형광 및 MS 검출을 이용한 단일 클론 항체 N-glycans의 상대적 정량결과 비교

응용 자료

바이오 의약품 및 생물학적 치료제

저자

Oscar Potter and Gregory Staples
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, California, USA

개요

이 응용 자료는 형광 및 질량 분석(MS)을 사용하여 검출할 수 있는 새로운 인스턴트 질량 태그(InstantPC)를 사용하는 단일 클론항체 N-글리코실화 분석에 대해 설명합니다. 두 개의 검출 분석법을 비교할 목적으로 HILIC 분리 분석법을 최적화했습니다. 결과는 형광과 InstantPC-labeled glycans의 MS 상대적 정량이 매우 유사하게 나타났습니다. 시료 전처리 절차는 두 개의 다른 시료에 대해 네 번씩 수행하였고, 결과는 미량 성분에 대해서도 낮은 RSD로 뛰어난 재현성을 보였습니다. InstantPC 라벨이 제공하는 높은 MS 감도는 accurate mass 와 Tandem MS를 이용한 미지의 Glycan의 성분 식별을 용이하게 합니다.

Agilent Technologies

소개

단일 클론 항체(mAb)는 셀 배양 시 생합성 중에 N-glycans에 의해 변형됩니다. 일반적인 mAb는 분자의 각 Fc 영역에 하나씩 들어 있는 두 개의 N-글리코실화 사이트를 포함합니다. 일부 mAb는 Fab 영역의 N- 또는 O-글리코실화 등 추가 글리코실화 사이트를 포함합니다. Glycan은 mAb의 기능에 영향을 줄 수 있으므로, 적절한 분석법을 사용하여 글리코실화 프로파일을 모니터링해야 합니다.

가장 많이 사용되는 Glycan 분석법으로는 NMR, CE-LIF, 형광 검출(FLD)을 사용하는 HPLC, 그리고 더 최근에는 LC/MS가 있습니다. CE-LIF와 HPLC-FLD 둘 다 Glycan의 광학적 검출이 가능하도록 염료를 이용한 표지 처리가 필요합니다. 일반적으로, 지금까지 사용된 염료들은 표지 처리되지 않은 종에 비해 Glycan의 이온화 효율성을 향상시키기도 하지만, MS를 사용하여 가장 존재비가 높은 성분을 검출할 수 있는 지점까지만 향상됩니다. 보다 최근에 개발된 새 염료(그림 1에 소개된 Prozyme Inc.의 InstantPC)는 형광 활성을 적정하게 향상시키고 MS 분석의 이온화 효율성을 크게 개선합니다. 이러한 태그를 사용하여, 연구자들은 현재 LC 분리에서 Glycan을 식별하기 위해 MS(accurate mass 또는 Tandem MS의 형태로)를 사용합니다. 또한, 형광 검출보다는 MS를 사용하는 상대적 정량을 선택합니다.

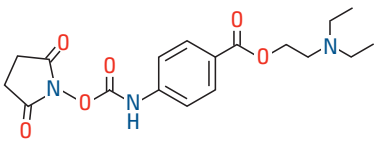

그림 1. InstantPC(ProZyme, Inc) 다이어그램, Glycan의 형광 및 MS 검출에 대한 amine 반응성 인스턴트 라벨

이 응용 자료는 두 개의 mAb 전처리에서 파생된 N-glycans의 상대적 정량에 따른 InstantPC의 성능을 조사합니다. mAb 시료보다 4배 많은 시료가 ProZyme Inc.의 InstantPC 키트를 사용하여 처리되었습니다. 이 시료들은 그 다음 FLD 및 MS 검출을 사용하여 UHPLC 시스템의 HILIC에 의해 분리되었습니다. LC 분리 조건은 최대 크로마토그래피 분리를 위해 최적화되었습니다. 이때, 목표는 FLD 검출만 사용할 경우에 구분할 수 없는 중첩 피크 수를 줄이는 것이었습니다. 결과적으로, 우리는 두 가지 검출 분석법의 상대적 정량 결과와 거의 모든 중요한 Glycan 구조를 비교할 수 있었습니다. Accurate mass와 Tandem MS 스펙트럼은 모든 Glycan 성분 분석을 위해 수집되었으며, mAb 전처리에 제시된 Glycan 식별에 사용되었습니다. 그림 2는 전체 워크플로를 보여줍니다.

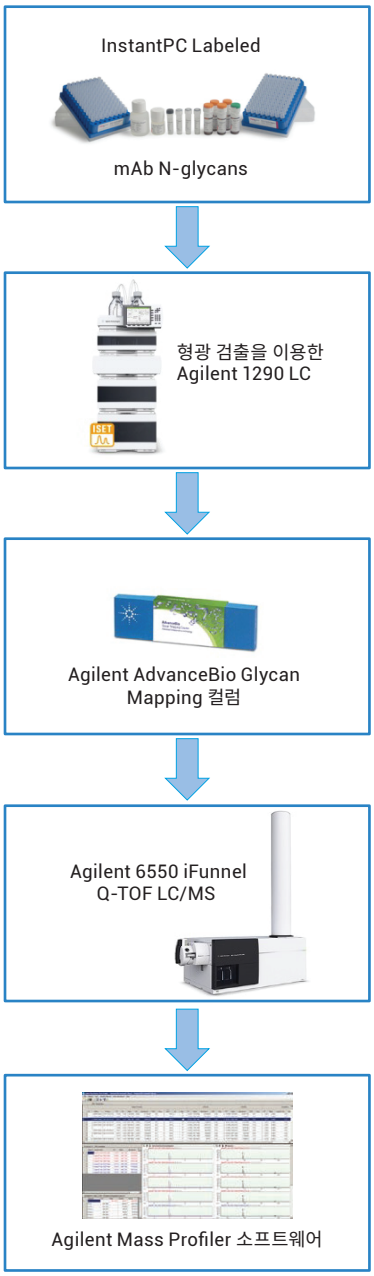

그림 2. mAb에서 InstantPC-labeled N-glycans의 식별 및 정량에 사용된 워크플로

실험

이 실험에 사용된 Agilent LC/MS 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 고성능 자동 시료 주입기 (G4226A), Agilent 1290 Infinity 온도 조절 장치 (G1330B) 포함
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치(G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 형광 검출기(G1321B)

MS 시스템

이중 분무 AJS 소스를 장착한 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 시스템

컬럼

두 번째 AdvanceBio Glycan Mapping column, 2.1 × 100mm에 연결된 Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column, 2.1 × 150mm, 1.8µm

소프트웨어

- Agilent PCDL Manager(버전 B.07.00 빌드 7024.0) 및 Agilent Mass Profiler(버전 B.07.01 빌드 99.0)
- Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어, 버전 B.05.01, 빌드 5.01.5125.1

용매 및 시료

모든 시약과 용매는 구할 수 있는 가장 높은 순도의 것으로 사용되었습니다.

크로마토그래피 조건

파라미터	값	
이동상 A	50mM ammonium formate pH 4.4	
이동상 B	Acetonitrile	
그레디언트	시간(분)	%B
	0	75
	32	69
	48	60
	48.5	25
	50.5	25
	52	75
자동 시료 주입기 온도	4°C	
FLD	Ex. 285Em. 345	
주입	20% DMSO에서 2µL(IgG의 1µg과 동일)	
컬럼 온도	40°C	
유속	0.4mL/분	

결과 및 토의

mAb 1 및 mAb 2의 FLD 크로마토그램은 그림 3에 나와 있는 것처럼 각 분자가 매우 유사한 글리코형 세트에 의해 변형된다는 것을 보여주었습니다. 일부 구조는 그림에 주석이 달려 있고, 기능적 글리코믹스 컨소시엄(CFG)의 지침에 따라 기호로 표현되었습니다[1].

Accurate mass와 Tandem 질량 분석기 정보를 사용하여, FLD 피크가 다음과 같은 형식으로 Glycan 성분에 할당되었습니다.

HxNxFxSgx + Core

H = galactose 또는 mannose, N = N-acetylglucosamine, F = fucose, Sg = N-glycolylneuraminic acid, Core = 모든 N-glycans에 공통된 trimannosyl core.

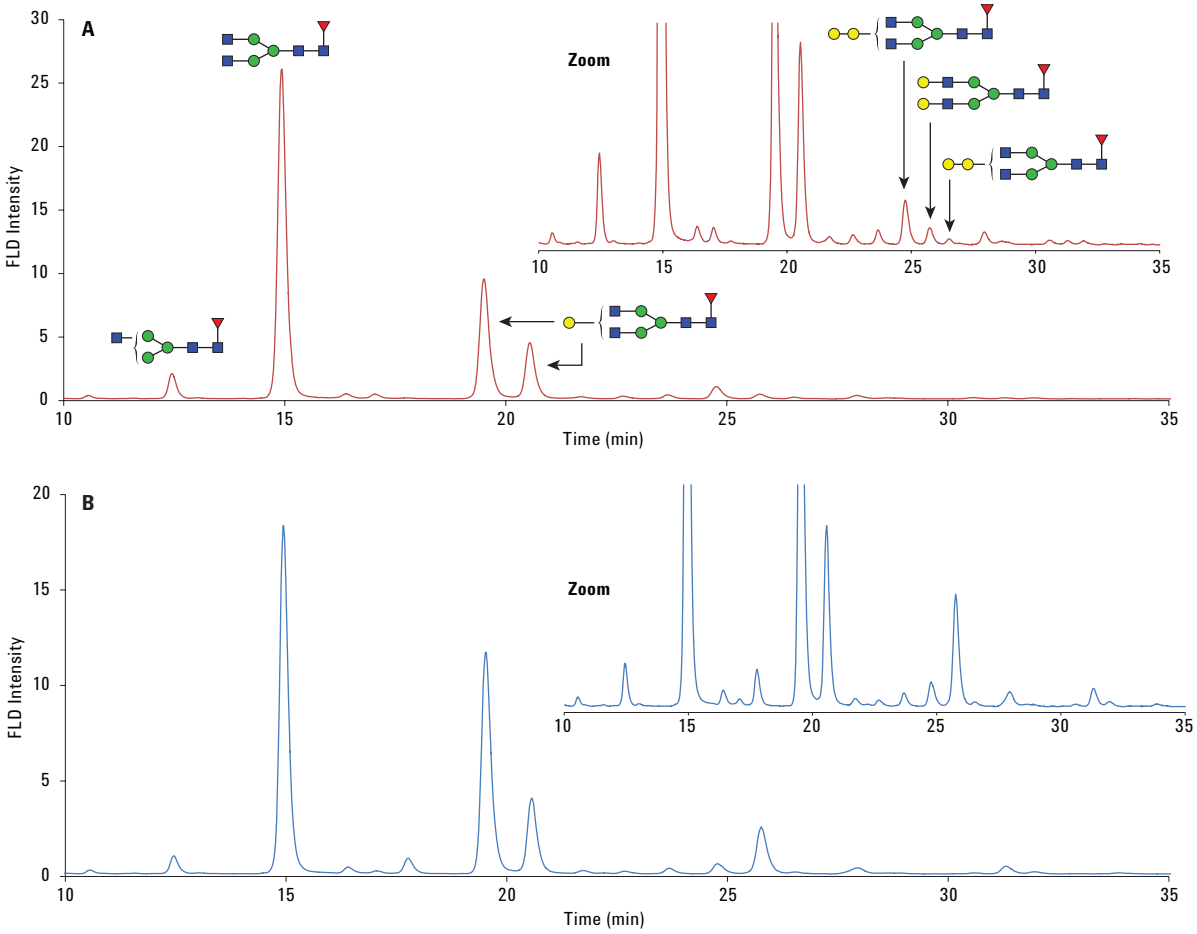

그림 3. mAb 1과 mAb 2에서 방출된 InstantPC-labeled N-glycans의 FLD 크로마토그램. A) mAb 1의 FLD 크로마토그램. B) mAb 2의 FLD 크로마토그램

FLD 크로마토그램의 피크 영역에 기초한 각 성분은 모든 성분에 대해 전체 FLD 영역에 기초한 상대 합계 백분율로 정량하였습니다. 이 결과는 그림 4에 막대 그래프로 나타냈습니다.

전체적으로, 21개의 Glycan 성분을 FLD 데이터에 기초하여 정량하였습니다. FLD 정량에 포함하기 위해 사용된 기준은 0.1% 이상의 상대 존재비와 이웃한 피크의 합리적인 분리능이었습니다. 한 가지 예외는 H2N1F1Sg1 + Core/H2N3F1 + Core 쌍이었습니다. 이 동시용리 성분은 FLD 정량에 포함될 정도로 충분한 존재비를 나타냈습니다. 따라서, 이 피크의 FLD 신호 영역은 MS에서 결정한 것처럼 각 영역의 상대 존재비에 따라 두 부분으로 분리되었습니다.

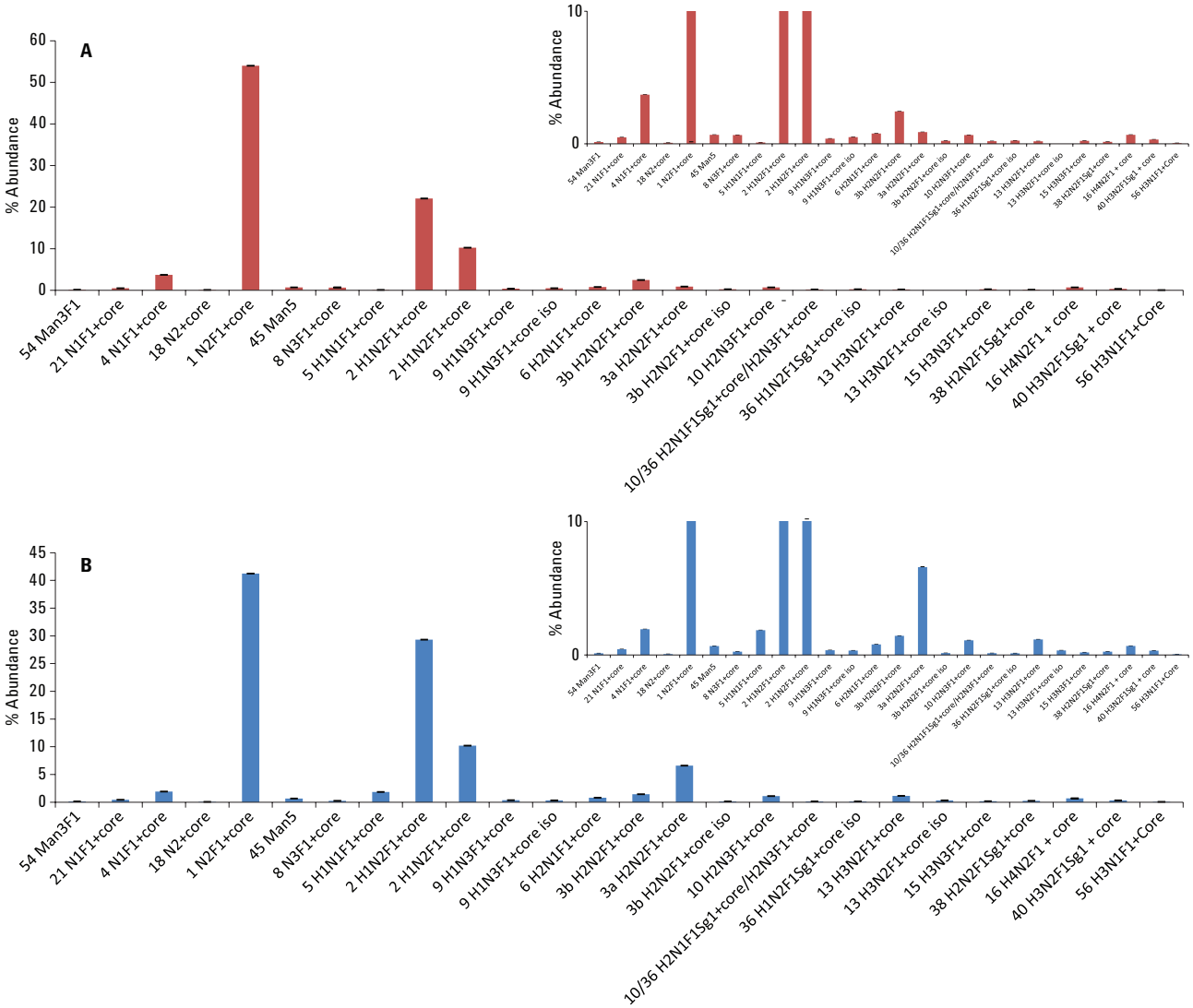

그림 4. A) mAb 1 Glycan의 상대적 FLD 정량. B) mAb 2 Glycan의 상대적 FLD 정량. 오차 막대는 전체 워크플로를 통해 진행된 4개의 ± 표준편차를 보여줍니다. FLD 신호 통합은 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어를 사용하여 수행되었습니다. 삽도는 상대 존재비가 10% 미만인 성분을 더 잘 나타내기 위해 동일한 데이터를 확대한 것입니다.

InstantPC는 높은 이온화 효율성을 N-glycans에 전달합니다. 따라서, MS 검출에서 추출한 이온 크로마토그램의 피크 영역을 사용하여 상대적 정량을 실행할 수 있습니다. 이런 가능성을 평가하기 위해, 우리는 FLD 크로마토그램과 이온 크로마토그램을 비교하였습니다. 그림 5는 FLD 및 MS 크로마토그램이 매우 유사했다는 것을 보여줍니다. 검출된 모든 FLD 피크에 대응하는 MS 피크가 있습니다.

그림 5에 나타난 높은 유사성에 고무된 우리는 MS 데이터에 기초하여 mAb 1에서 mAb 2까지 Glycan의 상대적 정량을 수행했습니다. 각 기능의 이온 크로마토그램(모든 전하 상태의 신호와 부가물을 포함하는 질량 머무름 시간 쌍으로 정의됨)은 Agilent Mass Profiler 소프트웨어를 사용하여 생성하였습니다. 이 경우, 더 낮은 검출 임계값을 부과하지 않았습니다. Mass Profiler를 사용하여 결정된 기능들은 이 실험을 위해 구성된 개별 화합물 데이터베이스(PCD)를 사용하여 식별하였습니다.

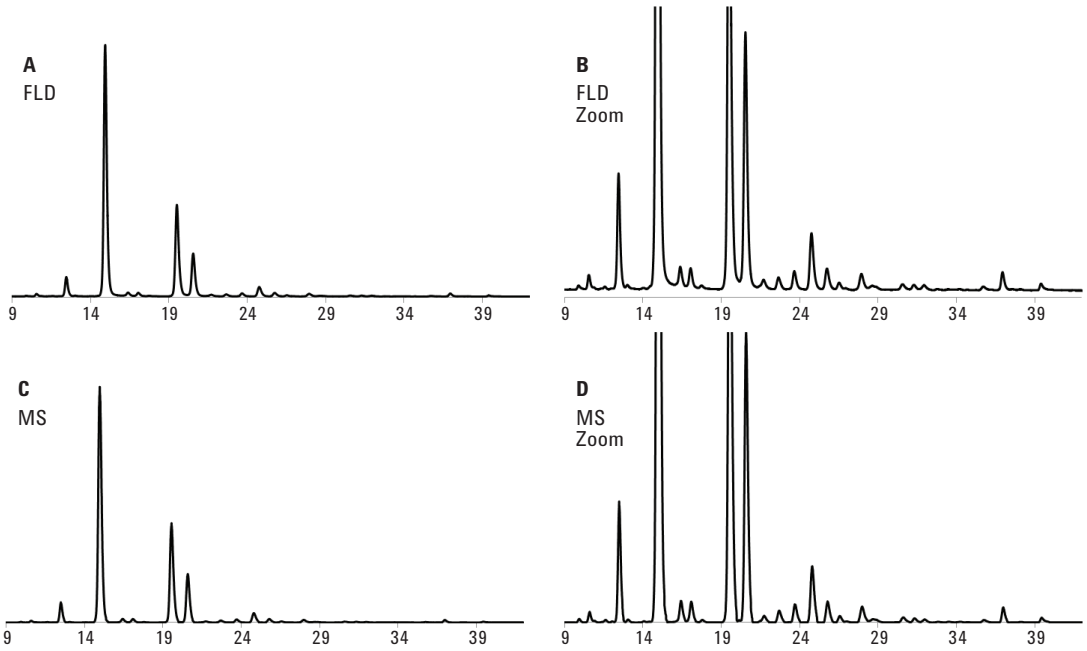

그림 5. mAb 1의 FLD 크로마토그램과 MS 크로마토그램 비교. A) mAb 1 Glycan의 FLD 크로마토그램 B) mAb 1 Glycan의 FLD 크로마토그램 확대 C) mAb 1 Glycan의 MS 크로마토그램 D) mAb 1 Glycan의 MS 크로마토그램 확대

PCD에는 mAb Glycan의 정확한 질량 및 머무름 시간 정보가 포함됩니다. 데이터베이스는 Glycan 생합성 규칙에 대한 지식 외에 현재 작업에 대한 Tandem MS 정보를 결합한 것을 기초로 구성되었습니다. 그림 6은 Glycan 성분을 할당하기 위해 Tandem MS를 사용한 예를 보여줍니다. 특히, 그림 6B에 제시된 예는 NeuGc + fucose의 질량과 NeuAc + galactose의 질량이 동일하다는 사실로 인해 성분 할당이 질량만으로는 충분하지 않을 수 있다는 일반 사례를 보여줍니다. Tandem Ms는 불확실성을 해결합니다. 왜냐하면 *m/z* 673의 조각 이온이 있다는 것 자체가 NeuGc가 있는 안테나가 구조에 포함된다는 강력한 증거가 되기 때문입니다.

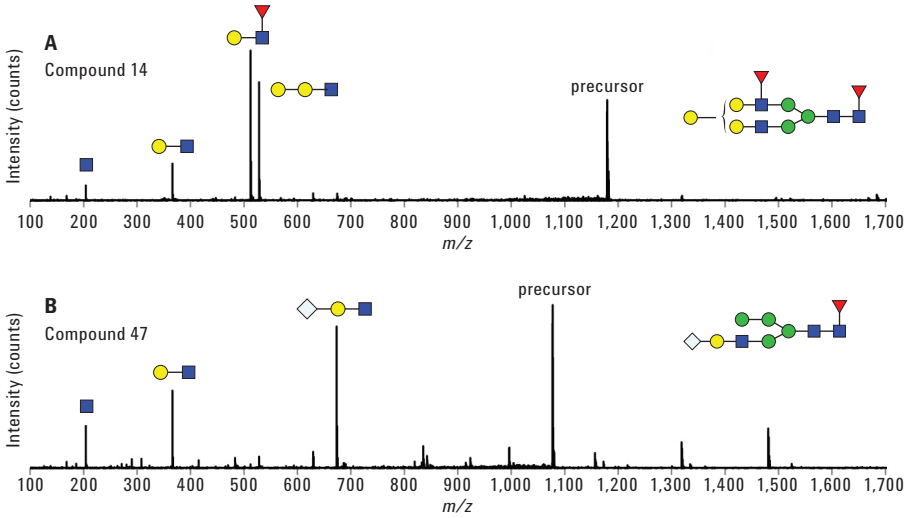

그림 6. 모든 Glycan에 대해 수집한 Tandem MS 데이터. Accurate mass가 불충분할 때 화합물 식별을 돕는 MS/MS. 위의 두 예는 gal-gal 및 외부 암 fucose(A)와 NeuGC(B) 변형과 일치합니다.

그림 7은 mAb 1 및 mAb 2 Glycan의 MS 기반 정량 결과를 보여줍니다.

Q-TOF 검출이 제공하는 질량 선택성의 결과로, FLD 검출보다 더 많은 성분을 정량할 수 있습니다. 이 경우, 총 35개의 성분을 정량하였습니다. 존재비와 무관한 모든 기능의 평균 RSD는 mAb 1이 3.2%, mAb2가 3.9%였습니다. 이 기능들은 상대 존재비가 0.1% 이상이었기 때문에 RSD는 각각 2.7%와 3.4%였습니다.

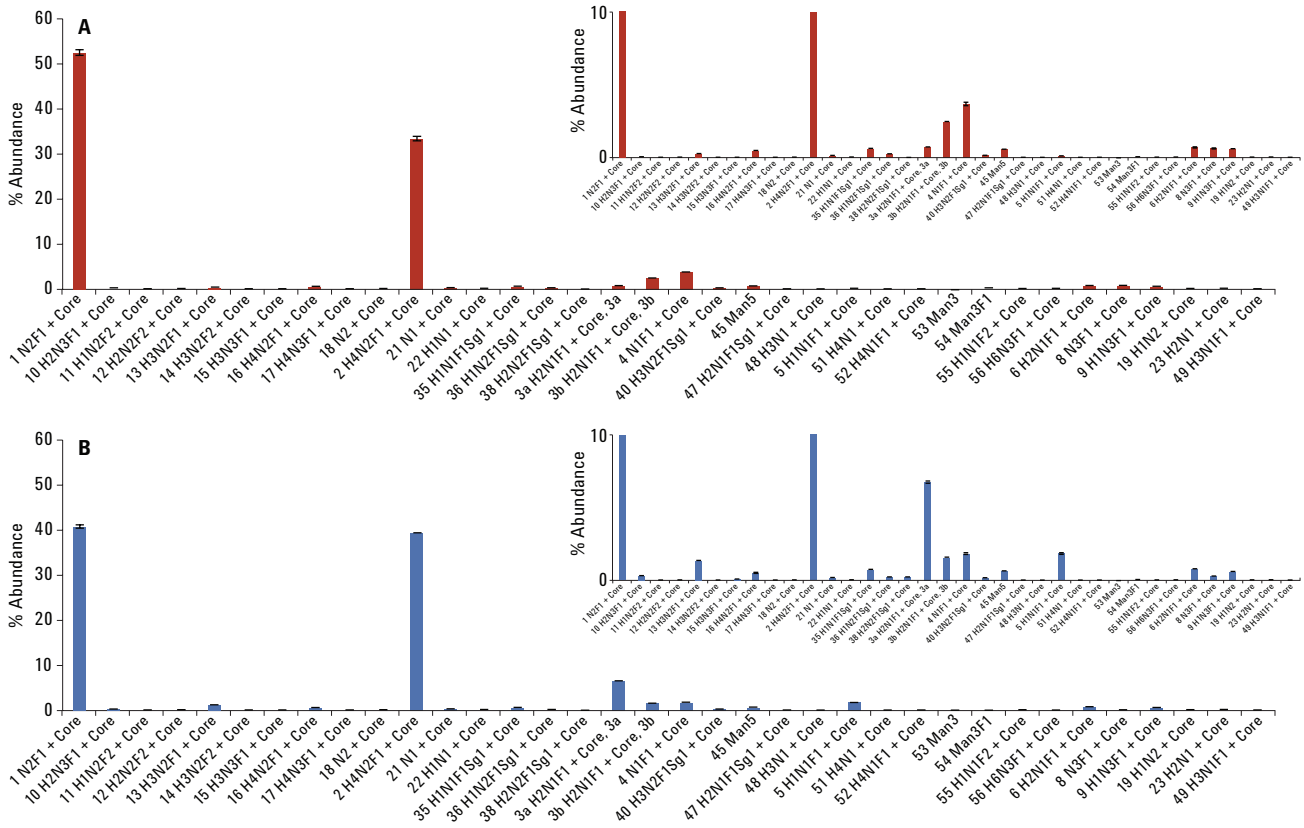

그림 7. mAb 1과 mAb 2에서 방출된 InstantPC labeled N-glycans의 상대 MS 크로마토그램. A) mAb 1 Glycan의 상대적 MS 정량. B) mAb 2 Glycan의 상대적 MS 정량. 오차 막대는 전체 워크플로를 통해 진행된 4개의 ± 표준편차를 보여줍니다. 삽도는 상대 존재비가 10% 미만인 성분을 더 잘 나타내기 위해 동일한 데이터를 확대한 것입니다.

마지막으로, 우리는 FLD와 MS를 사용하여 mAb 1과 mAb 2에서 Glycan의 상대적 정량을 직접 비교했습니다. 그림 8은 단일 막대 그래프에 표시된 각 분석법의 결과를 보여줍니다.

결론

그림 8에 나와 있는 것처럼, FLD와 MS의 상대적 정량 결과는 매우 유사했습니다. 두 분석법의 결과에서 나타난 몇 가지 작은 차이는 두 분석법에서 정량된 성분의 숫자가 다르다는 것(FLD에서 21, MS에서 35)으로 설명할 수 있습니다. 이 연구 결과를 토대로 연구자들은 Prozyme의 InstantPC 라벨과 Agilent LC/MS 시스템을 결합하면 Glycan을 mAb에서 MS-기반 정량을 수행할 수 있음을 알게 되었습니다. 하지만 FLD는 이 화합물 등급에 대해 표준 검출 분석법을 유지할 것입니다. 그럴 경우, 고품질 Q-TOF MS 데이터는 FLD를 사용하여 검출한 InstantPC-labeled glycans 각각에 대한 accurate mass와 Tandem 질량 정보를 제공함으로써 피크 할당을 매우 용이하게 합니다.

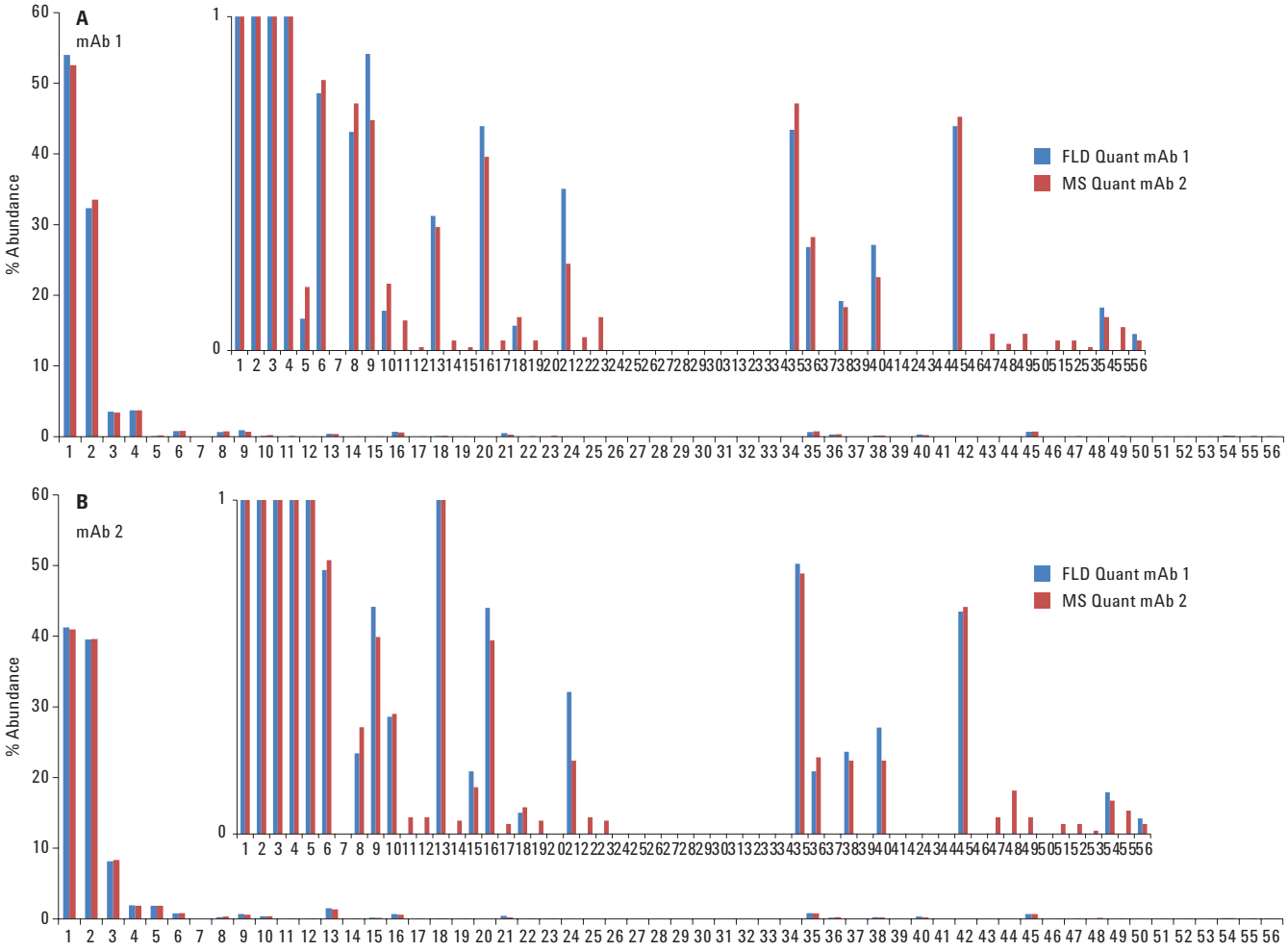

그림 8. mAb 1과 mAb 2에서 InstantPC-labeled N-glycans의 형광 및 상대 MS 존재비(면적 합계 백분율)의 비교. X-축은 이 연구에서 정량화된 개별 Glycan 성분을 나타냅니다.

감사의 글

이 연구에에 사용된 두 개의 mAb 시료를 제공해준 NIST에 감사 드립니다.

참고 문헌

1. http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹사이트 (www.agilent.com)를 방문하십시오.

www.agilent.com

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하실 수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
한국에서 인쇄
2016년 6월 29일
5991-6958KO

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

Agilent Technologies