응용 자료

바이오제약 및 제약

2D-LC 및 비변성 MS를 이용한 항체 - 약물 결합체 특성 규명

저자

David L. Wong and
Sarah M. Stow
Agilent Technologies, Inc.

개요

합성 링커를 통해 저분자 약물에 결합되는 단일 클론 항체(mAb)로 이루어진 항체 약물 결합체(ADC)는 최근 몇 년 동안 빠르게 성장한 효과적인 바이오 치료제 중 하나입니다. 결합된 약물 대 mAb의 비율(약물 대 항체 비율 또는 DAR)은 효능 및 안전성에 영향을 미칠 수 있기 때문에 ADC 개발에서 주요품질 속성(CQA) 중 하나입니다. 2D-LC/MS는 ADC 분자 특성을 규명하는 데 일반적으로 사용됩니다. 이 접근법에서는 질량 분석기에 장착된 소수성 상호작용 크로미토그래피(HIC) 컬럼 및 역상(RP) 컬럼을 사용합니다. 하지만 많은 ADC 제품이 유기 및 산성 용매 조건에서 분해됩니다.

이 응용 자료에서는 이러한 장애물을 극복하기 위한 새로운 2D-LC 접근법을 보여줍니다. 이 분석법은 HIC, multiple heart-cutting(MHC) 및 비변성 MS 분석과 함께 온라인 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 활용하는 탈염 및 분리를 사용합니다. 이 워크플로는 Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 시스템, Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, Agilent MassHunter 워크스테이션 11.0 소프트웨어 및 Agilent MassHunter BioConfirm 11.0 소프트웨어를 사용합니다.

서론

ADC는 암 치료에 만족스러운 결과를 제공하는 새로운 바이오 치료제 중 하나로 간주됩니다. 고전적인 인간 치료제인 mAb와 달리 ADC는 항원별 선택성 및 효율성 측면에서 결과가 우수합니다. 이러한 ADC는 생물학적 활성 세포 독성 저분자 약물이 화학적으로 연결되는 단일 클론 항체이기 때문입니다.[1] 처음 두 가지 성공적인 ADC의 결합 유형은 mAb의 라이신 곁사슬(Kadcyla, T-DM1) 및 시스테인 잔기(brentuximab vedotin, 품명 Adcetris by Takeda)를 사용하는 것입니다. Adcetris는 시스테인 잔기의 자유 티올기를 통해 저분자 약물에 결합된 부분적으로 환원된 mAb로 구성되어 있습니다(monomethyl auristatin E, MMAE). 항체당 0, 2, 4, 6, 8개 약물 혼합물이 일반적으로 관찰됩니다(그림 1). mAb(DAR)에 결합된 평균 약물 수는 안전성과 효능에 직접적인 영향을 미칠 수 있기 때문에 ADC의 가장 중요한 주요 품질 속성 중 하나입니다.

ADC 특성 규명 및 DAR 값 측정이 단순해 보이고 분석적으로 실현 가능하지만, ADC는 "비결합" mAb 또는 저분자 약물보다 훨씬 더 복잡합니다. 이 복잡성은 결합된 화학적 링커 및 결합 부위의 비균질적인 분포 때문입니다. 따라서 ADC 특성 규명 및 안정성 (또는 DAR 값) 모니터링이 까다로울 수 있습니다.

화학적 안정성 문제의 특성을 규명하고 DAR 값을 측정하기 위한 ADC 분석은 일반적으로 UV-Vis, 형광, DSC, SEC 후

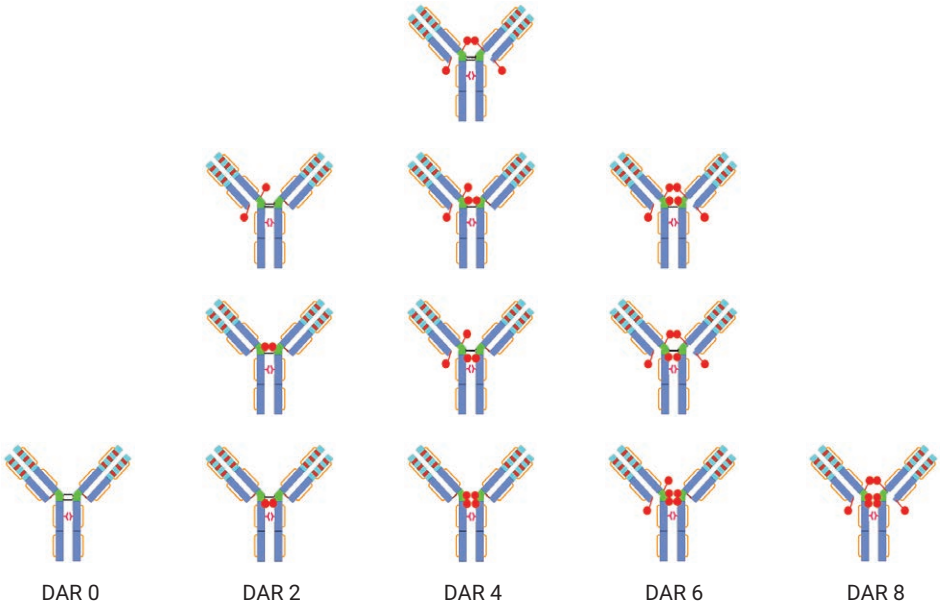


그림 1. 시스테인 결합 ADC에서의 다양한 약물 분포(brentuximab vedotin).

MALS 검출과 같은 다양한 분석 기법을 통해 수행할 수 있습니다. 최근에 HIC가 시스테인 결합 ADC에 대한 DAR 값 확인을 위한 중요한 기법이 되었습니다.[2] 항체에 화학적으로 연결된 저분자 약물은 소수성인 경우가 많습니다. 따라서 ADC의 전체적인 소수성이 DAR 값이 커질수록 증가하므로 HIC는 DAR 모니터링에 적합한 도구입니다. HIC의 단점은 이후 MS 분석과 호환되지 않는 고농도 비휘발성 염 완충제를 사용해 단백질을 분리한다는 점입니다. 이러한 분석 장애물을 극복하기 위해 2차원의 RP 컬럼과 함께 사용하는 2D-LC 솔루션이 개발되었습니다. 이 온라인 2D-LC/MS 접근법의 경우 관심 단백질 피크(DAR 값이 다양한 ADC)는 MHC 또는 고분해능 모드를 사용하는 1차원 HIC 분리에서 선택할 수 있습니다. 이후 탈염 및 분리는 MS 분석 전 2차원 RP 컬럼에서 이루어집니다.

이제 새로운 MassHunter 워크스테이션 11.0 소프트웨어가 동일한 소프트웨어에서 2D-LC 및 MS 모두를 제어합니다. 하나의 포괄적인 소프트웨어를 사용하면 MS 검출 전 크로마토그래피 분리 및 이후 탈염

모두를 사용하는 ADC 분석과 같은 다차원적 실험을 더 쉽게 수행할 수 있습니다. 시간 및 피크 기반 2D-LC뿐만 아니라 MHC 및 Comprehensive 2D-LC를 포함해 Agilent ChemStation 소프트웨어의 2D-LC 수집 기능 대부분을 이제는 MassHunter에서 사용할 수 있습니다. 이 소프트웨어 릴리스에는 MHC 워크플로용 고분해능 샘플링 및 사후 획득 파일 분할을 포함하는 새로운 멀티 주입 방법과 같은 새로운 기능도 포함되어 있습니다. 사용자는 멀티 주입 방법을 사용해 1차원의 넓은 피크에서 여러 분획을 수집할 수 있고, 고분해능 분석법에서처럼 개별적으로 각 분획을 주입하는 대신 한 번의 2차원 분석을 위해 함께 주입할 수 있습니다. 멀티 주입 방법을 사용하면 하드웨어를 변경하지 않고 1차원에서 2차원으로 전달할 수 있는 검체의 양이 증가하고, 필요한 2차원 실행 횟수가 감소해 전체 실행 시간이 감소합니다. 2D-LC 및 MS가 동일한 소프트웨어를 통해 제어되므로 Agilent MassHunter 데이터 파일 하나만 생성됩니다. MHC 실험의 경우 이 데이터 파일은 획득된 순서대로 모든 개별 2차원 분석을 연결합니다. 새 파일 분할기 유틸리티가 이 파일을 개별 2차원 LC/MS 파일로 분할하고 LC 1차원에서 컷이 이루어진 순서대로 이름을 지정합니다. 파일은 획득이 완료된 직후에 분할되므로 사용자 프로세스가 간소화됩니다. 2D-LC 데이터 파일이 본질적으로 1D-LC/MS 데이터 파일로 분할되므로 많은 데이터 분석 워크플로를 사용할 수 있습니다.

2D-LC(HIC + RP) 실험이 다양한 ADC 분리 및 이후 탈염에서 성공적이었지만, 약물 페이로드(MMAD) 및 mAb 변성 측면에서 주요 분해가 관찰되었습니다. ADC 분해가 주로 2차원 RP 크로마토그래피에서 유기 및 산성 용매를 사용하기 때문이라는 점이 확인되었습니다.

이 연구에서는 본래의 원형 brentuximab vedotin 및 정확한 DAR 값 측정을 위한 새로운 비변성 2D-LC/MS 분석법이 개발되었습니다. 이 워크플로는 시료 분리를 위해 다양한 Agilent AdvanceBio 컬럼(AdvanceBio HIC 및 AdvanceBio SEC)을 사용하는 1290 Infinity II 2D-LC 시스템 및 거대분자 SWARM 오토튠 기능이 있고 비변성 MS 분석을 위한 질량 범위가 최대 *m/z* 30,000으로 확대된 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF로 구성되어 있습니다(그림 2).



그림 2. 2D-LC 및 비변성 MS 단백질 분석 워크플로의 분석 성분.

실험

재료 및 분석법

Ammonium sulfate, sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate, ammonium acetate를 모두 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입했습니다.

ADC 시료

Lyophilized brentuximab vedotin을 용매 A에 용해해 50mg/mL를 만들었습니다. 각 2D-LC/MS 분석을 위해 약 10~20µL의 시료를 주입했습니다.

주의: 배합된 Adcetris에는 많은 보조제가 포함되어 있기 때문에 이 농도는 순수하게 단백질 또는 ADC 농도가 아닙니다. ADC 약물 시료의 모든 성분 전체 농도를 나타냅니다.

1차원(HIC) 완충액 준비

- **완충액 A:** 2M ammonium sulfate 혼합 100mM 인산염 완충액, pH 7
- **완충액 B:** 100mM 인산염 완충액, pH 7 + 25% 이소프로판올

pH 7의 100mM 인산염 완충액 2L를 만들기 위해 11.68g의 sodium phosphate monobasic monohydrate 및 30.94g의 sodium phosphate dibasic heptahydrate를 사용했습니다. 총용량을 2L로 만들기 위해 탈이온수를 추가했고, 용액의 pH를 7로 조정했습니다. 완충액 A의 경우 264.28g의 ammonium sulfate를 1L 용기에 추가했고, 100mM의 인산염 완충액을 추가해 총용량 1L를 만들었습니다. 완충액 B의 경우 250mL 이소프로판올과 750mL의 인산염 완충액을 사용했습니다.

기기

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC, 포함 항목:

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A) 2개
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B) 및 Agilent Infinity II 샘플 쿨러(옵션 #100)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II DAD(G7117A)
- Agilent 1290 Infinity II DAD(G7117B)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A) 및 Agilent InfinityLab 2D-LC ASM 밸브, 1,300bar(제품 번호 5067-4266)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A) 2개 및 40µL 루프 장착 Agilent Multiple Heart-Cutting 밸브(G4242-64000)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A) 및 전환 밸브 2 포지션/6 포트 초고압 밸브 헤드, 1,200bar(제품 번호 5067-4241)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/QTOF 및 Agilent Dual Jet Stream ESI 이온화원

컬럼

- 1차원: Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 × 100mm, 3.5µm(제품 번호 685975-908)
- 2차원(변성 조건): Agilent PLRP-S 1000Å, 2.1 × 50mm, 5µm(제품 번호 PL1912-1502)
- 2차원(비변성 조건): Agilent AdvanceBio SEC 200Å, 4.6 × 300mm, 1.9µm(제품 번호 PL1580-5201)

2D-LC/MS 분석

2D-LC/MS 분석을 Jet Stream ESI 이온화원이 장착된 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 결합 1290 Infinity II 2D-LC 시스템에서 수행했습니다. LC/TOF 및 LC/Q-TOF 버전 11.0 소프트웨어용 MassHunter 워크스테이션을 2D-LC(즉, 멀티 주입 방법 및 파일 분할기 유틸리티)의 새로운 기능과 거대분자 SWARM 오토튜 기능과 함께 사용했습니다.

LC 1차원에서 수집한 HIC 피크 분획을 2차원 LC/MS 분석을 사용해 주입하고 분석했습니다. 일반적으로 변성 조건에서 원형 mAb 또는 원형 ADC에 대한 LC/MS 분석은 일반적인 RP HPLC 분석법을 사용해 수행합니다. PLRP-S 컬럼을 유기 용매 및 0.1% 포름산으로 아세토니트릴과 함께 사용했습니다.

비변성 LC/MS 조건에서 ADC 시료 특성은 2차원 AdvanceBio SEC 컬럼 및 100mM 아세트산 암모늄 용액을 사용하는 14분 등용매 분석을 통해 규명했습니다.

분석을 시작할 때가 아니라 종료할 때 염을 용리하는 2차원 AdvanceBio SEC 컬럼의 경우 전환 밸브가 뒤로 연결되어 있습니다. 이를 통해 2차원 LC 분석 시 처음 7분 동안 MS로 이동하고 분석(염 포함) 마지막에 waste로 이동합니다. 이러한 구성을 통해 전환 밸브를 사용하지 않을 때보다 MS로 염 이동을 줄입니다.

표 1과 2에 사용한 LC/MS 파라미터가 정리되어 있습니다.

데이터 처리

변성 및 원형 ADC의 모든 LC/MS 데이터 파일은 MassHunter Qualitative Analysis 10.0 및 BioConfirm 11.0 소프트웨어를 사용해 처리했습니다.

표 1. 액체 크로마토그래피 파라미터.

1차원	
컬럼	Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 × 100mm, 3.5µm(p/n 685975-908)
항온 장치	4°C
용매 A	2M ammonium sulfate 함유 100mM 인산나트륨 완충액 pH 7.0
용매 B	100mM 인산나트륨 완충액 pH 7.0+25% IPA
그레디언트	0~17분, 30~100% B 17~27분, 100% B
컬럼 온도	실온
유속	0.4mL/분
주입량	20µL의 20~50mg/mL brentuximab vedotin
UV 검출	280nm, 10Hz
2차원, 변성 조건	
컬럼	Agilent PLRP-S 1000Å, 2.1 × 50mm, 5µm(p/n PL1912-1502)
항온 장치	4°C
용매 A	0.1% 포름산 함유 탈이온수
용매 B	0.1% 포름산 함유 100% 아세토니트릴
그레디언트	0~1분, 0~20% B 1~3분, 20~50% B 3~4분, 50~70% B
컬럼 온도	60°C
유속	0.5mL/분
2차원, 비변성 조건	
컬럼	Agilent AdvanceBio SEC 200Å, 4.6 × 300mm, 1.9µm(p/n PL1580-5201)
항온 장치	4°C
용매 A	100mM ammonium acetate 완충액 pH 7.0
등용매 용리	0~14분, 100% A
컬럼 온도	실온
유속	0.4mL/분

표 2. 변성 및 비변성 MS 데이터 수집 파라미터.

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템		
시료 유형	ADC(변성)	ADC(비변성 MS)
소스	Agilent Jet Stream ESI	Agilent Jet Stream ESI
건조 가스 온도	350°C	365°C
건조 가스 유속	12L/분	12L/분
Nebulizer	60psig	35psig
Sheath 가스 온도	400°C	300°C
Sheath 가스 유속	11L/분	12L/분
캐필러리 전압	5,500V	5,500V
노즐 전압	2,000V	2,000V
Fragmentor	380V	300V
Skimmer	140V	220V
Quad amu	*m/z* 500	*m/z* 3,000
질량 범위	*m/z* 100~10,000	*m/z* 3,000~10,000
수집 속도	1.0스펙트럼/초	1.0스펙트럼/초
수집 모드	양이온, 확장된(*m/z* 10,000) 질량 범위	양이온, 확장된(*m/z* 10,000) 질량 범위

결과 및 토의

ADCs

이 연구에서는 물리적, 화학적 안정성 연구를 위해 표적 ADC로 brentuximab vedotin을 사용했습니다. 이 ADC는 시스테인을 기반으로 하며, 리간드 매개 약물 전달 시스템에 널리 사용되는 maleimide-thiol 결합을 활용합니다. DAR 값 측정 및 특정 분해 또한 자세하게 조사했습니다. brentuximab vedotin 결합에서 다양한 저분자 약물(monomethyl auristatin E, MMAE)은 프로테아제-절단 가능 링커를 통해 IgG1 mAb의 시스테인 잔기 자유 티올기에 부위 특이적으로 결합되어 있습니다. 전체적인 약물 분포 범위는 mAb당 0, 2, 4, 6 또는 8개 약물 분자입니다.

DAR 측정

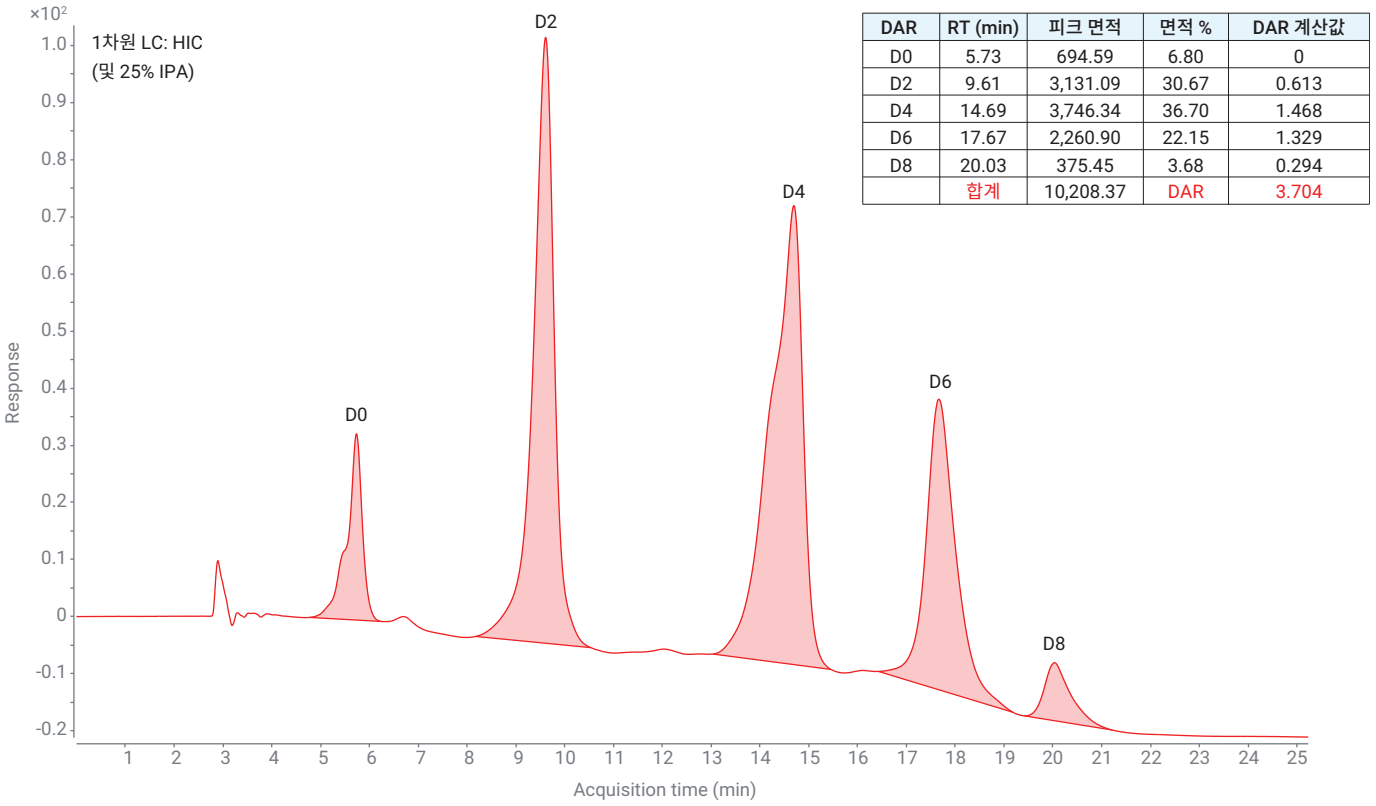
HIC는 높음-낮음 염 그레디언트를 사용해 단백질을 분리하는 일반적인 분석 기법입니다. 분석 조건이 온화(중성 pH)하기 때문에 본래의 원형 ADC 구조를 보존할 수 있습니다. ADC 분자의 상대적 소수성은 항체에 부착된 약물 분자가 늘어날수록 증가합니다. 따라서 HIC 기법은 다양한 ADC를 분리하고 DAR 값을 측정하는 데 적절한 도구입니다.

그림 3은 25분 LC 그레디언트를 사용하는 HIC(1차원)를 통한 다양한 ADC(D0~D8)의 크로마토그래피 분리가 우수하다는 점을 보여줍니다. 작은 양의 유기용매(25% 이소프로판올)을 용매 B에 추가해 D8 분자를 효율적으로 용리했습니다. HIC 결과를 사용해 DAR 값을 바로 측정할 수 있었습니다. 다른 DAR 변이의 피크 면적을 적분해 전체 DAR이 약 3.7(그림 3 삽입된 표)인 것으로 계산했으며, 이는 brentuximab vedotin에 대한 예상 값과 일치합니다.[3]

mAb-약물 결합체 특성 규명을 위한 새로운 2D-LC/MS 시스템

핵심적인 2D-LC/MS 기능:

- MassHunter 워크스테이션 11.0 소프트웨어가 2D-LC 및 MS 시스템 모두를 제어합니다(그림 4)
- 2D-LC 획득 프로그램에는 multiple heart-cutting 및 Comprehensive 모드가 모두 포함되어 있습니다
- 사용자는 멀티 주입 방법을 사용해 1차원의 넓은 피크에서 여러 분획을 수집하고 한 번의 2차원 분석을 위해 모두 함께 주입할 수 있습니다
- 새 파일 분할기 유틸리티가 단일 데이터 파일 문자열을 개별 2차원 LC/MS 파일로 분할하고 1차원에서 컷이 이루어진 위치를 기반으로 이름을 지정합니다(그림 5)



DAR	RT (min)	피크 면적	면적 %	DAR 계산값
D0	5.73	694.59	6.80	0
D2	9.61	3,131.09	30.67	0.613
D4	14.69	3,746.34	36.70	1.468
D6	17.67	2,260.90	22.15	1.329
D8	20.03	375.45	3.68	0.294
	합계	10,208.37	DAR	3.704

그림 3. Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 시스템에서 brentuximab vedotin의 DAR 측정 및 HIC 분리. D0~D8은 mAb에 결합된 약물 수를 나타냅니다.

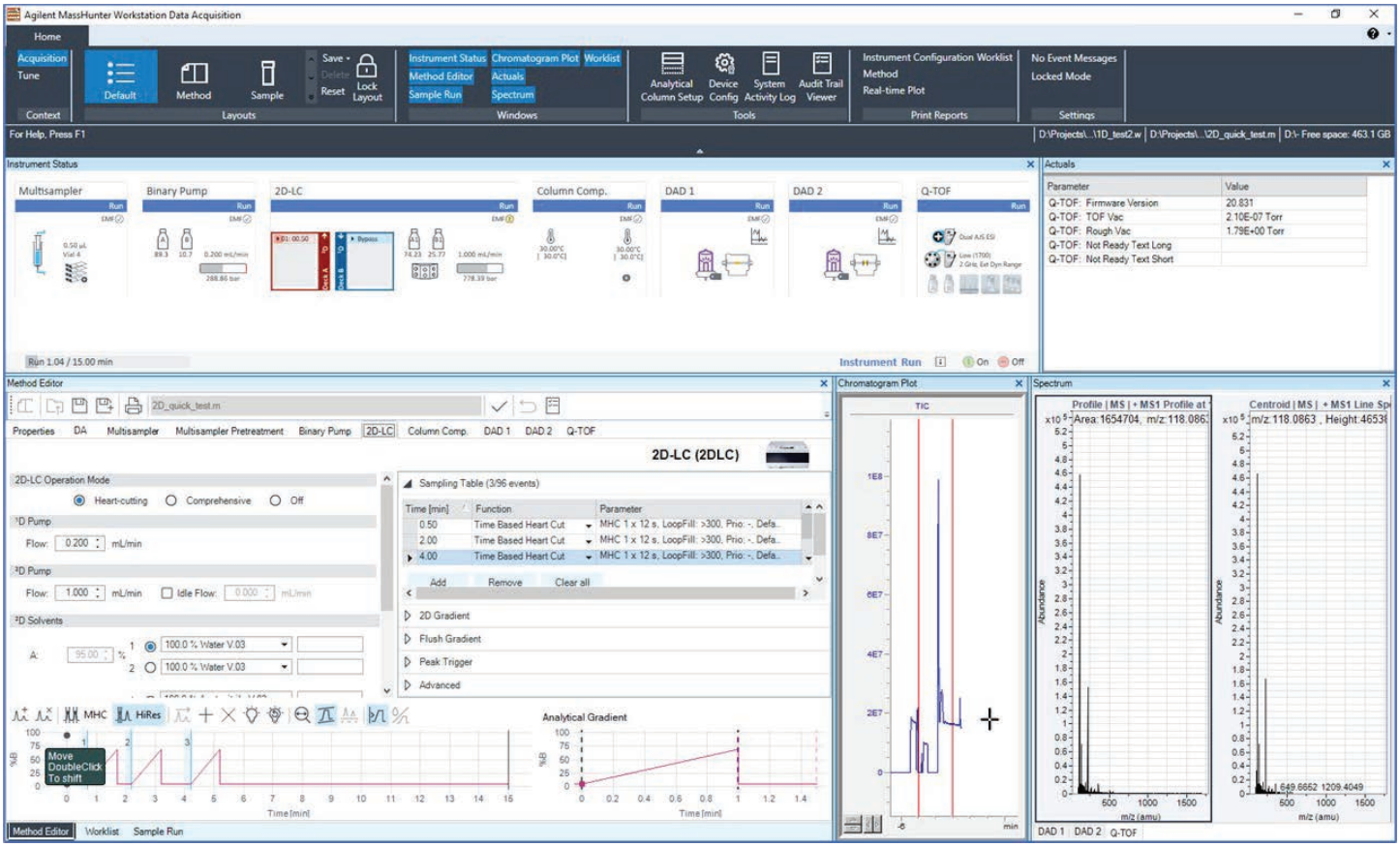


그림 4. Agilent MassHunter 워크스테이션 11.0 소프트웨어의 화면 캡처는 시료 분석 동안 2D-LC 및 MS 시스템 모두를 제어하는 단일 소프트웨어 플랫폼을 보여줍니다.

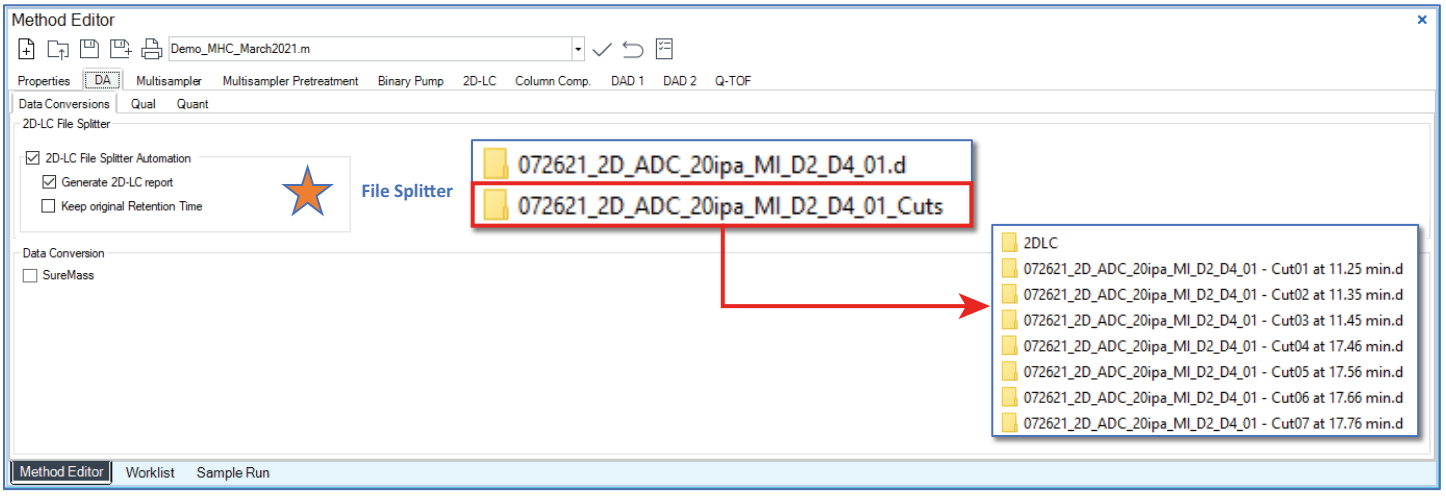


그림 5. 파일 분할기 유틸리티는 하나의 전체 데이터 파일을 2차원 LC/MS 개별 데이터 파일로 분할하고, 1차원 LC 컷이 이루어진 시점을 기준으로 이름을 지정합니다. 분할된 1차원 LC/MS 데이터 파일을 사용해 많은 데이터 분석 워크플로를 실행할 수 있습니다.

변성 조건에서 원형 mAb 약물 결합체에 대한 2D-LC/MS 분석

원형 ADC를 추가로 조사하고 특성을 규명하기 위해 1차원 HIC 분석에서 나온 각 DAR 변이 피크를 MHC 또는 고분해능 모드를 사용해 수집했습니다. 그 다음에 이러한 분획을 2차원 RP LC/MS 분석을 사용해 분석했습니다. PLRP-S 컬럼을 유속 0.5mL/분의 8분 그레디언트와 함께 사용했습니다.

그림 6은 DAR 값이 6(D6)인 원형 ADC의 LC/MS 프로필을 보여줍니다. RP 조건(유기 및 산성 용매)에서 이 원형 ADC가 변성되고, 여러 피크가 UV 크로마토그램에 나타납니다 (그림 6 왼쪽). MS 데이터 deconvolution 및 mAb와 저분자 약물에 대한 질량 일치를 20~160kDa 범위의 MS deconvoluted 질량을 사용해 피크 1 및 피크 2에서 수행했습니다. 이 넓은 질량 범위가 mAb 경사슬에서 DAR이 8인 원형 ADC까지를 포함해야 합니다. MS deconvolution 결과에서 많은 분해/환원 mAb 또는 ADC가 그림 6(오른쪽)에서 확인할 수 있는 것처럼, 검출 및 식별된 것으로 나타났습니다. 이러한 분해 분자는 한 가지 약물을 포함하는 mAb 경사슬, 두 가지 약물을 포함하는 절반 mAb, 절반 mAb + 중사슬 + 1가지 약물, 세가지 약물을 포함하는 mAb 중사슬 등입니다.

이와 마찬가지로 많은 분해 ADC가 다른 RP 피크에서 검출되었습니다. 이러한 결과는 대부분의 ADC가 변성 LC/MS 조건에서 해리되었음을 나타냅니다. 시스테인 결합 ADC에서 저분자 약물이 부분적으로 환원된 이황화 결합을 통해 mAb에 결합되어 있습니다. 따라서 이전에 강했던 이황화 결합이 깨지고, 약한 정전기적 상호작용을 통해 결합되어 있는 새로운 ADC 구조의 안정성이 떨어지고, 유기/산 불안정 분자가 늘어납니다. 따라서 이러한 원형 ADC 분자의 특성을 규명하려면 비변성 LC/MS 분석이 필요합니다.

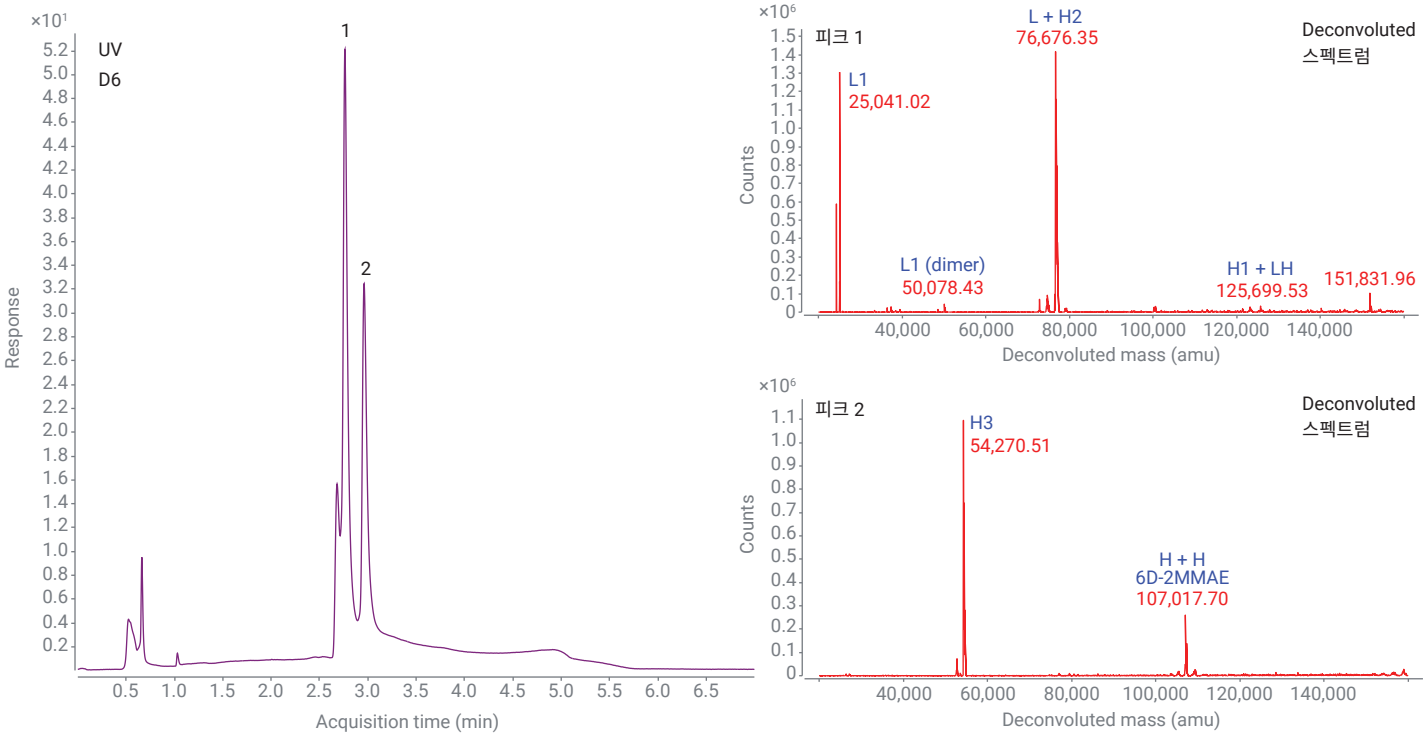


그림 6. 2차원 액체 크로마토그램(Agilent PLRP-S, UV) 및 HIC 분리 ADC 시료(D6)에 대한 deconvoluted MS 스펙트럼. 변성 MS 조건에서 LC/MS 분석이 수행되었습니다. 다양한 분해 ADC 분자가 검출되었습니다. L1: 한 가지 약물을 포함하는 mAb 경사슬; L + H2: 두 가지 약물을 포함하는 절반 mAb; H1 + LH: 절반 mAb + 중사슬 + 한 가지 약물, H3: 세가지 약물을 포함하는 mAb 중사슬; H + H + 6D-2MMAE: 6가지 약물을 포함하는 2가지 중사슬, 2가지 MMAE 분자 소실.

원형 mAb-약물 결합체에 대한 비변성 2D-LC/MS 분석

비변성 MS는 단백질-단백질 상호 작용, 비공유 단백질 복합체 구조, 단백질-리간드 결합, 프로틴 접힘 및 항체-약물 결합체와 같은 다양한 단백질 기반 응용 분야에서 널리 사용되는 기법입니다. 비유기 용매 및 산이 LC/MS 분석에서 사용되기 때문에 관찰되는 단백질 변성이 감소하고, 비공유 단백질-단백질 복합체의 무결성을 보전할 수 있습니다.[4,5] 하지만, 높은 *m/z* 범위에서 존재비가 더 낮은 MS 신호 및 분자당 전하 감소와 같은 주요 MS 분석 문제가 주로 LC/MS 분석에서 중성 pH 용매(100 mM ammonium acetate, pH 7) 사용으로 인해 관찰되었습니다.

이 연구를 통해 1차원 HIC 분리에서 수집된 다양한 ADC 시료 분석을 위한 매우 민감한 비변성 MS 방법론을 개발했습니다. 이 워크플로는 2차원 온라인 시료 분리를 위해 AdvanceBio SEC 컬럼을 사용합니다.

그림 7은 ADC(DAR 2) 시료에 대한 비변성 LC/MS 분석의 SEC 컬럼 분리를 보여줍니다. 이 시료는 1차원 HIC에서 분리했습니다. 따라서 검체에는 2차원 AdvanceBio SEC 컬럼에서 하나의 LC 피크만 나타납니다. 그림 7A는 MS 하전 상태 엔벨로프 범위가 *m/z* 5,500~10,000(16+~27+)인 원형 DAR 2 시료의 가공하지 않은 MS 스펙트럼을 보여줍니다. Deconvoluted 스펙트럼(그림 7B)은 이 시료에 ADC DAR 2만 있음을 나타냅니다. 스펙트럼을 확대하면 (그림 7B, 삽도) 6545XT 시스템의 MS 분리능이 우수하며, 비변성 LC/MS 조건에서 세 가지 모든 주요 글리코형이 분리되었고 MS 정확성(~10ppm, Δm = 1.6Da)이 뛰어나다는 점을 알 수 있습니다.

이와 마찬가지로 우수한 MS 스펙트럼 품질 및 검출 감도가 그림 8에서 확인할 수 있는 것처럼 모든 DAR 0~DAR 6 시료에 대해 확인되었습니다. 이러한 MS 데이터에 대한 MS deconvolution 분석을 통해 정확한 DAR 값 할당 및 우수한 MS 정확성이 확인되었습니다(그림 9).

IPA 함량이 높을 때 시료 분해 및 낮은 존재비로 인해 DAR 8 시료에 대한 MS 데이터는 비변성 LC/MS 분석에서 수집할 수 없었습니다.

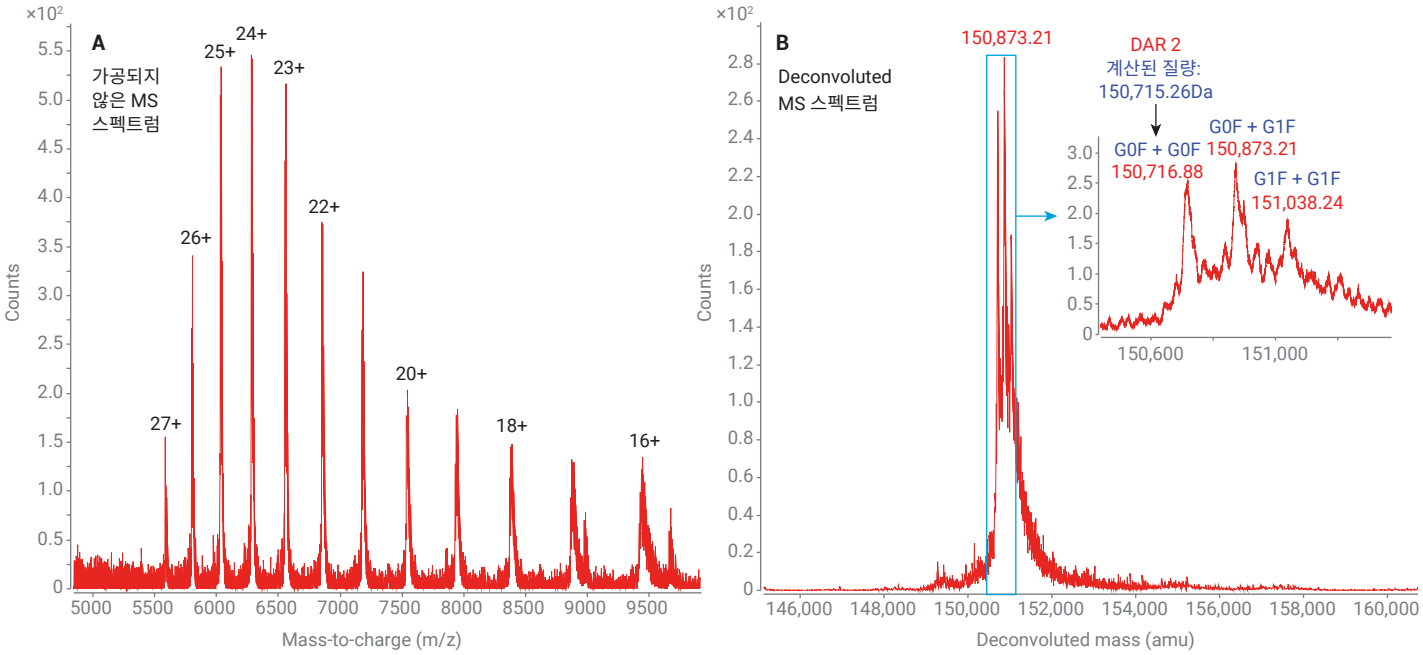


그림 7. ADC에 대한 비변성 LC/MS 분석(DAR 2). (A) 비변성 MS 조건에서 원형 ADC DAR 2에 대한 가공되지 않은 MS 스펙트럼. (B) DAR 2가 포함된 원형 ADC의 deconvoluted MS 스펙트럼.

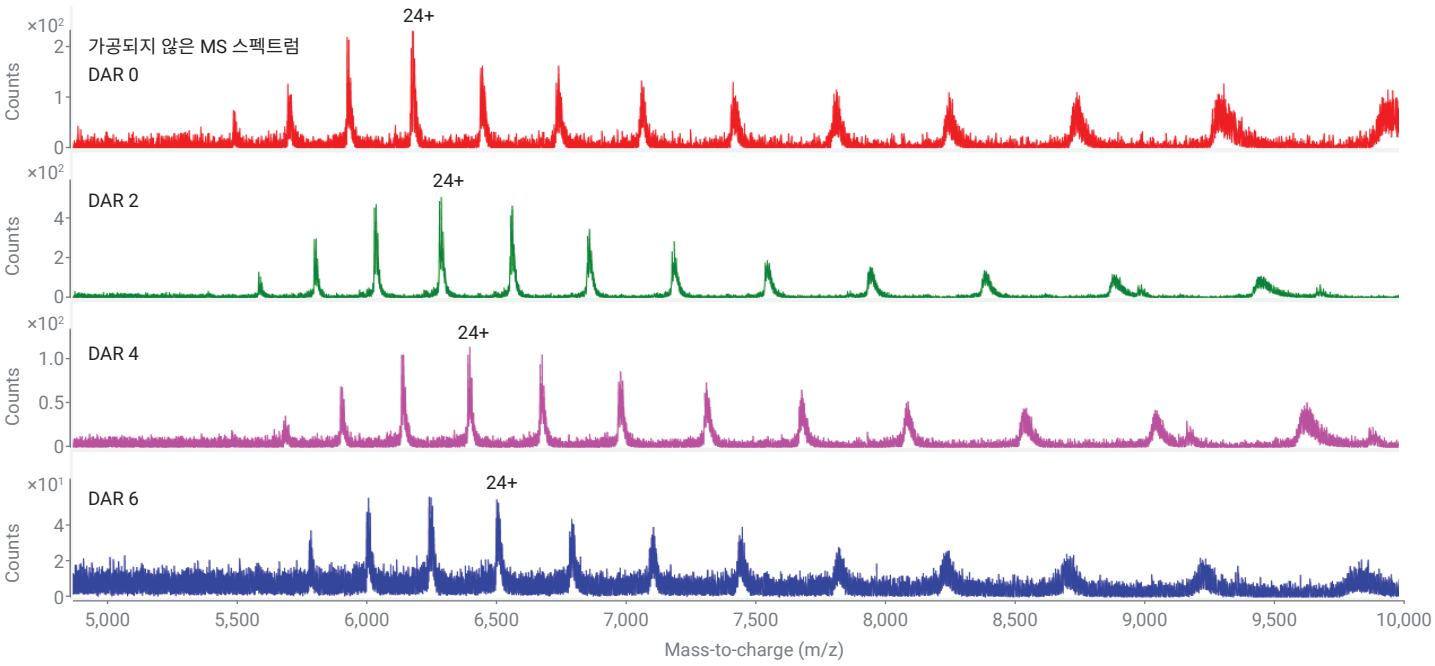


그림 8. 다양한 ADC DAR의 비변성 SEC LC/MS 분석에 대한 가공되지 않은 MS 스펙트럼(DAR 0~DAR 6).

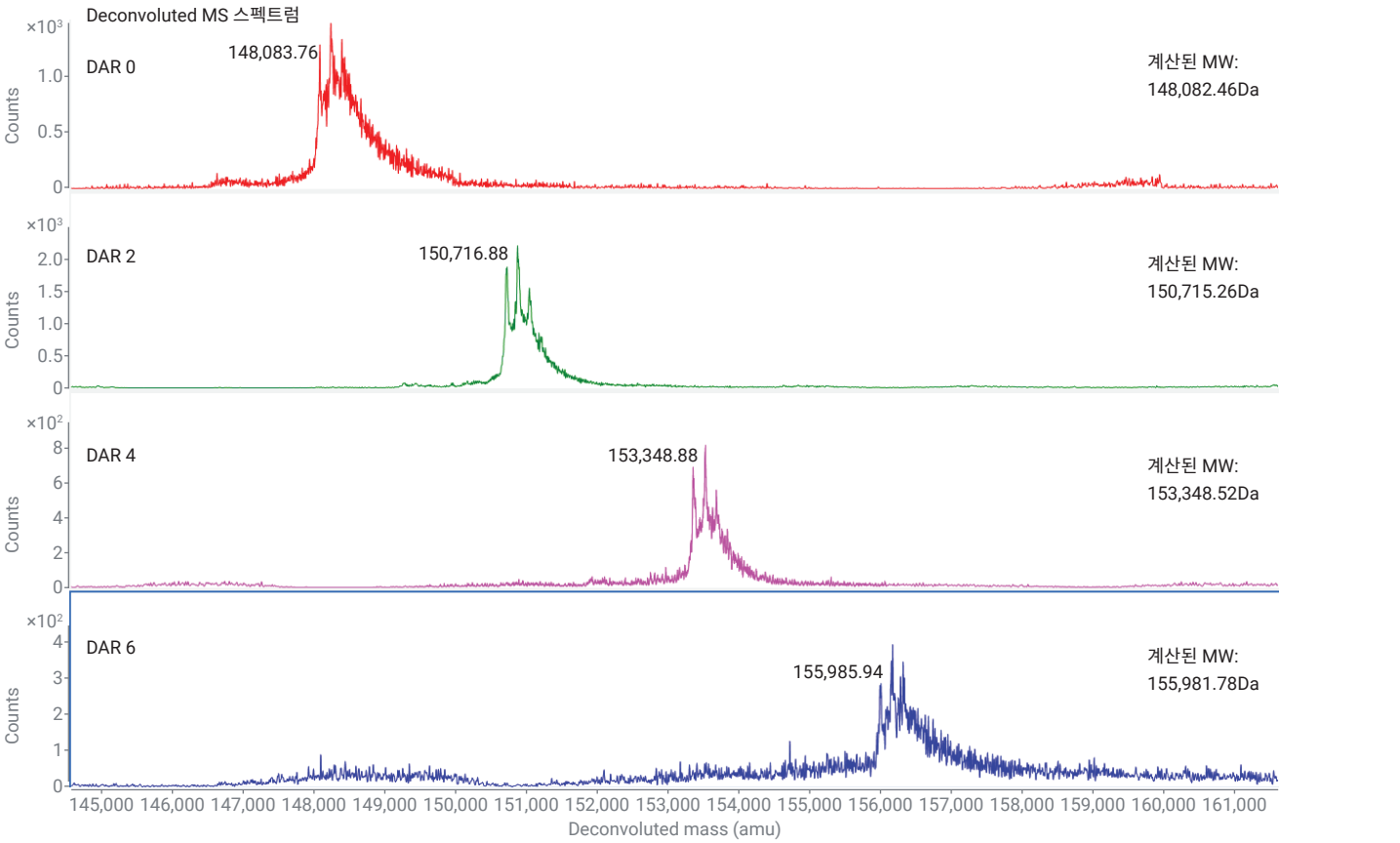


그림 9. 다양한 ADC DAR의 비변성 SEC LC/MS 분석에 대한 deconvoluted MS 스펙트럼(DAR 0~DAR 6).

결론

애질런트는 비변성 LC/MS 조건에서 다양한 원형 DAR 특성 규명을 위한 새로운 2D-LC/MS 분석법을 개발했습니다. 이 최적화된 워크플로는 Agilent AdvanceBio HIC 컬럼이 장착된 Agilent 1290 Infinity II 2D-LC, Agilent AdvanceBio SEC 컬럼 및 질량 범위가 최대 *m/z* 30,000까지 확대된 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 사용합니다. LC/TOF와 LC/Q-TOF 11.0 및 Agilent MassHunter BioConfirm 11.0 소프트웨어용 Agilent MassHunter 워크스테이션을 데이터 수집 및 분석에 사용했습니다.

이 비변성 MS 분석법은 ADC 시료에 대한 정확한 평균 DAR 값을 제공할 뿐만 아니라 뛰어난 크로마토그래피 분리를 가능하게 하고, 본래의 원형 구조를 보존하고, DAR이 다양한 모든 ADC에 대한 정확한 원형 질량 측정을 가능하게 합니다.

참고 문헌

1. Ross, P. L. *et al.* Physical and Chemical Stability of Antibody Drug Conjugates: Current Status. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *105*, 391–397.
2. Schneider, S. High Salt—High Reproducibility: Analysis of antibody drug conjugates using hydrophobic interaction chromatography with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2691EN, **2020**.
3. Van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, *4(4)*, 458–465.
4. Wong, D. Sensitive Native Mass Spectrometry of Macromolecules Using Standard Flow LC/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1739EN, **2020**.
5. Wong, D. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2155EN, **2020**.

www.agilent.com/chem

DE44508.299525463

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021

2021년 11월 30일, 한국에서 인쇄
5994-4328KO

한국애질런트테크놀로지스㈜
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

Agilent
Trusted Answers