

기본 SEC-MS를 사용하여 단일 클론 항체(mAb) 및 mAb 유래 치료제 분석



응집체의 정량화는 효능 및 면역원성에 대한 잠재적인 영향을 감안할 때 단백질 기반 요법의 경우에 특히 중요합니다. UV 검출과 결합된 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 치료용 단백질의 응집을 측정하기 위한 표준 접근 방식입니다. 그러나 연구자들은 정확한 질량 측정값을 얻기 위해 SEC를 고분해능 MS 기술인 비변성 질량 분석(Native-MS)과 통합하려는 추세로 가고 있습니다.¹ 일부 실험적 목표의 경우에 MS가 UV보다 더 적합한 검출기입니다. 분자량 확인 외에도 기본 MS 검출은 항체-약물 접합체(ADC)의 약물 대 항체 비율(DAR)을 측정하고 번역 후 변형(PTM)에 대한 정보를 제공합니다.

역상 분리는 일반적으로 MS와 쌍을 이루지만 mAb를 분석할 때는 제한이 있습니다. 역상 크로마토그래피에 사용되는 낮은 pH 및 유기 용매는 mAb를 변성시키고 cysteine 또는 lysine 결합 ADC에서 발견되는 것과 같은 취약한 비공유 또는 산 불안정 구조를 분해합니다. SEC는 역상 기술과 비교해 고유한 이점을 제공합니다. 이 기술은 중성 pH에서 완충된 이동상으로 수행되기 때문에 intact 단백질 구조와 깨지기 쉬운 공유 또는 비공유 결합을 보존하고 기본 상태에서 mAb의 질량 측정을 가능하게 합니다. SEC는 특히 취약한 cysteine 결합 ADC 구조까지 보존하여 MS 데이터로부터 DAR을 계산할 수 있게 해줍니다.^{2,3}

SEC-MS와 관련된 과제는 다음과 같습니다.

- 고분자량(HMW) 및 저분자량(LMW) 불순물로부터 mAb 단량체의 고분해능 SEC 분리를 달성합니다
- 다음에 중점을 두고 MS 검출과 호환되는 SEC 컬럼 및 조건을 확인합니다
 - 고정상 표면 결합이 안정적이고 컬럼 블리드를 일으키지 않습니다
 - MS에서 분석물의 효율적인 탈용매화를 지원하는 유속에서 시료가 응집되지 않습니다
 - 이동상은 휘발성이 충분하고 염 농도가 낮아 질량을 정확하게 감지할 수 있습니다

SEC-MS 분석에 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용하는 이유는?

- 입자 크기와 공극 특성은 피크 모양, 피크 감도 및 분해능을 향상시키는 중요한 요소입니다. 1.9µm 입자 AdvanceBio SEC 컬럼은 고분해능 분리에 최적화된 공극 크기와 부피를 가지고 있습니다
- SEC 레진 표면과의 2차 상호작용으로 인해 공극을 자유롭게 통과하지 못하고 크기 기반 분리가 방해받을 수 있습니다. 고유한 독자 기술력의 친수성 결합 케미스트리가 ADC 및 mAb와의 2차 소수성 상호작용을 최소화하는 불활성 표면을 제공합니다
- AdvanceBio SEC 하이브리드 입자에 불리당되지 않는 동급 최고의 기계적 견고성을 제공하는 실리카 및 폴리머 기술이 최고의 특성으로 통합되어 있으며, MS 검출기와 함께 사용하기에 이상적입니다
- AdvanceBio 1.9µm SEC 컬럼은 변성 이동상 조건(예: 아세토니트릴/물/TFA)과 MS 호환 기본 조건(예: 80mM 암모늄 아세테이트) 모두에서 효과적이어서 intact 단백질 (>2,000m/z)에 이상적입니다
- 좁은 2.1 및 4.6mm 내경 컬럼은 분석물의 효율적인 탈용매화/이온화에 필요한 낮은 유속에 잘 맞습니다. 이는 정확한 질량 측정을 방해하는 부가물 형성을 최소화하기 위해 필요합니다
- PEEK 라인의 SS 컬럼 하드웨어는 시료 흐름 경로에서 금속을 제거합니다. 그 결과, 정확한 질량 측정을 방해하는 부가물의 형성을 감소시키는 저농축 이동상 완충액을 사용하기가 더 쉽습니다

컬럼 선택 기준

SEC 실험에 적합한 공극 크기는 관심 분석물의 크기와 실험의 목표에 따라 결정됩니다. 공극 크기 선택은 단백질의 분자량을 기반으로 하며, 분자량이 큰 단백질에 더 큰 공극 크기가 필요합니다(그림 1 참조). AdvanceBio SEC 1.9µm 컬럼은 두 가지 공극 크기로 제공됩니다. 저분자 또는 완충액 성분에서 단백질을 분리하는 것이 목표인 탈염 실험을 수행할 때는 작은 공극 크기에서 분리가 최대화됩니다. 이 경우 단백질 분자량이 컬럼의 크기 상한보다 큰 컬럼을 선택하여 단백질을 배제하는 것이 유리합니다.

SEC-MS 실험 목표를 달성하는 데 도움이 되고 시료 제약 조건과 잘 맞는 치수의 SEC 컬럼을 선택하세요.

- 30 또는 50mm 길이의 짧은 컬럼은 간단한 탈염 실험에 충분할 수 있습니다¹
- 긴 컬럼은 더 높은 분해능을 제공하여 단량체에서 이량체를 분리하거나 단량체를 조각에서 분리할 수 있습니다
- 좁은 컬럼 직경에는 더 적은 주입량이 필요하며 이용할 수 있는 시료량이 제한적일 때 유용합니다
- 또한 좁은 컬럼에는 최적의 SEC 분리를 위해 더 낮은 유량이 필요하며 최적의 유속 및 MS 이온화원 조건과 더 잘 호환되어 기본 MS의 탈용매화와 이온화가 효율적으로 이루어집니다
- PEEK 라인의 컬럼은 금속 표면과 시료 접촉을 최소화하여 2차 상호작용을 최소화함으로써 피크 모양을 개선하고 상대적으로 희석된 휘발성 이동상을 사용할 수 있습니다²

Agilent AdvanceBio SEC 컬럼 시작하기: 최상의 성능과 분리를 위한 팁

컬럼 작동 및 세척

- 유속과 컬럼 내경 적절히 맞추기⁴ - 내경이 작은 컬럼에는 최적의 SEC 분리를 위한 유속이 더 낮아 컬럼에 과도한 압력을 인가할 필요가 없습니다. 좁은 2.1 및 4.6mm 내경 컬럼은 시료의 효율적인 탈용매화/이온화가 필요한 기본 MS에 이상적입니다
 - 작동 유속⁵:
 - 4.6 × 150mm, 0.1 ~ 0.7mL/분
 - 4.6 × 300mm, 0.1 ~ 0.5mL/분
 - 2.1mm 내경 컬럼, 0.05 ~ 0.10mL/분
- 유량 램프 속도를 기본값에서 1mL/분² 이하로 낮춥니다. 유속이 점진적으로 증가하면 컬럼 수명이 연장됩니다. 애질런트 소프트웨어에서 이 설정은 LC 펌프 제어의 고급 섹션에서 찾을 수 있습니다
- 컬럼의 최대 압력 한계와 일치하도록 LC 분석법의 최대 압력 한계를 설정합니다(AdvanceBio SEC 1.9µm 컬럼의 경우 620bar). 이는 LC에서 가능한 최대 압력이 컬럼의 가능한 최대 압력을 초과하는 모든 경우에 중요합니다
- 컬럼을 백플러시하지 마십시오. 항상 화살표 방향으로 컬럼을 세척하고 압력을 400bar 미만으로 유지하도록 유속을 조정합니다

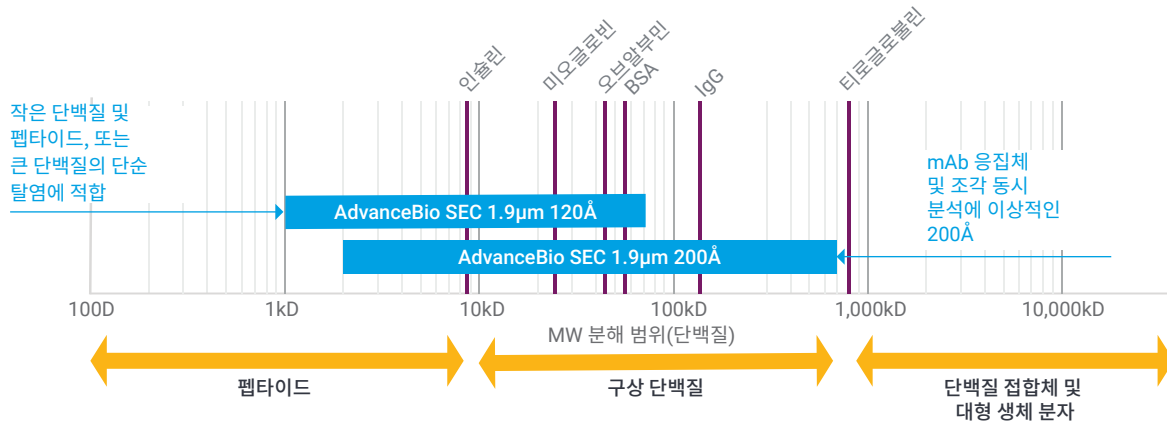


그림 1. 분석물의 크기에 따라 사용할 SEC의 공극 크기가 결정됩니다. 큰 단백질에는 더 큰 공극이 필요합니다.

- 최소 20 컬럼 부피의 세척 용액으로 세척하기 전, 후에 최소 5 컬럼 부피의 초순수로 행급니다
- 적절한 SEC 표준을 이용해 정기적으로 시스템 성능을 확인합니다

크로마토그래피 최적화

- 시료를 필터링하여 모든 미립자를 제거합니다
- 특히 복잡하거나 "더러운" 시료로 작업할 때는 가드 컬럼 및/또는 인라인 필터를 사용하여 컬럼 수명을 연장합니다
- 컬럼이 단단히 연결되었고 누출이 없는지 확인합니다
- 시스템 데드 볼륨을 최소화하여 서브 2µm SEC 입자의 분해능을 최대화합니다. **초저분산 키트**를 1290 모델 LC에 설치하여 시스템 볼륨을 추가로 줄이고 대역 확장을 방지할 수 있습니다⁶
- 시료 주입량을 최소화하여 크로마토그래피 분해능을 최대화합니다. 1~5µL의 시료 주입량이 권장되며, 최대 주입량은 컬럼 부피의 1%가 적당합니다

MS 관리 및 최적화

- 특히 MS 소스를 더 깨끗하게 유지하기 위해 높은 염이 용리될 수 있는 총 투과 지점 주변에서 관심 대상인 머무름 시간을 벗어나 LC 스트림을 폐기물로 전환합니다
- HPLC 등급 이상의 용매를 사용합니다

- 암모늄 아세테이트와 같은 휘발성 완충액을 사용하고 크로마토그래피 분해능을 유지하고 단백질 구조를 보존하는 최저 완충액 농도로 SEC 이동상을 최적화합니다. 그러면 MS 소스가 더 깨끗하게 유지되고 질량 측정을 방해하는 부가물을 최소화할 수 있습니다
- 가능하면 매일 보풀 없는 천으로 MS 소스를 닦습니다. 소스가 만질 수 없을 정도로 뜨겁지 않은지 확인하세요!

컬럼 보관

- 단기 보관(2주 이내) - 분석에 사용되는 이동상에 컬럼을 보관합니다
- 장기 보관(2주 이상) - 컬럼을 pH ≤ 7.0, 0.02% NaN₃ 또는 20% 메탄올이 포함되거나 포함되지 않은 여과된 100mM 인산나트륨에 보관합니다. 최소 10 컬럼 부피로 컬럼을 세척합니다. 메탄올 또는 에탄올을 도입하기 전에 항상 물로 세척하는 것이 좋습니다. 20% 메탄올로, 또는 20% 메탄올에서 전환하는 경우 높은 점도로 인해 컬럼에 과도한 압력이 가해지지 않도록 낮은 유속으로 세척을 수행해야 합니다. 낮은 유속으로 시작하고 4.6mm 컬럼의 경우 0.1mL/분 이하, 2.1mm 컬럼의 경우 0.05mL/분 이하로 세척합니다. 압력을 400bar 미만으로 유지하세요. 컬럼을 실온에서 보관하세요

참고 문헌

1. Sensitive Native Mass Spectrometry of Macromolecules using Standard Flow LC/MS (agilent.com) - [5994-1739EN](#)
2. Agilent AdvanceBio SEC 120Å 1.9µm PEEK-lined 컬럼을 사용한 항체-약물 결합체 분석 - [5994-3045KO](#)
3. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q TOF - [5994-2155EN](#)
4. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 µm Column User Guide - [5994-0739EN](#)
5. Analysis of Nanobodies Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm and AdvanceBio HIC Columns - [5994-1869EN](#)
6. Elevate Your mAb Aggregate Analysis - [5994-2709EN](#)

간편한 선택 및 주문 정보

애질런트 온라인 스토어에서 다음 표에 나열된 품목을 주문하려면 헤더의 MyList 링크를 클릭하여 "내 즐겨찾기" 목록에 항목을 추가하세요. 그 후 필요한 제품의 수량을 기입하고 장바구니에 추가한 후 결제를 진행하십시오. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록이 "내 즐겨찾기"에 저장됩니다.

내 즐겨찾기를 처음 이용하는 경우라면 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 개별 부품 번호를 클릭하거나 일반 판매 및 유통업체 채널을 통해 온라인으로 주문할 수도 있습니다.

설명	부품 번호
MyList 시료 전처리	
Captiva Disposable syringe, 5mL, 100/pk	9301-6476
Captiva Premium Syringe Filter, PES, 15mm, 0.2µm, 100/pk	5190-5096
MyList 표준물질	
Agilent NIST mAb, 25µL	5191-5744
Agilent NISTmAb, 4 x 25µL	5191-5745
300Å AdvanceBio SEC calibration standard	5190-9417
MyList AdvanceBio SEC 컬럼	
120Å 컬럼	
AdvanceBio SEC 120Å, 1.9µm, 2.1 x 150mm, PEEK-lined stainless-steel hardware (recommended)	PL1980-3250PK
AdvanceBio SEC 120Å, 1.9µm, 2.1 x 50mm, guard, PEEK-lined stainless-steel hardware (recommended)	PL1980-1250PK
AdvanceBio SEC 120Å, 1.9µm, 4.6 x 300mm	PL1580-5250
AdvanceBio SEC 120Å, 1.9µm, 4.6 x 150mm	PL1580-3250
AdvanceBio SEC 120Å, 1.9µm guard, 4.6 x 30mm	PL1580-1250
200Å 컬럼	
AdvanceBio SEC 200Å, 1.9µm guard, 2.1 x 50mm, PEEK-lined SS (recommended)	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC 200Å, 1.9µm, 2.1 x 150mm, PEEK-lined SS (recommended)	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200Å, 1.9µm guard, 4.6 x 30mm	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200Å, 1.9µm, 4.6 x 300mm	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200Å, 1.9µm, 4.6 x 150mm	PL1580-3201
MyList 컬럼 피팅 및 커넥터	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting (for connection on column inlet)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect Capillary MP35N 0.12 x 105 mm (for Quick Connect fitting)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (for connection on column outlet)	5067-5966
Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 280mm (for Quick Turn fitting)	5500-1596
Mounting tool for QuickTurn fittings	5043-0915

설명	부품 번호
Capillary MP35N 0.17 x 100mm SL/SL ps/ps (for connecting guard and column)	5500-1278
MyList 초저분산 키트	
Ultra-low dispersion tubing kit for Agilent 1290 Infinity II LC	5067-5963
Ultra-low dispersion tubing kit for Agilent 1290 Infinity II Bio*	5004-0007
MyList 시료 용기	
A-line screw top vial, 2mL, 12 x 32mm(12mm cap) amber, write-on spot, 100/pk	5190-9590
Screw cap, 12mm, bonded, blue, PTFE/white silicone septa, 100/pk	5190-7021
Vial insert, 250µL, 5.6 x 30mm, deactivated glass with polymer feet, 100/pk	5181-8872
InfinityLab Well-plate 96/0.5mL, 30/pk	5043-9310
InfinityLab microplateWell-plate closing mat, 50/pk	5042-1389
MyList 용매 및 첨가제	
InfinityLab Ultrapure LC/MS Water, 1L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS MeOH, 1L (for column storage)	5191-4497
Formic acid, 5mL	G2453-85060
MyList 용매 여과 공급품‡	
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, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
MyList 용매 처리 공급품	
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 filter 5043-1193 not included)	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g (use with 5043-1221)	5043-1193

* 1290 Infinity II Bio 시스템에 권장.

‡ 이 표에 나열된 용매가 아닌 다른 용매를 사용할 경우, 분석 전에 InfinityLab 용매 여과 어셈블리를 사용하십시오.

DE44462.6107060185

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 10월 12일, 한국에서 인쇄
5994-4200KO

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

 **Agilent**
Trusted Answers