



혈청에서 정제된 항체-약물 결합체에 대한 약물 대 항체 비율 결정

자동 친화성 정제, LC/MS 분석 및 Novel DAR 계산 소프트웨어 사용

응용 자료

저자

Jing Chen, Michael Bovee, and
Steve Murphy
Agilent Technologies, Inc.

서론

항체-약물 결합체(ADC)는 약물을 단일클론 항체에 결합하여 표적 약물을 전달하기 위해 만들어진 새로운 바이오 의약품입니다. 저분자 약물과는 달리, ADC는 단일 분자 성분은 아니지만 각 항체의 약물 수와 PTM(post-translational modification)의 변동에 의해 변화하는 이종 항체군입니다. 약물 대 항체 비율(DAR)은 ADC에 결합된 평균 약물 수입니다. DAR은 효능과 독성에 영향을 줄 수 있기 때문에 ADC 개발 중에 최적화되고 자세히 모니터링되는 ADC의 중요한 품질 속성입니다^{1,2}.

ADC에 대한 DAR은 약물 방출로 인해 시간이 지나면서 순환이 바뀔 수 있습니다^{1,3}. 따라서, 약동학(PK) 연구에서 시료의 ADC DAR을 결정할 확실한 솔루션이 있어야 합니다. ADC DAR을 결정하기 위해, 우선 ADC를 혈청에서 정제한 다음 LC/MS로 분석해야 합니다. 이 워크플로에서 시료 전처리 및 데이터 분석은 일반적으로 강도가 높은 작업이므로 변동성과 인위적 오류에 민감합니다.

이 응용 자료는 Agilent AssayMAP Bravo 플랫폼을 사용하여 ADC 친화성 정제를 자동화하고, Agilent 6550 Q-TOF 질량 분석기에 Agilent 1290 Infinity UHPLC를 결합하여 정확한 원형 단백질 질량 데이터를 수집하고, Agilent MassHunter BioConfirm 및 DAR Calculator 소프트웨어를 사용하여 ADC 질량과 DAR을 결정하는 혈청 시료에서 ADC의 DAR을 결정하는 솔루션을 제시합니다. 이 워크플로는 작업, 변동성 및 ADC DAR 결정과 관련된 인위적 오류 가능성을 줄여주는 동시에 시료의 수를 최소한의 추가 노력으로 조정할 수 있습니다.



Agilent Technologies

실험

재료

재조합 인간 HER2 세포 외 도메인 (ECD)은 ACRO Biosystems(Newark, DE)에서 구매하였습니다. EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin과 Pierce Biotin 정량 키트는 Thermo Fisher Scientific(Grand Island, NY)에서 구매하였습니다. 쥐 혈청은 BioreclamationIVT(Hicksville, NY)에서 구매하였습니다. AssayMAP Streptavidin 카트리지(SA-W)는 Agilent Technologies, Inc.(Santa Clara, CA)사 제품을 사용하였습니다. 기타 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)사 제품을 사용하였습니다.

ADC 항원의 바이오티닐화 및 고정화

HER2 ECD는 제조업체의 지침에 따라 EZ-Link Sulfo-NHS-LC biotin 키트를 사용하여 바이오티닐화되었습니다. biotin 대 HER2 ECD의 몰비는 제조업체의 지침에 따라 Pierce Biotin 정량 키트에 의해 9.0으로 결정되었습니다. 바이오티닐화된 HER2 ECD 2 μ g은 고정화 응용으로 제어하는 Agilent AssayMAP Bravo를 사용하여 각 AssayMAP SA-W 카트리지에 고정하였습니다. 요약하면, SA-W 카트리지(streptavidin이 공유 결합된 약 5 μ L의 충전 수지로 충전된 마이크로크로마토그래피 카트리지)는 1% formic acid로 준비 및 안정화한 후 준비, 안정화 및 내부 카트리지 세척 1과 같은 고정화 응용 기본 설정을 사용하여 HEPES 완충액(10mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4)으로 세척하였습니다. 다른 모든 고정화 응용

단계는 생략하였습니다. 1% formic acid를 사용한 준비 및 안정화는 카트리지를 통해 혼합된 공기를 제거하며, 최종 용리에서 나타나는 낮은 pH 조건에서 고체 지지물에서 분리되는 streptavidin 모노머를 제거하기 위한 엄격한 세척 단계로 작용합니다. 세척 단계에서는 바이오티닐화된 항원과 결합할 카트리지를 준비합니다. 그런 다음, 100 μ L HEPES 완충액에 든 2 μ g의 바이오티닐화된 항원을 5 μ L/분의 유속으로 각 SA-W 카트리지에 로딩한 후 고정화 응용으로 제어되는 AssayMAP Bravo를 사용하여 HEPES 완충액으로 1회 세척하였습니다. 이 경우, 시료 부하 및 내부 카트리지 세척 1은 기본 설정으로 사용하였으며, 다른 모든 응용 단계는 생략하였습니다. 이 과정 이후에, 2 μ g의 바이오티닐화된 ADC 항원을 각 SA-W 카트리지에 결합하여 ADC 친화성 카트리지를 생성하였습니다.

ADC 친화성 정제

시판 동결건조 ADC는 1mg/mL의 탈이온(DI)수에 재용해, 분취되고, 사용될 때까지 -80°C로 보관되었습니다. ADC를 쥐 혈청에 첨가하여 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 및 0.625 μ g/mL의 ADC 농도를 준비하기 위해 연속 희석하였습니다. ADC가 첨가되지 않은 쥐 혈청도 대조군으로 포함하였습니다. 이 시료들은 ADC 친화성 카트리지에 시료를 로딩하기 직전에 HEPES 완충액으로 1:1 추가 희석하였습니다. 친화성 정제는 친화성 정제 응용으로 제어되는 AssayMAP Bravo를 사용하여 수행하였습니다. 요약하면, ADC를 포함하는 100 μ L의 희석된 쥐 혈청을 3 μ L/분의 유속으로 각 ADC 친화성 카트리지(각 ADC 농도에서 n = 4)에 로딩하고, 이후에 4회의 50 μ L

세척(HEPES 완충액, 1M NaCl의 HEPES 완충액, 0.003% formic acid 및 물)을 10 μ L/분의 유속으로 수행하였습니다. 마지막으로, 정제된 ADC가 카트리지당 15 μ L의 1% formic acid로 기존의 15 μ L의 0.5% ammonium hydroxide에 용리하여 정제된 ADC를 중화하였습니다.

LC/MS 분석

LC/MS 분석은 Dual Agilent Jet Stream ESI 소스와 Agilent 1290 Infinity UHPLC 시스템(Santa Clara, Ca)이 결합된 Agilent iFunnel Accurate Mass 6550 Q-TOF(Santa Clara, CA)으로 수행하였습니다. 표 1과 표 2에는 사용한 LC/MS 파라미터가 나열되어 있습니다. 모든 혈청 시료에서 정제된 3 μ L(전체 시료 부피의 1/10) ADC가 MS 전용 분석을 위해 주입되었습니다. 추가로, 2.5, 1.25 및 0.625 μ g/mL의 ADC 농도를 포함하는 혈청 시료에서 정제된 10 μ L(전체 시료 부피의 1/3)의 ADC가 MS 전용 분석을 위해 주입되었습니다. 100ng의 시판 ADC가 대조군으로 주입되었습니다(n = 4).

데이터 분석

원본 데이터 파일은 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어로 분석하였습니다. 2.2~3.2분 사이의 스펙트럼을 추출하고 평균화하여, deconvolution하였습니다. ADC의 DAR과 각 약물이 부하된 ADC의 비율은 Agilent MassHunter DAR Calculator와 deconvoluted 스펙트럼을 사용하여 계산했습니다. 표 3은 deconvolution 파라미터를 보여줍니다.

표 1. 액체 크로마토그래피 파라미터

파라미터	Agilent 1290 Infinity UHPLC 시스템	
컬럼	Agilent PLRP-S 1000Å 8µm 150 × 2.1mm(PL1912-3802)	
시료 항온 장치	5°C	
이동상 A	0.1% Formic acid in water	
이동상 B	0.1 % Formic acid in acetonitrile	
그라디언트(세분화됨)	Time (min)	%B
	0~0.5	25
	0.5~1.5	25~35.5
	1.5~3.5	35.5
	3.5-5.0	35.5~50
	5.0~5.5	50~25
	5.5~7.5	25
정지 시간	7.5분	
컬럼 온도	80°C	
유속	0.4mL/분	

표 2. 질량 분석기 파라미터

파라미터	Agilent 6550 Q-TOF 질량 분석기
이온 모드	양이온 모드
소스	Agilent Dual Jet Stream
건조 가스 온도	225°C
건조 가스 유량	14L/분
Sheath 가스 온도	325°C
Sheath 가스 유량	12L/분
분무기	40psi
캐필러리 전압	4,500V
노즐	1,500V
Fragmentor 전압	250V
Oct RF Vpp	750V
MS 모드 수집 파라미터	높은(10,000m/z) 질량 범위, 확장된 질량 범위(2GHz), MS 전용 모드, 질량 범위 1,000~4,500m/z

표 3. MassHunter BioConfirm 파라미터

파라미터	Agilent MassHunter BioConfirm Deconvolute(MS): 단백질
Deconvolution 알고리즘	최대 엔트로피
Deconvolution 설정	질량 범위: 140~160KDa 질량 단계: 1.0Da
제한된 m/z 범위 사용	2,000~4,500m/z
베이스라인	베이스라인 제거 베이스라인 계수 3.50
부가물	양성자
동위원소 폭	자동

결과 및 토의

혈청 시료 중 ADC의 DAR을 결정하는 솔루션을 개발하였습니다. 이 솔루션에는 AssayMAP Bravo에서 ADC 친화성 카트리지를 사용한 혈청에서 ADC의 자동 친화성 정제, 1290 Infinity UHPLC 및 6550 Q-TOF 질량 분석기를 사용한 원형 ADC의 MS 스펙트럼 수집, Agilent MassHunter BioConfirm을 사용한 MS 스펙트럼의 deconvolution 및 Agilent MassHunter DAR Calculator를 사용한 DAR 계산이 포함됩니다(그림 1).

이 워크플로의 첫 번째 단계는 혈청에서 ADC의 자동 정제입니다. 이 단계를 완성하기 위해, 맞춤형 친화성 카트리지를 생성하도록 특수 고안된 고정화 응용으로 제어되는 AssayMAP Bravo를 사용하여 바이오틴화된 ADC 항원을 AssayMAP SA-W 카트리지에 고정함으로써 맞춤형 AssayMAP 친화성 카트리지를 생성하였습니다. 2µg의 항원이 카트리지마다 고정되었는데, 이는 이 응용 자료에서 정제되는 최대 항체 양에 비해 항원이 약 4배 몰 초과했음을 나타냅니다. 최적화 연구는 4배 몰 초과는 이 응용 자료에서 사용된 유속에서 표적 성분 ADC(데이터 표시 안 됨)의 효율적인 포획에 충분하다는 것을 입증하였습니다. 몰 초과 유속과 수준은 상관 관계가 있으며, 두 개 모두 실험 설계에 따라 변경될 수 있습니다. 사용된 항원의 양이 SA-W의 용량(이 특별한 항원의 경우는 약 75µg이었음)에 의해 제한되지 않았지만 이 실험에서 소모된 항원의 양을 최소화하도록 선택되었음을 유념해야 합니다.



그림 1. ADC DAR 결정 워크플로.

시판 ADC는 20µg/mL의 농도로 쥐 혈청에 첨가하였으며, 그 다음에 친화성 정제 응용으로 제어되는 ADC 친화성 카트리지와 AssayMAP Bravo를 사용하여 친화성 정제를 수행하였습니다. 100ng의 시판 ADC(그림 2A)와 혈청 시료에서 얻은 100ng의 ADC 친화성 정제(그림 2B)는 100% 회수율을 가정한 상태에서 LC/MS를 이용하여 분석하였습니다. 2.2~3.2분에 관찰된 주요 피크는 ADC의 용리를 나타냅니다. 잔여 염분을 나타내는 피크가 1~1.5분에, 질량 엔벨로프가 1,500m/z 주위에 집중된 쥐 혈청에서 공동 정제된 단백질을 나타내는 피크가 4.7~5.5분에, 친화성 정제 ADC에서 중요하지 않은 추가 피크가 관찰되었습니다. 이 잔여 공동 정제 단백질은 미세 조정된 LC 그라디언트로 완전히 분리되면서 ADC의 이온화를 방해하지 않습니다.

그림 2C와 2D는 ADC 용리 범위에 대한 추출 스펙트럼이 거의 동일하다는 것을 보여줍니다. deconvolution 후에, 0~7의 DAR 값을 표시하는 7개의 피크 그룹이 시판 ADC(그림 2E)와 친화성 정제 ADC(그림 2F) 두 가지 모두 deconvoluted 질량 스펙트럼에서 관찰되었습니다. 각 피크 그룹의 4개 주요 피크는 다양한 글리코형(G0F/G0F, G0F/G1F, G1F/G1F 또는 G0F/G2F, G1F/G2F)을 가진 ADC를 나타냅니다. MassHunter DAR Calculator는 7개의 피크 그룹에 따라 영역을 사용하는 DAR을 계산하기 위해 사용되었습니다. 두 조건에 대해 비슷한 DAR이 계산되었습니다(DAR = 3.5). 이 결과는 AssayMAP Bravo 플랫폼에서 자동 ADC 정제로 높은 회수율과 고순도를 달성할 수 있다는 것을 보여줍니다.

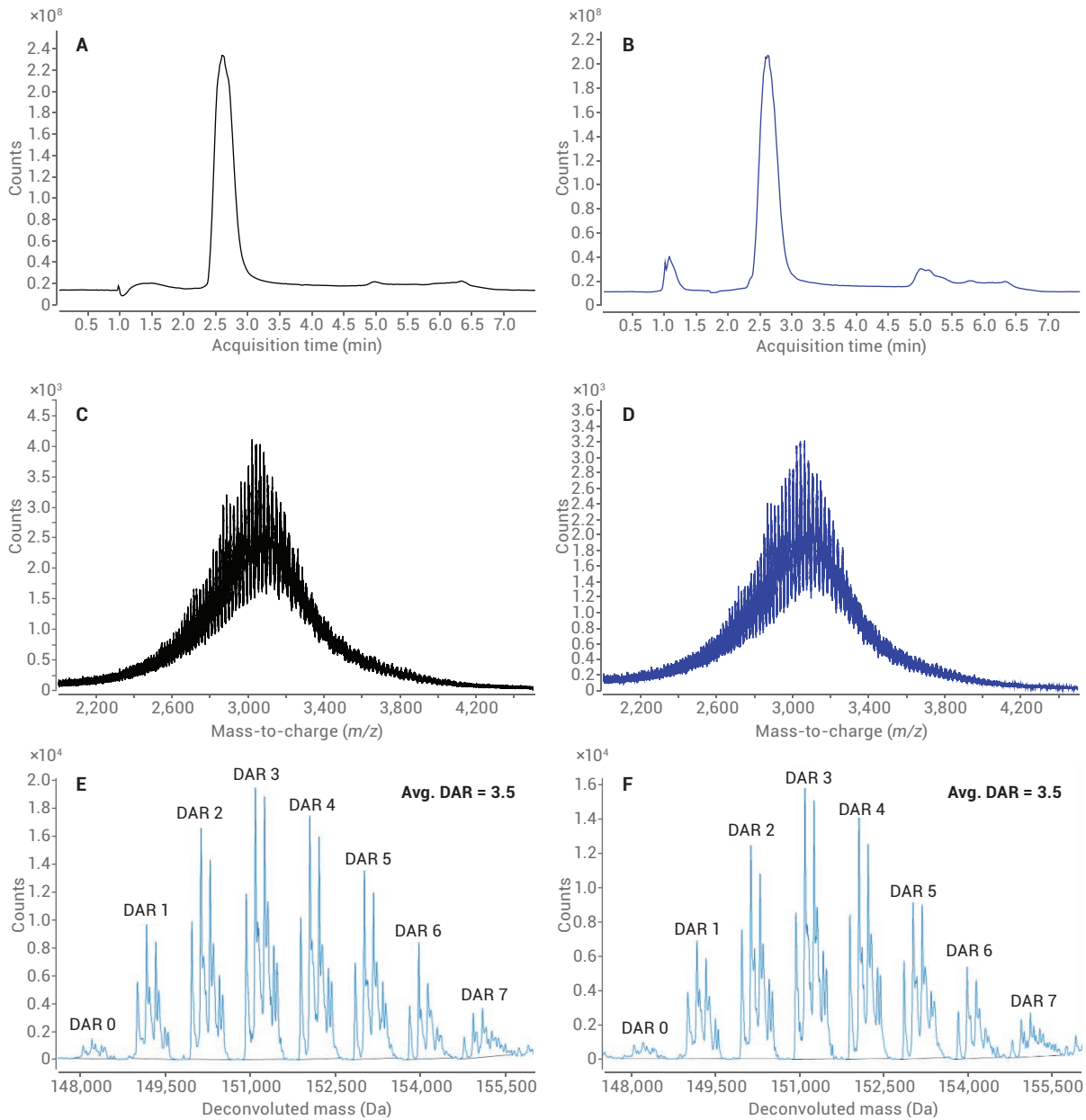


그림 2. 대표적인 전체 이온 크로마토그램(TIC), 추출 스펙트럼, 시판 ADC 및 친화성 정제 ADC로부터 얻은 deconvoluted 스펙트럼. A) 시판 ADC의 TIC. B) 친화성 정제 ADC의 TIC. C) 시판 ADC의 추출 스펙트럼. D) 친화성 정제 ADC의 추출 스펙트럼. E) 시판 ADC의 DAR 계산을 사용한 deconvoluted 스펙트럼. F) 친화성 정제 ADC의 DAR 계산을 사용한 deconvoluted 스펙트럼

PK 연구의 워크플로 적합성을 평가하기 위해, 시판 ADC를 쥐 혈청에 첨가하여 20, 10, 5, 2.5, 1.25 및 0.625µg/mL로 연속 희석하고, 위에서 설명한 대로 정제하였습니다. ADC가 함유되지 않은 쥐 혈청 시료도 대조군으로 정제하였습니다. 각 카트리지에 로딩된 혈청 시료의 ADC 양은 각각 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0ng이었습니다. 각 친화성 정제 시료의 질량 분석을 위해 100% 회수율을 가정하고 컬럼 직접 주입 시 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 0ng ADC에 해당하는 10%의 용리액을 주입하였습니다. 그림 3은 ADC의 질량 엔벨로프 (2,000~4,500m/z)에 대한 추출 이온 크로마토그래프(EIC)를 보여줍니다. 2.2~3.2분의 피크가 통합되었고, 각 ADC 농도에 대한 변동 계수(CV)가 계산되었습니다. 농도가 1.25µg/mL 이상인 혈청 시료에서 정제된 ADC에 대한 CV가 10% 미만인 탁월한 재현성을 나타냈습니다. 친화성 정제 혈청 대조군 (첨가된 ADC 없음)의 EIC는 ADC 용리 범위에서 공동 정제된 단백질이 존재하지 않음을 나타내기 위해 반드시 평평해야 합니다. 이 특이성은 SA-W 카트리지의 낮은 비특이적 결합, 항원에 대한 ADC의 높은 특이성 및 미세 조정된 세척 조건으로 수행되었습니다. 공동 정제된 단백질의 제거에 어떤 세척액도 필요하지 않았습니다.

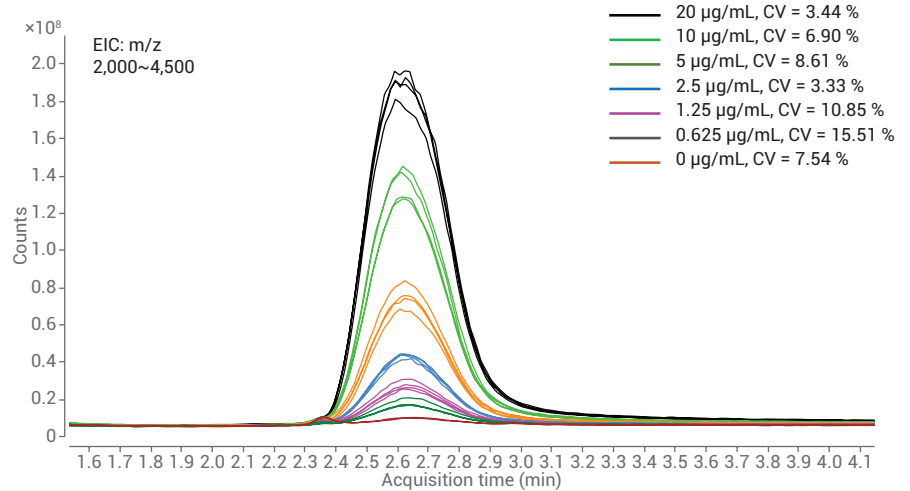


그림 3. 다양한 혈청 농도에서 친화성 정제 ADC의 추출 이온 크로마토그래프(EIC). 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 및 0µg/mL ADC(각 농도에서 n = 4)를 포함하는 50µL의 쥐 혈청은 Agilent AssayMAP Bravo를 사용하는 ADC 친화성 카트리지로 친화성 정제되었습니다. 질량 분석을 위해 혈청 시료에서 얻은 10%의 정제 ADC를 각 친화성 정제 시료에 주입하였습니다. EIC(2,000~4,500m/z)를 추출하였습니다. 2.2~3.2분의 피크가 통합되었고, 각 ADC 농도에서 시료에 대한 변동 계수(CV)가 계산되었습니다.

그림 4는 20, 10, 5, 2.5, 1.25 및 0.625µg/mL ADC를 사용하여 쥐 혈청 시료에서 친화성 정제된 ADC의 deconvoluted 스펙트럼과 DAR을 보여줍니다. 분석된 ADC 양이 감소하면 신호대 잡음비(S/N)도 감소합니다. 그래서 2.5, 1.25 및 0.625µg/mL의 ADC 농도로 혈청 시료에서 정제된 ADC의 33%가 20, 10 및 5µg/mL의 ADC 농도로 혈청 시료에서 정제된 ADC의 10%와 비교하여 분석하였습니다. 이를 통해 더 높은 품질의 deconvoluted 스펙트럼을 더 낮은 ADC 농도의 시료에서 얻을 수 있었습니다. 테스트 완료된 모든 ADC 농도에 대해 비교 가능한 deconvoluted 스펙트럼과 DAR을 얻었습니다(그림 4, 표 4). 다양한 약물이 부하(D0-D7)된 ADC의 비율은 20, 10, 5 및 2.5µg/mL의

ADC 농도로 혈청 시료에서 정제된 ADC와 비교하였으며, MS 분석을 위해 직접 주입된 시판 ADC의 비율과 비슷하였습니다. 다양한 약물 부하의 비율은 1.25 및 0.625µg/mL의 ADC 농도로 혈청 시료에서 정제된 ADC에 비해 시판 ADC에 덜 가까웠습니다(표 4, 그림 5). 스펙트럼 품질을 개선하고 워크플로의 검출 및 정량 한계를 낮추기 위해 LC/MS 분석에서 더 높은 비율의 용리액을 주입할 수 있습니다. 또한, 스펙트럼을 단순화하고 시그널을 향상하기 위해 ADC의 용리 전에 탈당화를 수행할 수 있습니다. 이러한 결과는 제시된 워크플로가 낮은 혈청 ADC 농도에서 약물 부하가 다를 경우 ADC의 DAR 및 비율을 재현성 있게 결정할 수 있다는 것을 보여줍니다.

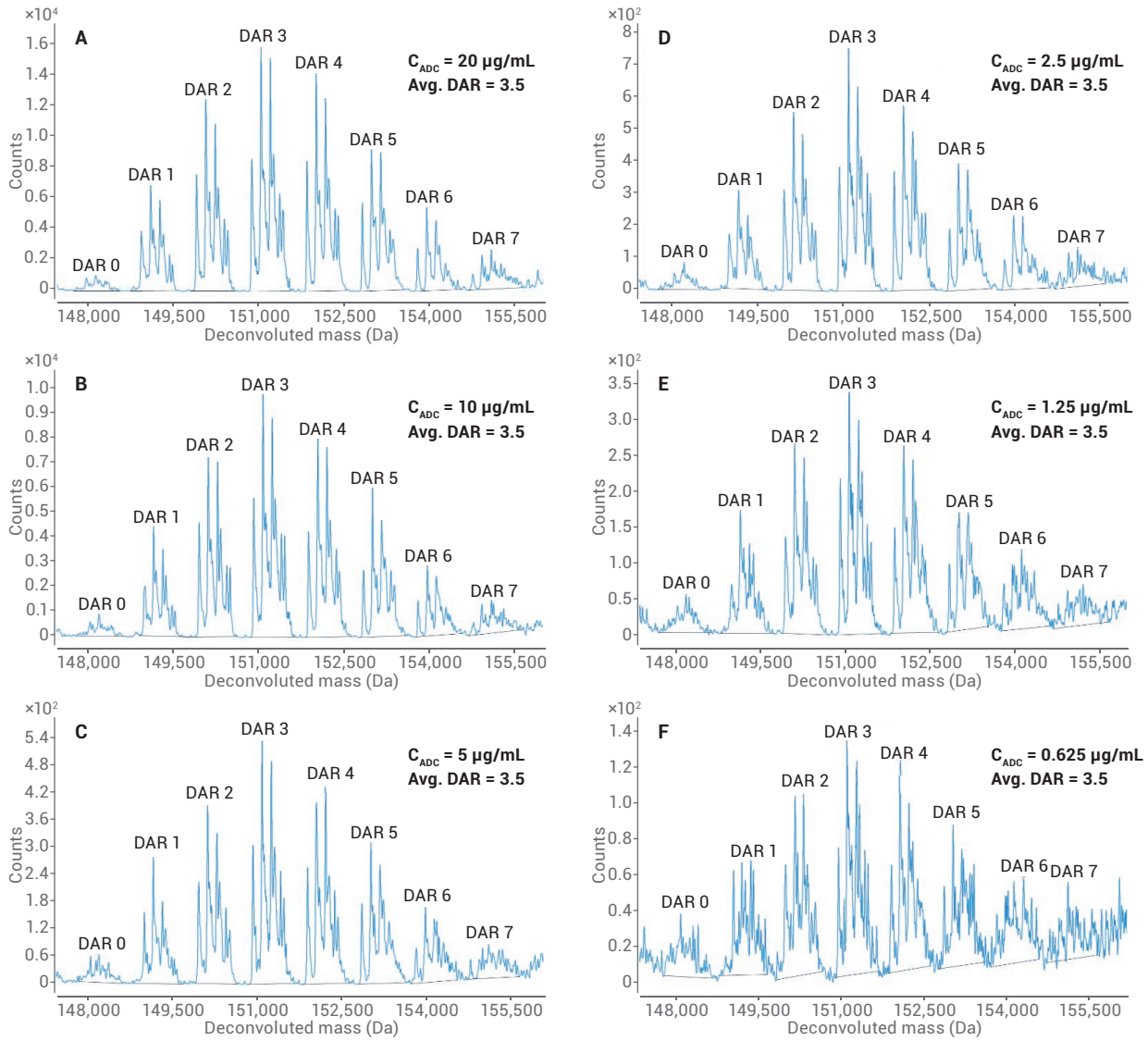


그림 4. 쥐 혈청에서 얻은 친화성 정제 ADC의 대표적인 deconvoluted 스펙트럼과 DAR. 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 및 0μg/mL ADC(각 농도에서 n = 4)를 포함하는 50μL의 쥐 혈청은 Agilent AssayMAP Bravo를 사용하는 ADC 친화성 카트리지로 친화성 정제되었습니다. 20μg/mL(A), 10μg/mL(B) 및 5μg/mL(C)에서 ADC를 포함하는 혈청 시료에서 얻은 10%의 정제 ADC가 MS 분석을 위해 주입되었습니다. 2.5μg/mL(D), 1.25μg/mL(E) 및 0.625μg/mL(F)에서 ADC를 포함하는 혈청 시료에서 얻은 33%의 정제 ADC가 MS 분석을 위해 주입되었습니다. C_{ADC} : 쥐 혈청의 ADC 농도

표 4. DAR 및 각 약물 부하에 대한 ADC 비율

시료	각 약물 부하에 대한 ADC 비율(%)								
	DAR	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 3	DAR 4	DAR 5	DAR 6	DAR 7
시판(n = 4)	3.50±0.02	2.11±0.75	9.9±1.08	17.35±0.33	22.82±1.69	19.88±1.81	15.35±0.47	7.97±0.93	4.65±0.77
20µg/mL 혈청 시료에서 얻은 친화성 정제(n = 4)	3.49±0.02	2.4±0.68	9.45±1.05	17.32±0.25	23.32±1.45	20.17±1.63	14.97±0.59	7.58±0.69	4.8±0.88
10µg/mL 혈청 시료에서 얻은 친화성 정제(n = 4)	3.46±0.02	2.54±0.19	9.72±0.24	17.38±0.18	23.87±0.47	19.73±0.13	14.36±0.13	7.47±0.24	4.95±0.38
5µg/mL 혈청 시료에서 얻은 친화성 정제(n = 4)	3.49±0.03	3.47±0.21	9.67±0.74	16.6±0.16	22.3±0.1	19.83±1.08	14.41±0.21	8.49±0.26	5.24±0.74
2.5µg/mL 혈청 시료에서 얻은 친화성 정제(n = 4)	3.43±0.06	3.08±0.26	9.94±0.22	17.83±0.53	23.21±0.59	19.55±0.18	13.64±0.23	8.01±0.65	4.73±0.54
1.25µg/mL 혈청 시료에서 얻은 친화성 정제(n = 4)	3.4±0.1	4.43±0.22	11.31±1.68	17.96±0.89	20.73±0.65	18.17±0.94	12.55±1.17	9.08±0.5	5.78±0.66
0.625µg/mL 혈청 시료에서 얻은 친화성 정제(n = 4)	3.48±0.08	6.49±0.66	10.95±1.45	16.43±0.8	17.9±0.98	16.61±0.49	12.67±1.29	11.91±0.71	7.05±0.43

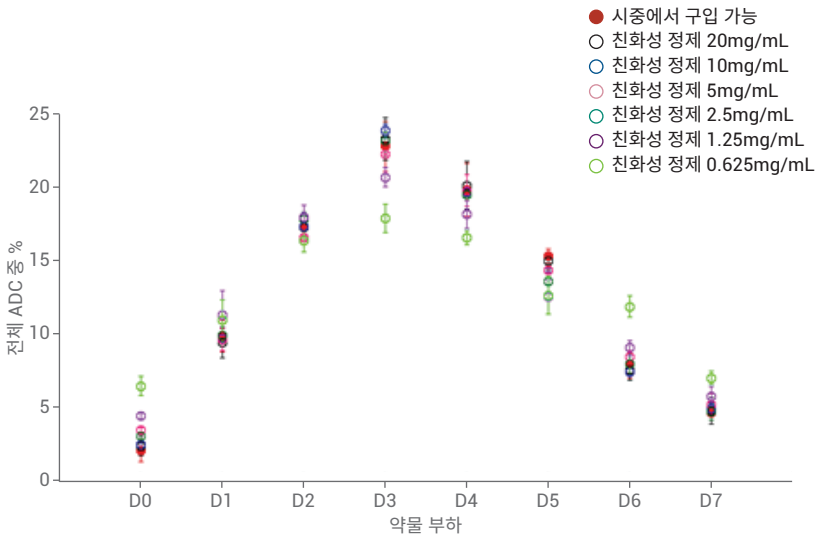


그림 5. 각 약물 부하에 대한 ADC 비율

결론

애질런트는 Agilent AssayMAP Bravo를 사용한 자동 친화성 정제, Agilent 1290 Infinity UHPLC와 Agilent 6550 Q-TOF을 사용한 LC/MS 수집, Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 사용한 deconvolution, Agilent MassHunter DAR Calculator를 사용한 DAR 결정을 포함하는 완전한 ADC DAR 결정 솔루션을 제공합니다. 이 ADC DAR 결정 솔루션의 특징은 다음과 같습니다.

- 수작업, 변동성 및 인위적 오류 가능성 감소
- 고효율 및 고순도로 혈청에서 ADC 정제
- 고분해능 스펙트럼 생성
- 간편한 DAR 계산 제공

참고문헌

1. Perez, H. L.; *et al.* Antibody-drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discovery Today* **2014**, *19*(7), 869-881.
2. Beck, A.; *et al.* Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates. *Expert Reviews of Proteomics* **2016**, *13*:2, 157-183.
3. Xu, K.; *et al.* Characterization of intact antibody-drug conjugates from plasma/serum in vivo by affinity capture capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2011**, *412*, 56-66.

www.agilent.com/chem/bioconfirm

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 3월 30일, 한국에서 발행
5991-6621KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies