果的な治療法を提供できる可能性があるバイオシミラーの開発の勢いが、ここ数年で高まっています。一方、バイオシミラーの開発は、広範な特性解析および参照品との比較を必要とする複雑で困難なプロセスです。開発のライフサイクルの初期におけるクローン選抜は、所定の製品を質の高い目標の製品プロファイルに適合させる能力に、非常に大きな影響を及ぼします。N 結合型オリゴ糖鎖プロファイルおよび C 末端リジン、側鎖の酸化や糖化などの一般的な PTM は、発現のダイナミクスと細胞ストレス応答の結果として、クローン間で異なる場合があります。したがって、クローン選抜時にこれらの製品品質特性を評価し、イノベーターに近いプロファイルを示すクローンを選択することで、その後のプロセス開発のコストを削減することができます。さらに、細胞培養フィード培地とその補充を評価する実験計画法 (DoE) 試験では多くのサンプルが生じ、プロセス開発の指針とするために、多数の分析法にわたってこれらを試験する必要があります。これにより、分析試験に大きな負担がかかり、反復的な開発ワークフローが可能になるように処理時間を短縮することが必要になります。

迅速な自動アットライン mAb サブユニット特性モニタリングワークフロー (図 1) を使用して、クローン選抜時およびアップストリームのプロセス開発時に、mAb バイオシミラー製品の品質特性の比較スクリーニングを行いました。Sartorius Ambr250™ ハイスループットバイオリアクターから採取したバイオシミラーサンプルに対して、自動プロテイン A (ProA) アフィニティーキャプチャーおよび Andrew+ ピペッティングロボットを使用して Genovis FabRICATOR によるサブユニット酵素消化を行いました。次に、精製して FabRICATOR 消化したサンプルを、BioAccord LC-MS システムを用いて、遊離サブユニットのインタクト質量分析により分析しました。各サンプルの取り込みが完了するたびに、waters\_connect インフォマティクスプラットフォーム内の Intact Mass アプリを使用して、データの自動取り込み、解析、視覚化を行いました。



図 1. mAb サブユニット MAM ワークフロー。ProA 精製および FabRICATOR 消化に Andrew+ ロボットプラットフォームを使用した自動サンプル前処理、およびそれに続く waters\_connect インフォマティクスを使用した BioAccord LC-MS システムでの LC-MS データの取り込みおよび解析を含む。

このハイスループットの分析法により、各品質特性について、直交する分析法と同等の N 結合型グリコシル化のプロファイル、未切断 C 末端リジンの存在量、糖化、酸化レベルが得られたと同時に、自動化、拡張性、スループットの面でも大きなメリットが得られました。高マンノース型糖鎖およびアフコシル化糖鎖は、低相対存在量の mAb の薬物動態 (pK) およびエフェクター機能活性に大きな影響を及ぼす可能性があるため、これらの分析種に対する分析法の感度は、意思決定者にとって特に高い関心事項となっています。この mAb サブユニット LC-MS ワークフローは、バイオシミラー開発の初期におけるデータの感度、精度、再現性の要件を満たすことができます。同様の mAb サブユニット LC-MS モニタリングワークフローが最近 Genovis によって発表されており、BioAccord システムが mAb サブユニットレベルでのルーチンで効率的な製品品質特性のモニタリングにおいて理想的なプラットフォームであることが実証されています<sup>1</sup>。

## 実験方法

### サンプルの説明 (自動精製)

細胞培養サンプルは、最近発表された Andrew+ ロボットプラットフォーム (Extraction+ モジュールを搭載) ワークフローで精製しました<sup>2</sup>。簡単に説明すると、0.2 μm フィルタープレートを使用し、各ウェルに ProA 樹脂を入れ、洗浄してサンプルをロードしました。各サンプルをまず洗浄し、次に中和バッファの入ったコレクションプレートに溶出しました (図2A)。2つのクローンを使用して、同じ製品について、以下で「バイオシミラー」および「バイオシミラー-ネガティブコントロール」と呼んでいる別々の細胞培養サンプルを作製しました。

## サンプルの説明（サブユニット消化）

Andrew+ による自動化（Heater/Shaker+ モジュールを含む）を用いて、得られた ProA 精製サンプル（およびイノベーターサンプル（市販医薬品））の各 20  $\mu\text{L}$ （約 1 mg/mL）を PCR プレートに移し、サブユニットの部分還元を伴うワンステップ消化を行いました。10  $\mu\text{L}$ の調製済みマスターミックス（図2B）（2 単位/ $\mu\text{L}$  の FabRICATOR 酵素、50 mM Tris、10 mM DTT、pH 7.5）を各サンプルウェルに添加し、このプレートを 37  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間インキュベートしました（図2C）。LC-MS 分析用に、サンプルを 0.1% ギ酸水溶液で 5 倍希釈（0.1 mg/mL まで）しました（図2D）。

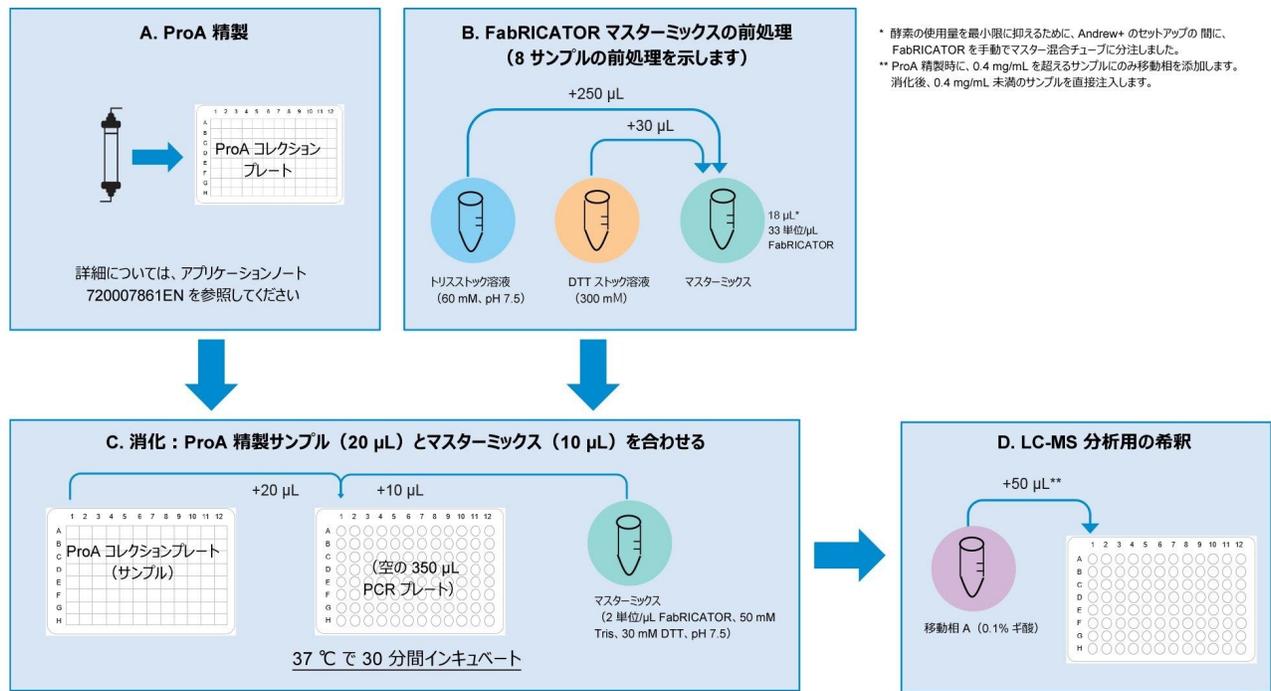


図 2. Andrew+ ピペッティングロボットを使用したサブユニットサンプルの前処理

## プロテイン A および FabRICATOR によるサンプル前処理

ロボットシステム:

Extraction+ モジュールおよび Heater/Shaker+ モジュールを搭載した Andrew+ ピペッティングロボット

ソフトウェア:

OneLab (Andrew Alliance/ウォーターズ)

フィルタープレート:

Pall AcroPrep™ Advance 96 ウェルフィルタープレート

	ト - 350 $\mu$ L、0.2 $\mu$ m Supor™ メンブレン（製品番号：8019）
コレクションプレート：	QuanRecovery™ 700 $\mu$ L 96 ウェルプレート（製品番号：186009184）
サブユニット消化プレート：	Eppendorf twin.tec™ PCR プレート 96 LoBind™（例：製品番号：0030129555）
プロテイン A 樹脂：	Cytiva MabSelect™（製品番号：17519901）、スラリーは約 25%  （1：1、PBS：50% 樹脂）。50% 樹脂を 1000 g で 3 分間遠心分離し、上清を樹脂容量と同量の 400 mM NaCl、20% エタノールに交換します。
PBS：	リン酸緩衝生理食塩水（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、pH 7.4）
中和バッファー（NB）：	1M Tris HCl、pH 7.5
溶出バッファー（EB）：	100 mM グリシン、pH 3.0
オービタルシェーカー：	Eppendorf Thermomixer® C（8 °C）
FabRICATOR 酵素：	Genovis（製品番号：A0-FR1-020）
ジチオトレイトール（DTT）：	Pierce No-Weigh DTT（製品番号：A39255）

## LC 条件

LC システム：	ACQUITY™ Premier UPLC システム
検出：	ACQUITY UPLC TUV（280 nm）
カラム：	BioResolve™ RP mAb カラム、2.7 $\mu$ m、2.1 × 100

	mm (製品番号: 186008945)
カラム温度:	60 °C
サンプル温度:	6 °C
注入:	0.5 µg の FabRICATOR 消化 mAb (0.1 mg/mL のサンプルを 5 µL 注入)
流速:	0.3 mL/分
移動相 A:	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B:	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

## グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0.0	0.3	80	25	6
10.0	0.3	60	40	6
10.3	0.3	20	80	6
11.3	0.3	20	80	6
11.6	0.3	80	25	6
15.0	0.3	80	25	6

## MS 条件

MS システム:	ACQUITY RDa™
イオン化モード:	ESI ポジティブ
取り込み範囲:	<i>m/z</i> 400 ~ 7000 (高質量)

キャピラリー電圧: 1.5 kV

コーン電圧: 50 V

脱溶媒温度: 550 °C

## データ管理

waters\_connect インフォマティクスプラットフォーム (v 3.1) 内の Intact Mass アプリ (v 1.4.0.0) でデータを取り込み、解析しました。

---

## 結果および考察

mAb サブユニット LC-MS 特性モニタリングワークフローでは、イノベーター mAb やバイオシミラー mAb の位置が特定された重要な製品品質特性をモニターしながら、サンプル分析時間を 15 分に短縮できるという妥協点が見出されています<sup>3-7</sup>。今回、Ambr250 バイオリアクターからアットラインでサンプリングし、LC-MS で分析した mAb の、自動 ProA 精製および FabRICATOR サブユニット消化について実証しました。Intact Mass アプリ内の Acquire and Process (取り込みと解析) 機能を使用することで (図 3)、分析シーケンスをセットアップし、リアルタイムのデータ読み取り値をモニターし、注入ごとにデータ取り込みが完了するたびにデコンボリューション/解析済みデータを表示することができます。装置が後続のサンプルを実行している間に解析済みデータを表示する機能により、より迅速な意思決定が可能になり、開発プロセスにおいて有益です。

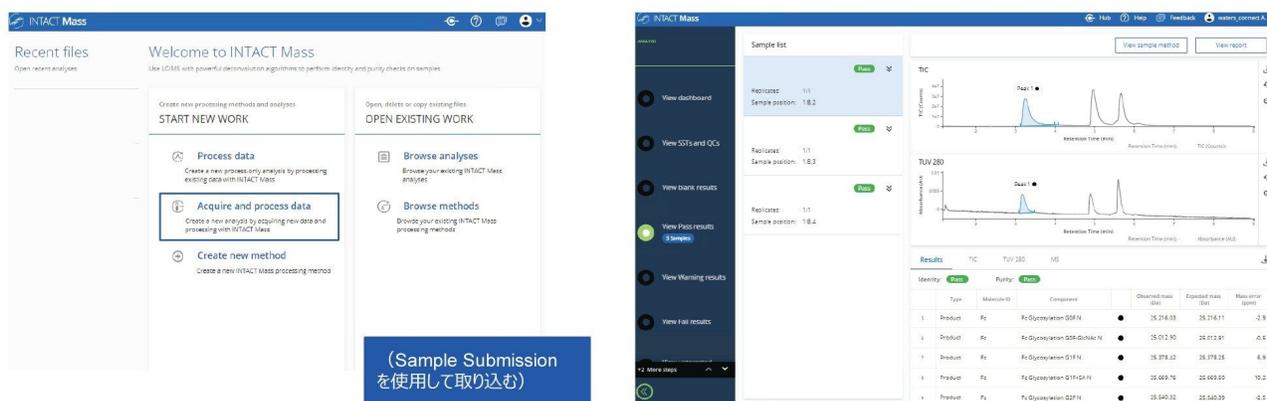


図 3. waters\_connect インフォマティクスプラットフォーム内の Intact Mass アプリを使用した取り込みおよびデータ解析の統合。データは、Sample Submission アプリによって取り込まれ、各注入が取り込まれた後に Intact Mass アプリによって自動的に解析されました。

本試験の主な目的は、バイオシミラー mAb サンプルの Man5 およびアフコシル化 N グリコシル化レベルに対する mAb サブユニット LC-MS 特性モニタリングアプローチの感度および精度によって、他の直交するアッセイの必要性が低減するかどうかを判断することです。鎖間ジスルフィド結合の還元を伴う FabRICATOR 消化により、質量がすべて 23 ~ 25 kDa 範囲内の 3 本のタンパク質鎖 (Fc、LC、および Fd') が生成され、RPLC-MS でモニターできます (図 3 のクロマトグラム)。N グリコシル化部位が Fc サブユニットにあります。イノベーター (図 4A、上)、バイオシミラー (図 4A、中央)、およびバイオシミラー-ネガティブコントロール (図 4A、下) の MaxEnt1 デコンボリューションスペクトル。バイオシミラー-ネガティブコントロールは高レベルの Man5 を含むことが知られています。イノベーターとバイオシミラーは、N 型糖鎖プロファイルが比較的一貫していますが、バイオシミラーに存在する未切断の C 末端リジンのレベルが大きく異なります (図 4B でそれぞれ 0% と 15%)。バイオシミラー-ネガティブコントロールには、予想どおりほぼ 10% の Man5 分子種が見られますが、バイオシミラーサンプルに含まれる比率は、イノベーターと同様、低レベルとなっています (図 4B)。

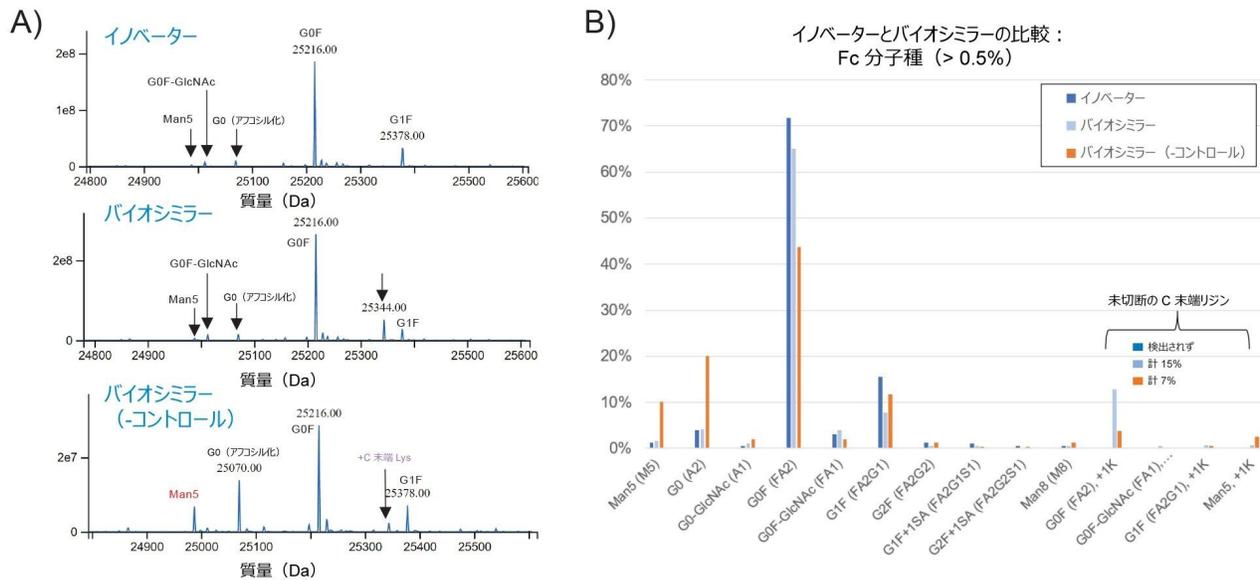


図 4. A) Intact Mass アプリによって生成された Fc 分子種のデコンポリュメンテーションスペクトル。イノバーター、ProA 精製バイオシミラー、およびネガティブコントロールバイオシミラー（高濃度の Man5 を含む）のサンプルを比較しています。B) N-グリコフォームおよび未切断の C 末端リジンを含む Fc 分子種の相対定量値。

糖鎖レベルのモニタリングにおける Similis Bio の標準操作手順 (SOP) は、mAb から酵素で遊離させた糖鎖を蛍光タグ (RapiFluor-MS) 標識し、HILIC-FLR-MS で分析する遊離 N 型糖鎖アッセイでした<sup>8</sup>。この分析法は非常に高感度で頑健ですが、サンプル中に存在する N 型糖鎖に限定された、非常にターゲットを絞った情報しか得られません。mAb サブユニット LC-MS 分析法により、遊離糖鎖アッセイと同等の結果が得られ、さらに mAb に関する追加の品質特性情報が得られれば、現在のワークフローや、場合によってはその他のアッセイの代替法となる可能性があります。存在量が多い上位 5 種類の N-グリコフォーム\* の LC-MS の結果 (図 5A) を、Similis Bio 社内で行われた遊離糖鎖アッセイの結果と比較しました。各サンプルおよび分子種の相対比の差 ( $\Delta\%$ ) を図 5B にプロットしています。LC-MS サブユニット分析で検出されたこれらの N 型糖鎖種の相対割合の値はすべて、遊離糖鎖アッセイで報告された値の 2% の範囲内でした。このことは、2 つの分析法の結果の同等性が許容範囲内であることを実証しています。

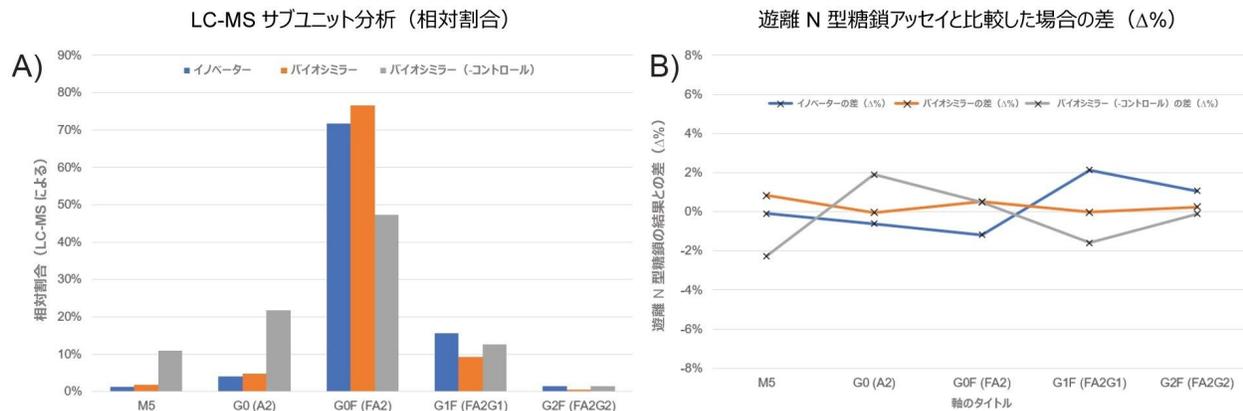


図 5. Fc サブユニットおよび遊離 RFMS N 型糖鎖の結果の比較 (存在量が多い上位 5 種類の分子種)。パネル A: LC-MS サブユニット分析法で検出された相対割合 (遊離 N 型糖鎖アッセイでは観測されない C 末端リジンバリエーションについて調整済み)。パネル B: LC-MS と遊離 N 型糖鎖アッセイの結果の差 (Δ%)。

mAb サブユニット LC-MS モニタリング分析法により、N 型糖鎖プロファイルに加えて、未切断の C 末端リジン、Fd' および LC の糖化および酸化などの他の品質特性に関する情報が得られました。同様の取り組みが、プロセス開発におけるサブユニットアッセイで示され、続いて mAb QC への導入に向けたバリデーションが行われています<sup>9,10</sup>。

これらの特性は通常、ペプチドマッピング (光学または LCMS) などの直交する分析法によって、またはペプチド、インタクト、またはサブユニットレベルでの間接光学 LC 分析法や CE 分析法を使用して評価されます。例えば、C 末端リジンは、未処理のサンプルと (残存する正に荷電した C 末端リジンを除去するために) カルボキシペプチダーゼ B (CPB) 酵素で処理した同じサンプルのチャージバリエーションのプロファイルを比較することで調査できる可能性があります。電荷プロファイルにおいて、未切断の C 末端リジンを含む分子種は通常、塩基性バリエーションとして現れ、CPB 消化によって減少します。論理的には、サンプル間の塩基性分子種の差により、サンプル中に存在する未切断の C 末端リジンのおおよその推定値が得られるはずですが、このアプローチは一般的に、単純な電荷プロファイルを有する mAb には非常に有用ですが、複雑さが増すにつれて分析があいまいになります。実証した mAb サブユニット LC-MS 分析法により、この特性の分析が簡素化します。

さらに、この mAb サブユニット LC-MS モニタリング分析法により、mAb 医薬品の結合 (したがって活性) に関わる配列の一部が含まれる Fd' 鎖および LC 鎖の修飾に関する情報が得られます。これらの修飾には、糖化および酸化および/または未変換の N 末端ピログルタミン酸 (非 pyroQ) が含まれますが、これらに限定されません。(注記、LC-MS では、酸化修飾と非 pyroQ 修飾がサブユニットレベルで容易に区別できません。) このケーススタディでは、イノベーターとバイオシミラーのサンプルの両方で、低レベルの Fd' および LC の糖化 (2% 未満) が検出されました。酸化/非 pyroQ の場合、イノベーターでもバイオシミラーでも LC には観察可能なレベルで存在しませんでした。Fd' 分

子種には 10 ~ 15% 含まれていました。Fd' の酸化分子種および/または非 pyroQ 分子種を区別するには、さらなる調査が必要です。

mAb サブユニット LC-MS モニタリング分析法の頑健性を試験するため、同じイノベーター（医薬品）のサンプルを異なる 2 つのラボで前処理し（手動と自動の FabRICATOR 消化）、サンプルをそれぞれのラボにある BioAccord システムで分析しました。相対存在量が 0.5% を超えるすべての Fd'、LC、Fc 分子種の結果（Fc 分子種は図 6 に示す）は、一貫していました（1.5% 以内）。手動または自動のサンプル前処理で実行した mAb サブユニット LC-MS 分析法は、複数のラボ間での試験においても頑健で信頼性が高いことが示されました。

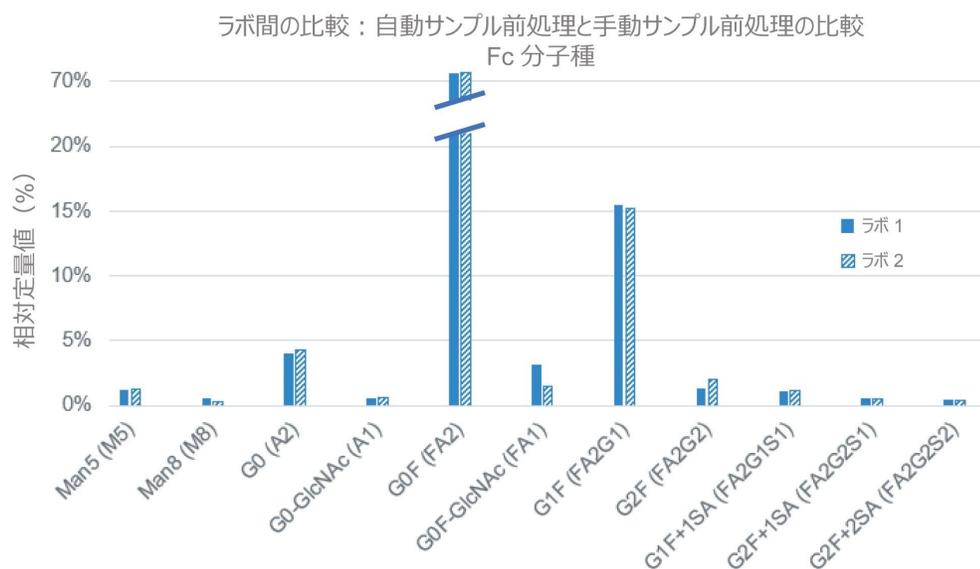


図 6. ラボ間の比較で得られた Fc の N グリコシル化についての同等の結果（ラボ 1 = 自動サンプル前処理、ラボ 2 = 手動サンプル前処理）

\*LC-MS サブユニットの N-グリコフォームの相対割合は、遊離糖鎖アッセイの結果との比較のために、末端のリシン残基がある場合とない場合の値を組み合わせ調整しています。これは、遊離糖鎖アッセイでは考慮しない C 末端リジンがある分子種からのレスポンスを除外するためです。

## 結論

Similis Bio と Waters Corporation の共同の取組みにより、バイオリアクターから直接サンプリングしたイノベーター

およびバイオシミラー医薬品候補のサブユニット LC-MS 分析を使用して、mAb の一部の製品品質特性をモニターするためのワークフローの有用性が実証されました。このアットラインワークフローは、Andrew+ ロボットプラットホームを使用する自動 ProA 精製および FabRICATOR 消化、続いて BioAccord システムを使用する LC-MS 分析で構成されています。Intact Mass アプリにより、シームレスなデータ取り込み、モニタリング、解析がすべてコンプライアンス対応の waters\_connect インフォマティクスプラットホーム内で可能になります。この mAb サブユニット LC-MS ワークフローを使用して得られた結果は、イノベーターおよびバイオシミラーのサンプルの両方について、遊離糖鎖の結果と一致しています。同じワークフローにより、未切断 C 末端リジン、糖化、酸化などの他の品質特性に関する情報も得られ、直交する分析法でこの情報を取得するのに必要な時間と労力を削減できました。

---

## 参考文献

1. Nägeli A, Ekemohn M, Nyhlén H. Automated Middle-level Analysis of Therapeutic mAbs in Complex Protein Samples. *Genovis Application Note*. AN0056.
2. Koza SM, Hanna CM, Jiang AHW, Yu YQ. Automated High-Throughput Analytical-Scale Monoclonal Antibody Purification Using Production-Scale Protein A Affinity Chromatography Resin. *Waters Application Note*. [720007861](#). February 2023.
3. Dong J, Migliore N, Mehrman S, Cunningham J, Lewis M, Hu P. High-Throughput, Automated Protein A Purification Platform with Multiattribute LC-MS Analysis for Advanced Cell Culture Process Monitoring. *Anal Chem*. 2016;88:8673-8679.
4. Sokolowska I, Mo J, Dong J, Lewis M, Hu P. Subunit mass analysis for monitoring antibody oxidation. *mAbs*. 2017; 9:3, 498-505.
5. Sokolowska I, Mo J, Pirkolachahi F, McVean C, Meijer L, Switzar L, Balog C, Lewis M, Hu P. Implementation of a High-Resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method in Quality Control Laboratories for Release and Stability Testing of a Commercial Antibody Product. *Anal Chem*. 2020; 92, 2369-2373.
6. Shion H, Yu YQ, Chen W. Enabling Routine and Reproducible Intact Mass Analysis When Data Integrity Matters. *Waters Application Note*. [720006472](#). October 2019.
7. Ippoliti S, Yu YQ, Ranbaduge N, Chen W. Establishment of a Robust mAb Subunit Product Quality Attribute Monitoring Method Suitable for Development, Process Monitoring, and QC Release. *Waters Application Note*. [720007129](#). January 2021.
8. Deriš H, Cindrić A, Lauber M, Petrović T, Bielik A, Taron CH, Wingerden M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. Robustness

and repeatability of GlycoWorks RapiFluor-MS IgG N-glycan profiling in a long-term high-throughput glycomic study. *Glycobio*.2021; 31 (9) 1062-1067.

9. Sokolowska I, Mo J, Dong J, Lewis M, Hu P. Subunit mass analysis for monitoring antibody oxidation. *mAbs* .2017; 9:3, 498-505.
10. Sokolowska I, Mo J, Pirkolachahi F, McVean C, Meijer L, Switzar L, Balog C, Lewis M, Hu P. Implementation of a High-Resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method in Quality Control Laboratories for Release and Stability Testing of a Commercial Antibody Product. *Anal Chem*. 2020; 92, 2369-2373.

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>>

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

バイオ医薬品のための BioAccord LC-MS システム <[https://www.waters.com/waters/en\\_US/BioAccord-LC-MS-System-for-Biopharmaceuticals/nav.htm?cid=135005818](https://www.waters.com/waters/en_US/BioAccord-LC-MS-System-for-Biopharmaceuticals/nav.htm?cid=135005818)>

720007997JA、2023 年 8 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)