

# 항체의약품의 품질평가 시험정보집

2017.04.

식품의약품안전처  
식품의약품안전평가원



# 목 차

<b>1. 배경 및 필요성</b>	1
<b>2. 항체의약품 품질평가의 요건</b>	3
2.1. 소개	3
2.2. 특성분석	4
2.3. 확인·순도·역가·함량 시험	5
<b>3. SPR(Surface Plasmon Resonance)원리를 활용한 항체의약품 역가 시험법</b>	8
3.1. 소개	8
3.2. TNF $\alpha$ 에 특이적인 항체의약품에 대한 SPR 시험법	13
3.3. Fc $\gamma$ RIIIa를 사용한 항체의약품의 SPR 시험법	17
<b>4. 재조합 단클론항체의약품 품질분석 시험법(USP 139)</b>	21
4.1. 소개	21
4.2. 크기배제 고성능 액체크로마토그래피	23
4.3. 모세관 SDS 전기 영동(환원, 비환원 조건)	26
4.4. 올리고당 분석- 단클론 항체의 N-linked 올리고당 분석	31
<b>5. 맺음말</b>	38
<b>6. 참고문헌</b>	40
<b>7. 별첨자료</b>	43
USP 129 Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies	

이 항체의약품 국외정보집은 식품의약품안전처에서 수행한 바이오의약품 안전관리 연구사업인 「표면플라즈몬공명원리를 이용한 항체의약품 품질평가를 위한 연구」(첨단바이오제품과)의 연구를 수행하며 획득한 정보를 관련 분야 연구자와 심사관련 종사자에게 제공하기 위한 목적으로 작성되었다. 여기에 제시한 가이드라인은 앞으로 관련 분야의 과학기술 발전에 따라 다른 분석법이 사용될 수 있으며, 식약처의 정책이나 심사 방향과는 다를 수 있음을 밝힌다.

## 1. 배경 및 필요성

전 세계 의약품 시장에서 바이오의약품은 합성의약품에 비해 높은 성장률을 보이고 있으며 그 매출이 차지하는 비중도 비약적으로 증가하고 있다. 특히 항체의약품은 효능이 우수하고 목표로하는 특정부위에만 특이적으로 작용하며 생체 유래 물질이기 때문에 부작용이 적을 것으로 기대되어 국내·외에서 개발 투자가 활발히 이루어지고 있다.

항체의약품은 면역세포 신호전달체계에 관여하는 단백질 항원이나 암세포 표면에서 발현되는 표지인자를 표적으로 하는 단일클론항체(monoclonal antibody)를 제작하고, 인체적용 시 부작용을 최소화할 수 있도록 재조합 기술, 항체공학기술 등을 이용하여 단백질을 개량해 제조한다. 1985년, 세계 최초의 단클론항체 의약품(Orthoclone OKT3, Janssen-Cilag, 장기이식 환자의 급성이식거부반응 억제용)이 미국 FDA에 의해 판매 승인된 이후, 1997년에는 세계 최초의 단클론항체 항암제(Rituxan, 비호지킨림프종 치료용)가 Genentech社에 의해 개발되는 등 다양한 질환의 치료를 목적으로 하는 수많은 항체의약품이 출시되고 있다.

이러한 항체의약품은 특이적으로 작용하기 때문에 부작용이 적고 효능이 뛰어날 뿐 아니라, 자가면역 질환이나 암 등 일반 합성의약품으로 치료효과가 한계가 있는 질환에 적용이 가능한 장점을 갖고 있다. 특히 단일클론항체의 특이적 결합력은 항체를 운반체로도 활용할 수 있도록 하는데 항체를 방사성 물질이나 강한 세포독성물질과 결합시켜 암세포만을 선택적으로 파괴할 수 있는 의약품도 개발되고 있다.

이처럼 바이오의약품 시장에서 큰 비중을 차지하고 있는 항체의약품은 향후에도 지속적인 성장이 기대되는데 항체의약품의 특성상 생산 단계에 따라 많은 변화가 가능하고, 구조가 복잡하기 때문에 품질 및 특성 확인이 가능한 시험법이 매우 다양하다. 특히 단백질이라는 것은 생물학적 성질이 매우 다

양하고, 특징 하나하나가 제품의 임상적 효과와 연결되는 부분이 많기 때문에 항체의약품을 효율적으로 품질평가하기 위한 방법 선정이 매우 중요하다고 할 수 있다.

본 보고서에서는 단클론항체의약품 품질평가지 고려가 필요한 사항들에 대하여 안내하고, 덧붙여 식약처 자체 연구사업을 통해 개발한 SPR(Surface Plasmon Resonance) 원리 활용 항체의약품 품질평가 시험법과 미국약전에서 2016년도 5월에 공표한 항체의약품 품질평가 시험법을 소개함으로써, 허가심사자는 물론 항체의약품 개발에 관심이 있는 연구자들에게 유용한 정보를 제공하고자 한다.

## 2. 항체의약품 품질평가의 요건

### 2.1. 소개

항체의약품은 기존의 바이오의약품과는 다르게 정제법 및 특성분석 방법, 그리고 규격 시험의 구성에서 각 제품 간에 공통된 기술적 요소들이 존재한다. 이에 최소한의 안전성과 유효성 확보를 위한 항체의약품 품질평가의 기본적인 사항을 소개하고자 한다.

바이오의약품의 품질 관리를 위해서는 제조 공정 관리 및 제품의 품질 평가 모두가 필수적이다. 바이오의약품 중에서도 항체의약품은 단백질로 번역 후 변형(post-translational modification) 뿐만 아니라 여러 폴리펩타이드가 결합된 고차 구조를 포함하고 있기 때문에 구조 특성을 분석하는 것이 쉽지 않다. 그러나, 일반적으로 의약품으로 주로 제조되는 IgG 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 4 개의 종류로 분류되며, 동일한 H 체인 2 분자와 동일한 L 체인 2 분자로 구성된 4 가닥(H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 체인)의 기본 구조를 가지고 있어, 품질 평가 시험법 선택에 있어서 공통적인 접근이 가능할 수 있다.

항체의 제조 공정 관리에 대하여 일차적으로 고려할 사항은 생산세포에 대한 것이라고 할 있다. 생산세포로는 주로, CHO 세포와 마우스 골수종 세포(Sp2/0 세포, NS0 세포 등) 등이 이용되는데 이러한 세포에서 생산된 재조합 단백질은 N-글리코닐뉴라민산(N-Glycolylneuraminic acid, NeuGc)과 갈락토스  $\alpha$  1-3 갈락토스(Gal  $\alpha$  1-3Gal)과 같은 비인간형 당쇄가 붙어있는 예도 보고되었다. Fab 영역에 비인간형 당쇄를 가진 항체의약품의 경우, 환자에게서 과민성 반응이 발생할 수 있어, 항체의약품 생산 숙주 세포의 선택시 이 점이 고려되어야 하며, 이를 품질평가 항목으로 포함시킬 필요성이 있다. 또한, 상기 기술된 세포주 이외의 항체의약품 생산에 응용 실적이 없는 신규세포주를 이용하는 경우에는 세포 선택의 경위, 수립 방법 등에 대한 정보와 안전성을 보장할 수 있도록 추가적인 특성 분석이 필요할 수 있다.

## 2.2. 특성분석

각각의 항체의약품에 대한 구조 분석에서는 H 체인 및 L 체인에 대해, 다른 바이오의약품과 마찬가지로 아미노산 배열, N 말단 및 C 말단 아미노산 서열 펩티드 지도, -SH 기 및 이황화 결합, 당쇄 구조, N 말단 및 C 말단 아미노산 서열 프로세싱의 정도, Fc 영역 이외의 당쇄 결합시에는 당쇄의 결합 위치 확인 등이 필요할 수 있다.

항체와 같은 고분자 단백질은 N 말단 및 C 말단 아미노산 서열 분석 및 펩타이드 맵핑, 질량 분석법(Mass Spectroscopy) 등을 결합하여 전체적인 1차 아미노산 서열을 확인하는 것이 가능하다. 항체 의약품의 H 체인의 N 말단에 대하여 MS를 이용한 펩타이드 맵핑 등을 통하여 피로글루타민산(pyroglutamic acid)의 형성의 유무를 확인할 수 있으며, 피로글루타민산의 형성이 확인된 경우에는 그 비율을 구할 수 있다. 또한 대부분의 항체 의약품에서 H 체인 C 말단의 리신(Lysine) 부분은 결실되어 있어 C 말단 아미노산의 불균일성도 확인할 필요가 있다.

N 말단과 C 말단 아미노산 변이 외에도, 각 L 사슬과 H 사슬에서의 이황화 결합(disulfide bond)에 대한 분석이 필요한 경우도 있다. -SH 기 및 이황화 결합 분석은 각각 이황화 결합하지 않고 있는 -SH 기의 비율 밝히거나 의도한 이황화 결합이 제대로 형성되어 있는지 확인하기 위해 실시한다.

항체의약품은 당단백질로서 일반적으로 H 체인 CH2 도메인 한 곳에 공통적으로 N 결합형 당쇄가 결합되어 있다. 이 N 결합형 당쇄는 갈락토스(galactose)가 0 ~ 2 분자 결합한 후코실(fucosyl) 2 가닥 당쇄(fucosyl double stranded sugar chain, 관용적으로 G0 ~ G2로 불린다.)이다. 이 N 결합형 당쇄의 유무를 확인 한 후, 결합 당쇄의 구조와 각 당쇄의 결합 비율을 명확히 할 필요가 있다. 특히 항체 의존성 세포성 세포 독성(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) 활성 또는 보체의존성 세포독성



(complement-dependent cytotoxicity; CDC) 활성을 이용하고 있는 항체의약품은 각각 N 결합형 당쇄의 트리맨노실(trimannosyl) 코어 부분에  $\alpha$  1-6 결합하고 있는 푸코오스(fucose) 또는 비환원 말단 갈락토스가 그 세포 독성 활성 등을 조절하는 것으로 알려져 있기 때문에 당쇄 구조가 ADCC 활성 또는 CDC 활성에 미치는 영향에 대해서도 다양한 각도에서 검토해야 한다. 또한, 가변부(antibody variable region)에 N 결합형 당쇄의 보존 서열(consensus sequence, Asn-Xaa-Ser/Thr; Xaa는 Pro 이외의 아미노산 잔기)이 존재하는 경우, N 결합형 당쇄가 결합되어있을 수 있으므로, 당쇄의 유무를 확인해야 한다. 항체의 당쇄 분석 방법으로는 단당류로 가수 분해하여 분석하는 방법(단당류 조성 분석), 당쇄를 효소 등으로 잘라 분석하는 방법(올리고당 분석), 트립신 등으로 당펩티드로 분석 방법(당펩티드 분석) 및 당단백질 그대로 해석하는 방법(글리코 폼 분석) 등을 적용할 수 있다.

### 2.3. 확인·순도·역가·함량 시험

항체의약품의 품질평가를 위하여 기본적인 항목으로 확인·순도·역가·함량이 있다. 확인 시험은 대개의 경우 주성분이 해당 항체인지 확인하기 위한 시험으로 설정되며, 높은 특이성이 요구된다. 항체의약품은 펩티드지도, 크로마토그래피의 유지 시간, 전기영동 패턴 등을 표준품과 비교하여 주성분의 구조 및 물리 화학적 성질이 일치하는지 확인하는 시험이 설정되는 경우가 많으며 때에 따라 항원에 특이적으로 반응할 수 있는 항체인지를 보는 시험으로 설정하는 경우도 있다.

순도 시험은 주성분의 불균일성 및 불순물 함량을 관리하기 위해 설정된다. 순도 시험의 예로는 H 체인 C 말단 리신 소실 분자 등의 이형체(isoform)의 함량 평가를 목적으로 한 이온 교환 크로마토그래피를 들 수 있다. 이온 교환 크로마토그래피에서는 탈아미드 분자, 하나 또는 둘 모두의 H 체인 C 말단 리신이 없는 분자, 하나 또는 두 H 사슬의 N 말단이 글루탐산 잔기인 것, 시알산이 덧붙은 분자, 조건에 따라서는 H 사슬 조각, L 사슬 단

편, Fab 단편 및 Fc 단편 등의 검출도 가능하다. 순도 시험의 다른 예로는 전하 불균일성 평가를 목적으로 하는 등전점전기영동 또는 모세관등전점전기영동시험을 들 수 있다. 항체를 파파인으로 절단하여 만들어진 정상 부위의 히스티딘과 트레오닌 잔기 사이가 절단되어 2 분자의 Fab 단편과 1 분자의 Fc 단편에 대하여, 이를 소수성 크로마토그래피 등으로 분석하면 유리 시스테인의 존재, 메티오닌 등의 산화 및 일부 아미노산의 변화(예: 아스파르트산의 이성화) 등을 확인할 수 있어 이를 순도 시험에 적용할 수도 있다.

당단백질인 항체에 대하여 당쇄 구조의 불균일성의 평가를 목적으로 한 순도시험도 포함될 수 있다. 있다. 특히, ADCC 활성 또는 CDC 활성을 갖는 항체처럼 당쇄 구조가 생물 활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 항체의약품은 당쇄 구조의 균일성을 확보하기 위한 기준과 시험방법의 설정을 고려해야 할 필요가 있다. 다른 한편 주성분의 균일성을 평가하기 위해 설정되는 시험에서는 피크 강도(intensity)의 비율 및 표준품과의 패턴 일치 여부를 기준으로 설정한다.

주성분 유래의 불순물(impurity) 관리를 위해서는 주성분인 단량체와 고분자량 응집체 함량 비율을 평가하기 위한 위해 크기배제 크로마토그래피를 활용한다. 이 시험방법에서는 이량체 및 다량체의 존재를 확인할 수 있으며, H 체인 및 L 체인의 단일 체인의 존재, Fab 단편 또는 Fc 단편 등 분해물의 측정도 가능하다. 주성분인 IgG와 저분자량 변이체들의 함량 비율을 평가하기 위한 시험방법에는 SDS-PAGE 및 모세관 전기영동 등이 있다. 이러한 시험에서는 불순물 또는 주성분의 상대적인 함량에 대하여 기준이 설정되는 것이 일반적이다.

항체의약품의 생물학적 활성은 품목마다 달라 항원과 결합하여 항원을 통한 생체 내 반응을 억제 또는 촉진하는 것, 항원 결합능 이외에 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 가지는 것 등이 있다. 목적으로 하는 효능 효과를 반영한 생물 활성을 측정하기 위해서는 임상 효과와 그 분자작용기전을 고려하여야

한다. 그러나, 항체의약품의 기능적인 특성을 평가하기 위하여 항원과의 결합능에 대하여 시험을 설정하는 것이 일반적이다. 주로 세포주나 항체-항원 반응을 이용한 생물학적·면역학적 시험을 실시하고 표준품과 활성의 비교에서 산출된 역가에 대하여 허용 범위를 기준으로 설정한다. 역가 표준품과 활성의 비율(%)로 표시 될 수도 있고, 독자적으로 설정한 단위로 표시되는 경우도 있다.

항체의약품의 함량은 거의 대부분의 경우에서 원료 및 완제의약품 중의 단백질 농도로 규정하며, 가시자외부흡광도측정법을 이용하여 매질내 빛이 진행할 때 용액의 투과율이 용액의 농도와 단위 길이당 흡광도, 매질의 길이(빛의 투과거리) 곱의 지수항수에 비례한다는 Lambert-Beer 법칙에 따라 함량을 계산한다.

### 3. SPR(Surface Plasmon Resonance) 원리를 활용한 항체의약품 역가 시험법

#### 3.1. 소개

SPR 기술이란 굴절률이 다른 두 매질 사이에 전기전도도를 가진 금속 박막이 위치해 있고, 그 금속 박막 매질 위에 특정한 물질(Ligand)을 코팅하여 상호작용이 일어나도록 준비한다. 이 코팅면 쪽으로 상호 작용이 예상되는 분석물질(Analyte)을 용매에 녹여 흘려주게 된다. 이렇게 되면, ligand와 analyte 두 물질(또는 때에 따라서 다수의 물질)이 금속박막위에서 만나게 된다. 이들 물질이 서로 결합력을 가지고 반응하게 되면 매질의 표면 물질 자기학적 계수가 변하게 된다. 이 때 금속박막의 다른 한쪽에서는 프리즘을 통해 빛을 쏘여주게 되면, 처음 Ligand만이 금속박막 위에 코팅되어져 있을 때의 빛의 굴절률과 Analyte를 흘려주어 이 analyte가 ligand와 결합했을 때 각각 빛의 굴절률이 질량 변화의 차이에 따라 달라지게 되고, 빛이 맺히는 위치가 달라지게 된다. 이러한 반사각 굴절률의 차이를 전기적 신호로 바꾸어 측정하여 수치상으로 나타냄으로써 분자간의 상호작용을 확인하는 방법이 SPR이다[1-8, 19, 26-27].

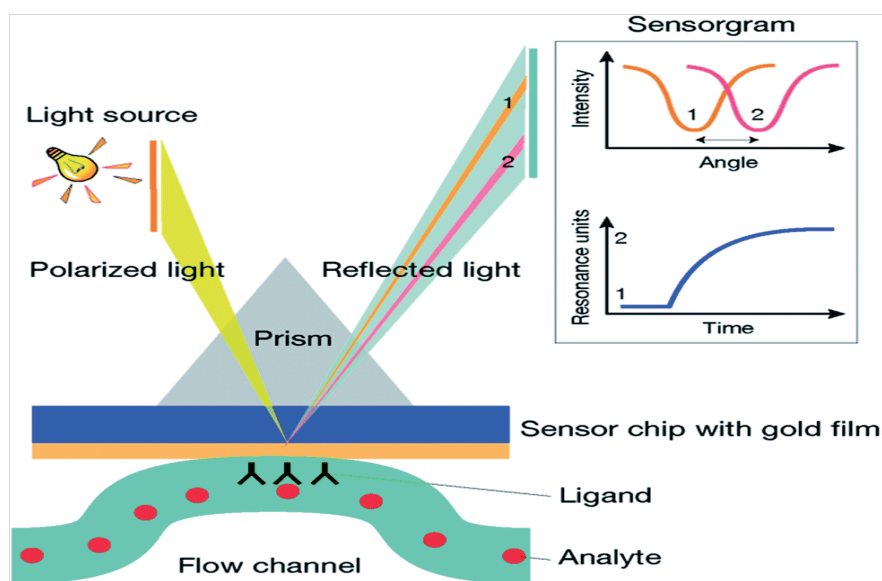


그림 1 표면플라즈몬공명원리 시험법의 원리(출처: Med. Chem. Commun., 2014, 5, 1058-1066)

이 반응물질의 반응정도를 시간별-신호로 나타낸 것을 센소그램 (sensogram)으로 부른다. 이것을 통해 반응물과 항체의 생화학적 반응식을 이용하여 계산하여 결합친화도 및 물질간의 결합, 해리 등의 상호작용을 측정할 수 있게 해준다.

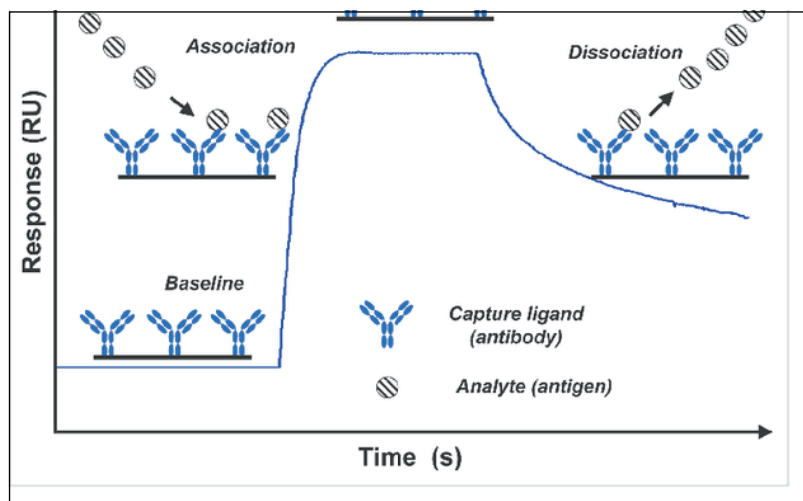
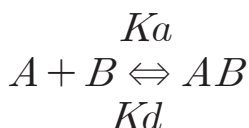


그림 2 항체의약품의 센소그램 예시(출처: [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))

이러한 원리를 이용하여 물질간의 결합력, 항원항체반응 등을 측정하게 되는데 각각 반응의 강도에 따라 반응의 강도가 높은 경우 동력학적 특성 (Kinetics)을 분석하거나, 반대로 반응의 강도가 낮은 경우는 Steady-state affinity를 측정하는데 사용하게 된다[1, 28, 29].

Kinetics 분석 방법은 반응의 강도가 강한 경우에 사용한다. ligand가 결합되어져 있는 금속박막 chip에 일정한 유속으로 검체를 흘려주어 반응시키면 결합이 생기게 되고 이에 따른 RU값의 변화에 따라 그래프가 Association 상태로 올라가게 된다. 결합했던 검체는 떨어지고 불기를 반복하는데 이 반복하는 부분이 평형을 이룰 때가 되면 그래프가 더 이상 올라가지 않는데 이때가 Steady state가 되고, 이때 검체를 더 이상 흘려주지 않고 다시 버퍼를 흘려주는데 이렇게 되면 더 이상의 불을 검체가 없기 때문에 떨어지는 단계만 반복하게 되는 Dissociation 상태가 된다. 더 이상의 dissociation이 없게 되면 이제 센서 칩을 재사용하기 위한 Regeneration을 실시하게 된다. 이러한 일련의 반응을 통해 결합력을 측정하게 되고, 각각 Association은  $K_A$ ,

dissociation은  $KD(=K_a/K_d)$ 로 나타나게 된다[1, 20, 21].



Steady-state affinity 분석방법은 포화가 되는 최고점을  $R_{max}$ 라고 하며, 각 농도의 그래프를 통해  $R_{max}$  1/2 지점의 R값을 Equilibrium  $R_{eq}$ 라고 한다. 이때의 analyte 농도를 KD로 지정한다. 즉, 반응강도가 낮은 검체들을 농도별로 반응성을 측정하고, 측정된 농도별 RU 값을 농도별로 그래프를 그린 후, 반응값을 KD 라는 단위로 나타낸다.

위의 방법을 이용해 표준품과 검체에 대한 KD값을 구하고 이 값을 이용해 % Binding affinity를 구하게 된다. % Binding affinity를 구하는 식은 다음과 같다.

$$\% \text{ Binding Affinity} = (\text{Standard KD} / \text{Sample KD}) \times 100$$

이러한 SPR 시험법을 활용하여, 기허가된 제품 및 허가 신청중인 항체의약품 중 일부 항체의약품에서도 이를 특성분석시 사용하는 것으로 알려졌다. 특히  $Fc\gamma$  수용체 I, II, III 분석 같은 경우 최근 허가 신청된 제품 몇몇이 기존에 사용하던 ELISA 방법과 함께 SPR을 이용한 시험법을 설정하여 사용하고 있다[9, 17, 22].

2012년 일본에서 발행한 항체의약품 품질평가 가이드스에서도 항체 의약품의 결합 특성으로 밝혀야 주요 사항은 표적 항원에 대한 결합 친화성, 항체가 확인·식별하는 항원결정부와 유사한 단백질(항원과 구조의 유사한 분자, 동물의 상동 단백질)에 대한 교차 반응 등을 확인하기 위하여, 효소 면역측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA)과 함께 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance : SPR) 분석 등을 제안하고 있다. 특히 이 가이드스에서는 SPR 분석에서는 결합 친화성(해리 상수) 외에 결합속도상수와 해리속도상수를 명시하도록 권고하고 있다.

기존의 항체 품질평가 시험법으로는 세포주를 사용한 항체의 역가시험이나, 항원 또는 FC 수용체와의 결합특이성(Specific binding activity)을 보기 위하여 ELISA 등과 같은 방법을 이용해 이미 결합이 종료된 반응을 측정해왔다. 즉, 분자간 상호작용을 측정하는 다른 기술의 경우 반응의 엔드포인트 값만으로 반응의 특성을 판단해야 하나, 실시간 반응 양상을 모니터링할 수 있는 SPR 기술은 반응 여부뿐만 아니라 반응속도 및 해리속도, 친화도, 반응의 특이성, 활성분자 농도 등 다양한 정보를 얻을 수 있다. 또한 형광 및 방사성 동위원소와 같은 표지를 하지 않고도 분석이 가능하기 때문에, 화학적 공유결합에 의한 분자변성의 우려가 없는 상태로 분자와 분자 그 자체만의 상호작용을 정확하게 측정할 수 있다. 그러나 SPR 원리를 이용한 시험법은 적은 양의 시료를 가지고, 실시간으로 결합반응을 관찰할 수 있다는 장점이 있다. 이는 초기 스크리닝의 효율 및 정확도를 높일 수 있고 신약개발 및 생산시 중요한 정보인 해리속도 상수 등을 정확하게 산출할 수 있는 방법이다.

즉, SPR 시험법은 표지 없이 분자상호간의 작용을 확인할 수 있는 획기적인 시험법으로서, Ligand-Analyte 결합에 의한 생물학적 작용기전을 반영하는 역가시험으로 이미, 미국 FDA에서는 독감 백신에 대하여 기존의 SRID(single radial immunodiffusion) 역가시험법에서 SPR을 이용한 역가시험법으로 대체 타당성을 보기 위한 연구결과를 발표했다. 또한 2015년 8월에는 미국 USP에서 면역학적 시험법 일반정보 중의 하나로서 SPR 시험법을 수재하였다 (USP 1105 Immunological Test Methods(Genral Information), Surface Plasmon Resonance).

따라서, 이와 같은 항체의약품 품질평가 시험법 개발 동향을 반영하여 식약처에서도 자체연구사업을 통해 SPR 원리 활용 항체의약품 품질평가 시험법에 대한 연구를 수행한 바 있다.

많은 항체의약품들 중에서, 특히 류머티즘 관절염 적응증 제품은 전체 바이오의약품 중 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 이들은 주로 TNF- $\alpha$  (Tumor

necrosis factor- $\alpha$ ), IL-6, IL-17 등 관절염증 원인 인자를 타겟으로 하는 항체의약품이 주를 이루고 있다. 이중에서도 자가 면역 질환에 항체가 가장 큰 효과를 거둘 수 있으며, 질환 원인과약이 쉽기 때문에 신약 및 바이오시밀러 개발 단계에 있어 신약 개발 성공률이 높을 것으로 예상되는 TNF- $\alpha$ 를 항원으로 하는 항체의약품이 대부분이다. 따라서 이 TNF- $\alpha$ 를 항원으로 하는 항체의약품에 대하여 SPR 시험법을 개발하였다.

또한, 항체의약품의 항원 특이적인 결합을 갖는 Fab 부분과 더불어 Fc 부분은 그 효능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ADCC 방법으로 하여금 면역 세포 및 물질들의 면역 반응을 증대시킬 수 있으며, 또한 Fc부분의 mannose glycosylation으로 하여금 항체 자체의 stability를 높여줌으로써 항체의약품의 체내 잔류 시간을 늘려주는 것으로 알려져 있다. Fc $\gamma$ RIIIa와의 결합력 측정하기 위한 항체의약품의 특성분석, 품질평가 시험법도 개발하였다.

이에 본 시험정보집을 통해 식약처 자체연구사업의 결과로 개발된 ‘TNF $\alpha$ 에 특이적인 항체의약품에 대한 SPR 시험법’과 ‘Fc $\gamma$ RIIIa를 사용한 항체의약품의 SPR 시험법’을 소개하고자 한다.



### 3.2. TNF $\alpha$ 에 특이적인 항체에 대한 SPR 시험법

1. 목적 : 이 시험법은 TNF- $\alpha$  항원을 이용하여 항체의약품의 품질을 측정하는 SPR 시험법이다.

2. 적용범위 : 항 TNF- $\alpha$  항체의약품(Golimumab, Infliximab 등)의 품질 평가 시험

#### 3. 재료

##### 3.1 시약

※동등이상의 시약을 사용할 수 있다.

3.1.1 HBS-EP buffer (GE, #BR-1001-88)

3.1.2 10 mM Sodium Acetate pH 5.0 (GE, BR-1003-51)

3.1.3 10 mM Glycine pH 1.5 (GE, BR-1003-54)

3.1.4 Maintenance kit (GE, BR-1006-66)

3.1.5 Amine coupling kit (GE, BR-1000-50)

3.1.6 Recombinant Human TNF- $\alpha$  (R&D system, 210-TA/CF)

##### 3.2 장비 및 도구

※동등이상의 시약을 사용할 수 있다.

3.2.1 Biacore 3000 또는 그 이상

3.2.2 Amicon Ultra-0.5, 100 kDa Device (Millipore, #510096)

3.2.3 Series S sensor chip CM5 (GE, BR-1000-12)

3.2.4 원심분리기

#### 4. 시험방법

##### 4.1 시료의 준비

- 4.1.1 분석할 시료는 HBS-EP 완충액으로 10배 희석한다.
- 4.1.2 희석한 시료를 Amicon Ultra 100kDa device에 가하고 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 14000 x g에서 10분간 원심 분리한다.
- 4.1.3 여과 후 남은 용액에 HBS-EP 완충액을 넣어 최대 부피로 맞추고 4.1.2를 반복한다.
- 4.1.4 Filter device를 뒤집어 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 1000 x g에서 2분간 원심 분리하여 시료를 회수한다.  
(시료의 희석액이 baseline에 영향을 미치지 않는다면 이 과정은 생략할 수 있다.)
- 4.1.5 시료는 HBS-EP 완충액을 Blank로 하여 280, 320nm에서 각각 흡광도를 측정하고 단백질의 농도를 결정한다.

## 4.2 Chip 표면처리

- 4.2.1 Dextran layer를 가진 CM5 chip을 SPR 장비에 장착한다.
- 4.2.2 HBS-EP 완충액을 펌프라인에 연결하고 prime을 3회 실시하여 평형화시킨다.
- 4.2.3 70%(w/w) Glycerol 로 normalization을 수행하여 chip 표면을 안정화시킨다.
- 4.2.4 Run sensorgram을 통해 RU값을 0으로 지정한다.
- 4.2.5 120  $\mu$ L of NHS x 2개, 120  $\mu$ L of EDC x 2개, 빈튜브 x 2개, 75  $\mu$ L of Ethanolamine x 3개를 준비한다.
- 4.2.6 목표로 하는 리간드 (TNF- $\alpha$ )를 10mM Sodium Acetate pH 5.0 용액을 이용하여 1  $\mu$ g/ml의 농도로 희석한다.
- 4.2.7 Immobilization 마법사를 통해 Fc (1, 2), (3, 4)중 라인을 선택한다.
- 4.2.8 NHS/EDC amine coupling 조건을 유속 5  $\mu$ l/min, 7분간 흘려주는 조건을 선택한다.

4.2.9 리간드 붙이는 조건을 RU값 50을 선택한다.

4.2.10 Auto sampler rack에 해당되는 튜브들을 깨끗이 씻어주고 마법사를 실행시킨다.

4.2.11 자동으로 NHS/EDC amine coupling을 통해 표면을 활성화시키고, 리간드가 해당 RU가 도달하게끔 immobilization 시켜준다. 그리고 Etanolamine이 주입되어 Blocking이 이루어진다. 해당 과정이 끝나면 standby 상태로 장비가 대기하게 된다.

#### 4.3 결합친화력 측정

4.3.1 HBS-EP 완충액을 펌프라인에 연결하고 Chip의 온도를 25℃로 설정한다.

4.3.2 검체(Golimumab 혹은 Infliximab)은 HBS-BP 완충액을 이용하여 10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.123, 0.041, 0 nM 농도로 희석하여 준비한다.

4.3.3 Kinetic 마법사를 통해 유속 10  $\mu$ l/min의 조건에서 주입시간은 4 min, 해리시간은 10 min으로 설정한다.

4.3.4 Regeneration 조건은 10 mM of Glycine pH 1.5을 준비한다.

4.3.5 리간드를 붙여 놓은 flow cell (FC) 라인을 지정하고 각 검체명과 위치를 입력한 후 분석을 시작한다.

#### 5. 결과 분석 및 허용 기준

1) 아래 식과 같이 계산하여 상대적인 결합친화도를 구한다.

$$\text{상대적인 결합친화도 (\%)} = \text{표준품의 } KD / \text{검체의 } KD \times 100$$

2) 표준품 및 검체의 허용기준

① 각 실험 (duplicate)내, 농도 7 point 범위의 농도 응답성:

(x축- analyte 농도, y축-  $K_{eq}$  값),  $R^2$  값은 0.97 이상이어야 한다.

② Surface response level의 변화는 10% 미만이어야 한다.

③ duplicate, 3 반복 시험하여 얻은 KD 값의 CV가 20 % 미만이어야 한다.

duplicate, 3 반복 시험하여 얻은  $R_{max}$  값의 CV가 20 % 미만이어야 한다.

④  $\chi^2$  값은 10.0 이하이어야 한다.

⑤ SPR 시험법에 따라 시험할 때 검체의 결합 친화도는 표준품의 65% ~ 130%이어야 한다

### 3.3. FcγRIIIa를 사용한 항체의약품의 SPR 시험법

1. 목적 : 이 시험법은 Fc γRIIIa를 사용하여 SPR 원리를 이용한 항체의약품의 품질을 측정하는 시험법이다.

2. 적용범위 : 항체의약품의 역가시험

3. 재료

#### 3.1 시약

※동등이상의 시약을 사용할 수 있다.

3.1.1 HBS-EP buffer (GE, #BR-1001-88)

3.1.2 Sodium Acetate 5.0 (GE, BR-1003-51)

3.1.3 NaOH 50 (GE, BR-1003-58)

3.1.4 Glycine 1.5 (GE, BR-1003-54)

3.1.5 Glycine 2.0 (GE, BR-1003-55)

3.1.6 Maintenance kit (GE, BR-1006-66)

3.1.7 Amine coupling kit (GE, BR-1000-50)

3.1.8 Recombinant Human Fc gamma receptor (R&D system, 4325-FC-050)

#### 3.2 장비 및 도구

※동등이상의 시약을 사용할 수 있다.

3.2.1 Biacore 3000 또는 그 이상

3.2.2 Amicon Ultra-0.5, 100kDa Device (Millipore, #510096)

3.2.3 Series S sensor chip CM5 (GE, BR-1000-12)

3.2.4 원심분리기

#### 4. 시험방법

##### 4.1 시료의 준비

4.1.1 분석할 시료는 HBS-EP 완충액으로 10배 희석한다.

4.1.2 희석한 시료를 Amicon Ultra 100kDa device에 가하고 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 14000 x g에서 10분간 원심 분리한다.

4.1.3 여과 후 남은 용액에 HBS-EP 완충액을 넣어 최대 부피로 맞추고 4.1.2를 반복한다.

4.1.4 Filter device를 뒤집어 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 1000 x g에서 2분간 원심 분리하여 시료를 회수한다.

(시료의 희석액이 baseline에 영향을 미치지 않는다면 이 과정은 생략할 수 있다.)

4.1.5 시료는 HBS-EP 완충액을 Blank로 하여 280, 320nm에서 각각 흡광도를 측정하고 단백질의 농도를 결정한다.

##### 4.2 Chip 표면처리

4.2.1 Dextran layer를 가진 CM5 chip을 SPR 장비에 장착한다.

4.2.2 HBS-EP 완충액을 펌프라인에 연결하고 prime을 3회 실시하여 평형화시킨다.

4.2.3 70%(w/w) Glycerol 로 normalization을 수행하여 chip 표면을 안정화하고 유속 5ul/min 조건에서 NHS/EDC 용액을 7분간 흘려주며 표면을 활성화 시킨다.

4.2.4 목표로 하는 Ligand를 Sodium Acetate pH 5.0 용액을 이용하여 1ug/ml의 농도로 희석한다.

4.2.5 ligand 주입 전의 RU값을 0으로 하고 5ul을 흘려 준 다음 RU 값의 변화를 확인하여 원하는 RU값에 도달할 때 까지 반복하여 흘려준다.

4.2.6 Ethanolamine 용액을 7분간 흘려 blocking을 실시한다.

4.2.7 Blocking 후 RU(B) 값과 NHS/EDC 주입 후 RU 값(A)의 차가 100 - 120 정도가 되도록 chip을 준비한다.

### 4.3 결합친화력 측정

4.3.1 HBS-EP 완충액을 펌프라인에 연결하고 Chip의 온도를 25℃로 설정한다.

4.3.2 시료는 HBS-BP 완충액을 이용하여 10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.123, 0.041, 0  $\mu$ M 농도로 희석하여 준비한다.

4.3.3 유속 10ul/min의 조건에서 주입시간은 4 min, 해리시간은 10min으로 한다.

4.3.4 Ligand가 심어져 있는 flow cell 라인을 지정하고 각 시료의 이름과 위치를 입력한 후 분석을 시작한다.

4.3.5 Regeneration 조건은 시료에 따라 다르며 적절하게 설정한다.

## 5. 결과 분석 및 허용 기준

1) 아래 식과 같이 계산하여 상대적인 결합친화도를 구한다.

$$\text{상대적인 결합친화도}(\%) = \text{표준품의 } KD / \text{검체의 } KD \times 100$$

2) 표준품 및 검체의 허용기준

① 각 실험 (duplicate)내, 농도 7 point 범위의 농도 응답성:

(x축- analyte 농도, y축- Keq값), R2 값은 0.97 이상이어야 한다.

② Surface response level의 변화는 10% 미만이어야 한다.

③ duplicate, 3 반복 시험하여 얻은 KD 값의 CV가 20 % 미만이어야 한다.

duplicate, 3 반복 시험하여 얻은 Rmax 값의 CV가 20 % 미만이어야 한다.

④ Chi2 값은 10.0 이하이어야 한다.

⑤ SPR 시험법에 따라 시험할 때 검체의 결합 친화도는 표준품의 65% ~ 130%이어야 한다



## 4. 재조합 단클론항체의약품 품질분석 시험법

### [USP129. Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies]

#### 4.1. Introduction

본 일반 정보에서는 IgG 이소 타입(예를 들어, IgG 및 IgG2)의 마우스, 키메라 및 인간화 된 단클론 항체에 대한 분석 시험법에 대하여 소개한다. 각 서브클래스는 아미노산 서열과 이황화 결합의 수에 차이를 보이며, 때에 따라 각 서브클래스의 특성 분석이 요구된다. 여기에서는 치료 및 예방적 목적을 위한 항체의약품과 생체 진단을 위한 단클론 항체에 대하여 논한다. 이는 합법적 규제 기관에 의해 결정된 요구사항에 적합한 의약품 제조 중에 시약으로 사용되는 단클론 항체에는 적용되지 않는다.

혈청 또는 혈장에서 자연적으로 유래한 다클론 항체는 면역계 일부로서 많은 다양한 표적에 결합할 수 있다. 이와 반대로, 사람에게 적용되는 치료 용도의 단클론 항체는 세포의 단일 클론에서 유래하며, 표적에 대한 특이성을 가지는 면역 글로불린(혹은 면역 글로불린의 단편) 제제이다. 단클론 항체의 약품은 수용성 항원과 결합하여 중화시킬 수 있으며, 작용 메커니즘(MOA)는 종종 관련 수용체와 해당하는 리간드와의 결합을 차단하는 것에 관련된다. 또는 단클론 항체의약품은 세포에 붙어있는 항원을 인지하여 결합하며, MOA의 한 영역으로 Fc(결정화 조각) 매개 효능성을 통한 면역 체계와 관계된다. 하나의 제한된 결합 특이성을 가진 단클론항체는 단일 특이적인 반면에, 재조합방법으로 재설계된 두-결합 특이성을 가진 단클론항체는 다른 두 대상(예: 항원)에 결합할 수 있다. IgG형 단클론 항체는 약 150KD의 분자량을 갖고 있으며, 각 분자는 각각 약 50 및 25KD의 분자량을 갖는 이 폴리펩티드 중사슬과 경사슬로 구성된다. 항체는 개략적으로 이황화 결합으로 연결된 Y자로 대표되며, Y자의 각 팔부분은 Fab 도메인으로 불리며, Y자의 줄기는 Fc 도메인으로 불린다. 단클론 항체는 당백질로서, 각 중사슬에 위치하는 Fc 부분에서 당사슬을 가지며, 물질에 따라 Fab 도메인에 추가적인 당사슬을 가지고 있기도 하다.

단클론 항체의 특이성은 Fab 부분에 있는 항원 결합 부위에 의해 결정된다. Fc 도메인은 보체-의존 세포독성과 항체-의존 세포 독성과 같은 특정 서브클래스에 따라 적용되는 항체 효능성과 관련돼 있는 수용체 결합 부위를 포함하고 있다. FcRN(neonatal Fc receptor)에 붙음으로써 발생하는 약동학(Pharmacokinetic) 효과 역시 이 도메인에 존재한다.

단클론 항체는 마스터 세포 은행과 작업용 세포 은행으로 시드 로트 시스템(seed lot system)을 사용한 세포 배양을 통해 생산된다. 수확 후, 정제 단계는 제품 및 공정 관련 불순물이 허용 가능한 수준으로 감소하였는지 확인한다.

현재 허가된 단클론 항체의약품은 이펙터 세포(effector cells)의 활성화, 세포 괴사, 가교(cross-link)로 유도된 세포사멸, 몇몇 표적에 대한 대항작용(antagonism), 항체에 대한 작용물질(agonist)에 관련된 항체들을 포함한다.

여기에서는 크기배제고성능액체크로마토그래피(SE-HPLC), 모세관 전기영동, 그리고 당사슬 분석에 의한 순도 평가를 포함하고, 이들 각각에 대한 검증 절차를 소개한다.

본문 내용은 주로 IgG형 단클론 항체에 대한 것이나, 기재된 시험법의 원리는 IgM 또는 다른 이소 타입 항체, 항체 단편, 및 Fc-융합 단백질 등 다른 분자에도 적용될 수 있다. 활성 물질이 결합한 항체일 경우, 이 같은 시험은 변형 또는 결합 전에 정제된 항체에서 수행될 수 있다.

대체시험법 절차는 정확성, 감도, 정밀성, 선택성 혹은 자동처리 또는 컴퓨터화된 데이터의 저장 및 특별한 상황에서의 관점에서 장점을 기대할 수 있을 때 사용되어 질 수도 있다. 어떠한 대체 절차 혹은 시험법은 [Validation of Compendial Procedure<1225>]에 따라 검증되고, 이전의 결과와 동등하거나 월등한 결과를 보여야 한다.

## 4.2. 크기배제 고성능액체크로마토그래피

SE-HPLC는 고분자량 중(HMWS, 응집체) 및 단량체의 측정에는 건고하지만, 저분자량 중(LMWS 단편)의 정량화는 연구되는 단클론항체에 따라 매우 다를 수 있다. LMWS는 모세관 SDS-전기영동(CE-SDS)에 의해 더 잘 정량화된다.

**이동상:** 이염기성 인산칼륨 10.5g, 인산 이수소칼륨 19.1g 및 물 1L당 염화칼륨 18.6g을 혼합하여 준비한다. pH  $6.2 \pm 0.1$ 로 맞추어 준다.  $0.45\mu\text{m}$ 로 여과시킨다.

**시스템 적합성 용액:** 한 바이알당 이동상  $200\mu\text{L}$ 의 양으로 재용해 시킨  $10\text{mg/mL}$  USP 단일 클론 IgG의 시스템 적합성 표준액(RS) 용액을 준비한다. 재용해 시킨 시스템 적합성 용액은 24시간 이내에 사용해야 하며, 즉시 사용하지 않을 경우  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다.

**시스템 적합성 공시험액:** 이동상

**시료 용액:** 희석이 필요한 경우 이동상에  $10\text{mg/mL}$ 의 시료를 희석한다. 마찬가지로, 공시험액 또한 같은 재형 버퍼를 이용하고 이동상에 희석하여 준비한다.

**크로마토그래피 시스템** (크로마토그래피(621)<sup>1)</sup>, 시스템 적합성 참조)

- 모드: LC
- 검출기: UV 280 nm
- 칼럼: 7.8-mm X 30-cm;  $5\text{-}\mu\text{m}$  packing L59
- 온도
  - 칼럼: 상온(주변온도)
  - 자동 시료 주입기:  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$  유지
- 유속:  $0.5\text{mL/분}$
- 주입량:  $20\mu\text{L}$
- 실행 시간: 30분

## 시스템 적합성

1) USP 621 Chromatography 항을 의미함

- **샘플:** 시스템 적합성 용액

[참고-대략적인 중합체, 이량체, 단량체에 대한 각각의 유지시간은 12, 15, 18, 22분이다.]

- **적합성 요구 사항**

**크로마토그램:** USP 인증서에 나온 것과 같이, USP 단클론 IgG의 시스템 적합성 표준액에 대한 시스템 적합성 용액 크로마토그램은 전형적인 크로마토그램과 일치해야 한다.

**크로마토그램의 유사성:** 검액의 주입 전후에 브라케팅으로 주입한 시스템 적합성 표준액의 크로마토그램의 프로파일은 각각 일치하여야 하며, USP 단클론 IgG의 시스템 적합성 표준액에 대한 USP 인증서에 나온 것과도 일치해야 한다. 전형적인 크로마토그램에서는 이름 지어진 모든 피크들은 반드시 존재하면서 잘 구분되어야 하며, 시스템 적합성 용액 크로마토그램에서 같은 용출 순서이어야 한다.

**양적 기준:** 브라케팅 시스템 적합성 용액 주입에서는 다음과 같은 양적 기준을 충족시켜야 한다.

시스템적합성 용액의 HMWS 퍼센트의 피크 면적이 0.4%~0.67%이어야 한다.

시스템적합성 용액의 주 피크의 백분율 피크 면적은 99.1%~99.6%이어야 한다.

시스템 적합성 용액에 범람의 %의 피크 면적은 0.2% 이하(NMT)이어야 한다.

**분석**

- **샘플:** 공 시험액, 시스템 적합성 용액 및 검액

검액 주입 전후에는 최소한 한 번 이상의 시스템 적합성 용액을 주입해야 한다(브라케팅). 최종 시스템 적합성 용액 주입 전에 마지막으로 공시험액을 주입하는 순서를 포함해야 한다.

- **계산:** 적절한 전자 적분기 또는 컴퓨터 시스템을 사용하여, 브라케팅한 시스템 적합성 용액 주입을 분석한다. 공시험액에서 나온 피크의 적분은 제외한다. 주피크 전에 용출된 단백질 관련 피크는 HMWS로 분류한다. 주피크후에 용출된 것은 LMWS로 분류한다. HMWS, 주피크, LMWS의 피크 면적 비율을 보고한다.

### 4.3. 모세관 SDS 전기 영동(환원, 비환원 조건)

모세관 도데실 황산나트륨(CE-SDS) 전기영동은 비당화물, 반쪽 항체 및 항체 단편과 같은 제품 관련 불순물의 정량 측정에 대한 분석 방법이며, 안정성 분석에도 유용하다. SDS로 변성시킨 뒤, 비환원 조건과 환원 조건에서 각각, 완전한 항체의 분석과 경사슬 및 중사슬(LC 및 HC 각각)의 분석이 가능한 방법이다.

[참고- 각 항체의 안정성에 따라 샘플 준비에서 약간의 차이가 필요할 수 있다. 70° C에서 15분 처리시 특정 항체의 단편화 혹은 이황화 결합을 손상시킨다면, 그에 따라 처리 시간을 조정한다.]

**SDS 샘플 완충액:** 100mM Tris-HCl, pH 8.95±0.05, 1%(w/w) SDS를 함유하는 용액을 준비한다.

**SDS 겔 완충액:** 0.2%(w/w) SDS 포함하는 pH 8.0의 완충액과 물질 체(molecular sieve) 역할을 하는 적합한 친수성 중합체

**알킬화 솔루션:** 물에 녹인 250mM 아세트아미드(Iodoacetamide)을 사용하기 바로 전에 준비한다.

**시스템 적합성 용액:** 최종 농도를 4mg/mL로 하기 위해 물 0.5mL로 단클론 IgG의 USP 시스템 적합성 표준품 1 바이알을 녹인다.

**내부 표준 용액:** 0.5%(w/w) SDS와 0.2%(w/v) 아지드화 나트륨을 함유하는 물에 녹인 5mg/mL의 10KD의 내부 표준 물질.

**비환원 시스템적합성 용액:** 내부 표준 용액 4μL과 시스템 적합성 용액 25μL를 섞는다. 알킬화 용액의 5μL와 SDS 샘플 버퍼 66μL를 섞는다. 시스템 적합성 용액 및 내부 표준 용액 혼합물에 SDS 샘플 버퍼와 알킬화 혼합물을 넣는다. 완전히 혼합하고, 15분 동안 70°C에서 혼합물을 가열한다. 3분 동안 상온에서 식힌 뒤, 1분 동안 300xg로 원심 분리한 다음, 100μL를 자동 시료 주입기 튜브에 옮긴다.

**환원 시스템 적합성 용액:** 시스템 적합성 용액 25μL과 66μL SDS샘플 완충액을 섞는다. 내부 표준 용액 4μL과 β-머캅토에탄올 5μL를 넣어준다.

완전히 혼합하고, 15분 동안 70℃에서 혼합물을 가열한다. 3분 동안 상온에서 식힌 뒤, 1분 동안 300xg로 원심 분리한 다음, 자동 시료 주입기 튜브에 100  $\mu$ L를 옮긴다.

**공시협액:** 물 45  $\mu$ L와 50  $\mu$ L SDS 샘플 버퍼를 섞는다. 내부 표준 용액 4  $\mu$ L와 환원조건을 위한  $\beta$ -머캅토에탄올 5  $\mu$ L 혹은 비환원 조건을 위한 알킬화 용액 5  $\mu$ L을 넣는다. 완전히 혼합하고, 15분 동안 70℃에서 혼합물을 가열한다. 3분 동안 상온에서 식힌 뒤, 1분 동안 300xg로 원심 분리한 다음, 100  $\mu$ L를 자동 시료 주입기 튜브에 옮긴다.

**비환원 샘플 용액:** 최종 부피가 95  $\mu$ L가 되도록 50-95  $\mu$ L의 SDS 샘플 버퍼로 샘플을 100  $\mu$ g으로 희석한다. 내부 표준 용액 4  $\mu$ L과 시스템적합성 용액 25  $\mu$ L를 섞는다. 알킬화 용액의 5  $\mu$ L와 SDS 샘플 버퍼 66  $\mu$ L를 섞는다. 시스템 적합성 용액 및 내부 표준 용액 혼합물에 SDS 샘플 버퍼와 알킬화 혼합물을 넣는다. 완전히 혼합하고, 15분 동안 70℃에서 혼합물을 가열한다. 3분 동안 상온에서 식힌 뒤, 1분 동안 300xg로 원심 분리한 다음, 100  $\mu$ L를 자동 시료 주입기 튜브에 옮긴다.

**환원 샘플 용액:** 최종 부피가 95  $\mu$ L가 되도록 50-95  $\mu$ L의 SDS 샘플 버퍼로 샘플을 100  $\mu$ g로 희석한다. 내부 표준 용액 4  $\mu$ L와  $\beta$ -머캅토에탄올 5  $\mu$ L를 넣어준다. 완전히 혼합하고, 15분 동안 70℃에서 혼합물을 가열한다. 3분 동안 상온에서 식힌 뒤, 1분 동안 300xg로 원심 분리한 다음, 자동 시료 주입기 튜브에 100  $\mu$ L를 옮긴다.

## 기기조건

- 모드: CE-SDS
- 검출기: UV 또는 Diode array 220nm
- 모세관: 전처리와 사전충전 단계의 각 실행단계 사이에서 요구된다. 융합 실리카 모세관(내경 50  $\mu$ m)은 유효 길이가 20cm가 되도록 30cm 길이로 자른다. 아래에 언급한 전처리와 사전충전은 각 실행단계마다 필요하다.
- 모세관 전처리: 0.1N 수산화나트륨을 이용하여 70psi로 3분간 씻어주고, 0.1N 염산을 이용하여 70psi로 1분간 씻는다. 그다음 물로 70psi로 1분간

씻는다.

- 모세관의 사전 충전: SDS 젤 버퍼로 70 psi에서 10분 동안 행군다.
- 샘플 주입: Electrokinetic 주입, 5.0kV 역상 극성으로 20초간 실시
- 전압 분리

비환원 조건: 15 kV 역상 극성으로 40분간 실시

환원 조건: 15 kV 역상 극성으로 40분간 실시

- 온도

샘플 보관: 약 25℃

모세관: 약 25℃

## 시스템 적합성

### 환원 조건에 대한 적합성 요구 사항

- **샘플:** 환원 시스템 적합성 용액
- **일렉트로페로그램:** 환원 시스템 적합성 용액의 일렉트로페로그램은 USP 단클론 IgG에 시스템 적합성 표준품에 대해, USP 인증서에 제시된 전형적인 일렉트로페로그램과 일치하여야 한다.
- **분리도:** 중사슬과 비당화 중사슬의 주 피크가 명확하게 식별 될 수 있어야 한다. 비당화 중사슬과 중사슬 사이의 해상도는 1.2(NLT) 이상이다.
- **전체 중사슬의 비당화의 비율:** 계산을 위해 시간 보정된 피크 면적을 사용한다(모세관 전기영동 Capillary Electrophoresis<1053> 정량 참조, 필수적이지 않지만 도움이 될 수 있다). 비당화된 중사슬 비율을 모든 중사슬의 합에 당화된 중사슬의 상대량을 나눈 후 100을 곱해 구한다. 시스템 적합성 용액에서 전체 중사슬의 비당화 비율은 0.75%~1.34%의 범위 내에 있어야한다.

### 비환원 조건에 대한 적합성 요구 사항

- **샘플:** 비환원 시스템 적합성 용액
- **일렉트로페로그램:** 비환원 시스템 적합성 용액의 일렉트로페로그램은 USP 단클론 IgG에 시스템 적합성 표준품에 대한 USP 인증서에



제시된 전형적인 일렉트로페로그램과 일치하여야 한다.

- **분리도:** IgG 메인 피크가 명확하게 식별될 수 있어야 한다. IgG 주피크와 조각 1(F1) 사이의 해상도는 1.3 이상이다.
- **메인 피크의 양:** 내부 표준 피크와 모든 시스템 피크를 제외하고, IgG 메인 피크의 시간 보정 피크 면적을 모든 시간 보정 피크의 합으로 나눈 뒤 100을 곱하여 상대 메인 피크 양을 구한다. 시스템 적합성 용액의 IgG 메인 피크의 상대량은 61.4%~86.4%의 범위 내에 있어야 한다.
- **상대 표준 편차:** 브라케팅 공시험에서 내부 표준물질의 이동에 대한 상대 표준 편차는 2% 이하이어야 한다. 내부 표준물질 이동 이후에 어떠한 다른 피크도 검출되지 않아야 한다.

## 분석

- **샘플:** 공시험액, 시스템 적합성 용액 및 샘플 용액

[참고-기기 조건에 따라, 모세관에 적용되는 필드와 샘플 주입을 위한 조건은 시스템 적합성을 만족할 수 있도록 조정될 수 있다.]

필드 강도를 각 버퍼 보관 통의 전해질로서 SDS 젤 버퍼를 이용하여 500V/cm로 40분 동안(역상 극성) 필드 강도를 적용한다. 20초의 역상 극성을 주어 샘플을 전기 분리하고, 5.0kV에서 electrokinetic 주입하여 음극에서 모세관으로 주입한다. 220nm에서 일렉트로페로그램을 기록한다. 0.1N 수산화나트륨을 이용하여 70psi로 3분간 씻어주고, 0.1N 염산을 이용하여 70psi로 1분간 씻는다. 그다음 물로 70psi로 1분간 씻는다. 주입은 적어도 2회 실시한다.

내부 표준 피크 이후의 모든 피크의 이동의 시간 보정된 피크 면적을 계산한다.

- **환원 조건:** 내부 표준액 후에 보이는 모든 시간 보정된 피크 면적의 합으로 경사슬과 비당화된 중사슬 그리고 중사슬의 시간 보정된 피크

면적의 합을 나눠주고 100을 곱하여 검액 피크의 상대량을 계산한다.

- **비환원 조건:** 내부 표준액 후에 보이는 모든 시간 보정된 피크 면적의 합으로 IgG 메인 피크의 시간 보정된 피크 면적의 합을 나눠주고 100을 곱하여 검액 피크의 상대량을 계산한다.

#### 4.4. 올리고당 분석- 단클론 항체의 N-linked 올리고당 분석

단클론 항체의약품의 규격에 올리고당 분석을 포함시키는 것은 과학적 그리고 리스크 기반 접근 방식을 사용하여 평가되어야하고, 제품별로 정의되어야 한다. 이 경우 당 프로파일링 혹은 개별 구조의 정량에 아래의 분석방법이 하나 또는 복수로 사용될 수 있다. 다른 한편으로 당 분리방법, 표지방법(라벨링), 검출방법 등에서 차이가 나는 검증된 다른 분석법도 사용될 수 있다.

[참고- 단클론항체의 Fc 및 Fab의 N-linked 당화의 경우, 추가적인 검액 전처리 과정(예: papain과 같은 효소 처리)는 분석 전에 도메인을 분리하여, 각각의 당화 부위의 정보를 얻을 수 있다. 시험을 위한 모든 추가적인 검액 준비 단계는 검증이 필요하다.]

[참고- 합격 기준 수치는 개별 글리칸(glycan) 구조에 대해 정의될 수 있다. 가능하다면, 합격 기준은 제품의 역대의(historical) 배치 데이터의 적정 범위를 고려한 제품 특이적인 정보로부터 도출된다.]

#### 방법 A: 레이저 유도 형광 검출과 모세관 전기 영동

- 실행 완충액: 트리에탄올아민(TEA) 1.492g과 물 80mL 중의 글리세롤 10g을 용해한 100mM 트리에탄올 아민(TEA) 및 10% 글리세롤을 준비한다. 1N 염산을 이용하여 pH 7.5로 조정된 뒤, 물로 최종 부피 100mL로 희석한다.
- 샘플 버퍼: 러닝 버퍼 1mL를 물 9mL로 희석.
- 효소 반응 완충액: 50mM 인산 나트륨, pH 7.5
- APTS 라벨링 시약: 15% 초산 48  $\mu$ L에 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate(APTS) 5mg을 녹이고 섞는다.
- 검액: 검체 50  $\mu$ g에 Petide N-Glycosidase F(PNGase F)(5Unit/mL) 2  $\mu$ L을 넣고 효소 반응 버퍼로 50  $\mu$ L이 되도록 맞추어준다.

[참고-PNGase F의 Unit 정의는 제조사마다 다르다. PNGase F는 검체에서 N-linked 당을 완전히 제거하는데 필요하다.]

37℃에서 18시간 동안 처리한다. 10,000 분자량 분리(MWCO)를 이용하여 원심 분리하여 떨어진 올리고당을 분리한다. 원심 진공 증발기를 이용하여 떨어진 올리고당을 말린다. APTS 라벨링 시약 2  $\mu$ L과 1M sodium cyanoborohydride 2  $\mu$ L을 넣어 말린 올리고당에 넣는다. 55℃에서 90분 동안 처리한다. 반응 혼합물을 해소하기 위해 물 46  $\mu$ L를 추가한다. 샘플버퍼 95  $\mu$ L에 APTS 라벨링 검체의 5  $\mu$ L을 넣는다.

- **시스템 적합성 용액:** 물 50  $\mu$ L에 당사슬 적합 표준품(10  $\mu$ g)을 재현탁하고, 볼텍스 믹서로 혼합한다. 초소형 원심분리기에 당사슬 표준품(1  $\mu$ g) 5  $\mu$ L를 추가한다. 상온에서 원심 진공 증착법을 사용하여 당사슬 표준품을 건조한다. 각 표준품에 sodium cyanoborohydride 2  $\mu$ L를 추가한다. 각 표준에 APTS 라벨링 시약의 2  $\mu$ L를 추가한다. 표준품을 섞고 55℃에서 90분 동안 처리하기 전에, 액체를 침전시키기 위해서 짧게 원심 분리한다. 반응 혼합물을 해소하기 위해 물 46  $\mu$ L를 추가한다. 표준품은 5주까지 -20℃에서 저장 될 수 있다.

#### - 기기 조건

**모드:** CE

**검출기:** 레이저 유도 형광 검출기(Ex 488nm, Em 520nm)

**모세관:** 총길이 50cm, 분리 길이 40cm인 내경 50  $\mu$ m의 융합 실리카 모세관

**시료 주입:** 10초 hydrodynamic injection

**분리 전압:** 22kV으로 50분간

**샘플:** 시료 용액 및 시스템 적합성 용액

**분석:** 결과 일렉트로페로그램에 피크를 통합, 그리고 제품 관련 주요 글리칸 구조의 상대 비율 시간 보정 피크 면적을 보고한다. 적합한 제품의 표준품과의 비교가 수행될 수 있다.

## 방법 B: 액체 크로마토그래피의 형광 검출

- 효소 반응 완충액: 100mM 인산 나트륨, pH 7.5
- 라벨링 완충액: 아세트산 나트륨 삼수화물 800mg과 붕산 400mg을 메탄올 10mL에 용해함으로, 메탄올에 용해한 8%(w/v) 아세트산 나트륨 삼수화물 및 4%(w/v) 붕산 용액 준비한다.
- 라벨 시약 솔루션: 라벨링 버퍼에 안트라닐산(2-AA; anthranilic acid)의 100mg/mL 원액을 준비한다. 50mg/mL 2-AA 5M sodium cyanoborohydride이 포함된 메탄올에 1M sodium cyanoborohydride을 같은 부피로 섞어 최종 라벨링 시약 용액을 만든다.[참고-차광]
- 용액 A: 50mM 암모늄 포름산, pH 4.4
- 용액 B: 아세토니트릴
- 이동상: 표 1을 참조.

시간 (min)	용액 A (%)	용액 B (%)
0.0	32.5	67.5
48.0	42.5	57.5
49.0	100	0
53.0	100	0
54.0	32.5	67.5
60.0	32.5	67.5

표 1

- 샘플 준비: 시료 80  $\mu$ g을 소형 원심분리기 튜브에 옮긴다. PNGase F 3  $\mu$ L (2.5Units/mL)를 추가한다.

[참고-PNGase F의 Unit의 정의는 제조사마다 다르다. PNGase F는 샘플에서 N-linked 당을 완전히 떼어내는데 필요하다.]

효소 반응 버퍼 14  $\mu$ L를 추가한다. 전체 부피의 70  $\mu$ L에 물을 추가하고 37°C에서 18시간 동안 처리한다. 새로 제조한 라벨링 시약 용액

70  $\mu$ L를 추가하고, 흡 후드에서 70°C 에서 2시간 동안 처리한다. 식혀 준 뒤, 각 샘플에 50% 메탄올 60  $\mu$ L를 추가한다. 혼합한 후 원심 분리 한다. 상층액 140  $\mu$ L를 제거하고 원심분리기에 옮긴다. 상층액이 든 튜브에 아세토니트릴 500  $\mu$ L를 추가한다. 과량의 라벨링 시약을 제거하기 위해 친수성 상호작용 고상 추출 카트리지(hydrophilic-interaction solid-phase extraction cartridge)에 샘플을 로드한다. 카트리지를 95% 아세토니트릴(약 10mL)로 세척한다. 20% 아세토니트릴 0.5mL로 카트리지에서 표지된 글리칸을 용출시킨다. 아세토니트릴로 용출 받은 시료를 1:1로 희석한다.

#### - 크로마토그래피 시스템

(크로마토그래피<621><sup>2)</sup>, 시스템 적합성을 참조)

모드: LC

칼럼: 4.6-mm  $\times$  15-cm; 3-mm packing L68

검출기: 형광(Ex360nm Em420nm)

칼럼 온도: 30° C 유지

유속: 0.8mL/분

주입 부피: 50  $\mu$ L

#### 분석

##### - 검액: 검액 준비

얻어진 크로마토그램의 피크를 통합하고 검액 관련 주요 글리칸 구조의 상대적 백분율 피크 면적을 보고한다. 적절한 제품의 표준품과 비교를 수행할 수 있다.

##### - 올리고당 및 분석 시알산 분석

[참고- 표준 곡선 또는 시료 질량의 범위는 단클론 항체의 시알산 함량에 의존적인 변형을 해야 할 수 있다.]

##### - 용액 A: 물 2L에 50%(w/w) 수산화 나트륨 수용액 10.4mL을 희석해

2) USP 621 Chromatography 항을 의미함

100mM 수산화 나트륨을 준비한다.

[참고 - 가능한 한 적은 용존산소를 포함하고 있는 높은 저항도(18M $\Omega$ -cm 또는 그 이상)를 갖는 높은 품질의 물을 사용한다.]

- **용액 B:** 물 800mL에 아세트산 나트륨 82.0g을 첨가하여 1M 아세트산 나트륨 용액을 만들고 50%(w/w) 수산화 나트륨 용액 5.2mL를 넣어 1000mL의 최종 부피의 물로 희석하여, 100mM 수산화 나트륨 1M 아세트산 나트륨 용액을 만든다.
- **이동상:** 표 2를 참조

시간 (min)	용액 A (%)	용액 B (%)
0.0	93	7
10.0	70	30
11.0	70	30
12.0	93	7
15.0	93	7

표 2

- **표준 원액:** 20mM 나트륨 아세트산 완충액(pH 5.2)에서 USP N-아세틸 뉴라민산 (NeuAc) 및 0.2mM 미국 약전(USP)의 N-글리코 뉴라민산 표준액(NeuGc)을 준비한다. 0.02mM 표준 원액을 얻기 위해, 20mM 아세트산 나트륨 완충액의 적절한 부피로 희석한다.
- **내부 표준 원액:** 0.1mM 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid(KDN) 용액을 20mM 아세트산 나트륨 용액에 준비하여 pH 5.2로 조정.
- **표준 용액 :** 표 3에 표시된 대로 준비한다.

표준액	농도 ( $\mu\text{M}$ )	표준 원액( $\mu\text{L}$ )	20mM 아세트산 나트륨, pH 5.2 ( $\mu\text{L}$ )	내부 표준 원액 ( $\mu\text{L}$ )
1	10	250	235	15
2	5	125	360	15
3	4	100	385	15
4	2	50	435	15
5	1	25	460	15
6	0.4	10	475	15

표 3

- 시스템 적합성 용액:  $3\mu\text{M}$  NeuAc, NeuGc, KDN를 20mM 아세트산 나트륨에 준비하여 pH 5.2로 조정.
- 샘플 용액: 0.5mg에 상응하는 부피의 테스트 샘플을 원심분리 튜브로 옮긴다. 전체 부피  $475\mu\text{L}$ 가 되도록 20mM 아세트산 버퍼로 희석해 주고, pH 5.2로 조정한다. 테스트 스트립으로 pH를 확인하고,  $10\mu\text{L}$ 의 neuraminidase( $10\text{-}6\text{Unit/mL}$ )를 넣는다.  $37^\circ\text{C}$ 에서 5시간 동안 처리한다. 내부 표준 원액의  $15\mu\text{L}$ 을 추가한다. 볼텍스로 혼합하고, 오토 샘플러 바이알에 샘플을 옮겨준다.

[참고-샘플 준비에서의 약간의 조정은 테스트 샘플과 효소의 품질에 따라 필요하다. 이에 따라 처리 시간을 조정한다.]

### 크로마토그래피 시스템

(크로마토그래피 Chromatography<621><sup>3)</sup>, 시스템 적합성을 참조한다.)

방법: LC

- 검출기: 금 전극을 이용한 통합 전류 측정 감지기
- 칼럼: 4-mm × 25-cm; 10-mm packing L46
- 유속: 1mL/분
- 주입 부피:  $50\mu\text{L}$

3) USP 621 Chromatography 항을 의미함



- 전기 화학 검출기 다음 파형을 사용(표 4 참조).

시간 (s)	전압 (V)	통합
0.00	+ 0.10	-
0.20	+ 0.10	시작
0.40	+ 0.10	종료
0.41	-2.00	-
0.42	-2.00	-
0.43	+ 0.60	-
0.44	-0.10	-
0.50	-0.10	-

표 4

## 분석

- **샘플:** 표준 용액, 시스템 적합성 용액 및 시료 용액  
NeuAc, NeuGc 및 내부 표준 원액의 각각의 크로마토그램에서의 피크를 통합한다.

표준 용액의 경우, 다음과 같은 내부 표준 원액의 피크 면적을 비교하여 NeuAc와 NeuGc 피크 영역을 평가한다.

NeuAc 피크의 면적/내부 표준원액 피크  $\times$  100

NeuGc 피크의 면적/내부 표준원액 피크  $\times$  100

NeuAc 및 NeuGc의 표준 곡선을 생성한다. 표준 곡선을 사용하여 내부 표준 원액 및 내부 표준 원액 NeuGc의 상대 백분율과 NeuAc의 상대 백분율을 비교하여, 샘플 용액의 NeuAc와 NeuGc를 정량한다. 시료의 농도에 의해 결정의 NeuAc와 NeuGc의 농도를 나누고 같은 몰비를 보고한다(예: 테스트 샘플의 분자당 NeuAc와 NeuGc의 수).

## 5. 맺음말

항체의약품은 그 생산의 어려움과 구조의 복잡성, 효능 효과를 나타내는 기전의 다양성 등으로 인하여 가장 복잡한 의약품들 중의 하나이다. 이러한 특징 때문에 바이오의약품들 중에서도 특히 항체의약품은 이전부터 개별적인 특성분석 및 품질평가가 이루어지고 있었으나, 2016년 현재 40여 종의 항체의약품이 국내에서도 승인되어 있을 정도로 연구 개발 및 심사의 경험이 축적되었다고 할 수 있다. 따라서 본 시험정보집에서는 항체의약품에 일반적으로 적용할 수 있는 품질평가 가이드와 시험법을 소개하였다.

항체의약품의 특성상 항체 단백질 생산단계에서 많은 조작이 가능하고, 구조가 복잡하기 때문에 품질 및 생물학적 활성 및 특성 확인이 가능한 시험법이 매우 다양하다. 특히 항체 단백질은 생물학적 성질이 매우 다양하고, 특징 하나하나가 제품의 임상적 효과와 연결되는 부분이 많기 때문에 생물학적 활성을 측정하기 위해서는 단백질의 다양한 특성들을 신중히 고려하여 설정하여야 한다. 따라서 항체의 생물학적 활성(역가)을 측정하기 위해선 여러 가지 특징을 고려할 수 있는 시험법의 개발 및 선정이 매우 중요하다고 할 수 있다. 본 시험정보집에서 소개하고 있는 시험법은 식약처 연구사업을 통하여 타당성이 검증되었고, USP129에서 소개된 시험법은 우리가 국제공동 연구에 참여하여 개발된 시험법이므로, 현재의 항체의약품 품질분석에서 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

항체의약품의 품질평가와 관련하여 참고할만한 국외 자료로는 2012년 일본에서 발간한 [항체의약품의 품질평가를 위한 가이드스, 抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス]가 있으며 번역본은 식약처의 ‘바이오IT 플랫폼’ 홈페이지([www.bpis.kr.kr](http://www.bpis.kr.kr))에서 확인할 수 있다.

덧붙여, WHO에서도 항체의약품의 바이오시밀러 개발 및 제조, 허가등을 염두에 둔 가이드라인을 제정 중에 있으며, 이 문서에서는 항체의약품의 제

조/품질/비임상 및 임상 전 단계에 걸친 허가 가이드라인을 제시할 것으로 예상된다.

본 시험정보집에서는 항체의약품 품질평가지 고려사항 외에 식약처 자체 연구사업으로 개발한 표면플라즈몬공명원리를 이용하여 분자상호작용을 측정함으로써 항체의 역가를 확인할 있는 시험법과 2016년 미국 약전위원회에서 공표한 단클론항체의약품에 대한 품질평가 시험법 3가지를 설명하였다. 본 시험정보집이 연구개발자, 시험자, 심사자의 항체의약품 품질관리 및 시험법에 대한 이해를 증진하는데 기여할 수 있기를 기대한다.

## 6. 참고문헌

- [1] Analysis of biomolecules using surface plasmon (Willander M, 2009)
- [2] Novel antibody-independent receptor-binding SPR-based assay for rapid measurement of influenza vaccine potency. *Vaccine* 32(2014). 2188-2197
- [3] Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors. *Journal of Chromatography B*, 878, 149-153 (2010)
- [4] Capture molecules preconditioned for kinetic analysis of high-affinity antigen-antibody complex in Biacore A100. *Analytical Biochemistry*, 424(2012). 168-177
- [5] Exploring the Dynamic Range of the Kinetic Exclusion Assay in Characterizing Antigen-Antibody Interactions. *PLoS One*, 7, Issue 4, e36261(2012)
- [6] Surface plasmon resonance for vaccine design and efficacy studies: recent applications and future trends. *Expert Reviews Vaccines*(2010), 9(6):645-664.
- [7] Surface plasmon resonance detection of blood coagulation and platelet adhesion under venous and arterial shear conditions. *Biosensors & bioelectronics*(2007), 23:261-268.
- [8] Surface Plasmon Resonance Studies of the Direct Interaction Between a Drug/Intestinal Brush Border Membrane. *Pharmaceutical Research*(2004), 21:1233-1239.
- [9] Methods to measure the binding of therapeutic monoclonal antibodies to the human Fc receptor FcγRIII (CD16) using real time kinetic analysis and flow cytometry (A. Harrison et al, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012)
- [10] Interaction between Bevacizumab and Murine VEGF-A: A reassessment (L. Yu et al, *IOVS*, 2007)
- [11] Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo (J. Lowe et al, *Experimental Eye Research*, 2007)
- [12] Comparing ELISA and Surface plasmon resonance for assessing clinical

- immunogenicity of panitumumab (James A. Lofgren et al, 2007)
- [13] Characterization of golimumab. a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor  $\alpha$  (D. shearly et al, mAbs, 2010)
- [14] Comparisons of affinities avidities, and complement activation of adalimumab. infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clinical Immunology*(2009), 131, 308 - 316
- [15] Development of biosensor-based SPR technology for biological quantification and quality control of pharmaceutical proteins. (H. Wang et al, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009)
- [16] Biacore surface matrix effects on the binding kinetics and affinity of an antigen/antibody complex (Andrw W. Drake, 2012)
- [17] Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *Journal of experimental medicine*(2013), 210:1695-1710.
- [18] Comparison of competitive Ligand-binding assay and bioassay formats for the measurement of neutralizing antibodies to protein therapeutics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(2011), 351-358
- [19] Label-free assessment of high-affinity antibody-antigen binding constants. Comparison of bioassay, SPR, and PEIA-ellipsometry. *Journal of Immunological Methods*, 365(2011), 50-57
- [20] Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors. (Yasmina noubia abdiche, 2008)
- [21] Comparative surface plasmon resonance and enzyme-linked immunosorbent assay characterization of a monoclonal antibody with N-acyl homoserine lactones. *Analytica Chimica Acta*, 683(2010), 113-118
- [22] Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *Journal of Immunological Methods*, 352(2010), 13-22

- [23] Development of biosensor-based SPR technology for biological quantification and quality control of pharmaceutical proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(2009), 1026–1029
- [24] Improvement of drug tolerance in immunogenicity testing by acid treatment on Biacore. *Journal of Immunological Methods*, 334(2008), 29–36
- [25] Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors. *Protein Science*(2008), 17:1326–1335.
- [26] Surface plasmon resonance in protein–membrane interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*(2006), 141:169–178.
- [27] Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*(2007), 43:1744–1750.
- [28] Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. *Sensors*(2010), 10:7323–7346.
- [29] Off-rate screening for selection of high-affinity anti-drug antibodies. *Analytical Biochemistry*(2013), 441:208–213

## 7. 별첨자료

# 2016

U.S. Pharmacopeia  
National Formulary

---

# USP 39 NF 34

**USP 39 Published General Chapter  
<129> Analytical Procedures for Recombinant  
Therapeutic Monoclonal Antibodies**

The official version can be found in the *USP-NF*.  
The *USP-NF* is subscription based publication.

For more information on how to access the *USP-NF* [click here](#).

**Official: May, 2016**

**Add the following:**

## **129 ANALYTICAL PROCEDURES FOR RECOMBINANT THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES**

### **INTRODUCTION**

This chapter provides analytical procedures for murine, chimeric, and humanized IgG isotype monoclonal antibodies and subtypes (e.g., IgG1 and IgG2). Subclasses show differences in amino acid sequence and in the number of disulfide bonds, and in some cases they require subclass-specific analysis. This chapter applies to monoclonal antibodies for therapeutic and prophylactic use and for use as in vivo diagnostics. It does not apply to monoclonal antibodies used as reagents in the manufacture of medicinal products, for which applicable requirements are determined by the appropriate regulatory agency.

Naturally occurring polyclonal antibodies in serum or plasma can bind to many different targets as part of the immune system. In contrast, therapeutic monoclonal antibodies for human use are preparations of an immunoglobulin (or a fragment of an immunoglobulin) that have specificity for a target and are derived from a single clone of cells. Therapeutic monoclonal antibodies can bind to and neutralize soluble antigens, and their mechanism of action (MOA) often involves blocking of the ligand from binding to its cognate receptor. Alternatively, therapeutic monoclonal antibodies can recognize and bind to cell-bound antigens and in these cases may also engage the immune system through Fc (crystallizable fragment) mediated effector functions as part of their MOA. Monoclonal antibodies that have a single defined binding specificity are monospecific, whereas recombinantly engineered bispecific monoclonal antibodies can bind to two different targets (e.g., antigens). IgG-type monoclonal antibodies have a molecular weight of approximately 150 kD. Each molecule consists of two heavy and two light polypeptide chains that have a molecular weight of approximately 50 and 25 kD, respectively. Antibodies can



be schematically represented as a Y joined by disulfide bridges, where each arm of the Y is called the Fab domain, and the stem of the Y is called the Fc domain. Monoclonal antibodies are glycoproteins that have a glycosylation site in the Fc portion located on each of the heavy chains and have possible additional glycosylation sites in the Fab domain, depending on the molecule.

The specificity of a monoclonal antibody is based on its antigen binding site, which is located in the Fab part of the molecule.

The Fc domain contains receptor binding sites that are associated with antibody effector functions that have subclass-specific applications such as antibody-dependent cellular cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity. Pharmacokinetic effects via binding to the neonatal Fc receptor also are present in this domain.

Monoclonal antibodies are produced in cell culture using a seed lot system with master and working cell banks. After harvest, purification steps ensure that product- and process-related impurities are reduced to an acceptable level.

Currently licensed monoclonal antibody therapeutics include those involved in the activation of effector cells, cell killing, cross-linked induced apoptosis, antagonism against several targets, and agonist antibodies.

This chapter includes purity assessments by size-exclusion chromatography (SE-HPLC), capillary electrophoresis, and analysis of oligosaccharides, and it provides validated procedures for each of these.

Although this chapter is focused on IgG-type monoclonal antibodies, the principles of the tests included can apply to other related molecules, such as IgM or other isotype antibodies, antibody fragments, and Fc-fusion proteins. When the active substance is a conjugated antibody, such tests can be performed on the purified antibody before modification or conjugation.

Alternative methods and/or procedures may be used if they provide advantages in terms of accuracy, sensitivity, precision, selectivity, or adaptability to automation or computerized data reduction, or in other special circumstances. Such alternative procedures and methods shall be validated as described in *Validation of Compendial Procedures* (1225) and must be shown to give equivalent or better results.

#### • SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY

Although SE-HPLC is robust for measuring monomer and high-molecular-weight species (HMWS, aggregates), the quantitation of low-molecular-weight species (LMWS, fragments) can be highly variable depending on the mAb studied. The measurement of LMWS is better quantitated by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS).

**Mobile phase:** Prepare by mixing 10.5 g of dibasic potassium phosphate, 19.1 g of monobasic potassium phosphate, and 18.6 g of potassium chloride per L of water. Verify that the pH is  $6.2 \pm 0.1$ . Pass through a membrane filter of  $\leq 0.45\text{-}\mu\text{m}$  or smaller pore size.

**System suitability solution:** Prepare a 10-mg/mL USP Monoclonal IgG System Suitability RS solution in *Mobile phase* by reconstituting the contents of one vial with 200  $\mu\text{L}$  of *Mobile phase*. Reconstituted *System suitability solution* should be used within 24 h after reconstitution, and should be stored at  $2^{\circ}\text{--}8^{\circ}$  if not used immediately.

**System suitability blank:** Use *Mobile phase*.

**Sample solution:** Dilute the sample to 10 mg/mL in *Mobile phase* if dilution is required. Similarly, a blank should be prepared using an equivalent dilution of formulation buffer in *Mobile phase*.

#### Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV 280 nm

**Column:** 7.8-mm  $\times$  30-cm; 5- $\mu\text{m}$  packing L59

#### Temperatures

**Column:** Ambient

**Autosampler:** Maintain at  $2^{\circ}\text{--}8^{\circ}$

**Flow rate:** 0.5 mL/min

**Injection volume:** 20  $\mu\text{L}$

**Run time:** 30 min

#### System suitability

**Sample:** *System suitability solution*

[NOTE—Approximate retention times for polymer, dimer, monomer, and LMWS are 12, 15, 18, and 22 min, respectively.]

#### Suitability requirements

**Chromatogram:** The chromatogram of the *System suitability solution* is consistent with the typical chromatogram as illustrated in the USP Certificate for USP Monoclonal IgG System Suitability RS.

**Chromatogram similarity:** The chromatographic profiles of *System suitability solution* injections that bracket injections of *Sample solutions* in a sample set are consistent with each other and with the typical chromatographic profile as illustrated in the USP Certificate for USP Monoclonal IgG System Suitability RS. All named peaks in the typical chromatogram must be present, be well-resolved, and in the same elution order as that in the *System suitability solution* chromatograms.

**Quantitative criteria:** Bracketing *System suitability solution* injections must meet the following quantitative criteria:

The percent peak area of the HMWS in the *System suitability solution* must be 0.4%–0.67%.

The percent peak area of the main peak in the *System suitability solution* must be 99.1%–99.6%.

The percent peak area of the LMWS in the *System suitability solution* must be NMT 0.2%.

**Analysis****Samples:** *Blank*, *System suitability solution*, and *Sample solution*

Injectations of the *Sample solution* should be bracketed minimally with single injections of the *System suitability solution*. An injection of a *Blank* should be included as the final injection before the final *System suitability solution* injection.

**Calculations:** Using a suitable electronic integrator or computer system, analyze the bracketing *System suitability solution* injections. Exclude from integration any peaks that are present in the *Blank*. Protein-related peaks that elute before the main peak are classified as HMWS; those that elute after the main peak are classified as LMWS. Report the percentage of peak areas for the HMWS, main peak, and LMWS.

- CAPILLARY SDS ELECTROPHORESIS (REDUCED AND NONREDUCED)**

Capillary sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) electrophoresis is a sensitive, analytical method for quantitative estimation of product-related impurities such as nonglycosylated molecules, half antibodies, and fragments, and thus is also useful as a stability-indicating assay. After denaturation with SDS, the method allows the analysis of the complete antibody under nonreducing conditions, and the analysis of light and heavy chains (LC and HC, respectively) under reducing conditions.

[NOTE—Slight variations in sample preparation may be necessary depending on the stability of the individual antibody. If 15 min incubation at 70° leads to fragmentation or cleavage of disulfide bonds for a particular antibody sample, adjust the incubation time accordingly.]

**SDS sample buffer:** Prepare a solution containing 100 mM tris-hydrochloride (tris-HCl), a pH of 8.95 ± 0.05, and 1% (w/w) SDS.

**SDS gel buffer:** Buffer at a pH of 8.0 containing 0.2% (w/w) SDS and an appropriate hydrophilic polymer acting as a molecular sieve<sup>1</sup>

**Alkylation solution:** 250 mM iodoacetamide in water prepared immediately before use

**System suitability solution:** Reconstitute 1 vial of USP Monoclonal IgG System Suitability RS with 0.5 mL of *Water for Injection* (WFI) to a final concentration of 4 mg/mL.

**Internal standard solution:** 5 mg/mL of 10 kDa internal standard<sup>2</sup> in water containing 0.5% (w/w) SDS and 0.2% (w/v) sodium azide

**Nonreduced system suitability solution:** Mix 25 µL of the *System suitability solution* with 4 µL of *Internal standard solution*. Mix 66 µL of *SDS sample buffer* with 5 µL of the *Alkylation solution*. Add the *SDS sample buffer* and *Alkylation solution* mixture to the *System suitability solution* and *Internal standard solution* mixture. Mix thoroughly, and heat the mixture at 70° for 15 min. Allow to cool for 3 min at room temperature, centrifuge at 300 × g for 1 min, and transfer 100 µL into autosampler vials.

**Reduced system suitability solution:** Mix 25 µL of the *System suitability solution* with 66 µL of *SDS sample buffer*. Add 4 µL of *Internal standard solution* and 5 µL of neat β-mercaptoethanol. Mix thoroughly, and heat the mixture at 70° for 15 min. Allow to cool for 3 min at room temperature, centrifuge at 300 × g for 1 min, and transfer 100 µL into autosampler vials.

**Blank solution:** Mix 45 µL of water with 50 µL of *SDS sample buffer*. Add 4 µL of *Internal standard solution* and 5 µL of neat β-mercaptoethanol for the reduced conditions or 5 µL of *Alkylation solution* for the nonreducing conditions. Mix thoroughly, and heat the mixture at 70° for 15 min. Allow to cool for 3 min at room temperature, centrifuge at 300 × g for 1 min, and transfer 100 µL into autosampler vials.

**Nonreduced sample solution:** Dilute 100 µg of the sample to be tested with 50–95 µL of *SDS sample buffer* to give a final volume of 95 µL. Add 4 µL of *Internal standard solution* and 5 µL of the *Alkylation solution*. Mix thoroughly, and heat the mixture at 70° for 15 min. Allow to cool for 3 min at room temperature, centrifuge at 300 × g for 1 min, and transfer 100 µL into autosampler vials.

**Reduced sample solution:** Dilute 100 µg of the sample to be tested with 50–95 µL of *SDS sample buffer* to give a final volume of 95 µL. Add 4 µL of *Internal standard solution* and 5 µL of neat β-mercaptoethanol. Mix thoroughly, and heat the mixture at 70° for 15 min. Allow to cool for 3 min at room temperature, centrifuge at 300 × g for 1 min, and transfer 100 µL into autosampler vials.

**Instrumental conditions**

**Mode:** CE-SDS

**Detector:** UV or diode array 220 nm

**Capillary:** Fused-silica capillary (i.d. 50 µm) cut to a total length of 30 cm with an effective length of 20 cm.<sup>3</sup> The following preconditioning and prefilling steps are required between each run.

**Preconditioning of the capillary:** Rinse for 3 min at 70 psi with 0.1 N sodium hydroxide followed by 0.1 N hydrochloric acid for 1 min at 70 psi, and water for 1 min at 70 psi.

**Prefilling of capillary:** Rinse for 10 min at 70 psi with *SDS gel buffer*.

**Sample injection:** Electrokinetic injection, 5.0 kV reversed polarity for 20 s

**Voltage separation**

**Nonreduced conditions:** Run time 40 min at 15 kV, reversed polarity

**Reduced conditions:** Run time 40 min at 15 kV, reversed polarity

<sup>1</sup> Available from Beckman Coulter as a component of test kit, catalog number A10663, or a suitable equivalent.

<sup>2</sup> Available from Beckman Coulter as a component of test kit, catalog number A10663, or a suitable equivalent.

<sup>3</sup> Beckman Coulter catalog number 338472 or equivalent.

**Temperatures****Sample storage:** Approximately 25°**Capillary:** Approximately 25°**System suitability****Suitability requirements for reducing conditions****Sample:** *Reduced system suitability solution***Electropherogram:** The electropherogram of the *Reduced system suitability solution* is consistent with the typical electropherogram illustrated in the USP Certificate for USP Monoclonal IgG System Suitability RS.**Resolution:** The main peak of the heavy chain and the peak of the nonglycosylated heavy chain can be clearly identified. The resolution between the nonglycosylated heavy chain and the intact heavy chain is NLT 1.2.**Ratio of nonglycosylated to total heavy chain:** Use time-corrected peak areas (see *Capillary Electrophoresis* (1053), *Quantification*, which may be a helpful, but not mandatory resource) for calculation. Calculate the ratio of nonglycosylated to total heavy chain by dividing the relative amount of nonglycosylated heavy chain by the sum of all heavy chains, and multiply by 100. The ratio of nonglycosylated to total heavy chain in the *System suitability solution* should be within the limits of 0.75%–1.34%.**Suitability requirements for nonreducing conditions****Sample:** *Nonreduced system suitability solution***Electropherogram:** The electropherogram of the *Nonreduced system suitability solution* is consistent with the typical electropherogram illustrated in the USP Certificate for USP Monoclonal IgG System Suitability RS.**Resolution:** The IgG main peak can be clearly identified. The resolution between the IgG main peak and Fragment 1 (F1) is NLT 1.3.**Amount of main peak:** Calculate the relative amount of the main peak by dividing the sum of the time-corrected peak area of the main IgG peaks by the sum of all time-corrected peak areas excluding internal standard peaks and all system peaks, and multiply by 100. The relative amount of the main IgG peak of the *System suitability solution* should be within the limits of 61.4%–86.4%.**Relative standard deviation:** NMT 2% for the migration of the internal standard in the bracketing *Blank solution*. No other peaks migrating after the internal standard are detectable.**Analysis****Samples:** *Blank solution, System suitability solution, and Sample solution*[NOTE—Based on instrument requirements, the field applied across the capillary and the conditions for the sample injection may be adjusted to achieve *System suitability*.] Apply a field strength of 500 V/cm (reversed polarity) for 40 min, using the *SDS gel buffer* as the electrolyte in both buffer reservoirs. Electrophorese the samples, using a 20-s reversed polarity and electrokinetic injection at 5.0 kV, into the anodic end of the capillary, and record the electropherograms at 220 nm. Rinse for 3 min at 70 psi with 0.1 N sodium hydroxide followed by 0.1 N hydrochloric acid for 1 min at 70 psi, and water for 1 min at 70 psi. Inject at least in duplicate.

Calculate the time-corrected peak areas of all peaks migrating after the internal standard peak.

**Reduced conditions:** Calculate the relative amount of product peak by dividing the sum of the time-corrected peak areas of heavy chain, nonglycosylated heavy chain, and light chain by the sum of all time-corrected peak areas for peaks appearing after the internal standard, and multiply by 100.**Nonreduced conditions:** Calculate the relative amount of product peak by dividing the sum of the time-corrected peak area of the main IgG peak by the sum of all time-corrected peak areas for peaks appearing after the internal standard, and multiply by 100.**• OLIGOSACCHARIDE ANALYSIS—ANALYSIS OF N-LINKED OLIGOSACCHARIDES OF MONOCLONAL ANTIBODIES**The inclusion of oligosaccharide analysis in a specification for a monoclonal antibody drug substance should be assessed using science- and risk-based approaches and should be defined on a product-specific basis. If applicable, one or more of the following analytical approaches can be employed for oligosaccharide profiling or quantitation of individual structures. Other validated methods that are suitable for determination of *N*-linked glycosylation utilizing different modes of separation, labeling, or detection can be used. [NOTE—For monoclonal antibodies with both Fc and Fab *N*-linked oligosaccharides, additional sample preparation procedures (e.g., treatment with the enzyme papain) can be employed to separate the domains before analyses so that information at individual glycosylation sites can be obtained. All additional sample preparation steps for the method require validation.]

[NOTE—Numerical acceptance criteria may be defined for individual glycan structures. If applicable, acceptance criteria must be derived from product-specific information taking into consideration a suitable range of historical batch data.]

**Method A: Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection****Run buffer:** Prepare 100 mM triethanolamine (TEA) and 10% glycerol at pH 7.5 by dissolving 1.492 g of TEA and 10 g of glycerol in 80 mL of water. Adjust with 1 N hydrochloric acid to a pH of 7.5, and dilute with water to a final volume of 100 mL.**Sample buffer:** Dilute 1 mL of *Run buffer* with 9 mL of water.**Enzyme reaction buffer:** Prepare 50 mM sodium phosphate, pH 7.5.**APTS labeling reagent:** Dissolve 5 mg of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) in 48  $\mu$ L of 15% acetic acid, and mix.

**Sample solution:** Add 2  $\mu\text{L}$  of peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) (5 units/mL) to 50  $\mu\text{g}$  of sample, and adjust with *Enzyme reaction buffer* to a volume of 50  $\mu\text{L}$ . [NOTE—The unit definition for PNGase F may differ among commercial sources. It may be necessary to experimentally determine the appropriate quantity of PNGase F required for the complete release of *N*-linked oligosaccharides in the sample.] Incubate at 37° for 18 h. Separate released oligosaccharides by centrifugation using a 10,000 molecular-weight-cut-off (MWCO) centrifugal filter. Dry the released oligosaccharides in a centrifugal vacuum evaporator to dryness. Add 2  $\mu\text{L}$  of *APTS labeling reagent* and 2  $\mu\text{L}$  of 1 M sodium cyanoborohydride to the dried oligosaccharides. Incubate at 55° for 90 min. Add 46  $\mu\text{L}$  of water to quench the reaction and mixture. Add 5  $\mu\text{L}$  of APTS-labeled sample to 95  $\mu\text{L}$  of *Sample buffer*.

**System suitability solution:** Resuspend each of the suitable glycan standards (10  $\mu\text{g}$ ) in 50  $\mu\text{L}$  of water, and mix on a vortex mixer. Add 5  $\mu\text{L}$  of a suitable glycan standard (1  $\mu\text{g}$ ) to a microcentrifuge tube. Dry the glycan standard using centrifugal vacuum evaporation at ambient temperature. Add 2  $\mu\text{L}$  of sodium cyanoborohydride to each standard. Add 2  $\mu\text{L}$  of the *APTS labeling reagent* to each standard. Mix the standards on a vortex mixer, and centrifuge briefly to settle the liquid before incubation at 55° for 90 min. Quench the reaction by the addition of 46  $\mu\text{L}$  of water to each standard. Standards can be stored at –20° up to 5 weeks.

#### Instrumental conditions

**Mode:** CE

**Detector:** Laser-induced fluorescence detector (488-nm excitation wavelength; 520-nm emission wavelength)

**Capillary:** 50- $\mu\text{m}$  inner diameter bare fused-silica capillary with 50-cm total length and 40-cm separation length

**Sample injection:** 10-s hydrodynamic injection

**Separation voltage:** 22kV for 50 min

**Samples:** *Sample solution* and *System suitability solution*

**Analysis:** Integrate peaks in the resultant electropherogram, and report relative percentage time-corrected peak areas of major glycan structures relevant to the product. Comparison to suitable product-specific reference standard can be performed.

#### Method B: Liquid chromatography with fluorescence detection

**Enzyme reaction buffer:** Prepare 100 mM sodium phosphate, a pH of 7.5.

**Labeling buffer:** Prepare 8% (w/v) sodium acetate trihydrate and 4% (w/v) boric acid solutions in methanol by dissolving 800 mg of sodium acetate trihydrate and 400 mg of boric acid in 10 mL of methanol.

**Labeling reagent solution:** Prepare a 100-mg/mL stock solution of anthranilic acid (2-AA) in *Labeling buffer*. Mix with an equal volume of 1 M sodium cyanoborohydride in methanol for a final *Labeling reagent solution* containing 50 mg/mL of 2-AA and 0.5 M sodium cyanoborohydride. [NOTE—Keep the labeling reagent protected from light.]

**Solution A:** Prepare 50 mM ammonium formate, pH 4.4.

**Solution B:** Acetonitrile

**Mobile phase:** See *Table 1*.

**Table 1**

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0.0	32.5	67.5
48.0	42.5	57.5
49.0	100	0
53.0	100	0
54.0	32.5	67.5
60.0	32.5	67.5

**Sample preparation:** Transfer 80  $\mu\text{g}$  of test sample to a microcentrifuge tube. Add 3  $\mu\text{L}$  of PNGase F (2.5 units/mL). [NOTE—The unit definition for PNGase F may differ among commercial sources. It may be necessary to experimentally determine the appropriate quantity of PNGase F required for complete release of *N*-linked oligosaccharides in the sample.] Add 14  $\mu\text{L}$  of *Enzyme reaction buffer*. Add water to 70  $\mu\text{L}$  of total volume, and incubate at 37° for 18 h. Add 70  $\mu\text{L}$  of freshly prepared *Labeling reagent solution*, and incubate at 70° for 2 h in a fume hood. Allow to cool, and add 60  $\mu\text{L}$  of 50% methanol to each sample. Mix, then centrifuge. Remove 140  $\mu\text{L}$  of the supernatant, and transfer to a microcentrifuge tube. Add 500  $\mu\text{L}$  of acetonitrile to the supernatant-containing tube. Load the sample onto a hydrophilic-interaction solid-phase extraction cartridge to remove excess labeling reagent. Wash the cartridge with 95% acetonitrile (approximately 10 mL). Elute the labeled glycans from the cartridge with 0.5 mL of 20% acetonitrile. Dilute the eluate 1:1 with acetonitrile.

#### Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

**Mode:** LC

**Column:** 4.6-mm  $\times$  15-cm; 3- $\mu\text{m}$  packing L68

**Detector:** Fluorescence (360-nm excitation wavelength; 420-nm emission wavelength)

**Column temperature:** Maintain column at 30°.

**Flow rate:** 0.8 mL/min**Injection volume:** 50  $\mu$ L**Analysis****Sample:** *Sample preparation*

Integrate peaks in the resulting chromatogram, and report relative percentage peak areas of major glycan structures relevant to the product. Comparison to a suitable product-specific reference standard can be performed.

• **OLIGOSACCHARIDE ANALYSIS—SIALIC ACID ANALYSIS**

[NOTE—The range of the standard curve or the mass of test sample may require modification depending on the sialic acid content of the monoclonal antibody.]

**Solution A:** Prepare 100 mM sodium hydroxide by diluting 10.4 mL of a 50% (w/w) sodium hydroxide solution in 2 L of water. [NOTE—Use high-quality water of high resistivity (18 M $\Omega$ -cm or better) that contains as little dissolved oxygen as possible.]**Solution B:** Prepare a solution containing 100 mM sodium hydroxide and 1 M sodium acetate by adding 82.0 g of sodium acetate to 800 mL of water. Add 5.2 mL of 50% (w/w) sodium hydroxide, and dilute with water to a final volume of 1000 mL.**Mobile phase:** See Table 2.**Table 2**

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0.0	93	7
10.0	70	30
11.0	70	30
12.0	93	7
15.0	93	7

**Standard stock solution:** Prepare 0.2 mM solutions of USP N-Acetylneuraminic Acid (NeuAc) RS and USP N-Glycolylneuraminic Acid RS (NeuGc) in 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.2. Dilute an appropriate volume of this solution with 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, to obtain a 0.02 mM *Standard stock solution*.**Internal standard stock solution:** Prepare a 0.1 mM solution of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid (KDN) in 20 mM sodium acetate buffer, adjusted to a pH of 5.2.**Standard solutions:** Prepare as indicated in Table 3.**Table 3**

Standard	Concentration ( $\mu$ M)	Volume of Standard Stock Solution ( $\mu$ L)	Volume of 20 mM Sodium Acetate Buffer, pH 5.2 ( $\mu$ L)	Volume of Internal Standard Stock Solution ( $\mu$ L)
1	10	250	235	15
2	5	125	360	15
3	4	100	385	15
4	2	50	435	15
5	1	25	460	15
6	0.4	10	475	15

**System suitability solution:** Prepare 3  $\mu$ M solutions of NeuAc, NeuGc, and KDN in 20 mM sodium acetate buffer, adjusted to a pH of 5.2. Store the *System suitability solution* at  $-70^{\circ}$ .**Sample solution:** Pipet a volume of test sample equivalent to 0.5 mg into a microcentrifuge tube. Dilute with 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, to a total volume of 475  $\mu$ L. Confirm the pH with a test strip, and add 10  $\mu$ L of 10 milliunit/ $\mu$ L of neuraminidase. Incubate for 5 h at  $37^{\circ}$ . Add 15  $\mu$ L of *Internal standard stock solution*. Mix on a vortex mixer, and transfer the sample to an autosampler vial. [NOTE—A slight adjustment in sample preparation may be necessary depending on the test sample and the quality of the enzyme. Adjust the incubation time accordingly.]**Chromatographic system**(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)**Mode:** LC**Detector:** Integrated amperometric detector with gold electrode**Column:** 4-mm  $\times$  25-cm; 10- $\mu$ m packing L46**Flow rate:** 1 mL/min**Injection volume:** 50  $\mu$ L

Use the following waveform for the electrochemical detector (see Table 4).

**Table 4**

Time (s)	Potential (V)	Integration
0.00	+0.10	—
0.20	+0.10	Begin
0.40	+0.10	End
0.41	−2.00	—
0.42	−2.00	—
0.43	+0.60	—
0.44	−0.10	—
0.50	−0.10	—

**Analysis**

**Samples:** *Standard solutions, System suitability solution, and Sample solution*

Integrate the NeuAc, NeuGc, and *Internal standard stock solution* peaks in each chromatogram. For the *Standard solutions*, evaluate the NeuAc and NeuGc peak areas relative to the peak area of the *Internal standard stock solution* as follows.

Area of NeuAc peak/area of *Internal standard stock solution* peak × 100

Area of NeuGc peak/area of *Internal standard stock solution* peak × 100

Generate NeuAc and NeuGc standard curves. Quantify NeuAc and NeuGc in the *Sample solution* by comparison of the relative percent of NeuAc of the *Internal standard stock solution* and the relative percent of NeuGc of the *Internal standard stock solution*, using the standard curves.

Divide the determined NeuAc and NeuGc concentrations by the test sample concentration, and report as molar ratio (i.e., numbers of NeuAc and NeuGc per molecule of test sample).

▲ USP39

## (130) PROTEIN A QUALITY ATTRIBUTES

### Introduction

Protein A is coupled to a resin support in order to create protein A affinity chromatography media commonly used in the manufacturing of recombinant therapeutic monoclonal antibodies. Natural protein A is derived from *Staphylococcus aureus* and contains five homologous antibody binding regions and a C-terminal region for cell wall attachment. In addition to naturally derived protein A, recombinant material manufactured in *Escherichia coli*, as well as several engineered versions of the protein, also manufactured recombinantly, have entered the market place. When immobilized on a column, protein A provides a highly efficient and robust purification method for purifying antibodies at various scales. However, protein A ligand from the column can co-elute with the antibody during purification, an effect which is often referred to as protein A leaching. This tendency increases as the chromatography medium ages. Engineered versions of protein A may improve the pH tolerance of the medium, but do not eliminate leaching. It is the current regulatory expectation that leached protein A should be cleared during the purification of antibodies for human use, and manufacturing processes should be validated accordingly. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-based residuals testing is generally employed during process development and validation to assure the efficient removal of residual protein A during process steps following protein A affinity chromatography. In addition, the manufacturer should have a clear understanding and documentation of resin and ligand quality through raw materials qualification and column lifetime studies.

General Chapter (130) describes quality attributes of protein A ligands that are used in chromatography media for the manufacture of therapeutic monoclonal antibodies: Protein A; rProtein A; rProtein A, C-Cys; rProtein A, B4, C-Cys.

#### Change to read:

### Protein A

C<sub>1995</sub>H<sub>3163</sub>N<sub>597</sub>O<sub>697</sub>S<sub>3</sub>  
46,760

N-terminal Sequence AQHDEA

C-terminal Sequence IAADNK

Protein A is derived from *Staphylococcus aureus*. The structure is composed of a single polypeptide chain containing four IgG binding domains. With the exception of IgG<sub>3</sub>, all other human IgGs bind to protein A. Each molecule of Protein A is capable of binding two IgG molecules. It is manufactured as a bulk solution at a concentration of greater than 20 mg protein A per mL.

## 항체의약품의 품질평가 시험정보집

---

발 행 일 : 2017년 4월 27일

발 행 인 : 식품의약품안전평가원장 손여원

편 집 위 원 장 : 의료제품연구부장 서경원

편 집 위 원 : 첨단바이오제품과

안치영, 엄준호, 박기대, 백정희, 김호, 허지연

발 행 부 서 : 식품의약품안전평가원 첨단바이오제품과

---

연 락 처 : 식품의약품안전평가원 첨단바이오제품과

전 화 번 호 : 043) 719-4751~7

팩 스 번 호 : 043) 719-4750