

치료용 재조합 단일 클론 항체의 Fc 부위에 대한 글리코실화 특성 규명

응용 자료

바이오 의약품

저자

James Martosella,
Phu Duong, and
Alex Zhu
Agilent Technologies, Inc.

개요

단일 클론 항체와 같은 바이오 의약품은 가장 빠르게 성장하고 있는 의약품 종류 중 하나이며, 지난 10년 동안 인체 치료에서 임상적으로 큰 성공을 거두었습니다. 바이오 의약품을 발굴하고 개발하는 과정은 전통적인 저분자 의약품에서와는 다른 처리량 문제를 야기합니다. 더 빠른 데이터 처리 시간을 요하는 보다 복잡한 제조 및 특성 규명 공정이 필요하지만, 효능, 일치도(identity), 품질, 순도 및 안정성과 관련된 특성도 규명해야 하므로, 신속하고 정확한 프로파일링 기법이 필요합니다. 이 응용 자료에서는 CHO 세포 유래 IgG의 특성을 규명하기 위한 신속하고 효율적인 액체 크로마토그래피-TOF 질량 분석 접근법을 설명합니다. Agilent Poroshell 300SB-C3, 5 μ m 표면 다공성 IgG1 컬럼을 사용하여 원형 IgG1의 정확한 글리코형 질량을 확보하였고, IgG1 이질성에 대한 추가적인 특성 규명을 위해 파파인 소화 IgG1에 대한 다음의 연구에서 Fc 부위의 위치 특이적 글리코실화 프로파일 정보를 획득하였습니다. 또한 이후의 mAb-glyco chip LC/MS 분석을 사용하여 TOF 질량 분석으로 확인한 글리칸의 추가 검증을 위해 글리칸 accurate mass 데이터베이스를 구축하였습니다.



Agilent Technologies

서론

다양한 질병을 표적으로 삼는 치료제로 단일 클론 항체 (mAb)를 사용하는 경우가 늘어나고 있으며, 이것은 상업적 승인을 받았거나 현재 개발 중인 치료용 단백질 중 많은 부분을 차지합니다. 시장에 출시되는 mAb의 양이 늘어나면서 자세한 특성 규명을 위한 신속한 분석법에 대한 요구가 급증하였습니다 [1]. 예를 들어, mAb 개발의 경우 공정 개발 요구 사항을 충족하기 위한 신속한 처리 시간과 함께 최적의 생산성을 제공하는 재조합 생산 시스템을 찾는 것이 중요합니다. mAb 개발 시, 단축된 분석 시간 내에 글리코실화 프로파일을 평가하는 것이 필수적이며, 신속하고 신뢰할 수 있는 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC/MS) 글리코프로파일링 분석법에 대한 필요성이 증가하고 있습니다.

이 응용 자료에서는 치료용 mAb(IgG1)에 대한 글리코실화를 프로파일링하는 고속 온라인 역상(RP) LC/MS 접근방법을 설명합니다. Fc 및 Fab 조각을 얻기 위해 원형 IgG1 및 파파인 절단 IgG1에 대한 분리를 Agilent Poroshell 300SB-C3, 5µm 표면 다공성 컬럼을 사용하여 빠른 분석으로 최적화하였습니다. 구체적으로, 원형 IgG1은 특성을 규명하여 글리코형과 글리칸 accurate mass 정보를 확보하였습니다. 그런 다음 IgG1을 파파인 소화하고, Fc 부분을 포함하는 글리코실화를 TOF 질량 분석법으로 분석하여 당 특이적 변형을 분석하였습니다. 데이터 처리 속도를 단축시키기 위한 고속 LC/MS 절차를 사용하여 핵심적인 글리코형 프로파일 정보를 제공하기 위한 분석법을 개발하였습니다. TOF 분석에서 나온 Fc 글리칸 특이적 지정(assignment)을 추가로 검증하기 위해 원형 mAb를 완전 자동화된 고속 글리칸 분석에 적용하였습니다. 이는 mAb-glyco chip 키트를 사용하여 글리칸 accurate mass 데이터베이스를 구축함으로써 이루어졌습니다. 본 응용 자료에서 설명하는 이 분석법은 세포주(cell lines) 및 클론 선별 공정, 그리고 절대 정량화는 필요하지 않지만, 신속하고 신뢰할 수 있으며 효율적인 특성 규명이 필요한 세포 배양의 최적화에 유용합니다.

실험

중국 햄스터 난소(CHO) 세포주 유래의 인간화 단일 클론 항체를 Creative Biolabs(Shirley, NY)에서 구입하였습니다. Trifluoroacetic acid는 Sigma-Aldrich Corp.(St. Louis, MO)에서 구입하였고 isopropanol, *n*-propanol 및 acetonitrile은 Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI)에서 공급 받았습니다. 1-propanol은 VWR(p/n BJ322-4)에서 구입하였습니다. 투석 카세트의 단백질 분자량 컷오프(MWCO)는 3,500-Da 이었으며, Thermo Scientific(p/n 66330)에서 구입하였습니다.

mAb의 파파인 소화

Fc 및 Fab 조각을 준비하기 위해 Pierce Fab Micro Preparation Kit(Thermo Scientific p/n 44685)를 사용하였습니다. 최종 Fab 및 Fc 정제에서는 spin 컬럼으로 마이크로 원심 분리를 사용하여 조각으로부터 고정 파파인을 분리하였습니다. 최종 농도는 2µg/µL였습니다.

원형 IgG1 크로마토그래피 조건

컬럼:	Agilent Poroshell 300 SB-C3, 2.1 × 75mm, 5µm (p/n 660750-909)
용리액:	A: water(5% AcOH, 1.0% FA, 0.05% TFA) B: 70/20/10 IPA/ACN/water (5% AcOH, 1.0% FA, 0.05% TFA)
주입량:	2µL
유속:	1.0mL/분
그라디언트:	분할
시간(분)	% B
0	20
4	45
8	45
9	90
10	20
온도:	80°C
검출기:	UV, 280nm

Fc 조각 크로마토그래피 조건

원형 IgG1 분리와 동일, 다음 제외:	
주입량:	5µL(2µg/µL)
그라디언트:	20 ~ 50% B, 7분, 50 ~ 90% B, 4분, 90 ~ 20% B, 1분(재평형화)
검출기:	DAD, 225nm

기기

LC/MS

Agilent 1200 Infinity 시리즈 (고성능 자동 시료 주입기 장착), binary 펌프, 항온 컬럼 장치(TCC) 및 다이오드 어레이 검출기(DAD)와 Agilent 6224 TOF LC/MS 연결.

글리칸 라이브러리

Agilent 1200 Infinity HPLC-Chip/ MS 시스템(Agilent mAb-Glyco Chip 키트) 및 Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

6224 TOF 기기 파라미터

스펙트럼은 양이온 모드 및 centroid 모드로 저장하였습니다.

가스 온도:	350°C
건조 가스:	10L/분
분무기:	45psi
Vcap:	5,500V(원형), 5,000V(Fc)
Octupole 1 RF:	750V
MS:	4Hz
질량 범위:	100 ~ 7,000m/z
기준 질량:	149.02332, 922.009798
수집 모드:	확장된 측정 범위
범위 모드:	2GHz

MS 데이터 분석

데이터는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 및 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 사용하여 처리하였습니다.

Agilent mAb-Glyco Chip 키트

키트에는 mAb-glyco chip(p/n G4240-64021), 시약 팩, mAb-glyco chip 콘텐츠 디스크 및 빠른 시작 가이드가 포함되어 있습니다. 시약 팩은 즉각적인 칩 운영에 필요한 모든 화학물질을 제공합니다. 다시 말해, 이것은 유동 경로

비활성화 및 교차 오염 최소화를 위한 컨디셔닝 시약, 크로마토그래피 확인 및 분석법 개발을 위한 글리칸 표준물질, 기능 확인 및 문제 해결을 위한 항체 표준물질, 그리고 표준물질 및 시료 희석과 칩 효소 반응기에 mAb 시료를 로드하기 위한 탈글리코실화 완충액을 포함하고 있습니다. Glyco chip 조건은, 반응기(310nL PNGase F)와 분리 컬럼(43mm PGC, 5µm) 및 농축 컬럼(160nL PGC, 5µm)입니다.

결과 및 토의

원형 IgG1 분석

원형 IgG1의 역상 분리는 큰 분자 크기, 확산의 제약 및 증가된 소수성으로 인해 쉽지 않습니다. 이러한 이유로, 대칭적인 좁은 피크 모양을 갖는 고속 분리는 더욱 까다롭습니다. 주로 이러한 분자의 입자 공극 구조 내 확산 경로 때문입니다. 최근 들어, 속이 가득 찬(막혀있는) 코어 입자 주위를 얇은 층으로 둘러싼 다공성 충전물질로 제공되는 표면 다공성 재질이 크기가 큰 분자의 고속 분리와 관련된 문제를 피하기 위해 주목을 받고 있습니다. 확산 시간을 줄이고 확산 경로를 제한하면 mAb와 같은 거대 분자의 피크가 더 좁아져 더욱 높은 컬럼효율로 분리됩니다. 여기서 단백질(mAb)의 이동 경로는 전체가 다공성인 입자의 경로와 비교했을 때 짧아집니다. 그림 1은 이러한 이동을 통해 고속 분석 시간 동안 mAb 분리를 개선하는 방법을 보여줍니다.

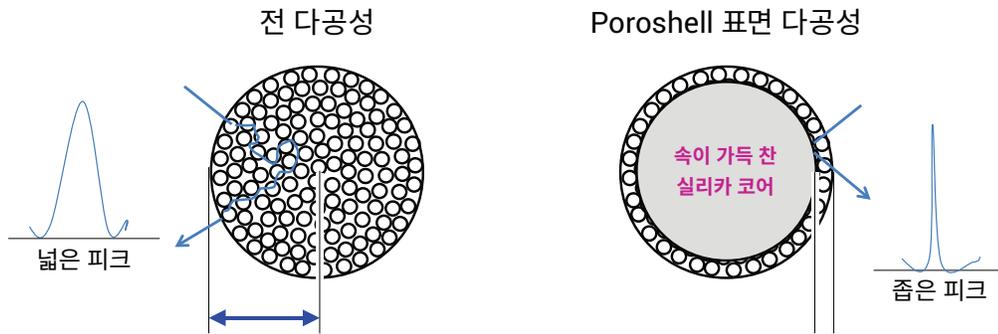


그림 1. 전 다공성 및 표면 다공성 입자에서 생체분자의 이동 경로

IgG1 분리의 경우 가장 높은 MS 분석 감도에 대한 조건을 신중하게 최적화하여 높은 온도에서 Poroshell 300 SB-C3 표면 다공성 컬럼을 사용함으로써, 높은 효율의 고속 분리가 가능하였습니다(그림 2A). 양이온 모드 전기분무 이온화 (ESI) MS에서는 서로 다른 전하 상태의 동형(isoform)에 해당하는 여러 개의 피크가 m/z 2,800 ~ 4,800에서 나타났습니다(그림 2B). 이렇게 다중 하전된 포락선(envelope)을 Agilent MassHunter 소프트웨어로 deconvolution하여

다양한 원형 IgG1 글리코형의 분자량 값을 구하고 표 1에 나타난 IgG1 시퀀스 데이터에서 나온 글리칸 accurate mass를 확인하였습니다.

MS 스펙트럼 피크는 140 내지 150Da만큼 떨어져 있습니다. 이러한 데이터는 IgG1 이질성에 대한 다른 원인이 존재하여, 관찰된 질량의 차이가 다양한 글리코실화 형태와 함께 이러한 다양한 변형을 모두 합친 영향 때문이라는 점을 보여줍니다.

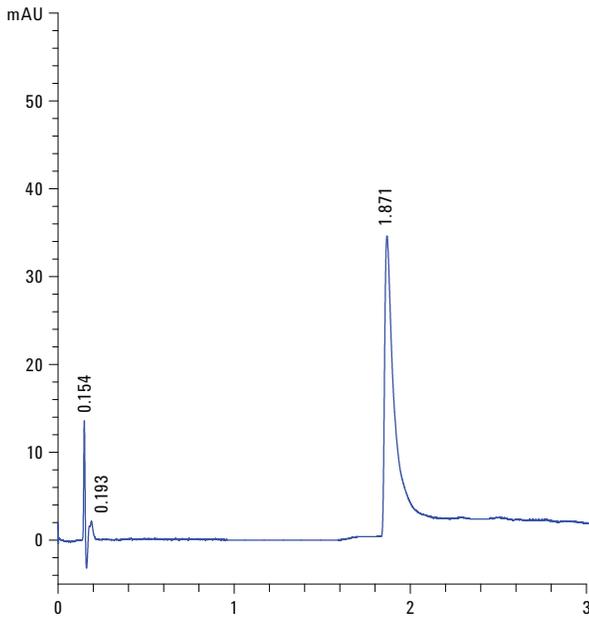


그림 2A. 원형 IgG1에 대한 LC/MS 분석, Agilent Poroshell 300 SB-C3 LC 컬럼을 사용한 고속 역상 분리

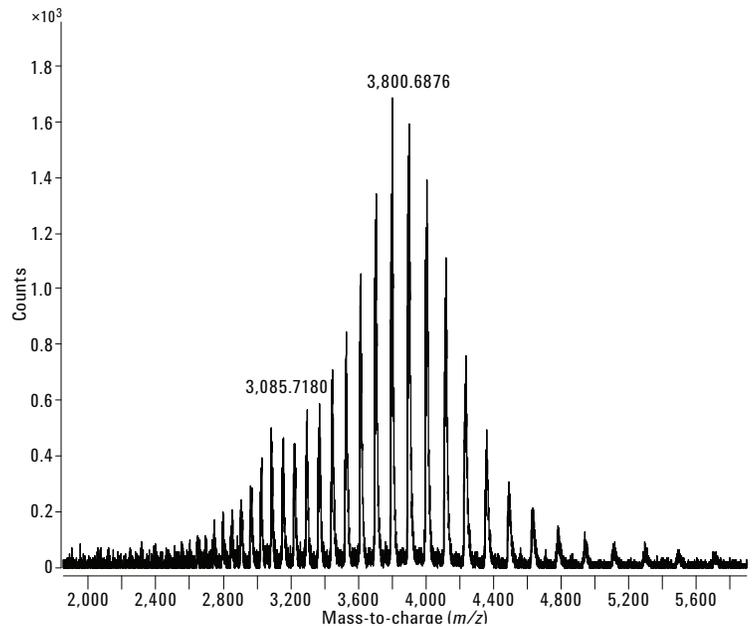


그림 2B. 그림 2A의 UV 크로마토그램 주요 피크에 걸친 MS 스캔을 평균하여 생성한 ESI 질량 스펙트럼

표 1. 그림 2B로부터 MassHunter 최대 엔트로피 deconvolution으로 확인한 3가지 주요 IgG1 글리코형

원형 mAb 글리코형 질량	Glycan 지정	구조	글리칸 accurate mass
148253,5366	G1/G2		(+3084.8581)
	또는 G1/G2F		(+3231.0019)
148400.7426	G1F/G2		(+3231.0019)
148549.6014	G1F/G2F		(+3377.1458)

파파인 소화 IgG1 및 Fc 조각 분석

원형 IgG1 분석에서 이질성의 속성을 추가로 프로파일링하기 위해 파파인 소화를 통해 IgG1을 Fc와 Fab 조각으로 절단하였습니다. 분석한 Fc 부위에는 고도로 보존된 N-글리코실화 위치가 있습니다. Fc 조각의 글리코실화는 Fc 수용체 매개 활성화에 매우 중요하고, 이 위치에 부착된 N-글리칸은 주로 복합 유형의 코어- biantennary 구조입니다 [2]. 파파인에 의한 IgG1 절단을 사용하여 경첩 부위의 위아래를 잘라 Fc 및 Fab 조각을 생성하였습니다. 그림 3은 분리 및 절단 후 상태를 역상 크로마토그래피에서 보여줍니다. 3분 내에 수행된 이 분리에서 2개의 주 피크가 2.4분 및 2.7분에 나타나며, 이는 각각 Fc 및 Fab 조각에 해당됩니다. 또한, Fc 부위에는 2.1 ~ 2.5분 사이에 부분적으로 분리된 더 작은 피크들이 있는데, 이는 Fc 조각의 변이체를 나타냅니다.

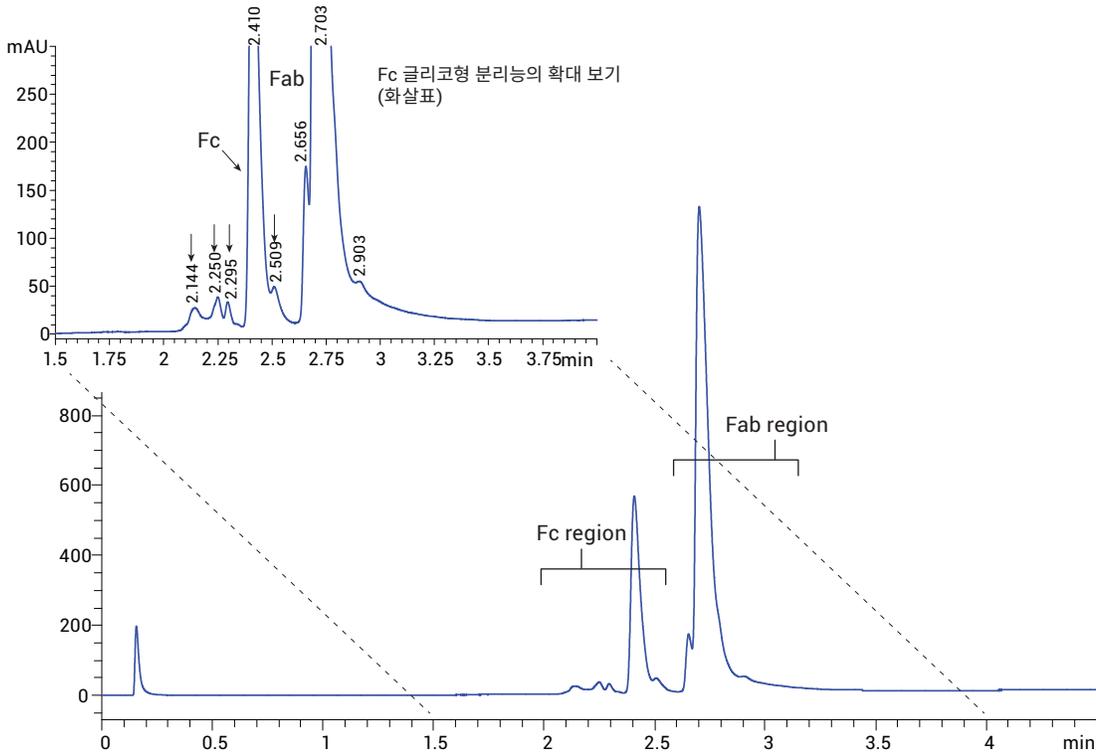


그림 3. Fc 및 Fab 조각의 2가지 주 피크를 보여주는 파파인 소화 후 IgG1의 역상 분리. 삽도는 Fc 및 Fab 조각의 변이체 (화살표)로서, 부분적으로 분리된 피크를 자세하게 보여줌

그림 4A 및 4B는 2.4분에 있는 Fc 주 피크의 평균 질량 스펙트럼과 deconvolution한 스펙트럼을 보여줍니다. 서로 다른 글리칸을 갖는 Fc는 질량에서 162 Da이 차이납니다. 표 2는 Fc 조각화된 IgG1에서 확인한 글리코실화 형태를 정리하여 나타내고 있습니다. 파파인 소화에 의해 원형

IgG1을 Fab 및 Fc로 분취하여 Fc에 대한 크로마토그래피적 고속 역상 분리를 최적화함으로써, 글리코실화 프로파일을 평가하는 데 사용할 수 있는 상대적인 추정치를 얻기 위한 분석법의 가치를 입증하면서, 글리코형 분포를 더욱 효율적이고 신속하게 분석할 수 있습니다.

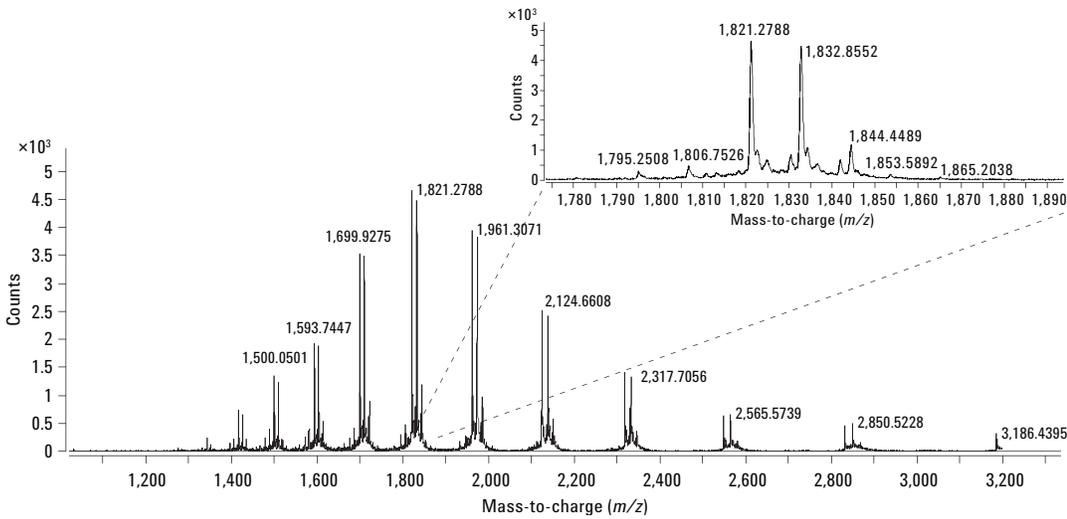


그림 4A. 1,400 ~ 3,200m/z의 전하 분포 프로파일을 보여주는 Fc 피크 평균 질량 스펙트럼. 삽도는 +14 전하 상태를 확대한 스펙트럼임. 주 피크들은 서로 다른 글리코형에 해당

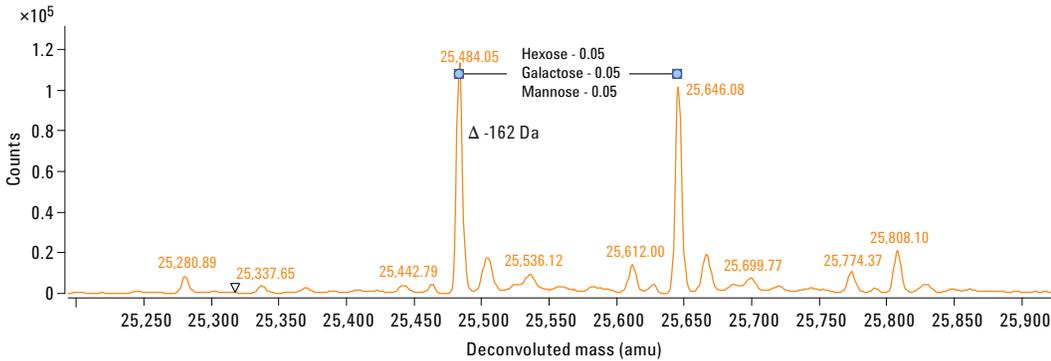


그림 4B. 그림 3의 크로마토그램 중 2.4분의 크로마토그래피 피크에서 생성된 IgG1 Fc 조각의 deconvolution된 ESI 질량 스펙트럼, hexose 단위($\Delta m/z = 162$) 기준으로 일정한 간격을 갖는 글리코형을 나타냄

표 2. TOF LC/MS Fc 조각 글리칸의 지정

Glycan 지정	글리칸 accurate mass
2010 0A 0G (G1)	(+1,461.3574)
2010 0A 0G (G2) (NA2)	(+1,623.5007)
2110 0A 0G (G1F) (NA2)	(+1,607.5012)
2110 0A 0G (G1F) (NA2)	(+1,769.6445)
2030 0A 0G	(+1,785.6439)
1010 0A 0G	(+1,258.1613)
1000 0A 0G	(+1,096.0181)

Fc 조각 분석에서 얻은 글리칸 지정을 검증하기 위해, 원형 단일 클론 항체에서 절단한 유리 글리칸을 농축시키고 nanospray 이온화-TOF 분석 전에 분리하는 고속 칩 기반 온라인 글리칸 분석을 수행하였습니다. 그 다음, 글리칸 accurate mass 데이터베이스를 구축하여(표3) 파파인 소화 mAb의 Fc 부위에서 수행한 TOF 질량 분석을 통해 확인된 글리칸을 신속하게 지정하고 검증할 수 있었습니다(표2). 이러한 추가 조사는 글리칸 특성 규명에 대한 신뢰도를 더욱 높임과 동시에 신속하고 상호 보완적인 구조 분석을 제공하였습니다.

표 3. 원형 glyco-chip 글리칸 결과

Glycan 지정	글리칸 accurate mass
2010 0A 0G (G1)	1,461.3574
2110 0A 0G (G1F)	1,607.5012
2020 0A 0G (G2)	1,623.5007
2120 0A 0G (G2F)	1,769.6445
2030 0A 0G	1,785.6439
1000 0A 0G	1,096.0181
1010 0A 0G	1,258.1613
2000 0A 0G	1,299.2141

결론

재조합 치료용 단일 클론 항체(mAb)의 글리코실화 프로파일링을 위해 고속 LC/MS 기반 접근방식을 개발하였습니다. Agilent 5µm Poroshell 300SB-C3 컬럼을 통해 최적화된 고분리능 고속 분리를 사용하여 원형 mAb(IgG1) 및 파파인 분해 후 Fc 조각에 대한 고감도의 특성 규명을 수행할 수 있었습니다. TOF MS 분석을 결합함으로써, 이 응용 자료에서는 mAb 글리코실화에 대한 빠르고 효과적인 특성 규명을 설명합니다. 뿐만 아니라, 글리칸 절단을 통해 원형 단일 클론 항체에 대한 mAb-glyco chip LC/MS 분석을 사용하여 TOF의 Fc 부위 글리칸 분석을 검증하였습니다.

이 분석법이 절대 정량이 아닌 상대적인 추정치만 제공하고 있지만, 그것으로 충분한 정보를 제공하여 단일 클론 항체의 글리코실화 프로파일 평가에 유용합니다. LC/MS TOF 분석으로 가능한 신속한 분리와 빠른 데이터 처리 시간 덕분에 공정 최적화 연구 과정에서 글리코실화 프로파일링과 같은 바이오 의약품 품질 분석을 용이하게 할 수 있으며, 이와 함께 생산성을 늦출 수 있는 펩타이드 맵핑 검증의 대안을 제공해 줄 수 있습니다.

참고 문헌

1. A. Lim, A. Reed-Bogan, B. J. Harmon. *Anal. Biochem.* **375**, 163(2008).
2. H. S. Gadgil, P. V. Bondarenko, G. D. Pipes, T. M. Dillon, D. Banks, J. Abel, G. R. Kleemann, M. J. Treuheit. *Anal. Biochem.* **355**, 165(2006).

자세한 정보

본 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품과 서비스에 대한 보다 자세한 정보는 www.agilent.com/chem을 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
2017년 11월 2일
5991-2323KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies