바이오 치료제(Biotherapeutics) 속 응집체의 고속 고분해능 크기 배제 크로마토그래피(SEC)

응용 자료

바이오 의약품 및 바이오시밀러

저자

Andrew Coffey

Agilent Technologies, Inc.

소개

단백질 응집체는 의약품 안전에 지대한 영향을 미치고 항원 반응을 유발할 수 있기 때문에, 단백질 응집은 바이오 치료용 단백질의 품질을 판단하는 중요한 속성입니다[1]. 응집체는 또한 바이오 의약품의 효능을 낮추고 공정의 경제성에 큰 영향을 미치기도 합니다. 단백질은 pH, 온도 또는 농도 변화와 같은 stress 조건에서 응집되기 쉽습니다. 따라서 응집은 생산의 여러 단계에서 발생할 수 있습니다. 이 같은 응집체의 정량 방법으로 크기 배제 크로마토그래피(SEC)가 각광받고 있습니다.

바이오 치료제 개발 단계(예를 들어, 클론 선택 단계 또는 철저한 실험계획 ("design of expriments")을 통한 발효조건 최적화 단계)에서 형성된 응집체를 모니터링하려면 크기 배제 분석에 필요한 시료가 많이 소요될 수 있습니다.

일반적인 SEC 분석은 20분 이상이 소요되며, 이는 시료의 대량 분석 능력을 크게 제약합니다. Agilent AdvanceBio SEC 컬럼은 입자 및 pore 크기가 고도로 최적화되어 분리속도를 높이고 분석제한 조건도 크게 완화시킵니다. 본 응용자료에서는 분석 정확도의 저하 없이 시료 처리량을 늘리는 기법에 대해 소개합니다.

Agilent Technologies

재료 및 방법

시약, 시료 및 재료

면역글로불린 G(IgG)는 Sigma-Aldrich사에서, 단백질 표준 혼합물은 Bio-Rad Laboratories사에서 구입하였습니다. 단백질 표준 혼합물의 성분에는 티로글로불린(670kDa), γ-글로불린(158kDa), 오브알부민(44kDa), 미오글로빈(17kDa) 및 비타민 B12(1.35kDa)가 있습니다. 모든 화학품과 용매는 HPLC 등급이며, Milli-Q 정수 시스템으로 얻는 초순수를 사용하였습니다.

기기

100% 생체적합성을 지닌 Agilent 1260 Infinity Quaternary Bio-inert LC를 사용하였으며, 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(G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 다이오드 어레이 검출기(생체 비활성 플로우 셀 포함)(G1315D)

소프트웨어는 Agilent ChemStation B.04.03을 사용하였습니다.

분석 조건

컬럼:	Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 150mm, 2.7µm (p/n 1180-3301), Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm (p/n 1180-5301), 기타 업체의 diol 컬럼, 7.8 × 300mm, 5µm
이동상:	150mM 인산나트륨, pH 7.0
TCC 온도:	30°C
주입량:	5µL
유속:	0.5 – 1.4mL/분(그림 범례 참조)
검출:	UV, 220nm

결과 및 토의

AdvanceBio SEC 컬럼에는 2.7µm 입자가 포함되어 있어 시료의 전단 및 분해나 입자 막힘이 없이 최대 효율을 얻을 수 있습니다. 이 독특한 제조 방식으로 pore의 크기와 구조는 물론 그 부피까지 제어할 수 있습니다. 친수성 폴리머 코팅을 적용하면 단백질 피크가 선명하고 분해도도 높아집니다. 그림 1은 AdvanceBio SEC 컬럼과 같은 치수(7.8 × 300mm)의 타사 컬럼을 이용하여 분리한 단백질 표준물질의 비교 SEC 크로마토그램입니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 다른 컬럼보다 단백질 표준물질의 분리 효율이 더 높았습니다. AdvanceBio SEC 컬럼을 통해 이상적인 IgG 단량체(monomer) 크로마토그래피 피크 모양(피크 4)을 확인할 수 있었습니다. 오브알부민 이합체(dimer)(피크 5)는 타사 컬럼보다 애질런트 컬럼에서 더 잘 분리되었습니다. 이 같은 결과는 AdvanceBio SEC 컬럼의 월등한 성능을 입증하고 있습니다.

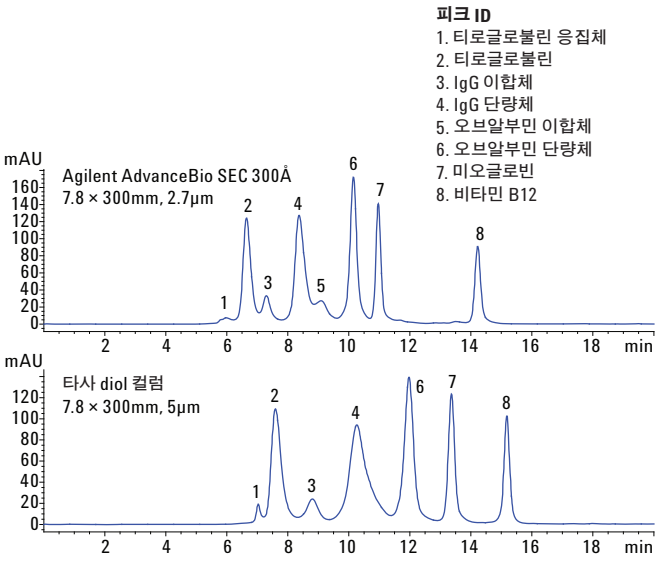


그림 1은 고분해능 조건(유속: 0.8mL/분, 분석 시간: 20분)에서 측정한 단백질 표준물질의 크기 배제 크로마토그래피 결과를 통해 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼의 월등한 성능을 보여줍니다.

"표준" 고분해능 조건에서, 300mm 컬럼과 0.8mL/분의 유속으로 분석하는 데 20분이 걸렸습니다. 이는 시간당 최대 3개의 시료를 분석하고 96개 시료를 분석하는 데 1.3일이 넘게 소요된다는 의미입니다. 더 짧은 150mm 컬럼을 사용하여 분석 시간을 상응하게 줄임으로써 생산성을 개선할 수 있습니다. 그림 2는 300mm 및 150mm AdvanceBio SEC 컬럼에서 0.8mL/분의 유속으로 분석된 면역글로불린 G의 분리현황을 보여줍니다. 150mm 컬럼을 이용할 때 머무름 시간은 반으로 줄었으며, 단량체와 이합체 피크 간 분해능 계수는 1.73이며 정량분석 결과에 부정적인 영향을 미치지 않았습니다. 짧은 AdvanceBio SEC 컬럼을 이용하면 보다 신속한 고분해능 mAbs 분석을 얻을 수 있습니다.

바이오 치료용 단백질의 응집은 면역원성의 강화와 관련이 있어 의약품의 효능과 독성에 영향을 미칩니다. SEC 분석에서 응집체 정량화의 정확도는 단량체와 응집체 피크 사이의 분해능에 따라 결정됩니다. 따라서 분해능과 정량성은 SEC 분석의 두 가지 핵심 파라미터이며, 여기서 선속도는 분해능에 영향을 미칩니다. 150mm 컬럼으로 여러 가지 유속에서 이 두 파라미터를 평가하였습니다. AdvanceBio SEC 컬럼의 탁월한 입자 안정성으로 불필요한 성능 저하 없이 상당히 높은 유속에서도 작동 가능합니다. 높은 유속에서 분해능 계수가 감소되지만, 단량체 피크 면적의 정량분석 결과가 대체로 변하지 않으므로(그림 3) 상당히 많은 시료를 스크리닝하여 그 응집체 함량을 확인할 수 있습니다.

시료 처리량 증대가 선사하는 경쟁적 이점과 신뢰성 높은 결과로 경제적인 효익을 얻을 수 있습니다. 고속 SEC 분석을 달성하는 직접적인 방법은 컬럼 길이를 단축하고 유속을 증가시키는 것입니다. 표 1은 하루에 분석 가능한 시료 수와 유속에 대한 이론 계산결과를 보여줍니다. 1.5mL/분 유속에서의 분석 시간은 4.8분이며 하루에 분석 가능한 시료 수는 300개에 달하므로 처리량을 최대 4.2배 개선할 수 있습니다.

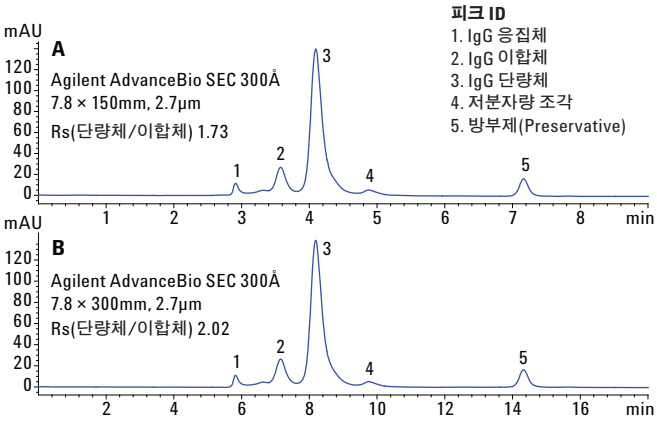


그림 2는 0.8mL/분 유속의 고분해능 조건에서 측정한 면역글로불린 G의 크기 배제 크로마토그래피 결과를 보여줍니다. 150mm 컬럼에서의 분석시간은 9분이었으며(A) 300mm 컬럼에서의 분석시간은 18.5분이었습니다(B).

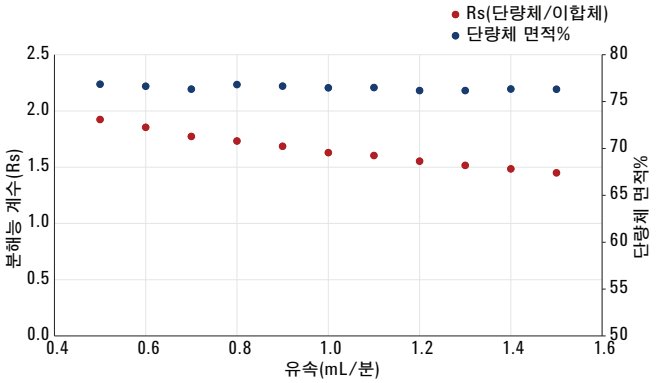


그림 3은 분해능 계수와 단량체 면적 측정결과(퍼센트)에 미치는 영향을 보여줍니다.

표 1. 유속 증가로 인한 시료 처리량 증대로 생산성 향상

컬럼 길이 (mm)	유속 (mL/분)	분석 시간 (분)	시간당 분석 가능한 시료 수	매일 분석 가능한 시료 수
300	0.8	20	3	72
150	0.5	15	4	96
150	0.6	12	4–5	120
150	0.7	10	5–6	144
150	0.8	9	6–7	160
150	0.9	8	6–7	180
150	1.0	7	7–8	205
150	1.1	6.5	8–9	220
150	1.2	6	8–9	240
150	1.3	5.5	11	260
150	1.4	5	12	288
150	1.5	4.8	12–13	300

그림 4는 300mm 및 150mm 컬럼에서 서로 다른 유속으로 측정한 SEC 중첩 크로마토그램을 보여줍니다. 이는 빠른 SEC 조건에서도 단량체 함량을 정확하게 정량화할 수 있고 3/4의 분석시간을 단축할 수 있음을 나타냅니다.

결론

본 연구에서는 짧은 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼과 높은 유속을 이용하면 바이오 치료용 단백질 속 응집체 분석 시 처리량을 크게 개선할 수 있음을 보여주었습니다. 컬럼 길이를 300mm에서 150mm로 줄이고 유속을 0.8mL/분에서 1.5mL/분으로 늘리면 시료 처리량과 생산성을 400% 높여주어, 96개 시료를 분석하는 데 걸리는 시간을 1.3일에서 8시간 내로 줄일 수 있습니다.

참고 문헌

1. K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, I. Kimber. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J. Immunotoxicol*. **2014**, *11(2)*, 99–109.

추가 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품 및 서비스에 대한 더 자세한 정보는 웹사이트 www.agilent.com/chem에서 확인하실 수 있습니다.

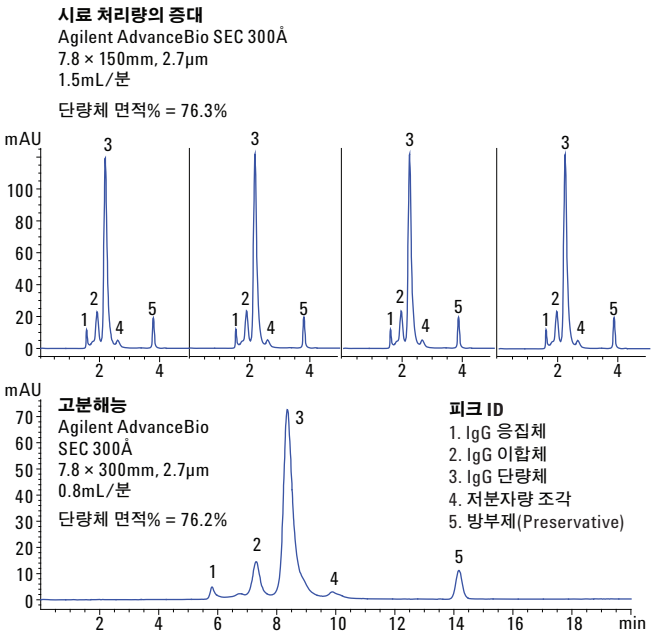


그림 4. 고처리량과 고분해능 조건에서 측정한 면역글로불린 G의 비교 크로마토그램

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하실 수 없습니다.

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., 2017

한국에서 발행
2017년 11월 2일
5991-6458KO

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

Agilent Technologies