

High-Performance Biopharma Analysis

Application Flyer



바이오제약의 분석 난제 극복

바이오제약 분석의 복잡성이 증가함에 따라 바이오 의약품 워크플로 전반에 걸쳐 우수성을 제공할 수 있는 혁신이 요구 되고 있습니다.

Agilent InfinityLab Bio LC 솔루션은 완전히 생체에 적합한 생체 불활성 LC 시스템으로 폭넓게 구성되어, 의약품 발견 및 개발부터 QA/QC에 이르기까지 견고하고 정확한 바이오 분석을 지원합니다. 이러한 시스템을 바이오 컬럼, MS 검출, 소프트웨어 및 서비스와 결합하면 바이오제약의 난제를 해결할 수 있는 완벽한 솔루션을 구성할 수 있습니다.

BIO



바이오 분석, 그 이상을 위한 시스템

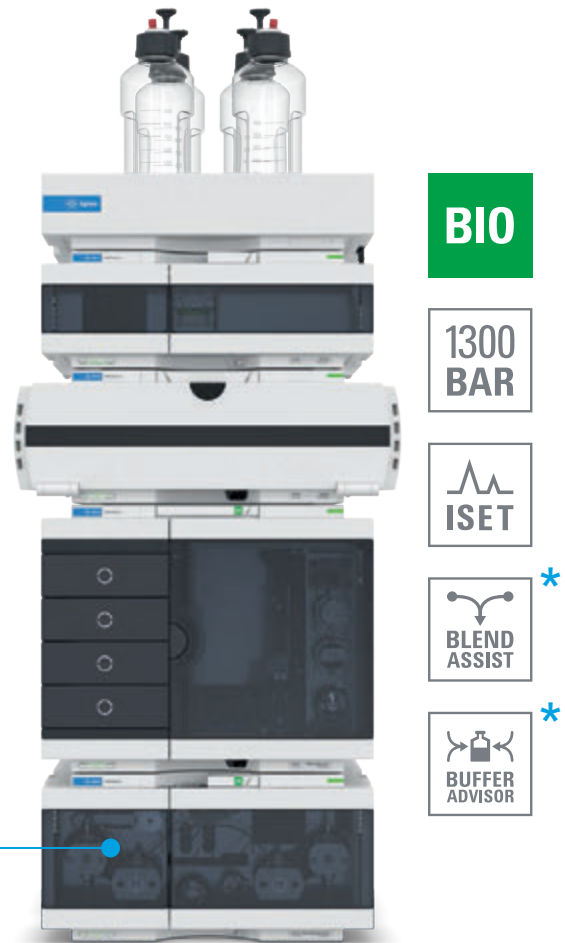
InfinityLab Bio LC 솔루션은 1260 Infinity II Bio-Inert LC 에 의한 분석 스케일 정제 응용과 같이 실험실의 모든 바이오 분석 요구를 충족하도록 조정할 수 있는 4개의 핵심 시스템으로 구성되어 있습니다. 입증된 InfinityLab 기술과, 생체 적합성 또는 생체 불활성 구성 요소를 결합한 이러한 시스템으로 가장 광범위하게 분석의 어려움을 해결할 수 있습니다. 생체 적합성 시스템은 철을 함유하지 않은 시료 유동 경로를 포함하고 있으며, 생체 불활성 시스템에는 금속이 없는 시료 유동 경로가 사용됩니다.

1290 Infinity II Bio LC에는 **binary** 또는 **quaternary** 펌프가 포함될 수 있습니다.

1290 Infinity II Bio LC

복잡한 분석에서 더욱 발휘되는 초고성능

1290 Infinity II Bio LC 시스템은 1290 Infinity II Bio High-Speed 펌프(binary) 또는 Flexible 펌프(quaternary)로 구성할 수 있습니다. 가장 까다로운 응용 분야를 위해 설계된 이 시스템은 매우 얇은 그레디언트 구현이 가능하며, 최고 수준의 성능, 정확성 및 신뢰성을 제공합니다. 시스템의 생체 적합성 특성은 견고성과 생체 분자 무결성을 보장합니다.



* quaternary 펌프 구성의
1290 Infinity II Bio LC 에서만 사용가능.

1260 Infinity II Prime Bio LC

뛰어난 유연성을 갖춘 일상 분석

생체 적합성을 갖춘 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템은 바이오 분리에 있어 다재다능한 HPLC로서, 생물 분석용 HPLC 및 엔트리 레벨 Quaternary bio UHPLC를 위한 뛰어난 기능과 운영 편리성을 제공합니다. 이 시스템은 1290 기술을 기반으로 하기 때문에 어떠한 상황에서도 가장 높은 분석 신뢰도를 얻을 수 있습니다.



- BIO**
- 800 BAR
- ISET
- BLEND ASSIST
- BUFFER ADVISOR

1260 Infinity II Bio-Inert LC

완전한 (bio-)inert 응용에 적합

1260 Infinity II Bio-Inert LC는 완벽한 생체 불활성 특성을 통해 금속 상호 작용을 제거하여 가장 까다로운 화합물의 분석도 원활하게 만들어줍니다. 내식성이 뛰어난 티타늄 용매 전달 시스템과 금속 성분을 함유하지 않은(metal-free) 시료 흐름 경로는 일상적인 바이오 응용에서 생체 분자의 무결성을 보장합니다. 이 시스템은 ICP-MS 분석의 이상적인 프런트 엔드 역할도 수행할 수 있습니다.



- BIO
INERT**
- 600 BAR
- BUFFER ADVISOR

다양한 워크플로를 위한 솔루션

InfinityLab Bio LC 솔루션은 바이오제약 워크플로 내에 적용된 여러 분석 기술과 접근 방식을 망라하고 있습니다. 2D-LC, 온라인 LC, LC/MS, SEC 등과 같이 다양한 응용에 지정된 솔루션을 선택할 수 있습니다.

Bio 2D-LC로 복잡한 분리 정복

InfinityLab Bio 2D-LC 솔루션*은 다차원 크로마토그래피의 강력하고 빠른 분리능과 생체 적합성의 하이엔드 LC 시스템을 결합합니다. 이 시스템은 복잡한 시료 또는 시료 매트릭스의 분석과 더불어 단일 클론 항체, 올리고뉴클레오타이드, 단백질 및 단백질 분해물, 지질, 대사체 및 기타 여러 가지 까다로운 응용에서 동시 용리 화합물 분리의 난제를 해결하는 데 완벽하게 적합합니다. 또한 이 시스템은 MS 검출과 호환되는 완충액 기반의 분리도 만들어 줄 수 있습니다.

* InfinityLab Bio 2D-LC 솔루션은 출시 예정입니다.
자세한 내용은 현지 애질런트 영업 담당자에게 문의하세요.



2D-LC

온라인 LC로 자신 있게 공정 모니터링

InfinityLab Online LC 솔루션*은 자동화된 공정 모니터링을 지원하며, 공정의 더 나은 제어와 더욱 빠른 이해를 위한 실시간 데이터를 제공합니다. 솔루션 내의 핵심 기술인 Online Sample Manager는 분석 영역과 공정 영역을 쉽게 연결합니다. 이 모듈은 직접 주입을 통해, 또는 유동 반응기 및 배치 반응기는 물론 업스트림 생물 반응기와 다운스트림 정제 장치에서 보존된 시료를 통해 자동화된 시료 분석을 제공합니다.

* InfinityLab Online LC 솔루션은 출시 예정입니다.
자세한 내용은 현지 애질런트 영업 담당자에게 문의하세요.



PAT

LC/MS로 분석 범위 확장

바이오제약용으로 설계된 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF는 거대 생체 분자, 펩타이드 또는 글리칸을 분석하는 데 사용할 수 있습니다. 1290 Infinity II Bio LC 및 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어와 함께 이 시스템을 사용하면 원형(intact) 단백질, 펩타이드 맵핑 및 글리칸 분석을 위한 자동화된 워크플로를 실현할 수 있습니다. BioConfirm Networked Workstation은 규정 준수를 지원하는 고급 보안 기능과 빌트인 기술 제어 기능을 통해 보안 위험을 최소화하는 동시에 데이터 무결성을 보존합니다.



LC/MS

SEC로 단백질 특성 규명

응집체와 잠재적 분해물의 측정 및 정량에서 첨단 광산란(LS) 검출을 사용하면 SEC의 성능이 현저히 향상됩니다. 이 기능은 AdvanceBio SEC 컬럼과 이상적으로 결합되는 1260 Infinity II Bio-SEC 다중 검출기 솔루션에서 사용할 수 있습니다.



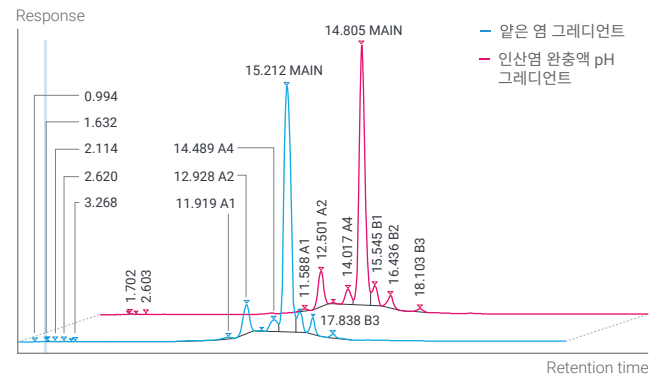
SEC

바이오제약 전반을 관통하는 뛰어난 성능

InfinityLab Bio LC 솔루션은 몇몇 일반적인 바이오제약 응용 분야에서 높은 견고성과 성능을 보여줍니다. 실험실에서는 주요 품질 속성(CQA)을 포함한 영역에서 신뢰할 수 있는 결과에 대한 확신을 얻을 수 있습니다.

전하 변이체 분석 (Charge Variant Analysis)

단일 클론 항체(mAbs)의 전하 변이체 분리는 어려운 작업일 수 있습니다. Quaternary 펌프인 1260 Infinity II Bio Flexible 펌프는 Buffer Advisor 소프트웨어를 사용하여 단 4개의 원액으로부터 용매를 쉽게 동적 혼합할 수 있어 바이오 분석을 단순화하고 완충액 제조 시간을 크게 단축해줍니다.



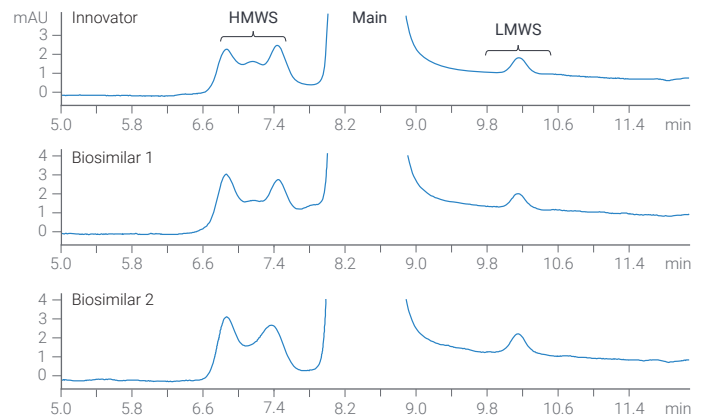
아른 염 그레디언트(파란색)와 인산염 완충액 pH 그레디언트 (pH 7 ~ 8.4, 빨간색)를 각각 사용하여 전하 변이체를 분리한 두 개의 크로마토그램 오버레이.

(Source : 5994-3275EN)

응집 분석 (Aggregate Analysis)

SEC는 이합체, 삼량체, 기타 고차 응집체 및 저분자량 화학종으로부터 단량체 단백질을 분리하는 데 이상적입니다.

AdvanceBio SEC 컬럼을 장착한 1260 Infinity II Bio-SEC 다중 검출기 솔루션은 고감도 응집체 검출에 대한 관련 정보를 얻는 데 있어 사용하기 쉽고 최적화된 솔루션입니다.

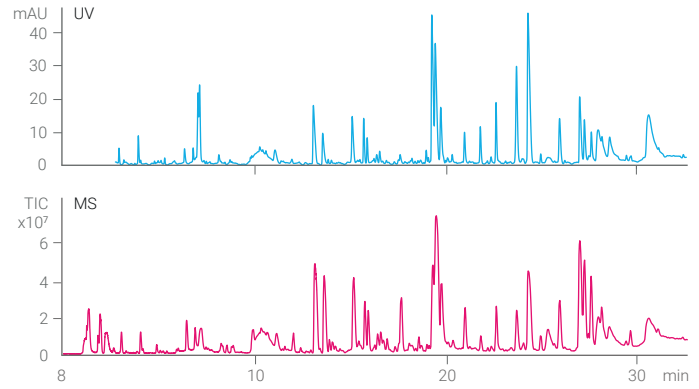


리튬시암 선발의약품과 바이오시밀러 응집체 프로파일 비교 결과의 클로즈업 화면. HMWS: 고분자량 화학종; LMWS: 저분자량 화학종.

(Source : 5994-1496EN)

펩타이드 맵핑 (Peptide Mapping)

펩타이드 맵핑은 mAb의 1차 구조를 설명하기 위한 절대적 표준입니다. 1290 Infinity II Bio LC는 탁월한 머무름 시간 정밀도와 견고한 성능을 바탕으로 바이오 의약품 생산 체인 전반에 걸쳐 완벽한 분석을 지원합니다.

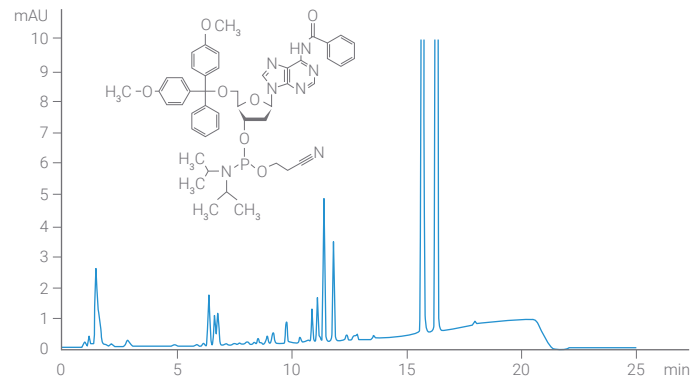


1290 Infinity II Bio LC로 분리된 NISTmAb의 트립신 분해물 크로마토그램 (UV 및 MS 순차 검출).

(Source : 5994-2718EN)

올리고뉴클레오티드 (Oligonucleotides)

올리고뉴클레오티드 치료법은 바이오 의약품 산업에서 성장중인 분야입니다. 1290 Infinity II Bio LC의 유동 경로는 철을 함유하지 않고 있어 원료 중 불순물 분석을 보다 쉽게 수행할 수 있습니다. 1290 Infinity II Bio Flexible 펌프의 유연성으로 인해 분석법 개발이 간단합니다.

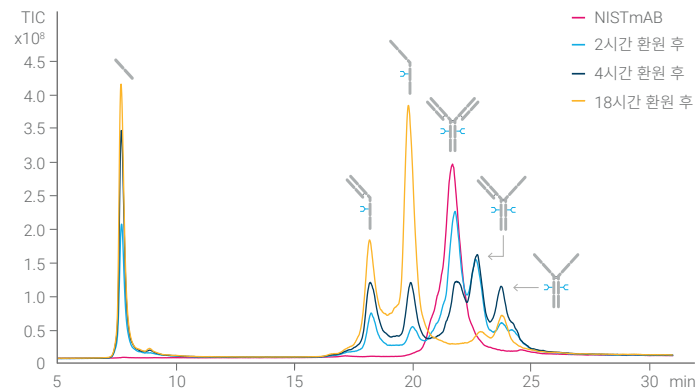


1290 Infinity II Bio LC를 사용하여 올리고뉴클레오티드 합성용 deoxyribose adenosine phosphoramidite 원료의 불순물 분석 결과에 대한 클로즈업 보기.

(Source : 5994-3498EN)

원형 단백질 분석 (Intact Protein Analysis)

생체 적합성의 1290 Infinity II Bio LC를 사용하면 치료용 mAb에서 주요 품질 속성(CQA)으로 간주되는 저분자량 화학종과 같은 제품 유래 불순물을 분석할 수 있습니다. Agilent PLRP-S PEEK-lined 컬럼을 결합한 이 분석법은 SDS-PAGE 또는 CE-SDS의 대안이 됩니다.



1290 Infinity II Bio LC 및 PLRP-S PEEK-lined 컬럼에서 분리하고 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF로 검출한 NISTmAb의 동적 부분 환원을 보여주는 크로마토그램.

(Source : 5994-3021EN)

응용자료 퀵가이드: Method and System Overview

- 응용자료에 사용한 제품
- 대체 사용 가능한 제품

	Method						Bio LC			Conventional LC			LCMS	
	IEX	SEC	RPLC	Ion-Pair RPLC	HILIC	HIC	UHPLC (1300bar)	HPLC (600bar, Inert)	2D-LC	UHPLC (1300bar)	HPLC (600bar)	2D-LC	SQ	QTOF
전하 변이체 분석 (Charge Variant Analysis)														
Charge Variant and Aggregation Analysis of Innovator and Biosimilars of Rituximab	●	●						●					○	
Refining charge variant analysis of mAbs	●						●						○	
응집 분석 (Aggregate Analysis)														
Elevate Your mAb Aggregate Analysis		●					●						○	
A Comprehensive Workflow to Optimize and Execute Protein Aggregate Studies		●						●					○	
펩타이드 맵핑 (Peptide Mapping)														
QA/QC of monoclonal antibodies: High-resolution peptide mapping			●				○	●		●	○			
Monitoring Product Quality Attributes of Biotherapeutics at the Peptide Level			●				○			●			●	
An Integrated Workflow for Peptide Mapping of Monoclonal Antibodies			●											●
올리고뉴클레오티드 (Oligonucleotides)														
Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis				●			○			●				●
Analysis of mRNA Poly-A Sequence Variants by High-Resolution LC/MS				●			○			●				●
Use Temperature to Enhance Oligonucleotide Mass Transfer and Improve Resolution				●										
원형 단백질 분석 (Intact Protein Analysis)														
Monitoring Product-Related mAb Fragments			●				●			●				●
Precise Characterization of Intact Monoclonal Antibodies			●				○			●				●
An Integrated Workflow for Intact and Subunits of Monoclonal Antibody Accurate Mass Measurements			●				○			●				●
Determination of Multiple Attributes of Monoclonal Antibodies	●	●				●	○	○	○	●	●	●		●
N-글리칸 분석 (N-Glycan Analysis)														
Development of a Rapid 2-AB Sample Preparation Workflow for N-Glycan Release and Labeling					●			○		●				

아래 제목을 클릭하시면 해당 제품을 확인하실 수 있습니다

- [UHPLC Bio LC](#) Agilent 1290 Infinity II Bio LC with High-Speed Pump(binary), Agilent 1290 Infinity II Bio LC with Flexible Pump(quarterternary)
- [HPLC Bio LC](#) Agilent 1260 Bio-inert LC, Agilent 1260 Infinity II Bio LC with Flexible Pump(quarterternary) with 800 bar
- [LCMS SQ](#)
- [LCMS QTOF](#)

Rituximab Innovator 및 바이오시밀러의 전하 변이체 및 응집체 분석



저자

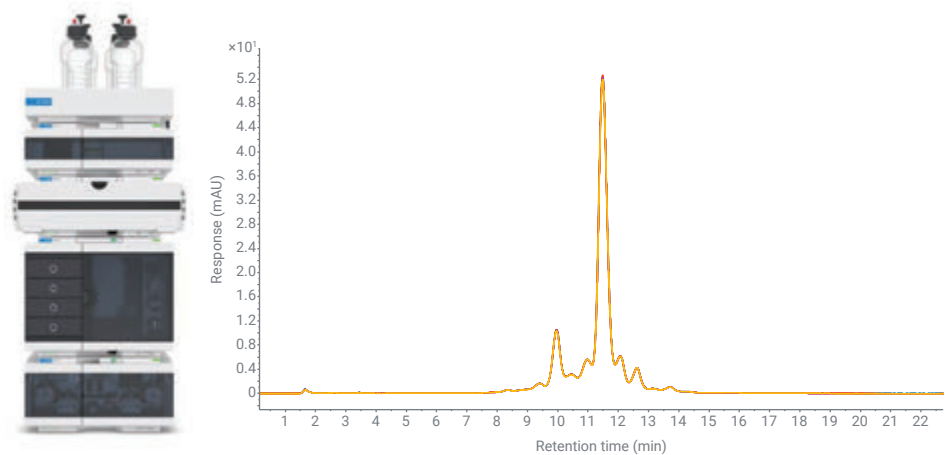
Bian Yulan
Global Solution
Development Center,
Global Laboratory Solution
Sales (LSS) Marketing,
Agilent Technologies
Singapore (Sales) Pte. Ltd.

개요

단일 클론 항체는 다양한 질병 치료에 사용되는 중요한 생체 분자 클래스입니다. Innovator 분자의 카피 버전인 바이오시밀러는 응집체 및 전하 변이체와 같은 주요 품질 특성(CQA)에서 상세한 특성화가 요구됩니다. 규제 기관의 승인을 얻기 위해서는 Innovator와 비교하여 이러한 특성이 요구되는 범위 내에 있어야 합니다. 본 연구에서는 Agilent 1260 Infinity II bio-inert LC 및 Agilent AdvancedBio 컬럼을 사용하여 두 가지 분석 워크플로를 수행하는 방법으로 서로 다른 제조업체의 Rituximab 바이오시밀러와 그 Innovator의 응집체 및 전하 변이체 프로파일을 비교합니다. 그 결과, 응집체와 전하 변이체 프로파일에서 Innovator와 바이오시밀러 사이에 유사점이나 차이점이 관찰되었습니다. 바이오시밀러 1은 응집체와 전하 변이체 측면에서 바이오시밀러 2보다 Innovator와 더 많은 유사성을 가지고 있습니다. 이 분석법은 일중 재현성과 일간 재현성이 모두 탁월했습니다. Peak Explorer 기능이 있는 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어를 사용하면 한 눈에 쉽게 데이터를 검토할 수 있습니다. 이 연구는 Rituximab에 대한 일련의 생물학적 유사성을 알아보는 연구의 일환으로 이루어졌습니다.

얼마나 완만한 그레이디언트까지 가능할까요?

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



저자

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

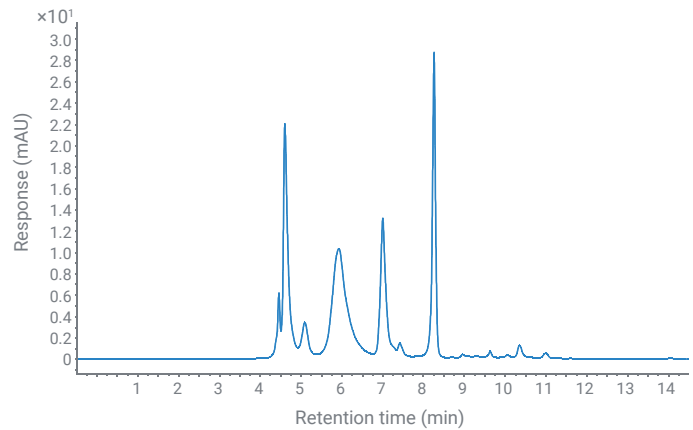
개요

전하 변이체 분석은 최적의 분리를 위해 매우 얇은 그레이디언트와 함께 부식성이 높은 완충액 염을 사용하기 때문에 응용 액체 크로마토그래피 시스템에 까다로운 분야입니다. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템에서 다양한 염 그레이디언트를 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 그레이디언트에서도 뛰어난 재현성을 나타낸 1290 Infinity II Bio LC는 생성된 데이터에 대한 높은 신뢰도를 제공하는 차세대 애질런트 첨단(high-end) 액체 크로마토그래피 시스템을 입증했습니다.

Elevate Your mAb Aggregate Analysis

High-resolution SEC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System



Author

Edgar Nägele
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

This application note demonstrates the superior resolution in size exclusion chromatography (SEC) protein separation made possible by the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System equipped with the Agilent AdvanceBio SEC column and ultralow dispersion capillaries. The biocompatible UHPLC system enables analysis using corrosive salty buffers and therefore saves maintenance expense. The resolution in SEC analysis was compared for capillaries of different inner diameter (0.17, 0.12, and 0.07 mm). A protein standard mixture and monoclonal antibodies (mAbs), including aggregates, were separated and compared for resolution. In addition, molecular weight was determined by the Agilent OpenLab GPC/SEC add-on software in one software solution, enabling a one-step workflow.

단백질 응집체 연구를 최적화하고 실행하기 위한 종합 워크플로

분석법 개발 및 광산란과 크기 배제 크로마토그래피의
조합

응용 자료

바이오 의약품 및 바이오시밀러

저자

Andy Coffey 및 Matthew Rain
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 다음을 위한 종합적인 응집 분석 워크플로를 설명합니다.

- 단일클론 항체의 고성능 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 위한 이동상 조건 최적화
- 단량체(Monomer), 이합체 및 고차 응집체를 포함한 응집 프로파일 특성 규명

당사는 Agilent Buffer Advisor 소프트웨어를 사용하여 일련의 빠른 LC 실행 중 실시간에 자동으로 다양한 범위의 버퍼 조성을 혼합하기 위해 Agilent 1260 Infinity II bio-inert LC 시스템의 bio-inert Quaternary 펌프를 최대한 활용하는 복잡한 SEC 최적화 실험을 자동화했습니다. Agilent 1260 Infinity Bio-MDS 다중 검출기 세트는 고차 단백질 응집체를 밝히고, 절대 분자량을 결정하며 UV 검출 시스템으로 얻은 정량 측정데이터를 보완하기 위해 동적 광산란 검출 기능을 사용했습니다.

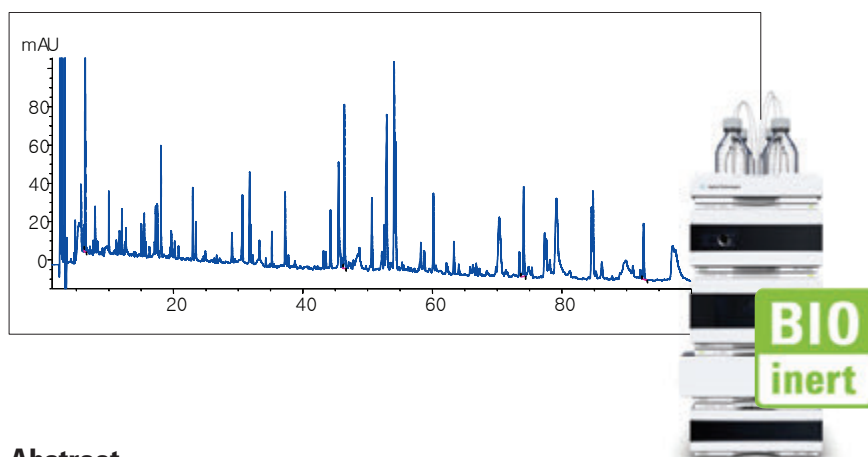
QA/QC of monoclonal antibodies: High-resolution peptide mapping using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC and Agilent 1290 Infinity LC Systems

Application Note

Biopharmaceuticals

Author

M. Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India



Abstract

This Application Note describes an application solution for peptide mapping of a monoclonal antibody using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System and proves the reliability of the solution. The bio-inertness and corrosion resistance of the instrument coupled with simple and reproducible methods make this solution particularly suitable for the QA/QC analysis of monoclonal antibody for the biopharmaceutical industry. To achieve even higher resolution as well as analytical sensitivity, we transferred the method to an Agilent 1290 Infinity LC System and sub-2- μm particle columns. The power range of the 1290 Infinity LC System (pressure versus flow) overcomes the challenge of increased back pressure caused by smaller particles and longer columns making this system ideal for applications where high resolution and analytical sensitivity are a must.

Monitoring Product Quality Attributes of Biotherapeutics at the Peptide Level Using the Agilent InfinityLab LC/MSD XT System

Authors

Linfeng Wu, Lisa Zang, and
Guannan Li
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Single quadrupole (SQ) LC/MS has been adopted in the biopharmaceutical QC labs for its low-cost, robustness, and simple operation. This Application Note describes a simple, generic method for routine biotherapeutic peptide map analysis using the Agilent InfinityLab liquid chromatography/mass selective detector XT (LC/MSD XT), an SQ system with an extended mass range up to m/z 3,000, in combination with an Agilent 1290 Infinity II LC System and Agilent OpenLab ChemStation software. Streamlined data processing and reporting were demonstrated for pre-identified peptides of a recombinant monoclonal antibody (mAb), including complementary-determining regions (CDR) peptides, deamidated peptides, oxidized peptides, and glycopeptides using OpenLab ChemStation. This study serves as a proof of concept for monitoring multiple product quality attributes (PQAs) using an SQ LC/MS system with software that is recommended for laboratories requiring regulatory compliance.

단일 클론 항체의 펩티드 맵핑을 위한 통합 워크플로

응용 자료

바이오 의약품 및 바이오시밀러

저자

David L. Wong
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

Jing Chen
Agilent Technologies, Inc.
Madison, WI, USA

도입

단일 클론 항체(mAbs)는 의약품 산업에서 가장 빠르게 성장하고 있는 분야 중 하나입니다. 단백질 약물이므로 시작단계의 발현(단백질 합성)에서 상업화에 이르기까지 단일 클론 항체의 제조는 모든 단계에서 단일 클론 항체의 꼼꼼한 특성 규명을 요구하는 아주 복잡한 과정을 거치게 됩니다. 단일 클론 항체 특성 규명에 사용되는 수많은 분석법 중 펩티드 맵핑은 단일 클론 항체의 일차 서열 확인을 비롯하여 탈아미드화, 산화, 당화¹ 등의 PTM(Post-translational modification) 식별 및 정량을 제공하는 필수 기술입니다.

LC/MS/MS 접근법을 사용하는 단일 클론 항체 펩티드 맵핑은 정제된 단일 클론 항체를 펩티드로 분해시키는 효소처리, 탬덤 질량 분석기 분석 및 데이터 해석 과정을 거칩니다. 시료 전처리는 일반적으로 변성, 환원, 알킬화 및 효소 분해 등 여러 단계로 구성됩니다. 펩티드 맵핑을 위한 수동 시료 전처리는 노동 집약적이며 제한된 확장성과 재현성을 가지는 경향이 있습니다.

본 응용 자료는 시료의 효소분해 및 정제를 동시에 높은 재현성으로 가능하게 하는 고처리량 워크플로를 제공합니다. 전 과정은 Agilent AssayMAP Bravo 액체 처리 로봇, Agilent 6550 Q-TOF 를 결합한 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 이용한 고감도의 정확한 스펙트럼 수집 및 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 이용한 자동화된 데이터 분석을 통해 진행되었습니다.

Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis of Oligonucleotides

Authors

Gerd Vanhoenacker,
Cindy Lecluyse, Griet Debyser,
Pat Sandra, and Koen Sandra
RIC Biologics
Belgium

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider, and
Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.
Germany

Abstract

The effect of various ion pairing reagents (amines and acidic counterions) on the LC/UV and LC/MS analysis of oligonucleotides (ONs) has been studied. The type of amine and concentration of the counterion play a significant role in the retention and resolution of the ONs and strongly affect the MS data. Charge state and adduct formation are influenced by the mobile phase composition. This application note shows that there are numerous variables available for optimization of the analytical conditions for ONs. The analyses were carried out on an Agilent 1290 Infinity II LC System with UV detection by DAD and an Agilent 6530 LC/Q-TOF.

고분해능 LC/MS를 사용한 mRNA Poly-A 서열 변이 분석

저자

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

서론

2020년 SARS-CoV-2 대유행으로 상황이 급박해지면서 정책 입안자와 제약 회사들은 전례 없는 속도로 mRNA 백신을 개발하고 배포해야 하는 상황으로 내몰렸습니다. mRNA 백신은 임상 시험¹⁻⁴에서 기대 이상의 안전성과 효능을 보여주었으며 대체 기술에 기반을 둔 백신의 효과를 증가했습니다. mRNA 백신은 유전자 치료로 간주되기 때문에⁵ FDA 지침에 따라 제품 관련 불순물에 대해 광범위한 특성 분석을 실시해야 합니다. 여기에는 서열 변이로 알려진, 서열에 약간의 오류가 있는 mRNA 분자 집단이 포함될 수 있습니다. 또한 mRNA 백신은 최적의 안정성과 생물학적 활성을 갖기 위해 3' 말단에 A 뉴클레오티드 (poly-A)의 길고 반복적인 섹션이 필요합니다.⁶ 따라서 poly-A 서열의 길이와 조성은 모두 주요 품질 속성에 해당합니다.

Use Temperature to Enhance Oligonucleotide Mass Transfer and Improve Resolution in Ion-Pair RP HPLC

Application Note

Authors

J Massi and L Lloyd
Agilent Technologies, Inc.

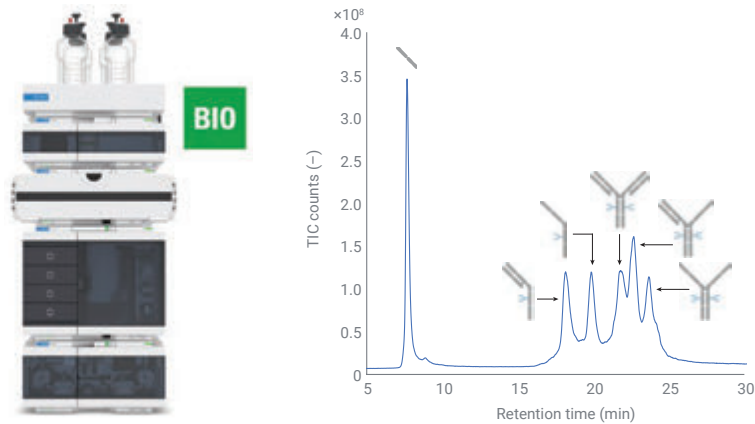
Introduction

Growth in the field of genomics has increased the need for pure synthetic oligonucleotides, and for ways in which to analyze these oligonucleotides and oligonucleotide products of various genomic assays (i.e. genotyping, methylation analysis, HPLC). HPLC is widely used for the purification and analysis of these oligonucleotides due to its selectivity, automation, and robustness.^{[1],[2]} Oligonucleotide separations are very demanding, often requiring separations based on small changes in size or sequence. Separations become increasingly difficult as the size of the oligonucleotide increases. In order to improve resolution to meet these demanding requirements it is necessary to look at ways of improving the mass transfer, including the use of monoliths, non-porous particles, small porous particles and elevated temperatures. Monoliths and non-porous particles have the disadvantage of reduced loading capacity, and so oligonucleotide separations are increasingly being performed using small particles at elevated temperatures.^{[1],[2],[3]}

After oligonucleotide de-protection, removal of the dimethoxytrityl group (DMT) from the 5' hydroxyl end, ion-pair reversed phase HPLC is often the method of choice for oligonucleotide analysis and purification, as unlike ion exchange chromatography, the eluents are volatile and mass spec compatible. However, traditional silica-based HPLC columns are chemically unstable at elevated temperatures, at alkaline pH, and also with the ion-pairing agents typically needed for oligonucleotide separations. Silica columns tend to dissolve quickly under these conditions, and can contaminate purified fractions with silica and bonded phase. In order to address these problems, research has focused on the development of advanced hybrid organic-inorganic methylsiloxane-silica media and advanced polystyrene-divinylbenzene polymer materials.^{[4],[5]} Neither silica-based or hybrid particle columns are recommended for use at temperatures over 70 °C. Polymeric polystyrene-divinylbenzene HPLC columns can withstand temperatures far in excess of this. In this example, the effect of temperature on the resolution of oligonucleotide separations is investigated and compared on reversed phase silica, hybrid, and polymeric HPLC columns.

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 중요 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 그라데이션 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.

Precise Characterization of Intact Monoclonal Antibodies by the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

Application Note

Author

David L. Wong
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are a very important class of biopharmaceutical molecules. As a protein drug, thorough characterization of the mAb is required in each of the manufacturing steps. Intact mAb analysis offers rapid assessment on determining the accurate molecular weight of an mAb product and its degree of heterogeneity, such as post-translational modifications (PTMs), antibody-drug conjugate (ADC), mAb sequence variations, or degradation products. Quadrupole Time-of-flight (Q-TOF) LC/MS systems are often used to analyze intact proteins or antibodies due to excellent resolution at the high mass range¹⁻³. The Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF system includes hardware and software features to significantly improve the measurement of biomolecules up to 30,000 m/z . This Application Note describes a seamless workflow using the Agilent 1290 Infinity II UHPLC system, 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, and automatic data processing with Agilent MassHunter BioConfirm software to analyze a variety of mAb products.



Figure 1. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF system.

An Integrated Workflow for Intact and Subunits of Monoclonal Antibody Accurate Mass Measurements

Application Note

Biotherapeutics and Biosimilars

Authors

Shuai Wu and Maryann Shen
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

Steve Murphy and
Zach Van Den Heuvel
Agilent Technologies, Inc.
Madison, WI, USA

Introduction

Monoclonal antibody (mAb) based entities represent a rapidly growing class of biologics that require extensive characterization to obtain approval for clinical trials and subsequent market release. Accurate mass measurement is a challenging step in the analytical characterization of antibodies because of their large size and the presence of post-translational modifications such as glycosylation. These characteristics also make determining the location of modifications more complex.

To overcome the challenges associated with antibody mass measurement, a number of complementary approaches are typically used. Antibodies can be treated with PNGase F to remove the N-Glycans, digested with proteases such as IdeS to generate antibody fragments, or reduced to generate light and heavy chains prior to mass measurement. These techniques can be used in various combinations. Sample preparation can be laborious, time-consuming, and have limited reproducibility. This Application Note demonstrates how these approaches can be streamlined by automation on the Agilent AssayMAP Bravo to reduce the probability of human error, increase reproducibility, and create more walk-away time (Figures 1 and 2).

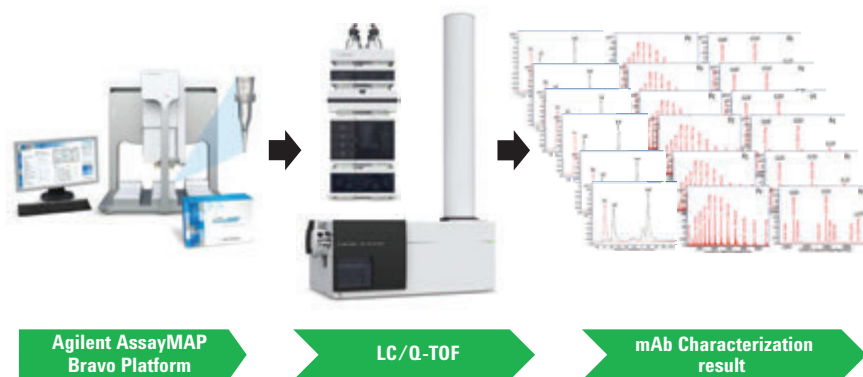
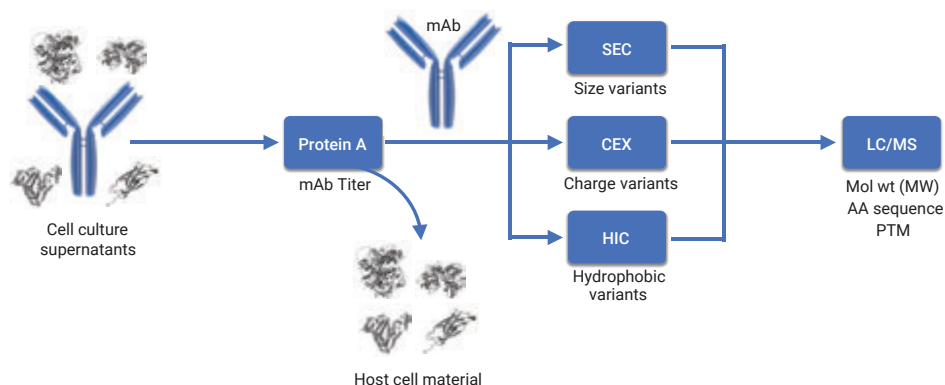


Figure 1. Integrated workflow for automated antibody characterization using Agilent AssayMAP Bravo.

Determination of Multiple Attributes of Monoclonal Antibodies

Simultaneous and parallel multi-attribute analysis using 3D-LC/MS with ²D multimethod option



Authors

Liesa Verscheure,
Gerd Vanhoenacker,
Pat Sandra, and Koen Sandra
RIC biologics
President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider, and
Udo Huber
Agilent Technologies
Hewlett-Packard Strasse 8
D-76337 Waldbronn
Germany

Abstract

This application note describes multi-attribute analysis of monoclonal antibodies using the Agilent InfinityLab 2D-LC Solution and the Agilent 6530 LC/Q-TOF system. The analyzer combines Protein A affinity chromatography in the first dimension with a multimethod option (choice between SEC, CEX, or HIC) in the second dimension and desalting SEC-MS in the third dimension. This innovative 3D-LC/MS setup allows simultaneous and parallel assessment of mAb titer, size/charge/hydrophobic variants, molecular weight, amino acid (AA) sequence, and post translational modifications directly from cell culture supernatants.

N-글리칸 유리 및 표지를 위한 빠른 2-AB
시료 전처리 워크플로 개발

저자

Vaishali Sharma,
Andres Guerrero, John Yan,
Aled Jones, Michael Kimzey,
Emily Dale, Ted Haxo 및
Sergey Vlasenko
Agilent Technologies, Inc.

개요

N-글리칸의 특성 규명은 바이오의약품 개발의 필수 과정입니다. 일반적으로, 효소적으로 유리된 N-글리칸은 HILIC UHPLC-FLR 및 UHPLC/MS에 의한 형광(FLR) 및 질량 분석(MS) 검출을 허용하는 태그로 유도체화됩니다. N-글리칸 시료 전처리를 위해 몇 시간 또는 며칠이 소요되는 경우가 많습니다. Agilent InstantPC(이전 명칭 ProZyme)와 같은 최신 형광 태그는 높은 FLR 및 MS 감도를 제공 하지만 2-AB(2-aminobenzamide)는 20년 이상 N-글리칸 데이터를 생성하는 데 사용되어 왔고 많은 실험실에서 잘 정립된 태그입니다. 여기서는 5분 동안 용액 내에서 탈당화 단계를 거치고 건조 단계 없이 매트릭스에서 직접 2-AB 표지 지정과 정제를 수행하는 빠른 N-글리칸 시료 전처리 워크플로우의 개발과 적용에 대해 소개합니다. 이 방법을 이용하면 약 2시간 내에 시료 분석 준비가 끝납니다.

애질런트에서 제공하는 두 가지 N-글리칸 시료 전처리 워크플로를 사용하여 두 개의 단클론 항체(MabThera, NISTmAb)와 하나의 Fc 융합 단백질(Enbrel)로 구성된 비교 연구를 제시합니다. 1) 2-AB를 사용한 Agilent GlykoPrep Rapid N-Glycan 전처리; 2) 2-AB Express(이전 명칭 ProZyme)를 사용한 Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan 전처리. Agilent AdvanceBio Gly-X 기술 및 2-AB Express 표지 지정은 기존 시료 전처리 방법에 비해 결과 도출 시간을 훨씬 단축합니다.

신뢰할 수 있고 효율적이며, 최상의 결과를 위해 언제나 혁신하고 있습니다

Agilent InfinityLab LC 기기, 컬럼 및 소모품은 견고한 품질과 신뢰성 있는 분석 결과를 제공합니다. 하지만 애질런트의 약속은 여기서 끝나지 않습니다. Agilent InfinityLab 제품군의 모든 구성 요소는 완벽한 조화를 이루어 작동하도록 설계되어 있기 때문에 워크플로를 개선하여 작업 효율을 높이고 운영 비용을 절감할 수 있습니다.

InfinityLab에 대한 자세한 정보 보기:

www.agilent.com/chem/infinitylab

추가 정보:

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

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고 리소스에 액세스하세요:

community.agilent.com

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

DE44420.8848726582

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 8월 24일, 한국에서 발행
5994-4046KOKR

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

