

크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용한 단일 클론 항체(mAb) 조각 및 이합체 분석



저분자량(LMW) 조각과 고분자량(HMW) 이합체 및 응집체는 신약 개발, 보관, 수송 또는 배송 중에 바이오 의약품 단백질로부터 형성될 수 있습니다. 이러한 크기 변형체는 면역원성 반응과 약동학 또는 약력학의 차이를 방지하기 위해 특성을 제대로 규명해야 하는 주요 품질 속성(CQA)입니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용한 크기 기반 분리는 크기 변형체를 분석하고 단일 클론 항체(mAb)와 같은 바이오 의약품의 순도 수준을 모니터링하는 데 사용되는 표준 기술입니다. SEC는 전적으로 컬럼 고정상의 공극을 통한 단백질의 투과성에 기반하며 상과의 상호작용에 의한 것이 아닙니다. 따라서 구형 단백질 및 펩타이드는 더 큰 단백질과 응집체가 먼저 용리된 다음 조각 및 작은 펩타이드가 동적 반경(크기)에 기반하여 분리됩니다.

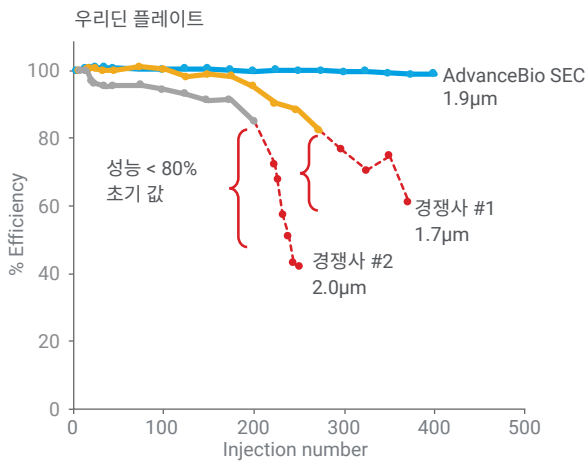
mAb 조각 및 응집체 분리 및 분리능에 영향을 미치는 주요 요인

입자 크기 및 공극 특성은 피크 모양, 피크 감도, 분리능을 향상시키는 중요한 요인입니다. 인접한 크기의 응집체 또는 조각을 효과적으로 분리하려면 올바른 공극 크기가 필요합니다. 공극이 클수록 공극 내부의 생체분자가 보다 효율적으로 투과하고 화합물 간의 용리 시간 내에 더 잘 확산됩니다. 반면, 공극 부피는 충전재의 강도를 감소시켜 더 깨지기 쉽게 만듭니다. SEC 컬럼으로 원하는 분리를 달성하기 위해서는 분리능과 기계적 강도 사이의 적절한 균형을 찾는 것이 중요합니다.

SEC 레진 표면과의 **2차 상호작용**은 공극을 통한 자유로운 투과를 막고 크기 기반 분리를 방해할 수 있습니다. SEC 컬럼을 선택할 때는 2차 상호작용을 최소화하는 입자가 필수적입니다.

왜 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9µm 컬럼을 mAb 조각 및 응집체 분리에 사용할까요?

- 특허 받은 AdvanceBio 1.9µm 단분산 실리카 입자는 동급 최고의 기계적 견고성을 위해 설계되었습니다. 따라서 뛰어난 컬럼 수명의 UHPLC 및 HPLC 기기에 모두 적합합니다¹
- 1.9µm 입자 AdvanceBio SEC 컬럼은 단일 컬럼을 이용한 저분자량 단백질 조각과 mAb 응집체 및 이합체의 고분리능 고속 분리에 이상적인 공극 특성을 가지고 있습니다²
- 특허 받은 고유한 친수성 결합 화학이 ADC 및 mAb와의 2차 소수성 상호작용을 최소화하는 비활성 표면을 제공합니다



컬럼: 4.6 x 300mm
이동상: 150mM 인산나트륨, pH 7.0
유속: 0.35mL/분
온도: 실온
검출기: 220nm
시료: Bio-Rad 단백질 혼합물 및 우리딘(50회 주입마다 유속 정지)

그림 1. AdvanceBio SEC 200 Å 1.9µm 컬럼은 400회 주입 시 플레이트 수가 2% 미만으로 감소하여 기계적 안정성이 우수함을 확인하였습니다.

권장 시작 조건³

파라미터	값
컬럼	AdvanceBio SEC 200 Å 4.6 x 300mm, 1.9µm (부품 번호: PL1580-5201)
기기	Agilent 1260 Infinity II Bio-inert LC 시스템
유속	0.35mL/분
이동상	150mM 인산나트륨, pH 7.0
파장	280nm
컬럼 온도	25°C
시료	스트레스를 가한 mAb (1µg, 컬럼에 주입). mAb 시료는 100mM의 pH 9.0인 탄산수소나트륨에서 스트레스를 가하고 하룻밤 동안 40°C에서 배양됨

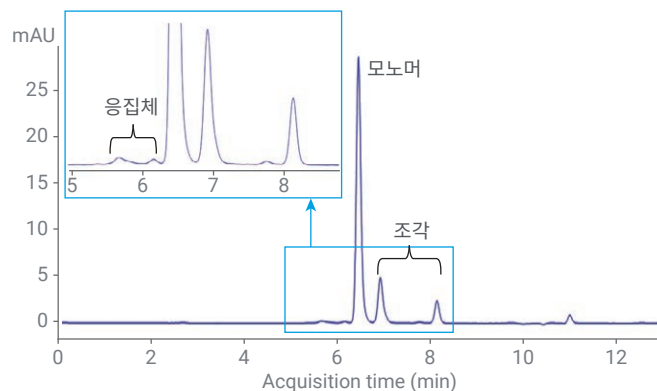


그림 2. 권장되는 시작 조건에서 AdvanceBio SEC 200 Å 4.6 x 300mm, 1.9µm 컬럼의 스트레스를 가한 mAb 시료에서의 응집체 및 조각 분리.

크로마토그래피 조건 최적화 방법

초기 크로마토그램을 확인한 후 분리를 개선하거나 단백질 용해도를 유지하기 위해 다음을 조정하는 것을 고려할 수 있습니다.

이동상의 이온 강도 - 염 추가가 필요한 프로토콜의 경우 일반적으로 다음과 같은 완충액이 사용됩니다.

- 100~150mM 염화나트륨이 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.0)
- 100~150mM 황산나트륨이 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.0)
- 50~100mM 요소(urea)가 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.0). 기타 유사한 염(예: KCl) 및 염산 구아니딘(guanidine hydrochloride)을 사용할 수 있습니다

pH - ± 0.2 단위로 조정. AdvanceBio SEC 컬럼의 안정성 범위는 pH 2.0~8.5입니다.

온도 - SEC 분리는 일반적으로 10~30°C 사이에서 실행됩니다. 소수성 펩타이드의 분리능과 회수율을 개선하려면 더 높은 온도가 필요할 수 있습니다. 온도에 민감한 단백질의 생물학적 활성을 최대로 유지하기 위해 냉장실에서 SEC 분리를 실행해야 할 수 있습니다. 낮은 온도에서 분리를 실행할 경우, 압력을 모니터링하여 과도한 압력을 방지하고 필요에 따라 유속을 조정합니다.

Agilent AdvanceBio SEC 컬럼의 최대 작동 온도는 80°C입니다.

주의: 고온은 단백질을 변성시킬 수 있습니다.

유기 용매 첨가물

- 50mM 인산나트륨(pH 7.0)에서 5~10% EtOH(MeOH 또는 CH₃CN과 같은 기타 유사한 용매)는 높은 소수성의 단백질에 유용할 수 있습니다
- 높은 함량의 시스테인 잔기를 포함하고 산화/응집되기 쉬운 단백질에 대해 5% DMSO가 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.0)을 첨가할 수 있습니다

주의: 점도가 높은 이동상을 사용할 경우, 최대 작동 압력 이하로 유지하기 위해 유속을 낮출 필요가 있을 수 있습니다.

참고 문헌

1. Fast Separations for Aggregates and Fragments with AdvanceBio SEC columns - [5994-0873EN](#)
2. Size Exclusion Chromatography Analysis of a Monoclonal Antibody and Antibody Drug Conjugate - [5994-0827EN](#)
3. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 µm Column user guide - [5994-0739EN](#)
4. Elevate Your mAb Aggregate Analysis - [5994-2709EN](#)
5. Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9µm PEEK-lined 컬럼을 사용한 항체 조각-약물 접합체 분석 - [5994-3045KO](#)
6. 바이오 치료제(Biotherapeutics) 속 응집체의 고속 고분리능 크기 배제 크로마토그래피(SEC)- [5991-6458KO](#)

Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 컬럼 시작하기: 최적의 성능 및 분리를 위한 팁

시료에 대한 고려사항

- 시료를 여과하여 입자 물질을 제거합니다
- 특히 복잡하거나 "더러운" 시료 작업 시 가드 컬럼 및/또는 인라인 필터를 사용하여 컬럼 수명을 연장합니다
- 컬럼 연결이 단단히 고정되고 누출이 없는지 확인합니다
- 시스템 dead volume을 최소화하여 2µm 미만의 SEC 입자의 분리능을 최대화합니다. [Ultralow Dispersion Kit](#)를 1290 모델 LC에 설치하여 시스템 부피를 더욱 줄이고 락스/거품을 방지할 수 있습니다⁴
- 가능한 가장 작은 주입 부피를 통해 분리능을 최대화합니다. 시료 주입 부피는 1~5µL이며 최대 주입 부피는 컬럼 부피의 1%가 권장됩니다

컬럼 선택 요인

다음과 같은 조건을 사용하여 시료에 적합한 컬럼을 선택합니다.

- 컬럼이 길수록 분리능이 높아져 모노머를 이합체로부터 분리 또는 모노머를 조각으로부터 분리하는 데 이상적입니다
- 더 좁은 컬럼 직경:
 - 더 적은 주입 부피를 필요로 하므로 시료 가용성이 제한될 경우 이상적입니다
 - 더 낮은 유속을 필요로 하여 네이티브 MS에서 효율적인 탈용매화/이온화에 이상적입니다³
- PEEK-lined 컬럼은 금속 표면과 시료의 2차 상호작용을 최소화하여 피크 모양을 개선할 수 있으며, 휘발성 이동상 완충액을 사용할 경우 이상적입니다⁵
- 고차원의 응집체 분석에 초점을 맞출 경우, [AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7µm](#) 컬럼은 동일한 신뢰할 수 있는 성능의 mAb 응집체, 이합체, 모노머를 빠르고 정확하게 정량합니다⁶

컬럼 작동 및 세척

- 유속을 컬럼 id³에 맞춰 조정합니다. 작은 id 컬럼은 컬럼에 과한 압력을 가하지 않도록 최적의 SEC 분리를 위해 더 낮은 유속을 필요로 합니다. 2.1mm 및 4.6mm id 컬럼은 시료의 효율적인 탈용매화/이온화를 필요로 하는 네이티브 MS에 이상적입니다
 - 분석 유속³:
 - 4.6 × 150mm, 0.1~0.7mL/분.
 - 4.6 × 300mm, 0.1~0.5mL/분.
 - 2.1mm id 컬럼, 0.05~0.10mL/분.
- 유속 램핑 속도를 기본값에서 1mL/분² 이하로 낮춥니다. 유속의 점진적인 증가는 컬럼 수명을 연장합니다. 애질런트 소프트웨어에서 이러한 설정은 LC 펌프 제어의 고급 섹션에서 확인할 수 있습니다
- LC 분석법의 최대 압력 한계를 컬럼과 일치하도록 설정합니다 (AdvanceBio SEC 1.9µm 컬럼의 경우 620bar). 이는 LC의 최대 압력 기능이 컬럼의 압력을 초과하는 모든 경우에 있어 중요합니다
- 컬럼을 백플러시하지 마십시오. 항상 컬럼을 화살표 방향으로 플러싱하고 유속을 조정하여 압력을 400bar 이하로 유지합니다
- 최소 20배 컬럼 부피의 세척액을 사용하여 플러싱하기 전후에 최소 5배 컬럼 부피의 초순수로 헹굽니다
- 적절한 SEC 표준물질을 사용하여 정기적으로 시스템 성능을 확인합니다

컬럼 보관

- 단기 저장(2주 미만) - 분석에 사용되는 이동상에 컬럼을 보관합니다
- 보관 기간 연장(2주 이상) - 여과된 100mM 인산나트륨(pH ≤ 7.0)에 0.02% NaN₃ 을 포함하거나 포함하지 않고 또는 20% 메탄올을 포함한 물에 보관합니다. 최소 10배의 컬럼 부피로 컬럼을 플러싱합니다. 메탄올 또는 에탄올을 주입하기 전에 항상 물로 플러싱할 것을 권장합니다. 20% 메탄올로 전환하거나 20% 메탄올로부터 전환할 경우, 높은 점도로 인해 컬럼에 과한 압력이 가해지지 않도록 낮은 유속으로 컬럼을 플러싱해야 합니다. 낮은 유속으로 시작하여, 4.6mm 컬럼의 경우 0.1mL/분 이하로, 2.1mm 컬럼의 경우 0.05mL/분 이하로 플러싱합니다. 압력은 400bar 이하로 유지합니다. 컬럼은 실온 환경에서 보관합니다

간편한 선택 및 주문 정보

다음 표의 품목을 애질런트 온라인 스토어에서 주문하려면 헤더의 MyList 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하십시오. 그 후 필요한 제품의 수량을 기입하고 장바구니에 추가한 후 결제를 진행하세요. 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 주시기 바랍니다. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다. 모든 품목은 각각의 부품 번호를 클릭하거나 영업 담당자 및 대리점 채널을 통해 온라인으로 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, 4 x 25µL	5191-5745
300 Å AdvanceBio SEC calibration standard	5190-9417
AdvanceBio SEC 컬럼 MyList	
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9µm guard, 4.6 x 30mm (recommended)	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9µm, 4.6 x 300mm (recommended)	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9µm, 4.6 x 150mm	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9µm guard, 2.1 x 50mm, PEEK-lined SS	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9µm, 2.1 x 150mm, PEEK-lined SS	PL1980-3201PK
컬럼 피팅 및 커넥터 MyList	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting (for connection on column inlet)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect Capillary MP35N 0.12 x 105mm (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 quick turn fittings	5043-0915
Capillary MP35N 0.17 x 100mm SL/SL ps/ps (for connecting guard and column)	5500-1278

설명	부품 번호
Ultra-Low Dispersion 키트 MyList*	
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
시료 용기 공급품 MyList	
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 Well-plate closing mat, 50/pk	5042-1389
용매 및 첨가제 MyList	
InfinityLab Ultrapure LC/MS Water, 1L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS MeOH, 1L (for column storage)	5191-4497
Formic acid, 5mL	G2453-85060
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, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
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 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 대한 권장 사항

† 표에 나열된 용매가 아닌 다른 용매를 사용하실 경우, 분석 전 InfinityLab 용매 여과 어셈블리를 사용하세요

응집체 및 조각 분석을 위한 추가 SEC 컬럼 솔루션은 다음 사이트를 참조하세요.

www.agilent.com/chem/aggregates

DE44462.411099537

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 10월 11일, 한국에서 인쇄
5994-3947KO

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