

직교 분석법을 사용해 항체 약물 결합체 품질 개선

항체 약물 결합체

항체 약물 결합체(ADC)는 차세대 표적 바이오치료제로서 신약 개발 파이프라인에서 빠르게 성장하고 있는 분야 중 하나입니다. 특정 세포를 표적으로 하는 단일 클론 항체(mAbs)에 링커를 통해 강력한 세포독성 약물을 부착하는 방식으로 만들어집니다. 2019/2020년에 미국 FDA의 승인을 받은 ADC는 시스테인과 라이신에서의 결합을 기반으로 하며, 시스테인 링커가 대다수를 차지합니다.

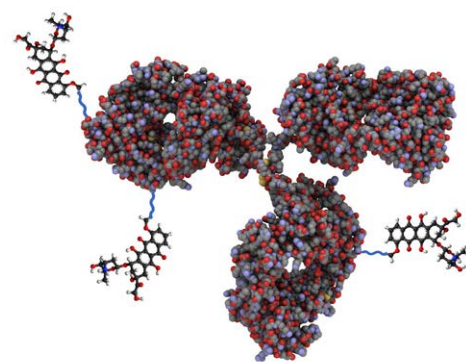


표 1. 2019~2020년 사이에 승인된 ADC.

이름	IgG isotype	표적	Linker site	페이로드
Gemtuzumab ozogamicin	IgG4	CD33	라이신	Calicheamicin
Brentuximab vedotin	IgG1	CD30	시스테인	Auristatin(MMAE)
Trastuzumab emtansine	IgG1	HER2	라이신	Maytansine(DM1)
Inotuzumab ozogamicin	IgG4	CD22	라이신	Calicheamicin
Polatuzumab vedotin	IgG1	CD79b	시스테인	Auristatin(MMAE)
Enfortumab vedotin	IgG1	Nectin 4	시스테인	Auristatin(MMAE)
Trastuzumab deruxtecan	IgG1	HER2	시스테인	Topoisomerase I inhibitor
Sacituzumab govitecan	IgG1	TROP-2	시스테인	Active metabolite of irinotecan(SN-38)
Belantamab mafodotin	IgG1 afucosylated	BCMA	시스테인	Auristatin(MMAF)

시스테인 링커

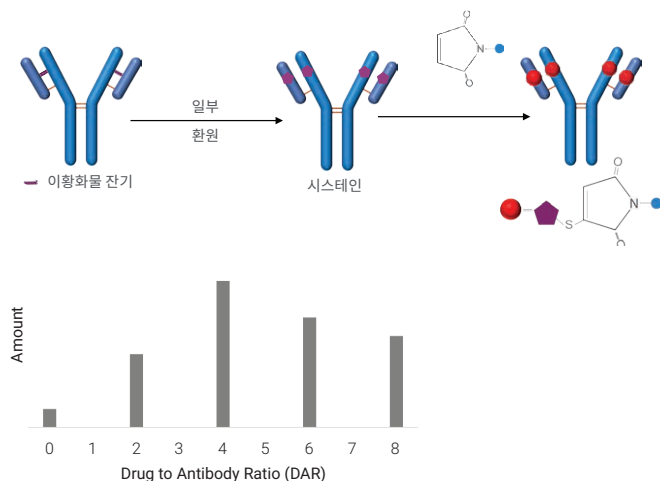
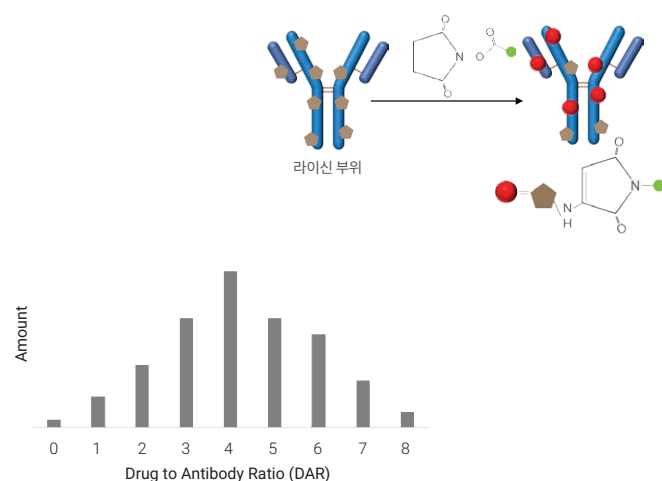


그림 1. ADC 결합 유형.

시스테인 결합의 경우 경첩 부위의 사슬 간 이황화 결합 환원 때문에 2의 배수로 최대 8개의 약물을 부착할 수 있습니다. 라이신 링커로 인해 이질성의 정도가 높아지는 경우가 많습니다. 예를 들어, trastuzumab emtansine에는 trastuzumab 분자 전체에 90개의 Lys 잔기가 있으며, 각 분자는 최대 8개의 DM1 결합체를 포함할 수 있습니다.

업계에서 완제품 승인 가능성을 높이기 위해 "여러 번 빨리 실패하는" 전략을 채택함에 따라 ADC의 구조-기능 관계를 조기에 빨리 깊이 있게 이해하는 것이 매우 중요합니다. 분자 구조 및 기능의 각 측면 특성을 규명하는 데 다양한 직교 분석법을 적용해야만 이러한 목표를 달성할 수 있습니다.

라이신 링커



ADC를 생성하기 위해 항체에 결합하는 저분자는 일반적으로 소수성입니다. 시스테인 결합 ADC의 경우 전체적인 소수성이 DAR 값이 커질수록 증가하므로 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 DAR 모니터링에 적합한 도구입니다. 반대로 라이신 결합 ADC에는 많은 Lys 잔기가 있으며, 위치 이성질체의 혼합물로 구성되어 있습니다. HIC는 라이신 결합 ADC를 분해하기 위한 분석법으로 제안하지 않습니다^{7,8}. 질량 분석 검출(MS)을 포함하는 역상 크로마토그래피(RP)(RP-MS)가 선택받는 분석법입니다. RP는 원형(intact) mAb 및 조각 모두에 대한 선택성을 제공하는 반면, MS는 피크 식별에 매우 중요한 감도 및 질량 정보를 모두 제공합니다. 조각에 비결합 및 가변적인 결합 경사슬과 중사슬뿐만 아니라 링커만 있는 사슬도 포함되어 있기 때문에 라이신 결합 ADC를 연구하는 데 매우 중요합니다⁷.

소수성 페이로드와의 결합을 통한 ADC 형성도 소수성 작용 응집을 강화합니다⁹. 비록 응집체 및 분해물이 낮은 농도로 존재하지만, 생물의약품의 품질에 큰 영향을 주기 때문에 활성 상실, 용해성 감소 및 면역원성 증가로 이어질 수 있습니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 단백질 응집을 특성화하기 위해 사용되는 표준 분석법입니다.

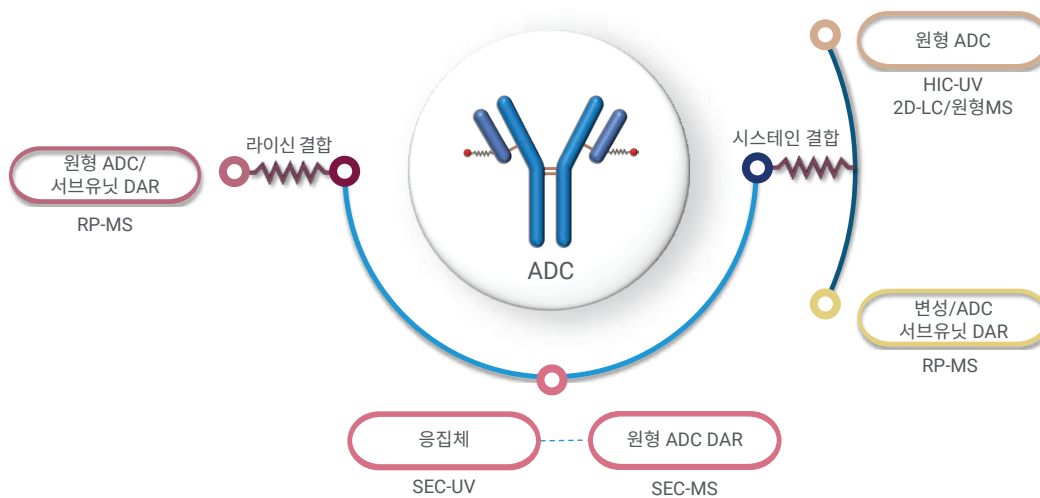


그림 2. ADC 특성 규명을 위한 직교 분석법.

분리를 최적화하기 위한 팁

시료 전처리

- ADC 시료는 소수성인 경향이 있기 때문에 용리액의 용해성을 확인하는 것이 매우 중요합니다. 시료는 초기 이동상에서 용해되는 것이 이상적입니다
- 응집체 및 불순물로 인해 발생할 수 있는 손상으로부터 컬럼을 보호하기 위해 HPLC 분석 전에 Captiva 프리미엄 PES 시린지 필터를 사용해 시료를 필터링하는 것이 좋습니다(용이한 선택 및 주문 정보 섹션 참조)
- 복잡하거나 "더러운" 시료를 사용해 작업하는 경우 컬럼 수명 연장을 위해 가드 컬럼을 사용하십시오(용이한 선택 및 주문 정보 섹션 참조)

애질런트 AdvanceBio HIC 컬럼:

DAR은 ADC의 고유 형태에서 모니터링됩니다

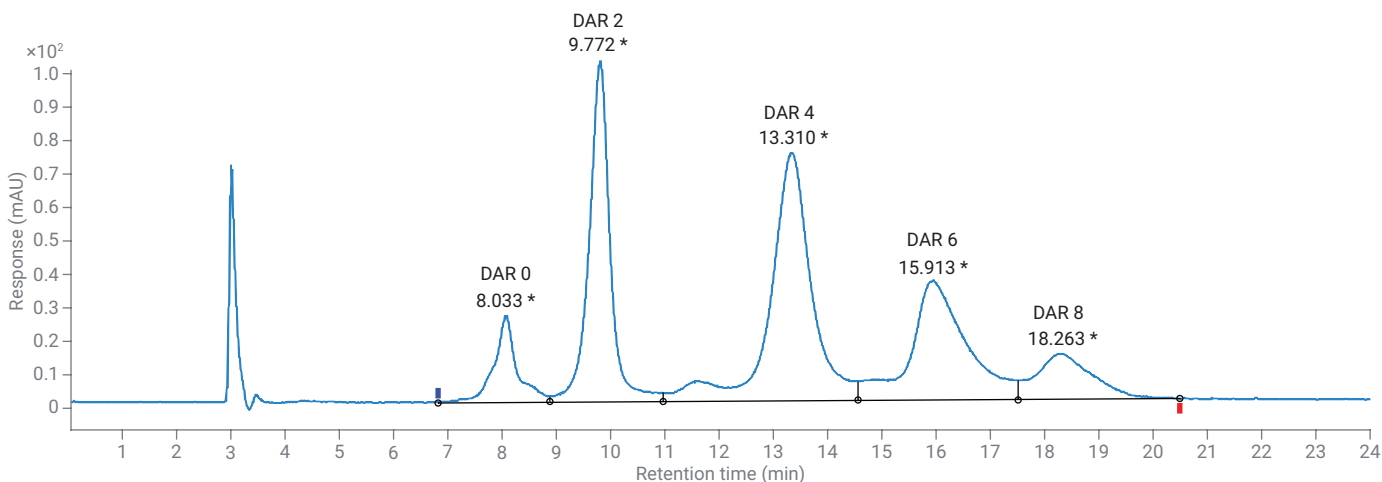


그림 3. 애질런트 AdvanceBio HIC 컬럼을 사용해 brentuximab vedotin 분리.
(5994-0149EN)

소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)

HIC는 생체분자 용해성을 줄이는 이동상을 포함하는 높은 염을 활용합니다. 이를 통해 HIC 고정상에 흡수되도록 합니다. 염 그레디언트를 통한 용리를 통해 분자가 소수성이 증가하는 순서대로 용리됩니다. HIC에서 사용되는 염의 높은 농도 때문에 Bio-inert LC를 사용하는 것이 좋습니다. LC 시스템이나 컬럼을 고농도 염 용액에 장시간 방치하지 않는 것이 여전히 중요합니다. 이러한 이유로 Quaternary LC 시스템을 사용하면 다른 채널을 유기 변형제 및 물 또는 기타 플러시 용매에 사용할 수 있습니다. DAR을 높은 순서대로 정확하게 결정하고 컬럼 수명을 연장하기 위해 Propan-2- 이 필요합니다¹.

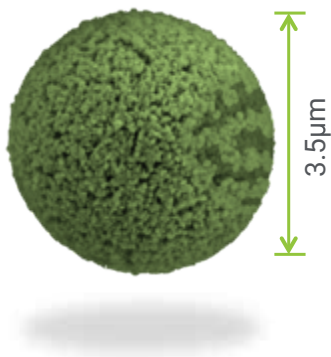


그림 4. AdvanceBio HIC(공극 크기 450Å).

- 황산암모늄은 소수성 단백질 상호작용을 유도한다는 특징 때문에 HIC에서 공통적으로 사용되는 염이지만, 침전 가능성도 높입니다. 침전을 방지하는 가장 좋은 방법은 시료 매트릭스를 초기 이동상과 가능한 가장 비슷하게 만드는 고농축 황산암모늄을 사용해 시료를 희석하는 것입니다². 장점은 다음과 같습니다
 - 최적의 피크 모양 및 감도
 - 주입 전 시료 침전 여부 사전 확인 및 컬럼 헤드에 시료 침전 방지
- 그레디언트 마지막에 수분에 걸쳐 상대적으로 느린 역 그레디언트를 사용하세요. 2-3 컬럼 부피를 사용해 재평형하세요 ([사용자 가이드](#))
 - 염 농도 변화로 인한 급작스러운 점도 변화 때문에 컬럼 손상을 방지하려면 초기 이동상으로 점진적으로 돌아가야 합니다
- 온도 증가가 고점도 이동상 실행을 위한 공통적인 방법이지만, 단백질 피크 모양의 저하 때문에 HIC에는 권장하지 않습니다
- 2M의 황산암모늄은 상당한 양입니다. 순도가 낮은 염을 사용하는 경우 크로마토그램의 베이스라인이 드리프트될 수 있습니다
 - [OpenLab CDS 바탕 감산](#)을 적용해 베이스라인 드리프트를 차단할 수 있습니다³

애질런트 PLRP-S 컬럼:

원형 ADC 및 서브유닛의 DAR 모니터링

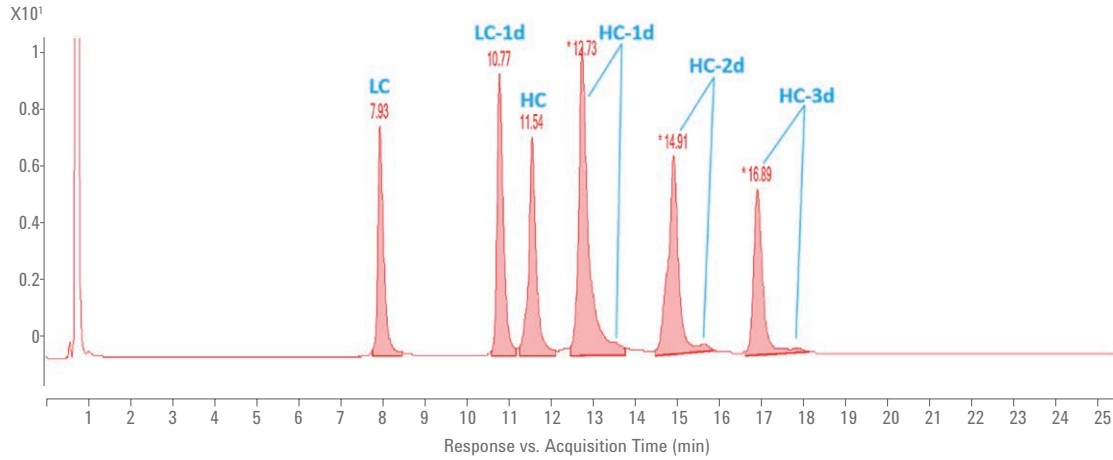


그림 5. 역상 크로마토그래피로 분리한 환원된 brentuximab vedotin의 경우 자외선 흡수 스펙트럼(280nm) 및 피크 식별은 질량 분석법을 통해 확인되었습니다. ([5991-6559KO](#))

PLRP-S

- 역류는 일반적으로 컬럼에 해를 끼치지 않으나 막힌 프리트를 제거하려고 시도할 때를 제외하고는 이를 피해야 합니다 ("컬럼 관리" 참조)
- 낮춰진 수준에서 유속을 시작하고 원하는 작동 유속까지 천천히 올려 과도한 압력 발생을 방지하세요
- 항상 고순도의 시약 및 크로마토그래피 등급 용매만을 사용해 이동상을 전처리하세요. 모든 이동상은 사용 전에 탈기 및 여과를 거치세요
- 인라인 필터를 사용해 컬럼을 보호하고 수명을 연장하세요
- PLRP-S 컬럼에서 100% 수용성 용리액 사용 시 컬럼 수명이 다소 줄어들고 피크 넓이 및 대칭성이 빠르게 열화될 수 있으니 이를 피하세요

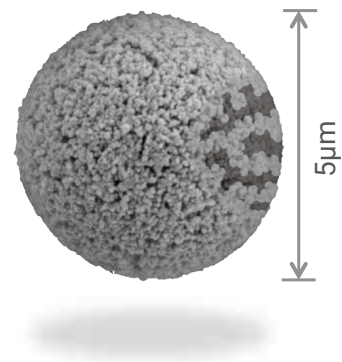


그림 6. PLRP-S(공극 크기 1000Å).

애질런트 AdvanceBio SEC 컬럼:

모노머, 이합체, 응집체 및 분해물 모니터링

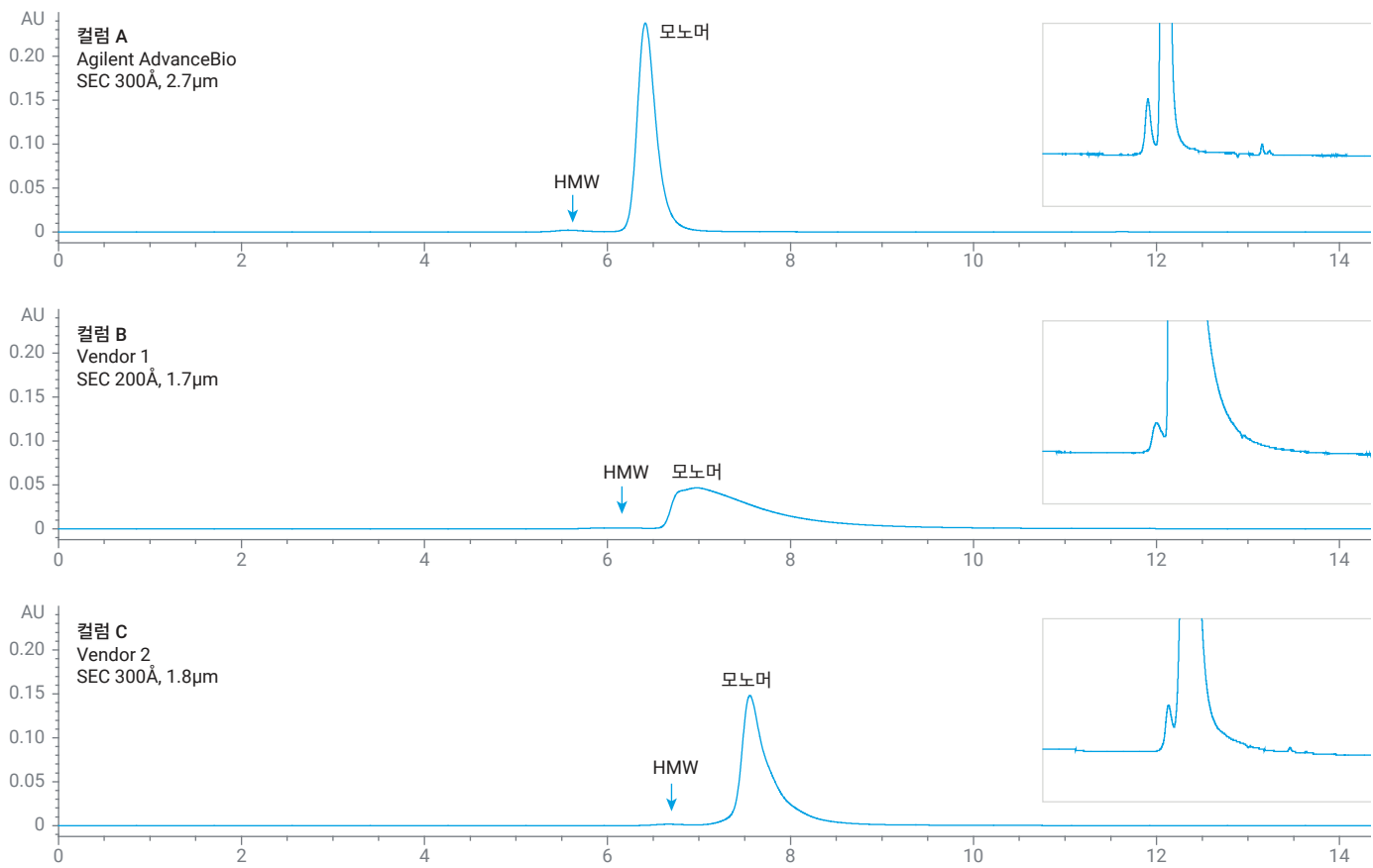


그림 7. Lys 결합 trastuzumab emtansine 분석을 위한 AdvanceBio SEC 300Å, 2.7µm. 컬럼 B는 피크 분리능 손실로 인해 나타나는 것과 같은 2차 상호작용의 증가를 보여줍니다. 컬럼 C는 피크 모양이 약간 더 좁지만, 분리능이 AdvanceBio 컬럼보다 떨어집니다. ([5994-3276EN](#))

크기 배제 크로마토그래피(SEC)

응집체 분석은 ADC 특성 규명의 또다른 주요 품질 속성입니다. 응집을 유도하고 보다 복잡한 불순물 프로파일을 만들 수 있는 항체에 부착된 세포독성 약물의 존재 때문에 이 분석은 복잡합니다. SEC는 효과적이지만, 응집체 및 조각 정량에는 여전히 어려움이 있습니다. ADC는 mAbs만 있을 때보다 소수성이 더 높은 경우가 많기 때문에 비특이적 상호작용에 더 민감합니다. 응집 상태에 영향을 미칠 수 있는 유기 변형제를 사용하지 않고 2차 상호작용을 최소화하는 불활성 친수성 결합 표면 케미스트리를 제공하는 고정상을 선택하는 것이 중요합니다.

원형 LC/MS 분석법을 사용하면 시스테인 결합 및 라이신 결합 ADC DAR을 결정할 수 있습니다. 애질런트는 비변성 LC/MS 조건에서 원형 시스테인 결합 DAR의 특성 규명을 위한 2D-LC/MS 분석법¹⁰을 개발했습니다. 워크플로는 애질런트 AdvanceBio HIC 컬럼, 애질런트 AdvanceBio SEC 컬럼 및 고감도 MS 분석법을 사용해 다양한 DARS의 모든 ADC에 대한 원형 질량을 정확하게 결정합니다. 이와 마찬가지로 애질런트는 애질런트 AdvanceBio SEC 200Å, 1.9µm 컬럼 및 Agilent Jet Stream 소스를 장착한 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템을 사용하는 원형 LC/MS 분석법¹¹을 개발했습니다. 이 분석법은 이동상에서 유기 용매 및 산의 간섭을 최소화하기 때문에 라이신 결합 ADC에 적합합니다.

- 컬럼이 길수록 분리능이 높아져 모노머에서 높은 순서대로 응집체를 분리하는 데 이상적입니다
- [AdvanceBio SEC 300Å, 2.7µm 컬럼](#)이 다양한 컬럼 길이 및 직경으로 제공되기 때문에 ADC 응집체 및 모노머를 빠르고 정확하게 정량할 수 있습니다([사용자 가이드](#))
- pH 7.4의 수용성 이동상은 시스테인 결합 ADC 및 라이신 결합 ADC⁶ 모두에 최고의 분리능을 제공합니다
- 염 농도가 더 높아져도 ADC의 피크 분리능이 개선되지 않습니다⁶

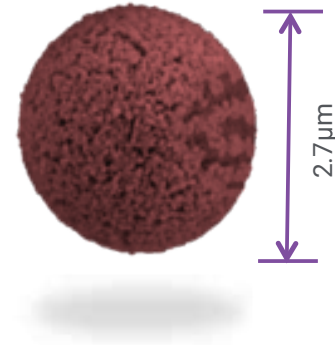


그림 8. AdvanceBio SEC(공극 크기 300Å).

용이한 선택 및 주문 정보

애질런트 온라인 스토어에서 다음 표에 나열된 제품을 주문하려면 MyList # 헤더 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하세요. 그런 다음 필요한 제품 수량을 기입하고 장바구니에 추가하면 결제를 진행할 수 있습니다. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다.

즐거찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있는 경우 바로 로그인할 수 있습니다. 등록된 애질런트 계정이 없는 경우 등록해 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다. 모든 품목은 영업 담당자 및 대리점 채널을 통해 주문할 수도 있습니다.

설명	부품 번호
시료 전처리 공급품 MyList	
Captiva disposable syringe, 5mL, 100/pk	9301-6476
Captiva Premium Syringe Filter, PES, 15mm, 0.2µm, 100/pk	5190-5096
표준물질 MyList	
Agilent-NISTmAb, 25µl	5191-5744
Agilent NISTmAb, 4 x 25µL	5191-5745
300Å AdvanceBio SEC calibration standard	5190-9417
AdvanceBio HIC 컬럼 MyList	
AdvanceBio HIC, 4.6 x 100mm, 3.5µm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 x 30mm, 3.5µm	681975-908
AdvanceBio PLRP-S 컬럼 MyList	
PLRP-S 1000Å, 1.0 x 50mm, 5µm	PL1312-1502
PLRP-S 1000Å, 2.1 x 50mm, 5µm	PL1912-1502
PLRP-S 1000Å, 4.6 x 50mm, 5µm	PL1512-1502
PLRP-S 1000Å 5µm, 2.1x50mm PEEK lined	PL1912-1502PK
PLRP-S 1000Å, 5µm. 2.1x100mm PEEK lined	PL1912-2502PK

설명	부품 번호
AdvanceBio SEC 컬럼 MyList	
AdvanceBio SEC 300Å, 4.6 x 150mm, 2.7µm, LC 컬럼	PL1580-3301
AdvanceBio SEC 300Å, 4.6 x 300mm, 2.7µm, LC 컬럼	PL1580-5301
AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 150mm, 2.7µm, LC 컬럼	PL1180-3301
AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 300mm, 2.7µm, LC 컬럼	PL1180-5301
AdvanceBio SEC 300Å, 4.6 x 50mm, 2.7µm, LC 가드 컬럼	PL1580-1301
AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 50mm, 2.7µm, LC 가드 컬럼	PL1180-1301
AdvanceBio SEC 200Å, 4.6 x 150mm, 1.9µm, LC 컬럼	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200Å, 4.6 x 30mm, 1.9µm, LC 가드 컬럼	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200Å, 4.6 x 300mm, 1.9µm, LC 컬럼	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200Å 1.9µm 2.1x150mm PEEK lined	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200Å 1.9µm 2.1x50mm PEEK lined	PL1980-1201PK
HPLC 공급품 MyList	
Ultra low dispersion kit, bio, 1290 Infinity II Bio 시스템과 함께 사용	5004-0007
Ultra-low dispersion kit, Agilent 1290 Infinity LC 시리즈용	5067-5189
용매 및 시약 MyList	
InfinityLab Ultrapure LC/MS acetonitrile, 1L	5191-4496
InfinityLab Ultrapure LC/MS standard, water, 1L	5191-4498
Formic Acid - 99.5% purity	G2453-85060

설명	부품 번호
컬럼 피팅 및 커넥터 MyList	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting (컬럼 주입구 연결용)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect Capillary MP35N 0.12 x 105mm(Quick Connect fitting용)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (컬럼 배출구 연결용)	5067-5966
Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 280mm (Quick Turn 피팅용)	5500-1596
Mounting tool for quick turn fittings	5043-0915
캐필러리 MP35N 0.17 x 100mm SL/SL ps/ps (SEC 가드 및 컬럼 연결용)	5500-1278
캐필러리 MP35N 0.12 x 90mm SL/SL ns/ns (PLRP-S 가드 및 컬럼 연결용)	5004-0018
용매 처리 공급품 MyList	
InfinityLab Stay Safe cap starter kit	5043-1222
InfinityLab solvent bottle, clear, 1L	9301-6524
InfinityLab solvent bottle, amber, 1L	9301-6526
Solvent bottle, clear, 2L	9301-6342
Solvent bottle, amber, 2L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe Purging Bottle, 1L	5043-1339
InfinityLab waste can, GL45, 6L with Stay Safe cap (Charcoal 필터 5043-1193 불포함)	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g (5043-1221과 함께 사용)	5043-1193
용매 여과 공급품 MyList	
InfinityLab Solvent filtration assembly	5191-6776
InfinityLab solvent filtration flask, glass, 2L	5191-6781
Filter membrane, Nylon 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4341
Filter membrane, Regenerated Cellulose 47mm, 공극 크기 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
MyList 시료 용기	
A-Line screw top vial, 2mL, amber, write-on spot, 100/pk	5190-9590
Screw cap, bonded blue, PTFE/silicone septa, 100/pk	5190-7021
Vial, screw top, clear, high recovery, 5mL, LC용, 30/pk	5188-5369
Septa, preslit PTFE/silicone, 16mm, 100/pk	5188-2758
Cap, screw, for 6mL vials, 100/pk	9301-1379
InfinityLab 96-well plate, 2.0mL, round wells, U shape, polypropylene, 45mm, 30/pk	5043-9302
InfinityLab 96-well plate, 2.2mL, square wells, U shape, polypropylene, 41mm, 30/pk	5043-9300

주의. ADC DAR 계산기 업그레이드(부품 번호 G4994AA)는 ADC에서 획득한 deconvoluted LC/MS 시료 데이터의 DAR 비율을 연구하도록 설계된 MassHunter DAR 계산기 소프트웨어에 사용할 수 있습니다. 현지 애질런트 담당자에게 주문 정보를 문의하세요.

참고 문헌

1. 항체 약물 결합체(ADC)의 약물 대 항체 비율(DAR) 분석을 위한 AdvanceBio HIC 컬럼
[5994-0149EN](#)
2. CQA 특성 규명 과정을 완성하는 기술 트리오: 당화, 응집 및 DAR
[5994-2097EN](#)
3. 높은 염 — 높은 재현성
[5994-2691EN](#)
4. mAbs 및 ADC의 LC/MS 분리를 위한 PLRP-S 폴리머 역상 컬럼
[5991-7163KO](#)
5. UHPLC/Q-TOF를 사용하여 항체-약물 결합체(ADC)에 대한 약물 대 항체 비율(DAR) 측정
[5991-6559KO](#)
6. ADC 응집체 및 조각 분석을 위한 SEC 컬럼의 평가
[5994-3276EN](#)
7. 크기 배제 크로마토그래피 및 질량분석을 이용한 항체-약물 결합체 분석
[5991-6439KO](#)
8. 단일 클론 항체 분석
[5991-6376KO](#)
9. Jakob W. Buecheler, Matthias Winzer, Jason Tonillo, Christian Weber 및 Henning Gieseler Molecular Pharmaceutics 2018 15 (7), 2656-2664 DOI: [10.1021/acs.molpharmaceut.8b00177](#)
10. 2D-LC 및 비변성 MS를 이용한 항체 약물 결합체 특성 규명
[5994-4328KO](#)
11. 표준 유속 LC/MS를 사용한 거대 분자의 고감도 비변성 질량 분석
[5994-1739EN](#)

Agilent CrossLab 서비스

CrossLab은 생산성 및 운영 효율성 향상과 같은 워크플로의 성공과 중요한 성과를 지원하기 위해 서비스와 소모품을 통합한 애질런트의 기능입니다. 애질런트는 CrossLab으로 귀하의 목표 달성을 지원하기 위해 모든 작업에 대한 가치있는 정보를 제공하려 노력합니다. CrossLab은 분석법 최적화, 유연한 서비스 계획 및 모든 기술 수준의 교육을 제공합니다. 애질런트는 최고의 성능을 위한 귀하의 기기 및 실험실 관리를 지원하는 다른 많은 제품과 서비스를 갖추고 있습니다.

www.agilent.com/crosslab에서 Agilent CrossLab에 대해 더 자세히 알아보고, 실제 우수한 성과를 거둔 사례를 살펴보세요.

추가 정보:

www.agilent.com/chem/advancebio

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고 리소스에 액세스하세요.

community.agilent.com

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

www.agilent.com/chem/ordering-guides

DE73791623

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 11월 17일, 한국에서 인쇄
5994-5089KO

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