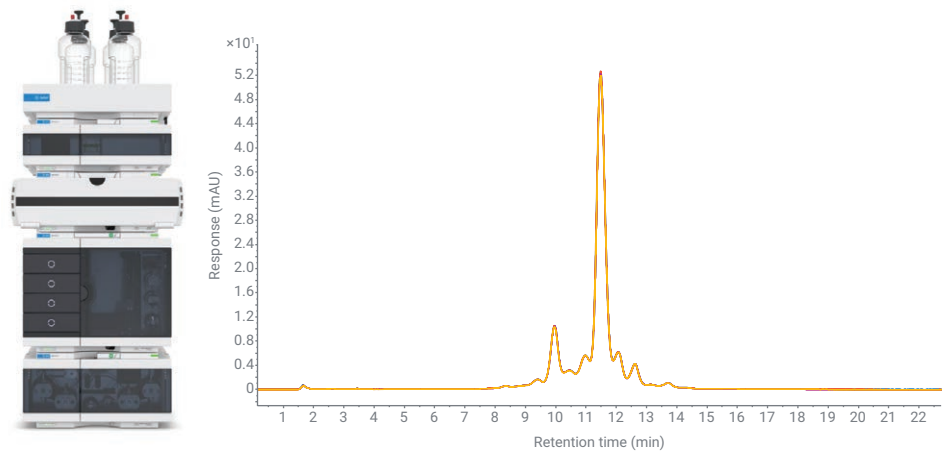


## 얼마나 완만한 그레이디언트까지 가능할까요?

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템으로 mAbs의 전하  
변이체 분석 개선



### 저자

Sonja Schneider  
Agilent Technologies, Inc.

### 개요

전하 변이체 분석은 최적의 분리를 위해 매우 얇은 그레이디언트와 함께 부식성이 높은 완충액 염을 사용하기 때문에 응용 액체 크로마토그래피 시스템에 까다로운 분야입니다. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템에서 다양한 염 그레이디언트를 평가하고 분리능과 재현성을 분석했습니다.

유동 경로에 철을 완전히 함유하지 않은(iron-free) 고속 펌프가 포함된 1290 Infinity II Bio LC는 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건에 최적화되어 있으며 잠재적 부식성으로 인한 시스템 손상을 방지합니다. 매우 까다로운 얇은 그레이디언트에서도 뛰어난 재현성을 나타낸 1290 Infinity II Bio LC는 생성된 데이터에 대한 높은 신뢰도를 제공하는 차세대 애질런트 첨단(high-end) 액체 크로마토그래피 시스템임을 입증했습니다.

## 서론

단일 클론 항체(mAbs)는 일반적으로 재조합 생산 방식에 의해 만들어지는 크기가 약 150kDa인 크고 매우 비균질한 거대 분자입니다. 생산 과정에서 복잡한 생합성이 이루어지는 공정을 거치는데, 이 때 많은 변형이 일어나 수백 가지의 변이체가 만들어집니다. 탈아미드화, 산화, 이황화 가교, N-글리코실화, N- 및 C-말단 처리 등이 가장 일반적인 번역 후 변형(PTM)으로 알려져 있습니다. 이러한 모든 변형은 생성 과정에서 발생할 수 있지만 제조 및 보관도 이러한 거대 분자의 복잡성에 기여합니다. PTM은 복잡한 동형 프로파일을 형성하는데, 최종 의약품의 변형은 생물학적 활성 손실, 반감기의 변화 또는 면역원성과 관련될 수 있기 때문에 이에 대한 광범위한 분석과 모니터링이 필요합니다.<sup>1</sup> 일부 PTM에 의해 생겨나는 분자의 전하 변이체는 일반적으로 이온 교환 크로마토그래피(IEC)를 사용하여 분석합니다.<sup>2</sup> 전하 변이체는 가장 중요한 CQA(주요 품질 속성) 중 하나로 간주되므로 엄격한 허용 기준과 품질 관리를 고려해야 합니다. 제품이 올바르게 제조되었는지 확인하고 불순물을 식별 및 정량하는 것이 대단히 중요합니다.

얇은 그레이디언트 용리는 단백질의 IEX에서 매우 일반적입니다. 단백질 용리를 위한 이온 강도 모드의 일반적인 염 그레이디언트는 pH 값이  $\pm 0.02\text{pH}$  허용 오차 단위로 설정된 경우 약 1 ~ 3mM/분입니다.<sup>3</sup>

1290 Infinity II Bio LC에는 고성능 고속 펌프가 장착되어 있습니다. Binary 펌프의 가장 큰 장점은 저압 혼합 펌프(예: Quaternary 펌프)에 비해 용매 성분 중 하나를 소량 혼합할 때 용매 혼합이 훨씬 더 정확하고 정밀하다는 것입니다. 이러한 유형의 혼합은 용매 그레이디언트의 시작과 끝에서 매우 정밀한 용매 조성을 제공합니다.<sup>4</sup> 이것은 재현성 있고 정확하게 얇은 그레이디언트(각 채널에서 1%/분 미만)를 생성하기 위한 기반이 됩니다.

1290 Infinity II Bio LC는 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건(2M NaCl, 최대 8M 요소와 같은 고염 농도, 0.5M NaOH 또는 0.5M HCl과 같은 고/저 pH 용매)에 적합하게 특별히 설계된 애질런트의 차세대 첨단 액체 크로마토그래피 시스템입니다. 전체 유동 경로에는 스테인리스강(SST) 또는 철이 전혀 없습니다. Multisampler, 다중 컬럼 온도 조절 장치 및 검출기 전체의 모든 캐필러리와 피팅은 니켈-코발트 합금인 MP35N으로 제작됩니다. 이러한 재료를 적용한 덕분에 염이 많이 함유된 완충액으로 인한 잠재적 부식성이 줄어들고 철 이온으로 인한 단백질 변형(예: 산화, 단백질 복합체 형성)을 방지할 수 있습니다.

이 응용 자료에는 trastuzumab 및 NISTmAb 참조 표준물질에 대한 전하 변이체 분석을 제공합니다. 가능한 최상의 분리능을 찾기 위해 다양한 염 그레이디언트 기울기를 테스트했습니다. 그런 다음 재현성 측면에서 가장 성능이 좋은 그레이디언트 기울기를 평가했습니다.

## 실험

### 장비

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler(G7137A) 및 시료 온도 조절 장치(#101 옵션)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), 표준 유량 바이오 적합성 열교환기 포함
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기(G7114B), 바이오 적합성 마이크로 플로우 셀 장착, 3mm, 2 $\mu\text{L}$

### 소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.5

### 컬럼

Bio MAb, NP5, 2.1  $\times$  250mm, PEEK (품번 5190-2411)

### 화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. 초순수는 0.22 $\mu\text{m}$ 의 멤브레인 point-of-use 카트리지(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다. Sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate 및 sodium chloride는 Sigma-Aldrich(Steinheim, 독일)에서 구입하였습니다.

## 시료

- Agilent-NISTmAb(품번 5191-5744)
- Herceptin으로 판매되는 인간화 단일 클론 항체인 trastuzumab은 Roche (Basel, 스위스)에서 구입하였습니다.
- Trastuzumab을 pH 6.8의 30mM 인산염 완충액에 용해했습니다.

## 완충액 준비

pH 6.8인 30mM 인산염 완충액 2L를 만들기 위해 sodium phosphate monobasic monohydrate 4.45g 및 sodium phosphate dibasic heptahydrate 7.44g의 무게를 재고 2L 용량 갈색병에 넣은 다음, 초순수를 사용하여 최대 2L까지 채웠습니다(→완충액 A). 총 농도가 500mM가 되도록 sodium chloride 29.22g을 1L 용량의 빈 갈색병에 넣고 준비된 인산염 완충액 A를 사용하여 최대 1L까지 채웠습니다(→완충액 B). 준비된 두 완충액의 pH 값을 확인하고 필요한 경우 pH 6.8로 조정했습니다(다량의 염을 첨가하면 pH가 변할 수 있음). 제조된 두 완충액을 0.2µm 멤브레인 필터를 사용하여 여과시켰습니다.

## 분석법

표 1 참조.

**참고:** 농축 염 용액을 용리액으로 사용하는 경우, 펌프 분석법에서 해당 용매 유형을 설정하는 것이 좋습니다. 예를 들어 500mM sodium chloride를 포함한 용매 B의 경우, 펌프 분석법의 용매 선택 필드에 일반 수용액 또는 물 대신 “Sodium Chloride 0.5M”을 사용합니다. 다량의 염이 있으면 용매의 압축률이 달라지므로, 사전 구성된 용매 테이블을 사용하면 최고의 펌프 성능을 얻을 수 있습니다.

## 결과 및 토의

### 분석법 개발

원하는 분리능에 도달하고 최적의 분리를 얻으려면 전하 변이체 분석을 위한 광범위한 분석법 개발이 필요합니다. 이러한 목표를 성공으로 이끌려면 최적의 pH와 최적의 그레이디언트 기울기를 찾는 것이 중요합니다. 두 요소 모두 분리에 큰 영향을 미칠 수 있습니다. 첫째, 분리를 위한 최적의 pH를 찾기 위해 pH 조사가 권장됩니다. 초기 실험에서 사용된 완충액의 pH는 pH 6.4에서 7.4까지 분석했으며 사용된 두 시료(trastuzumab 및 NISTmAb 참조 표준물질) 모두에 대해 pH 6.8에서 최적인 것으로 밝혀졌습니다(데이터는 표시하지 않음). 다음 단계는 효율적인 분리를 위한 이상적 그레이디언트 기울기를 결정하는 것입니다.

표 1. 염 그레이디언트 크로마토그래피 조건.

| 파라미터   | 값                                                                                                                                                                                                                          |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 용매     | A) 30mM 인산염 완충액, pH 6.8, B: 30mM 인산염 완충액, pH 6.8, 500mM sodium chloride                                                                                                                                                    |
| 그레이디언트 | 분석법 개발을 위해 0 또는 25mM에서 150mM NaCl까지 30분(여러 가지 얇은 그레이디언트)<br>재현성 연구를 위해 0mM(trastuzumab) 및 25mM(NIST)에서 100mM NaCl까지 30분<br>재현성 연구를 위해 25에서 50mM NaCl까지 30분(매우 얇은 그레이디언트)<br>31분—500 mM NaCl 세척<br>정지 시간: 35분<br>평형 시간: 15분 |
| 유속     | 0.200mL/분                                                                                                                                                                                                                  |
| 온도     | 30 °C                                                                                                                                                                                                                      |
| 검출     | 280nm<br>10 Hz                                                                                                                                                                                                             |
| 주입     | 주입 용량: Trastuzumab의 경우 3µL, NIST의 경우 2µL<br>시료 온도: 10°C<br>니들 세척: 물에서 3초                                                                                                                                                   |

그림 1은 1% B/분(5mM/분)에서 0.33% B/분(1.66mM/분)에 이르는 다양한 그레이디언트 기울기에서 trastuzumab의 전하 변이체 분석 결과를 중첩시켜 나타낸 것입니다. 그레이디언트가 알수록 펌프 성능에 대한 요구가 높아집니다. 그레이디언트 중에 매우 정밀한 용매 조성을 얻으려면 소량의 용매 성분을 혼합할 때 펌프가 정확하고 정밀하게 작동해야 합니다. 하지만 염 그레이디언트의 경우, 그레이디언트가 매우 얇다고 해서 항상 더 높은 분리능이 얻어지는 것은 아니며 단순히 피크 폭만 증가시킨다는 점을 고려해야 합니다(예: 그림 1의 0.33% B/분). 따라서 재현성 연구를 위해 선택한 그레이디언트 기울기는 여전히 알은 것으로 간주되는 0.66% B/분 및 3.3mM/분에서 테스트된 그레이디언트의 중간에서 찾았습니다.

NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체를 분리하기 위해 비슷한 분석법 개발 절차를 수행했습니다(그림 2 참조). 등전점(pI)이 약 9인 trastuzumab에 비해 NIST 항체의 pI이 더 높았기 때문에(~9.2의 pI) NIST의 시작 조건에 약간 더 많은 양의 염이 포함되었습니다. NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체를 보다 효과적으로 분리하기 위해 그레이디언트가 trastuzumab에 비해 약간 더 얇아졌고, 그래서 가장 알은 그레이디언트는 0.17% B/분(0.83mM/분)이 되었는데, 이것은 펌프에 부담스러운 수준이었습니다. 추가적인 재현성 연구를 위해 0.5% B/분(2.5mM/분) 그레이디언트 기울기를 선택했습니다.

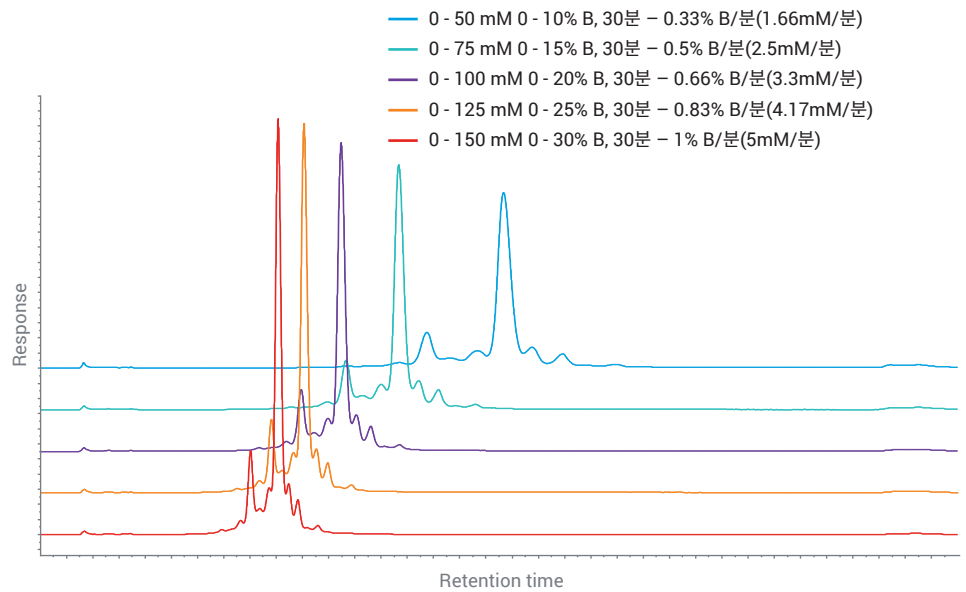


그림 1. 염 그레이디언트 기울기가 서로 다른 Trastuzumab 분리를 위한 분석법 개발.

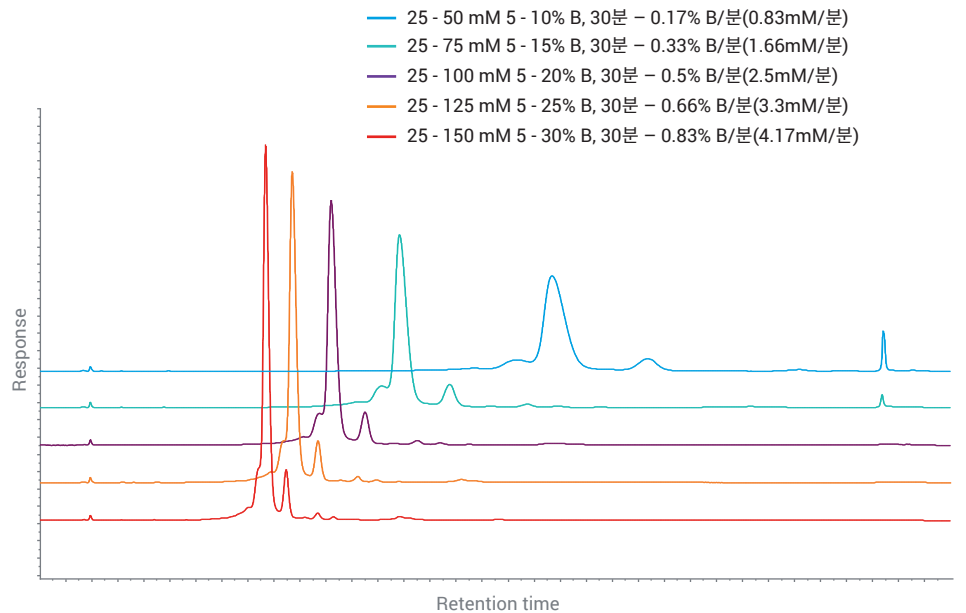


그림 2. 염 그레이디언트 기울기가 서로 다른 NISTmAb 참조 표준물질 분리를 위한 분석법 개발.

### Trastuzumab 전하 변이체 분리의 재현성

그림 3은 0.66% B/분(3.3mM/분)의 그레이디언트 기술기에서 trastuzumab(A)의 전하 변이체 분리에 대한 재현성 연구를 보여줍니다. 그림 3B는 분리된 변이체가 보다 잘 보이도록 확대한 모습입니다. A로 표시한 변이체는 주 피크 이전에 용리되는 산성 변이체를 나타내고, 염기성 변이체 B는 주 피크 이후에 용리됩니다. 주 피크 이전에 5개의 산성 변이체가 분리되었고, 주 피크 이후에 4개의 염기성 변이체가 용리되었습니다. 머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도 측면에서 모든 변이체와 주 피크를 평가했습니다. RT와 면적 정밀도는 모두 우수했으며, 두 개의 매우 작은 변이체 피크인 A1 및 B3을 제외하고 RT의 상대 표준 편차(RSD)는 0.052% 미만, 면적의 RSD는 0.82% 미만이었습니다.

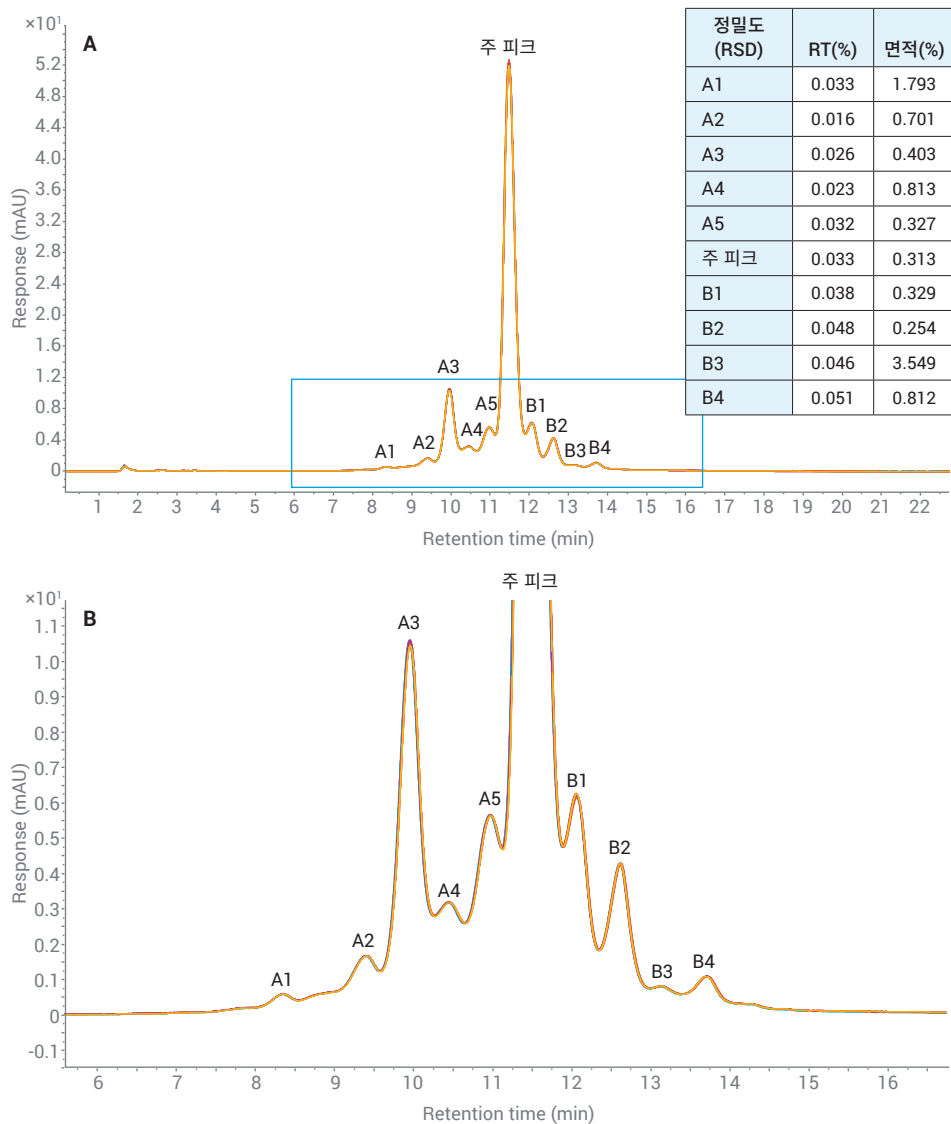


그림 3. 0.66% B/분(3.3mM/분)의 그레이디언트 기술기에서 trastuzumab(A)의 전하 변이체 분리를 위한 7회 연속 실행의 재현성 연구. (B) 확대 보기.

## NISTmAb 전하 변이체 분리의 재현성

그림 4는 0.5% B/분(2.5mM/분) 그레이디언트 기울기에서 NISTmAb 참조 표준물질(A)의 전하 변이체 분리에 대한 재현성 연구를 보여줍니다.

그림 4B는 2개의 산성 변이체와 4개의 염기성 변이체를 확대한 것입니다. 이번에도, 머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도 측면에서 모든 변이체와 주 피크를 평가했습니다. RT와 면적 정밀도는 모두 우수했으며, 하나의 매우 작은 변이체 피크인 B2를 제외하고 RT의 경우 0.06% RSD 미만, 면적의 경우 0.55% RSD 미만의 값을 얻었습니다.

그림 2에서 볼 수 있듯이 0.17% B/분(0.83mM/분)의 가장 얇은 그레이디언트는 0.5% B/분(2.5mM/분) (여전히 얇은 그레이디언트며 이 재현성 연구에서 이용함)과 같은 그레이디언트에 비해 더 우수한 분리능을 제공하지 않습니다.

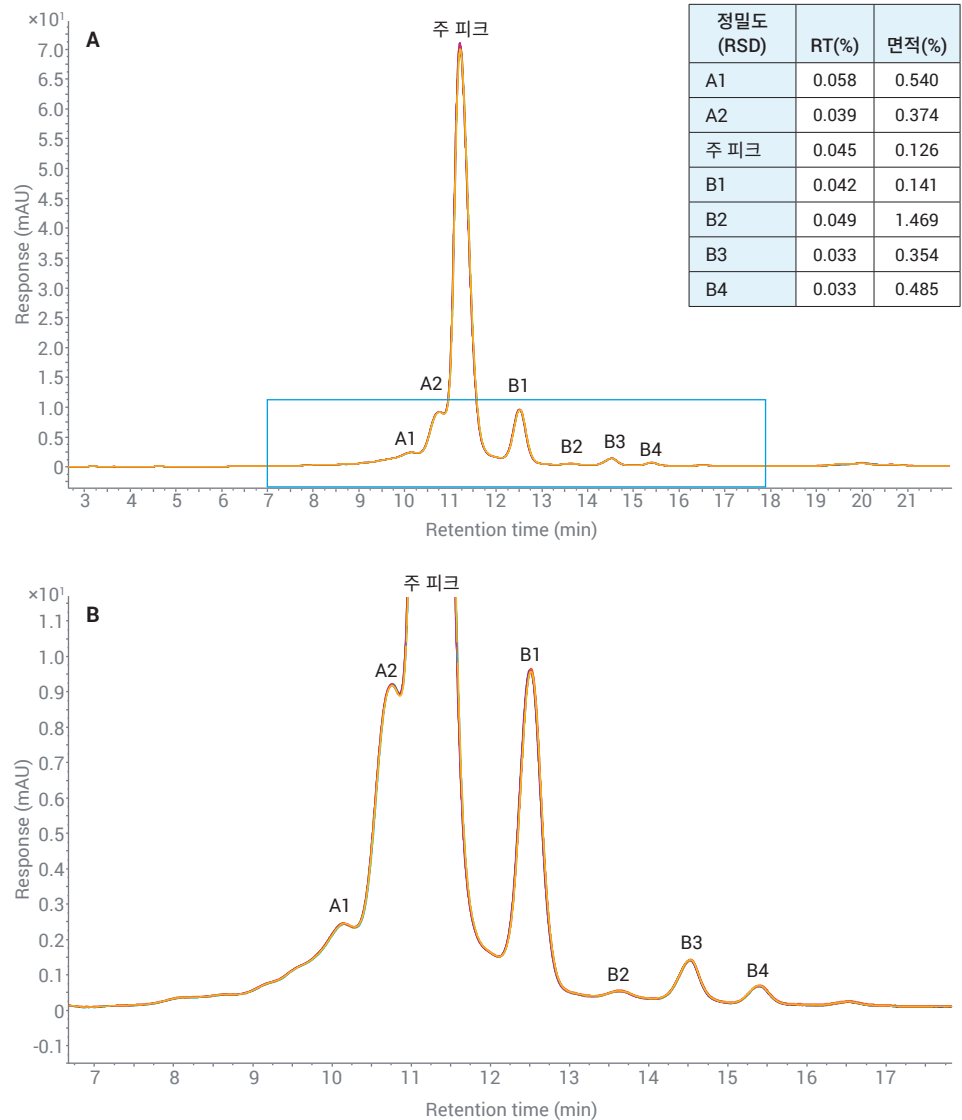


그림 4. 0.5% B/분(2.5mM/분) 그레이디언트 기울기에서 NISTmAb 표준 참조물질(A)의 전하 변이체 분리를 위한 7회 연속 실험의 재현성 연구. (B) 확대 보기.

그러나 1290 Infinity II Bio 고속 펌프는 그림 5에 나타난 부담스러운 그레이디언트 기울기를 처리했습니다. 적용된 그레이디언트에서 피크가 상당히 넓어지기는 했지만 7회 연속 실행에 대한 RT 정밀도는 매우 좋았습니다(0.25% RSD 미만). 피크 폭이 증가하면 피크 높이가 감소하여 면적 정밀도에 부정적인 영향을 미칩니다.

## 결론

1290 Infinity II Bio LC를 이용해 다양한 염 그레이디언트 기울기에서 trastuzumab 및 NISTmAb에 대한 전하 변이체 분리의 분리능과 재현성이 어떻게 달라지는지 평가했습니다. 얼핏보면 그레이디언트가 얇으면 분리능이 좋아질 것으로 생각될 것입니다. 그러나 두 mAb에 대해 평가된 가장 얇은 그레이디언트는 최상의 분리능을 제공하지 못했습니다. 오히려 기울기가 감소하면 피크가 넓어지기 시작하여 분리능이 더 이상 향상되지 않았습니다. 고분리능과 날카로운 피크 모양을 최상으로 조합한 분석법을 재현성 측면에서 추가적으로 평가했습니다. 3.3mM/분(trastuzumab) 및 2.5mM/분(NISTmAb)의 그레이디언트 기울기에서 RT뿐만 아니라 면적 측면에서도 우수한 재현성이 얻어졌습니다. RT 정밀도는 평가된 모든 피크에 대해 0.06% RSD 미만이었습니다. NISTmAb에 대해 테스트한 가장 얇은 그레이디언트도 재현성을 평가했는데, 0.83mM/분의 대단히 얇은 그레이디언트 기울기에서도 매우 우수한 RT 정밀도가 확인되었습니다(<0.25% RSD). 이 데이터는 유동 경로에 철을 완전히 함유하지 않은(iron-free) 1290 Infinity II Bio LC가 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건에 최적화되어 있으며 재현성이 높은 결과를 이끌어냄을 보여줍니다.

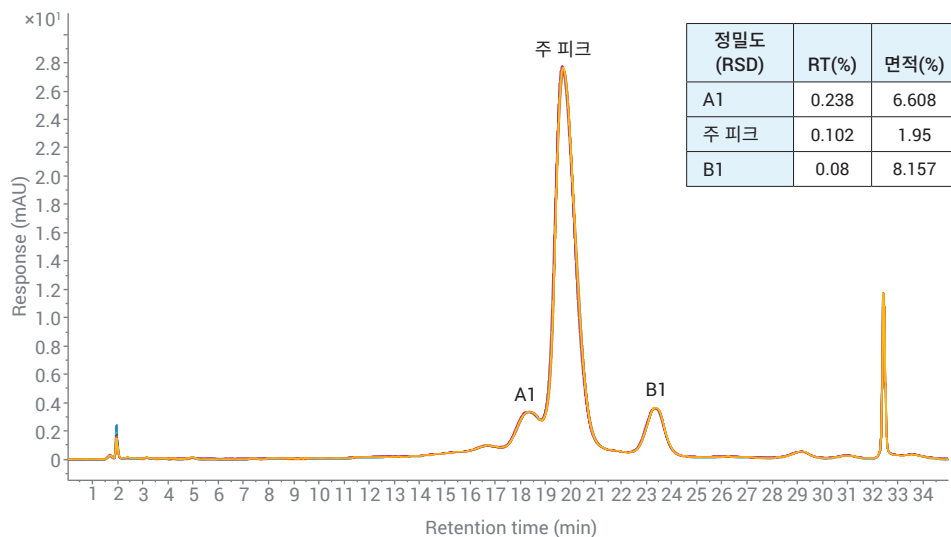


그림 5. 0.17% B/분(0.83mM/분) 그그레이디언트 기울기에서 NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체 분리를 위한 7회 연속 실행의 재현성 연구.

## 참고 문헌

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841-3849.
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56-64.
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846-8857.
4. The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. *Agilent Technologies*, publication number 5990-7595EN, **2016**.
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065–1066, 119–128.
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363–379.

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

DE.964027778

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
2021년 1월 5일, 한국에서 인쇄  
5994-2692KO

한국에질런트테크놀로지스(주)  
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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)