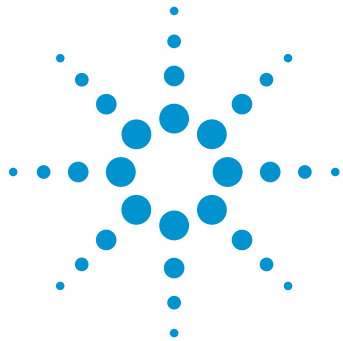




Agilent 1290 Infinity 온라인 2D-LC/MS 솔루션을 이용한 클론 선별

응용 자료

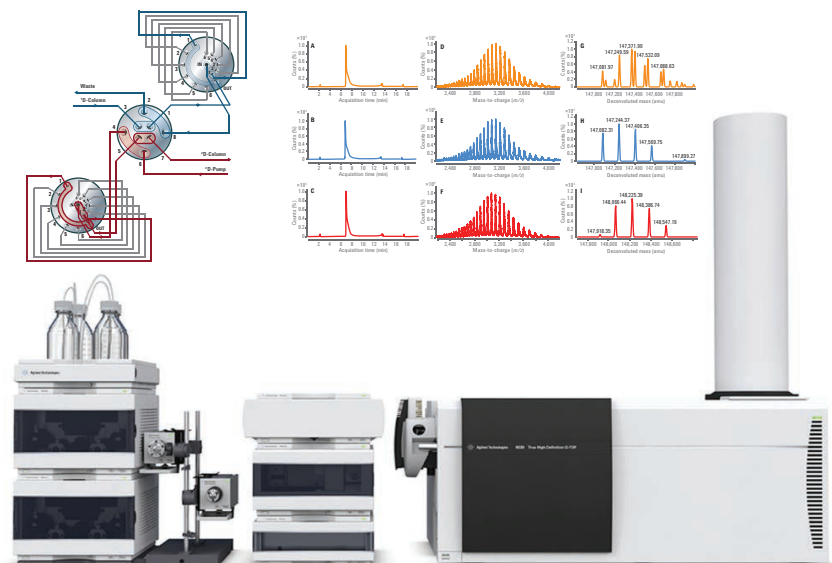
바이오 의약품

저자

Ravindra Gudihal and Syed Salman
Lateef
Agilent Technologies, India Pvt Ltd,
Bangalore, India

개요

이 응용 자료는 Agilent 1290 Infinity 온라인 2D-LC/MS 솔루션의 클론 선별 및 단일 클론 항체(mAb) 정량에 대한 개념 증명(proof of principle)을 소개합니다. 온라인 2D-LC의 1차원에서 Agilent Bio-Monolith Protein A 컬럼을 사용하고, 질량 분석기와 연결된 2차원에서 Agilent AdvancedBio RP-mAb diphenyl 컬럼을 이용해 탈염과정을 수행합니다. 첫 번째 단계에서는 mAb를 농축하고, 두 번째 단계는 mAb의 올바른 품질 확인에 사용하였습니다.



Agilent Technologies

소개

단일 클론 항체(mAb)는 최근에 가장 빠르게 성장하는 단백질 치료제입니다¹. 바이오시밀러 시장 또한 급속히 성장하고 있습니다². mAb의 개발 과정에서는 정확하게 의도한 mAb를, 만족할 만큼의 발현량으로 생산할 수 있는 우수한 클론을 선별하기 위해 잘 계획된 전략을 세우는 것이 매우 중요합니다. 이것은 바이오시밀러 개발에서도 적용됩니다. 현재 사용되는 클론 선별 과정은 mAb를 농축하거나 정제한 다음, 농축한 분획을 수집하여 별도의 실험으로 질량 분석을 수행하는 것입니다. 온라인 2D-LC/MS 분석은 한 번의 실행으로 서로 다른 분석법을 수행할 수 있는 솔루션을 제공합니다. 이 응용 자료는 1차원에서의 친화 크로마토그래피에 의한 단백질 농축 및 정제의 조합과, 2차원에서 accurate-mass 질량 분석기와 연결된 역상 크로마토그래피를 이용한 단백질 질량 확인에 대해 소개합니다. 본 연구에서는 개념 증명 과정으로서, rituximab에 대한 상용 innovator와 바이오시밀러 한 쌍을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 첨가하여 온라인 2D-LC/MS 방법론 검증을 위한 유사 매트릭스로 사용하였습니다. 이 분석법은 클론 선별 과정에 쉽게 적용할 수 있습니다.

재료 및 방법

Rituximab 바이오시밀러 및 innovator는 현지 약국에서 구입하였으며 제조업체의 지침에 따라 보관하였습니다. Acetic acid, formic acid, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium chloride 및 LC/MS 등급 용매는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였습니다. 초순수는 0.22µm의 membrane point-of-use cartridge (Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다.

시료 전처리

검량선 작성을 위해 10mg/mL의 항체 원액을 DMEM 배지로 희석하였습니다. 시료는 주입 전에 5,000g에서 5분 동안 원심분리 하였습니다.

기기

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션은 다음의 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary 펌프(G5611A)
- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
- 1290 Infinity 항온 장치 (G1330B)를 장착한 Agilent 1290 Infinity 자동 시료 주입기(G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치(2x G1316C)

- 2-위치/4-포트 duo-valve(2D-LC 밸브 헤드, G4236A)를 장착한 Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A)
- 40µL 루프의 multiple heart-cutting 밸브 (2x G4242-64000)를 장착한 Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(2X G1170A)
- 1mm 플로우 셀을 포함한 Agilent 1260 Infinity 다이오드 어레이 검출기(2x G1315C)
- Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS (G6530A)

컬럼

- 1D: Agilent Bio-Monolith Column Protein A, 4.6 × 12.5mm, 5.0µm (p/n 5069-3639)
- 2D: Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50mm, 3.5µm (p/n 799775-944)

소프트웨어

- Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition 소프트웨어(버전 C.01.07 [27]) 및 Agilent 1290 Infinity 2D-LC Acquisition 소프트웨어(버전 A.01.03)
- 기기 제어용 Agilent MassHunter Workstation (B.06.01)
- LC/MS로부터 획득한 데이터는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어 (B.07)와 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어(B.07)를 이용해 분석하였습니다.

표 1. LC/MS 기기 파라미터

파라미터	값	
밸브 및 루프 구성	2-포지션/4-포트 duo 2 × 6 루프(상호 반대방향) 루프 사이즈 40μL	
1D 펌프	Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary 펌프	
1D 이동상	A) PBS (Sigma p/n P4417) B) 0.5 M acetic acid in water	
1D 컬럼 온도	25°C	
1D 그레디언트	시간(분) %B 유속(mL/분) 1 0 1 1.1 100 1 4.0 100 1 4.1 0 1 10.0 0 1 11.0 0 0	
주입량	5μL	
온도 조절 장치 온도	4°C	
다이오드 어레이 검출기	280nm, 4nm, Ref. 360nm, 100nm 피크 폭 1D >0.05분 피크 폭 2D >0.05분	
2D 펌프	Agilent 1290 Infinity Binary 펌프	
2D 이동상	A) 98 % water, 2 % IPA, 0.1 % FA B) 70 % IPA, 20 % acetonitrile, 10 % water, 0.1 % FA	
2D 컬럼 온도	80°C	
2D 그레디언트	시간(분) %B 유속(mL/분) 0 20 0.5 4 20 0.5 5 40 0.5 10 70 0.5 11 90 0.5 11.1 20 0.5 15 20 0.5	
모드	HiRes sampling, 4 커트, 시간 기반	
Agilent 6530 Q-TOF LC/MS 시스템		
이온 모드	양이온 모드	
이온화원	Agilent Dual Jet Stream	
건조 가스 온도	350°C	
건조 가스 유량	8L/분	
시스 가스 온도	400°C	
Sheath gas 유량	11L/분	
분무기	35psi	
캐필러리 전압	5,000V	
노즐 전압	2,000V	
MS 범위(m/z)	2,000~5,000	
LC 유로 전환	타임 세그먼트 시작 시간(분) 전환 밸브 위치	
	1 0 폐기물	
	2 5 MS	
	3 10 폐기물	

결과 및 토의

매트릭스 배지에서 mAb를 농축하기 위한 Protein A 정제법은 앞서 개발되었습니다³. 본 연구에서는 mAb의 1차원 친화성 정제에 이 분석법을 적용하였습니다(표 1). 2차원 크로마토그래피에서도 마찬가지로, 이전에 개발된 역상 분석법을 채택하여⁴, mAb의 온라인 탈염을 포함하고, 질량 분석기와 연결하였습니다. 또한 2차원에서 더 빠른 분석이 필요한 경우, 길이가 더욱 짧은 최신 Agilent AdvanceBio Desalting-RP 카트리지를 사용할 수 있습니다⁵. 그림 1은 Multiple heart-cutting의 유로 연결 다이어그램으로서, 상호 역방향의 유로를 포함한 중앙의 2D-LC 밸브와 multiple heart-cutting 밸브 2개로 구성되어 있습니다. Multiple heart-cutting 설정은 2개의 6-위치/14-포트 밸브에 연결된 12개의 40-μL 루프로 이루어져 있으며 매우 뛰어난 피크 파킹(parking) 기능을 가지고 있습니다. 본 실험은 이 밸브 구성을 사용하여 수행하였습니다.

클론 선별을 위한 온라인 2D-LC/MS 분석법을 설정하기 위해 2D 펌프 설정의 미리보기 옵션을 사용하여 이전에 저장했던 친화성 정제의 1차원 크로마토그램을 로드하였습니다. Protein A 정제에 의한 mAb 피크는 2차원 분석을 위해 heart-cut 하였습니다(그림 2에 표시). 그림 2는 2D 펌프 설정을 보여주며, Protein A 정제 mAb 피크가 하단에 표시되어 있습니다. 고분해능 heart-cutting을 이용하여 샘플링된 Protein A 정제 피크의 2D 타임 세그먼트를 크로마토그램에서 밝은 오렌지 색으로 나타냈습니다.

그림 3은 1차원 크로마토그램의 세 번째 커트 위치가 선택되어 나타난 2D Heart-cut 뷰어를 보여줍니다(A). 선택된 커트 부분에 대한 다이오드 어레이 검출기(DAD)의 2D UV 크로마토그램도 하단 패널(D)에 나타납니다. 또한 이 뷰어는 선택된 세 번째 heart-cut의 샘플링 테이블(B)과 피크 테이블(C)을 표시합니다.

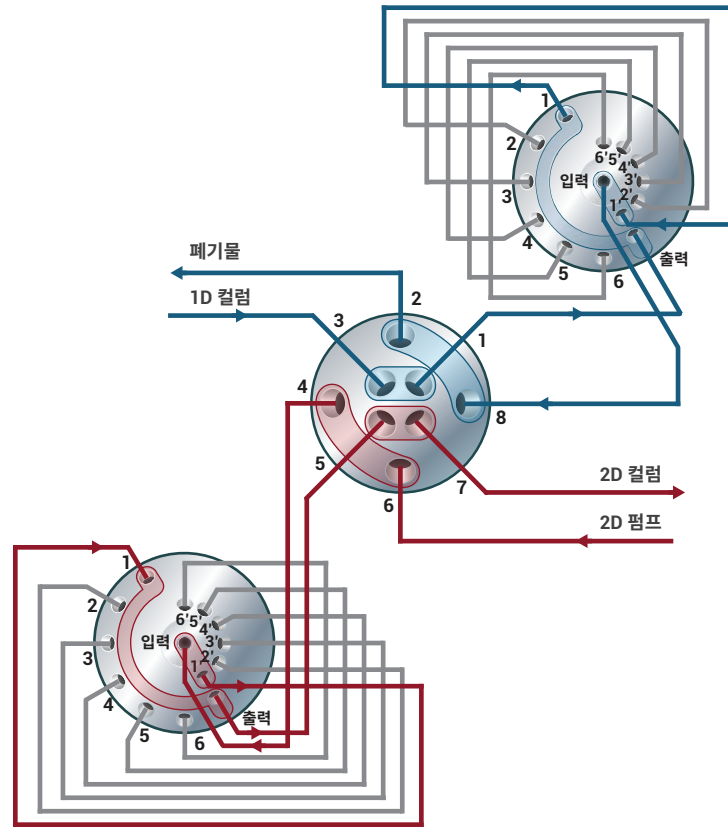


그림 1. Multiple heart-cutting의 유로 연결 다이어그램. 상호 역방향 유로 구성의 중앙 2D-LC 밸브 및 2개의 multiple heart-cutting 밸브 2로 구성

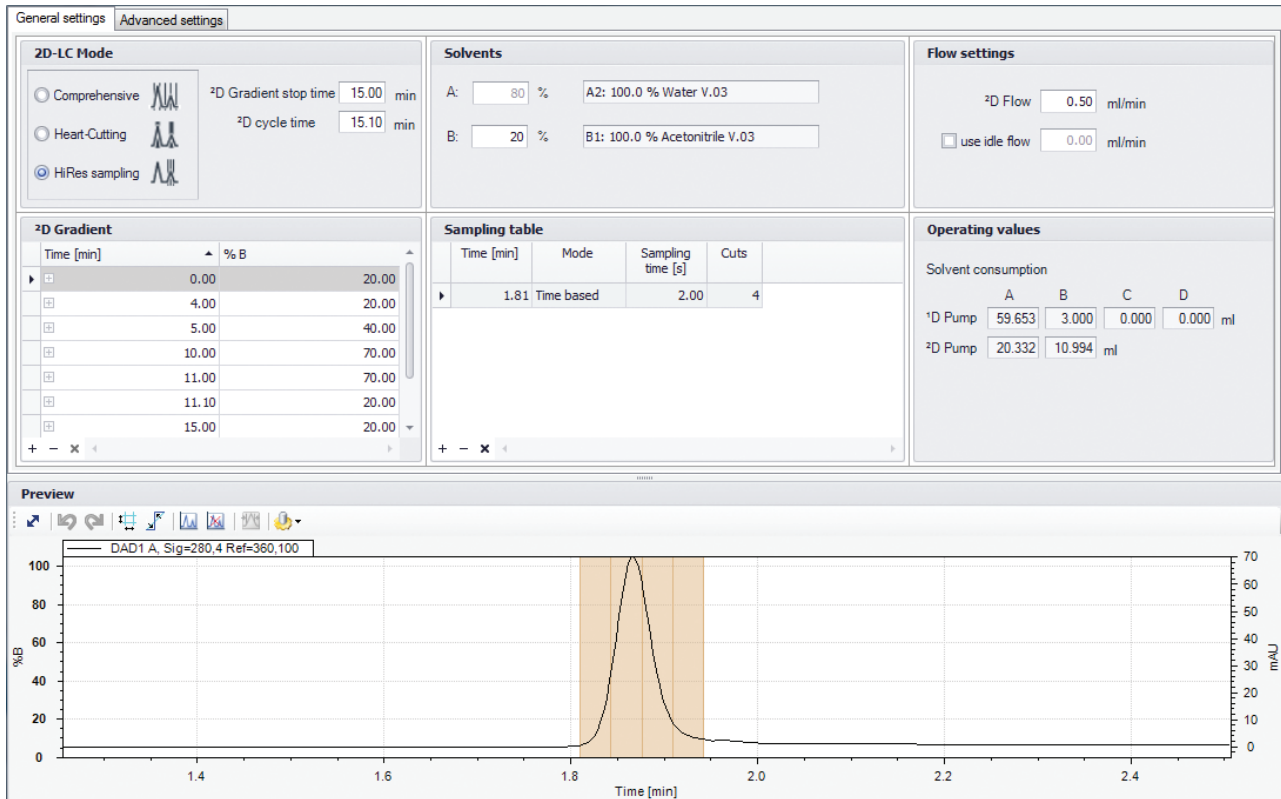


그림 2. 고분해능 피크 샘플링을 위한 분석법 설정. 위의 미리보기에서는 서로 다른 루프에 저장된 Protein A 정제 피크에 대한 4개의 고분해능 커트를 보여줌

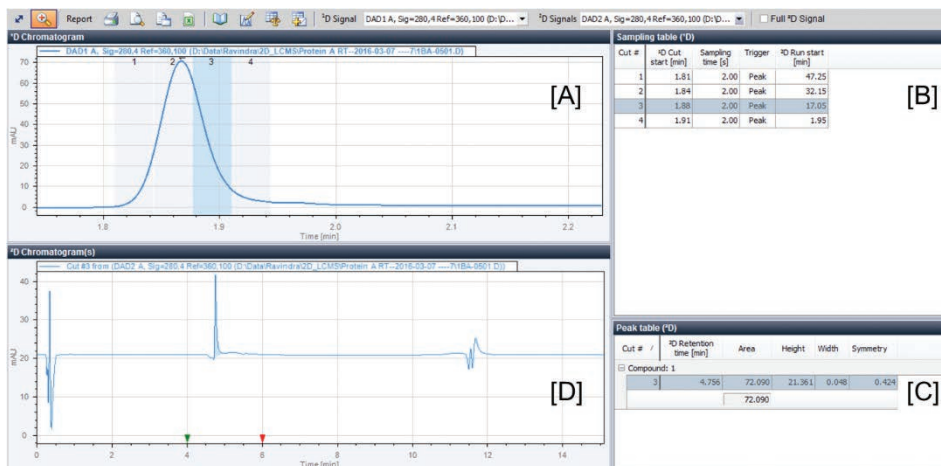


그림 3. Protein A 정제의 2차원 분석 결과. Heart-cut이 표시된 1차원 크로마토그램(A), 샘플링 테이블(B), 피크 테이블(C) 및 2차원 크로마토그램(D)

바이오시밀러 개발 프로그램을 진행하는 동안 수율이 낮은 클론과 높은 클론을 구분해야 합니다. mAb 절대 농도를 측정하기 위해 innovator 분자를 이용한 외부 표준 검량을 진행할 수 있습니다. 본 연구에서는 innovator rituximab을 사용해 검량선을 작성하였습니다. Innovator rituximab의 검량선은 그림 4에서, 해당 크로마토그램은 그림 4B에서 확인할 수 있습니다. 검량선 작성 결과 0.2~10µg/µL 범위에서 탁월한 직선성을 얻었습니다. 이 검량 플롯을 이용하여 농도를 알고 있는 2개의 스팅킹 시료를 측정하였으며, 그림 4의 삽도에 그 결과를 요약하였습니다. 결과는 스팅킹 시료의 우수한 회수율을 시사하고, 클론의 mAb 농도 측정을 통해 항체 생산 수율이 낮은 클론과 높은 클론을 구분하는데 있어 검량선의 사용이 유용함을 증명하였습니다.

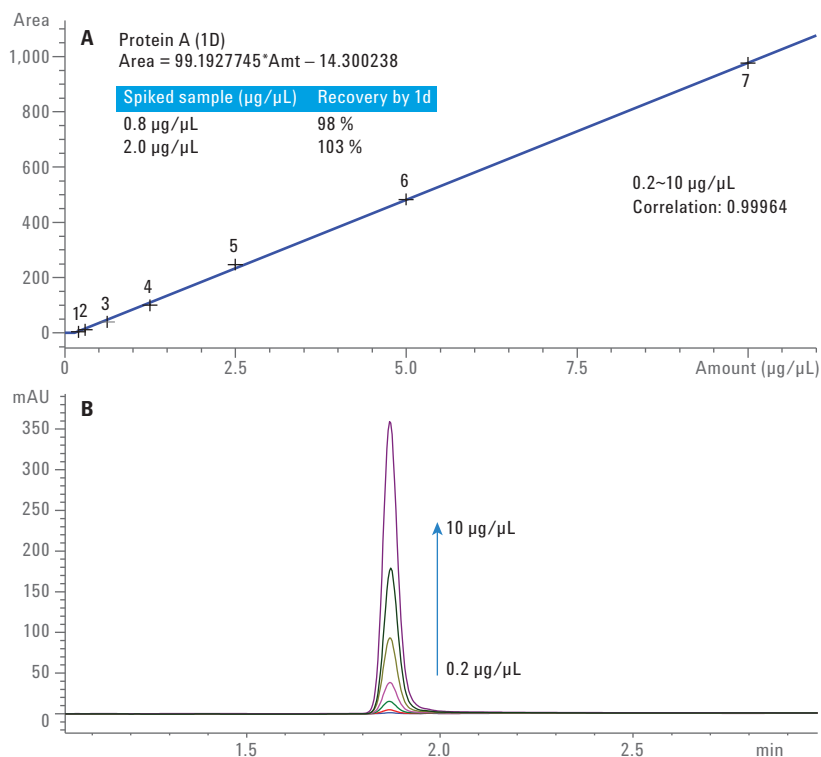


그림 4. Protein A정제를 이용하여, DMEM에 첨가된 rituximab의 검량선(A) 및 280nm에서의 rituximab 검량 포인트에 대한 Agilent Bio-Monolith Protein A 크로마토그램의 오버레이(B)

LC/MS 분석

2차원 분리의 용리액을 Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS로 도입하여 mAb의 질량을 측정하였습니다. 그림 5는 원형 mAb의 LC/MS 분석 결과를 나타냅니다. Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 컬럼에서 IPA/ACN/H₂O 이동상을 이용하여 분석한 결과 피크 폭이 좁고 모양이 우수한 피크를 얻을 수 있었습니다(그림 5A, 5B, 5C). 그림 5D, 5E, 5F는 mAb의 하전 상태 엔벨로프의 가우시안 분포를 나타냅니다.

그림 5G, 5H, 5I에서는 mAb(rituximab innovator, 바이오시밀러 및 IgG1)의 deconvolution된 스펙트럼을 보여줍니다. 스펙트럼은 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어에서 피크 모델링 deconvolution 알고리즘을 사용하여 deconvolution 하였습니다. mAb에 부착된 서로 다른 글리코형에 대응되는 여러 질량 피크를 관찰할 수 있었습니다. 원형 mAb 분석으로 항체가 질량에서 차이를 갖는다는 것을 밝혀냈습니다. 일부 주요 피크에 대한

질량은 바이오시밀러와 innovator 쌍이 유사하였으나, 바이오시밀러는 추가 피크를 보였으며 이는 바이오시밀러 mAb의 추가 변형에 해당되는 피크일 수 있습니다. 바이오시밀러 mAb의 전하 이질성(heterogeneity)을 가능한 전하 변이체의 설명과 함께 소개한 응용 자료를 발행한 바 있습니다^{6,7}. 바이오시밀러-innovator 쌍과 비교 시 IgG1은 서로 다른 분자량을 보였습니다. 이 결과는 mAb간의 차이 구별에 있어 accurate mass 질량 분석의 유용성을 입증합니다.

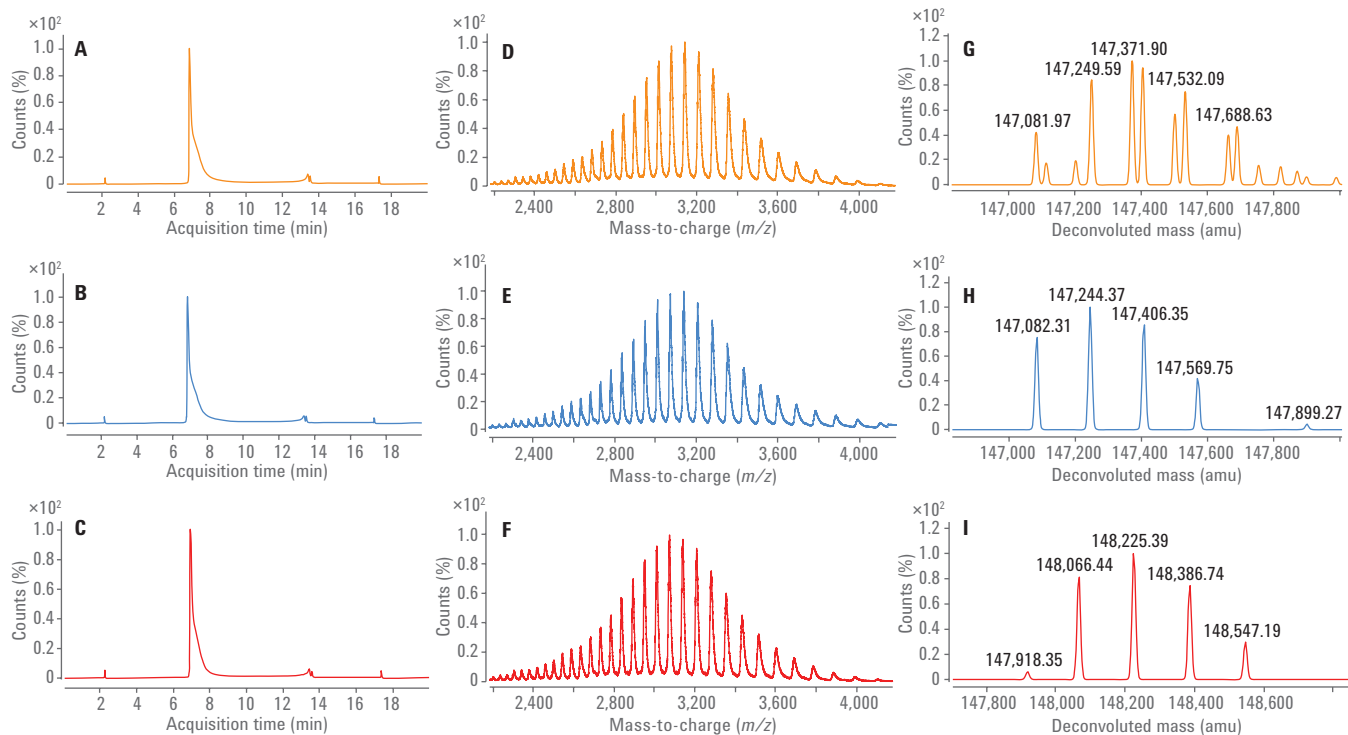


그림 5. 원형 mAb의 TIC (A, B, C), 하전 상태 엔벨로프(D, E, F) 및 그에 해당하는 각각의 deconvolution된 질량(G, H, I). A, D 및 G는 바이오시밀러, B, E 및 H는 innovator 그리고 C, F 및 I는 IgG1임

미러 플롯

바이오시밀러-innovator 쌍을 비교하기 위해 미러 플롯을 사용하였습니다. 미러 플롯을 통해 바이오시밀러가 innovator에 비해 더 많이 변형되었음을 쉽게 관찰할 수 있습니다. 이러한 미러 플롯은 추가 연구를 위해 선택한 클론의 품질에 대해 신속한 결정을 내리는 데 도움이 됩니다.

결론

- 본 연구는 클론 선별을 위해 multiple heart-cutting과 MS를 연결한 구성의 온라인 2D-LC/MS 분석법에 대해 소개하였으며, 2D-LC의 1차원에서는 친화 크로마토그래피를, 2차원에서는 역상 크로마토그래피에 의한 탈염 과정을 사용하였습니다.
- Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS와 multiple heart-cutting 기능을 탑재한 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션은 mAb 개발 과정에서 클론 선별을 위한 완벽한 솔루션임을 나타냅니다.
- Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어는 mAb간의 차이점을 찾기 위한 데이터 추출, deconvolution 그리고 미러 플롯 생성에 사용하였습니다.
- 이 분석법은 클론 선별 과정 및 바이오시밀러 비교 분야에 유용하게 사용할 수 있습니다.

참고 문헌

1. Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J. Antibody Therapy of Cancer, *Nature Reviews Cancer* **2002**, *12*, 278–287.
2. Udpa, N.; Million, R. P. Monoclonal antibody biosimilars, *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15*, 13–14.

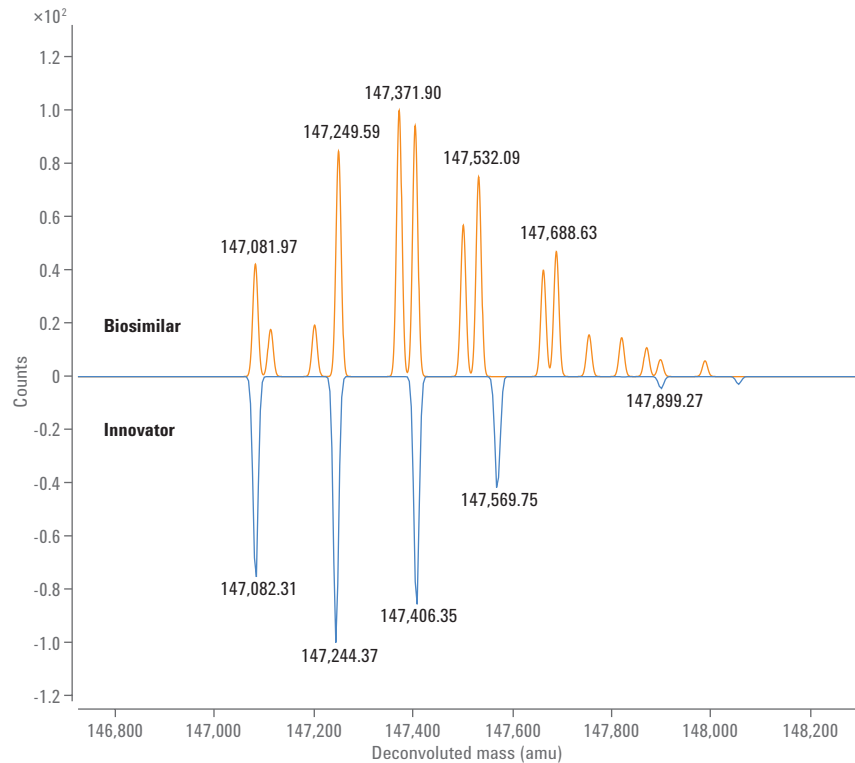


그림 6. 바이오시밀러(밝은 갈색) 및 innovator(파란색)의 원형 질량 비교 결과를 나타내는 미러 플롯

3. Dumont, E.; et al., Cell Clone Selection Using the Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5124EN, **2014**.
4. Suresh, Babu C. V., LC/MS of Intact Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Agilent AdvanceBio RP-mAb, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6296EN, **2015**.
5. Suresh, Babu C. V., Gudihai, R. 2D-LC/MS mAb 분석에서 온라인 탈염을 위한 Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지 (Agilent AdvanceBio Desalting-RP Cartridges for Online Desalting in 2D-LC/MS mAb Analysis), *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행물 번호 5991-7066KO, **2016**.
6. Schneider, S., 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6673EN, **2016**.
7. Suresh Babu C. V., Charge Heterogeneity Analysis of Rituximab Innovator and Biosimilar mAb, *Agilent Technologies Application Note*, 5991-5557EN, **2015**.

www.agilent.com/chem

연구 용도뿐만 아니라 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 9월 1일, 한국에서 발행
5991-7297KO

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



Agilent Technologies