

Protein A 친화성 IgG 포집 이후 AdvanceBio SEC 응집(Aggregation) 분석

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션 사용

응용 자료

생물약제 및 생물약품

저자

Patrick Cronan, Timothy Rice 및
Michael Kruger
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션을 사용한 바이오 의약품
시료 내 응집체(aggregates)의 정량화입니다. Protein A 컬럼으로의 친화성 포집은
1차원에서 수행되었으며 크기 배제 크로마토그래피는 2차원에서 수행되었습니다.
다중 heart-cutting은 시료를 1차원에서 2차원으로 보내기 위해 사용되었습니다.
이 기술로 단일 분석으로 전체 특성을 규명할 수 있어 분획 분취와 다중 주입이
필요하지 않습니다.



Agilent Technologies

서론

단백질 치료제는 작은 분자량의 약품보다 훨씬 복잡하므로 이 복잡성을 밝히는 것이 분석 작업의 난제입니다. 이러한 분자의 발달과 수명 기간 동안 면밀한 특성 규명이 필요합니다.¹

Protein A는 황색포도상구균의 세포벽에서 발견되는 면역글로불린-Fc(IgG) 수용체입니다. 이 단백질은 인간 IgG 1, IgG 2, IgG 4 및 토끼와 쥐 등 다른 종의 IgG 같은 다클론성 및 단클론성 IgGs에 높은 친화성을 가지고 있습니다. 고정시킨 Protein A는 통상적으로 분취 및 공정 스케일의 IgG 정제에 사용됩니다. 분석 규모에서 Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC 컬럼은 복잡한 혼합물 또는 순수 시료^{2,3}의 빠른 정량화와 IgG의 소규모 정제에 사용될 수 있습니다.

크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 바이오 의약품 시료에서 응집체(agggregates)의 정량화를 위해 선택한 분석법입니다. Protein A IgG 포집 및 이어지는 응집체(agggregates) 분석을 위한 SEC는 분석하는 시료가 순수할수록 더 정확한 특성 규명이 이루어집니다. 이 분석은 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션을 사용하여 1회 주입으로 실행될 수 있습니다. IgG Protein A 포집은 1차원에서 수행됩니다. 그런 후에 용리된 IgG는 다중 heart-cutting 루프에 모아지게 되고 2차원에서 정확한 응집체(aggregate) 분석을 위해 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼에 용리됩니다.

실험

실험 기기

이 연구에 사용된 2D-LC 솔루션은 Agilent 1260 Infinity Bio-Inert LC를 1차원 시스템으로 구성하였습니다. 1260 Infinity Bio-Inert LC는 2차원 크로마토그래피를 위해 다중 heart-cutting 밸브인 Agilent 2D-LC Quick Change 밸브(12곳에 40µL 시료 루프 장착)와 Agilent 1290 Infinity 고속 펌프가 한 쌍을 이룹니다. 다이오드 어레이 검출기(DAD)는 2차원에 배치됩니다. 그림 1은 사용된 기기 모듈을 보여줍니다.

소프트웨어

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 소프트웨어가 포함된 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition 소프트웨어는 시스템 구성, 2D-LC 분석법 설정, 2D-LC 데이터 수집 제어(그림 2)에 사용되었습니다.

시료

시료는 Sigma(p/n 19640)로부터 구입한 IgG 표준물질입니다.

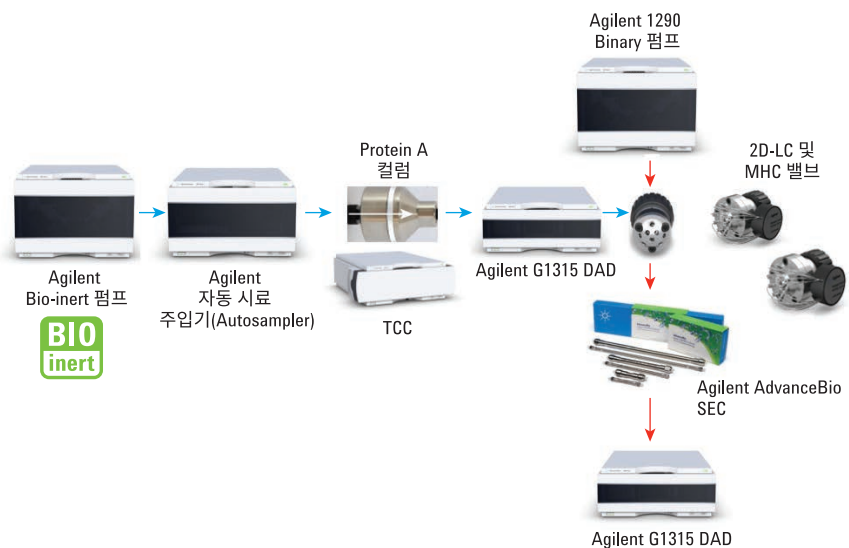
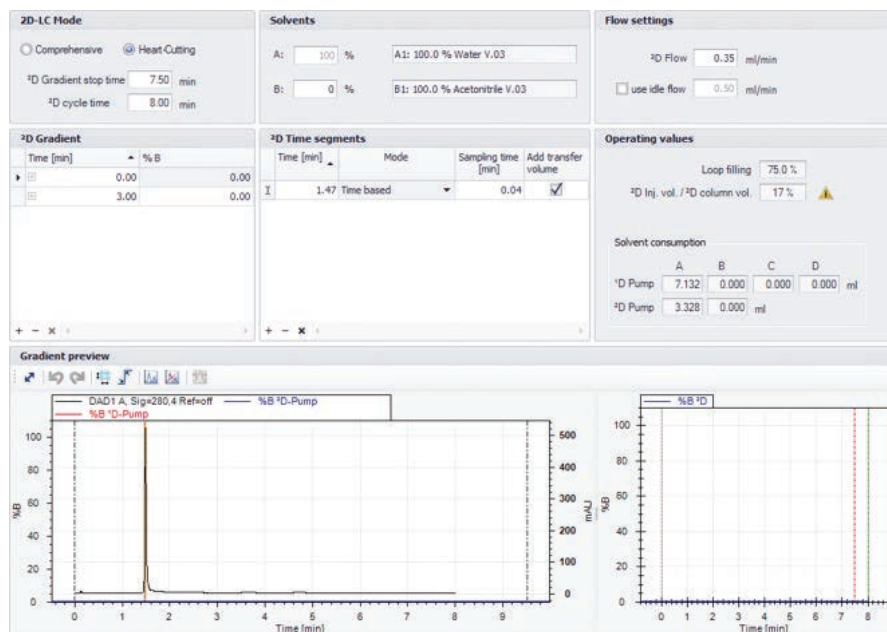


그림 1. 1차원에서 Agilent Bio-Monolith Protein A 컬럼과 2차원에서 Agilent AdvanceBio SEC를 사용하는 2D-LC 솔루션 구성

A



B

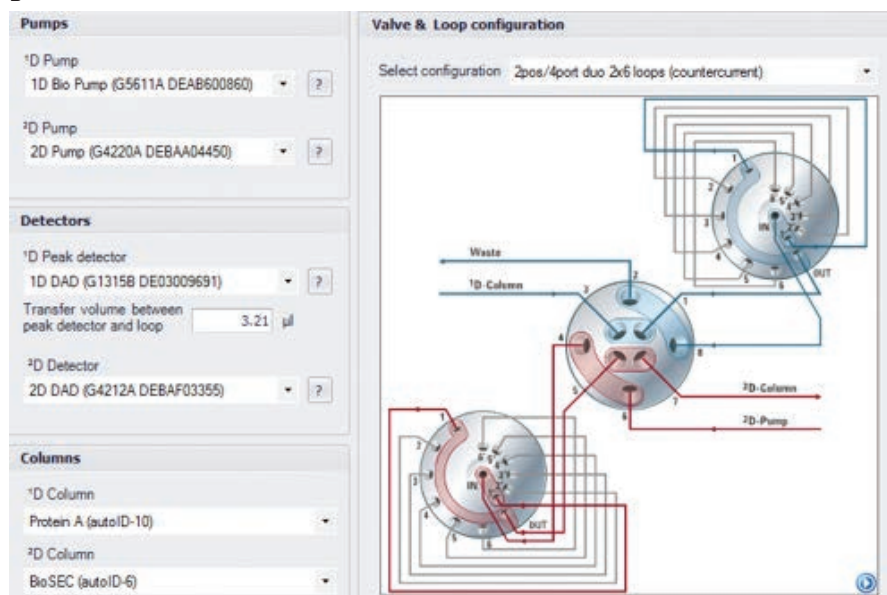


그림 2. Agilent OpenLab CDS ChemStation 2D-LC 소프트웨어로 2D-LC 시스템을 구성하고 중첩된 1차원 기유키와 더불어 첫 번째 크로마토그램을 참고하여 두 번째 기유키와 다중 cutting을 설정합니다. 이러한 분석법 설정 대화 상자를 통해 다중 시간과 시간별 이벤트를 쉽게 설정할 수 있습니다

결과 및 토의

이 2D 분리는 단일클론 항체(mAb) 응집체(aggregate) 분석의 속도를 높이는 데 이용됩니다. 응집체(aggregate) 특성 규명의 두 단계를 결합함으로써 1회 주입으로 전체 분석을 수행하여 분획 분취 단계를 없앨 수 있습니다. 그림 3은 일반적인 Protein A 친화성 포집 분리를 보여줍니다. 시료는 인산염 완충 생리식염수에 포집되고, 500mM 아세트산(수용액)에 용리됩니다.

그림 4는 2D 분석에서 1차원으로 사용되었을 때, Protein A 컬럼으로부터 풀려난 후 SEC 단계가 즉시 수행될 수 있음을 보여줍니다.

분석법

1차원 분리 - UV 검출을 사용하여 Protein A 친화성 포집	
컬럼	Agilent Bio-Monolith Protein A 컬럼(p/n 5069-3639), 실온
유속	0.75mL/분
이동상 A	100mM PBS
이동상 B	500mM 아세트산
이동상 변화도	0분 - 0% B 0.5분 - 0% B 0.51분 - 100% B 2.5분 - 100% B 2.6분 - 0% B
2차원 분리- SEC	
컬럼	Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 4.6 × 150mm, 2.7µm 컬럼(p/n PL1580-3301), 25°C
유속	0.35mL/분
이동상	10mM PBS pH 7.4, 등용매
2D-LC 모드	다중 heart-cutting

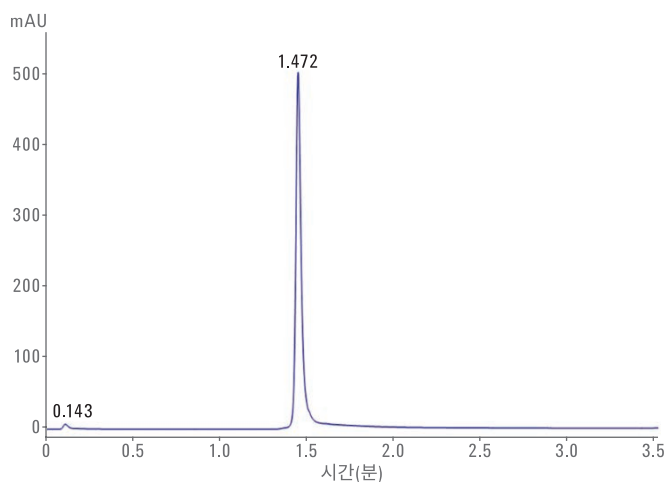


그림 3. Agilent Bio-Monolith Protein A 컬럼을 사용한 IgG의 Protein A 친화성 포집 분리

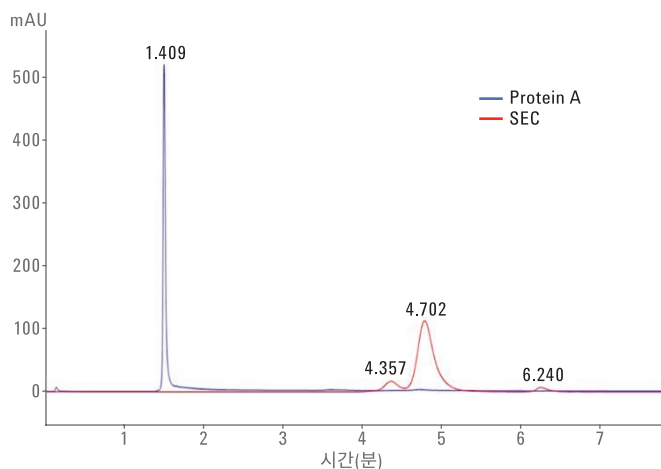


그림 4. Agilent Bio-Monolith Protein A 컬럼을 사용한 Protein A 친화성 포집과 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용한 IgG 크기 배제 분리

이 절차는 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션을 사용하는 하나의 분석에서 Protein A와 SEC 기술의 결합 가능성을 보여줍니다. 이 증명 이외에 서로 다른 응집(aggregation) 농도에 대해 2D 분석법을 사용하는 SEC 검출을 테스트합니다. IgG 표준물질은 24시간 동안 65°C의 온수에서 열을 가합니다. 이와 같은 가열로 그림 5와 6에 나타난 것과 같이 더 큰 응집체(aggregate) 농도를 얻게 됩니다. 그림 6은 단량체와 이합체 중으로부터 얻은 응집체(aggregate)의 명확한 분리 결과를 보여줍니다.

결론

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션은 한 가지 방법을 사용하여 mAb Titer와 응집(aggregation)을 측정하기 위한 효율적인 범용 방법을 제공하여 분획 분취와 다중 주입의 필요가 없습니다. 2D-LC 워크플로의 1차원으로 사용된 Agilent Bio-Monolith Protein A 컬럼은 적정 농도 측정을 위한 분석 규모 mAb 정제에 편리하며 응집(aggregation) 분석 이전의 초기 정제 단계로 사용합니다. Agilent AdvanceBio SEC 300Å 컬럼은 2D-LC 워크플로의 2차원으로서 정확한 평가를 가능하게 하기 위해 단량체로부터 응집체(aggregate)의 분리에 대한 훌륭한 분리능을 보여주었습니다.

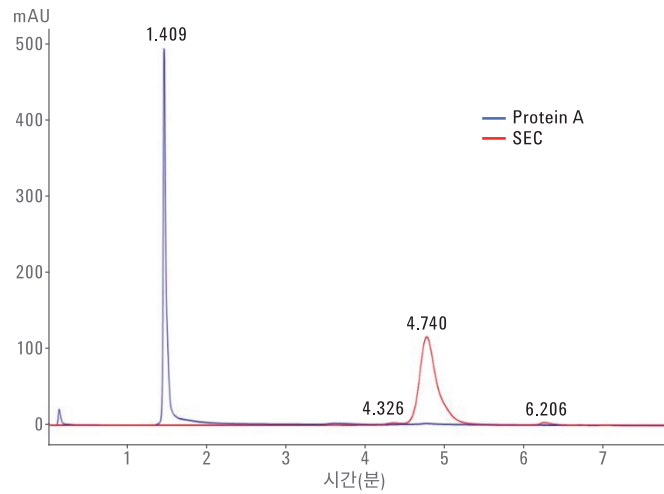


그림 5. Agilent Bio-Monolith Protein A 컬럼을 이용한 Protein A 친화성 포집과 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용한 가열된 IgG의 크기 배제 분리

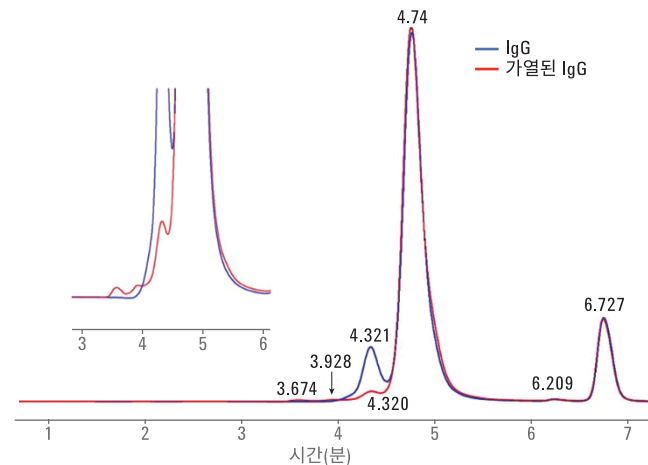


그림 6. IgG와 가열된 IgG에 대한 Agilent AdvanceBio SEC 2D 크기 배제 분리 오버레이

참고 문헌

1. Vanhoenacker, G.; *et al.* Analysis of Monoclonal Antibody Digests with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution. *Agilent Technologies* 응용 자료, 발행물 번호 5991-2880EN, **2013**.
2. Lidija, U.; *et al.* Rapid Human Polyclonal IgG Quantification Using the Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC Column. *Agilent Technologies* 응용 자료, 발행물 번호 5989-9733EN, **2008**.
3. Duong, P. T. Agilent Bio-Monolith Protein A Monitors Monoclonal Antibody Titer from Cell Cultures. *Agilent Technologies* 응용 자료, 발행물 번호 5991-2990EN, **2014**.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 9월 1일 한국에서 발행
5991-7223KO

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



Agilent Technologies