

SQ LC/MS를 사용하여 원형(Intact) 및 서브유닛 수준에서 항체 당화 모니터링

저자

Stephen Sciuto
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus SQ 질량 분석기(MS)를 사용하여 트라스투주맙의 원형 수준과 서브유닛 수준에서 항체 당화의 상대적 존재비를 모니터링하는 방법을 설명합니다. 원형 수준에서는, MS spectral deconvolution 소프트웨어를 통해 5개의 당화된 성분이 식별되었으며, 상대적 존재비는 이전에 애질런트 고분해능 accurate mass 시스템에서 측정된 것과 일치했습니다. 서브유닛 수준에서는, 트라스투 주맙의 경쇄는 아미노산 서열을 기반으로 예상되는 단일 성분을 보인 반면, 트라스투주맙 중쇄에서는 G0, G0F, G1F 및 G2F 글리칸과 일치하는 4개의 피크를 확인했습니다. 당화 모니터링을 위한 신뢰할 수 있는 상대적 존재비와 탁월한 MS 스펙트럼 피크 모양의 결합은 Agilent Pro iQ Plus 질량 분석기의 우수한 성능을 잘 보여줍니다.

소개

당화는 치료제의 구조적 안정성, 안전성 및 효능에 중요한 역할을 하기 때문에 바이오 의약품 산업에서 모니터링해야 할 중요한 파라미터입니다.¹ 일반적으로 반복적으로 모니터링되는 품질 측정 기준은 단백질 당화의 상대적 존재비가 허용 오차 내에 있는지 확인하는 것입니다. 상대적 존재비가 품질 관리(QC) 팀에서 정한 사전 정의된 기준을 통과하지 못할 경우 치료제 제조 공정에 대한 추가적인 조사가 필요합니다. 질량 분석법은 단일클론 항체(mAb)의 특성 규명을 위한 민감하고 견고한 방법으로, 당 특성 규명에 질량 분석법을 사용하는 것이 이상적입니다.

본 연구에서는 향상된 질량 범위와 탁월한 질량 스펙트럼 피크 모양을 갖춘 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 액체 크로마토그래피/질량 분석기(LC/MS)를 사용하여 원형 수준과 서브유닛 수준(HC, LC)에서 당화를 검출했습니다. Deconvolution 후 당화의 상대적 존재비는 이 장비 플랫폼에서 단백질 당화²에 대한 주요 정보를 측정할 수 있음을 보여줍니다.

실험

화학물질 및 용액 제조

환원 반응에는 Sigma-Aldrich(St. Louis, Mo)의 다음 용액이 사용되었습니다.

- 8 M guanidine hydrochloride, pH 8.5 (part number G7294, 100 mL)
- 0.2 M DTT (DL-Dithiothreitol, part number D9779, 1 g)
- 1 M Tris buffer, pH 8.0 (part number 648314, 100 mL)

변성: 6.4 M guanidine-HCl, 200 mM tris-HCl buffer, pH 8.1

100mL 용적 플라스크에 8.0M guanidine HCl 용액 80mL를 1M Tris-HCl buffer 20mL에 첨가합니다. 뒤집어서 완전히 섞은 후 피펫과 pH 지시약을 사용하여 pH를 측정하고 기록합니다. pH가 7.2와 8.5 사이에 들어오면 환원 단계를 진행하기에 충분합니다.

환원: 200 mM DTT in 50 mM Tris-HCl solution

분석용 저울을 사용하여 DTT 31mg을 칭량하고 50mM Tris-HCl 용액 1mL을 첨가하여 용해합니다. 환원 단계 전에 용액을 볼텍싱합니다.

표준물질 및 시료 전처리

단일클론 항체(mAb) 트라스투주맵은 22mg/mL 농도로 Genentech(South San Francisco, CA)에서 구입했습니다. 0.1% 포름산 수용액 210μL에 원액 10μL를 첨가하여 이 용액을 농도 1μg/μL로 희석했습니다. LC/MS 분석에 사용된 최종 용액은 1μg/μL 용액 55μL를 취해 0.1% 포름산 수용액 165μL에 첨가하여, 농도 250ng/μL로 희석했습니다.

트라스투주맵 환원에 사용된 시료 전처리 절차는 다음과 같습니다.

- 트라스투주맵 원액(22mg/mL) 2.3μL를 취하여 6.4M guanidine chloride, 200mM Tris-HCl 27.4μL에 첨가합니다.
- 6.3μL의 200mM DTT in 50mM Tris-HCl를 트라스투주맵 용액에 첨가합니다. 부드럽게 혼합하고 스피ندا운시킨 후 37°C에서 30분(또는 60°C에서 30분) 동안 인큐베이션합니다.
- 환원 반응을 중단하려면 용액을 최종 v/v% 을 1%의 포름산으로 산성화해야 합니다. 2단계에서 환원된 용액에 10% FA 4μL를 첨가합니다. 부드럽게 볼텍싱하고 스피ندا운시킵니다.

- 0.1% 포름산 160μL를 첨가하여 최종 부피를 200μL로 만듭니다. 환원된 트라스투주맵 용액의 농도는 250ng/μL이며 LC/MS 분석에 사용할 수 있습니다.

LC/MS 분석

LC/MS 분석은 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus SQ LC/MS 시스템과 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템에서 수행했습니다(그림 1). 크로마토그래피 분리에는 Agilent PLRP-S 컬럼(2.1 × 50mm, 5μm)이 사용되었습니다. LC 및 MS 파라미터는 표 1과 표 2에 나타내었습니다.



그림 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 Agilent Pro iQ Plus SQ 질량 분석기.

액체 크로마토그래피

표 1. Agilent 1290 Infinity II LC 분석법.

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템	
컬럼	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50mm, 5µm(제품 번호 PL1912-1502)
샘플러 온도	5°C
이동상 A	Water with 0.1% formic acid
이동상 B	Acetonitrile with 0.1% formic acid
유량	0.5mL/분
주입량	2µL
컬럼 온도	80°C
그라디언트 프로그램(원형)	시간(분) %B 0 10 5 60 6 10 8 10
그라디언트 프로그램(환원)	0 5 0.1 20 8 40 8.1 70 9.1 70 9.2 5 11 5

질량 분석기

표 2. MS 파라미터.

Agilent Pro iQ Plus SQ 질량 분석기	
이온화원	Agilent Jet Stream ESI 소스
극성	Positive
Time Filter Window	0.1분
Stop Time	As pump/No limit
MS1 스캔 범위	m/z 1,000-3,000(원형) m/z 600-2,400(환원)
스캔 시간	1,500ms
Detector Gain Factor	1
Fragmentor	275V(원형) 175V(환원)
Fragmentor Ramp?	선택 안 됨
데이터 저장	Profile
가스 유량	12L/분
네블라이저	50psi
Sheath 가스 유량	11L/분
캐필러리 전압	4,500V
노즐 전압	2,000V
가스 온도	350°C
Sheath 가스 온도	360°C
전환 밸브	Enabled; LC flow to waste from 0 to 1 min, LC flow to MS from 1 to 8 min (intact) or 1 to 11 min for reduced
Postrun Diverter Position	To waste

데이터 처리

LC/MS 데이터는 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어 버전 2.8을 사용하여 처리했습니다. 원형 deconvolution 파라미터는 그림 2에 나와 있습니다. 환원된 mAb deconvolution의 경우, external background time range는 3.0-4.3분으로, automatic deconvolution RT window는 4.3-5.6분으로, deconvoluted mass range는 10,000-60,000Da로, Absolute noise threshold는 2,000으로, relative abundance threshold은 25%로, MW algorithm은 centroid로 설정했습니다.

결과 및 토의

원형 트라스투주맵에 대한 총 이온 크로마토그램

500ng의 원형 트라스투주맵에 대한 총 이온 크로마토그램(TIC)을 그림 3A에 나타내었습니다. 예상대로 TIC는 약 2.6분에 용출되는 단일 피크를 보여줍니다. 고수분 및 염분이 질량 분석기로 유입되는 것을 방지하기 위해 LC/MS 분석법의 첫 1분 동안 LC 흐름은 waste로 전환됩니다. 1분에서 8분 사이에 전환 밸브를 Pro iQ Plus로 직접 흐르도록 전환하여 mAb 신호를 측정했습니다.

원형 트라스투주맵에 대한 raw MS 및 deconvoluted 스펙트럼

원형 트라스투주맵의 raw MS 및 deconvoluted 스펙트럼을 각각 그림 3B와 3C에 나타내었습니다. Agilent Pro iQ Plus SQ 질량 분석기는 m/z 3,000의 스캔 범위를 가지고 있어 원형 트라스투주맵의 여러 전하 상태를 감지하고 뛰어난 deconvoluted 스펙트럼을 제공합니다. 실제로, 그림 3B의 삽입 그림은 트라스투주맵의 전하 상태 중 하나에 대한 raw 피크 모양을 보여줍니다. 여기에 표시된 상대적 존재비는 그림 3C의 deconvoluted 스펙트럼에서 관찰된 것과 일치하며, 사용자는 deconvoluted 스펙트럼과 식별된 5개의 주요 당화 피크에 대한 추가적인 신뢰를 제공합니다.

Processing Method

Trastuzumab_intact_deconvolution

- General
 - Properties
 - Signals
- Extraction
 - Chromatogram
 - Spectrum**
- Integration Events ChemStation
 - Standard
 - Advanced
 - Manual Integration
- Compounds
 - Identification
 - Calibration
 - Spectra
- System Suitability
 - Properties
 - Column
- Reports
 - Injection Report
- Spectral Analysis
 - MS Library Search
 - MS Spectral Deconvolution
- Tools
 - Custom Calculation
 - Post Processing Plugins

Arbitrary spectra

Background mode ☒ Use external time range

Peak spectra

Spectrum type Average peak spectrum

Background mode External background time range

External background time range

Start time 1.00 End time 2.60 min

Automatic spectrum extraction

☐ Extract spectra from integrated peaks on reprocessing

☒ Identified Peaks ☐ All Peaks

Spectrum threshold

☐ Maximum abundance 10.00 %

Spectral smoothing

☐ Gaussian smoothing of profile data

Width 0.3

Processing Method

Trastuzumab_intact_deconvolution

- General
 - Properties
 - Signals
- Extraction
 - Chromatogram
 - Spectrum
- Integration Events ChemStation
 - Standard
 - Advanced
 - Manual Integration
- Compounds
 - Identification
 - Calibration
 - Spectra
- System Suitability
 - Properties
 - Column
- Reports
 - Injection Report
- Spectral Analysis
 - MS Library Search
 - MS Spectral Deconvolution**
- Tools
 - Custom Calculation
 - Post Processing Plugins

Automatic Deconvolution

☒ Run automatic deconvolution

☒ Use RT window

Start time 2.60 End time 2.80 min

TIC peak type

☐ Identified peaks

☐ Unidentified peaks

☒ All peaks

TIC peak threshold

☐ None

☒ Top (n) peaks 5

☐ Peak height 10000

☐ Peak area 50000

Adducts

Positive

-electron

+H

+Na

+K

+NH4

+Ca

Negative

-electron

-H

+O

+HCOO

+CH3COO

Basic Settings

Use m/z range ☐

Low limit 2200

High limit 3000

Low molecular weight 140000

High molecular weight 160000

Maximum charge 60

Minimum peaks in set 15

Show unmatched peaks ☐

Advanced Settings

MW agreement (0.01%) 5

Absolute noise threshold 2000

Relative abundance threshold (%) 20

MW algorithm Centroid

MW algorithm threshold (%) 40

Envelope threshold (%) 50

그림 2. 원형 mAb deconvolution에 사용된 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어 버전 2.8의 프로세싱 파라미터.

Deconvoluted 스펙트럼에서 고스트 피크를 줄이는 데 중요한 프로세싱 파라미터는 OpenLab CDS MS Spectral Deconvolution 탭의 Basic Settings에 있는 Minimum Peaks in Set 파라미터입니다(그림 2).

원형 및 환원된 mAb deconvolution의 경우, 이 설정은 15로 설정되었으며, 이에 따라 소프트웨어는 최소 15개의 전하 상태를 갖는 피크를 deconvolution합니다. 이는 deconvoluted 스펙트럼에서 감지된

피크의 품질을 향상시키기 때문에 중요한 파라미터입니다. 이 파라미터는 관심 분자의 raw 질량 스펙트럼에서 관찰된 전하 상태의 수에 따라 조정할 수 있습니다.

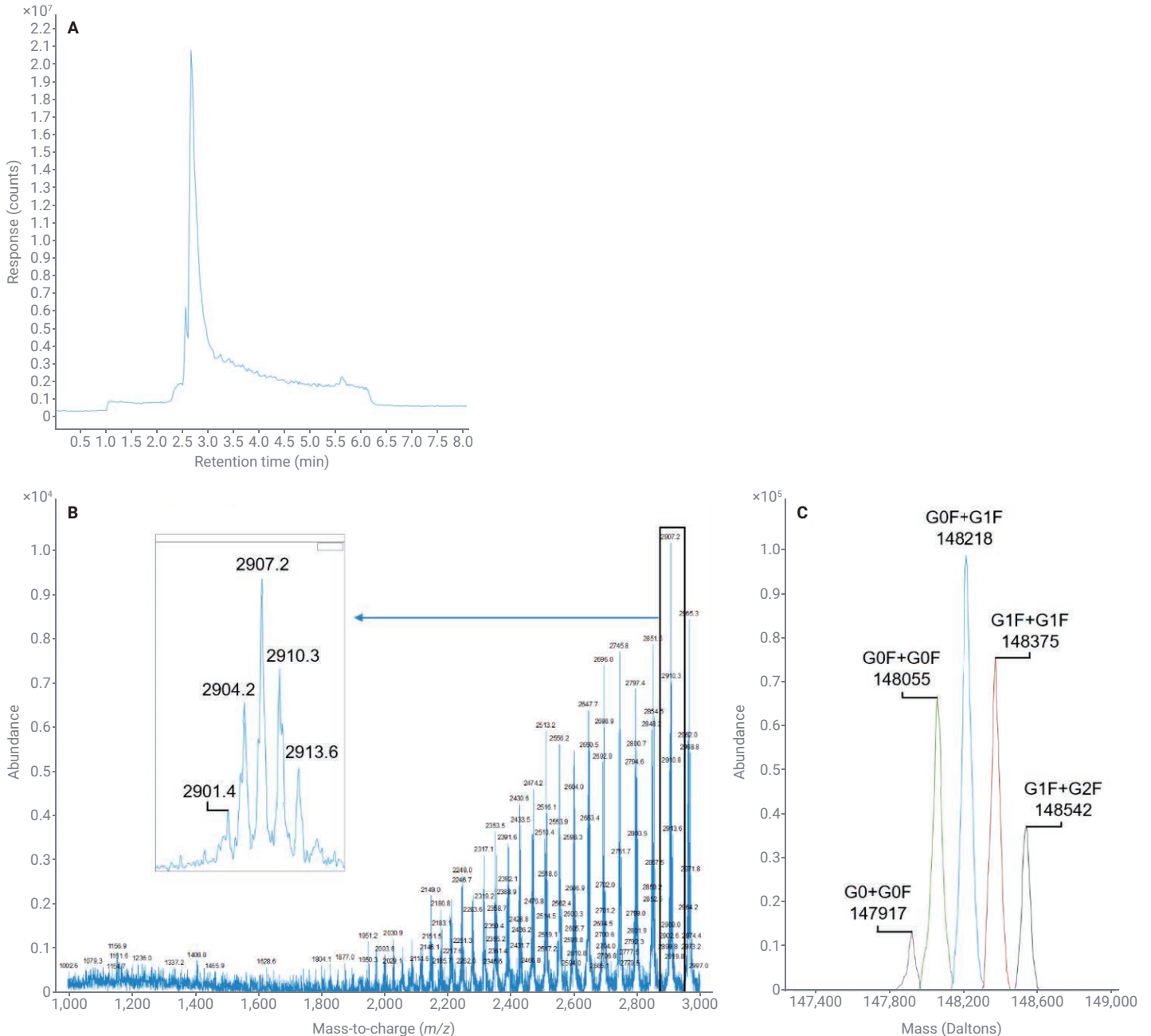


그림 3. (A) Agilent Pro iQ Plus SQ 질량 분석기로 측정된 원형 트라스투주맙의 TIC. (B) 트라스투주맙의 raw MS. 삽입 그림은 전하 상태 중 하나에 대한 확대 영역을 보여줍니다. (C) 측정된 질량과 제안된 당형태를 포함한 트라스투주맙의 deconvoluted 질량 스펙트럼. LC/MS 설정은 표 1과 2에 나와 있고, 프로세싱 파라미터는 그림 2에 나와 있으며, 계산된 질량 오차는 표 3에 나와 있습니다.

환원된 mAb 크로마토그램, raw MS 및 deconvoluted 스펙트럼

당화 프로파일링에 추가적인 차원을 더하기 위해, 원형 mAb를 서브유닛으로 환원하여 복잡성을 줄일 수 있습니다. 그림 4A에 나타난 환원된 트라스투주맙의 TIC

크로마토그램을 보면 경쇄와 중쇄에 대한 두 개의 피크가 관찰됩니다. 경쇄에 대해 측정된 MS 스펙트럼 강도는 중쇄보다 4배 더 높았습니다. 그러나 Agilent Pro iQ Plus에서는 중쇄에 대한 상당한 당화 정보와 뛰어난 MS 스펙트럼 품질을 얻었습니다.

그림 4B와 4D의 삽입 그림은 각각 트라스투주맙 경쇄(LC)와 중쇄(HC)의 확대된 영역을 보여줍니다. 당화 부위가 트라스투주맙의 합의된 서열을 따르기 때문에(즉, 당화는 NXS/T 모티프 다음의 아스파라긴 잔기에서 일어남), 아미노산

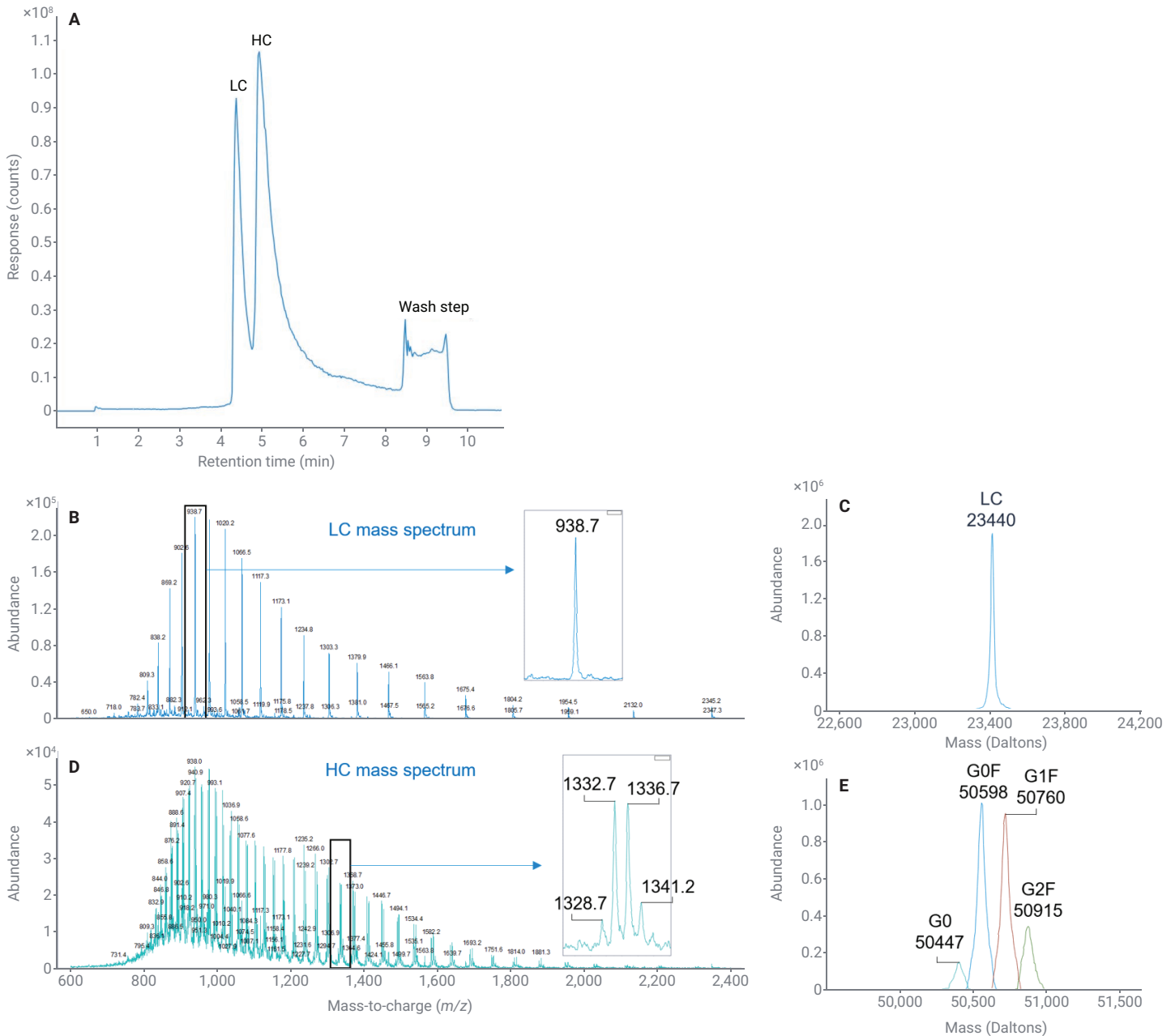


그림 4. (A) Agilent Pro iQ Plus SQ 질량 분석기로 측정된 환원된 트라스투주맙의 TIC. 트라스투주맙 경쇄와 중쇄에 대한 raw MS(B+D). 삽입 그림에는 기기의 raw 스펙트럼 품질을 보여줍니다. 트라스투주맙 경쇄와 중쇄에 대한 각 deconvoluted 질량 스펙트럼(C+E). 계산된 질량 오차는 표 3에 나와 있습니다.

서열이 글리칸 변형을 허용하지 않으므로 경쇄는 단일 피크를 보일 것으로 예상됩니다. 반면, 트라스투주맙 중쇄는 NXS/T 모티프를 가지고 있어 Fc 영역의 아스파라긴 잔기에서 당화가 가능합니다. 그림 4D의 삽입 그림은 raw MS 스펙트럼에서 G0, G0F, G1F 및 G2F 글리칸과 일치하는 4개의 피크를 보여줍니다. 경쇄(LC)와 중쇄(HC)의 deconvoluted 스펙트럼을 각각 그림 4C와 4E에 나타내었습니다. 환원된 트라스투주맙에 사용된 프로세싱 파라미터는 그림 2에 나타난 원형 mAb에 대한 파라미터와 유사했습니다. 유일한 차이점은 deconvoluted mass range가 10,000-60,000Da로 변경되었고 relative abundance threshold가 25%로 설정되었다는 것입니다. 트라스투주맙 중쇄의 deconvoluted 스펙트럼에서 주목할 점은 당화된 피크의 상대적 강도가 raw MS 스펙트럼 삽입 그림에서 관찰된 것과 유사하다는 것입니다. 중쇄의 각 전하 상태는 당화된 피크에 대해 서로 다른 상대적 강도를 보이지만, raw MS 스펙트럼의 상대적 존재비를 deconvoluted 스펙트럼과 연관시킬 수 있으면 deconvoluted 스펙트럼에 대한 신뢰를 얻을 수 있습니다. 환원 및 원형 수준에서 당화의 상대적 존재비를 보고할 수 있는 능력은 중요한 측정 기준입니다. 이런 존재비가 확립된 허용 오차를 벗어나면 바이오 의약품 실험실의 QA/QC 팀이 추가적인 조사를 수행해야 합니다.

원형/서브유닛 수준의 상대적 존재비 및 MS spectral deconvolution 보고서

표 4는 각각 원형 수준과 서브유닛 수준에서 트라스투주맙의 측정된 상대 존재비를 보여줍니다. 상대적 존재비(%)는 강도가 가장 높은 성분을 기준으로 존재비를

정규화하여 계산하며, 상대적 정량화(%)는 모든 성분의 총 존재비에 대한 성분의 절대적 존재비를 측정합니다. 상대적 존재비(%)와 상대적 정량화(%)는 모두 제품 재현성과 품질을 모니터링하는 데 사용할 수 있습니다.

표 3. Agilent OpenLab CDS 소프트웨어에서 deconvolution 후 이론적 평균 분자량과 실험적으로 관찰된 분자량을 비교한 내용입니다.

Agilent Pro iQ Plus 질량 분석기에서 측정된 실험 오차					
분자	변형	이론적 질량(Da)	측정된 질량(Da)	Δ Mass (Da)	질량 오차(ppm)
원형 트라스투주맙	G0+G0F	147,912.7	147,916.7	4.0	27
	G0F+G0F	148,058.8	148,055.1	-3.7	-25
	G0F+G1F	148,221.0	148,217.7	-3.3	-22
	G1F+G1F	148,383.1	148,374.7	-8.4	-57
	G1F+G2F	148,545.3	148,542.0	-3.3	-22
트라스투주맙 HC	G0	50456.1	50,447.3	-8.8	-174
	G0F	50602.2	50,597.9	-4.3	-85
	G1F	50764.4	50,759.9	-4.5	-89
	G2F	50926.5	50,915.4	-11.1	-218
트라스투주맙 LC	없음	23,443.3	23,440.5	-2.8	-119

표 4. (A) 원형 수준과 (B) 환원 수준에서 deconvolution 후의 상대적 존재비.

A

트라스투주맙 원형의 상대적 존재비				
성분	측정된 질량	제안된 ID	상대적 존재비(%)	상대적 정량화(%)
A	148,218Da	G0F+G1F	100	33.77
B	148,375Da	G1F+G1F	76.63	25.88
C	148,055Da	G0F+G0F	67.72	22.87
D	148,542Da	G1F+G2F	38.00	12.83
E	147,917Da	G0+G0F	13.79	4.66

B

트라스투주맙 중쇄의 상대적 존재비				
성분	측정된 질량	제안된 ID	상대적 존재비(%)	상대적 정량화(%)
A	50,598Da	G0F	100	41.22
B	50,760Da	G1F	94.13	38.80
C	50,915Da	G2F	33.71	13.90
D	50,447Da	G0	14.73	6.07

그림 5는 원형 트라스투주맵에 대한 MS spectral deconvolution 소프트웨어 보고서의 예를 보여줍니다. 이 보고서는 OpenLab CDS 소프트웨어의 보고서 편집기 탭에서 쉽게 사용자 정의할 수 있습니다. 여기 보고서에는 추적을 위해 데이터 수집 및 프로세싱 방법, 주입량, 바이알 위치 및 주입 날짜에 대한 세부 정보가 표시됩니다. 또한, 검출된 성분이 포함된 raw MS와 deconvoluted 스펙트럼도 표시됩니다. 보고서에는 또한 deconvoluted 스펙트럼 성분의 상대적 존재비(%)와 상대적 정량화(%)도 나열됩니다.

결론

LC/MS를 이용한 원형 질량 분석은 바이오 의약품 실험실에서 당화의 상대적 존재비를 모니터링하기 위해 일반적으로 사용하는 기술입니다. 이러한 분석은 제품의 효과와 안전성에 중요합니다. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템은 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus와 결합되어, 정기적인 분석에서 요구되는 견고한 시스템이 필요한 실험실에 작은 크기와 비용 효율적인 LC/MS 기기를 제공합니다. 본 연구에서는 Pro iQ Plus LC/MS 시스템을 사용하여 치료제의 원형 수준과 환원된 수준에서 당화된 피크의 상대적 존재비를 보고했습니다. 5개의 당화된 피크가 원형 수준에서 확인되었으며, 상대적 존재비는 애질런트 고분해능 accurate mass 분석 시스템에서 측정된 결과와 일치했습니다. 트라스투주맵 중재의 상대적 존재비도 모니터링했는데, G0, G0F, G1F 및 G2F 클리칸과 일치하는 4개의 피크가 확인되었습니다. 당화 모니터링을 위한 신뢰할 수 있는 상대적 존재비와 탁월한 MS 스펙트럼 피크 모양의 결합은 Agilent Pro iQ Plus SQ 질량 분석기의 우수한 성능을 잘 보여줍니다.

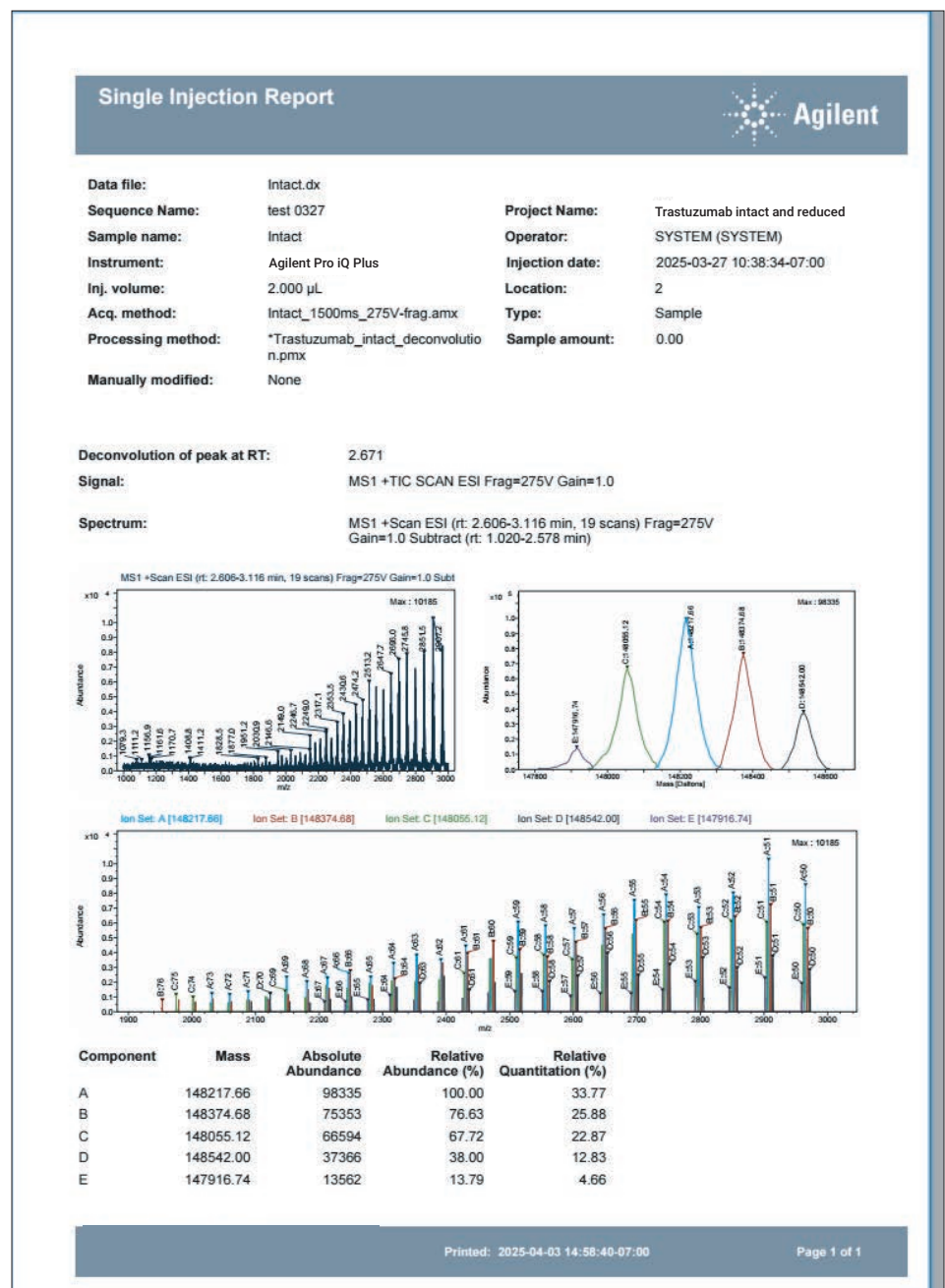


그림 5. 원형 트라스투주맵에 대한 MS spectral deconvolution 보고서.

참고 자료

1. Higel, F.; Seidl, A.; Sörgel, F.; Friess, W. N-glycosylation Heterogeneity and the Influence on Structure, Function and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies And Fc Fusion Proteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *100*, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005>
2. Wang, D.; Baudys, J.; Bundy, J.; Solano, M.; Keppel, T.; Barr, J. Comprehensive Analysis of the Glycan Component of SARS-CoV-2 Spike Proteins Using Signature Ions-Triggered Electron-Transfer/Higher-Energy Collisional Dissociation (ETHcD) Mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 21, 14730–14739. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03301>

www.agilent.com

DE-006222

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
2025년 5월 13일 한국에서 인쇄
5994-8345KO

한국에질런트테크놀로지스㈜
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
DF타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090(고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com