

단일 클론 항체 분석

Multiple Heart-cutting 소수성 상호작용/역상 2D-LC/MS 이용

응용 자료

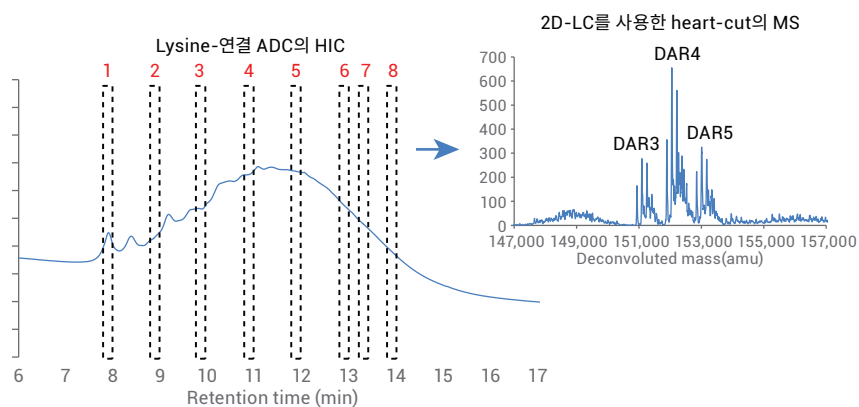
바이오 의약품 및 생물학적 치료제

저자

Gregory Staples
Agilent Technologies, Inc.

개요

소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 단일 클론 항체(mAb)에 대한 다운스트림 공정 및 분석 스케일 분석 모두에 대한 일반적인 접근법입니다. 후자의 경우에서 HIC가 종종 특정 이성질체 또는 산화 화학종과 같은 mAb 변이체를 분리할 수 있기 때문에 이것이 유용한 특성 규명 도구가 될 수 있습니다. HIC 분리는 항체 약물 결합체(ADC)의 특성 규명에서도 인기를 얻고 있습니다. 이러한 연구는 대개 MS를 이용한 질량 측정의 이점을 활용하지만 HIC 분리에서 사용되는 높은 염농도 조건은 ESI와 완전히 호환되지 않습니다. 이 연구에서는 2D-LC 시스템을 사용하여 이 난제를 해결합니다. 해당 2D-LC는 multiple heart-cutting과 연속된 온라인 역상크로마토그래피 TOF-MS에 의한 탈염/분리를 제공합니다.



Agilent Technologies

서론

단백질은 치료제로서의 잠재력을 널리 인정받고 있습니다. 여러 국가에서 다양한 질병군의 치료를 위해 승인하는 분자의 수가 증가하고 있는 것이 그 증거입니다. 대부분의 치료용 단백질은 포유류 세포 배양을 통해 생산합니다. 따라서 최종 제품은 생합성 과정의 속성을 반영하는 이질성을 가진 분자 집단입니다. 완제의약품의 제제 및 보관 과정으로 인해 이질성은 더욱 커질 수 있습니다. 이러한 요소가 모두 결합되어 단백질 치료제의 물리화학적 특성 규명을 더욱 어려운 과제로 만듭니다.

단일 클론 항체(mAb)는 승인된 치료용 단백질의 대부분을 차지합니다. 효능 및 면역원성과 같은 mAb의 여러 성능적 측면은 분자의 물리화학적 특성에 영향을 받습니다. 이러한 특징은 주요 품질 속성(CQA)으로 알려져 있으며, 제품 품질을 보장하기 위해 면밀하게 측정해야 합니다. mAb의 CQA는 N-말단 및 C-말단 특성, 이황화 결합, 글리코실화, 탈아미드화, 산화 및 당화반응을 포함할 수 있습니다. mAb와 결합한 저분자량 약물로 이루어진 새로운 계열의 ADC는 한층 더 높은 구조적 복잡성을 나타내 특성 규명 활동을 더 복잡하게 만듭니다.

연구 분석가가 mAb 특성 규명을 위해 사용할 수 있는 여러 도구 중에 HIC가 있습니다. HIC 분리 시 단백질은 높은 초기 농도의 이액성(lyotropic) 또는 코스모트로픽 염(가장 일반적으로 ammonium sulfate)의 존재 하에서 약한 소수성 고정상과 상호작용합니다. Ammonium sulfate의 농도는 그레디언트가 진행되면서 낮아지고, 그 결과 고정상으로부터 단백질이 용리됩니다.

일반적으로, HIC 분리 시 단백질은 고유의 구조를 유지하는 것으로 알려져 있습니다. 따라서 HIC는 역상(RP) 분리와는 매우 다른 분리 메커니즘을 사용합니다. HIC는 산화와 같은 일반적인 변형에서 발생할 수 있는, 표면 소수성이 다른 단백질 집단을 분리할 수 있습니다.

HIC에서 특별히 분리한 점은 분리를 촉진하는 데 사용하는 비휘발성 염의 비율이 높아 LC/MS와 완전히 호환되지 않는다는 것입니다. 주어진 크로마토그래피 피크에 대한 질량 정보가 동정에 매우 유용한 첫 번째 단계이므로 이러한 단점은 매우 아쉬운 부분입니다. 그러나 이 문제는 2D-LC를 사용하여 2차원(²D) 분리에서 RP 컬럼을 이용함으로써 해결할 수 있습니다. 이 접근법에서는 1차원(¹D) HIC 분리에서 관심 피크를 선택한 다음, 탈염 및 분리를 수행하여 LC/MS 시스템에 도입할 수 있습니다.

MHC(Multiple Heart-cutting)용 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션은 위에서 설명한 상황을 가능하게 해주는 도구입니다. 그림 1은 이 솔루션의 시스템 다이어그램을 보여줍니다. 이 구성에서는 ¹D와 ²D를 2-포지션/4-포트 듀오 밸브를 사용해 인터페이스합니다. 듀오 밸브 자체는 각각 6개의 40μL 루프가 연결된 2개의 6-포지션/14-포트 밸브와 인터페이스합니다. 이러한 배열을 통해 ¹D의 피크를 보관했다가 나중에 ²D로 주입하는 것이 가능합니다. 실질적으로, MHC는 ¹D와 ²D를 분리합니다. 이것은 사용자에게 최적의 ²D 분리를 수행할 시간을 제공합니다. 이는 분리 주기 시간이 저분자에서보다 종종 더 길 수 있는 단백질 분리에 유리합니다. 소프트웨어 특징을 포함하여 MHC 2D-LC 시스템 운영에 대한 자세한 설명은 Agilent Technologies 기술 개요(발행물 번호 5991-5615KO¹)에서 확인할 수 있습니다.

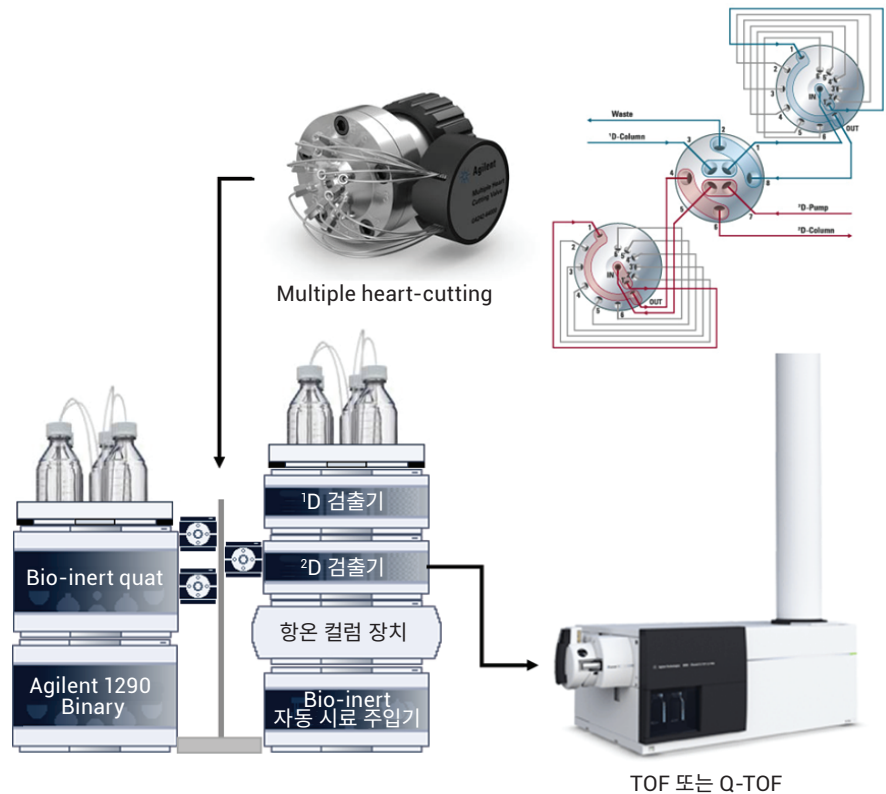


그림 1. 현재 연구에 사용된 MHC 2D-LC/MS 시스템 다이어그램.

실험

Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution
은 다음의 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary 펌프(G5611A), ¹D
- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A), ²D
- Agilent 1260 Infinity Bio-inert 고성능 자동 시료 주입기(G5667A), Agilent 1290 Infinity 온도 조절 장치(G1330B) 장착
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치(G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A), Multiple Heart-Cutting 밸브 업그레이드 키트(G4242A)를 장착한 2-포지션/4-포트 듀오 밸브 (G4236A)
- Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)

MS 시스템

Agilent 6224 TOF LC/MS 시스템,
이중 분무 ESI 이온화원 포함

컬럼

- 실리카 기반 HIC 컬럼, 4.6 × 100mm(mAb A 및 mAb B의 1차원 HIC 분리 시)
- 폴리머 기반 HIC 컬럼, 4.6 × 100mm(mAb C의 1차원 HIC 분리 시)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb C4 컬럼, 2.1 × 50mm(p/n 799775-904)(모든 mAb 시료의 2차원 RP 분리 시)

크로마토그래피 조건

¹ D 분리				
mAb A 및 B				
이동상 A	50mM sodium phosphate pH 7.0			
이동상 B	2M ammonium tartrate 함유 50mM sodium phosphate pH 7.0			
그라디언트	시간(분)	%A	%B	
	2	25	75	
	17	100	0	
	20	100	0	
	22	25	75	
	25	25	75	
mAb C				
이동상 A	50mM sodium phosphate pH 7.0			
이동상 B	2M ammonium tartrate 함유 50mM sodium phosphate pH 7.0			
이동상 C	Isopropanol			
그라디언트	시간(분)	%A	%B	%C
	0	25	75	0
	15	75	0	25
	20	75	0	25
	21	25	75	0
	25	25	75	0

² D 분리				
모든 mAb				
이동상 A	0.5% AcOH 0.05% TFA 함유 H ₂ O			
이동상 B	0.5% AcOH 0.05% TFA 함유 80:10:10 ACN:1-propanol:H ₂ O			
밸브 및 루프 구성	2-포지션/4-포트 듀오 2×6루프(동일 방향) 루프 크기: 40μL			
분석법 파라미터				
자동 시료 주입기 온도	4°C			
DAD	280nm			
주입량	1~10μL			
¹ D 파라미터				
컬럼 온도	25°C			
¹ D 유속	0.4mL/분			
² D 파라미터				
컬럼 온도	80°C			
² D 유속	0.2mL/분			
2D-LC 모드	Multiple heart-cutting			
² D 그라디언트 정지 시간	5.0분			
² D 주기 시간	7.0분			
유휴 유속	n/a			
² D 그라디언트	시간(분)	%B		
	2.00	28		
	4.00	42		
	4.60	50		
	4.61	28		
루프 채움	100%			

소프트웨어

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition Rev. C.01.07 [27] 및 1290 Infinity 2D-LC 수집 소프트웨어 제품 버전 A.01.02 [24]
- Agilent MassHunter Workstation 소프트웨어, 버전 B.05.01, Build 5.01.5125.1

용매 및 시료

모든 시약과 용매는 구할 수 있는 가장 높은 순도의 제품을 사용하였습니다.

결과 및 토의

치료용 단백질의 HIC 분리에서 질량을 측정하기 위한 목적으로 Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution 기반의 분석 플랫폼을 구성하였습니다. 앞서 설명한 MHC 키트를 사용해 ^1D 의 관심 분획물을 ^2D 로 전달하여 탈염 처리 및 LC/MS 시스템으로 도입하였습니다. 초기 실험은 성공적이었으나, ^1D HIC 분리에서 ammonium sulfate를 사용한 결과로 발생한 +98 Da 부가물이 MS 스펙트럼에 지배적으로 나타났습니다(데이터 표시하지 않음). 이 문제를 완화하기 위해, 최근에 Xiu²에서 설명한 대로 ammonium tartrate를 ammonium sulfate 대신 사용하였습니다.

그런 후에 원형 mAb 분리, 강제 산화된 mAb 분리, lysine-연결 ADC 분리의 3 가지 테스트 사례를 사용하여 HIC/RP 2D-LC/MS 시스템의 성능을 조사하였습니다.

mAb A의 HIC/RP-MS

그림 2A는 RT 17.5분에 주 피크가 용리되는 mAb A의 HIC 분리를 보여줍니다. 이 피크가 대부분의 UV 시그널을 나타냈지만, 크로마토그램의 베이스라인을 보다 면밀하게 검사했을 때 RT 16.4, 16.8 및 18.9분에 용리되는 3 개의 다른 피크가 나타났습니다. 주 피크와 함께 ^1D HIC에서 이러한 각 피크의 Heart cut을 취하여 TOF LC/MS 시스템과 인터페이스한 ^2D RP 컬럼으로 보냈습니다.

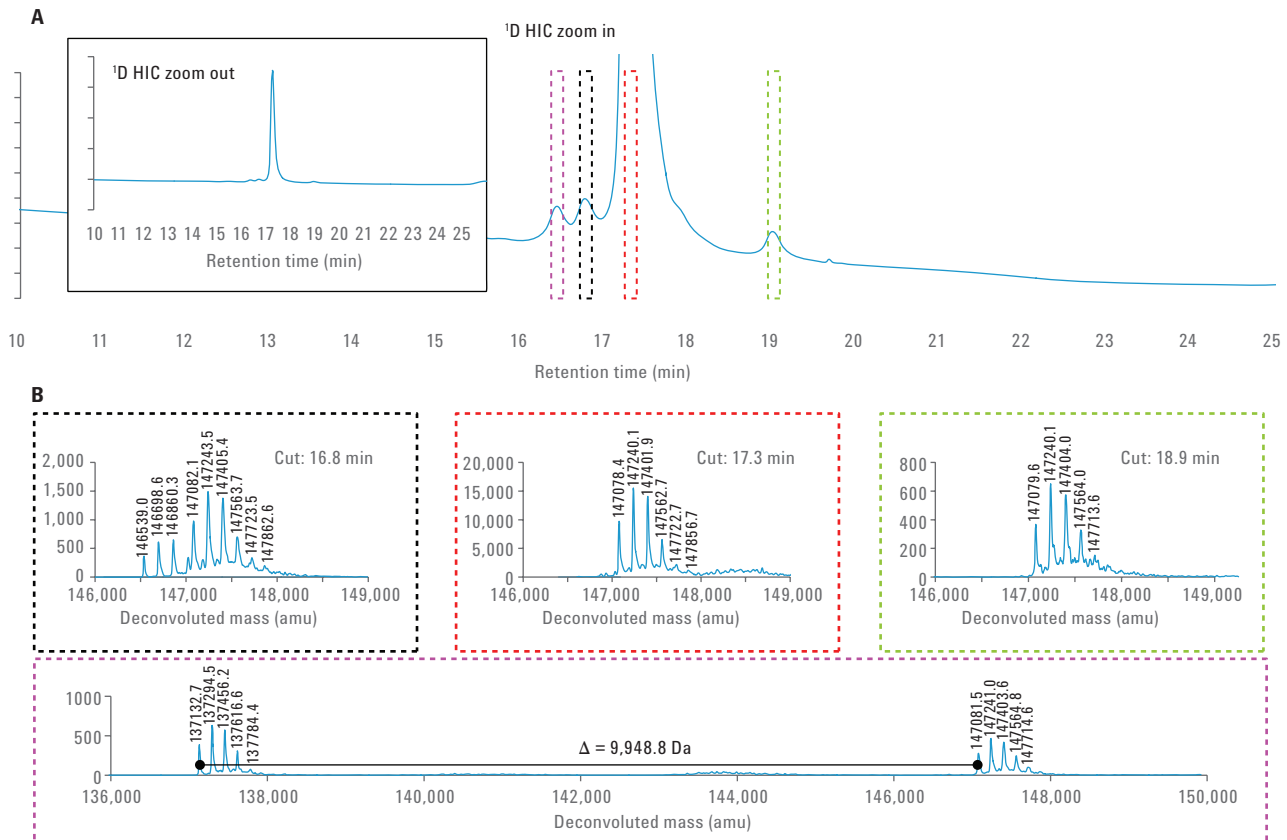


그림 2. HIC/RP 2D-LC/MS 시스템을 사용한 mAb A 분석. (A) 1개의 주 피크(zoom out 참조)와 함께 여러 개의 위성 피크(zoom in 참조)가 나타난 mAb A의 HIC 크로마토그램. (B) 16.4, 16.8, 17.3 및 18.9분에서 첫 번째 차원의 Heart-cut을 저장한 다음, 두 번째 차원에서 분리하여 MS 검출을 수행함. 주 피크와 질량 차이를 보이는 다양한 불순물이 검출됨

그림 2B는 그에 따른 질량 스펙트럼을 보여줍니다. RT 16.4분의 피크는 주 피크보다 질량이 9948.8 Da만큼 낮았습니다. RT 16.8분의 피크 또한 질량이 낮았습니다(이 경우 539.4 Da 차이). 마지막으로 RT 18.9분의 피크는 주 피크와 질량 차이를 보이지 않았습니다. 데이터에 따르면 가장 먼저 용리되는 피크는 mAb의 잘려진 변이체를 나타내는 것으로 보이는 반면, 가장 늦게 용리되는 피크는 주 mAb 피크와 표면 소수성이 크게 다른 이성질체를 나타낼 수 있습니다.

강제 산화된 mAb B의 HIC/RP-MS

1% TBHP를 사용하여 37°C에서 72시간 동안 mAb B를 강제로 산화하였습니다. 그림 3A에 나타난 것과 같이, TBHP 처리를 통해 mAb 주 피크보다 0.5분 앞선 12.5분에 용리되는 피크를 생성하였습니다. MHC 2D-LC/MS 접근법을 사용하는 질량 측정을 위해 이 두 개의 피크를 각각 선택하였습니다.

예상대로 TBHP 처리 결과 나타난 피크는 그림 3B 및 3C에 나타난 바와 같이 mAb 주 피크보다 질량이 더 높았습니다. 이 경우, 질량이 64 Da 더 높게 나타났으며 이는 4개의 산화 반응과 일치합니다. 분자에 대한 사전 정보에 근거하여 이러한 산화반응은 mAb내에 존재하는, 이 변형에 영향받기 쉬운 4개의 methionine 잔기에서 발생할 가능성이 있습니다.

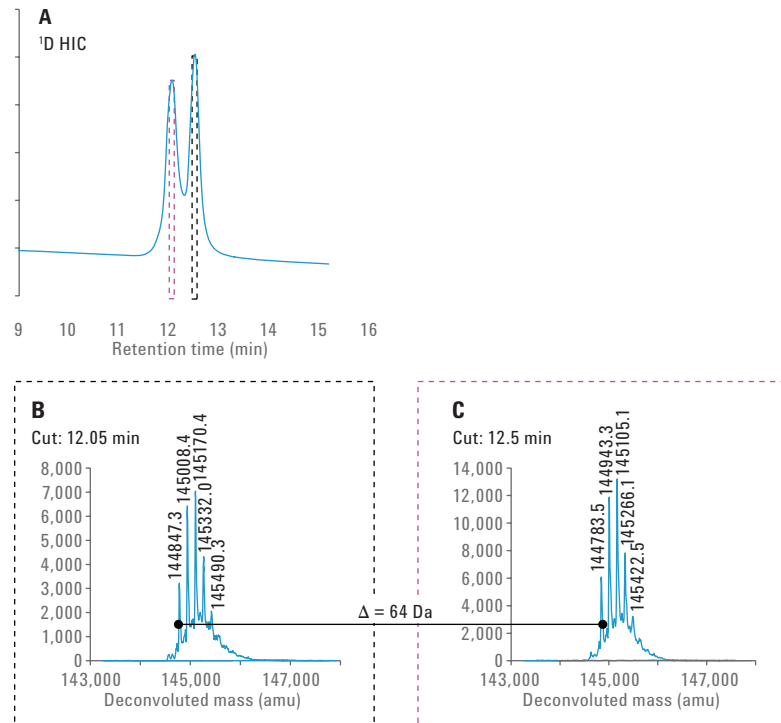


그림 3. HIC/RP 2D-LC/MS 시스템을 사용한 mAb B 분석. (A) 1% TBHP로 처리한 mAb B의 HIC 크로마토그램. TBHP 처리 결과 RT 12.05분에 새로운 피크가 나타남. (B) 12.05분에서의 피크 질량 측정. (C) 12.5분에서의 피크 질량 측정. 산화된 mAb의 질량이 처리하지 않은 mAb보다 64 Da만큼 더 높았으며, 이는 4 개의 잠재적 산화 부위를 시사함

mAb C(lysine-연결 ADC)의 HIC/RP-MS

마지막으로, lysine-연결 ADC(mAb C)의 HIC 분리에서 일련의 질량 측정을 수행하였습니다. 그림 4에 나타난 바와 같이, mAb C의 HIC 분리에서는 자세한 특성 규명에 필요한 분리능이 부족합니다. 이는 저분자 약물이 mAb 표면에 접근 가능한 수십 개의 lysine 잔기와 결합하는 lysine-연결 ADC에 대한 HIC 분리에서 일반적으로 나타나는 현상입니다. 그러한 ADC 제제는 매우 복합적인 위치 이성질체의 혼합물로 구성됩니다. HIC가 ADC의 약물 대 항체 비율(DAR)을 결정하는 데 종종 유용하지만, 이 경우는 분명한 예외에 해당합니다.

mAb C의 HIC 분리를 더 자세히 조사하기 위해 질량 측정을 수행할 수 있도록 총 8개의 heart-cut을 선택하여 ^2D 로 보냈습니다. 이 heart-cut은 그림 4에 1~8로 번호를 매긴 파선 직사각형으로 표시하였습니다. 이러한 각 heart-cut의 MS 결과는 그림 5에 나타나 있습니다. Deconvolution 질량 스펙트럼은 예상대로 DAR의 함수로서 RT가 증가한다는 것을 보여주었습니다. 또한 특정 DAR 화학종이 여러 heart-cut에 존재한다는 사실을 근거로, 혼합물에서 위치 이성질체에 기반한 선택성이 어느 정도 있다는 것 또한 명백합니다.

0개(비결합 mAb)에서 최대 8개의 저분자 약물을 포함한 화학종을 검출하였습니다. 게다가 저분자 약물 없이 링커 분자만을 포함한 화학종도 혼합물에 존재하였는데, 이것은 mAb C의 복잡성을 갖는 분자의 감도 높은 질량 측정을 교란시키는 하나의 요인입니다. 또 다른 교란 요인으로는, 단 $20\mu\text{g}$ 의 mAb C가 HIC 차원에 로드되었고, 두 번째 차원으로 옮겨진 양은 해당 총 질량의 일부에 지나지 않았다는 사실입니다. 또한, 시료 전처리를 간소화하기 위해 의도적으로 시료의 탈글리코실화를 하지 않기로 선택했습니다. 이러한 각 요인이 결합하여 전체 MS 시그널을 희석하였음에도 불구하고 결과는 명확합니다. 이 사실은 이러한 유형의 분석에 많은 양의 시료가 필요하지 않다는 점에서 장점이 됩니다. 수집한 데이터는 전반적으로 MHC 2D-LC HIC/RP 플랫폼의 탈염 효율이 극도로 높음을 보여줍니다.

결론

HIC는 변형된 화합물이 소수 화학종으로 존재하는 경우에도 mAb의 특성을 규명할 수 있는 대단히 유용한 도구입니다. 여기에서는 mAb 및 ADC의 분리를 예로 들어 HIC의 유용성을 설명하였습니다. HIC는 고유한 선택성 덕분에 탁월한 바이오분석 도구로

인정받고 있습니다. 그러나 미지 성분 피크를 측정하는 첫 번째 단계인 단백질 변이체의 질량 측정은 HIC 시 분리에 사용하는 비휘발성 염의 농도가 높기 때문에 종종 간단하지 않습니다. HIC와 RP를 결합한 2D-LC/MS 플랫폼을 사용할 때 이러한 어려움을 해결할 수 있습니다. mAb A에 대해 나타낸 것과 같이, 특히 미지의 피크를 다룰 경우 이 연구에서 얻은 MS 측정 결과는 동일성(identity)을 확인할 수 있는 유용한 첫걸음입니다. 검사한 원형 mAb에서 RP 컬럼은 주로 탈염 도구로 작동합니다. 환원된 시료, 여러 조각으로 소화된 시료 또는 사슬간 cysteine-연결 ADC 유래 시료와 같은 기타 시료의 경우에는 ^2D RP 컬럼이 제품 특성 규명에 유용한 추가 분리를 제공합니다.

MHC의 사용을 통해 연구자는 ^1D 에서의 관심 피크를 저장하여 최적화된 ^2D 분리를 수행하는 데 필요한 충분한 시간을 할당할 수 있습니다. 이것은 현재 연구에서 비교적 낮은 유속($0.2\text{mL}/\text{분}$)으로 시료를 탈염하고 MS에 감도 높게 도입하는 데 필요한 적절한 시간을 할당할 수 있었다는 점에서 유용하였습니다. MS 분석을 위한 탈염이 목적은 아닌 경우라도, MHC 형태의 2D-LC는 대개 단백질 시료 연구에 필요한 더욱 긴 ^2D 그라디언트를 수행할 수 있는 유연성을 제공합니다.

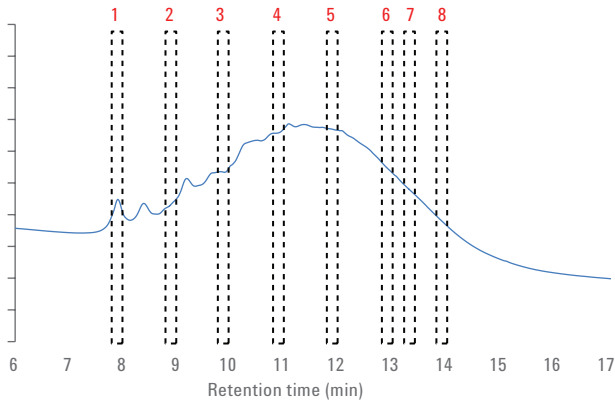


그림 4. HIC/RP 2D-LC/MS 시스템을 사용해 분석한 mAb C (lysine-연결 ADC). HIC 결과 크로마토그램은 약 7분간의 용리동안 매우 잘 분리되지 않은 피크 그룹으로 구성되었으며, 이는 제제에 존재하는 다수의 위치 이성질체를 반영함. RT 7.9, 8.9, 9.9, 10.9, 11.9, 12.9, 13.4 및 13.9분에서의 heart-cut 8개를 선택하여 2D로 전달

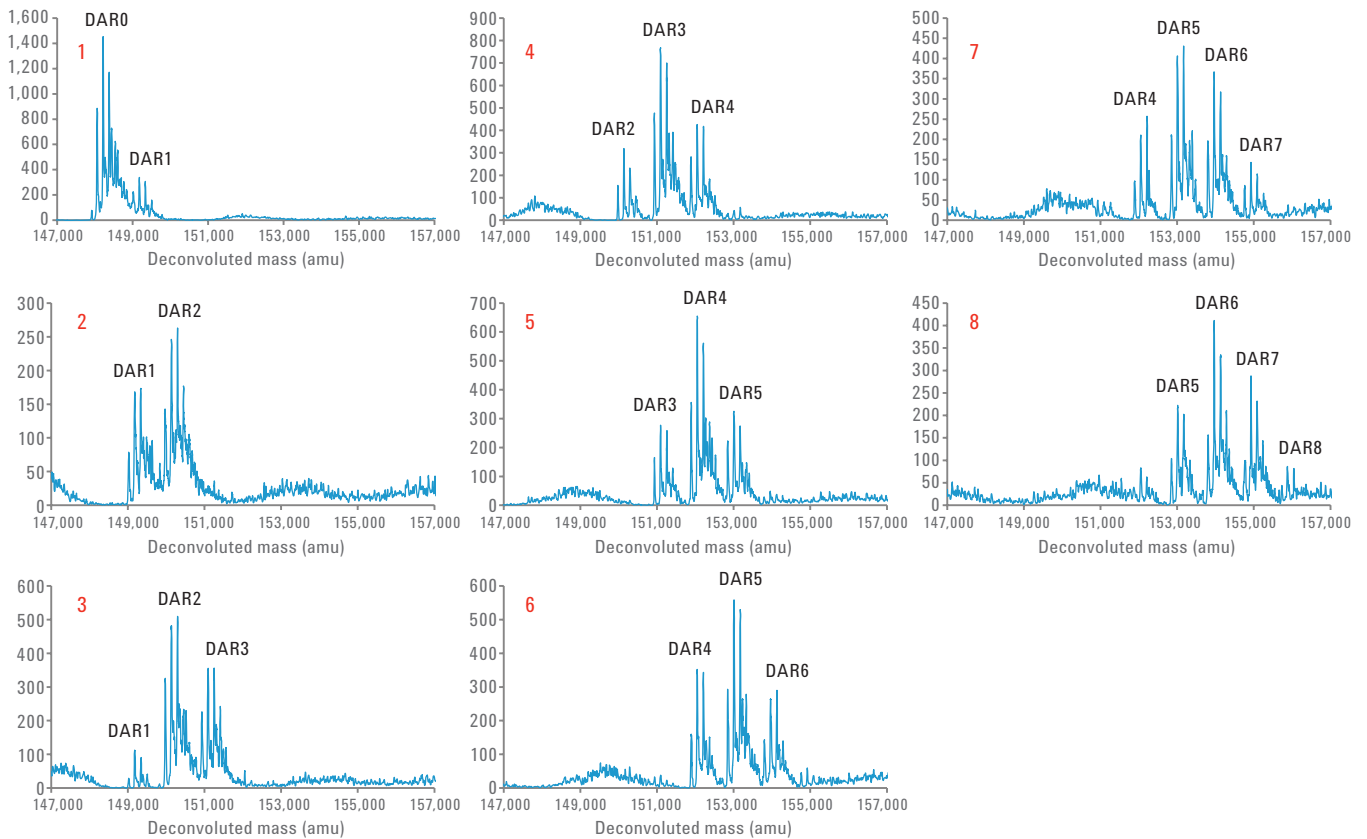


그림 5. 그림 4의 heart-cut에 해당하는 MS 스펙트럼. 0~8 범위의 DAR을 갖는 mAb가 관찰됨. 이 스펙트럼은 페이로드(약물)가 없는 링커에 의해 변형된 분자의 소집단 외에 mAb의 글리코형 분포 또한 반영함

참고 문헌

1. Buckenmaier, S. Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution for Multiple Heart-Cutting, *Agilent Technologies Overview*, publication number 5991-5615EN, **2015**.
2. Xiu, L. et al. Effective Protein Separation by Coupling HIC and RP for Top-down Proteomics. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, pp 7899-7906.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오.
진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 2월 1일, 한국에서 인쇄
5991-6376KO

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



Agilent Technologies