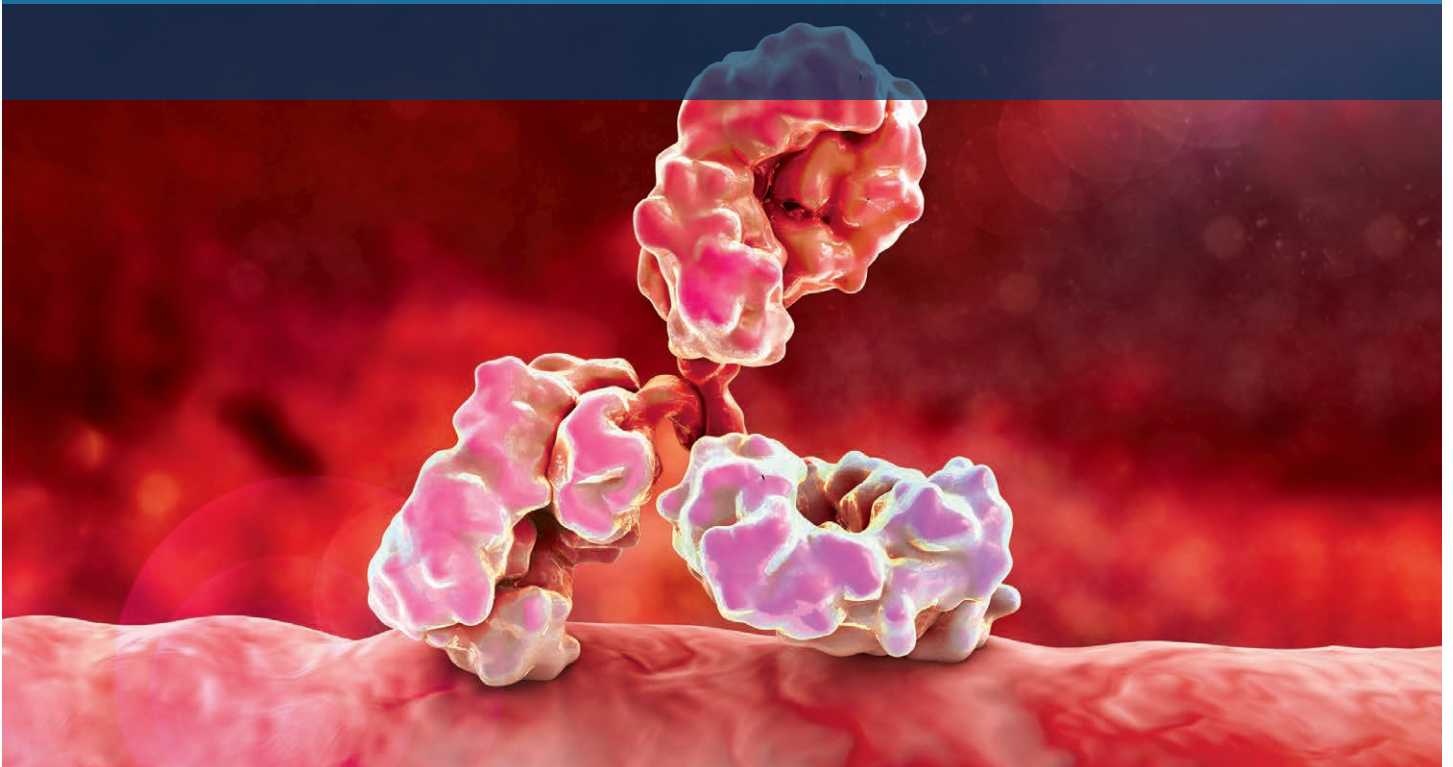


Agilent InfinityLab Bio LC 솔루션

고성능 바이오제약 분석

응용 개요서





바이오제약의 분석 난제 극복

바이오제약 분석의 복잡성이 증가함에 따라 바이오의약품 워크플로 전반에 걸쳐 우수성을 제공할 수 있는 혁신이 요구되고 있습니다. Agilent InfinityLab Bio LC 솔루션은 완벽한 생체 적합성 및 생체 불활성 특성을 갖춘 LC 시스템으로 구성되어, 의약품 발견 및 개발부터 QA/QC에 이르기까지 견고하고 정확한 바이오 분석을 지원합니다. 이러한 시스템을 바이오 컬럼과 MS 검출, 소프트웨어 및 서비스와 결합하면 바이오제약의 난제를 해결하는 완벽한 솔루션을 구성할 수 있습니다.

이 응용 개요서에는 바이오 분석을 위한 InfinityLab Bio LC 솔루션의 뛰어난 성능과 다목적성을 보여주는 다수의 최신 응용자료가 수록되어 있습니다.

BIO



목차

1	단일 클론 항체(mAb)	8
1.1	mAb 전하 변이체 분석 개선	8
	- 이온 교환 크로마토그래피	
	- Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성)	
	- Agilent Bio MAb, NP5, 2.1 × 250mm, 5μm, PEEK	
1.2	향상된 mAb 응집체 분석	16
	- 크기 배제 크로마토그래피	
	- Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성)	
	- Agilent AdvanceBio SEC, 200Å, 4.6 × 300mm, 1.9μm	
1.3	제품 관련 mAb 조각 모니터링	24
	- 역상 크로마토그래피	
	- Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성)	
	- Agilent PLRP-S, 1,000Å, 2.1 × 100mm, 5μm, PEEK-lined	
1.4	양이온 교환 분석의 편리한 사용자 맞춤화	30
	- 이온 교환 크로마토그래피	
	- Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC	
	- Agilent Bio MAb, NP5, 2.1 × 250mm, 5μm, PEEK	
1.5	4D-LC/MS를 사용한 단일 클론 항체 전하 변이체의 완전 자동 특성 규명	38
	- 이온 교환 크로마토그래피;	
	역상 크로마토그래피	
	- Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 시스템,	
	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 구성	
	- Agilent Bio MAb, NP5, 2.1mm × 250mm, 5μm, PEEK;	
	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 150mm, 2.7μm	
1.6	2-In-1 바이오 프로세스 분석	50
	- 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피;	
	친화성 크로마토그래피	
	- Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC	
	- Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100mm, 2.7μm;	
	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2mm	
2	펩타이드	58
2.1	Agilent 1290 Infinity II Bio LC로의 원활한 분석법 이전	58
	- 역상 크로마토그래피	
	- Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성)	
	- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8μm;	
	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guards, 2.1 × 5mm, 1.8μm	

2.2 견고하고 신뢰할 수 있는 펩타이드 맵핑	64
<ul style="list-style-type: none"> - 역상 크로마토그래피 - Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성) - Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 250mm, 2.7μm; Agilent AdvanceBio Peptide Mapping Fast Guards, 2.1 × 5mm, 2.7μm; Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8μm; Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guards, 2.1 × 5mm, 1.8μm 	
3 항체 약물 결합체(ADC)	70
3.1 고농도 염 조건에서의 항체 약물 결합체 분석	70
<ul style="list-style-type: none"> - 소수성 상호작용 크로마토그래피 - Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성) - Agilent AdvanceBio HIC 컬럼, 4.6 × 100mm, 3.5μm 	
3.2 편리하고 신뢰할 수 있는 항체 약물 결합체 분석	76
<ul style="list-style-type: none"> - 소수성 상호작용 크로마토그래피 - Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC - Agilent AdvanceBio HIC 컬럼, 4.6 × 100mm, 3.5μm 	
4 글리칸	80
4.1 글리칸 분리의 분리능 및 속도	80
<ul style="list-style-type: none"> - 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피 - Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성) - Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150mm, 1.8μm; Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 100mm, 1.8μm 	
5 올리고뉴클레오타이드 전구체	88
5.1 올리고뉴클레오타이드 합성을 위한 원료약품 분석	88
<ul style="list-style-type: none"> - 역상 크로마토그래피 - Agilent 1290 Infinity II Bio LC(플렉시블 펌프 구성) - Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 100mm, 1.8μm 	
6 중국 전통 의학(TCM)	94
6.1 LC 분석법 호환성 결정을 위한 성능 비교	94
<ul style="list-style-type: none"> - 역상 크로마토그래피 - Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC - Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150mm, 5μm; Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18, 2.1 × 50mm, 2.7μm; Agilent InfinityLab Poroshell SB-C18, 2.1 × 150mm, 2.7μm 	

분석법 및 시스템 한 눈에 보기

이 표를 각 응용의 실험 설정을 위한 빠른 가이드로 활용하세요.

	분석법						1290 Bio			1260 Bio	
	IEX	SEC	RPLC	HILIC	HIC	AC	HSP	2D-LC	FP	Prime	Inert
단일 클론 항체(mAb)											
mAb 전하 변이체 분석 개선	●						●				
향상된 mAb 응집체 분석		●					●				
제품 관련 mAb 조각 모니터링			●				●				
양이온 교환 분석의 편리한 사용자 맞춤화	●									●	
4D-LC/MS를 사용한 단일 클론 항체 전하 변이체의 완전 자동 특성 규명	●		●					●			
2-In-1 바이오 프로세스 분석				●		●					●
펩타이드											
Agilent 1290 Infinity II Bio LC로의 원활한 분석법 이전			●				●				
견고하고 신뢰할 수 있는 펩타이드 맵핑			●				●				
항체 약물 결합체(ADC)											
고농도 염 조건에서의 항체 약물 결합체 분석					●		●				
편리하고 신뢰할 수 있는 항체 약물 결합체 분석					●					●	
글리칸											
글리칸 분리의 분리능 및 속도				●			●				
올리고뉴클레오타이드 전구체											
올리고뉴클레오타이드 합성을 위한 원료약품 분석			●						●		
중국 전통 의학(TCM)											
LC 분석법 호환성 결정을 위한 성능 비교			●							●	

HSP Agilent 1290 Infinity II Bio LC(고속 펌프 구성)
2D-LC Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 시스템, Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 구성

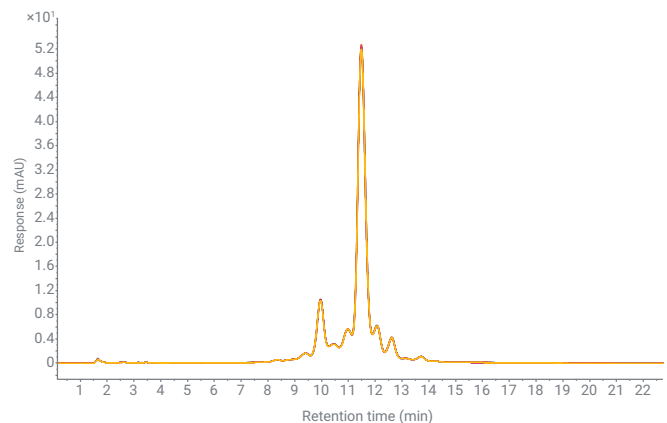
FP Agilent 1290 Infinity II Bio LC(플렉시블 펌프 구성)
Prime Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC
Inert Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC

얼마나 완만한 그레디언트까지 가능할까요?

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템으로 mAbs의 전하
변이체 분석 개선



BIO



저자

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

개요

전하 변이체 분석은 최적의 분리를 위해 매우 얇은 그레디언트와 함께 부식성이 높은 완충액 염을 사용하기 때문에 응용 액체 크로마토그래피 시스템에 까다로운 분야입니다. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템에서 다양한 염 그레디언트를 평가하고 분리능과 재현성을 분석했습니다.

유동 경로에 철을 완전히 함유하지 않은(iron-free) 고속 펌프가 포함된 1290 Infinity II Bio LC는 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건에 최적화되어 있으며 잠재적 부식성으로 인한 시스템 손상을 방지합니다. 매우 까다로운 얇은 그레디언트에서도 뛰어난 재현성을 나타낸 1290 Infinity II Bio LC는 생성된 데이터에 대한 높은 신뢰도를 제공하는 차세대 애질런트 첨단(high-end) 액체 크로마토그래피 시스템을 입증했습니다.

서론

단일 클론 항체(mAbs)는 일반적으로 재조합 생산 방식에 의해 만들어지는 크기가 약 150kDa인 크고 매우 비균질한 거대 분자입니다. 생산 과정에서 복잡한 생합성이 이루어지는 공정을 거치는 데, 이 때 많은 변형이 일어나 수백 가지의 변이체가 만들어집니다. 탈아미드화, 산화, 이황화 가교, N-당화, N- 및 C-말단 처리 등이 가장 일반적인 번역 후 변형(PTM)으로 알려져 있습니다. 이러한 모든 변형은 생성 과정에서 발생할 수 있지만 제조 및 보관도 이러한 거대 분자의 복잡성에 기여합니다. PTM은 복잡한 동형 프로파일을 형성하는데, 최종 의약품의 변형은 생물학적 활성 손실, 반감기의 변화 또는 면역원성과 관련될 수 있기 때문에 이에 대한 광범위한 분석과 모니터링이 필요합니다.¹ 일부 PTM에 의해 생겨나는 분자의 전하 변이체는 일반적으로 이온 교환 크로마토그래피(IEC)를 사용하여 분석합니다.² 전하 변이체는 가장 중요한 CQA(주요 품질 속성) 중 하나로 간주되므로 엄격한 허용 기준과 품질 관리를 고려해야 합니다. 제품이 올바르게 제조되었는지 확인하고 불순물을 식별 및 정량하는 것이 대단히 중요합니다.

얇은 그레디언트 용리는 단백질의 IEX에서 매우 일반적입니다. 단백질 용리를 위한 이온 강도 모드의 일반적인 염 그레디언트는 pH 값이 $\pm 0.02\text{pH}$ 허용 오차 단위로 설정된 경우 약 1~3mM/분입니다.³

1290 Infinity II Bio LC에는 고성능 고속 펌프가 장착되어 있습니다. Binary 펌프의 가장 큰 장점은 저압 혼합 펌프(예: Quaternary 펌프)에 비해 용매 성분 중 하나를 소량 혼합할 때 용매 혼합이 훨씬 더 정확하고 정밀하다는 것입니다. 이러한 유형의 혼합은 용매 그레디언트의 시작과 끝에서 매우 정밀한 용매 조성을 제공합니다.⁴ 이것은 재현성 있고 정확하게 얇은 그레디언트(각 채널에서 1%/분 미만)를 생성하는 기초가 됩니다.

1290 Infinity II Bio LC는 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건(2M NaCl, 최대 8M 요소와 같은 고염 농도, 0.5M NaOH 또는 0.5M HCl과 같은 고/저 pH 용매)에 적합하게 특별히 설계된 차세대 애질런트 첨단(high-end) 액체 크로마토그래피 시스템입니다. 전체 유동 경로에는 스테인리스 강(SST) 또는 철이 전혀 없습니다. Multisampler, 다중 컬럼 온도 조절 장치 및 검출기 전체의 모든 캐필러리와 피팅은 니켈-코발트 합금인 MP35N으로 제작됩니다. 이러한 재료를 적용한 덕분에 염이 많이 함유된 완충액으로 인한 잠재적 부식성이 줄어들고 철 이온으로 인한 단백질 변형(예: 산화, 단백질 복합체 형성)을 방지할 수 있습니다.

이 응용 자료에는 trastuzumab 및 NISTmAb 참조 표준물질에 대한 전하 변이체 분석을 제공합니다. 가능한 최상의 분리능을 찾기 위해 다양한 염 그레디언트 기울기를 테스트했습니다. 그런 다음 재현성 측면에서 가장 성능이 좋은 그레디언트 기울기를 평가했습니다.

실험

장비

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- 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), 표준 유량 생체 적합성 열 교환기 포함
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2 μ L) 장착

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.5

컬럼

Bio MAb, NP5, 2.1 \times 250mm, PEEK (제품 번호 5190-2411)

화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. 초순수는 0.22 μ m 멤브레인 point-of-use 카트리지(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국). Sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate, sodium chloride, hydrochloric acid, sodium hydroxide, tris(hydroxymethyl)-aminomethane, imidazole 및 piperazine hexahydrate는 Sigma-Aldrich(독일 슈타인하임)로부터 구입했습니다.

시료

- Agilent-NISTmAb(p/n 5191-5744)
- Herceptin으로 판매되는 인간화 단일 클론 항체인 trastuzumab은 Roche (Basel, 스위스)에서 구입하였습니다
- Trastuzumab을 pH 6.8의 30mM 인산염 완충액에 용해했습니다

완충액 준비

pH 6.8인 30mM 인산염 완충액 2L를 만들기 위해 sodium phosphate monobasic monohydrate 4.45g 및 sodium phosphate dibasic heptahydrate 7.44g의 무게를 재고 2L 용량 갈색병에 넣은 다음, 초순수를 사용하여 2L까지 채웠습니다 (→완충액 A). 총 농도가 500mM가 되도록 sodium chloride 29.22g을 1L 용량의 빈 갈색병에 넣고 준비된 인산염 완충액 A를 사용하여 1L까지 채웠습니다 (→완충액 B). 준비된 두 완충액의 pH 값을 확인하고 필요한 경우 pH 6.8로 조정했습니다 (다량의 염을 첨가하면 pH가 변할 수 있음). 제조된 두 완충액을 0.2µm 멤브레인 필터를 사용하여 여과시켰습니다.

분석법

표 1 참조.

노트: 농축 염 용액을 용리액으로 사용하는 경우, 펌프 분석법에서 해당 용매 유형을 설정하는 것이 좋습니다. 예를 들어 500mM sodium chloride를 포함한 용매 B의 경우, 펌프 분석법의 용매 선택 필드에 일반 수용액 또는 물 대신 “Sodium Chloride 0.5M”을 사용합니다. 다량의 염이 있으면 용매의 압축률이 달라지므로, 사전 구성된 용매 테이블을 사용하면 최고의 펌프 성능을 얻을 수 있습니다.

결과 및 토의

분석법 개발

원하는 분리능에 도달하고 최적의 분리를 얻으려면 전하 변이체 분석을 위한 광범위한 분석법 개발이 필요합니다. 이러한 목표를 성공으로 이끌려면 최적의 pH와 최적의 그레디언트 기울기를 찾는 것이 중요합니다. 두 요소 모두 분리에 큰 영향을 미칠 수 있습니다. 첫째, 분리를 위한 최적의 pH를 찾기 위해 pH 조사가 권장됩니다. 초기 실험에서 사용된 완충액의 pH는 pH 6.4에서 7.4까지 분석했으며 사용된 두 시료 (trastuzumab 및 NISTmAb 참조 표준물질) 모두에 대해 pH 6.8에서 최적인 것으로 밝혀졌습니다(데이터는 표시하지 않음). 다음 단계는 효율적인 분리를 위한 이상적 그레디언트 기울기를 결정하는 것입니다.

표 1. 염 그레디언트 크로마토그래피 조건.

파라미터	값
용매	A) 30mM 인산염 완충액, pH 6.8, B) 30mM 인산염 완충액, pH 6.8, 500mM sodium chloride
그레디언트	분석법 개발을 위해 0 또는 25mM에서 150mM NaCl까지 30분(여러 가지 얇은 그레디언트) 재현성 연구를 위해 0mM(trastuzumab) 및 25mM(NIST)에서 100mM NaCl까지 30분 재현성 연구를 위해 25에서 50mM NaCl까지 30분(매우 얇은 그레디언트) 31분—500mM NaCl 세척 정지 시간: 35분 평형 시간: 15분
유속	0.200mL/분
온도	30°C
검출	280nm 10Hz
주입	주입량: Trastuzumab의 경우 3µL, NIST의 경우 2µL 시료 온도: 10°C 니들 세척: 물에서 3초

그림 1은 1% B/분(5mM/분)에서 0.33% B/분(1.66mM/분)에 이르는 다양한 그레디언트 기울기에서 trastuzumab의 전하 변이체 분석 결과를 오버레이 한 것입니다. 그레디언트가 알수록 펌프 성능에 대한 요구가 높아집니다. 그레디언트 중에 매우 정밀한 용매 조성을 얻으려면 소량의 용매 성분을 혼합할 때 펌프가 정확하고 정밀하게 작동해야 합니다. 하지만 염 그레디언트의 경우, 그레디언트가 매우 얇다고 해서 항상 더 높은 분리능이 얻어지는 것은 아니며 단순히 피크 폭만 증가시킨다는 점을 고려해야 합니다(예: 그림 1의 0.33% B/분). 따라서 재현성 연구를 위한 그레디언트 기울기는 충분히 얇은 것으로 간주되는 0.66% B/분(3.3mM/분)으로, 테스트한 그레디언트의 중간에 있는 것을 선택했습니다.

NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체를 분리하기 위해 비슷한 분석법 개발 절차를 수행했습니다(그림 2 참조). 등전점(pI)이 약 9인 trastuzumab에 비해 NIST 항체의 pI이 더 높았기 때문에(약 9.2의 pI) NIST의 시작 조건에 약간 더 많은 양의 염이 포함되었습니다. NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체를 보다 효과적으로 분리하기 위해 그레디언트를 trastuzumab에 비해 약간 더 얇게 만들었고, 그에 따라 가장 얇은 그레디언트는 0.17% B/분(0.83mM/분)이 되었는데, 이것은 펌프에 부담스러운 수준입니다. 뒤이은 재현성 연구는 0.5% B/분(2.5mM/분)의 그레디언트 기울기를 선택했습니다.

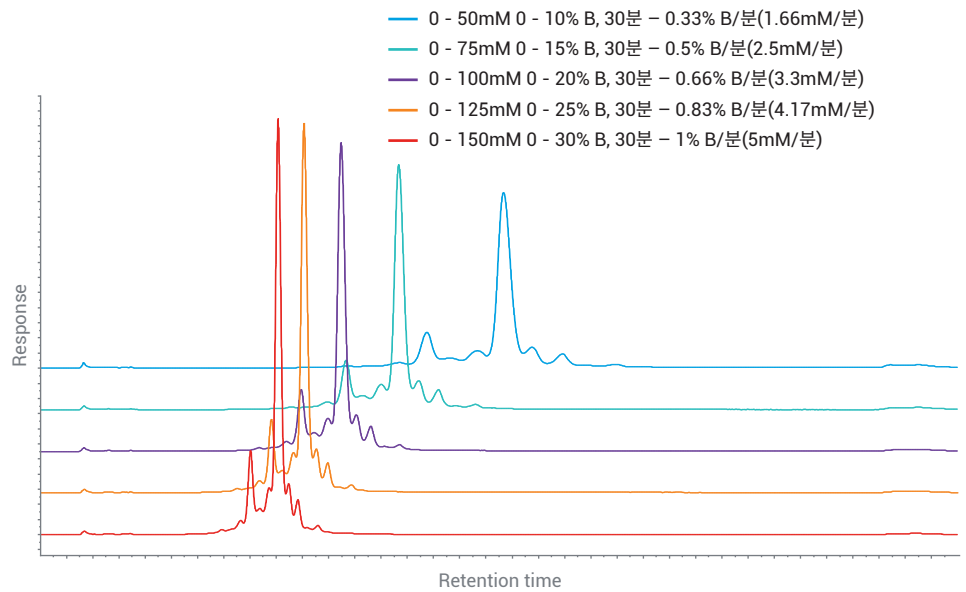


그림 1. 염 그레디언트 기울기가 서로 다른 trastuzumab 분리를 위한 분석법 개발.

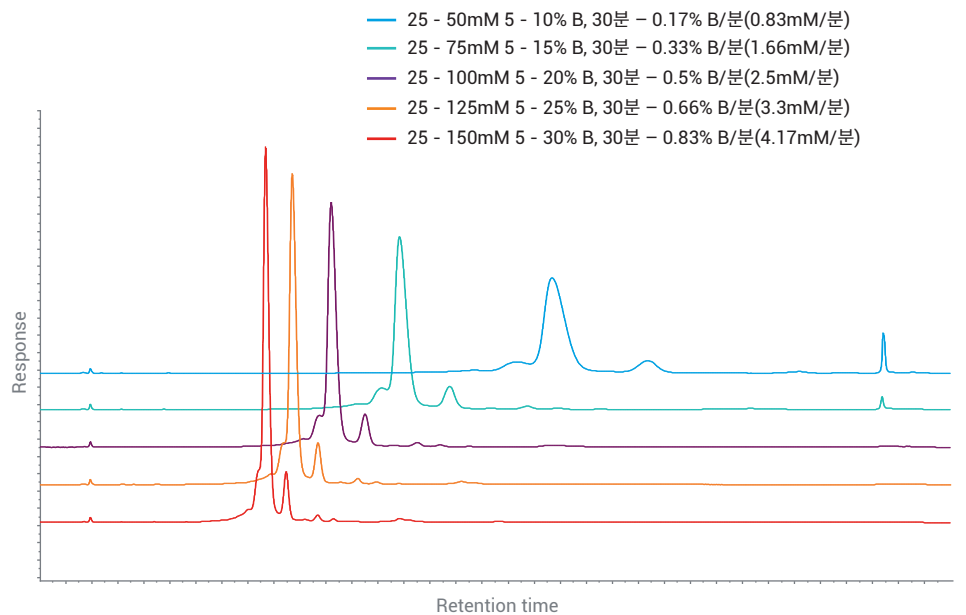


그림 2. 염 그레디언트 기울기가 서로 다른 NISTmAb 참조 표준물질 분리를 위한 분석법 개발.

Trastuzumab 전하 변이체 분리의 재현성

그림 3은 0.66% B/분(3.3mM/분)의 그레디언트 기울기에서 trastuzumab(A)의 전하 변이체 분리에 대한 재현성 연구를 보여줍니다. 그림 3B는 분리된 변이체가 보다 잘 보이도록 확대한 모습입니다. A로 표시한 변이체는 주 피크 이전에 용리되는 산성 변이체를 나타내고, 염기성 변이체 B는 주 피크 이후에 용리됩니다. 주 피크 이전에 5개의 산성 변이체가 분리되었고, 주 피크 이후에 4개의 염기성 변이체가 용리되었습니다. 머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도 측면에서 모든 변이체와 주 피크를 평가했습니다. RT와 면적 정밀도는 모두 우수했으며, 두 개의 매우 작은 변이체 피크인 A1 및 B3을 제외하고 RT의 상대 표준 편차(RSD)는 0.052% 미만, 면적의 RSD는 0.82% 미만이었습니다.

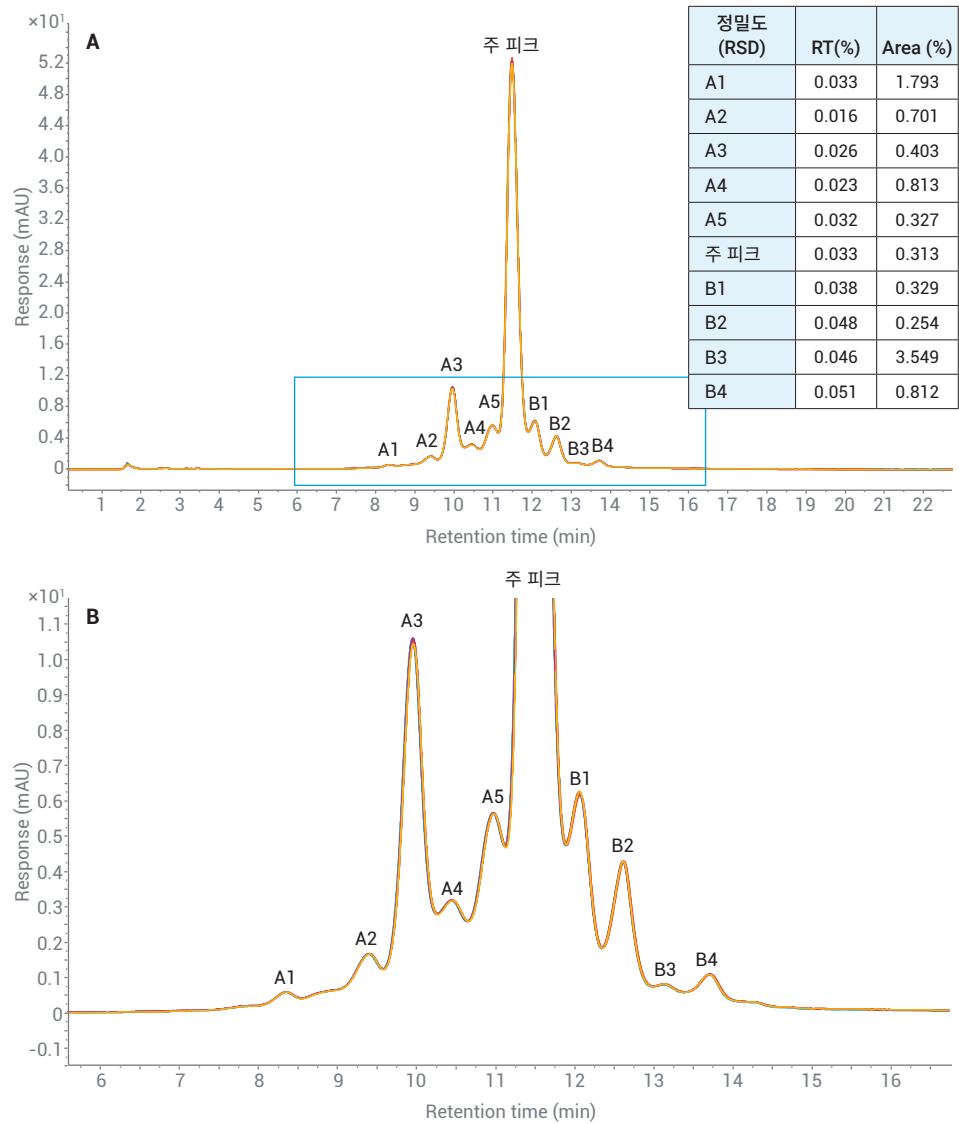


그림 3. 0.66% B/분(3.3mM/분)의 그레디언트 기울기에서 trastuzumab(A)의 전하 변이체 분리를 위한 7회 연속 실행의 재현성 연구. (B) 확대 보기.

NISTmAb 전하 변이체 분리의 재현성

그림 4는 0.5% B/분(2.5mM/분) 그레디언트 기울기에서 NISTmAb 참조 표준물질(A)의 전하 변이체 분리에 대한 재현성 연구를 보여줍니다.

그림 4B는 2개의 산성 변이체와 4개의 염기성 변이체를 확대한 것입니다. 이번에도, 머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도 측면에서 모든 변이체와 주 피크를 평가했습니다. RT와 면적 정밀도는 모두 우수했으며, 매우 작은 변이체 피크인 B2 하나를 제외하고 RT의 경우 0.06% RSD 미만, 면적의 경우 0.55% RSD 미만의 값을 얻었습니다.

그림 2에서 볼 수 있듯 0.17% B/분 (0.83mM/분)의 가장 얇은 그레디언트가 0.5% B/분(2.5mM/분)(여전히 얇은 그레디언트로서 이 재현성 연구에 이용함)과 같은 그레디언트에 비해 더 우수한 분리능을 제공하지는 않았습니다.

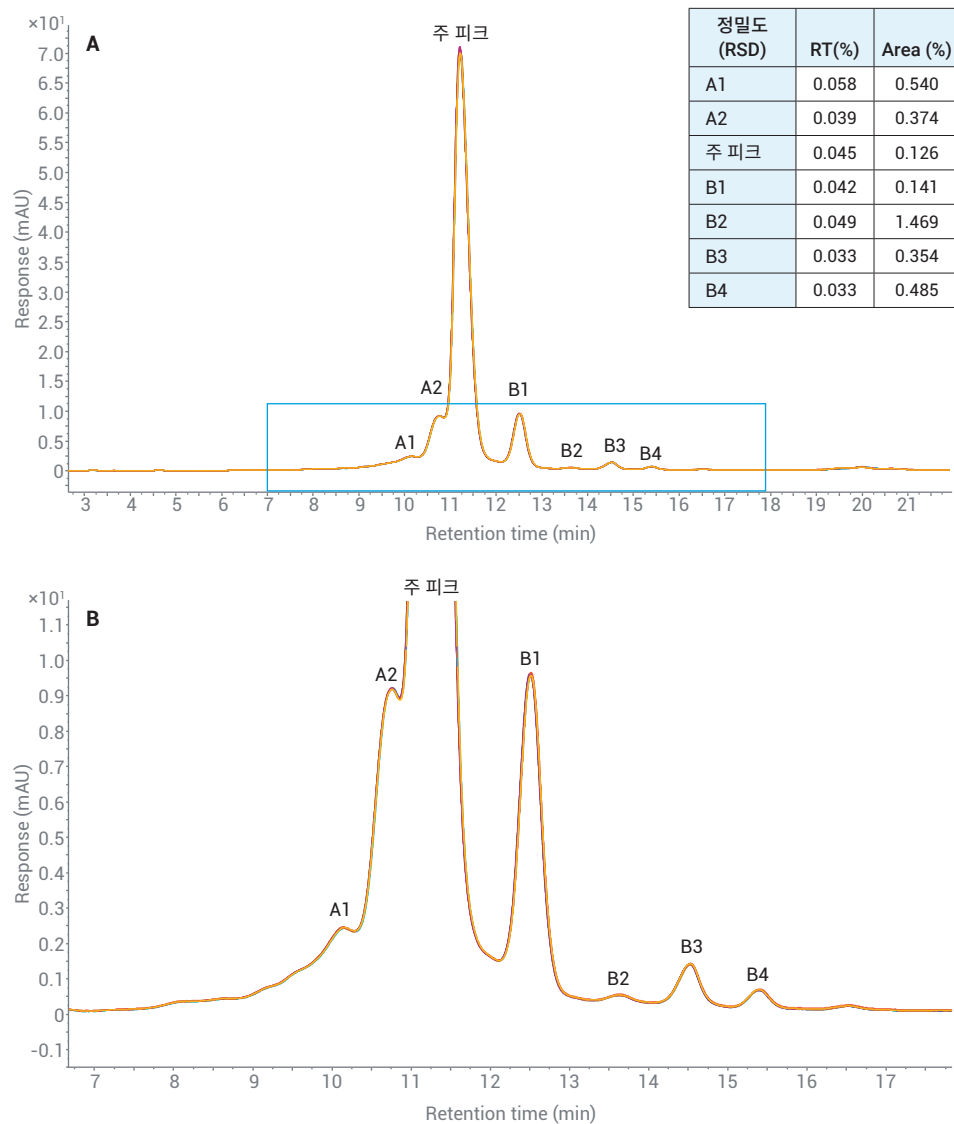


그림 4. (A) 0.5% B/분(2.5mM/분) 그레디언트 기울기에서 NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체 분리를 위한 7회 연속 실험의 재현성 연구. (B) 확대 보기.

그러나 1290 Infinity II Bio 고속 펌프는 그림 5에 나타난 바와 같이 매우 까다로운 그레디언트 기울기를 잘 처리했습니다. 적용된 그레디언트에서는 피크가 상당히 넓어졌지만 7회 연속 실행에 대한 RT 정밀도는 매우 우수했습니다(0.25% RSD 미만). 피크 폭이 증가하면 피크 높이가 감소하여 면적 정밀도에 부정적인 영향을 미칩니다.

결론

1290 Infinity II Bio LC를 이용해 다양한 염 그레디언트 기울기에서 trastuzumab 및 NISTmAb에 대한 전하 변이체 분리의 분리능과 재현성이 어떻게 달라지는지 평가했습니다. 얼핏보면 그레디언트가 얇으면 분리능이 좋아질 것으로 생각될 것입니다. 그러나 두 mAb에 대해 평가된 가장 얇은 그레디언트는 최상의 분리능을 제공하지 못했습니다. 오히려 기울기가 감소하면 피크가 넓어지기 시작하여 분리능이 더 이상 향상되지 않았습니다. 고분리능과 날카로운 피크 모양을 최상으로 조합한 분석법을 재현성 측면에서 추가적으로 평가했습니다. 3.3mM/분(trastuzumab) 및 2.5mM/분(NISTmAb)의 그레디언트 기울기에서 RT뿐만 아니라 면적 측면에서도 우수한 재현성이 얻어졌습니다. RT 정밀도는 평가된 모든 피크에 대해 0.06% RSD 미만이었습니다. NISTmAb에 테스트한 가장 얇은 그레디언트 또한 재현성을 평가한 결과, 0.83mM/분의 대단히 얇은 그레디언트 기울기에서도 매우 우수한 RT 정밀도가 확인되었습니다(<0.25% RSD). 이 데이터는 유동 경로에 철을 완전히 함유하지 않은 (iron-free) 1290 Infinity II Bio LC가 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건에 최적화되어 있으며 재현성이 높은 결과를 이끌어냄을 보여줍니다.

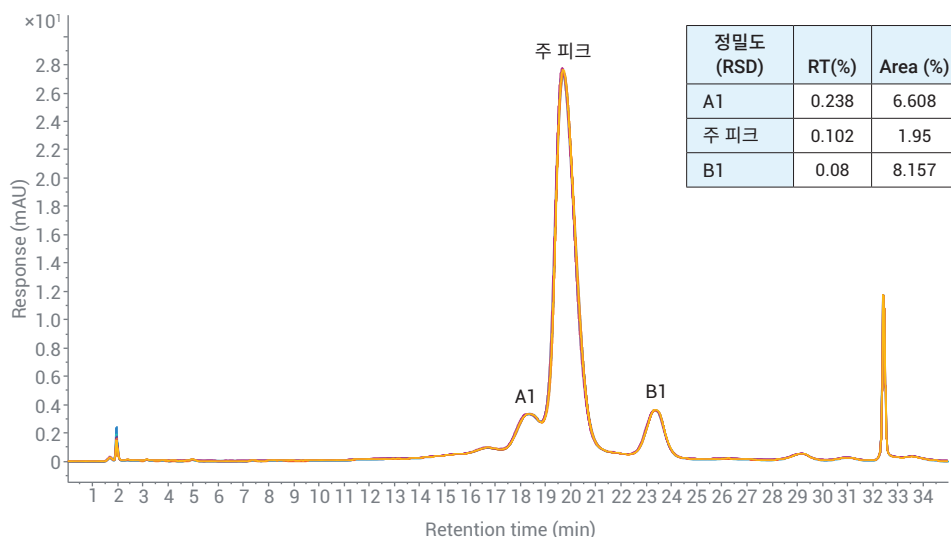


그림 5. 0.17% B/분(0.83mM/분) 그레디언트 기울기에서 NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체 분리를 위한 7회 연속 실행의 재현성 연구.

참고 문헌

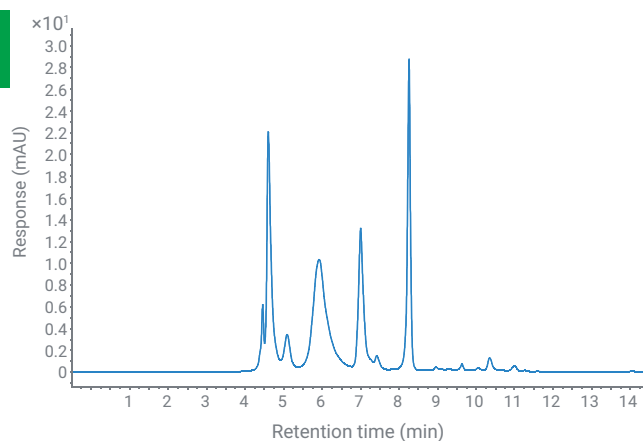
1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841–3849.
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56–64.
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857.
4. The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. *Agilent Technologies*, publication number 5990-7595EN, **2016**.
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065–1066, 119–128.
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363–379.

mAb 응집체 분석 향상

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 이용한
고분리능 SEC



BIO



저자

Edgar Nägele
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼과 초저확산(ULD) 캐필러리를 장착한 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 이용해 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 단백질 분리에서 얻을 수 있는 탁월한 분리능을 입증합니다. 생체 적합성의 UHPLC 시스템은 부식성 염 완충액을 사용하는 분석이 가능하므로 유지보수 비용을 절감할 수 있습니다. 내경이 서로 다른 캐필러리(0.17, 0.12 및 0.07mm)에 대해 SEC 분석의 분리능을 비교했습니다. 단백질 표준 혼합물과 단일 클론 항체(mAb)에 대하여 응집체를 포함해 분리하고 분리능을 비교했습니다. 또한 하나의 소프트웨어 솔루션 안에서 Agilent OpenLab GPC/SEC 애드온 소프트웨어로 분자량을 결정함으로써 원스텝 워크플로를 가능하게 했습니다.

서론

mAbs와 같은 최신 바이오의약품은 매우 비균질한 화합물입니다. 가장 중요한 CQA(주요 품질 속성) 중 하나인 응집 모니터링에서 일반적으로 SEC를 이용합니다. 이 기술을 사용하면 표준 컬럼 검량 후 분자량을 계산하여 화합물의 정체를 확인할 수 있습니다. 또한 이합체 및 고차 응집체와 같은 원치 않는 고분자량 화합물의 유무를 나타내어 순도를 확인해 줍니다. 필요한 분리능을 얻기 위해 입자 크기가 2µm 미만인 최신 SEC 컬럼 사용을 권장합니다. 최적의 성능을 위해서는 2µm 미만 컬럼과 함께 dead volume을 최소화한 UHPLC 기기를 구성하는 것이 좋습니다. Dead volume이 크면 확산 효과로 인해 이러한 컬럼에서 얻어지는 분리능이 크게 훼손되기 때문입니다. 또한 완전한 생체 적합성의 1290 Infinity II Bio LC는 SEC 완충액에서 흔히 볼 수 있는 높은 염 농도를 완벽하게 처리하여 매우 낮은 유지보수 비용으로 확실한 결과를 제공합니다.

이 응용 자료는 1290 Infinity II Bio LC에서 최신 2µm 미만 입자 SEC 컬럼의 사용을 시연하고 dead volume을 가능한 가장 낮은 기기를 사용할 때의 이점을 보여줍니다. 단백질 및 응집체 분리에 미치는 dead volume의 영향을 입증하기 위해 내경이 서로 다른 캐필라리를 사용했습니다. 특성이 잘 규명되어 있는 NISTmAb에 pH와 열 스트레스를 가해 더 많은 응집체를 만든 후 이합체, 삼량체 및 더 높은 단위의 응집체를 분리해 봅니다.

실험

기기

- Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler(G7137A), 시료 온도 조절 장치 내장(#101)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), 생체 적합성 열 교환기 포함
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2µL) 장착

추가 부품

Agilent 1290 Infinity II Bio 초저확산 키트 (ULD Kit, G7132A#006)

소프트웨어

Agilent OpenLab 버전 2.5 및 GPC/SEC 애드온 소프트웨어 V. 1.2

LC 분석법

파라미터	값
용매	인산염 완충 생리식염수(PBS), pH 7.4
유속	0.35mL/분
등용매 분리	
컬럼 온도	30°C
시료 온도	4°C
니들 세척	물, 3초
주입량	5µL
검출(VWD)	280nm, 데이터 수집 속도 20Hz

컬럼

Agilent AdvanceBio SEC, 200Å, 4.6 × 300mm, 1.9µm(제품 번호 PL1580-5201)

시료

- 검량용 단백질 혼합물(제품 번호 5190-9417): thyroglobulin (670,000 Da), γ-globulin (150,000 Da), ovalbumin(45,000 Da), myoglobin(17,000 Da), angiotensin II(1,000 Da)
- Herceptin으로 판매되는 인간화 단일 클론 항체(mAb) trastuzumab은 Roche(Basel, 스위스)에서 구입하였습니다. Trastuzumab을 pH 6.8의 30mM 인산염 완충액에 용해했습니다.
- Agilent NISTmAb, 인간화 IgG1κ mAb (제품 번호 5191-5745)

pH/온도 스트레스 NISTmAb 프로토콜

mAb를 최종 농도 2mg/mL가 되도록 이동상으로 희석했습니다. pH 스트레스는 다른 문헌에서 설명한 것을 약간만 수정하여 수행했습니다.¹ 1M HCl을 시료 용액에 천천히 첨가하여 pH를 6.0에서 1.0으로 변경했습니다. 그런 다음 1M NaOH를 추가하여 pH를 10.0으로 조절한 후, 마지막으로 1M HCl을 추가하여 pH를 다시 6.0으로 조절했습니다. 각 pH 이동 사이에는 약 1분의 대기 시간이 있었으며, 일정하고 약하게 교반했습니다. 최종 용액을 60°C에서 60분간 배양했습니다.

용매 및 화학물질

- **PBS:** 200mL의 탈이온수에 정제 1개를 용해하여 25°C에서 pH 7.4의 0.01M 인산염 완충액(0.0027M 염화칼륨 및 0.137M 염화나트륨)을 조제했습니다
- 화학물질은 VWR(독일)에서 구입하였습니다
- 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22µm 멤브레인 point-of-use 카트리지 (Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다

결과 및 토의

단백질의 SEC 분리를 위한 최신 컬럼은 최적의 분리능을 위해 2 μ m 미만의 입자를 가진 재질로 구성됩니다. 그러나 이러한 컬럼은 낮은 dead volume을 갖도록 최적화된 기기를 필요로 합니다. 컬럼으로 획득된 분리능이 주로 내경이 큰 캐필러리로 인해 파괴될 수 있기 때문입니다. 그림 1A에는 1290 Infinity II Bio LC를 사용한 5개의 단백질 혼합물(3개의 이합체 포함)의 분리가 나타나 있습니다. Dead volume과 확산 효과를 최소화하기 위해 내경 0.07mm의 캐필러리를 분리에 사용했습니다. 초기에 용리되는 thyroglobulin 이합체(4.947분)도 부분적으로 분리되었습니다. 분자량 측정을 위한 검량을 설정하기 위해 이 혼합물의 모든 단백질을 사용하여 검량선을 생성했습니다(그림 1B). 최상의 커브 피팅은 4차로 얻어졌습니다.

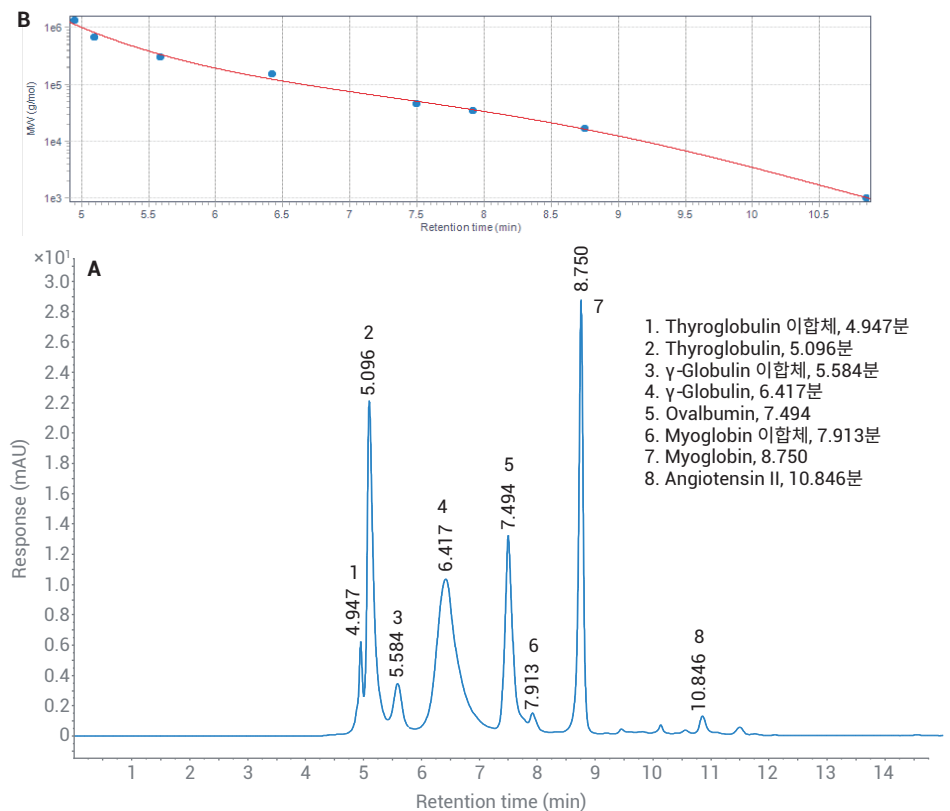


그림 1. (A) 0.07mm 캐필러리들로 구성된 Agilent 1290 Infinity II Bio 초저확산 키트(ULD Kit)와 함께 Agilent AdvanceBio SEC, 200Å, 4.6 × 300mm, 1.9 μ m를 사용하여 3개의 이합체를 포함한 5개의 단백질 혼합물 분리. (B) 일부 이합체를 포함하고 있는 단백질 혼합물을 모두 이용한 분자량 측정용 SEC 검량선.

검량은 mAb trastuzumab 및 포함된 이합 응집체의 분자량을 결정하는 데 사용되었습니다(그림 2). 항체는 6.489분에 용리되고 해당 이합 응집체는 5.673분에서 용리됩니다(그림 2A). Trastuzumab과 이합체의 피크 정점에서 측정된 분자량은 각각 Mp 141,566 Da 및 Mp 321,609 Da 였습니다. 분자량 분포는 그림 2B에 나와 있으며 계산된 분자량은 포함된 표(2C)에 요약되어 있습니다.

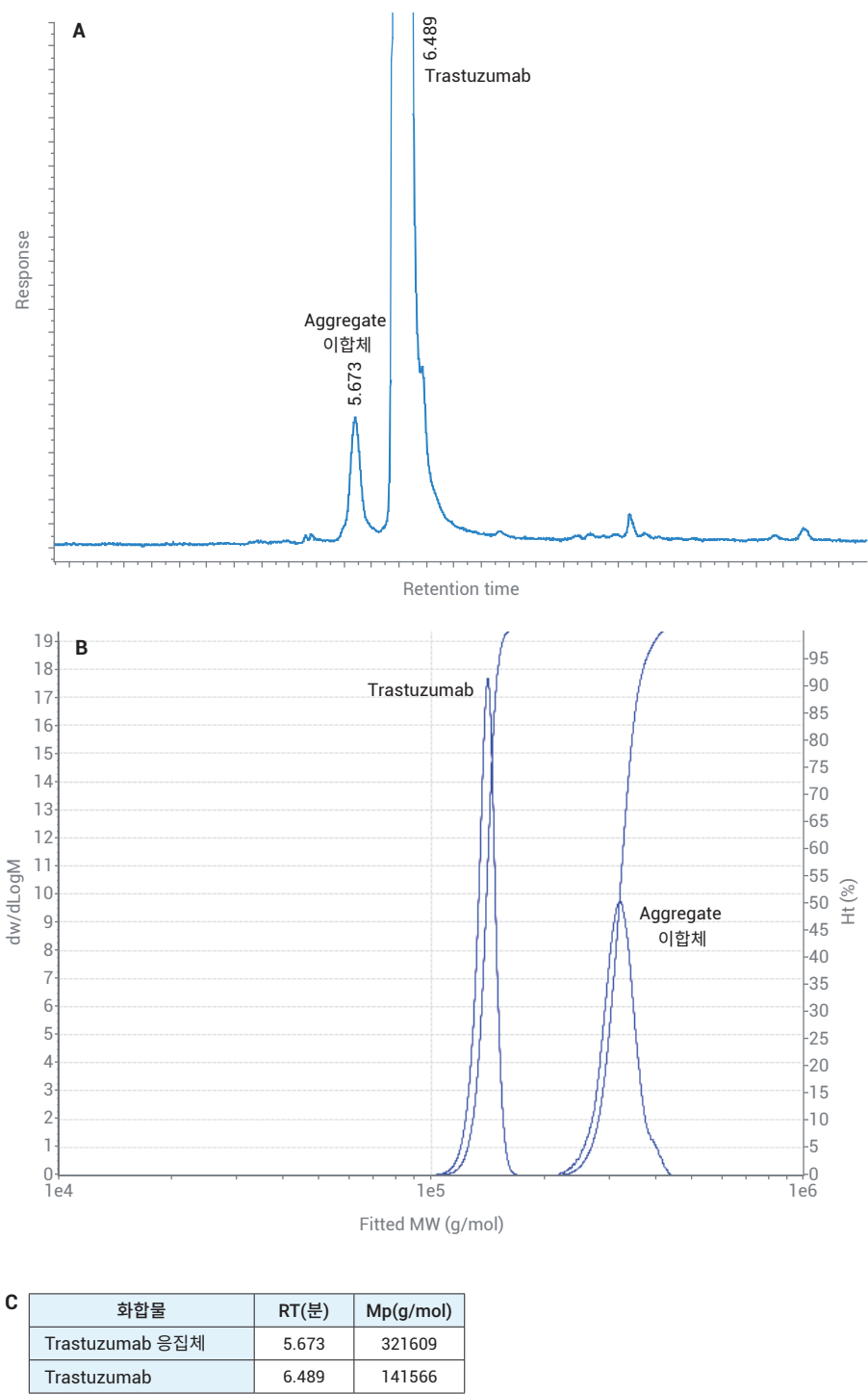


그림 2. Trastuzumab 및 이합 응집체, 분자량 측정. (A) 이합 응집체로부터 trastuzumab 단량체의 SEC 분리. (B) Trastuzumab 및 이합 응집체의 분자량. (C) Trastuzumab 및 그 응집체의 분자량을 나타낸 표. Mp: 피크 정점에서의 분자량.

사용된 캐필러리의 내경이 미치는 영향은 내경이 0.07(ULD), 0.12 및 0.17mm인 캐필러리를 비교하여 확인할 수 있습니다. 영향을 입증하기 위해 단백질 혼합물의 두 번째와 세 번째 피크(그림 1 참조)의 분리능을 측정했습니다(그림 3). 피크 2 및 피크 3에 대한 최상의 분리능 값은 0.07mm 내경의 캐필러리를 사용하여 얻을 수 있었습니다(그림 3의 표 참조). 절반 높이에서의 피크 폭 확인은 단백질 혼합물의 피크 2를 사용했습니다. 측정 값을 보면 내경이 큰 캐필러리 사용 시 피크 폭이 증가함을 알 수 있습니다.

Trastuzumab과 그 응집체의 분리에 미치는 캐필러리의 영향은 그림 4에 나와 있습니다. 여기에서 하나의 저분자량 화합물이 추가적으로 주요 피크 아래에 숨겨져 있음을 알 수 있었습니다. 0.17mm 캐필러리에서 이 피크가 약간의 솔더로만 분리되었지만 0.07mm 캐필러리를 사용하면 보다 명확하게 볼 수 있습니다.

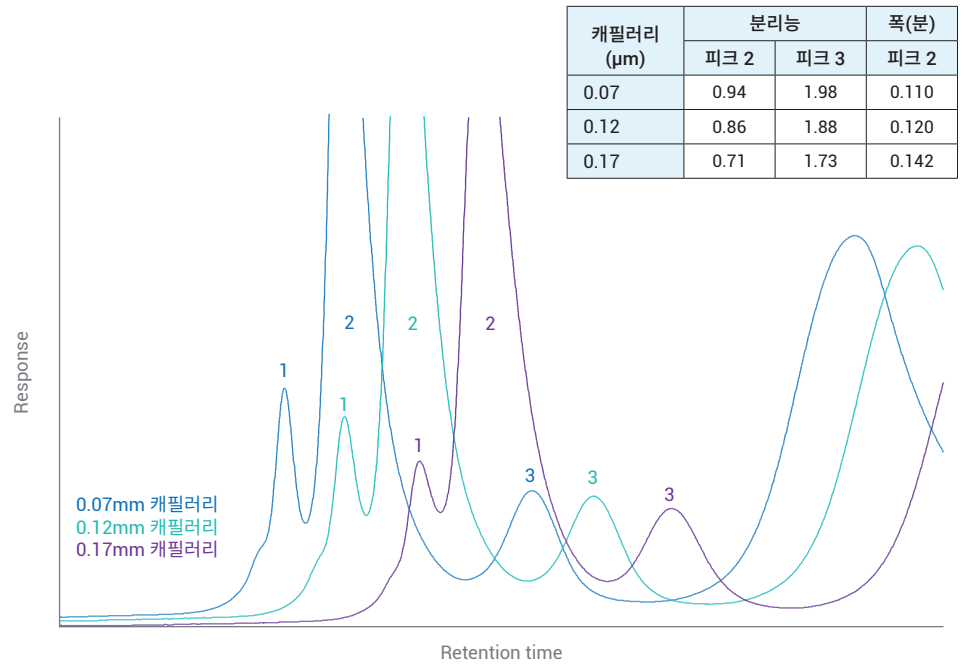


그림 3. 캐필러리의 내경 증가에 따른 분리능 및 피크 폭의 영향 비교.

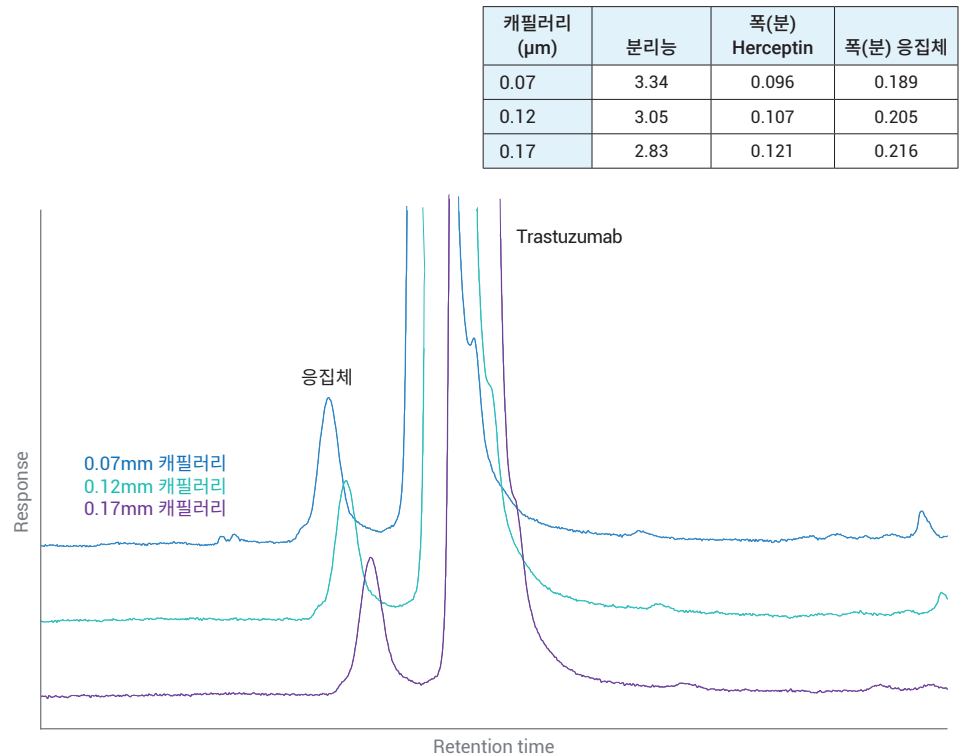


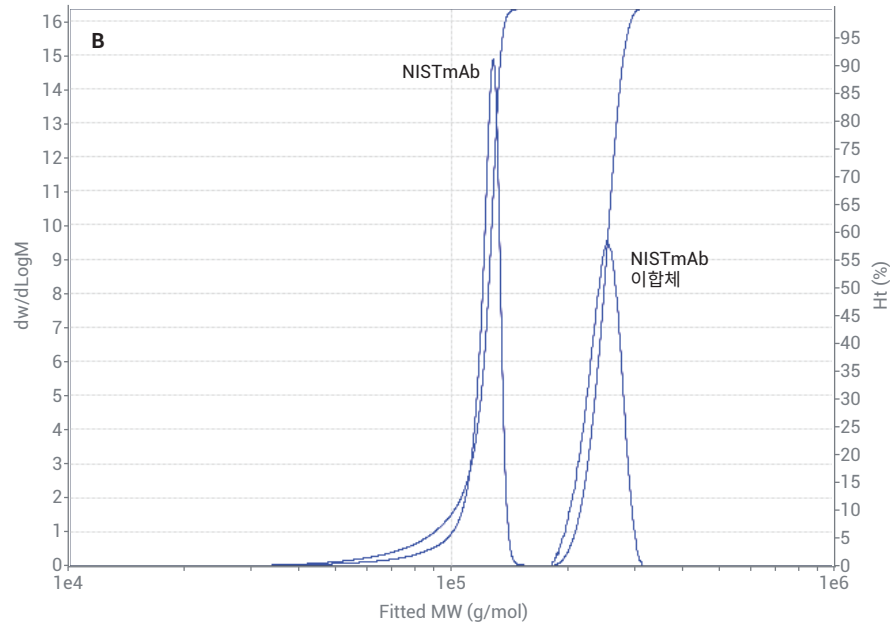
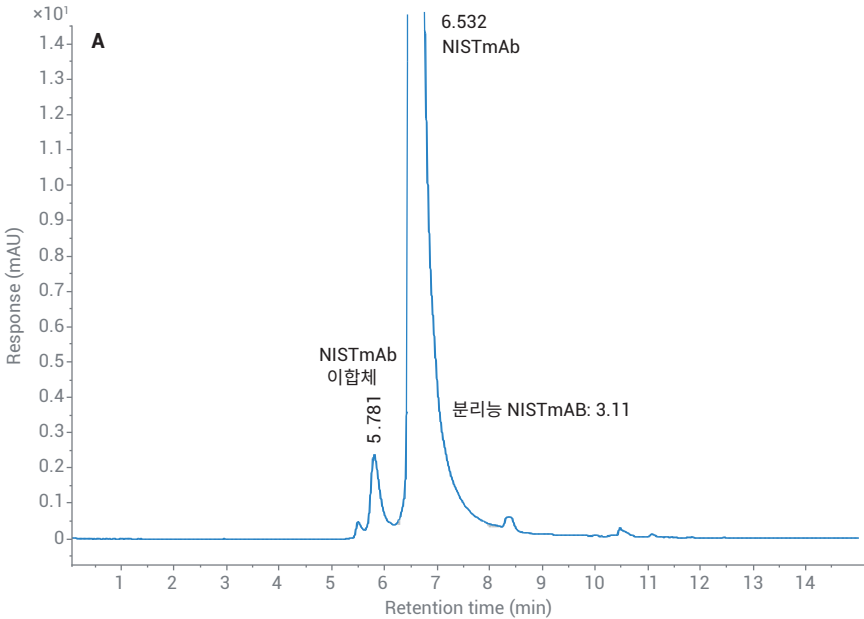
그림 4. 사용된 캐필러리의 내경에 따른 trastuzumab과 이합 응집체의 분리능 및 피크 폭.

머무름 시간과 피크 면적의 RSD 값은 모든 캐필러리에서 우수합니다(표 1).

또 다른 예로, 특성이 잘 규명된 NISTmAb (인간화 IgG1κ mAb)를 사용하여 응집체 분리와 분자량 측정을 수행했습니다(그림 5).

표 1. 사용된 모든 캐필러리에 대한 trastuzumab의 머무름 시간 및 피크 면적 RSD. 머무름 시간의 증가는 서로 다른 캐필러리 세트의 부피 증가에 기인함.

	0.07mm 캐필러리		0.12mm 캐필러리		0.17mm 캐필러리	
	RT	면적	RT	면적	RT	면적
평균	6.464	1736.13	6.500	1727.05	6.554	1717.29
RSD(%)	0.02	0.10	0.01	0.28	0.01	0.25



C

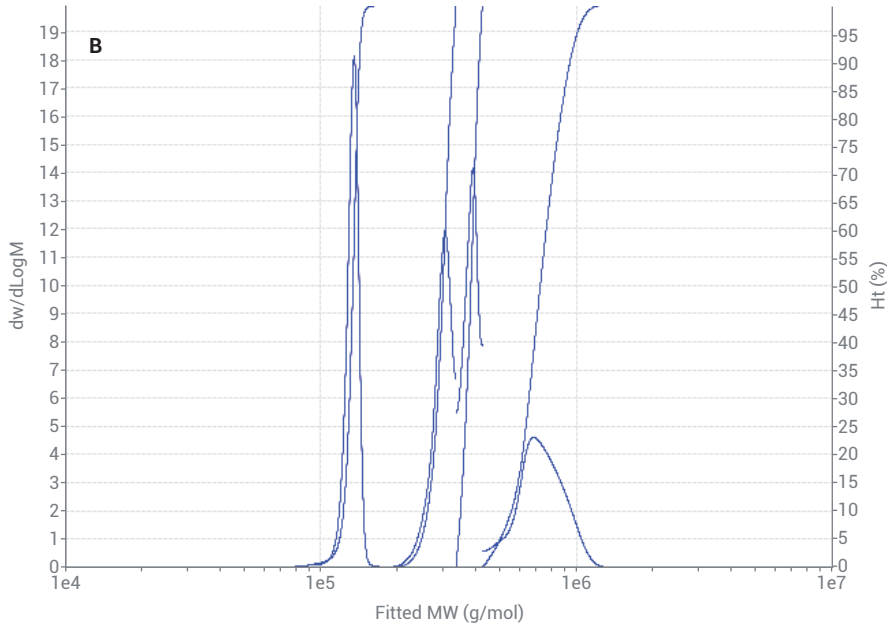
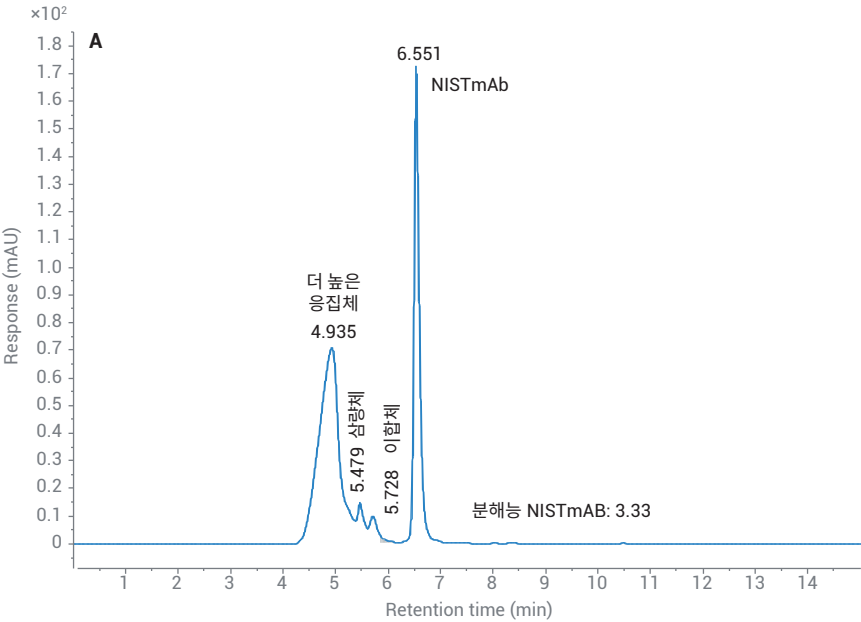
RT (분)	면적	높이	분리능 USP	테일링	폭 50%
5.781	23.80	2.08		1.940	0.175
6.532	3006.00	409.40	3.11	1.569	0.100

D

RT(분)	Mp(g/mol)
5.781	305626
6.532	144767

그림 5. (A) 3.11의 분리능으로 주 이합 응집체로부터 NISTmAb 분리. (B) NISTmAb 및 그 응집체의 분자량. (C) NISTmAb 및 그 응집체의 주요 피크 특성 규명 값을 보여주는 표. (D) NISTmAb 및 그 응집체의 분자량을 보여주는 표.

pH 및 온도 스트레스 조건(실험 섹션 참조)
 에서 이 mAb는 더 높은 단위의 응집체를
 형성할 수 있습니다(그림 6). 초저확산
 캐필러리를 사용하면 더 큰 응집체를 분리할
 수 있습니다(그림 6A). 분자량 분포와
 피크 특성 규명 값을 그림 6B 및 관련 표에
 요약했습니다.



C

RT (분)	면적	높이	분리능 USP	테일링	폭 50%
4.913	1926.46	70.80		0.781	0.398
5.479	129.63	14.58	0.85	1.277	0.168
5.728	106.16	9.5	0.91	1.985	0.185
6.551	1208.07	172.21	3.33	1.116	0.110

D

RT(분)	Mp(g/mol)
4.913	706827
5.479	411615
5.728	321609
6.551	141918

그림 6. (A) pH 스트레스를 적용한 NISTmAb에서 응집체 분리. (B) NISTmAb의 스트레스 조건에서 발생하는 응집체의 분자량 분포. (C) NISTmAb 및 해당 응집체의 주요 피크 특성 규명 값을 정리한 표. (D) NISTmAb 및 해당 응집체의 분자량을 보여주는 표.

결론

이 응용 자료에서는 AdvanceBio SEC 컬럼과 1290 Infinity II Bio LC를 함께 사용하여 최소화된 시스템 dead volume과 초저확산 캐필러리를 통해 단백질과 해당 응집체를 최고의 분리능으로 분리할 수 있음을 입증했습니다. 1290 Infinity II Bio LC는 높은 염 농도의 완충액을 이용해 작동할 수 있는 완전한 생체 적합성 시스템입니다. 이는 최고의 분리능 성능과 함께 매우 낮은 유지보수 비용의 이점이 있습니다.

참조 문헌

1. Quantitation of mAb and ADC Aggregation Using SEC and an Aqueous Mobile Phase. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-6303EN, **2016**.

www.agilent.com/chem

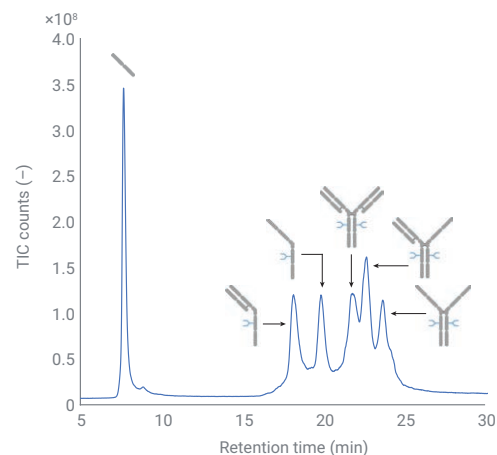
DE.1846180556

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 10월 22일, 한국에서 인쇄
5994-2709KO

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 주요 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 그레디언트 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 생체분자는 이황화 결합으로 연결된 두 개의 중사슬과 두 개의 경사슬로 구성된 보존 이중사슬체 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.

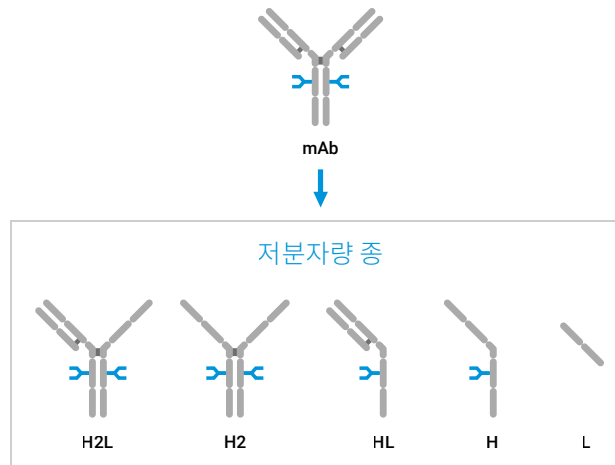


그림 1. 단일 클론 항체(mAb)의 환원 유도 LMW 종을 보여주는 개략도. 약어: H2L(두 개의 중사슬 및 하나의 경사슬), H2(두 개의 중사슬), HL(하나의 중사슬 및 하나의 경사슬), H(중사슬) 및 L(경사슬).

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
- Connect Bio 열 교환기(G7116-60071) 및 두 개의 애질런트 열평형 장치 (G7116-60013) 장착
- 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 (제품 번호 PL1912-2502PK)

화학물질

Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS 아세토니트릴(제품 번호 5191-4496) 및 Agilent-NISTmAb(제품 번호 5191-5744)가 사용되었습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 point-of-use 카트리지를(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 1mM DTT와 함께 갈색 유리 바이알에 직접 넣어 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
그레디언트	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	60°C, 열 평형 장치 설치
UV 검출	VWD: 280nm, 10Hz/MS: 표 2 참조
주입	주입량: 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 유속	11L/분
VCap	4,000V
노즐 전압	2,000 V
Fragmentor	180 V
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 분석법이 기울기 0.32 및 0.55%B/분인 두 개의 선형 그라데이션 단계로 구성되어 있음에도 RSD 값은 머무름 시간 대비 0.190%(L) 및 0.056%(H), 그리고 면적 정밀도 대비 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 완제품의 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.

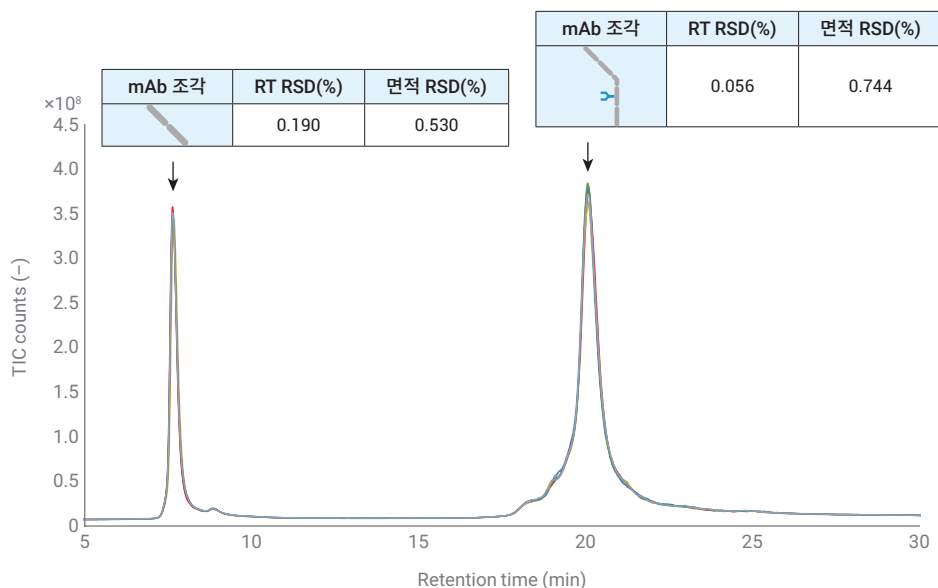


그림 2. NISTmAb 환원으로 유도된 중사슬 및 경사슬 조각을 Agilent 1290 Infinity II Bio LC로 분석했을 때의 상대 머무름 시간 및 면적 정밀도(RSD, n = 7) 값.

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 당화는 이 분석법으로 여러 조각의 PTM을 쉽게 분석할 수 있음을 보여줍니다. 또한, 그림 4B는 mAb 피크 주변에 클러스터링된 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 띠 넓힘이 거의 또는 전혀 없는 UV 및 MS 검출이 한 번의 실행으로 가능하며, 공정 개발에서 품질 관리로 분석법을 편리하게 이전할 수 있습니다 (그림 4A).

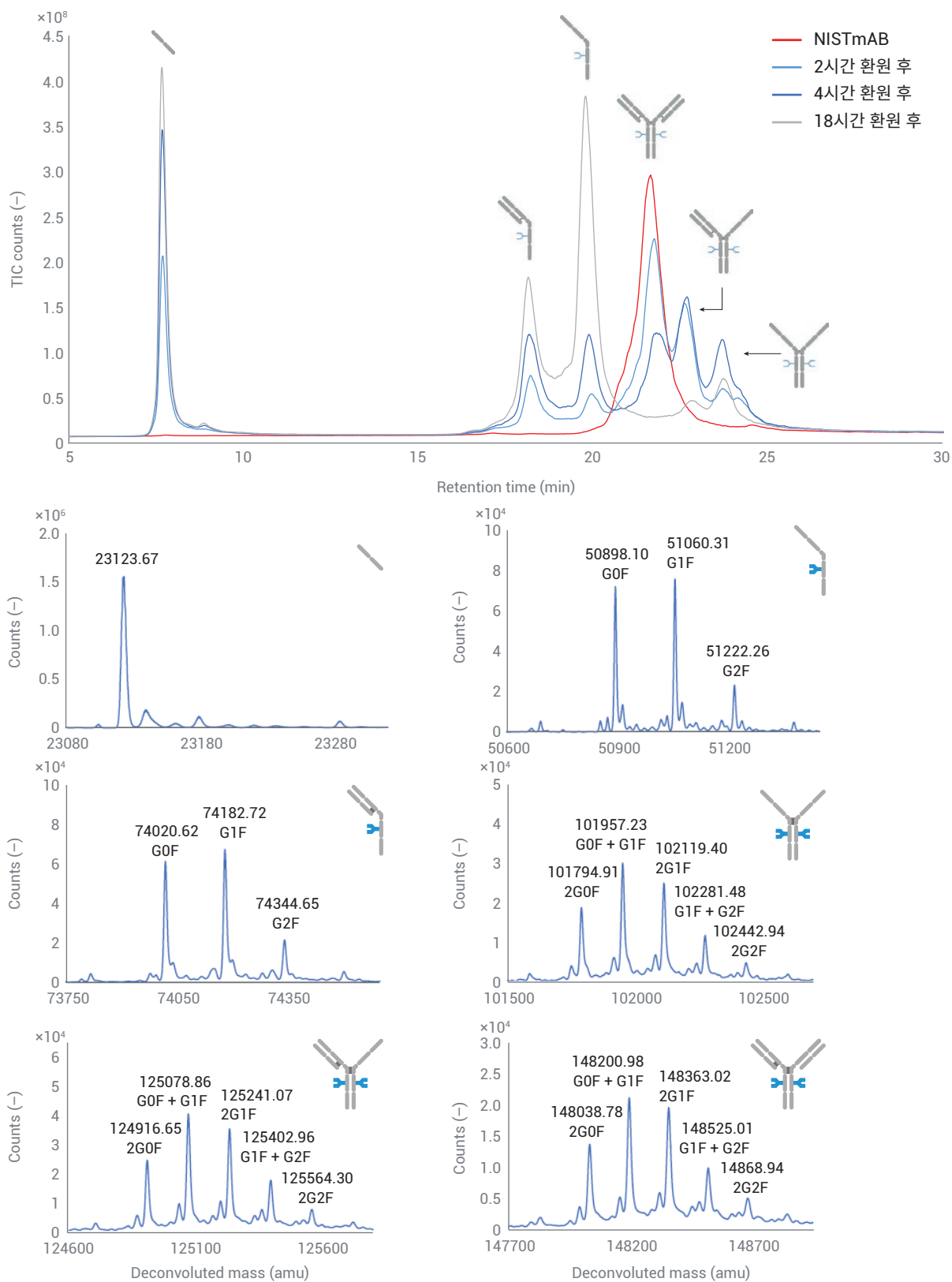


그림 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC로 분리되고 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF로 검출된 NISTmAb의 동적 부분 환원에 대한 크로마토그램. 각 조각의 해당 추출 스펙트럼은 NISTmAb의 특징적인 당화를 보여줍니다.

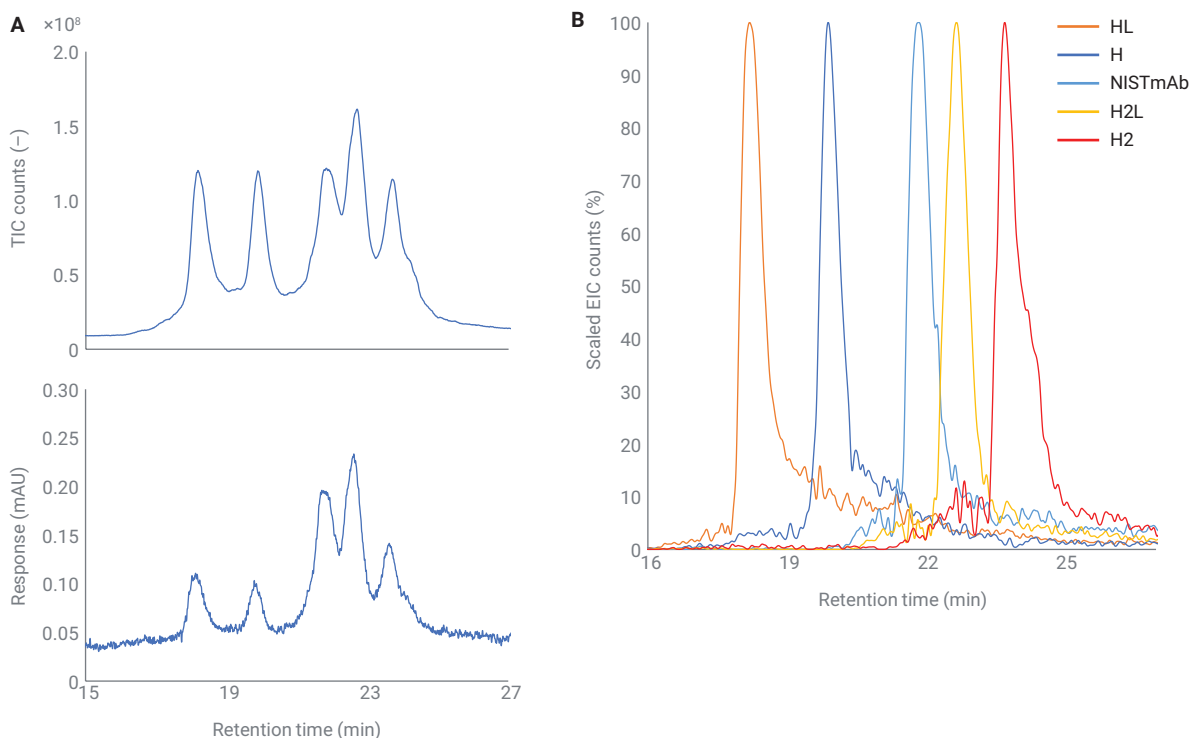


그림 4. NISTmAb 주변에 클러스터링되는 조각의 MS 및 UV 크로마토그램을 한 번의 실행으로 획득(A). 우수한 피크 모양을 보여주는 NISTmAb 조각의 추출 이온 크로마토그램(B).

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 NISTmAb를 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, **2018**.
- 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

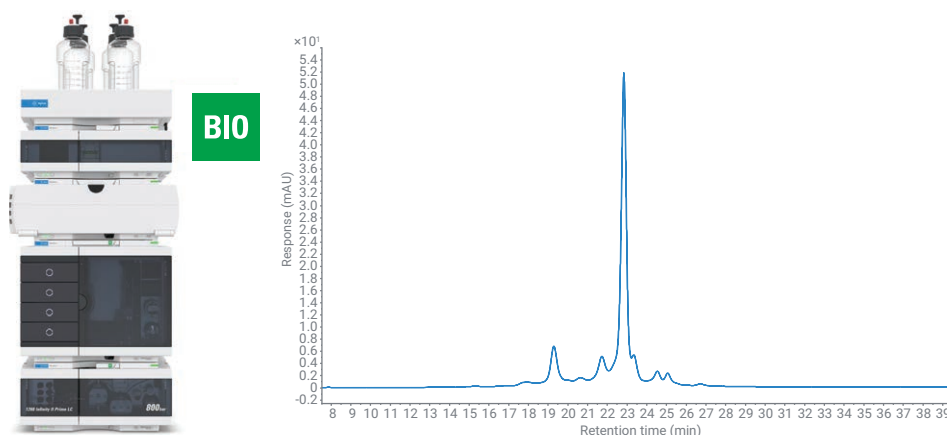
DE44181.2356018519

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

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

양이온 교환 분석의 편리한 사용자 맞춤화

고분리능 전하 변이체 분석을 위한 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템, Agilent Buffer Advisor 소프트웨어 및 pH 그레디언트 결합



저자

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

개요

단일 클론 항체의 전하 변이체 분리는 크로마토그래퍼에게 어려운 작업이 될 수 있습니다. 분석된 단일 클론 항체의 미세 이질성으로 인해 원하는 최적의 분리능을 찾기 위해서는 광범위한 분석법 개발이 필요할 수 있습니다. 기존의 많은 염 그레디언트 성능을 뛰어넘는 pH 그레디언트의 분리 능력은 전하 변형체를 매우 효율적인 방식으로 분리할 수 있게 해줍니다. 이 응용 자료는 여러 유형의 pH 그레디언트를 사용하여 두 개의 단일 클론 항체인 trastuzumab 및 NISTmAb의 전하 변이체를 고분리능으로 재현성 있게 분석하는 방법을 보여줍니다.

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템은 철을 완전히 함유하지 않은 유동 경로와 Agilent 1260 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프를 특징으로 Agilent Buffer Advisor 소프트웨어를 사용해 단 4개의 원액만으로 용매를 동적 혼합할 수 있습니다.

서론

치료용 단일 클론 항체(mAbs)는 매우 비균질한 분자이며 많은 수의 변형체로 구성됩니다. 이들 변형체는 이러한 종류의 바이오의약품에서 자연적으로 발생하며, 반드시 불순물로 간주되지는 않습니다. 용액 내 단백질은 수성 매질과 단백질의 계면에서 대부분 극성인 하전된 아미노산을 가지고 있는 반면, 소수성 잔기는 소수성 상호작용으로 인해 스스로 회합하려는 경향이 있습니다. 이렇게 주변 액체와 접촉하는, 단백질의 “바깥쪽” 아미노산은 변형되기 쉽습니다.¹

단백질 미세 이질성이라고도 불리는 변이체는 항체 생산 중 번역 후 변형에서 유래할 수 있습니다. 또한 정제 공정, 제제 및/또는 보관 후에도 변형이 발생할 수 있습니다.² 그러나 변이체가 제약용 단백질에 존재하는 경우 그 생물학적 활성이 다를 수 있고 면역원성이 증가될 수 있습니다.² 따라서 mAb의 미세 이질성은 바이오의약품의 안전성과 효능을 보장하기 위해 광범위한 분석으로 특성을 규명해야 합니다.

양이온 교환 크로마토그래피(CEX)는 단일 클론 항체의 전하 변이체 분석을 위한 절대 표준으로 간주됩니다.³ 전통적인 염 그래디언트는 일단 분석법이 완전히 최적화되고 나면 높은 분리능을 가집니다. 그러나 단백질 분리를 위한 고분리능 이온 교환 분석법을 개발하려면 매우 많은 노력이 필요합니다. 염 농도, 이동상 pH 값 및 첨가제 등 최적화해야 하는 파라미터가 이 외에도 많습니다. 또한 모든 분자, 특히 생체 분자는 서로 다른 거동을 보일 수 있으며, 개발된 분석법은 실험 파라미터의 큰 변화(특히 pH 값과 관련하여)를 용인하지 못합니다.^{1,4}

크로마토포커싱이라고도 알려진 pH 그래디언트 기반 CEX는 mAb 전하 변이체를 고분리능으로 분리하는 견고한 분석법으로 이용됩니다.^{1,4,5} 일반적인 이온 교환 크로마토그래피(IEC)에서 분자는 완충액의 이온 강도(대부분 NaCl과 같은 염 사용)를 증가시키는 방식에 의해 컬럼에서 용리됩니다. 이와 달리 pH 그래디언트를 사용하면 결합된 분자가 완충액의 pH 변화로 용리됩니다. 즉, 순 표면 전하를 변화시켜 분자가 전기적으로 중성인 등전점(pI)에서 결합된 분자가 용리할 수 있게 됩니다.

넓은 pH 그래디언트 분석법이 보다 일반적이며 단일 완충액 시스템 내에서 서로 다른 항체의 변이체를 분리할 수 있습니다.¹ 또한 pH 그래디언트 기반 분석법의 분석법 개발은 기존의 이온 강도 기반 IEX에 비해 훨씬 간단하고 현저하게 빠릅니다.

1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템은 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건에 적합하도록 특별히 설계된 애질런트의 차세대 고성능 액체 크로마토그래피 시스템입니다. 시료 유동 경로에는 스테인리스 강(SST) 또는 철이 전혀 없습니다. Multisampler, 다중 컬럼 온도 조절 장치 및 검출기 전체의 모든 캐필러리와 피팅은 니켈-코발트 합금인 MP35N으로 제작됩니다. 이러한 재료를 적용한 덕분에 염이 많이 함유된 완충액으로 인한 잠재적 부식을 줄이고 철 이온의 존재로 인한 단백질 변형(예: 산화, 단백질 복합체 형성)을 방지할 수 있습니다.

Quaternary 펌프인 1260 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프는 Buffer Advisor 소프트웨어를 사용하여 단 4개의 원액을 이용한 용매의 동적 혼합이 가능해 바이오 분석 워크플로를 단순화하고 완충액 준비 시간을 크게 단축시킬 수 있습니다. Buffer Advisor 소프트웨어에서는 IEX에 대한 펌프 시간표를 계산하여 4 용매 염 그래디언트는 물론 pH 그래디언트도 빠르고 간단하게 생성할 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 두 개의 서로 다른 pH 그래디언트를 사용한 trastuzumab 및 NISTmAb 참조 표준물질의 전하 변이체 분석을 소개합니다.

실험

장비

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프(G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler (G7137A) 및 시료 온도 조절 장치(#101 옵션)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), 표준 유량 생체 적합성 열 교환기 포함
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2μL) 장착

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.5 이상

컬럼

Bio MAb, NP5, 2.1 × 250mm, PEEK (제품 번호 5190-2411)

화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 point-of-use 카트리지(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국). Sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate, sodium chloride, tris(tris(hydroxymethyl)aminomethane), imidazole, hydrochloric acid 및 piperazine hexahydrate는 Sigma-Aldrich(독일 슈타인하임)로부터 구입했습니다.

시료

- Agilent-NISTmAb(제품 번호 5191-5744)
- Herceptin으로 판매되는 인간화 단일 클론 항체인 trastuzumab은 Roche(Basel, 스위스)에서 구입하였습니다. Trastuzumab을 pH 6.8의 30mM 인산염 완충액에 용해했습니다

완충액 준비

완충액은 Buffer Advisor 소프트웨어의 원액 제조법에 따라 준비했습니다(그림 1 참조).

4용매 인산염 기반 완충액 시스템 - Buffer Advisor에서 계산

A: 물

B: 1,700mM sodium chloride

C: 44.5mM sodium phosphate monobasic

D: 55mM sodium phosphate dibasic

노트: 이 설정은 염 및 pH 그레디언트 용리에 모두 사용할 수 있으므로 직접 비교가 가능하며 분석법 개발 가능성을 높일 수 있습니다.

2용매 광범위 pH 그레디언트 완충액 시스템 — Buffer Advisor에서 계산

Buffer Advisor를 사용하면 복합 버퍼(Composite Buffer)라고도 하는 넓은 범위의 pH 그레디언트를 생성할 수도 있습니다. 이러한 경우 C 및 D 채널만을 사용하여 그레디언트를 만듭니다. 이 실험에서는 Farnan과 Moreno¹에 의해 기술된 pH 그레디언트를 사용했으며 Buffer Advisor의 원액 조성에서 완충액 조성을 사용자 혼합물로 입력했습니다(2.4mM tris, 1.5mM imidazole, 11.6mM piperazine,

그림 1. Agilent Buffer Advisor 원액 제조법 - 4용매 인산염 완충액 시스템.

pH 6 → C 및 10.5 → D로 pH 조정을 위한 HCl). 이 옵션을 통해 사용자는 직접 제작한 완충액 조성으로 원하는 pH 범위를 구성할 수 있습니다. Buffer Advisor는 두 완충액 혼합물의 이온 강도(IS)와 완충 용량(BC)을 계산합니다.

A: 물

B: 해당 없음

C: pH = 6; IS = 22.5mM; BC = 6.19mM

D: pH = 10.5; IS = 0.717mM; BC = 2.31mM

분석법

표 1. 4용매 인산염 기반 완충액 시스템 - 염 그레디언트 크로마토그래피 조건.

파라미터	값
용매	A: 물 B: 1,700mM sodium chloride C: 44.5mM sodium phosphate monobasic D: 55mM sodium phosphate dibasic
그레디언트	pH 6.8, 30mM 인산염 완충액에서 10~110mM NaCl의 0~30분 그레디언트(30~31분까지 500mM NaCl 세척 단계 포함) 정지 시간: 31분 사후 시간: 15분
유속	0.200mL/분
온도	30°C
검출	280nm 10Hz
주입	주입량: 4μL 시료 온도: 8°C 니들 세척: 물에서 3초

표 2. 4용매 인산염 기반 완충액 시스템 - pH 그레디언트 크로마토그래피 조건.

파라미터	값
용매	A: 물 B: 1,700mM sodium chloride C: 44.5mM sodium phosphate monobasic D: 55mM sodium phosphate dibasic
그레디언트	pH 6.8, 30mM 인산염 완충액에서 pH 7~8.4의 0~30분 그레디언트(30~31분까지 500mM NaCl 세척 단계 포함) 정지 시간: 31분 사후 시간: 15분
유속	0.200mL/분
온도	30°C
검출	280nm 10Hz
주입	주입량: 4μL 시료 온도: 8°C 니들 세척: 물에서 3초

노트: 농축 염 용액을 용리액으로 사용하는 경우, 펄프 분석법에서 해당 용매 유형을 설정하는 것이 좋습니다. 예를 들어 1,700mM NaCl을 사용하는 인산염 완충 그래디언트의 용매 B의 경우, 펄프 분석법의 용매 선택 영역에서 일반 수용액이나 물 대신 Sodium Chloride 1.5M을 사용하십시오. 다량의 염이 있으면 용매의 압축률이 달라지기 때문에, 사전 구성된 용매 테이블을 사용하면 최고의 펄프 성능을 얻을 수 있습니다.

결과 및 토의

Buffer Advisor를 사용하면 염과 pH 그래디언트를 모두 계산할 수 있습니다. 이 응용 자료의 실험 섹션에 설명한 4용매 인산염 완충액을 사용하여 trastuzumab 전하 변이체의 분리에 대한 두 가지 버전을 모두 계산할 수 있습니다.

그림 2는 알은 염 그래디언트(파란색)와 pH 7에서 8.4로의 인산염 완충 pH 그래디언트(녹색)를 사용하여 trastuzumab 전하 변이체를 분리한 두 개 크로마토그램의 오버레이입니다. 염 및 pH 그래디언트에 의한 분리는 대등하며 pH 그래디언트 사용에서 약간의 분리능 향상이 있습니다.

Buffer Advisor 소프트웨어의 특징 중 하나는 주어진 그래디언트 내에 추가적인 그래디언트 단계를 추가하여 선행 그래디언트(염 및 pH)의 계산을 개선한

표 3. 2용매 광범위 pH 그래디언트 완충액 시스템/Farnan pH 그래디언트.

파라미터	값
용매	A: 해당 없음 B: 해당 없음 C: pH = 6; IS = 22,4mM; BC = 6,14mM(Farnan 완충액) D: pH = 10,5; IS = 0,717mM; BC = 2,31mM(Farnan 완충액)
그래디언트	Trastuzumab 그래디언트: pH 8.3~10의 0~50분 그래디언트(pH 10.5에서 이후 51~55분에 “세척” 단계 포함) 정지 시간: 55분 사후 시간: 20분 NISTmAb 그래디언트: pH 8.9~10.5의 0~45분 그래디언트 정지 시간: 50분 사후 시간: 20분
유속	0.200mL/분
온도	30°C
검출	280nm 10Hz
주입	주입량: 4μL 시료 온도: 8°C 니들 세척: 물에서 3초

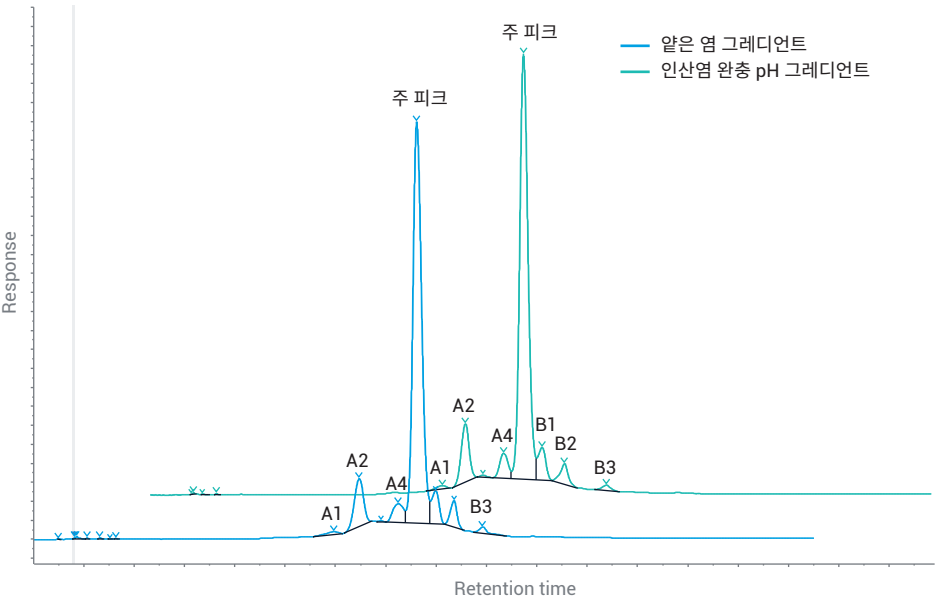


그림 2. 알은 염 그래디언트(파란색)와 인산염 완충 pH 그래디언트(pH 7~8.4)(녹색)를 사용하여 전하 변이체를 분리한 두 개의 크로마토그램 오버레이.

것으로, 이를 통해 원하는/사전 설정된 pH 대비 큰 편차 없이 완벽한 선형성을 얻을 수 있습니다. 이 기능을 사용하려면 Buffer Advisor 사용자 인터페이스(UI)의 4. Create % Timetable 섹션에 있는 **Optimize Gradient** 체크박스를 선택해야 합니다(그림 3A 및 3B의 빨간색 원 참조).

그림 3A와 B는 체크박스를 선택 취소(A) 및 선택한 경우(B) 사전 설정 pH와 실제 pH의 차이를 보여줍니다. Buffer Advisor에서 추가적인 최적화가 없는 경우, 실제 pH가 사전 설정된 pH대비 최대 0.4 단위까지 벗어날 수 있으므로 사용자가 실행되는 그레디언트의 선형성을 신뢰하기 어렵습니다. **Optimize Gradient** 체크박스(그림 3B)를 선택하면 pH 그레디언트의 선형성을 보장하기 위한 추가 단계가 본래의 그레디언트에 삽입됩니다. 왼쪽 하단의 **Result Pump Gradient Timetable**에 추가로 삽입된 단계가 표시되며 결과적으로 실제 그레디언트가 사전 설정된 그레디언트에 최대한 가깝게 됩니다. 그런 다음 이 그레디언트 시간표는 OpenLab의 분석법으로 내보내기 할 수 있어 입력하는데 추가 시간을 들이지 않고 쉽게 전송할 수 있습니다.



그림 3. 매우 높은 선형성의 pH 그레디언트 생성이 가능한 Agilent Buffer Advisor 소프트웨어의 Optimize Gradient 기능. A는 최적화하지 않은 경우, B는 최적화된 그레디언트를 나타냄.

그림 4는 pH 7에서 8.4까지의 인산염 완충 pH 그레디언트를 사용한 trastuzumab 전하 변이체 분석의 7회 연속 실행 결과를 겹쳐 놓은 것입니다. 처음 두 피크를 제외하고 상대 표준 편차(RSD)가 0.085% 미만인 머무름 시간(RT)과, 면적에서의 우수한 재현성이 확인되었습니다. A3 및 B3 변이체의 면적과 높이가 매우 작기 때문에 면적 재현성이 1% 이상입니다.

인산염 완충 시스템 내에서, 특히 관심 분자의 pI가 6과 8 사이의 pH 완충 범위에 있지 않은 경우 분석법 개발이 제한됩니다. 분자의 pI가 너무 높으면 이 완충 시스템을 사용한 용리는 불가능합니다. 예를 들어, pI가 9.18⁶인 NISTmAb는 CEX 컬럼에서 용리시키기 위해 다른 완충 시스템이 필요합니다.

보다 일반적인 접근 방식은 하나 이상의 완충 시스템으로 구성된 광범위 pH 그레디언트를 사용하는 것입니다. 이 설정 역시 *Composite Buffer(Wide Range pH Gradient)*라는 이름으로 Buffer Advisor 소프트웨어에 통합되어 있습니다. Farnan 및 Moreno(2009)¹가 사용한 pH 범위 6.0~10.5의 pH 그레디언트는 단일 클론 항체의 전하 변이체를 분석하는 데 적합한 완충 시스템입니다. 이 시스템을 추가로 사용하였으며 분석법을 trastuzumab 및 NISTmAb에 최적화하였습니다.

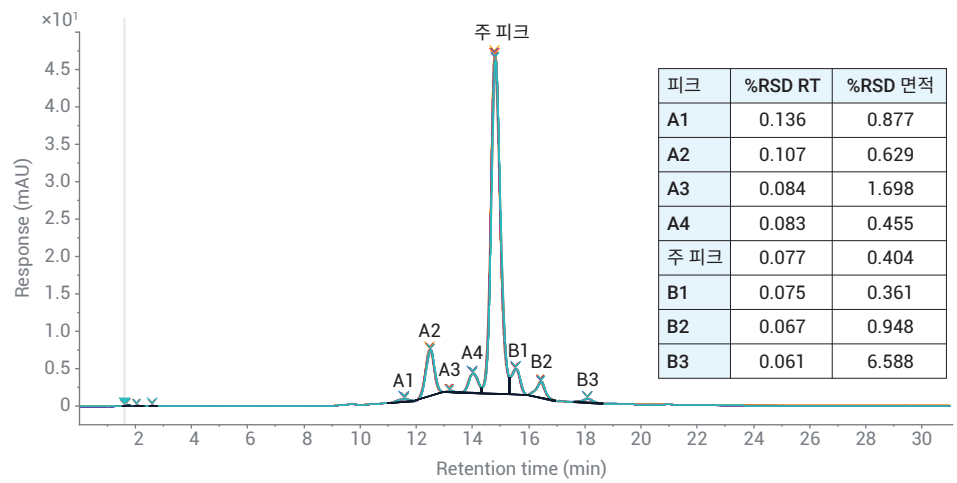


그림 4. pH 7에서 8.4까지의 인산염 완충 pH 그레디언트로 분석한 7회 연속 trastuzumab 실행 결과 오버레이(머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도 표 포함).

그림 5는 최적의 분리능을 얻기 위해 pH 8.3~10 범위로 좁힌 광범위 pH 그레디언트를 사용한 trastuzumab 전하 변이체의 분리를 보여줍니다. 인산염 완충 pH 그레디언트(그림 2 참조)와 비교했을 때 주 피크 전에 용리되는 두 가지 산성 변이체 (A1~A6)와 주 피크 이후에 용리되는 하나의 염기성 변이체를 추가적으로 분리할 수 있었습니다. 특히 그림 5B의 확대 보기는 주 피크 주변의 다양한 전하 변이체가 우수하게 분리된 모습을 보여주며, 그림 2에 나타난 얇은 염 및 pH 그레디언트 대비 피크가 더 날카롭고 분리능이 향상되었습니다.

분리된 모든 변이체에 대해 RT 및 면적 정밀도를 평가했습니다(그림 5의 피크 표 참조). 극히 작은 피크에서도 RT 정밀도가 우수하여 첫 번째 변이체 A1을 제외하고 0.06% RSD 미만의 값을 나타냈습니다. 면적 정밀도는 극히 작은 피크를 제외하고 대부분의 피크에서 우수한 값을 나타냈습니다.

Farnan과 Moreno¹가 사용한 pH 그레디언트는 NISTmAb 분석에서도 이상적인 것으로 입증되었습니다(그림 6 참조). NISTmAb의 경우, NISTmAb의 pI가 다르기 때문에 pH 그레디언트를 다른 pH 범위로 조정하였습니다. pH 8.9에서 10.5 까지로 개선한 이 얇은 그레디언트를 통해 3개의 산성 변이체와 2개의 염기성 변이체를 분리할 수 있었습니다.

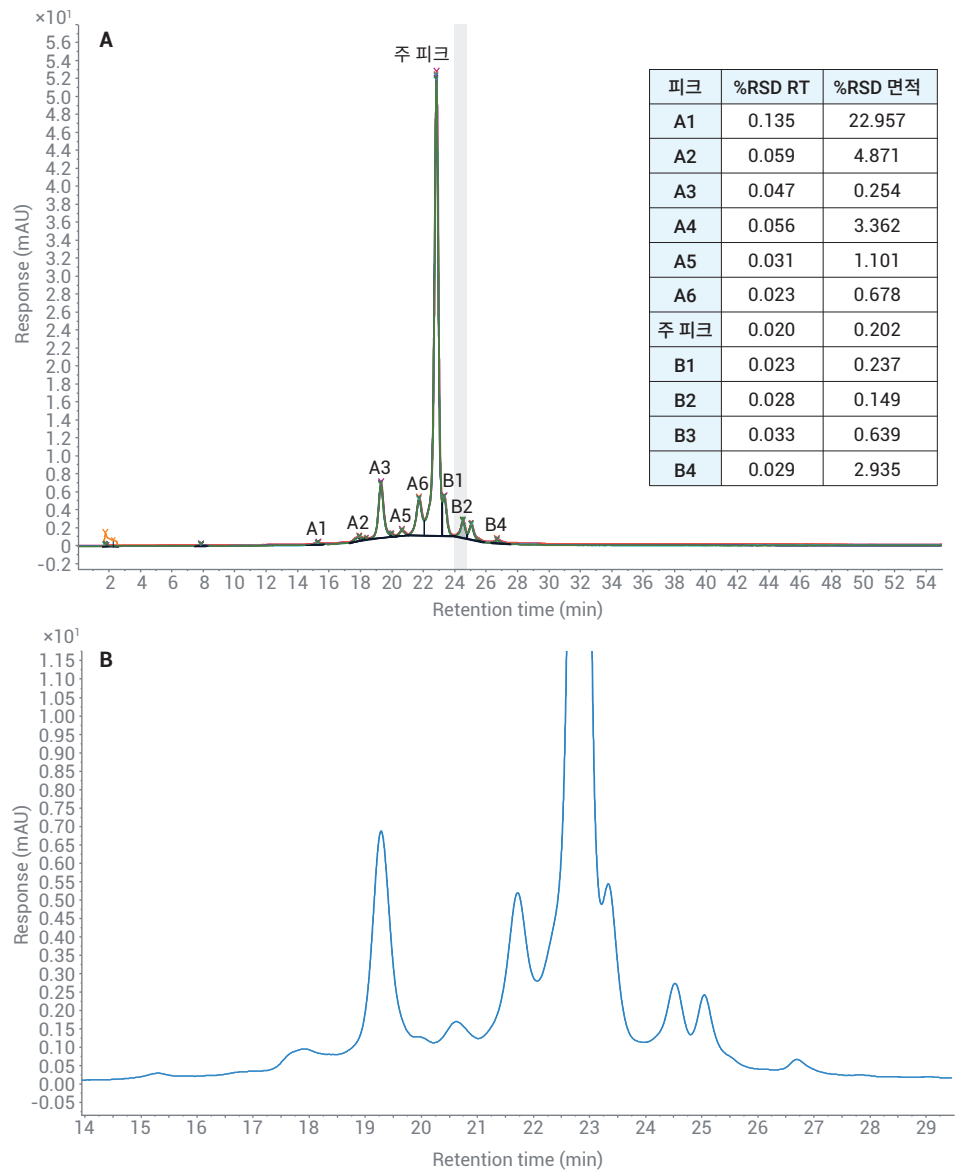


그림 5. A. pH 8.3에서 10까지의 광범위 pH 그레디언트로 분석한 7회 연속 trastuzumab 실행 결과 오버레이(머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도 표 포함). B. 단일 주입 확대 보기.

결론

단일 클론 항체 분석에서 염 그래디언트와 비교한 pH 그래디언트의 이점이 입증되었습니다. pH 그래디언트는 분석법 개발을 단순화하고 다른 한편으로는 고분리능 크로마토그래피 결과를 생성한다는 점에서 알은 염 그래디언트보다 더 우수한 것으로 나타났습니다. 염 그래디언트 분석법 개발의 잠재력은 다소 제한적인 반면(그래디언트 기울기의 변화가 추가적인 분리능의 변화 없이 피크 폭만 증가시킴), pH 그래디언트는 분리능을 더욱 높이고 피크를 날카롭게 유지할 가능성을 보여줍니다. 이는 특히 Farnan 및 Moreno¹의 방법에 기초한 광범위 pH 그래디언트를 사용해 trastuzumab 및 NISTmAb를 분석한 결과로부터 입증되었습니다. Buffer Advisor 소프트웨어는 인산염 완충 시스템을 위한 4가지 완액을 동적으로 혼합할 수 있어 실험실에서 시간이 많이 소요되는 완충액 준비 시간을 절약해 주었습니다. 또한 광범위 pH 그래디언트는 Buffer Advisor로 쉽게 계산할 수 있었습니다. 따라서 Buffer Advisor 소프트웨어로 개발하고 시료 유동 경로에 철 성분이 전혀 없는 플렉시블 펌프 구성의 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템에서 실행된 모든 분석법은 매우 신뢰할 수 있고 재현 가능한 결과를 제공했습니다.

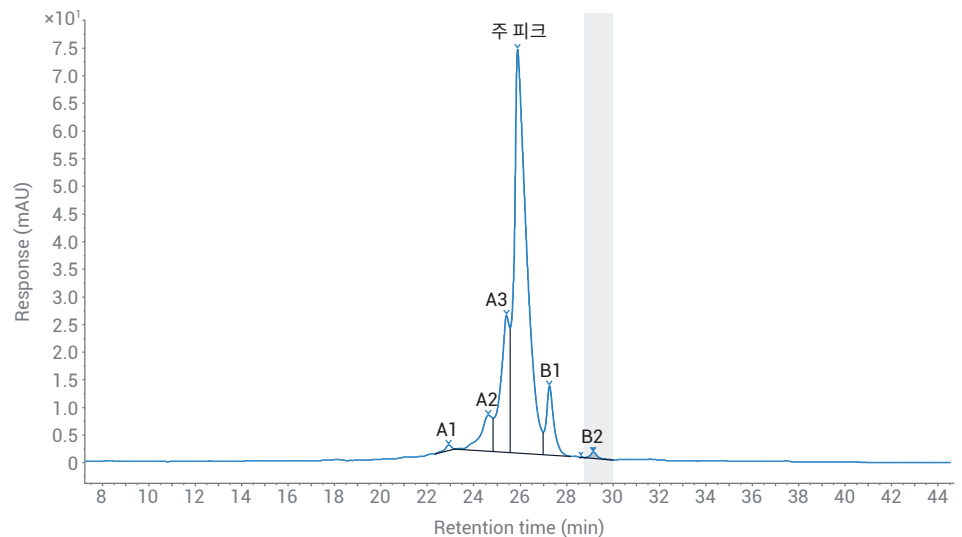
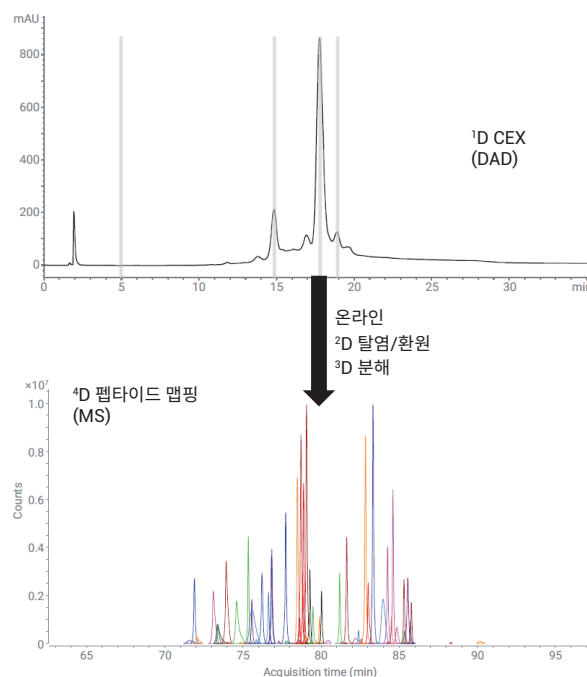


그림 6. Farnan 및 Moreno¹의 방법을 바탕으로 수정된 pH 그래디언트(pH 8.9에서 10.5까지)를 사용한 NISTmAb의 분리.

참고 문헌

1. Farnan, D.; Moreno, G.T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, *81*(21), 8846-8857.
2. Liu, H. et al. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2426-2447.
3. Vlasak, J.; Ionescu, R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 468-481.
4. Rea, J. et al. Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 317-323.
5. Lingg, N. et al., Highly Linear pH Gradients for Analyzing Monoclonal Antibody Charge Heterogeneity in the Alkaline Range: Validation of the Method Parameters. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1373*, 124-130.
6. Turner, A.; Schiel, J. E. Qualification of NISTmAb Charge Heterogeneity Control Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*(8), 2079-2093.
7. Schneider, S. How Shallow Can You Go? Refining Charge Variant Analysis of mAbs with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2692EN, **2020**.

4D-LC/MS를 사용한 단일 클론 항체 전하 변이체의 완전 자동 특성 규명



저자

Liesa Verscheure,
Gerd Vanhoenacker,
Pat Sandra 및 Koen Sandra
RIC Biologics
벨기에

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider 및 Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.
독일

개요

이 응용 자료는 Agilent InfinityLab 2D-LC 솔루션과 Agilent 6545 LC/Q-TOF 시스템을 사용하는 4차원 액체 크로마토그래피/질량 분석법(4D-LC/MS)에 의한 단일 클론 항체 (mAb) 전하 변이체의 완전 자동화된 심층 특성 규명에 대해 설명합니다. 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)로 분리된 전하 변이체는 multiple heart-cutting 밸브에 설치된 루프에 수집되고 LC/MS 기반의 펩타이드 맵핑 전에 온라인 탈염, 변성, 환원 및 트립신 분해를 연속적으로 거칩니다.

서론

단백질 바이오의약품은 암, 심혈관 질환, 당뇨, 감염, 염증 및 자가 면역 질환을 포함한 다양한 질병의 치료를 위한 중요한 치료제로 부상했습니다. 1-3 단백질 바이오의약품은 다양한 종류로 제공되며 단일 클론 항체(mAbs), 항체-약물 결합체(ADC), 융합 단백질, 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 치료용 효소, 혈액 (응고) 인자, 백신 및 항응고제를 포함합니다. 안전성과 효능 측면에서 명백한 이점을 가진 이러한 분자는 제약 시장의 구도를 실질적으로 새롭게 바꾸고 있으며 현재 350개 이상의 제품이 미국과 유럽 연합에서 인체용으로 승인되었습니다. 1-3 이는 전체 제약 시장의 약 1/4에 해당하며, mAbs는 그 중 가장 빠르게 성장하고 있는 의약품 종류입니다.

이러한 분자는 치료 잠재력이 매우 높은 동시에 분석적으로 까다로운 구조적 복잡성을 가지고 있습니다. 1,2 저분자 약물과 달리 바이오 의약품은 분자량이 크고 (mAb의 MW는 약 150kDa) 비균질합니다. 이러한 의약품은 하나 또는 몇 개의 유전자가 만들어낸 산물입니다. 그러나 번역 후 변형(PTM), 아미노산 서열, 고차원 구조 등에서 차이를 보이는 수백 가지 가능한 변이체가 공존할 수 있으며, 모두 제품의 프로파일, 안전성 및 효능에 영향을 미칩니다. 1-3 결과적으로, 심층적인 구조 특성을 규명하려면 상당한 수의 분석 도구가 필요하며 크로마토그래피(LC)와 질량 분석(MS)이 그 최전선에 있습니다.

아스파라긴 탈아미드화, C-말단 라이신 절단, N-말단 고리화(pyroglutamate 형성), 시알화 등과 같이 PTM으로 생성될 수 있는 전하 변이체를 연구하는 핵심 기술은 CEX입니다. CEX에서는 고정상의 음이온 그룹과 단백질 표면의 양이온 그룹 사이의 정전기적 상호작용이 분리의 기초를 이룹니다. 단백질은 등전점(pI) 이하의 이동상 pH에서 컬럼에 로딩되고 용리는 염 또는 pH 그레디언트를 사용하여 이루어집니다. CEX 완충액은 일반적으로 비휘발성 성분으로 구성되어 있어 이러한 분석법은 MS와 호환되지 않습니다. 피크 식별은 MS 분석 전에 피크 수집과 탈염이 수반되는 힘든 작업입니다. 4 최근에 강력한 상용 2D-LC 기기가 도입됨에 따라 이러한 일련의 작업은 이제 온라인 자동화 방식으로 수행됩니다. 5-9 CEX 컬럼에서 용리되는 피크는 루프에 저장하고 MS 측정 전에 역상(RPLC) 또는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 온라인 탈염을 실시합니다. 포괄적 2D-LC(LCxLC) 및 (다중) heart-cutting 2D-LC(LC-LC)가 모두 사용되었습니다. 5-9 그러나 CEX 피크를 명백하게 식별하려면 펩타이드 맵핑이 필요합니다. 단백질 측정에서는 정체를 나타내고 MS 기기의 질량 정확도를 초월하는 질량 차이를 갖는 지배적인 변형이 부각되지만, 일반적으로 실제 아미노산 서열은 제공되지 않으며 변형 위치를 특정할 수도 없습니다. 후자의 문제를 해결하는 데 목적을 두고 이전 연구를 기초로 삼아 10-12 본 응용 자료에서는 mAb 전하 변이체의 심층적 특성 규명을 위해 1차원(1D) CEX, 피크 수집, 2D 탈염, 변성, 환원, 3D 트립신 분해, 그리고 4D RPLC/MS 기반 펩타이드 맵핑을 모두 포함한 완전 자동 온라인 4D-LC/MS 구성에 대해 설명합니다.

실험

재료

아세트ونی트릴(HPLC-S), 물(ULC/MS) 및 포름산(ULC/MS)은 Biosolve(네덜란드 팔켄스바르트)로부터 구입했습니다. NaH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NH_4HCO_3 , Tris 염기 및 dithiothreitol (DTT)은 Sigma(미국 미주리, 세인트 루이스)로부터 구입했습니다. UltraPure Tris-HCl pH 7.5는 ThermoFisher Scientific(미국 매사추세츠, 월섬)으로부터 구입했습니다. Type I 물은 Sartorius(독일 괴팅겐)의 arium pro Ultrapure Lab Water 시스템으로 수돗물을 처리해 얻었습니다. Herceptin으로 판매되는 인간화 단일 클론 항체인 trastuzumab은 Roche(Basel, 스위스)에서 구입하였습니다.

시료 전처리

Trastuzumab을 1D CEX 이동상 A(MPA: 10mM sodium phosphate pH 7.65)을 이용해 7mg/mL로 희석했습니다. 높은 pH 조건(100mM Tris pH 9.0)에서 3일 동안 37°C로 trastuzumab을 배양하여 탈아미드화를 유도한 다음, 1D CEX 이동상 A를 이용해 7mg/mL로 완충액 교환했습니다.

기기

Multiple Heart-Cutting 옵션과 Agilent 1260 Infinity II Quaternary 펌프 및 Agilent 1260 Infinity II Isocratic 펌프, 2개의 2-위치/6-포트 밸브 및 zero dead-volume(ZDV) T-piece를 추가 장착한 Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 시스템이 사용되었습니다. 내경이 0.12mm인 스테인리스 강 튜빙이 적용되었습니다. 이 구성을 그림 1에 개략적으로 나타냈으며 이 응용 자료에 요약되어 있습니다. 첫 번째 차원(CEX)과 네 번째 차원(RPLC)에서 다이오드 어레이 검출(DAD)을 사용했습니다. 또한 Jet Stream ESI 소스가 장착된 Agilent 6545 LC/Q-TOF를 네 번째 및 최종 차원 이후의 검출에 사용했습니다.

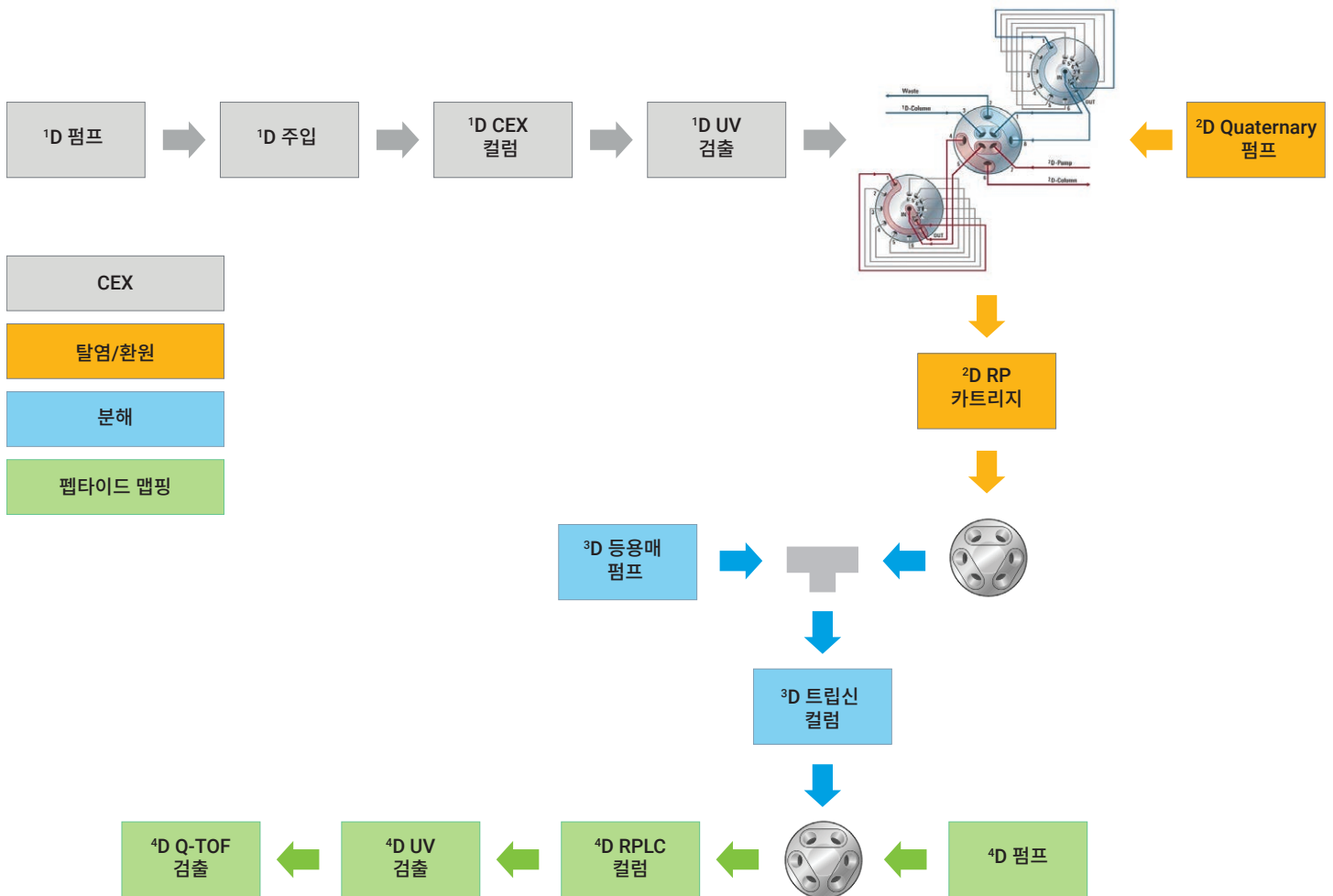


그림 1. Multiple heart-cutting을 사용한 1D CEX 분리 및 전하 변이체 피크 수집, 2D RPLC 기반 탈염, 변성, 환원, 3D 트립신 분해 및 4D RPLC-MS 기반 펩타이드 맵핑을 통합한 4D-LC/MS 구성.

구성

1D: 양이온 교환 크로마토그래피

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프
- G7167B Agilent 1290 Infinity II Multisampler, 시료 온도 조절 장치 (옵션 101) 포함
- G7116B Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(MCT), 밸브 드라이브(옵션 058) 설치, Agilent InfinityLab Quick Change 2-위치/6-포트 밸브, 1300bar(G4231C) 장착

- G7117B Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기, 3.7mm HDR InfinityLab Max-Light 카트리지 셀 (G4212-60032) 장착

노트: 짧은 3.7mm 검출기 플로우 셀을 설치한 것은 신호 강도를 줄여 UV 신호의 포화를 방지하기 위함입니다.

Multiple Heart-Cutting을 이용한 2D-LC

- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브 (G1170A), 2D-LC 밸브(G4236A) 장착
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브 (G1170A) 2개, 각각 40μL 루프 설치된 Multiple Heart-Cutting 밸브 (G4242-64000) 2개 장착

2D: 탈염, 변성 및 환원용 역상 크로마토그래피

G7111B Agilent 1260 Infinity II Quaternary 펌프, 액티브 인렛 밸브(AIV) (옵션 032) 장착

3D: 트립신 분해

- 0100-0969 ZDV T-piece
- G7110B Agilent 1260 Infinity II Isocratic 펌프

4D: 펩타이드 맵핑용 역상 크로마토그래피

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프
- G7116B Agilent 1290 Infinity II MCT, 밸브 드라이브(옵션 058) 설치, Agilent InfinityLab Quick Change 2-위치/ 6-포트 밸브, 1300bar(G4231C) 장착
- G7117B Agilent 1290 Infinity II DAD, 10mm InfinityLab Max-Light 카트리지 셀(G4212-60008) 장착
- G6545A Agilent 6545 LC/Q-TOF, Jet Stream ESI 이온화원 장착

노트: Orachrom StyrosZyme TPCK-Trypsin 및 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 모두 하나의 컬럼 온도조절기의 서로 다른 영역에 포함되어 있으며 각각 40°C 및 60°C에서 유지됩니다.

소프트웨어

- Agilent OpenLab CDS ChemStation 개정 버전 C.01.07 SR4 [505]
- 2D-LC 애드온 소프트웨어 개정 버전 A.01.04 [017]
- Agilent MassHunter(B.09.00), 기기 제어용
- Agilent MassHunter(B.07.00), 데이터 분석용, BioConfirm 애드온 포함

분석법

¹D 및 ⁴D는 2D-LC 소프트웨어에서 구성했으며 ²D 및 ³D는 일반 분석법 설정으로 제어하여 반복 이벤트로 프로그래밍했습니다. 해당 이벤트의 주기 시간은 110분으로, 2D-LC 소프트웨어에 프로그래밍된 ⁴D 주기 시간과 동일했습니다. MassHunter Acquisition은 2D-LC 시스템에서 원격 시작으로 트리거되었습니다.

CEX 분석 전체에서 네 개의 heart-cut을 수행했습니다. 4.8분의 첫 번째 heart-cut은 블랭크 컷으로, 이를 통해 관심 대상인 실제 CEX heart-cut을 분석하기 전에 모든 차원을 프리컨디셔닝할 수 있습니다.

¹ D: 양이온 교환 크로마토그래피			
컬럼	Agilent Bio MAB, 비다공성(2.1mm × 250mm, 5µm) (p/n 5190-2411)		
온도	30°C		
이동상 A	10mM sodium phosphate, pH 7.65		
이동상 B	10mM sodium phosphate, pH 7.65 + 100mM NaCl		
유속	0.2mL/분		
그레디언트	Time (분)	B(%)	CEX 분석
	0	5	
	36	70	
	36.5	100	
	46	100	
	46.5	5	
	60	5	
주입	100µg		
검출	220 및 280nm		
피크 폭	> 0.025분(10Hz)		

Multiple Heart-Cutting ¹ D > ² D	
Trastuzumab 샘플링 시간표	
Cut	Time (분)
1 - 블랭크	4.80
2 - 이전 피크	14.93
3 - 주 피크	17.55
4 - 이후 피크	18.99

² D: 탈염, 변성 및 환원용 역상 크로마토그래피(반복 이벤트로 수동 입력)						
컬럼	폴리머 기반 탈염 카트리지, 2.1 × 10mm					
온도	23 °C					
이동상 A	0.1%(v/v) 포름산 수용액					
이동상 B	0.1%(v/v) 포름산 첨가 아세트ونی트릴 용액					
이동상 C	20mM DTT 첨가 100mM Tris-HCl 용액, pH 7.5					
그레디언트	Time (분)	A(%)	B(%)	C(%)	유속(mL/분)	
	10	99	1	0	0.5	탈염 및 포커싱
	10.01	0	0	100	0.2	환원
	20	0	0	100	0.2	
	20.01	99	1	0	0.5	탈염 및 용리
	25	99	1	0	---	
	25.01	40	60	0	---	
	27	40	60	0	0.5	
	27.01	40	60	0	0.015	용리 및 분해
	68	40	60	0	0.015	
	68.01	0	100	0	0.5	
	85	0	100	0	---	
	95	99	1	0	---	
	120	99	1	0	---	
밸브	27분: 위치 1 → 위치 2(트립신 분해 시작) 67분: 위치 2 → 위치 1(펩타이드 맵핑 시작)					

3D: 트립신 분해 (반복 이벤트 수동 입력)			
컬럼	Orachrom StyrosZyme TPCK-Trypsin PEEK(2.1 × 150mm)		
온도	40°C		
이동상	50mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8		
그라디언트	시간 (분)	유속 (mL/분)	
	25	0.06	
	25.01	0.135	분해
	67	0.135	
	67.01	0.06	
	135	0.06	
밸브	27분: 위치 1 -> 위치 2 (트립신 분해 시작) 67분: 위치 2 -> 위치 1 (펩타이드 맵핑 시작)		

데이터 처리

MassHunter 소프트웨어에 통합된 BioConfirm 알고리즘을 사용하여 측정된 신호를 trastuzumab 경쇄 및 중쇄 서열에 일치시켰습니다. 실험 데이터를 시퀀스에 일치시키기 위한 질량 허용 오차는 8ppm으로 설정되었습니다. 20ppm 질량 정확도에서 얻은 추출 이온 크로마토그램 (EIC)을 사용하여 탈아미드화와 같은 PTM을 모니터링했습니다.

결과 및 토의

CEX, 피크 수집, 탈염, 변성, 환원, 트립신 분해 및 펩타이드 맵핑을 통합하여 완전 자동화 한 온라인 4D-LC/MS 단백질 분석기의 도식도를 그림 1에 나타냈습니다. CEX 피크는 multiple heart-cutting 밸브에 설치된 40µL 루프에 수집되어 탈염, 변성 및 환원이 이루어지는 폴리머 RP 카트리지로 하나씩 전달됩니다. 카트리지에 포획된 환원된 mAb는 이후 아세토니트릴 농도 증가에 따라 트립신 컬럼으로 용리됩니다. T-piece를 사용하여 트립신 분해 완충액을 역상 이동상과 혼합하는 방법으로 최적의

4D: 펩타이드 맵핑용 역상 크로마토그래피(2D-LC 소프트웨어 제어 반복 이벤트)			
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping(2.1 × 150mm × 2.7µm) (p/n 651750-902)		
온도	60°C		
이동상 A	0.1%(v/v) 포름산 수용액		
이동상 B	0.1%(v/v) 포름산 첨가 아세토니트릴 용액		
유속	0.4mL/분		
그라디언트	Time (분)	B(%)	
	0	1	
	8.5	1	
	9	100	
	15	100	
	16	1	
	20	1	펩타이드 맵핑 컬럼에 분해물 로딩
	64	1	
	64	1	펩타이드 맵핑
	97	45	
	98	100	
	103	100	
	104	1	
	110	1	
DAD 검출	214 및 280nm		
피크 폭	> 0.025분(10Hz)		
MS 검출			
이온화원			
양이온화			
건조 가스 온도	300°C		
건조 가스 유속	8L/분		
Nebulizer 압력	35psi		
Sheath 가스 온도	350°C		
Sheath 가스 유속	8L/분		
캐필러리 전압	3,500V		
노즐 전압	1,000V		
Fragmentor	175V		
수집			
모드	확장된 동적 측정 범위(2GHz)		
데이터 수집 범위	m/z 100~3,200		
	1 스펙트럼/초		
	질량중심 수집		
67분 후 전환 밸브를 MS로 전환			

분해 조건을 유지하고 아세트오니트릴 농도를 줄입니다. 분해 단계 동안 트립신 컬럼은 펩타이드 맵핑 컬럼과 동일 유로 선상에 놓이게(in-line) 되고 생성된 펩타이드는 RPLC 컬럼 헤드에 포커싱됩니다. 20분 후, 밸브 스위칭을 통해 분해물이 MS로 용리되기 시작합니다.

mAb trastuzumab의 CEX 크로마토그램은 그림 2에 나와 있습니다. Herceptin으로 상품화된 trastuzumab은 HER2 수용체에 결합하는 인간화 IgG1로, HER2 양성 전이성 유방암 치료에 사용됩니다. pI가 8.45인 해당 mAb는 CEX 이동상 pH에서 양전하를 띠게되어 음전하를 띠는 크로마토그래피 수지와와의 상호작용을 지배합니다. NaCl 염 그래디언트를 사용하여 mAb를 용리시킬 때 다양한 전하 변이체가 나타났으며, 이후 온라인 펩타이드 맵핑을 수행하였습니다. 그림 3A는 그림 2에 표시한 바와 같이 3개의 CEX 피크(이전, 주 및 이후 피크) 및 CEX 블랭크 분석을 포함하는 4D-LC/MS 실험을 개략적으로 보여줍니다. 그림 3B는 1회 주기의 압력 및 DAD 프로파일을 확대한 것으로, 주 CEX 피크의 탈염, 변성, 환원, 분해 및 펩타이드 맵핑을 보여줍니다. 90% 이상의 시퀀스 커버리지를 얻을 수 있었습니다. 식별된 펩타이드는 표 1에 나와 있으며 LC/MS 화합물 크로마토그램의 오버레이는 그림 4에 나타나 있습니다. 포함되지 않은 펩타이드는 일반적으로 작고/또는 친수성이어서 분해 단계 중에 펩타이드 맵핑 컬럼의 헤드에 집중되지 않습니다. 이 때문에 폐기물 유로로 처리됩니다.

펩타이드 맵핑은 시퀀스 정보 옆에 변형 및 변형 부위도 보여줍니다. 그림 5는 CEX의 이전, 주 및 이후 피크에 대한 온라인 펩타이드 맵핑, 특히 두 가지 펩타이드의 EIC를 보여줍니다(즉, 위치 30에서 잠재적 탈아미드화 부위를 포함하는 경쇄 펩타이드 ASQDVNTAWAWYQQKPGK(LC 25-42)

및 위치 102에서 잠재적 이성질화 부위를 포함하는 중쇄 펩타이드 WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124)). 이 데이터로부터 이전 피크는 탈아미드화된 변이체에 해당하고, 아스파라긴이 경쇄 중 하나의 위치 30에서 아스파르테이트로 변환된다는 것을 추론할 수 있습니다. 또한, 이후 피크가 중쇄 중 하나의 위치 102에서 이소아스파르테이트를 가지고 있다는 것도 입증할 수 있습니다. 이것은 변형된 변이체 및 변형되지 않은 변이체에 해당하는 두 개의 피크로 명확하게 시각화됩니다. 이러한 결과는 Herceptin의 산성 및 염기성 변이체에 대한 오프라인 분취 및 펩타이드 맵핑을 수행한 Harris 등의 보고 결과와 일치합니다.⁴

높은 pH로 스트레스를 준 Herceptin 시료에 대해 동일한 실험을 수행했습니다(그림 6). 이러한 조건은 탈아미드화를 유도하여 mAb를 더욱 산성으로 만드는 것으로 알려져 있습니다. 그림 6에 나타낸 CEX 프로파일은 산성 이동을 보여주며, CEX 피크 1과 2의 펩타이드 맵 데이터는 두 경쇄가 위치 30에서 탈아미드화된 이중 탈아미드화 변이체를 보여줍니다. CEX 피크 3과 4는 위치 30에서 하나의 경쇄가 탈아미드화된 단일 탈아미드화 이벤트에 해당합니다. 피크 1과 2, 3과 4 사이의 차이는 또 다른 탈아미드화(이번 경우 중쇄의 위치 387)에서 비롯됩니다. 이 탈아미드화 부위는 탈아미드화가 존재할 때 분명히 다르게 분해되는 두 개의 펩타이드(하나는 완전히 절단되고 하나는 잘못 절단됨)에 나타납니다.

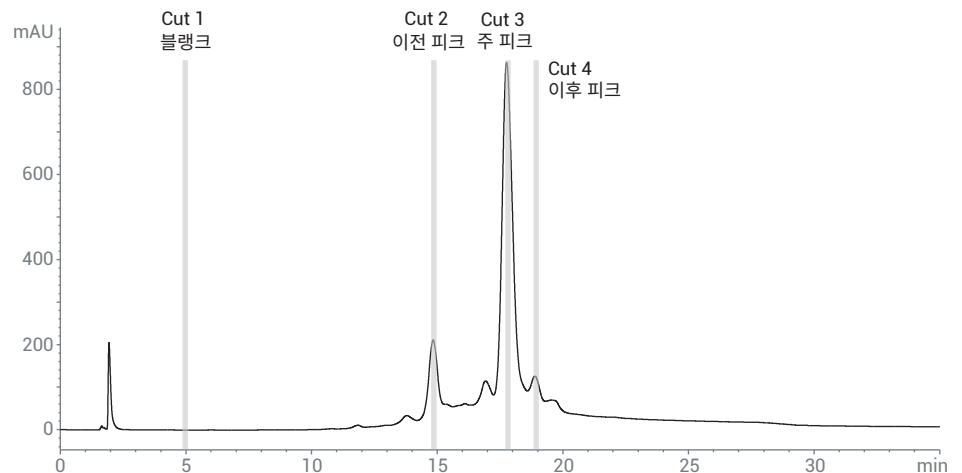


그림 2. 단일 클론 항체 trastuzumab의 CEX 크로마토그램. 참고문헌 13에 따른 조건. 수집한 heart-cut을 회색으로 표시.

Time (min)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540
------------	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

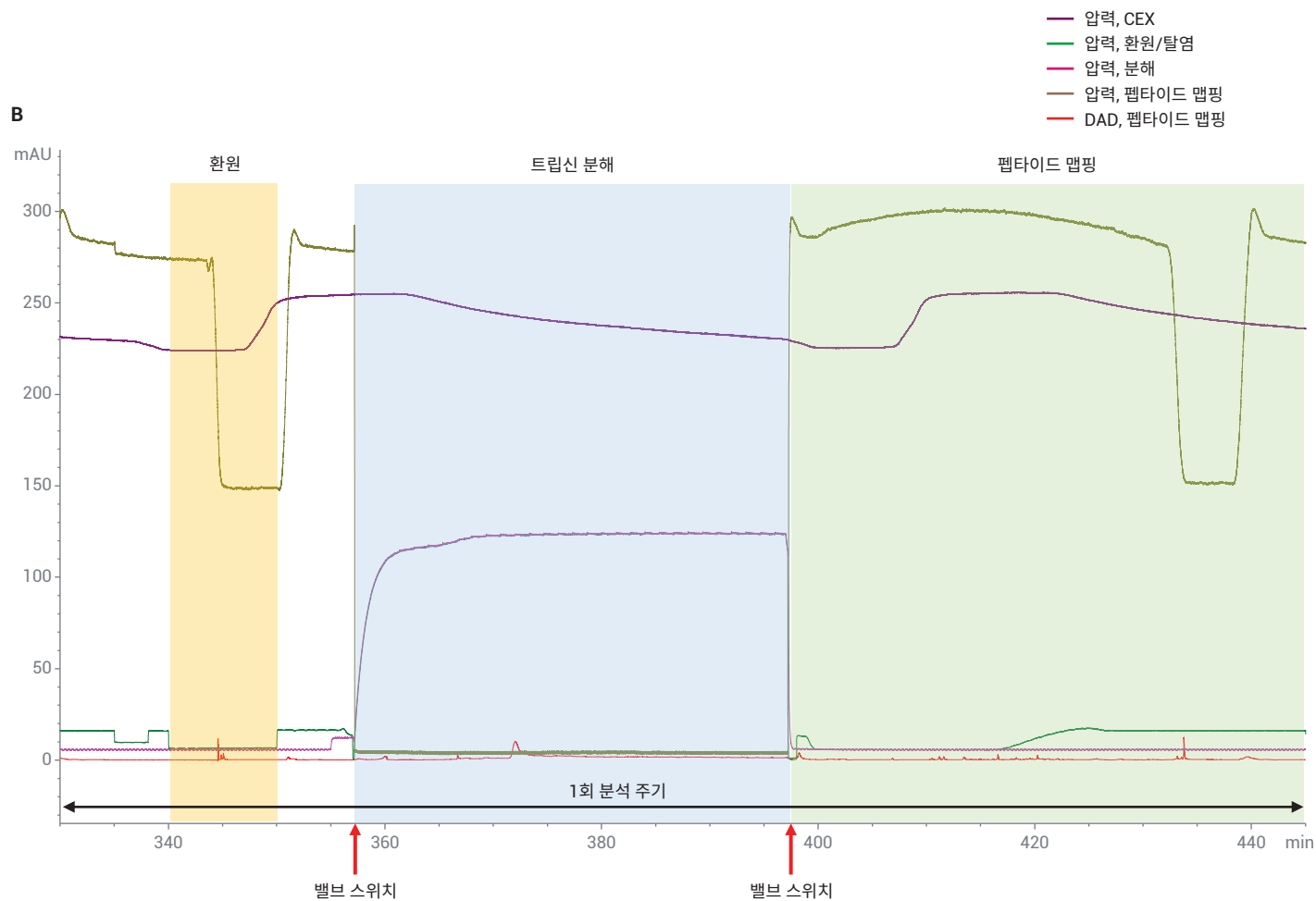
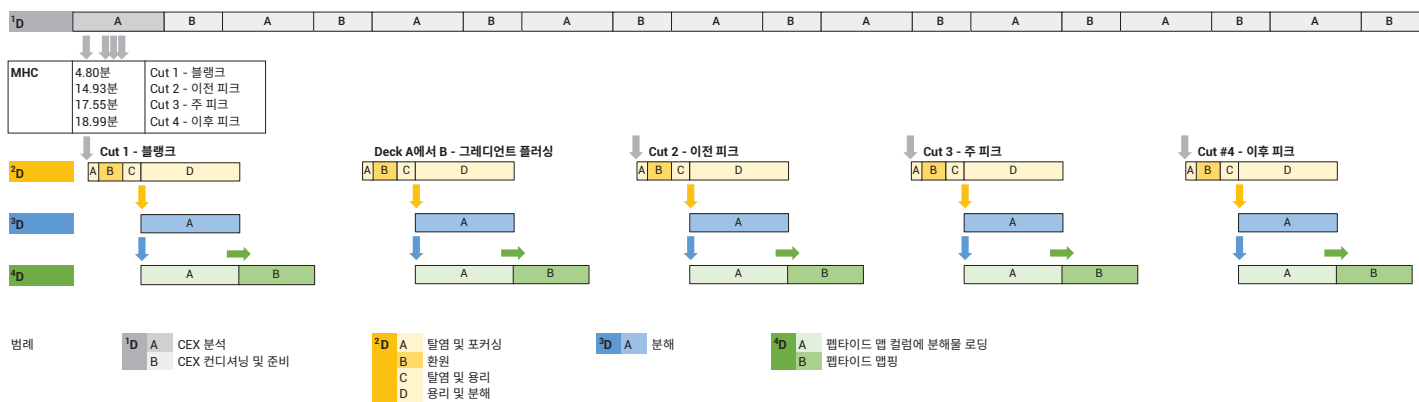


그림 3. (A) 그림 2에 표시된 대로 이전, 주 및 이후 피크와 CEX 블랭크 영역에 초점을 맞춘 4D-LC/MS 실험의 각 단계를 나타낸 개략도. (B) 주 CEX 피크의 탈염, 변성, 환원, 분해 및 펩타이드 맵핑에 초점을 맞춘 자료.

표 1. 온라인 RPLC/MS 기반 펩타이드 맵핑 후 CEX 주 피크에서 식별된 펩타이드.

RT	질량	부피	부피%	시퀀스	시퀀스 위치	표적 시퀀스 질량	차이 (ppm)	누락 절단
79.1	1880.9972	66635668	6.61	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	HC(001-019)	1880.9956	0.8	0
76.8	1109.5539	25727274	2.55	LSCAASGFNIK	HC(020-030)	1109.5539	0.0	0
81.2	2180.0864	16055279	1.59	LSCAASGFNIKDTYIHWVR	HC(020-038)	2180.0837	1.2	1
76.6	1088.5410	13618352	1.35	DTYIHWVR	HC(031-038)	1088.5403	0.6	0
76.2	829.4442	24354704	2.42	GLEWVAR	HC(044-050)	829.4446	-0.5	0
71.9	1083.5360	19879112	1.97	IYPTNGYTR	HC(051-059)	1083.5349	1.0	0
72.1	1181.6059	3708836	0.37	GRFTISADTSK	HC(066-076)	1181.6041	1.6	1
73.1	968.4819	26423682	2.62	FTISADTSK	HC(068-076)	968.4815	0.4	0
79.3	2260.1184	317550	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLR	HC(068-087)	2260.1158	1.1	1
81.3	3518.6474	320893	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDAVYYCSR	HC(068-098)	3518.6446	0.8	2
76.8	1309.6451	24858112	2.47	NTAYLQMNSLR	HC(077-087)	1309.6449	0.1	0
79.9	2568.1769	5903991	0.59	NTAYLQMNSLRAEDAVYYCSR	HC(077-098)	2568.1737	1.2	1
71.6	1276.5392	2994056	0.30	AEDAVYYCSR	HC(088-098)	1276.5394	-0.1	0
85.3	2783.2545	16863744	1.67	WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK	HC(099-124)	2783.2537	0.3	0
78.7	1185.6398	68405792	6.79	GPSVFPLAPSSK	HC(125-136)	1185.6394	0.4	0
77.7	1263.6494	36588096	3.63	STSGGTAALGCLVK	HC(137-150)	1263.6493	0.1	0
88.3	6655.2898	221285	0.02	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	HC(151-213)	6655.2857	0.6	0
79.8	1374.7171	214690	0.02	VDKKVEPKCDK	HC(214-225)	1374.7177	-0.4	3
84.9	2729.4093	7103687	0.71	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	HC(226-251)	2729.4073	0.7	0
73.4	834.4277	13166738	1.31	DTLMISR	HC(252-258)	834.4269	1.0	0
82.0	2897.4175	220680	0.02	DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK	HC(252-277)	2897.4151	0.9	1
84.3	4556.2041	547132	0.05	DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(252-291)	4556.1992	1.1	2
79.3	2081.0013	17858876	1.77	TPEVTCVVDVSHEDPEVK	HC(259-277)	2080.9987	1.2	0
83.0	3739.7881	18901388	1.88	TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(259-291)	3739.7828	1.4	1
78.6	1676.7966	5991668	0.59	FNWYVDGVEVHNAK	HC(278-291)	1676.7947	1.1	0
84.6	1807.0008	38113724	3.78	VVSVLTVLHQDWLNGK	HC(305-320)	1806.9992	0.9	0
83.3	2227.2022	63210428	6.27	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	HC(305-323)	2227.2001	0.9	1
82.4	2458.3080	2959244	0.29	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK	HC(305-325)	2458.3043	1.5	2
81.6	2886.5495	183447	0.02	VVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK	HC(305-329)	2886.5426	2.4	3
73.9	837.4964	38694668	3.84	ALPAPIEK	HC(330-337)	837.4960	0.5	0
75.4	1285.6662	875645	0.09	EPQVYTLPPSR	HC(348-358)	1285.6667	-0.4	0
75.6	1903.9366	36378636	3.61	EPQVYTLPPSREEMTK	HC(348-363)	1903.9350	0.8	1
80.5	2989.5263	1849832	0.18	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	HC(348-373)	2989.5253	0.3	2
78.4	1721.8701	179925	0.02	EEMTKNQVSLTCLVK	HC(359-373)	1721.8692	0.6	1
78.9	1103.6013	45037560	4.47	NQVSLTCLVK	HC(364-373)	1103.6009	0.4	0
81.6	2543.1245	29221288	2.90	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	HC(374-395)	2543.1241	0.2	0
85.7	4398.0307	5032842	0.50	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK	HC(374-412)	4398.0281	0.6	1
85.9	4954.3531	225838	0.02	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(374-417)	4954.3502	0.6	2
82.8	1872.9144	57538216	5.71	TPPVLDSDGSFFLYSK	HC(396-412)	1872.9146	-0.1	0
82.6	2429.2370	970108	0.10	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(396-417)	2429.2366	0.2	1
77.8	2986.3744	1042270	0.10	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	HC(418-442)	2986.3715	1.0	1
78.5	2743.2427	46302832	4.60	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	HC(420-442)	2743.2384	1.6	0
74.6	659.3487	26985572	2.68	SLSLSPG	HC(443-449)	659.3490	-0.5	0
76.7	1877.8787	2655889	0.26	DIQMTQSPSSLSASVGDR	LC(001-018)	1877.8789	-0.1	0
79.5	2551.2398	9011163	0.89	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR	LC(001-024)	2551.2371	1.1	1

RT	질량	부피	부피%	시퀀스	시퀀스 위치	표적 시퀀스 질량	차이 (ppm)	누락 절단
75.6	1989.9932	10501849	1.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	LC(025-042)	1989.9908	1.2	0
74.8	2286.1771	370620	0.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	LC(025-045)	2286.1757	0.6	1
84.3	1771.9519	27274394	2.71	LLIYSASFLYSGVPSR	LC(046-061)	1771.9509	0.6	0
85.8	4129.8936	10160642	1.01	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGGTK	LC(067-103)	4129.8892	1.1	0
85.3	4599.1803	2980494	0.30	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGGTKVEIK	LC(067-107)	4599.1792	0.2	1
84.5	4755.2888	6157193	0.61	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGGTKVEIKR	LC(067-108)	4755.2803	1.8	2
82.2	2101.1217	3894068	0.39	RTVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(108-126)	2101.1208	0.4	1
84.0	1945.0220	32666390	3.24	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(109-126)	1945.0197	1.2	0
90.2	3666.8789	1457746	0.14	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR	LC(109-142)	3666.8756	0.9	1
85.5	1739.8676	23403588	2.32	SGTASVVCLLNNFYPR	LC(127-142)	1739.8665	0.6	0
75.9	2676.2628	852142	0.08	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	LC(146-169)	2676.2627	0.0	1
80.0	4160.0087	11663837	1.16	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK	LC(146-183)	4160.0033	1.3	2
79.7	4766.2746	403170	0.04	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK	LC(146-188)	4766.2683	1.3	3
78.8	3618.7073	16391463	1.63	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK	LC(150-183)	3618.7021	1.5	1
78.6	4224.9705	725845	0.07	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK	LC(150-188)	4224.9670	0.8	2
77.3	4490.1265	478190	0.05	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK	LC(150-190)	4490.1209	1.3	3
78.9	6290.0188	328711	0.03	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(150-207)	6290.0085	1.6	4
79.0	1501.7515	2071466	0.21	DSTYLSSTLTLSK	LC(170-183)	1501.7512	0.2	0
74.0	2689.3218	547667	0.05	ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(184-207)	2689.3170	1.8	2
73.4	2083.0562	6116953	0.61	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(189-207)	2083.0521	2.0	1
75.3	1817.8988	25691042	2.55	VYACEVTHQGLSSPVTK	LC(191-207)	1817.8982	0.3	0

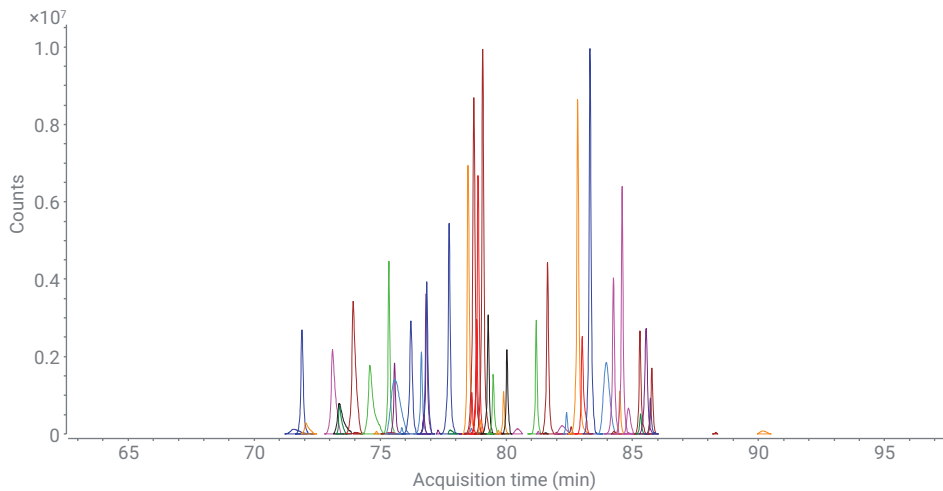


그림 4. 온라인 펩타이드 맵핑 후 CEX 주 피크에서 MS 식별된 펩타이드의 RPLC/MS 화합물 크로마토그램 오버레이.

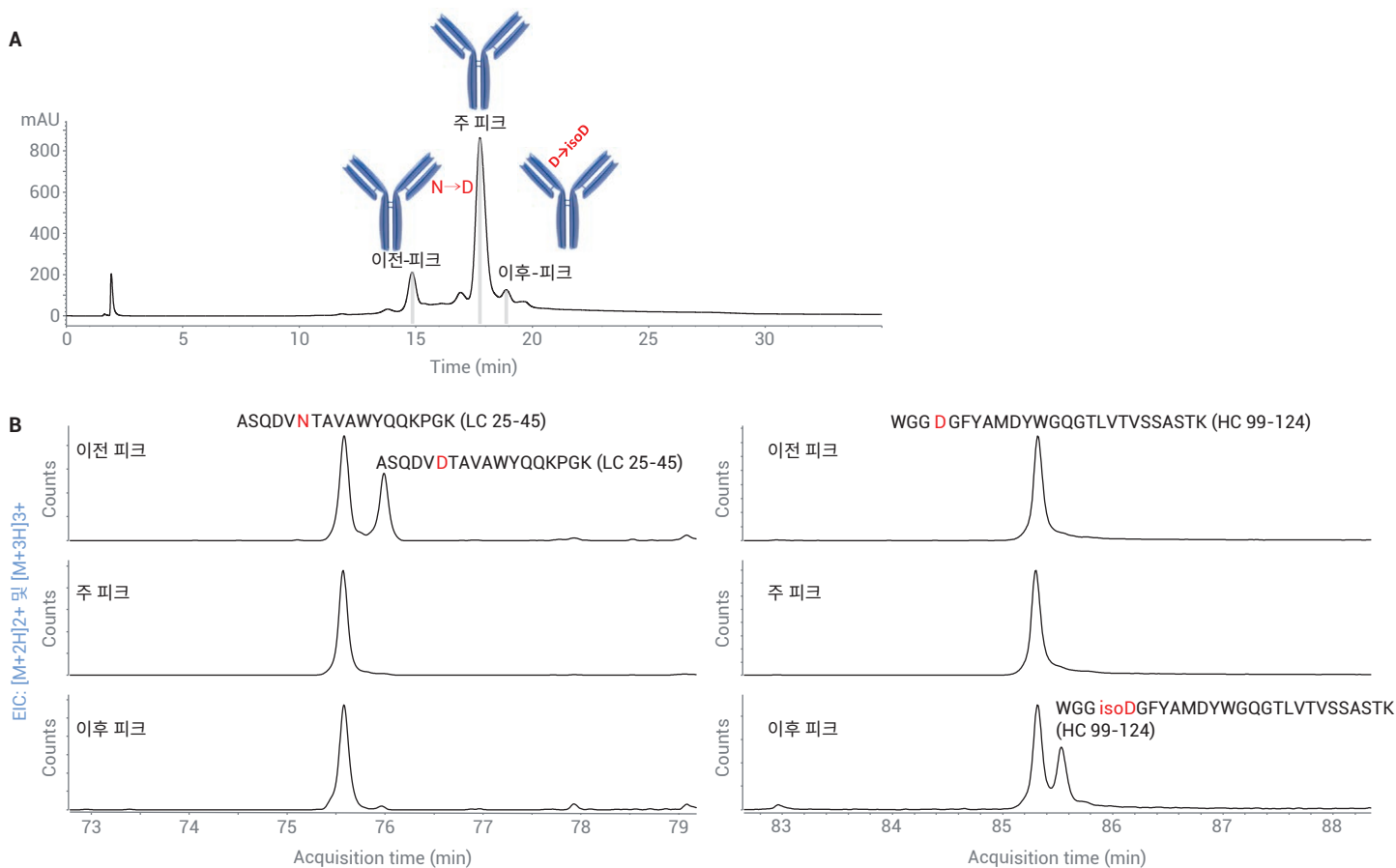


그림 5. Trastuzumab CEX 이전, 주 및 이후 피크의 온라인 펩타이드 맵핑. (A) CEX 크로마토그램 및 (B) 펩타이드 추출 이온 크로마토그램(경쇄 펩타이드 ASQDVNTAVAWYQQKPGK(LC 25-42), 탈아미드화된 경쇄 펩타이드 ASQDVTAVAWYQQKPGK(LC 25-42), 중쇄 펩타이드 WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124) 및 이성질화된 중쇄 펩타이드 WGGisoDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK(HC 99-124)).

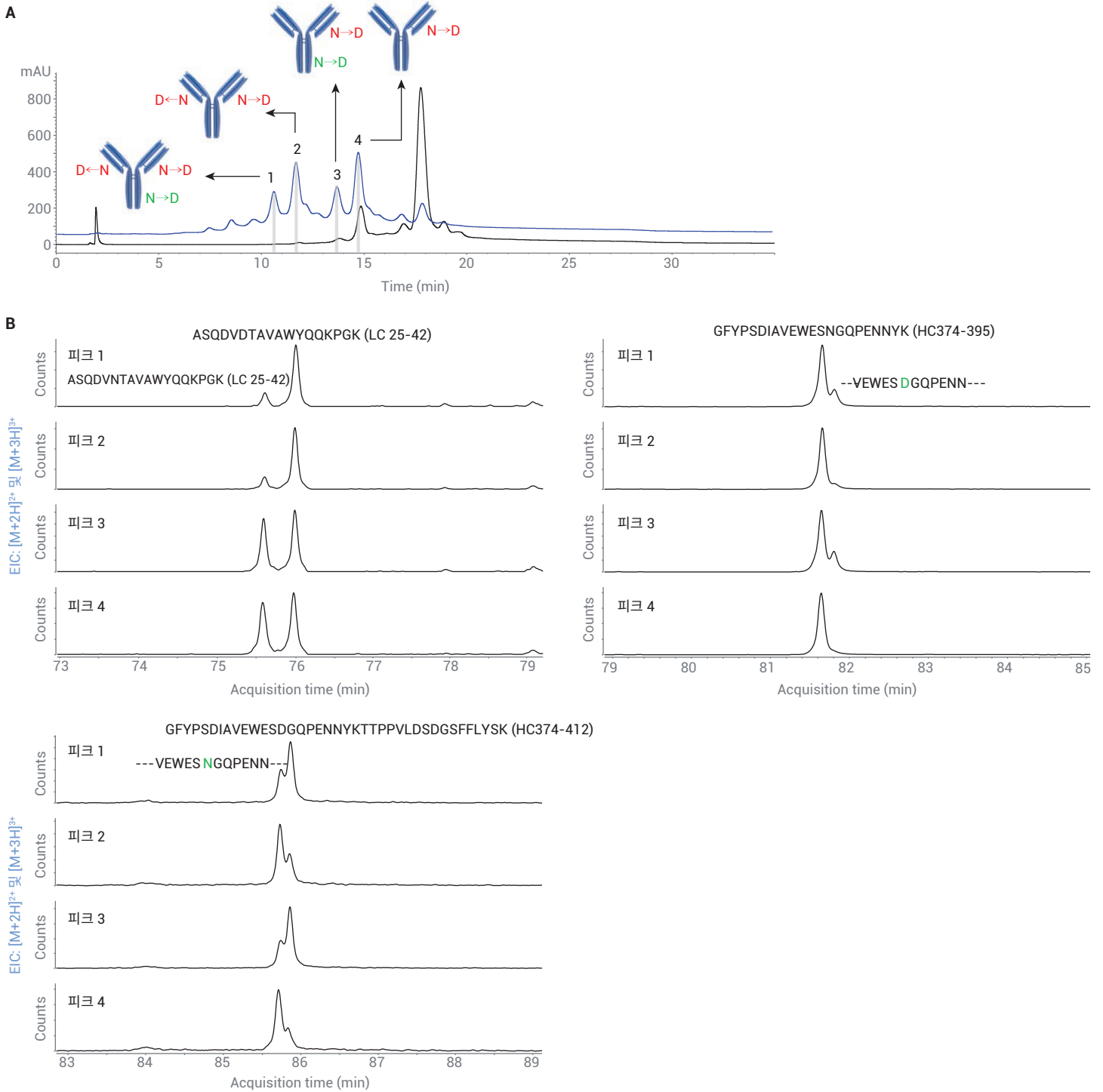


그림 6. 높은 pH 스트레스를 가한 trastuzumab CEX 피크 1, 2, 3 및 4의 온라인 펩타이드 맵핑. (A) 비-스트레스 및 높은 pH 스트레스를 받은 trastuzumab의 CEX 크로마토그램 오버레이 및 (B) 펩타이드 추출 이온 크로마토그램(경쇄 펩타이드 ASQDVNTAWAWYQQKPGK(LC 25-42), 탈아미드화된 경쇄 펩타이드 ASQDVDTAWAWYQQKPGK(LC 25-42), 중쇄 펩타이드 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK(HC 374-395), 탈아미드화된 중쇄 펩타이드 GFYPSDIAVEWESDGQPENNYK(HC 374-395), 중쇄 펩타이드 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK(HC374-412) 및 탈아미드화된 중쇄 펩타이드 GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK(HC 374-412)).

결론

Multiple heart-cutting을 사용한 ¹D CEX 분리 및 전하 변이체 피크 수집, ²D RPLC 기반의 탈염, 변성, 환원, ³D 트립신 분해 및 ⁴D RPLC/MS 기반 펩타이드 맵핑을 수행하는 기능을 통합한 완전 자동 4D-LC/MS 단백질 분석기를 소개하였으며 비-스트레스 및 고 pH 스트레스 trastuzumab의 CEX 프로파일에서 관찰된 산성 및 염기성 변이체 특성을 규명하는데 성공적으로 적용했습니다. 이 다차원 시스템은 InfinityLab 2D-LC 솔루션과 6545 LC/Q-TOF 시스템을 기반으로 합니다. 이 4D-LC/MS 설계는 첫 번째 차원의 CEX를 Protein A 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 등으로 변경하여 쉽게 구성할 수 있습니다.

참고 문헌

1. Sandra, K. *et al.* Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1335, 81-103.
2. Fekete, S. *et al.* Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480-507.
3. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 32, 992-1000.
4. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr. B* **2001**, 752, 233-245.
5. Stoll, D. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with UV Absorbance and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 51-60.
6. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149-157.
7. Stoll, D. R. *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8307-8315.
8. Sandra, K. *et al.* Multiple Heart-Cutting and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for the Characterization of the Antibody-Drug Conjugate Ado-Trastuzumab Emtansine. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 119-130.
9. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-6673EN, **2016**.
10. Gstöttner, C. *et al.* Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2119-2125.
11. Goyon, A. *et al.* Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14896-14903.
12. Goyon, A. *et al.* From Proof of Concept to the Routine Use of an Automated and Robust Multi-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Workflow Applied for the Charge Variant Characterization of Therapeutic Antibodies. *J. Chromatogr. A* **2020**, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460740.
13. Vandenheede, I. *et al.* Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-5273EN, **2014**.

2-In-1 바이오 프로세스 분석

Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC 및 InfinityLab LC/MSD iQ의 내부 밸브 전환을 통한 mAb 역가 측정과 소모 배지 분석 결합



저자

André Feith
Agilent Technologies, Inc.
독일, 발트브론

Natascha Verhagen,
Lena Gaugler,
Attila Teleki 및 Ralf Takors
Institute of Biochemical
Engineering
독일, 슈투트가르트 대학교

개요

주요 공정 변수(CPP) 및 주요 품질 속성(CQA)의 분석은 바이오 의약품 생산 중 최적의 공정 수율과 제품 품질을 모니터링하고 보장하는 데 중요한 역할을 합니다. HPLC 분석법은 이러한 파라미터를 분석하는 데 자주 사용됩니다. 그러나 이러한 도구를 구현하는 데에는 비용, 실험실 공간 및 작업량이 중요합니다. 이 응용 자료에서는 소모 배지 분석 및 Protein A 기반 역가 측정을 위해 자동화된 컬럼 선택 밸브를 사용하여 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ와 결합한 Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC 시스템의 활용을 소개합니다. 스마트 MS 검출을 사용하는 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)를 적용하여 중요한 세포 배양 배지 성분에 대해 우수한 선형성, 감도 및 선택성을 달성했습니다. 1260 Infinity II Bio-Inert LC 시스템에 사용된 quaternary 펌프를 통해 기기를 수동으로 재구성하지 않고도 UV 검출을 사용한 단일 클론 항체(mAb) 제품의 후속 분석이 가능했습니다. 컬럼 전환, 세척 또는 평형화와 같은 모든 필수 유지보수 작업을 Agilent OpenLab CDS 2 소프트웨어를 사용하여 수행할 수 있으며, 해당 소프트웨어는 21 CFR 파트 11 준수에 관한 FDA의 요구 사항을 완전히 충족할 수 있습니다.

서론

mAb와 같은 바이오 의약품 생산하기 위해 주로 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유류 세포주의 바이옱터 배양이 이용됩니다. 최적의 성장과 수율을 위해 이러한 생산 속주에는 당, 아미노산, 비타민 및 성장 인자와 같은 수많은 영양분이 필요합니다.¹ 국제의약품규제조사위원회(ICH)에서는 완제품의 품질을 테스트하는 것이 아닌, 공정 안에서 품질을 확립하는 것을 목표로 하는 설계기반 품질고도화(QbD)와 같은 개념을 통해 공정 및 제품을 분석할 것을 권장하고 있습니다.² 업스트림/다운스트림 공정 또는 품질 관리를 위한 다양한 분석 방법을 온라인, 앳-라인(at-line) 또는 오프라인 도구로 사용할 수 있습니다. 모니터링을 위한 중요 파라미터는 영양분 소비, 의약품 제제 및 제품 품질(CQA)입니다.¹ 제한된 실험실 공간에서 분석법을 준비하거나 전환하는 데에는 시간이 많이 걸릴 수 있으므로 여러 파라미터를 동시에 분석할 수 있는 진보된 분석법이 필요합니다. 이 응용 자료에서 나타난 두 가지 분석법은 다음과 같습니다: 극성 배지 화합물을 위한 HILIC, 제품 역가 측정을 위한 Protein A 친화도 크로마토그래피. 두 개의 분석법을 자동화된 컬럼 선택 밸브를 통해 LC/MSD iQ와 연결한 1260 Infinity II Bio-Inert LC 시스템 하나에서 실행했습니다.

실험

장비

LC/MSD iQ를 결합한 1260 Infinity II Bio-Inert LC 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다:

- Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert 펌프 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert Multisampler(G5668A), Agilent InfinityLab 시료 온도 조절 장치 (G5668A#101) 및 다중 세척 (multiwash) 옵션(G5668A#112) 장착
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A), Bio-inert 4-위치/10-포트 컬럼 선택 밸브(G5639A) 및 서로 다른 온도 구역 사용을 위한 분할기 어셈블리(G7116-60006) 장착
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 WR(G7115A), Bio-inert 표준 플로우 셀, 10mm(G4212-60007) 장착
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ(G6160AA)
- Agilent InfinityLab Flex Bench MS(G6015B)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.4

컬럼

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100mm, 2.7μm (p/n 685775-601)
- Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2mm(p/n 5069-3639)

밸브 구성

서로 다른 실행 사이에 재구성 없이 단일 LC 시스템에서 소모 배지 분석과 mAb 역가 분석을 수행하기 위해 생체 불활성의 bio-inert 4-위치/10-포트 컬럼 선택 밸브를 그림 1과 같이 설치 및 구성했습니다. 위치 3에 바이패스 캐필러를 추가하여 컬럼 선택 밸브의 상류측에서 LC 시스템이 세척되도록 함으로써 두 분석법에 사용되는 이동상 사이의 접촉과 잠재적인 염의 침전을 방지합니다.

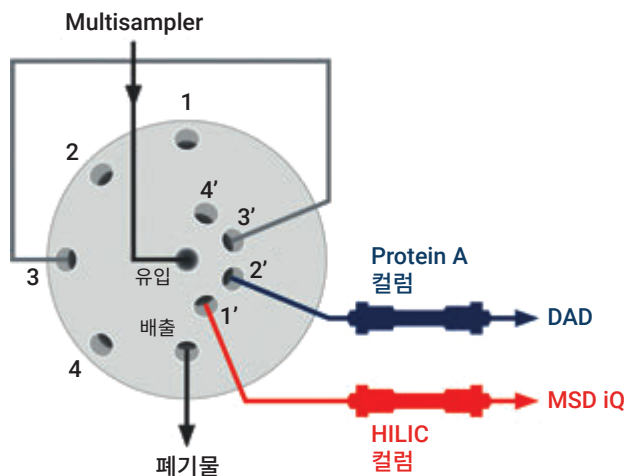


그림 1. 구성된 bio-inert 4-위치/10-포트 컬럼 선택 밸브의 개략도.

화학물질

LC 등급 아세트오니트릴은 Merck(독일, 다름슈타트)에서 구입했습니다. 초순수는 0.22 μ m 멤브레인 point-of-use 카트리지(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국). D-글루코스, L-글루탐산, L-글루타민, L-락트산 및 L-알라닐-L-글루타민은 Sigma-Aldrich(독일, 슈테인하임)에서 구입했습니다. 또한 프리믹스 형태의 아미노산 표준물질을 사용했습니다(p/n 5061-3330, 1nmol/ μ L). 포름산암모늄 및 포름산은 VWR(독일, 다름슈타트)에서 구했습니다.

표준물질 및 시료 전처리

모든 분석물질의 원액은 10mM 농도의 참조 표준물질 수용액으로 조제했습니다. 표준물질 수용액 또는 배양 상청액(슈투트가르트 대학, 생화학 공학 연구소에서 제공)을 Protein A 크로마토그래피를 통한 역가 분석을 위해 원심 분리(12.100 x g, 2분) 후 직접 주입하거나, HILIC 크로마토그래피를 위해 물로 1:10 희석하고 원심 분리한 다음 60%(v/v) 아세트오니트릴 및 30mM 포름산암모늄(pH 3.0)으로 조정했습니다. 배지 화합물의 크로마토그래피 성능을 향상시키기 위해 유기 용매 및 완충액으로 시료를 사전 희석해야 했습니다.

배양

CHO DP12 세포주를 생산하는 IgG₁ 단일 클론 항체(anti-IL-8)의 바이오리액터 배양은 1.0 L의 시작 부피로 배치 모드에서 수행되었습니다. 배지는 화학적으로 정의된 배지로서, L-글루타민, L-알라닐-L-글루타민, D-글루코스, 성장 인자 및 기타 다양한 아미노산으로 구성되었습니다(TC42, Xell AG, 독일). 시료를 매일 채취하여 0.2 μ m PES 시린지 필터를 통해 여과했습니다. 이렇게 얻은 상청액을 분석 전까지 -70°C에서 보관했습니다.

표 1. 소모 배지 분석을 위한 HILIC 분석법.

파라미터	값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100mm, 2.7 μ m
용매	A) 85% 아세트오니트릴/5% 2-프로판올/10% 물 + 30mM 포름산암모늄, pH 3 B) 10% 아세트오니트릴/5% 2-프로판올/85% 물 + 30mM 포름산암모늄, pH 3
그레디언트	0.00분 – 100% A/0% B 1.00분 – 100% A/0% B 11.00분 – 90% A/10% B 12.00분 – 0% A/100% B 12.01분 – 100% A/0% B 20.00분 – 100% A/0% B
유속	0.600mL/분
온도	20°C
MS 검출	자동 수집 모드/SIM(표 3 참조)
주입	주입량: 1 μ L 시료 온도: 4°C 다중 세척: 90% 아세트오니트릴/10% 물로 5초(S1, 니들 세척)

표 2. mAb 역가 분석을 위한 Protein A 분석법.

파라미터	값
컬럼	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2mm
용매	C) 50mM 인산나트륨 완충액 pH 7.4 D) 500mM 아세트산, pH 2.6
그레디언트	0.00분 – 100% C/0% D 0.50분 – 100% C/0% D 0.60분 – 0% C/100% D 1.70분 – 0% C/100% D 1.80분 – 100% C/0% D 3.5분 – 100% C/0% D
유속	1mL/분
온도	30°C
UV 검출	280nm/4nm, 기준 파장360nm/100nm, 20Hz
주입	주입량: 50 μ L 시료 온도: 4°C 다중 세척: 100% 물로 5초(S2, 니들 세척)

결과 및 토의

CHO 세포 배양을 위한 화학적으로 정의된 세포 배양 배지는 HILIC 컬럼에서 사전 유도체화 없이 분석할 수 있는 여러 극성 화합물들로 구성되어 있습니다. 이러한 화합물의 대부분은 발색단이 없기 때문에 표준 UV 검출은 적합하지 않습니다. 이 경우 LC/MSD iQ에서 제공하는 사용하기 쉬운 질량 검출로 특이성과 선택성을 높일 수 있습니다. 자동 수집 모드를 사용하여, 설정된 LC 유속 및 화합물의 이온 질량에 따라 이온화원 파라미터 및 fragmentor 전압이 자동으로 조정되었습니다. 오직 고유의 SIM 채널만 수동으로 구성했습니다. 분리를 위해 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 컬럼을 낮은 pH에서 포름산암모늄 완충액과 함께 사용했습니다 (표 1). 또한, HILIC 분리에서 피크 모양을 최적화하기 위해 5%(v/v) 2-프로판올을 유기 변형제로 이동상 A 및 B에 첨가했습니다. 그림 2는 유기산, 아미노산, 디펩타이드를 포함하는 세포 배양 배지에 일반적으로 존재하는 16가지 극성 화합물의 분리를 보여줍니다.

LC/MSD iQ의 외부(표준법) 정량 능력을 입증하기 위해 모든 화합물에 대한 다음 농도의 10포인트 검량선을 준비했습니다: 1, 2, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200 μ M. 또한 검출 한계(LOD, S/N = 3)를 측정하기 위해 OpenLab CDS의 자동 신호 대 잡음비(S/N) 계산(P2P)을 사용하여 모든 화합물에 대한 세 가지 최저 수준의 평균을 구했습니다. 표 3과 같이 대부분의 분석물질에 대해 우수한 선형성($R^2 > 0.99$)과 1 pmol(온-컬럼) 미만의 LOD가 확인된 만큼, LC/MSD iQ가 작은 실험실 설치 공간에서 사용자 친화적인 정량 분석을 얻는 데 탁월한 선택임을 보여줍니다.³

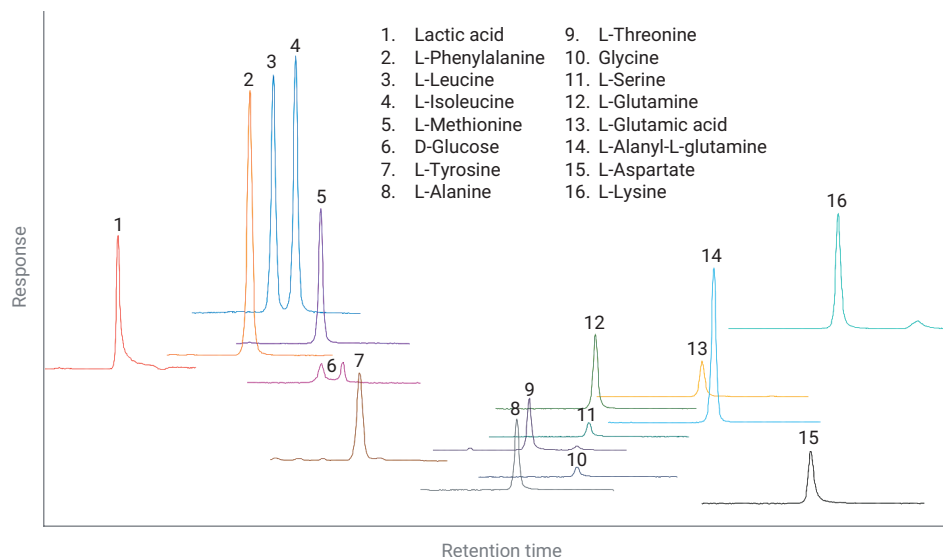


그림 2. HILIC 분석법 및 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 검출기를 사용하여 표준물질(200 μ M)로 분석한 세포 배양 배지 화합물의 크로마토그램.

표 3. HILIC 소모 배지 분석에서 분석된 각 화합물 표준물질에 대한 MS 및 정량 파라미터.

화합물	SIM(m/z)/극성	Fragmentor (V)	머무름 시간 (분)	검량 범위(μ M)	R^2	LOD (pmol 온-컬럼)
Lactic acid	89 / -	90	1.734	1~200	0.9979	0.63
L-Phenylalanine	166 / +	100	3.611	1~200	0.9956	0.41
L-Leucine	132 / +	90	3.951	1~200	0.9964	0.86
L-Isoleucine	132 / +	90	4.274	1~200	0.9964	0.67
L-Methionine	150 / +	100	4.615	1~200	0.9966	0.23
D-Glucose	179 / -	100	4.917	20~200	0.9934	12.24
L-Tyrosine	182 / +	100	5.134	2~200	0.9997	1.09
L-Alanine	90 / +	90	7.358	1~200	0.9980	0.88
L-Threonine	120 / +	90	7.534	1~200	0.9984	0.90
Glycine	76 / +	90	8.218	5~200	0.9991	3.72
L-Serine	106 / +	90	8.387	5~200	0.9982	2.80
L-Glutamine	147 / +	90	8.512	2~200	0.9989	1.72
L-Glutamic acid	148 / +	90	10.100	2~200	0.9996	1.46
L-Alanyl-L-glutamine	218 / +	100	10.158	1~200	0.9952	0.54
L-Aspartate	132 / -	90	11.537	2~200	0.9958	1.19
L-Lysine	147 / +	90	11.969	1~150	0.9901	0.29

두 번의 CHO 세포 배양(A + B)을 수행하고 바이오리액터를 매일 샘플링하여 소모 배지 분석에 후자의 HILIC 분석법을 적용할 수 있는지 알아보았습니다. 영양성분의 동적 프로파일을 그림 3에 나타냈습니다. 왼쪽에는 배양 중에 감소하는 농도를 갖는 모든 화합물이 나타나 있습니다. 농도가

증가하는 화합물은 도표의 오른쪽에 표시되어 있습니다. 전반적으로 배지 성분은 전형적인 거동을 나타냅니다. 그 예로, D-글루코스(탄소 공급원) 및 L-글루타민/ L-알라닐-L-글루타민(질소 공급원)의 소비 또는 오버플로우 물질대사 도중 부산물로서의 젖산 형성을 들 수 있습니다.

화합물 형성 또는 소비 속도에 나타나는 약간의 차이는 CHO 세포 배양의 성능이 다를 수 있음을 보여줍니다(A vs. B). 배양 중에 이 HILIC 분석법을 적용하면 공정을 제어하고 배양이 끝날 때 생성물 수율을 최적화하기 위해 공정 중(in-process) 조치를 취할 수 있습니다.

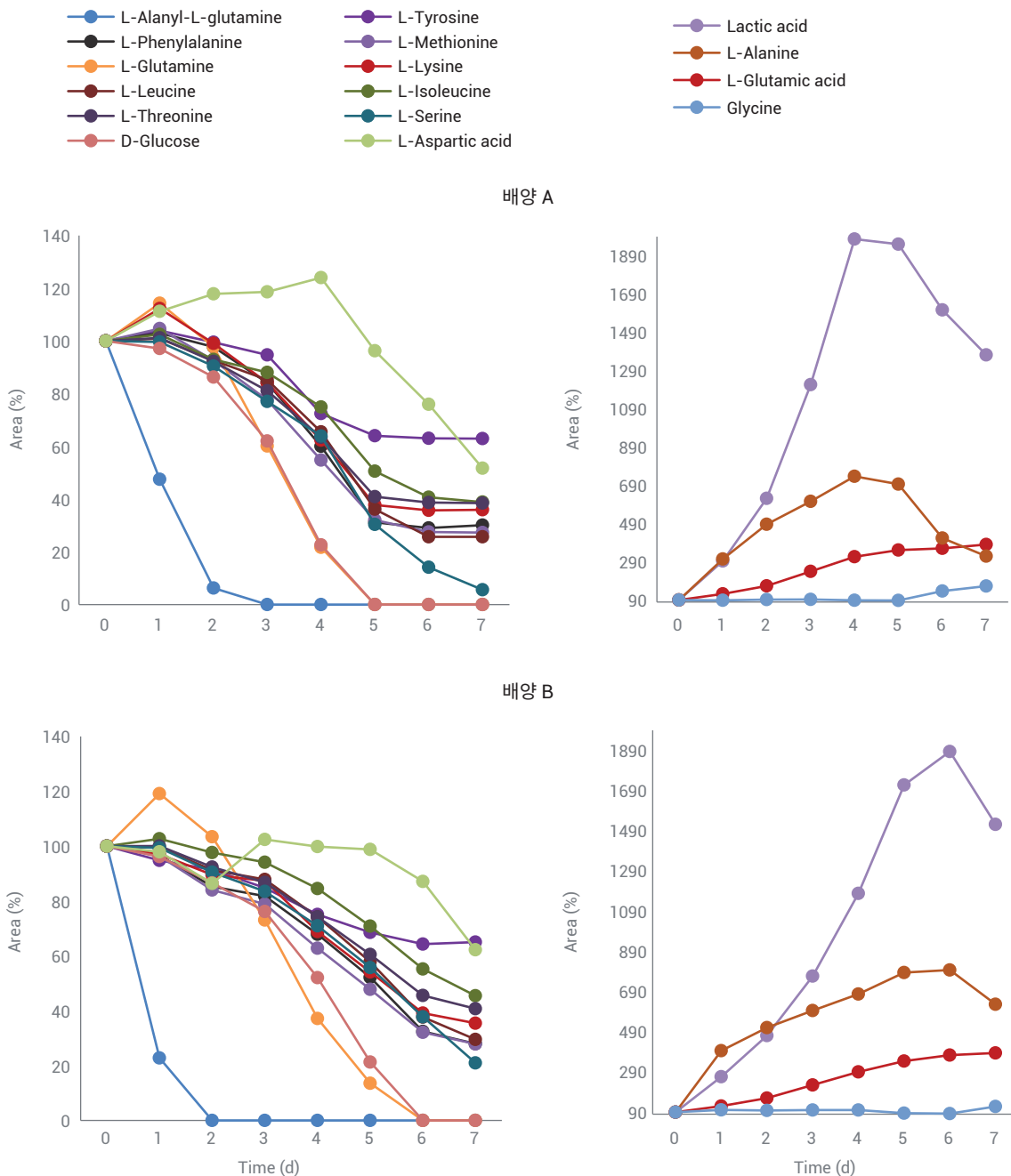


그림 3. 세포 배양 중 HILIC 분석 배지 화합물의 프로파일.

공정 변수를 추가로 모니터링하기 위해 Protein A 친화도 크로마토그래피를 동일한 1260 Infinity II Bio-Inert LC 시스템에 적용했습니다. 이 시스템은 완전한 생체 불활성 유동 경로를 갖추고 있으며 특히 흡착하는 성질의 생체분자 및 대사체에 적합합니다. 사용 가능한 4개의 용매 채널 (HILIC의 경우 A + B, Protein A의 경우 C + D)을 모두 사용하여 수동 용매 전환 없이 두 가지 분석법을 모두 실행할 수 있었습니다. 또한 두 컬럼을 동시에 설치한 상태에서 서로 다른 온도로 제어하고 내부 컬럼 선택 밸브로 전환할 수 있어 수작업을 더욱 줄일 수 있었습니다. 개발 및 최적화된 Protein A 분석법을 표 2에 나타냈습니다. 그림 4는 6일의 배양 기간에 걸친 배양 A의 Protein A 분석법에 대한 UV 크로마토그램을 보여줍니다. mAb 역가는 6일째에 최대치에 도달했고 그 후 감소했습니다. 이는 Protein A에 결합하는 mAb의 Fc 영역이 열적 또는 효소적으로 분해됨에 따른 것으로 보입니다.

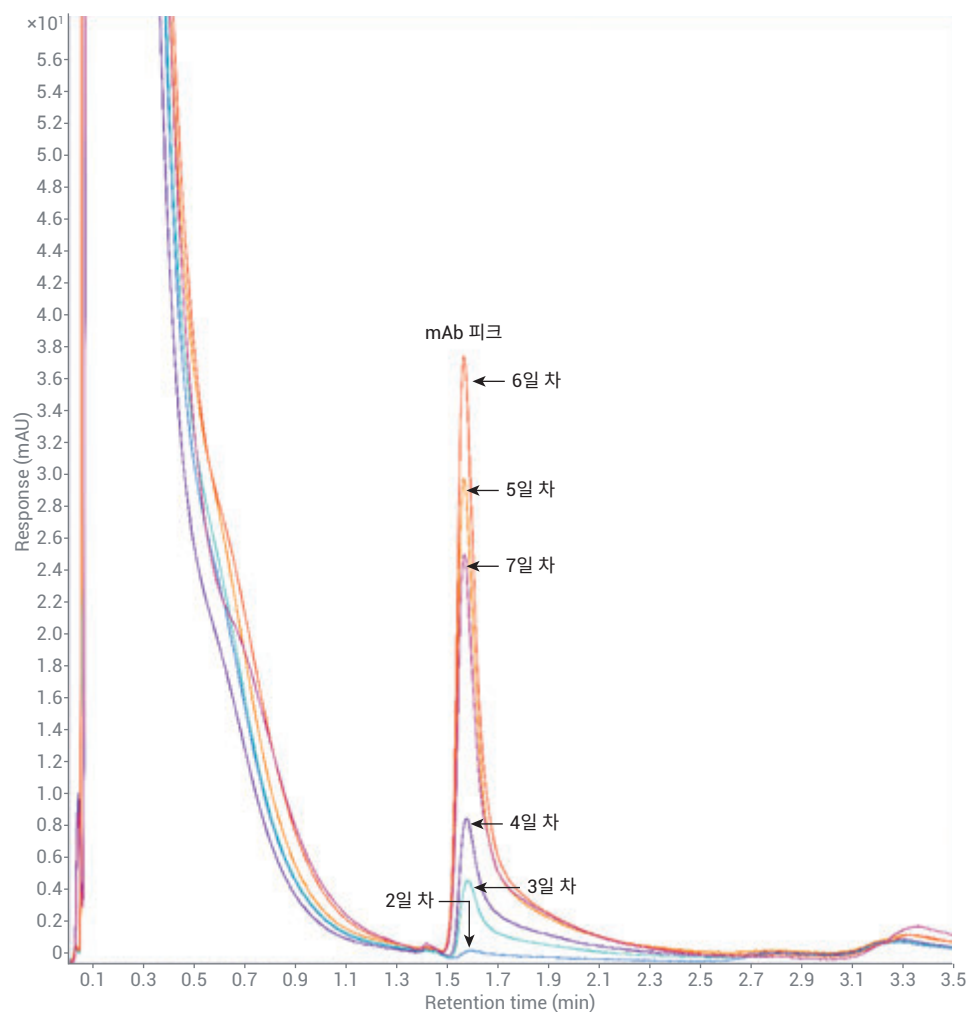


그림 4. Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(280nm)와 결합된 Protein A 분석법으로 분석한 배양 A의 상층액 시료 크로마토그램(발효 6일간의 경과).

OpenLab은 mAb 피크를 적분한 후 Peak Explore라는 기능을 제공합니다. 그림 5A는 Peak Explore 보기의 스냅샷으로, Y축은 서로 다른 주입을 나타내고 X축은 해당 머무름 시간을 나타냅니다. 적분된 mAb 피크의 면적이 원으로 표시되며 원의 직경은 mAb의 양과 비례합니다. 이 Peak Explorer 보기는 동적 mAb 생산을 정성적으로 간단하고 빠르게 보여줍니다. 배양 A와 B의 동적 mAb 축적을 비교할 때 mAb 증가에서 유의미한 차이가 확인했고(그림 5B), 이는 다시 공정 중 조정이 필요한 신호가 될 수 있습니다. 두 가지 분석법을 결합하면 생산 또는 공정 개발 환경에서 오프라인 공정 분석을 사용할 수 있는 훌륭한 도구가 될 수 있습니다.

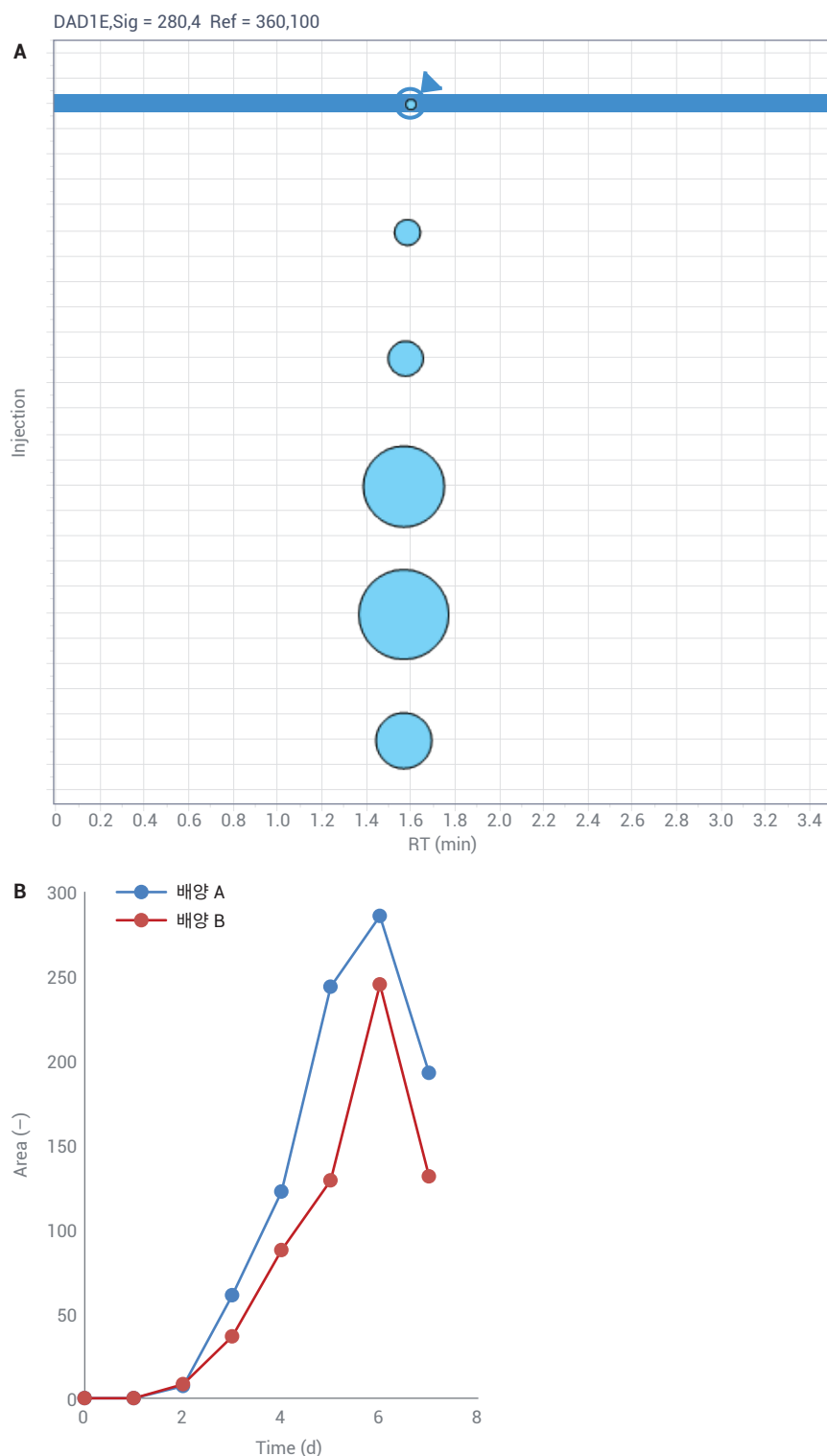


그림 5. Agilent OpenLab CDS에서 배양 A에 대한 Peak Explorer 보기의 스냅샷 (A) 및 배양 기간 동안의 mAb 생성 (B).

결론

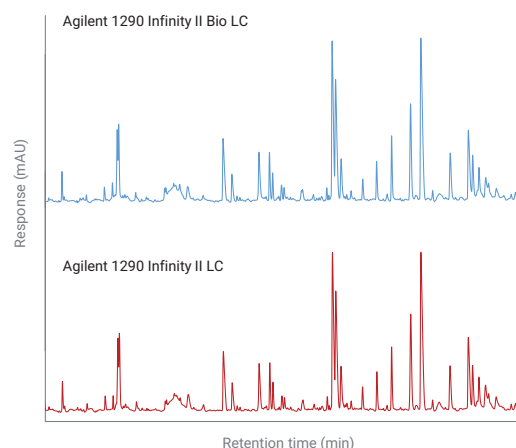
공정 분석 기술(PAT)은 생산 공정 중 성장률, 생성물 수율 및 생성물 품질과 같은 생물 공정 파라미터를 조정하고 개선하기 위한 강력한 도구입니다. 필수 전제 조건으로서, 이 응용 자료에서는 공정 제어 수단으로 HPLC 측정을 적용하는 방법을 보여주었습니다. LC/MSD iQ를 검출기로 사용하여 제시한 HILIC 분석은 사용하기 쉬운 자동 수집 모드를 통해 주요 세포 배양 영양성분에 대해 우수한 선형성, 감도 및 선택성을 보여주었습니다. 자동 컬럼 전환 기능과 함께 LC/MSD iQ와 연결된 1260 Infinity II Bio-Inert LC에서 소모 배지 분석과 Protien A 친화도 크로마토그래피를 결합함으로써 수작업이 크게 줄어들었습니다. 21CFR 파트 11에 관한 FDA의 요구 사항을 충족하는 데 필요한 모든 서비스를 제공하는 공인된 OpenLab CDS 2 소프트웨어와 함께 구성하는 경우, 이 옛-라인 HPLC 솔루션은 최신 QbD 환경의 일부로서 완전히 적합합니다.

참고 문헌

1. Tripathi, N. K.; Shrivastava, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, 7.
2. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2). **2009**. 웹사이트: https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf. (접속: 2020년 4월 20일)
3. Feith, A. *et al.* HILIC-Enabled ¹³C Metabolomics Strategies: Comparing Quantitative Precision and Spectral Accuracy of QTOF High- and QQQ Low-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites* **2019**, 9, 63.

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템으로의 원활한 분석법 이전

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템 대비 우수한 성능과
높은 분석법 호환성을 보여주는 펩타이드 맵핑 분석



저자

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

개요

펩타이드 맵핑을 위해서는 바이오 의약품의 1차 구조와 번역 후 변형(PTM)을 분석하기 위해 높은 정밀도를 제공하며 신뢰할 수 있는 강력한 분석법이 필요합니다. 그러나 검증된 분석법의 경우는 분석법 이전 가능성과 호환성이 문제가 될 수 있습니다. 이 응용 자료는 새로운 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 사용했을 때 분석법 이전이 쉽고 편리함을 보여줍니다. 12개의 선택된 펩타이드에 대해 0.039%의 우수한 평균 상대 머무름 시간 편차를 기반으로, 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템 간 머무름 시간의 차이가 0.17%에 불과한 것으로 나타났습니다. 이들 LC 시스템을 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 결합하여 피크 존재비에 대한 추가적인 비교 통계 분석을 실시한 결과, 두 시스템 간에 큰 차이가 없는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 사실은 새로운 1290 Infinity II Bio LC가 UV 또는 MS 기반 펩타이드 맵핑 워크플로에 이상적인 선택임을 제시했습니다.

서론

한 기기에서 다른 기기로의 분석법 이전과 호환성은 다양한 산업 분야의 실험실에서 중요한 부분입니다.¹ 특히 바이오의약품 산업에서 기기간(I2I) 분석법 이전은 검증된 분석법의 경우 매우 중요합니다. 1290 Infinity II LC에서 1290 Infinity II Bio LC로의 원활한 분석법 이전을 입증하기 위해 ICH 가이드라인 Q6B.2에 설명된 생물학적 제제 평가에서 상당한 관련성을 가진 펩타이드 맵핑 워크플로를 선택했습니다.² NISTmAb의 트립신 분해물을 사용하는 이 응용 자료는 1290 Infinity II Bio LC 덕분에 분석법 이전이 간단할 수 있음을 보여줍니다.

실험

장비

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 각각 연결된 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템 및 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다.

Agilent 1290 Infinity II Bio LC:

- Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler(G7137A), 시료 온도 조절 장치(옵션 101) 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A), Standard Flow Quick Connect Bio 열 교환기(G7116-60071) 및 두 개의 애질런트 열평형 장치 (G7116-60013) 장착

- 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)

Agilent 1290 Infinity II LC:

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167A), 시료 온도 조절 장치(옵션 #101) 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A), Standard Flow Quick Connect 열 교환기(G7116-60015) 및 두 개의 애질런트 열평형 장치 (G7116-60013) 장착
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (VWD) (G7114B), VWD용 Micro Flow Cell(3mm, 2μL, RFID) 장착
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF(G6545XT)

소프트웨어

- Agilent MassHunter 워크스테이션 데이터 수집(B.09.00)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis(B.10.00)
- Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00)

컬럼

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8μm(제품 번호 959759-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guards, 2.1 × 5mm, 1.8μm(제품 번호 821725-901)

화학물질

LC 등급 아세트오니트릴, 중탄산암모늄, *tris*(2-carboxyethyl)phosphine 및 2-iodoacetamide는 Merck(독일, 다름슈타트)에서 구입했습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 point-of-use 카트리지를 (Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, 미국 매사추세츠, 빌레리카). 포름산은 VWR(독일, 다름슈타트)에서 구입했습니다. 트립신(돼지, 질량 분석 등급)은 G-Biosciences(미국, 세인트 루이스)에서 구입했습니다.

시료 전처리

100μL의 중탄산암모늄(100mM)에 0.8mg의 Agilent-NISTmAb(제품 번호 5191-5744)를 배합한 용액에 2μL의 *tris*(2-carboxyethyl)phosphine(TCEP, 200mM)을 첨가하여 변성 및 환원시킨 다음 60°C에서 1시간 동안 배양했습니다. 4μL의 2-iodoacetamide(IAM, 200mM)로 알킬화한 후(상온에서 1시간), 2μL의 TCEP로 잉여의 IAM을 퀘칭한 다음 (상온에서 1시간), 0.8mL의 25mM 중탄산암모늄으로 희석한 후, 효소 트립신을 첨가했습니다(NISTmAb와 트립신을 w/w로 20:1). 37°C에서 밤새 분해한 후, 2μL의 포름산을 첨가하여 생성된 현탁액의 pH를 pH 4 미만으로 감소시켰습니다.

결과 및 토의

1290 Infinity II Bio LC와 1290 Infinity II LC 사이의 우수한 성능과 분석법 이전을 보여주기 위해 NISTmAb의 트립신 분해물을 UV 및 MS 검출로 분석했습니다. 두 시스템의 컬럼 외 부피가 유사하도록 동일한 길이와 직경의 캐필러리를 장착했습니다. 그러나 1290 Infinity II Bio LC는 특히 흡착하는 성질이 있는 생체분자에 적합하도록 철을 완전히 함유하지 않은 유동 경로를 특징으로 합니다. 두 분석 모두에 대해 동일한 ZORBAX RRHD Eclipse Plus 컬럼 및 분석법 파라미터가 사용되었습니다 (표 1). 그림 1은 두 시스템에서 획득한 펩타이드 맵의 크로마토그램을 보여줍니다. 감지할 수 있는 차이가 거의 없이 펩타이드 패턴 간의 탁월한 유사성을 확인할 수 있습니다.

표 1. Agilent 1290 Infinity II LC 및 Bio LC를 위한 펩타이드 맵핑 분석법.

파라미터	값
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8µm + Fast Guard 2.1 × 5mm
용매	A) 물 + 0.1% 포름산 B) 아세트ونی트릴 + 0.1% 포름산
그라디언트	0.00분 – 2% B 44.00분 – 45% B 44.01분 – 97% B 50.00분 – 97% B 50.01분 – 2% B 60.00분 – 2% B
유속	0.300mL/분
온도	열 평형 장치가 설치된 경우 40°C
UV 검출	VWD: 214nm, 10Hz/MS: 표 2 참조
주입	주입량: 15µL 시료 온도: 4°C 세척: 물로 3초(플러시 포트)

표 2. 펩타이드의 All Ions MS/MS 분석을 위한 이온화원 및 MS 파라미터.

파라미터	값
기기	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
가스 온도	300°C
건조 가스 유속	13L/분
Nebulizer	40psig
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유속	12L/분
Vcap	4,000V
노즐 전압	500V
Fragmentor	175V
스키머	65V
Oct 1 RF Vpp	750V
수집 모드	양이온, 확장된 동적 측정 범위(2GHz)
질량 범위	m/z 100~1,700
수집 속도	6스펙트럼/초
충돌 에너지	All Ions MS/MS—0V, 10V, 25V

더 나은 평가를 위해 세 가지 일반 분리능(R_s) 값을 두 분리 모드에 대해 계산했으며 (그림 1) 대단히 우수한 공통성을 보여주었습니다. 머무름 시간 정밀도와 관련하여 1290 Infinity II Bio LC 및 1290 Infinity II LC의 성능을 분석하기 위해 12가지 펩타이드를 선정하고 10회 연속 주입을 바탕으로 머무름 시간의 해당 상대 표준 편차(RSD)를 계산했습니다. 그림 2는 시스템에 관계없이 모든 RSD 값이 0.1% 미만임을 나타내며, 이것은 Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프 및 1290 Infinity II 고속 펌프의 뛰어난 성능을 입증하는 것입니다. 12가지 펩타이드의 평균 RSD 값은 1290 Infinity II Bio LC의 경우 0.039% 까지 낮아져 이 시스템이 견고하고 신뢰할 수 있는 펩타이드 매핑을 위한 탁월한 선택임을 보여줍니다. 그러나 높은 성능 외에도 다양한 LC 시스템 간의 분석법 호환성은 많은 실험실에서 매우 중요합니다.

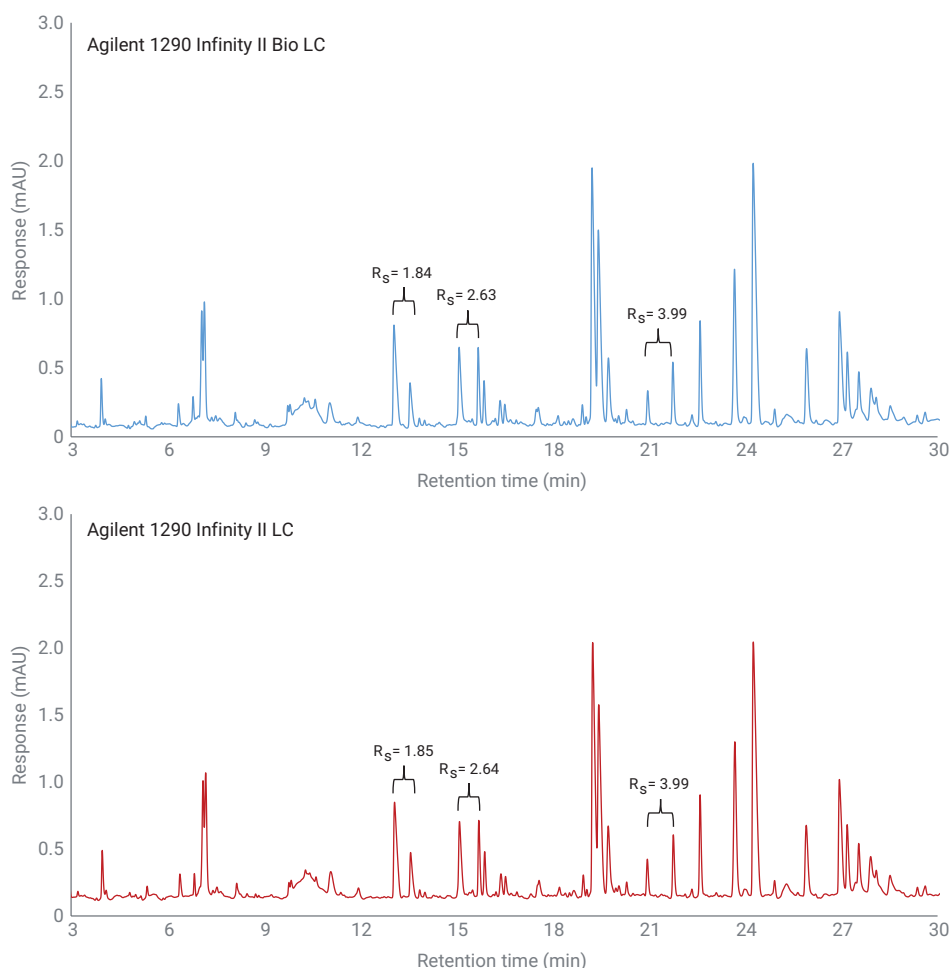


그림 1. 동일 분석법을 이용해 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 및 Agilent 1290 Infinity II LC로 분리한 NISTmAb 트립신 분해물의 크로마토그램(표 1).

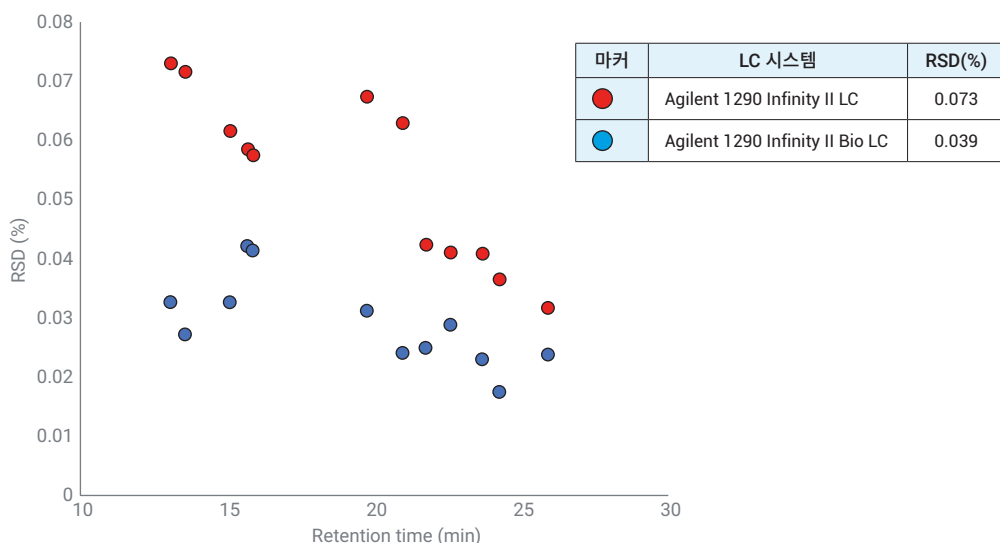


그림 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 및 Agilent 1290 Infinity II LC의 상대 머무름 시간 정밀도(RSD) 값.

검증된 환경 또는 규정을 준수하는 환경에서 분석물질을 식별하려면 절대 머무름 시간이 특정 범위 내에 있어야 합니다. 두 LC 시스템에 대한 12가지 펩타이드의 머무름 시간 평균을 측정하고 1290 Infinity II Bio LC와 1290 Infinity II LC 사이의 머무름 시간 편차를 계산하여 성능을 평가했습니다. 펩타이드 머무름 시간 평균은 그림 3의 표에 나타내었으며 해당 편차는 막대 그래프로 표시했습니다. LC 시스템 사이에서 최대 0.17%까지인 최소한의 편차가 계산되어 1290 Infinity II Bio LC와 1290 Infinity II LC 간에 분석법이 원활하게 이전되었음을 보여줍니다.

분석법 호환성을 추가적으로 조사하기 위해 두 시스템을 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 연결했습니다. 비표적 접근 방식에서 MS 검출기는 All Ions 모드(표 2)로 사용되어 충돌 셀 안의 모든 전구체 이온을 주기적으로 조각화했습니다. 정보가 풍부하게 담긴 이러한 데이터 세트는 두 LC 시스템에 대해 Agilent MassHunter Mass Profiler(B.10.00) 소프트웨어로 평가하여 식별된 피크의 존재비 차이를 전체적으로 파악했습니다. 두 LC 시스템 모두에 NISTmAb의 트립신 분해물을 10회 연속 주입하여 후속 통계 분석의 근거로 삼았습니다. 존재비가 가장 큰 피크 250개를 상관 분석으로 평가했으며 해당 로그-배율 변화(log-fold change)를 그림 4A에 나타내었습니다. 피크가 두 시스템에서 다르지 않으면 그림 4A에서 1x 라인 주위에 클러스터링되어 피크 면적에 큰 차이가 없음을 보여줍니다. 그러나 하나의 시스템에서 2배 더 높은 존재비를 갖는 피크가 있는 경우에는 2x 라인 주위에 위치하게 될 것입니다. 그래픽 데이터 결과를 보면 대부분의 피크에 대해 큰 차이가 없음을 분명하게 알 수 있습니다. 최대 75%의 피크에 대한 존재비가 10% 이내에서 달랐습니다.

LC 시스템	펩타이드 머무름 시간 평균(분)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Agilent 1290 Infinity II LC	13.082	13.577	15.104	15.704	15.887	19.751	20.968	21.769	22.599	23.684	24.261	25.907
Agilent 1290 Infinity II Bio LC	13.062	13.559	15.084	15.677	15.860	19.743	20.961	21.742	22.585	23.663	24.249	25.907

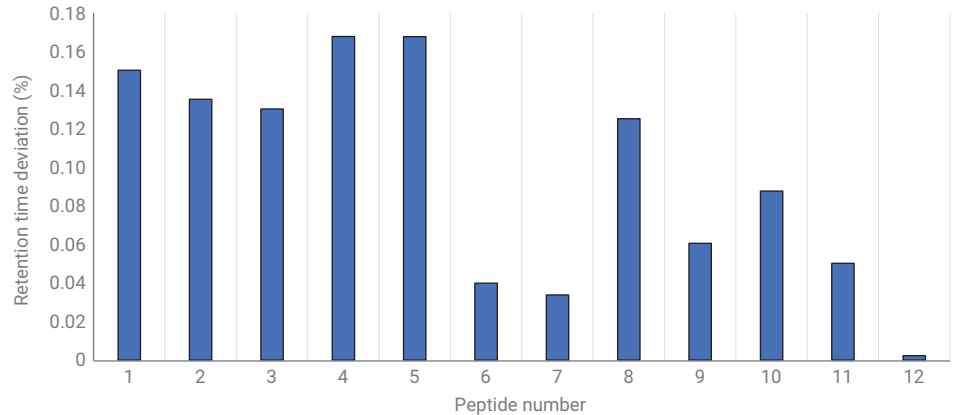


그림 3. 선택한 12개의 펩타이드에 대한 머무름 시간 평균과 두 LC 시스템 간의 편차.

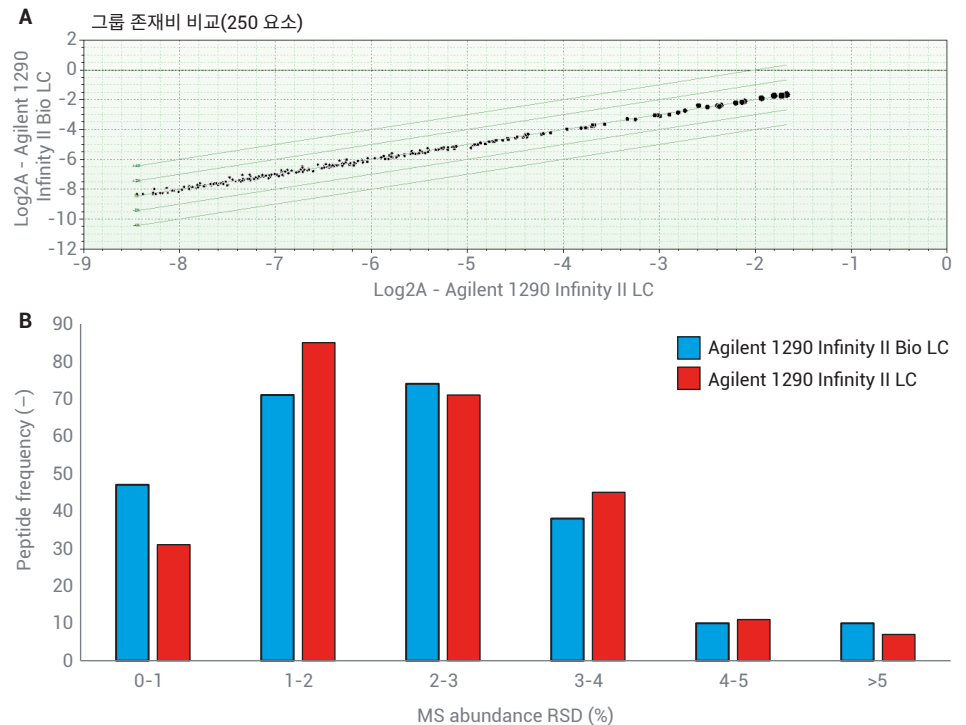


그림 4. (A) 10회 연속 주입에 근거한 통계적 상관 관계 분석. 로그 배율 값이 Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00)로 식별한 250개의 최대 존재비 피크에 대해 검정색 점으로 표시됨. (B) Agilent 1290 Infinity II Bio LC 및 1290 Infinity II LC에 대한 펩타이드 존재비의 RSD 값을 보여주는 히스토그램.

더욱 놀랍게도 10회 주입에 걸친 존재비의 RSD가 1290 Infinity II Bio LC 및 1290 Infinity II LC에서 거의 동일했습니다(그림 4B). 90% 이상의 펩타이드 피크가 4% 이하의 면적 RSD 값을 가졌습니다.

결론

분석법 이전은 새로운 LC 시스템을 구성하고 설치할 때 많은 실험실에서 겪는 힘들고 어려운 과정이 될 수 있습니다. 이 응용 자료에서, Agilent 1290 Infinity II Bio LC의 경우에는 그렇지 않음을 보여주었습니다. 1290 Infinity II Bio LC 및 1290 Infinity II LC에서 동일한 NISTmAb 펩타이드 맵핑 분석법을 실행한 결과, 시스템 간에 머무름 시간 편차가 최대 0.17%에 불과해 이 분석법이 원활하게 이전될 수 있음을 증명했습니다. 1290 Infinity II Bio 고속 펌프 덕분에 10회 주입 후 상대 머무름 시간 편차의 평균값도 0.039%로서 우수한 값을 나타냈습니다. 두 시스템을 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 결합하였을 때 피크 존재비에 대한 포괄적인 통계 분석에서 유의미한 차이가 없었으며 2.8%의 우수한 RSD 평균을 보여주었습니다. 이러한 결과를 종합해 보면 1290 Infinity II Bio LC와 1290 Infinity II LC 사이에서 분석법이 효율적이고 편리하게 이전된다는 사실을 명백히 확인할 수 있습니다. 따라서 1290 Infinity II Bio LC는 철을 함유하지 않은 유동 경로의 이점에 힘 입어 검출 방법에 관계없이 펩타이드 맵핑 워크플로에 이상적인 선택이라 할 수 있습니다.

참고 문헌

1. Agilent 1290 Infinity with ISET. *Agilent Technologies user manual*, publication number G4220-90314, **2015**.
2. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q6B, **1999**. 웹사이트: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf.

www.agilent.com/chem

DE.44140.1323148148

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

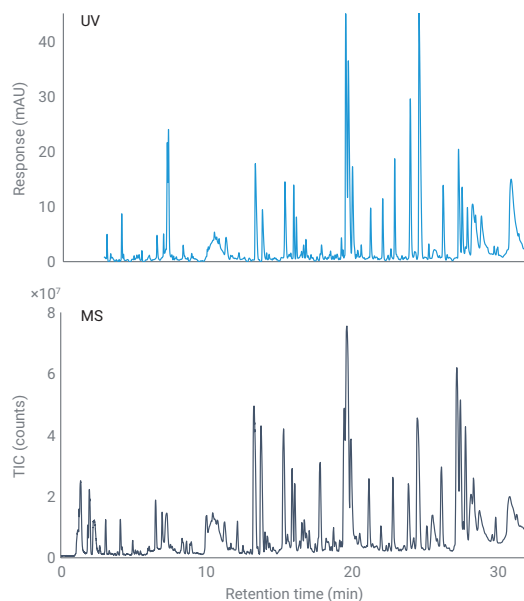
© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 11월 19일, 한국에서 인쇄
5994-2836KO

견고하고 신뢰할 수 있는 펩타이드 맵핑

UV 및 MS 기반의 mAb 1차 구조와 PTM 분석을 위한 새로운 플랫폼, Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템



BIO



저자

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

개요

펩타이드 맵핑은 단일 클론 항체(mAb)의 1차 구조를 설명하기 위한 절대 표준입니다. 그러나 성공적인 펩타이드 맵핑의 핵심은 고품질 펩타이드 분리를 위한 견고하고 신뢰할 수 있는 LC 시스템입니다. 이 응용 자료에서는 펩타이드 맵핑을 위한 시스템으로서의 Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 소개합니다. NISTmAb에 대해 이미 발표된 포괄적인 펩타이드 맵핑 분석법을 재현해본 결과, 매우 얇은 그레디언트에서도 0.1% 미만의 매우 우수한 상대 머무름 시간 편차를 나타냈습니다. 추가적인 분석법 개발을 통해 우수한 상대 표준 편차와 피크 용량 값은 유지한 상태에서 총 실행 시간을 60% 단축했습니다. 또한 1290 Infinity II Bio LC는 분석법 개발용 설정의 예로서 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 직접 연결하여 바이오 의약품 생산 체인 전체에서 분석법을 쉽게 이전할 수 있도록 했습니다.

서론

펩타이드 맵핑은 오늘날의 산업용 생명 공학 기술에서 바이오 의약품의 1차 구조 및 번역 후 변형(PTM)을 분석하는 데 널리 사용되는 기술입니다. 일반적으로, 이러한 상향식 접근 방식에서는 mAb의 변성, 알킬화 및 분해를 사용합니다. 그 후, 생성된 펩타이드를 역상 또는 (경우에 따라) 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피를 사용하는 HPLC 혹은 UHPLC로 분리합니다. 검출은 원료의약품을 식별하기 위한 목적으로 질량 분석법(MS)을 사용하거나, 품질 관리(QC) 환경에서 자외선(UV) 흡광도를 측정하여 크로마토그래피 프로파일을 참조 맵과 비교하는 방식으로 수행됩니다. 펩타이드 맵핑은 생물학적 제제 평가에 대한 허용기준의 일부로 사용할 수 있으며, 이는 ICH 가이드라인 Q6B에 기술되어 있습니다.¹ LC/MS 또는 UV를 사용하면 펩타이드 맵의 변화(예: 산화 또는 탈아미드화 증가², 새로운 서열 변이의 출현³, 또는 글리칸 조성의 변화⁴)를 평가할 수 있습니다. 따라서 특히 UV 검출기를 사용할 때 정밀도와 견고성은 안전하고 효능이 강력한 바이오 의약품을 출시하고 개발하는 데 가장 중요합니다.

이 응용 자료는 펩타이드 맵핑을 위한 새로운 플랫폼으로서, 새로운 1290 Infinity II Bio LC를 소개합니다. 고정밀 binary (2용매 고압혼합) Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프와 철을 함유하지 않은 생체 적합성 유동 경로를 이용하는 이 시스템은 특히 펩타이드, 단백질 및 대사체와 같은 생체분자에 적합합니다.

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(G7116A), Standard Flow Quick Connect Bio 열 교환기(G7116-60071) 및 두 개의 애질런트 열평형 장치 (G7116-60013) 장착
- 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)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis(B.10.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm (B.10.00)

컬럼

- Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 250mm, 2.7μm(제품 번호 651750-902)
- Agilent AdvanceBio Peptide Mapping Fast Guards, 2.1 × 5mm, 2.7μm(제품 번호 851725-911)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8μm(제품 번호 959759-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guards, 2.1 × 5mm, 1.8μm(제품 번호 821725-901)

화학물질

LC 등급 아세토니트릴, 중탄산암모늄, *tris*(2-carboxyethyl)phosphine 및 2-iodoacetamide는 Merck(독일, 다름슈타트)에서 구입했습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 point-of-use 카트리지를 (Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, 미국 매사추세츠, 빌레리카). 포름산은 VWR(독일, 다름슈타트)에서 구입했습니다. 트립신(돼지, 질량 분석 등급)은 G-Biosciences(미국, 세인트 루이스)에서 구입했습니다.

시료 전처리

100μL의 중탄산암모늄(100mM)에 0.8mg의 Agilent-NISTmAb(제품 번호 5191-5744)를 용해한 용액에 2μL의 *tris* (2-carboxyethyl)phosphine(TCEP, 200mM)을 첨가하여 변성 및 환원시킨 다음 60°C에서 1시간 동안 배양했습니다. 4μL의 2-iodoacetamide(IAM, 200mM)로 알킬화한 후(상온에서 1시간), 2μL의 TCEP로 잉여의 IAM을 퀘칭한 다음(상온에서 1시간), 0.8mL의 25mM 중탄산암모늄으로 희석한 후, 효소 트립신을 첨가했습니다(NISTmAb와 트립신을 w/w로 20:1). 37°C에서 밤새 분해한 후, 2μL의 포름산을 첨가하여 생성된 현탁액의 pH를 pH 4 미만으로 감소시켰습니다.

표 1. 분석법 A: Mouchahoir 및 Schiel, 2018⁵로부터 채택한 포괄적인 NISTmAb 펩타이드 맵핑 분석법.

파라미터	값
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 250mm, 2.7μm + Fast Guard 2.1 × 5mm
용매	A) 물 + 0.1% 포름산 B) 아세토니트릴 + 0.1% 포름산
그라데이션트	0.00분 - 2% B 110.00분 - 45% B 110.01분 - 97% B 125.00분 - 97% B 125.01분 - 2% B 150.00분 - 2% B
유속	0.200mL/분
온도	열 평형 장치가 설치된 경우 40°C
검출	VWD: 214nm, 10Hz/MS: 표 3 참조
주입	주입량: 15μL 시료 온도: 4°C 세척: 물로 3초(플러시 포트)

표 2. 분석법 B: 최적화되고 단축된 펩타이드 맵핑 분석법.

파라미터	값
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8μm + Fast Guard 2.1 × 5mm
용매	A) 물 + 0.1% 포름산 B) 아세토니트릴 + 0.1% 포름산
그라데이션트	0.00분 - 2% B 44.00분 - 45% B 44.01분 - 97% B 50.00분 - 97% B 50.01분 - 2% B 60.00분 - 2% B
유속	0.300mL/분
온도	열 평형 장치가 설치된 경우 40°C
UV 검출	VWD: 214nm, 10Hz/MS: 표 3 참조
주입	주입량: 15μL 시료 온도: 4°C 세척: 물로 3초(플러시 포트)

표 3. 펩타이드의 반복 MS/MS 분석을 위한 이온화원 및 MS 파라미터.

파라미터	값
기기	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
가스 온도	325°C
건조 가스 유속	13L/분
Nebulizer	35psig
Sheath 가스 온도	275°C
Sheath 가스 유속	12L/분
캐필러리 전압	4,000V
노즐 전압	0V
수집 모드	확장된 동적 측정 범위(2GHz)
질량 범위	m/z 100~1,700
수집 속도	8스펙트럼/초
자동 MS/MS 범위	m/z 50~1,700
분리 폭	Narrow(~ m/z 1.3)
전구 이온/주기	10
충돌 에너지	전하 2: 3.1(기울기) 및 1(오프셋) 전하 3 및 >3: 3.6(기울기) 및 -4.8(오프셋)
전구체 임계값	1,000카운트 및 0.001%
능동 배제	0.2분간 1 스펙트럼 후
전구체 존재비에 따른 스캔 속도	예, 25,000카운트/스펙트럼
MS/MS 누적 시간 제한	예
순도	엄격도: 100%/cut-off: 30%
동위원소 모델	펩타이드
전구체 정렬	전하 상태, 그 다음 존재비

결과 및 토의

mAbs와 같은 단백질 바이오의약품의 트립신 분해물에는 수많은 펩타이드가 매우 복잡하게 혼합되어 있습니다. 이러한 바이오 의약품의 1차 구조를 결정하고 분석하기 위해서는 매우 길고 얇은 그레디언트를 사용하는데, 실행 시간이 최대 몇 시간까지 소요될 수 있어 기기에 대한 부담이 높습니다. 이 까다로운 분석에 1290 Infinity II Bio LC의 적합성을 보여주기 위한 연구로서 NISTmAb의 트립신 분해에 대해 NIST(National Institute of Standards and Technology)에서 이전에 발표한 LC/UV 및 MS 분석법을 재현해 보기로 했습니다.⁵ 이를 위해 250mm 길이의 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼을 2.5시간의 총 분석법 실행 시간에 사용했습니다(분석법 A, 표 1). 또한 실행 시간을 단축하기 위해 입자크기 2μm 미만의 ZORBAX RRHD Eclipse Plus 컬럼을 활용한 두 번째 LC 분석법을 개발했습니다(분석법 B, 표 2). 그림 1은 Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기(VWD)로 검출된 두 분석법의 크로마토그램을 보여줍니다.

두 크로마토그램에서 유사한 펩타이드 패턴을 관찰할 수 있습니다. 단, 대부분의 분석물질이 원래 발표된 NIST 분석법 A에서 80분 내에 용리된 것에 비해, 분석법 B에서는 30분 내에 용리될 수 있었습니다. 그 결과 총 실행 시간을 60% 단축할 수 있었습니다. 1290 Infinity II Bio LC의 정밀도와 견고성을 체계적으로 평가하기 위해 두 가지 분석법 모두에서 8개의 피크를 선택했습니다. 그 후, 10회 연속 주입을 바탕으로 머무름 시간 표준 편차를 계산했습니다(그림 2).

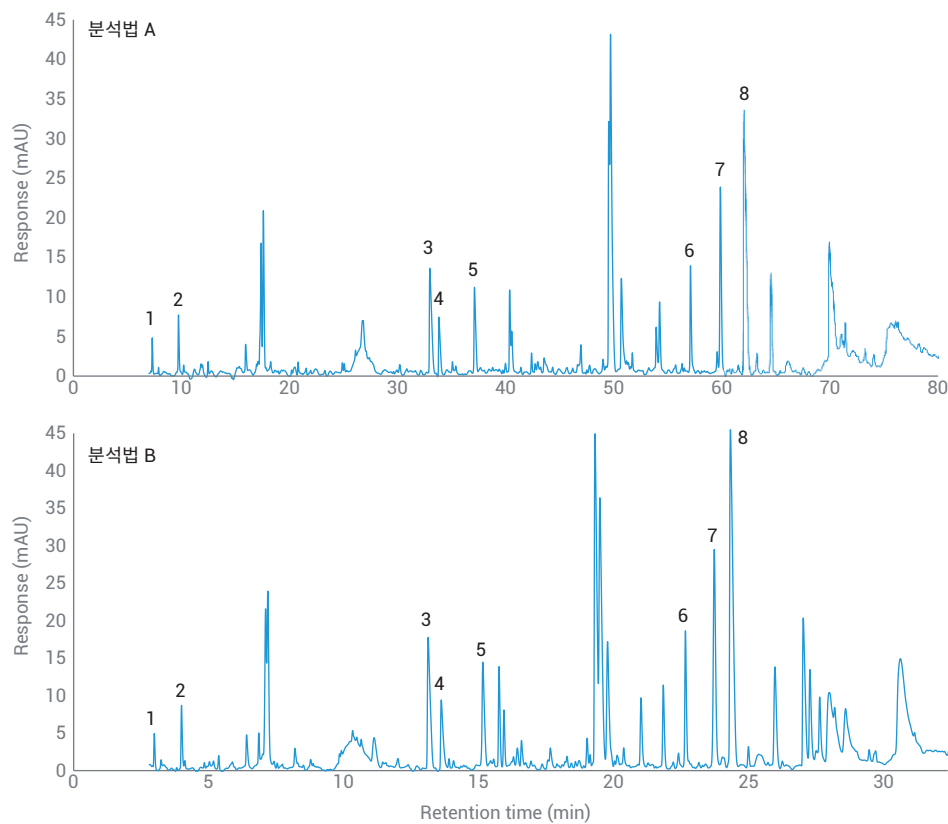
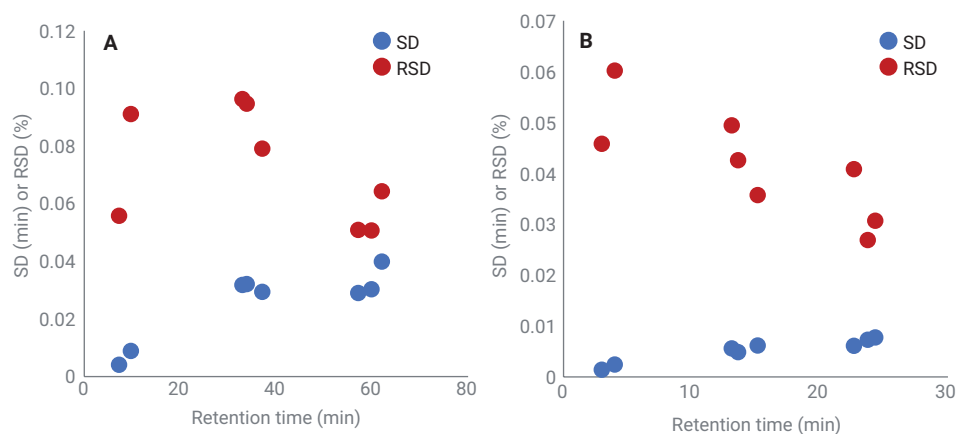


그림 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC에서 분석법 A 및 B로 분리된 NISTmAb의 트립신 분해 크로마토그램. 이후의 머무름 시간 정밀도 및 피크 용량 계산을 위해 8개의 피크를 선택함.



	그레디언트 기울기(%B/분)	SD(분)	RSD(%)	P _{C,As} (-)
분석법 A	0.39	0.026	0.073	428
분석법 B	0.98	0.005	0.039	348

그림 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC로 획득한 분석법 A 및 B의 절대(SD) 및 상대(RSD) 머무름 시간 정밀도 값. 표에 그레디언트 기울기 및 피크 용량 표시.

분석법 A와 B는 모두 0.1% 미만의 상대 머무름 시간 편차를 보여주며, 각각 0.39 및 0.98% B/분의 매우 얇은 그레디언트 기울기에서도 1290 Infinity II Bio 고속 펌프의 탁월한 성능을 입증합니다. LC 분석법의 포괄적인 분리 특성을 평가하기 위해 분리 품질의 척도로 4σ 피크 용량을 계산했습니다. 분석법 A의 보다 긴 실행 시간으로 인해 해당 피크 용량 값은 428의 최대값을 나타냈습니다. 하지만 분석법 B는 0.039%의 뛰어난 평균 RSD와 348의 높은 피크 용량을 결합함으로써 NIST에서 발표하고 제공한 펩타이드 맵핑 분석법에 비해 실행 시간을 크게 단축시키므로 유력한 대안으로 제시됩니다.

생명 공학 환경에서 펩타이드 맵핑을 위한 일반적인 워크플로는 UV 및 MS 검출기를 순서대로 사용하는 것입니다. 이 구성을 통해 두 검출기를 이용한 분석법 개발을 수행할 수 있으며, 이중 MS를 사용하여 펩타이드를 식별할 수 있습니다. 분석법을 수립한 뒤에는, QC 환경 내 고처리량 분석을 위한 UV 검출기로 분석을 쉽게 이전할 수 있습니다. 이러한 경우를 입증하기 위해 1290 Infinity II Bio LC를 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 직접 연결하고 NISTmAb의 트립신 분해물을 분석법 B로 다시 분석했습니다. MS 검출은 표 3과 같이 반복 MS/MS 모드에서 수행했습니다. 결과 크로마토그램은 그림 3에 나타나 있습니다.

분리능은 피크 폭 넓어짐에 대해 특별한 조치를 취하지 않았음에도 불구하고 신뢰할 수 있는 MS 검출에 충분한 수준 이상으로 유지되었습니다. AgilentMassHunter BioConfirm 소프트웨어를 사용하면 mAb의 1차 구조를 식별하고 확인하는 작업을 편리하게 수행할 수 있습니다. MS 및/또는 MS/MS 수준에서 식별된 펩타이드를 선택한 바이오 의약품의 참조 시퀀스와 비교하여 PTM을 상대적으로 분석하고 정량할 수 있습니다. 이 접근법을 사용하면 소위 PENNY 펩타이드 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK)⁶ 및 이에

대응하는 탈아미드화된 동형 펩타이드를 확인할 수 있습니다. PENNY 펩타이드는 거의 모든 인간 또는 인간화 mAb가 공유하는 보존 영역(Fc)의 일부로, 유도된 탈아미드화를 나타내는 적절한 지표로 사용할 수 있습니다. 이러한 펩타이드를 확대한 모습이 그림 4에 나와 있습니다.

최적화된 펩타이드 맵핑 분석법 B의 뛰어난 분리능과 1290 Infinity II Bio LC의 탁월한 머무름 시간 정밀도로 인해 펩타이드를 식별한 뒤 이 경우 UV 검출로 상대적 정량 또한 수행할 수 있습니다.

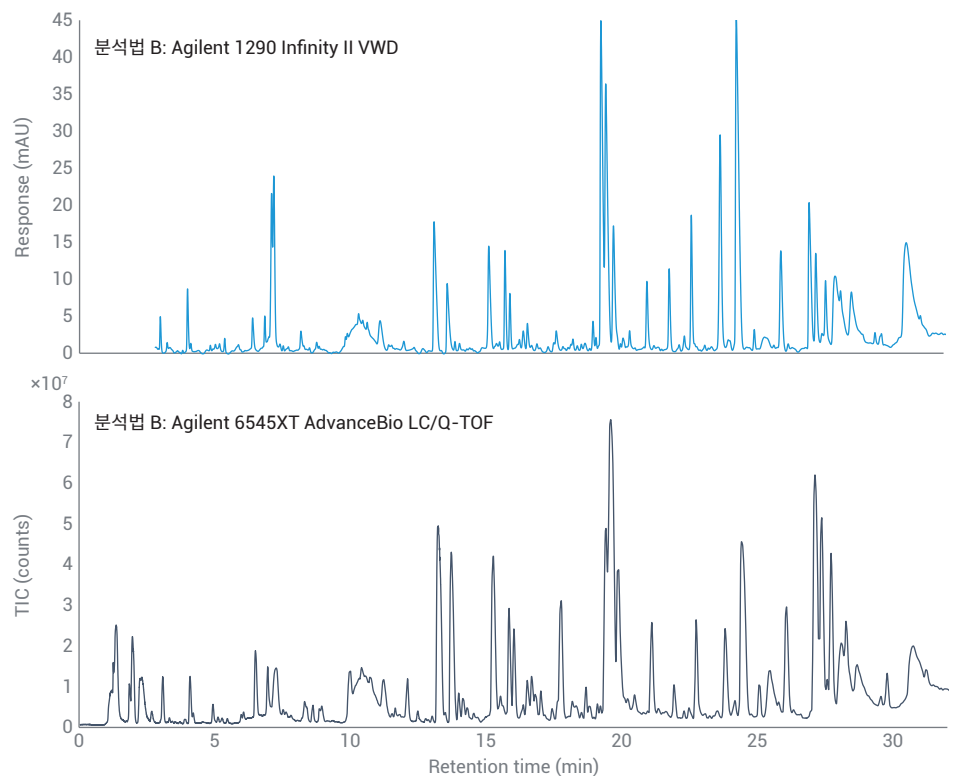


그림 3. 생체 적합성의 마이크로 플로우 셀이 장착된 Agilent 1290 Infinity II VWD(위) 및 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF(아래)를 사용하여 순차적으로 검출한 NISTmAb의 트립신 분해물 크로마토그램.

결론

서열 또는 당화 변이체, 산화 및 탈아미드화와 같은 주요 품질 속성(CQA)을 펩타이드 매핑으로 분석할 수 있습니다. 그러나 가능한 최상의 결과를 제공하기 위해, 사용된 분석법과 기기가 견고하고 신뢰할 수 있어야 합니다. 이 응용 자료에서는 새로운 1290 Infinity II Bio LC가 이러한 높은 기대에 부응할 수 있음을 보여주었습니다. NISTmAb에 대해 발표된 포괄적인 펩타이드 매핑 분석법을 재현함으로써 0.1% 미만의 머무름 시간 정밀도 편차를 일상적으로 달성할 수 있습니다. 이 분석법을 최적화한 결과, 1290 Infinity II Bio 고속 펌프의 이점으로 뛰어난 정밀도와 분리 품질을 손상시키지 않으면서 전체 실행 시간을 60%까지 단축할 수 있었습니다. 분석법 개발 환경에서의 유용성을 보여주기 위해 1290 Infinity II Bio LC를 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 직접 연결함으로써 분석법을 높은 처리량의 QC 환경으로 간단하게 전송할 수 있음을 입증했습니다. 요컨대, 1290 Infinity II Bio LC는 UV 및 MS 기반의 mAb 1차 구조와 PTM 분석을 위한 새로운 플랫폼이 될 수 있습니다.

참고 문헌

1. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q6B. (1999). 웹사이트: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf.
2. Li, X. *et al.* High Throughput Peptide Mapping Method for Analysis of Site Specific Monoclonal Antibody Oxidation. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1460, 51-60.
3. Li, Y. *et al.* Characterization of Alanine to Valine Sequence Variants in the Fc Region of Nivolumab Biosimilar Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *MAbs* **2016**, 8, 951-960.
4. Wang, T. *et al.* Application of a Quantitative LC-MS Multiattribute Method for Monitoring Site-Specific Glycan Heterogeneity on a Monoclonal Antibody Containing Two N-Linked Glycosylation Sites. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 3562-3567.
5. Mouchahoir, T.; Schiel, J. E. Development of an LC-MS/MS Peptide Mapping Protocol for the NISTmAb. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410, 2111-2126.
6. Chelius, D.; Rehder, D. S.; Bondarenko, P. V. Identification and Characterization of Deamidation Sites in the Conserved Regions of Human Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6004-6011.

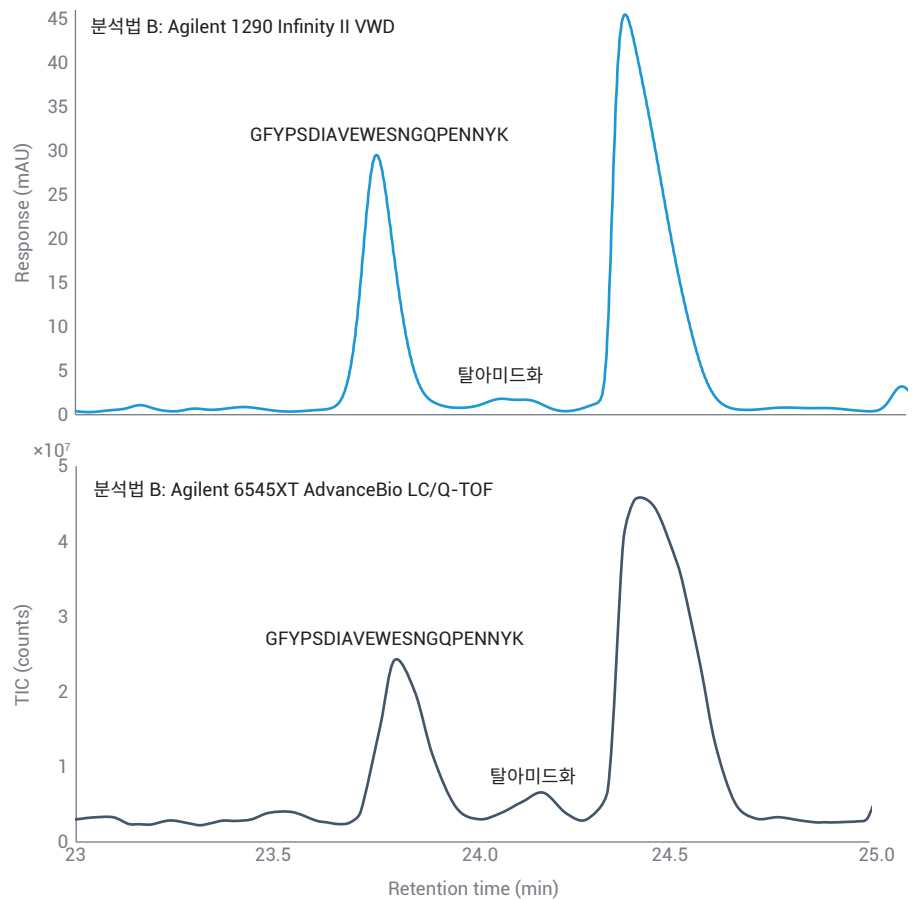


그림 4. PENNY 펩타이드(GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 및 해당 탈아미드화 동형 펩타이드의 분리를 강조하여 나타내기 위한 이전 크로마토그램의 확대 보기.

www.agilent.com/chem

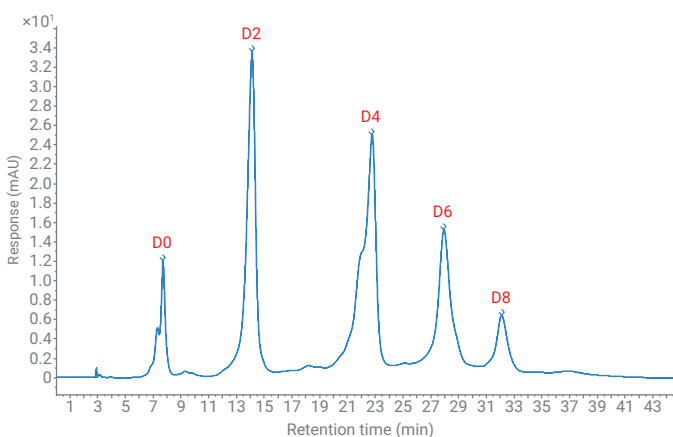
DE.1797222222

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 10월 12일, 한국에서 인쇄
5994-2718KO

높은 염 — 높은 재현성

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 이용한 항체
약물 결합체의 소수성 상호작용 크로마토그래피 분석



저자

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

개요

약물 대 항체 비율(DAR) 결정에는 일반적으로 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)가 이용됩니다. 이 온화한 비변성 분석법의 용리액은 고농도의 부식성 염을 포함하고 있어 액체 크로마토그래피(LC) 시스템 능력의 한계를 시험합니다.

유동 경로에 철을 완전히 함유하지 않은 고속 펌프를 포함한 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건에 최적화되어 있으며 잠재적 부식으로 인한 시스템 손상을 방지합니다. 이 응용 자료는 HIC를 사용한 brentuximab vedotin의 DAR 측정을 소개합니다. DAR은 항체당 3.7개의 약물 분자로 계산되었습니다. 생성 데이터에 대한 최고의 신뢰도를 제공하는 애질런트의 차세대 하이엔드 액체 크로마토그래피 시스템에 1290 Infinity II Bio LC가 속함을 입증하는 탁월한 재현성을 확인하였습니다. Agilent OpenLab CDS의 소프트웨어 기능인 “바탕 감산(Blank subtraction)”을 통해 순도가 낮은 황산 암모늄으로 인한 베이스라인 이동을 제거하여 원활한 적분을 가능하게 합니다.

서론

항체 약물 결합체(ADC)는 세포 독성 저분자의약품과 화학적으로 연결되어 있는 단일 클론 항체(mAbs)입니다.¹ 해당 항체 자체와 비교했을 때, 구조는 더 복잡하고 비균질합니다.

시스테인 결합 ADC²(예: brentuximab vedotin, Takeda의 Adcetris)에는 부분적으로 환원된 mAb의 유리 thiol 그룹에 저분자가 부착되어 있습니다.^{3,4} 유리 sulfhydryl 그룹의 수는 결합될 약물에 정의된 위치의 수를 제한하여 항체당 0, 2, 4, 6 및 8개 약물 혼합물을 생성합니다. mAb에 결합된 평균 약물 수는 안전성과 효능에 직접적인 영향을 미칠 수 있기 때문에 ADC의 가장 중요한 품질 속성 중 하나입니다. DAR은 원하는 조직으로 전달할 수 있는 페이로드 (약물)의 양을 결정합니다.⁵

HIC는 항체당 서로 다른 수의 약물이 로딩된 시스테인 결합 ADC 분자의 분리에 기준이 되는 기술입니다.⁶ mAb에 부착된 저분자가 종종 상대적으로 소수성이기 때문에 ADC의 약물 로딩에 따라 상대적 소수성이 증가합니다. 따라서 HIC는 DAR을 모니터링하는 데 완벽하게 적합합니다.

HIC는 본래의 단백질 구조를 유지하는 비변성 분석 기술로, 중성 pH에서 일반적으로 수행되며 고염에서 저염 농도로 진행되는 그라데이션을 이용해 단백질을 분리합니다. 분리 원리는 단백질 염색 실험과 동일합니다.⁶ 이동상 A에 사용되는 고농도 염 완충액에서 단백질은 수화 겹질을 잃고 고정상의 소수성 표면에 머무르게 됩니다. 이동상 B는 대개 염이 첨가되지 않은 동일한 완충액(대부분 인산염)입니다. 그라데이션에서 이동상 B의 양이 증가함에 따라 단백질은 물 겹질을 재형성하고 컬럼에서 용리됩니다. 이소프로필 알코올과 같은 소량의 유기 용매를 첨가하는 방법

또한 컬럼에서 단백질을 용리하는 데 도움이 될 수 있습니다.

1290 Infinity II Bio LC는 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건(2M NaCl⁷과 같은 높은 염 농도, 최대 8M 요소 및 0.5M NaOH 또는 0.5M HCl과 같은 고/저 pH 용매)에 적합하도록 특별히 설계된 애질런트의 차세대 하이엔드 액체 크로마토그래피 시스템입니다. 시료 유동 경로에는 스테인리스 강(SST) 또는 철이 전혀 없습니다. Multisampler, 다중 컬럼 온도 조절 장치 및 검출기 전체의 모든 캐필러리와 피팅은 니켈-코발트 합금인 MP35N으로 제작됩니다. 이러한 재료의 적용을 통해 염이 많이 함유된 완충액으로 인한 부식의 가능성을 줄이고 철 이온으로 인한 단백질 변형(예: 산화, 단백질 복합체 형성)을 방지할 수 있습니다.

이 응용 자료는 DAR 측정에 HIC를 사용한 brentuximab vedotin 분석을 소개하고 머무름 시간 및 면적의 정밀도를 평가합니다. 또한 OpenLab 2의 프로세싱 분석법에서 소프트웨어 기능인 “바탕 감산”이 베이스라인 이동을 필터링하는 데 효과적임을 입증합니다.

실험

장비

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- 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), 표준 유량의 생체 적합성 열 교환기 장착

- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2μL) 장착

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.5

컬럼

Agilent AdvanceBio HIC 컬럼, 3.5μm, 4.6 × 100mm(p/n 685975-908)

화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. 이소프로판올은 Merck (독일, 다름슈타트)에서 구입하였습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 point-of-use 카트리지를(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, 미국 매사추세츠, 빌레리카). Sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate 및 ammonium sulfate는 Sigma-Aldrich(독일, 슈타인하임)에서 구입하였습니다.

시료

Brentuximab vedotin(상품명 Takeda의 Adcetris, 일본, 도쿄)을 물 절반, 용매 A 절반 (아래 참조)에 100mg/mL로 용해했습니다.

노트: Adcetris에는 많은 면역증강제가 포함되어 있기 때문에 여기에 언급된 농도는 단백질 단독 농도가 아닌 약물 내 모든 성분의 총 농도입니다.

완충액 준비

A: 1.5M ammonium sulfate 혼합 50mM 인산염 완충액, pH 7

B: 50mM 인산염 완충액, pH 7 + 20% 이소프로판올

pH 7인 50mM 인산염 완충액 2L를 만들기 위해 sodium phosphate monobasic monohydrate 5.84g 및 sodium phosphate dibasic heptahydrate 15.47g을 2L 용량의 갈색병에 넣은 다음, 초순수로 2L까지 채웠습니다. pH 값을 확인하고 필요한 경우

pH 7로 조정했습니다. 그 다음, 총 1.5M을 만들기 위해 ammonium sulfate 198.21g을 1L 용량의 빈 갈색병에 첨가하고 앞서 조제한 인산염 완충액(→완충액 A)을 사용하여 1L까지 채웠습니다. pH 값을 확인하고 필요한 경우 다시 pH 7로 조정했습니다(다량의 염 첨가시 pH가 변할 수 있음). 200mL의 이소프로판올과 앞서 조제한 50mM 인산염 완충액(pH 7) 800mL를 혼합하여 1L 용량의 빈 갈색병(→완충액 B)에 넣었습니다. 조제한 두 완충액은 0.2µm 멤브레인 필터를 사용하여 여과시켰습니다.

노트: mAb에 결합된 작은 소수성 약물 분자의 존재는 전체 소수성을 상당히 증가시킵니다. 결과적으로 이동상에 유기 변형제를 포함시켜야 합니다 (여기에서는 20% 이소프로판올).

분석법

표 1. 염 그래디언트 크로마토그래피 조건.

파라미터	값
용매	A) 1.5M ammonium sulfate 혼합 50mM 인산염 완충액, pH 7 B) 50mM 인산염 완충액, pH 7 + 20% 이소프로판올
그래디언트	0분 30% B, 30분 100% B 정지 시간: 45분 평형 시간: 10분
유속	0.400mL/분
온도	25°C
검출	280nm, 10Hz
주입	주입량: 15µL 시료 온도: 10°C 니들 세척: 물에서 3초

노트: HIC에는 고농도 염이 사용되기 때문에 견고한 LC 시스템이 필요하며, 스테인리스강(SST)/철을 완전히 함유하지 않은 1290 Infinity II Bio LC의 유동 경로는 고농도 염 함유 완충액으로 인한 부식의 가능성을 방지합니다. 또한 싼 세척 및 니들 세척과 같은 세척 기능은 염 침전 문제를 예방하는데 도움이 됩니다. 그러나 LC 시스템이나 컬럼을 고농도 염 용액에 장시간 방치하지 않는 것이 여전히 중요합니다.

노트: 농축 염 용액을 용리액으로 사용하는 경우, 펌프 분석법에서 해당 용매 유형을 설정하는 것이 좋습니다. 예를 들어 1.5M ammonium sulfate를 포함한 용매 A 경우, 펌프 분석법의 용매 선택 영역에서 일반 수용액 또는 물 대신 “Ammonium Sulfate 1.5M”을 사용하세요. 다량의 염이 있으면 용매의 압축률이 달라지므로, 사전 구성된 용매 테이블을 사용하면 최고의 펌프 성능을 얻을 수 있습니다.

결과 및 토의

그림 1은 brentuximab vedotin 분석 결과를 보여주며, 각각 0, 2, 4, 6 및 8개의 저분자 약물을 포함한 mAb에 해당하는 5개의 주요 피크를 확인할 수 있습니다. HIC 분석을 통해 약물 결합종 분포의 특성을 규명하고 DAR 또한 결정할 수 있었습니다.

사슬 간 이황화 가교가 접합된 약물에 의해 파괴되고 점유되더라도, 항체 사슬 사이의 공유 결합과 비공유적 힘의 조합은 분석 중에 mAb를 온전한 형태로 유지하기에 충분합니다. 이는 HIC의 강하지 않은 비변성 조건에 기인한 것으로, 시스테인 연결 ADC 분석에 이상적입니다. 그림 1의 각 피크는 부착된 약물 분자 수가 증가하는 온전한 mAb 종에 해당합니다(0~8개 결합된 분자, D0~D8). 피크는 HIC 크로마토그램을 brentuximab vedotin 관련 문헌에서 찾은 크로마토그램과 비교하여 식별했습니다.⁶

각 피크의 피크 면적과 각 약물 부하를 통합하여 전체 DAR을 계산할 수 있습니다 (수식 1).

공식 1.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 피크 면적} \times n_{drug}}{\text{총 LC 피크 면적}}$$

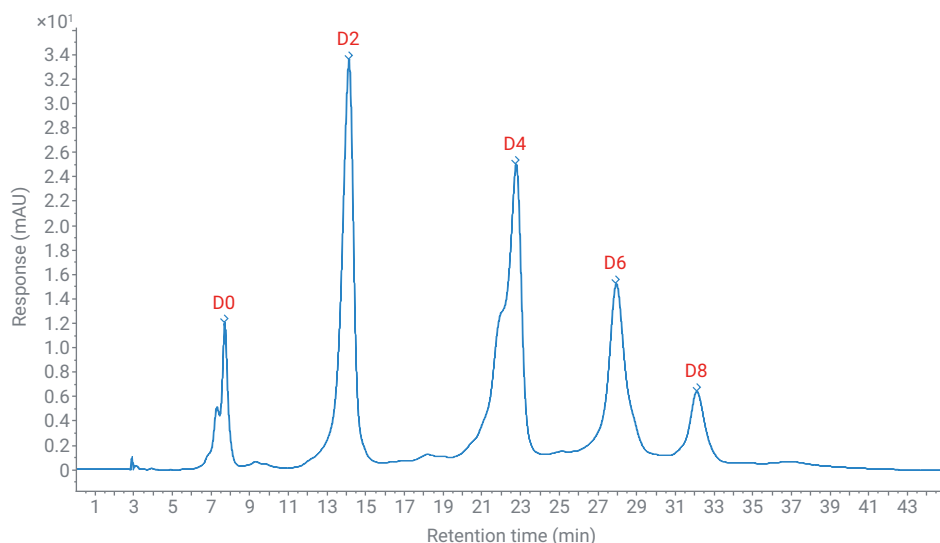


그림 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC에서의 brentuximab vedotin 분석. D0~D8은 서로 다른 DAR 종을 의미.

5개의 관찰된 피크의 적분값 및 면적 백분율 계산값을 종합한 결과, DAR이 3.7정도로 나타났습니다(표 2 참조). 이 값은 문헌과 일치합니다.⁸

해당 분석을 머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도에 대해서도 평가했습니다(그림 2). 7회 연속 실행 후 0.081% 미만의 상대 표준 편차(RSD)를 갖는 우수한 RT 정밀도를 확인하였습니다. 면적 정밀도 또한 우수하였으며, RSD는 0.282% 미만이었습니다(그림 2의 표 참조).

Ammonium sulfate는 HIC 분석에서 매우 일반적으로 사용되는 chaotropic 염 (물질의 수소 결합을 억제하는 염)입니다. 사용되는 농도는 보통 1~2M 염으로, 상당한 양입니다. 덜 순수한 염을 분석에 사용하면(때로 염 결정의 색으로도 드러남) 크로마토그램의 베이스라인이 크게 이동하여 잠재적으로 적분 오차를 일으킬 수 있습니다. 이 문제에 접근하기 위해 “바탕 감산”이라는 소프트웨어 기능을 적용함으로써 바탕 주입으로 베이스라인 이동을 필터링할 수 있습니다. 이 기능은 OpenLab 2의 프로세싱 분석법에서 확인할 수 있습니다(그림 3 참조). 그림 4는 해당 기능을 적용하기 전과 후의 베이스라인 거동이 다른 크로마토그램을 보여줍니다.

표 2. DAR 종별 결과.

DAR 종	RT(분)	면적	면적%	DAR 계산값
D0	7.68	378.116	7.59	0
D2	14.12	1537.829	30.84	0.6196
D4	22.78	1756.026	35.22	1.415
D6	27.98	951.983	19.13	1.1506
D8	32.15	340.176	6.79	0.5482
			DAR	3.733

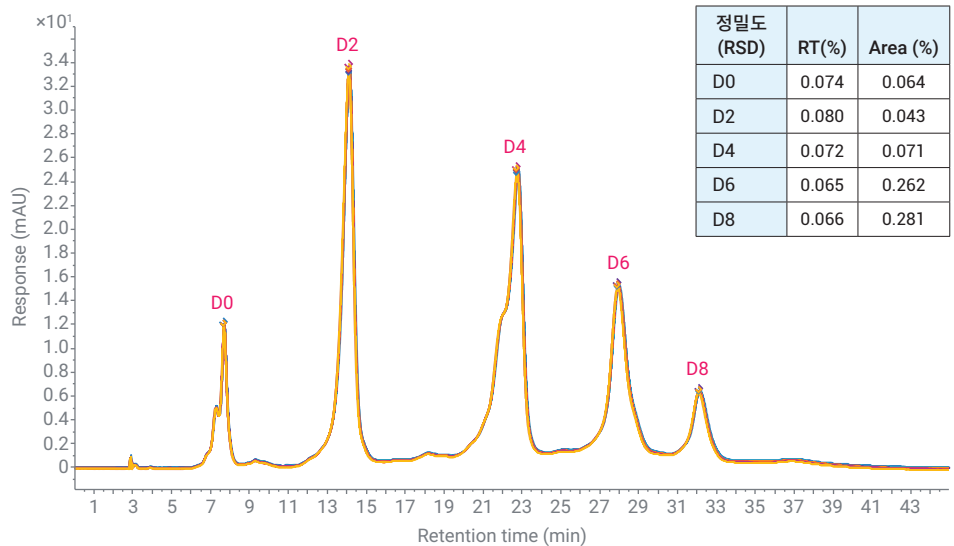


그림 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC에서의 brentuximab vedotin 분리(7개의 연속 실행 오버레이).

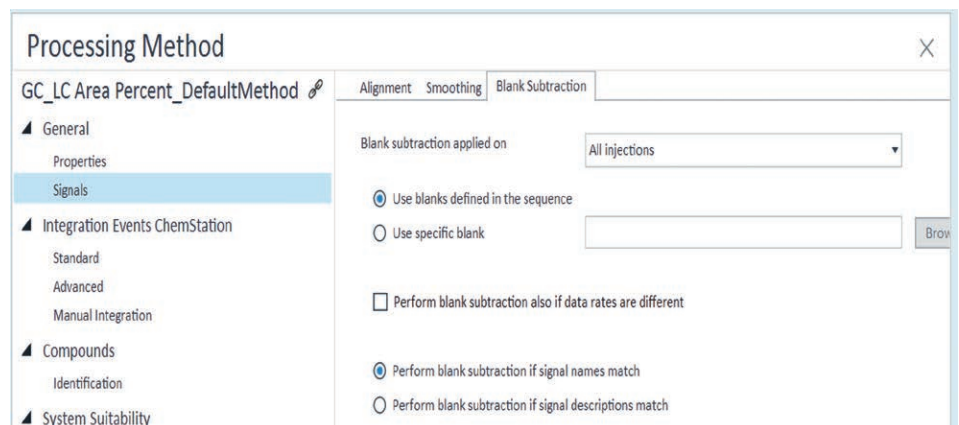


그림 3. Agilent OpenLab CDS 2의 처리법에서 “바탕 감산” 기능을 보여주는 스크린샷.

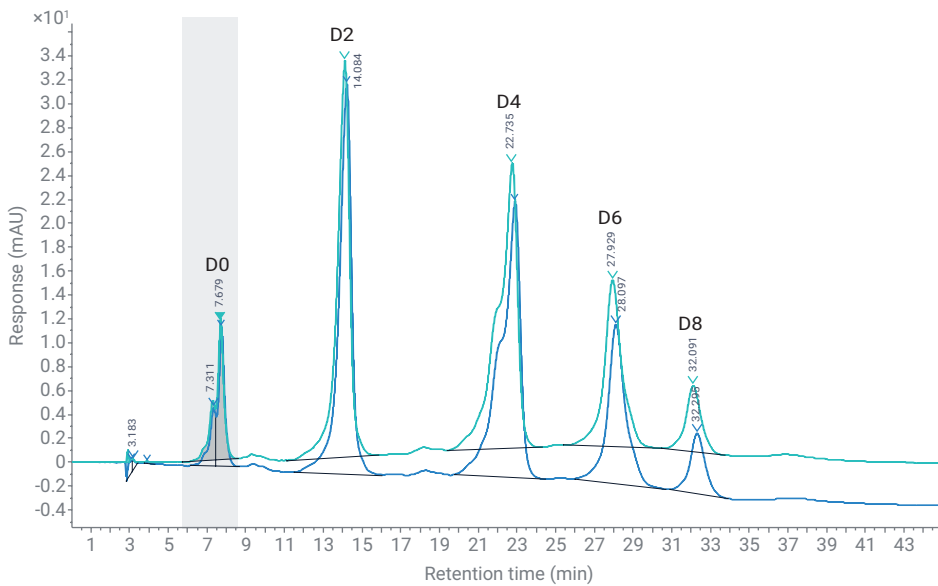


그림 4. 바탕 감산 전(파란색)과 후(녹색)의 HIC 크로마토그램 비교.

결론

Brentuximab vedotin을 Infinity II 1290 Bio LC에서 HIC를 사용하여 분석했습니다. 5개의 예상 DAR 중 모두 0, 2, 4, 6 및 8개의 저분자 약물을 각각 포함하는 mAb에 대응되며 잘 분리되었습니다. HIC 분석을 통해 약물 결합종 분포의 특성을 규명하고 항체당 3.7개의 약물 분자로 계산된 DAR 또한 결정할 수 있었습니다. 7회의 연속 실행으로 실시한 정밀도 분석에서는 RT 및 면적에 대한 우수한 재현성을 보여주었습니다. HIC에 사용되는 용리액에는 LC 시스템의 한계를 시험하는 고농도의 부식성 염이 포함되어 있습니다. 철을 완전히 함유하지 않은 시료 유동 경로로 인해 1290 Infinity II Bio LC는 바이오 크로마토그래피 사용 조건에 최적으로 부합하며 시스템에 대한 부식 손상의 가능성을 방지합니다.

OpenLab 2의 소프트웨어 특징인 바탕 감산 기능을 사용하면 결과에 부정적인 영향을 주지 않으면서 덜 순수한 ammonium sulfate를 분석에 사용할 수 있습니다. 바탕 실행을 필터링하는 것만으로 베이스라인을 수정하여 적분 값을 원활하게 계산할 수 있습니다.

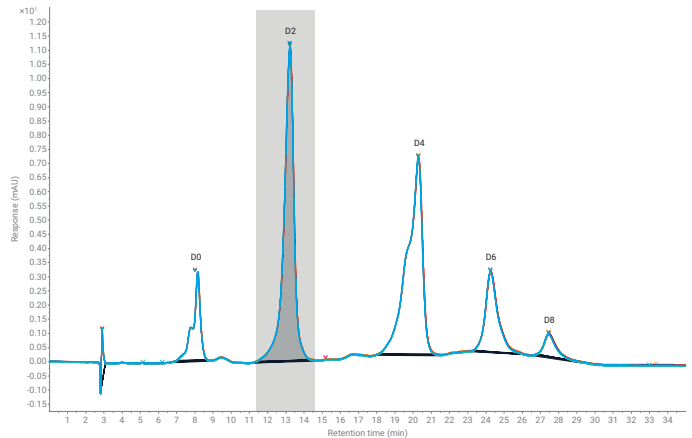
생체 적합성을 갖는 1290 Infinity II Bio LC 하드웨어와 OpenLab 2의 새로운 소프트웨어 기능의 결합으로 생성 데이터에 대한 최고의 신뢰도를 얻을 수 있습니다.

참고 문헌

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339-51.
2. Marcoux, J. et al. Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterization of Trastuzumab Emtansine, a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Protein Sci.* **2015**, 24, 1210-1223.
3. Younes, A. et al. Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *N. Eng. J. Med.* **2010**, 363(19), 1812-1821.
4. Schneider, S. Analysis of Cysteine-Linked Antibody Drug Conjugates, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-8493EN, **2017**.
5. Wakankar, A. et al. Analytical Methods for Physiochemical Characterization of Antibody Drug Conjugates. *mAbs* **2011**, 3(2), 161-172.
6. Rodriguez-Aller, M. et al. Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393-403.
7. High Stakes. High Performance. High Confidence: Agilent 1290 Infinity II Bio LC. *Agilent Technologies brochure*, publication number 5994-2376DE, **2020**.
8. van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, 4(4), 458-465.

편리하고 신뢰할 수 있는 항체 약물 결합체 분석

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC에서 3용매
그레디언트를 사용한 약물 대 항체 비율 측정



저자

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

개요

소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)에서 이소프로판올과 같은 유기 변형제의 첨가는 소수성 항체 약물 결합체(ADC)의 머무름을 감소시키고 선택성을 조정하는 중요한 파라미터가 될 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 세 번째 채널에서 유기 변형제인 이소프로판올을 사용하는 3용매 그레디언트를 통해 brentuximab vedotin의 약물 대 항체 비율(DAR)을 결정합니다. 높은 염을 함유한 완충액과 유기 용매의 이 까다로운 조합에서 확인된 탁월한 재현성은 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC가 생성된 데이터에 대한 최고의 신뢰도를 제공하는 애질런트의 차세대 하이엔드 액체 크로마토그래피 시스템을 입증했습니다.

서론

ADC는 세포 독성 저분자 약물과 화학적으로 연결된 단일 클론 항체(mAbs)입니다.¹ 해당 항체 자체와 비교했을 때, 구조는 더 복잡하고 비균질합니다.

Brentuximab vedotin과 같은 시스템인 결합 ADC는 사슬 간 이황화물의 환원 후에 생성되어 특정 maleimide 링커와 결합할 수 있는 유리 sulfhydryl 그룹을 생성합니다. 유리 sulfhydryl 그룹의 수는 결합될 약물에 정의된 위치의 수를 제한하여 항체당 0(D0), 2(D2), 4(D4), 6(D6) 및 8개(D8)의 약물 혼합물을 생성합니다.

특히 높은 DAR 종의 소수성으로 인해 이소프로판올과 같은 유기 변형제를 첨가하는 것이 HIC 컬럼에서 완전한 용리를 가능하게 하는 데 도움이 됩니다. 일반적으로 2용매 그레디언트에서 변형제는 용리에 사용되는 이동상(보통 염이 거의 또는 전혀 포함되지 않은 완충액)에 첨가됩니다. Agilent 1260 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프는 quaternary 펌프이기 때문에 세 번째 채널을 사용하여 유기 변형제 용매를 첨가할 수 있습니다. 고농도 염 함유 완충액과 유기 이동상의 조합은 두 용매가 펌프에서 혼합될 때 염 결정이 형성될 가능성이 있기 때문에 위험할 수 있습니다.

1260 Infinity II Prime Bio LC는 바이오 크로마토그래피에 사용되는 조건에 적합하도록 특별히 설계된 애질런트의 차세대 하이엔드 액체 크로마토그래피 시스템입니다. 시료 유동 경로에는 스테인리스강(SST) 또는 철이 전혀 없습니다. Multisampler, 다중 컬럼 온도 조절 장치 및 검출기 전체의 모든 캐필러리와 피팅은 니켈-코발트 합금인 MP35N으로 제작됩니다. 이러한 이유로 1260 Infinity II Prime Bio LC는 HIC에서 흔히 사용되는 고농도 부식성 염을 포함한 일반적인 바이오 크로마토그래피 조건에 최적화되어 있으며, 이를 통해 시스템의 부식 손상 가능성을 방지해 줍니다.

실험

장비

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프(G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler (G7137A) 및 시료 온도 조절 장치(#101 옵션)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), 표준 유량의 생체 적합성 열 교환기 장착
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2μL) 장착

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.5 이상

컬럼

Agilent AdvanceBio HIC 컬럼 3.5μm, 4.6 × 100mm(제품 번호 685975-908)

화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. 이소프로판올은 Merck (독일, 다름슈타트)에서 구입하였습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 point-of-use 카트리지(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국). Sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate 및 ammonium sulfate는 Sigma-Aldrich(독일, 슈타인하임)에서 구입하였습니다.

시료

Brentuximab vedotin(상품명 Takeda의 Adcetris, 일본 도쿄); 50% 물: 50% 용매 A (아래 참조)에 100 mg/mL 농도로 용해.

노트: Adcetris에는 많은 면역증강제가 포함되어 있기 때문에 여기에 언급된 농도는 단백질 단독 농도가 아닌 약물 내 모든 성분의 총 농도입니다.

완충액 준비

- A) 1.5M ammonium sulfate 혼합 50mM 인산염 완충액, pH 7
- B) 50mM 인산염 완충액, pH 7
- C) 이소프로판올

pH 7인 50mM 인산염 완충액 2L를 만들기 위해 sodium phosphate monobasic monohydrate 5.84g 및 sodium phosphate dibasic heptahydrate 15.47g을 2L 용량의 갈색병에 넣은 다음, 초순수로 2L까지 채웠습니다. pH 값을 확인하고 필요한 경우 pH 7(완충액 B)로 조정했습니다. 총 1.5M을 만들기 위해 ammonium sulfate 198.21g을 1L 용량의 빈 갈색병에 첨가하고 앞서 조제한 인산염 완충액(→완충액 A)을 사용하여 1L까지 채웠습니다. pH 값을 확인하고 필요한 경우 pH 7로 조정했습니다(다량의 염을 첨가하면 pH가 변할 수 있음). 제조된 두 완충액을 0.2μm 멤브레인 필터를 사용하여 여과시켰습니다.

분석법

크로마토그래피 조건	
파라미터	값
용매	A) 1.5M ammonium sulfate 혼합 50mM 인산염 완충액, pH 7 B) 50mM 인산염 완충액, pH 7 C) 이소프로판올
그레디언트	그레디언트: 0분 55% A, 40% B, 5% C 25분 0% A, 75% B, 25% C 정지 시간: 35분 사후 시간: 10분
유속	0.400mL/분
온도	25°C
검출	280nm 10Hz
주입	주입량: 15μL 시료 온도: 10°C 니들 세척: 물에서 3초

노트: HIC에 고농도 염이 사용되기 때문에 견고한 LC 시스템이 필요하며, 스테인리스강 (SST)/철 성분이 완전히 없는 1260 Infinity II Prime Bio LC의 유동 경로는 고농도 염 함유 완충액으로 인한 부식의 가능성을 방지합니다. 또한 실패 세척 및 니들 세척과 같은 세척 기능은 염 침전 문제를 예방하는데 도움이 됩니다. 그러나 LC 시스템이나 컬럼을 고농도 염 용액에 장시간 방치하지 않는 것이 여전히 중요합니다.

노트: 농축 염 용액을 용리액으로 사용하는 경우, 펌프 분석법에서 해당 용매 유형을 설정하는 것이 좋습니다. 예를 들어 1.5M ammonium sulfate를 포함한 용매 A 경우, 펌프 분석법의 용매 선택 영역에서 일반

수용액 또는 물 대신 Ammonium Sulfate 1.5 M을 사용하세요. 다량의 염이 있으면 용매의 압축률이 달라지므로, 사전 구성된 용매 테이블을 사용하면 최고의 펌프 성능을 얻을 수 있습니다.

결과 및 토의

그림 1은 brentuximab vedotin의 분석 결과를 보여주며, 각각 0, 2, 4, 6 및 8개의 저분자 약물을 포함하는 mAb에 해당하는 5개의 주요 피크를 확인할 수 있습니다. 그림 1의 각 피크는 부착된 약물 분자 수가 증가하는 온전한 mAb 종에 해당합니다 (0~8개 결합된 분자, D0~D8). 피크는 HIC

크로마토그램을 brentuximab vedotin관련 문헌에서 찾은 크로마토그램과 비교하여 식별했습니다.²

머무름 시간(RT) 및 면적의 정밀도에 대한 분석을 평가했습니다. 7회 연속 실행 후 0.055% 미만의 상대 표준 편차(RSD)를 갖는 우수한 RT 정밀도를 확인하였습니다. 이는 고농도 염 함유 완충액(예: 여기에 사용된 1.5M 황산 암모늄 완충액)과 유기 변형제인 이소프로판올의 매우 까다로운 조합에서도 3용매 그레디언트를 실행하는 해당 quaternary 펌프의 우수성을 입증합니다. 면적 정밀도 또한 우수하여 마지막 피크를 제외한 RSD가 0.46% 미만이었습니다 (그림 1의 표 참조).

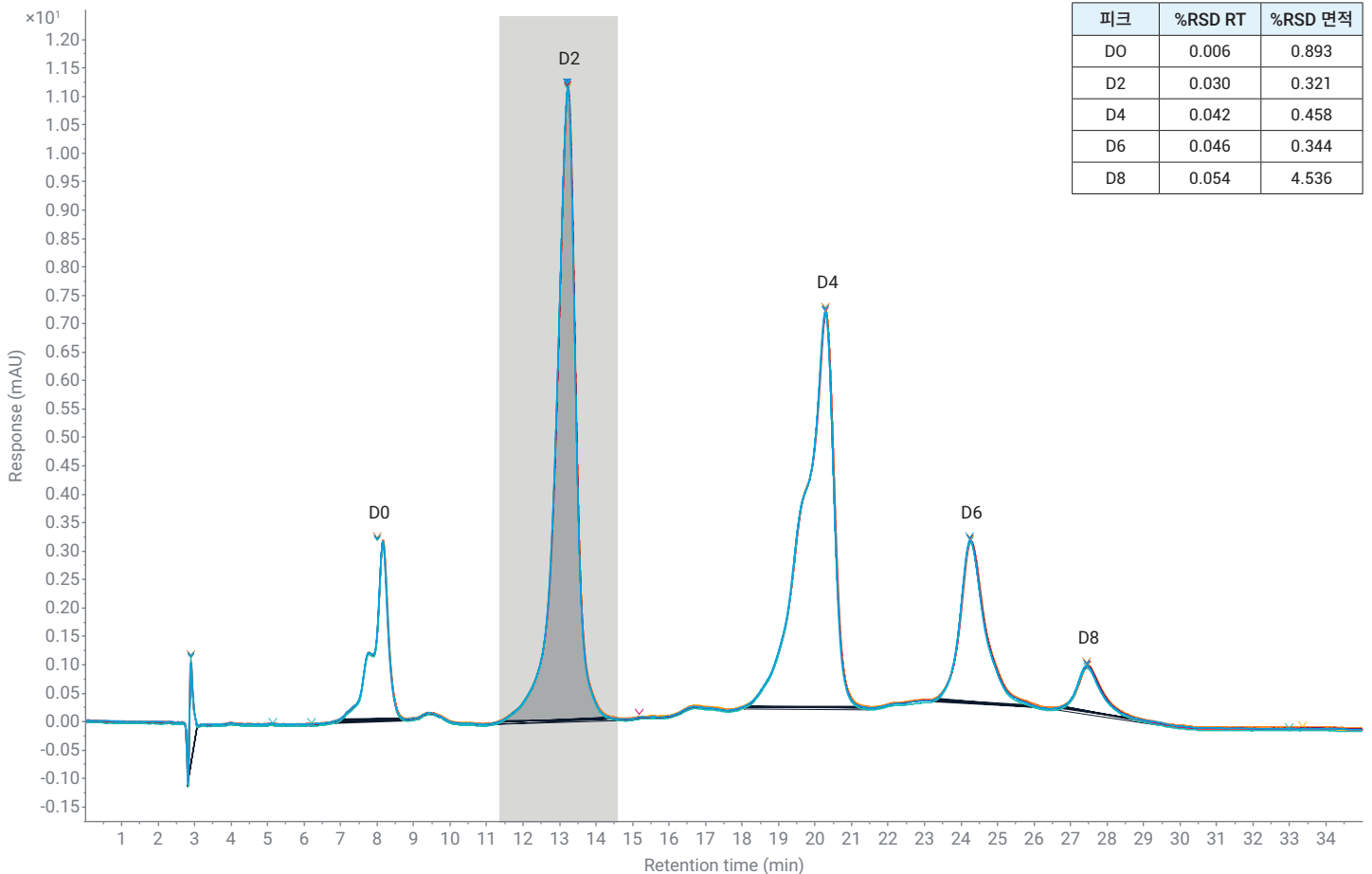


그림 1. Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC에서의 brentuximab vedotin 분리. D0~D8은 서로 다른 DAR 종을 나타냄. 7회 연속 실행으로 얻은 결과 오버레이 표시. “바탕 감산 (Blank Subtraction)” 기능을 적용하여 동일한 시퀀스에서 실행되는 바탕 주입을 통해 완충액 A의 ammonium sulfate 염으로 인한 베이스라인 이동을 필터링함.

HIC 분석을 통해 약물 결합종 분포의 특성을 규명하고 DAR 또한 결정할 수 있었습니다. 각 피크의 피크 면적과 각 약물 부하를 통합하여 전체 DAR을 계산할 수 있습니다 (수식 1).

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 피크 면적} \times n_{drug}}{\text{총 LC 피크 면적}}$$

공식 1.

5개의 관찰된 피크의 적분값 및 면적 백분율 계산값을 종합한 결과, DAR이 3.3 정도로 나타났습니다(표 1 참조).

표 1. DAR 중별 결과.

DAR 종	RT(분)	면적	면적%	DAR 계산값
D0	8.00	89.18	8.11	0
D2	13.22	427.04	38.83	0.78
D4	20.29	405.58	36.88	1.48
D6	24.27	140.51	12.78	0.77
D8	27.48	37.38	3.4	0.27
			DAR	3.3

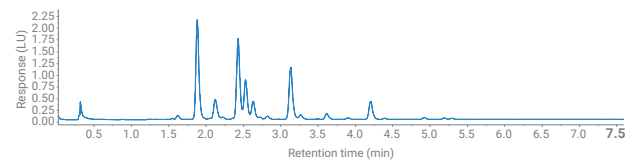
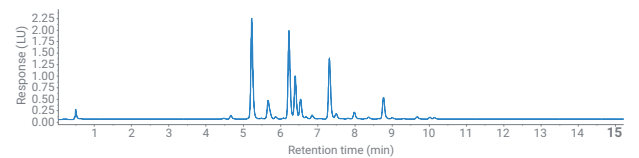
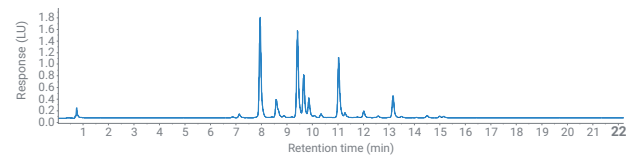
결론

3용매 그레디언트의 HIC에서 세 번째 채널을 이소프로판올 유기 변형제로 사용하여 Brentuximab vedotin을 분석했습니다. 5개의 예상 ADC 종 모두 0, 2, 4, 6 및 8개의 저분자 약물을 각각 포함하는 mAb에 대응되며 잘 분리되었습니다. HIC 분석을 통해 약물 관련 종 분포의 특성을 규명하고 항체당 3.3개의 약물 분자로 계산된 DAR을 결정할 수 있었습니다. Agilent 1260 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프를 포함한 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC를 통해 까다로운 용매 조합을 탁월한 성능으로 처리할 수 있었습니다. 상대 표준 편차가 0.055% 미만으로 머무름 시간의 재현성이 뛰어나 고압 혼합 방식 binary 펌프의 그것과 유사한 성능을 얻음으로써 생성된 데이터에 최상의 신뢰도를 제공했습니다.

참고 문헌

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339-51.
2. Rodriguez-Aller, M. *et al.* Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393-403.

글리칸 분리의 분리능 및 속도



저자

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 분리능 및 속도 최적화 조건에서 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 사용한 2-AB 및 InstantPC 표지 글리칸의 신뢰할 수 있는 분리 과정을 소개합니다. 머무름 시간 정밀도, 면적 정밀도 및 분리능과 같은 성능을 계산한 결과, 모두 우수한 값을 얻음으로써 신뢰성을 입증했습니다. 검출에는 생체 불활성 플로우 셀을 갖춘 Agilent 1260 Infinity II 형광 검출기(FLD)를 사용했습니다. 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 내부 부피가 적으며 고압 혼합 방식의 binary 펌프가 매우 정밀한 용매 조성과 유속을 제공하므로 고분리능 분석법으로부터 속도 최적화된 분석법으로 대등한 결과를 유지하면서 분석법을 이전할 수 있습니다.

서론

오늘날, 단일 클론 항체(mAbs)는 현대 바이오의약품 화합물에서 가장 중요한 부류입니다. 모든 치료용 mAb는 면역글로불린 G(IgG) 계열에 속합니다.¹ IgG는 각 중쇄에 N-연결 당화(glycosylation) 부위를 표면에 가지고 있어 최대 30개의 글리코형 혼합물을 생성합니다.² 당화 패턴이 mAbs의 치료 효능에 중요하기 때문에 QA/QC 과정에서 이 분석이 중요한 역할을 합니다. 또한 당화는 mAbs의 가장 중요한 CQA(주요 품질 속성) 중 하나이기도 합니다.

더 많은 시료를 처리하려면 빠른 시료 전처리 방법뿐만 아니라 복잡한 혼합물에 대해 충분한 분리능을 갖는 빠른 분석법이 필요합니다. 일반적으로 글리칸은 크로마토그래피 분리 후 FLD로 검출하기 위해 형광 화합물로 표지됩니다. 표지 방법은 InstantPC와 같은 최신 표지 화합물을 사용함으로써 더욱 빠르게 이루어졌습니다. 특히 이 표지는 기존 표지에 비해 형광 감도가 높고 질량 분석 검출에서 우수한 이온화 특성을 보여줍니다.³ 이후의 크로마토그래피 분리는 오늘날 글리칸 분리의 표준 방법인 HILIC 컬럼에서 수행했습니다.⁴

이 응용 자료는 Agilent AdvanceBio Glycan Mapping HILIC 컬럼이 장착된 1290 Infinity II Bio LC를 사용하여 형광 표지된 글리칸 래더와 형광 표지 인간 IgG N-글리칸 라이브러리에 대한 고분리능 및 고속 분리 과정을 소개합니다. 면적 및 머무름 시간 RSD 및 분리능과 같은 일반적인 성능 파라미터를 150mm 및 100mm 컬럼에 대해 나타냅니다. 형광 표지의 경우, 전통적인 2-AB 표지와 최신의 InstantPC 표지를 IgG 라이브러리에 대해 비교하여 고분리능 및 고속 분석법에서 동일한 용리 패턴을 얻을 수 있음을 입증합니다.

실험

기기

- Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler (G7137A), 시료 온도 조절 장치 내장 (#101)
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), 생체 적합성 열 교환기 포함
- Agilent 1290 Infinity II 형광 검출기 (FLD) (G7162B), bio-inert 표준 FLD 플로우 셀(G5615-60005) 장착

컬럼

1. Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150mm, 1.8μm(859700-913)
2. Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 100mm, 1.8μm (858700-913)

소프트웨어

Agilent OpenLab 버전 2.5 및 GPC/SEC 애드온 소프트웨어 V. 1.2

시료

- AdvanceBio 2-AB Human IgG N-Glycan Library(제품 번호 GKSB-005)
- AdvanceBio InstantPC Human IgG N-Glycan Library(제품 번호 GKPC-005)
- AdvanceBio 2-AB Glucose Homopolymer Standard(제품 번호 GKSB-503)

화학물질

- 아세토니트릴, HPLC 그레디언트 등급
- 포름산암모늄

화학물질은 VWR(독일)에서 구입하였습니다. 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22μm의 멤브레인 point-of-use 카트리지를 장착한 Milli-Q Integral 시스템(Millipak)에서 얻었습니다.

전체 분석법 설정

파라미터	값
Binary 펌프	
용매	A) 물 + 100mM 포름산암모늄, pH 4.5 B) ACN
MCT	
컬럼 온도	60°C
FLD	
파장(2AB)	Ex. 260nm, Em. 430nm
파장(InstantPC)	Ex. 285nm, Em. 345nm
데이터 수집 속도	18.75Hz(고분리능 분석법)
데이터 수집 속도	39.75Hz(고속 분리 분석법)
시료 주입기	
주입	1µL
니들 세척	3초간, 물/ACN 30/70
고분리능 분석법, 150mm 컬럼	
Binary 펌프	
유속	0.5mL/분
그레디언트	0분—80% B; 22분—55% B; 22.25분—40% B; 24.25분—40% B; 24.5분—80% B; 정지 시간: 24.5분; 사후 시간: 7분
MCT	
	컬럼 1
고분리능 분석법, 100mm 컬럼	
Binary 펌프	
유속	0.5mL/분
그레디언트	0분—80% B; 15분—55% B; 15.25분—40% B; 16.75분—40% B; 17.0분—80% B; 정지 시간: 17.0분; 사후 시간: 5분
MCT	
	컬럼 2
고속 분석법, 100mm 컬럼	
Binary 펌프	
유속	0.75mL/분
그레디언트	0분—75% B; 7.5분—65% B; 7.75분—40% B; 8.75분—40% B; 9.0분—75% B; 정지 시간: 9.0분; 사후 시간: 3분
MCT	
	컬럼 2

결과 및 토의

150mm AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼에서의 고분리능 분석법 초기 개발을 위해 2-AB 형광 표지한 글루코스 기반 글리칸 래더를 사용했습니다. 초기 용매 비율, 종점 용매 비율 및 실행 시간은 잔류 2-AB 표지(0.735분)와 글루코스 단위 1(GU1, 0.934분) 사이에서 우수한 분리능을 갖도록 결정했습니다(그림 1). 글루코스 동중중합체를 분리하여 GU18까지 검출했습니다.

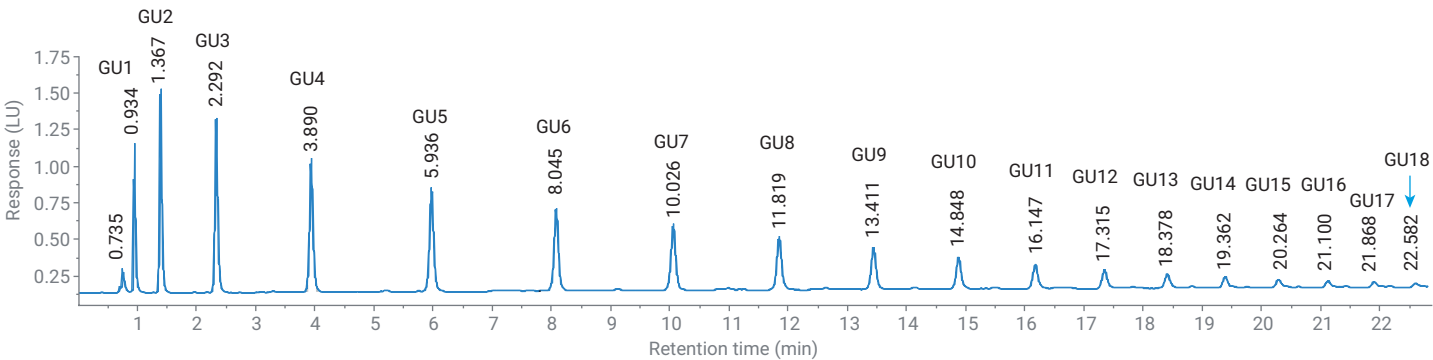


그림 1. 150mm 컬럼에서 글리칸 래더의 고분리능 분리; 일반 선형 그레디언트를 사용하여 시작 부분의 잔류 2-AB 및 GU1에 대한 베이스라인 분리에 맞추어 조정.

잔류 2-AB 및 GU1의 초기 분리능은 4.23이었으며 이는 명확하게 베이스라인 분리가 된 것입니다. 분리능은 8.045분의 GU6까지 증가합니다. 그 보다 더 나중에 용리되는 글루코스 동종중합체의 경우, 피크 폭이 증가함에 따라 분리능이 감소합니다. GU5까지의 면적 RSD는 0.65% 미만이고 GU13까지는 1.17%에서 3.4% 사이입니다. 나중에 용리되는 동종중합체에서 더 높은 면적 RSD를 보이는데, 그에 따른 피크 면적이 작은 것을 알 수 있습니다. 머무름 시간 RSD는 일반적으로 모든 화합물에 대해 0.08% 미만입니다(표 1).

150mm 컬럼에서의 초기 고분리능 분석법을 100mm 컬럼에 맞추어 조정했으며, 그에 맞춰 분리 그레디언트를 15분으로 줄였습니다. 플러싱 및 재생 시간은 100mm 컬럼의 더 낮은 컬럼 부피에 맞게 조정되었습니다. 얻어진 분리에서 잔류 2-AB는 계속해서 GU1와 분리되었으며 18개의 글루코스 동종중합체는 그레디언트 실행 시간 안에서 여전히 베이스라인 분리되었습니다(그림 2).

표 1. 150mm 컬럼에서 글리칸 래더의 분리 성능 결과.

GU	면적 RSD(%)	RT(분)	RT RSD(%)	분리능 USP	폭 50%(분)
1	0.59	0.934	0.06	4.23	0.028
2	0.47	1.367	0.08	8.29	0.034
3	0.64	2.292	0.09	14.03	0.044
4	0.33	3.890	0.08	18.27	0.057
5	0.61	5.936	0.06	18.59	0.069
6	1.23	8.045	0.09	16.89	0.075
7	1.20	10.026	0.08	14.81	0.079
8	1.17	11.819	0.05	12.85	0.082
9	1.50	13.411	0.06	11.17	0.082
10	1.77	14.848	0.05	9.92	0.084
11	2.65	16.147	0.05	8.84	0.085
12	3.40	17.315	0.05	7.92	0.085
13	2.79	18.378	0.05	7.15	0.085
14	6.65	19.362	0.04	6.53	0.089
15	6.44	20.264	0.04	5.99	0.090
16	6.76	21.100	0.03	5.39	0.094
17	6.77	21.868	0.04	4.77	0.093
18	5.57	22.582	0.04	4.52	0.093

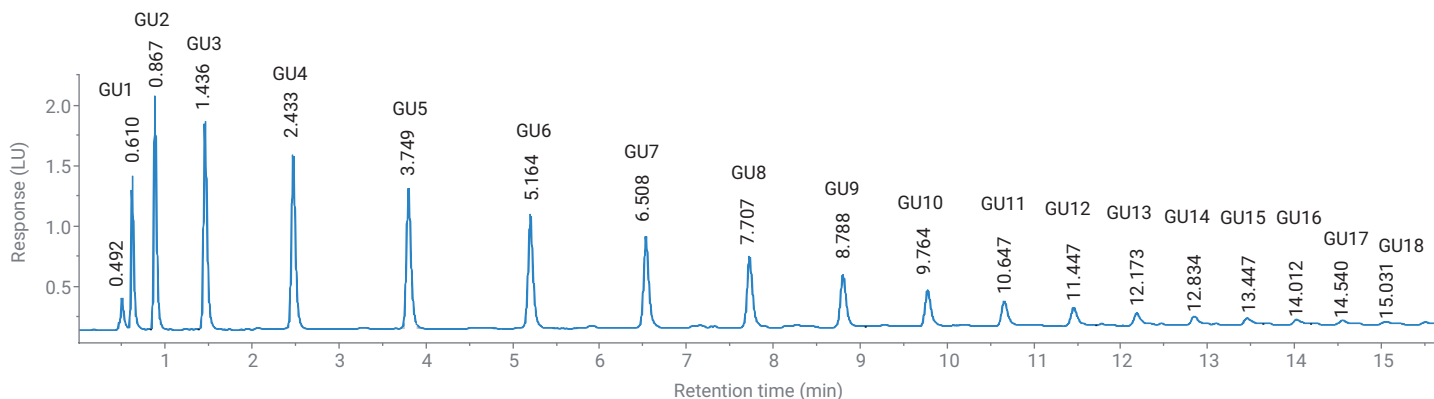


그림 2. 100mm 컬럼에서 글리칸 래더의 고분리능 분리; 짧은 컬럼에 맞게 그레디언트를 조정하여 150mm 컬럼에서 이전됨. 잔류 2AB와 GU1이 여전히 잘 분리됨.

잔류 2-AB 및 GU1의 분리능은 2.16 이었습니다. 분리능도 3.749분에 용리되는 GU5까지 증가합니다. GU4까지 RSD 면적은 1.00% 미만이고 GU14까지는 1.09%에서 3.5% 사이입니다. 나중에 용리되는 동중중합체는 더 높은 면적 RSD를 나타내는데, 그에 따른 피크 면적이 작은 것을 알 수 있습니다. 머무름 시간 RSD는 일반적으로 모든 화합물에 대해 0.09% 미만입니다(표 2).

비교하면(표 1 및 2), 150mm 및 100mm 컬럼에서 얻은 면적 RSD 및 머무름 시간 RSD는 동일한 순서입니다. 물론 분리능은 더 짧은 100mm 컬럼을 사용했을 때 감소하지만 여전히 모든 피크의 베이스라인 분리에 충분할 정도로 높습니다.

100mm AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼과 150mm AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼용으로 개발된 두 고분리능 분석법을 글리칸 시료인 인간 IgG의 형광 표지 N-글리칸 라이브러리 분리에 적용했습니다(그림 3 및 4). 분리는 2-AB 표지 IgG N-글리칸 라이브러리(그림 3A 및 3B)와 InstantPC 표지 IgG N-글리칸 라이브러리(그림 4A 및 4B)로 수행되었습니다. 2-AB 표지 글리칸 라이브러리의 분리는 100mm 및 150mm

표 2. 100mm 컬럼에서 글리칸 래더의 분리 성능 결과.

GU	면적 RSD(%)	RT(분)	RT RSD(%)	분리능 USP	폭 50%(분)
1	0.86	0.610	0.13	2.16	0.031
2	0.82	0.867	0.18	4.87	0.032
3	0.95	1.436	0.19	9.23	0.040
4	0.97	2.433	0.09	13.35	0.048
5	1.09	3.749	0.06	15.02	0.054
6	1.13	5.164	0.03	14.41	0.058
7	1.41	6.508	0.08	12.94	0.061
8	1.24	7.707	0.08	11.11	0.063
9	1.57	8.788	0.05	9.59	0.066
10	2.30	9.764	0.04	8.33	0.069
11	3.46	10.647	0.03	7.28	0.071
12	1.82	11.447	0.02	6.32	0.074
13	1.50	12.173	0.03	5.50	0.078
14	3.25	12.834	0.02	4.87	0.079
15	5.92	13.447	0.03	4.25	0.087
16	3.75	14.012	0.03	3.64	0.097
17	5.38	14.540	0.02	3.06	0.105
18	6.17	15.031	0.04	2.82	0.106

컬럼(그림 3A 및 3B)에 대해 유사한 용리 패턴을 보여주며, 그레디언트 실행 시간은 100mm 컬럼의 경우 약 1/3 더 짧습니다. 두 경우 모두 동일하게 낮은 존재비의 피크를 관찰할 수 있었고 패턴 중간에 용리되는 세 개의 피크는 양호한 분리능으로

분리되었습니다. 예를 들어, 150mm 컬럼에서 9.651분에 용리된 피크는 9.408분에 용리된 피크로부터 1.94의 분리능 값을 가졌습니다. 100mm 컬럼에서 이 피크는 1.68의 분리능으로 6.391분에 용리됩니다.

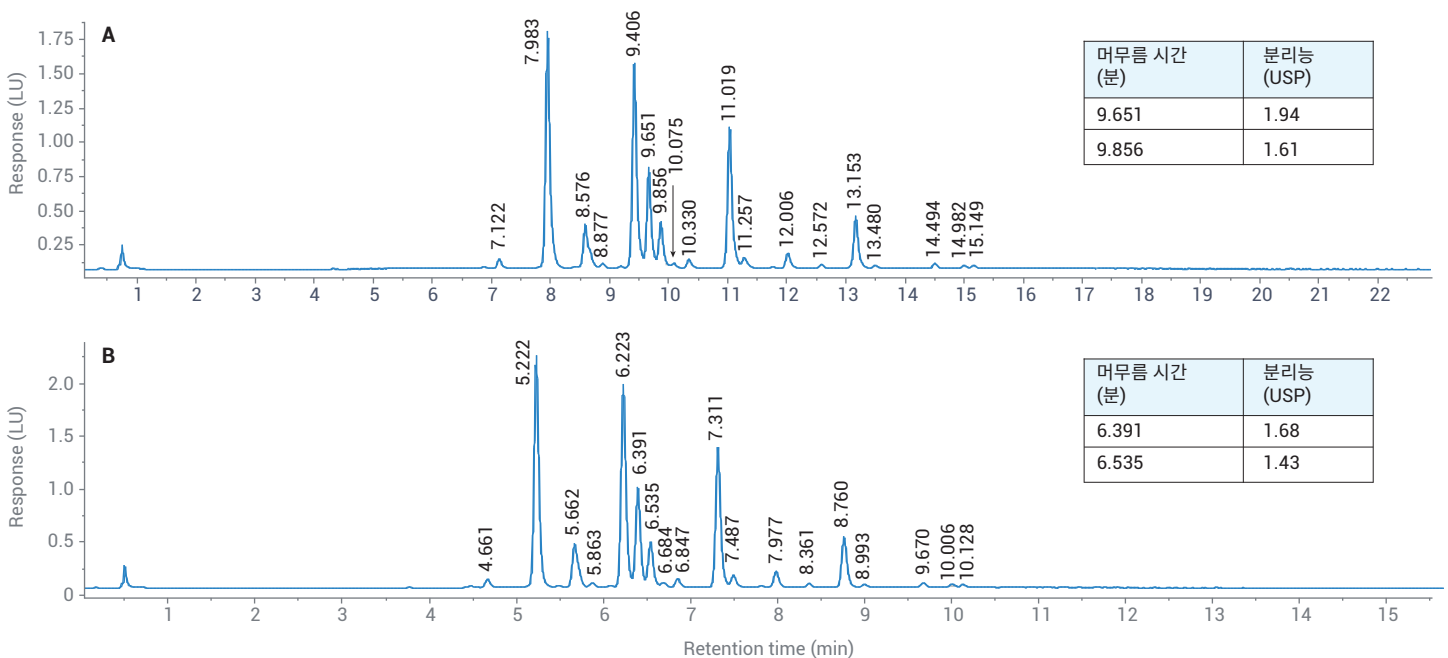


그림 3. 150mm Agilent AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼(A) 및 100mm AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼(B)에서 2-AB 표지 IgG N-글리칸 라이브러리의 고분리능 분리.

형광 표지 InstantPC는 더 높은 형광 감도와 질량 분석 검출에 적합한 이온화 능력을 가지고 있는 보다 최근에 개발된 것입니다.³ 150 및 100mm 컬럼에서 얻은 용리 패턴은 비슷했습니다(그림 4A 및 4B). 두 가지 결과 모두 낮은 수준의 글리칸에 대한 동일한 정보와 피크에 대한 유사한 분리능을 제공했습니다. 100mm 컬럼의

경우 그레디언트 실행 시간이 약 1/3 정도 단축되었습니다. 실행 시간 중간 피크 패턴의 경우, 150mm 컬럼에서 10.702분에 용리된 피크는 10.438분 피크로부터 2.09의 분리능을 나타냈습니다(그림 4A). 100mm 컬럼에서는, 7.186에서 용리된 동일한 피크가 1.74의 분리능을 보였습니다(그림 4B). 150mm 및 100mm 컬럼에서

10.837분 및 7.237분에 용리된 피크와 15.456 및 10.424의 피크 각각에 대해 동일한 거동을 관찰할 수 있었습니다. 적용된 두 표지를 비교해 보면, 글리칸 라이브러리의 InstantPC 표지 분리는 표지 2-AB에 비해 형광 감도가 더 높기 때문에 낮은 존재비의 피크가 더 많이 나타났습니다.

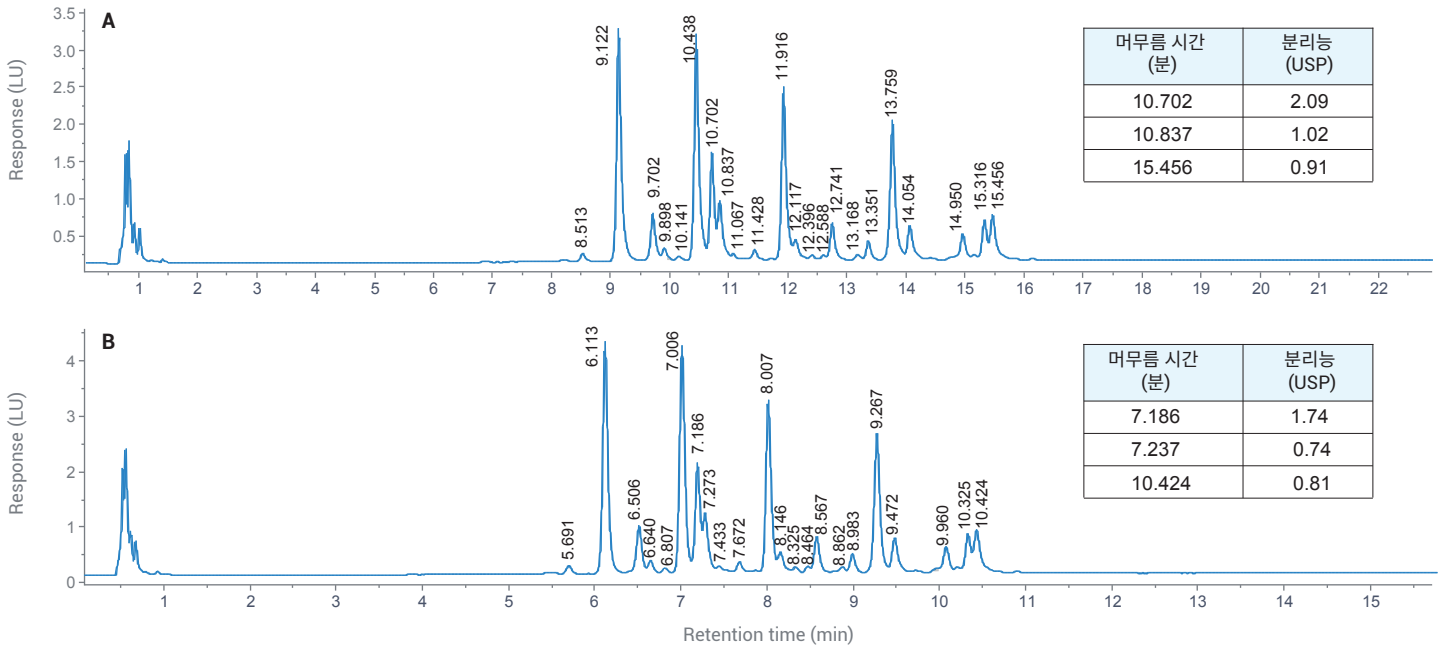


그림 4. 150mm Agilent AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼(A) 및 100mm AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼(B)에서 InstantPC 표지 IgG N-글리칸 라이브러리의 고분리능 분리.

시료 전처리의 개선으로 처리 시간이 훨씬 빨라지고 처리량이 더욱 늘어났기 때문에 빠른 분석 방법이 필요해졌습니다.^{3,4} 따라서 빠른 글리칸 분리를 위한 분석법을 개발하기 위해 100mm 컬럼용으로 개발된 고분리능 분석법을 기초로 했습니다. 이미 알려진 용리 패턴과 충분한 분리능을 유지하면서 실행 시간을 더욱 단축하기 위해 유량을 점진적으로 증가시키면서 그에 따른 그레디언트 시간은 줄였습니다. 그 결과, 50% 더 높은 유량에서 그레디언트 실행 시간이 이전의 절반에 불과한 분석법이 만들어졌습니다. 이 분석법을 사용하여

2-AB 표지 및 InstantPC 표지 IgG N-글리칸 라이브러리의 분리를 비교했습니다(그림 5 및 6).

2-AB 표지 글리칸의 빠른 분리에서 얻은 용리 패턴(그림 5)과 고분리능 방법에서 얻은 분리(그림 3B)를 비교하면 동일한 용리 패턴이 보입니다. 패턴 중간 부분에서 용리된 글리칸에서 얻은 분리능도 시각적 식별과 정량에 충분한 수준입니다. 2.527분에 용리되는 피크는 바로 앞에 용리된 피크로부터 1.24의 충분한 분리능을 가지고 있습니다(고분리능 분석법의 경우 분리능은 1.68).

InstantPC 표지 글리칸의 빠른 분리(그림 6)와 고분리능 분리(그림 4B)를 비교해 보아도 비슷한 용리 패턴을 보여줍니다. 3.063분에 용리되는 피크는 고분리능 분석법에서 얻은 1.74의 분리능 대비 1.48의 분리능을 가졌습니다. 그림 5와 6을 비교해 보면 InstantPC 표지된 시료가 고분리능 분리에서 이미 확인한 바와 같이 낮은 존재비의 글리칸에 대해 더 많은 정보를 제공하는 것 또한 알 수 있습니다. 서로 다른 크로마토그래피 거동으로 인해 InstantPC 표지 화합물의 분리능이 2-AB 표지 글리칸 대비 저하된 경우도 일부 있습니다.

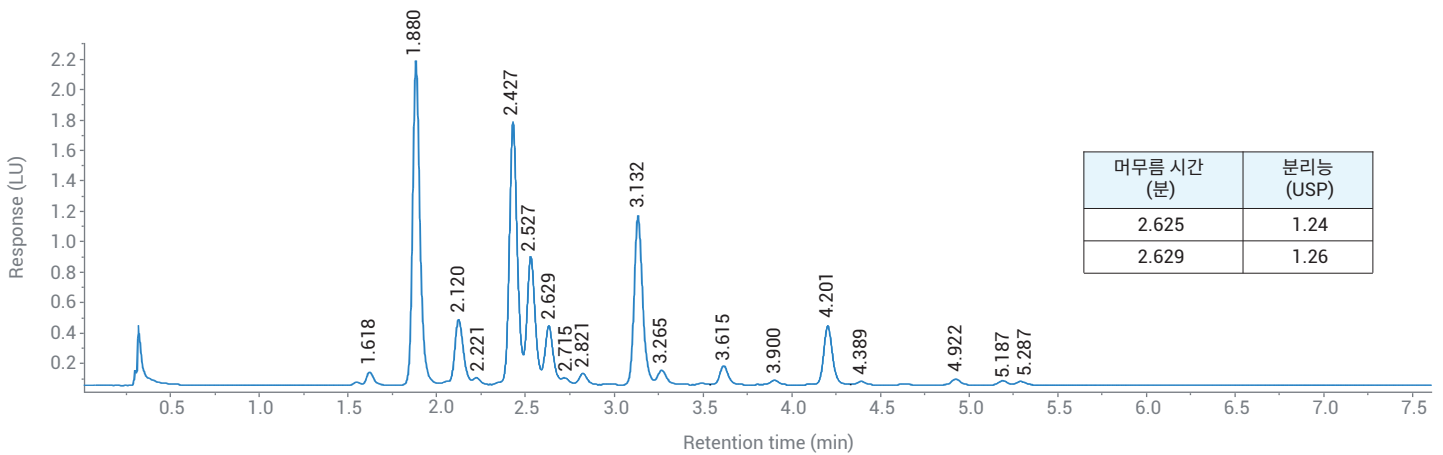


그림 5. 100mm Agilent AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼에서 개발한 고속 분리 분석법을 통해 얻은 2-AB 표지 IgG N-글리칸 라이브러리의 분리 결과.

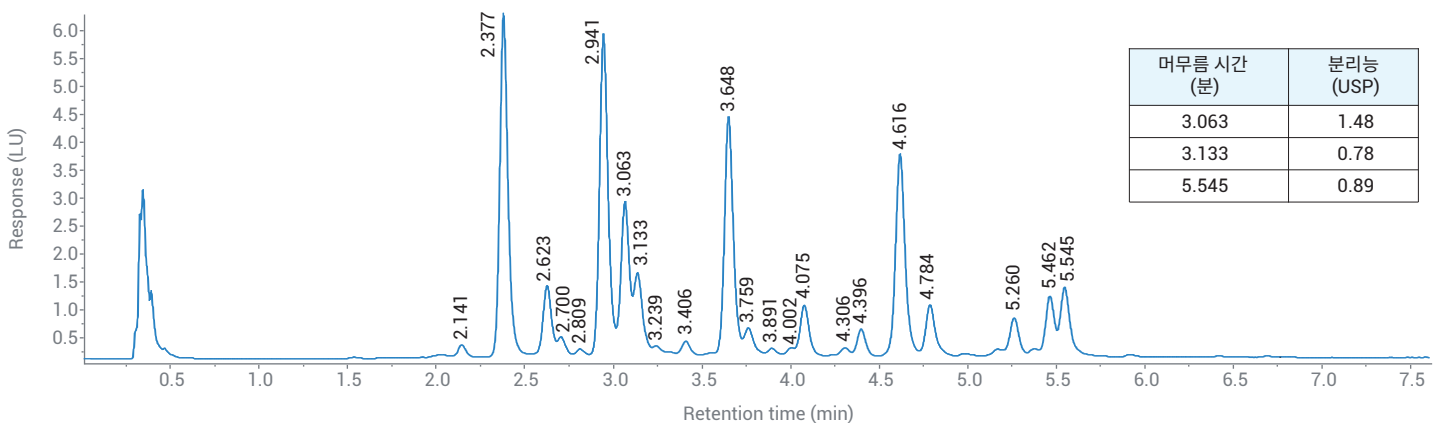


그림 6. 100mm Agilent AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼에서 개발한 고속 분리 분석법을 통해 얻은 InstantPC 표지 IgG N-글리칸 라이브러리의 분리 결과.

결론

이 응용 자료에서는 1290 Infinity II Bio LC를 형광 표지 글리칸 분리에 사용하는 방법을 소개하였습니다. 생체 적합성을 갖춘 UHPLC 시스템을 사용하면 시스템의 활성 표면에 대한 비특이적 흡착으로 인해 존재비가 낮은 화합물을 놓칠 위험 없이 글리칸과 같은 매우 복잡한 생체 화합물을 분석할 수 있습니다.

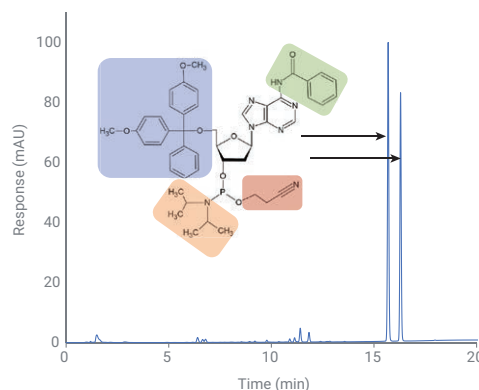
1290 Infinity II Bio LC 시스템이 가진 낮은 내부 지연 부피 및 1290 Infinity II Bio 고속 펌프가 제공하는 정밀한 용매 혼합과 유속으로 인해 고분리능 분석법에서 속도 최적화 분석법으로의 분석법 이전 시 비슷한 결과를 얻을 수 있습니다. 머무름 시간 정밀도, 면적 정밀도 및 분리능과 같이 계산된 모든 성능 값이 우수한 결과를 나타냈습니다.

참고 문헌

1. Jefferis, R. Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21(1), 11-16.
2. Arnold, J. N. *et al.* Human Immunoglobulin glycosylation and the Lectin Pathway of Complement Activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, 564, 27-43.
3. Yan, J.; Jones, A. Streamlined Workflows for N-Glycan Analysis of Biotherapeutics using Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC and 2-AB Express Sample Preparation with FLD/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1348EN, **2019**.
4. Marosella, J. *et al.* A Novel HILIC Column for High Speed N-linked Glycan Analysis. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-4886EN, **2017**.

올리고뉴클레오타이드 합성을 위한 원료약품 분석

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 사용한
nucleoside phosphoramidite 분석의 유연하고 견고한
분석법 개발



저자

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

개요

최고 품질의 완제품을 확보하기 위해서는 바이오의약품 생산 공정의 첫 번째 단계로서 모든 합성용 원료약품(raw material)을 철저히 분석해야 합니다. 올리고뉴클레오타이드의 경우 이러한 원료품을 nucleoside phosphoramidite라고 하며 이후의 DNA 합성에서 기본 단위 물질의 역할을 합니다. 이 응용 자료에서는 생체 적합성을 갖춘 Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 기반으로 LC 분석법을 개발했습니다. 해당 LC를 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 결합하면 여러 불순물을 측정된 정확한 질량(accurate mass)으로 식별할 수 있으며, 우수한 머무름 시간과 면적 정밀도를 보여주는 4채널 Agilent 1290 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프로 분석법 개발을 쉽게 수행할 수 있습니다. 이를 바탕으로 뛰어난 성능을 유지하면서 LC 실행 시간을 66% 단축하는 추가 분석법 개발을 진행했으며 분석법 호환성 실험을 수행한 결과, 기존 Agilent 1290 Infinity II LC로부터 분석법을 원활하게 이전할 수 있음을 입증했습니다. 이러한 결과를 종합해 보았을 때, 1290 Infinity II Bio LC는 올리고뉴클레오타이드 합성을 위한 원료품을 견고하고 유연하게 분석하기 위한 완벽한 선택임을 알 수 있습니다.

서론

DNA 올리고뉴클레오타이드의 화학적 합성은 현대 분자 생물학을 견인하는 기술 중 하나로 자리 잡았습니다.¹ 최근에 올리고뉴클레오타이드 기반의 여러 바이오의약품이 승인²된 것과 관련하여 올리고뉴클레오타이드의 제조 및 생산 체인 전반에 걸쳐 안정적이고 강력한 분석법에 대한 필요성이 증가하고 있습니다.

Nucleoside phosphoramidite는 관련 보호 그룹을 빠르고 쉽게 제거할 수 있어 DNA 합성 기술의 절대 표준이 되는 기본 단위 물질로 간주됩니다.³ 천연 뉴클레오사이드에는 하이드록실(-OH) 및 아미노(-NH₂) 그룹과 같은 반응성 부위가 풍부합니다. Phosphoramidite 구성 단위에서는 이러한 작용기가 변경됩니다. 그림 1은 다음의 네 가지 고유한 변형을 가진 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 분자의 구조식을 보여줍니다: Deoxyribose의 5'-hydroxyl 그룹을 보호하는 dimethoxytrityl(DMT) 그룹(파란색), diisopropylamino(주황색) 및 phosphoramidite 부분을 변형시키는 2-cyanoethyl(빨간색) 그룹, 그리고 아데닌 염기에서 아미노 그룹을 보호하는 benzoyl(녹색) 그룹. 변형 후, deoxyadenosine(dA), deoxyguanosine(dG), deoxycytidine(dC) 및 deoxythymidine(dT)과 같은 해당 DNA 뉴클레오사이드의 phosphoramidite는 별도의 탈보호, 커플링, 산화 및 캡핑 단계로 구성된 다중 합성 사이클을 통해 이후의 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성에서 원료약품으로 작용합니다.¹ 그러나 시퀀스 불순물을 최소화하고 커플링 효율성을 개선하기 위해서는 원료약품의 순도와 불순물을 면밀히 모니터링하고 식별해야 합니다.

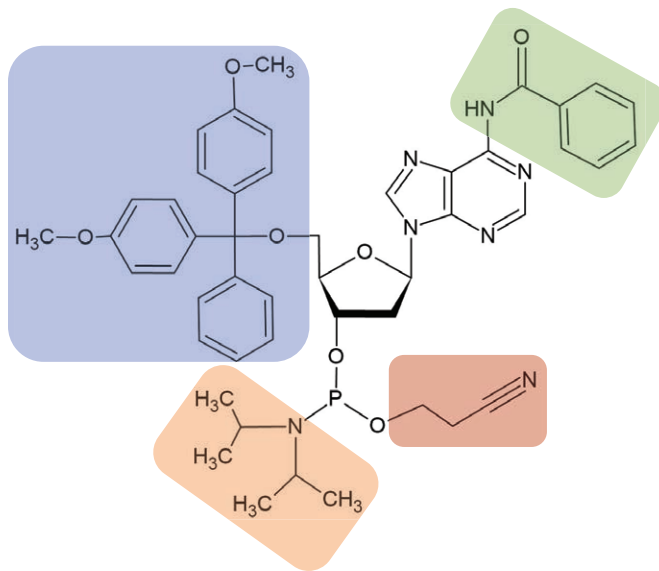


그림 1. 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 분자에서 변형된 그룹의 개략도. 파란색: dimethoxytrityl(DMT) 그룹. 녹색: benzoyl 그룹. 주황색: diisopropylamino 그룹. 빨간색: 2-cyanoethyl 그룹.

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 LC 시스템:

- Agilent 1290 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프(G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler(G7137A), 시료 온도 조절 장치(옵션 101) 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), Standard Flow Quick Connect Bio 열 교환기(G7116-60071) 및 두 개의 애질런트 열평형 장치(G7116-60013) 장착
- 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)

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템의 경우는 다음 모듈로 구성했습니다:

Agilent 1290 Infinity II LC:

- Agilent 1290 Infinity II Flexible 펌프(G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167A), 시료 온도 조절 장치(옵션 101) 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), Standard Flow Quick Connect 열 교환기(G7116-60015) 및 두 개의 애질런트 열평형 장치(G7116-60013) 장착
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기(VWD) (G7114B), VWD용 Micro Flow Cell(3mm, 2μL, RFID) 장착

소프트웨어

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

컬럼

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 95 Å, 2.1 × 100mm, 1.8µm(제품 번호 959758-902)

화학물질

InfinityLab Ultrapure LC/MS 아세트니트릴 (제품 번호 5191-4496) 및 InfinityLab Ultrapure LC/MS 물(제품 번호 5191-4498)이 사용되었습니다. 암모늄 아세테이트 및 아세트산은 VWR(독일, 다름슈타트)에서 구했습니다.

시료 전처리

올리고뉴클레오타이드 합성을 위한 실제 5'-O-DMT 2'-deoxyadenosine phosphoramidite(dA) 원료약품은 Agilent Nucleic Acid Solutions Division으로부터 제공받았습니다. 주입 농도는 1mg/mL phosphoramidite(아세트니트릴)였습니다.

표 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC에 의한 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 원료약품의 불순물 분석관련 이온화원 및 MS 파라미터.

파라미터	값
기기	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
가스 온도	320°C
건조 가스 유속	8L/분
Nebulizer	35psi
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유속	11L/분
VCap	3,500V
노즐 전압	1,000V
Fragmentor	140 V
스키머	65V
Oct 1 RF Vpp	750V
수집 모드	양이온, 확장된(m/z 10,000) 질량 범위
질량 범위	m/z 25~10,000
수집 속도	1스펙트럼/초
기준 질량	m/z 121.050873, m/z 922.0098

표 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 사용하여 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 원료약품의 불순물을 분석하기 위한 분석법 A.

파라미터	값																																
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 95 Å, 2.1 × 100mm, 1.8µm																																
용매	A) 아세토니트릴 B) 물 C) 500mM 암모늄 아세테이트, pH 5.5																																
그레디언트	<table><tr><th>시간 (분)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th><th>C (%)</th></tr><tr><td>0.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>1.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>15.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>15.01</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>18.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>18.01</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>25.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr></table>	시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)	0.00	50	48	2	1.00	50	48	2	15.00	90	8	2	15.01	90	8	2	18.00	90	8	2	18.01	50	48	2	25.00	50	48	2
시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)																														
0.00	50	48	2																														
1.00	50	48	2																														
15.00	90	8	2																														
15.01	90	8	2																														
18.00	90	8	2																														
18.01	50	48	2																														
25.00	50	48	2																														
유속	0.200mL/분																																
온도	열 평형 장치가 설치된 경우 20°C																																
UV 검출	VWD: 236nm, 10Hz/MS: 표 2 참조																																
주입	주입량: 2µL 시료 온도: 4°C 세척: 90% 아세토니트릴/10% 물로 3초(플러시 포트)																																

표 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 사용한 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 원료약품의 불순물 분석에 대해 실행 시간 최적화된 분석법 B.

파라미터	값																																
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 95 Å, 2.1 × 100mm, 1.8µm																																
용매	A) 아세트니트릴 B) 물 C) 500mM 암모늄 아세테이트, pH 5.5																																
그레디언트	<table><tr><td>시간 (분)</td><td>A (%)</td><td>B (%)</td><td>C (%)</td></tr><tr><td>0.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>0.33</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>5.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>5.01</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>6.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>6.01</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>8.33</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr></table>	시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)	0.00	50	48	2	0.33	50	48	2	5.00	90	8	2	5.01	90	8	2	6.00	90	8	2	6.01	50	48	2	8.33	50	48	2
시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)																														
0.00	50	48	2																														
0.33	50	48	2																														
5.00	90	8	2																														
5.01	90	8	2																														
6.00	90	8	2																														
6.01	50	48	2																														
8.33	50	48	2																														
유속	0.600mL/분																																
컬럼 온도	열 평형 장치가 설치된 경우 20°C																																
UV 검출	VWD: 236nm, 10Hz																																
주입	주입량: 2µL 시료 온도: 4°C 세척: 90% 아세트니트릴/10% 물로 3초(플러시 포트)																																

결과 및 토의

HPLC 분석법 개발과, 초기 공정 개발 및 품질 관리와 같은 다른 업무 부서로 분석법을 이전하는 일은 지루하고 번거로울 수 있습니다. 그러나 1290 Infinity II Bio LC 시스템에서 1290 Infinity II Bio 플렉시블 펌프가 제공하는 다용도성으로 인해 분석법을 보다 견고하고 편리하게 개발할 수 있습니다. 이를 입증하기 위해 4채널 Infinity II Bio Flexible 펌프에서 3용매 그레디언트를 사용하여 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 원료약품에 대한 불순물 분석 LC 분석법을 개발했습니다. 1290 Infinity II Bio LC의 부식 방지 유동 경로로 인해 500mM 암모늄 아세테이트(pH 5.5)와 같은 고농도 완충액을 분석법 개발에 일상적으로 사용할 수 있습니다. 이를 바탕으로 기기 안에서 즉각적으로 실행되는 그레디언트 혼합을 이용해 다양한 양과 유형의 완충액을 빠르게 선별할 수 있습니다(표 1, 분석법 A). 1290 Infinity II Bio LC를 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 순차적으로 연결하여 생성물과 3가지 불순물(표 4)을 측정된 정확한 질량을 이용해 식별할 수 있었으며, 이를 통해 화합물의 UV 및 MS 동시 분석이 가능했습니다. Phosphoramidite의 인(P) 원자 키랄 중심에서의 에피머화(epimerization)로 인해 생성물, 불순물 2 및 불순물 3에 대한 두 개의 피크(A 및 B)를 볼 수 있습니다.

그림 2는 Bio Micro 플로우 셀이 장착된 VWD로 원료약품을 분리 검출한 크로마토그램입니다. 하단 크로마토그램은 불순물을 확대한 모습으로, 관심 피크가 잘 분리된 것을 볼 수 있습니다. 3'-DMT-deoxy adenosine 5'-phosphoramidite(불순물 2A/2B) 분석은 소위 “reverse amidite”가 후속 DNA 합성에서 오류를 일으킬 수 있기 때문에 특히 중요합니다.

표 4. 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 원료약품에서 식별된 생성물과 불순물.

이름	종	머무름 시간(분)
5'-DMT-Deoxy Adenosine 3'-Phosphoramidite	생성물 A	15.69
	생성물 B	16.29
5'-DMT-Deoxy Adenosine	불순물 1	6.40
3'-DMT-Deoxy Adenosine 5'-Phosphoramidite (Reverse Amidite)	불순물 2A	10.89
	불순물 2B	11.13
5'-DMT-Deoxy Adenosine Phosphoramidate	불순물 3A	11.41
	불순물 3B	11.83

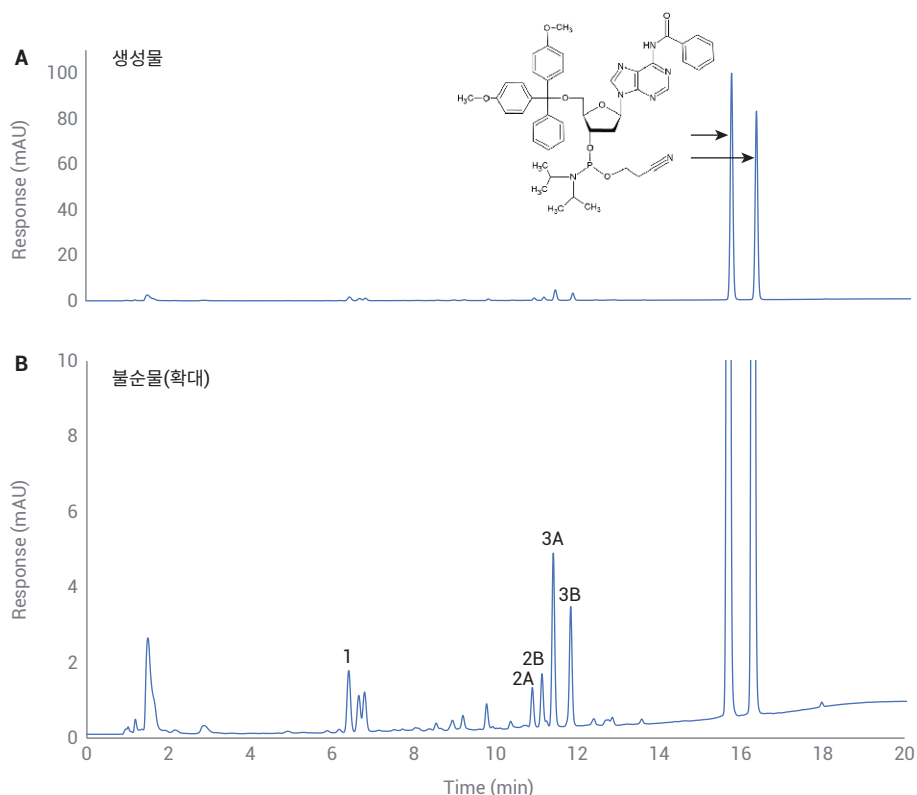


그림 2. A: Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 사용한 원료약품의 LC 분리(분석법 A)를 보여주는 크로마토그램 (생성물에 집중하여 나타냄). B: 불순물을 더 잘 볼 수 있도록 동일 크로마토그램을 확대한 보기.

10회 연속 주입을 분석하여 1290 Infinity II Bio LC 성능을 추가로 조사하고 머무름 시간 및 면적 정밀도 값을 계산했습니다 (표 5). 생성물 및 불순물에 대해 0.015%에서 0.050% 사이의 우수한 머무름 시간 RSD 값이 측정되어 까다로운 3용매 그레디언트 분리 실행 시 1290 Infinity II Bio 플렉시블 펌프의 뛰어난 성능을 입증했습니다. 뿐만 아니라 면적 정밀도 측면에서도 1290 Infinity II Bio LC의 성능은 상대 표준 편차 평균 0.269%로 탁월했습니다. 1290 Infinity II Bio LC와 1290 Infinity II LC의 분석법 호환성을 추가로 평가하기 위해 앞서 수행한 실험을 1290 Infinity II LC에서도 실행했습니다. 표 5는 두 LC 시스템의 절대 머무름 시간이 평균 0.686% 정도만 차이가 남을 보여주며, 이는 1290 Infinity II LC로 부더의 탁월한 분석법 이전 가능성을 보여줍니다.

현대의 실험실, 특히 바이오의약품 및 그 원료약품의 품질 관리를 위한 일상적인 분석에서 시간은 중요한 자원입니다. 따라서 LC 분석의 실행 시간을 단축하기 위해 추가적인 분석법 개발을 진행했습니다. 1290 Infinity II Bio LC 시스템에서는 최대 1,300bar의 고압을 견딜 수 있기 때문에 높은 유속과 작은 입자를 사용하여 성능과 실행 시간을 최적화할 수 있습니다. 유속을 0.6mL/분으로 늘리고 그레디언트 부피를 일정하게 유지한 결과, LC 분석법이 단 8.33분으로 66% 단축되었습니다(표 2, 분석법 B). 실행 시간이 단축되었음에도 불구하고 높은 머무름 시간 및 면적 정밀도 (그림 3 및 표 6)로 성능이 뛰어나게 유지됨으로써 1290 Infinity II Bio LC를 올리고뉴클레오타이드 생산 과정 전반에 걸친 다양하고 견고한 분석법 개발 시스템으로 사용하기에 완벽한 것으로 확인되었습니다.

표 5. 분석법 A로 분석한 화합물의 머무름 시간 및 면적 정밀도 값, 그리고 Agilent 1290 Infinity II Bio LC와 Agilent 1290 Infinity II LC 사이의 절대 머무름 시간 편차 비교.

종	머무름 시간 RSD(%)	면적 RSD(%)	머무름 시간 편차 - 1290 Bio LC vs. 1290 LC(%)
생성물 A	0.017	0.113	0.07
생성물 B	0.015	0.118	0.19
불순물 1	0.050	0.211	1.53
불순물 2A	0.026	0.314	0.85
불순물 2B	0.020	0.539	0.76
불순물 3A	0.022	0.209	0.73
불순물 3B	0.021	0.378	0.67

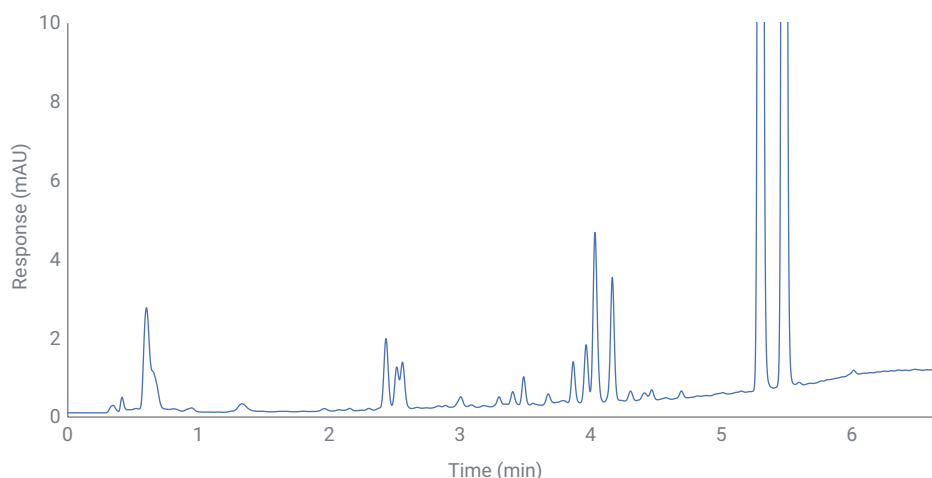


그림 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 사용하여 원료약품을 더 짧은 실행 시간(분석법 B)으로 LC 분리한 결과의 확대 보기.

표 6. 분석법 B로 분석한 화합물의 머무름 시간 및 면적 정밀도 값.

종	머무름 시간(분)	머무름 시간 RSD(%)	면적 RSD(%)
생성물 A	5.30	0.042	0.180
생성물 B	5.48	0.40	0.185
불순물 1	2.43	0.115	0.214
불순물 2A	3.86	0.079	0.557
불순물 2B	3.96	0.066	0.986
불순물 3A	4.03	0.065	0.355
불순물 3B	4.16	0.059	0.301

결론

Phosphoramidite를 기반으로 한 DNA 합성 기술은 1980년대부터 존재해 왔지만 관련 분석 문제를 간소화하는 것이 여전히 중요한 과제입니다. 이 응용 자료에서는 플렉시블 펌프를 장착한 Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 이용해 공정 개발 및 품질 관리 환경에서 5'-DMT-deoxy adenosine 3'-phosphoramidite 기본 단위 물질의 실제 원료약품에 대해 높은 신뢰도로 불순물 분석을 수행할 수 있음을 보여주었습니다. 다용도성과 고성능을 제공하는 Agilent 1290 Infinity II Bio 플렉시블 펌프와 전체 1290 Infinity II Bio LC 시스템에 걸친 생체 적합성 유동 경로의 결합으로 탁월한 머무름 시간과 면적 정밀도를 달성했으며 완벽한 분석법 호환성을 보여주었습니다. 이는 1290 Infinity II Bio LC 시스템이 까다로운 생체분자 분석에 있어 미래에도 경쟁력을 갖춘 선택인 이유입니다.

참고 문헌

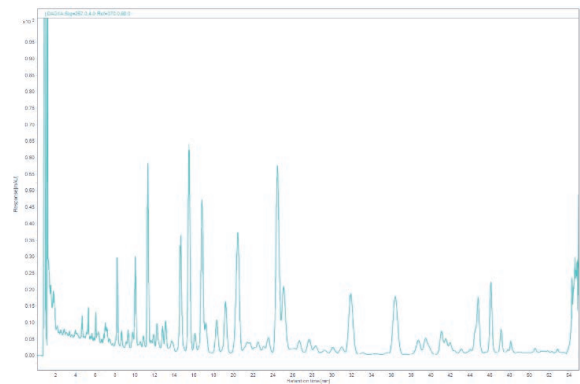
1. Hughes, R. A.; Ellington, A. D. Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, 9, a023812.
2. Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, 19, 673-694.
3. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites—A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.

LC 분석법 호환성 결정을 위한 성능 비교

Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템과 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템 비교 연구



BIO



저자

Jochen Strassner
Agilent Technologies, Inc.

개요

새로운 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템에는 정격 압력 800bar의 quaternary 펌프가 장착되어 있어 수많은 응용을 용이하게 합니다. 적합한 응용으로는 저분자 중심의 역상 LC 응용과 비변성 단백질 및 핵산 등을 포함한 생체분자 분야를 들 수 있습니다. 철을 완전히 함유하지 않고 견고하며 활용성이 높은 이 액체 크로마토그래피 시스템의 성능을 동급 스테인리스 강 기반 제품인 Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템과 비교해 봅니다.

펌프 혼합 정밀도 및 분석법 호환성 측면에서 성능을 비교하기 위해 등용매, 빠른 그레디언트 및 얇은 그레디언트를 적용했습니다. 두 시스템 모두 적용한 모든 조건에서 매우 우수한 재현성을 보여주었습니다. 등용매 및 빠른 그레디언트에서 탁월한 분석법 호환성이 확인된 반면, 얇은 그레디언트 분석법의 경우 작은 이동상 조성 변화가 시료 구성 성분의 머무름 시간(RT)에 높은 영향을 미치는 관계로 약간의 조정이 필요했습니다.

서론

(U)HPLC에서 단백질 및 핵산과 같은 생체분자를 시료로 사용하는 응용의 수가 꾸준히 증가하고 있습니다. 이는 특히 이동상으로 사용되는 고염 완충제와 염산, 수산화나트륨 및 요소와 같은 가혹한 정치세척(CIP) 용매와 관련하여 LC 하드웨어의 유용성과 견고성에 대한 우려를 불러 일으킵니다. 바이오 응용과 표준 역상 응용 모두에서 최고의 성능을 제공할 수 있도록 이러한 실험 및 세척 조건을 견딜 수 있는 견고하고 신뢰할 수 있는 기기에 대한 분명한 요구가 있습니다.

1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템은 핵심 용매 전달 모듈인 800bar quaternary 펌프로 구성된 범용 시스템 제품군 중 하나입니다. 표준 역상 응용 분야에서 이에 대응하는 제품은 1260 Infinity II Prime LC 시스템입니다. 두 시스템 모두 동일한 성능 사양을 공유합니다.

분석법 호환성은 기존 애질런트 LC 시스템을 대체하기 위해 새로운 LC 기기를 구매하려는 고객의 유력한 검토사항입니다. 두 1260 Infinity II Prime 시스템의 성능 사양이 동일하므로 일반적으로 분석법 호환이 가능합니다.

이 기술 개요에서는 다양한 적용 조건(즉, 등용매, 빠른 그레디언트 및 얇은 그레디언트 모드)에서 철을 함유하지 않은 생체 적합성의 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템과 스테인리스 강(SST) 기반 1260 Infinity II Prime LC 시스템의 펌프 성능을 비교합니다.

실험

장비

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity II 바이오 플렉시블 펌프(G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler (G7137A) 및 시료 온도 조절 장치(#101 옵션)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), 표준 유량 생체 적합성 열 교환기 포함
- Agilent 1290 Infinity II DAD(G7117B), 생체 적합성 InfinityLab Max-Light 카트리지가 셀, 10mm 장착

Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity II Flexible 펌프 (G7104C)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), 시료 온도 조절 장치(옵션 #101) 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II DAD(G7117B)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.5 이상.

컬럼

- 등용매 분석법:

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150mm, 5µm(제품 번호 959993-902)

- 빠른 그레디언트 분석법: Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 2.7µm(제품 번호 699775-902)

- 얇은 그레디언트 분석법:

Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 150mm, 2.7µm(제품 번호 683775-902)

화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. 초순수는 0.22µm 멤브레인 point-of-use 카트리지가(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국). 아세트오닐리, Lichrosolv 및 메탄올은 VWR International (독일 다름슈타트)에서 구입했습니다.

시료

- 애질런트 등용매 시료(제품 번호 01080-68704)
- 애질런트 RRLC 혼합물(제품 번호 5188-6529)
- 영지버섯(Ganoderma Lucidum) 자실체 건조 추출물(USP 표준물질, 카탈로그 번호 1288372) 15.5mg 영지버섯 자실체 건조 추출물을 7.75mL 메탄올에 용해하고 볼텍스한 다음 초음파 처리했습니다. 진공 농축기에서 약 4배 농축 단계를 거친 후, 원심 분리하고 0.22µm 시린지 필터를 통해 여과하여 최종 시료 용액을 얻었습니다.

분석법

등용매 분석법

표 1. 등용매 분석법 조건.

파라미터	값
용매	A) 물 B) 아세토니트릴(ACN) C) ACN D) 물
그레디언트	등용매, 65% B(채널 A/B) 또는 65% C(채널 C/D) 정지 시간: 20분 사후 시간: 꺼짐
펌프 설정	최소 스트로크: 자동 압축률: $60 \times 10^{-6}/\text{bar}$ 1차 채널: 자동
유속	1.000mL/분
온도	40°C
검출	254nm 10Hz
주입	주입량: 5 μ L 시료 온도: 10°C 니들 세척: ACN/물에서 3초(50/50)

빠른 그레디언트 분석법

표 2. 빠른 그레디언트 분석법 조건.

파라미터	값
용매	A) 물 B) ACN
그레디언트	0분 20% B 5분 90% B 정지 시간: 6분 사후 시간: 3분
펌프 설정	최소 스트로크: 자동 압축률: $55 \times 10^{-6}/\text{bar}$ 1차 채널: 자동
유속	1.000mL/분
온도	40°C
검출	245nm 40Hz
주입	주입량: 5 μ L 시료 온도: 10°C 니들 세척: ACN/물에서 3초(50/50)

얇은 그레디언트 분석법

표 3. 얇은 그레디언트 분석법 조건.

파라미터	값
용매	A) 0.075% 인산 수용액 B) ACN
그레디언트	0분 20% B 3분 26.5% B 34분 26.5% B 52분 38.5% B 54분 100% B 정지 시간: 55분 사후 시간: 15분
펌프 설정	최소 스트로크: 자동 압축률: $50 \times 10^{-6}/\text{bar}$ 1차 채널: 자동
유속	0.400mL/분
온도	30°C
검출	257nm 20Hz
주입	주입량: 5 μ L 시료 온도: 10°C 니들 세척: ACN/물에서 3초(50/50)

결과 및 토의

등용매 분석법

이 응용 자료를 통해, 등용매 시료의 성분을 정확하고 안정적이며 정밀하게 분리하기 위해 이동상을 혼합하는 펌프의 능력을 알아보았습니다. 등용매 시료를 10회 주입하여 반복성 및 분석법 호환성을 테스트했습니다. 여기서 하나의 시퀀스는 용매 채널 A/B을, 두 번째 시퀀스는 C/D를 이동상 혼합 용매 라인으로 사용하여 실행했습니다. 각 시퀀스의 마지막 7개 연속 크로마토그램을 평가에 사용했습니다 (그림 1 참조).

두 시스템에서 동일한 분석법을 실행했습니다. 해당 크로마토그램의 오버레이는 두 시스템을 사용한 두 채널의 조합에서 피크 머무름 시간 측면의 우수한 반복성을 입증합니다. 피크 모양의 작은 차이는 기기 간의 미소한 차이와 관련이 있습니다.

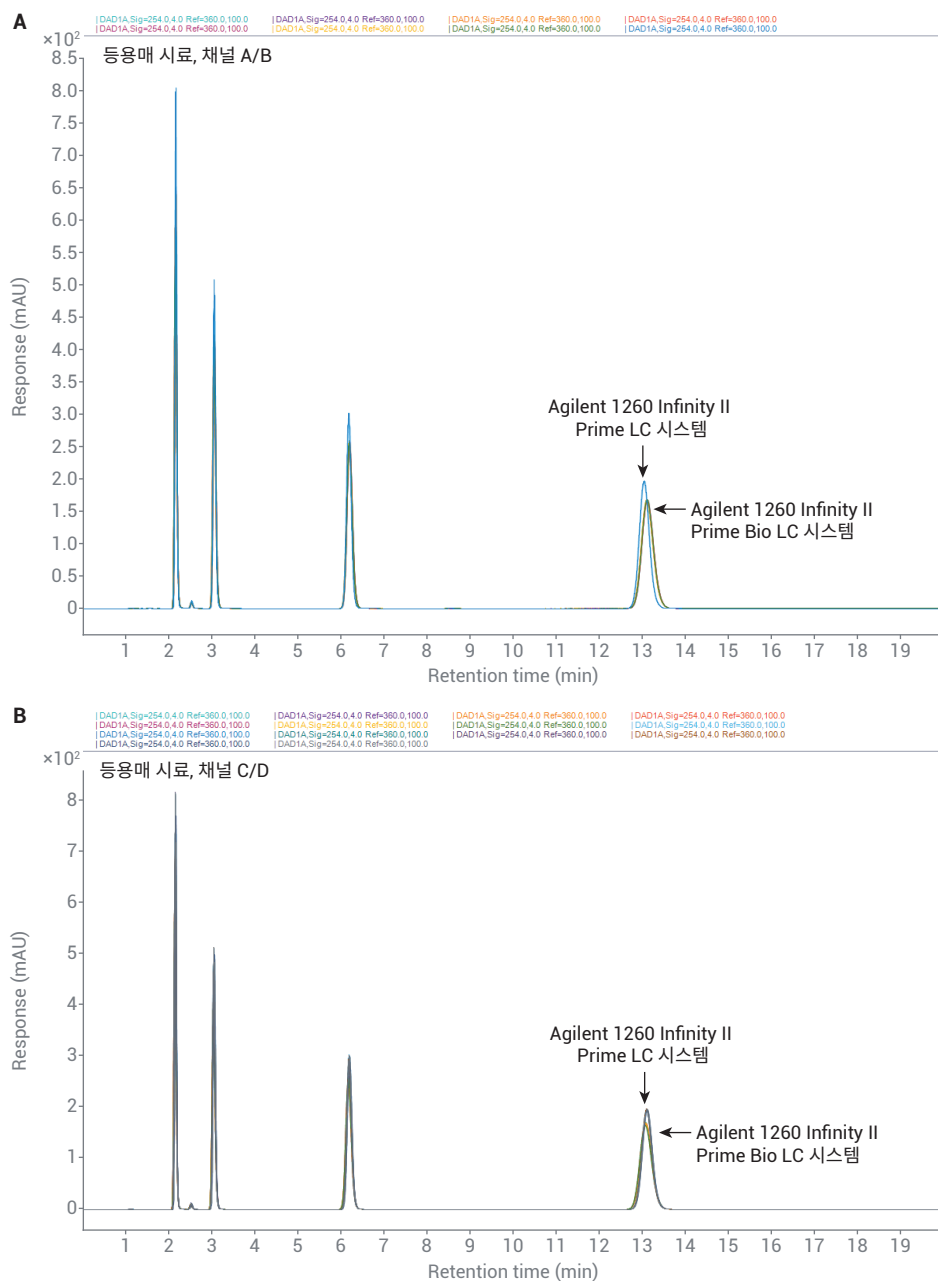


그림 1. Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템 및 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템에서 실행한 등용매 시료의 7회 연속 크로마토그래피 결과 오버레이. (A) 채널 A/B에 대한 데이터; (B) 채널 C/D에 대한 데이터.

두 시스템에 대한 용매 조성 정밀도 사양은 <0.15% RSD 또는 0.02분 SD(둘 중 더 큰 값으로 결정)로 정의됩니다. 표 4는 등용매 시료 구성 성분의 각 머무름 시간에 대한 조성 정밀도 RSD 값을 보여줍니다. 사용된 모든 용매 채널 조합에서 높은 펌프 성능을 확인할 수 있었습니다. RT 편차가 ±1% 범위보다 훨씬 낮은 수준으로 분석법 호환성이 뛰어나, 두 기기의 성능 일치도가 높음을 보여줍니다.

빠른 그레디언트 분석법

UHPLC 분석법은 일반적으로 작은 입자 컬럼을 사용하여 상대적으로 높은 역압에서 실행되는 더 빠르고 가파른 용매 조성 그레디언트를 특징으로 합니다. 이번 테스트에서는, 20% B에서 시작하여 최대 90% B에 이르는 5분간의 그레디언트와 6분의 실행 시간이 적용되었습니다. 두 시스템에서 생성된 7개의 UV 신호를 오버레이한 결과, 펌프 혼합 정밀도의 재현성이 매우 우수한 것으로 나타났습니다 (그림 2, 표 5).

두 시스템 간의 머무름 시간 차이는 특히 나중에 용리되는 피크에서 눈에 띄기 시작합니다. 그러나 용리 시료 성분의 상대 머무름 시간 편차(%RT)는 두 기기 사이에서 2%에 한참 못 미쳐, 유용한 분석법 호환성을 보여줍니다.

표 4. 두 용매 채널에 대한 분석법 호환성 및 머무름 시간(RT) 정밀도 평가. 두 LC 시스템에서 7회 시료 주입으로 얻은 평균 RT 값 사용. 분석법 호환성의 경우, Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템 값을 기준으로 사용함.

용매 채널	머무름 시간 1260 Agilent Infinity II Prime LC 시스템(분)	RT % RSD	머무름 시간 1260 Agilent Infinity II Prime Bio LC 시스템(분)	RT % RSD	RT 편차(분)	RT 편차(%)
A/B	2.1533	0.0408	2.1487	0.0164	0.0046	-0.2134
A/B	3.0430	0.0361	3.0431	0.0771	0.0000	0.0012
A/B	6.1627	0.0226	6.1780	0.0417	-0.0153	0.2478
A/B	13.0088	0.0236	13.0808	0.0235	-0.0720	0.5537
C/D	2.1579	0.0536	2.1494	0.0385	0.0085	-0.3920
C/D	3.0534	0.0632	3.0435	0.0523	0.0099	-0.3244
C/D	6.1957	0.0349	6.1791	0.0380	0.0165	-0.2668
C/D	13.1101	0.0190	13.0814	0.0232	0.0287	-0.2191

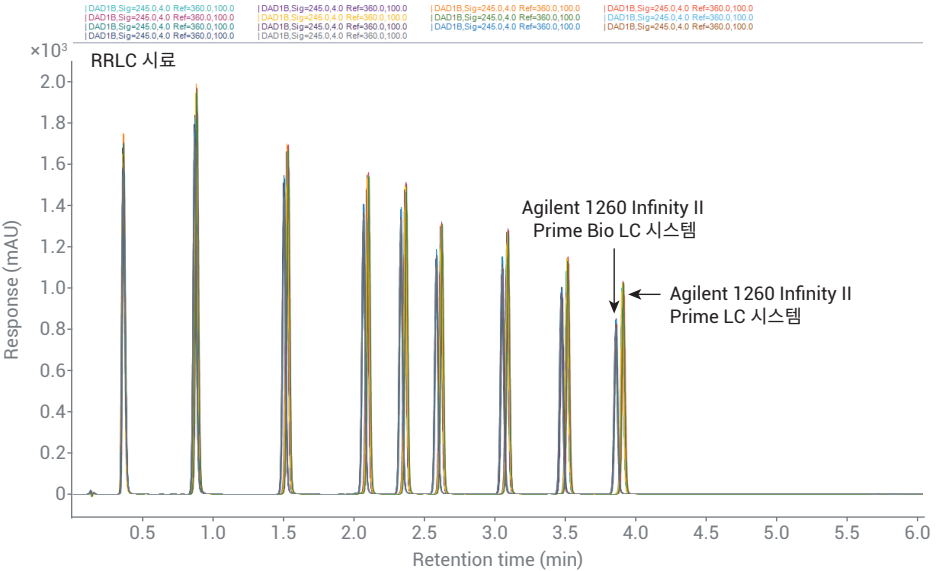


그림 2. Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템 및 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템에서 실행한 RRLC 시료의 7회 연속 크로마토그래피 실행 결과 오버레이.

표 5. RRLC 시료에 대한 분석법 호환성 및 머무름 시간(RT) 정밀도 평가. 두 LC 시스템에서 7회 시료 주입으로 얻은 평균 RT 값 사용. 분석법 호환성 추산을 위해 Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템 값을 기준으로 사용함.

화합물 ID RRLC 시료	머무름 시간 Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템(분)	RT %RSD	머무름 시간 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템(분)	RT %RSD	RT 편차 (분)	RT 편차 (%)
1	0.3604	0.5275	0.3593	0.0766	0.0012	-0.3233
2	0.8738	0.3954	0.8625	0.0578	0.0113	-1.2879
3	1.5150	0.3013	1.4900	0.0514	0.0250	-1.6513
4	2.0798	0.2418	2.0486	0.0252	0.0312	-1.5021
5	2.3447	0.1989	2.3117	0.0327	0.0331	-1.4106
6	2.5960	0.1765	2.5610	0.0238	0.0350	-1.3463
7	3.0619	0.1427	3.0236	0.0617	0.0384	-1.2531
8	3.4828	0.1268	3.4395	0.0684	0.0434	-1.2448
9	3.8720	0.1170	3.8227	0.0369	0.0492	-1.2719

얇은 그레디언트 분석법

세 번째 조건에서는 분석을 위해 복잡한 시료를 선택했으며, 분리를 위해 다소 얇은 그레디언트가 필요했습니다. 영지버섯 (*Ganoderma Lucidum*) 자실체 추출물은 USP에서 표준 시약으로 제공하는 triterpenoid가 풍부한 추출물입니다(USP, 미국 메릴랜드, 록빌). 분리 방법은 USP에서 공개한 크로마토그래피 분석법을 기초로 하며¹ 획득한 피크의 지정은 영지버섯 자실체 건조 추출물 로트 인증서 F012B0(USP 카탈로그 번호 1288372)에 따라 수행했습니다.² 그림 3에서 볼 수 있듯이 두 시스템 모두에서 우수한 이동상 조성 정밀도와 동일한 시료 용리 패턴을 얻었습니다.

그러나 특히 분석법 중 등용매 유지 단계에서 머무름 시간의 이동을 관찰할 수 있습니다(그림 3). 이 내용을 표 6에 추가로 나타냈습니다. 여기서 몇몇 피크의 머무름 시간이 5% 이상 차이가 나는 것으로 미루어 앞서 진행한 두 테스트와 비교하여 이 특정 분석법에 대한 분석법 호환성이 좋지 못함을 나타냅니다.

더 높은 RT 편차의 근원을 추가로 평가하기 위해 B에 대한 등용매 유지 단계를 원래 분석법의 $\pm 0.2\%$ 로 조정하는 방식으로 분석법을 약간 수정했습니다. 이렇게 두 펌프 사이의 약간의 조성 정확도 차이로 인해 머무름 시간의 차이가 발생한 화합물의 머무름 시간 변화를 시뮬레이션했으며, 두 펌프는 여전히 지정된 $\pm 0.4\%$ 의 범위 내에서 계속 작동했습니다. 그림 4와 같이 이러한 매우 작은 조성 변화로 용리 피크에 상당한 머무름 시간의 변화가 초래되었으며, 이는 해당 분석법이 조성 변화에 너무 민감하여 두 펌프 간의 조성 정확도 차이를 과도하게 반영함을 나타냅니다. 이러한 영향은 일반적으로 분석법 호환성을 테스트할 때 고려해야 합니다.

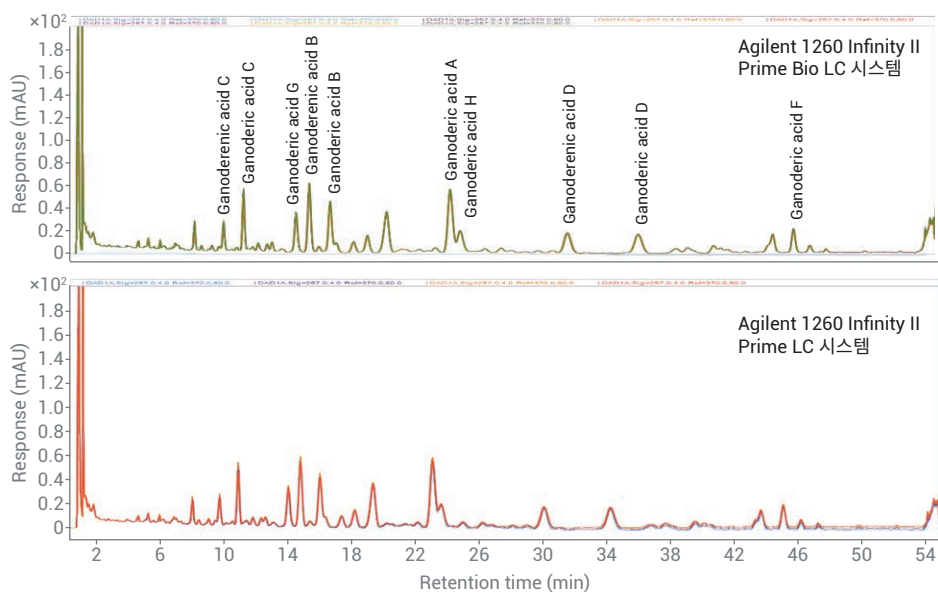


그림 3. Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템 및 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템에서의 영지버섯 (*Ganoderma Lucidum*) 자실체 추출물 분리를 보여주는 7회 연속 크로마토그램 오버레이. 위에서 언급한 바와 같이 피크 지정.

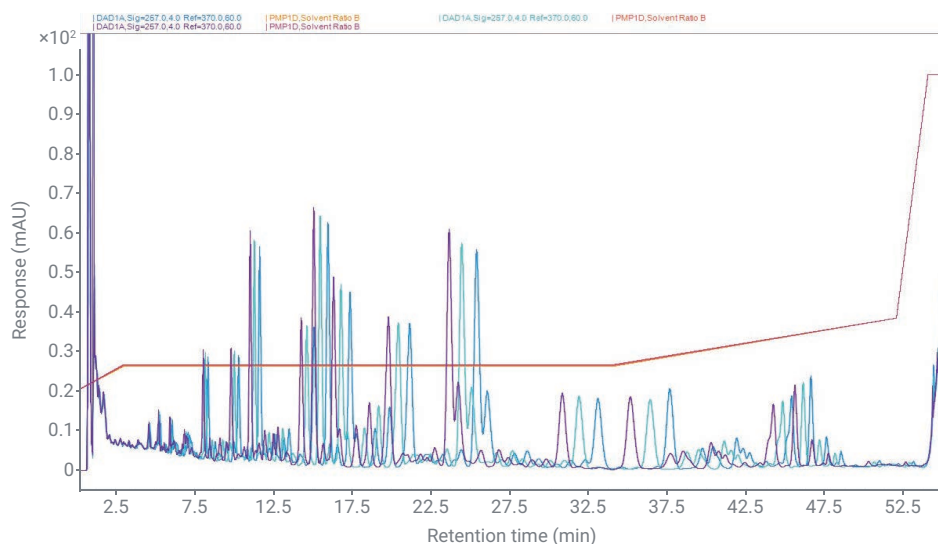


그림 4. 등용매 유지 단계에서 약간의 변화가 머무름 시간에 미치는 영향. 등용매 유지 단계를 $\pm 0.2\%$ B 만큼 변경. Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템에서의 결과를 나타냄. 녹색: 26.5% B 등용매 유지 단계(원본); 파란색: 26.3% B; 마젠타: 26.7% B.

표 6. Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템과 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템 사이의 머무름 시간 편차 계산. 1260 Infinity II Prime LC 시스템의 머무름 시간을 편차 계산을 위한 기준으로 사용. 그에 따른 각 기기의 RT 정밀도 표시. 각 RT 및 RT% RSD 값은 7회 측정의 평균임.

화합물 ID Ganoderma L. 추출물	머무름 시간 Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템(분)	RT %RSD	머무름 시간 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템(분)	RT %RSD2	RT 편차 (분)	RT 편차 (%)
1. Ganoderenic acid C	9.6596	0.1357	9.9924	0.0111	-0.3327	3.4446
2. Ganoderic acid C	10.8330	0.1216	11.2505	0.0112	-0.4176	3.8546
3. Ganoderic acid G	13.9869	0.0977	14.5709	0.0123	-0.5839	4.1749
4. Ganoderenic acid B	14.7444	0.0811	15.4070	0.0138	-0.6627	4.4943
5. Ganoderic acid B	15.9688	0.0868	16.7174	0.0136	-0.7486	4.6878
6. Ganoderic acid A	23.0435	0.1056	24.2967	0.0136	-1.2532	5.4386
7. Ganoderic acid H	23.5823	0.1021	24.9284	0.0082	-1.3461	5.7080
8. Ganoderenic acid D	30.0558	0.0992	31.7005	0.0223	-1.6447	5.4721
9. Ganoderic acid D	34.2341	0.1031	36.1752	0.0187	-1.9411	5.6700
10. Ganoderic acid F	45.1035	0.0405	45.9687	0.0108	-0.8652	1.9182

결론

이 기술 개요에서는 세 가지 조건을 실행하여 새로운 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템의 성능을 표준 스테인리스 강 기반 Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템과 비교했습니다. 세 가지 적용 조건 모두에서 각 시스템에 대한 높은 수준의 재현성을 얻었으며, 등용매 및 빠른 그라디언트 분석법에 대한 분석법 호환성이 우수함을 입증할 수 있었습니다. 머무름 시간 편차는 해당 용리 화합물의 머무름 시간 대비 $\pm 2\%$ 미만으로 유지되었습니다.

오래 지속되는 등용매 유지 단계를 포함하여 얇은 그라디언트로 구성된 세 번째 조건은 많은 용리 화합물에서 더 높은 RT 편차를 나타냈습니다. 시스템 간 이동상 조성의 작은 차이가 상당한 편차를 초래할 수 있음을 입증할 수 있었습니다. 조성 정확도 사양

내에서 작동하는 펌프라도 두 펌프 사이에 5% 이상의 RT 이동을 나타낼 수 있기 때문에 분석법 호환성 평가에 적합한 분석법을 이용하는 것이 중요함을 보여줍니다.

참고 문헌

1. Ganoderma lucidum Fruiting Body Monograph, Source URL: <https://hmc.usp.org/monographs/ganoderma-lucidum-fruited-body-1-0>, The United States Pharmacopeial Convention, **2015**.
2. Ganoderma lucidum Fruiting Body Dry Extract Lot Certificate F012B0, USP Catalog No. 1288372, The United States Pharmacopeial Convention, **2014**.

www.agilent.com/chem

DE44314.0505092593

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 5월 20일, 한국에서 인쇄
5994-3533KO

자세한 정보:

www.agilent.com/chem/infinitylab-bio-lc-solutions

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 답을
찾을 수 있으며 리소스에 액세스할 수 있습니다.

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

DE44348.2760069444

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2021

2021년 6월 1일, 한국에서 발행

5994-2900KO

한국애질런트테크놀로지스㈜

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