

단일 클론 항체 N-결합 글리칸 분석의 자동화된 워크플로

저자

Shuai Wu, Zach Van Den
Heuvel, Steve Murphy,
Aled Jones
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 Agilent AssayMAP Bravo 및 Agilent GlykoPrep InstantPC 키트를 사용한 N-글리칸 유리, 표지, 정제를 위한 자동화된 워크플로에 대해 설명합니다. 총 24개의 항체를 단일 실험에서 분석했고, N-글리칸을 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 사용해 식별했습니다.

서론

단일 클론 항체(mAbs)는 암 면역 치료에서 구현된 매우 중요한 생물약품으로 최근 몇 년 사이에 크게 발전을 이루었습니다. 당화는 항체 안정성 및 효과 유지에 중요한 역할을 담당합니다.¹ 따라서 글리칸은 항체 개발 프로세스와 제조 전반에서 세심하게 모니터링됩니다. 고처리량 글리칸 시료 전처리가 클론 선택 및 세포 배양 최적화 프로세스에서 매우 중요합니다. 애질런트는 AssayMAP Bravo 및 GlykoPrep InstantPC 키트를 사용해 N-글리칸을 유리, 표지, 정제를 위한 자동화된 워크플로를 개발했습니다.

이 워크플로에서 자동 프로토콜은 GlykoPrep InstantPC 키트와 AssayMAP Bravo를 포함합니다(그림 1). IgG 시료를 RX 카트리지에서 고정 및 변성시킨 다음에 PNGase F를 사용해 카트리지에서 N-글리칸을 유리했습니다. 즉각적인 표지 지정을 위해 방출된 N-글리칸을 InstantPC 염료에 용리했습니다. 최종 시료 전처리 단계에는 CU(Cleanup) 카트리지를 사용한 N-글리칸 정제 절차가 포함됩니다. 카트리지를 기반 플랫폼을 사용하는 이 분석법은 InstantPC 염료 및 자동 액체 처리 장치를 완벽하게 통합해 N-글리칸 시료 전처리를 간소화합니다. 고처리량 시료 전처리를 약 3시간 내로 완료하였습니다. InstantPC-표지 N-글리칸은 형광 검출(FLD) 및 질량 분석(MS) 측정 모두에서 신호를 향상시키는 것으로 나타났습니다.



Agilent AssayMAP Bravo



Agilent GlykoPrep InstantPC 키트

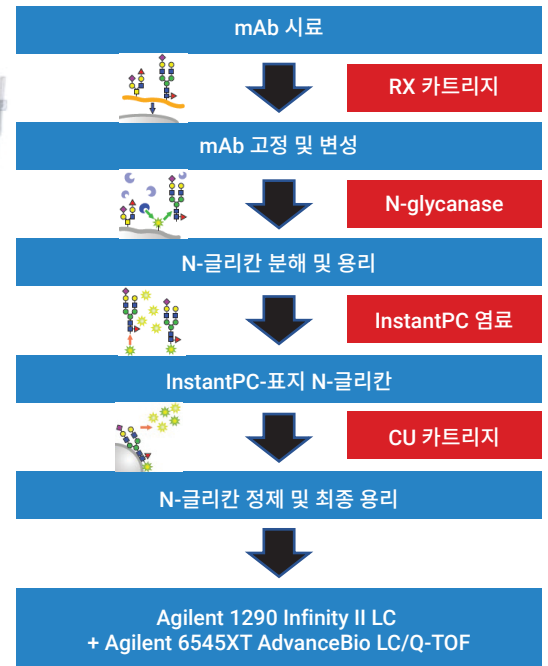


그림 1. Agilent AssayMAP Bravo 및 Agilent GlykoPrep InstantPC 키트를 사용한 자동 N-글리칸 시료 전처리.

실험

재료

InstantPC를 이용한 GlykoPrep-plus N-glycan 전처리 키트, 애질런트(이전 ProZyme)의 96-ct(부품 번호 GPPNG-PC), 다음 모듈 포함: GlykoPrep-plus 분해 모듈, 96-ct(부품 번호 GSP-RX), InstantPC 표지 모듈(부품 번호 GSP-PC), GlykoPrep cleanup 모듈, 96-ct(부품 번호 GSP-CU), GlykoPrep-plus 랩웨어 모듈(부품 번호 AM96-NG).

Agilent CHO mAb는 애질런트에서 생산된 것입니다.

- Herceptin은 Genentech(NDC 50242-134-68)에서 구입
- ProZyme에서 제조된 인간 IgG
- NISTmAb는 NIST(RM 8671)에서 구입
- 기타 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 사에서 주문

자동 N-글리칸 시료 전처리

Agilent Protein Sample Prep Workbench 소프트웨어에는 AssayMAP Bravo 플랫폼을 사용하는 GlykoPrep InstantPC 키트 자동화를 위해 사전 로드된 워크플로가 포함되어 있습니다. "RX 분해 - InstantPC 표지" 워크플로는 워크플로 라이브러리 내 N-글리칸 시료 전처리 카테고리에서 찾을 수 있습니다. 이 워크플로에는 반자동화 N-글리칸 시료 전처리를 위한 다섯 가지 프로토콜이 포함되어 있습니다.² 간단히 소개하면, 사용자는 프로토콜 1을 사용해 시약 플레이트를 설정할 수 있고, 프로토콜 2 및 4를 사용해 마이크로크로마토그래피 카트리지 레이아웃을 정의할 수 있으며, 프로토콜 3 및 5는 샘플러 처리를 수행합니다.

첫 번째 단계는 "플레이트 및 시약 설정 프로토콜"을 사용해 InstantPC 키트로부터 시약 플레이트를 준비하는 것입니다. 이 단계를 위한 전용 "시약 용량 계산기"가 설계되어 있습니다. 처리해야 하는 시료 수와 열(column)을 기준으로 계산기는 각 시약의 조제해야 할 정확한 용량과 이러한 시약을 시약 소스 플레이트에 분주할 위치에 대한 지침을 제공합니다. 이 실험의 경우, 시료와 각 50µg의 mAb를 합쳐 총24개를 포함하는 3개의 컬럼이 있습니다. 계산기에 따른 특정 용량의 시약을 키트에서 시약 소스 플레이트로 이송하면 그림 2(프로토콜 1, 데크 레이아웃)에 따라 데크에 다른 랩웨어를 설정할 수 있습니다. 데크 위치 7에서 4개의 U-바닥 플레이트는 분해 완충액(상단) > 시약 > 변성 시약 > InstantPC 용액(하단)으로 표시하고, 쌓아야 합니다. 프로토콜이 시작된 후에는 AssayMAP Bravo가 원하는 용량의 서로 다른 시약을 분취합니다. 이는 다음 반응 및 글리칸 표지를 위한 시약 플레이트 준비에서 매우

중요한 단계입니다. 이뿐만 아니라 계산기는 프로토콜 3에서 사용할 RX 카트리지 프라이밍 용액 용량과 프로토콜 5에서 사용할 모든 완충 용액의 용량을 계산합니다. 이 응용의 두 번째 단계는 RX 카트리지 이송 프로토콜만 있는 것으로, 여기서 사용자는 다음 반응을 위한 데크를 설정할 수 있으며, 응용 분석 페이지를 닫지 않고 데크 위치

2로 카트리지를 이송할 수 있습니다. 본 실험에서는 1열부터 시작하여 세 개의 전체 카트리지 열을 이송했습니다.

대조군 인간 IgG, Agilent CHO mAb, Herceptin, NISTmAb, rituximab, SiLuMAb을 포함하는 여섯 개의 다른 항체 시료는 1µg/µL로 정규화하였고 그림 3에 나타낸 것과 같이 원 시료 플레이트에

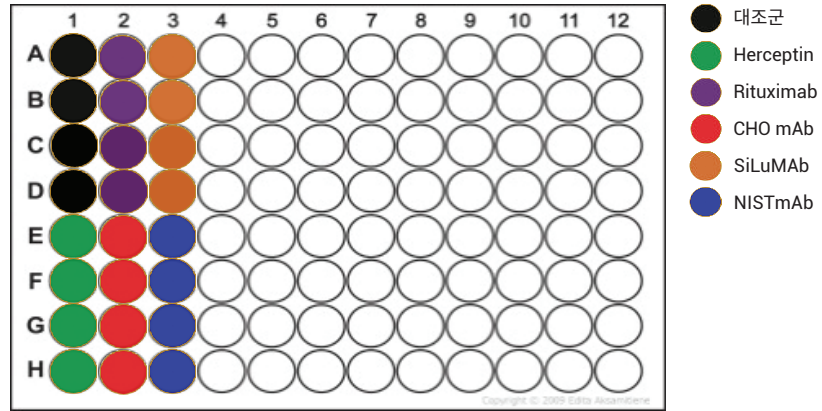


그림 3. 96-well plate에서의 항체 시료 위치.

1 Plate & Reagent Setup Protocol

Deck Layout

1. Wash Station	2. Empty	3. Empty Seating Station
4. Processing Plate	5. Reagent Source Plate	6. Pipette Tips
7. 96-well U-bottom stack	8. Empty	9. Empty

Labware Table

1	96AM Tip Wash Station
2	None
3	96AM Cartridge Seating Station
4	96 PCR Block + 96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
5	96 AbGene 1127, 1mL Deep Well, Square Well, Round Bottom
6	96 V11 LT250 Tip Box (19477.002)
7	Stack of 4: 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard, PolyPro
8	None
9	None

Application Settings

Parameter	Value
Number of Columns to Manage	3
Starting Column of Destination Plate	1

Status 1

▶ Run Protocol 1
 ⏸

그림 2. Agilent InstantPC 소프트웨어의 시료 설정 프로토콜.

배치되었습니다. N-글리칸 유리 및 표지는 프로토콜 3에서 수행되었습니다. 50µL의 mAb 시료(각 mAb별 4개의 반복시료)를 변성 시약을 사용해 변성하였으며, mAbs는 24개 RX 카트리지에 동시에 고정했습니다. 이후 차단 단계를 사용해 RX 카트리지에서 남아있는 활성 결합 부위를 차단했습니다.

45°C에서 PNGase F를 카트리지로 흡입시켜 N-글리칸을 고정된 단백질로부터 유리했고 mAbs를 30분 동안 배양했습니다. 반응이 끝날 때 유리된 N-글리칸을 InstantPC 용액을 사용해 플레이트로 용리했으며 N-Glycan에 대한 표지를 즉시 수행했습니다(그림 4, 데크 위치 7).

프로토콜 4에서 정제(CU) 카트리지를 이송했습니다. 데크 레이아웃이 그림 5와 같이 설정되면 InstantPC 표지 N-글리칸 시료를 프로토콜 5를 사용해 정제하여 과량의 유리 InstantPC를 제거했습니다. 최종 InstantPC-표지 글리칸 시료를 50µL의 최종 용리 용량으로 용리했습니다.

3 Immobilization, Digestion & InstantPC Labeling Protocol

Deck Layout

1. Wash Station	2. RX Cartridges	3. RX Priming Solution
4. Processing Plate	5. Denaturation Reagent	6. Samples
7. InstantPC Solution	8. Digestion Buffer	9. Blocking Reagent

Labware Table

- 96AM Tip Wash Station
- 96AM Cartridge Seating Station
- 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
- 96 PCR Block + 96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
- 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard, PolyPro
- 96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
- 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard, PolyPro
- 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard, PolyPro
- 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard, PolyPro

Application Settings

Parameter	Value	Units
Denaturant Volume	55	µL
Starting Sample Volume	55	µL
Denatured Sample Load Volume		µL
Sample Loading Flow Rate	5	µL/min
Temperature Set Point for Digestion	45	°C
Duration of Digestion Step	30	minutes

Status 3

Run Protocol 3

그림 4. Agilent InstantPC 소프트웨어의 N-글리칸 유리 및 표지 프로토콜.

5 Cleanup Protocol

Deck Layout

1. Wash Station	2. CU Cartridges	3. Organic Waste
4. CU Eluate Collection	5. 1% Formic Acid in ACN	6. 1% Formic Acid in ACN
7. 1% Formic Acid in ACN	8. 10% ACN in Water	9. InstantPC Labeled Glycans

Labware Table

- 96AM Tip Wash Station
- 96AM Cartridge Seating Station
- 96 AbGene 1127, 1mL Deep Well, Square Well, Round Bottom
- 96 PCR Block + 96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
- 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
- 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
- 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
- 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
- 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
- 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard, PolyPro

Application Settings

Parameter	Value	Units
Final Eluate Volume	50	µL

Status 5

Run Protocol 5

그림 5. Agilent InstantPC 소프트웨어의 N-글리칸 정제 프로토콜.

LC/MS를 사용한 N-글리칸 분석

정제된 N-글리칸 시료를 추가 정제 없이 LC/Q-TOF 시스템에 주입했습니다. 최종 N-글리칸 시료의 용량이 원 mAb 시료 용량과 동일하기 때문에 최종 시료 1 μ L는 1 μ g의 mAb에서 얼마만큼의 N-글리칸이 만들어졌는지를 나타냅니다. Agilent 1290 Infinity II LC에는 Agilent 1260 Infinity FLD 및 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF MS를 장착했으며, Dual Agilent Jet Stream(AJS) 소스를 MS 이온화원으로 사용했습니다. N-글리칸 시료는 소수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)를 사용해 분리했으며, Agilent AdvanceBio glycan mapping 컬럼, 2.1 \times 150mm, 1.8 μ m(부품 번호 859700-913)을 컬럼 온도 40°C(그림 6)에서 사용했습니다. 이전에 분리 조건이 신중하게 개발된 바 있어 본 연구에서는 동일한 그레디언트를 구현했습니다(총 분석 시간 35분 중 그레디언트 28분).³ LC 조건은 표 1에 정리되어 있습니다. FLD는 λ_{Ex} = 285nm 및 λ_{Em} = 345nm, PMT gain = 10으로 설정했습니다.

Dual AJS 소스를 사용해 N-글리칸 시료를 m/z 300~1,700의 질량 범위, 2 스펙트럼/초의 스캔 속도, 고분해능(4GHz) 모드에서 분석했고, 자세한 Q-TOF 설정은 표 2에 정리했습니다.

표 1. UHPLC HILIC/FLD 조건.

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템			
컬럼	Agilent AdvanceBio glycan mapping, 2.1 \times 150mm, 1.8 μ m(p/n 859700-913)		
용매 A	50mM 포름산(암모니아수를 사용해 pH 4.5로 조정)		
용매 B	아세토니트릴		
그레디언트	시간(분)	B (%)	유속(mL/분)
	0.0	78.0	0.6
	0.5	74.0	0.6
	13.0	72.5	0.6
	28.0	61.0	0.6
	28.5	50.0	0.5
	28.6	50.0	0.4
	28.8	78.0	0.4
	31.0	78.0	0.5
	31.5	78.0	0.55
	33.5	78.0	0.6
정지 시간 = 35.0분			
컬럼 온도	40°C		
주입량	1 μ L		
FLD	λ_{Ex} = 285nm λ_{Em} = 345nm		

표 2. LC/Q-TOF 파라미터.

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
소스	Dual Agilent Jet Stream
가스 온도	150°C
건조 가스 유속	9L/분
Nebulizer	35psi
Sheath 가스 온도	300°C
Sheath 가스 유속	10L/분
Vcap	3,000V
노즐 전압	500V
Fragmentor	120V
스키머	65V
질량 범위	m/z 300~1,700
스캔 속도	2스펙트럼/초
수집 모드	고분해능(4GHz)

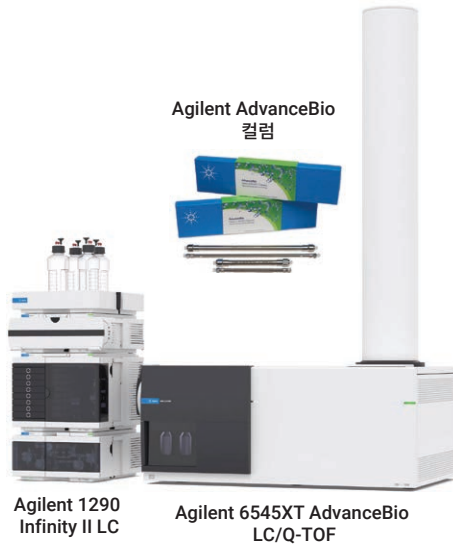


그림 6. Agilent 1290 Infinity II LC 및 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 Agilent AdvanceBio glycan mapping 컬럼을 사용하는 N-글리칸 분석.

결과 및 토의

InstantPC-표지 N-글리칸 정성 분석

대조군 인간 IgG에는 명확하게 특성 규명된 17개의 N-글리칸이 포함되어 있어, 머무름 시간 및 측정된 정확 질량을 이들 글리칸과 비교해 N-글리칸을 식별하는 데 사용할 수 있습니다. 그림 7A 및 그림 8A에는 17개의 모든 글리칸에 주석이 표시되어 있습니다. 그림 7B~7F에서 머무름 시간이 같은 동일 글리칸은 주석 표시를 하지 않았습니다. 또한 5개의 다른 일반 N-글리칸(그림 7B, 7C, 7D, 8B, 8C, 8D에 표시)은 측정된 정확 질량 및 단당류 조성을 사용해 식별했습니다. FLD 결과에서는 이러한 글리칸에 대한 동일한 머무름 시간 및 비슷한 상대 피크 존재비가 나타났습니다(그림 8).

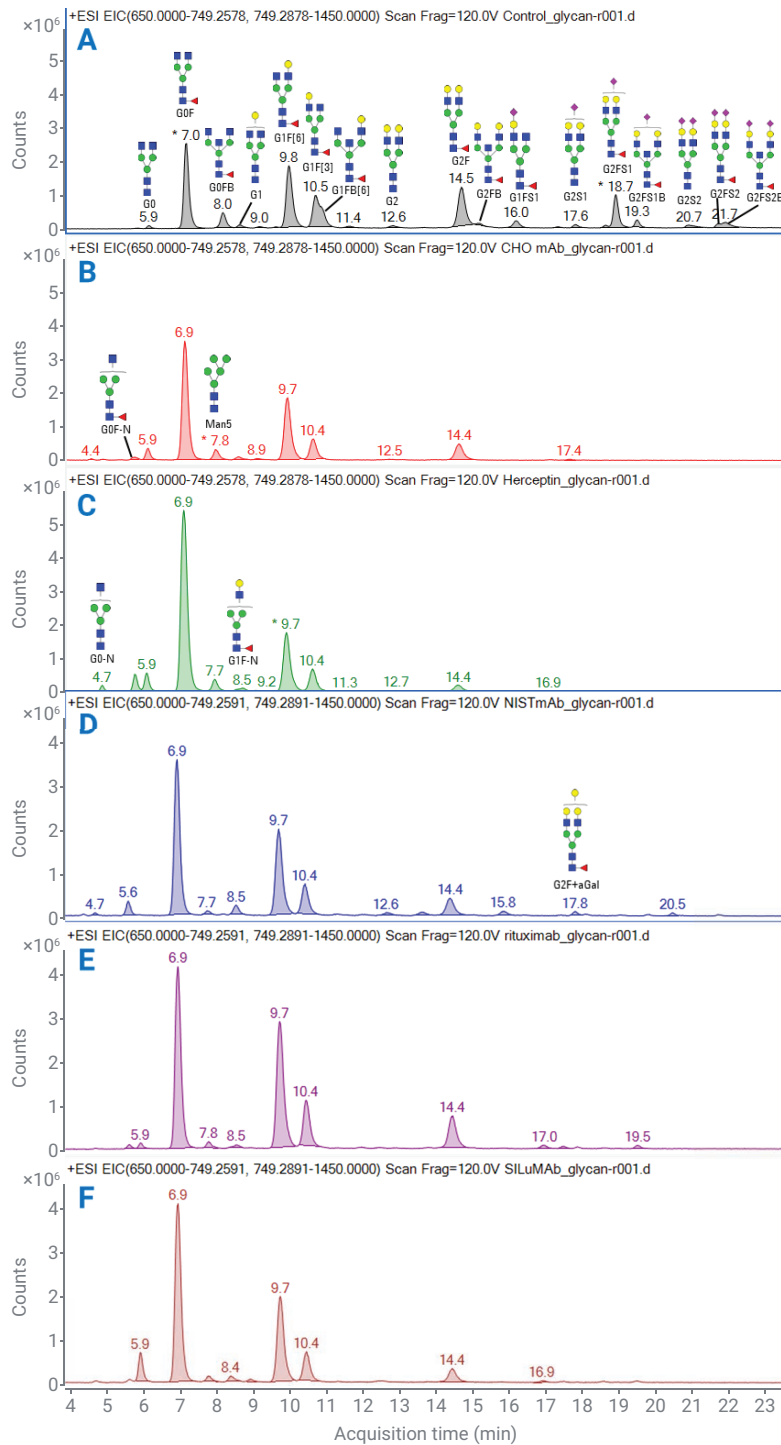


그림 7. 모든 시료에 대한 InstantPC-표지 N-글리칸의 LC/Q-TOF 분석. (A) 대조군 인간 IgG, (B) CHO mAb, (C) Herceptin, (D) NISTmAb, (E) Rituximab, (F) SILuMAB.

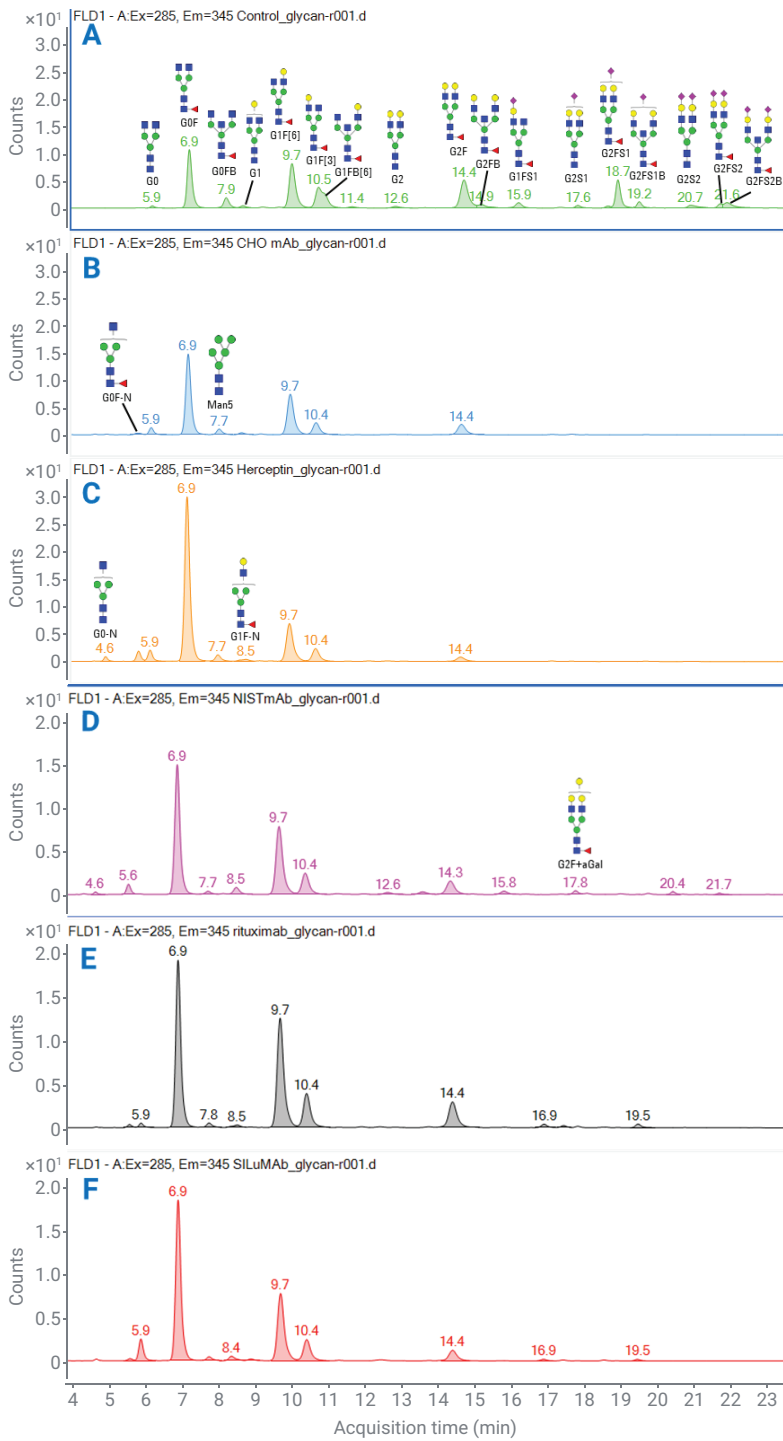


그림 8. 모든 시료에 대한 InstantPC-표지 N-글리칸의 LC/FLD 분석. (A) 대조군 인간 IgG, (B) CHO mAb, (C) Herceptin, (D) NISTmAb, (E) Rituximab, (F) SiLuMAb.

표 3에는 이 연구에서 확인한 22개 N-글리칸에 대한 상세 정보가 나열되어 있습니다. 글리칸은 머무름 시간, 이론상의 질량, 단당류 조성, 구조, 일반명을 기준으로 작성되었습니다.

MS에 의한 InstantPC-표지 N-글리칸 정량 분석

InstantPC-표지 N-글리칸 시료를 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어의 유리 글리칸 워크플로를 사용하여 분석했습니다. 사용자는 소프트웨어를 사용해 질량 오류, 머무름 시간 구간, 글리칸 이온 종, 태그(2-AB 및 InstantPC)를 포함하여 매칭 기준을 설정하고, 소프트웨어 자체 평점 시스템으로 결과를 검증할 수 있습니다. N-글리칸은 대부분 2가 전하 이온[M+2H]²⁺으로 관찰되었고, 일부 다른 종에는 [M+NH₄+H]²⁺, [M+H+Na]²⁺ 및 [M+H+K]²⁺가 포함되었습니다.⁴ InstantPC는 261.1477 Da의 단일 동위원소 질량을 환원 말단에 추가했습니다. 내부 글리칸 데이터베이스를 이 연구에 구현하여 모든 mAbs에서 높은 질량 정확도(<2ppm)로 N-글리칸을 빠르게 식별할 수 있었습니다. BioConfirm은 내부 글리칸 데이터베이스를 사용해 머무름 시간 및 측정된 정확 질량을 기준으로 24개 시료에서 10개의 표지 N-글리칸을 빠르게 식별하고 적분했습니다. 이 10개의 글리칸은 모든 mAbs에서 확인되는 가장 존재비 높은 상위 10개 N-글리칸입니다.

그림 9A는 MS 측정을 통해 작성한 것으로, 각 mAb에서의 10개 N-글리칸 상대 비율을 나타냅니다. 10개 글리칸은 LC 크로마토그램의 머무름 시간 순서를 기준으로 나열되었습니다. 상대 존재비 분석은 대개 동일한 mAb 내에서 다양한 N-글리칸 비율을 비교하는 것입니다. 예를 들어, 비율이 40.85%인 rituximab G0F는 CHO mAb(44.58%) 및 NISTmAb(44.67%)보다 상대 비율이 낮습니다. 푸코실화된 글리칸(G0F, G1F, G2F)은 가장 존재비가 높은 글리칸으로, 10개 글리칸 중 90% 이상을 차지했습니다. 각 N-글리칸의 상대 백분율 평균값은 CV%(n = 4)와

표 3. 모든 시료에서 식별된 22개 N-글리칸 요약.

피크 번호	R.T. (분)	이론값 [M+2H] ²⁺	조성	구조	일반명
1	4.7	688.2856	Hex3HexNAc3		G0-GlcNAc
2	5.6	761.3130	Hex3HexNAc3dHex1		G0F-GlcNAc
3	5.9	789.8244	Hex3HexNAc4		G0
4	7.0	862.8534	Hex3HexNAc4dHex1		G0F
5	7.8	748.7987	Hex5HexNAc2		Man5
6	8.0	964.3931	Hex3HexNAc5dHex1		G0FB
7	8.4	870.8508	Hex4HexNAc4		G1
8	8.5	842.3410	Hex4HexNAc3dHex1		G1F-GlcNAc
9	9.8	943.8798	Hex4HexNAc4dHex1		G1F[6]
10	10.5	943.8798	Hex4HexNAc4dHex1		G1F[3]
11	10.7	1045.4195	Hex4HexNAc5dHex1		G1FB[6]
12	12.6	951.8772	Hex5HexNAc4		G2
13	14.5	1024.9062	Hex5HexNAc4dHex1		G2F
14	14.9	1126.4459	Hex5HexNAc5dHex1		G2FB
15	16.0	1089.4275	Hex4HexNAc4dHex1NeuAc1		G1FS1[3]
16	17.6	1097.4249	Hex5HexNAc4NeuAc1		G2S1
17	17.8	1105.9325	Hex6HexNAc4dHex1		G2F+aGal
18	18.7	1170.4539	Hex5HexNAc4dHex1NeuAc1		G2FS1
19	19.3	1271.9936	Hex5HexNAc5dHex1NeuAc1		G2FS1B
20	20.7	1242.9726	Hex5HexNAc4NeuAc2		G2S2
21	21.5	1316.0016	Hex5HexNAc4dHex1NeuAc2		G2FS2
22	21.7	1417.5413	Hex5HexNAc5dHex1NeuAc2		G2FS2B

함께 표 4에 정리되어 있습니다. N-글리칸 유리, InstantPC 표지, 정제를 포함한 여러 단계 후에도 거의 모든 CV%는 10% 미만이었으며, 이는 자동화된 워크플로의 높은 재현성을 나타냅니다.

FLD에 의한 InstantPC-표지 N-글리칸 정량 분석

FLD를 분석법으로 사용했기 때문에 정량 결과 또한 FLD 측정을 기반으로 평가했습니다. 그림 9B에는 24개 시료의 FLD 결과가 요약되어 있습니다. 그림 9A에서와 같이, 가장 존재비가 높은 상위 10개

N-글리칸에 대한 상대 존재비를 계산하고 주석을 표시했습니다. 푸코실화된 글리칸(G0F, G1F, G2F)이 존재비 측면에서 10개 글리칸 중 90% 이상을 차지했습니다. FLD로 측정된 N-글리칸 평균 상대 백분율 면적값은 표 5에 CV%(n = 4)와 함께 나열되어 있습니다.

MS 및 FLD 간의 정량 결과를 비교했을 때 각 글리칸에 대한 상대 존재비 결과는 모든 글리칸에 대해 5% 미만, 존재비가 높은 주요 글리칸에 대해 2% 미만의 차이를 보이며 매우 유사한 것으로 나타났습니다.

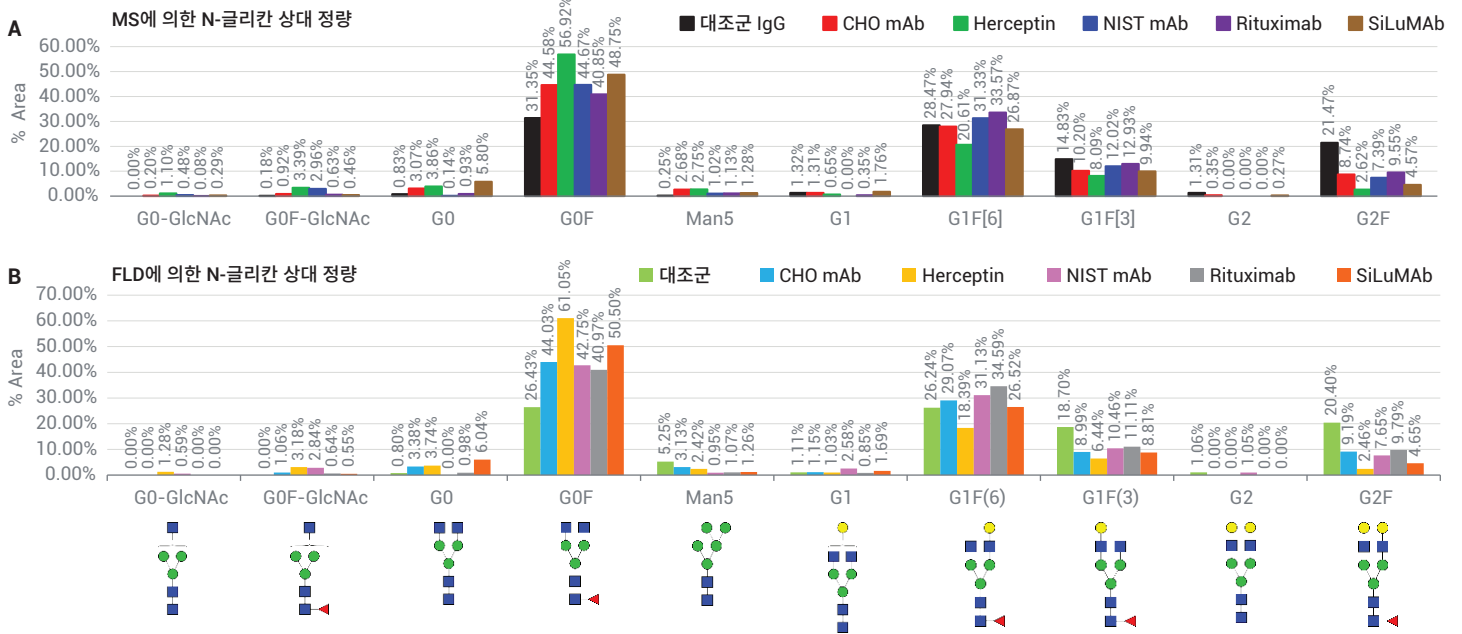


그림 9A. MS로 측정된 N-글리칸 상대 존재비. 9B. FLD로 측정된 N-글리칸 상대 존재비.

표 4. MS로 측정된 6개 IgG 시료에 포함된 10개 주요 N-글리칸의 평균 상대 % 면적(CV% 함께 표시).

일반명	대조군 IgG	CV%	CHO mAb	CV%	Herceptin	CV%	NIST mAb	CV%	Rituximab	CV%	SiLuMAB	CV%
G0-GlcNAc	0.00%	0.00%	0.20%	7.60%	1.10%	1.19%	0.48%	7.47%	0.08%	6.84%	0.29%	8.14%
G0F-GlcNAc	0.18%	5.31%	0.92%	13.10%	3.39%	1.85%	2.96%	7.88%	0.63%	4.51%	0.46%	8.82%
G0	0.83%	6.81%	3.07%	10.45%	3.86%	3.11%	0.14%	6.70%	0.93%	4.67%	5.80%	8.49%
G0F	31.35%	6.11%	44.58%	7.22%	56.92%	2.16%	44.67%	5.91%	40.85%	3.72%	48.75%	6.20%
Man5	0.25%	8.27%	2.68%	9.75%	2.75%	3.10%	1.02%	8.21%	1.13%	3.74%	1.28%	9.19%
G1	1.32%	6.56%	1.31%	9.14%	0.65%	3.25%	0.00%	0.00%	0.35%	2.54%	1.76%	8.56%
G1F[6]	28.47%	6.15%	27.94%	6.06%	20.61%	3.17%	31.33%	8.92%	33.57%	3.85%	26.87%	6.76%
G1F[3]	14.83%	6.30%	10.20%	9.22%	8.09%	3.09%	12.02%	11.05%	12.93%	5.63%	9.94%	7.60%
G2	1.31%	9.30%	0.35%	9.26%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.27%	6.77%
G2F	21.47%	7.54%	8.74%	8.27%	2.62%	2.95%	7.39%	8.03%	9.55%	5.96%	4.57%	6.07%

표 5. FLD로 측정된 6개 IgG 시료에 포함된 10개 주요 N-글리칸의 평균 상대 % 면적(CV% 함께 표시).

일반명	대조군 IgG	CV%	CHO mAb	CV%	Herceptin	CV%	NIST mAb	CV%	Rituximab	CV%	SiLuMAB	CV%
G0-GlcNAc	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.28%	2.66%	0.59%	10.92%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
G0F-GlcNAc	0.00%	0.00%	1.06%	8.21%	3.18%	2.43%	2.84%	7.18%	0.64%	4.12%	0.55%	9.22%
G0	0.80%	6.03%	3.38%	8.95%	3.74%	3.05%	0.00%	0.00%	0.98%	5.90%	6.04%	9.23%
G0F	26.43%	5.54%	44.03%	9.38%	61.05%	3.43%	42.75%	7.89%	40.97%	4.16%	50.50%	8.79%
Man5	5.25%	5.85%	3.13%	9.58%	2.42%	14.36%	0.95%	11.55%	1.07%	5.96%	1.26%	10.77%
G1	1.11%	6.11%	1.15%	9.11%	1.03%	5.05%	2.58%	11.34%	0.85%	8.62%	1.69%	8.86%
G1F(6)	26.24%	7.09%	29.07%	9.08%	18.39%	2.99%	31.13%	9.62%	34.59%	3.96%	26.52%	7.43%
G1F(3)	18.70%	7.66%	8.99%	13.25%	6.44%	3.06%	10.46%	10.26%	11.11%	1.89%	8.81%	7.10%
G2	1.06%	8.33%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.05%	11.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
G2F	20.40%	7.67%	9.19%	8.44%	2.46%	2.96%	7.65%	9.75%	9.79%	6.59%	4.65%	5.35%

결론

Agilent AssayMAP Bravo 및 Agilent GlykoPrep InstantPC 키트를 사용하여 N-글리칸에 대한 자동화된 유리, 표지, 정제 워크플로를 구현했습니다. 한 번의 실험에서 24개 항체 시료를 처리했습니다. AssayMAP을 사용하면 고처리량의 재현성 높은 시료 전처리가 가능하며, 이를 통해 정밀도 및 무인 작동 시간을 늘릴 수 있습니다. InstantPC-표지 N-글리칸은 MS 및 FLD 모두에서 향상된 신호를 나타냈습니다. Agilent AdvanceBio glycan mapping 컬럼은 N-글리칸의 탁월한 분리를 제공합니다. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF는 고감도의 정확 질량 측정을 제공해 N-글리칸 식별을 가능하게 합니다.

내부 N-글리칸 데이터베이스를 사용하는 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어는 머무름 시간과 측정된 정확 질량(<2ppm)을 매칭시켜 빠른 식별을 가능하게 합니다. 또한 BioConfirm을 사용해 N-글리칸의 상대 정량에 관한 배치 분석과 N-글리칸 함량의 자동 플로팅이 가능합니다. 푸코실화된 N-글리칸(G0F, G1F, G2F)이 다섯 개의 모든 mAb에서 가장 존재비 높은 글리칸이었으며, 이 세 가지가 90% 이상의 존재비를 차지합니다. 자동화된 시료 전처리를 사용한 각 글리칸의 CV%는 10% 이내로, 워크플로의 높은 재현성을 나타냅니다.

InstantPC-표지 N-글리칸 시료에 대한 FLD 정량에서는 MS 정량과 유사한 결과가 나타났습니다. 두 가지 분석법 간의 차이는 주요 글리칸의 경우 2% 미만, 모든 글리칸의 경우 5% 미만입니다. 이것은 글리칸이 HPLC에서 베이스라인

분리된 경우, MS 정량이 FLD를 사용한 정량과 비교하여 허용 가능한 범위 내에 있고, 상대적으로 정확한지를 나타냅니다. 이는 특히 2-aminobenzamide(2-AA) 및 2-aminobenzoic acid(2-AB)와 같은 전통적인 표지와 비교했을 때 InstantPC 글리칸 표지의 강력한 MS 감응으로 인해 가능한 것입니다.⁵

애질런트는 수동 및 자동 GlykoPrep N-글리칸 시료 전처리 키트와 함께 InstantPC를 사용한 차세대 AdvanceBio Gly-X N-글리칸 전처리를 제공합니다. 이는 세 가지 모듈, 즉 탈당화 모듈, InstantPC 표지 모듈 및 정제 모듈(24-ct 또는 96-ct 옵션 포함)로 구성되어 있습니다.⁶ Gly-X InstantPC 키트는 5분 PNGase F 용액 내 분해 및 InstantPC 염료 표지로 수동 시료 전처리 시간을 1시간 이하로 단축하며⁷, 비건조 및 매트릭스 내(on-matrix) 표지 절차를 사용하는 2-AB 버전도 있습니다.⁸ 향후 목표는 자동 N-글리칸 시료 전처리를 통해 Gly-X 시료 전처리를 Bravo 플랫폼에 완벽하게 통합하는 프로토콜을 개발하는 것입니다.

참고 문헌

1. Arnold, J. N. *et al.* The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, 25, 21–50.
2. GlykoPrep-plus Rapid N-Glycan Sample Preparation with InstantPC Automated on AssayMAP Technology, part number GPPNG-PC, Instruction Manual.

3. Oscar, P. *et al.* Analysis of Monoclonal Antibody N-glycans by Fluorescence Detection and Robust Mass Selective Detection and Robust Mass Selective Detection Using the Agilent LC/MSD XT. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-8071EN, **2017**.
4. Wong, D. L. *et al.* A Comprehensive Approach for Monoclonal Antibody N-linked Glycan Analysis from Sample Preparation to Data Analysis. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-8550EN, **2017**.
5. Yan, J. *et al.* Comparison of Common Fluorescent Labels for LC/MS Analysis of Released N-Linked Glycans. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0942EN, **2019**.
6. N-글리칸 분석: 함께하면 커지는 힘. *Agilent Technologies brochure*, publication number 5994-1647KO, **2020**.
7. InstantPC 키트를 이용한 Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep: 빠른 FLD/MS 글리칸 분석을 위한 간소화된 워크플로. *Agilent Technologies brochure*, publication number 5994-0918KO, **2019**.
8. Yan, J.; Jones, A. Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 및 2-AB Express 시료 전처리와 LC/FLD/MS를 사용한 바이오 치료제 N-글리칸 분석의 간소화된 워크플로. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1348KO, **2019**.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

RA44343.663125

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 6월 14일, 한국에서 인쇄
5994-3622KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com