

단일 클론 항체의 다중 주요 품질 속성 규명 및 비교 평가

저자

Suresh Babu C.V.와
Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

개요

다중 속성 분석법(MAM) 기반의 LC/MS 펩타이드 매핑이 바이오 제약 분석 분야에서 많은 관심을 받고 있습니다. 본 응용 자료에서는 단일 클론 항체(mAb)에 대한 서로 다른 주요 품질 속성(CQA)의 특성 규명과 정량을 위한 LC/MS 펩타이드 매핑 접근법을 설명합니다. 펩타이드 매핑 결과를 기존 분석법과 비교한 결과 라이신 절단, 산화, 탈아미드화, N-말단 고리화 및 당화에 대해 매우 유사한 추정치를 산출함을 확인했습니다.

서론

단일 클론 항체(mAb)는 빠른 성장을 겪는 생체에서 얻어집니다. 이러한 복합 분자는 생물학적 유래로 인해 생산 과정에서 다양한 번역 후 변형(PTM)을 거치며 상당한 수준의 이질성을 나타냅니다. 이러한 의도치 않은 변형은 mAb의 개발 및 생산 과정에서 CQA로 특성을 규명하고 모니터링하는 것이 중요합니다. 모든 CQA의 화학적 비유사성으로 인해 지금까지 이러한 목적으로 여러 가지의 테스트 분석법이 사용되었으며, 각각의 기법은 여러 가지 장점과 단점을 가지고 있습니다. 최근에는 LC/MS 기반의 다중 속성 분석법(MAM)¹ 접근법이 mAb CQA의 포괄적 특성 규명을 위한 단일 분석법으로서 기존 분석법 대비 분석 시간과 비용을 크게 절감해 줄 것으로 기대되면서 각광을 받고 있습니다. 그러나 MAM 접근법을 엄격하게 규제된 품질 관리 환경에 적용하기 전에 먼저 기존 분석법이 펩타이드 맵핑 결과와 정확하게 일치하는지 검증하는 것이 필요합니다. 펩타이드 맵핑 워크플로가 기존 분석법과 유사한 결과를 제공하도록 하는 것이 중요합니다.

이 연구에서는 펩타이드 맵핑 분석법의 성능을 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HILIC) 및 sub-unit 수준의 역상 크로마토그래피를 포함하는 기존 분석법과 비교합니다. mAb의 펩타이드 맵핑은 Agilent AssayMAP Bravo 액체 처리 플랫폼, Agilent 1290 Infinity II LC 시스템, Agilent 6545XT Advancebio LC/Q-TOF 및 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 통한 데이터 분석으로 구성된 통합 워크플로를 사용하여 수행하였습니다. 모든 CQA의 상대 % 정량을 펩타이드 맵핑 및 기존 분석법 간에 비교했습니다.

실험

재료

mAb1, mAb2, 및 mAb3는 현지 대리점 (싱가포르)에서 구입하였으며, 제조업체의 지침에 따라 보관하였습니다. Trizma base, Tris-HCl, guanidine-hydrochloride, Tris (2carboxyethyl)phosphine (TCEP), iodoacetamide(IAA), 포름산, trifluoroacetic acid, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium chloride 및 LC/MS 등급 용매는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였습니다. IdeS 프로테아제는 Genovis에서 구입했습니다. 고품질 시퀀싱 등급 트립신은 Agilent Technologies, Inc로부터 받았습니다.

기기, 컬럼 및 소프트웨어

자동화	
Agilent AssayMAP Bravo 액체 처리 플랫폼(G5542A)	
LC 시스템	
Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC - Agilent 1260 Infinity II Bio-inert 펌프(G5654A) - Agilent 1260 Infinity II Bio-inert Multisampler(G5668A), 시료 냉각기 포함 - Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A), bio-inert heat exchanger 포함 - Agilent 1260 Infinity Bio-Inert LC - 분석 스케일 분획 분취기(G5664A)	Agilent 1290 Infinity II LC 시스템 - Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A) - Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B) - Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
검출	
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 WR(G7115A), bio-inert 플로우 셀 포함 - Agilent 1260 Infinity 형광 검출기(G1321B) - Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
컬럼	
- Agilent Bio MAb, 비다공성, 4.6 × 250mm, 5µm HPLC, PEEK - Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1 × 100mm, 1.8µm - Agilent AdvanceBio 글리칸 맵핑, 2.1 × 150mm, 1.8µm - Agilent AdvanceBio 펩타이드 맵핑 2.1 × 150mm, 2.7µm, 120Å	
소프트웨어	
- Agilent OpenLab CDS 버전 2.3 - Agilent Buffer Advisor A.01.01[009] - LC 시스템용 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, Rev. C.01.07 - Agilent MassHunter Acquisition(B.10.00) - Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 - Agilent VWorks Automation Control 13.1.1.1383	

실험 방법

전하 변이체: 시료를 희석하지 않고 직접 주입했습니다(10mg/mL). 표 1과 2는 mAb1 및 mAb2의 약 양이온 교환(WCX) 크로마토그래피에 사용된 크로마토그래피 파라미터를 나타냅니다. 수집된 WCX 분획물(fraction)을 사용하여 트립신 분해 및 펩타이드 맵핑 분석을 수행하였습니다.

산화: 5μL의 mAb 시료(Tris-HCl 완충 용액에서 2mg/mL)를 5μL의 IdeS 프로테아제에 추가하고 30°C에서 30분간 배양한 후, 실온에서 냉각시켜 분석했습니다.

유리 글리칸: 라벨링된 N-글리칸 시료는 AssayMAP Bravo 액체 처리 시스템 및 Agilent GlykoPrep Rapid N-Glycan kit(GPPNG-PC)²를 사용하여 제조했으며, 라벨링된 N-글리칸은 HILIC으로 분리했습니다.

트립신 분해

분획 분취된 WCX 시료와 mAb 시료는 환원/알킬화 및 트립신 분해를 거친 뒤 Agilent AssayMAP Bravo 액체 처리 플랫폼을 이용해 탈염하였습니다.³ 요약하자면, mAb를 포함한 샘플 플레이트에 변성 완충제(8M guanidine-HCl, 5mM TCEP 및 150mM Tris, pH8)로 재용해하고,

60°C에서 60분간 인큐베이션했습니다. 이황화 결합의 변성과 환원 후, 133mM의 iodoacetamide를 첨가하여 유리 cysteine의 알킬화를 수행하였습니다(실온에서 40분간). 그런 다음 시료를 1.75% TFA로 산성화 및 희석했습니다. 그리고 시료는 RP-W 카트리지를 사용한 Protein Cleanup 응용을 수행하고 트립신 분해(20:1, 단백질: 단백질 분해효소 w/w)는 37°C에서 밤새 수행하였습니다. 시료는 추후 AssayMAP 시약 전달 유틸리티를 이용해 0.1% 포름산으로 산성화하여 트립신 반응을 중지시켰습니다. AssayMAP Bravo 펩타이드 클린업 프로토콜(탈염)은 C18 역상 카트리지를 이용해 수행했습니다.

표 1. LC 조건

파라미터	WCX(C-말단 Lys, N-말단 고리화 변이체, 탈아미드화)	RP(산화)	HILIC(유리 글리칸)	RP(펩타이드 맵핑)
	Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC	Agilent 1290 Infinity II LC	Agilent 1290 Infinity II LC	Agilent 1290 Infinity II LC
컬럼	Agilent Bio Mab NP5, 4.6 × 250mm, 5μm PEEK	Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1 × 100mm, 1.8μm	Agilent AdvanceBio 글리칸 맵핑, 2.1 × 150mm, 1.8μm	Agilent AdvanceBio 펩타이드 맵핑 2.1 × 150mm, 2.7μm, 120 Å
주입량	1~10μL	4μL	2μL	2~8μL
시료 온도 조절 장치	5°C	5°C	5°C	5°C
이동상	A) Water B) NaCl (1,000mM) C) NaH ₂ PO ₄ (55mM) D) Na ₂ HPO ₄ (50mM)	A) 0.1% FA, 0.1% TFA in water B) 0.1% FA, 0.1% TFA in 80% IPA, 10% ACN, 10% Water	A) 50mM 포름산 암모늄, pH 4.5 B) ACN	A) 0.1% formic acid in water B) 0.1% formic acid in ACN
그라디언트	mAb1 및 mAb2 시간(분) %A %B %C %D 0.0 30.3 0 59.6 10.1 2.0 26.0 5.0 56.9 12.1 8.0 21.5 10.0 54.9 13.6 20.0 13.3 19.0 51.9 15.8 21.0 30.3 0 59.6 10.1 mAb3 시간(분) %A %B %C %D 0.0 44.5 0 44.4 11.1 20.0 27.7 16.2 38.7 17.4 21.0 44.5 0 44.4 11.1	0분 → 20% B 2분 → 20% B 42분 → 35% B 42.5분 → 80% B 45분 → 80% B 45.1분 → 20% B	0분 → 25% B 2분 → 30% B 15.5분 → 37% B 17분 → 80% B 20분 → 80% B 21분 → 25% B 30분 → 25% B	0분 → 3% B 30분 → 40% B 33분 → 90% B 35분 → 90% B 37분 → 3% B 40분 → 3% B
컬럼 온도	25°C	74°C	40°C	60°C
유속	0.75mL/분	0.4mL/분	15.5~20분 0.25mL/분, 기타 0.4mL/분	0.4mL/분
UV	220/280nm	—	—	—
FLD	—	—	Ex/Em = 285nm/345nm	—
분획 분취 모드	시간 기반 분획 트리거	—	—	—

표 2. LC/MS 조건.

파라미터	WCX(C-말단 라이신, N-말단 고리화 변이체, 탈아미드화)	RP(산화)	HILIC(유리 글리칸)	RP(펩타이드 맵핑)
Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF				
이온 모드	-	양이온 모드, 듀얼 AJS ESI	양이온 모드, 듀얼 AJS ESI	양이온 모드, 듀얼 AJS ESI
건조 가스 온도	-	350°C	150°C	325°C
건조 가스 유속	-	12L/분	9L/분	13L/분
Sheath 가스 온도	-	350°C	300°C	275°C
Sheath 가스 유속	-	11L/분	10L/분	12L/분
Nebulizer	-	35psi	35psi	35psi
캐필러리 전압	-	4,000 V	3,000 V	4,000 V
노즐 전압	-	2,000 V	500 V	0 V
Fragmentor 전압	-	180 V	180 V	175 V
스키머 전압	-	65V	65V	65V
참조 질량	-	922.009798	922.009798	121.050873, 922.009798
수집 모드	-	확장된(10,000m/z) 질량 범위	저질량, 고분해능(4Ghz)	확장된 측정 범위(2GHz)
MS 질량 범위	-	800~5,000m/z	300~1,700m/z	110~1,700m/z
수집 속도	-	1스펙트럼/초	2스펙트럼/초	8스펙트럼/초
Auto MS/MS 범위	-	-	-	50~1,700m/z
MS/MS 수집 속도	-	-	-	3스펙트럼/초
분리 폭	-	-	-	좁음(약 1.3m/z)
전구체/주기	-	-	-	Top 10
충돌 에너지	-	-	-	전하 상태 2 또는 3 기울기 3.1 또는 3.6 오프셋 1 또는 -4.8
MS/MS 임계값	-	-	-	1,000카운트, 0.001%
동적 배제 커짐	-	-	-	1회 반복 후 0.1 또는 0.2분간 배제
전구 이온 존재비 기반 스캔 속도	-	-	-	예
표적	-	-	-	25,000카운트/스펙트럼
MS/MS 누적 시간 제한 사용	-	-	-	예
순도	-	-	-	100% 엄격성, 30% 컷오프
동위원소 모델	-	-	-	펩타이드
전구체 정렬	-	-	-	먼저 전하 상태로, 그 다음 존재비 순서대로; +2, +3, >+3

결과 및 토의

C-말단 라이신 절단

중쇄에서의 C-말단 라이신 절단은 Carboxypeptidase의 활성으로 인해 일반적으로 나타나는 PTM입니다. 라이신 잔기가 소실되면 mAb의 순 양전하가 감소하여 전하 이질성이 발생합니다. C-말단 라이신 염기성 변이체(Lys 포함 및 불포함)는 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)로 잘 분리되었습니다. 그림 1A는 Agilent Bio Mab PEEK 컬럼을 사용한 mAb1의 전하 변이체 프로파일로서 3개의 뚜렷한 피크가 있는 고분리능 분리를 보여줍니다. 13.11분에 있는 피크를 주 피크(M)로 지정했습니다. 주 피크를 기준으로 그 앞부분과 뒷부분에 용출되는 피크는 각각 산성(A1, A2) 및 염기성 변이체(B1, B2, B3, B4, B5, B6)로 지정했습니다. 주 피크, 산성 및 염기성 전하 변이체의 피크 면적 백분율은 그림 1A에 표로 정리되어 있습니다. C-말단 라이신 절단의 특성을 규명하기 위한 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석을 실시하기 전에 전하 변이 피크를 개별 분획물로 수집하고 여러 차례의 주입을 혼합(pool)했습니다. 펩타이드 맵핑 분석을 기반으로 CEX 피크를 C-말단 라이신 절단 변이체로 어노테이션했습니다. C-말단 라이신의 이질성에 대한 추가 확인은 carboxypeptidase B(CPB) 처리를 통해 수행했습니다. C-말단 라이신 절단의 상대적 함량은 전하 변이체 피크 면적의 백분율로 계산하였으며 58.28%인 것으로 밝혀졌습니다(표 3).

C-말단 라이신 변이체 프로파일의 펩타이드 맵핑 기반 정량을 위해 mAb1을 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석법으로 분석했습니다. 그림 1B는 mAb1에 대한 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석 결과를 보여줍니다. MS/MS 분석을 통해 변형 및 비변형 중쇄 C-말단 라이신 절단 펩타이드를 식별했으며, 상대 함량은 55.30%로 확인되었습니다.

기존의 CEX와 펩타이드 맵핑 분석법 간의 C-말단 라이신 절단 변이체 정량 비교는 표 3에 나타나 있습니다. 두 분석법 모두 C-말단 라이신 절단의 유사한 상대적 함량을 추정했습니다.

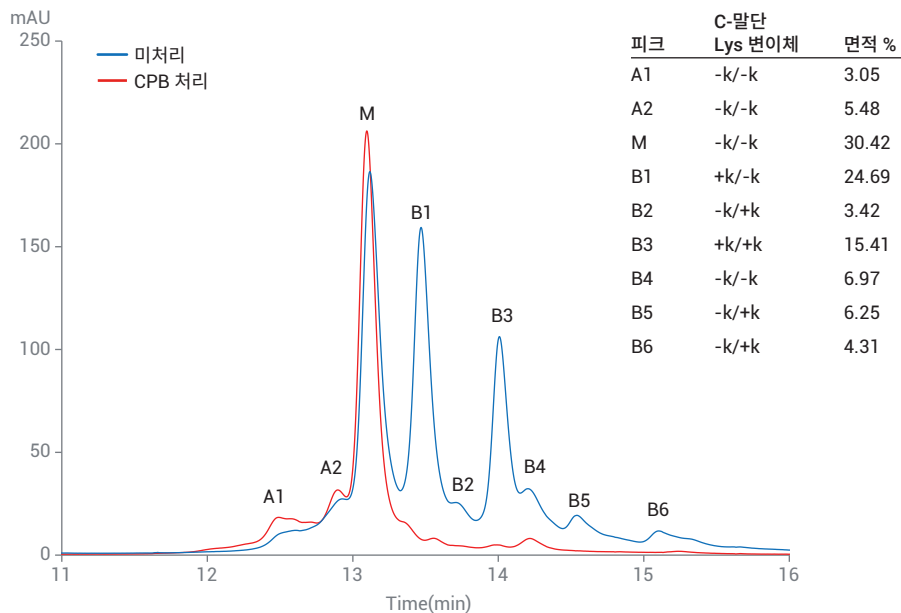
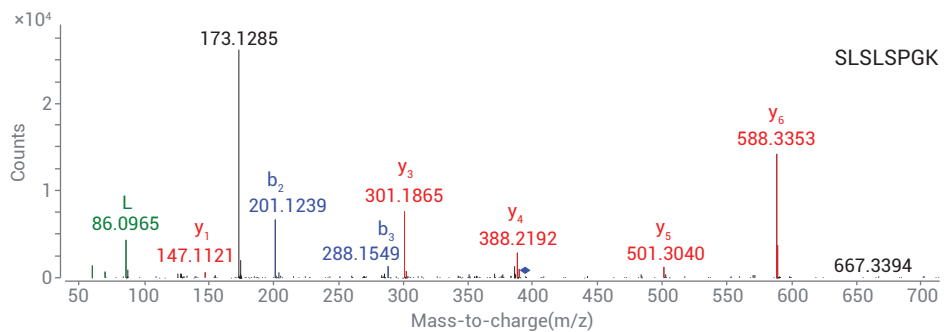
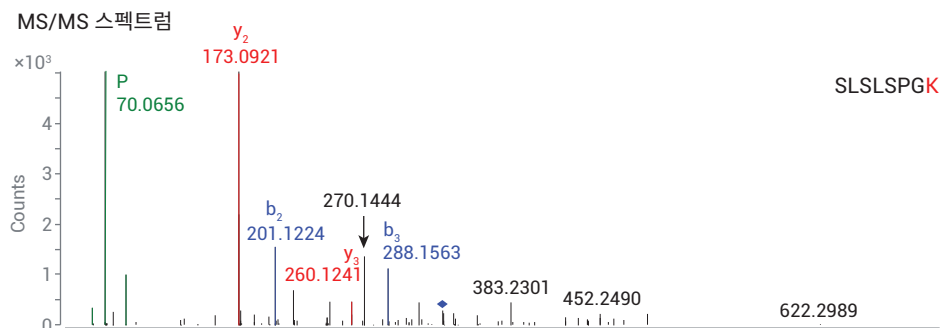
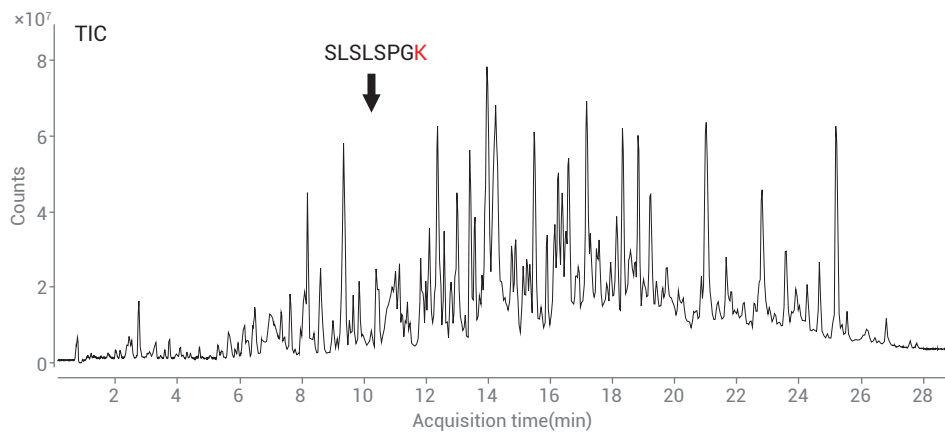


그림 1A. Agilent Bio Mab, 4.6 × 250mm, 5μm, PEEK 컬럼을 사용하여 Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC에서 획득한 mAb1의 전하 변이체 프로파일. CPB 처리(빨간색) 및 미처리(파란색) mAb1 프로파일의 오버레이



시퀀스	m/z	표적 질량	변형	상대적 레벨
SLSLSPGK	394.7289	659.349	—	44.70%
SLSLSPGK	330.6815	787.444	Lys 손실	55.30%

그림 1B. 애질런트 펩타이드 맵핑을 사용한 mAb1의 LC/MS 펩타이드 맵핑, 2.1 × 150mm, 2.7μm 컬럼

표 3. 상대적 % 정량 비교(기존 vs. 펩타이드 맵핑 분석법)

기법	상대 함량(%)	
C-말단 Lys 변이체		
CEX	58.28	
펩타이드 맵핑	55.30	
N-말단 고리화 변이체(HC)		
CEX	100	
펩타이드 맵핑	99.87	
Asp55 - 탈아미드화		
CEX	3.86	
펩타이드 맵핑	4.79	
산화(M256+M432)		
RP-LC/MS(Subunit)	2.38	
펩타이드 맵핑	2.33	
글리칸		
	HILIC	펩타이드 맵핑
Man5	10.9	12.43
G0	6.48	8.35
G0F	49.13	50.41
G1F	28.80	24.57
G2F	4.69	4.24

N-말단 고리화

N-말단 고리화는 N-말단 Glu 또는 Gln이 pyroglutamate(pyro-Glu)로 재배열되어 발생합니다. 이로 인해 순 양전하가 감소하여 mAb의 산성도가 높아집니다. C-말단 라이신 절단의 경우와 같이 CEX를 사용해 이 PTM으로 인한 전하 이질성을 관찰할 수 있습니다. 그림 2A는 Agilent Bio Mab PEEK 컬럼에서의 mAb2의 전하 변이체에 대한 고분리능 분리를 보여줍니다. 13.1분에 있는 피크는 주 피크(M)로 지정되었습니다. 그 앞부분과 뒷부분에 용출되는 피크를 각각 산성(A1, A2) 및 염기성 변이체(B1, B2, B3)라고 지정했습니다. 그림 2A는 주 피크, 산성 및 염기성 전하 변이체의 면적 백분율을 요약해서 보여줍니다. N-말단 고리화 변이체의 특성을 분석하기 위해 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석을 실시하기 전에 전하 변이 피크를 개별 분획물로 수집하고 여러 차례의 주입을 통해 혼합했습니다.

펩타이드 맵핑 분석을 기반으로 CEX 피크는 N-말단 고리화 변이체로 어노테이션했습니다. 중쇄 N-말단 고리화 절단의 상대적 함량은 전하 변이체 피크 면적의 백분율을 통해 계산하였으며 100%인 것으로 밝혀졌습니다(표 3).

중쇄 N-말단 고리화 변이체 프로파일의 펩타이드 맵핑 기반 정량을 위해 mAb2를 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석법으로 분석했습니다. 그림 2B는 mAb2에 대한 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석 결과입니다. MS/MS 분석을 통해 중쇄 펩타이드의 N-말단 고리화를 확인했으며 N-말단 고리화를 보여주는 중쇄 분자의 백분율은 99.98%인 것으로 밝혀졌습니다.

기존의 CEX와 펩타이드 맵핑 분석법 간의 N-말단 고리화 정량 비교는 표 3에 나타냈습니다. 두 분석법 모두 N-말단 고리화의 유사한 상대적 함량을 추정했습니다.

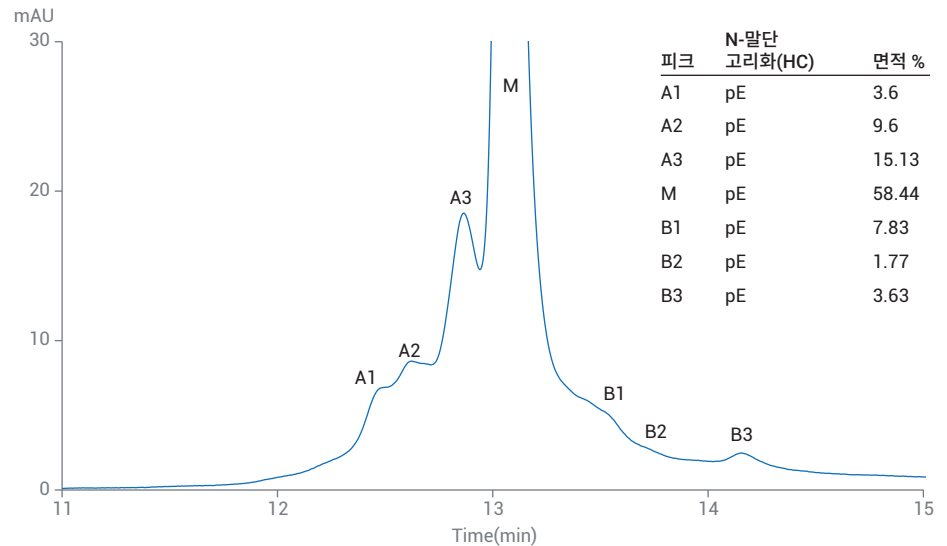
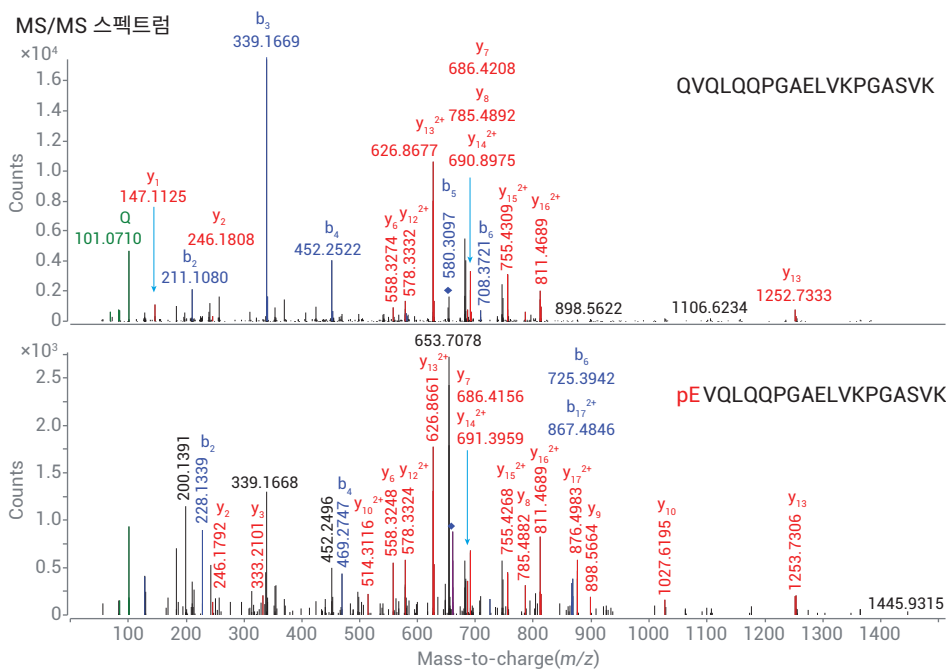
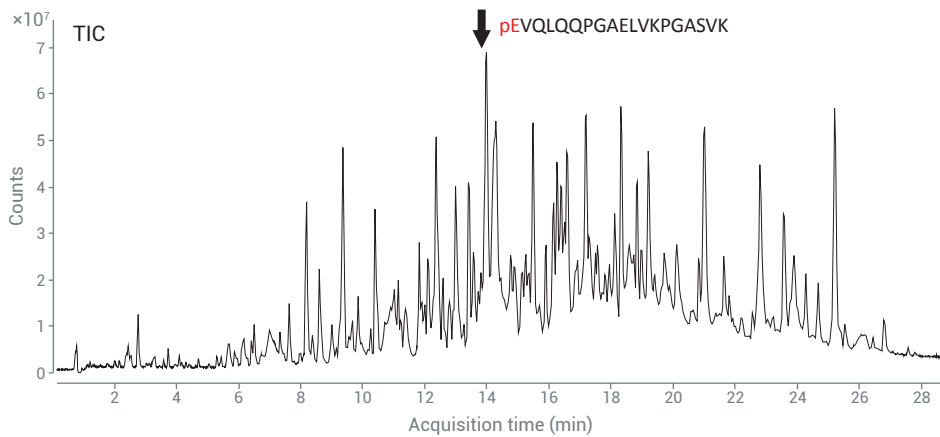


그림 2A. Agilent Bio Mab, 4.6 × 250mm, 5µm, PEEK 컬럼을 사용하여 Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC에서 획득한 mAb2의 전하 변이체 프로파일



시퀀스	m/z	표적 질량	변형	상대적 레벨
QVQLQQPGAELVKPGASVK	659.7089	1976.1159	—	0.13%
pEVQLQQPGAELVKPGASVK	654.0339	1959.0219	N-말단 고리화	99.87%

그림 2B. 애질런트 펄타이드 맵핑 2.1 × 150mm, 2.7μm 컬럼을 사용한 mAb2의 LC/MS 펄타이드 맵핑

탈아미드화

탈아미드화는 mAb에서 가장 빈번한 PTM으로, 이는 단백질 분해 경로와 관련되어 있습니다. Asparagine(Asn, N) 잔기의 탈아미드화는 Asn을 산성 이성질체인 Aspartic acid(Asp, D) 및 isoaspartic acid(isoAsp)으로 변환하며 순 양전하를 감소시킵니다. CDR 영역의 Asn 탈아미드화는 산성 전하 변이체를 생성합니다. 그림 3A는 Agilent Bio MAb PEEK 컬럼에서의 mAb3의 전하 변이체 프로파일에 대한 고분리능 분리를 보여줍니다. 11.4분에 있는 피크는 주 피크 (M)으로 지정되었습니다. 그 앞부분과

뒷부분에 용출되는 피크를 각각 산성 (A1, A2) 및 염기성 변이체(B1, B2, B3, B4)라고 지정했습니다. 그림 3A는 주 피크, 산성 및 염기성 전하 변이체의 면적 백분율을 요약해서 보여줍니다. 탈아미드화의 특성을 분석하기 위해 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석을 실시하기 전에 전하 변이 피크를 개별 분획물로 수집하고 여러 차례의 주입을 통해 혼합했습니다. 펩타이드 맵핑 분석을 통해 분획물 A2에서 Asn55 탈아미드화를 식별했습니다. N55 탈아미드화의 상대적 함량은 전하 변이체 피크 면적 백분율을 통해 계산하였으며 3.86%인 것으로 밝혀졌습니다(표 3).

탈아미드화에 대한 펩타이드 맵핑 기반의 정량을 위해 mAb3을 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석법으로 분석했습니다. 그림 3B는 mAb3에 대한 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석 결과입니다. MS/MS 분석을 통해 변형 및 비변형 IYPTN⁵⁵GYTR 펩타이드를 식별했으며, Asn55 탈아미드화의 상대적 함량은 4.79%인 것으로 밝혀졌습니다.

기존의 CEX와 펩타이드 맵핑 분석법 간의 탈아미드화 정량 비교는 표 3에 나타나 있습니다. 두 분석법 모두 Asn55 탈아미드화 수준의 유사한 상대적 함량을 추정했습니다.

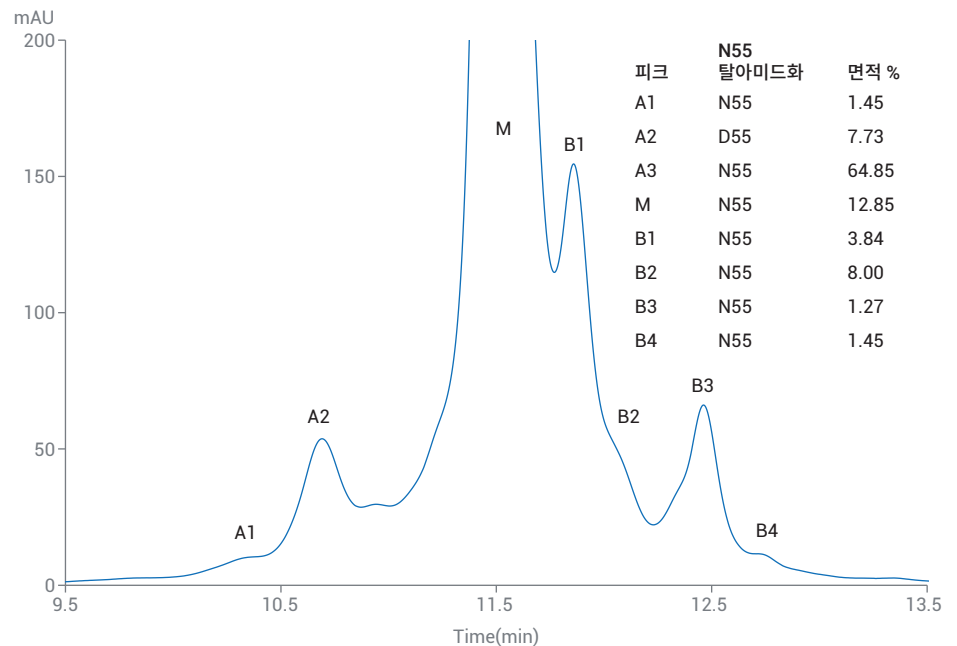
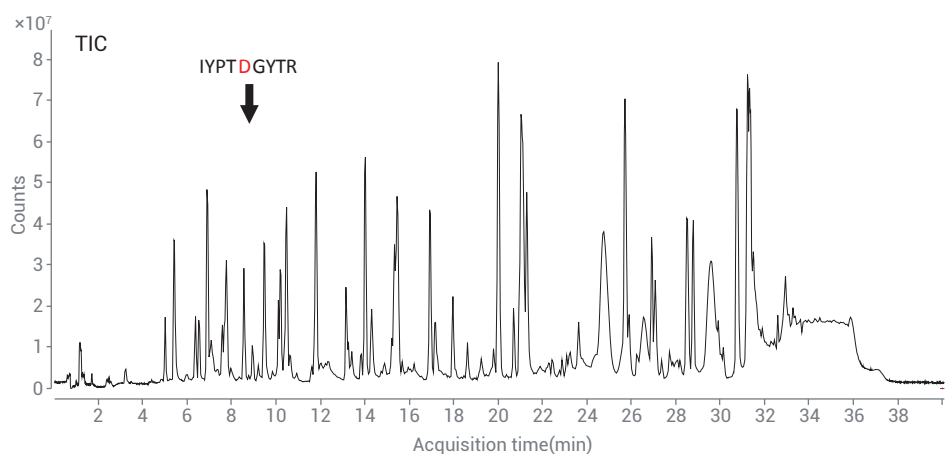
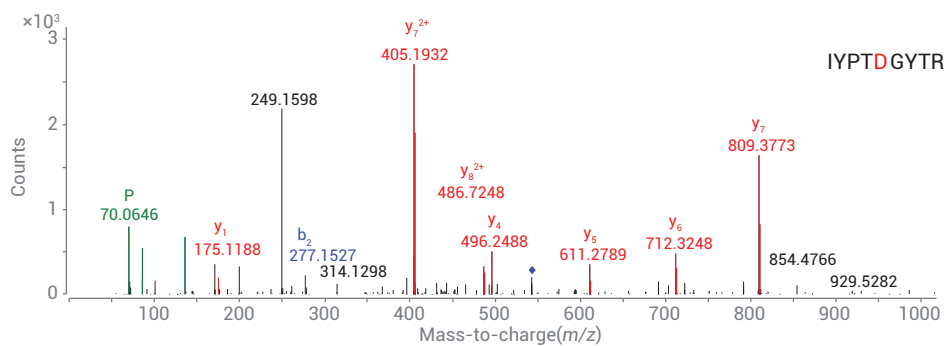
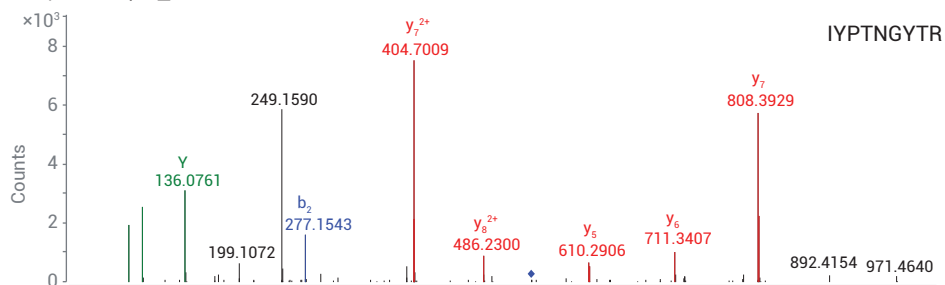


그림 3A. Agilent Bio Mab, 4.6 × 250mm, 5µm, PEEK 컬럼을 이용해 Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC에서 획득한 mAb3의 전하 변이체 프로파일



MS/MS 스펙트럼



시퀀스	m/z	표적 질량	변형	상대적 레벨
IYPTNGYTR	1084.4541	1083.5349	—	95.21%
IYPTDGYTR	543.2567	1084.5139	탈아미드화	4.79%

그림 3B. 애질런트 펩타이드 맵핑 2.1 × 150mm, 2.7μm 컬럼을 사용한 mAb3의 LC/MS 펩타이드 맵핑

산화

Methionine(Met)의 산화는 mAb에서 흔하게 발생하며 기능을 변경할 수 있는 단백질의 형태 변화를 일으킵니다. Fc 영역에는 2개의 Methionine(Met) 잔기(M256 및 M432)가 포함되어 있으며 이들은 산화에 보다 취약합니다. 산화가 일어나면 질량이 +16 Da 증가하며, 펩타이드와 원형 mAb 모두에서 측정할 수 있습니다.

그림 4A는 Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 컬럼을 이용해 분리한 IdeS 분해

mAb2 Fc subunits의 LC/MS 프로파일을 보여줍니다. Deconvolution된 질량 스펙트럼에서 우세한 피크는 두 개의 산화 종에 해당하며, 대부분 M256과 M432에 기인한 것입니다. Fc 산화의 정량 수준은 Deconvolution된 질량 스펙트럼의 피크 면적을 사용해 계산했으며 2.38%로 확인되었습니다.

산화의 펩타이드 맵핑 기반 정량을 위해 mAb2를 LC/MS 펩타이드 맵핑 분석법으로 분석했습니다. 그림 4B는 트립신 분해

mAb2 펩타이드에 대한 LC/MS 프로파일을 보여줍니다. MS/MS 분석을 통해 변형 및 비변형 펩타이드 변이체(DTLM²⁵⁶ISR 및 WQQGNVFSCSVM⁴³²HEALHNHYTQK)의 ID를 확인하였으며, 상대적 산화 함량(M256 + M432)은 2.33%인 것으로 밝혀졌습니다.

Subunit 분석 및 펩타이드 맵핑 분석법 간의 산화 정량 비교는 표 3과 같이 두 분석법 모두 유사한 추정치를 보여줍니다.

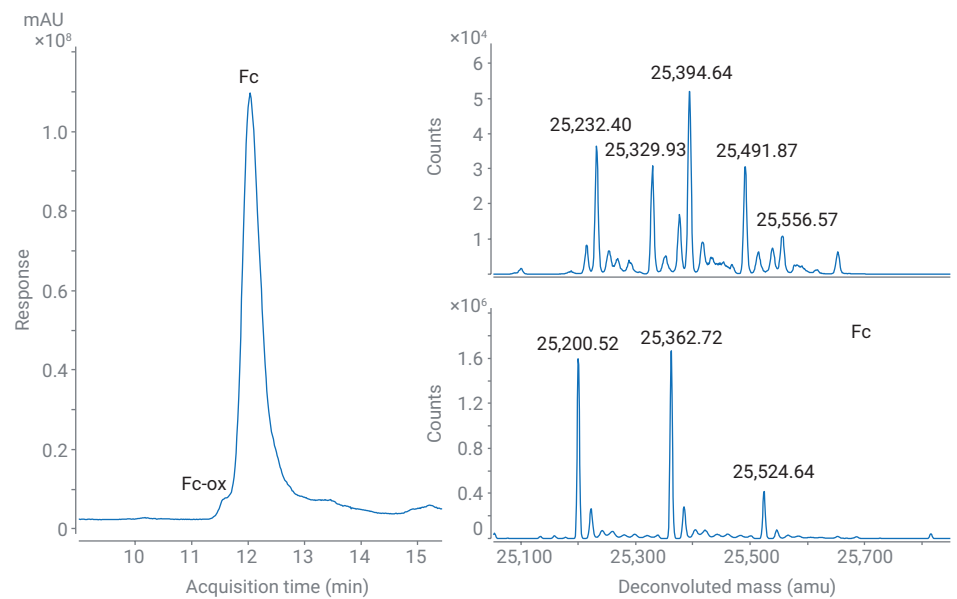
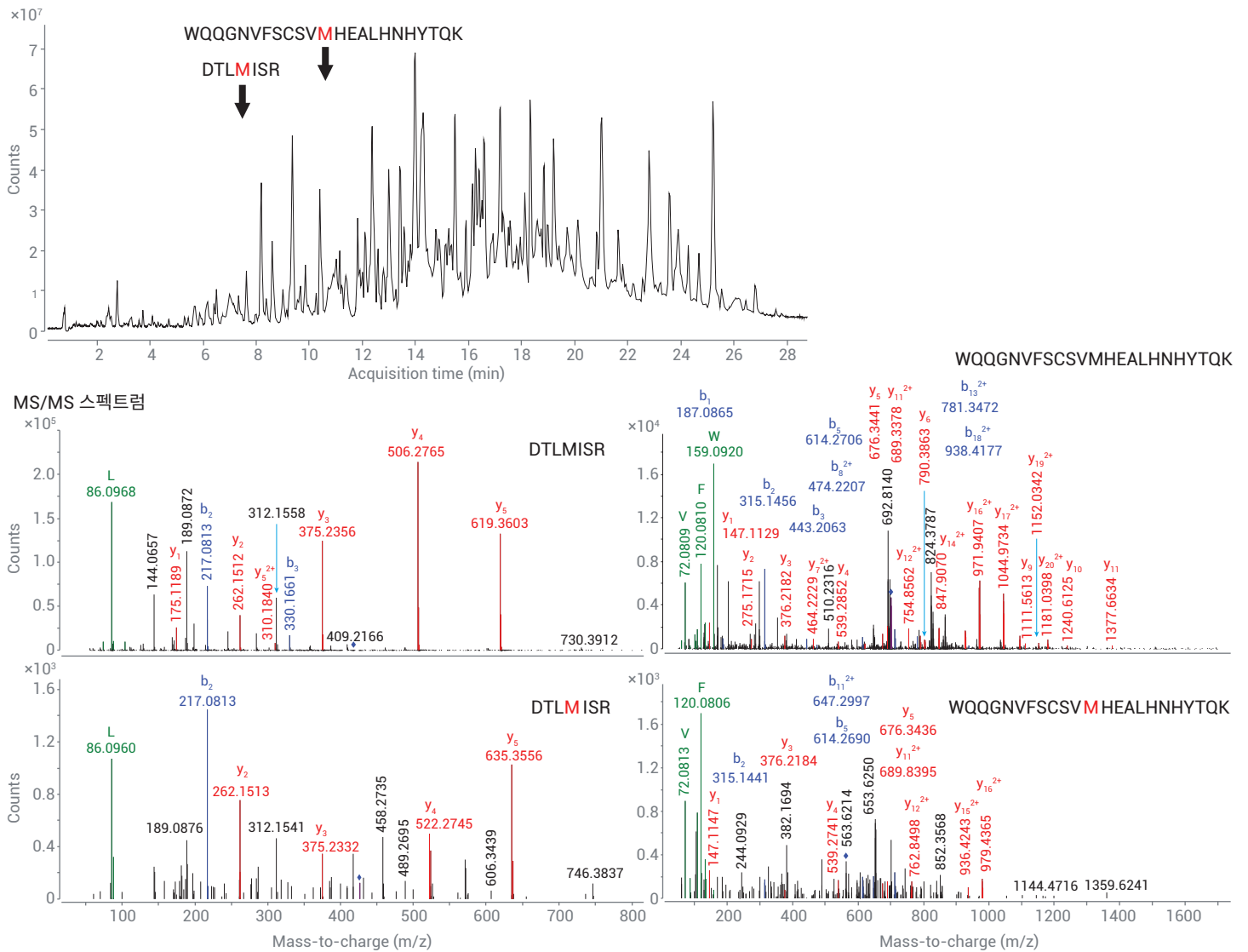


그림 4A. Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1 × 100mm, 1.8μm, PEEK 컬럼을 이용한 IdeS 분해 mAb2의 LC/MS 분석. Fc 조각의 deconvolution된 질량 스펙트럼은 32Da의 이동을 보여줌(두 개의 산소 추가에 해당)



시퀀스	m/z	표적 질량	변형	상대적 레벨
DTL MISR	418.2216	834.4269	—	98.24
DTL MISR	418.2200	850.4219	산화	1.76
WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQK	1401.1368	2800.2598	—	99.43
WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQK	705.0704	2816.2548	산화	0.57

그림 4B. 애질런트 펩타이드 맵핑 2.1 × 150mm, 2.7μm 컬럼을 사용한 mAb2의 LC/MS 펩타이드 맵핑

당화

아스파라긴 결합 N-연결 당화는 가장 중요한 PTM 중 하나이며 mAb 이질성에 영향을 미칩니다. 글리칸 특성 규명은 바이오 제약 제조 과정에서 매우 중요합니다. 그림 5A는 Agilent AdvanceBio 글리칸 맵핑 컬럼에서 분리된 mAb1의 InstantPC 라벨링된 N-글리칸의 형광 크로마토그램을 나타내며, 대표적인 주요 글리칸 G0F, G1F 및 G2F를 보여줍니다. 글리칸 종은 상대적 함량을 계산할 수 있을 정도로 충분히 잘 분리되었으며, 삽입된 표에는 모든 글리칸의 상대량이 정리되어 있습니다. 글리칸 어노테이션을 확인할 때 다중 하전 H⁺ 및 Na⁺ 부가 이온의 동위원소 모델로 모든 피크의 MS 신호를 매칭시켰습니다.

글리칸 종의 펩타이드 맵핑 기반 정량을 위해 mAb1의 트립신 처리 펩타이드를 LC/MS로 분석했습니다. 그림 5B는 AdvanceBio 펩타이드 맵핑 컬럼을 사용하여 분리한 서로 다른 글리코실화 TKPREEQYNSTYR 펩타이드의 추출 이온 크로마토그램(EIC) 오버레이를 보여줍니다. MS 분석 결과 TKPREEQYNSTYRSTYR 펩타이드의 주요 당형(G0, G1F, G0F, G2F)과 일치하는 질량을 식별했으며 가장 풍부한 당형은 G0F 및 G1F에 해당하는 것으로 확인되었습니다.

유리 글리칸(HILIC)과 펩타이드 맵핑 분석법 간의 글리칸 정량 비교는 그림 5C 및 표 3에 나타나 있으며, 두 분석법 모두 유사한 추정치를 보여줍니다. 상관 계수는 0.98로서 주요 글리칸에 대한 HILIC 및 RP 펩타이드 맵핑 분석법 간에 뚜렷한 양의 상관관계를 보여줍니다.

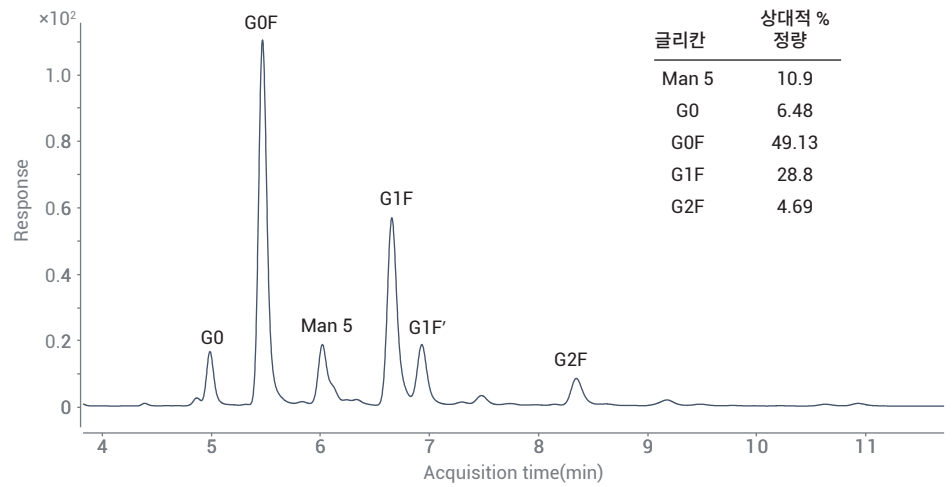


그림 5A. mAb1의 InstantPC 라벨링된 글리칸의 형광 크로마토그램 및 정량 결과

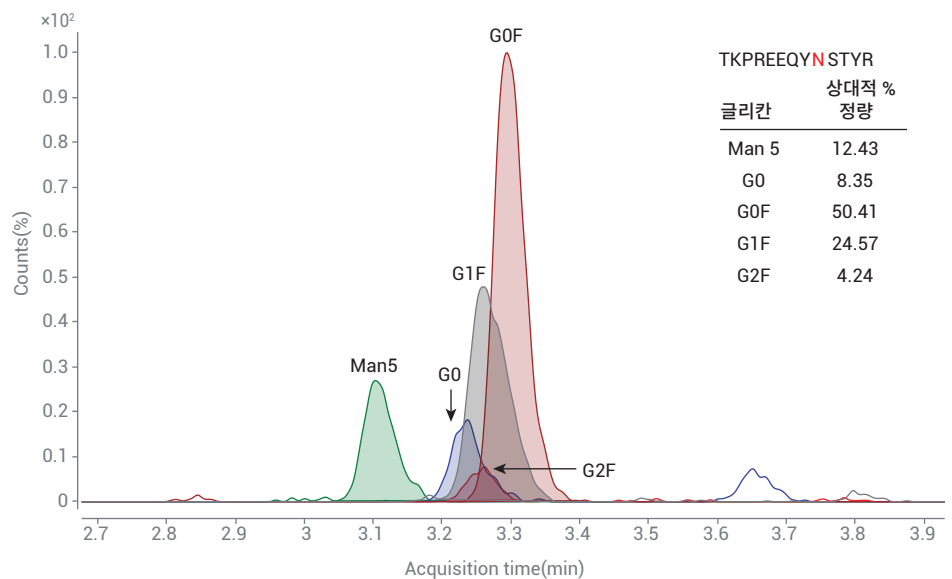


그림 5B. 당화 TKPREEQYNSTYR 펩타이드와 일치하는 m/z 비율의 MS 추출 화합물 크로마토그램 및 정량 결과

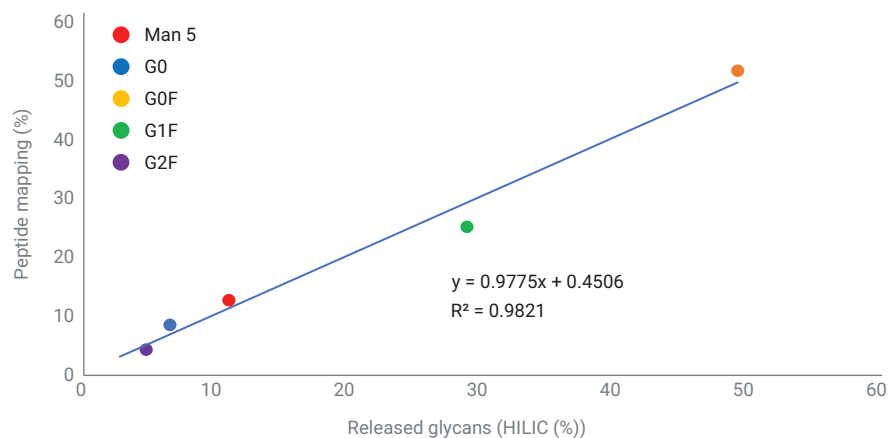


그림 5C. 상관 관계 그래프. HILIC 및 펩타이드 맵핑 분석법에 의한 글리칸 정량 비교

결론

본 연구에서는 mAb의 다중 CQA를 모니터링하기 위한 애질런트 펩타이드 맵핑 워크플로를 설명하였습니다. 펩타이드 맵핑 및 기존 분석법 사이의 다중 속성에 대한 상대 % 정량 비교에서 매우 우수한 상관관계를 보였습니다. 이러한 결과는 펩타이드 맵핑 접근법으로 기존의 분석법을 대체하여 mAb 품질 속성을 모니터링함으로써 분석 시간과 비용을 줄일 수 있음을 보여줍니다.

참고 문헌

1. Rogers, R. S. *et al.* A View on the Importance of “Multi-Attribute Method” for Measuring Purity of Biopharmaceuticals and Improving Overall Control Strategy. *The AAPS Journal* **2018**, 20, 7.
2. 고분해능 LC/MS를 이용한 두 가지 Rituximab 바이오시밀러의 Intact 질량, Subunit 질량, 유리 글리칸 비교 연구, *애질런트 테크놀로지스 응용 자료*, 발행번호 5994-1653K0, **2020년**.
3. Rapid Antibody Digestion Enabled by Automated Reversed-Phase Desalting on the Agilent AssayMAP Bravo Platform, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-6478EN, **2016**.

www.agilent.com/en/solutions/biopharma

DE.0531828704

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 8월 19일, 한국에서 인쇄
5994-2245K0

한국애질런트테크놀로지스(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