

Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 이용한 바이오 의약품의 고처리량 및 고감도 크기 배제 크로마토그래피(SEC)

Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7µm 컬럼

응용 자료

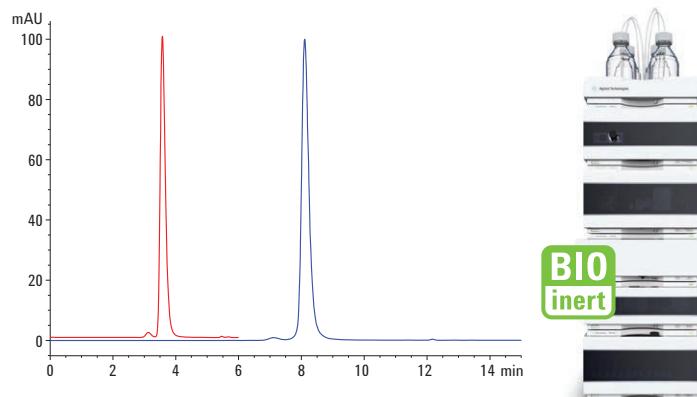
바이오 의약품

저자

M. Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Inc.

개요

단일클론 항체(mAb) 응집(aggregation)은 세포 배양, 수확, 정제, 보관 및 충전 중에 여러 메커니즘으로 인해 발생할 수 있습니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 mAb의 크기 기반 분리를 위한 표준 분석법입니다. 이는 응집체(aggregates)의 정성 및 정량 평가를 위한 기준이자 강력한 기법으로 간주됩니다. SEC 분석은 여러 공정으로 인해 완료하는 데 수 시간이 걸릴뿐 아니라 시료가 바람직하지 않은 환경에 보관될 때 응집(aggregation) 상태에 큰 영향을 미칠 수 있습니다. 본 연구는 mAb 및 항체 약물 결합체(ADC)의 빠르고 고분리능으로 감도 높고 재현성 있는 분리 및 정성을 위해 더 짧고 좁은 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용하였습니다. 분리와 정량은 4분 이내에 완료되며 더 중요하게도 이 분석법은 stress로 인해 생성된 응집체(aggregates)를 모니터링하고 검출할 수 있었습니다.



Agilent Technologies

서론

단백질은 pH, 온도 또는 농도 변화와 같은 stress 조건에 노출될 때 자주 응집합니다. 응집(aggregation)은 생산 공정의 여러 단계(업스트림, 다운스트림 또는 단순히 보관 중)에서 발생할 수 있습니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 단일클론 항체(mAbs) 및 항체 약물 결합체(ADCs)의 응집체(aggregates)를 모니터링 및 특성 규명하기 위한 분석법입니다. 그러나, SEC 분리는 대개 비교적 낮은 유속에서 대형 컬럼으로 실시되며, 분석 시간이 대개 오래 걸립니다. 가장 최근에, sub-2 μ m 컬럼을 사용하는 초고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC)를 적용해 이러한 과제를 극복하고 훨씬 짧은 분석 시간을 증명했습니다. 그러나, 매우 미세한 입자 및 높은 유속을 적용할 경우, 열 및 전단력이 온도나 압력에 민감한 단백질에 중요하게 될 수 있습니다[1]. 게다가, 액체 이동상을 이용한 ADC의 SEC 분석은 불량한 피크 모양과 응집체(aggregates) 및 단량체(monomer) 사이에 분리능이 좋지 못해 적절한 결과를 내지 못하기도 합니다. 이러한 문제는 소수성 세포독성 약물과 고정상 사이의 비특이적 상호작용에 의해 설명될 수 있습니다. 이 문제를 해결하고 피크 모양을 개선하기 위해, 다양한 유기 변형제(organic modifier)를 SEC 이동상에 추가합니다. 그러나, 이러한 유기 변형제는 단백질에 잠재적 손상을 주고 컬럼 수명을 저하시킬 수 있습니다.

애질런트는 정보의 질을 최대한 개선하기 위해 SEC에 여러 가지 발전을 이루었습니다. 그 중 하나는 최적의 pore 부피와 pore 크기를 가지는 고유한 친수성 폴리머 코팅과 조합된 더 짧고(150mm) 더 좁은(4.6mm) 컬럼의 개발입니다. 이러한 발전으로 인해 액체 이동상에 유기 변형제를 추가할 필요 없이 피크가 적절히 분리되고 뾰족한 피크를 얻을 수 있습니다. 이 응용 자료는 더 짧고 좁은 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 이용한 mAb 및 ADC의 빠른 고처리량 SEC 분석을 보여줍니다. 또한 본 연구는 이 컬럼을 이용한 이러한 분자의 정량을 보여줍니다.

재료 및 방법

기기, 컬럼 및 표준물질

최대 압력이 600bar이고 Bio-inert한 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 High Performance 자동 시료 주입기(Autosampler)(G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 시리즈 항온 장치(G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 항온 컬럼 장치(TCC: Thermostatted Column Compartment), Bio-inert Click-in 가열 소자 포함(G1316C, 옵션 19)
- 60mm Max-Light 고감도 흐름 셀을 가진 Agilent 1260 Infinity 다이오드 어레이 검출기(G4212B 옵션 33)
- Agilent AdvanceBio SEC, 300 \AA , 7.8 × 150mm 컬럼, 2.7 μ m 입자로 충진(p/n PL1180-3301)
- Agilent AdvanceBio SEC, 300 \AA , 4.6 × 150mm 컬럼, 2.7 μ m 입자로 충진(p/n PL1580-3301)
- AdvanceBio SEC 300 \AA 단백질 표준물질, 감압하 동결 건조됨. 1.5mL(p/n 5190-9417)

소프트웨어

Agilent ChemStation B.04.03(또는 상위 버전)

SEC 파라미터

표 1은 Agilent 1260 Bio-inert LC 시스템을 이용한 SEC의 크로마토그래피 파라미터를 보여줍니다.

표 1. SEC HPLC에 사용된 크로마토그래피 파라미터

파라미터	분석 조건
이동상	150mM 인산나트륨, pH 7.0(이동상 A)
TCC 온도	실온
등용매 분석	이동상 A
주입량	7.8 × 150mm 컬럼의 경우 5 μ L 4.6 × 150mm 컬럼의 경우 2 μ L
유속	7.8 × 150mm 컬럼의 경우 1mL/분 4.6 × 150mm 컬럼의 경우 0.35mL/분
UV 검출기	220 및 280nm

시약, 시료 및 재료

Innovator 및 바이오시밀러 Rituximab, Herceptin 및 ADC는 현지 약국에서 구입하여 제조업체의 지침에 따라 보관되었습니다. 일염기 및 이염기 인산수소나트륨, 염산(HCl) 및 수산화나트륨(NaOH)은 Sigma-Aldrich 사에서 구매했습니다. 모든 화학품과 용매는 HPLC 등급이며, Milli-Q 정수 시스템(Millipore Elix 10 모델, 미국)으로 얻은 초순수를 사용하였습니다.

Agilent AdvanceBio SEC 컬럼의 검량

AdvanceBio SEC 컬럼은 Agilent 300Å 단백질 표준물질(티로글로불린(670kDa), γ -글로불린(158kDa), 오브알부민(44kDa), 미오글로빈(17kDa) 및 안지오텐신 II(1,000Da))의 용리 부피를 측정하여 검량되었습니다. 배제 한계를 결정하기 위해 AdvanceBio SEC 단백질 표준물질의 로그 분자량(logMW) 값은 용리 부피에 대하여 플롯되었습니다.

정량 한계(LOQ) 및 검출 한계(LOD)

하나의 예로서, LOD 및 LOQ 측정을 위해 Herceptin 및 ADC가 사용되었습니다. 신호 대 잡음비(S/N) > 3일 때의 단백질 농도를 LOD로 간주하고 S/N > 10일 때의 단백질 농도를 LOQ로 간주합니다.

절차

면적 및 머무름 시간(RT) 편차를 계산하기 위해, 5 μ L 및 2 μ L의 이동상을 Blank로 주입했으며, 이어서 intact 및 stressed mAb를 6회 반복 주입했습니다.

Rituximab 응집체(aggregates)의 전처리

mAbs 및 ADC의 대표적인 예로서 Innovator rituximab 및 ADC가 응집체(aggregates) 분석에 사용되었습니다. 앞에 설명된 대로 응집체(aggregates)에 약간의 변형이 유도되었습니다[2].

1. 시료 용액(2mg/mL)에 1M HCl을 한 방울씩 천천히 추가하여 pH를 6.0에서 1.0으로 변경합니다.
2. 그런 다음 1M NaOH를 추가하여 pH를 10.0으로 조절합니다.
3. 1M HCl을 추가하여 pH를 다시 6.0으로 조절합니다.

500rpm으로 일정하게 혼합할 때 pH 변화 사이에는 약 1분의 대기 시간이 있었습니다. 마지막으로 얻은 용액을 60°C에서 60분 동안 배양했습니다.

결과 및 토의

분리 및 검출

AdvanceBio SEC 컬럼을 알려진 분자량을 가진 일련의 Agilent 300Å 단백질 표준물질로 검량했습니다. 단백질 마커에서 티로글로불린 응집체(aggregates)(void peak)를 사용해 틈새 부피를 계산했습니다. 이러한 응집체(aggregates)는 각각 AdvanceBio SEC, 7.8 × 150mm 컬럼에서 틈새 부피(V_0) = 2.56mL에 해당하는 2.56분에 용리되고, 4.6 × 150mm 컬럼에서는 V_0 = 0.805mL에 해당하는 2.35분에 용리됩니다. AdvanceBio SEC 컬럼에서 분리된 단백질의 검량 곡선은 선형 관계를 보여주며, 분석되는 단백질 범위에 대해 배제 한계(670kDa) 및 총 투과 한계(1,000Da)를 정의합니다. 그런 다음 이 플롯을 사용하여 용리 부피를 근거로 미지 단백질의 분자량을 확인할 수 있습니다(그림 1).

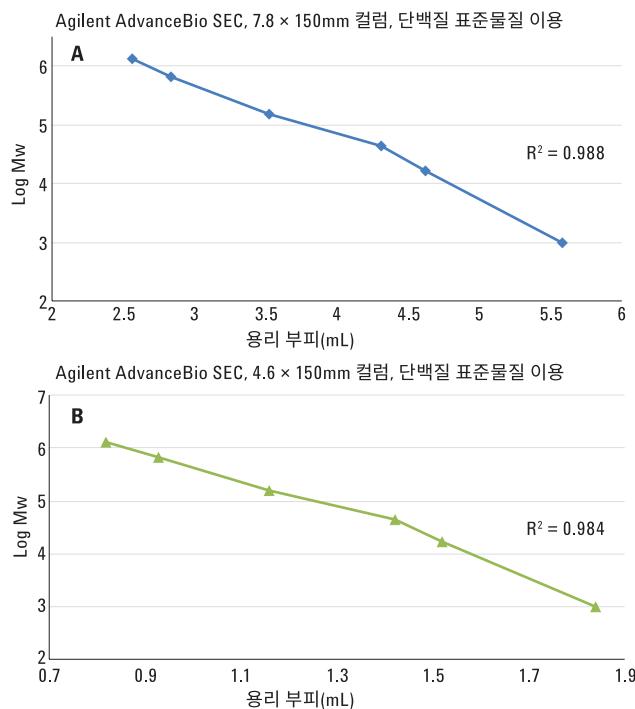


그림 1. 7.8 × 300mm(A) 및 4.6 × 150mm(B)
Agilent AdvanceBio SEC 300Å 컬럼을 이용한 단백질 표준물질의 검량 곡선

이 실험의 목표는 실행 시간을 줄여서 분석 처리량을 개선하는 것이었습니다. 주어진 컬럼 규격에 대해 유속은 SEC에서의 실행 시간을 결정하지만, 유속이 높으면 분리능이 저하될 수 있습니다. 더 빠른 실행 시간을 달성하려면, 유속 대 컬럼 틈새 부피의 비율을 줄여야 합니다. 더 빠른 SEC을 위한 명확한 방법은 컬럼 길이를 줄이고 유속을 높이는 것입니다[2,3]. 그림 2는 AdvanceBio SEC, 7.8 × 150mm 컬럼에서 rituximab 바이오시밀러 및 innovator, Herceptin 및 ADC의 SEC 크로마토그래피 프로필을 보여줍니다. 이러한 크로마토그램은 크로마토그래피 조건에서 4분 이내에 단량체(monomer)의 우수한 분리 결과를 증명합니다.

더 높은 감도를 달성하기 위해 AdvanceBio SEC, 4.6 × 150mm 컬럼에서 분리를 실시했습니다. 그림 3은 결과적으로 나타난 우수한 분리 성능을 보여줍니다. 두 경우에, 일찍 용출되거나 늦게 용출되는 피크(early or late eluting peaks)가 존재하지 않은 시판된 mAb가 균일하게 전처리되고 응집(aggregation)이나 분해가 없음을 설명합니다. 두 컬럼을 사용하여 액체 이동상을 통한 소수성 ADC의 분석에서 대칭 피크가 나타났으며, 이는 고정 서포트를 가진 소수성 페일로드의 2차 상호작용이 없음을 보여줍니다. 더 짧은 AdvanceBio SEC 컬럼이 모두 ADC 응집체(aggregates)를 분리하고 분석할 수 있었습니다. 이 분리는 서포트 개발, 로트 릴리스 및 안정성 연구에 대한 충분한 정보를 통해 ADC 특성 규명을 위한 적합성을 나타냅니다.

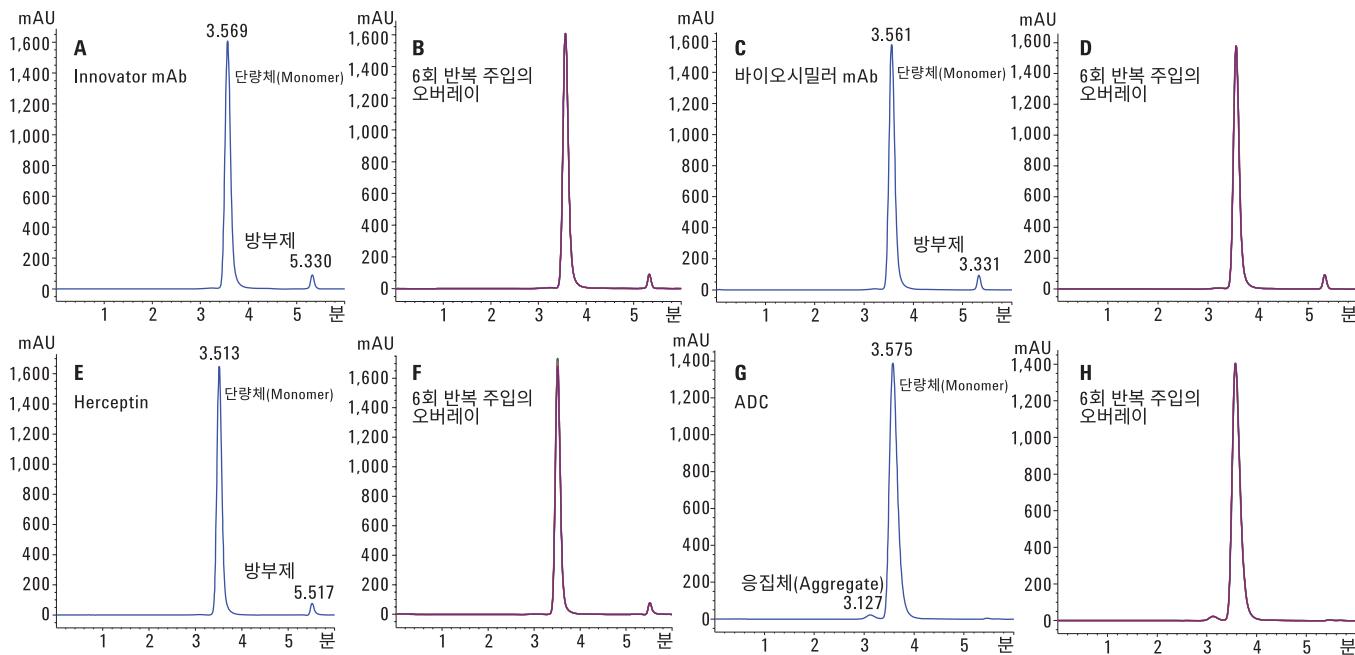


그림 2. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 150mm, 2.7µm 컬럼을 이용한 천연 Rituximab Innovator, 바이오시밀러, Herceptin 및 ADC의 SEC 크로마토그래피 프로필

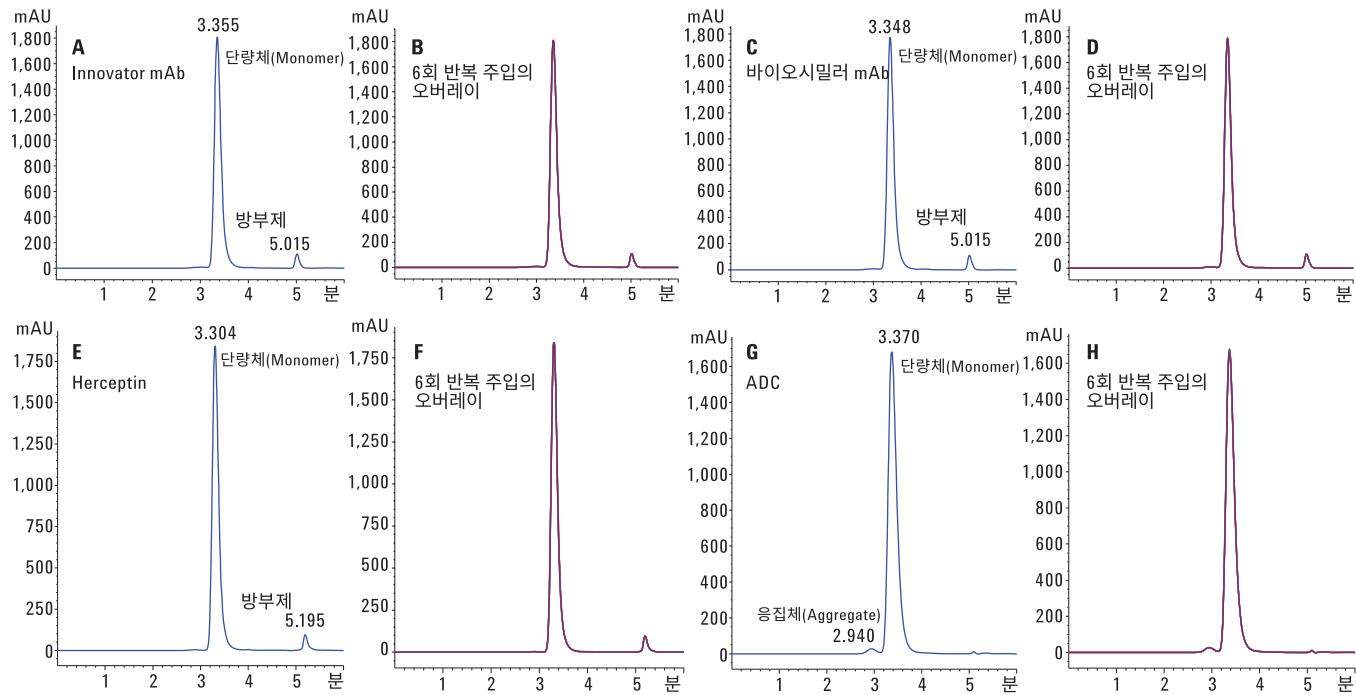


그림 3. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 4.6 × 150mm, 2.7μm 컬럼을 이용한 천연 Rituximab Innovator, 바이오시밀러, Herceptin 및 ADC의 SEC 크로마토그래피 프로필

RT와 면적 정밀도

분석법 정밀도를 수립하기 위해 7.8 × 150mm 컬럼의 경우 10μg 컬럼 상 농도에서 그리고 4.6 × 150mm 컬럼의 경우 4μg 농도에서 모두 4개의 생물학 물질이 가지는 RT 및 면적에 대한 상대 표준 편차(RSD) 값을 계산했습니다. 표 2는 시료의 6회 반복 주입에서 얻은 평균 RT와 면적 RSD를 보여줍니다. 가장 큰 면적 RSD 값은 0.21%이었고 RT RSD는 0.02%이었습니다. 면적 및 머무름 시간 RSD들은 분석법의 우수한 재현성을 증명하고 따라서 시스템의 정밀도를 입증합니다.

표 2. 시료의 RT 및 피크 면적 정밀도($n = 6$)

시료	Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 150mm, 2.7μm		Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 4.6 × 150mm, 2.7μm	
	RT RSD	피크 면적 RSD	RT RSD	피크 면적 RSD
Rituximab innovator	0	0.15	0.02	0.02
Rituximab 바이오시밀러	0	0.04	0.01	0.01
Herceptin	0	0.21	0.01	0.02
ADC	0	0.01	0	0.02

더 짧고 좁은 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 이용한 Herceptin 및 ADC의 정량화 LOD 및 LOQ

Herceptin 및 ADC에 대해 $7.8 \times 150\text{mm}$ 및 $4.6 \times 150\text{mm}$ 컬럼을 이용한 컬럼 상 LOD 및 LOQ를 표 3에 요약하였습니다. 그림 4는 Herceptin 및 ADC 시료에 대해 Blank를 이용한 LOD 및 LOQ 크로마토그램의 오버레이를 보여줍니다. 좁은 $4.6 \times 150\text{mm}$ 컬럼은 생물학 물질의 고감도 분석을 제공했음을 참고하십시오.

표 3. 시료에 대한 LOD 및 LOQ 값

시료	Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, $7.8 \times 150\text{mm}$, 2.7μm		Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 4.6 × 150mm, 2.7μm	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Herceptin	78ng	156ng	31.2ng	62.4ng
ADC	78ng	156ng	31.2ng	62.4ng

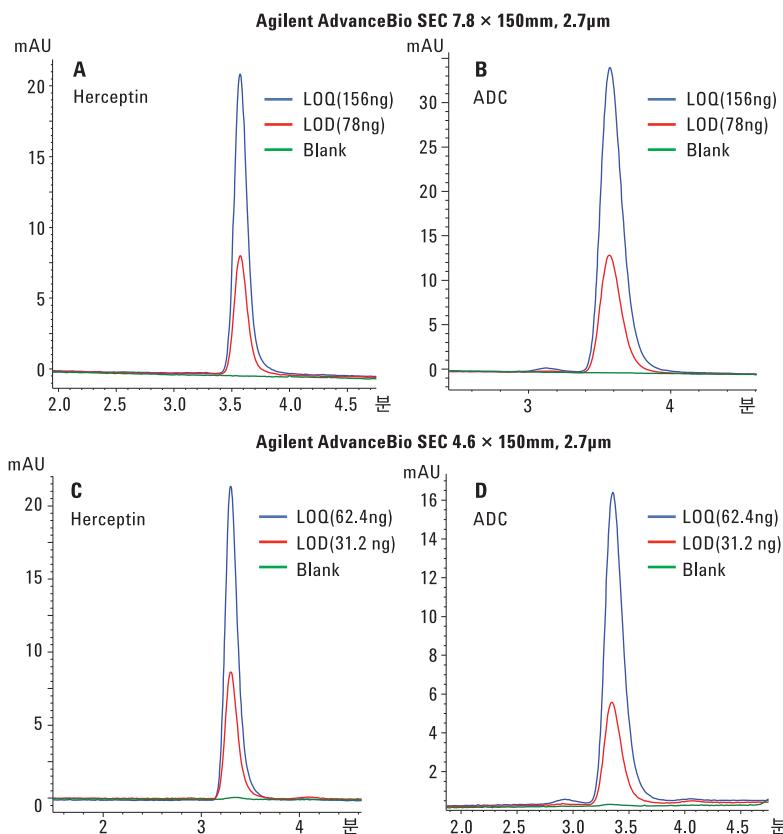


그림 4. $7.8 \times 150\text{mm}$ 및 $4.6 \times 150\text{mm}$ Agilent AdvanceBio SEC 300Å 컬럼에 대해 Blank와 중첩된 Herceptin 및 ADC의 LOD 및 LOQ에 대한 SEC 크로마토그래피 프로필

직선성

면적 감응도와 Herceptin/ADC의 농도(LLOQ 수준으로부터 본 연구의 최고 농도 수준까지)를 이용하여 Herceptin 및 ADC에 대해 관찰된 선형 곡선을 작성합니다. 그림 5는 두 컬럼에서 15.6 ~ 2,000 μ g/mL의 농도 범위에서 Herceptin 및 ADC의 선형 곡선을 보여줍니다. mAbs 및 ADC에 대해 관찰된 회귀 계수(R^2)는 분석법이 분석 범위 내에서 정량적임을 나타냅니다.

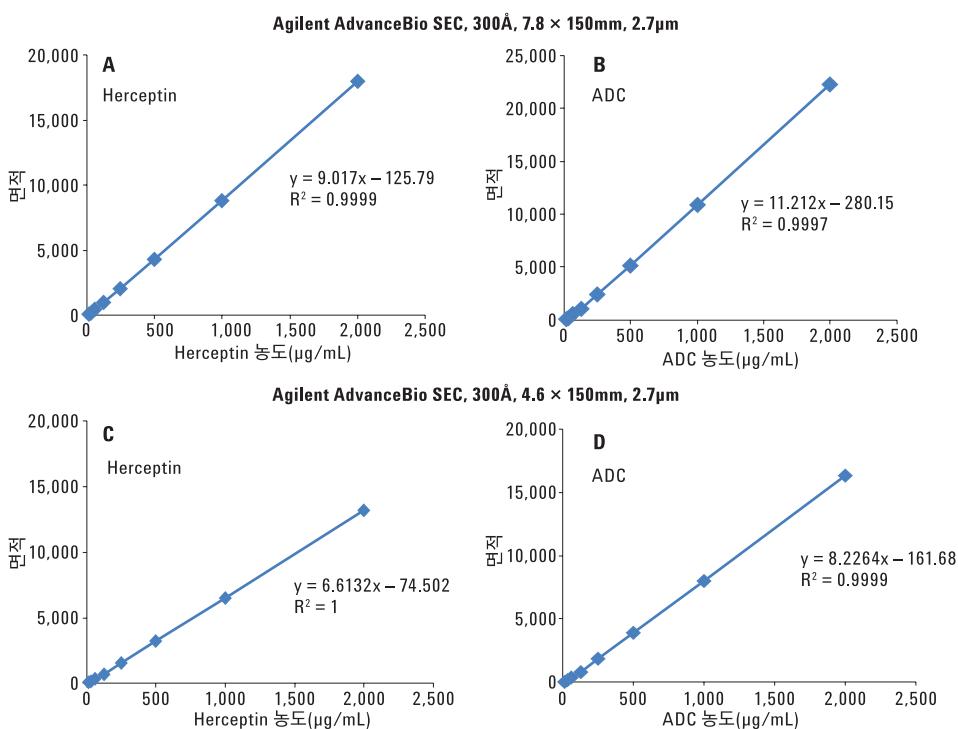


그림 5. Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 이용해 우수한 계수 값을 보여주는, 농도 범위가 15.6 ~ 2,000 μ g/mL인 Herceptin 및 ADC의 8가지 표준 농도로 구성된 선형 곡선

응집(aggregation)/분해 분석

단백질 응집(aggregation)의 제어는 단백질 제품의 정제, 제제 및 제조 중에 항상 제기되는 우려 사항입니다. 애질런트에서는 응집체(aggregates)와 분해물의 모니터링을 위해 AdvanceBio SEC 컬럼을 사용하여 천연 및 forced-stress Herceptin과 ADC를 비교했습니다. 크로마토그래피 실행에서 단량체(monomers) 형태 이전에 용출된 피크는 응집체(aggregates)로 간주되며, 그 후에 용출된 피크는 조각/분해물로 간주됩니다.

pH/열 유도 응집체(aggregates)의 크로마토그램은 이 두 개의 AdvanceBio SEC 컬럼이 응집체(aggregates) 및 조각을 분리하고 검출할 수 있음을 보여줍니다. 그림 6 및 7에서와 같이 단량체(monomer), 응집체(aggregates) 및 분해물은 각각 뚜렷하게 잘 분리되었습니다. 또한 stress로 인해 단량체(monomer)의 피크 높이가 크게 감소되었습니다(데이터 표시되지 않음).

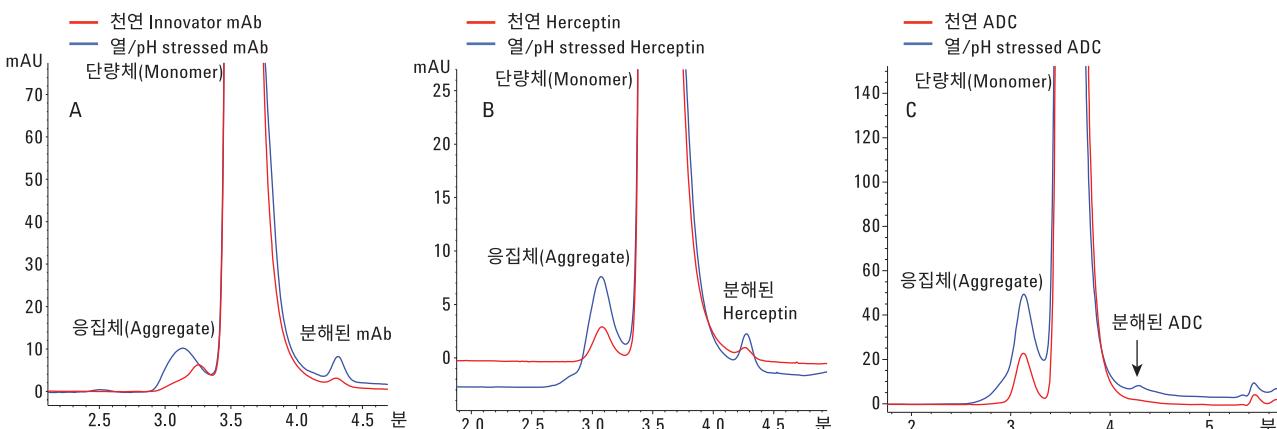


그림 6. Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 150mm, 2.7µm 컬럼을 사용하여 Heat/pH stressed(파란선)와 중첩된 천연(대조, 빨간선) Innovator mAb, Herceptin, 및 ADC의 크로마토그램

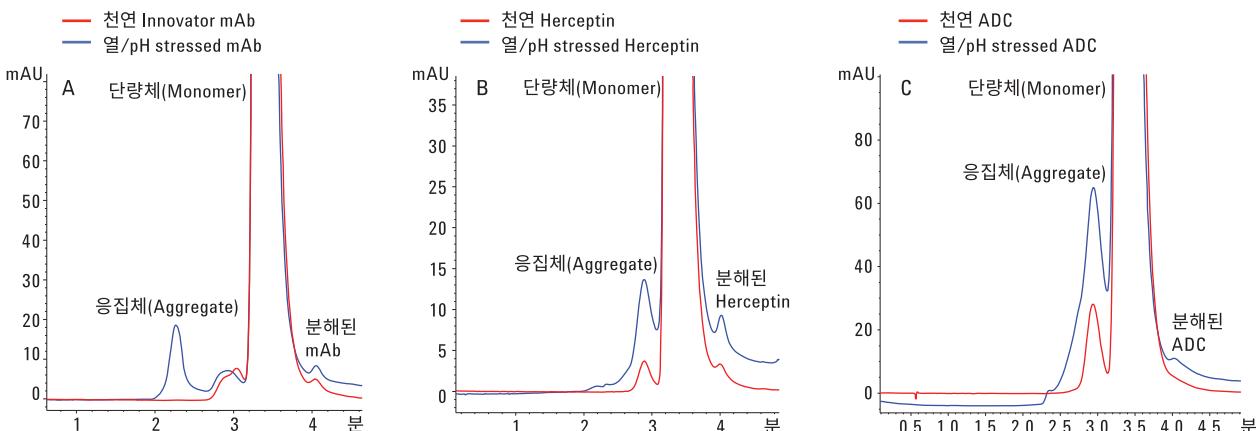


그림 7. Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 4.6 × 150mm, 2.7µm 컬럼을 사용하여 Heat/pH stressed(파란선)와 중첩된 천연(대조, 빨간선) Innovator mAb, Herceptin, 및 ADC의 크로마토그램

결론

SEC은 단백질 응집체(aggregates)의 특성 규명에 널리 사용됩니다. 잠재적인 면역원성으로 인해 재조합 단백질 생산 중 응집체(aggregates) 수준을 철저히 제어해야 합니다. 본 연구에서 단량체(monomer), 응집체(aggregates) 및 조각의 고처리량 분리는 2.7μm 입자를 가진 더 짧고 좁은 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 이용해 4분 이내에 실시되었습니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 이동상에 유기 변형제를 사용하지 않고도 소수성 ADC에 우수한 피크 모양을 제공할 수 있었습니다. 면적 및 RT 정밀도가 우수했으며, 일상적인 사용을 위한 분석법의 신뢰성을 증명합니다. 또한 평가된 농도 범위에 대해 선형 계수 값으로 확인된 바와 같이 분석법은 정량적이고 정확합니다. 마지막으로, 더 짧고 좁은 AdvanceBio SEC 컬럼은 forced-stress 연구에 기초한 응집체(aggregates) 및 조각 모니터링의 확실한 결과를 제공했습니다. 이러한 결과들은 이 컬럼이 고처리량과 감도가 요구되는 응용 분야에 적합하다는 사실을 나타냅니다.

참고 문헌

1. Fekete, S.; Beck, A.; Veuthey, J-L.; Guillarme, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J. Pharm. 및 Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 161-173.
2. 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. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 2197–2204.
3. Coffey, A. *Fast, High-Resolution Size Exclusion Chromatography of Aggregates in Biotherapeutics*(바이오 치료제 속 응집체의 고속 고분해능 크기 배제 크로마토그래피); 응용 자료, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-6458KO, 2015.

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

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., 2016
2016년 8월 1일 한국에서 인쇄
5991-7165KO

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



Agilent Technologies