

Agilent mAb-Glyco 칩 및 Mass Profiler Professional을 사용한 단일 클론 항체의 글리칸 집단 차이 분석

응용 자료

저자

Katherine M. Brenda,
Loredana Serafini
Gilead Sciences, Inc.
Foster City, CA USA

Rick Reisdorph
National Jewish Health
Denver, CO USA

Ning Tang
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA USA

개요

이 응용 자료에서는 서로 다른 성장 조건에서 생산된 단일 클론 항체(mAb)의 글리칸 집단을 분석합니다. Agilent mAb-Glyco 칩을 Agilent Accurate Mass Q-TOF LC/MS에 연결하여 사용하였습니다. mAb-Glyco 칩으로 다공성 graphitized carbon을 통해 유리된 글리칸 모이어티(moieties)를 인라인 농축 및 탈당화하였습니다. 글리칸은 Agilent 6530 Q-TOF LC/MS로 분석하였으며, 데이터는 먼저 Bioconfirm, PCDL (Personal Compound Database and Library) Manager 기능을 포함한 애질런트 MassHunter 소프트웨어에서 처리하였습니다. 그 다음, 결과 데이터를 Agilent MassHunter Profinder로 내보내 표적 재귀적 특징을 추출한 후(targeted recursive feature finding) 최종적으로 Mass Profiler Professional (MPP)을 사용하여 차이 분석을 수행하였습니다. MPP를 사용한 결과 데이터에서 패턴을 확인할 수 있었고, 이를 통해 시료를 그룹으로 묶어 서로 다른 성장 조건에서 생산된 mAb를 명확하게 구분할 수 있었습니다.



Agilent Technologies

소개

다당류 또는 글리칸은 다양한 생물학적 프로세스에서 중요한 역할을 합니다. 당단백질은 글리칸 모이어티(moieties)가 공유 결합되어 있는 단백질입니다. 최근에 항체 기반 치료법이 주목을 받으면서 이러한 치료제 분자의 글리칸 변형에 대한 연구는 그 특성을 규명하는데 중요한 부분이 되었습니다. 이러한 변형은 항체의 안정성, 구조, 생물학적 활성, 순환 반감기 및 적절한 작용인자 기능에 중요한 역할을 합니다. 글리칸 변형 패턴이 pH, 배지 및 성장 조건의 변화에 민감하다는 사실을 뒷받침하는 많은 자료가 있습니다. 이러한 파라미터는 궁극적으로 항체 기능에 영향을 미칠 수 있는 당화 범위, 글리칸의 분지도(branching) 및 시알릴화의 완전성에 영향을 미칠 수 있습니다.

Agilent mAb-Glyco 칩은 mAb의 당 집단 연구에 매우 편리한 도구입니다. 이 칩은 작동 방법이 간단하여 인라인 탈당화 및 글리칸 포획을 가능하게 만들며, 이로 인해 시료 전처리 및 처리 시간이 단축되므로 재현성을 향상시킵니다. 글리칸 집단에 대한 정보를 얻는 것은 비교적 간단합니다. 하지만 다운스트림 데이터 분석은 두 항체의 글리칸 집단을 비교할 수 있는 간단한 방법이나 데이터를 정제하여 단순한 문서로 만들어 주는 자동 기능이 없기 때문에 어려울 수 있습니다.

이 연구에서는 ELISA 방법에 의해 차이 결합이 나타나는 항체 글리칸 집단의 특성을 규명하고자 했습니다. 이 항체는 동일한 세포 유형으로 생산되었지만 서로 다른 조건에서 성장시켰습니다. 배지에서 배양한 하이브리도마(hybridoma, 혼성 세포) 세포로부터 한 세트의 항체를 수확하고 나머지 세트는 쥐에 주입한 후 복수액으로부터 수확하였습니다. 본 연구에서는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis의 Find by Feature 알고리즘으로 생성된 데이터를 단순화하고, 서로 다른 항체의 글리칸 집단 간의 차이를 검출할 수 있게 해줄 데이터를 어느 정도는 검토할 수 있는 방법을 찾고 있었습니다. 궁극적으로는, ELISA 방법으로 관측된 차이 결합을 설명할 수 있는 글리칸의 차이를 밝혀낼 수 있기를 바랐습니다. 데이터를 Agilent Mass Profiler Professional로 가져오면 모든 데이터 세트를 고려하여 편향되지 않은 방식으로 추세를 확인할 수 있다는 것을 알게 되었습니다. 이러한 접근법으로 글리칸 집단에서 차이가 발생하는 주요 원인이 항체의 생산원에 있다는 사실을 관찰할 수 있었고, 사용한 하이브리도마 항체에서 2종의 고유한 특정 글리칸을 식별할 수 있었습니다.

실험

재료

면역글로불린 G(IgG) 항체는 Aragen Bioscience Inc.(Morgan Hill, CA)로부터 구하거나 Gilead Sciences, Inc. 내부에서 제작한 것으로, 시판되고 있지 않습니다.

기기

LC/MS 분석을 위해 Agilent 1260 HPLC-Chip/MS 인터페이스(p/n G4240A)와 Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 시스템을 연결하여 사용하였습니다.

LC 파라미터

HPLC-Chip

온 칩(on-chip) 탈당화 및 N-글리칸 특성 규명에는 mAb-Glyco 칩(p/n G4240-64021)을 사용하였습니다. 이 칩은 고정시킨 PNGaseF를 포함한 310nL 용량의 효소 반응기와 160nL 농축 컬럼 및 75 x 43mm의 분리 컬럼을 포함하며, 두 컬럼 모두 5µm 입자 크기의 다공성 graphitized carbon으로 채워져 있습니다. 참고로, 이 칩은 Chip Cube의 백플러시 모드에서 작동해야 합니다.

유량

Agilent 1260 Capillary 펌프(p/n G1376A)에서 효소 반응기 및 농축 컬럼까지의 유량은 3µL/분이었으며, Agilent 1260 Nanoflow LC 펌프(p/n G2226A)에서 분석 컬럼까지의 유량은 500nL/분이었습니다.

용매

Capillary 펌프: Agilent mAb-Glyco Deglycosylation Buffer (p/n G4240-64023) + 3% acetonitrile(A).
Nanoflow 펌프: 0.1% formic acid in water (A); 90% acetonitrile with water with 0.1% formic acid (B).

시료 로딩

Agilent 1260 Capillary 펌프(100% A)

칩에 주입된 시료량

분석법의 최적 주입량은 2µL로서, 강한 글리칸 신호를 위해 0.5mg/mL의 항체 희석액 2µL를 권장합니다(약 75ng의 항체가 컬럼 내에 존재하게 됨).

시료 분석

표 1은 Agilent 1260 Nanoflow LC 펌프를 사용한 그레디언트를 나타냅니다.

MS 파라미터

스펙트럼은 양이온에서 centroid 모드 및 profile 모드로 저장하였습니다. VCap: 1,860V 및 건조 가스 유량은 325°C에서 6L/분으로 설정하였습니다.

Fragmentor 전압

Fragmentor 전압은 120V였습니다. MS only 모드에서 2GHz로 데이터를 수집하였으며, 범위는 1 spectra/초에서 100-3,000m/z였습니다. LC/MS 분석 중 내부 질량 검교정 시료를 지속적으로 주입하였습니다. LC/MS 분석 중 내부 참조 질량 시스템을 통해 정확하고 자동화된 질량 검교정 보정을 수행할 수 있습니다.

데이터 분석

LC/MS로 부터 수집한 데이터는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis, PCDL Manager, Agilent MassHunter Profinder 및 Agilent Mass Profiler Professional 소프트웨어 패키지에 포함된 기능을 사용하여 분석하였습니다.

분자 특징 추출

원본 데이터는 MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어 내의 Molecular Feature Extractor(MFE)라 불리는 Find by Molecular Feature 알고리즘을 사용하여 처리하였습니다. 그리고 추출된 분자 특징을 처리하여 글리칸 화합물 목록을 생성하였습니다. 이 화합물들을 accurate mass 라이브러리 검색을 통해 식별하였습니다(해당 라이브러리는 PCDL Manager를 사용하여 모든 단일 클론 항체에서 발견된 가장 흔한 144개의 N-링크 글리칸으로 생성되었으며, mAb-Glyco 칩과 함께 제공됨).

Profinder

특징 추출과 글리칸 식별을 마친 후 데이터를 .cef 파일로 저장하여 표적 재귀적 특징 추출을 위해 MassHunter Profinder로 가져왔습니다.

Mass Profiler Professional

MassHunter Profinder를 사용하여 데이터 큐레이션을 마친 다음 데이터를 .cef 파일로 저장하여 차이 분석을 위해 Mass Profiler Professional (MPP)로 가져왔습니다.

표 1. 펌프 그레디언트

시간(분)	B(%)
초기	3
6	3
7.5	32
8	85
9	85
9.01	3

표 2. Chip cube 밸브 위치 시간표(100µM Seat capillary)

시간(분)	기능	파라미터
0	내부 밸브 위치 변경	내부 밸브 위치: 분석
0	외부 밸브 위치 변경	외부 밸브 위치: 바이패스
1	내부 밸브 위치 변경	내부 밸브 위치: 분석
1	외부 밸브 위치 변경	외부 밸브 위치: 인라인
1.2	내부 밸브 위치 변경	내부 밸브 위치: 분석
1.2	외부 밸브 위치 변경	외부 밸브 위치: 바이패스
5	내부 밸브 위치 변경	내부 밸브 위치: 농축
5	외부 밸브 위치 변경	외부 밸브 위치: 인라인
6	내부 밸브 위치 변경	내부 밸브 위치: 분석

결과 및 토의

글리칸 프로파일링

이 연구의 목표는 ELISA에 의한 차이 결합의 이유를 알아내기 위해 서로 다른 방법으로 생산된 항체의 글리칸 집단을 비교하는 것이었습니다. 이를 위해 네 가지 항체의 글리칸 집단을 비교하였습니다. 항체 3.2 및 3.7은 체외 배양한 하이브리도마 세포에서 얻었습니다. 항체 11 및 13은 동일한 하이브리도마 세포를 쥐에 주입한 후 복수액으로부터 항체를 수확하였습니다. 모든 항체는 0.5mg/mL로 희석한 후 Agilent mAb-Glyco 칩에 주입하여 인라인 탈당화를 진행하고 이후에 유리된 당에 대해 MS 분석을 실시하였습니다¹. 4개의 mAb 시료를 각각 5회 반복 주입하였습니다. 항체의 MS 분석을 통해 생성된 데이터는 이전에 보고된 워크플로와 유사하게 자동화된 데이터 분석을 거쳤습니다¹. MassHunter Qualitative Analysis 및 MassHunter Profinder 소프트웨어 패키지를 사용하여 Q-TOF 데이터 파일을 처리하였습니다. 먼저 Find By Molecular Feature 알고리즘(MFE)을 통해 화합물을 추출하였습니다. MFE를 활용하면 관련성을 지닌 모든 이온 신호를 단일 화합물로 편향되지 않게 묶을 수 있습니다. 이후에 mAb-Glyco 칩과 함께 제공된 데이터베이스에서 이러한 화합물을 검색하고 주석을 달았습니다. 그림 1은 MFE를 통해 글리칸을 추출하고 PCDL 데이터베이스 검색을 통해 주석을 단 후 MassHunter Qualitative Analysis로부터 얻은 결과를 보여줍니다.

그런 다음 MassHunter Profinder의 Targeted Feature Extraction 기능을 사용하여 각 글리칸 화합물의 분자 특징을 재추출하였습니다. MassHunter Profinder를 통해 데이터를 재처리할 수 있었을 뿐 아니라 스펙트럼 피크 및 크로마토그래피 피크 추출을 관찰하고 질량과 시간이 잘 정렬 되었는지 검증할 수도 있었습니다. 데이터 품질과 적절한 머무름 시간 및 질량 정렬을 위해 각 글리칸 화합물의 스펙트럼과 크로마토그램을 검토하였습니다. 모든 시료에서 일관되게 추출되지 않은 글리칸은 수동으로 추출하였습니다. 그림 2는 단일 화합물의 결과를

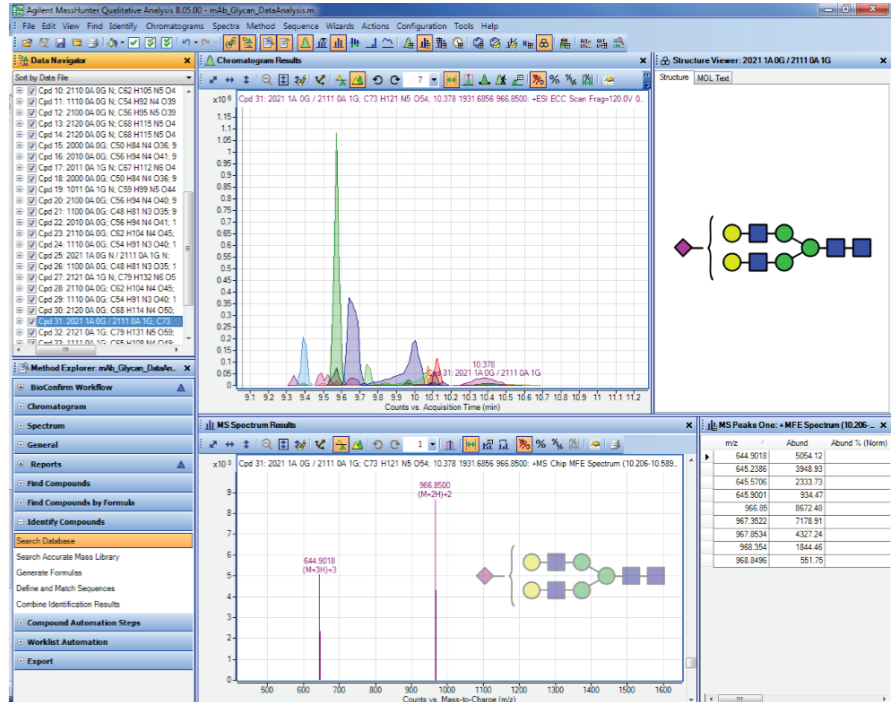


그림 1. Agilent MassHunter Qualitative Analysis MFE

나타냅니다. 이 글리칸의 크로마토그램과 스펙트럼은 9개 데이터 파일 모두에 나타나고 있습니다. 이러한 데이터는 추가 분석을 위해 .cef 파일로 MPP에 내보냈습니다.

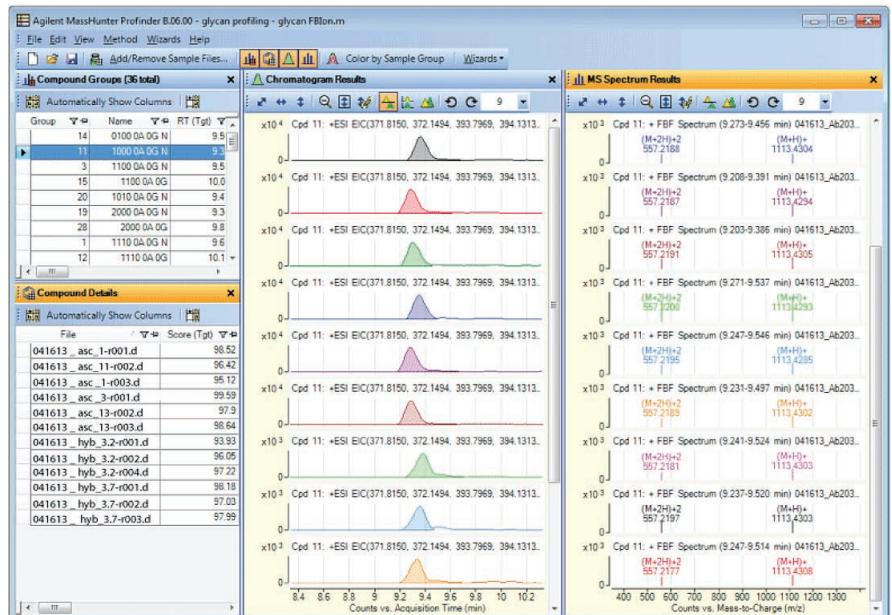


그림 2. Agilent MassHunter Profinder

Agilent Mass Profiler Professional (MPP)

MPP 소프트웨어를 통해 MS 기반 차이 분석이 가능하며 서로 다른 시료 또는 그룹 간의 관계를 확인할 수 있습니다². mAb 글리칸 데이터를 가져온 후 특정 항체(3.2, 3.7, 11 및 13)와 생산원(하이브리도마 세포 및 복수액)을 기준으로 시료들을 그룹화 하였습니다. 분석에는 총 36개의 글리칸 종을 사용하였습니다.

주성분 분석(Principal components analysis, PCA)

데이터 세트 내의 분산을 설명하기 위해 PCA를 적용할 수 있습니다. PCA는 높은 차원의 데이터 세트를 주성분이라고 하는 단 몇 개의 차원으로 변환합니다. 데이터를 주성분으로 변환하면 데이터 세트 내의 패턴과 시료 간의 관계를 관찰할 수 있습니다. X축에 표시된 첫 번째 주성분은 흔히 데이터 세트 내 분산에 가장 크게 영향을 주는 특성을 나타냅니다. 그림 3은 글리칸 데이터의 PCA 결과를 보여줍니다. 가장 높은 분산(52%)이 두 개의 주요 클러스터를 명확히 드러내는 X축의 첫 번째 주성분으로 나타납니다. 이러한 클러스터는 항체 생산원인 하이브리도마 세포 또는 복수액에 해당합니다. 또한 이러한 1차 클러스터 내에서도 특정 항체 전처리에 따라 Y축인 주성분 2(약 21%)에서 분리되어 나타납니다. 이러한 PCA 결과는 글리칸 프로파일의 항체의 생산원에 따라 가장 많은 차이를 보이고 특정 항체 전처리에 따라서는 명확하게 식별할 수 있는 정도이지만 상대적으로 적은 차이를 보인다는 것을 나타냅니다.

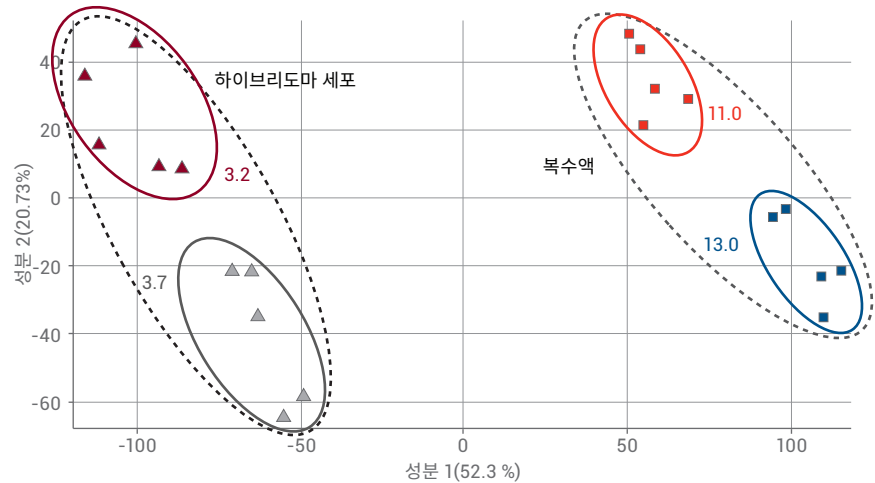


그림 3. 글리칸 데이터의 PCA 도표

C-C (Correlation-covariance, 상관-공분산) 도표

PCA를 통해 생성된 C-C 도표를 살펴보면 데이터를 추가로 마이닝할 수 있습니다. 이 도표에서 각 글리칸은 상관 스코어(글리칸 간 관계의 신뢰성)와 공분산 스코어(전체 시료에서 관찰된 각 글리칸의 변화량)를 바탕으로 표시되었습니다. 글리칸 데이터 세트의 PCA 분석을 통해 생성된 C-C 도표는 그림 4에 표시하였습니다. 도표의 오른쪽 상단에 있는 글리칸은 상관 점수가 높은(약 0.8) 반면 공분산 점수는 낮습니다(0에 가까움). 따라서 이러한 글리칸은

배양 조건 간에서 절대 존재비의 적은 변화를 보이지만 그 변화는 각 항체 세트 내의 모든 시료에서 일관되게 나타납니다. 이것은 삽도 A의 이 특정 글리칸에 대한 존재비 프로파일에서 확인할 수 있습니다. 반대로, 플롯의 왼쪽 하단에 있는 글리칸은 공분산 점수가 높습니다. 왜냐하면, 시료 간, 특히 복수액과 하이브리도마 세포에서 취한 항체의 존재비 프로파일이 매우 다르기 때문입니다(삽도 B). 이러한 글리칸은 상관 점수도 높고 모든 시료에서 존재비 프로파일이 매우 유사합니다.

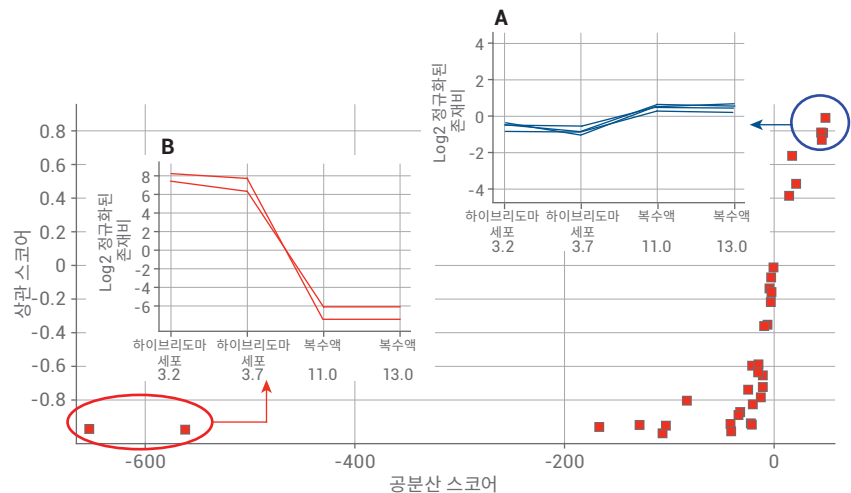


그림 4. 글리칸 데이터의 C-C 도표

또한 그림 5 및 6에서 볼 수 있듯이 개별 글리칸 프로파일을 통해 각각의 당이 전반적인 시료 분산에 어떠한 영향을 미쳤는지 조사하고 그 사실을 확인하였습니다. 그림 5에서 도표 상단에 위치한 $(Hex)_4(HexNAc)_3(dHex)_1(NeuGc)_1$ (0에 가까움)은 긴밀한 상관관계를 가지고 시료 간 공분산이 거의 없습니다. 각 반복 주입과 각각의 개별 항체 시료에 대한 막대 그래프에 표시된 원시 카운트를 살펴보면, 반복

주입 간의 변동성이 거의 보이지 않으며 항체 생산 유형 간에 약 2배의 배율 변화만 관찰되는 것을 확인할 수 있습니다. 따라서 이 글리칸의 양은 복수액 전처리 시 약간 증가합니다. C-C 도표에 있는 데이터 포인트의 위치를 통해 이를 예측할 수 있습니다. 반면, 그림 6은 원점에서 벗어나 도표의 왼쪽 하단에 위치한 고-만노스(high mannose) 글리칸($(Hex)_8(HexNAc)_2$ 아민)을 집중하여 보여줍니다. 반복 주입

시료 간에 긴밀한 상관관계를 가지고 시료 세트 간 공분산 스코어가 높은 것을 확인할 수 있습니다. 막대 그래프에 표시된 원시 카운트를 살펴보면, 반복 주입 시료 사이에 변동성이 거의 보이지 않지만 이 당은 하이브리도마 세포에서 생산된 항체 시료에만 존재하는 것으로 보입니다. 따라서 C-C 도표는 화합물 분산에 기반해 데이터 분리를 확인하는 좋은 방법입니다.

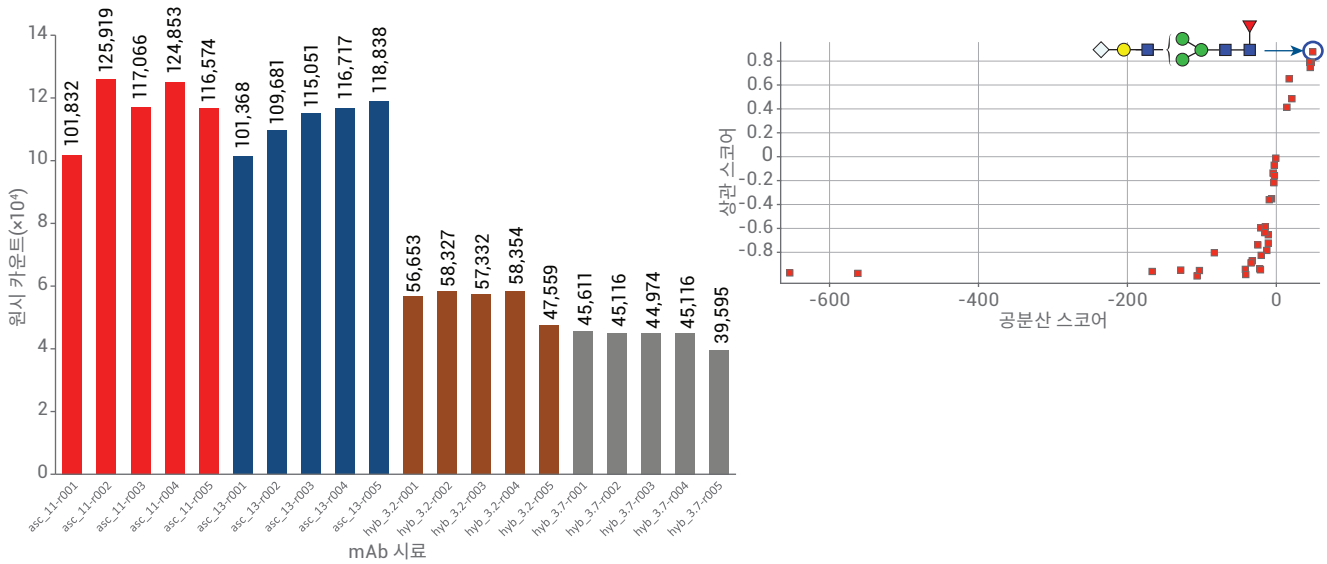


그림 5. $(Hex)_4(HexNAc)_3(dHex)_1(NeuGc)_1$ 글리칸. 상관 점수가 높고 공분산 점수가 낮음

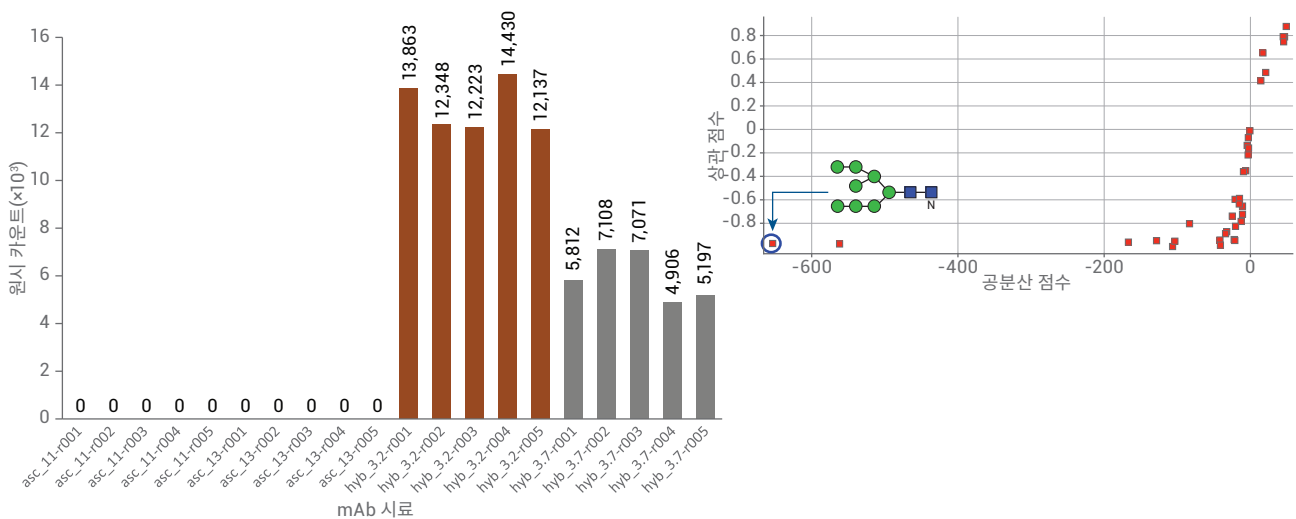


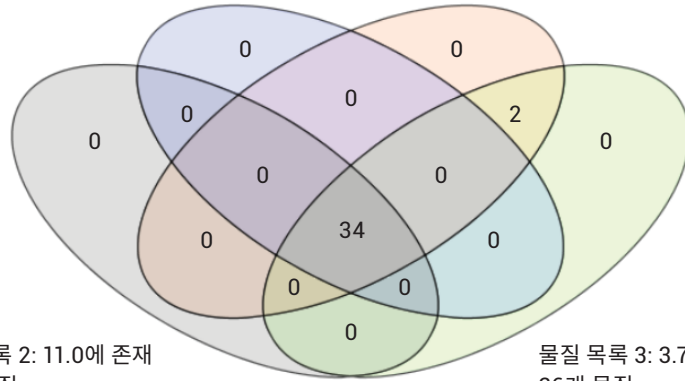
그림 6. $(Hex)_4(HexNAc)_3(dHex)_1(NeuGc)_1$ 상관 점수가 높고 공분산 점수가 낮음

항체 전처리에서의 글리칸 분포

항체 간에 유의하게 다른 글리칸을 확인하기 위해 ANOVA를 수행하였습니다. 데이터 세트에 있는 36개 글리칸 중 26개가 p -값이 0.05로 설정된 ANOVA 필터를 통과하였습니다. 이 26개 글리칸 중 21개의 평균 존재비 값이 2가지 항체 유형 간에서 최소 1.5배 이상 차이를 보였습니다. 대부분의 차이는 복수액과 하이브리도마 세포 사이에서 나타났습니다. 관찰된 대부분의 글리칸은 모든 항체에 존재하였습니다. 그림 7의 벤 다이어그램을 사용하여 어떤 글리칸이 특정 항체에 고유한 지를 확인하였습니다. $(Hex)_7(HexNAc)_4(dHex)_1$ 및 $(Hex)_8(HexNAc)_2$ 아민이라는 두 글리칸만 하이브리도마 세포에서 기인한 항체에 고유하게 존재하였습니다. 유사한 접근법을 사용하여 하이브리도마 세포 또는 복수액 시료 간에 다르게 나타나는 당을 살펴보고, 반복 주입 시료 간 차이점을 중점적으로 확인하였으며, 시료 전처리가 분산에 미치는 영향을 분석하였습니다(데이터 미제공). 본 연구의 한 가지 목표는 항체 간 글리칸 집단 차이를 통해 항체의 Fc 부분에 존재하는 당이 ELISA 결합에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 통찰을 얻을 수 있는지를 확인하는 것이었습니다. 그래서 전하 차이의 원인을 단순히 ELISA 연구에서 관측된 차이 결합에서 찾을 수 있을 것으로 기대하였습니다. 차이를 보이며 발현된 글리칸 중 하나인 $(Hex)_4(HexNAc)_3(dHex)_1(NeuGC)_1$ 은 하전된 sialic acid를 포함하지만 이 글리칸은 모든 항체에 존재하며 단지 복수액에서 약간 높게 나타났습니다. 하이브리도마 세포에 고유한 두 개의 글리칸은 존재비를 바탕으로 한 상위 5개 글리칸에 포함되지 않습니다. 따라서, 기능적 차이의 원인을 단일 고유 글리칸 또는 본 연구에서의 전반적인 글리칸 집단에서 찾기는 어려웠습니다.

물질 목록 1: 13.0에 존재
34개 물질

물질 목록 4: 3.2에 존재
36개 물질



물질 목록 2: 11.0에 존재
34개 물질

물질 목록 3: 3.7에 존재
36개 물질

그림 7. 글리칸 집단의 벤 다이어그램

결론

애질런트 소프트웨어 제품군을 사용하면 높은 정확도의 고분해능 질량 분석, 자동 및 재귀적 특징 추출, 포괄적이고 맞춤형 가능한 데이터베이스 검색 및 강력한 차이 분석이 가능해집니다. 이 특별한 사례를 통해 글리칸 데이터 세트에 적용한 해당 기술의 사용을 소개하였지만, 이 워크플로는 서로 다른 실험 조건에서 수집된 관련성 있는 생물학적 시료를 비교하는 모든 상황에 적용할 수 있습니다. 이 연구에서는 하나의 단일 항체 생산원에 고유한 글리칸 하위 세트를 찾을 수 있었습니다. 안타깝게도, 이러한 글리칸은 차이 결합의 간단한 해석에 도움이 되지 않았으며, 이 항체 간의 기계론적인 차이를 설명하기 위한 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료됩니다.

참고문헌

1. Trojer, L., Gromadski, K., Buckenmaier, S. The Agilent mAb-Glyco Chip Kit for rapid and fully automated characterization of N-linked glycans from monoclonal antibodies, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5990-6924EN, **2011**.
2. Agilent G3835AA MassHunter Mass Profiler Professional Software, *Agilent Technologies Familiarization Guide*, publication number G3835-90010 Rev. A, **2012**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
2014년 8월 26일, 한국에서 발행
5991-5068KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies