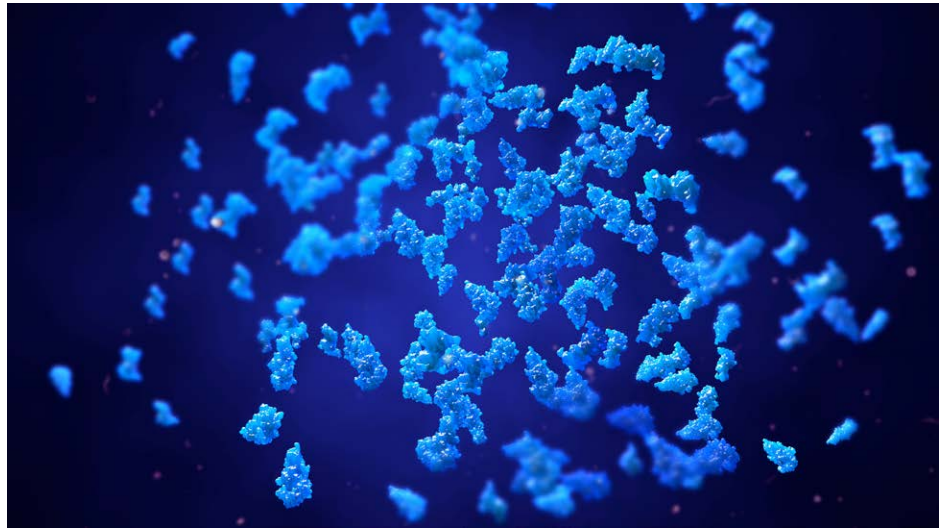


FTIR을 사용한 Innovator 및 바이오시밀러 치료용 단백질 응집 분석

Agilent Cary 630 FTIR 분광기를 이용한 농축된 시료 내
리톡시맵 응집 측정

저자

Aveline Neo, Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.



개요

단백질 응집은 단일 클론 항체(mAb)와 같은 생물 기반 치료제 생산 또는 보관 과정에서 발생할 수 있으며, 치료제의 효과, 효능, 안전성 등에 영향을 미칠 수 있습니다. 따라서 mAb 생산 과정에서 단백질 응집을 모니터링하는 것은 중요합니다. 푸리에 변환 적외선(FTIR) 분광법은 빠르게 mAb 응집을 모니터링할 수 있는 비파괴 기술로, 고농도 시료와 같이 다른 방법을 사용했을 때는 분석이 어려운 시료에서도 모니터링이 가능합니다. 이 응용 자료에서는 Agilent Cary 630 FTIR 분광기를 사용해 열 유도 단백질 응집을 측정했습니다. 이 연구를 통해 제제 완충액 내 고농도 mAb 시료의 안정성에 대한 정보를 얻을 수 있습니다. 또한 이 연구는 Cary 630 FTIR을 사용해 innovator 또는 바이오시밀러 제품의 품질 관리 및 생산 과정을 최적화할 수 있는 방법을 보여줍니다.

소개

응집은 생명을 위협하는 면역 반응에 기여할 수 있기 때문에 mAb 개발 및 생산 과정에서의 주요 문제로 여겨집니다. mAb는 낮은 pH, 고온, 고농도와 같은 스트레스 조건에 노출되었을 때 발생할 수 있습니다. 치료용 mAb는 보통 고농도로 처방되기 때문에, mAb 응집을 중요 품질 속성으로서 모니터링하는 것이 중요합니다.¹

바이오시밀러는 innovator(오리지널) 치료제의 복제 약품으로, 오리지널 참조 제품과 거의 동일한 품질, 안전성, 효능을 갖추고 있습니다. 규제 기관으로부터 바이오시밀러 허가를 받으려면 innovator과 바이오시밀러 제품 간 생리화학적 유사성이 증명되어야 합니다.²

크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 단백질 응집 연구를 위한 가장 적합한 표준 기술입니다. 그러나 SEC는 분석 과정에서 희석을 할 경우 시료 내 응집 구성에 변화가 있을 수 있기 때문에 고농도 mAb 시료 모니터링에는 적합하지 않습니다. 이와 달리 제약 실험실 또는 생산 과정 내에서 널리 사용되며 안정된 방법으로 인정받고 있는 FTIR은 고농도 단백질 시료 내 응집 연구에 적합합니다.

이 연구에서는 Agilent Cary 630 FTIR 분광기를 사용해 리톡시맙(mAb 치료제)의 단백질 응집을 모니터링했습니다. 모델 시스템으로서 innovator와 바이오시밀러 리톡시맙을 열 스트레스에 노출시켰으며, 이를 FTIR을 이용한 아마이드 밴드 변경을 통해 모니터링했습니다.



그림 1. 벤치탑 Agilent Cary 630 FTIR 분광기는 혁신적이고 직관적인 다목적 기기로서, 고체, 액체, 기체 분석에서 정량 및 정성 정보를 제공합니다.

많은 제약 실험실에서 FTIR 분석에 제품의 견고성, 유연성, 높은 성능, 사용 편의성, 초소형 설계 등을 이유로 Cary 630 FTIR을 사용합니다(그림 1). 이 제품이 사용되는 일반적인 응용 분야로는 약품, 입고 물품, 포장재의 식별, 제약 원료 농도 등에 대한 정량 측정 등이 있습니다. 응용에 따라 Cary 630 FTIR은 최적화된 시료 모듈로 재구성 가능하므로, 사용자 정렬이 필요하지 않습니다.

Agilent MicroLab 소프트웨어의 안내용 그림과 단계별 설명은 사용자가 전체 분석 워크플로를 직관적으로 탐색할 수 있도록 하므로, 시스템 사용을 한층 더 쉽게 만들어 줍니다(그림 2). 애질런트는 또한 고급 FTIR 분광기 소프트웨어인 MicroLab Expert를 통해, 일반 소프트웨어보다 더 우수한 분석 유연성 및 스펙트럼 시각화를 제공합니다. MicroLab Expert는 분석자가 데이터 수집 과정에서 스펙트럼 정보를 확인할 수 있으므로, 응집 연구에 매우 유용합니다.



그림 2. Agilent Cary 630 FTIR에 사용되는 직관적인 소프트웨어인 Agilent MicroLab은 사용자에게 분석 워크플로를 안내함으로써 교육 필요를 줄이고, 작동 관련 오류 위험을 최소화합니다.

실험

기기

Cary 630 FTIR 분광기에 단일 반사 다이아몬드 감쇠 전반사(ATR) 모듈을 장착했습니다. 데이터 수집은 표 1에 기재된 파라미터를 사용해 MicroLab Expert 소프트웨어로 수행했습니다.

표 1. Agilent Cary 630 FTIR에 대한 실험 파라미터.

파라미터	값
스펙트럼 범위	4,000~650cm ⁻¹
백그라운드 스캔	140
시료 스캔	140
분해능	4cm ⁻¹
Zero Fill Factor (제로 필 팩터)	없음
Apodization (아포다이제이션)	Triangular(삼각)
Phase Correct (위상 보정)	Mertz
Sampling Technology (샘플링 기술)	ATR

재료

- Innovator와 바이오시밀러 리톡시맙을 싱가포르 현지 대리점에서 구입했습니다. 두 mAb 시료는 모두 Vivaspin 500 원심분리 농축기 스피너 컬럼 (10kDa MWCO; Sartorius)을 사용해 농축했습니다

- 초순수는 0.22µm의 멤브레인 point-of-use 카트리지를(Merck Millipore)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다
- 제제 완충액은 5.35mg/mL의 citric acid monobasic anhydrous pH 6.5(CAS 18996-35-5), 9mg/mL의 sodium chloride(CAS 7647-14-5), 0.7mg/mL의 polysorbate 80(CAS 9005-56-6)으로 구성되었습니다. 모든 시약은 Sigma-Aldrich, St. Louis에서 구입했습니다

워크플로

Cary 630 FTIR을 사용한 innovator 및 바이오시밀러 리톡시맙의 응집 연구 워크플로는 그림 3에 나타나 있습니다.

첫 번째로, 2개의 스피너 컬럼 농축 리톡시맙 시료의 농축액을 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용해 UV 흡광 방식으로 측정했습니다. 각 시료의 단백질 농도 계산에는 1.7mLmg⁻¹cm⁻¹의 소광 계수를 사용했습니다. Innovator 바이오시밀러 리톡시맙의 농도는 50mg/mL로 측정되었습니다.



그림 3. Agilent Cary 630 FTIR을 사용한 innovator 및 바이오시밀러 리톡시맙의 응집 연구 워크플로.

응집 연구를 위해 10 μ L의 농축된 리톡시마를 동일 부피의 물로 희석하고 15분간 보다 높은 온도에서 배양한 후, Cary 630 FTIR로 측정했습니다. 인큐베이션 온도는 20, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 90°C였습니다.

응집 인큐베이션 실험을 위해 75 μ L의 농축된 리톡시마를 동일 부피의 물 또는 제제 완충액으로 희석했습니다. 그리고 각 용액을 60°C에서 배양했습니다. FTIR 측정을 위해 모든 시료의 10 μ L를 0.5, 1, 2, 3, 4시간 후에 수집했습니다.

각 실험 조건에서 취한 시료를 Cary 630 FTIR로 3회 측정했습니다.

데이터 분석

Agilent MicroLab Expert(버전 1.1.0.1)를 사용해 데이터 분석을 수행했습니다. 데이터 처리에는 평균 스펙트럼(3회 측정)을 사용했습니다. Mathematics 탭의 Spectrum Arithmetic에 있는 “Subtract Spectra(스펙트럼 차감)” 기능을 사용해 바탕 스펙트럼(예: 물 또는 제제 완충액)을 평균 스펙트럼에서 차감했습니다. 스펙트럼에서 차감된 블랭크는 2D View 탭의 “Merge View(보기 통합)”을 사용해 통합했습니다. 추가 처리 및 데이터 분석에는 피크 면적별 스펙트럼 평균을 통한 노멀라이제이션(Normalization), Mathematics 탭에서 smoothing window 9 및 polynomial order 3을 사용한 스무딩(Smoothing)을 사용해 수행했습니다. 2차 유도 스펙트럼에는 Savitzky Golay 2차 유도 및 Mathematics 탭 아래의 smoothing window 9이 적용되었습니다.

응집 연구의 그래프는 다음과 같은 공식으로 표현할 수 있는 1차 반응 동역학을 따릅니다.

$$\text{Rate} = -d[A]/dt = k[A]$$

$$d[A]/[A] = -kdt$$

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt$$

[A]에 대해 해결하려면 재정렬하여 한 가지 형태의 속도 법칙을 구합니다.

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$$

$$\ln[A] = -kt + \ln[A]_0$$

여기에서

[A]는 시간 t에서의 농도

[A]₀은 시간 0에서의 농도

k는 1차 속도 상수입니다

따라서 시간에 대한 ln[A] 선의 기울기는 -k 값을 산출합니다.

1차 동역학의 반감기는 다음과 같이 계산됩니다.

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

결과 및 토의

온도 유도 응집

Innovator와 바이오시밀러 mAb의 2차 구조에 대한 온도 의존적 변화를 모두 FTIR 분광기로 조사했습니다. 단백질 특성 규명에 일반적으로 쓰이는 아마이드 스펙트럼 밴드는 Amide I 및 Amide II³이며, 이는 그림 4에도 나타나 있습니다. 그림 4A는 25°C와 75°C에서의 innovator 리톡시마 FTIR 스펙트럼을 보여줍니다. 25°C에서 Amide I 밴드는 1,638cm⁻¹에 위치하며, 이는 분자 내

β -sheets 2차 구조를 뜻합니다. mAbs는 β -sheet가 풍부한 단백질로, 이는 X선 분석을 통해서도 드러납니다.⁴ 75°C에서 Amide I 밴드는 1,616cm⁻¹로 변경되며, 이는 응집 과정에서 분자 내 β -sheet 2차 구조의 형성을 뜻합니다.^{5,6} Innovator 리톡시마의 25°C 및 75°C에서의 2차 유도 IR 스펙트럼(그림 4B)은 리톡시마 응집 과정에서 Amide I 밴드가 1,638에서 1,616cm⁻¹로 바뀌었음을 분명하게 보여줍니다.

그림 5는 innovator와 바이오시밀러 모두에서 발생하는 온도에 따른 1,616 및 1,638cm⁻¹에서의 흡광도 비율 변화를 보여줍니다. 1,616cm⁻¹에서의 흡광도가 1,638cm⁻¹에서의 흡광도보다 커지는 교차 지점을 고려해, innovator와 바이오시밀러의 녹는점(T_m)은 각각 70.2°C 및 71.8°C로 추정될 수 있습니다. 이 온도는 차등적 스캐닝 비색법으로 측정된 리톡시마의 T_m인 71.6°C와 일치합니다.⁷ 이 결과는 mAb의 열변성 관찰에 Cary 630 FTIR을 사용하는 것이 적합하다는 것을 보여줍니다.

응집 동역학에 대한 제제 완충액의 효과

열변성 연구에서 열 안정성에 대한 완충액의 효과를 명확하게 식별할 수 없었기 때문에 상세한 동역학 연구를 수행했습니다. 응집 동역학에 대한 제제 완충액의 효과 연구를 위해 실험 내내 60°C의 일정한 온도(T_m 보다 낮은 온도)를 유지했습니다. 그림 6은 innovator와 바이오시밀러 mAb의 60°C에서 시간 대비 파장 1,638cm⁻¹에서의 흡광 자연 로그를 보여줍니다(제형 완충액 사용 및 미사용). 1차 동역학은 응집 절차를

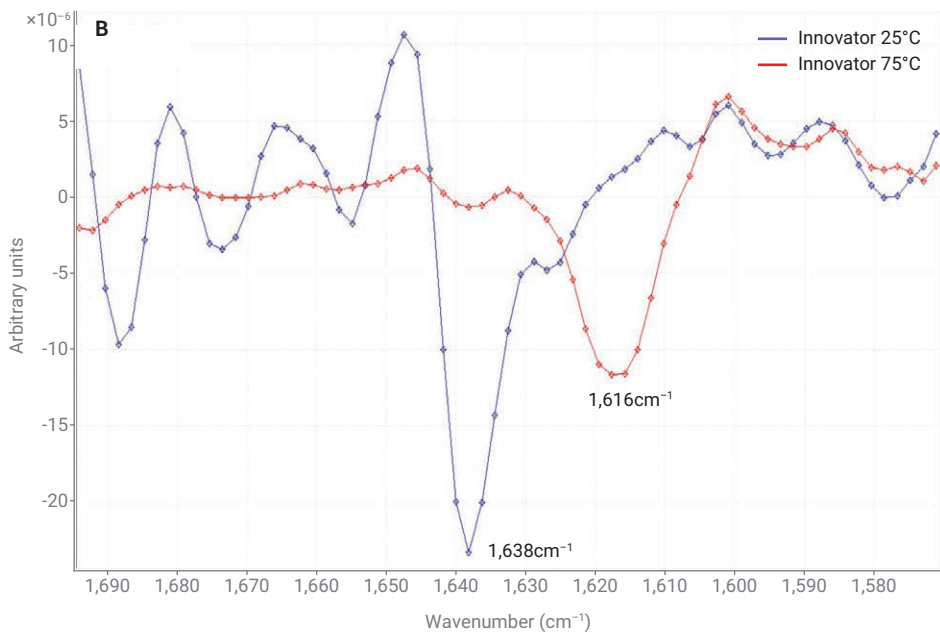
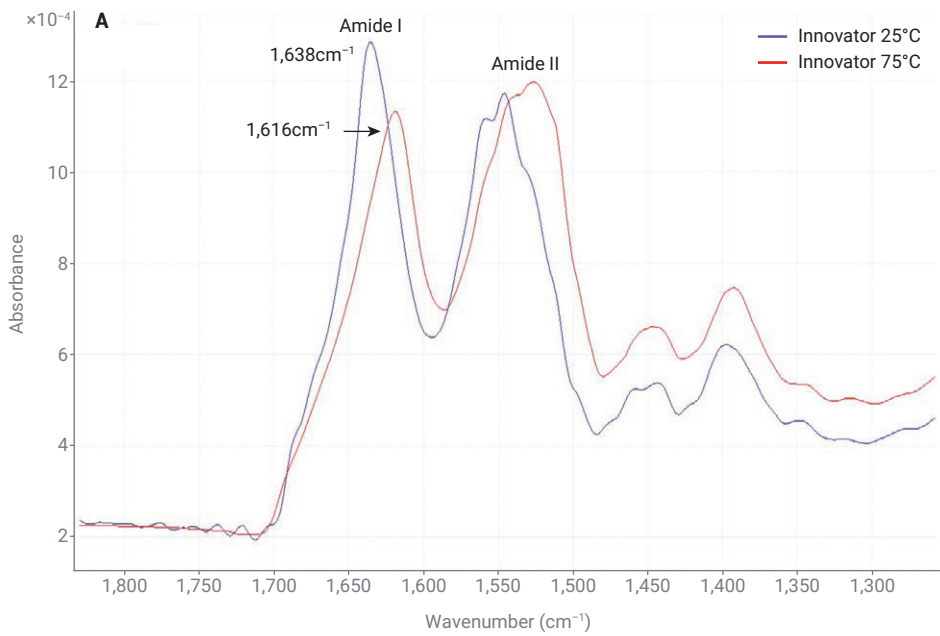


그림 4. (A) 25°C 및 75°C에서의 innovator 리튬시말 FTIR 스펙트럼. (B) 25°C 및 75°C에서의 innovator 리튬시말 2차 유도 IR 스펙트럼.

통제하는 것으로 추정되었습니다.⁸ 기율기로부터 1차 상수 k_1 및 $t_{1/2}$ 를 추정했습니다. 표 2는 innovator와 바이오시밀러에 대한 동역학 파라미터를 나타냅니다. 단백질은 제제 완충액 사용 시에 향상된 안정성을 보이며, 이는 제제 완충액 미사용 시보다 느린 속도 상수 및 높은 $t_{1/2}$

값으로 알 수 있습니다. 이와 같은 발견을 통해 제제 완충액이 열 스트레스에 대한 보호 기능을 한다는 것을 추정할 수 있습니다. Innovator와 바이오시밀러 mAb의 k_1 은 비제형 조건에서 비슷하게 나타났습니다. 제제 완충액 사용 시, 바이오시밀러는 innovator보다 안정적이었습니다(보다

낮은 k_1 및 보다 높은 $t_{1/2}$). 제형 및 부형제는 항체 안정성에 큰 영향을 미칠 수 있습니다. pH를 유지하는 부형제(예: tris, acetate, histidine, citrate 완충제)는 안정성을 향상시켜줍니다.⁹

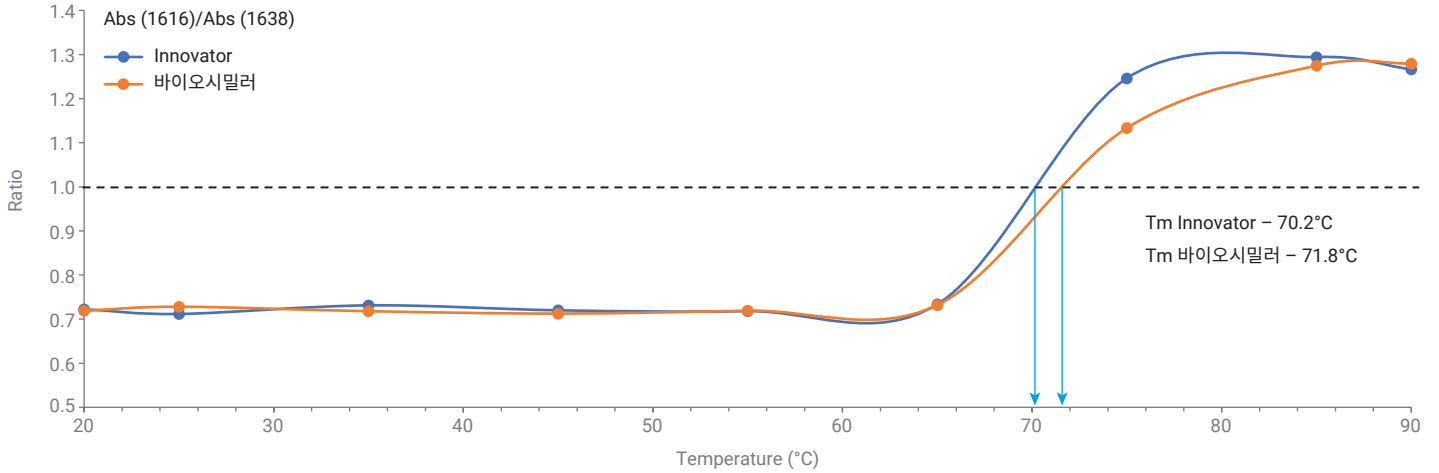


그림 5. Innovator와 바이오시밀러 리퀴시말의 1,616cm⁻¹ 및 1,638cm⁻¹ 파장에서의 흡광도 비가 온도 상승에 따라 나타내는 변화

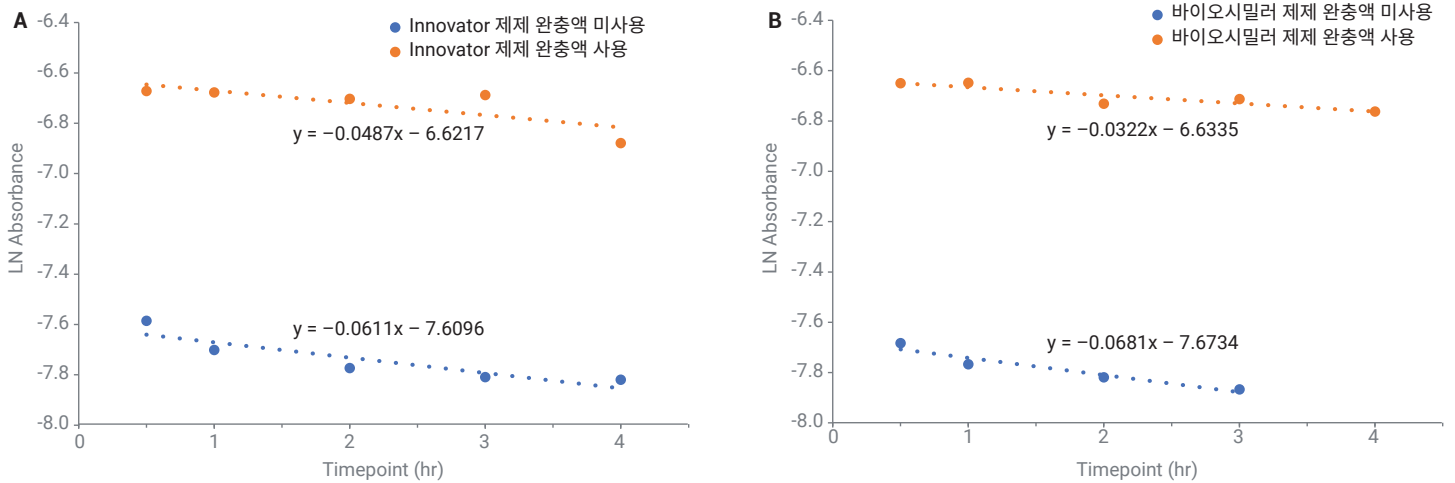


그림 6. 60°C에서 Innovator(A) 및 바이오시밀러 mAb(B)의 시간 대비 흡광 자연 로그(1,638cm⁻¹) (제제 완충액 사용 및 미사용). 4시간 지점에서 제제 완충액 미사용 시 바이오시밀러의 측정치에 변이가 크게 나타난 관계로, 데이터 지점이 분석에 포함되지 않았습니다.

표 2. Innovator 및 바이오시밀러의 응집 동역학(제제 완충액 사용 및 미사용).

	제제 완충액 미사용		제제 완충액 사용	
	k_1 (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	k_1 (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
Innovator	0.0611	11.34	0.0487	14.34
바이오시밀러	0.0681	10.17	0.0322	21.52

결론

Agilent Cary 630 FTIR 분광기는 생물학적 치료제의 단백질 응집 분석에 간단하고 쉽게 사용할 수 있는 기기로, 복잡한 시료 전처리 절차를 필요로 하지 않습니다. 위와 같은 방법을 통해 고농도 시료의 응집 측정을 빠르게 수행했으며, 이는 mAb의 생산 과정에 사용될 수 있습니다. 리톡시맵이 열변성되는 FTIR 측정 온도와 논문에 보고된 온도가 일치하여, 이 분석법의 효과를 확인했습니다.

Cary 630 FTIR과 Agilent MicroLab Expert 소프트웨어를 사용해 제제 완충액의 mAb 응집 동역학에 대한 안정화 효과 또한 측정했습니다. 단백질 응집 메커니즘을 이해하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보이지만, 이와 같은 초기 연구는 Cary 630 FTIR이 단백질 접힘에 대한 직교 정보를 제공할 수 있음을 보였습니다.

Cary 630 FTIR은 시료 전처리가 불필요하며 사용이 편리한 기기로, innovator와 바이오시밀러 단백질 기반 치료제 응집의 품질 관리를 비롯해 여러 용도로 바이오 의약품 업계에서 사용될 수 있습니다.

참고 문헌

1. Carpenter, J. F. *et al.* Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*(4), 201–5.
2. Biologics vs Biosimilars: Understanding the Differences. Available from: https://www.pfizer.com/news/articles/biologics_vs_biosimilars_understanding_the_differences.
3. Tiernan, H.; Byrne, B.; Kazarian, S. G. ART-FTIR Spectroscopy And Spectroscopic Imaging for the Analysis of Biopharmaceuticals. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *241*, 118636.
4. Costantino, H. R. *et al.* Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Analysis of the Secondary Structure of Recombinant Humanized Immunoglobulin G. *Pharmacy and Pharmacology Comm.* **1997**, *3*(3), 121–128.
5. Sathya Devi, V.; Coleman, D. R.; Truntzer, J. Thermal Unfolding Curves of High Concentration Bovine IgG Measured by FTIR Spectroscopy. *Protein J.* **2011**, *30*(6), 395–403.
6. Baird, G. *et al.* FTIR Spectroscopy Detects Intermolecular β -Sheet Formation Above the High Temperature T_m for Two Monoclonal Antibodies. *Protein J.* **2020**, *39*(4), 318–327.
7. Flores-Ortiz, L. F. *et al.* Physicochemical Properties of Rituximab. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2014**, *37*(10), 1438–1452.
8. Byler, D. M. *et al.* Effect of Sucrose on the Thermal Denaturation of a Protein: an FTIR Spectroscopic Study of a Monoclonal Antibody. AIP Conference Proceedings, *American Institute of Physics* **1998**, *430*(1), 332–335.
9. Ma, H.; Ó'Fágáin, C.; O'Kennedy, R. Antibody Stability: a Key to Performance-Analysis, Influences and Improvement. *Biochimie* **2020**, *177*, 213–225.

www.agilent.com

DE95285922

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 5월 31일 한국에서 인쇄
5994-4944KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com