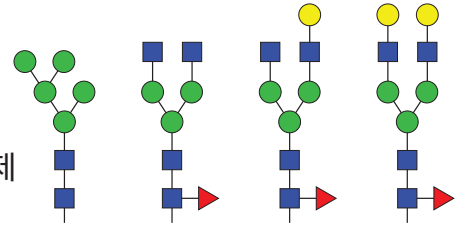


Agilent LC/MSD XT와 형광 검출 및 견고한 질량분석검출법을 이용한 단일클론항체 N-glycans 분석

응용 자료

바이오 의약품 및 생물학적 치료제



저자

Oscar Potter, Gregory Staples,
Jordy Hsaio, Te-Wei Chu



Agilent LC/MSD XT

소개

제품 개발, 공정 개발 및 QC 과정에서는 치료용 단백질의 N-글리코실화 모니터링이 수반됩니다. 많은 분석자들은 효소로 N-glycan을 분리한 후 형광 태그로 라벨링을 하여 HILIC-FLD 분석을 진행합니다. Prozyme Inc.의 InstantPC 태그로 라벨링을 하여 1시간 내에 수동 시료 전처리를 마치거나, 애질런트 AssayMap Bravo Liquid Handling 플랫폼을 이용하여 높은 처리량으로 시료를 동시 처리할 수 있습니다. 애질런트 AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼을 이용하면 짧은 분석 주기 내에 고성능 분리를 수행할 수 있습니다(5991-4886EN 참조).

형광 검출은 인기 있는 검출 기술이나, 분석가들은 HILIC-FLD 워크플로를 수행하는 과정에서 모호한 피크 위치로 인해 어려움을 겪을 수 있습니다. 특히 새로운 시료 유형이거나 예상치 못한 피크의 경우에는 더욱 그러합니다. 그러한 경우에 분석가들은 LC-Q-TOF, MALDI-TOF와 같은 보완적 분석법으로 시료를 처리할 수 있으나, 추가적인 시간과 비용은 피할 수 없습니다.

우리는 예전에 HILIC-FLD 시스템과 고분해능 Q-TOF 질량 분광기의 온라인상 연결을 통해 강화된 워크플로를 시연한 적이 있습니다(5991-6958EN 참조). 이 방법은 질량 분석기의 강력한 구조 해석 성능과 견고한 형광 기반 정량화의 장점을 모두 취할 수 있습니다. 그러나 일상적인 비용 효율적 솔루션을 찾는 분석가들은 보다 안정적이고 자원 소모가 덜한 single quadrupole 기술 기반의 질량 분석기(Mass Selective Detector)를 선호할 수 있습니다. 그러므로 우리는 HILIC-FLD 시스템을 안정적이고 민감하며 중첩 가능한 Agilent LC/MSD XT single quadrupole과 결합한 방법을 제시합니다. MSD 데이터는 질량 정보를 제공하여 모호한 피크 위치 문제를 해결하고 동시에 용출되는 물질의 구조를 검출할 수 있습니다. 이 방법은 현존하는 LC 시스템과의 호환성을 위해 600bar 이하에서 운영됩니다.



Agilent Technologies

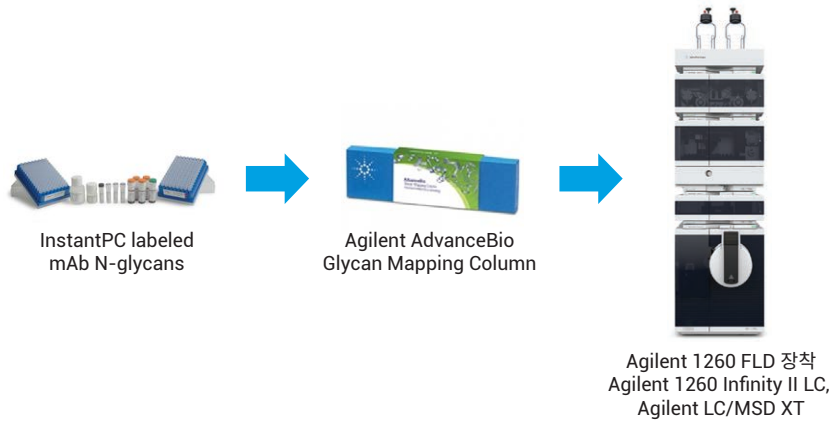


그림 1. 시료 전처리 흐름도, LC 컬럼, InstantPC labeled N-glycan 정량화 및 식별에 사용된 기기

실험

시료 전처리

단일클론항체(mAb) 시료는 실험실에서 자체 발현된 것이거나(CHO mAb 1), 씨그마-알드리치(SiLu Lite P/N MSQC4) 및 NIST (NIST mAb, Reference Material 8671) 에서 구입하였습니다. 모든 시료는 1 μ g/ μ L로 조정된후 Prozyme Inc.(GPPNG-PC)의 GlykoPrep-plus Rapid N-Glycan Sample Preparation(InstantPC (96-ct) 포함) 으로 처리됩니다. 시료 처리는 AssayMap Bravo Liquid Handling Platform(G5542A)을 이용해 자동화되었습니다. 이 프로토콜의 마지막 단계에서 50 μ L의 라벨링 처리된 글리칸을 용출하므로, 1 μ L 최종 시료 용액은 1 μ g의 mAb 로부터 Release된 N-glycan을 대표합니다. 이 워크플로는 어떤 원심분리 또는 건조 단계가 필요 없으므로 매우 간편합니다.

크로마토그래피 조건

펌프

Agilent 1260 Infinity II Binary Pump G7112B

이동상 A

50 mM Formic acid adjusted to pH 4.5 with ammonium hydroxide

이동상 B

Acetonitrile

시료 주입기

Agilent 1260 Infinity II Multisampler(G7167A), thermostat는 11 $^{\circ}$ C로 설정

컬럼

- AdvanceBio Glycan Mapping Column 1.8 μ m, 2.1 \times 100mm(method A에 사용)
- AdvanceBio Glycan Mapping Column 2.7 μ m, 2.1 \times 150mm(method B에 사용)
- AdvanceBio Glycan Mapping Column 1.8 μ m, 2.1 \times 150mm(method C에 사용)

컬럼 히터

Agilent 1260 Infinity II G7116 thermostatic column compartment(40°C로 설정된 G7116-60015 solvent preheater 포함)

컬럼은 8µL 플로우 셀(G1321-60005)이 장착된 Agilent 1260 Infinity Fluorescence Detector(G1321B)에 100µm id SSTL 튜브를 이용해 플래밍되었습니다. 검출기는 λEx = 285nm, λEm = 345nm, PMT gain = 10으로 설정되었습니다.

LC/MSD XT 파라미터

파라미터	값
Ion source	
소스	애질런트 Jet Stream(양이온 모드)
Sheath gas	300°C at 10.0L/min
건조 가스 온도	150°C at 9.0L/min
Nebulizer 압력	35psig
VCap	2,500V Nozzle: 500V
수집 설정	
질량 범위	500 ~ 1,400m/z
Fragmentor	100V
Gain EMV	1.0
Step size	0.10
피크 너비	0.2

소프트웨어

OpenLab CDS Chemstation Edition Rev C.01.07 SR3

시약

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

Gradient 표

Method A(2.1 × 100mm 1.8µm 컬럼)

시간(분)	%A	%B	유속(mL/min)
0.00	25.0	75.0	0.70
0.50	27.0	73.0	0.70
4.00	28.0	72.0	0.70
9.00	33.0	67.0	0.70
9.20	50.0	50.0	0.70
9.70	50.0	50.0	0.70
10.00	25.0	75.0	0.70
11.50	25.0	75.0	0.70
11.80	25.0	75.0	0.80
14.50	25.0	75.0	0.90
15.30	25.0	75.0	0.70

정지 시간 = 18분

Method B(2.1 × 150mm 2.7µm 컬럼)

시간(분)	%A	%B	유속(mL/min)
0.00	27.0	73.0	0.50
1.00	28.5	71.5	0.50
9.00	29.5	70.5	0.50
22.00	41.0	59.0	0.50
22.50	50.0	50.0	0.80
23.50	50.0	50.0	0.70
23.70	27.0	73.0	0.70
25.00	27.0	73.0	0.70
25.50	27.0	73.0	0.80
27.50	27.0	73.0	0.90
28.00	27.0	73.0	0.50

정지 시간 = 30분

Method C(2.1 × 150mm 1.8µm 컬럼)

시간(분)	%A	%B	유속(mL/min)
0.00	22.0	78.0	0.60
0.50	26.0	74.0	0.60
13.00	27.5	72.5	0.60
28.00	39.0	61.0	0.60
28.50	50.0	50.0	0.50
28.60	50.0	50.0	0.40
28.80	22.0	78.0	0.40
31.00	22.0	78.0	0.50
31.50	22.0	78.0	0.55
33.50	22.0	78.0	0.60

정지 시간 = 37분

결과 및 토의

분리

우리는 3개의 서로 다른 컬럼을 이용해 다양한 주기를 목표로 전형적인 치료용 mAb 글리칸 프로파일의 분리를 최적화하였습니다. 이 분석법은 완만한 gradient로부터 시작하여 대부분의 치료용 mAb 시료에 나타나는 대부분 중성 글리칸의 분리능을 극대화합니다. 보다 큰 산성 글리칸 구조를 더 효율적으로 용출하기 위해 경사 기울기를 높였습니다. 위에서 언급한 분석법은 견고성을 극대화하고 대부분의 LC 기기와 호환되도록 하기 위해 600bar 이하 압력을 유지하도록 설계되었습니다. 그림 2에서 3가지 분석법을 전부 표시하였으나, 나머지 실험에 대해서는 3가지 mAb N-glycan 샘플에서 최고의 성능을 발휘하는 것으로 나타난 분석법 C를 사용했습니다.

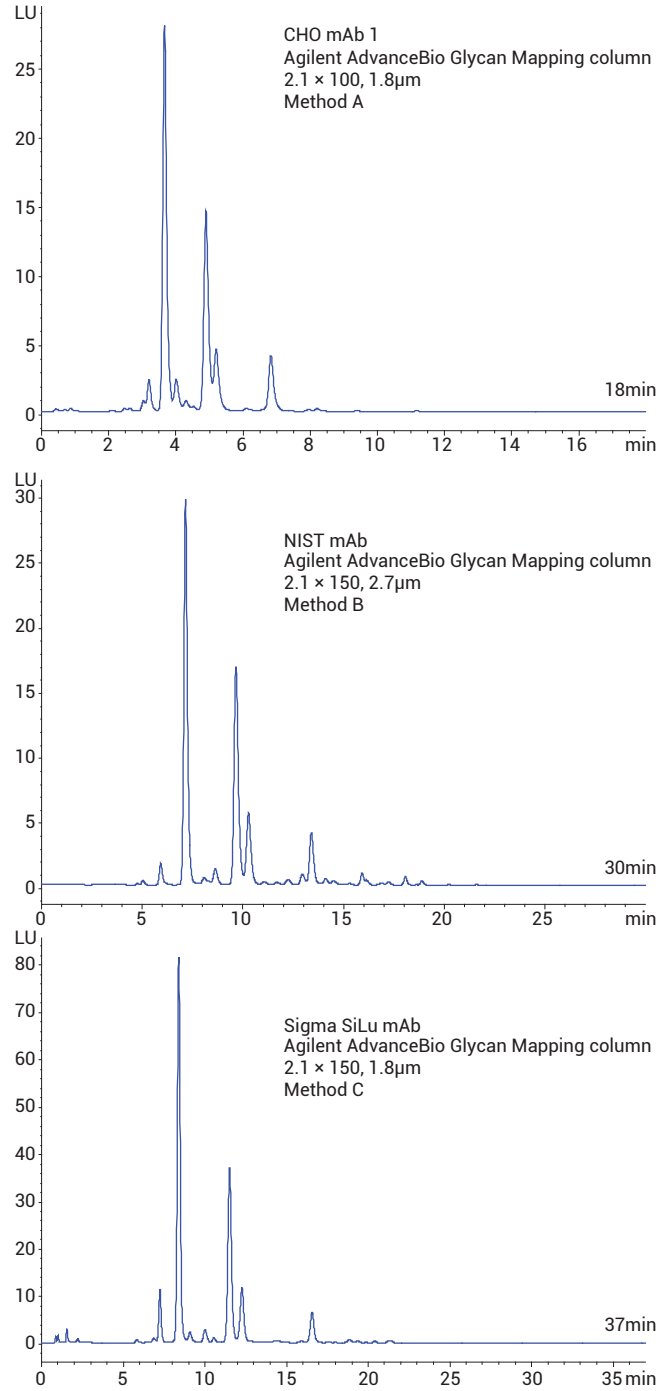


그림 2. 3개 mAb 시료에 각기 다른 컬럼 유형을 사용하는 3가지 분석법

LC/MSD XT의 감도

분석가들은 감도 문제 때문에 single quadrupole 질량 분석기를 N-glycan의 LC/MS 분석에 사용하는 것을 꺼려왔습니다. 그러나 2개의 기술적 혁신이 N-glycan의 검출 한계에 놀라운 향상을 가져왔습니다. 첫 번째 혁신은 고감도 Ion source인 애질런트 Jet Stream을 사용할 수 있게 된 것으로, 초고온으로 가열된 sheath gas를 electrospray plume 주위로 흘려보내 이온화도를 획기적으로 개선합니다. 두 번째 혁신은 Prozyme Inc의 InstantPC 태그를 사용할 수 있게 된 것으로, 이는 전통적인 형광 라벨에 비해 이온화도 효율성을 현저히 향상시켰습니다.

우리는 감도를 극대화하기 위해 MSD 파라미터를 최적화하였습니다. InstantPC-labeled N-glycan은 대부분 2가 전하 이온([M+2H]²⁺ 및 일부는 [M+NH₄+H]²⁺, [M+H+Na]²⁺)의 형태로 관찰되었습니다. 건조 가스 온도나 fragmentor 전압을 높이는 것은 N-glycan의 충돌 유도 분리(collision-induced dissociation)를 야기하고 Q-TOF가 성취할 수 있는 것과 유사한 강력한 구조 해석 전략을 제공할 수 있습니다(5991-5253EN 참조).

진단 신호를 얻은 글리칸은 전체 프로필의 0.1%에 불과합니다. 이 감도를 대체 워크플로와 비교했을 때, 이 결과는 시료 전처리 워크플로의 마지막에 사전 농축 단계를 추가하지 않고도 성취된 것이라는 점, 따라서 현저한 시간 절약 효과가 있다는 점을 기억해야 합니다. 시료를 건조시켜 저용량 시료 매트릭스에서 reconstitution하여 감도를 한층 더 향상시킬 수 있습니다.

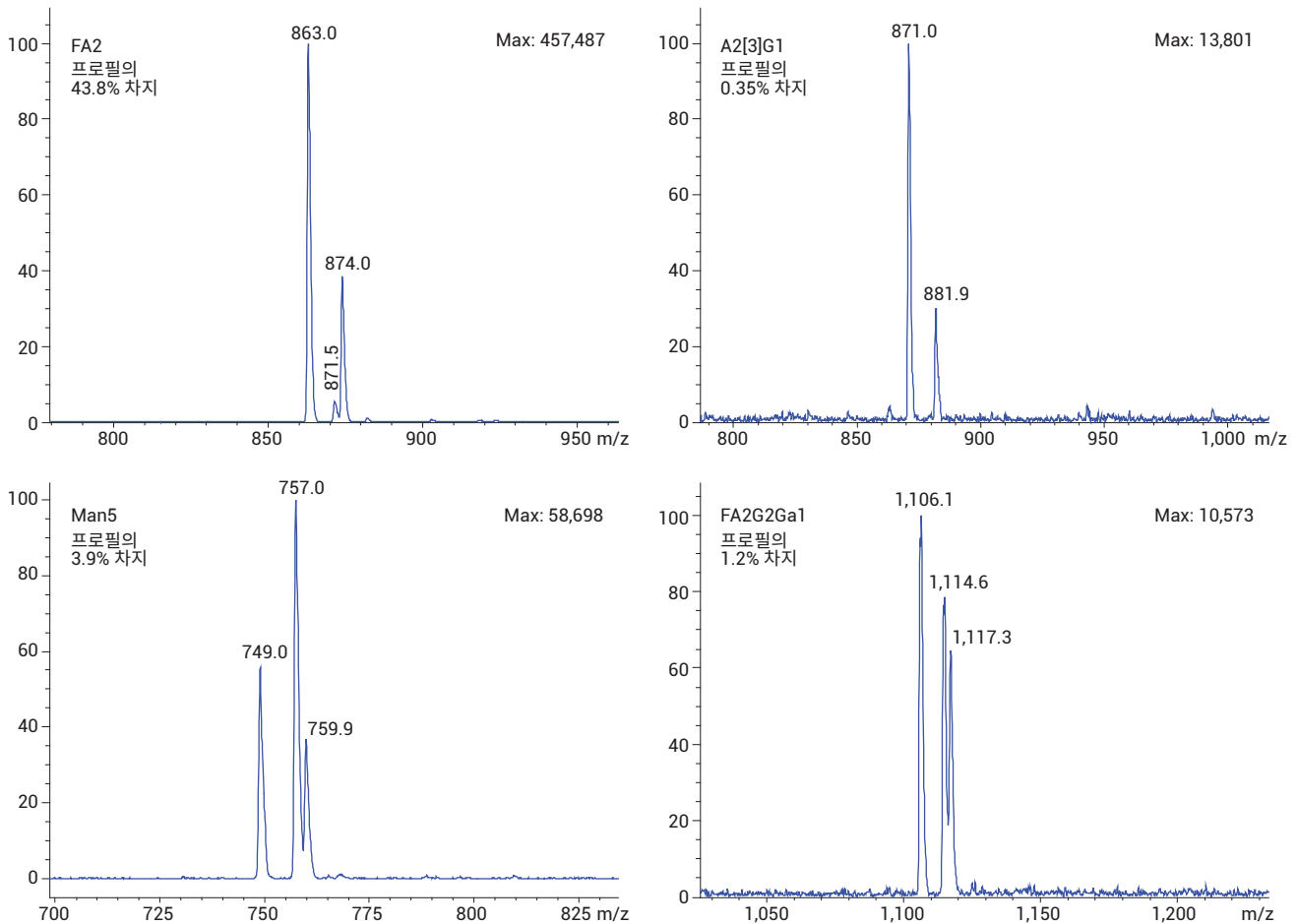


그림 3. 다양한 상대 존재비의 3µg mAb에서 유래한 4개 대표 글리칸의 질량 스펙트럼 글리칸 프로필의 단 0.35%만을 차지하는 A2[3]G1의 신호, 높은 신호 대 잡음 비율에서 뚜렷하게 관찰됨

피크 배정

3개 시료(분석법 C 사용) 데이터를 적분하였으며, 응용 자료 5991-5253EN에 나타난 것과 유사한 접근으로 피크의 글리칸 조성을 결정하였습니다.

참고: InstantPC 라벨링은 글리칸의 free reducing-end 형식에 비해 261.1477 m/z의 질량이 증가되게 됩니다.

표 1에는 3개 시료에서 검출된 글리칸 조성이 정리되어 있습니다. 글리칸 조성의 형태는 HxNxFxSgx + Core(H = Galactose 또는 Mannose, N = N-acetylglucosamine, F = Fucose, Sg = N-glycolylneuraminic acid, Core = trimannosyl, 모든 N-glycan의 핵심 구조)입니다. 대부분의 경우에 치료용 mAb 글리코실화 패턴과 HILIC 머무름 순서에 대한 기본 지식에 기반하여, 상기 조성으로부터 글리칸 구조를 추정할 수 있습니다. 대부분의 치료용 mAb가 유사한 범용 N-glycan 구조를 한정적으로 포함하고 있으므로, 표 1은 이 워크플로에 N-glycan을 배정하기 위해 유용한 참고 자료가 될 수 있습니다.

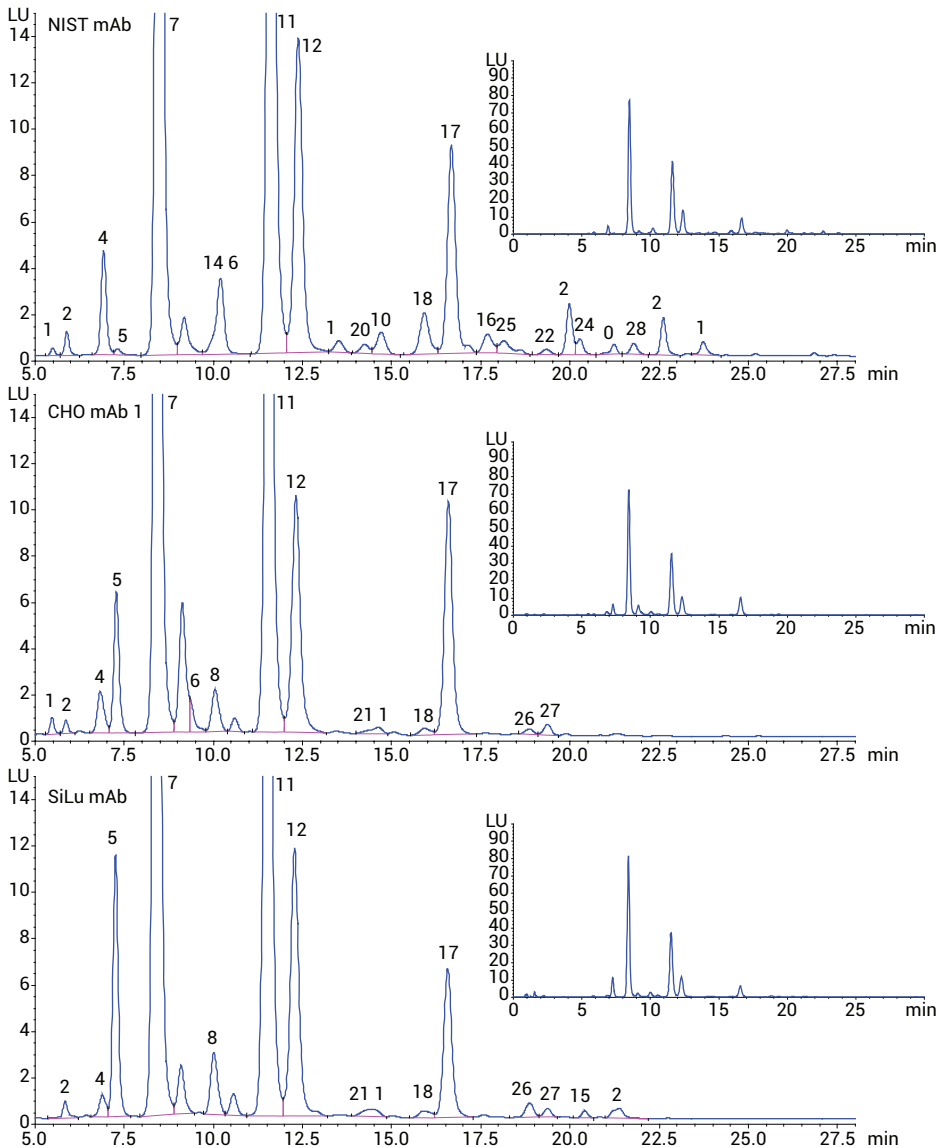


그림 4. 분석법 C로 분석된 메이저 및 마이너 글리칸 검출 결과가 나타난 3개 mAb N-glycan의 확대된 FLD 크로마토그램입니다(삼도는 줌아웃으로 축소된 데이터). 주석은 표 1 참조

표 1.

ID	관찰된 [M+2H] ²⁺	제안된 조성	이론적 [M+2H] ²⁺	제안된 구조	
				Oxford	대안
1	659.9	F1+Core	659.774	F1M3	G0F-2GlcNAc
2	688.4	N1+Core	688.284	A1	G1-GlcNAc
3	748.9	H2+Core	748.798	M5	Man5
4	761.5	N1F1+Core	761.313	FA1	G0F-GlcNAc
5	790.0	N2+Core	789.824	A2	G0
6	842.4	H1N1F1+Core	842.340	FA1G1	G1F-GlcNAc
7	863.0	N2F1+Core	862.853	FA2	G0F
8	871.0	H1N2+Core	870.851	A2[6]G1	G1
9	871.0	H1N2+Core	870.851	A2[3]G1	G1'
10	923.6	H2N1F1+Core	923.366	-	-
11	944.0	H1N2F1+Core	943.879	FA2[6]G1	G1F
12	944.0	H1N2F1+Core	943.879	FA2[3]G1	G1F'
13	952.0	H2N2+Core	951.877	A2G2	G2
14	964.7	N3F1+Core	964.393	FA2B	G0FB
15	991.9	H5+Core	991.877	M8	Man8
16	996.1	H1N1Sg1F1+Core	995.885	FA1G1Sg1	G1Sg1F-GlcNAc
17	1025.1	H2N2F1+Core	1024.906	FA2G2	G2F
18	1025.1	H2N2F1+Core	1024.906	FA2G1Ga1	G1F+αGal
19	1045.6	H1N3F1+Core	1045.419	FA2[6]B1G1	G1FB
20	1045.7	H1N3F1+Core	1045.419	FA2[3]B1G1	G1FB'
21	1089.5	H1N1F1S1+Core	1089.427	FA1G1S1	G1S1F-GlcNAc
22	1097.7	H1N2F1Sg1+Core	1097.425	FA2G1Sg1	G1Sg1F
23	1106.1	H3N2F1+Core	1105.932	FA2G2Ga1	G2F+αGal
24	1106.1	H3N2F1+Core	1105.932	FA2G2Ga1 iso	G2F+αGal'
25	1126.5	H2N3F1+Core	1126.446	FA2BG2	G2FB
26	1170.4	H2N2F1S1+Core	1170.454	FA2G2S1	A1F
27	1170.4	H2N2F1S1+Core	1170.454	FA2G2S1 iso	A1F iso
28	1178.7	H2N2F1Sg1 + Core	1178.451	FA2G2Sg1	Ag1F
29	1187.1	H4N2F1+Core	1186.959	FA2G2Ga2	G2F+(αGal)2
30	1207.7	H3N3F1+Core	1207.472	FA2BG2Ga1	G2FB+αGal
31	1259.4	H3N2F1Sg1+Core	1259.477	FA2G2Sg1Gal1	Ag1F+αGal
32	1316.2	H2N2F1S2+Core	1316.001	FA2G2S2	A2F

결과 표

FLD 크로마토그램의 피크가 총 글리칸 프로파일의 상대적 총 %값으로 나열되었습니다. 그림 5는 결과를 보여주고 있습니다.

프로파일의 일부는 동시에 용출되는 글리칸 구조를 나타내는 피크를 포함하고 있습니다. 동시에 용출되는 성분에는 마이너 글리칸이 포함되어 있으며, FLD를 이용한 정량 분석만으로 2개 구조가 결합된 피크 영역을 보고하게 됩니다.

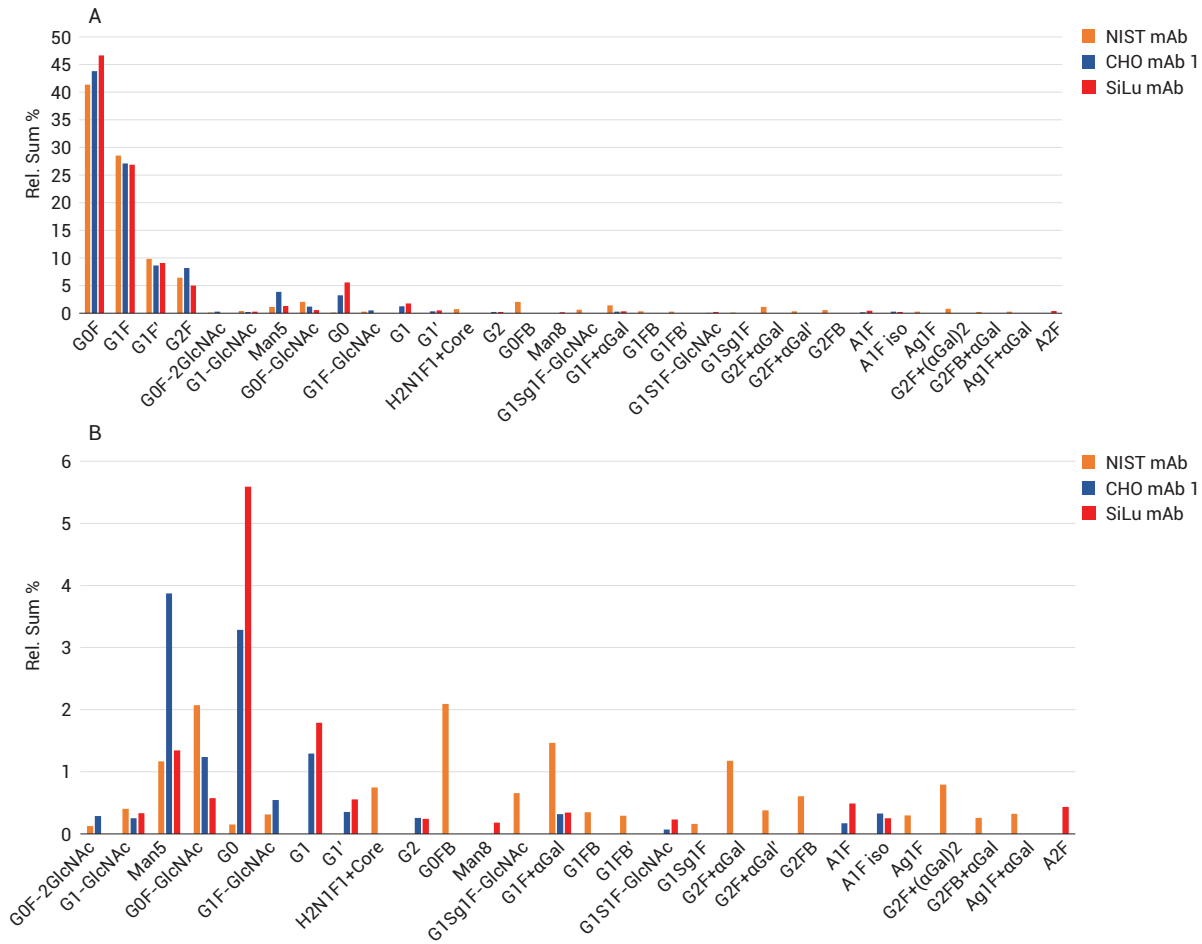


그림 5. A) 3개 mAb 시료 내 N-glycan의 상대적 존재비 B) 마이너 성분만을 보여주는 확대된 차트 마이너 글리칸은 1% 이하에서 쉽게 검출됨

이 낮은 존재비의 동시에 용출되는 물질의 구조에 대한 정확한 정량화를 필요로 할 경우, FLD를 보완할 수 있는 LC/MSD XT 데이터를 제안해드립니다. 질량 스펙트럼은 동시에 용출되는 FLD 피크에 대응하는 시간대에서 적분을 할 수 있습니다. 그다음 이 스펙트럼의 2가 전하 N-glycan 이온의 결합된 상대 세기를 근거로, FLD 영역을 다른 구조로 배분할 수 있습니다. 우리는 이전에 InstantPC 라벨링 MS 신호가 형광 세기로 정의된 진정한 존재비와 긴밀히 연관된다는 점을 보인 바 있습니다(5991-6958EN 참조).

결론

single quad 기술에 기반을 둔 Agilent LC/MSD XT는 일반적인 UHPLC HILIC-FLD 시스템과 온라인상에서 결합하여 모든 샘플 내 모든 피크에 대한 mass spec 기반의 식별 옵션을 제공할 수 있습니다. 애질런트의 Jet Stream Ion source와 InstantPC 글리칸 태그의 조합으로, 일반적 항체 시료를 분석할 때 농축 절차 없이도 메이저 및 마이너 피크 모두의 MS 신호를 감지할 수 있는 충분한 감도를 제공합니다. 일반적인 단일클론항체 시료에서 이는 믿을 수 있는 글리칸 구조 배정을 가능케 합니다. 이 응용 자료에서는 형광 검출에 대한 전통적인 상대적 정량화 기반 접근법이 사용되었으나, 공용출 피크의 경우에 MS 데이터가 정량화를 보조하기 위해 쓰일 수 있습니다.

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다.
애질런트 제품에 대한 더 자세한 정보를 알아보시려면
www.agilent.com/chem을 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 자료의 오류 또는 장비의 설치, 성능, 이 자료의 사용 등과 관련된 사고나 결과적 손상에 대해 법적 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017

2017년 5월 22일

한국에서 발행

5991-8071KO

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



Agilent Technologies