

# 단백질 응집체 연구를 최적화하고 실행하기 위한 종합 워크플로

분석법 개발 및 광산란과 크기 배제 크로마토그래피의  
조합

## 응용 자료

바이오 의약품 및 바이오시밀러

### 저자

Andy Coffey 및 Matthew Rain  
Agilent Technologies, Inc.

### 개요

이 응용 자료는 다음을 위한 종합적인 응집 분석 워크플로를 설명합니다.

- 단일클론 항체의 고성능 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 위한 이동상 조건 최적화
- 단량체(Monomer), 이합체 및 고차 응집체를 포함한 응집 프로파일 특성 규명

당사는 Agilent Buffer Advisor 소프트웨어를 사용하여 일련의 빠른 LC 실행 중 실시간에 자동으로 다양한 범위의 버퍼 조성을 혼합하기 위해 Agilent 1260 Infinity II bio-inert LC 시스템의 bio-inert Quaternary 펌프를 최대한 활용하는 복잡한 SEC 최적화 실험을 자동화했습니다. Agilent 1260 Infinity Bio-MDS 다중 검출기 세트는 고차 단백질 응집체를 밝히고, 절대 분자량을 결정하며 UV 검출 시스템으로 얻은 정량 측정데이터를 보완하기 위해 동적 광산란 검출 기능을 사용했습니다.



**Agilent Technologies**

## 서론

일부 단일클론 항체(mAbs)와 단백질은 용액에서 자발적으로 응집하는 경향이 있습니다. 대부분 바이오 의약품 응용 분야에서, 그러한 응집의 정도를 다양한 조건에서 정밀하게 특성 규명하고 정량화해야 합니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 단백질 응집의 특성 규명과 정량화를 위한 강력한 기법이지만, 정확한 측정을 위해서는 천연 단백질 형태를 수용하는 조건에서 운영 가능한 우수한 크로마토그래피가 필요합니다. 특정 단백질에 대한 크로마토그래피 피크 모양을 개선하여 분리능을 향상시키기 위해, 종종 다양한 이동상 조건을 평가할 필요가 있습니다.

때때로 SEC 기법에 최적화된 버퍼 조건의 활용이 간과되곤 합니다. 전통적으로, 버퍼 조건은 고정상 물질과 원치 않는 비특이적 상호 작용을 극복하기 위해 최적화되었지만, 컬럼 결함을 해결하기 위한 최적화는 측정하고자 하는 모든 응집을 방해하는 위험을 야기할 수 있습니다. 그러나, Agilent AdvanceBio SEC 컬럼의 inert한 표면 코팅은 다양한 버퍼 조건에서 이차 상호 작용을 줄이는 데 도움을 주며, 단백질 형태와 크로마토그래피 분리능을 위한 버퍼의 화학적 특성을 최적화할 수 있는 높은 유연성을 제공합니다. 매우 복잡한 파라미터 스카우팅 실험은 응집체 분석을 위해 SEC 버퍼 조건의 일반적인 최적화에 또 다른 방해물이 되어 왔습니다. 실험을 최적화하기 위해 이용 가능한 이동상에 대한 복잡한 테이블을 고안해야 했으며, 다양한 염, 버퍼 및 pH의 매트릭스를 실험적으로 평가하기 위해 다양한 용액을 지루하게 수동으로 만들어야 했습니다. 그러나, 현대화된 도구는 SEC 조건 최적화, 응집체 특성 규명 및 정량화, 일상적으로 사용할 최적화된 기법의 응용에 대한 워크플로를 단순화했습니다.

이 응용 자료는 다음과 같이 응집체 연구를 위해 전체 워크플로 솔루션의 활용 방법을 보여줍니다.

- 4개의 간단한 저장 원액에서 지정된 일련의 LC 버퍼를 자동으로 혼합하고 Agilent Buffer Advisor 소프트웨어와 고분리능 bio-inert quaternary LC 펌프를 이용해 실시간으로 pH와 버퍼 농도를 조정합니다.
- 다양한 질량 범위에서 UV 검출의 감도를 높이면서 광산란 검출을 이용해 고차 단백질 응집체를 측정합니다.
- 광산란 검출을 이용해 응집 단백질 및 단량체 단백질의 절대 분자량과 Hydrodynamic radius를 특성 규명합니다.

이 분석에는 빠른 스크리닝을 위한 고속 분리를 달성하기 위해 Agilent AdvanceBio SEC 15cm 컬럼을 사용했습니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 더 긴(및 더 짧은) 길이로 제공되므로 30cm 형식이나 심지어 추가적인 분리능이 요구될 수 있는 multiplex 컬럼에 맞게 분석법을 쉽게 수정할 수 있다는 점을 주목해야 합니다. 이 연구에서 사용되는 단일클론 항체 시료는 일반적인 rituximab와 rituximab 바이오시밀러입니다.

## 재료 및 방법

### 시약, 시료 및 재료

일염기 및 이염기 인산수소나트륨 및 염산은 VWR사에서 구매했습니다. 사용된 모든 화학품과 용매는  $\geq 99.7\%$ 의 순도를 가졌습니다. Milli-Q A10 정수 시스템(Millipore, 미국)으로 얻은 초순수( $>18M\Omega$ )를 사용하였습니다. 용액은 매일 새로 준비되었으며 사용 전에  $0.22\mu\text{m}$  멤브레인 필터로 여과되었습니다.

## 기기

응집체 분석을 위한 Agilent 1260 Infinity II Bio-inert LC 시스템의 구성:

- Agilent 1260 Infinity II Bio-inert Quaternary 펌프(G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II Bio-inert Multisampler, 시료 냉각기 및 multi-wash 포함(G5668A)
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치, bio-inert heat exchanger 포함(G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 WR, bio-inert 표준 흐름 셀 포함(G7115A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-SEC 다중 검출기 시스템(G7805AA)
- Agilent AdvanceBio SEC 300Å,  $7.8 \times 150\text{mm}$ ,  $2.7\mu\text{m}$  컬럼 (p/n PL1180-3301) 또는
- Agilent AdvanceBio SEC,  $2.7\mu\text{m}$  300Å  $7.8 \times 300\text{mm}$  컬럼 (p/n PL1180-5301)

## 기기 조건

Parameter	Value
Mobile phase	표 1 참조
Flow rate	0.8mL/min
Temperature	25°C
Injection	1 ~ 25 $\mu\text{L}$ (시료 농도에 좌우됨)
Detection	220nm, 280nm, LS 90°, and DLS
Samples	Rituximab innovator, rituximab biosimilar 및 BSA

## 결과 및 토의

각 분석 혼합물에 최적의 이동상 조성을 얻기 위해, 12가지 실험 조건을 대표하는 4개의 서로 다른 pH 수준에 걸쳐 3가지 이동상을 평가했습니다. 버퍼 조성은 다음과 같습니다:

- 150mM Sodium phosphate
- 10mM Sodium phosphate + 140mM NaCl(서로 다른 pH 조건에서 PBS를 에뮬레이션)
- 100mM Sodium phosphate + 150mM NaCl

각 이동상을 pH 6.2, 6.6, 7.0 및 7.4에서 테스트했습니다.

각 실험을 실행하기 위해, 당사는 Agilent Buffer Advisor에서 각 처리에 대한 버퍼 조성과 pH를 지정했습니다. 소프트웨어는 저장 원액 A ~ D의 적절한 혼합을 자동으로 계산하여 LC 파라미터 스카우팅 실행 동안에 실시간으로 원하는 이동상 사양을 만들었습니다. 표 1은 12가지의 실험 조건을 나타냅니다.

이러한 조건은 rituximab의 상용 시료, rituximab 바이오시밀러 시료 및 상용 BSA 단백질 표준 혼합물(기기 검량을 위한 10mg/mL 용액)을 분석하기 위해 사용되었습니다.

Agilent AdvanceBio SEC 300Å 150 × 7.8mm 컬럼을 사용함으로써 시료 당 10분 이내에 스크리닝 실험을 수행할 수 있었습니다.

표 1. 실험 조건 및 해당하는 이동상 조성

Experiment	pH	User-specified parameters			Software-calculated parameters			
		Buffer (mM)	NaCl (mM)	Total conc. (mM)	% A	% B	% C	% D
1	6.2	150	0	150	25.0	0.0	57.0	18.0
2	6.6	150	0	150	25.0	0.0	42.3	32.7
3	7.0	150	0	150	25.0	0.0	26.3	48.7
4	7.4	150	0	150	25.0	0.0	13.8	61.2
5	7.4	10	140	150	67.0	28.0	0.9	4.1
6	7.0	10	140	150	67.0	28.0	1.8	3.2
7	6.6	10	140	150	67.0	28.0	2.9	2.1
8	6.2	10	140	150	67.0	28.0	3.9	1.1
9	6.2	100	150	250	20.0	30.0	36.3	13.7
10	6.6	100	150	250	20.0	30.0	26.1	23.9
11	7.0	100	150	250	20.0	30.0	15.6	34.4
12	7.4	100	150	250	20.0	30.0	7.8	42.2

A = Water  
 B = 500mM NaCl  
 C = 200mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 D = 200mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

크로마토그래피 데이터의 초기 검토에서는 그림 1과 그림 2에서 나오는 바와 같이 이동상 조건이 실험 동안에 rituximab innovator 및 rituximab 바이오시밀러의 피크 모양에 영향을 준 것으로 나타났습니다. 두 가지 버전의 분자는 프로파일에서 유사하게 보이며, 10mM 인산나트륨과 140mM NaCl의 이동상 조성에 동일한 비정상 현상을 나타냅니다. 이 이동상 조건에서 피크 높이는 줄어들면서 피크 테일링은 눈에 띄게 커졌습니다. 이러한 현상은 다른 단백질에서도 관찰할 수 있으며, 분석법 개발과 분석법 완전성 모두를 위해 이동상 조성의 영향을 주의 깊게 평가할 필요성을 보여줍니다.

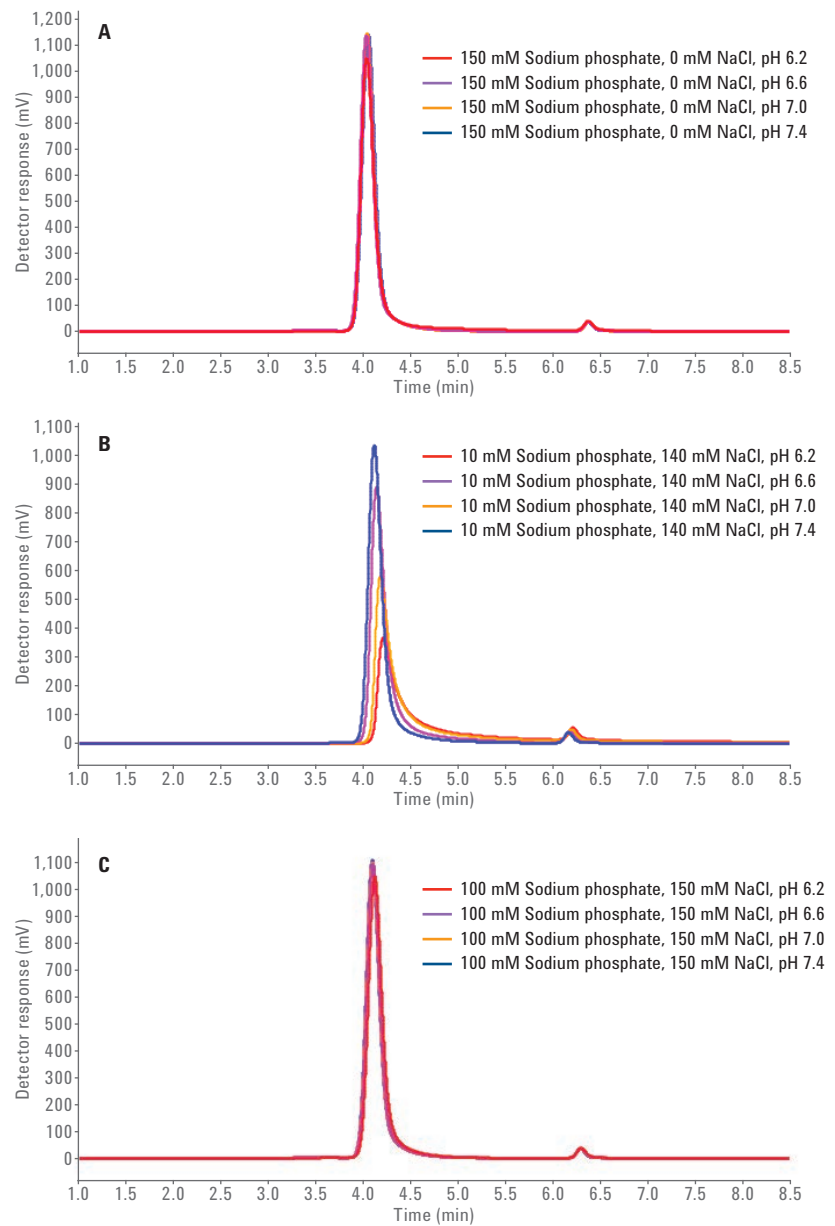


그림 1. 12가지 이동상 조건에서 연속 실행한 Rituximab innovator(1 $\mu$ L 주입량) 분석 결과(실험 1 ~ 12: 표 1 참조)

응집체 함량을 정량화하기 위해 UV 검출기를 사용해야 합니다. 단량체(monomer) 피크와 응집체 피크(검출된 경우)의 적분을 통해 응집체의 피크 면적 백분율을 계산했습니다. 결과는 rituximab innovator의 경우 그림 3A에 나오고 rituximab 시밀러의 경우 그림 3B에 나와 있습니다. 가장 일정한 결과는 150mM 인산나트륨이나 100mM 인산나트륨과 150mM NaCl을 사용하여 pH 7.0에서 얻어졌습니다(실험 3 및 11).

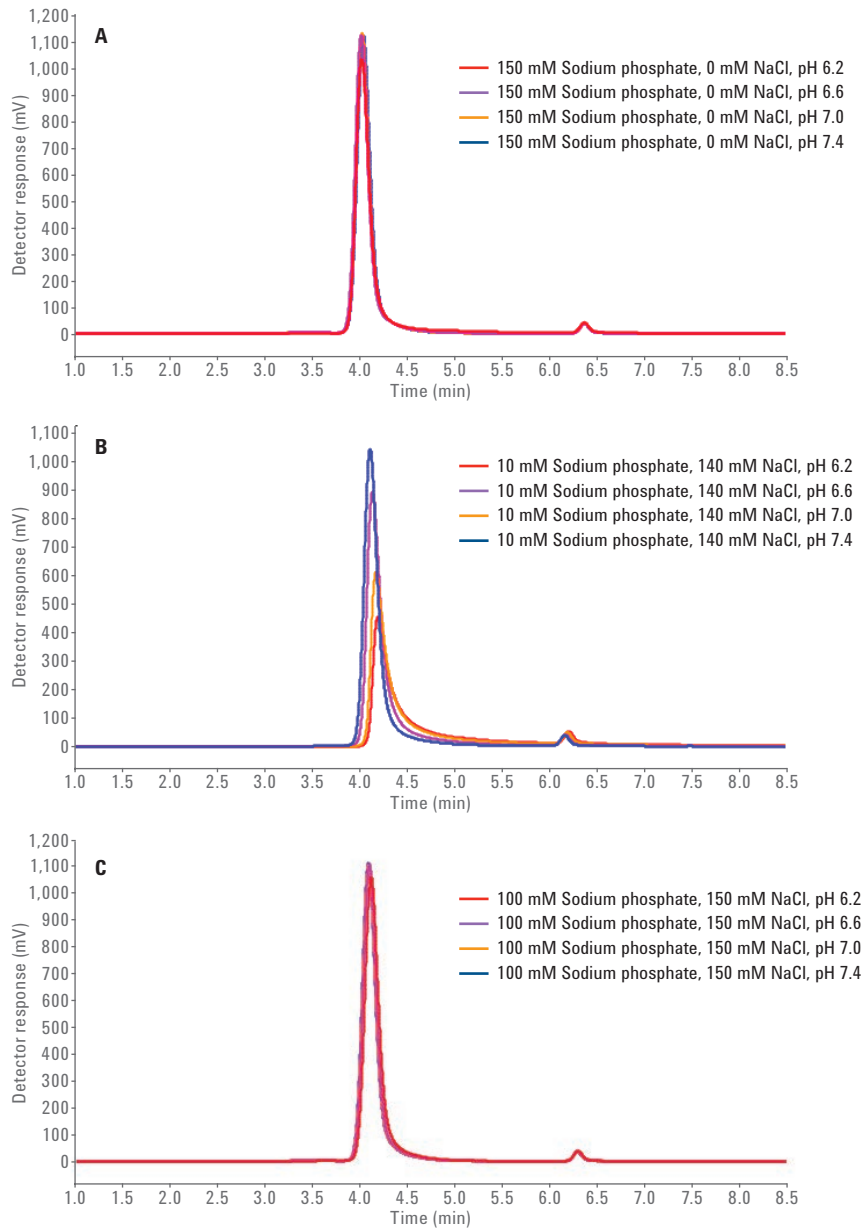


그림 2. 12가지 이동상 조건에서 연속 실행한 Rituximab 바이오시밀러(1 $\mu$ L 주입량) 분석 결과(실험 1 ~ 12: 표 1 참조)

그림 4는 pH 7.0에서 세 가지 버퍼 조성으로 얻어진 크로마토그램을 보여주며, 10mM 인산나트륨과 140mM NaCl이 이 분자의 분석에 이동상으로 사용될 경우 응집체(화살표로 강조 표시)가 검출되지 않았음을 명확히 증명합니다.

응집체 분석 워크플로에 광산란 검출기를 추가하는 것은 선택 사항이지만, 단백질 응집체에 대해 더 유용한 정보를 보여줍니다. 잘 정의된 분자(이 경우 BSA)를 일회 주입하고 간단한 기기 검량을 실시하여, 검출기 사이의 지연과 기기 상수를 빠르게 결정할 수 있습니다. Agilent Bio-SEC 소프트웨어는 동일한 컬럼 및 유속 조건에서 얻어진 다른 크로마토그램으로부터 개별 피크에 대해 분자량 정보를 보고하기 위해 사용될 수 있습니다.

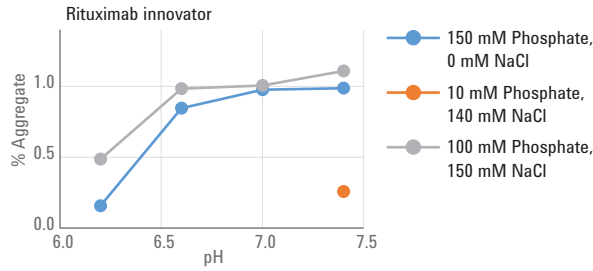


그림 3A. Rituximab innovator 응집체 함량의 피크 면적 백분율(실험 1 ~ 12: 표 1 참조). 점은 응집체가 검출된 실험에 표시됩니다.

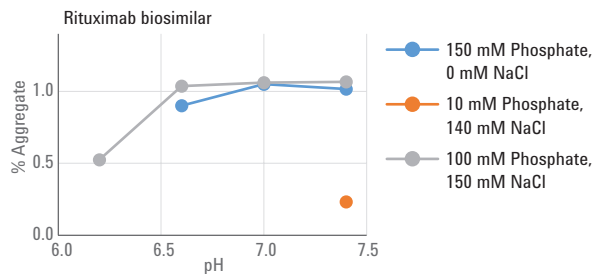


그림 3B. Rituximab 바이오시밀러 응집체 함량의 피크 면적 백분율(실험 1 ~ 12: 표 1 참조). 점은 응집체가 검출된 실험에 표시됩니다.

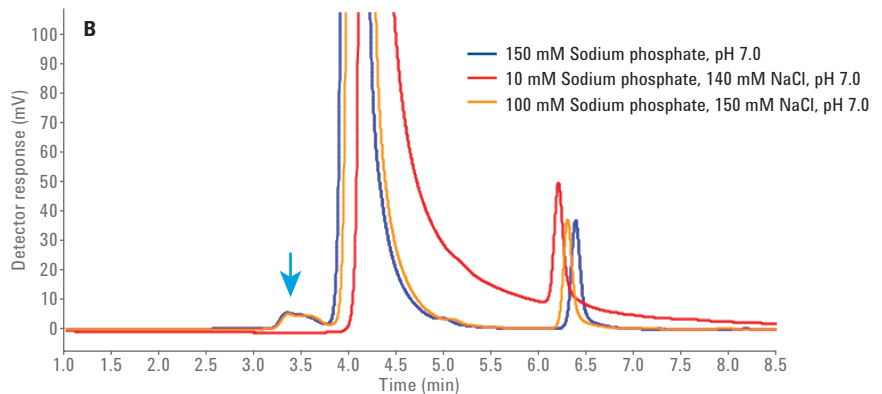
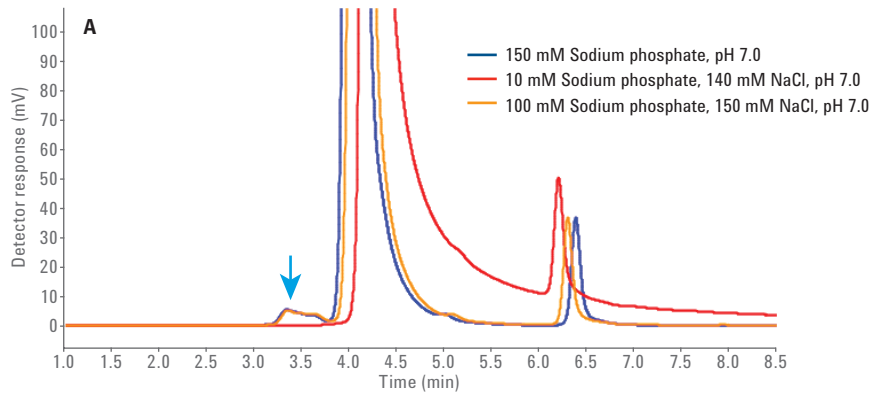


그림 4. 최적화된 pH 7.0에서 서로 다른 버퍼 염 농도를 이용해 UV 220nm에서 검출한 rituximab innovator(A) 및 rituximab 바이오시밀러(B)에 대한 바탕선 확대/축소 결과(표 11의 실험 3, 6 및 11)

그림 5는 실험 11의 높은 염 조건에서 실행되는 rituximab 시밀러 대비 rituximab innovator의 광산란 분석 결과를 보여줍니다. 단량체(monomer) 피크에만 분석을 집중할 때, 광산란 분석은 이전 응용 자료에서 얻은 정확한 질량 값에 가까운 분자량을 보고했습니다. 바이오시밀러 분자는 originator 분자에 명확하지 않은 C-말단 라이신 변이체의 존재 때문에 약간 높은 질량을 가질 것으로 예상됩니다.

더 큰 응집체와 분할 가능한 입자의 형성은 바이오 의약품 응용 분야에 특히 우려가 되는 사항입니다. 고도로 응집된 시료에 대해 광산란 검출의 높은 감도는 UV 검출로 얻는 데이터를 보완합니다.

UV 검출로는 단량체(monomer)와 이합체가 매우 유사한 결과임에도 불구하고, 광산란 검출기로는 고차 응집체에 더 높은 감응을 보이며, 그림 6과 같이 특정 이동상 조건에서 rituximab innovator와 바이오시밀러가 좀 더 응집되는 약간의 차이를 보여주었습니다.

DLS 검출을 추가하면 더 많은 정보를 얻을 수 있으며, Hydrodynamic radius를 측정할 수 있습니다(그림 7).

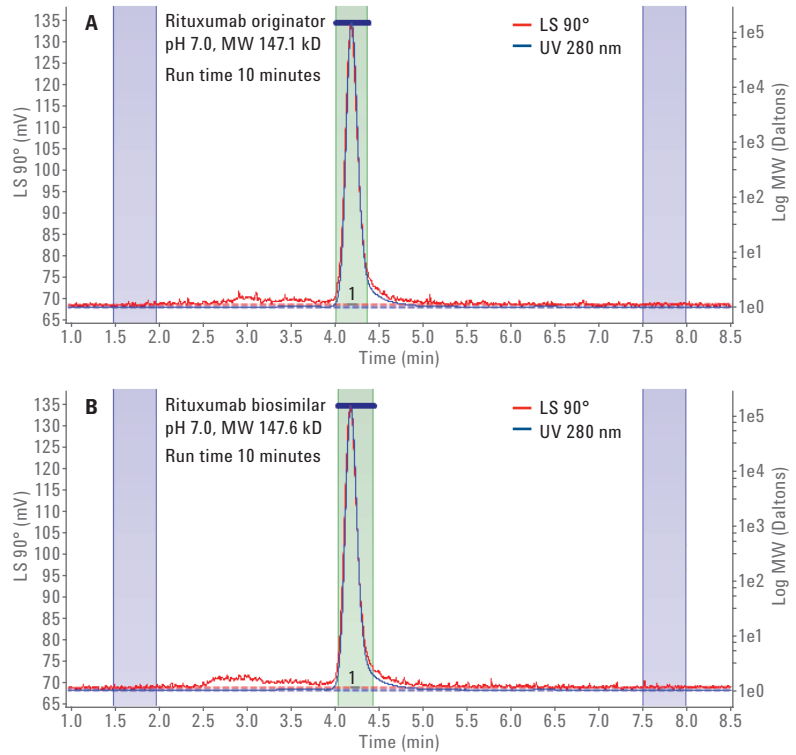


그림 5. 100mM 인산나트륨과 150mM NaCl을 이용해 pH 7.0에서 실행한 rituximab innovator(A) 및 rituximab 시밀러(B)의 LS 분석 결과(표 1의 실험 11)

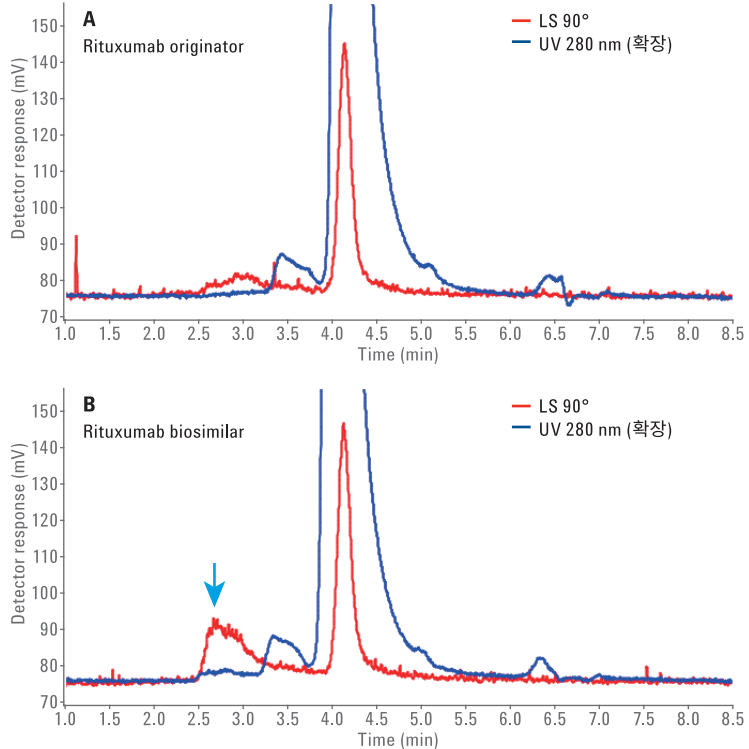


그림 6. 150mM 인산나트륨을 이용해 pH 7.0에서 실행한 rituximab innovator(A) 및 rituximab 시밀러(B)의 LS 분석 결과(표 1의 실험 3)

## 결론

완전 bio-inert 흐름 경로를 가진 Agilent 1260 Infinity II Bio-inert LC 시스템은 Agilent Buffer Advisor 소프트웨어를 이용하여 단백질 응집체 정량화를 위한 크기 배제 크로마토그래피에 대해 간단한 분석법 최적화 방법을 제공합니다. 더 짧은 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 15cm 컬럼을 이용하여 더 빠른 분리가 가능하며, 이는 처리량을 크게 높이며 다양한 분석 조건을 스크리닝하는 데 필요한 시간을 줄여 줍니다. 더 높은 분리능과 정확도를 얻기 위해서는 더 긴 30cm 컬럼을 사용하십시오. AdvanceBio SEC 컬럼은 낮은 비특이적 결합과 같은 추가적인 이점을 보여줍니다. Bio-SEC 소프트웨어가 포함된 Bio-MDS 다중 검출기 세트를 사용하여 다른 수단으로 검출하기 어려운 낮은 농도의 고분자량 응집체를 찾아낼 수 있습니다. 궁극적으로, Bio-MDS를 사용하여 단백질 분자량을 측정하거나 DLS 검출과 연계하여 Hydrodynamic radius를 측정할 수 있습니다. 이러한 기술들은 SEC 조건을 신속하게 최적화하고, 전체 분자량 범위에서 정확하게 응집체를 정량하며 적절한 버퍼 조건에서 단일클론 항체의 응집 역학을 특성 규명하기 위해 종합적인 워크플로 솔루션을 구성합니다.

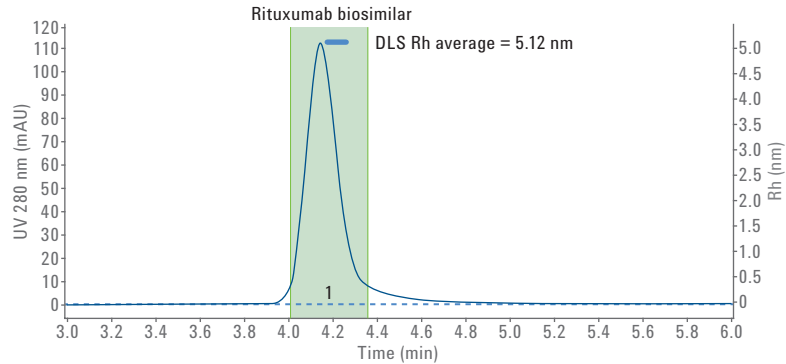


그림 7. LS 검출기에서 Hydrodynamic radius 결과를 보여주는 rituximab 바이오시밀러의 DLS 분석 결과

## 참고 문헌

1. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography, *Agilent Technologies* 응용 자료, 발행물 번호 5991-6673EN, 2016.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016  
2016년 11월 1일 한국에서 발행  
5991-7476KO

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



**Agilent Technologies**