

Application News

No. 01-00473-K

LabSolutions™ MD: Software for Efficient Method Development based on Analytical Quality by Design

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단일클론항체 크기 변이체의 효율적인 분석 방법 개발

Efficient Method Development of Monoclonal Antibody Size Variants by Size Exclusion Chromatography

사용자 활용 포인트

- ◆ 단일클론항체 응집체(aggregate), 단량체(monomer), 단편(fragment) 간의 분리를 효율적인 디자인으로 시각화하여 충분한 분리도 및 견고감을 제공하는 최적의 조건을 찾을 수 있다.
- ◆ Nexera™ XS inert(UHPLC 시스템)는 염 농도가 높은 이동상을 사용하는 경우에도 부식에 대한 저항성이 높아, 안정적인 데이터를 제공할 수 있다.
- ◆ pHM-40은 이동상 pH의 실시간 모니터링을 제공할 뿐만 아니라 크로마토그램과 함께 pH 프로필을 시각화 할 수 있다.

■ 서론

단일클론항체(mAb)를 사용하는 항체 약물은 안전성과 효능에 미치는 영향 측면에서 생산 및 보관 중에 응집체 형성에 대한 우려를 제기한다. ICH-Q6B는 항체의약품의 응집체, 단편 등의 불순물을 분리하고 그 함량을 결정하도록 규정하고 있다. 따라서 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 이러한 불순물을 모니터링하는 것은 mAb 생산 중 가장 중요한 분석 중 하나이다.

SEC 분석을 위해서는 mAb와 컬럼 패킹 물질 간의 상호 작용을 고려하면서 염 농도와 이동상의 pH를 변경하여 응집체, 단량체 및 단편 간의 분리를 최적화해야 한다. 반면에 염 농도가 높은 이동상을 사용하면 LC 시스템이 손상될 수 있다. 따라서, 이 뉴스레터에서는 부식에 대한 저항성이 뛰어난 Nexera XS inert와 pH 모니터(pHM-40) 및 LabSolutions MD(분석법 개발을 지원하는 전용 소프트웨어)를 사용하여 mAb 크기 변이체에 대해 충분한 분리 및 견고성을 제공하기 위한 효율적인 분석법 최적화의 예를 설명한다.

■ 분석 조건

mAb 응집체, 단량체, 단편의 분리를 위한 최적화 조건은 표 1에 나타났다. 먼저, 인산염 완충용액의 염화나트륨 농도를 변화시켜 분리를 위한 최적 조건을 평가하였다. 그 다음, 이동상의 pH, 유속 및 오븐 온도를 변화시켜 최적의 조건을 찾기 위한 추가 분석을 하였다.

표 1. 분석 조건

System:	Nexera XS inert (Method Scouting System)
Mobile Phase	
Pump A:	200 mmol/L disodium hydrogen phosphate in water
Pump B:	200 mmol/L sodium dihydrogen phosphate in water
Pump C:	1 mol/L sodium chloride in water
Pump D:	Water
Sample:	Monoclonal Antibody Standard (0.5 mg/mL)
Column:	TSKgel UP-SW3000 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
Vial:	TORAST-H Glass Vial (Shimadzu GLC)*1
Analytical Conditions (Isocratic)	
Oven Temp.:	20, 25, 30 °C
Flow rate:	0.15, 0.2, 0.25 mL/min
Injection Vol.:	5 μL
Detection:	280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

*1 P/N: 370-04301-01

■ 이동상의 염화나트륨 농도 평가

이동상의 염 농도가 분리에 미치는 영향을 평가하기 위해 이동상 혼합 기능(C190-0563¹⁾ 참조)을 사용하여 염 농도가 다른 이동상을 자동으로 준비하였다. 구체적으로, 50 mmol/L에서 300 mmol/L까지 50 mmol/L씩 증가하는 인산염 완충용액 내 염화나트륨의 6가지 농도 수준을 평가하여 응집체, 단량체 및 단편 사이의 분리를 최적화했다. 그림 1은 이동상의 염 농도를 50 mmol/L 및 150 mmol/L에서 얻은 mAb 크로마토그램을 나타내었다. 염화나트륨의 농도가 50 mmol/L 인 경우, 고정상과 mAb 사이의 정전기적 상호작용이 응집체(그림 1의 A)와 단량체(그림 1의 B) 사이의 분리도를 낮추고 단량체(그림 1의 B)와 단편(그림 1의 C) 사이의 peak-to-valley ratio도 낮다. 반면에, 이동상의 염 농도가 150 mmol/L 일 때, 이 값은 개선되었다(그림 2). 이 결과를 바탕으로 염화나트륨의 농도는 150 mmol/L로 결정하고, 이후 이동상의 pH, 유속 및 오븐 온도의 최적화를 진행하였다.

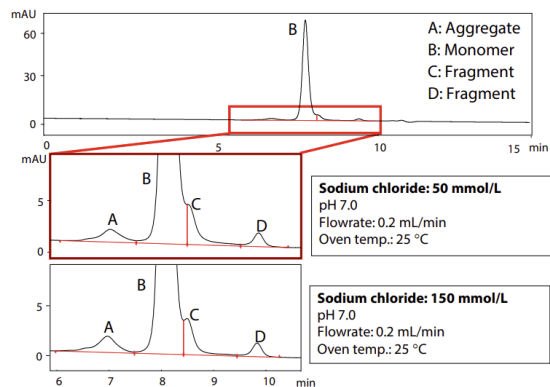


그림 1. 50 및 150 mmol/L 염화나트륨 농도에서의 크로마토그램

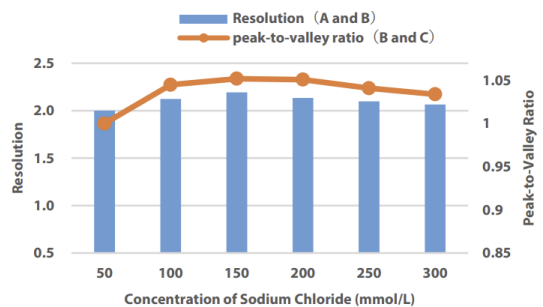


그림 2. 염화나트륨 농도별 분리도 및 peak-to-valley ratio

이동상의 pH, 유속 및 오븐 온도 평가

단백질은 해리가 가능한 그룹이 많기 때문에 일반적으로 전하 상태는 pH 수준에 따라 달라지며, 이는 고정상과 mAb 사이의 2차 상호작용으로 피크 모양에 영향을 미칠 수 있다. 또한 최적의 유속과 오븐 온도는 컬럼의 충전재의 입자 크기, 기공 크기 및 분자의 화학적 특성에 따라 달라진다. 따라서 이동상의 pH, 유속 및 오븐 온도를 변경하여 응집체, 단량체 및 단편 간의 분리를 최적화했다. pH 6.1, 6.7, 7.3, 유속 0.15, 0.20, 0.25 mL/min, 오븐 온도 20, 25, 30 °C에서 얻은 크로마토그램을 그림 4 - 6에 나타내었다. 응집체와 단량체 사이의 분리도 및 단량체와 단편 사이의 peak-to-valley ratio를 나타내는 디자인 스페이스를 그림 3에 나타내었다. 가로축은 유속을 나타내고 세로축은 pH를 나타낸다. 빨간색 영역은 더 높은 분리도와 peak-to-valley ratio를 나타내고 파란색 영역은 더 낮은 값을 나타낸다. 디자인 스페이스는 응집체, 단량체 및 단편 사이의 분리를 위한 최적 조건이 pH 7.3, 유속 0.15mL/분, 오븐 온도 30°C (그림 3의 왼쪽 상단 영역의 파란색 점)임을 자동으로 발견하였다. 디자인 스페이스를 활용하여 사용자 경험에 관계없이 최적의 조건을 얻을 수 있다. pH의 경우, pH가 6.1에서 7.3으로 증가함에 따라 응집체, 단량체 및 단편 간의 분리가 향상되었다(그림 4). 표적 mAb의 등전점(pI) 값이 약 7이기 때문에 전하 상호 작용으로 인한 머무름의 영향은 pH 6.1에서 더 중요할 수 있다. 유속 및 오븐 온도의 경우, 응집체, 단량체 및 단편 사이의 최적의 크로마토그래피 분리는 낮은 유속 및 높은 오븐 온도에서 얻어졌다(그림 5, 6). pH 값은 각 크로마토그램에 겹쳐진 파란색선으로 모니터링이 되며, 분석 중에 pH가 안정적인지를 보여준다. 예를 들어 비정상적인 분리 동작의 경우, 모니터링된 pH 값이 분석 안정성을 확인하기 위한 매개변수로 사용될 수 있다.

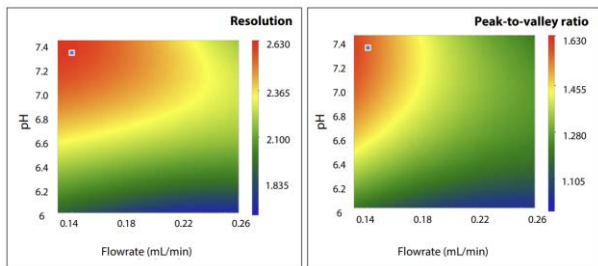


그림 3. 응집체(A)와 단량체(B) 사이의 분리도를 나타낸 디자인 스페이스 (왼쪽) 단량체(B)와 단편(C) 사이의 peak-to-valley ratio를 나타낸 디자인 스페이스 (오른쪽) (오븐 온도: 30 °C)

결론

이 뉴스레터에서는 Nexera XS inert, pHM-40(pH 모니터) 및 LabSolutions MD를 사용하여 mAb 응집체, 단량체 및 단편 간의 분리를 효율적으로 최적화하는 방법을 설명한다. Nexera XS inert는 염 농도가 높은 이동상을 사용하여도 부식에 대한 높은 저항성을 가지고 있기 때문에 신뢰할 수 있는 데이터를 얻을 수 있다. 또한 디자인 스페이스는 사용자의 경험에 의존하지 않고 최적화하는 방법을 효율적으로 지원한다.

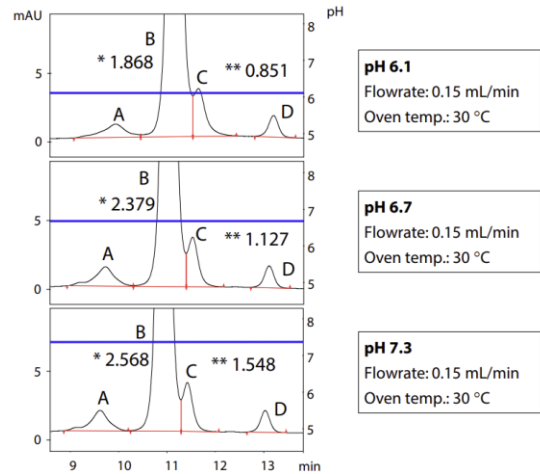


그림 4. pH가 다른 크로마토그램 (파란색 선: 모니터링된 pH)
A: 응집체; B: 단량체; C, D: 단편;
* A와 B 사이의 분리도, ** B와 C 사이의 peak-to-valley ratio

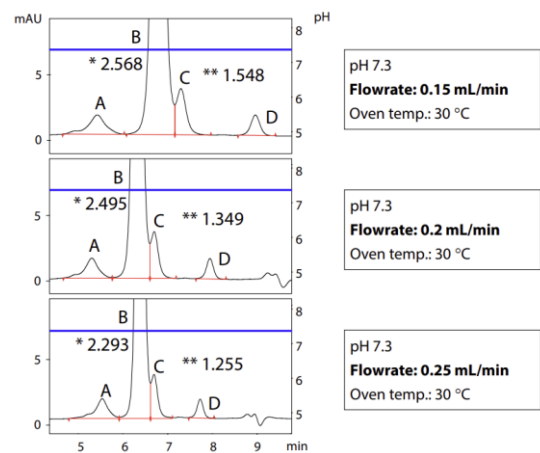


그림 5. 유속이 다른 크로마토그램 (파란색 선: 모니터링된 pH)
A: 응집체; B: 단량체; C, D: 단편;
* A와 B 사이의 분리도, ** B와 C 사이의 peak-to-valley ratio

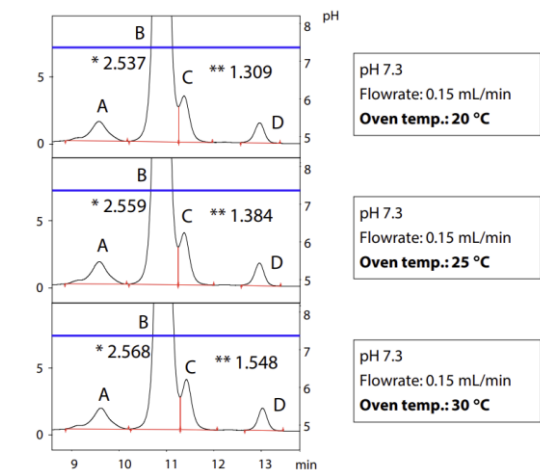


그림 6. 오븐 온도가 다른 크로마토그램 (파란색 선: 모니터링된 pH)
A: 응집체; B: 단량체; C, D: 단편;
* A와 B 사이의 분리도, ** B와 C 사이의 peak-to-valley ratio

<Reference>

- 1) Efficient Method Development by automated pH Screening with LabSolutions MD (C190-0563)



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not available in the USA, Canada, and China. This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

Copyright © 2022 SHIMADZU group. All rights reserved.