

# 고분해능 LC/MS를 이용한 두 가지 Rituximab 바이오시밀러의 Intact 질량, Subunit 질량, 유리 글리칸 비교 연구

## 저자

Brian Liao  
Agilent Technologies, Inc.

## 서론

최근 몇 년 동안 수익성이 높은 여러 innovator 생물약품의 특허권 보호 기한이 만료됨에 따라, 단일 클론 항체(mAb) 바이오시밀러의 개발 및 제조가 급증했습니다. 바이오시밀러에 대한 글로벌 규제 기준이 존재하지는 않지만, 업계에서는 바이오시밀러에 대해 다음과 같이 합의합니다. (i) innovator 생물약품과 높은 생물리학적 및 생화학적 유사성을 가지며, (ii) 순도, 효능, 안전성 면에서 거의 동등합니다.<sup>1</sup> 미국 FDA와 같은 규제 기관은 범위가 상대적으로 좁은 생체 내(*in vivo*) 연구의 경우 고품질 분석 데이터로 평가해야 할 필요가 있다고 밝혔으며,<sup>2</sup> 포괄적인 고분해능 특성 규명 분석의 중요성에 대해 강조했습니다.

mAb는 매우 복잡한 특성으로 인해 저분자 약물과 달리 특성 규명이 어렵습니다. 따라서 바이오약품 기업들은 일련의 중요 품질 속성(CQA)을 지정하여 모니터링하며, 이러한 CQA는 생물약품의 전반적인 품질, 안전성 또는 효능에 크게 영향을 줍니다. 동일한 공장에서 여러 치료제가 생산될 수 있으므로 한 CQA는 mAb의 ID에 해당하며, 이는 가장 효율적인 원형 단백질(intact protein) 질량 분석법을 통해 확인할 수 있습니다. 또한 비인간 글리칸 모티프(motifs)가 급성 또는 만성 알레르기 반응을 일으킬 수 있기 때문에 당화 역시 CQA의 하나로 인식되고 있습니다.<sup>3,4</sup> 이 외에도 mAb는 배양된 세포에 의해 생산되는데 글리칸은 배양 조건의 변화에 매우 민감하여 의도치 않은 제조 공정의 변화를 나타내는 유용한 지표가 되기도 합니다.

이 응용 자료에서는 두 가지 Rituximab 바이오시밀러의 Intact 질량, Subunit 질량, 당화를 innovator 의약품과 비교 분석합니다. 당사는 다음 네 가지 서로 다른 워크플로를 이용하여 분석을 수행했습니다. (i) Intact mAb, (ii) 환원된 subunits, (iii) IdeS 분해된 subunits, (iv) 유리 글리칸. 이러한 워크플로의 시료 전처리 시간은 서로 다르며, 시료 전처리가 전혀 필요하지 않거나(Intact mAb) 3시간 정도 소요되는 경우(유리 글리칸)도 있습니다. 더 많은 시료 전처리 시간이 필요한 워크플로의 장점은 저농도 글리칸 성분에 대해 더 높은 감도를 보이며, 기법에 대한 분석 능력을 향상시킵니다.

이 응용 자료에서는 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템과 Agilent 6545XT Q-TOF로 구성된 애질런트의 고분해능 LC/MS가 이러한 분석 수행에 적합함을 보여줍니다. 또한 유리 글리칸 워크플로의 자동 시료 전처리에 AssayMAP Bravo를 사용함으로써, 인위적 오류와 시료 전처리에 소요되는 시간을 줄였습니다. 표지된 글리칸은 작은 시료 부피에서 고농도로 용리되어, 장시간의 건조 단계가 필요하지 않습니다.

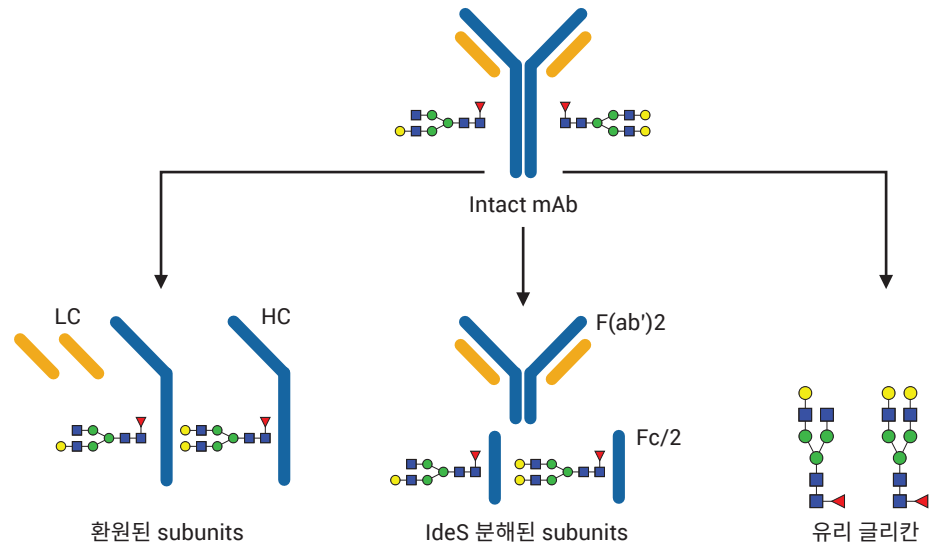


그림 1. 이 응용 자료에서 수행한 워크플로



Agilent AssayMap Bravo



GlykoPrep Rapid N-Glycan kit (InstantPC)



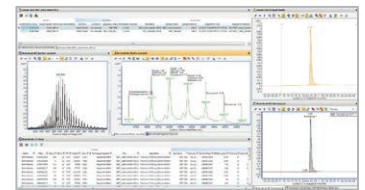
Agilent PLRP-S 또는 AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼



Agilent 1290 Infinity II LC



Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF



Agilent MassHunter BioConfirm 10.0

그림 2. 이 응용 자료에서 사용된 장비 및 소모품

## 실험

### 재료 및 분석법

Rituximab의 바이오시밀러와 innovator 의약품은 싱가포르 현지 대리점에서 구입했습니다. Dithiothreitol(DTT), guanidine HCl, 포름산, 포름산암모늄, 아세트니트릴, 중탄산암모늄, Tris-HCl 은 Sigma에서 구입했습니다. IdeS 프로테아제는 Genovis에서 구입했습니다. 모든 이동상은 LC/MS 등급입니다.

### 기기

- Agilent AssayMAP Bravo 시스템 (G5542A) – 유리 글리칸 실험에만 사용
- Agilent 1290 Infinity II LC 시스템 구성:
  - Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
  - Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
  - Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)
  - Agilent 1260 Infinity 형광 검출기 (G1321B) – 유리 글리칸 실험에만 사용
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

### 시료 전처리

Intact mAb 실험에서는 추가 시료 전처리 없이 10mg/mL의 시료를 분석했습니다.

환원된 mAb 중사슬 subunit 실험에서는, 4M guanidine HCl를 함유한 새로 제조된 50mM 중탄산암모늄(pH 8.0)을 이용하여 시료를 1mg/mL로 희석했습니다. 시료는 56°C에서 60분간 가열한 후, 실온으로 냉각시켜 분석합니다.

IdeS 분해된 Fc/2 subunit 실험에서는 IdeS 프로테아제를 50mM Tris-HCl(pH 7.5)에서 2단위/μL의 농도로 재용해합니다. mAb 시료는 Tris-HCl 완충액에서 2mg/mL로 희석했습니다. 그런 다음 5μL의 IdeS 프로테아제를 5μL의 각 mAb 시료에 추가하고, 30°C에서 30분간 배양한 후, 실온으로 냉각시켜 분석합니다.

유리 글리칸 실험에서는 키트와 함께 제공된 지침에 따라 AssayMap Bravo 액체 처리 시스템(G5542A)과 Agilent GlykoPrep Rapid N-Glycan kit(GPPNG-PC)를 결합하여 사용했습니다. 각 mAb는 50μg의 시료로 반복 처리되었습니다. 최종 클린업 단계가 끝난 후, 각 시료 내의 표지된 글리칸은 50μL의 부피에서 용리되었습니다. 피크 모양을 개선하기 위해, 분석 전에 각 시료의 표지된 글리칸 30μL에 70μL의 아세트니트릴을 추가했습니다. 각 시료는 3회 반복 주입되었습니다.

### LC/MS 분석

Agilent PLRP-S 컬럼(2.1 × 50mm, 1000, 5μm)으로 Intact mAb, 환원된 mAb subunits, IdeS 분해된 subunits에 대한 크로마토그래피 분리를 수행했습니다. 각 크로마토그래피 실험에서 첫 1분 동안 흐름이 폐기물에 유입되도록 합니다. Intact mAb의 경우 시료 피크는 2.4분에 용리되고, 환원된 mAb subunits의 경우 경사슬은 1.8분, 중사슬은 2.1분에 용리되며 IdeS 분해된 subunits의 경우 Fc/2는 1.3분, F(ab')2는 2.1분에 용리되었습니다.

Agilent AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼 (2.1 × 150mm, 1.8μm)으로 InstantPC 표지된 글리칸에 대한 크로마토그래피 분리를 수행했습니다. 형광 검출기는 Ex/Em = 285nm/345nm, PMT gain = 10으로 설정되었습니다. 표 1과 2에는 사용한 LC/MS 파라미터가 정리되어 있습니다. 이온화원 내 글리칸 조각화를 줄이기 위해, 분석 전에 "autotune" 옵션을 사용하여 SWARM autotune을 수행했습니다. 글리칸의 상대 정량은 형광 크로마토그램의 피크 면적 비고를 통해 수행했습니다.

표 1. 크로마토그래피 파라미터

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템				
시료 유형	Intact mAb	환원된 mAb subunits(HC 및 LC)	IdeS mAb subunits(Fc/2 및 F(ab')2)	유리 글리칸
컬럼	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 1000 Å, 5 μm (p/n PL1912-1502)	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 1000 Å, 5 μm (p/n PL1912-1502)	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 1000 Å, 5 μm (p/n PL1912-1502)	Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (p/n 859700-913)
용매 A	0.1% 포름산 함유 탈이온수	0.1% 포름산 함유 탈이온수	0.1% 포름산 함유 탈이온수	50mM 포름산암모늄, pH 4.5
용매 B	0.1% 아세트니트릴 함유 포름산	0.1% 아세트니트릴 함유 포름산	0.1% 아세트니트릴 함유 포름산	아세트니트릴
그라디언트	0~1분, 0~20% B 1~3분, 20~50% B 3~4분, 50~70% B	0~5분, 25~45% B 5~6분, 45~60% B 6~7분, 60% B	0~1분, 25% B 1~6.5분, 25~60% B 6.5~7.5분, 60% B 7.5~7.6분, 60~25% B 7.6~8.5분, 25% B	0~2분, 25~30% B 2~15.5분, 30~37% B 15.5~17분, 37~80% B 17~20분, 80% B 20~21분, 80~25% B 21~30분, 25% B
컬럼 온도	60°C	60°C	60°C	40°C
유속	0.5mL/분	0.8mL/분	0.5mL/분	15.5~20분 0.25mL/분 기타: 0.4mL/분
주입 부피	0.5μL	1μL	1μL	2μL

표 2. 질량 분석 파라미터

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템				
시료 유형	Intact mAb	환원된 mAb subunits(HC 및 LC)	IdeS mAb subunits(Fc/2 및 F(ab)2)	유리 글리칸
이온화원	Agilent Dual Jet Stream			
가스 온도	350°C	350°C	350°C	150°C
가스 유속	12L/분	12L/분	12L/분	9L/분
Nebulizer	60psig	35psig	35psig	35psig
Sheath 가스 온도	400°C	350°C	350°C	300°C
Sheath 가스 유속	11L/분	11L/분	11L/분	10L/분
Vcap	5.5kV	4kV	4kV	3kV
노즐 전압	2kV	2kV	2kV	500V
Fragmentor	380V	180V	180V	120V
스키머	140V	65V	65V	65V
질량 범위	100~10,000m/z	100~3,200m/z	800~5,000m/z	300~1,700m/z
수집 속도	1스펙트럼/초	1스펙트럼/초	1스펙트럼/초	2스펙트럼/초
참조 질량	922.0098			
수집 모드	양이온, 확장된(10,000m/z) 질량 범위	양이온, 표준(3,200m/z) 질량 범위, HiRes(4Ghz)	양이온, 확장된(10,000m/z) 질량 범위	양이온, 낮은 질량 범위, HiRes(4Ghz)

### 데이터 처리

데이터 분석에는 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어를 사용했습니다. 유리 글리칸의 경우, MassHunter Qualitative Analysis 버전 10.0을 사용해 형광 크로마토그램을 추출한 뒤, 애질런트 개인 화합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL) 글리칸 데이터베이스를 사용해 글리칸 조성을 확인했습니다.<sup>5</sup>

Intact mAb, 환원된 mAb subunit, IdeS 분해된 subunit 분석에서는 질량 단계가 1Da인 Maximum Entropy deconvolution 이 사용되었습니다.

유리 글리칸의 경우, 허용 오차를 10ppm 으로 설정했습니다. 허용된 이온 종은 H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 및 H<sup>-</sup>이며, 전하 상태 범위는 1~3입니다. 소프트웨어에서 InstantPC 태그 옵션이 선택되었습니다.

### 결과 및 토의

Intact mAb의 고분해능 질량 분석은 최소한의 시료 전처리로 수행 가능하며, mAb와 mAb의 주요 글리코형 특성을 빠르게 평가할 수 있습니다. 대부분의 치료용

mAb는 각 중사슬에 단일 당화 부위를 포함하고 있으며, 생성된 글리코형은 두 개 글리칸의 서로 다른 조합을 나타냅니다. 또한 세포 배양 과정에서 Carboxypeptidase D의 활성 정도에 따라 중사슬 C-말단의 라이신 잔기는 다양한 수준으로 잘릴 수 있습니다.<sup>6</sup>

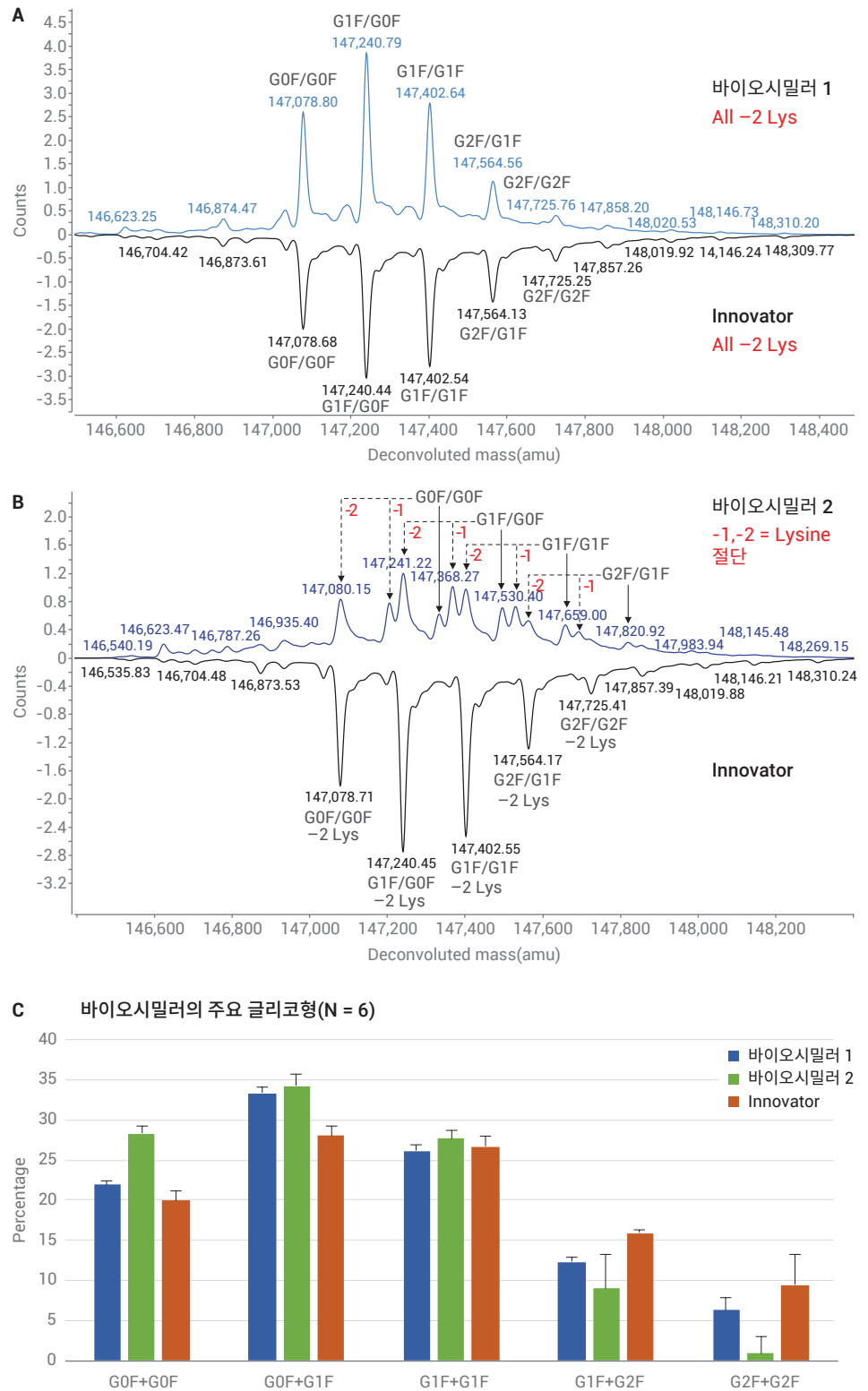
표 3. Deconvolution 설정

Agilent MassHunter BioConfirm B10.0 설정			
시료 유형	Intact mAb	환원된 mAb subunits (HC 및 LC)	IdeS mAb subunits (Fc/2 및 F(ab)2)
Deconvolution	Maximum entropy		
Deconvolution m/z 범위	2,000~6,500	800~2,600	1,000~2,600
Deconvolution 질량 범위	140~160kDa	20~60kDa	21~28kDa
Deconvolution 베이스라인 제거	7.0	7.0	6.0
매치 허용 오차	20ppm	20ppm	20ppm

그림 3A와 3B는 각 바이오시밀러 mAb의 Innovator mAb 대비 deconvoluted 질량 스펙트럼을 보여줍니다. 바이오시밀러와 Innovator mAb의 특성은 정확한 질량의 비교를 통해 높은 신뢰도로 확인할 수 있었습니다. G1F+G0F-2 Lys 글리코형을 기준으로 비교할 경우, 바이오시밀러 1은 7.18ppm의 오차(147,240.79Da), 바이오시밀러 2는 9.98ppm의 오차(147,241.22Da), Innovator는 4.78ppm의 오차(147,240.44Da)로 확인할 수 있었습니다. 표 4는 2\*G0F-2 Lys를 제외한 바이오시밀러 2의 다른 모든 글리코형이 <10ppm의 오차를 나타냅니다.

그림 3A는 바이오시밀러 1이 바이오시밀러 2보다 Innovator mAb와 더 유사하다는 것을 보여줍니다. 그림 3B에서 바이오시밀러 2의 스펙트럼은 다양한 수준의 C-말단 라이신 절단이 존재하기 때문에 더 복잡하며, 이는 각 -128.175Da의 평균 질량 이동을 반영하여, 각 글리코형이 1개의 피크가 아닌 3개의 피크로 표현됩니다. 바이오시밀러 2에서 다양한 수준의 라이신 절단은 다른 연구의 펩타이드 맵핑 실험에서 확인된 바 있습니다.<sup>7</sup>

BioConfirm 10.0 소프트웨어는 사용자가 선택한 글리코형에 대해 상대 정량을 수행할 수 있도록 합니다. 그림 3C는 N = 6의 관찰 결과에서 얻은 각 글리코형의 평균 상대적 양을 요약해 보여줍니다. 바이오시밀러 2는 Innovator에 비해 8.3 ± 1.5% 더 많은 G0F+G0F, 6.2 ± 1.9% 더 많은 G0F+G1F, 8.6 ± 4.3% 더 적은 G2F+G2F 글리코형을 가지며, 글리칸 함량에서 Innovator와 상당한 차이를 보였습니다. 이에 반해, 바이오시밀러 1의 글리코형은 Innovator와 더 유사했으며, 주요 차이는 5.3 ± 1.5% 더 많은 G0F+G1F였습니다.



**그림 3.** 주요 바이오시밀러 글리코형을 보여주는 Deconvoluted Intact mAb 스펙트럼. (A) Innovator와 바이오시밀러 1의 비교. 모든 글리코형은 2개의 C-말단 라이신 잔기 소실을 포함(-2 Lys). (B) Innovator와 바이오시밀러 2의 비교. 바이오시밀러 2는 다양한 수준의 라이신 소실을 포함. (C) 글리코형 통계 요약. 오차 막대는 표준 편차를 나타냄(N = 6).

subunit 분석을 통해 시료의 크기와 복잡성이 낮춰질 수 있으며, 저농도의 글리칸 검출을 용이하게 합니다. Subunits은 DTT 및 *tris*(2-carboxyethyl)phosphine(TCEP)와 같은 시약을 사용해 이황화 결합을 환원하거나 IdeS 프로테아제를 사용한 효소 분해를 통해 생성될 수 있습니다. 그림 4는 DTT로 이황화 결합을 완전히 환원시켜 생성된 바이오시밀러 중사슬(~50kDa)의 deconvoluted 질량 스펙트럼을 보여줍니다. 그림 5는 IdeS로 시료를 분해하여 생성된 Fc/2 subunits(~25kDa)를 보여줍니다.

표 4. BioConfirm으로 매칭시킨 바이오시밀러 2의 글리코형

바이오시밀러 2 글리코형				
질량	면적(MS)	%Quant (면적)	Diff (Bio, ppm)	예측된 변형
147,080.15	25,527,902	14.01	17.34	2*G0F (NGA2F)(1,445.3580) + 2*Lys-loss(-128.1750)
147,205.55	770,401	6.99	-1.53	2*G0F (NGA2F)(1,445.3580) + 1*Lys-loss(-128.1750)
147,241.22	32,853,404	15.98	9.98	1*G1F(1,607.5013) + 1*G0F (NGA2F)(1,445.3580) + 2*Lys-loss(-128.1750)
147,333.70	7,733,970	5.52	-1.71	2*G0F (NGA2F)(1,445.3580)
147,368.27	25,443,047	9.2	2.35	1*G1F(1,607.5013) + 1*G0F (NGA2F)(1,445.3580) + 1*Lys-loss(-128.1750)
147,402.38	28,448,038	14.37	3.31	2*G1F(1,607.5013) + 2*Lys-loss(-128.1750)
147,496.45	96,402	6.55	2.38	1*G1F(1,607.5013) + 1*G0F (NGA2F)(1,445.3580)
147,530.40	28,606,318	6.83	2.29	2*G1F(1,607.5013) + 1*Lys-loss(-128.1750)
147,563.14	23,128,142	9.49	-6.05	1*G2F (NA2F)(1,769.6445) + 1*G1F(1,607.5013) + 2*Lys-loss(-128.1750)
147,659.00	19,354,473	4.69	5.18	2*G1F(1,607.5013)
147,692.91	47,347	3.79	4.73	1*G2F (NA2F)(1,769.6445) + 1*G1F(1,607.5013) + 1*Lys-loss(-128.1750)
147,820.92	14,880,698	2.6	3.63	1*G2F (NA2F)(1,769.6445) + 1*G1F(1,607.5013)

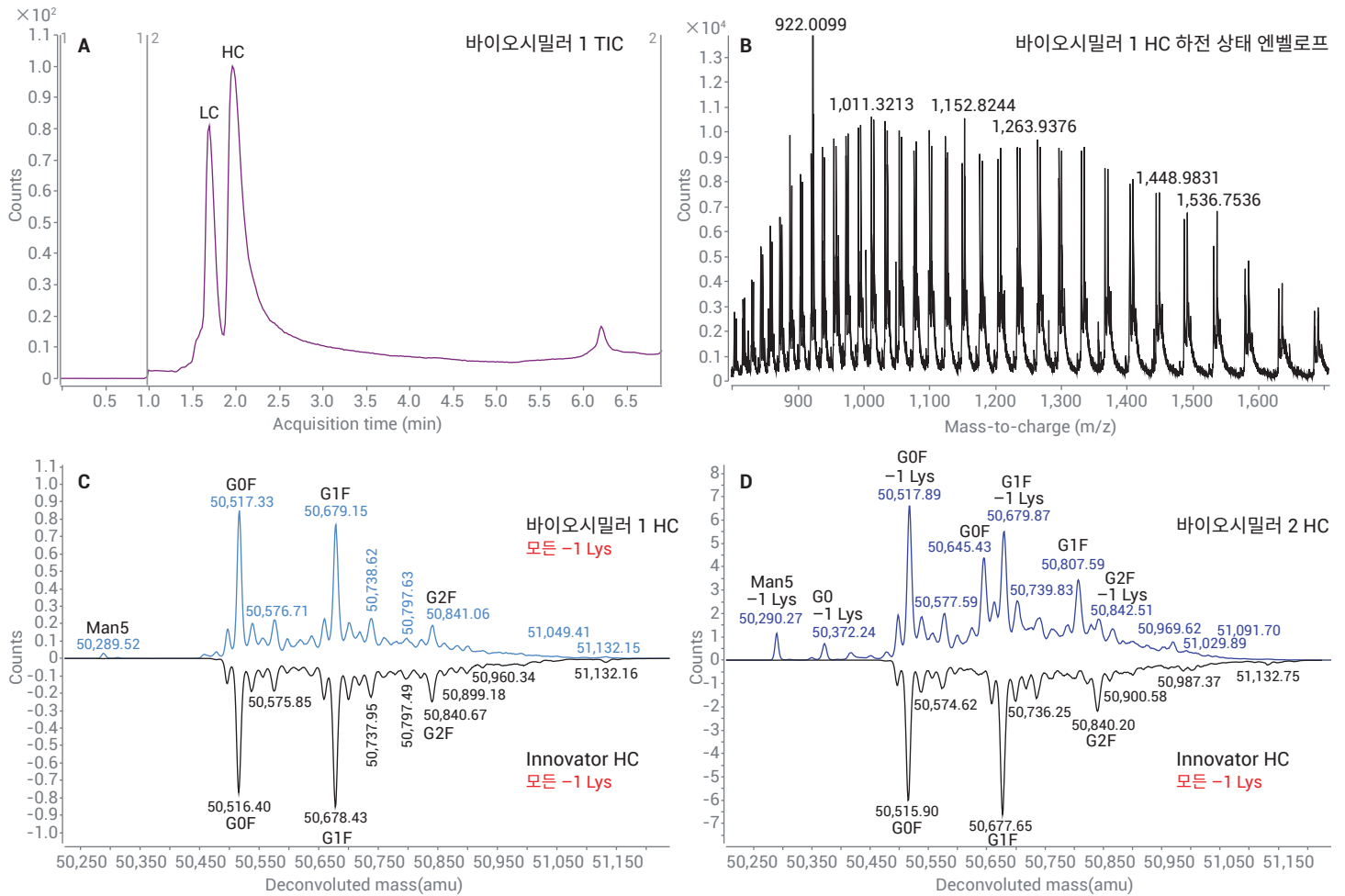
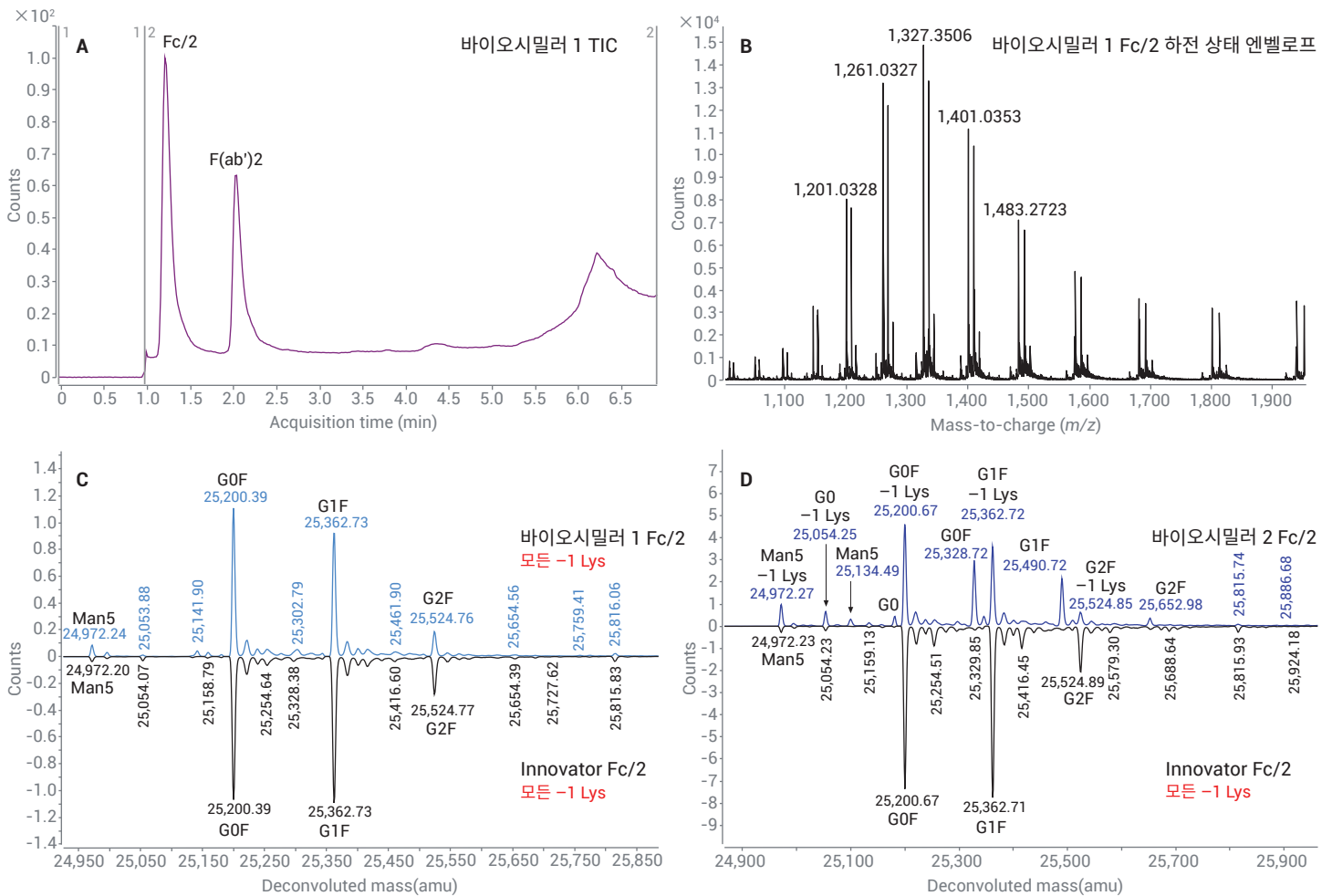


그림 4. Deconvoluted 환원된 mAb 중사슬 subunits의 질량 스펙트럼. (A) 바이오시밀러 1 내의 경사슬 및 중사슬 분리를 보여주는 TIC 크로마토그램. (B) 바이오시밀러 1 중사슬 피크의 하전 상태 엔벨로프. 참고: 922.0099m/z는 참조 질량임. (C) Innovator와 바이오시밀러 1의 중사슬 비교. 모든 글리코형은 하나의 C-말단 라이신 잔기 소실을 포함(-1Lys). (D) Innovator와 바이오시밀러 2의 중사슬 비교. 바이오시밀러 2는 다양한 수준의 라이신 소실을 포함.

그림 4에서 보여준 환원된 중사슬(HC) subunits 수준에서 Man5와 G0과 같은 보다 낮은 농도의 글리칸을 관찰할 수 있었습니다. 이는 Man5가 치료용 mAbs의 청소율(clearance)을 향상시키는 것으로 나타났으며,<sup>8</sup> 중요한 품질 속성으로 알려졌기 때문에 매우 중요합니다. Innovator와 비교했을 때, 그림 4C는 Man5가 바이오시밀러 1에서 증가했고, 그림 4D는 Man5와 G0이 바이오시밀러 2에서 모두 증가하는 것으로 보입니다.

IdeS 분해된 Fc/2 subunits은 환원된 HC subunits 크기의 약 절반으로 이에 대한 분석은 저농도 글리코형에 대해 더 뛰어난 감도를 제공합니다. 그림 5는 Innovator Fc/2 subunits 내에서 Man5를 검출할 수 있으며, 더 나아가 라이신 절단 없이도 subunits에서 Man5 및 G0와 같은 저농도의 바이오시밀러 2 글리코형을 명확하게 구분할 수 있는 것으로 보입니다.

고감도의 글리칸 분석은 PNGase-F 효소를 이용해 유리 글리칸을 형성한 다음 형광 염료로 표지하는 것으로 수행 가능합니다. 이 분석에는 집중적인 시료 전처리가 필요하며, 일반적으로 8~16시간이 소요되는 대량의 수동 작업이 필요합니다. 당사는 AssayMAP Bravo 액체 처리 시스템 및 Agilent GlykoPrep Rapid N-Glycan kit를 사용하여 자동화된 고처리량 워크플로를 개발하여, 시료 전처리 시간을 단 3시간으로 단축했습니다.<sup>9</sup>



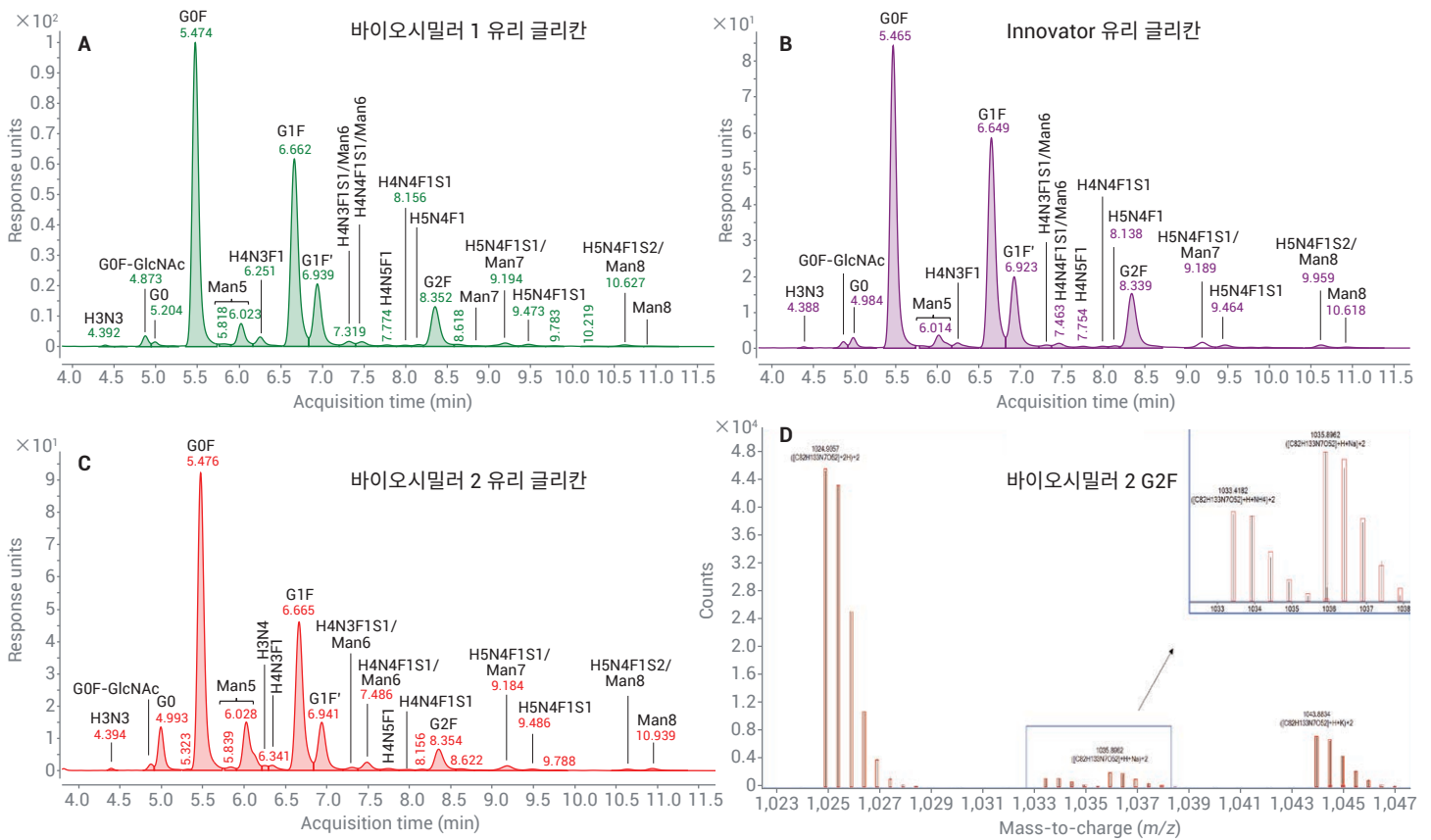
**그림 5.** IdeS 분해된 Fc/2 subunits의 deconvoluted 질량 스펙트럼. (A) 바이오시밀러 1 내의 Fc/2 및 F(ab')<sub>2</sub> 분리를 보여주는 TIC 크로마토그램. (B) 바이오시밀러 1 Fc/2 피크의 하전 상태 엔벨로프. (C) Innovator와 바이오시밀러 1의 Fc/2 비교. 모든 글리코형은 하나의 C-말단 라이신 잔기 소실을 포함(-1Lys). (D) Innovator와 바이오시밀러 2의 Fc/2 비교. 바이오시밀러 2는 다양한 수준의 라이신 소실을 포함.

이는 액체 처리 캐필러와 시료 반응 카트리지의 독특한 설계 덕분에 유리 글리칸을 매우 작은 부피로 용리할 수 있으며, 시간 소모적인 진공 건조 단계를 거칠 필요가 없습니다.

이 실험에서는 애질런트 특허 형광 염료 InstantPC를 사용하였으며, 이 염료는 독특한 화학반응을 사용했기 때문에 글리칸의 이온화 효율성을 크게 높이면서 결합에 소요되는 시간을 단축할 수 있습니다.<sup>9</sup>

그림 6은 AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼에서 분리된 바이오시밀러와 Innovator 글리칸의 대표적 형광 크로마토그램을 보여주며 표 3에는 관찰된 모든 글리칸이 나열되어 있습니다. BioConfirm 10.0은 accurate mass 스펙트럼을 사용해 글리칸의 조성을 확인한 다음 머무름 시간 상관관계를 통해 형광 피크에 주석을 추가했습니다. 그림 6D는 글리칸을 확인할 때 BioConfirm 10.0이 다중 하전  $H^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Na^+$  및  $K^+$  부가 이온에서

신호와 동위원소 모델을 매칭시켜, 주석의 신뢰도를 향상시켰음을 보여줍니다. 동시에 용리는 추출 질량 스펙트럼의 수동 검사를 통해 확인되었습니다. 이 분석에서는 바이오시밀러 2에서 눈에 띄게 증가한 G0과 Man5 글리칸이 확인된(그림 6B) 반면, G2F 글리칸은 Innovator에 비해 적은 것으로 나타났습니다. 또한 바이오시밀러 2에는 바이오시밀러 1이나 Innovator에서는 검출되지 않은 아푸코실화된 글리칸 H4N3 및 H4N4가 상당량 포함되어 있었습니다 (표 5).



**그림 6.** (A~C) 바이오시밀러 및 Innovator 시료에서 분리된 InstantPC 표지 글리칸 형광 크로마토그램. (D) 바이오시밀러 2 내 G2F 글리칸(RT = 8.35분)의 Centroid 질량 스펙트럼. 빨간색 사각형은 각 부가 이온의 예상되는 동위원소 모델을 나타냄. 참고: BioConfirm 10.0이  $[m+2H]^{2+}$ ,  $[m+H+NH_4]^{2+}$ ,  $[m+H+Na]^{2+}$  및  $[m+H+K]^{2+}$ 을 포함한 다중 부가물과 성공적으로 매칭됨.



그림 7은 환원된 중사슬 subunits, IdeS 분해된 Fc/2 subunits, 유리 글리칸의 수준에서 추정된 선택 글리칸의 상대적 양을 보여줍니다. 일반적으로 시료 전처리에 더 많은 시간을 들이면 분석 감도를 향상시킬 수는 있으나, 단백질 구조가 점점 분해되어 정보 손실이 발생합니다. 예를 들어, Man5와 G0 글리칸은 Intact mAb 분석에서는 검출되지 않았으나(그림 3), subunit 및 유리 글리칸 분석에서는 검출 및 정량되었으며, 그 정확도는 점점 증가합니다. 이는 단백질 또는 시료 완충액에서 매트릭스 효과를 없애므로 시료 복잡성이 감소하면서, 저농도 글리코형 또는 유리 글리칸에 대해 더 높은 감도를 나타냅니다.

이 응용 자료의 데이터를 종합해보면, subunit 분석에서 저농도 글리코형에 대한 감도 수준은 Intact mAb와 유리 글리칸 분석 사이에 있으며, 이 감도는 Innovator와 매우 다른 글리칸 조성을 가진 바이오시밀러를 구분하기에 충분합니다. 그러나 포괄적인 글리칸 프로파일링을 위해서는 저농도 글리칸의 미세한 차이를 정확하게 정량할 수 있는 유리 글리칸 분석이 필요합니다.

표 5. 유리 글리칸의 조성 및 상대적 양(N = 6).

글리칸	RT(분)	바이오시밀러 1		바이오시밀러 2		Innovator	
		평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
H3N3	4.392	0.15	0.04	0.25	0.07	0.10	0.06
G0F-GlcNAc	4.874	1.25	0.04	0.72	0.05	0.66	0.03
G0	4.995	0.62	0.05	5.58	0.19	1.23	0.04
H4N3	5.324	-	-	0.14	0.02	-	-
G0F	5.479	40.47	0.69	41.03	0.82	37.49	0.61
Man5	5.845	0.44	0.01	0.55	0.09	0.29	0.02
Man5	6.032	3.52	0.03	8.64	0.06	2.21	0.04
H4N3F1	6.255	1.68	0.01	0.52	0.04	1.01	0.06
H4N4	6.347	-	-	0.87	0.11	-	-
G1F	6.671	28.72	0.22	23.40	0.41	30.23	0.19
G1F'	6.946	10.38	0.14	8.18	0.11	11.28	0.05
H4N3F1S1 Man6	7.315	0.92	0.02	0.59	0.08	0.51	0.02
H4N4F1S1/Man6	7.495	0.94	0.02	1.58	0.10	0.94	0.03
H4N5F1/H5N4	7.754	0.30	0.01	0.45	0.09	0.35	0.03
H4N4F1S1	7.994	0.22	0.01	0.22	0.06	0.30	0.03
H5N4F1	8.167	0.28	0.01	0.19	0.09	-	-
G2F	8.363	7.29	0.20	4.10	0.09	9.84	0.15
Man7	8.854	0.14	0.01	0.11	0.05	0.05	0.07
H5N4F1S1/Man7	9.194	0.89	0.03	1.19	0.09	1.19	0.05
H5N4F1S1	9.495	0.50	0.02	0.37	0.06	0.67	0.03
H5N4F1S2/Man8	10.649	0.41	0.03	0.32	0.03	0.67	0.08
Man8	10.951	0.09	0.01	0.51	0.03	0.26	0.01

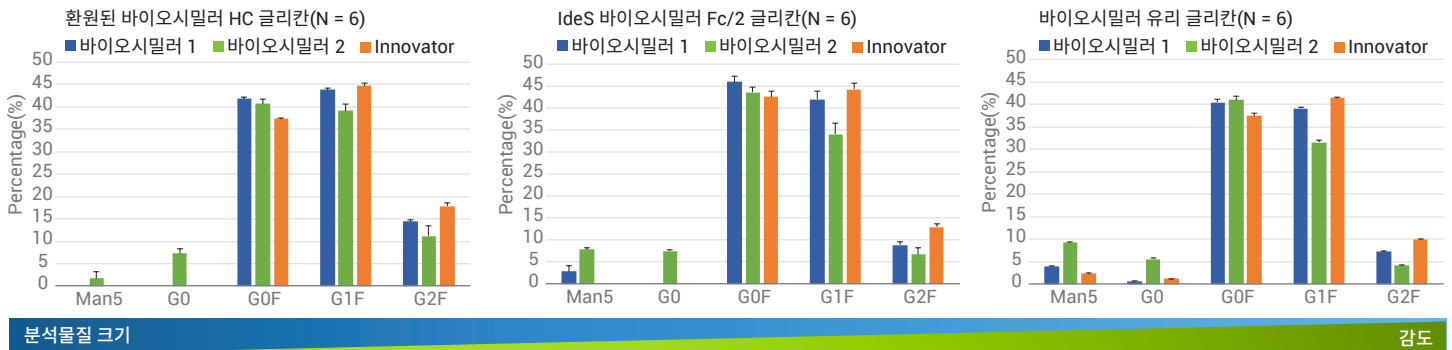


그림 7. 환원된 HC subunits, IdeS 분해된 Fc/2 subunits, 유리 글리칸의 분석에서 추정된 선택 글리칸의 상대적 양. 오차 막대는 표준 편차를 나타냄(N = 6).

## 결론

본 연구에서는 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템, 고분해능 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 및 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어를 사용해 두 가지 바이오시밀러와 한 가지 Innovator mAb에 대해 포괄적인 분석을 수행했습니다. Agilent AssayMap Bravo 액체 처리 기술을 사용해 집중화 시료 전처리 단계를 자동화하고 신속하게 처리하여 생산성과 재현성을 높였습니다.

애질런트는 바이오의약품 생산의 여러 다른 단계에 적합한 네 가지 분석 방식을 구현했습니다.

- Intact mAb 접근법은 시료 내에 존재하는 mAb 특성과 주요 글리코형을 빠르게 평가할 수 있으며, 이는 바이오의약품 연구/개발 과정에서 CHO 세포 클론의 로트 릴리스와 스크리닝에 적합합니다. 이 접근법을 사용하면 시료 전처리가 전혀 필요하지 않으며, 서로 다른 당화 또는 라이신 절단 중사슬 쌍으로 인해 생성된 글리코형의 상대 정량과 같은 독특한 고차원 정보를 얻을 수 있습니다.
- 환원된 HC와 IdeS 분해된 subunit 접근법은 Intact mAb와 유리 글리칸 분석 사이 중간 정도의 감도를 제공하며, 제조 과정에서 일상적인 바이오리액터 산물의 at-line 모니터링에 적합합니다.<sup>10</sup> 보다 높은 감도는 Man5와 같은 저농도 CQA의 검출과 정량을 가능케 합니다.

- 유리 글리칸 접근법은 가장 높은 수준의 감도를 제공하며, 연구/개발의 치료제 개발에 적합합니다. 이 분석법은 형광 크로마토그래피에 의존하므로, 글리칸의 상대적 정량 면에서는 네 가지 접근 방식에서 가장 신뢰성 있는 방법입니다. InstantPC는 2-AB와 같은 전통적인 표지보다 훨씬 밝으며, 1:1의 화학양으로 글리칸과 공유 결합되어 당화의 미세한 차이까지도 검출 및 정량할 수 있습니다.

애질런트는 두 가지 바이오시밀러와 Innovator 사이에서 당화 패턴(즉, G0F, G1F 및 G2F의 상대적 발현) 차이를 검출했으며, 사용된 네 가지 분석법은 모두 일관된 결과를 보였습니다. 이는 바이오시밀러 개발에서 애질런트의 LC/MS 기술의 견고성과 다용도성을 보여줍니다.

## 참고문헌

1. Kirchoff, C. F. *et al.* Biosimilars: Key regulatory Considerations and Similarity Assessment Tools. *Biotechnol. Bioeng.* **2017**, *114*, 2696–2705.
2. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product - Guidance for Industry, *United States Food and Drug Administration* **2015**.
3. Chung, C. H. *et al.* Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose-alpha-1,3-Galactose. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1109–1117.

4. Tangvoranuntakul, P. *et al.* Human uptake and Incorporation of an Immunogenic Nonhuman Dietary Sialic Acid. *PNAS* **2003**, *100*, 12045–12050.
5. A Comprehensive Approach for Monoclonal Antibody N-linked Glycan Analysis from Sample Preparation to Data Analysis. *Agilent Technologies*, publication number 5991-8550EN.
6. Hu, Z. *et al.* Carboxypeptidase D is the Only Enzyme Responsible for Antibody C-Terminal Lysine Cleavage in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 2100–2106.
7. LC/MS/MS Peptide Mapping Comparison of Innovator and Biosimilars Rituximab. *Agilent Technologies*, publication number 5994-1495EN.
8. Goetze, A. M. *et al.* High-Mannose glycans on the Fc Region of Therapeutic IgG antibodies Increase Serum Clearance in Humans. *Glycobiology* **2011**, *21*, 949–959.
9. Streamlined Workflows for N-Glycan Analysis of Biotherapeutics Using Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC and 2-AB Express Sample Preparation with LC/FLD/MS, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1348EN, **2019**.
10. Liu, P. *et al.* Subunit Mass Analysis for Monitoring Multiple Attributes of Monoclonal Antibodies. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, *33*, 31–40.

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

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020  
2020년 2월 14일, 한국에서 인쇄  
5994-1653KO  
DE.0897222222

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