

# SEC와 수용성 이동상을 이용한 mAb 및 ADC 응집(Aggregation)의 정량화

Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC 시스템 및 AdvanceBio SEC 300Å, 2.7µm 컬럼

## 응용 자료

생물 의약품 및 바이오시밀러

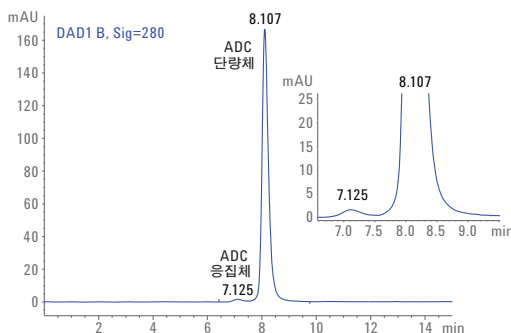
### 저자

M.Sundaram Palaniswamy  
Agilent Technologies Pvt Ltd  
인도 방갈로르

### 개요

크기 배제 크로마토그래피(SEC: Size Exclusion Chromatography)는 단일클론성항체 및 그 유도체를 비롯한 바이오 치료용 단백질 시료에서 단량체(monomers), 이합체(dimers), 응집체(aggregates) 및 잠재적 분해물(degradants)을 모니터링하기 위한 중요한 도구입니다. 응집은 중요한 품질 속성으로 간주되기 때문에 정량화가 필요합니다.

이 응용 자료에서는 Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼 및 Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC를 이용하여 바이오 치료용 mAb 및 항체 약물 결합체(ADC: antibody drug conjugate)의 응집체(aggregate)를 정량화하기 위한 간단하고 감도가 높은 분석법을 설명합니다. 이 분석법은 유기 변형제(organic modifier)를 추가하지 않고 동일한 수용성 이동상을 사용하여 mAb와 소수성이 더 강한 ADC를 분석합니다. 또한 이 최적화된 분석법은 pH/온도 stress에 의해 생성된 응집체(aggregate) 및 분해물(degradants)을 모니터링할 수 있습니다. 기기의 부식을 방지할 수 있는 이 간단하고 재현 가능한 분석법은 바이오 제약 산업에서 mAbs 및 ADC의 일상적인 QA/QC 분석에 적합합니다.



Agilent Technologies

## 소개

치료용 단백질은 발현, 재접힘, 다운스트림 공정, 제형, 멸균 및 보관과 같은 모든 개발 단계 동안에 응집되고 분해될 수 있습니다. 또한, 소수성 페이로드(hydrophobic payload)와의 결합을 통한 ADC 형성도 소수성 작용 응집(hydrophobicity-driven aggregation)을 강화합니다. 비록 응집체/분해물이 낮은 농도로 존재하지만, 생물학적 치료제의 품질에 큰 영향을 주기 때문에 활성 상실, 용해성 감소 및 면역원성 증가로 이어질 수 있습니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 단백질 응집을 특성화하기 위해 사용되는 표준 분석법입니다. 여기서, Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7μm 컬럼을 사용하여 치료용 mAb 및 ADC를 분리, 정량화하고 무결성을 모니터링하는 이점을 설명합니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 SEC 분석을 위한 혁신적인 기술입니다. 이 컬럼은 애질런트가 혁신적인 실리카 입자와 고유한 결합상을 이용해 설계 및 제조했으며, 이동상에 유기 변형제를 추가할 필요 없이 다양한 치료 유형에 분리능과 크기 분리 능력(size separation)을 제공합니다. 단일클론성항체와 소수성이 더 강한 ADC의 분석에는 동일한 수용성 이동상을 사용합니다.

## 재료 및 방법

### 장비

애질런트에서는 최대 압력이 600bar이고 완전한 생체적합성을 지닌 Agilent 1260 Infinity Bio inert Quaternary LC 시스템을 사용했습니다. 그 모듈의 구성은 다음과 같습니다:

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 펌프(G5611A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-inert 고성능 자동 시료 주입기 (Autosampler)(G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 시리즈 항온 장치(G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 항온 컬럼 장치(TCC: Thermostatted Column Compartment), 생체 비활성 click-in 가열 소자 포함(G1316C, 옵션 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL(10mm 생체 비활성 표준 플로우 셀을 포함한 G1315D)

### 소프트웨어

Agilent ChemStation 개정판 B.04.03(이상)

## 분석 조건

컬럼:	Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7μm(p/n PL1180-5301)
이동상:	인산염 완충 생리식염수(PBS), 50mM 인산나트륨(150mM 염화나트륨 포함), pH 7.4
TCC 온도:	실온
주입량:	10μL
유속:	0.8mL/분
검출:	UV, 220/280nm

## 시약, 시료 및 재료

Trastuzumab 및 항체 약물 결합체(T-DM1)는 현지 약국에서 구입하여 제조업체 지침에 따라 보관되었습니다. PBS, 염산 및 수산화나트륨은 Sigma-Aldrich사로부터 구입했습니다. 모든 화학품과 용매는 HPLC 등급이며, Milli-Q 정수 시스템 (Millipore Elix 10, 미국)으로 얻은 초순수를 사용하였습니다.

## 직선성 및 범위

검량선은 농도 범위가 15.625 ~ 2,000μg/mL인 trastuzumab과 ADC의 8가지 표준 농도로 구성되었습니다.

## 정량 한계(LOQ) 및 검출 한계(LOD)

LOD 및 LOQ 측정에는 Trastuzumab 및 ADC(T-DM1)가 사용됩니다. 신호 대 잡음비(S/N) > 3일 때의 생체 분자 농도를 LOD로 간주하고 S/N > 10일 때의 생체 분자 농도를 LOQ로 간주합니다.

## 절차

이동상(10μL)을 Blank로 주입한 후, 각 직선성 수준 시료를 3회 반복 주입합니다. 각 수준의 면적 및 머무름 시간(RT)을 이용하여 표준 편차(SD) 및 상대 표준 편차(RSD %) 값을 계산하며, 낮은 직선성 수준 주입을 통해 LOD 및 LOQ를 설정합니다. 각 직선성 수준의 평균 면적으로 분석물질의 농도에 대한 플롯을 그려 단량체 검량선을 결정합니다.

## Trastuzumab 및 ADC 응집체의 전처리

이동상으로 단일클론성항체를 최종 농도 2mg/mL까지 희석하여 Trastuzumab 및 ADC 응집체를 전처리합니다. pH stress 테스트는 앞에서 설명한 바와 유사하며, 다만 약간의 수정 [1]이 따릅니다. 간단히 말해서, 시료 용액에 1M HCl을 한 방울씩 천천히 추가하여 pH를 6.0에서 1.0으로 변화시킵니다. 그런 다음 1M NaOH를 추가하여 pH를 10.0으로 조절한 후, 마지막으로 1M HCl을 추가하여 pH를 다시 6.0으로 조절했습니다. pH 변화 사이에 약 1분의 대기 시간이 있으며, 동시에 500rpm의 회전 속도로 계속 교반합니다. 마지막으로 얻은 용액을 60°C에서 60분 동안 배양합니다.

## 결과 및 토의

### 분리 및 검출

응집체, 단량체, 이합체 및 고응집체의 SEC 정량화를 위해 이동상이 시료 구성에 영향을 주지 않는 것이 중요합니다. 환경 조건이 응집의 정도를 변화시킬 수 있기 때문에, 중성 pH와 저농도 염의 조건과 수용성 이동상에서 SEC 분리를 완성해야 합니다. 그림 1은 단백질에 자주 사용되는 크로마토그래피 조건(인산염 완충 생리식염수, pH 7.4)에서 AdvanceBio SEC 컬럼을 이용하여 15분 내에 치료용 Intact trastuzumab mAb를 분리하는 우수한 능력을 보여줍니다. 피크는 대칭성을 가지며 mAb의 분자량과 일치하는 머무름 시간에 용리되었으며, 이는 분리가 크기를 기준으로 하고 2차 상호 작용은 없었다는 것을 나타냅니다. 그림 1의 확대 영역은 또한 소량의 응집체가 존재함을 나타냅니다. 일찍 용출되거나 늦게 용출되는 피크(early or late eluting peaks)가 존재하지 않음은 시판된 mAb가 균일하게 전처리되고 응집이나 분해가 없음을 설명합니다.

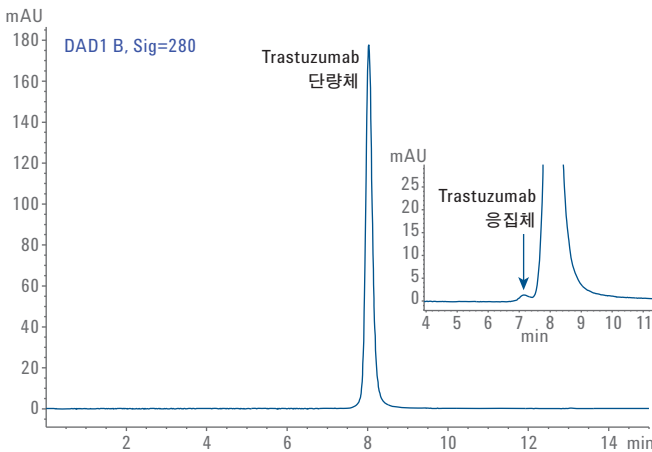


그림 1. SEC 프로파일: (A) Intact trastuzumab (B) Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼에서의 trastuzumab 응집체를 보여주는 확대 영역

### ADC SEC

수용성 이동상과 시판된 SEC 컬럼을 이용한 대부분의 공개된 ADC SEC 분석법은 피크 형태가 불충분하며 단량체의 결합체와 응집체간의 분리능이 완전하지 않습니다. 이러한 결과는 소수성 페이로드와 고정상의 비특이 상호 작용 때문이었습니다. 2-프로판올 15%를 추가하면 이 영향을 극복할 수 있는 것으로 증명되었습니다[2]. 수용성 이동상과 AdvanceBio SEC 컬럼을 이용하여 ADC T-DM1을 분석할 경우, PBS는 피크의 대칭성과 단량체와 응집체 사이의 우수한 분리능을 제공하며, 이는 소수성 약물과 고정상 사이에 비특이적 상호 작용이 없음을 나타냅니다(그림 2).

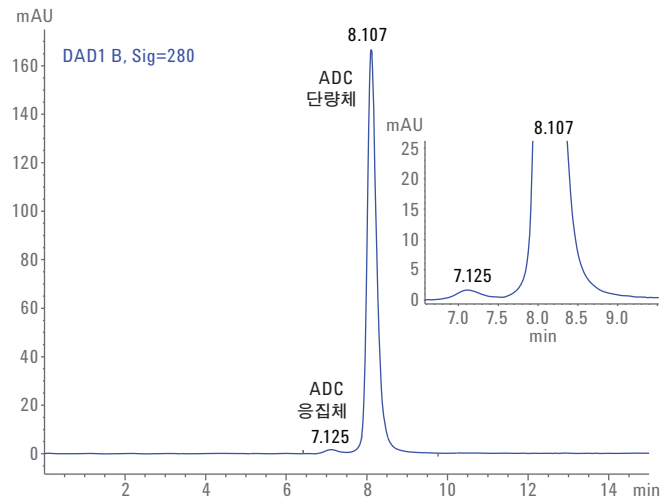


그림 2. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 통한 Intact T-DM1(ADC)의 SEC 프로파일(이동상: PBS, pH 7.4)

### 머무름 시간과 면적의 정밀도

표 1은 trastuzumab mAb 및 ADC 분석의 6회 반복 주입을 통해 평균 머무름 시간과 면적 RSD를 보여줍니다. 머무름 시간과 피크 면적 상대표준편차(RSD)는 각각 0.04 및 1% 미만이며, 이는 분석법의 우수한 재현성과 이에 따른 시스템의 정밀도를 입증하는 것입니다.

표 1. 머무름 시간 및 피크 면적 정밀도(n = 6)

시료	머무름 시간		피크 면적	
	평균(분)	상대표준편차	평균(mAU/분)	상대표준편차
Trastuzumab innovator	8.034	0	100	0
ADC	8.106	0.005	98.91	0.33

## 검출 한계 및 정량 한계

trastuzumab 및 ADC에 대한 LOD와 LOQ는 각각 15 $\mu$ g/mL 및 31 $\mu$ g/mL이며, 이는 분석법의 높은 감도를 보여줍니다. 관찰된 trastuzumab과 ADC의 LOD 및 LOQ 값은 표 2에, LOD, LOQ 및 Blank의 중첩 크로마토그램은 그림 3에 나와 있습니다.

표 2. LOD, LOQ 및 S/N 결과(n = 3)

농도( $\mu$ g/mL)	S/N	평균 면적
<b>Trastuzumab</b>		
15.625 (LOD)	7.8	12.62
31.25 (LOQ)	21.4	29.16
62.5	32.7	60.74
<b>ADC</b>		
15.625 (LOD)	10.5	15.20
31.25 (LOQ)	15.5	37.89
62.5	37.9	80.24

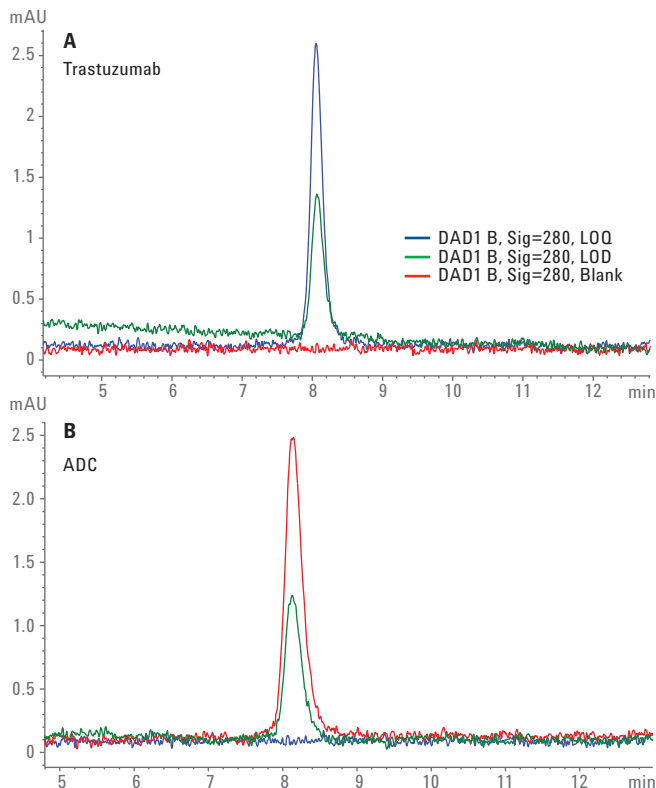


그림 3. LOD 및 LOQ 농도에서의 trastuzumab, ADC 및 blank의 중첩 크로마토그램

## 직선성

면적 감응도와 trastuzumab/ADC의 농도(LOQ 수준으로부터 본 연구의 최고 농도 수준까지)를 이용하여 trastuzumab 및 ADC의 선형 곡선을 작성합니다. 정확도 결과는 표 3에, 12.5 ~ 2,000 $\mu$ g의 농도 범위에서 그려진 trastuzumab/ADC의 선형 곡선은 그림 4에 나와 있습니다.

표 3. trastuzumab 및 ADC의 직선성 범위(n = 3)에 대한 요약

Trastuzumab		ADC	
농도( $\mu$ g/mL)	평균 면적	농도( $\mu$ g/mL)	평균 면적
15.625	16.4	15.625	22.6
31.25	30.6	31.25	37.9
62.5	64.4	62.5	91.2
125	140.7	125	178.8
250	277	250	348.4
500	538.2	500	704.7
1000	1095	1000	1400
2000	2179	2000	2821

## 응집/분해 분석

애질런트에서는 응집체와 분해물의 모니터링을 위해 SEC를 사용하여 천연 및 forced-stress trastuzumab와 ADC를 비교했습니다. 크로마토그래피 실행에서, 단량체 형태 이전에 용출된 피크는 응집체로 간주되며, 그 후에 용출된 피크는 분해물로 간주됩니다[3].

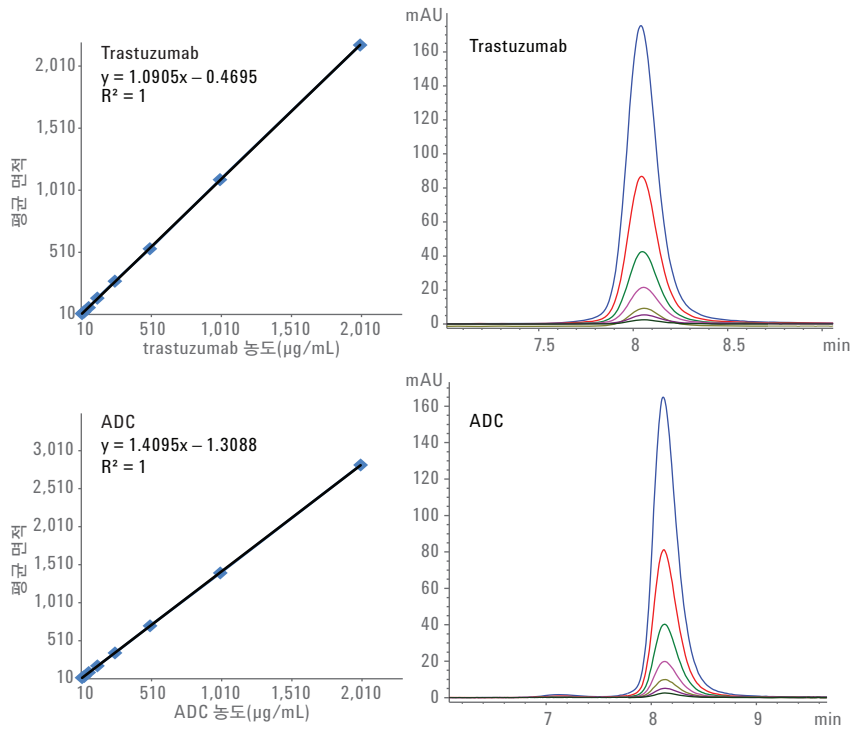


그림 4. 우수한 계수 값을 보여주는, 농도 범위가 15.62 ~ 2,000 $\mu$ g/mL인 trastuzumab 및 ADC의 8가지 표준 농도로 구성된 선형 곡선 직선성 범위의 중첩 크로마토그램도 나와 있습니다.

그림 5와 6에 나오는 pH/열 유도 응집체의 크로마토그램은 AdvanceBio SEC 컬럼이 응집체뿐만 아니라 분해된 trastuzumab과 ADC도 분리 및 검출할 수 있음을 보여줍니다. Intact, 응집체 및 분해물은 서로 뚜렷하게 분리되었습니다.

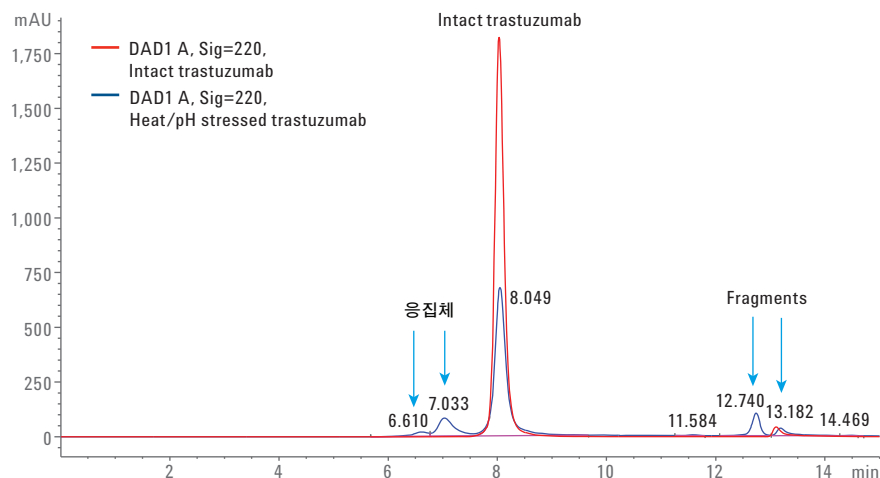


그림 5. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7 $\mu$ m 컬럼을 이용한 천연(대조; 빨간색 선) trastuzumab과 2mg/mL pH/heat stressed trastuzumab의 중첩 크로마토그램

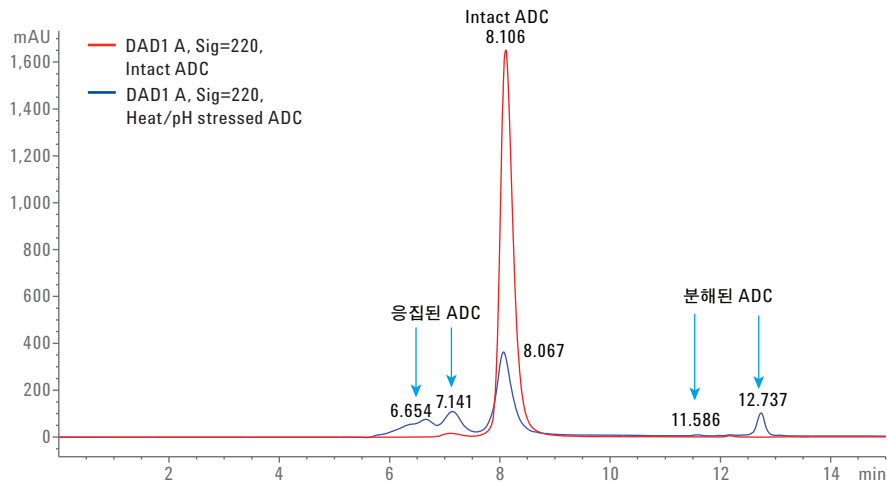


그림 6. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 이용한 천연 (대조; 빨간색 선) ADC와 2mg/mL pH/heat stressed ADC의 중첩 크로마토그램

## Trastuzumab 및 ADC 응집과 분해의 정량화

trastuzumab 및 ADC의 응집체와 분해물에 대한 면적 백분율을 기준으로 한 상대 정량분석 결과는 표 2에 요약되어 있습니다.

이 데이터에서 알수 있다시피, trastuzumab과 ADC의 응집체 및 분해물의 농도는 증가하였으며 단량체 형태의 농도는 각각 71% 및 54%로 감소하였습니다. 비록 이러한 결과가 고무적이긴 하지만, 생물학적 활성 데이터의 뒷받침 하에서만 응집/분해의 효능 손실에 이를 수 있습니다.

표 4. trastuzumab과 ADC 단량체, 응집체 및 fragments의 머무름 시간 및 피크 면적

Intact trastuzumab		Stressed trastuzumab	
머무름 시간(분)	면적 %	머무름 시간(분)	면적 %
7.14	0.140	6.61	2.8
8.034	96.8	7.033	13.26
13.10	3.0	8.03	71.83
		12.74	7.65
		13.18	4.0
Intact ADC		Stressed ADC	
7.115	2	6.654	19
8.106	97.8	7.141	17.8
		8.06	54.92
		11.58	0.2
		12.73	7.5
		14.46	0.2

## 결론

애질런트에서는 치료용 mAb trastuzumab/ADC T-DM1의 순도와 안정성을 모니터링하고 분석법을 개발하는 여러 가지 우수한 도구를 출시했습니다. 먼저 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용하여 간단한 고분리능 mAbs 분리를 개발했습니다. 그 중에서도 특히, AdvanceBio SEC 컬럼은 이동상에 유기 변형제를 사용하지 않고도 소수성 ADC를 효과적으로 분리할 수 있습니다. 이 분석법의 면적 및 머무름 시간 정밀도가 우수하며, 이는 분석법의 신뢰성을 증명합니다. 농도 범위가 15 ~ 2,000µg/mL인 8개 mAb 및 ADC 표준 농도로 작성한 선형 곡선은 우수한 선형 값 계수를 가지며, 이는 분석법이 정량성과 정확성이 우수함을 나타냅니다. mAb와 ADC에 대한 LOD 및 LOQ는 각각 15µg/mL 및 25µg/mL이며, 이는 이 분석법의 높은 감도를 보여줍니다. 또한, mAb와 ADC에 대한 stress 시험은 AdvanceBio SEC 컬럼이 면적 백분율에 기초하여 응집체와 분해물을 분리, 검출 및 정량화할 수 있음을 증명했습니다. Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quarternary LC의 생체 비활성과 부식을 방지할 수 있는 이 간단하고 재현성 있는 분석법은 바이오 제약 산업에서 단일클론성항체/ADC의 QA/QC 분석에 적합합니다.

## 참조 문헌

1. Başak Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm. Res.* **2010**, 27, 2197-2204.
2. Wakankar, A.; Yan Chen; Gokarn, Y.; Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs* **2011**, 3:2, 161-172.
3. Rodriguez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, 2005.

## 추가 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다.

애질런트 제품 및 서비스에 대한 더 자세한 정보는 웹 사이트 [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)에서 확인하실 수 있습니다.

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

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015

한국에서 발행

2015년 10월 16일

5991-6303KO

서울 강남구 역삼로 542 신사제2빌딩 2층 우)06187

한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부

고객지원센터 080-004-5090

[www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)



**Agilent Technologies**