

LC|GC's **CHROM**academy

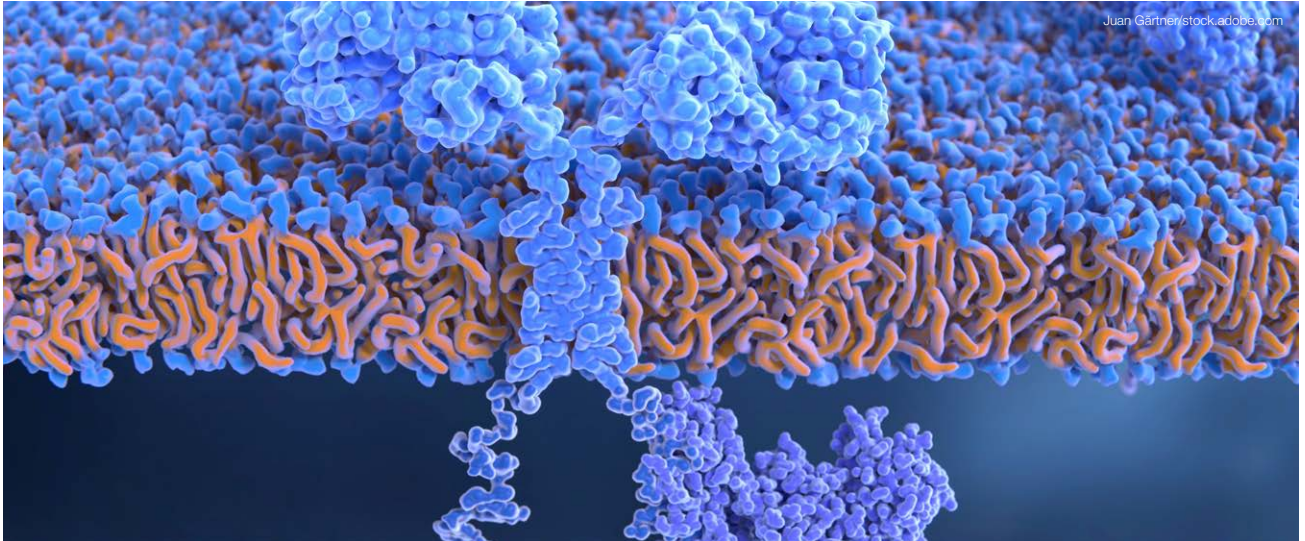
powered by crawford scientific

생체분자의 분리, 식별 및 정량을 위한 새로운 솔루션

당단백질의약품의 당화
및 시알산 분석

생체분자 분리를 위한 2차원
액체 크로마토그래피

SARS-CoV-2 스파이크
글리코펩타이드의 식별,
맵핑 및 정량화



당단백질의약품의 당화 및 시알산 분석

John Yan

**플레이트 기반
및 LC/FLD/MS
접근법을
사용하여 다양한
시알릴화
N-글리칸
종을 식별하고
당단백질의약품의
시알산 함량을
정량하기 위한
방법.**

서론

시알산은 재조합 치료용 당단백질의 효과를 조정하는 중요한 역할을 합니다. 글리칸의 비환원 말단에서 시알산의 존재 여부는 단백질 바이오의약품의 약동학뿐만 아니라 잠재적인 면역원성에도 영향을 미칠 수 있습니다. 결과적으로, 제조 과정에서 시알화를 모니터링하고 제어해야 합니다. 이 문서에서는 플레이트 기반 및 형광(FL)과 질량 분석(MS)을 포함한 액체 크로마토그래피(LC) 기법을 다양한 시알릴화 N-글리칸 종을 식별하고 당단백질의약품의 시알산 함량을 정량하는 방법을 제시합니다. 또한 N-글리칸 분석을 위한 형광 염료의 이점, 개선된 시알산 정량 및 분석 워크플로, 그리고 형광 및 질량 분석(MS) 검출을 모두 활용하는 크로마토그래피 분리 옵션에 대해서도 설명합니다.

당단백질의약품의 당화 및 시알산 분석

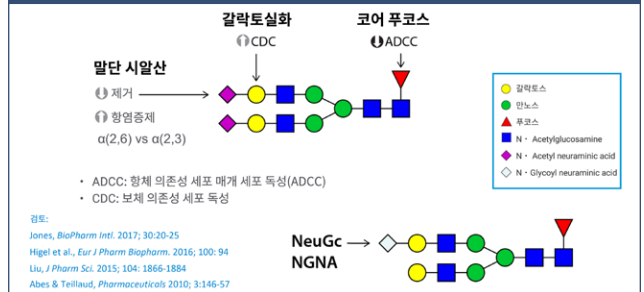
글리코실화된 바이오의약품

글리코믹스는 유전체학 및 단백질체학만큼 관심을 받지 못했지만 SwissProt 데이터베이스에 있는 모든 단백질의 5분의 1이 글리코실화된 것으로 알려져 있습니다. 당화는 단백질 접힘, 안정성 및 기능에 영향을 미치고 당화 부위, 글리칸 조성, 글리칸 길이 및 구조의 차이를 기반으로 다양성을 부여할 수 있습니다. 시판되는 바이오의약품의 60% 이상이 글리코실화되어 있습니다. 당화는 주요 품질 속성일 수 있으며 제품 품질 속성으로 모니터링될 수 있습니다. 당화의 두 가지 주요 유형은 O-연결 글리칸과 N-연결 글리칸의 첨가이지만, 정의된 공통서열 내에서 아스파라긴 잔기의 아미드 질소에 글리칸이 부착되는 N-연결 당화가 바이오의약품에서 가장 많이 볼 수 있는 당화 유형입니다.

2010년에 Epogen은 가장 많이 판매된 상위 10개 의약품 중 유일한 생물학의약품이었으며, 우연치 않게도 글리코실화된 의약품입니다. 2018년으로 시간이 빠르게 흐르면서 가장 많이 판매된 상위 10개 의약품 중 7개는 글리코실화된 생물학의약품이었으며, 그 중 가장 많이 판매된 제품은 Humira로, 이는 제약 산업이 바이오의약품으로 전환하고 있음을 잘 보여줍니다.

바이오의약품은 분석 특성 규명의 관점에서 저분자보다 훨씬 더 복잡합니다. 예를 들어, 저분자 약물인 아스피린의 분자량은 약 180Da입니다. 이와 대조적으로, 면역글로불린 G(IgG)를 기반으로 하는 바이오의약품은 약 150,000Da의 분자량을 가지며 약물 작용에 영향을 미칠 수 있는 다양한 번역 후 변형(PTM)

그림 1: 바이오의약품에 미치는 N-글리칸 구조의 영향.



(당화 포함)을 가지고 있습니다. 글리칸은 그림 1과 같이 푸코스, 만노스, 갈락토스, N-아세틸글루코사민 및 다양한 시알산과 같은 여러 단당류 단위로 구성됩니다. 코어 푸코스 (core fucose)는 암 치료제에 중요한 항체 의존 세포독성(ADCC)을 감소시킵니다. 이러한 이유로 바이오의약품을 개발하는 회사들은 ADCC 활성을 최대화하기 위해 코어 푸코스의 양을 줄이려고 할 수 있습니다. 갈락토실화는 보체 의존 세포독성(CDC) 활성을 증가시킬 수 있는 반면 말단 시알산은 제거율을 낮추어 치료제가 체내에 머무는 시간을 증가시킬 수 있다는 것이 문헌에서 밝혀졌습니다.

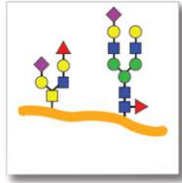
N-글리칸 분석

N-글리칸 분석에는 다양한 기술을 사용할 수 있습니다. Intact 단백질 수준에서 LC 분리는 고분해능 정밀 질량 분석법과 결합하여 글리칸 유형의 존재에 대한 정보를 제공할 수 있습니다. 또 다른 방법은 단백질 분해효소를 사용하여 당단백질을 펩타이드로 분해하여 LC로 분리한 후, Tandem MS로 분석하고 데이터베이스에서 검색하는 식으로 부위별 당화 정보를 얻는 것입니다. 또 다른 접근 방식은 PNGase F와

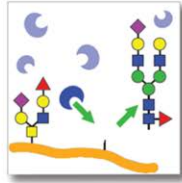
당단백질의약품의 당화 및 시알산 분석

그림 2: Gly-X N-글리칸 시료 전처리 기술.

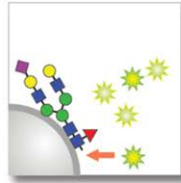
1~40µg 당단백질 시료*, 0.05~2mg/mL



변성
90°C에서 3분

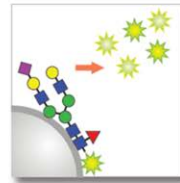


탈당화
PNGase F, 50°C에서 5분

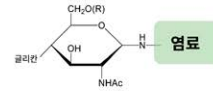


표지
InstantDye, 1분
Instant PC, Instant CI, Instant AB

환원 아미노화 염료, 60분
(건조 단계 없음)
2-AB, APTS



클린업
상온에서 15~20분



표지 N-글리칸
LC/FLD, LC/MS, CE



워크플로 시간: 45~120분(16 시료)

*로딩 범위는 단백질에 따라 다르며 mAb의 경우 최대 100µg까지 가능합니다(예: Rituxan)

같은 효소를 사용하여 당단백질에서 N-글리칸의 효소 유리를 분석하는 것입니다. 방출된 글리칸은 있는 그대로 분석하거나 일반적으로 형광 태그로 표지하여 형광을 이용한 LC 또는 모세관 전기영동(CE) 분리 기술을 적용하는 것입니다. 이 경우, 얻어진 데이터는 일반적으로 다른 글리칸 종의 상대적 면적 %로 표현됩니다.

글리칸은 또한 산 가수분해 후 직접 또는 형광 태그로 표지한 후 개별 단당류 수준에서 모니터링할 수 있습니다.

N-글리칸 시료 전처리

기존의 N-글리칸 시료 전처리는 밤새 탈당화와 표지 단계를 거치기 때문에 하루에서 수 일이 소요될 수 있는 매우 시간 소모적인 과정일 수 있습니다. 몇 년 전, 2-aminobenzamide (2-AB) 및 aminopyrene trisulfonate와 같은 기존의 환원성 아민화 형광단을 사용하여 시료

전처리 시간을 5시간으로 단축하는 올인원 솔루션 워크플로가 도입되었습니다. 신속한 글리코실아민 반응성 염료를 사용하여 추가 개선이 이루어짐에 따라 전처리 시간이 3~4시간으로 단축되었습니다. 보다 최근에는 AdvanceBio Gly-X 시료 전처리 플랫폼이 도입되었습니다. 이 새로운 플랫폼은 환원성 아민화(2-AB, APTS)의 경우 전처리 시간을 2시간으로 단축하고, 즉각적인 글리코실아민 반응성 염료(InstantPC)를 사용하여 1시간 미만으로 단축합니다.

AdvanceBio Gly-X N-글리칸 시료 전처리 플랫폼의 모식도를 그림 2에 나타내었습니다. 먼저 당단백질을 90°C에서 3분 동안 고유 시약으로 변성시켜 단백질을 전개시킨 후, 50°C에서 5분 동안 PNGase F로 탈당화합니다. 다음으로, 약 1분 내에 글리코실아민 반응성 염료 InstantPC와 같은 형광단으로, 또는 60분

당단백질의약품의 당화 및 시알산 분석

내에 2-AB와 같은 환원성 아민화 염료로 방출된 글리칸을 표지됩니다. 표지 후, 표지된 글리칸을 세척하여 과도한 염료를 제거한 다음 분석할 준비가 끝납니다.

InstantPC 표지 N-글리칸의 분리

형광 표지된 글리칸의 분리 및 분석에 일반적으로 사용되는 분석법 중 하나는 형광 검출을 사용한 친수성 상호작용 LC(HILIC)입니다. 인라인 MS 검출은 또한 다양한 글리칸 종을 식별하는 데 도움이 되는 선택입니다.

그림 3에는 IgG 치료제인 rituximab에서 InstantPC 표지 글리칸을 분리하고 분석하는 데 사용되는 60분 HILIC 그래디언트 분석법이 간략하게 소개되어 있습니다.

MS 검출도 사용됩니다. **그림 4**는 Enbrel의 표지 N-글리칸에 대한 총 이온 크로마토그램 반응을 나타냅니다. InstantPC 표지 시료에 대한 MS 총 이온 크로마토그램은 형광 반응을 거의 똑같이 반영하는 것으로 볼 수 있으며, 이는 낮은 존재비의 글리칸 종을 식별하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 또한 MS를 사용할 수 없는 경우 식별 작업에 도움이 될 수 있는 다양한 표지 N-글리칸 표준물질이 있습니다. 여기에는 중국 햄스터 난소 세포에서 발현되는 IgG 분자에 존재할 가능성이 있는 일반적인 biantennary N-글리칸과 같은 개별 글리칸 표준물질 외에도 인간 IgG 및 alpha-(2,6), alpha-(2,3)-sialylated와 같은 사전 표지된 글리칸 라이브러리가 포함됩니다.

2-AB 워크플로

2-AB는 유리 글리칸 분석에 지금까지 일반적으로 사용되어 온 염료입니다. 2-AB를 사용하는 기존 워크플로는 시간이 많이 걸릴

수 있지만 업데이트된 효율적인 워크플로를 이용할 경우 2-AB 표지 방식은 빠른 워크플로의 이점을 원하면서 새 데이터를 기존 데이터와 연관시키고자 하는 경우에 적합할 수 있습니다. AdvanceBio Gly-X 기술을 사용하는 빠른 워크플로를 **그림 2**에 나타내었습니다. 친숙한 용액 내 변성 및 탈당화 단계에 96-well 클린업 플레이트의 온-매트릭스 환원성 아민화가 사용되므로 추가적인 건조 단계가 필요하지 않습니다. 표지 후 글리칸을 정제하여 과도한 염료를 제거하면 분석할 준비가 끝납니다. 전처리 시간은 약 2시간으로, 이전 분석법보다 시간을 크게 단축할 수 있습니다. **그림 5**는 리톡시맙으로부터 글리칸을 분리하고 분석하는 예를 보여줍니다. 여기에는 모든 주요 글리칸 종에 대해 낮은 % CV를 갖는 biantennary 중성 2-AB 표지 글리칸 G0F, G1F 및 G2F의 경우가 나와 있습니다.

시알산 정량

시알산은 치료제용 당단백질의 효과를 조정하는 데 중요한 역할을 합니다. N-글리칸 또는 O-글리칸의 비환원 말단에서 시알산의 존재 여부는 단백질의 약동학뿐만 아니라 면역원성에도 영향을 미칠 수 있습니다. 따라서 단백질 치료제의 시알산 함량을 관리하고 제어하는 것이 필수적입니다. AdvanceBio 총 시알산 정량 키트는 총 시알산 정량을 민감하고 처리량이 높은 접근 방식을 제공합니다. 96-well 플레이트 기반 분석은 sialidase-A에 의해 방출된 시알산을 과산화수소로 전환하는 것으로 시작하는 효소 반응을 기초로 하며, 이 반응은 형광 염료와 일대일로 반응하여 강렬한 형광 또는 흡광 신호를 생성합니다. 당단백질마다 당화의 양이 다를 수 있으며, 이는 시알화의 양도 다름을 의미합니다. 결과적으로, 양호한

당단백질의약품의 당화 및 시알산 분석

그림 3: Rituximab InstantPC 글리칸.

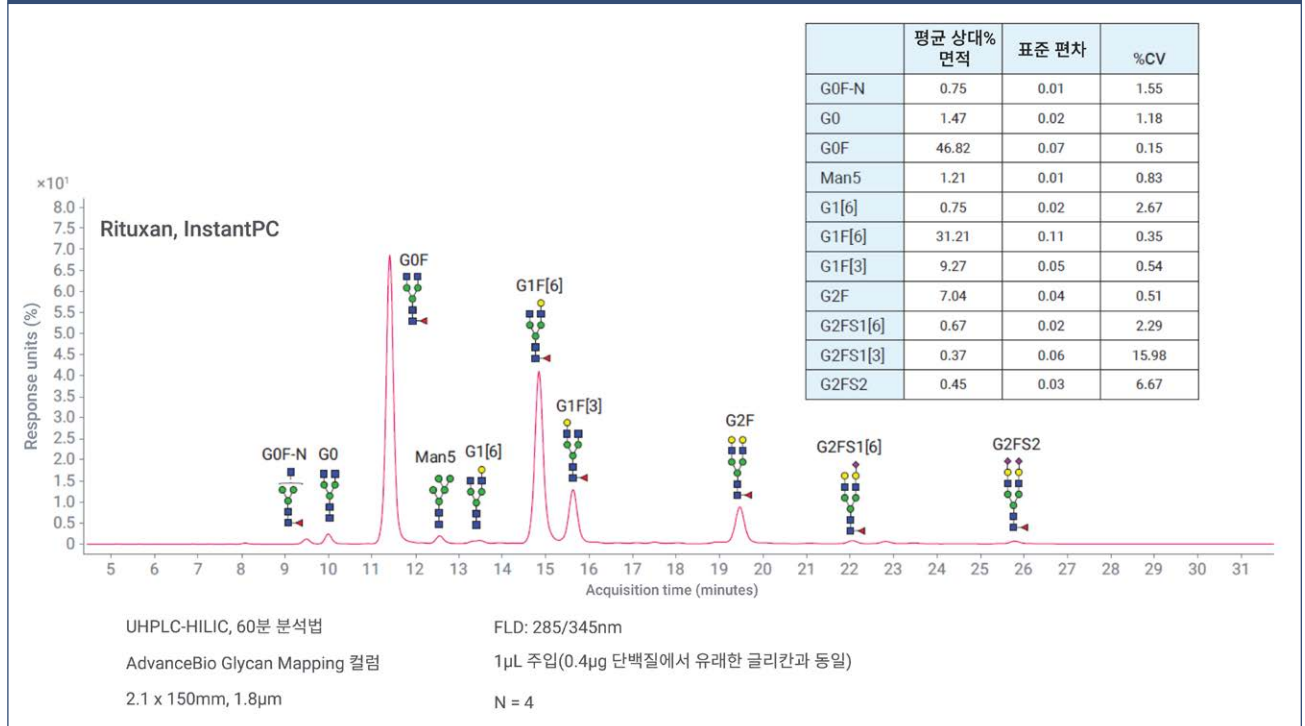
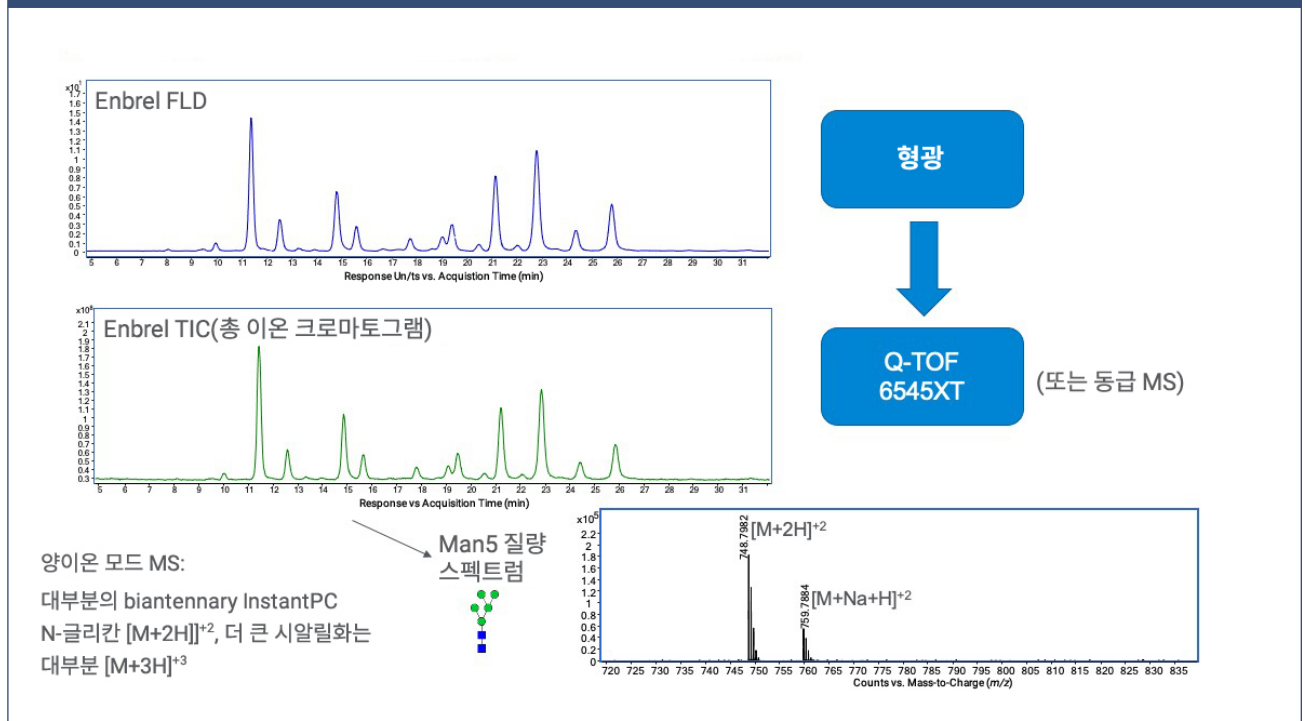


그림 4: Enbrel의 InstantPC N-글리칸용 MS 총 이온 크로마토그램.



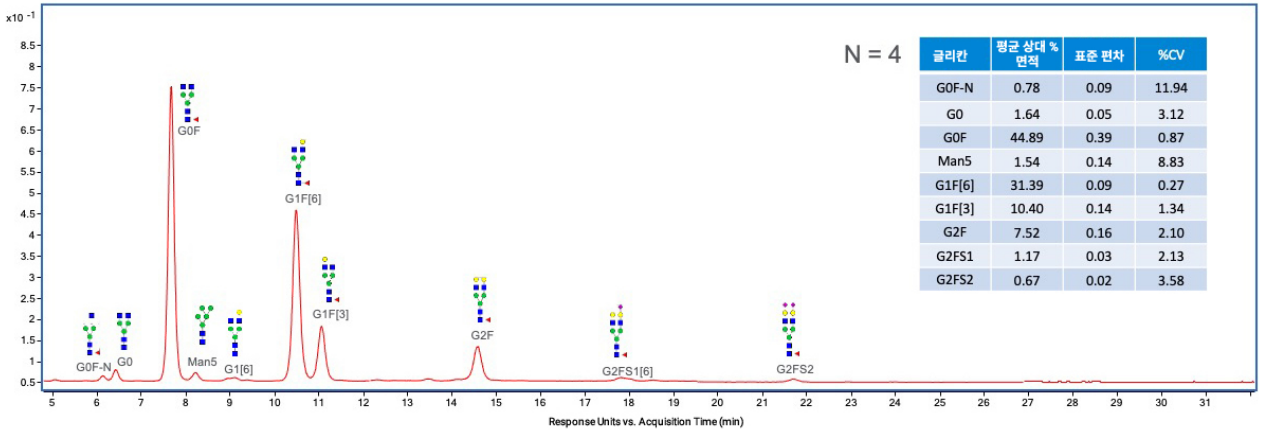
당단백질의약품의 당화 및 시알산 분석

그림 5: Rituximab Gly-X 2-AB Express N-글리칸.

분석법:

UHPLC-HILIC, 60분 분석법, 1µl 주입(0.4µg 단백질에서 유래한 글리칸과 동일), FLD: 260/430nm

AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼, 2.1 x 150mm, 1.8µm



신호를 제공할 단백질 양으로 시작하는 것이 중요합니다. 예를 들어, MabThera는 시알산 함량이 낮아 더 많은 양의 단백질이 필요한 반면, fetuin이나 Enbrel은 시알산 함량이 높아 더 적은 양의 단백질이 필요합니다.

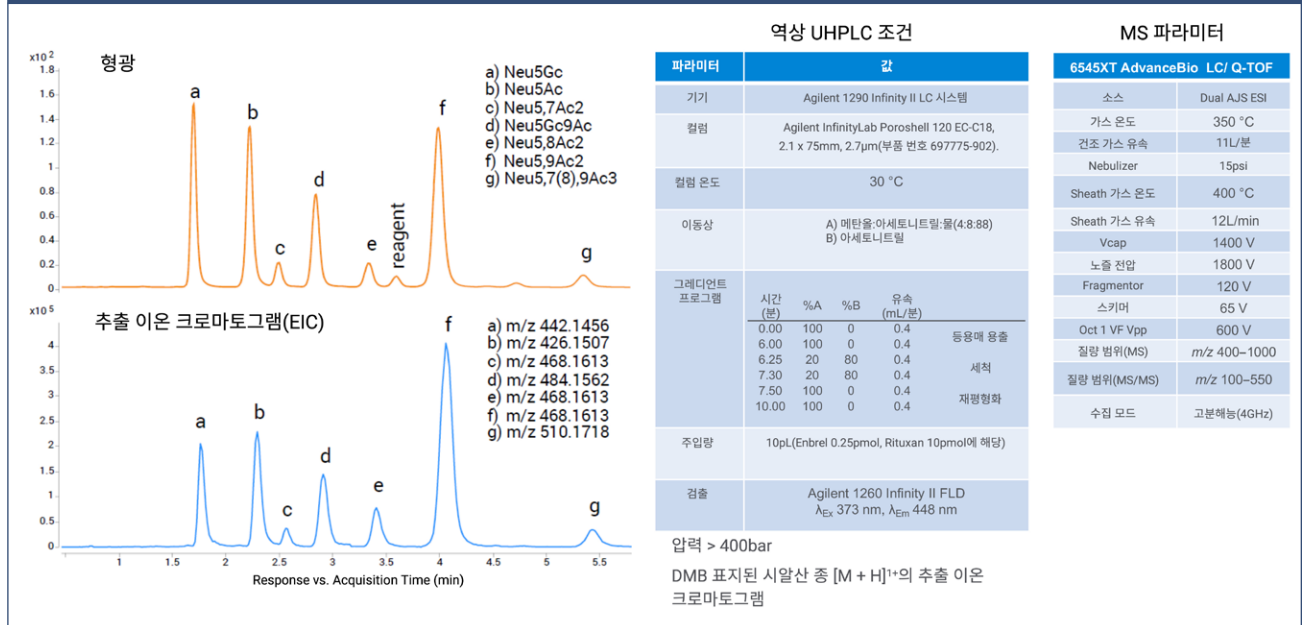
N-acetylneuraminic acid(NANA) 및 N-glucoylneuraminic acid(NGNA)는 히드록시기(NGNA)가 추가된 것만 제외하고 구조가 유사합니다. 작은 차이지만 이로 인해 NGNA가 인간에게 면역원성을 가질 잠재력은 충분합니다. 이 두 가지 유형의 시알산을 구별하기 위해 일반적으로 사용되는 한 가지 방법은 글리칸에서 시알산을 방출하여 염료인 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene-2HCl(DMB)로 표지하는 것인데, 바로 이 프로세스가 정량 NANA 및 NGNA 표준물질도 함께 포함하고 있는 AdvanceBio 시알산

프로파일링 및 정량화 키트에 이용됩니다. 표지 후에는 형광 및/또는 MS에 의한 LC 분리와 검출이 이어집니다. DMB로 표지된 다양한 유형의 시알산 혼합물인 시알산 참조 패널의 분석 예를 그림 6에 나타내었습니다. 여기서는 LC를 사용한 후 형광 및 MS 검출을 수행합니다. 크로마토그램의 처음 두 피크는 각각 NGNA와 NANA이고, 크로마토그램의 나머지 피크는 자연에서 관찰되는 다양한 형태의 시알산입니다.

“N-글리칸 또는 O-글리칸의 비환원 말단에서 시알산의 존재 여부는 단백질의 약동학뿐만 아니라 면역원성에도 영향을 미칠 수 있습니다.”

당단백질의약품의 당화 및 시알산 분석

그림 6: DMB 표지 시알산 참조 패널(SARP).



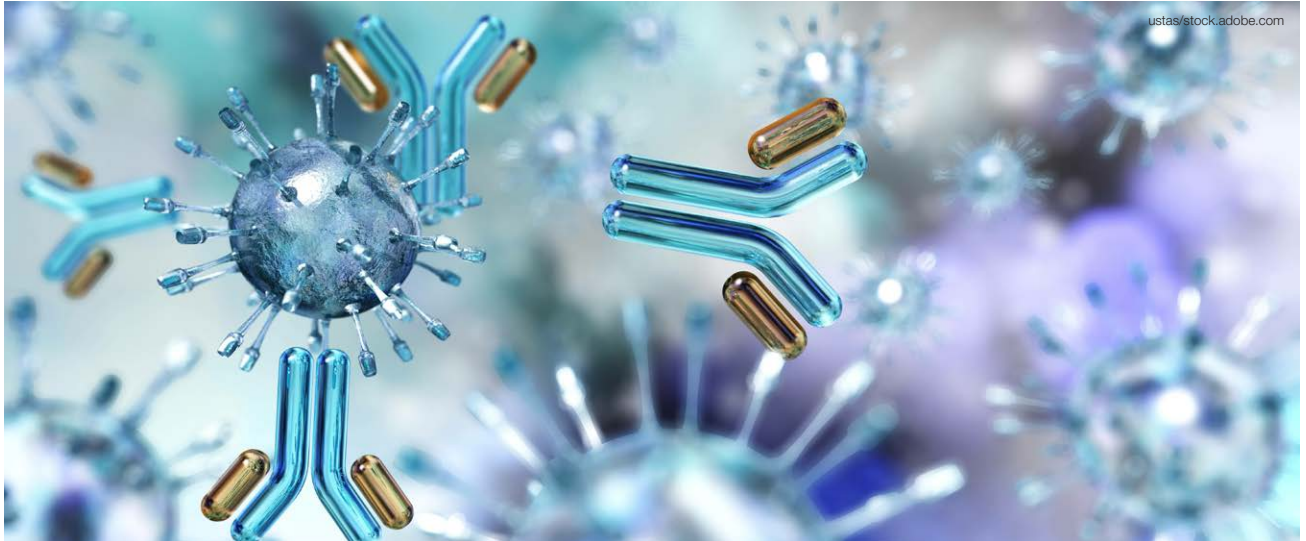
결론

일반적인 당단백질의약품에 존재하는 N-글리칸을 전처리, 분리, 검출 및 식별하기 위해 다양한 도구를 사용할 수 있습니다. AdvanceBio Gly-X 시료 전처리 키트와 같은 최신 워크플로에는 형광 검출을 통한 정량을 위해 글리칸을 빠르게 방출, 표지 및 분리하는 기술이 활용됩니다. 이러한 새롭고 신속한 시료 전처리 워크플로 외에도 InstantPC와 같은 새로운 염료의 높은 이온화 효율 덕분에 MS로 방출된 글리칸의 특성을 강력하게 프로파일링할 수 있습니다. 이러한 새로운 워크플로에는 2-AB와 같은 기존의 글리칸 표지 지정 염료도 사용할 수 있어, 새로운 데이터와 기존 데이터를 관련시키려는 경우에 편리하고 빠른 시료

전처리가 가능합니다. 유리 글리칸 분석 외에도 애질런트는 시알산 정량 및 프로파일링을 위한 제품을 제공하여 글리코실화된 바이오의약품 분석을 위한 강력한 도구 키트를 완성시킵니다.

John Yan

John Yan 박사는 애질런트 소속 응용 화학자입니다.



생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

Dwight R. Stoll

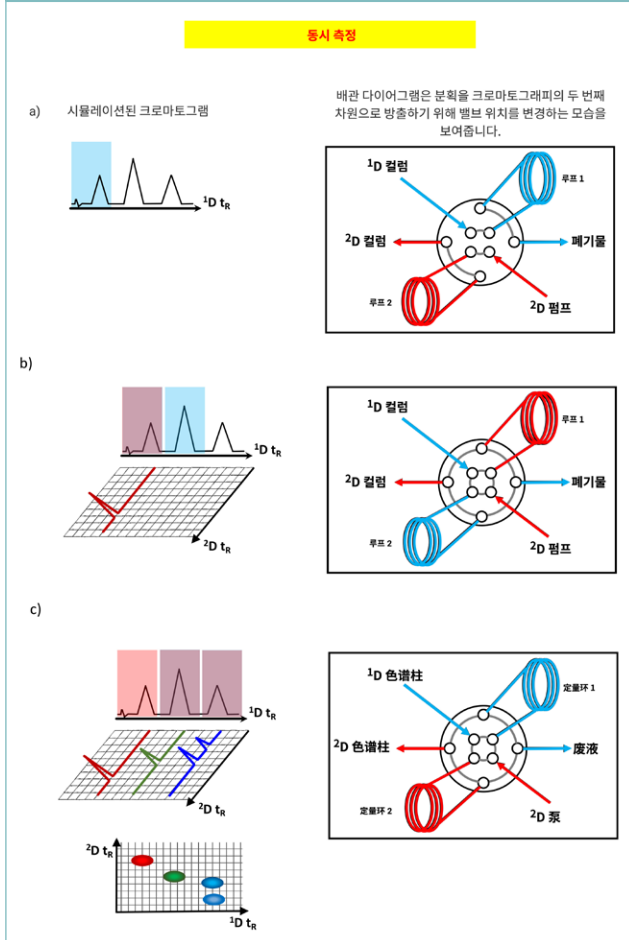
2D 액체 크로마토그래피의 기초 및 바이오 분석의 현대적 응용

서론

기존의 1차원 액체 크로마토그래피(1D-LC)가 바이오 분석에서 중요한 도구로 남아 있지만 또 다른 차원의 크로마토그래피 분리를 추가한다면 더욱 효과적일 수 있습니다. 두 개의 컬럼을 직렬로 사용하는 분석 분리 또는 2차원 액체 크로마토그래피(2D-LC)를 도입하여 분리 시간을 불편할 정도로 늘리지 않으면서 분석물질 분해능을 상당히 높일 수 있습니다. 특정 혼합물 조건 및 표적 분석물질에 대한 분리 파라미터를 알맞게 조정하면 2D-LC의 분석 수율을 극대화하는 데 도움이 됩니다. 본 요약문은 2D 액체 크로마토그래피 분리의 개념을 소개하며, 2D-LC의 몇 가지 주요 모드와 작동 원리를 다룹니다. 또한 2D-LC가 바이오 분석 문제를 해결하는 데 실질적인 이점을 제공하는 이유를 보여주는 관련 예도 제시합니다.

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

그림 1: 2차원 액체 크로마토그래피의 작동 방식.



2D-LC 분리 기초

생체분자 분석에서는 단순해보이는 시료일지라도 크로마토그래피 분리에서 피크가 식별되지 않을 정도로 복잡한 경우를 자주 볼 수 있습니다. 결과적으로, 액체 크로마토그래피 한 단계만 거쳐 혼합물에서 종을 분리하기 어려운 경우가 있을 수 있는데, 이성질체 혼합물과 같이 구조적으로 밀접하게 관련될 수 있는 분석물 또는 분석물 식별이 필요하지만 알려지지 않은 종의 경우에 특히

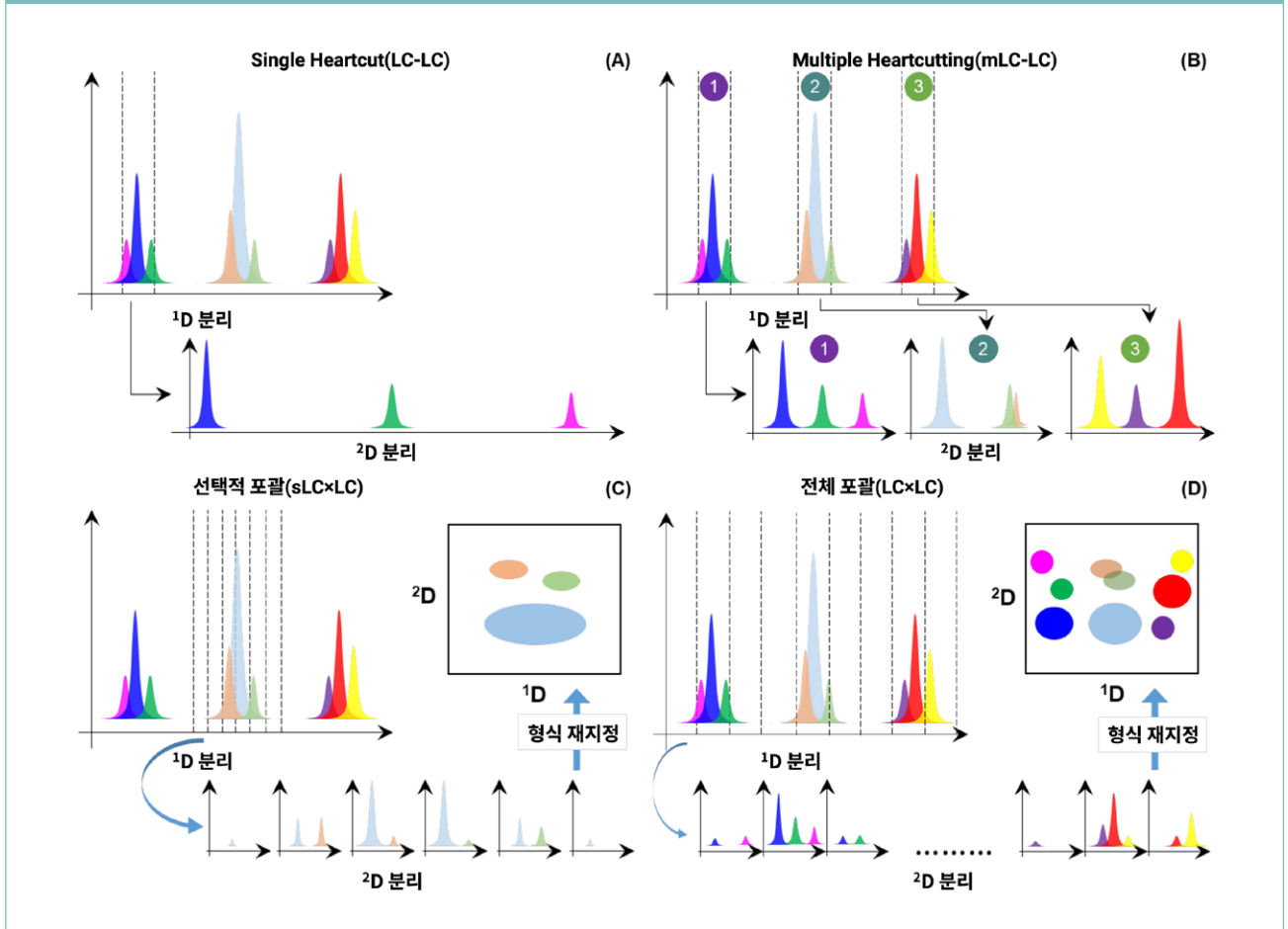
그렇습니다. **그림 1A**는 이상적인 예를 나타내지만 시뮬레이션하여 나타낸 크로마토그램은 두 개의 LC 차원을 사용하는 것이 중요한 이유를 명확히 알려줍니다. 크기 또는 전하와 같은 단일 속성에 따른 분리로 충분한 분석물 분해능이 얻어지지 않는 상황에서는 분석물을 두 속성으로 분리하여 화학 종을 완전히 분리할 수 있습니다.

2D-LC에서 관찰된 분리의 향상 정도를 수치화하는 방법으로서, 일반적으로 사용되는 피크 용량 측정법은 1D-LC용 컬럼을 단순히 연장하는 것보다 두 번째 LC 차원을 도입하는 것이 분석적으로 얼마나 더 가치가 있는지를 수치적으로 보여줄 수 있습니다. 크로마토그래피의 각 차원에 대해 분석 측정은 기본적으로 분리의 효율성과 기기 응답 듀티 사이클에 따라 여러 빈으로 그룹화됩니다. 그러면 시간 경과에 따른 기기 응답이 있는 선행 빈 집합이 생성됩니다. 두 번째 차원이 추가되면 피크 용량이 곱해져서 2D 측정 빈 집합이 생성됩니다. 보완 컬럼과 분리 조건을 신중하게 선택하면 이 분리 공간을 활용하여 이전에 분해되지 않은 분석물을 식별할 수 있습니다. 또한 주어진 분석의 필요에 따라 두 번째 차원을 추가할 수 있습니다. 2D-LC 작동 모드에서는 두 번째 차원(2D)의 분리 단계를 표적화하여 적용할 수 있습니다.

1D-LC와 마찬가지로 2D-LC에 필요한 계측에는 스위칭 밸브의 사용이 포함되지만 시료 주입 타이밍을 위한 일부 추가 구성요소가 있습니다. 밸브 전환의 적절한 타이밍과 두 시료 루프의 로딩으로 분리 프로세스가 두 컬럼에서 동시에 이루어집니다(**그림 1B**). 1D 컬럼에서 나온 유출물의 일부는 알려진 부피의 시료 루프로 우회되고, 채워진 후에는 시료 루프 내의 용액이 2D 컬럼에 주입됩니다. 결과적으로, 첫 번째

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

그림 2: 2D 분리 모드(6).



차원(1D)에서 분리된 부분이 두 번째 컬럼에 주입되기 전에 효과적으로 풀링됩니다. 2D-LC의 크로마토그래피 데이터는 각 1D 피크의 분석물이 2D 조건에 따라 어떻게 추가로 분리되는지 보여줍니다. 1D를 넘어 2D에서 이루어질 수 있는 성분의 추가적인 후속 분리는 2D 크로마토그램에서 추가 피크로 나타납니다.

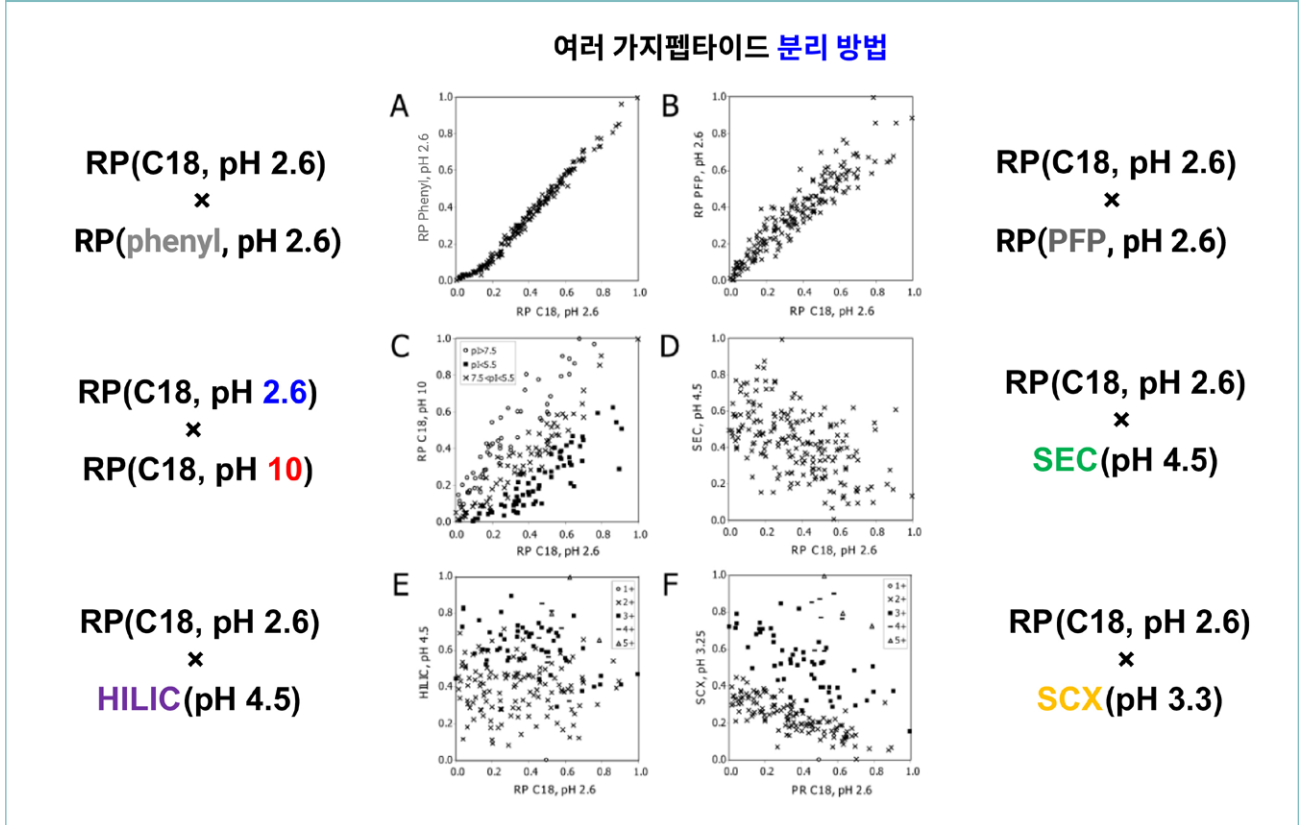
응용 분야별 2D-LC 작동 모드 타겟팅

2D-LC의 범위 내에는 두 가지 기본 작동 모드와 기본 작동 모드가 효과적으로 혼합된 두 가지 모드가 있습니다. 이 네 가지 모드가 그림 2에 모두 나와 있습니다.

첫 번째 기본 작동 모드는 Single Heartcut으로 알려져 있으며 줄여서 LC-LC로 표기합니다 (그림 2A). Single Heartcut 2D-LC의 접근 방식에서는 단일 피크 또는 피크 클러스터와 같은 1D 크로마토그램의 단일 시간 세그먼트에서 유출물을 가져와 유출물의 한 부분을 2D 컬럼에서 분리하는 작업이 이루어집니다. LC-LC는 1D에서 식별된 단일 관심 영역의 추가 특성을 제공하는 데 가장 효과적입니다.

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

그림 3: 2D 분리 공간의 사용을 최적화합니다(10).



2D-LC의 두 번째 기본 작동 모드의 경우, 1D의 모든 용리액은 완전한 종합 2D-LC로 알려져 있고 LCxLC로 약칭되는 분리를 위해 분획으로 2D에 전달됩니다(그림 2d). LCxLC는 대상 혼합물의 성분에 관한 가장 완벽한 데이터 세트를 제공합니다. 이 모드는 분해되지 않고 중첩된 여러 종이 존재할 가능성이 있는 매우 복잡한 시료 또는 미지 혼합물의 완전한 평가에 가장 적합합니다.

2D-LC를 위한 두 가지 기본 작동 모드 외에도 사용 가능한 두 가지 하이브리드 모드에는 Multiple Heartcutting(mLC-LC) 및 선택적 포괄(sLCxLC)이 있습니다. Multiple Heartcutting은 1D의 특정 용리액 섹션이

2D 분리를 위해 주입되는 Single Heartcut과 유사한 작동 원리를 적용하지만 크로마토그래피 실행당 두 개 이상의 heartcut 시료를 채취합니다(그림 2B). mLC-LC 기술은 LCxLC로 가능한 범위까지는 아니더라도 크로마토그램의 두 개 이상 영역에 대한 특성 분석을 강화해야 상황에서 유용합니다. 선택적 포괄의 경우, 특정 시간 범위에서 여러 시간 세그먼트를 샘플링하는 LCxLC 개념이 적용되지만 전체 분석 기간에 적용되는 것은 아닙니다(그림 2C). sLCxLC 작동 모드는 심층 단백질 특성 규명과 같이 크로마토그래피 실행의 일부에만 더 정밀한 분석이 필요한 특정 표적 종의 철저한 평가에 이상적입니다.

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

“ 기존의 1D-LC와 마찬가지로 2D-LC를 수행하면 사용 중인 검출기의 감도에 따라 분리 조건을 신중하게 조정할 수 있습니다.”

컬럼 직교성을 통해 최적의 분해능 얻기

2D-LC로부터 얻어지는 피크 용량의 배수적 향상은 1D 및 2D 컬럼에서 적절하게 보완적이거나 직교 고정상을 사용하는 것에 크게 좌우됩니다. 본질적으로 동일한 고정상 및 이동상 조건의 두 컬럼을 사용하여 2D-LC 분리를 시도하면 두 번째 차원을 추가한 결과로부터 생산적인 분리 개선이 이루어지지 않습니다. 대신, 2D 공간보다 분리를 향상하려면 차원 사이에 일정 형태의 차별화가 있어야 합니다. 그림 3a의 예에 따라, 이동상 pH가 동일한 C18과 페닐 고정상의 조합에서는 기본적으로 컬럼 간의 분석물질 용리에 대한 대략 1:1의 상관 라인을 넘는 분리 공간 영역으로 분석물 피크가 확산되지 않습니다. 그러나 단순히 2D 컬럼을 플루오르화 페닐 고정상으로 교체하면(그림 3b), 각 분리 단계에서 분석물질 간의 추가적인 구별이 이루어집니다. 1D와 2D 모두에 동일한 컬럼 유형이 사용되더라도(그림 3c), 차원 간에 이동상 pH를 변경하면 분리 조건에서 충분히 큰 차이가 발생하여 분석 공간 전체에서 피크

분해능이 눈에 띄게 개선됩니다. 마찬가지로, 그림 3d-f와 같이 차원 간에 훨씬 더 뚜렷하게 다른 컬럼을 사용하여 분해능을 향상시킬 수 있습니다.

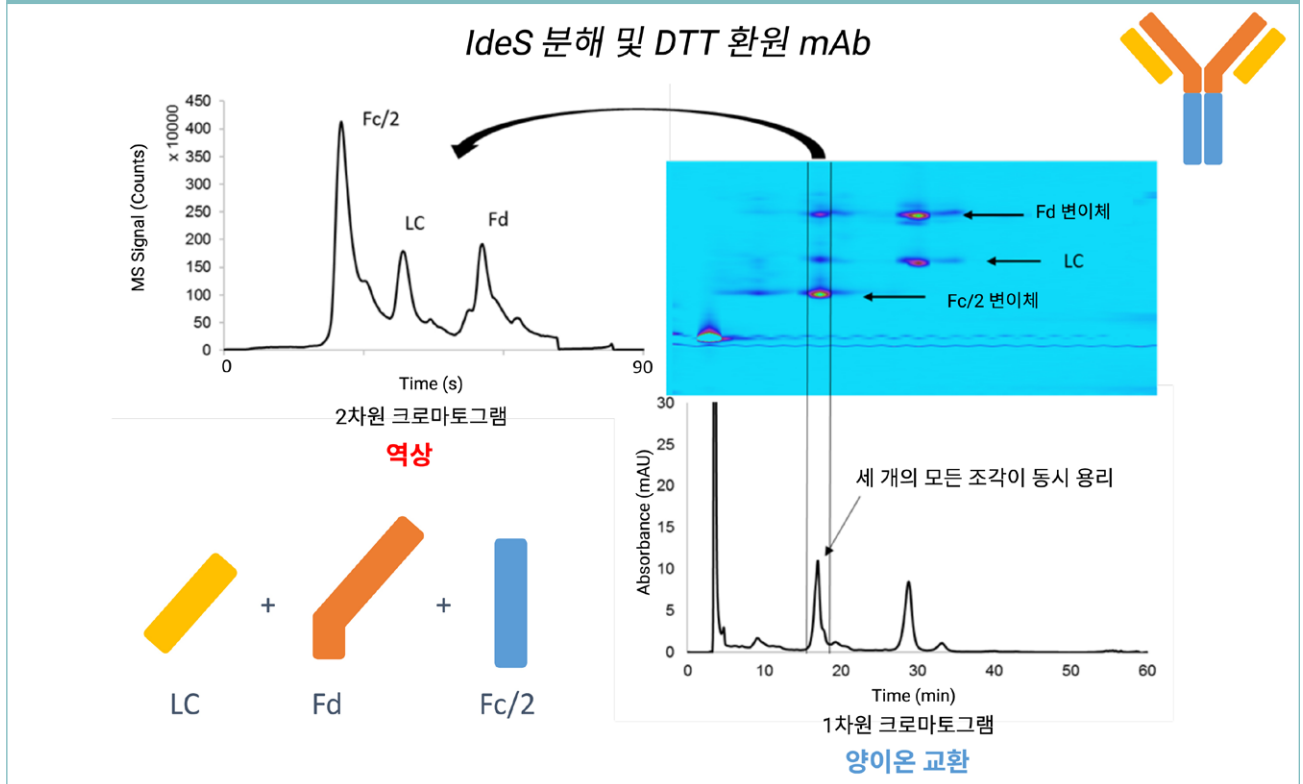
2D 샘플링 속도를 최적화하여 언더샘플링 피하기

2D-LC 분리 타이밍에서 핵심이 되는 사항은 2D 분리 시 1D 컬럼의 유출물 언더샘플링을 피하는 것입니다. 이 문제는 언더샘플링 또는 재혼합이라고 알려져 있습니다. 1D 피크에서 너무 적은 수의 시료를 취하면 본질적으로 1D로 분리된 모든 종이 평균화 또는 재혼합되는 최종적 효과로 나타나기 때문에 첫 분리 단계의 가치가 감소합니다. Murphy-Schure-Foley 이론(1)에 따르면 언더샘플링의 영향을 최소화하려면 크로마토그래피 전체 피크 영역에 걸쳐 1D로부터 4개 이상의 시료를 취해야 합니다. 또한, 1D와 2D의 속도 균형을 맞추어 시스템 전체적으로 얻어지는 순수 피크 용량을 최적화하기 위해 샘플링 속도를 최적화해야 합니다.

기존의 1D-LC와 마찬가지로 2D-LC를 수행하면 사용 중인 검출기의 감도에 따라 분리 조건을 신중하게 조정할 수 있습니다. 크로마토그래피의 각 단계(1D 및 2D)에서 용리액의 분석물질 농도는 각 컬럼에 초기 주입할 때보다 낮습니다. 결과적으로, 충분한 분석물질이 존재하기 위한 최소 주입량과 샘플링 시간이 존재합니다.

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

그림 4: LCxLC에 의한 mAb의 서브유닛 수준 2D-LC-MS(7).



차원 사이의 이동상 불일치 문제 극복

언더샘플링에 대한 고려 외에 2D-LC에서 고려해야 할 또 다른 중요한 측면은 컬럼 간의 이동상 불일치로 인한 부정적인 영향을 방지하는 것입니다. 이 문제는 1D로부터 분석물질에서 용리되는 이동상이 2D의 주입 용매가 되므로 이동상 호환성이 필요한 이유로 발생합니다. 컬럼과 이동상의 일부 조합에서는 이로 인한 영향이 매우 적을 수 있지만 상당히 중요한 경우도 있습니다. 예를 들어, 이온 교환 분리의 이동상 조성에는 일반적으로 수용성 성분이 있어서 일반적으로 역상 분리 시작 시 주로 수용성 이동상과 호환됩니다. 이와 달리, 순상

크로마토그래피에 사용되는 유기물 함량이 높은 이동상은 순상 1D와 역상(RP) 2D를 결합하는데 어려움을 초래하고 프론틱(fronting) 또는 기타 분석물질 분리 손실을 일으킬 수 있습니다.

그러나 이동상 비호환성은 active solvent modulation(ASM) 기술로 극복할 수 있습니다. 애질런트와 협력하여 개발된 ASM 결합 2D-LC 시스템은 호환성 개선을 위해 2D 컬럼에 주입되는 시료의 용매 조성을 조정하는 역할을 합니다. 시료가 2D 컬럼에 도달하기 전에 첫 번째 차원에서 수집된 유출물을 희석하는 평행 시료 루프를 도입하여 2D 주입 용매의 강도를 줄일 수 있습니다. ASM은 시료 희석에도

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

불구하고 2D 분해능을 향상시키는데, 낮은 용매 강도로 인해 분리 시작 시 이동상에서 부적절하게 높은 분석물질 용해도로 인해 발생할 수 있는 분석물질 돌파가 방지되기 때문입니다.

2-for-1 분석을 위한 2D-LC 활용

2D-LC가 이상적인 방법일 수 있는 한 범주는 단일 2D-LC 분석으로부터 결과를 얻기 위해 두 개 이상의 개별 실험이 필요한 경우입니다. Luo 등에 의해 조사된 바와 같이, 질량 분석법(MS)과 호환되지 않는 조건에서 크로마토그램의 미지의 피크를 특성화하는 경우를 예로 들 수 있습니다(2). MS 호환 분리 조건에서 추가적인 분리를 고안하는 대신 Luo 등은 LC의 첫 단계에 MS 호환 가능한 두 번째 차원을 추가하여 미지의 피크를 직접 식별할 수 있었습니다. Karongo 등이 관찰한 바와 같이, 치료제용 펩타이드의 불순물 특성 규명에 sLCxLC를 적용한 결과, 관심 펩타이드와 함께 용리되고 1D-LC에서는 놓쳤을 세 가지 불순물의 존재가 드러났습니다(3). Woiwode 등은 1D의 아키랄 RP 컬럼과 2D의 키랄 WAX 컬럼의 조합을 통해 sLCxLC가 단일 분석에서 모든 아미노산의 반선택적 분리를 허용한다는 것을 입증했습니다(4). 차 또는 와인 추출물과 같은 식물 유래 추출물의 특성화에서 LCxLC가 페놀 종을 식별하는 데 중요한 역할을 한다는 사실이 Muller 등에 의해 밝혀졌습니다(5).

심층 단백질 특성 규명을 위한 분석법

2D-LC가 특히 유용한 통찰력을 제공하는 또 다른 분석 형태는 단백질의 심층 특성 규명입니다. 백엔드에서 질량 분석과 결합하면 2차원의 분리를 통해 시료 식별 과정을 크게 간소화할 수 있습니다. 적절한 시료 처리와 2D-LC, 그리고 이어지는 MS 검출로 단클론 항체의 구조와 조성에 대한 철저한 평가를 수행할 수 있습니다. 항체 서브유닛, 경쇄 및 중쇄, 부착된 글리칸 및 성분 펩타이드가 이러한 유형의 다차원적인 접근을 통해 식별 가능한 것으로 입증되었습니다(6). 또한 Sorensen 등이 보고한 결과에 따르면 첫 번째 LC 차원이 단독으로 사용된 경우 분해된 항체 단편의 동시 용출로 인해 두 단계의 LC 분리가 필요한 것으로 나타났습니다(그림 4)(7).

자동화된 2D-LC 분석 개발

2D-LC가 극복하는 데 도움을 줄 수 있는 바이오 분석 과제 중 하나는 시료 전처리에 시간이 많이 소요되고 추가 분석을 위해 피크를 수동으로 선택해야 하는 문제입니다. 트립신 분해 또는 디티오트레이톨(DTT) 환원과 같은 각 시료 처리를 오프라인으로 수행하는 대신 이러한 단계를 자동화된 2D-LC와 통합할 수 있습니다. Gstöttner 등에 의한 항체 분리와 관련된 구체적인 사례에서는 먼저 시료를 이온 교환 컬럼에서 분리하고 온라인에서 분획으로 채집한

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

그림 5: 현대적 응용 - mAb에 대한 자동화 특성 규명 시스템(9).

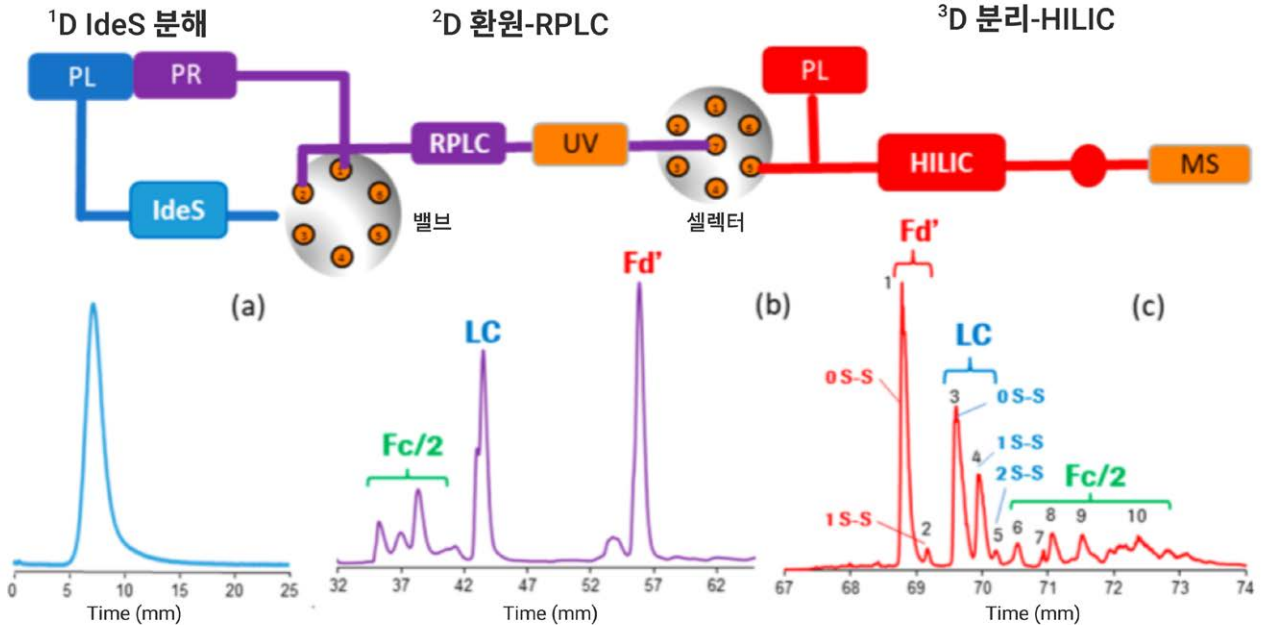


그림 2. 효소 고정 컬럼(2D)을 사용한 온라인 IdeS 분해 후 단백질 분해 조각 Fd', LC 및 Fc/2의 RP HPLC(2D) 및 HILIC(3D)/MS 분석에 의한 컬럼 환원을 사용하여 mAb의 자동화된 중간 분석가를 위한 온라인 3D LC 워크플로의 도식적 표현. (a) mAb의 IdeS 분해(오프라인, 280nm에서 UV 검출), (b) RPLC(2D) 및 (c) 세 개의 서브유닛(Fd', LC 및 Fc/2)을 보여주는 HILIC(3D) 크로마토그램. 머무름 시간 및 질량 할당은 표 S2를 참조하세요.

후 환원 반응기 컬럼을 통해 보내어 2D-RP 분리 및 MS 검출을 수행하는 워크플로가 이용되었습니다(8). 마찬가지로, Camperi 등은 시료가 IdeS 분해, RP 컬럼에서의 환원 및 분리, 그리고 질량 분석법에 의해 검출되기 전에 친수성 상호작용 LC(HILIC) 분리에 영향을 받는 단일클론 항체의 당화 변이체를 특성화하는 절차를 고안했습니다(그림 5) (9). Camperi 등의 자동화된 분석법은 개념 입증 실험에서 오프라인 시료 처리와 비교하여 큰 차이가 없는 것으로 나타났습니다.

결론

다차원 분리는 추가적인 노력이 거의 필요하지 않으면서 1D-LC 이상의 풍부한 분석 정보를

제공하는 것으로 빠르게 확인되고 있습니다. 그러나 이 기술로 최적의 결과를 얻으려면 화학 분석의 기초가 되는 전통적인 원리를 여전히 고려해야 합니다. 다른 분석 기기와 마찬가지로 2D-LC를 위한 분석법을 개발하려면 시료 유형 및 분석으로부터 얻으려는 정보를 따져서 사용할 작동 모드(LC-LC, mLC-LC, sLCxLC 또는 LCxLC)를 결정해야 합니다. 작동 모드를 고려한 후에는 충분히 직교하는 분리 조건을 사용하는 것이 중요합니다. 2D 공간에서 최대 분해능을 얻으려면 상보적인 고정상뿐만 아니라 분석물질 부류에 따른 pH와 같은 이동상 조건도 그에 맞게 뒷받침되어야 하므로 분자 특성을 고려하는 것이 매우 중요합니다. 또한 첫 번째 차원에서 얻어낸 분리 효과를 무효화시킬 수 있으므로 1D 단계에서 언더샘플링이 발생하지

생체분자 분리를 위한 2차원 액체 크로마토그래피 소개

않도록 주의해야 합니다. 그러나 검출기의 감도와 균형도 동시에 균형을 이루어야 합니다. 2D로 분리된 분획물은 검출되지 않을 정도로 분석물질의 양이 적어서는 안 됩니다. 또한 가능한 경우 불일치를 피하기 위해 차원 간의 이동상 호환성도 검토해야 합니다. 이동상 불일치가 불가피한 경우 적절한 해결 방법과 ASM 기술을 도입해야 합니다.

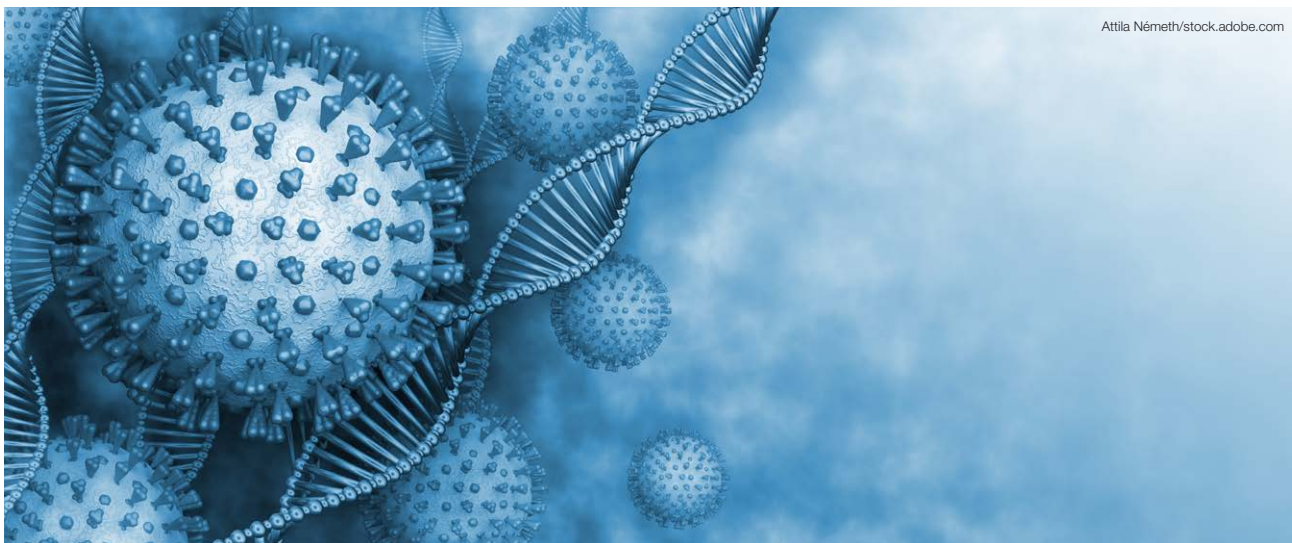
참고 문헌

1. R. E. Murphy, et al., *Anal. Chem.* **70**(8), 1585-1594 (1998). DOI: 10.1021/ac971184b
2. H. Luo, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137**, 139-145 (2017). DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.012
3. R. Karongo, et al., *J. Chrom. A*, **1627**, 461430 (2020). DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461430
4. U. Woiwode, et al., *J. Chrom. A*, **1562**, 69-77 (2018). DOI: 10.1016/j.chroma.2018.05.062
5. M. Muller, et al., *Chromatographia*, **82**, 181-196 (2019). DOI: 10.1007/s10337-018-3662-6
6. D. R. Stoll, et al., in *Advances in Chromatography*, (CRC Press: Boca Raton, FL, 2018).
7. M. Sorensen, et al., *mAbs*, **8**(7), 1224-1234 (2016). DOI: 10.1080/19420862.2016.1203497
8. C. Gstöttner et al., *Anal. Chem.* **90**(3), 2119-2125 (2017). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04372
9. J. Camperi et al., *Anal. Chem.* **92**(6), 4357-4363 (2020). DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05193
10. M. Gilar, et al., *Anal. Chem.* **77**(19), 6426-6434 (2005). DOI: 10.1021/ac050923i

Dwight R. Stoll 박사

Gustavus Adolphus 대학 교수





Attila Némethi/stock.adobe.com

질량-머무름 시간 핑거프린팅에 의한 SARS-CoV-2 스파이크 글리코펩타이드의 식별과 맵핑 및 상대적 정량화

Rod Chalk

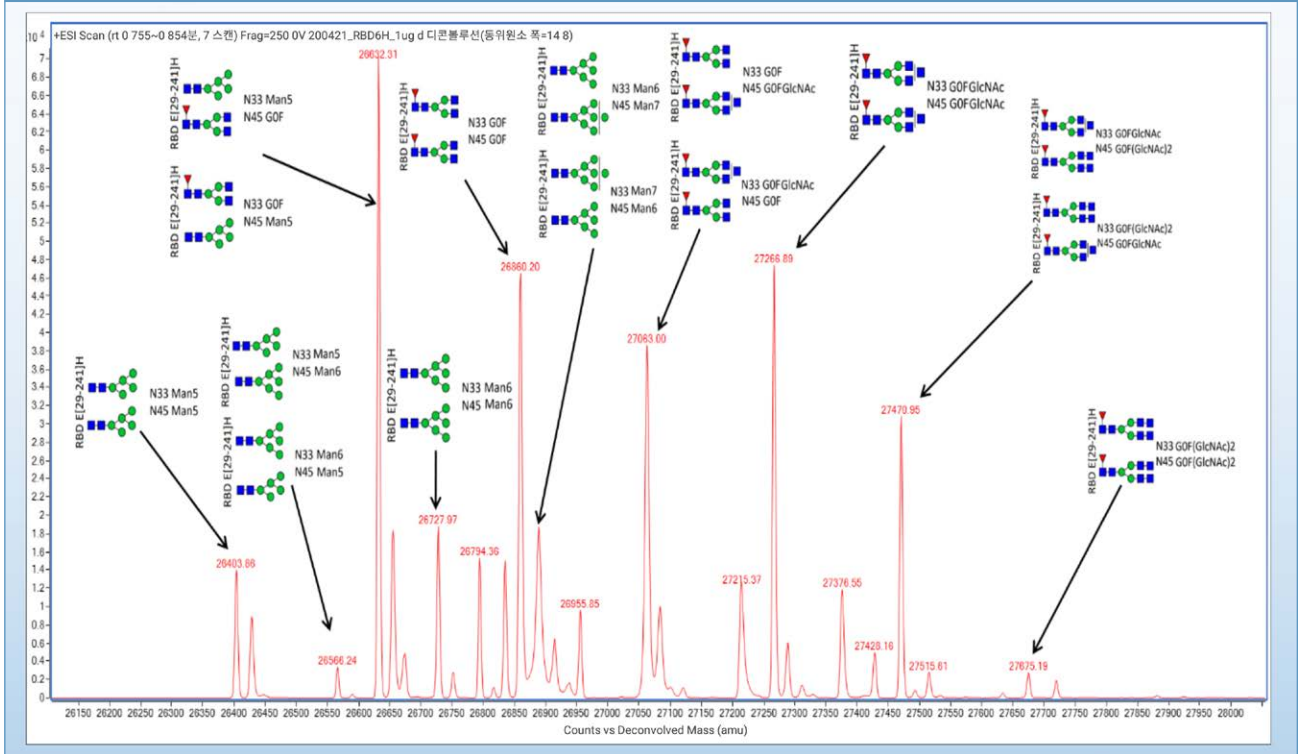
스파이크 단백질에서 글리코펩타이드 핑거프린팅과 맵핑을 위한 마스터 데이터베이스는 복잡하고 시간 소모적일 수 있는 이 과정을 크게 단순화합니다.

서론

SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질에 존재하는 복잡한 당화는 면역 회피에 관여하는 것으로 여겨지며 더 많은 병원성을 유발할 수 있습니다. 많은 실험실에서 연구 목적으로 스파이크 단백질을 발현하고 있으며 이를 완전히 특성화하려면 신뢰할 수 있는 분석 워크플로가 필요합니다. 이것은 당화 패턴이 사용된 숙주 세포 발현 시스템뿐만 아니라 성장 조건에 의해서도 결정된다는 점에서 중요합니다. 이러한 조건은 정확하게 제어하기 어렵고 생산되는 스파이크 단백질의 배치 사이에 변화를 일으킬 수 있습니다. 당화의 이러한 복잡성은 단백질의 완전한 특성 규명에 많은 기술적 장애물을 제공합니다. 역상 액체 크로마토그래프 질량 분석기 (LC-MS)에 의한 intact 질량 분석은 22개의 각 당화 부위에 있을 수 있는 많은 수의 글리칸이 예외적으로 높은 다분산성과 결과적인 신호 희석을 초래하기 때문에 실현 가능하지 않을 수 있습니다. 가능하다고 하더라도 글리칸에 대해 원하는 위치 정보를 제공하지 못합니다. 유리 글리칸 분석이 가능하지만 이 또한 위치 정보를 제공하지 못합니다.

질량-머무름 시간 핑거프린팅에 의한 SARS-CoV-2 스파이크 글리코펩타이드의 식별과 맵핑 및 상대적 정량화

그림 1: SARS-CoV2의 스파이크 수용체 결합 도메인에는 두 개의 당화 부위가 있습니다 (N343, N331). 여러 글리칸이 이러한 부위와 연관될 수 있습니다.



이 문서에서는 첫 단계로 LC-Q-TOF MSMS를 사용하여 글리코펩타이드 질량 및 머무름 시간 데이터베이스를 생성하는 새로운 접근 방식에 대해 설명합니다. 본질적으로 각 글리코펩타이드에 대한 accurate mass 머무름 시간 핑거프린트를 집성한 결과물이 이 데이터베이스는 간단하지만 강력하고 빠르며 완벽한 특성 규명 워크플로에 통합할 수 있습니다.

스파이크 단백질이 제기하는 해결 과제

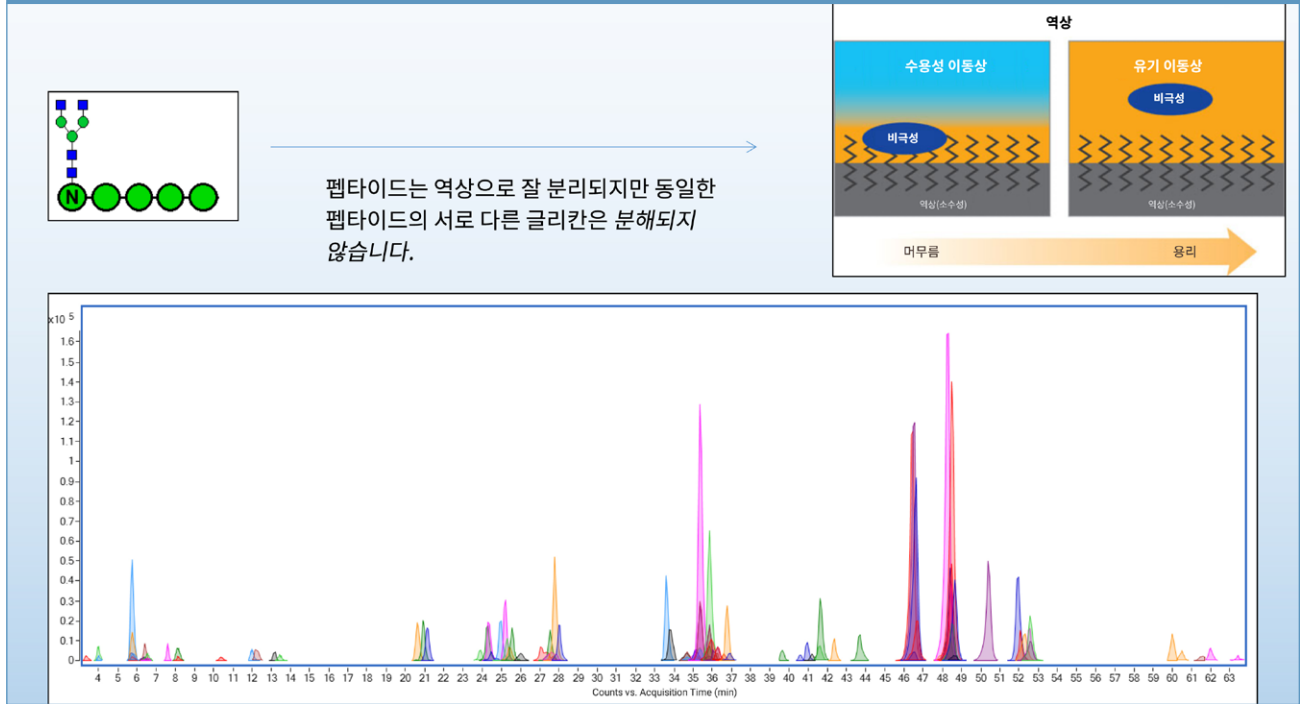
전체 길이 스파이크 단백질은 삼량체로 존재합니다. 스파이크 단량체의 수용체 결합 도메인(RBD) 부분에는 단 두 개의 당화 부위 (N343 및 N331)만 있지만 각각은 여러 가지

가능한 글리칸을 보유합니다. RBD에 대한 당화 부위의 수가 적음에도 불구하고 당화 프로파일은 복잡하고, intact 질량 스펙트럼에서 볼 수 있는 것처럼 시료 간 변화도 나타냅니다(그림 1). 두 개의 부위가 있기 때문에 경우에 따라 주어진 질량에 대해 두 가지 가능한 구조가 존재하므로 이러한 구조 중 어느 것이 올바른지 결정할 수 없고 완전한 식별이 불가능합니다.

전체 길이 스파이크 단백질의 경우에는 상황이 더 복잡합니다. 여기에는 22개의 당화 부위가 있으며 부위당 6개의 글리칸만 있다고 가정하더라도 가능한 글리코형의 총 수는 약 1,300억개이므로 스파이크 단백질에 대한 intact 질량 분석은 사실상 불가능합니다. 또한 이러한 분석은 위치 정보를 제공하지 않습니다.

질량-머무름 시간 핑거프린팅에 의한 SARS-COV-2 스파이크 글리코펩타이드의 식별과 맵핑 및 상대적 정량화

그림 2: 역상에 의한 글리코펩타이드 분리.



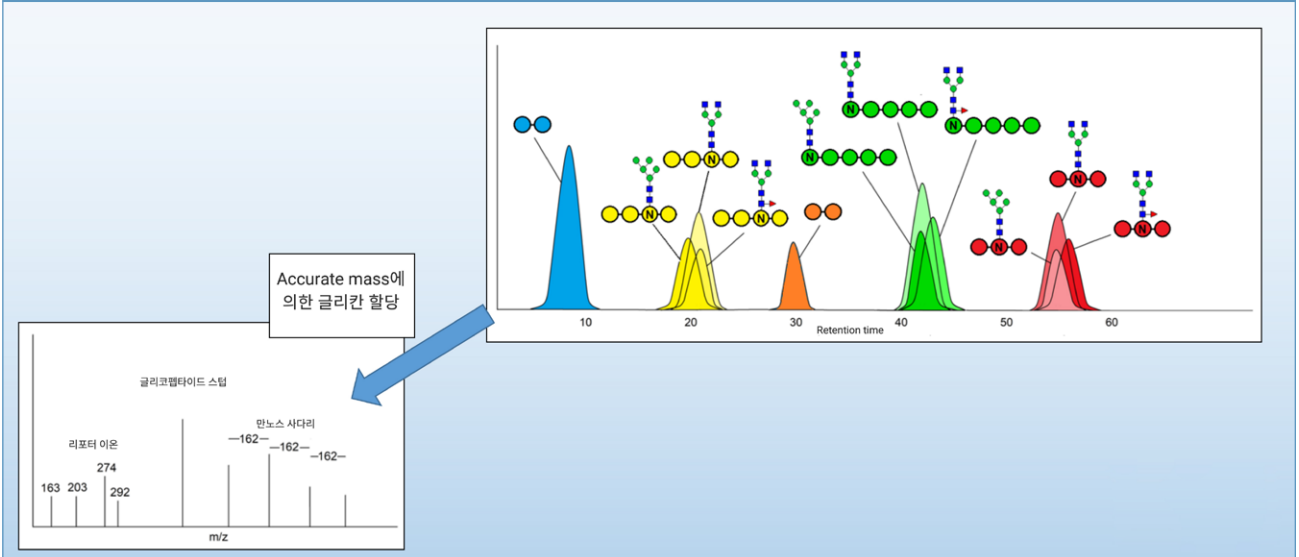
글리코펩타이드 분석이 그 대안으로 제시됩니다. 이 경우에는 펩타이드당 하나의 당화 부위를 생성하고 각 부위에 대해 명확하게 맵핑해야 합니다. RBD 내의 두 당화 부위에 트립신 절단 부위가 없기 때문에 트립신 단독으로는 사용할 수 없습니다. 또한, 전구체 질량을 알 수 없어 전구체 데이터베이스 매칭을 사용할 수 없으므로 MS/MS가 필요합니다. 그러나 고려해야 할 몇 가지 문제가 있습니다. 글리코펩타이드 분자는 펩타이드 골격과 각각에 대해 서로 다른 최적의 조각화 조건을 갖는 글리칸 구조로 구성된 하이브리드라는 사실입니다. 글리칸에 대한 최적의 조각화는 펩타이드를 조각화되지 않은 상태로 남깁니다. 한편, 최적의 펩타이드 조각화는 글리칸 정보가 손실된다는 것을 의미합니다.

향상된 분리 및 검출

다수의 효소를 사용하면 추가적인 복잡성이 초래될 수 있기 때문에 옥스포드 대학교의 의약품개발센터(Center for Medicines Discovery) 연구원들은 트립신보다 더 자주 절단되고 더 짧은 펩타이드를 생성하는 단일 효소인 엘라스타아제를 사용하기로 결정했습니다. 더욱 중요한 것은 엘라스타아제가 당화 부위 당 단일 펩타이드펩타이드를 생성하며, 이는 명확한 맵핑에 필수적입니다. 글리칸은 주로 극성이기 때문에 소수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)를 사용하여 잘 분리되는 반면, 비교적 비극성인 펩타이드는 역상(RP)-HPLC로 가장 잘 분리됩니다. 짧은 펩타이드는 MS에서 총 이온 크로마토그램(TIC) 신호를 증가시키고 RP-HPLC에 의해 더 쉽게 분해됩니다. 분리 결과는 펩타이드에 대해 우수한 분해능을 보여주지만 여러 중첩

질량-머무름 시간 핑거프린팅에 의한 SARS-COV-2 스파이크 글리코펩타이드의 식별과 맵핑 및 상대적 정량화

그림 5: 만노스 사다리는 만노스 함유 글리칸의 구조적 특징입니다.



피크로 나타나는 동시 용출 글리칸을 개별적으로 분리하지는 못합니다(그림 2).

이것이 문제로 보일 수 있지만, 연구자들은 이러한 글리코펩타이드를 식별하고 맵핑하는 새로운 방법을 개발하기 위해 이 부분을 이용했습니다. 연구팀은 애질런트의 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼을 사용하여 펩타이드를 분리하고 다른 글리칸을 포함하는 동일한 펩타이드가 동시에 용리되는 것을 관찰했습니다. 따라서, 동일한 머무름 시간을 갖는 글리칸은 동일한 펩타이드에 맵핑될 수 있습니다. 동일한 펩타이드의 글리칸은 동일한 머무름 시간을 가지며 정확한 질량이 알려져 있으므로 정확한 질량과 머무름 시간을 조합하면 완전한 글리코펩타이드 식별이 가능한 핑거프린트가 얻어집니다.

데이터베이스 구축

글리코펩타이드 발견 워크플로 워크플로(그림 3)는 밤새 엘라스타아제를 분해하여 펩타이드와 글리코펩타이드의 혼합물을 생성하는 것으로

시작됩니다. 다음으로, 동일한 펩타이드의 글리칸이 동시 용리되고 해당 머무름 시간으로 각각을 식별할 수 있는 RP-HPLC를 수행합니다. 예를 들어, 펩타이드 GEVFNAT에는 27개의 서로 다른 글리코형이 있으며 그림 4의 확장 이온 크로마토그램은 이들 모두가 4분의 머무름 시간 범위 내에서 용리된다는 것을 보여줍니다. 다음 단계는 정확한 질량을 사용하여 글리칸을 식별하는 것입니다. LC-MS/MS 실행에는 많은 종이 있습니다. 글리코펩타이드는 도식적으로 묘사된 바와 같이 만노스 사다리(만노스 함유 글리칸의 구조적 특성)뿐만 아니라 자유당을 나타내는 특정한 리포터 이온이 특징입니다 (그림 5). 디컨볼루션 질량 스펙트럼은 10ppm 이내의 질량 정확도로 개별 당과 함께 글리칸의 전체 시퀀스를 보여줍니다.

워크플로의 두 번째 단계에서는 펩타이드를 식별합니다. 이를 위해 유사 MS3이라는 절차를 이용하는데, MS 기기에서 높은 Fragmentor 전압을 사용하여 글리코펩타이드를 소스 내에서 조각화하고 글리칸 손실을 일으킵니다. 사중극자에서 표적 질량으로 펩타이드 스텝을

질량-머무름 시간 핑거프린팅에 의한 SARS-COV-2 스파이크 글리코펩타이드의 식별과 맵핑 및 상대적 정량화

이 경우에는 MS/MS가 필요하지 않은데, LC-MS 실행의 질량 머무름 시간을 사용하여 데이터베이스를 조사하면 높은 신뢰도로 글리코펩타이드 구조를 할당할 수 있기 때문입니다. 이 작업은 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 버전 B.07 및 분자 특징 추출 도구를 사용하여 자동으로 수행할 수 있습니다(그림 6). 이 워크플로의 또 다른 장점은 글리칸 분석에 대한 전문 지식이 필요하지 않다는 것입니다.

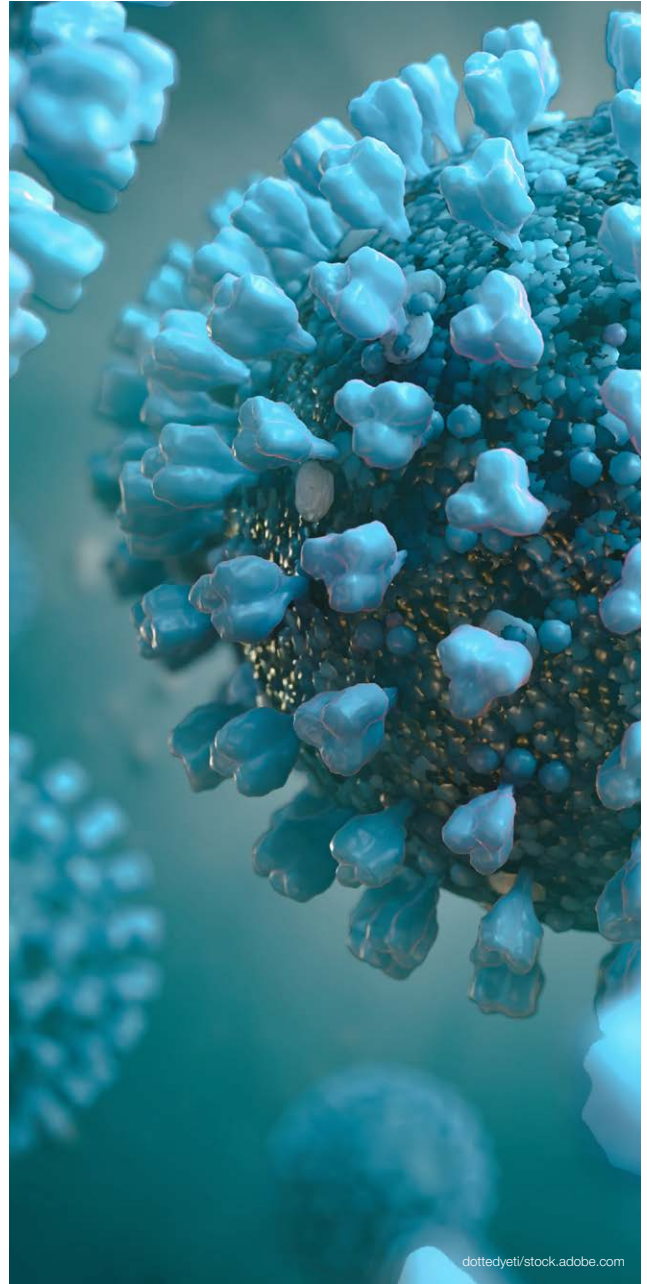
결론

상세한 펩타이드 발견 분석을 통해 얻은 질량-머무름 시간 데이터베이스는 SARS-CoV-2 스파이크 글리코펩타이드의 맵핑을 크게 단순화하며 복잡한 MS/MS 분석 필요성을 없애줍니다. LC 머무름 시간과 정확한 질량만을 사용하여 글리코펩타이드 구조를 식별할 수 있습니다. 이 간단한 워크플로는 다양한 HPLC-MS 기기 및 구성으로 이전할 수 있습니다. 자세한 분석법은 무료로 제공될 예정이며(Chalk, R., Greenland, W. 등, “질량-머무름 시간 핑거프린팅에 의한 SARS-CoV-2 스파이크 글리코펩타이드의 식별과 맵핑 및 상대적 정량화” 인쇄 중) 데이터베이스는 온라인에서 얻을 수 있습니다 (Chalk, R., Greenland, W. et al. (2020). SARS-COV2 스파이크 글리코펩타이드 질량-머무름 시간 PCDL 데이터베이스 (버전 1) [데이터 세트]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3958218>).

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다. 애질런트 제품은 코로나19 테스트, 진단, 치료 또는 완화 목적으로 승인되지 않았습니다. 애질런트는 제품을 대상으로 신종 코로나바이러스 검출 적격성에 대해 테스트하지 않았습니다.

Rod Chalk 박사

옥스퍼드 대학교,
의약품개발센터
질량 분석 책임자



dottedyeti/stock.adobe.com