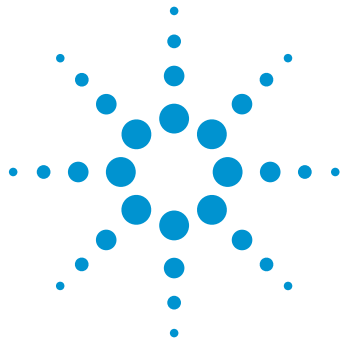




2D-LC/MS mAb 분석에서 온라인 탈염을 위한 Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지

응용 자료

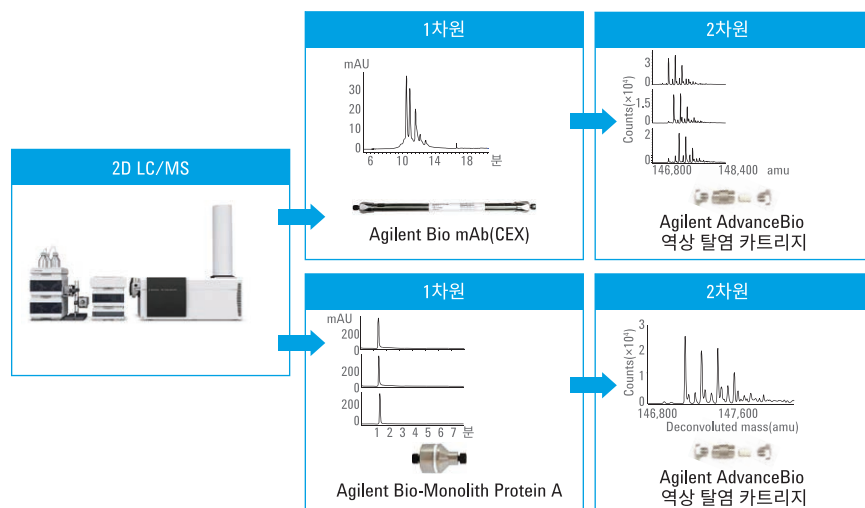
생물약제 및 생물의약품

저자

Suresh Babu C.V. 및 Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 2D-LC/MS 시스템(2차원)에서 탈염 카트리지를 사용하여 단일클론 항체(mAbs)를 탈염하고 특성 규명하는 방법을 설명합니다. 염 기반 용출 조건인 이온 교환(IEX) 및 친화성 크로마토그래피는 주로 1차원 분리에 사용되었습니다. 2차원에서는 Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지를 사용하여 MS 분석 전에 분획을 탈염했습니다. 그 결과로 고품질 MS 데이터를 제공하여 탈염 카트리지의 우수한 성능을 입증했습니다.



단일클론 항체의 특성 규명에 사용된 2D-LC/MS 워크플로의 예



Agilent Technologies

서론

단일클론 항체(mAb) 치료제는 제약 산업에서 지속적으로 성장하는 분야입니다. 이 분자들은 본질적으로 복잡하고 개발 과정 및 수명 기간 동안 다양한 효소 또는 화학적 변형을 거칩니다. 이러한 변형으로 조각화, 번역 후 변형(PTM), 분해, 응집 및 시퀀스 변이체와 같은 heterogeneity가 발생합니다. 따라서 제품의 안전성, 품질 및 효능을 보장하기 위해 철저한 물리화학적 특성 규명이 필요합니다. 질량 분석법(MS)과 연계한 다차원 액체 크로마토그래피(2D-LC)는 상이한 mAb 변이체의 특성 규명을 위해 선호되는 분석 기법입니다. 친화성, 이온 교환(IEX) 및 크기 배제 크로마토그래피(SEC)와 같은 기법은 1차원 분리에 사용됩니다. 이러한 LC 기법에 사용되는 일반적인 이동상은 액체 기반이며, MS 검출과 호환되지 않는 비휘발성 염을 함유하고 있습니다. 이렇게 MS에 의해 크로마토그래피로 분리된 피크를 식별하기 위해, 2차원에서의 온라인 탈염 방법이 사용되었습니다.

이 응용 자료는 mAb를 분석하기 위해 2차원에서 온라인 탈염 컬럼으로 AdvanceBio 역상 탈염 카트리지를 사용하는 방법에 대해 설명합니다. 1차원 LC의 경우, 전하 변이체의 특성을 규명하기 위해 IEX가 사용되었으며, 추가적으로 Protein A 컬럼을 이용한 친화성 수집이 innovator와 바이오시밀러를 비롯한 상이한 mAb 시료의 분석에 사용되었습니다. 그 결과로 향상된 MS 데이터를 제공하여 Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지의 우수한 성능을 입증했습니다.

실험

시료

치료제 단일클론 항체인 mAb1(innovator), mAb2(바이오시밀러) 및 mAb3(innovator)는 현지 약국에서 구입되어 제조업체 지침에 따라 보관되었습니다. 모든 용매는 LC 등급이었습니다.

실험 기기

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션이 사용되었으며 다음과 같은 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1260 Bio-inert Quarternary 펌프(G5611A)
- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 자동 시료 주입기(Autosampler)(G4226A), 1290 Infinity 온도 조절 장치(G1330B) 포함
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 격실(2X G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A)와 2-위치/4-포트 duo-valve(2D-LC 밸브 헤드, G4236A)

- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(2X G1170A)와 40μL 루프가 장착된 다중 heart-cutting 밸브(2x G4242-64000)
- 10mm 흐름 셀이 있는 Agilent 1260 Infinity 다이오드 어레이 검출기(2x G1315C)
- Agilent 6530 accurate-mass Q-TOF LC/MS(G6530A)

그림 1은 2D-LC/MS 구성 설정을 보여줍니다.

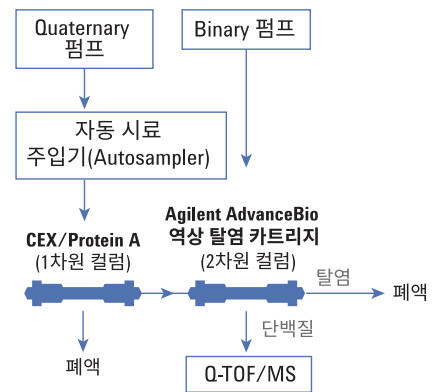


그림 1. 2D-LC/MS 구성의 개요도

크로마토그래피 조건

다중 heart-cutting 2D-LC/MS 분석(IEX → 역상 탈염; 친화성 → 역상 탈염)	
1차원 펌프(IEX)	
용매 A	물
용매 B	NaCl(850.0mM)
용매 C	NaH ₂ PO ₄ (41.0mM)
용매 D	NaH ₂ PO ₄ (55.0mM)
유속	0.75mL/분
이동상 변화도	Agilent Buffer Advisor를 이용하여 계산된 염 변화도 (버퍼: 30mM, pH: 6.3, NaCl: 0 ~ 161.5mM) 0분: 30.3% A, 0.0% B, 59.6% C, 10.1% D 2분: 26.0% A, 5.0% B, 56.9% C, 12.1% D 8분: 21.5% A, 10.0% B, 54.9% C, 13.6% D 20분: 13.3% A, 19.0% B, 51.9% C, 15.8% D 35분: 30.3% A, 0.0% B, 59.6% C, 10.1% D
처리 후 시간:	10분

크로마토그래피 조건(계속)

1차원 펌프(Protein A, 친화성)	
용매 A	20mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.4
용매 B	0.5M 아세트산
유속	1mL/분
이동상 변화도	0 ~ 0.5분: 0% B(결합) 0.6 ~ 1.7분: 100% B(용출) 1.8 ~ 3.5분: 0% B(재생)
2차원 펌프(역상 탈염)	
용매 A	0.1% FA
용매 B	0.1% FA가 함유된 ACN
유속	0.4mL/분
이동상 변화도	0분: 5% B 0.5분: 5% B 3.0분: 80% B 4.0분: 80% B 4.1분: 5% B 6.0분: 5% B
2차원 기울기 정지 시간	6.0
2차원 주기 시간	6.1
자동 시료 주입기(Autosampler)	
주입량	5µL
시료 온도	5°C
컬럼(IEX → 역상 탈염) (친화성 → 역상 탈염)	
1차원 컬럼	Agilent Bio MAb NP5, 4.6 × 250mm, 5µm PEEK(p/n 5190-2407) Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2mm, 5µm(p/n 5069-3639)
2차원 컬럼	Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지, 2.1 × 12.5mm, 10µm, 1,000Å(p/n PL1612-1102)
항온 컬럼 격실	
1차원 컬럼	실온
2차원 컬럼	실온
다중 heart-cutting	
작동 모드	1차원 머무름 시간에 따라 heart-cuts(2차원 세그먼트) 세트에 시간 기반 다중 heart-cutting이 실시되었습니다. 0.04분의 샘플링 시간으로 불순물의 heart-cutting이 실시되었습니다(>200%의 루프 충전).
검출	
1차원 DAD 파라미터	파장 280nm/4nm Ref. 360nm/100nm
2차원 MS 파라미터	가스 온도: 350°C Sheath 가스 온도: 400°C 가스 유속: 8L/분 Sheath 가스 유속: 11L/분 Nebulizer: 35psi Vcap: 5,000V 노즐: 1,000V Fragmentor: 200V
LC 스트림의 타이밍	MS 밸브 스위칭을 이용한 시간 세그먼트(폐액/MS)

소프트웨어

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition 소프트웨어, 버전 C.01.07 [27]과 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 수집 소프트웨어, 버전 A.01.02 [24]
- Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어, 버전 B.05.01, 빌드 4.0.479.0
- Agilent Buffer Advisor A.01.01 [009]

결과 및 토의

mAbs의 heterogeneity 때문에 질량 분석법 검출과 연계한 2D-LC가 생물약제의 특성 규명을 위한 분석법으로 선택되었습니다. 중요한 품질 속성을 분석하기 위해 IEX, SEC 및 친화성 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 기법이 사용됩니다. 현재 연구에서, 1차원 분리에서 친화성 정제와 IEX가 선택되었습니다. 분획을 얻어 수동으로 탈염할 필요 없이 mAb 시료를 분석하기 위해 2차원 역상 탈염 단계를 수행했습니다.

IEX → 역상 탈염

mAb 전하 heterogeneity의 분리를 위해서는 약한 양이온 교환 크로마토그래피(WCX)가 일반적으로 사용됩니다. 이러한 전하 변이체 피크를 추가적으로 특성 규명하기 위해 MS 분석 전에 탈염 단계가 요구됩니다. 그림 2와 3은 innovator와 바이오시밀러 mAb에 대한 2D-LC/MS 전하 변이체 결과를 보여줍니다. 1차원에서 전하 종류를 분리하기 위해 Agilent Bio MAb PEEK 컬럼이 사용되었습니다. 그런 다음, 2차원에서 탈염을 위해 Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지가 사용되었습니다. Innovator mAb는 낮은 수준의 염기성과 산성 변이체와 주 피크로 지정된 하나의 주요 피크를 볼 수 있습니다. 앞부분과 뒷부분에 용출되는 피크를 각각 산성 및 염기성 변이체라고 부릅니다. 바이오시밀러 mAb의 크로마토그램은 innovator mAb에 비교하여 상이한 수준의 염기성 및 산성 변이체를 나타내는 서로 다른 분리 프로필을 보여주었습니다. Innovator 및 바이오시밀러 mAb의 선택된 피크를 MS 분석을 위해 다중 heart-cutting 분석법을 사용하여 2차원의 탈염 카트리지로 옮겼습니다. 참조 1과 2는 다중 heart-cutting 2D-LC 분석법에 대한 자세한 정보를 제공합니다. 그림 3은 이러한 전하 변이체 피크에 대한 deconvoluted MS 결과를 보여줍니다. WCX에서, innovator 및 바이오시밀러 mAbs의 주 피크가 동일한 머무름 시간에 용출되었으며, 해당 deconvoluted 질량 측정을 통해 이러한 피크가 동일한 특성을 가짐이 확인되었습니다. 바이오시밀러 mAb의 피크 2와 3은 피크 1, 2 및 3 사이에 128Da의 변화를 나타냅니다. 이러한 변화는 C-말단 라이신 절단에 해당합니다(carboxypeptidase B 분해를 통해 확인, 데이터는 표시되지 않았음). 이러한 데이터 세트는 mAb 전하 변이체를 식별하기 위해 AdvanceBio 역상 탈염 카트리지를 사용한 효과적인 온라인 탈염 접근법을 보여줍니다. 고분리능 mAb 분리의 경우 Agilent AdvanceBio RP-mAb 컬럼이 2차원에서 사용될 수 있습니다³.

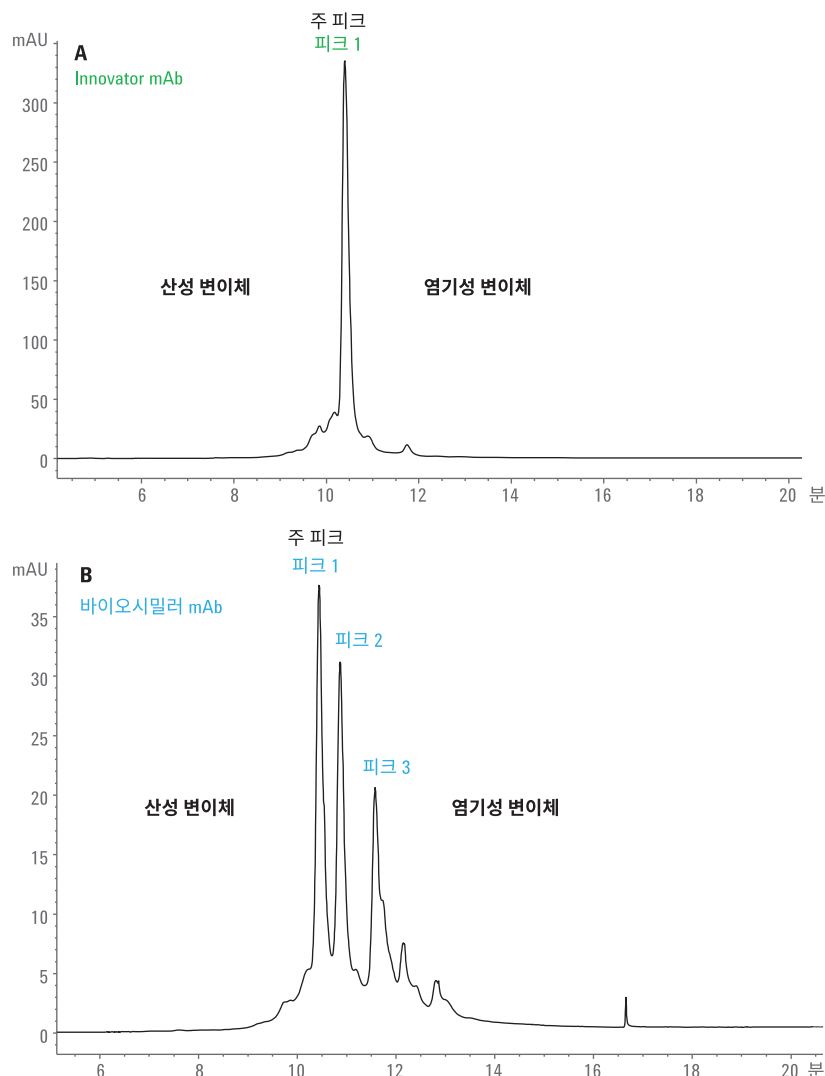


그림 2. Agilent Bio MAb 5µm 컬럼을 이용해 innovator 및 바이오시밀러 mAb의 1차원 전하 변이체 프로파일. 할당된 피크 1, 2 및 3이 MS 분석을 위해 2차원으로 옮겨졌습니다(Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지)

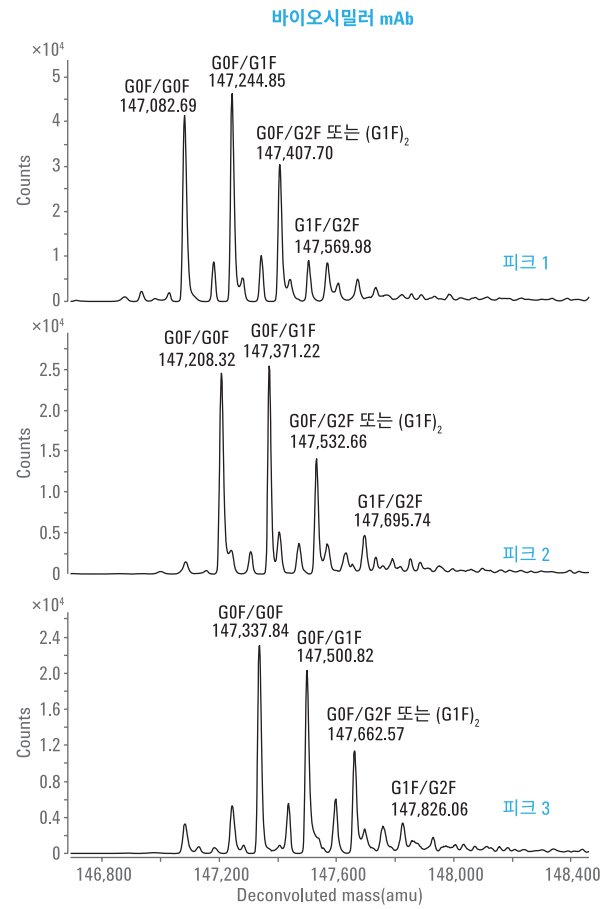
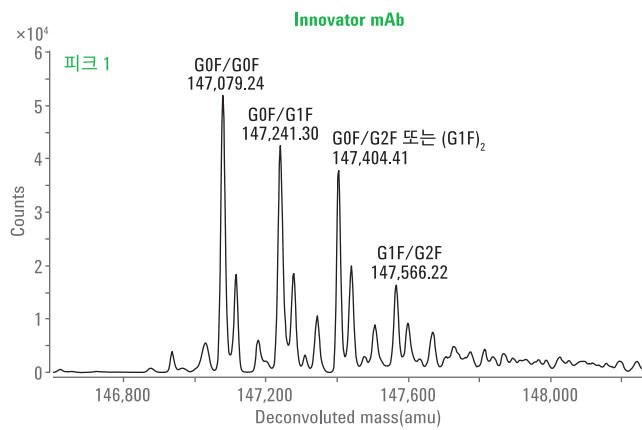


그림 3. 그림 2에서 할당된 피크 1, 2 및 3에 대한 deconvoluted 질량 스펙트럼

친화성 → 역상 탈염

mAb 생산 및 정제 중에, 높은 발현도를 가진 정확한 제품 후보물질을 생성하기 위해 적절한 클론을 선택하는 것이 중요합니다. 일반적으로, 세포 배양액에서 mAb 농도를 결정할뿐 아니라 정제하기 위해 Protein A 및 Protein G를 이용한 친화성 크로마토그래피가 응용됩니다. 게다가, 제품 피크의 특성은 MS 분석을 통해

확인할 수 있습니다. 이 연구에서 세 개의 치료제 mAbs가 2D-LC/MS heart-cutting 분석법을 이용해 분석되었습니다. 1차원에서, Agilent Bio-Monolith 단백질 A 컬럼을 사용하여 mAb를 수집하고 농축했습니다. Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지는 질량 분석법 분석 전에 탈염을 위해 2차원에서 사용되었습니다. Protein A 컬럼(그림 4)에서 얻어진 친화성 정제 피크가 MS 분석을 위해

heart-cutting 분석법을 이용해 2차원 탈염 카트리지로 옮겨졌습니다. 그림 4는 세 개의 각 mAb 시료에 대한 deconvoluted 질량 스펙트럼을 보여줍니다. 질량 측정치의 분석으로 적절한 품질의 mAb가 확인됩니다. 이러한 데이터 세트는 AdvanceBio 역상 탈염 카트리지를 사용한 빠른 온라인 탈염 방법을 증명합니다.

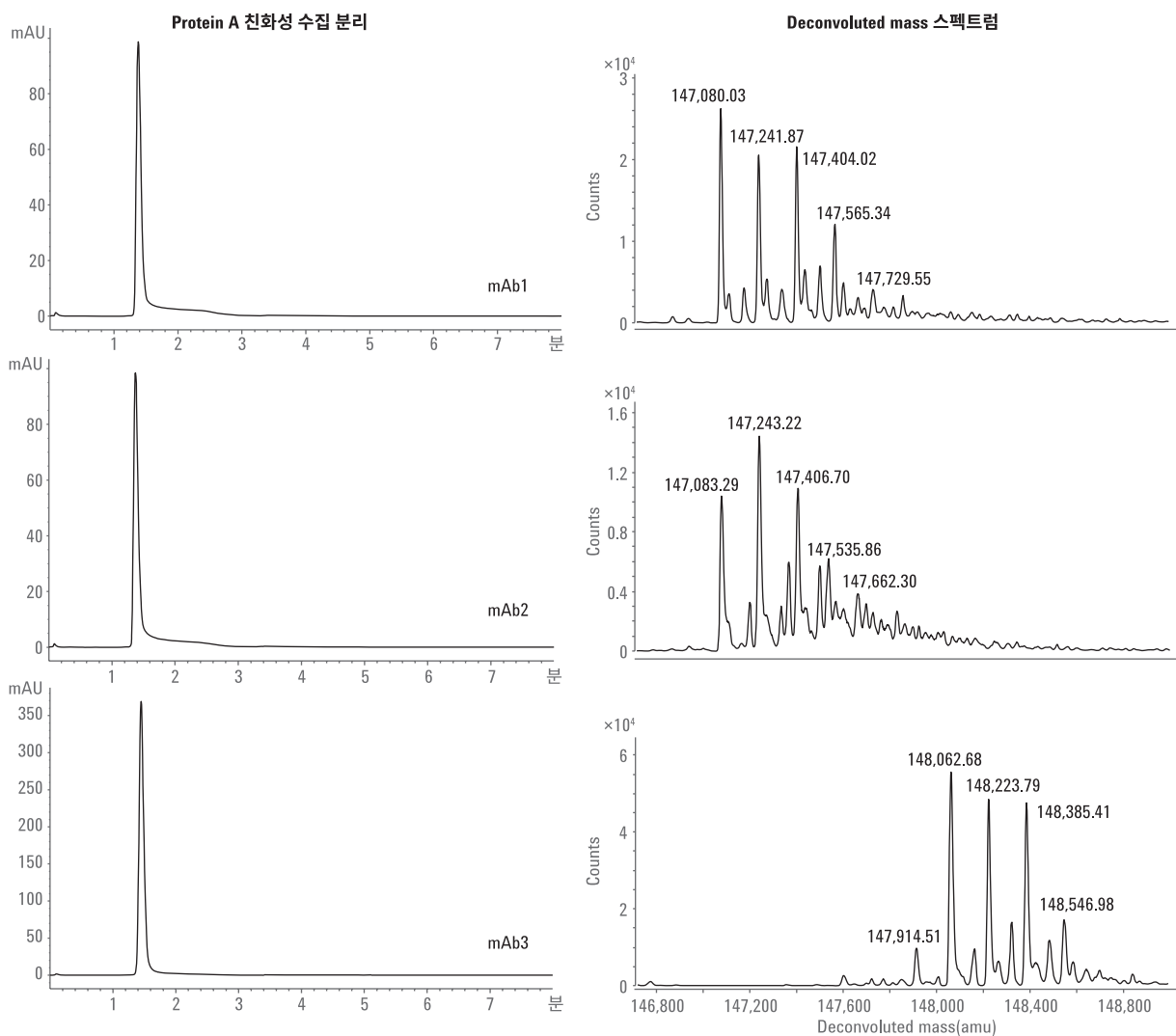


그림 4. 1차원 컬럼으로 Protein A를 사용하고 2차원 컬럼으로 탈염 카트리지를 이용한 mAb의 2D-LC/MS 1차원 크로마토그램에서 선택된 주 피크가 수집되어 Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지로 옮겨지고, 여기서 염이 효과적으로 제거되어 고품질 MS 결과가 제공됩니다

결론

본 연구는 애질런트 바이오 컬럼과 연계한 Agilent 2D-LC 시스템을 이용하여 mAb의 특성 규명을 위한 워크플로 솔루션을 증명합니다. 이는 1차원 분리에서 전하 변이체 또는 단백질 친화성 수집을 적용하여 이루어졌으며, 이어서 MS 분석 전에 Agilent AdvanceBio 역상 탈염 카트리지를 이용해 2차원에서 탈염이 진행됩니다. 결과는 AdvanceBio 역상 탈염 카트리지를 이용한 효과적인 온라인 탈염을 증명합니다.

참고 문헌

1. Buckenmaier, S. Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution for Multiple Heart-Cutting, *Agilent Technologies* 응용 자료, 발행물 번호 5991-5615EN, **2015**.
2. Krieger, S. Application of Multiple Heart-Cutting 2D-LC in Method Development for Impurity Analysis - The Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies* 응용 자료, 발행물 번호 5991-5643EN, **2015**.
3. Sandra, K.; Vanhoenacker, G.; Vandenheede, I.; Steenbeke, M.; Joseph, M.; Sandra, P. Multiple heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry for the characterization of the antibody-drug conjugate ado-trastuzumab emtansine. *Journal of Chromatography B* **2016**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.040>

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 9월 1일 한국에서 발행
5991-7066KO

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



Agilent Technologies