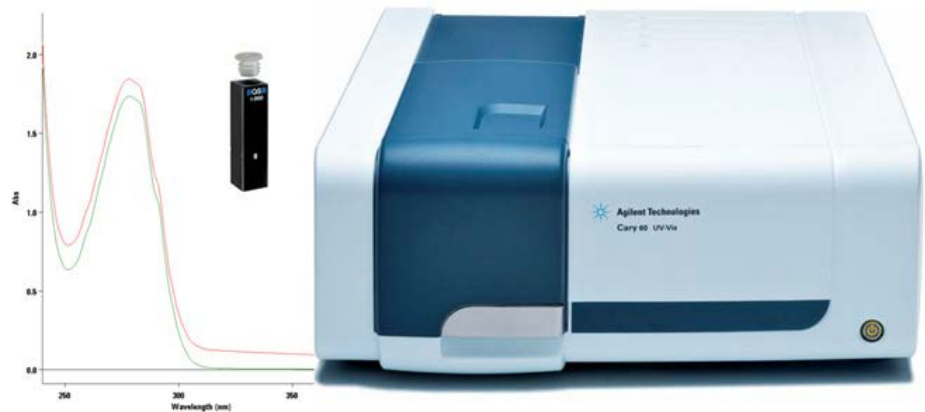


mAb 응집체 특성 규명

HPLC 분석법과 Cary 60 UV-Vis를 사용하여 개발한 빠른 분석법의 비교



저자

Arunkumar Padmanaban,
Sreelakshmy Menon
Agilent Technologies, Inc.

서론

단일 클론 항체(mAbs)는 제약 회사에서 주로 제조되는 중요한 바이오 의약품입니다. 생물학적 프로세스에서 mAbs의 사용이 증가함에 따라, 해당 특성을 세부적으로 규명하는 기술들이 제약 회사의 큰 관심을 끌고 있습니다. 단백질 응집체의 생물학적 활성에 미치는 영향을 주제로 규제 기관, 학계 및 제조 업체 사이에서 열띤 토론이 오가고 있다(1). 현미경으로만 관찰되는 단백질 응집체는 단백질이 안정적인 형태에서 존재하지 않을 수 있는 항원결정기를 노출시킬 수 있습니다. mAbs의 특성 규명에서 이러한 응집체의 존재 여부에 대한 신뢰성 있는 식별은 매우 중요합니다.

응집체의 형성은 제조, 정제, 제형 및 보관 과정에서 수많은 요소들에 의해 영향을 받습니다. 따라서 빠른 QC 분석법을 이용해 단백질 응집의 존재 여부를 확인하는 것이 유리합니다. 이러한 분석법은 항체 제조 수명주기의 여러 단계(예: 클론 선별), 그리고 보관 과정에서의 지속적인 제품 모니터링에 사용될 수 있습니다. 단백질 응집을 검출하는 분석법으로서 UV

분광법이 가진 장점은 비파괴적인 분석이 가능하다는 것입니다. 또한 적은 양의 시료 사용, 최소한의 시료 전처리 및 간편한 시료 분석도 장점으로 꼽을 수 있습니다.

본 연구에서는 응집체의 존재 여부를 나타내는 빠른 QC 분석법을 제시합니다. 이 분석법은 Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 다양한 스트레스 조건에서 발생하는 mAb 용액의 응집체를 식별합니다. 응집체의 존재 여부는 단백질 응집체 특성 규명에 사용되는 표준 분석법인 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석으로 확인했습니다.

실험

시약 및 시료

시판 mAb를 현지 약국에서 구입하여 제조업체의 지침에 따라 보관했습니다. monobasic 및 dibasic sodium hydrogen phosphate를 Sigma-Aldrich로부터 구입했습니다. 완충액을 새로 제조한 후, 사용하기 전에 0.22µm 멤브레인을 이용해 여과했습니다.

시료 전처리

응집을 유도하기 위해 mAb 시료에 열 스트레스 및 가속화된 동결-해동 스트레스(다음 내용 참조)의 두 가지 스트레스 분석법을 적용했습니다. 처리되지 않은(스트레스를 가하지 않은) 시료를 분석 측정을 위한 대조군으로 사용했습니다.

열 스트레스

mAb 시료를 물에서 1mg/mL 농도로 희석했습니다. 희석된 mAb 시료를 100µL 분취하여 0.5mL Eppendorf 튜브에 넣습니다. 그런 다음 ThermoMixer(Eppendorf)를 사용하여 5분 및 10분 동안 65°C에서 배양하여 열 스트레스를 가했습니다. 분석 측정 전에 시료를 실온으로 냉각시켰습니다.

가속화된 동결-해동 스트레스

1mg/mL mAb 시료의 단일 100µL 분취액을 0.5mL Eppendorf 튜브에 넣습니다. 이러한 튜브를 용액이 얼 때까지 에탄올-드라이 아이스 수조에 담갔습니다. 이어서 냉동된 시료를 즉시 30°C에서 4분 동안 thermomixer에 넣었습니다. 시료가 완전히 해동되면 다시 급속 냉동시켰습니다. 이 동결-해동 사이클을 15회 반복한 후 특성 규명을 분석합니다.

UV 스펙트럼 스캔

Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 대조군과 스트레스를 가한 mAb 시료의 스펙트럼 스캔을 수행했습니다. 50µL의 시료 분취액을 애질런트 서브마이크로(sub-micro) 직사각형의 석영 큐벳(경로 길이 10mm)에 넣었습니다. 240~380nm의 블랭크 보정 베이스라인에 맞게 시료 흡광도를 기록했습니다. 그림 1에 나타난 공식(2)를 이용해 응집 지수(A.I.)를 계산했습니다. 데이터 수집 및 분석은 Agilent Cary WinUV Scan Application 소프트웨어를 사용하여 수행했습니다.

$$AI = \left(\frac{OD350}{OD280 - OD350} \right) * 100$$

그림 1. 응집 지수 계산.

OD350은 350nm에서의 흡광도(%Abs)를 나타내고 OD280-OD350은 각각 280 및 350nm에서 흡광도의 차이입니다.

크기 배제 크로마토그래피(SEC)

시료의 SEC 분석은 다음으로 구성된 Agilent 1260 Infinity bio-inert LC 시스템을 사용하여 수행했습니다.

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 펌프
- Agilent 1260 Infinity High-performance Bio-inert 자동 시료 주입기
- Agilent 1260 Infinity Thermostat(bio-inert 열교환기 포함)
- 애질런트 항온 컬럼 장치
- Agilent 1260 Infinity 다오드 어레이 검출기 VL Plus
- Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm LC 컬럼

LC 파라미터는 표 1과 같습니다. 이러한 파라미터는 다른 연구(3)에서 인용해 왔으며 분리에도 동일하게 적용했습니다. 모노머 및 응집체의 피크 면적을 계산하고 대조군 시료와 비교했습니다. 데이터 수집과 분석에 OpenLAB CDS ChemStation을 사용했습니다.

표 1. LC 기기 조건.

파라미터	설정
이동상 A	150mM 인산나트륨 pH 7.0
컬럼	AdvanceBio SEC 2.7 μ m 300 Å 7.8 × 300mm 컬럼
TCC 온도(°C)	25°C
등용매 분석	이동상 A
분석 시간	15분
주입 부피	5 μ L
유속	0.8mL/min
DAD	220 및 280nm

결과 및 토의

UV 분광법

UV 흡광도 분광법은 단백질 용액의 정량 측정을 위한 가장 간단하고 비파괴적인 방법입니다.

이 분석법은 화학적 유도체화 또는 복잡한 염료 커플링 반응 없이 단백질을 정량하는 데 사용할 수 있습니다.

응집체 형성을 유도하기 위해 여러 조건에 노출시킨 mAb 시료를 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 측정했습니다. Xenon 플래시 램프 소스는 빛에 민감한 시료를 광분해하지 않기 때문에 Cary 60은 생체 시료 측정에 적합합니다. 애질런트는 시료 부피의 범위가 5 μ L~1mL 다양한 석영 큐벳을 제공합니다. 이 연구에서는 시료 부피가 50 μ L이고 경로 길이가 10mm인 서브마이크로 (sub-micro) 석영 큐벳을 사용했습니다. 이 큐벳을 사용하면 시료 손실을 최소화하면서 적은 시료량으로 측정을 수행할 수 있습니다.

320nm 이상의 흡광도 신호는 응집체 입자에 의한 광산란에 기인합니다. 응집체가 없는 단백질 용액은 320nm(4) 이상에서 흡수되지 않습니다. 스트레스를 가한 경우와 스트레스를 가하지 않은 경우에 mAb 시료의 스펙트럼 스캔을 그림 2에 나타냈습니다. 패널 A는 열 스트레스를 가한 시료의 흡광도 스펙트럼을 보여줍니다. 350nm에서 광학 밀도가 약간 증가한 것을 관찰할 수 있습니다. 이 스펙트럼은 동결-해동 스트레스를 가한 시료의 패널 B 스펙트럼이 350nm에서 광학 밀도를 나타낸 것과 대조적입니다.

동일한 데이터의 로그-로그 플롯을 그림 2의 각 패널 내에 삽입했습니다. 이 플롯은 전체 흡광도에 대한 산란의 기여도를 보여줍니다.

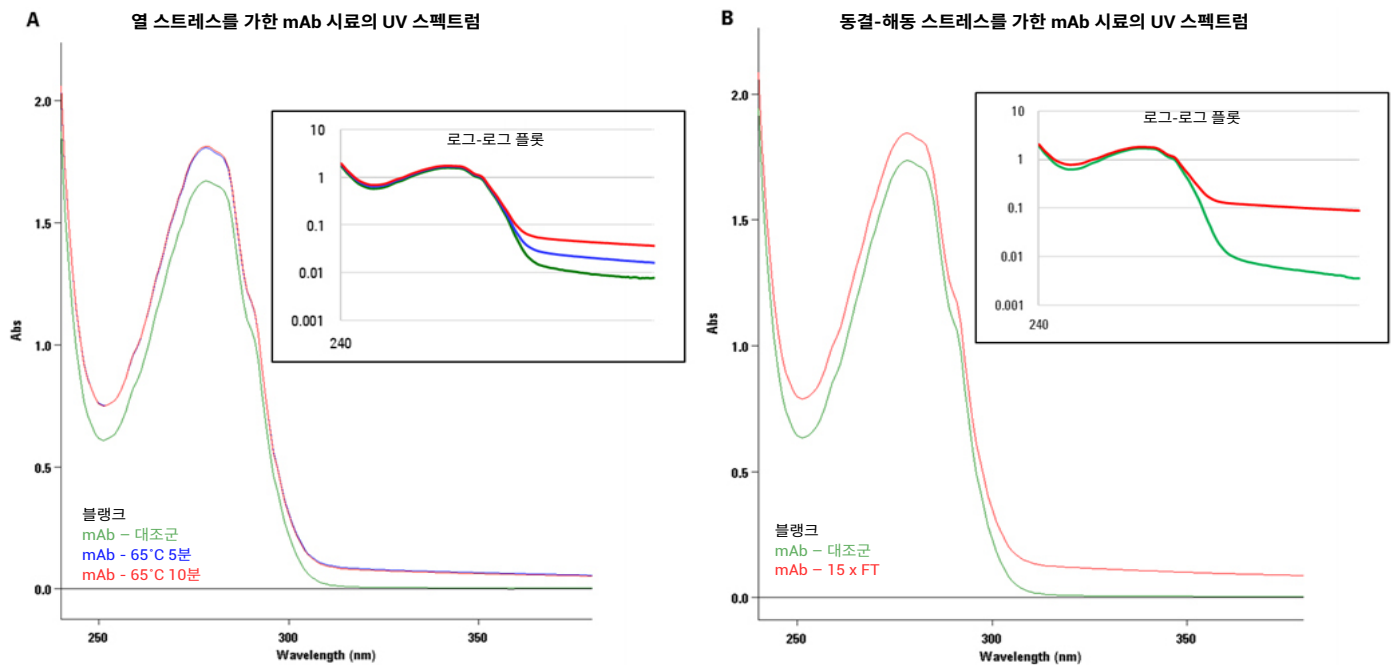


그림 2. 스트레스를 가하지 않은 mAb 및 스트레스를 가한 mAb 시료의 UV 흡수 스펙트럼. 패널 A: 열 스트레스를 가한 시료 및 패널 B: 동결-해동 스트레스를 가한 시료. 삽입한 그래프는 로그-로그 플롯입니다.

용액의 광학 밀도 변화는 UV 트레이스의 이동이 증가하는 부분에서 명확하게 볼 수 있습니다.

그림 1의 공식을 이용해 이러한 데이터로부터 응집 지수(AI)를 계산했으며 응집 지수의 변화를 표 2에 나타내었습니다. 반복적인 동결-해동 사이클을 거친 시료는 대조군 시료뿐만 아니라 열 스트레스를 가한 시료보다도 높은 응집 지수를 나타냈습니다. 이러한 데이터로부터 열 스트레스보다 동결-해동 스트레스에 의해 응집체가 더 많이 형성된다는 사실을 관찰할 수 있습니다. 이는 얼음-액체 계면에서의 부분적 전개, 완충 염이 결정화함에 따른 pH의 변화, 및 얼음 결정 성장 동안 용질 농도와 같은 요인에 기인할 수 있습니다.

SEC 분석

2.7µm 입자 크기의 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용하여 모든 시료를 분석했습니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 모노머 피크, 응집체 피크, 그리고 제형에 포함된 소분자 보존료까지 효율적으로 분리했습니다. 짧은 분석 시간 내에 모노머와 응집체 피크를 고분리능으로 분리했습니다.

표 2. 여러 조건에서 스트레스를 가한 경우와 가하지 않은 경우에 시료의 응집 지수 변화.

시료	OD 280nm	OD 350nm	응집 지수
스트레스를 가하지 않은 IgG	1.57	0.01	0.5
65°C~5분	1.69	0.02	1.1
65°C~10분	1.72	0.04	2.5
15 x 동결 해동(FT)	1.82	0.10	5.8

열 스트레스를 가한 시료에 대한 SEC 크로마토그램을 그림 3, 패널 A에 나타냈고, 동결-해동 시료는 패널 B에 나타냈습니다. 모든 시료가 전체 피크 면적에서 약 99%를 차지하는 주요 모노머 피크를 나타냈습니다. 대조군 시료에서 7분 지점에 소량의 응집체 피크가 존재하는 것으로 나타났습니다. 열 스트레스를 가한 시료의 크로마토그램은 6분의 머무름 시간에서 추가 피크를 나타냈습니다. 그러나 이 피크는 대조군 시료에 존재하지 않습니다. 또한 처리된 시료는 약 11분 지점에서 베이스라인의 증가를 나타냈고 이는 mAb의 저하를 보여줍니다. 크로마토그램은 열처리 시, 일부 고유 응집체가 고차원의 응집체 종으로 변화했음을 나타냅니다. 전체 응집체 피크 면적은 동일하지만 SEC 분석을 사용하여 여러 형태의 응집체를 분리할 수 있습니다. 대조군 시료와 15X 동결-해동 시료의 크로마토그램 오버레이를 패널 B에 나타냈습니다.

이로부터 스트레스를 가한 시료는 7분 지점에서 응집체의 피크 면적이 증가했음을 알 수 있습니다.

표 3에 나타난 모노머와 응집체 피크의 피크 면적 백분율은 열 분해와 비교하여 반복적 동결-해동 사이클에서 높은 수준의 응집을 보여줍니다. UV 스펙트럼도 유사한 결과를 보여주었습니다.

표 3. 여러 조건의 SEC 크로마토그램에서 얻은 응집체 및 모노머 피크의 피크 면적 %.

mAb 시료	피크 면적 %	
	응집체	모노머
스트레스 가하지 않은 mAb	0.73	99.13
65°C~5분	0.68	99.23
65°C~10분	0.67	99.20
15 x 동결 해동(FT)	1.18	98.65

UV 흡광도 데이터와 SEC 데이터는 응집체 존재 여부 평가에서 높은 연관성을 가집니다. UV 흡광도 분석법은 응집체를 분리할 수 없지만, SEC 특성 규명 전의 빠른 도구로 사용할 수 있습니다. UV 흡광도 분석법은 적은 시료량, 시료 재사용, 손쉬운 기기 설정, 그리고 1분 미만의 빠른 분석 등 여러 가지 이점을 제공합니다.

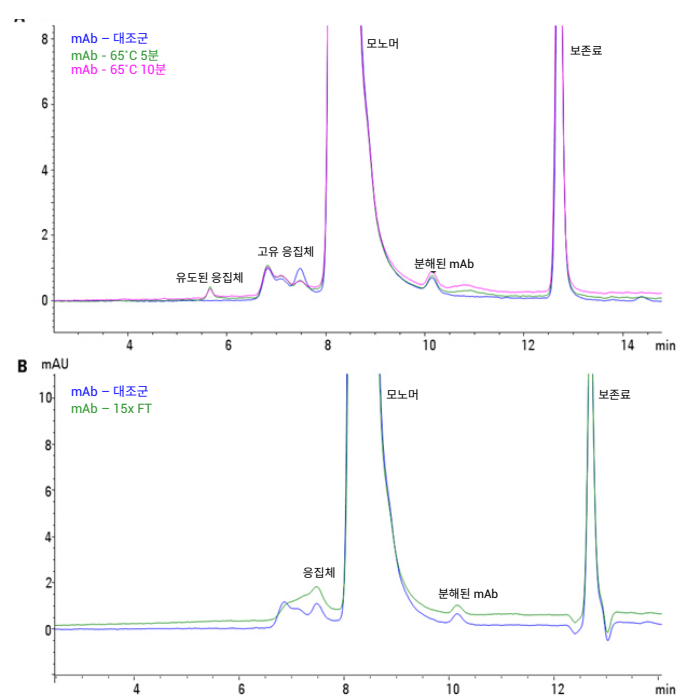


그림 3. 스트레스를 가하지 않은 및 스트레스를 가한 mAb 시료의 SEC 크로마토그램 오버레이. 패널 A: 응집체 피크 형성을 보여주는 열 스트레스를 가한 시료. 패널 B - 응집체 피크의 증가를 보여주는 동결-해동 시료.

결론

이 연구의 결과는 Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 단일 클론 항체 용액에서 응집체의 존재 여부를 모니터링할 수 있음을 보여줍니다. 이 분석법은 여러 형태의 응집체를 분리할 수 없지만, SEC 분석으로 이를 분리하기 전에 응집체의 존재 여부를 확인하는 빠른 선별 분석법으로 이용할 수 있습니다. 결과적으로 Agilent 1260 Bio-LC 시스템과 함께 사용된 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼은 짧은 분석 시간에 mAb 응집체를 고분리능으로 분석할 수 있는 것으로 입증되었습니다.

참고문헌

1. Vázquez-Rey, et al. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108.
2. Hawe, A, et al. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *Eur J Pharm Sci.* **2009**, 38.
3. Coffey, A. et al. 단백질 응집체 연구를 최적화하고 실행하기 위한 종합 워크플로 애질런트 테크놀로지스, 발행 번호 5991-7476KO. 2017.
4. Raynal, B. et al. Quality Assessment and Optimization of Purified Protein Samples: Why and How? *Microb Cell Fact.* **2014**, 13.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 3월 13일, 한국에서 인쇄
5991-7974KO
DE.6858912037

한국애질런트테크놀로지스(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