고분리능 SEC를 이용한 Rituximab 응집체(Aggregates) 및 Fragments의 분리와 정량화

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

응용 자료

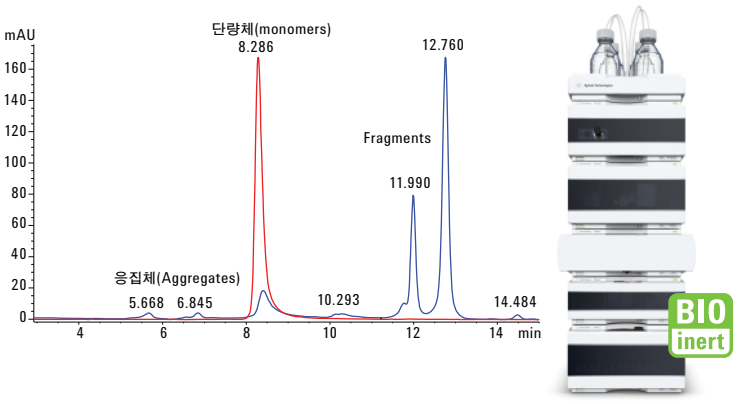
생물 의약품 및 바이오시밀러

저자

M.Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
인도 방갈로르

개요

단일클론성항체 응집은 생성물 및 환경적 요소를 비롯하여 여러 가지 메커니즘으로부터 발생할 수 있습니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC: Size Exclusion Chromatography)는 단일클론성항체 치료법의 응집도(aggregation)와 조각화 수준(fragment levels)을 확인하고 정량화하기 위한 표준 방법입니다. 이 응용 자료의 초점은 forced-stress 실험을 통해 얻은 바이오시밀러 및 Innovator Rituximab의 Intact, 응집체(Aggregates) 및 Fragments에 대한 고분해능 분리와 정량화를 보여주기 위한 것입니다. 이러한 분리와 정량화는 Agilent 1260 Infinity Quaternary Bio-inert LC와 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 통해 이루어졌으며, 컬럼의 검량은 분자량 마커를 이용해 수행되었습니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 응집체(aggregate)/분해물(degradants) 모니터링을 위해 고감도 및 고분해능 분리를 제공하며, 고분리능과 고감도가 필수적인 응용 분석에 이상적입니다.



Agilent Technologies

소개

크기 배제 크로마토그래피(SEC: Size Exclusion Chromatography)는 치료용 mAbs에서 단량체(Monomer), 저분자량(LMW) 및 고분자량(HMW) 변이체를 분리하기 위해 널리 수용되는 분석 방법입니다. 고유한 조건에서 SEC는 단량체(monomers)와 그 변이체의 크기에 기반한, 충진 물질의 pore로 확산되는 속도 차이를 이용해 분리합니다. mAb 기반 의약품의 성공적인 개발을 위해서는 물리적 및 화학적 분해 방식을 포함한 강제 분해 실험에서 얻은 응집체 및 Fragments에 대한 평가도 필요합니다. 바이오 의약품의 개발에서 응집체는 면역원성의 강화와 관련이 있고 안전성과 효능에 영향을 미치기 때문에 크기는 아주 중요합니다. 중요한 과제는 그러한 변이체를 분리하고 모니터링할 수 있는 SEC 분석법을 확인하는 것입니다. 여기에서 애질런트는 SEC 분석을 위한 획기적인 기술 — Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용한 분석법 중 하나를 예로들어 그 이점을 설명할 것입니다. 이 컬럼은 고유한 2.7µm 실리카 입자와 결합상을 이용하여 mAbs와 그 질량 변이체의 고분해능 분리를 제공합니다. 이 분석법은 머무름 시간 및 면적 정밀도가 우수하여 사용한 컬럼 및 Bioinert LC 시스템의 적합성을 증명합니다.

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

Innovator 및 바이오시밀러 Rituximab, Cetuximab, Trastuzumab 및 ADC는 현지 약국에서 구입하여 제조업체의 지침에 따라 보관되었습니다. PBS, 염산 및 수산화나트륨은 Sigma Aldrich사로부터 구입했습니다. 모든 화학품과 용매는 HPLC 등급이며, Milli Q 정수 시스템(Millipore Elix 10, 미국)을 통해 얻는 초순수를 사용하였습니다.

AdvanceBio SEC 컬럼의 검량

AdvanceBio SEC 컬럼은 여러 표준물질(단백질 응집체, 티로글로불린(670kDa), g-글로불린(158kDa), 오브알부민 (44kDa), 미오글로빈(17kDa) 및 비타민 B12(1.35kDa))의 용리 부피를 측정하여 검량되었습니다. 표준물질의 분자량 로그 값과 용리 부피에 대한 플롯을 작성하여 시료의 Equivalent 분자량을 확인합니다.

절차

이동상(10µL)을 Blank로 주입한 후, Intact 및 Stressed mAbs를 6번 반복 주입하여 면적과 머무름 시간(RT) 편차를 계산합니다.

Rituximab 응집체의 전처리

이동상으로 단일클론성항체를 최종 농도 2mg/mL까지 희석하여 mAbs 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 조절합니다. 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

AdvanceBio SEC 300Å 컬럼은 분자량을 알고 있는 일련의 표준 단백질을 이용하여 검량되었습니다(그림 1). 컬럼에서 5.748분에 용리된 단백질 마커의 표준 단백질 응집체(void peak)를 사용하여 V_0 = 4.59 (mL)에 상응하는 틈새 부피(void volume)를 계산했습니다. 컬럼에서 분리된 단백질의 검량선은 선형 관계를 보이며, 분석된 단백질 범위(1.3 ~ 670kDa)에 대해 배제 한계(670k Da)를 결정합니다(그림 2). 이 플롯을 사용하여 용리 부피를 근거로 미지 단백질의 분자량을 확인할 수 있습니다.

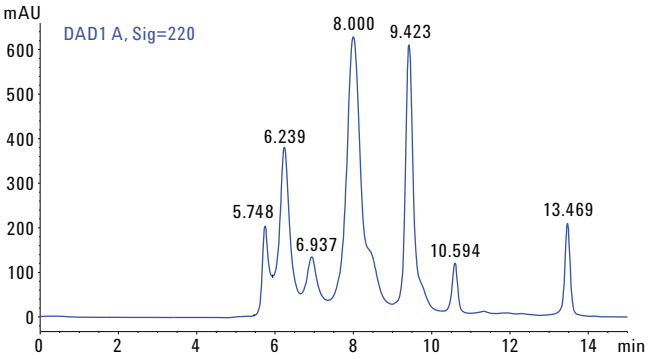


그림 1. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 통한 단백질 표준 물질의 분리

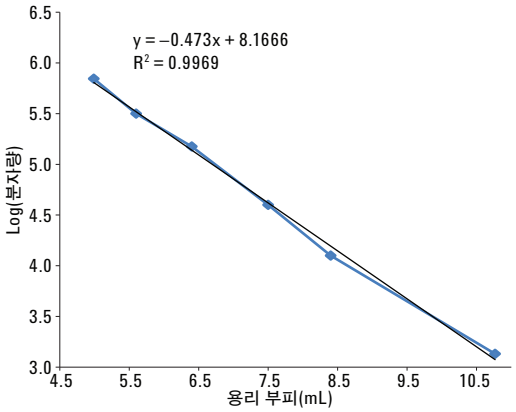


그림 2. Agilent AdvanceBio SEC-3, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 통한 표준 물질의 검량선

그림 3은 AdvanceBio SEC 300Å를 사용하여 8분 만에 Intact mAbs의 분리가 훌륭하게 진행되었음을 보여줍니다. 일찍 용출되거나 늦게 용출되는 피크(early or late eluting peaks)가 존재하지 않음은 시판된 mAb가 균일하게 전처리되고 응집이나 분해가 없음을 설명합니다.

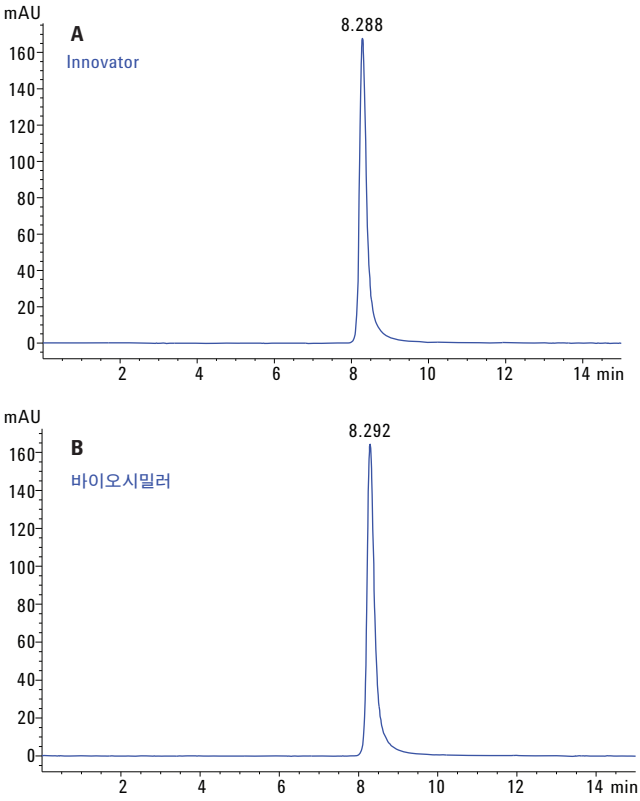


그림 3. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 통한 Intact 치료용 mAbs의 SEC 프로파일:
A: Rituximab Innovator; B: Rituximab 바이오시밀러

그림 4는 바이오시밀러 및 Innovator Rituximab의 중첩 그래프이며, 비특이적 상호 작용없이 선명하고 대칭되는 피크를 나타냅니다. 표 1은 Intact mAbs의 6회 반복 주입에서 얻은 평균 머무름 시간과 면적 RSD 값을 보여줍니다. 머무름 시간과 피크 면적 RSD 값은 각각 0.04 및 1% 미만이며, 이는 분석법의 우수한 재현성과 이에 따른 시스템의 정밀도를 입증하는 것입니다. 바이오시밀러 및 Innovator의 RT는 유사합니다. 또한 Innovator 및 바이오시밀러의 면적 백분율의 순도는 99% 이상을 나타내, 둘이 매우 유사함을 보여줍니다.

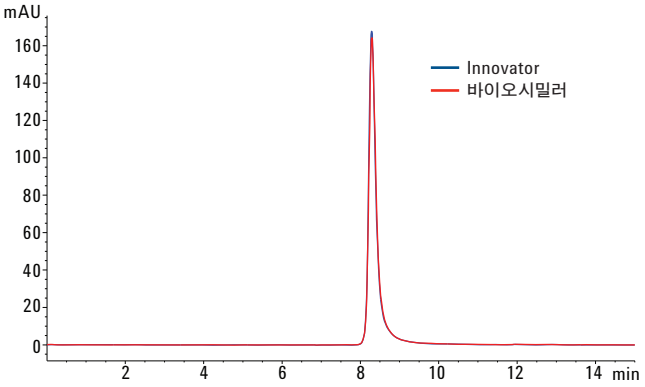


그림 4. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 통한 Rituximab Innovator 및 바이오시밀러의 중첩 그래프

표 1. Rituximab의 머무름 시간 및 피크 면적 정밀도(n = 6)

	머무름 시간		피크 면적	
시료	평균(분)	RSD	평균(mAU/분)	RSD
Rituximab innovator	8.28	0.04	99.33	1.21
Rituximab 바이오시밀러	8.29	0	100	0

응집(Aggregation)/분해(Degradation) 분석 및 정량화

애질런트에서는 응집체와 분해물의 모니터링을 위해 SEC를 사용하여 Intact 및 Stress 바이오시밀러와 Innovator mAbs를 비교했습니다. 크로마토그래피 실행에서, 단량체(monomers) 형태 이전에 용출된 피크는 응집체로 간주되며, 그 후에 용출된 피크는 분해물로 간주됩니다[2].

그림 5는 pH/heat-stressed Innovator 및 바이오시밀러 Rituximab의 SEC 프로파일을 보여줍니다. 이 프로파일은 AdvanceBio SEC 컬럼이 동일한 Intact 분석법을 사용하여 응집체와 분해된 mAbs를 분리하고 검출했음을 나타냅니다. Innovator 및 바이오시밀러의 응집체와 Fragments에 대한 면적 백분율을 기준으로 한 상대 정량분석 결과는 표 2에 요약되어 있습니다.

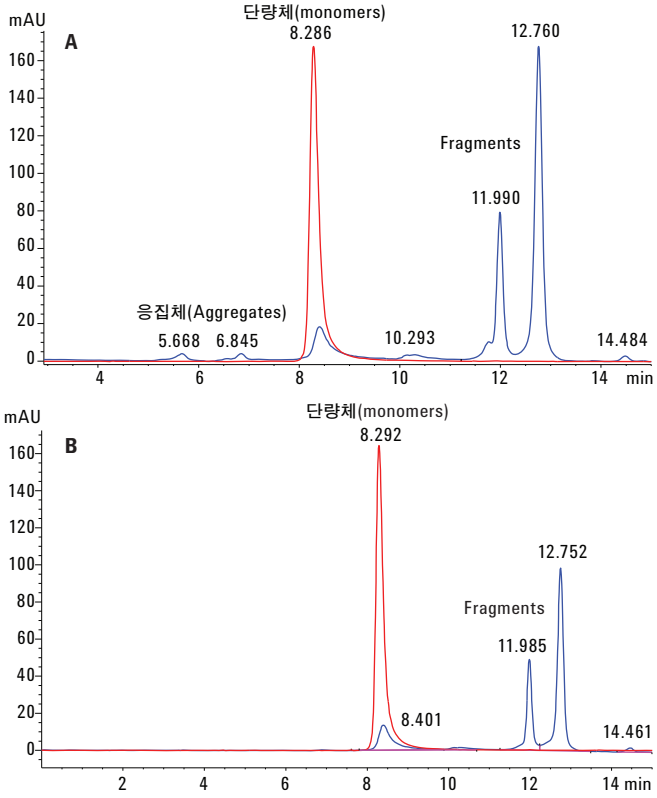


그림 5. Agilent AdvanceBio SEC 크로마토그램: (A) pH/heat-stressed 시료(파란색 선)와 Intact Rituximab Innovator(빨간색 선)의 중첩 그래프 및 (B) Stress 시료(파란색 선)와 Intact Rituximab 바이오시밀러(빨간색 선)의 중첩 그래프

표 2. Intact 및 Stressed Innovator와 바이오시밀러 Rituximab의 상대 면적 백분율

Intact innovator		Stressed innovator	
시간	면적 %	시간	면적 %
8.288(단량체)	100	1.289	4.24
		5.668	2.26
		6.845	2
		8.40(단량체)	13.6
		10.29	2.81
		11.99	23.22
		12.76	51.01
		14.48	1.11
Intact 바이오시밀러		**Stressed 바이오시밀러**	
시간	면적 %	시간	면적 %
8.292(단량체)	100	8.40(단량체)	16.832
		11.985	24.24
		12.75	57.36
		14.46	1.5

바이오시밀러 mAb와 비교할 때, Innovator mAb의 응집체에 대한 상대 피크 면적이 Stress로 인해 증가한 것은 주목할 만한 흥미로운 결과입니다. 그러나 두 mAbs에 대한 조각화 패턴(fragmentation pattern)과 Fragments의 피크 면적은 매우 유사했습니다. Stress 후 Innovator 및 바이오시밀러의 단량체(monomers) 형태는 13%와 16%인 것으로 확인되었으며, 두 mAbs에서 50%을 차지하는 주요 형태는 약 12.75분에 용출되는 Fragments이었습니다.

결국, 분자량이 매우 근접한 상업용 단일클론성항체와 ADC를 분별하는 AdvanceBio SEC 컬럼의 분리능을 확인하기 위해 시료의 단일 주입 분석을 실시했습니다. 그림 6은 중첩 그래프입니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 치료용 mAbs 및 ADC를 그 분자량에 따라 분리했으며, 머무름 시간에 명확한 차이가 있다는 것은 이 컬럼이 이러한 분자의 분석에 적합하다는 것을 설명합니다.

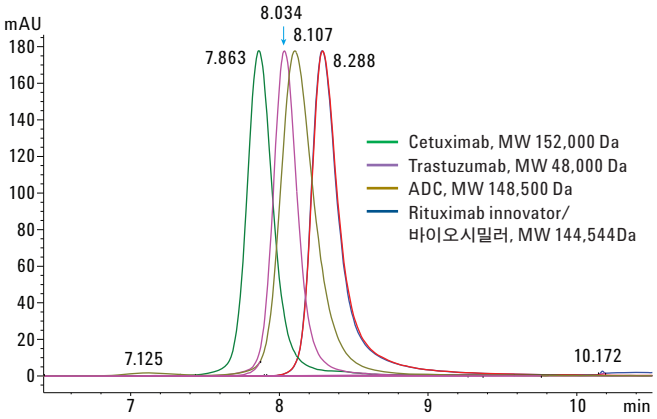


그림 6. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼에서 분리된 Rituximab Innovator/바이오시밀러, Trastuzumab, Cetuximab 및 ADC의 중첩 그래프

결론

mAb 기반 제품 개발의 과정은 복잡하며 순도, 응집체 및 기타 산물 관련 변이체의 확인에는 다양한 물리화학적 특성화가 관여됩니다. 크기 배제(Size Exclusion) 크로마토그래피는 고유한 조건하에서 단량체(monomers), HMW 및 LMW 물질의 모니터링과 정량화를 위해 널리 사용되었습니다. 이 작업에서는 Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 사용하여 고유한 조건하에서 Intact 및 Stressed Rituximab 시료를 분리하는 간단한 분석법을 개발했습니다. 최적화된 분석법으로 분리한 단량체(monomers)는 100% 순도의 단일 대칭 피크로 나타났으며 응집체나 Fragments의 징후는 없었습니다. 동일한 분석법으로 Stress 시험을 통해 얻은 응집체와 Fragments를 분리하고 정량화했습니다. 이 작업은 mAbs와 그 질량 변이체에 대해 고분리능 및 고감도 분리를 지원할 수 있는 AdvanceBio SEC와 같은 컬럼을 이용할 때만 가능합니다. 또한, Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC는 확실한 생체 비활성과 내부식성을 제공합니다.

참조 문헌

1. Ba ak 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. Rodriquez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriquez-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/chem에서 확인하실 수 있습니다.

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
5991-6304KO

서울 강남구 역삼로 542 신사제2빌딩 2층 우)06187
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies