

Rituximab Innovator 및 바이오시밀러의 전하 변이체 및 응집체 분석



저자

Bian Yulan
 Global Solution
 Development Center,
 Global Laboratory Solution
 Sales (LSS) Marketing,
 Agilent Technologies
 Singapore (Sales) Pte. Ltd.

개요

단일 클론 항체는 다양한 질병 치료에 사용되는 중요한 생체 분자 클래스입니다. Innovator 분자의 카피 버전인 바이오시밀러는 응집체 및 전하 변이체와 같은 주요 품질 특성(CQA)에서 상세한 특성화가 요구됩니다. 규제 기관의 승인을 얻기 위해서는 Innovator와 비교하여 이러한 특성이 요구되는 범위 내에 있어야 합니다. 본 연구에서는 Agilent 1260 Infinity II bio-inert LC 및 Agilent AdvancedBio 컬럼을 사용하여 두 가지 분석 워크플로를 수행하는 방법으로 서로 다른 제조업체의 Rituximab 바이오시밀러와 그 Innovator의 응집체 및 전하 변이체 프로파일을 비교합니다. 그 결과, 응집체와 전하 변이체 프로파일에서 Innovator와 바이오시밀러 사이에 유사점이나 차이점이 관찰되었습니다. 바이오시밀러 1은 응집체와 전하 변이체 측면에서 바이오시밀러 2보다 Innovator와 더 많은 유사성을 가지고 있습니다. 이 분석법은 일중 재현성과 일간 재현성이 모두 탁월했습니다. Peak Explorer 기능이 있는 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어를 사용하면 한 눈에 쉽게 데이터를 검토할 수 있습니다. 이 연구는 Rituximab에 대한 일련의 생물학적 유사성을 알아보는 연구의 일환으로 이루어졌습니다.

서론

단일 클론 항체(mAb) 약물은 제약 시장에서 가장 빠르게 성장하는 생물 치료제 중 하나입니다. mAb의 대부분은 암 치료를 위한 것입니다.¹ Innovator mAb 약물에 대한 약물 발견, 개발, 제조 및 임상 시험 과정에 투입되는 비용은 막대합니다.

이 때문에 환자가 Innovator 약물 치료를 받는 데 드는 비용은 일반적으로 높습니다. 따라서 Innovator 약물의 보다 경제적인 바이오시밀러라고 불리는 복제 의약품에 대한 수요가 높습니다. 최초의 바이오시밀러는 2006년 유럽 시장의 승인을 받았으며, 미국 시장은 2010년 3월 건강보험개혁법(Affordable Care Act)이 도입되면서 그로부터 9년 후에 열렸습니다. 바이오시밀러의 개발은 Innovator 분자의 특허가 만료되면서 활성화되고 있습니다.

규제 기관으로부터 바이오시밀러 승인을 얻기 위해 제조업체는 안전성, 순도 및 효능 면에서 생물학적 제품과 기준 제품간에 임상적으로 의미 있는 차이가 없음을 입증해야 합니다.² 이 과정에서 중요한 부분은 Innovator와 바이오시밀러 사이의 물리 화학적 유사성을 이해하기 위해 실시하는 광범위한 비교 분석 연구입니다.

응집체, 절단 및 기타 변형된 형태(탈아미드화, 이성질체화 등)는 제조 과정이나 보관 중에 발생하는 제품 관련 불순물입니다. 약물에 이러한 불순물이 존재하면 약물 안정성, 활성 및 효능에 부정적인 영향을 미칩니다. 따라서 이들은 일반적으로 CQA로 간주되어 제조 공정의 전 과정에서 면밀히 모니터링하고 검사합니다.³

이 응용 자료에서는 두 가지 분석 워크플로를 이용하여 Rituximab의 두 바이오시밀러와 그 기준 Innovator를 응집체 및 전하 변이체 프로파일의 측면에서 비교 입증합니다. Rituximab은 류마티스 관절염, 루푸스, 혈관염 및 피부 근염의 치료에 잘 알려진 생물 치료제입니다. 두 가지 바이오시밀러는 지리적으로 서로 다른 위치에 있는 두 제조업체로부터 얻었습니다. 두 워크플로 모두 AdvancedBio 컬럼 및 OpenLab CDS와 함께 1260 Infinity II bio-inert LC를 결합한 시스템에 기반을 둡니다. 전하 변이체는 약 양이온 교환(WCX) 컬럼에서 분리하고 응집체는 크기 배제(SEC) 컬럼에서 분리했습니다. 그림 1은 두 가지 워크플로를 자세히 보여줍니다. 일중 결과와 일간 결과의 재현성이 양호했기 때문에 워크플로의 신뢰성이 보장되었고 Innovator와 바이오시밀러 사이의 유사성 또는 차이점이 명확하게 드러났습니다.

실험

기기

분석 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다.

- 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 II 다이오드 어레이 검출기 WR(G7115A), bio-inert 플로우 셀 포함
- Agilent 1260 Infinity II Bio-inert MultiDetector Suite(MDS) (G7805A), dual-angle static 및 DLS 검출 기능 포함(G7809A)

컬럼

- Agilent Bio mAb, 비다공성, 2.1 x 250 mm, 5 µm HPLC, PEEK (p/n 5190-2411) - 전하 변이체 분석에 이용
- Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 300 mm, 2.7 µm (p/n PL1180-5301) - 응집체 분석에 이용

소프트웨어

- Agilent OpenLab CDS 버전 2.3
- Agilent Buffer Advisor A.01.01 [009]
- Agilent Bio-SEC 소프트웨어 버전 A.02.01 Build 9.34851[21]

LC 기기 제어와 LC 데이터 분석은 Agilent OpenLab CDS 버전 2.3을 사용하여 수행했습니다. 드래그 앤 드롭 템플릿 기능을 통해 사용자 정의 및 대화식으로 보고서를 작성할 수 있는 자연스러운 사용자 인터페이스를 제공합니다. 소프트웨어의 Peak Explorer 기능을 이용하여 Innovator와 바이오시밀러 간의 결과를 비교했습니다.

화학 물질 및 시료

용매는 전부 LC 등급 용매를 사용하였습니다. 초순수는 0.22µm의 membrane point-of-use cartridge(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다. Sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic 및 sodium chloride은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)로부터 구입했습니다. Innovator 및 두 개의 바이오시밀러를 포함한 mAb 약물은 지역 유통업체에서 구입했습니다. DLS 시스템에서 분석하기 전에 이동상을 0.1µm 친수성 PTFE 멤브레인 필터(Merck Millipore)를 통해 삼중으로 여과했습니다.

원래의 용기에서 시료를 채취하여 2분 동안 13,000g에서 원심분리했습니다. 분석을 위해 상등액을 LC 시료 바이알에 분취했습니다.

전하 변이체(IEX)



응집체 분석



그림 1. Rituximab Innovator와 바이오시밀러를 분석하기 위한 전하 변이체 및 응집체 분석 워크플로

실험 방법

전하 변이체: 표 1은 Rituximab Innovator 및 바이오시밀러의 이온 교환 크로마토그래피에 사용된 크로마토그래피 파라미터를 나타냅니다. 연구에 사용된 그레디언트는 Buffer Advisor 소프트웨어로 계산되었습니다. 시료를 희석하지 않고 직접 주입했습니다 (10mg/mL). 머무름 시간(RT), 면적 및 면적 백분율을 사용하여 상대 표준 편차(RSD %) 값을 계산했습니다. mAb의 전하 변이체를 정량하기 위해 상대적 백분율 면적을 사용했습니다.

응집체 분석: 표 2는 Rituximab Innovator 및 바이오시밀러의 응집체 분석에 사용된 크로마토그래피 파라미터를 나타냅니다. 시료를 희석하지 않고 직접 주입했습니다 (10mg/mL). RT, 면적 및 백분율 면적을 사용하여 RSD % 값을 계산했습니다. 시료에서 고분자량 종(HMWS)과 저분자량 종(LMWS)을 정량하기 위해 상대적 백분율 면적을 사용했습니다. Rituximab의 평균 분자량과 수력학적 반경(hydrodynamic radius)은 DLS 분석으로부터 얻었습니다.

결과 및 토의

전하 변이체(IEC)

그림 2는 BioMAb PEEK 컬럼에서 Innovator와 바이오시밀러의 전하 변이체 프로파일을 나타내며 16분만에 전하 변이체를 높은 분리능으로 분리했음을 보여줍니다. Rituximab Innovator와 바이오시밀러의 6회 반복 분석 오버레이가 우수한 재현성을 보여줍니다. 주 피크와 변이체에 대한 RT 및 면적 RSD는 각각 0.3 및 1% 이내입니다.

표 1. IEX 크로마토그래피 조건

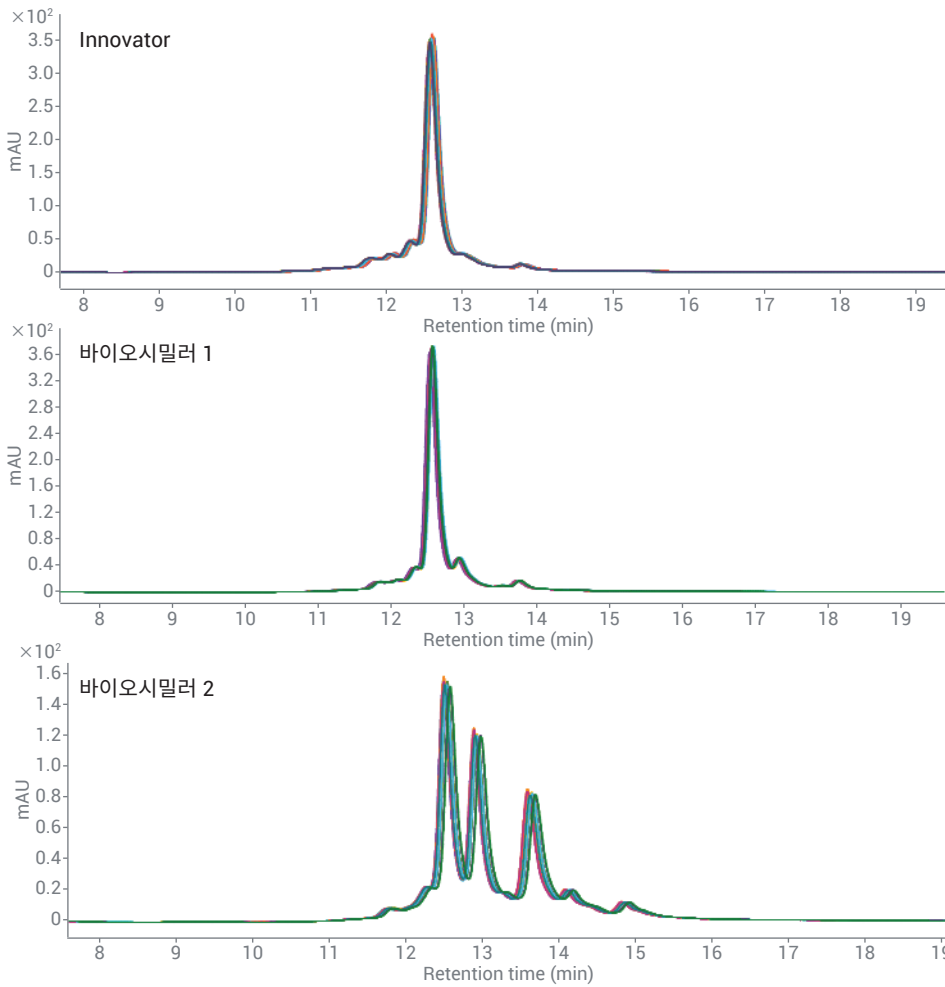
파라미터	값				
염 기울기	시간(분)	A) 물	B) NaCl (1,000 mM)	C) NaH ₂ PO ₄ (55 mM)	D) Na ₂ HPO ₄ (50 mM)
0 ~ 200 mM NaCl,	0.0	43.1	0.0	31.0	25.9
30 mM 인산나트륨	30.0	22.3	20.0	22.7	35.0
완충액, pH 6.8	35.0	22.3	20.0	22.7	35.0
중지 시간	35분				
평형 시간	30분				
유속	0.25mL/분				
주입 부피	2µL				
샘플러 온도	10°C				
컬럼 온도	25°C				
DAD	280nm/4nm, Ref:OFF				
피크 폭	>0.025분(10Hz)				

표 2. 응집체 분석 크로마토그래피 조건

파라미터	값
이동상	100mM 인산나트륨 완충액+150mM NaCl, pH 7.0
유속	0.8mL/분
중지 시간	20분
주입 부피	10µL(UV)/25µL(DLS)
샘플러 온도	10°C
컬럼 온도	25°C
DAD	280nm/4nm, Ref:off
피크 폭	>0.05분 (1.0초 감응 시간) (5Hz)
LS 검출기	25°C
DLS 작동 파라미터	
Correlator 실행 시간	5초
Correlator 기능 클립 시간	10µs
R ²	0.80
용리액 점도	0.0079(30°C에서 물의 점도)
용리액 굴절률	1.333(물의 굴절률)

그림 3은 Innovator와 바이오시밀러를 비교하기 위한 크로마토그램 오버레이를 보여줍니다. 12.5분 부근의 피크는 주 피크로 분류되며 주 피크의 좌우에 있는 피크는 각각 산성 및 염기성 전하 변이체 피크로 분류됩니다. 산성 변이체의 프로파일은 Innovator 및 바이오시밀러 1

사이에서 유사했지만, 바이오시밀러 2는 약간의 차이를 나타냈습니다. 라이신 절단에 주로 기인한 염기성 변이체의 프로파일은 불완전한 라이신 절단으로 인해 바이오시밀러 2와 Innovator 사이에서 큰 차이를 보였습니다.⁴



Innovator	일중(n = 6)		일간(n = 6)	
	%RSD RT	RSD% 면적	%RSD RT	RSD% 면적
산성 변이체	0.12	0.42	0.31	0.68
주 피크	0.10	0.15	0.29	0.50
염기성 변이체	0.10	0.90	0.28	1.91

바이오시밀러 1	일중(n = 6)		일간(n = 6)	
	%RSD RT	RSD% 면적	%RSD RT	RSD% 면적
산성 변이체	0.08	0.60	0.16	1.07
주 피크	0.07	0.32	0.15	0.85
염기성 변이체	0.07	0.75	0.14	1.05

바이오시밀러 2	일중(n = 6)		일간(n = 6)	
	%RSD RT	RSD% 면적	%RSD RT	RSD% 면적
산성 변이체	0.20	0.19	0.26	0.80
주 피크	0.21	0.52	0.25	0.89
염기성 변이체	0.22	0.32	0.26	0.70

그림 2. Agilent Bio Mab, 2.1 × 250 mm, 5µm, PEEK 컬럼을 사용하여 Agilent 1260 Infinity Bio-inert quaternary LC에서 Rituximab의 Innovator 및 바이오시밀러를 6회 반복 측정된 결과를 보여주는 오버레이. 그림의 표는 주 피크와 전하 변이체에 대한 머무름 시간과 면적의 정밀도(n = 6)를 보여줍니다.

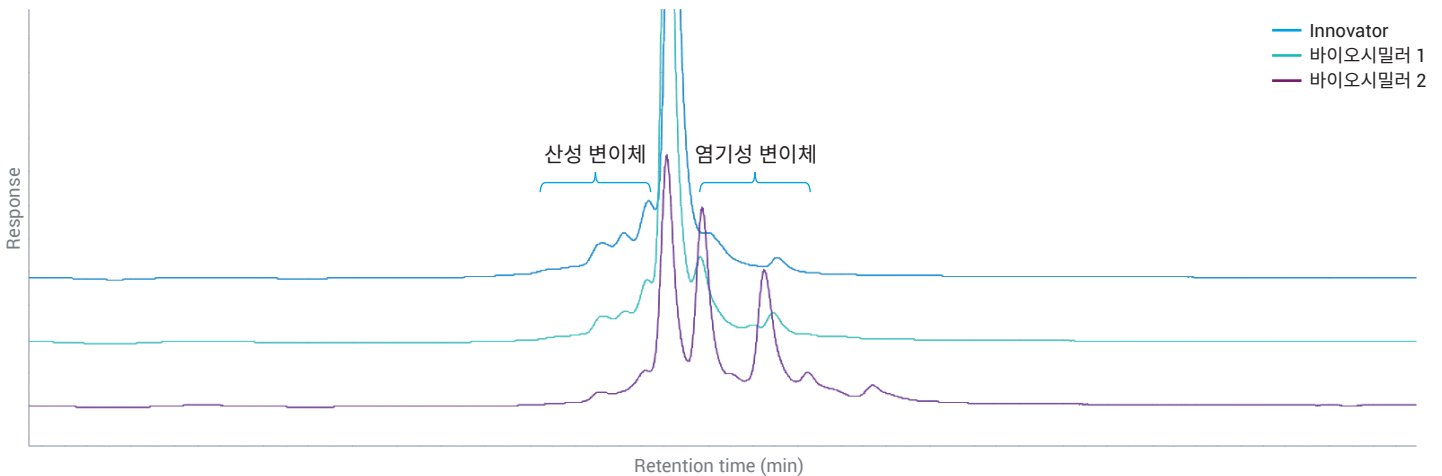


그림 3. Rituximab의 Innovator 및 바이오시밀러에 대한 전하 변이체 프로파일 비교 결과를 확대한 화면

그림 4는 Innovator와 바이오시밀러 전반에 걸친 전하 변이체와 주요 형태 분포를 보여줍니다. Innovator Rituximab의 주요 형태는 $65.35 \pm 0.27\%$, 바이오시밀러 1에서는 $65.14 \pm 0.10\%$ 이지만 바이오시밀러 2에서는 $28.8 \pm 0.07\%$ 에 불과한 것으로 밝혀졌습니다. 바이오시밀러 2 Rituximab의 주요 전하 변이체는 Innovator 제품 ($12.97 \pm 0.23\%$)과 비교하여 $62.99 \pm 0.06\%$ 염기성 변이체였습니다. 바이오시밀러 1이 약간 더 많은 염기성 변이체($20.11 \pm 0.12\%$ 대 $12.97 \pm 0.23\%$)를 나타내고 더 적은 산성 변이체($14.53 \pm 0.09\%$ 대 $21.68 \pm 0.13\%$)를 나타낸 것을 제외하고, Innovator와 바이오시밀러 1은 전하 변이체 프로파일에서 유사합니다.

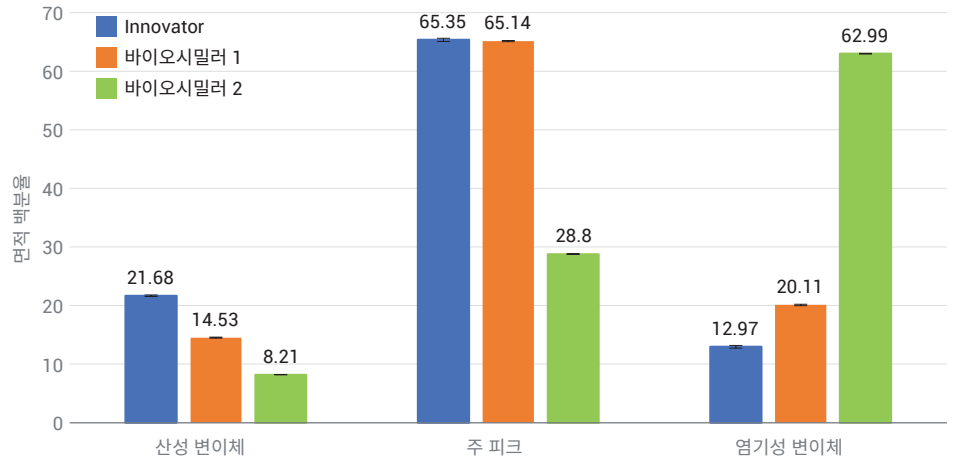


그림 4. Innovator와 바이오시밀러 사이의 전하 변이체(산성 변이체, 주 피크 및 염기성 변이체) 면적 백분율 비교

OpenLab CDS에 있는 또 다른 유용한 데이터 분석 기능은 Peak Explorer입니다. 이 기능은 많은 양의 데이터를 시각화하여 추세, 머무름 시간 변화, 이상치, 아티팩트 등을 발견함으로써 복잡한 시료의 데이터를 보다 신속하게 검토할 수 있게 해줍니다. 전하 변이체 데이터를 조사하고 Innovator와 바이오시밀러를 비교하기 위해 Peak Explorer를 사용했습니다. 그림 5는 Innovator와 바이오시밀러에 대한 Peak Explorer 비교 결과를 시각적으로 보여줍니다. 각 버블은 산성 및 염기성 변이체와 주 피크에 해당합니다. 버블 크기는 변이체의 면적 백분율을 나타냅니다. Peak Explorer로 표시된 비교 내용은 그림 4 결론에 따릅니다.

응집체 분석

그림 6은 Innovator와 바이오시밀러의 응집체 프로파일을 나타내며, 20분만에 응집체가 높은 분리능으로 분리된 것을 보여줍니다. Innovator와 바이오시밀러의 6회 반복 분석 오버레이가 우수한 재현성을 보여줍니다. 주 피크와 변이체에 대한 RT 및 면적 RSD는 각각 0.1 및 2% 이내입니다.

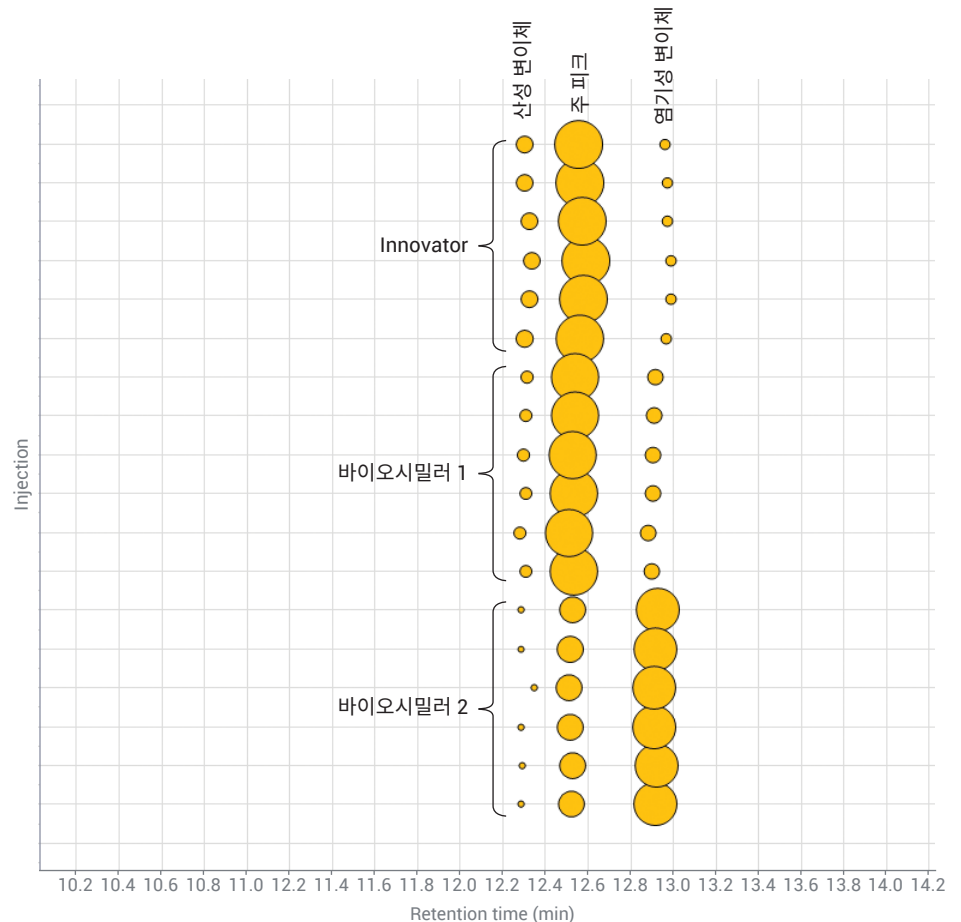
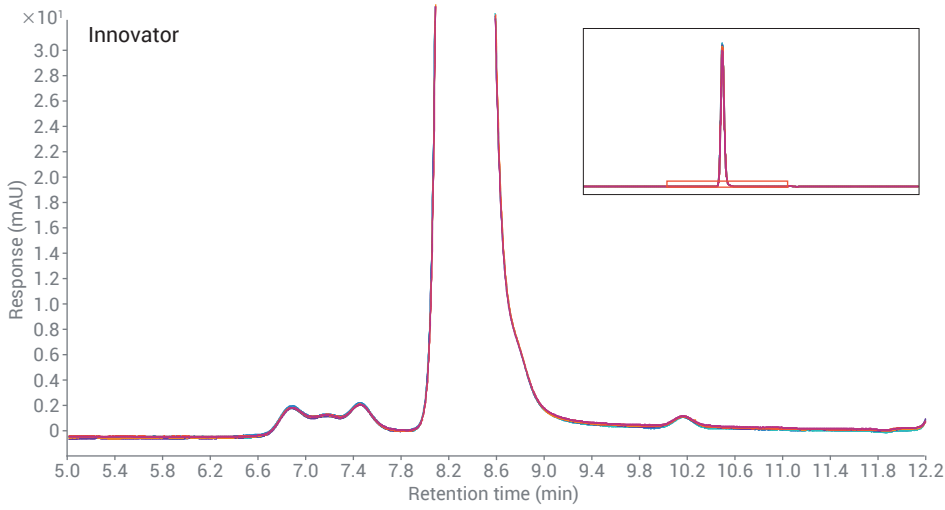
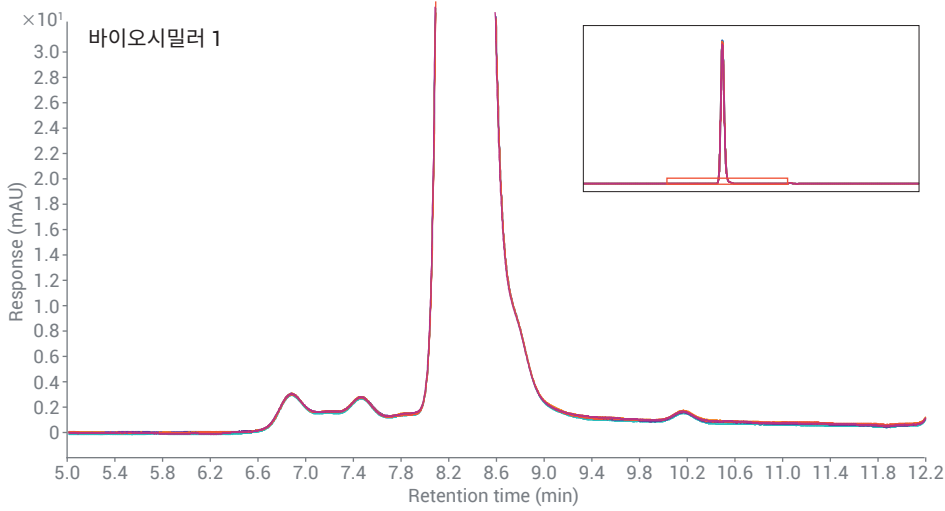


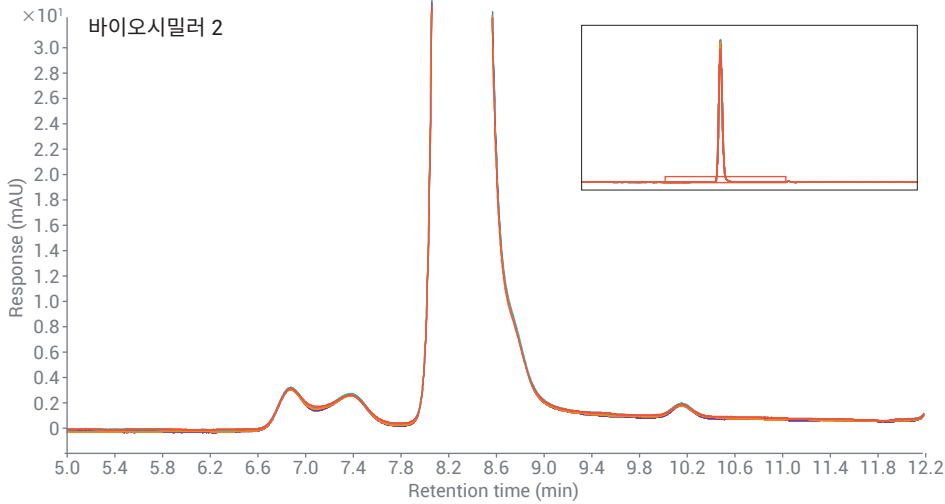
그림 5. Peak Explorer에 표시된 데이터를 보여주는 스냅샷. X축은 머무름 시간이고 Y축은 로드된 데이터 세트의 주입 번호입니다. 각 버블은 각 변이체와 주 피크를 나타냅니다. 버블 크기는 피크 면적 백분율을 나타냅니다.



Innovator	일중(n = 6)		일간(n = 6)	
	%RSD RT	RSD% 면적	%RSD RT	RSD% 면적
HMWS	0.05	0.35	0.05	0.56
모노머 피크	0.02	0.91	0.04	0.86
LMWS	0.03	1.12	0.06	1.77



바이오시밀러 1	일중(n = 6)		일간(n = 6)	
	%RSD RT	RSD% 면적	%RSD RT	RSD% 면적
HMWS	0.04	0.72	0.08	1.29
모노머 피크	0.00	0.68	0.02	0.62
LMWS	0.04	1.75	0.04	2.25



바이오시밀러 2	일중(n = 6)		일간(n = 6)	
	%RSD RT	RSD% 면적	%RSD RT	RSD% 면적
HMWS	0.04	0.66	0.04	0.63
모노머 피크	0.01	0.51	0.01	0.61
LMWS	0.02	2.11	0.05	2.29

그림 6. Agilent AdvancedBio SEC, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 사용하여 Agilent 1260 Infinity Bio-inert quaternary LC에서 Rituximab의 Innovator 및 바이오시밀러를 6회 반복 측정할 결과를 보여주는 오버레이. 표는 HMWS, 모노머 및 LMWS에 대한 머무름 시간 및 면적의 정밀도(n = 6)를 보여줍니다.

그림 7은 Innovator와 바이오시밀러를 비교하기 위한 크로마토그램 오버레이를 보여줍니다. 8.4분에 있는 피크는 모노머로 분류되며 주 피크의 좌우에 있는 피크는 각각 HMWS와 LMWS로 분류됩니다. 그림과

같이 LMWS는 시료 전체에서 유사하지만 (0.08, 0.08 및 0.11%) HMWS는 서로 다른 프로파일을 나타냅니다. Innovator와 바이오시밀러 2의 차이는 바이오시밀러 1보다 더 두드러집니다.

그림 8은 시료 내 HMWS, LMWS 및 모노머 분포를 보여줍니다. 세 시료 모두에서 모노머 피크는 98 ~ 99%인 것으로 밝혀졌습니다. 두 바이오시밀러에서 약간 더 높은 수준의 HMWS가 관찰되었습니다($0.93 \pm 0.01\%$, $0.94 \pm 0.01\%$).

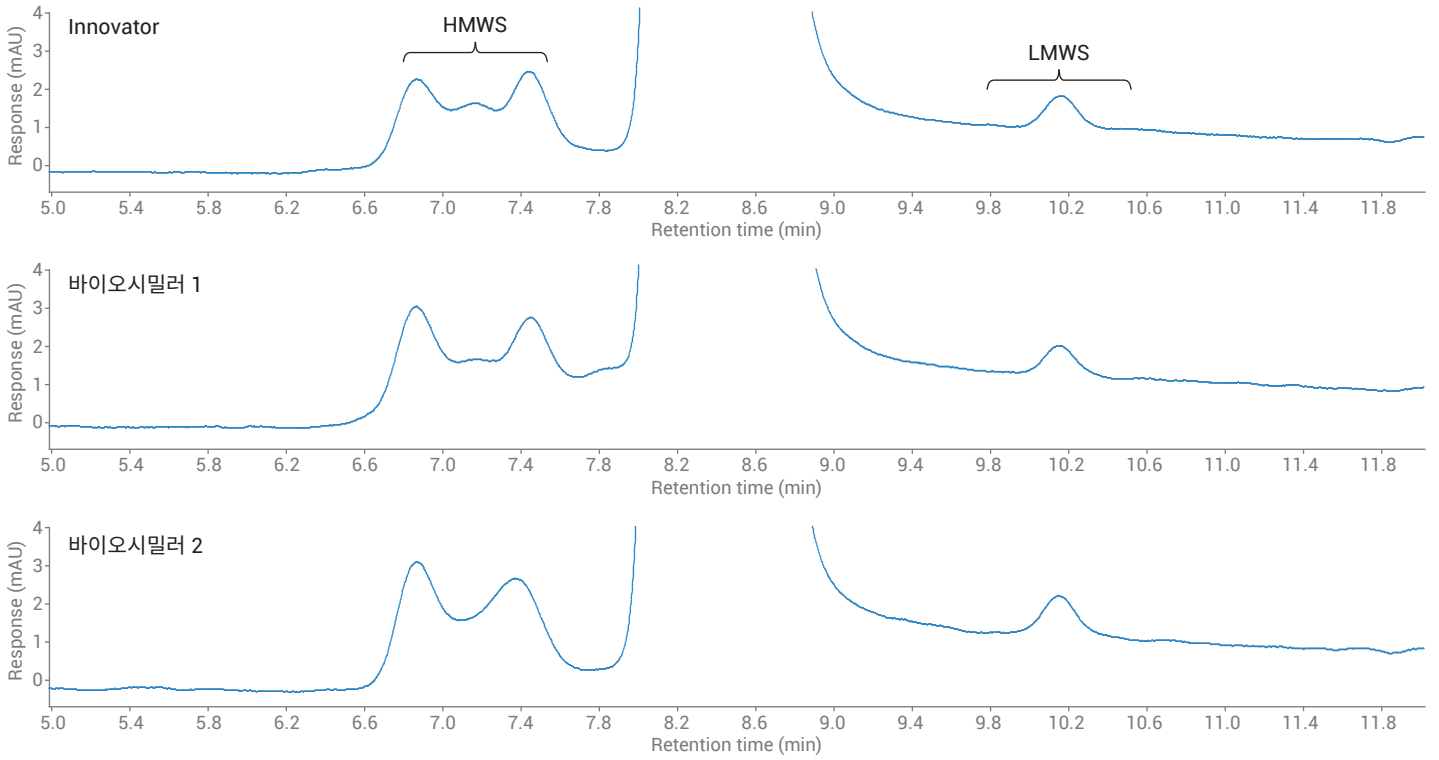


그림 7. Innovator 및 바이오시밀러의 응집체 프로파일 비교결과를 확대한 화면

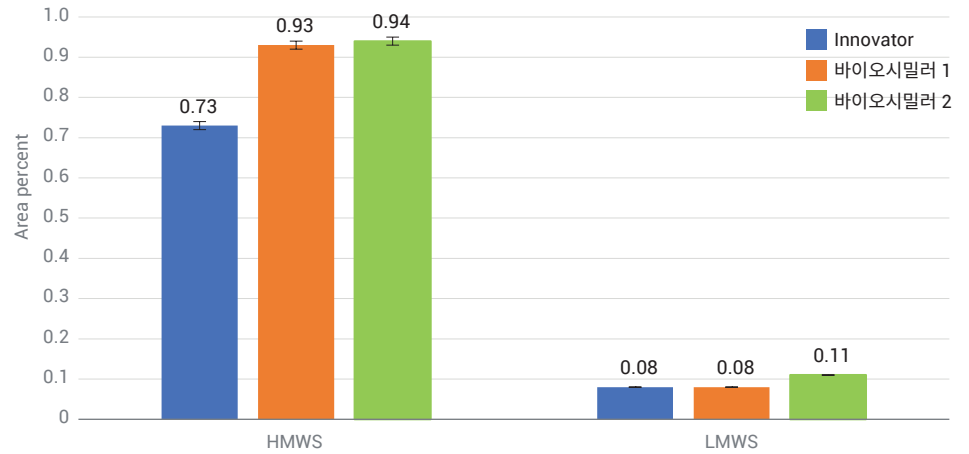


그림 8. Innovator와 바이오시밀러 사이의 HMWS 및 LMWS 면적 백분율 비교.

바이오시밀러 2는 또한 Innovator(0.08%) 및 바이오시밀러 1(0.08%)에 비해 더 높은 수준의 LMWS(0.11%)를 나타냈습니다. 그러나 모든 차이가 미미한 수준입니다.

그림 9는 DLS 검출 기능이 있는 bio-MDS 시스템으로 얻은 결과를 보여줍니다. mAb 모노머의 수력학적 반경(Rh)과 함께 절대 평균 분자량을 결과로부터 직접 판독할 수

있습니다. DLS 분석의 재현성이 우수하고 분자량 및 Rh 값이 정확하게 측정된 결과를 얻었습니다.

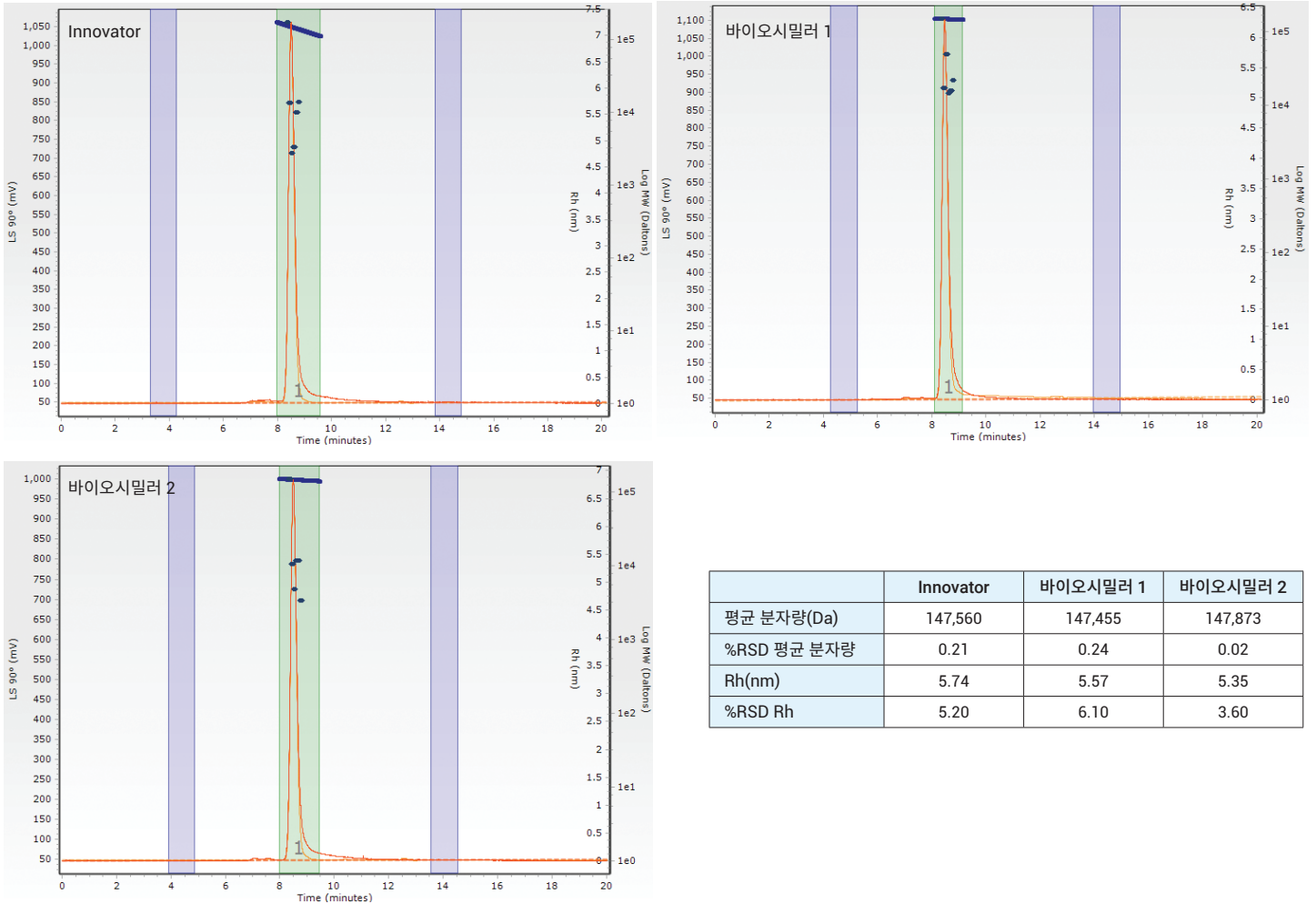


그림 9. Innovator와 바이오시밀러 사이의 DLS 분석에서 얻은 평균 분자량과 Rh 비교

결론

이 응용 자료는 Rituximab Innovator와 두 개의 바이오시밀러를 분석하기 위한 전하 변이체 분석과 응집체 분석의 두 가지 분석 워크플로를 보여줍니다. 두 워크플로 모두에서 RT와 면적이 우수한 재현성을 보였습니다. 전하 변이체 분석에서 바이오시밀러 2 시료는 라이신 절단 변이체로 여겨지는 염기성 변이체의 비율이 높은 뚜렷한 차이를 나타냈습니다. 응집체 분석에서 바이오시밀러 2는 Innovator와 비교해 약간 다른 HMWS 프로파일을 나타냈습니다. 약물 시료의 전하 변이체와 응집체 특성의 관점에서 바이오시밀러 1이 Innovator와 더 많은 유사성을 보여주었습니다. 이러한 결과는 또한 Rituximab 특성 분석에 관한 공개 데이터와도 일치합니다.⁵ 이는 애질런트 전하 변이체 및 응집 분석 워크플로가 바이오시밀러 비교 연구에 신뢰성을 제공할 수 있음을 나타냅니다. Agilent Openlab CDS 소프트웨어는 배치 모드에서 데이터 검토를 간소화하여 분석 효율을 높이도록 Peak Explorer와 같은 기능을 제공합니다.

참고문헌

1. Dübel, S.; Reichert, J. M. Handbook of Therapeutic Antibodies, second edition.
2. U.S. Public Health Service Act section 351(k).
3. ICH Harmonized Tripartite Guideline Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B.
4. Suresh Babu, C. V. Charge Heterogeneity Analysis of Rituximab Innovator and Biosimilar mAbs *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5557EN.
5. Lee, K. H. et al. Analytical Similarity Assessment of Rituximab Biosimilar CT-P10 to Reference Medicinal Product. *Mabs* 2018, 10(3), 380–396.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 10월 28일, 한국에서 인쇄
5994-1496KO
DE.089722222

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