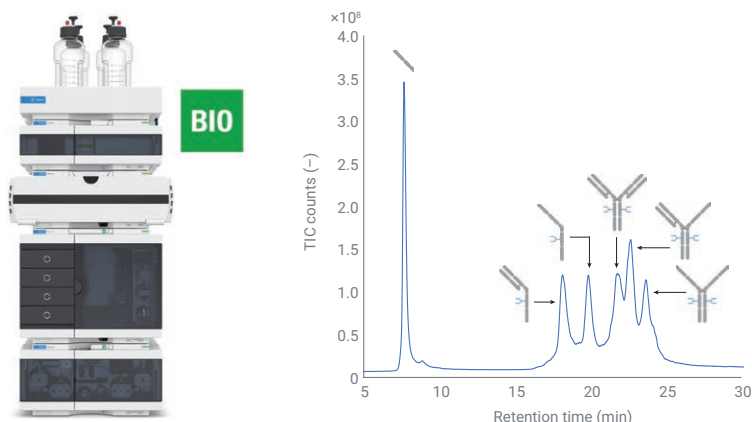


제품 관련 mAb 조각 모니터링

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 사용한 원형 단백질(Intact protein) 분석으로 저분자량 종의 UV 및 MS 검출 실현



저자

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

개요

저분자량(LMW) 또는 고분자량(HMW) 종과 같은 제품 관련 불순물은 치료용 단일 클론 항체(mAb) 제품에서 중요 품질 속성(CQA)으로 간주되며, 의약품 생산 공정 전반에 걸쳐 모니터링해야 합니다. 이 응용 자료에서는 PEEK-lined Agilent PLRP-S 컬럼과 결합된 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템의 우수한 성능을 기반으로 RPLC 분석법을 개발했습니다. NISTmAb의 환원된 중사슬 및 경사슬을 분석함으로써 극히 얇은 그레이디언트 기울기에서도 우수한 상대 머무름 시간 및 면적 편차를 관찰하였습니다. 분석법 개발 후, 두 개의 중사슬(H2) 또는 두 개의 중사슬과 하나의 경사슬(H2L) 같은 모든 관련 LMW 조각을 분리하고 검출할 수 있었습니다. UV 및 MS 검출기를 순차적으로 결합할 수 있어 이 분석법은 바이오 의약품 생산 과정의 여러 영역에서 사용할 수 있습니다. 이 분석법은 또한 한 번의 실행으로 두 개의 CQA(LMW 종 및 번역 후 변형(PTM))을 분석할 수 있어 SDS-PAGE/CE-SDS의 대안으로 제시됩니다.

서론

mAb는 바이오 의약품 중에서도 주요 제품으로 분류되며, 다양한 질병을 치료하는데 성공적으로 사용되고 있습니다.¹ 이러한 생체 분자는 이항화 결합으로 연결된 두 개의 중사슬과 두 개의 경사슬로 구성된 보존 이중 사량체 구조를 가지고 있습니다. 제조 또는 부적절한 보관 중에 LMW 종(그림 1 참조) 또는 HMW 종(예: 항체 이합체)과 같은 제품 관련 불순물이 형성될 수 있습니다. 이러한 불순물은 광범위한 정제 단계 후에도 남아 있을 수 있으므로 의약품에 대한 CQA로 이를 모니터링하는 것이 필수적입니다. 항체 이합체, 삼량체 또는 더 높은 응집체와 같은 HMW 종은 UV 검출을 이용한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 일상적으로 분석하고 분리할 수 있습니다.² SEC와 MS 검출을 결합하여 분자량 및 PTM과 관련된 불순물을 추가로 분석해 낼 수 있습니다.³ 중사슬(H), 경사슬(L) 또는 H2L 조각과 같은 LMW 종의 분석은 캐필러리 전기영동-도데실 황산나트륨(CE-SDS)으로 수행할 수 있습니다.⁴ 불행하게도, CE-SDS는 SDS에 의한 높은 이온 억제로 인해 MS 검출과 결합시킬 수 없으며, 따라서 경험적 지식에 의존해 제안된 LMW 종을 식별하는 경우가 많습니다. 이 응용 자료는 1290 Infinity II Bio LC 및 PEEK-lined PLRP-S 컬럼의 뛰어난 성능을 기반으로 mAbs의 LMW 종을 분석하는 대체 방법을 보여줍니다. 역상 액체 크로마토그래피(RPLC) 모드로 인해 NISTmAb의 모든 관련 환원 유도 LMW 조각은 필요에 따라 일상적 또는 심층 분석을 위해 UV 및 MS로 검출할 수 있습니다.

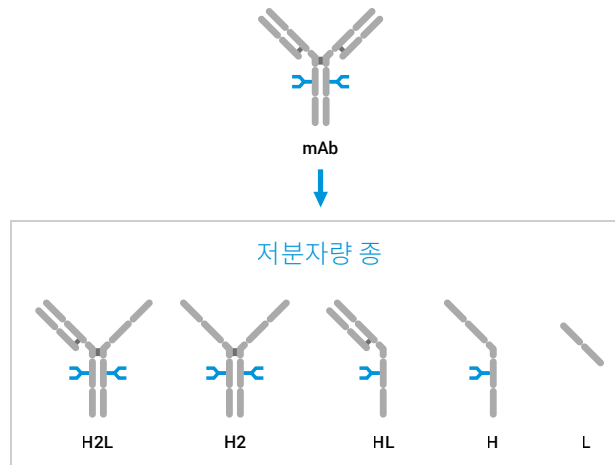


그림 1. 단일 클론 항체(mAb)의 환원 유도 LMW 종을 보여주는 개략도. 약어: H2L(두 개의 중사슬 및 하나의 경사슬), H2(두 개의 중사슬), HL(하나의 중사슬 및 하나의 경사슬), H(중사슬) 및 L(경사슬).

실험

장비

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 연결된 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성되었습니다.

- 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), Standard Flow Quick 장착
- Connect Bio Heat Exchanger (G7116-60071) 및 두 개의 Agilent Thermal Equilibration Devices(G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (VWD) (G7114B), Bio Micro Flow Cell VWD, 3mm, 2μL, RFID 장착
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF(G6545XT)

소프트웨어

- Agilent MassHunter 워크스테이션 데이터 수집(B.09.00 이상)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis(10.0 이상)
- Agilent MassHunter BioConfirm(10.0 이상)

컬럼

Agilent PLRP-S 5μm 1000Å, 2.1 × 100 mm PEEK-lined (품번 PL1912-2502PK)

화학물질

Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS 아세토니트릴(품번 5191-4496) 및 Agilent-NISTmAb(품번 5191-5744)가 사용되었습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 point-of-use 카트리지(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국). DL-dithiothreitol (DTT)은 Merck(Darmstadt, 독일)에서 구입했습니다.

시료 전처리

NISTmAb를 부분적으로 환원시키기 위해 40µg을 4°C의 1290 Infinity II Bio Multisampler에서 갈색 유리 바이알에 직접 넣어 1mM DTT와 함께 배양했습니다. 중사슬(H) 및 경사슬(L)로의 완전한 환원은 40µg의 NISTmAb를 10mM DTT와 함께 60°C에서 30분 동안 배양하여 달성했습니다. 주입 농도는 1mg/mL NISTmAb 또는 환원된 NISTmAb였습니다.

표 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC로 Intact NISTmAb 및 해당 LMW 종을 분석하기 위한 LC 분석법.

파라미터	값
컬럼	Agilent PLRP-S 5µm 1,000Å, 2.1 × 100mm PEEK-lined
용매	A) 물 + 0.1% 포름산 B) 아세토니트릴 + 0.1% 포름산
그레이디언트	0.00분 – 25% B 9.00분 – 30% B 34.00분 – 38% B 34.01분 – 100% B 36.00분 – 100% B 36.01분 – 25% B 40.00분 – 25% B
유속	0.400mL/분
온도	열 평형 장치가 설치된 경우 60°C
UV 검출	VWD: 280nm, 10Hz/MS: 표 2 참조
주입	주입 용량: 0.3µL 시료 온도: 4°C 세척: 물로 3초(플러시 포트)

표 2. Intact NISTmAb 및 해당 LMW 종 분석을 위한 소스 및 MS 파라미터.

파라미터	값
기기	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
가스 온도	350°C
건조 가스 유속	12L/분
Nebulizer	35psig
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유량	11L/분
VCap	4,000V
노즐 전압	2,000V
Fragmentor	180V
스키머	65V
Oct 1 RF Vpp	750V
수집 모드	양이온, 확장된(m/z 10,000) 질량 범위
질량 범위	m/z 100~10,000
수집 속도	1스펙트럼/초
기준 질량	m/z 922.0098

결과 및 토의

제조에서 품질 관리에 이르기까지 생산 공정의 모든 단계에 걸쳐 바이오 의약품 분석하려면 LC 시스템에서 가능한 최고의 성능이 요구됩니다. mAb 조각 분석과 관련하여 1290 Infinity II Bio LC의 성능을 평가하기 위해 NISTmAb를 DTT로 완전히 환원시켜 H 및 L 조각을 얻었습니다. 그림 2는 7회 연속 주입 시 상대 머무름 시간 및 면적 표준 편차(RSD)를 보여줍니다. 이러한 결과는 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 결합된 1290 Infinity II Bio LC의 머무름 시간 및 면적 정밀도가 우수하고, 얇은 그라데이션으로 mAb 조각을 분석하는 데 완벽하게 적합함을 보여줍니다. LC 분석법은 기울기가 0.32 및 0.55 %B/분인 두 개의 선형 그라데이션 단계로 구성되지만 RSD 값은 머무름 시간에 대해 0.190%(L) 및 0.056%(H), 그리고 면적 정밀도에 대해 0.530%(L) 및 0.744%(H)로 낮게 유지됩니다.

RPLC를 사용하여 LMW 종을 분석할 때 가장 큰 과제 중 하나는 실제 mAb와 비교하여 유사한 소수성으로 인해 H2 또는 H2L과 같은 항체 조각을 분리하기에 분리능이 불충분하다는 것입니다. 이러한 조각은 발효 과정에서, 또는 최종 제품의 부분적 환원으로 인해 발생할 수 있습니다. 그러나 이러한 조각은 적은 양의 DTT 및 감소된 온도 조건에서 시간이 지남에 따라 부분적으로 환원되어 인위적으로 생성될 수도 있습니다. 이 기법과 함께 PEEK-lined PLRP-S 및 1290 Infinity II Bio LC를 기반으로 한 RPLC 분석법이 개발되었습니다.

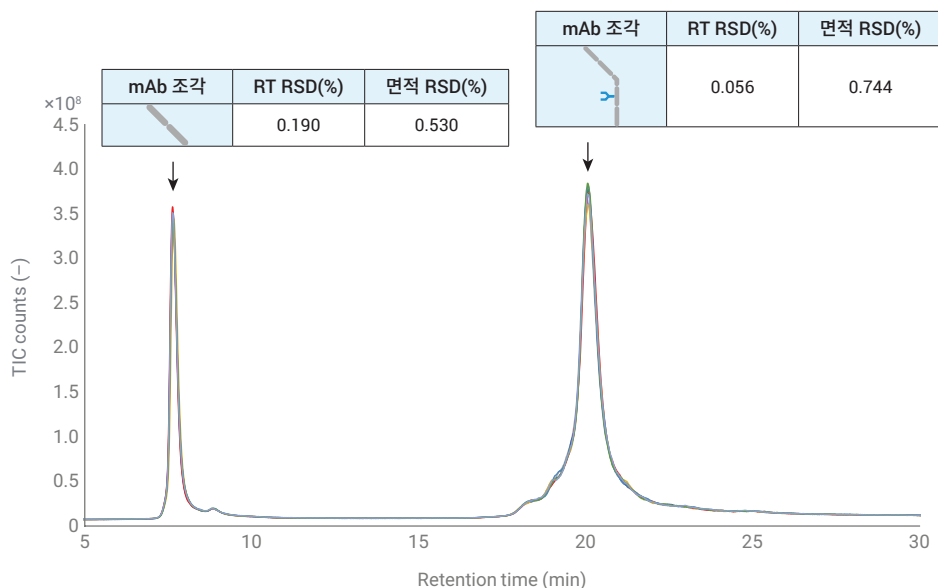


그림 2. NISTmAb 환원으로 유도된 중사슬 및 경사슬 조각을 Agilent 1290 Infinity II Bio LC로 분석했을 때의 상대 머무름 시간 및 면적 정밀도(RSD, n = 7) 값.

1290 Infinity II Bio Multisampler에서 NISTmAb의 동적 환원을 그림 3의 크로마토그램에서 확인할 수 있습니다. 그림 1에 나타난 모든 관련 mAb 조각은 DTT의 추가로 인해 잘 분리되고 시간이 지남에 따라 변할 수 있습니다. 특히 H2, H2L 조각 및 NISTmAb의 분리는 RPLC에 특히 훌륭하며, PEEK-lined PLRP-S 컬럼과 1290 Infinity II Bio LC의 결합이 LMW 분석을 위해 선택해야 하는 방법임을 보여줍니다. RPLC 모드 덕분에 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 쉽게 결합할 수 있으며, MS 데이터를 Agilent MassHunter BioConfirm에서 분석할 수 있습니다. 디컨볼루션 후, 그림 3의 스펙트럼은

각 조각의 주요 글리코형을 나타냅니다. NISTmAb의 특징적인 글리코실화는 이 분석법으로 여러 조각의 PTM을 쉽게 분석할 수 있음을 보여줍니다. 또한, 그림 4B는 mAb 피크 주변에 클러스터링되는 조각에 대한 대표 이온의 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 보여줍니다. 이러한 EIC는 또한 PEEK-lined PLRP-S 컬럼의 분리능 덕분에 우수한 피크 모양을 제공합니다.

1290 Infinity II 가변 파장 검출기와 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 순서대로 결합한 구성이기 때문에 대역 확장이 거의 또는 전혀 없이 UV 및 MS 검출이 한 번에 가능하며, 프로세스 개발에서 품질 관리로 분석법을 편리하게 이전할 수 있습니다(그림 4A).

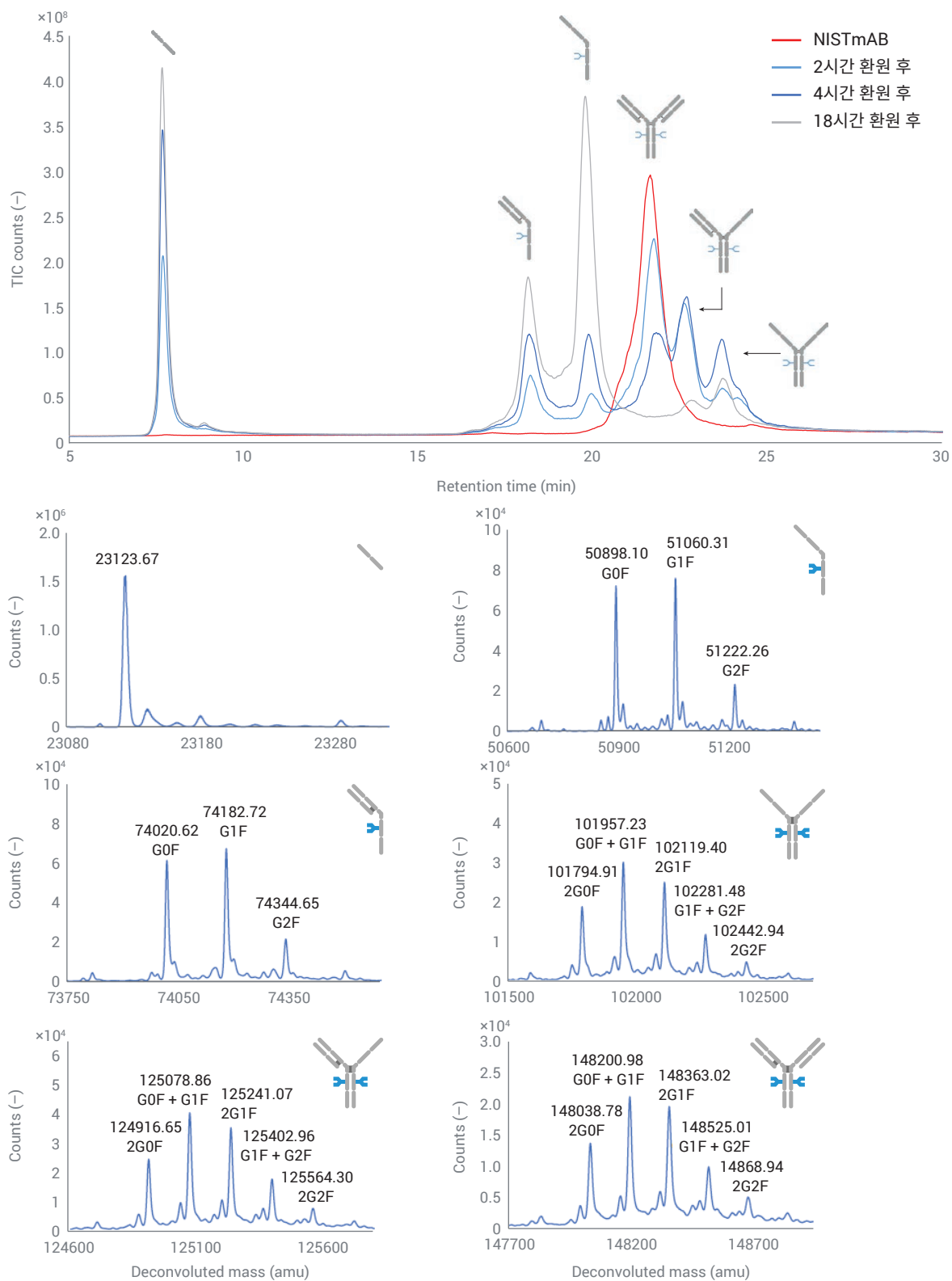


그림 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC로 분리되고 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF로 검출된 NISTmAb의 동적 부분 환원에 대한 크로마토그램. 각 조각의 해당 추출 스펙트럼은 NISTmAb의 특징적인 글리코실화를 보여줍니다.

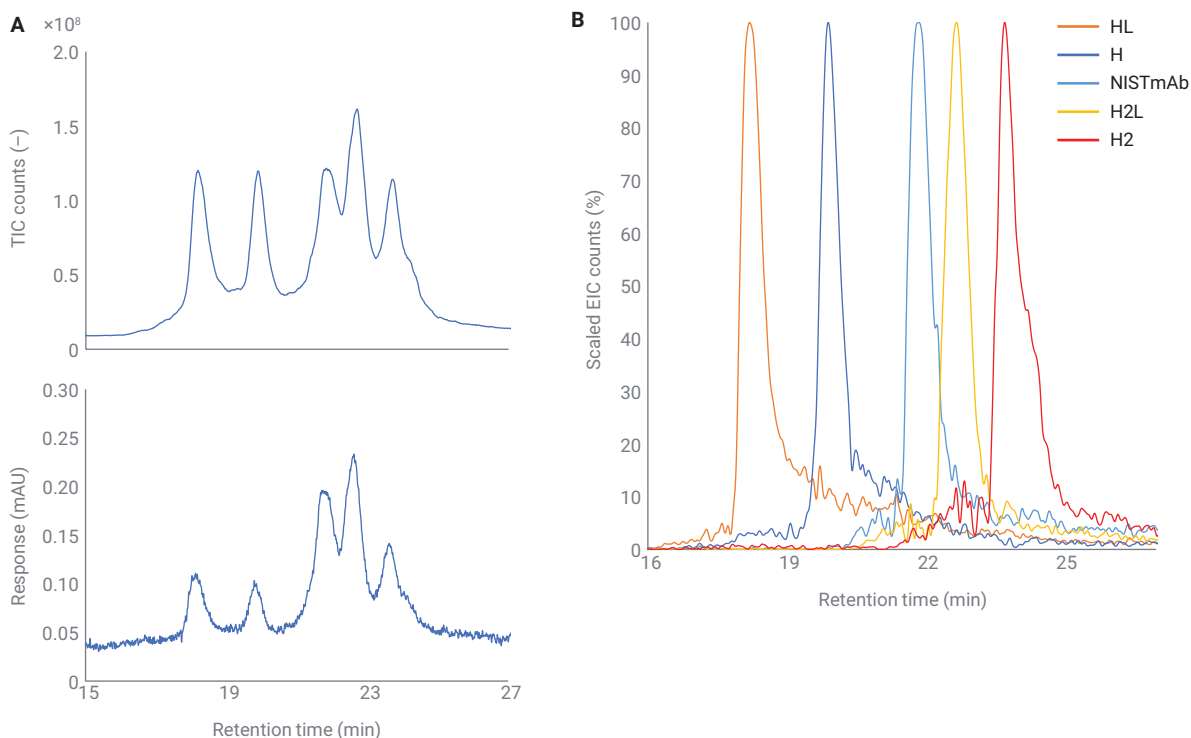


그림 4. NISTmAb 주변에 클러스터링되는 조각의 MS 및 UV 크로마토그램을 한 번의 실행으로 획득(A). 우수한 피크 모양을 보여주는 NISTmAb 조각의 추출 이온 크로마토그램(B).

결론

전통적인 SDS-PAGE와 이를 대체하는 현대적 CE-SDS는 LMW 및 HMW 종과 같은 제품 관련 불순물을 분석하는 데 널리 사용됩니다. 그러나 이러한 분석법으로 LMW 종을 구조적으로 식별하는 것은 까다롭기 때문에 주로 경험적 지식에 의존해 왔습니다. 이 응용 자료에서는 NISTmAb의 모든 관련 환원 유도 LMW 종을 분리할 수 있는 RPLC 분석법을 소개했습니다. 1290 Infinity II Bio LC는 중사슬 및 경사슬 조각 분석을 기반으로 우수한 머무름 시간 및 면적 정밀도 값을 나타냈습니다. 1290 Infinity II Bio Multisampler에서 NISTmAb

를 동적으로 환원하고 이후 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 사용하여 검출하는 실험을 통해 이 분석법으로 번역 후 변형을 분석할 수 있음을 보여주었습니다. 이를 조각 분석과 결합하면 바이오 의약품 개발을 가속화할 수 있습니다. 따라서 PEEK-lined PLRP-S 컬럼과 1290 Infinity II Bio LC의 결합된 구성은 최종 품질 관리에 이르는 전체 생산 공정에 걸쳐 바이오 의약품 분석에 유망한 미래를 열어줍니다.

참고 문헌

- Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992–1000.
- Nägele, E. Elevate Your mAb Aggregate Analysis: High-resolution SEC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note, publication number 5994-2709EN*, **2020**.
- Vandenhede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs. *Agilent Technologies application note, publication number 5994-0303EN*, <82>2018</82>.
- Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612–3620.

www.agilent.com/chem

DE44181.2356018519

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 1월 29일, 한국에서 인쇄
5994-3021KO

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

 **Agilent**
Trusted Answers