응용 자료

바이오의약품 및
바이오시밀러

Rituximab의 Innovator 및 바이오시밀러의 LC/MS/MS 펩타이드 맵핑 비교

저자

Suresh Babu C.V.
Agilent Technologies, Inc.

개요

바이오시밀러의 개발 및 제조를 위해서는 innovator 바이오의약품과의 비교 연구가 필요합니다. 본 응용 자료에서는 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템을 이용해 단일 클론 항체(mAb) 생물의약품의 펩타이드 맵핑 분석으로 rituximab innovator와 2 가지 바이오시밀러 간의 유사성 및 차이점을 조사하였습니다. 트립신 분해 mAb의 시퀀스 커버리지 맵은 >97%였습니다. 액체 크로마토그래피/질량 분석(LC/MS) 펩타이드 분리 프로파일은 innovator와 바이오시밀러 mAb 간의 펩타이드 존재비 차이를 보여주어, 탈아미드화 및 산화와 같은 번역 후 변형(post-translational modification, PTM)의 서로 다른 정도를 밝힙니다.

서론

mAb 기반 치료제의 생산은 빠르게 성장하고 있습니다[1]. 약 20년 전에 등장한 innovator mAb에 적용되는 특허가 곧 만료되고, 비용 효율적인 바이오시밀러 개발의 새로운 기회를 열게 될 것입니다. 바이오시밀러는 참조 약품과 유사하나, 제조 과정에서의 불가피한 차이로 인해 완전히 동일하지는 않습니다. 이들 제품의 생산 과정은 매우 복잡하며, 약간의 차이도 제품의 가변성 및 고유한 분자 이질성으로 이어질 수 있습니다. 규제 기관은 바이오시밀러에 대한 특성 규명을 통해 제품이 안전성, 순도, 효능 면에서 innovator 제품과 유사함을 증명하도록 요구합니다. 바이오시밀러 제품 개발의 목표는 innovator와 바이오시밀러 약물 간의 유사성과 차이점을 밝혀내는 것입니다. 분석 비교는 생물학적 유사성을 보여주기 위한 기본 요구 사항입니다.

생물의약품의 주요 품질 속성(CQA)은 약품의 효능과 안전성을 정의합니다. 글리코실화, 산화 및 탈아미드화 변이체 등과 같은 PTM은 생물학적 기능에 큰 영향을 줄 수 있는 CQA의 일종입니다. 바이오의약품 업계에서 LC/MS 기반의 펩타이드 맵핑은 PTM 모니터링과 같은 단백질 식별을 위한 주요 도구입니다. 분리능이 높고 신뢰성 있는 크로마토그래피 분리와 accurate mass 측정은 펩타이드 맵핑 실험의 성공에 필수적입니다.

본 연구에서는 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 사용해 rituximab innovator와 2가지 바이오시밀러 mAb 펩타이드 맵핑을 수행하였습니다 (그림 1). 중사슬, 경사슬 및 원형(intact) mAb의 시퀀스 유사성 백분율을 비교하여 아미노산 커버리지를 측정하였습니다. 이 연구 결과는 애질런트의 펩타이드 맵핑 워크플로가 탈아미드화 및 산화와 같은 주요 PTM을 모니터링하고 식별하는 데 적합하다는 것을 보여줍니다.

그림 1. 애질런트 펩타이드 맵핑 워크플로

실험

재료

Innovator 및 바이오시밀러 단일 클론 항체는 현지 대리점(싱가포르)에서 구입하였으며, 제조업체의 지침에 따라 보관하였습니다. Trizma base, guanidine-hydrochloride, *tris*(2-carboxyethyl) phosphine(TCEP), iodoacetamide(IAA), 포름산, trifluoroacetic acid 및 LC/MS 등급 용매는 Sigma-Aldrich에서 구입했습니다. 고품질 시퀀스 등급 트립신은 Agilent Technologies, Inc로부터 받았습니다.

시료 전처리: 트립신 분해

Innovator 및 바이오시밀러 mAb는 환원/알킬화, 그리고 트립신 분해를 거친 뒤, Agilent AssayMAP Bravo 액체 처리 플랫폼을 이용해 탈염하였습니다. 요약하자면, mAb(10µg/µL)를 포함한 샘플 플레이트는 변성 완충제(8M guanidine-HCl, 5mM TCEP 및 150mM Tris, pH 8) 내에서 재용해되고, 60°C에서 60분간 인큐베이션 과정을 거쳤습니다. 이황화 결합의 변성과 환원 후, 133mM의 iodoacetamide를 첨가하여 유리 cysteine의 알킬화를 수행하였습니다(실온에서 40분간, 차광). Guanidine-HCl 농도는 줄어들었으며, 용액의 pH는 트립신 분해 전에 150mM의 Tris-HCl을 이용해 pH를 7~8로 조절하였습니다. 트립신 분해(20:1, 단백질: 단백질 분해효소 w/w)는 37°C에서 밤새 수행하였습니다. 추후 시료를 AssayMAP 시약 전달 유틸리티를 이용해 0.1% 포름산으로 산성화해 트립신 반응을 중지시켰습니다. AssayMAP Bravo Peptide Cleanup 프로토콜(탈염)은 C18 역상 카트리지를 이용해 수행했습니다. 이 카트리지는 100µL의 60% acetonitrile, 0.1%의 trifluoroacetic acid으로 프라이밍하고, 50µL의 0.1% trifluoroacetic acid로 평형화하였으며, 유속 5µL/분에서 50µL의 mAb 트립신 분해물 시료를 로딩하고, 50µL의 0.1% trifluoroacetic acid로 세척하였으며, 유속 5µL/분에서 15µL의 60% acetonitrile과 0.1% trifluoroacetic acid로 용리하였고, 160µL의 0.1% 포름산과 혼합하였습니다.

기기

LC 시스템

다음을 포함하는 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)

MS 시스템

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

LC/MS 분석

LC/MS 펩타이드 맵 분리는 30분 그레디언트를 사용해 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼(2.1 × 150mm, 2.7µm)에서 수행하였습니다. 데이터는 iterative MS/MS 모드로 획득하였습니다 (표 1).

데이터 분석

데이터는 Agilent MassHunter BioConfirm 10 내의 펩타이드 맵핑 워크플로를 사용해 처리하였습니다. 간단히 말해, 분자 특징을 추출하여 고정된 변형(알킬화: C)의 및 가변적 변형(산화: M, 탈아미드화: N, Q, 라이신 소실: K, pyroglutamate:E)의 관점에서 innovator mAb와 매칭하였습니다. 질량 허용 오차는 MS에서 10ppm, MS/MS에서 30ppm이었습니다. 시퀀스 커버리지는 MS/MS 특징과 매칭되는 펩타이드 스펙트럼에 기반해 계산하였으며, 1%의 위발견율(FDR)로 필터링하였습니다.

표 1. LC/MS 조건

파라미터	Agilent 1290 Infinity II LC 시스템
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 2.1 × 150mm, 2.7µm, 120Å
주입 부피	2µL(2µg/µL)
시료 온도 조절 장치	5°C
이동상 A	0.1% formic acid in water
이동상 B	0.1% formic acid in acetonitrile
그레디언트	0분 → 3% B 30분 → 40% B 33분 → 90% B 35분 → 90% B 37분 → 3% B 40분 → 3% B
중지 시간	40.1분
컬럼 온도	60°C
유속	0.4mL/분

파라미터	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
이온 모드	양이온 모드, 듀얼 AJS ESI
건조 가스 온도	325°C
건조 가스 유속	13L/분
Sheath 가스 온도	275°C
Sheath 가스 유속	12L/분
Nebulizer	35psi
캐필러리 전압	4,000V
노즐 전압	0V
Fragmentor 전압	175V
Skimmer 전압	65V
Oct RF Vpp	750V
기준 질량	121.050873, 922.009798
수집 모드	확장된 측정 범위(2GHz)에서 데이터 획득
MS 질량 범위	110~1,700*m/z*
수집 속도	8스펙트럼/초
Auto MS/MS 범위	50~1,700*m/z*
MS/MS 수집 속도	3스펙트럼/초
분리 폭	좁음(약 1.3*m/z*)
전구체/주기	Top 10
충돌 에너지	전하 상태 / 기울기 / 오프셋 2 / 3.1 / 1 3 또는>3 / 3.6 / -4.8
MS/MS 임계값	1,000 counts, 0.001%
동적 배제 켜짐	1회 반복 후 0.1 또는 0.2분간 배제
전구 이온 존재비 기반 스캔 속도	예
표적	25,000 counts/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

MassHunter BioConfirm은 단백질 분석을 위한 종합적이고 사용자 친화적인 데이터 분석 도구입니다. 그림 2는 BioConfirm 10.0 소프트웨어 펩타이드 맵핑 워크플로 레이아웃을 보여줍니다. 펩타이드 맵핑 실험을 위해서는 소프트웨어가 펩타이드 찾기 알고리즘으로 펩타이드 특징을 자동으로 추출하고, 이를 가능한 PTM을 이용해 MS/MS 스펙트럼과 매칭시켜 펩타이드 시퀀스를 확인 및 밸리데이션해야 합니다[2]. 또한 이 소프트웨어 플랫폼은 PTM을 자동으로 상대 정량하고, 해당 정보를 빠른 데이터 검토를 위한 히스토그램으로 표시하여 더 빠른 의사결정을 가능하게 합니다. 다중 펩타이드 맵핑 파일 처리 및 다른 단백질 분해물 시료 간의 비교도 수행 가능합니다. MassHunter BioConfirm 소프트웨어는 이와 같은 강력하고도 사용자 친화적인 기능들 덕분에, innovator 및 바이오시밀러 펩타이드 맵핑 실험의 비교 평가에 매우 적합합니다.

그림 2. 펩타이드 맵핑 분석을 위한 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어 스크린샷

펩타이드 맵핑은 아미노산 시퀀스 확인을 통해 단백질을 식별하기 위해 일상적으로 사용됩니다. 또한 이 방법은 PTM의 특성 규명과 모니터링을 위해 선호되는 접근법입니다. 본 연구에서는 이러한 비교 평가의 사례로 innovator와 2가지 바이오시밀러 mAb를 선택하였습니다. 그림 3은 innovator와 바이오시밀러 mAb 트립신 펩타이드 맵의 LC/MS를 보여줍니다. AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼에서의 30분간 그레디언트는 고분리능 펩타이드 분리를 가능하게 하였습니다. MassHunter BioConfirm 소프트웨어 내의 자동 펩타이드 맵핑 워크플로를 이용해, LC/MS/MS에서 얻은 펩타이드 질량을 mAb 시퀀스에 포함된 선호되는 변형의 이론적인 분해물과 비교하였습니다. BioConfirm 소프트웨어는 MS/MS 데이터에 해당하는 펩타이드를 자동으로 식별 및 할당합니다. Iterative MS/MS의 결과는 중사슬과 경사슬 시퀀스에 대해 >97%의 시퀀스 커버리지를 보여줍니다(표 2).

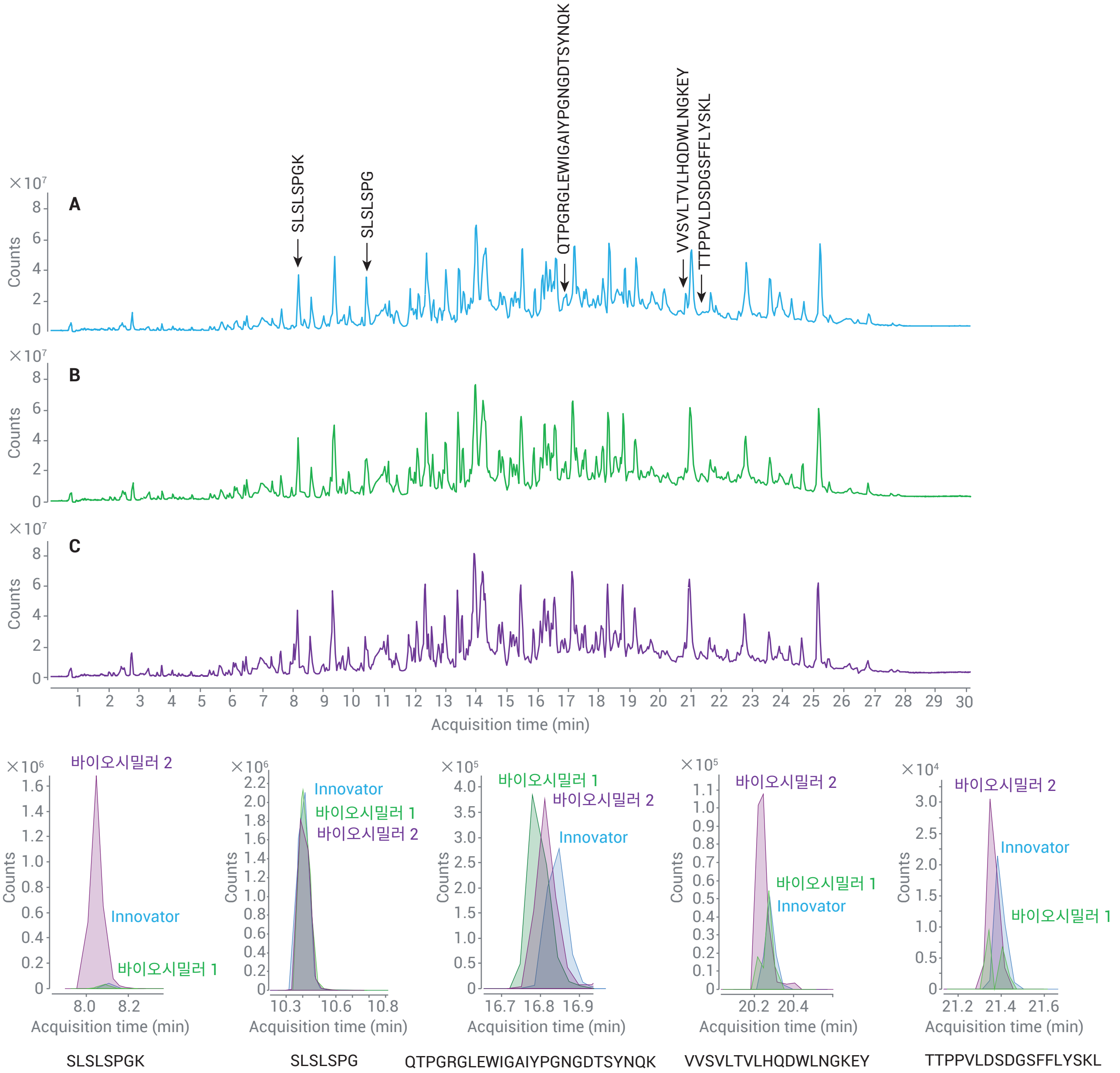

그림 3. 트립신 분해된 mAb의 비교. (A) Innovator, (B) 바이오시밀러 1, (C) 바이오시밀러 2의 TIC. 화살표는 TIC 프로파일의 차이점을 강조 표시하며, 하단 ECC는 해당 펩타이드를 나타냄

표 2. 평균 시퀀스 커버리지

mAb 시료	시퀀스 커버리지	
	중사슬	경사슬
Innovator	98.23	100
바이오시밀러 1	98.10	99.06
바이오시밀러 2	97.59	100

Innovator와 바이오시밀러 mAb 간의 유사성/차이점을 찾기 위해 자동 MS/MS에서 얻은 트립신 분해물의 총 이온 크로마토그램(TIC)을 비교하였습니다. 그림 3은 이온 크로마토그램 조사를 통해 펩타이드의 발현 수준 차이를 밝힐 수 있음을 보여줍니다. C-말단 시퀀스(SLSLSPGK)는 innovator 및 바이오시밀러 1과 비교했을 때, 바이오시밀러 2(약 8분) 내에서 더 많이 농축되었습니다. 반대로 lysine-truncated 펩타이드 형태(SLSLSPG)는 innovator mAb 내에 풍부합니다(약 10.4분). QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK, VVSVLTVLHQDWLNGKEY 및 TTPPVLDSDGSFFLYSKL 등 3종의 기타 펩타이드는 innovator와 바이오시밀러 mAb 내에서 서로 다른 강도 수준을 나타냈습니다.

PTM은 약물의 효능 및 안전성과 관련될 수 있는 CQA입니다. 따라서 바이오시밀러와 innovator mAb 쌍의 PTM 수준을 비교하고 식별하는 것은 매우 중요합니다. 흔한 2가지 변형인 산화와 탈아미드화에 대한 innovator와 바이오시밀러 mAb의 데이터를 생성하였습니다.

산화

산화는 mAb의 흔한 PTM으로, 정제, 제제 및 보관과 같은 여러 바이오프로세스 개발 단계에서 일어날 수 있습니다. Innovator와 바이오시밀러 mAb의 산화 수준을 비교하기 위해, 대표적인 중사슬 DLTMISR 펩타이드를 선택하였습니다. 그림 4는 산화되고 변형되지 않은 DLTMISR 펩타이드의 분리 및 M256 산화의 상대 정량에 대한 비교 결과를 보여주는 MS/MS 스펙트럼입니다. y_4 및 y_5 이온 질량에 대한 조사는 산화된 MS/MS 스펙트럼 내 16Da의 증가를 보여주며, Met 잔류물의 산화를 시사합니다. 그림 4C는 M256의 상대 산화 수준의 3회 분석을 통해 히스토그램으로 나타내며, 이는 모든 mAb에 대해 사용할 수 있는 MassHunter BioConfirm 소프트웨어의 유용한 기능입니다. Innovator와 바이오시밀러 1 mAb의 M256 산화 수준 히스토그램 실험은 유사한 것으로 나타났으며(각각 1.48%와 1.27%), 바이오시밀러 2는 약간 더 높은 산화율(2.5%)로 관찰되었습니다.

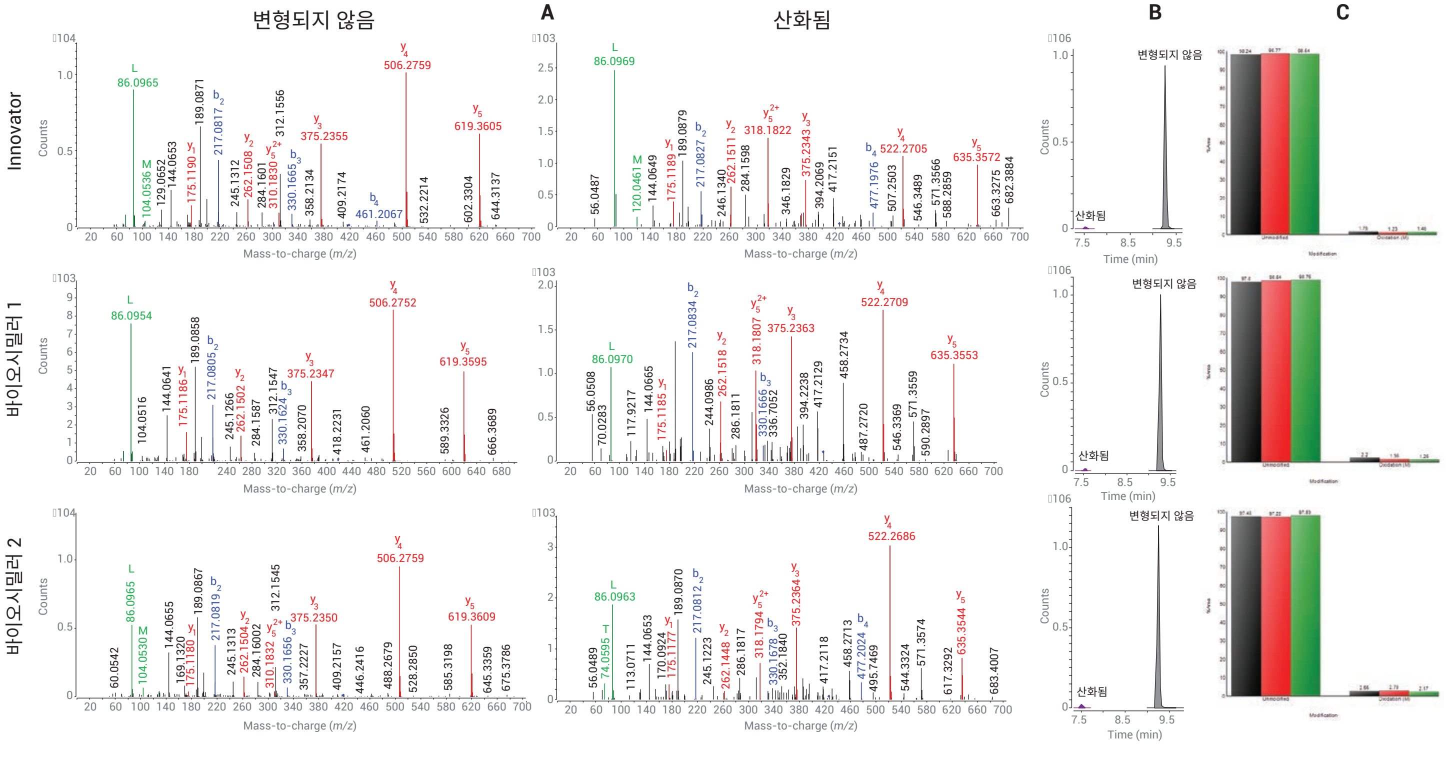

그림 4. DTLMISR 펩타이드의 산화 분석. (A) 변형되지 않은 펩타이드 및 산화된 펩타이드의 MS/MS 스펙트럼, (B) ECC 오버레이, (C) M256의 상대 정량(3회 반복 측정).

탈아미드화

탈아미드화는 또 다른 일반적인 변형으로, 아스파라긴(N)과 글루타민(Q) 잔류물에서 주로 발생합니다. N 잔류물의 탈아미드화는 Q 잔류물에서보다 빠르게 일어납니다. Innovator와 바이오시밀러 mAb의 탈아미드화 수준을 비교하기 위해, 중사슬 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 펩타이드 시퀀스(375~396)를 사용하였습니다. 그림 5는 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 분석 결과를 보여줍니다. MS/MS 스펙트럼 분석은 y_9 생성 이온의 a+1Da 질량 이동을 보여주며, y_8 하향의 y 이온은 동일하게 이동하여 Asn388 탈아미드화를 나타냅니다. 상대 정량의 분석 결과는 바이오시밀러 1 및 2의 Asn388 탈아미드화 수준(각각 19.99%와 19.83%)이 innovator mAb(10.92%)에 비해 더 높다는 것을 보여줍니다.

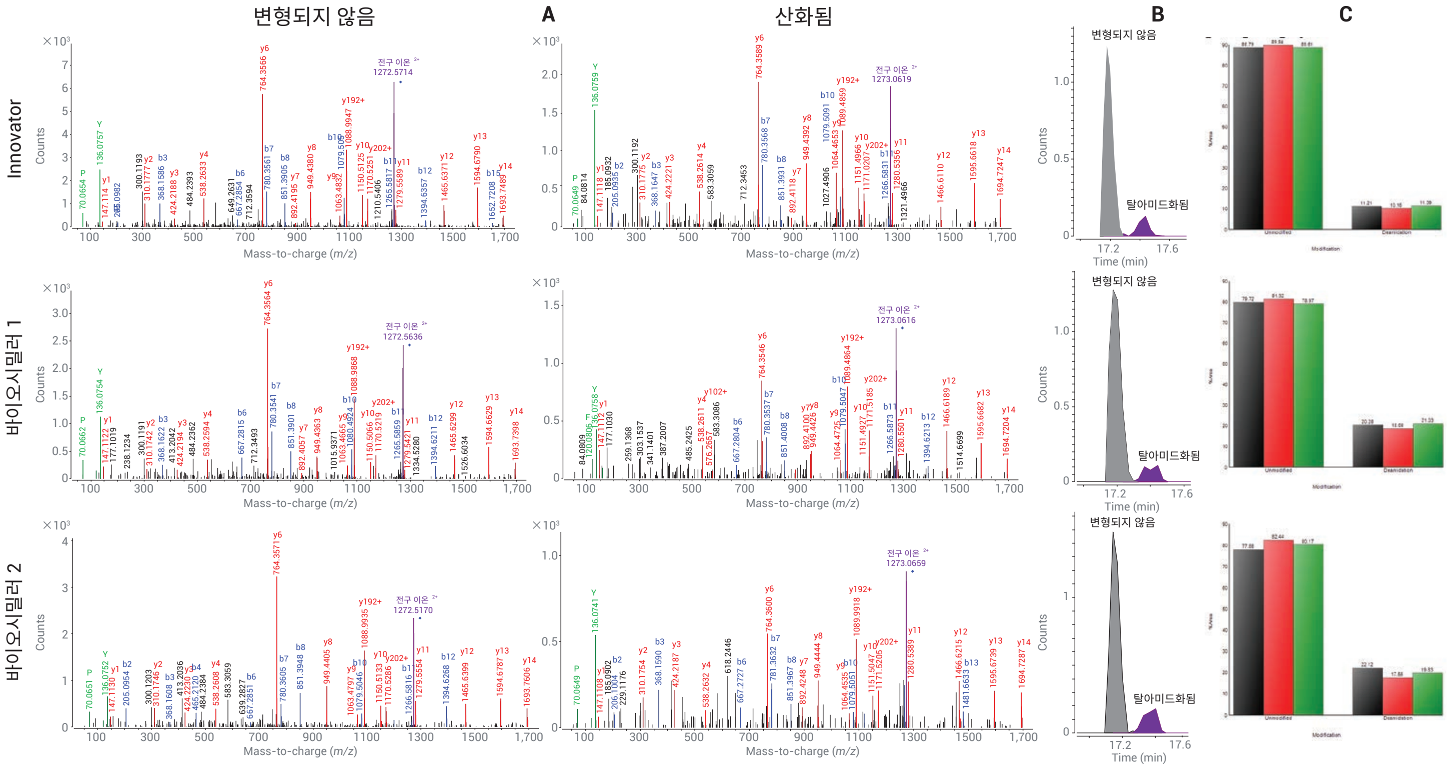

그림 5. GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 펩타이드 시퀀스(375~396)의 탈아미드화 분석. (A) 변형되지 않은 펩타이드 및 탈아미드화된 펩타이드의 MS/MS 스펙트럼, (B) ECC 오버레이, (C) N388의 상대 정량(3회 반복 측정)

다른 펩타이드의 PTM 역시 BioConfirm의 히스토그램 특징을 사용해 분석하였습니다. 그림 6은 innovator 및 바이오시밀러 mAb의 기타 변형된 잔류물에 대한 상대 정량을 보여줍니다. 히스토그램 비교 결과는 일련의 시료에 걸쳐 품질 속성 수준을 모니터링할 수 있는 쉽고 빠른 방법을 제공합니다.

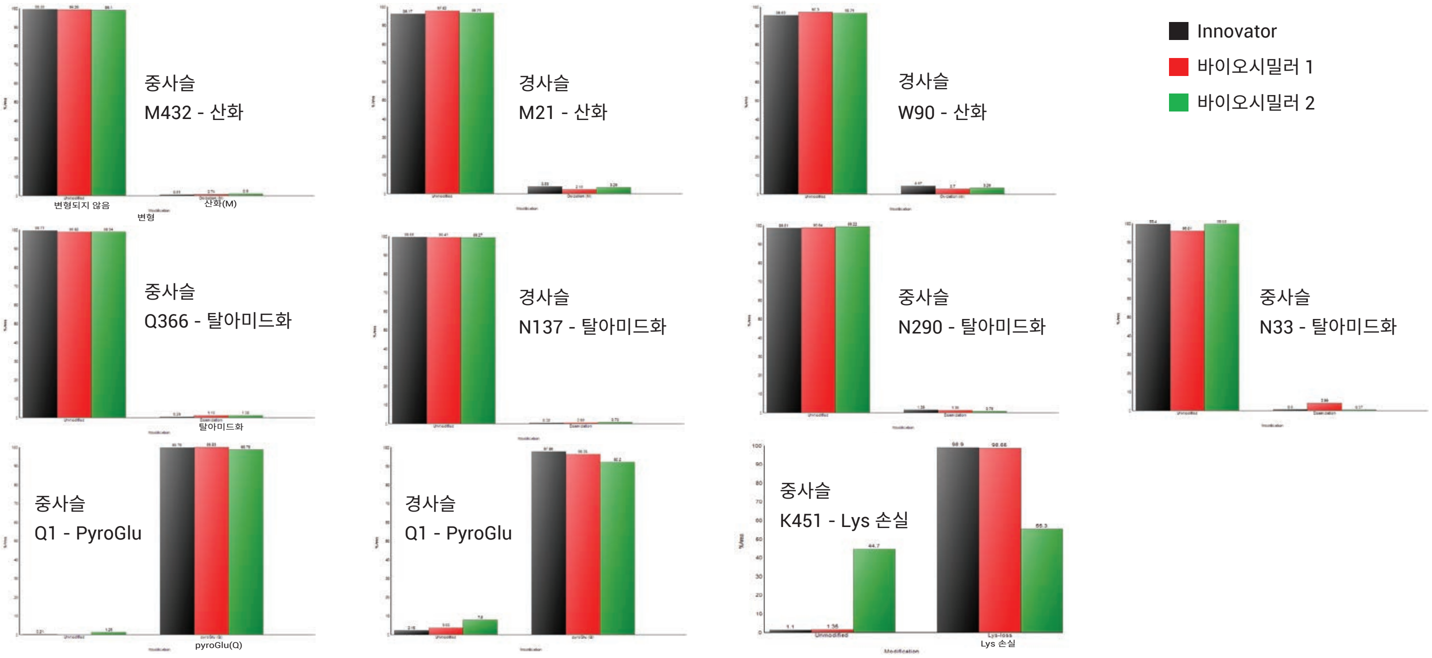

그림 6. PTM(산화, 탈아미드화, Lys 절단 및 Gln에서 pyroGlu로의 N-말단 고리화)의 상대 정량을 보여주는 대표 히스토그램

결론

본 응용 자료에서는 Agilent AssayMAP Bravo 플랫폼, Agilent Accurate Mass 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 및 사용이 쉬운 Agilent MassHunter BioConfirm 데이터 분석 소프트웨어를 사용해, innovator와 바이오시밀러 mAb를 연구하기 위한 통합 펩타이드 맵핑 워크플로를 소개하였습니다. 펩타이드 맵핑으로부터 얻은 결과는 innovator와 바이오시밀러 mAb에 대한 우수한 시퀀스 커버리지를 제공합니다. 고효율 크로마토그래피 분리 및 고품질 MS/MS 스펙트럼 덕분에 PTM의 정밀한 특성 규명을 수행할 수 있었습니다. 이 통합적인 접근법은 또한 innovator와 바이오시밀러 mAb의 여러 PTM에 대한 상대 정량을 가능하게 하였습니다.

참고문헌

1. Ecker DM1, Jones SD, Levine HL. The Therapeutic Monoclonal Antibody Market. MAbs. 7(1):9-14 **2015**
2. *Agilent Technologies*, publication number 5991-8552EN.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하실 수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 12월 18일, 한국에서 인쇄
5994-1495KO
DE.0897222222

한국애질런트테크놀로지스㈜
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

Agilent
Trusted Answers