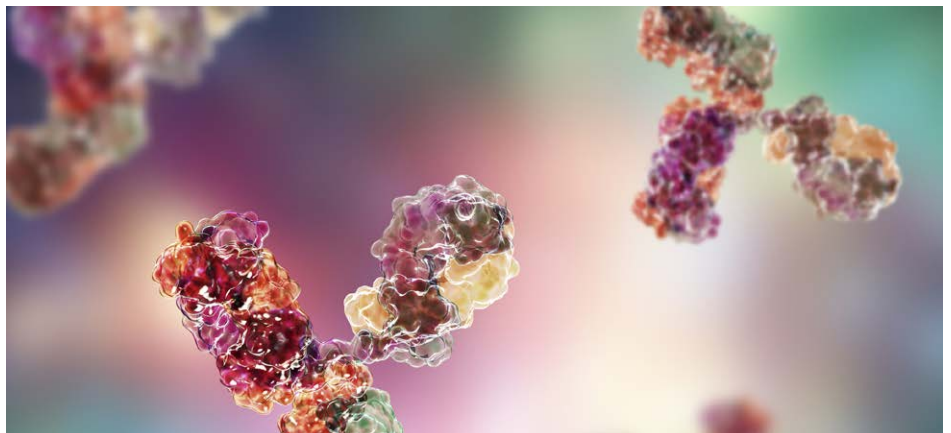


# 이차 미분 UV-Vis 흡수 분광법을 이용한 형태 연구

Innovator와 바이오시밀러 단일 클론 항체 쌍의 비교



## 저자

Devansh Shah  
Vellore Institute of  
Technology, India  
Neethu Ayyolath  
Amrita University  
Kollam, India  
Ursula Tems; Ravindra  
Gudihal  
Agilent Technologies, Inc.

## 서론

단일 클론 항체(mAbs)는 인체 건강에 대한 치료적 가치로 인해 큰 관심을 끌고 있습니다. (1). 바이오시밀러는 특정 질병에 대한 Innovator mAb의 복제 제품이며, Innovator의 특허 만료로 인해 이러한 분자의 의약품 시장이 빠르게 확장되고 있습니다(2). 단백질 형태 안정성(3)을 연구하고 Innovator와 바이오시밀러 사이의 비교 가능성을 보여주기 위해 UV 분광법, 원이색법 및 형광법(4) 등의 분석법이 이용됩니다. 이 연구에서는 Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 Innovator(리툽시맵)와 바이오시밀러 쌍을 분석했습니다. 그다음 독점적인 Cary WinUV 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고, 이차 미분 흡수 스펙트럼을 이용해 상세하게 비교했습니다. 그 결과, 이 응용을 위한 분석 솔루션으로서 Cary 60의 고유한 기능이 부각되었을 뿐만 아니라, 수집된 데이터가 단백질 구상 구조에서 방향족 아미노산의 미세 환경에 관한 정보를 어떻게 제공하는지 보여줌으로써 다양한 테스트 조건에서 mAbs의 안정성을 입증했습니다.

## UV-Vis 분광법의 이점

UV-Vis 분광법은 총 단백질 구조에 대한 인사이트를 제공하는 신속하고 신뢰할 수 있는 기술입니다. 이 분석법은 광범위하게 사용할 수 있으며, 값비싼 시약이나 소모품이 필요하지 않습니다. 중요한 것은 UV-Vis 분광 광도법은 비파괴적이므로 측정된 시료를 회수할 수 있습니다. 이러한 주요 특성으로 인해 UV-Vis는 LC 또는 질량 분광법과 같은 기술을 이용한 추가 분석 전에 사용할 수 있는 직교 도구로 이상적입니다.

Cary 60 UV-Vis 분광 광도계는 견고하고 효율적인 분석 도구입니다. 크세논 플래시 램프를 기반으로 하는 광학 설계는 시료의 광분해를 방지하는 고유한 특징을 가지며 기기 예열 시간을 없애 생산성을 향상시킵니다. 이러한 특징을 바탕으로 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계는 일상적으로 다양한 응용 분야에서 정확하고 정밀하며 재현 가능한 데이터를 획득하는 데 이용됩니다.

## 재료 및 분석법

L-phenylalanine, L-tryptophan 및 L-tyrosine은 애질런트 테크놀로지스에서 구입했습니다. 리톡시맵 Innovator 및 바이오시밀러는 지역 약국에서 구입했습니다. 다른 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich에서 구입했습니다.

### 시료 전처리

Tris HCl 완충액(pH 6.0)에서 500mg/mL 농도로 항체를 제조했습니다. Guanidine hydrochlorate(GdnHCl)은 mAb의 유도 변성에 이용되며 0~6M GdnHCl 농도 범위에서 수행됩니다. 적절한 양의 단백질 원액(10mg/mL)과 Tris HCl 완충액(pH 6.0)에 0~6M GdnHCl을 함유한 용액을 혼합하여 시료를 준비했습니다. L-phenylalanine, L-tryptophan 및 L-tyrosine은 물에 용해시켜 준비했습니다.

### 흡광도 측정 및 데이터 분석

Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 고분해능 흡수 스펙트럼을 획득할 수 있습니다. 경로 길이가 1cm인 3mL 석영 큐벳을 이용해 모든 시료를 실온 상태에서 분석했습니다. 0.5nm의 데이터 간격으로 240~350nm 파장 범위에서 스펙트럼을 수집했습니다.

Cary WinUV 소프트웨어 응용 프로그램 내에서 5포인트 데이터 필터와 함께 Savitzky Golay 알고리즘을 사용하여 이차 미분 스펙트럼을 계산했습니다. 각 원본 데이터 포인트 사이에 99개의 보간 포인트를 삽입하는 식으로 얻어진 미분 스펙트럼에 스플라인 함수를 적용함으로써 GdnHCl에 의해 유도된 항체 언폴딩을 모니터링하기 위한 분해능을 0.01nm로 향상시켰습니다.

## 결과 및 토의

이차 미분 흡수 분광법은 단백질 구조의 지표로서 tryptophan, tyrosine 및 phenylalanine 잔기(각각 W, Y 및 F)의 미세 환경을 분석하는 데 유용합니다(5,6). 이차 미분 스펙트럼으로 방향족 아미노산의 스펙트럼 밴드 문제를 해결할 수 있어 단백질이 정렬 상태에서 무질서 상태로 변할 때 흡광도의 특정 이동을 모니터링할 수 있습니다. 그림 1은 단일 클론 항체 외에 유리 L-방향족 아미노산에 대한 스캔 결과와 이에 해당하는 이차 미분 스펙트럼을 보여줍니다. 각 이차 미분 흡수 스펙트럼을 살펴보면, 이러한 아미노산과 단백질의 특성이 명확하게 식별됩니다. 바이오시밀러 및 Innovator mAbs에서 tryptophan 잔기의 미세 환경 변화를 모니터링하기 위한 지표로 이차 미분 스펙트럼에서 291nm에 나타난 포지티브 피크를 선택했습니다.

Cary 60을 사용하여 이차 미분 흡수 스펙트럼을 수집하고, 화학적 변성제인 GdnHCl이 있을 때 Innovator와 바이오시밀러 리톡시맵의 변성 민감성을 비교하는 식으로 그 구조적 안정성을 비교했습니다. 그림 2는 0M 및 5μM GdnHCl 농도에서 Innovator와 바이오시밀러의 이차 미분 스펙트럼을 보여줍니다. 스펙트럼을 조사해 보면 mAb 시료가 GdnHCl에 노출될 때 291nm(그림 2에 화살표로 나타냄) 부근에서 네거티브의 흡수 피크가 이동한 것이 드러납니다. 이는 mAbs에서 tryptophan 잔기의 미세 환경에 변화가 있음을 나타냅니다.

GdnHCl의 농도를 높여가면서 Innovator와 바이오시밀러의 변성을 비교했습니다. 그림 3은 mAbs가 높은 GdnHCl 농도에 노출되었을 때 발생하는 파장 이동을 보여줍니다. Innovator와 바이오시밀러는 비슷한 GdnHCl 농도에서 변성되어 이는 단백질 구조 내에서 tryptophan 잔기의 미세 환경이 유사함을 시사합니다. 이 결과는 애질런트 HPLC 기기로 이 mAb 쌍이 1차원 및 고차원 구조에서 유사함을 입증하기 위해 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC), 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 및 펩타이드 매핑을 이용하여 수행된 이전의 연구 결과를 뒷받침합니다(7).

미분 분광법으로 a/b 비(8,9)를 생성하여 단백질 시퀀스에서 tyrosine 잔기의 미세 환경을 분석하는 방법으로도 단백질 구조를 비교할 수 있었습니다. 여기서 a는 tyrosine에 의해 발생한 음의 피크의 최대( $\sim\lambda_{288}$ ) 및 최소( $\sim\lambda_{283}$ ) 흡광도 사이의 거리이고, b는 tryptophan에 의해 발생한 두 번째 최대( $\sim\lambda_{294}$ ) 및 최소( $\sim\lambda_{291}$ ) 흡광도 사이의 거리입니다(그림 4 삽도).

그림 4는 보다 높은 GdnHCl 농도에서 단백질 구조의 변화에 따른 a/b 비의 변화를 보여줍니다. 낮은 농도에서 a/b 비는 약 1.05이며, 이는 단백질 구상 구조와 일치합니다<sup>9</sup>. 높은 농도에서는 a/b 비가 증가하여 tyrosine 잔기가 더 많이 노출됨을 나타냅니다. Innovator와 바이오시밀러는 유사한 스펙트럼 프로파일을 보여주며, 이는 두 mAbs 모두에 대해 tyrosine의 미세 환경이 유사함을 보여줍니다.

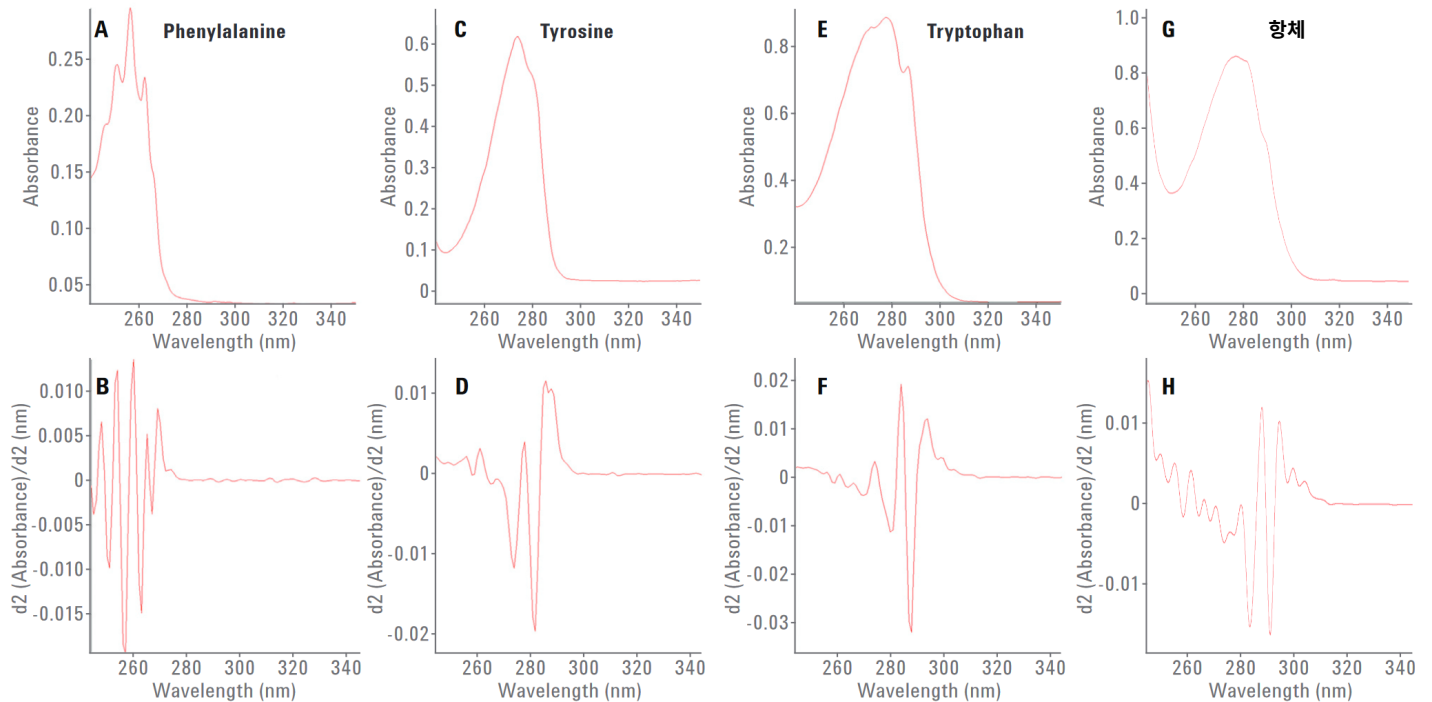


그림 1. Phenylalanine(A, B), tyrosine(C, D), tryptophan(E, F) 및 항체(G, H)에 대한 흡광도와 이차 미분 스펙트럼.

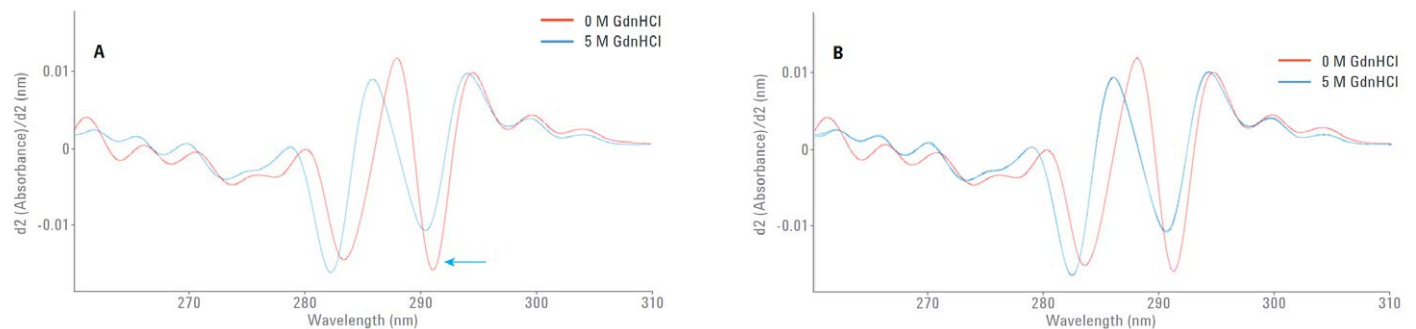


그림 2. 0M GdnHCl(빨간색 선) 및 5M GdnHCl(파란색 선) 조건에서 Innovator(A)와 바이오시밀러(B)에 대한 이차 미분 스펙트럼.

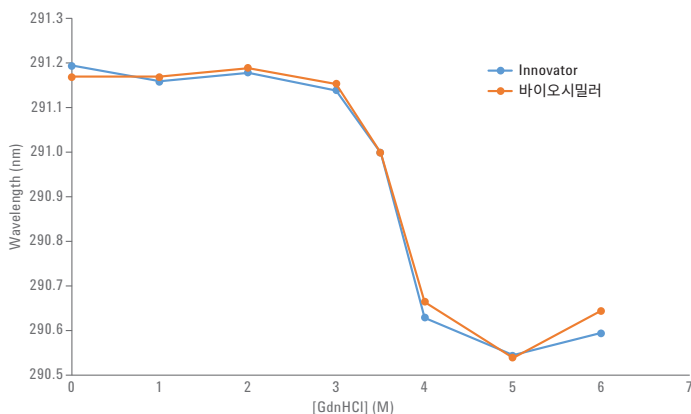


그림 3. GdnHCl 농도에 따른 Innovator와 바이오시밀러의 변성 프로파일.

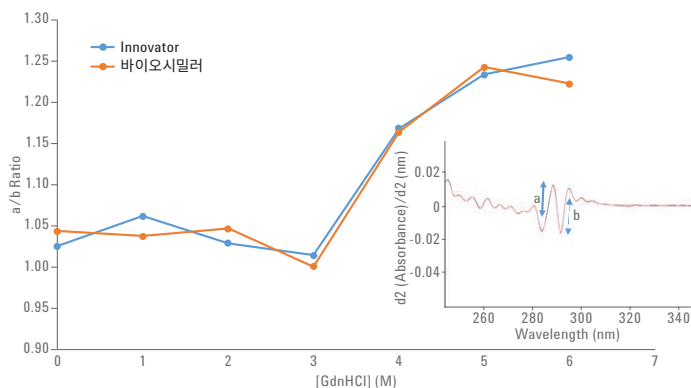


그림 4. 상이한 GdnHCl 농도에서 Innovator와 바이오시밀러에 대한 a/b 비. 삽도는 a와 b에 대한 정의를 보여줍니다.

UV-Vis 분광 광도법으로 정밀하고 상세하며 정확한 정보를 얻을 수 있다는 점에서 이 분석법의 잠재력을 집중적으로 보여줬습니다. 또한 실험실에 설치된 UV-Vis 분광 광도계와 같은 저렴하고 사용하기 쉬운 기술을 대체 분석 기법으로 이용하여, 다른 중요한 분석 기기의 작업량을 줄일 수 있는 기회도 충분히 기대해 볼 수 있습니다.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020  
2020년 2월 17일, 한국에서 인쇄  
5991-7026KO  
DE 6145023148

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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

## 결론

- Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계는 Innovator와 바이오시밀러 mAb 쌍의 단백질 구조를 비교하는 데 필요한 분해능과 정확도를 제공합니다.
- 연구되고 있는 mAb Innovator와 바이오시밀러 쌍은 화학적 변성제(GdnHCl)에 대해 유사한 언폴딩 패턴을 보여줍니다. 이는 mAb 쌍에 대한 총 단백질 구조가 유사함을 시사합니다.
- 이 연구에서는 또한 구조 연구 목적으로 Innovator와 바이오시밀러 mAbs를 비교하는 데 이차 미분 흡수 분광법을 사용할 수 있다는 사실을 보여주었습니다.

## 참고 문헌

1. Scott, A.; Wolchok, J.; Old, L. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012** 12, 278–287 (2012)
2. Udpa, N.; Million, R. Monoclonal antibody biosimilars. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2016** 15, 13–14.
3. Pace, C. N.; Scholtz, J. M. Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach*; Creighton, T. E., Ed.; Oxford University Press: New York, 1997; pp 299-321.
4. Zheng K.; Bantog C.; Bayer R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability mAbs **2011**, 3:6, 568-576.
5. Levine R.; Federici M. Quantitation of aromatic residues in proteins: model compounds for second-derivative spectroscopy *Biochemistry* **1982**, 21, 2600-2606.
6. Mach H.; Middaugh C.R.; Simultaneous Monitoring of the Environment of Tryptophan, Tyrosine, and Phenylalanine Residues in Proteins by Near-Ultraviolet Second-Derivative Spectroscopy *Anal. Biochem.* **1994**, 222, 323-331.
7. Comparison of Biosimilar and Innovator Monoclonal Antibody Rituximab Using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC System and Agilent OpenLAB Match Compare Software, Agilent Technologies application note publication number [5991-4920EN](#).
8. Ragone R.; Colonna G; et al. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy *Biochem.* **1984** 23 (8), 1871-1875. .
9. Katayama D.; Nayar R.; et al. Solution behavior of a novel type 1 interferon, interferon- $\tau$  *J. Pharma. Sci.* **2005**, 94, 2703-2715.