

mAbs 및 ADC의 LC/MS 분리를 위한 PLRP-S 폴리머 역상 컬럼

Intact mAbs, 조각 mAbs 및 ADC의 분석

응용 자료

생물약제 및 생물의약품

저자

Suresh Babu C.V.
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 단일클론 항체(mAbs) 및 항체 약물 결합체(ADC)와 같은 대형 생체분자의 특성 규명을 위한 폴리머 기반 역상 컬럼의 응용 기술을 기술하고 있습니다. 폴리머 컬럼의 성능을 파악하기 위해 intact 및 조각 수준의 mAbs 모두에 대한 연구가 실시되었습니다. 그 결과에 따르면 컬럼의 우수한 분리 성능과 더불어 mAbs 및 ADC의 일상적인 LC/MS 분석을 위한 적합성이 증명되었습니다.

서론

단일클론 항체(mAbs) 및 항체 약물 결합체(ADCs)는 본질적으로 heterogeneous한 치료제 분자입니다[1]. 이러한 분자들은 약물 개발 과정에서 다양한 변형을 거칠 수 있으므로 안전성과 효능을 보장하기 위해서는 철저한 특성 규명이 요구됩니다. mAbs 및 ADC의 주요 특성 규명을 위해 질량 분석법 검출을 이용한 역상 액체 크로마토그래피가 가장 일반적으로 사용됩니다. 적절한 LC 컬럼과 분석법의 선택은 재현성 있는 고분리능 분리와 고품질 MS 데이터 생성에 중요합니다. 일반적으로, 이동상으로 MS 친화적인 이온쌍 시약인 포름산(FA)을 사용할 경우 기존 실리카 기반 역상 컬럼에서 총 이온 크로마토그램(TIC) 피크 모양이 좋지 않게 나옵니다. 이는 LC/MS 결과(분리능, 감도, MS 신호, 정확한 분자량 정보 등)에 영향을 미칩니다. 때문에, 생체분자의 LC/MS 분석을 개선하기 위해서는 포름산 조건과 호환되는 LC 컬럼이 중요한 요구사항입니다.



Agilent Technologies

본 연구는 mAbs와 ADC의 LC/MS 분석을 증명하기 위해 폴리머 역상 컬럼(Agilent PLRP-S)을 사용했습니다. PLRP-S 컬럼은 폴리스티렌 및 디비닐벤젠으로 만든 단단하고 큰 다공성 구형 입자로 채워집니다. 이러한 입자들은 전체 pH 범위에서 물리화학적으로 안정적입니다. 이 입자들은 본래 소수성이므로, 역상 분리를 위해 결합상이나 알킬 리간드가 필요하지 않습니다. 이 장점 덕분에 실라놀 및 중금속 이온이 없는 재현성 높은 재료가 됩니다. 본 연구에서는 LC/MS 분석법에 PLRP-S 컬럼을 이용하여 ADC를 포함한 여러 가지 치료제 mAbs를 분석했습니다. 이러한 접근법으로 더 우수한 LC/MS 결과를 얻었으며, intact 및 조각 mAbs 및 ADC의 정확한 질량을 확인했습니다.

재료 및 방법

시료

- 치료제 mAb1, mAb2 및 ADC(라이신 결합체)는 현지 약국에서 구입하여 제조업체 지침에 따라 보관되었습니다.
- Intact:** mAb1, mAb2 및 ADC는 3% 아세토니트릴(ACN)에서 0.1% 포름산을 사용하여 2 μ g/ μ L의 농도로 희석되어 1 μ L가 주입되었습니다.
- 환원:** 20 μ L의 mAb(2 μ g/ μ L) 시료를 5 μ L dithiothreitol(DTT)(1M)과 혼합한 다음 1시간 동안 37°C에서 배양했습니다.
- 파파인(Papain) 분해:** 10 μ L의 mAb(2 μ g/ μ L) 시료를 5 μ L 분해 버퍼(시스테인 함유) 및 5 μ L의 활성 파파인(Sigma)과 혼합했습니다. 혼합물을 3시간 동안 37°C에서 배양했습니다.
- IdeS 단백질 분해:** 20 μ L의 mAb(2 μ g/ μ L) 시료를 0.5 μ L FabRICATOR(30 Units)(Sigma)와 혼합한 다음 1시간 동안 37°C에서 배양했습니다.

실험 기기

- LC:** Agilent 1290 Infinity LC 시스템
- MS:** Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight(Q-TOF)와 Agilent Jet Stream 이온 소스

분석 조건

Agilent 1290 Infinity LC 시스템

컬럼:	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50mm, 5 μ m, 1,000 \AA (p/n PL 1912-1502)	
주입량:	1 μ L	
시료 항온 장치:	5°C	
이동상 A:	0.1% FA가 함유된 물	
이동상 B:	0.1% FA가 함유된 ACN	
이동상 변화도:	Intact	조각
	0분에 → 20% B	0분에 → 20% B
	4분에 → 20% B	10분에 → 50% B
	5분에 → 40% B	10.1분에 → 85% B
	10분에 → 70% B	11분에 → 85% B
	11분에 → 90% B	11.1분에 → 20% B
	11.1분에 → 20% B	
증지 시간:	11.1분	
처리 후 시간:	4분	
컬럼 온도:	80°C	
유속:	0.6mL/분	

Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

이온 모드:	양이온 모드, 듀얼 AJS ESI(프로필)
건조 가스 온도:	350°C
건조 가스 유속:	8L/분
Sheath 가스 온도:	400°C
Sheath 가스 유속:	11L/분
Nebulizer:	35psi
캐필러리 전압:	5,500V
Fragmentor 전압:	380V
Skimmer 전압:	65V
Oct RF Vpp:	750V
MS 모드 수집 파라미터:	1GHz에서 수집된 데이터, MS 전용 모드, 질량 범위 600 ~ 4,000 m/z (조각), 2,000 ~ 6,000 m/z (intact)
데이터 분석:	LC/MS의 데이터를 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어 및 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 이용해 분석했습니다. 최대 엔트로피 및 pMod deconvolution 알고리즘을 사용하여 차례로 약물 결합 항체(ADC)와 mAb1/mAb2의 영 전하(zero-charge) 스펙트럼을 획득했습니다.

결과 및 토의

향상된 크로마토그래피 성능을 달성하기 위해 일반적으로 이동상에 이온쌍 시약으로서 Trifluoroacetic Acid(TFA)를 추가하여 더 선명한 크로마토그래피 피크를 생성합니다. 그러나, TFA는 신호 억제 효과 때문에 MS 분석에 적합하지 않습니다[2]. 포름산은 생체분자 응용 분야에 선호하는 MS 친화적 이온쌍 시약이지만 기존 실리카 기반 컬럼에서는 피크 모양이 안 좋아집니다. mAbs와 같은 고분자량 단백질을 분석할 경우 적절한 크로마토그래피 피크 모양과 높은 신호 대 잡음비(S/N) m/z 질량 스펙트럼의 달성은 상충됩니다[3]. MS 호환성과 mAbs 및 ADC 분리가 개선된 적절한 LC 컬럼을 선택하는 것이 중요합니다. mAbs 분리를 위해 LC/MS와 실리카 기반 컬럼을 사용하는 방법에 대한 지침은 애질런트 응용 자료를 참조하십시오: 5991-6296EN, 5991-4266EN, 5991-2116EN 및 5990-9631EN[3-6].

본 연구에서 폴리머 기반 PLRP-S 컬럼을 사용하여 intact 및 조각 수준에서 mAbs와 ADC를 분석했습니다. PLRP-S는 강하고 기계적으로 안정적이며, 대형 생체분자 응용 작업에 적합하게 다양한 구멍 및 입자 크기로 이용할 수 있습니다.

Intact 분석

그림 1은 PLRP-S, $2.1 \times 50\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, $1,000\text{\AA}$ 컬럼을 사용하여 intact mAbs 및 ADC의 LC/MS 분석을 보여줍니다. 이 컬럼으로 ≤ 0.1 분의 half maximum에서의 전체 너비(FWHM) mAbs 그리고 0.25분의 FWHM ADC를 가진 우수한 TIC 피크 모양을 얻을 수 있습니다. 표준 RP 이동상 시스템(ACN + FA)을 사용하여 좁은 TIC 피크 너비가 얻어졌습니다. 두 mAbs에 유사한 피크 너비가 관찰되었으며 이는 다양한 mAbs 시료에 대해 분석법의 적합성을 증명합니다. ADC 시료에 대해서는 좁은 피크 너비도 입증되었으며 이는 높은 heterogeneous를 나타냅니다. 또한 UV 검출을 이용해 동일한 분석법 조건과 컬럼을 테스트했으며, 동일한 머무름 시간 프로필(데이터 표시되지 않음)로 그 만족스러운 결과를 얻었습니다.

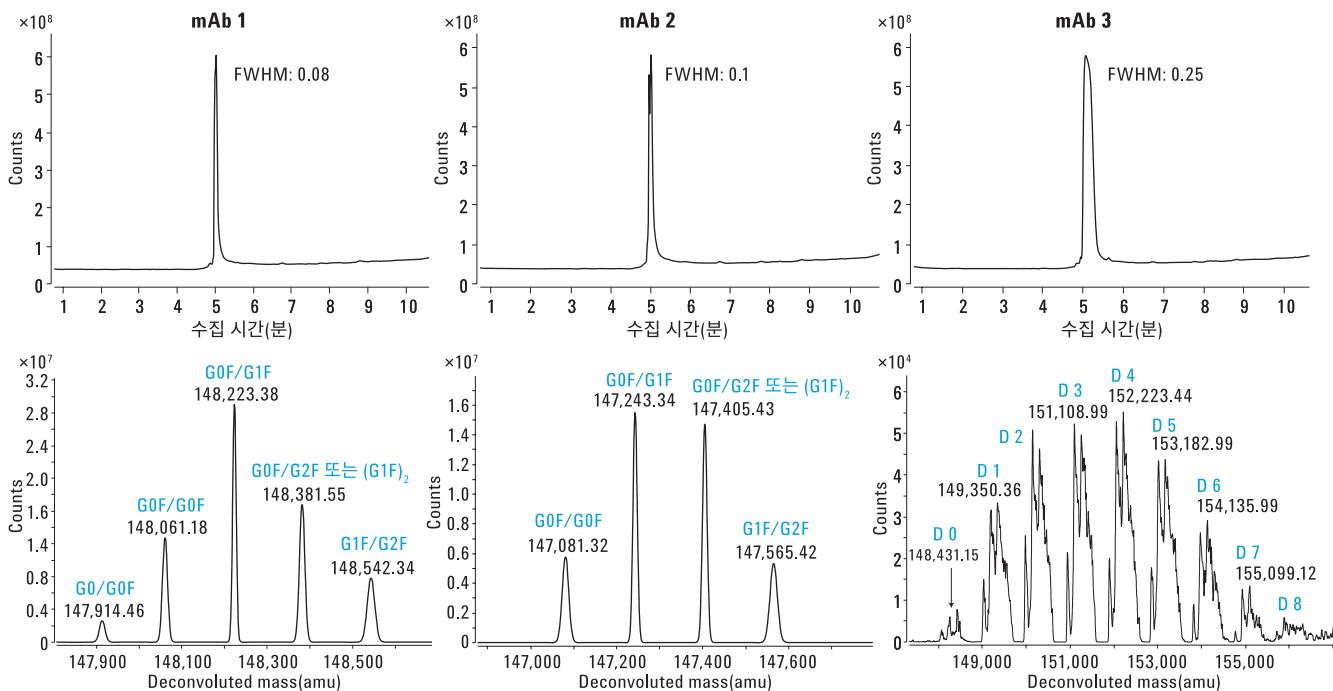


그림 1. Agilent PLRP-S, $2.1 \times 50\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, $1,000\text{\AA}$ 컬럼에서 intact mAb/ADC의 LC/MS 분석. 위: 총 이온 크로마토그램; 아래: Deconvoluted 스펙트럼. FWHM: half maximum에서의 전체 너비

Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 이용해 원시(raw) 질량 스펙트럼을 영 전하(zero-charge) 스펙트럼으로 변환했습니다. 그림 1은 deconvoluted 스펙트라를 보여줍니다. 5개의 주요 글리코형이 mAb1 deconvoluted 스펙트럼에 나타났으며 반면에 mAb2 스펙트럼에서는 4개의 주요 글리코형이 분명하게 나타났습니다. ADC에 대한 deconvoluted 질량 스펙트럼은 8개의 주요 약물 결합체(D0 ~ D8)를 이용한 한 번의 약물 로드 단계에서 페이로드 추세가 증가하고 있음을 보여주었습니다.

조각 분석

생성된 조각을 분석하기 위해 시료에 화학 및 효소 반응을 적용했습니다. 그림 2는 PLRP-S, $2.1 \times 50\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, $1,000\text{\AA}$ 컬럼을 사용하여, 환원된, IdeS 및 파파인 분해 mAbs 및 ADC의 LC/MS 분리를 보여줍니다. 조각 피크(다른 약물 결합체 종류를 가진 LC, HC, ScFc, F(ab')_2 , Fc, 2^*Fab_2 , 및 ADC 조각)는 표준 이동상 시스템(ACN + FA)을 이용해 PLRP-S 컬럼에서 양호하게 분리됩니다. 예상대로, 두 개의 mAb 시료에는 분해 후 2개의 주요 조각을 볼 수 있습니다.

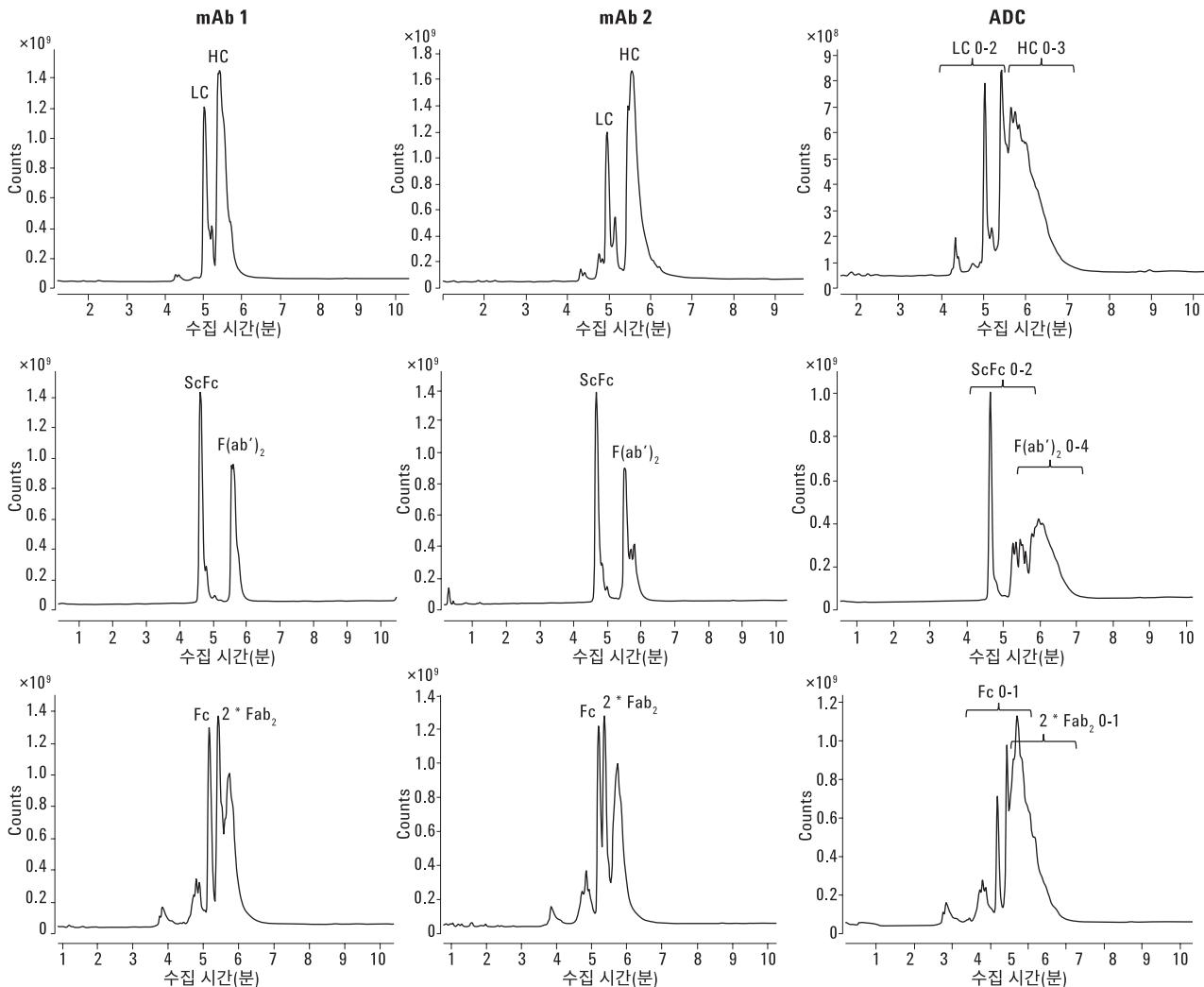


그림 2. Agilent PLRP-S, $2.1 \times 50\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, $1,000\text{\AA}$ 컬럼에서 mAb 조각의 LC/MS 분석. 위: 환원; 중간: IdeS 분해; 아래: 파파인 분해

이러한 주요 조각 피크 사이의 분리는 더 적절한 MS 감도와 정확한 분자량 결정을 위해 충분히 개선할 수 있습니다(그림 3). 이용 가능한 여러 라이신 잔류물에서 이루어진 결합으로 heterogeneity가 높아지기 때문에 조각 종류의 분리는 ADC 시료에는 매우 난제에 속합니다. 그림 2는 PLRP-S 펌프에서 글리코실화된 ADC 조각의 분리를 보여줍니다. 서로 다른 약물 결합체가 설명된 LC/MS 조건에서 적절하게 분리된다는 사실이 증명되었으며 PLRP-S 컬럼의 분리 성능을 보여주었습니다. 그림 3은 mAb1 및 ADC 조각에 대한 대표적인 deconvoluted 스펙트럼을 보여줍니다.

결론

- Agilent PLRP-S 컬럼은 intact 및 조각 레벨에서 mAbs 및 ADC의 분석에 우수한 분리 성능을 보여주었습니다.
- Agilent PLRP-S 컬럼은 포름산 함유 이동상에서 더 우수한 크로마토그래피 성능과 고품질의 MS 감응을 제공했습니다.
- Agilent PLRP-S 컬럼과 Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS를 연계한 mAb 및 ADC 분석이 증명되었습니다.

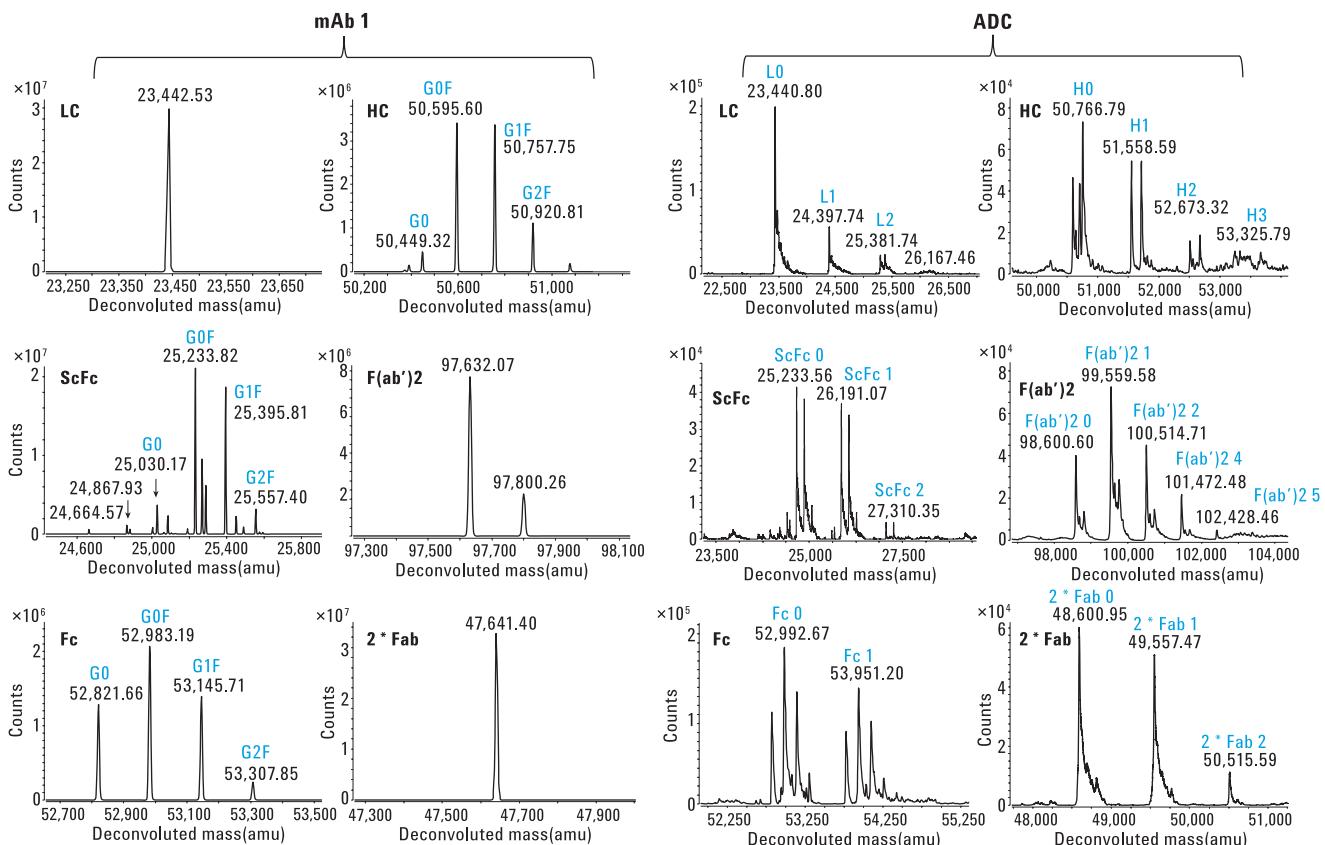


그림 3. 대표적인 deconvoluted 질량 스펙트럼. 위: 환원; 중간: IdeS 분해; 아래: 파파인 분해

참조 문헌

1. Beck, A.; Reichert, J. M. Antibody-drug conjugates. *mAbs* **2014**, 6:1, 15-17.
2. McCalley, D. V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1038, 77–84.
3. Gudihal, R.; Suresh Babu C. V.; Tang, N. *Analysis of Monoclonal Antibody(mAb) Using Agilent 1290 Infinity LC System Coupled to Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF)*. 응용 자료, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-4266EN, **2014**.
4. Suresh Babu, C. V. *LC/MS of Intact Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Agilent AdvanceBio RP-mAb*. 응용 자료, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-6296EN, **2015**.
5. Gudihal, R.; Suresh Babu, C. V.; Tang, N.; Madhavi H. N.; Uma, M. *Intact Protein Analysis using an Agilent 6550 Q-TOF Mass Spectrometer*. 응용 자료, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-2116EN, **2013**.
6. Martosella, J.; Duong, P.; Moyer, S. *Rapid UHPLC Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies using an Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C8 Column*. 응용 자료, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5990-9631EN, **2012**.

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹 사이트(www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem/advancebio

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하실 수 없습니다.

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 8월 1일 한국에서 인쇄
5991-7163KO

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



Agilent Technologies