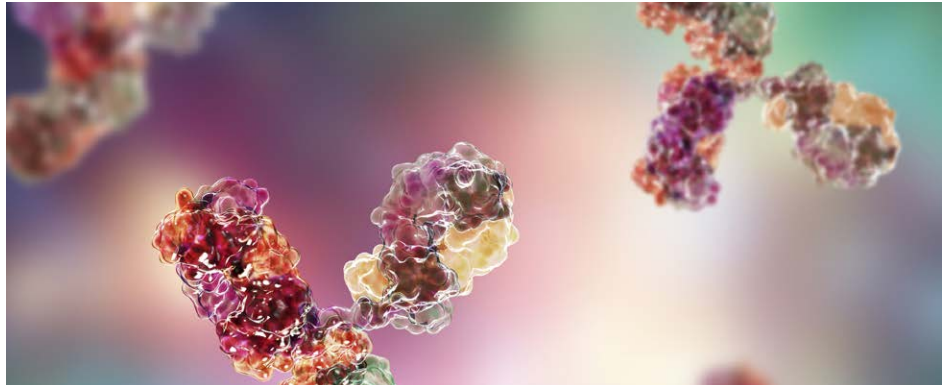


처리량 높은 형광 기반 mAbs 응집체 분석 워크플로

크기 배제 크로마토그래피 보안을 위한 형광 분석의 효율



저자

Brian Llau
Agilent Technologies, Inc.

서론

현대 바이오횰약품 개발은 100s~1,000s의 단일 클론 항체(mAb) 변형을 스크리닝하여 친화성, 특이성, 면역원성, 당화성 등 최적의 특징을 갖춘 주요 개발 신약 후보물질을 찾아내는 과정에 의존합니다. 항체 응집체는 분자 속성뿐 아니라 호스트 발현에도 영향을 받기 때문에 이러한 최적화에서 의도하지 않은 부작용을 일으킬 수 있습니다. 때문에 항체 응집체는 중요한 품질 속성으로서 제어 및 모니터링됩니다(1). mAb의 응집 성향을 신속하게 평가하는 것은 현대 의약품 개발에서 필수적인 요구 사항입니다.

이 연구에서는 고처리량의 형광 기반 응집체 분석 워크플로를 검토합니다. 이 워크플로는 모듈식 Agilent Cary Eclipse Microplate 판독기 및 상업적으로 사용 가능한 PEPBOPS 염료를 바탕으로 합니다. 이 워크플로는 고분자량 응집체의 반정량적인 추정치를 기존 측정 기술로는 시료당 5분 이내가 걸렸던 것과 달리 시료당 5초 이내에 측정하여 제공합니다(2). 형광 프로브로 사용되는 PEPBOPS 염료가 항체 응집체에 미치는 영향 또한 평가되었습니다.

본 연구를 위해 두 개의 치료용 mAbs(Rituximab과 Trastuzumab) 및 널리 가용한 항체 표준물질 NISTmAb RM 8671에 대한 강제 응집이 실시되었습니다. 본 연구에 이어 크기 배제 크로마토그래피와 함께 형광 기반 응집 분석을 사용하는 것에 대한 조사 연구가 이뤄졌습니다.

Cary Eclipse Microplate 판독기는 크기 배제 크로마토그래피를 위한 신속한 사전 스크리닝 도구 또는 기타 고분해능 기술로 사용할 수 있어 mAb 응집체 성향 평가의 전반적인 효율을 높여줍니다. 두 기술을 하나의 워크플로에 통합하면 원하지 않는 고분자량의 응집체를 포함한 시료를 신속하게 식별할 수 있습니다. 이처럼 보다 작은 시료 세트에 분석 자원을 집중하면 상당한 시간을 절약하고 생산성을 높일 수 있습니다.

실험

단일 클론 항체(mAbs)의 강제 응집

응집된 mAbs 시료는 두 분석 연구에 사용하도록 준비되었습니다.

재료 및 분석법

- mAb Rituximab: Ristova®(Roche AG) 및 Reditux™ (Dr. Reddy's Laboratories).
- mAb Trastuzumab(Herceptin® -Genentech).
- 모든 완충염 및 이동상 성분은 HPLC 등급 이상이며 Sigma Aldrich로부터 구매했습니다.
- 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)은 신선하게 준비되었으며 희석과 시료 전처리에 모두 사용되었습니다. 이하 'Tris 완충액' 이라고 칭합니다.
- NISTmAb RM 8671¹
- Vivaspin 500 원심분리 농축기, MWCO 10kDa(Sigma-Aldrich)
- Agilent HPLC 시료 바이알(애질런트 제품 번호 5182-0714)

완충액 교환 mAb 준비

각 Rituximab 시료 20mg, Trastuzumab 20mg, NISTmAb RM 8671 4mg을 Vivaspin 500 원심분리 농축기를 사용하여 Tris 완충액으로 완충 교환하였습니다. 원심분리 농축기는 제조사의 지침에 따라 사용해야 합니다.

각 완충액 교환 mAb의 농도는 크기 배제 크로마토그램(A₂₈₀) 총 피크 면적을 mAbs 제제의 알려진 피크 면적과 비교하여 계산되었습니다(Rituximab 및 NISTmAb RM 8671=10mg/mL, Trastuzumab=120mg/mL).

pH 스트레스 시료 준비

완충액 교환 mAbs는 Tris 완충액에서 1mg/mL로 희석되었습니다. 600µL 시료는 9µL(pH 2.4) 또는 7.8µL(pH 2.6)의 1M HCl를 첨가하여 일시적으로 산성화했습니다. 5 ~ 20분이 지난 뒤 시료는 동일한 1M NaOH로 중화되었으며 안정된 응집체 형성을 위해 37°C에서 밤새 배양했습니다. pH 2.4 또는 2.6 산성에 도달하기 위한 양은 Tris 완충액 5mL를 1M HCl로 적정하여 각각 측정되었습니다. 서로 다른 열량 측정에서 나타나듯이 Trastuzumab과 NISTmAb 응집에는 pH 2.4가 요구되며, 보다 덜 안정적인 Rituximab의 응집에는 pH 2.6으로 충분했습니다(3-5). 'pH 스트레스' 시료는 용해성 응집체를 주로 함유했으며 분석 전에 원심분리되지 않았습니다.

Shake 스트레스 시료 전처리

애질런트 HPLC 시료 바이알에는 Tris 완충액에 1mg/mL로 희석된 완충액 교환 Rituximab 900µL이 50% 채워졌습니다. 이 바이알은 바이알의 중심축을 기준으로 벤치탑 볼텍스 믹서를 사용해 앞뒤로 1,200RPM으로 진탕하여 난류를 일으키고 공기와 액체의 접촉을 늘렸습니다⁶. "Shake 스트레스" 시료는 비용해성 응집체를 함유했으며 10분 동안 15,000 xg로 원심분리하여 분석 전에 침전시켰습니다.

크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석 - 기기

Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC:

- Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert 펌프(G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert Multisampler (G5668A)
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 WR(G7115A), Bio-Inert 플로우 셀 포함(옵션 #028)

¹ NIST8671는 연구 용도로 개발되었습니다. 인간 및 동물의 섭취, 임상 시험, 치료의 용도가 아닙니다.

- Agilent AdvanceBio SEC 4.6x300mm, 300Å, 2.7µm 컬럼 (Agilent PL1180-5301)
- 애질런트 크로마토그래피 데이터 시스템, OpenLab CDS, 소프트웨어 버전 2.4

SEC는 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼 포함 Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC에서 표 1에 나타난 설정을 사용하여 수행되었습니다.

표 1. 크기 배제 크로마토그래피 설정.

파라미터	설정
컬럼 온도	실온(23°C)
저장 장치	실온(23°C)
이동상	50mM phosphate 완충액 + 150mM NaCl(pH 7.4)
유속(mL/분)	0.8
주입 부피(µL)	20
검출	UV 흡수, 220nm 및 280nm
참조 파장(nm)	360
수집 시간(분)	25
사후 시간(분)	10

표 2의 설정은 OpenLab CDS 2.4에서 크기 배제 크로마토그램을 적분하는데 사용됩니다(필요시 수동 적분 적용).

표 2. Openlab CDS 2.4 적분 설정.

파라미터	설정
Integrator 타입	ChemStation Integrator
기울기 감도	1.0
피크 폭	1.0
Area Reject	1.0
Height Reject	0.5
솔더 모드	드롭
Area % Reject	0.00
적분 시작 시간(분)	5.0
적분 중지 시간(분)	12.0
Tangent Skim 모드	표준
Tail Peak Skim Height Ratio	0.00
Front Peak Skim Height Ratio	0.00
Skim Valley Ratio	20.00
Baseline Correction 모드	고급
Peak to Valley Ratio	500.00

형광 기반 응집체 분석 - 기기, 재료 및 분석법

- Agilent Cary Eclipse Microplate 판독기(G9801AA)
- 흰색의 96-well 플레이트(애질런트 부품 번호 6610022300)
- 형광 염료 나트륨 3,3'-[[1,2-diphenylethene-1,2-diyl]bis(4,1-phenylene)]bis(oxy))bis(propene-1-sulfonate), (PEPBOPS), (애질런트 부품 번호 5799-0025).
- 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)
- Human Serum Albumin 20mg/mL 표준 용액(애질런트 부품 번호 5185-5989)
- Bis-ANS(Sigma Aldrich D41620)
- SYPRO Orange Protein Gel Stai(Sigma Aldrich S5692), 5,000배 농도

1.3mg PEPBOPS 가루를 Tris 완충액 2mL에서 재구성하여 1mM 원액을 만들고 실온, 어두운 조건에서 최소 2주 동안 두었습니다. Human Serum Albumin 75µg/mL의 양성 대조는 표준 용액을 Tris 완충액에 희석하여 준비하였습니다.

분석을 위해 1mM PEPBOPS 원액을 Tris 완충액에 희석하여 100µM의 시용액을 만들었습니다. 비교 실험을 위해 응집에 민감한 염료인 Bis-ANS 및 SYPRO Orange를 각각 Tris 완충액의 100µM 및 10x 시용액으로 준비했습니다. Bis-ANS 및 SYPRO Orange를 선택한 것은 이전에 플레이트 기반, 높은 처리량 응집체 분석 워크플로에 사용된 적이 있기 때문입니다(7,8).

100µL의 시용액을 흰색 96-well 플레이트의 각 웰에 넣고 응집된 mAb 시료 100µL를 첨가했습니다. well 당 최종 용량은 200µL이었으며 최종 염료 농도는 50µM(PEPBOPS + Bis-ANS), 5x(SYPRO ORANGE)였습니다.

광탈색을 피하기 위해 시료를 Cary Eclipse Microplate 판독기에서 형광 측정하기에 앞서 실온, 어두운 조건에서 15분 동안 배양했습니다. 표 3에 나타난 설정을 사용하여 데이터를 수집하였습니다. 그림 1은 분석 워크플로를 나타냅니다.

표 3. Cary Eclipse Microplate 판독기 설정

	PEPBOPS	Bis-ANS	SYPRO Orange
응용	고급 판독값		
들뜸(nm)	350	390	495
방출(nm)	475	500	580
슬릿 폭(nm)	5		
평균 시간(s)	0.5		
들뜸 필터	자동		
방출 필터	켜짐		
PMT 전압(v)	800		
액세서리	Wellplate 판독기		
플레이트 형태	96 Wells		

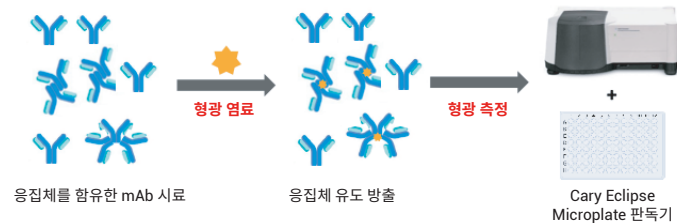


그림 1. 형광 기반 mAbs 응집체 분석 워크플로. PEPBOPS 형광 염료는 항체 응집체에 노출된 소수성 패치와 연결되어 입사광으로 자극되면 응집체 유도 방출이 일어납니다. 형광 신호는 Cary Eclipse와 Microplate 판독기 액세서리로 분석됩니다.

데이터 분석

기술적 반복 형광 판독은 Tris 완충액과 형광 염료만 함유하고 mAb는 함유하지 않은 웰의 평균 형광으로 평균화하고 바탕용액을 제거하였습니다. 최적의 실행 간 재현성을 위해 바탕용액을 제거한 형광 값은 양성 대조군에 대하여 정규화되었습니다. 그런 다음, 분석의 직선성을 위해 SEC로 측정된 고분자량 응집체 백분율에 대한 정규화된 형광 값을 나타내었습니다.

분석 정확도를 평가하기 위해 예상치의 표준 오차는 다음 공식에 따라 서로 다른 응집체 범위(1~3%, 3~5%, 5~9%)에서 계산되었습니다.

$$\text{예상 표준 오차} = \sqrt{\frac{\sum (\text{SEC 응집체 \%} - \text{형광 예측 응집체 \%})^2}{N}}$$

N은 각 응집체 범위의 시료 수입니다.

결과 및 토의

pH stressed mAb

SEC 분석에 따르면 5 ~ 20분의 일시적 산성화는 Rituximab, Trastuzumab, NISTmAb에서 저분자량 조각 이온의 비율에 큰 영향을 미치지 않고 고분자량(HMW) 응집체의 비율을 높였습니다 (그림 4A~4C). 응집의 정도는 적용된 pH에 따라 달랐으며 더 안정적인 Trastuzumab 및 NISTmAb 항체는 응집을 유도할 때 Rituximab보다 더 강한 산성 조건을 필요로 했습니다.

응집은 적용된 스트레스 기간의 영향도 받았습니다(표 2D). 스트레스를 가하지 않은 Rituximab은 1.2±0.3% HMW 응집체에서 스트레스를 가한 5분 뒤 4.0±0.5%로, 10분 뒤 5.2±0.8%, 20분 뒤 6.1±0.5%로 증가했습니다. 가해진 스트레스는 대부분 용해성 응집체를 산출했으며 총 피크 면적에 눈에 띄는 저하는 없었습니다.

형광 측정에는 PEPBOPS, Bis-ANS (7) 및 SYPRO Orange (8) 등 응집체에 민감한 염료를 사용하여 mAb 시료에서 응집 정도를 빠르게 예측할 수 있습니다(그림 3A). 정확한 매커니즘은 다르지만 이 염료들은 일반적으로 소수성 패치를 mAb 응집체와 연결하여 형광 강도 또는 방출 파장의 변화를 유도함으로써 형광 측정기로 측정 가능하게 만듭니다(9). 이 분석에 형광 분광 광도계를 사용하면 보다 유연하게 분석법을 개발하고 분석법을 영구 얼라인먼트되어 있어 빨리 설치 가능한 Microplate 판독기 액세서리로 쉽게 전송할 수 있습니다.

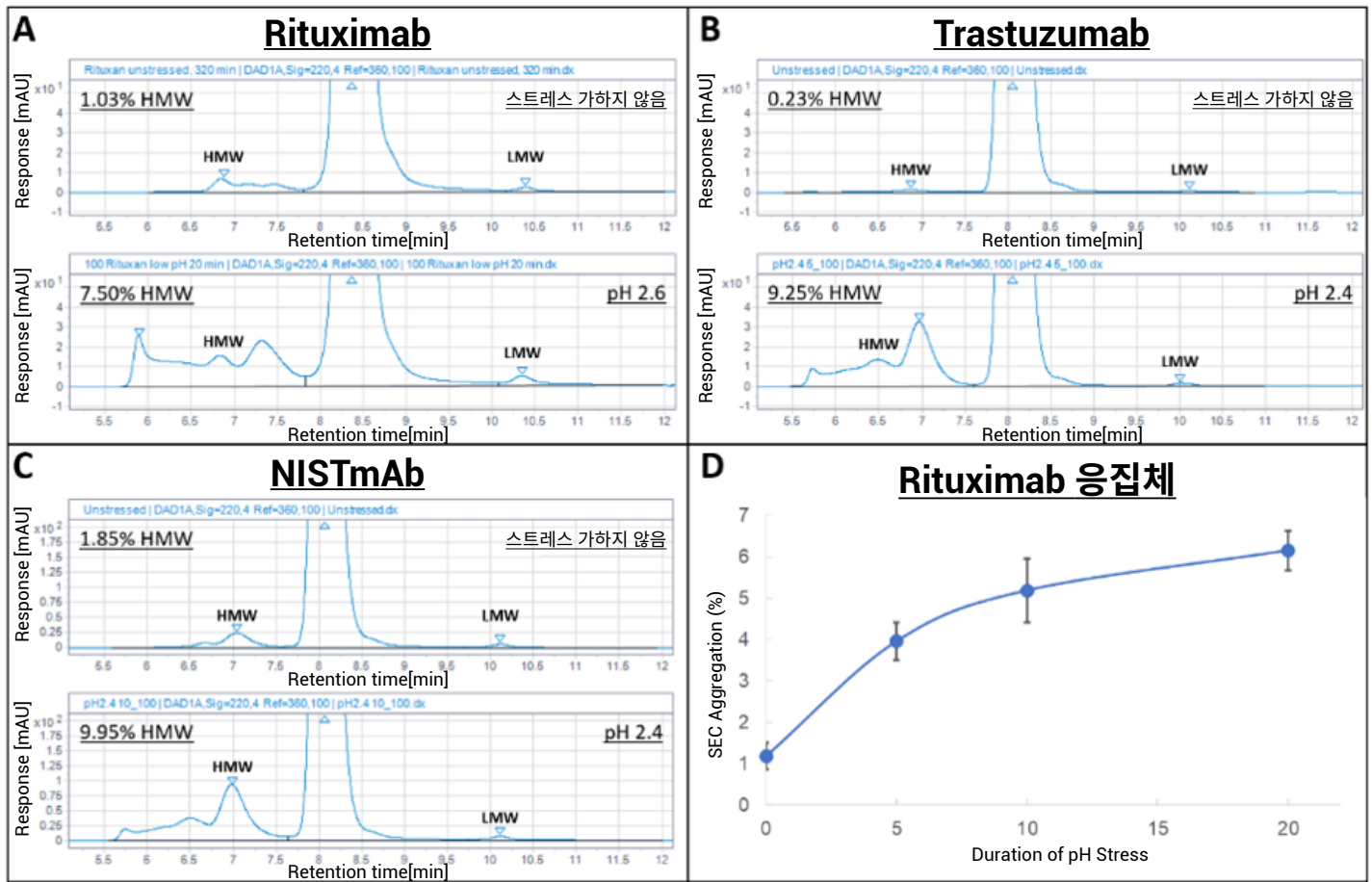


그림 2: pH-stressed Rituximab, Trastuzumab, NISTmAb의 SEC (A)~(C) 스트레스를 가지지 않은 mAbs(상단 패널)의 SEC-UV 트레이스를 pH 2.4 또는 2.6의 일시적 스트레스에 노출된 mAbs(하단 패널)과 비교한 표. (D) 5, 10, 20분의 pH 스트레스로 Rituximab에서 유도된 HMW 응집체의 평균 백분율. 오차 막대는 표준편차를 나타냄(N = 8)

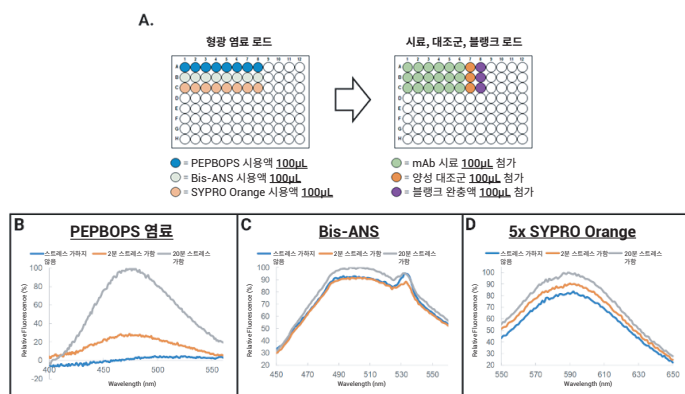


그림 3. pH 스트레스를 가한 Rituximab 시료에서 응집체 민감 염료의 형광 스펙트럼. (A) 시료, 양성 대조군 바탕용액 well의 로딩을 보여주는 그림. 스트레스를 가지지 않거나, 약하게(2분), 강하게(20분) 스트레스를 가한 (B) PEPBOPS, (C) Bis-ANS, (D) SYPRO Orange 시료의 형광 스펙트럼. 스펙트럼은 20분 동안 스트레스를 가한 시료의 피크 방출 강도에 대해 정규화되었습니다.

형광 기술은 낮은 배경 신호와 높은 감도 및 특이성을 가질 것으로 기대됩니다. 그러나 실제로 형광 염료는 단량체 mAbs에도 어느 정도 연결되어 상당한 백그라운드 신호를 일으킬 수 있습니다. 그림 3B ~ 3C는 스트레스를 가지지 않거나, 약하게(2분), 강하게(20분) 스트레스를 가한 Rituximab 시료에서 PEPBOPS, Bis-ANS, SYPRO Orange가 나타낸 형광 스펙트럼을 보여줍니다. 스트레스를 가지지 않은 Rituximab 시료에서 PEPBOPS는 Bis-ANS나 SYPRO Orange보다 훨씬 낮은 배경 형광을 보였으므로 스트레스를 가한 시료에서 응집체에 더 민감하다고 할 수 있습니다.

추가적인 분석 결과 475nm에서의 PEPBOPS 형광과 mAb 시료의 HMW 응집체 백분율 간에 강한 선형 상관관계가 나타났습니다. 그림 4A ~ 4C는 ~1%부터 ≥ 16%까지 폭넓은 응집체 값에서 Rituximab, Trastuzumab, NISTmAb에 대해 선형 관계를 보임을 나타냅니다. 그림 4D는 비용해성 응집체를 함유한 시료의 PEPBOPS 형광이 용해성 응집체만 연결한 경우보다 더 크다는

것을 나타내며, 이는 염료를 비용해성 응집체에 연결하여 이를 검출할 수도 있음을 시사합니다. Shake 스트레스를 가한 시료는 pH 스트레스를 가한 시료와 매우 유사한 SEC 크로마토그램을 보였으나 비용해성 응집체 형성(데이터 표시되지 않음)으로 인한 총 피크 면적의 감소에서만 차이를 보였습니다.

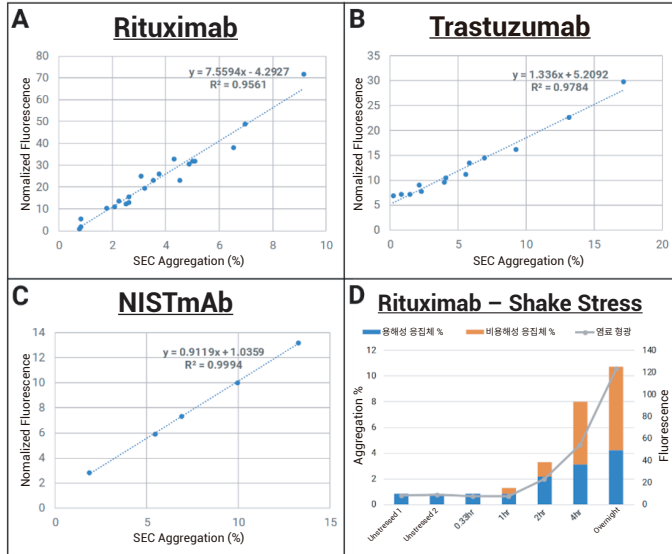


그림 4. PEPBOPS 형광은 mAb 시료에서 HMW 응집체와 높은 상관관계를 갖습니다. PEPBOPS는 (A) Rituximab, (B) Trastuzumab, (C) NISTmAb 시료에서 $R^2 \geq 0.95$ 의 선형 반응을 보였습니다. (D) 용해성 및 비용해성 응집체 혼합물을 함유한 Rituximab 시료의 PEPBOPS 형광. 표시된 데이터는 N=3 Rituximab 독립 실험, N=2 Trastuzumab 독립 실험, NN=1 ISTmAb 독립 실험에서 얻은 것입니다.

다음으로 의약품 개발에서 자주 수행되는 바이오시밀러 mAbs의 응집체 예측 작업에서 본 워크플로의 지속가능성을 평가했습니다. 그림 5A의 회귀선은 새로운 N=4 독립 실험 세트에서 Rituximab(Ristova 및 Reditux)의 형광 기반 mAb 응집체 예측 작업을 검량하기 위해 사용되었습니다. 이 검량은 두 mAbs의 번역 후 변형에 입증된 차이가 상당함에도 양쪽에 모두 적용 가능했습니다(10). 그림 5A 및 5B는 형광 기반 예측 결과를 각 시료의 실제 HMW 수준에 대해 연결한 것입니다. 두 플랫폼은 기울기가 1, 절편이 0에 가까워 두 mAbs에 대한 본 워크플로의 정확도를 보여줍니다. 그림 5C는 형광 기반 예측에 시료 응집 정도에 따른 $\pm 0.54\% \sim \pm 0.83\%$ 의 표준 오차가 있음을 보여줍니다. 이 오차는 반정량 예측에서 허용되는 수준입니다(8). 유사한 실험에서 Trastuzumab 및 NISTmAb에 대한 표준 오차는 각각 $\pm 0.61\%$, $\pm 0.81\%$ 이었습니다(데이터는 표시되지 않음).

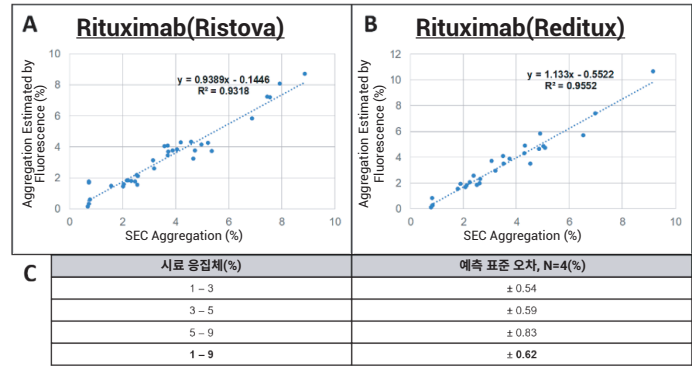


그림 5. 바이오시밀러 mAbs에서 형광 기반 응집체 예측의 정확도. (A) Innovator Rituximab(Ristova)와 (B) 바이오시밀러 Rituximab(Reditux) 형광 기반 응집체 예측치는 N=4 독립 실험에서 SEC로 판정된 각각의 실제 응집체 수준에 대하여 연결되었습니다. (C) 두 항체에서 서로 다른 응집체 백분율에 대한 형광 기반 예측의 표준 오차.

형광 염료를 사용하는 경우 공통되는 우려는 염료 자체가 시료 응집에 영향을 미쳐 측정 아티팩트로 이어질 수 있다는 것입니다. 그림 6은 PEPBOPS가 다양한 응집 범위에 걸친 여러 mAb 시료내 응집체 프로파일(그림 6A) 및 총 HMW 응집 백분율(그림 6B)에 영향을 거의 미치지 않았으며, 따라서 이 염료가 응집 측정에 혼란을 불러일으킬 가능성이 낮음을 보여줍니다.

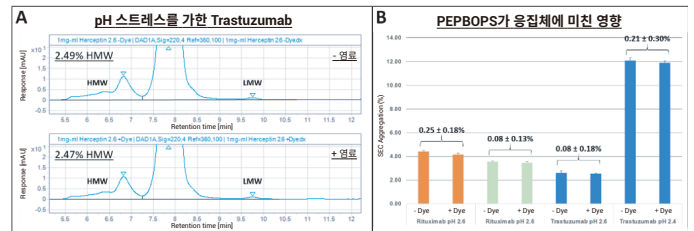


그림 6. PEPBOPS는 mAb 응집에 최소한의 영향을 미칩니다. (A) PEPBOPS 불포함(상단 패널) 및 포함(하단 패널) Trastuzumab의 대표적인 크로마토그램. (B) PEPBOPS 포함 및 불포함 Rituximab과 Trastuzumab 시료 4개에서 HMW 응집체의 백분율. 위 막대 그래프 각 쌍의 볼드체 숫자는 두 조건 사이의 HMW 응집체 백분율 차이를 나타냅니다.

결론

Cary Eclipse Microplate 판독기 및 PEPBOPS 염료는 mAbs 응집체의 예측에서 처리량이 높은 워크플로임이 입증되었습니다. 이 워크플로는 고분자량 응집체에 대한 반정량 예측을 시료당 약 5초 이내에 제공했습니다. 이는 약 5분이 걸리는 기존 측정 기술과 대비됩니다(2).

본 워크플로는 두 치료용 mAbs(Rituximab 및 Trastuzumab)와 함께 표준물질 NISTmAb RM 8671로 시험하였습니다. 시험 결과는 크기 배제 크로마토그래피를 사용한 동일 시료의 직교 측정과 우수한 상관관계를 보였습니다. 본 연구는 PEPBOPS 염료가 형광 프로브로서 시료에 첨가되었을 때 응집체에 영향을 미치지 않는다는 것도 입증했습니다.

본 워크플로는 다음과 같은 장점을 갖는 것으로 입증되었습니다.

- Bis-ANS 및 SYPRO Orange 기반 분석보다 훨씬 낮은 배경, 더 높은 감도
- 형광 신호와 ~1%에서 $\geq 16\%$ ($R^2 \geq 0.95$) 이내 고분자량 응집체의 강한 선형 상관관계
- $\pm 0.62\%$ 응집체 정확도(N=4)
- PEPBOPS가 시료의 응집 프로파일 또는 응집체 성분에 큰 영향을 미치지 않음

본 워크플로는 클론 선택, 후보물질 최적화 또는 제형 개발 시험에서 응집된 시료의 빠른 식별에 유용할 것입니다. SEC에 대한 프론트 엔드로 사용될 경우 본 워크플로는 스크리닝 시간을 크게 줄여서 높은 시료 로드량으로 전반적인 생산성을 높일 것으로 기대됩니다. 옵션형 Microplate 판독기가 탑재된 형광 분광 광도계를 사용하면 분석법 개발 및 높은 스크리닝 처리량에서 유연성을 확보할 수 있습니다.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 4월 9일, 한국에서 인쇄
5994-1745KO
DE 8755671296

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

참고 문헌

1. Eon-Duval, A., Broly, H. & Gleixner, R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnol. Prog.* 28, 608–622 (2012).
2. High-Resolution, High-Throughput Size Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal Antibodies. Agilent publication [5994-0828EN](#).
3. Saro, D. et al. Developability assessment of a proposed NIST monoclonal antibody. in *State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study*, 329–355 (ACS Publications, 2015).
4. Lee, K. H. et al. Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product. *MABs* 10, 380–396 (2018).
5. López-Morales, C. A. et al. Physicochemical and Biological Characterization of a Biosimilar Trastuzumab. *Biomed Res Int*, (2015).
6. Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A. & Bunjes, H. Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74, 139–147 (2010).
7. Li, Y., Mach, H. & Blue, J. T. High throughput formulation screening for global aggregation behaviors of three monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 100, 2120–2135 (2011).
8. He, F. et al. Detection of IgG aggregation by a high throughput method based on extrinsic fluorescence. *J Pharm Sci*, 99, 2598–2608 (2010).
9. Hawe, A., Sutter, M. & Jiskoot, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.*, 25, 1487–1499 (2008).
10. A Comparative Study of the Intact Mass, Subunit Mass and Released Glycans of Two Rituximab Biosimilars Using High Resolution LC-MS. Agilent publication [5994-1653EN](#).