

펩타이드 맵핑에서 크로마토그래피 성능 향상

Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼 사용

저자

Jordy Hsiao, Mahsan Miladi,
Li Gu, Stephen Sciuto,
Guannan Li 및 Anne Blackwell
Agilent Technologies, Inc.

개요

본 연구에서는 펩타이드 맵핑 시 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼의 성능 이점을 보여줍니다. 스테인리스 스틸 하드웨어와 비교했을 때, Altura 컬럼은 특히 소수성 및 변형 펩타이드의 경우 피크 모양, 재현성 및 분리능을 향상시킵니다. 합성 mAb 펩타이드 및 트립신 분해된 허셉틴의 LC/MS 분석에 비활성 컬럼을 사용하여 번역 후 변형을 확실하게 식별할 수 있었고, 탈아미드화된 펩타이드의 피크 모양과 분리능이 향상되었습니다. 탈아미드화 변이체의 향상된 분리 성능은 높은 감도와 정밀도가 요구되는 바이오 의약품 워크플로에서 이 컬럼의 유용성을 입증합니다.

소개

펩타이드 맵핑은 바이오 의약품 개발에서 단백질 시퀀스를 확인하고 번역 후 변형(PTM)을 식별하는 데 사용되는 매우 중요한 기술입니다. 하지만 분석 물질과 액체 크로마토그래피(LC) 하드웨어 내 금속 표면 간의 상호작용은 특히 하전되거나 인산화된 펩타이드의 경우에 감도와 분리능을 저하시킬 수 있습니다. 최근 여러 연구에서는 이러한 문제들을 완화하는 데 비활성 유로와 컬럼 하드웨어가 중요함을 잘 보여주었습니다.^{1,2}

이전의 한 연구에서는 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼을 사용한 펩타이드 맵핑 분석법을 최적화하여 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼의 2µm 미만 입자와 UHPLC 시스템을 활용함으로써 분석 시간을 2.5시간에서 1시간으로 단축했습니다.³ 실행 시간이 크게 단축되었음에도 불구하고, AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼과 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼 간에 유사한 펩타이드 용출 패턴이 관찰되어, 서로 다른 컬럼 기술 간에 분석법 이전과 일관된 분석 결과가 보장됩니다. 이러한 개선 사항은 성능 저하 없이 시료 처리량을 높이고 용매 소비량을 줄여줍니다.

성능을 더욱 향상시키기 위해 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼에는 스테인리스 스틸(SS)의 기계적 강도를 유지하면서 금속-분석 물질 상호 작용을 최소화하도록 설계된 Ultra Inert 기술이 적용되었습니다. 본 연구에서는 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 및 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템을 사용하여 합성 펩타이드 및 분해된 단일클론 항체(mAb) 시료를 LC/MS/MS로 분석할 때 Altura 비활성 컬럼과 기존 SS 컬럼의 성능 결과를 비교합니다.

실험

시료 전처리

허셉틴은 이전에 설명된 프로토콜⁴을 수정하여 트립신으로 분해시켰습니다. 구체적으로, 단백질 대 효소 비율 50:1 조건에서 트립신으로 분해를 수행했습니다. 이전 프로토콜에서는 트립신/LysC를 단백질 대 효소 비율 25:1로 사용했으며, 시료 정제 단계는 없었습니다.

LC/MS 분석에 앞서, 불순물을 제거하고 컬럼 수명을 연장하기 위해 C18 스피ن 컬럼을 사용하여 시료를 정제했습니다.

분석 컬럼

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼, 2.1 × 150mm, 1.8µm(부품 번호 959759-902)

Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼, 2.1 × 150mm, 1.8µm(부품 번호 204215-308)

기기

LC/MS 분석은 다음 기기 구성을 사용하여 수행했습니다.

- Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프(G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler, 시료 온도 조절 장치 포함(G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn 온도 조절 장치(G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF(G6549AA)

표 1. LC 파라미터.

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템		
파라미터	값	
이동상 A	0.1% 포름산 수용액	
이동상 B	0.1% 포름산 아세토니트릴 용액	
컬럼 온도	60°C	
유속	0.4mL/분	
샘플러 온도	8°C	
합성 펩타이드에 대한 그라데이션 1	시간(분)	%B
	0.00	2
	1.00	2
	7.00	38
	7.10	80
	9.00	80
	9.10	2
	14.0	2
허셉틴 트립신 분해물에 대한 그라데이션 2	시간(분)	%B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

표 2. MS 파라미터.

Agilent 6545 XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
파라미터	값
소스	Dual AJS Positive ESI
소스	
건조 가스 온도	250°C
건조 가스 유량	10L/분
Sheath Gas 온도	250°C
Sheath Gas 유량	12L/분
네불라이저 압력	25psi
캐필러리 전압	3,500V
노즐 전압	0V
Fragmentor	95V
Skimmer	50V

파라미터	값
수집 - MS	
수집 모드	확장된 측정 범위(2GHz)
질량 범위	m/z 100 - 3,000
스캔 속도	1스펙트럼/초
기준 질량	121.0509, 922.0098
수집 - MS/MS	
수집 모드	Auto MS/MS
질량 범위	m/z 100 - 3,000
스캔 속도	3 spectra/sec
분리 폭(MS/MS)	Medium(약 4amu)
주기당 최대 전구체 수	5
MS/MS 임계값	6,000 카운트 및 0.001%
전구체 전하	2+, 3+, > 3+
표적	50,000 카운트/스펙트럼

표 3. MS/MS 충돌 에너지 파라미터.

램핑 충돌 에너지		
충전	기울기	오프셋
2	3.1	1
3	3.6	-4.8
> 3	3.6	-4.8

표 4. Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어 버전 12.1 처리 파라미터.

워크플로 및 순서		
워크플로	단백질 분해	
조건	감소된	
시퀀스	허셉틴(직접 알킬화), 트립신	
가변 조정	탈아미드화, G0, G0F, G0F-GlcNAc, G2, G2F, H5N3F1-1, 메틸화, 산화(M, W), 피로글루탐산(E)	
효소	트립신	
펩타이드 찾기		
생체분자 필터	MS/MS 스캔을 포함한 분자 표시	사용
추출	높이가 있는 피크 사용	600 카운트 이상
이온 종	양이온	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
전하 상태	동위원소 모델	펩타이드
	활당된 요급 상태를 특정 범위로 제한	1 - 5
피크 필터(MS/MS)	높이 필터, 절대 높이 활성화	50 카운트 이상
매치 허용 오차		
질량 매칭	± 5ppm MS1, ± 20ppm MS2	
점수	점수가 7.00 미만이면 경고	
	점수가 5.00 미만(시퀀스 커버리지)이면 매칭 안 함	
매칭 규칙	MS/MS 파편화 유형	CID
	누락된 절단 수	2
	생체분자당 최대 매칭 수	3
	펩타이드 길이 범위	3 - 70
	N-항 또는 C-항 절단만 허용	선택됨
	최대 변형 수	2

결과 및 토의

비활성 컬럼 하드웨어로 가능해진 크로마토그래피 개선 사항 평가

펩타이드 맵핑 워크플로에서 Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼 하드웨어의 성능 우위를 평가하기 위해 SS ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼을 비교 대상으로 삼았습니다. mAb 시퀀스를 포함하는 합성 펩타이드 혼합물을 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 연결된 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 사용하여 분석했습니다.

추출된 이온 크로마토그램의 초기 오버레이(그림 1)는 두 컬럼 모두에서 유사한 머무름 시간을 보여주었습니다. 그러나 개별 펩타이드를 자세히 검사한 결과 신호 강도, 피크 모양 및 분리능에서 상당한 차이가 드러났습니다(그림 2). 예를 들어, 소수성 및 염기성 펩타이드인 VVSVLTVLHQDWLNGK는 Altura 컬럼에 비해 SS 컬럼에서 더 넓은 피크와 감소된 신호 강도를 나타냈습니다. 이는 SS 하드웨어에서 금속-분석 물질 상호작용이 시료 회수율 및/또는 크로마토그래피 성능에 영향을 미칠 수 있음을 시사합니다.

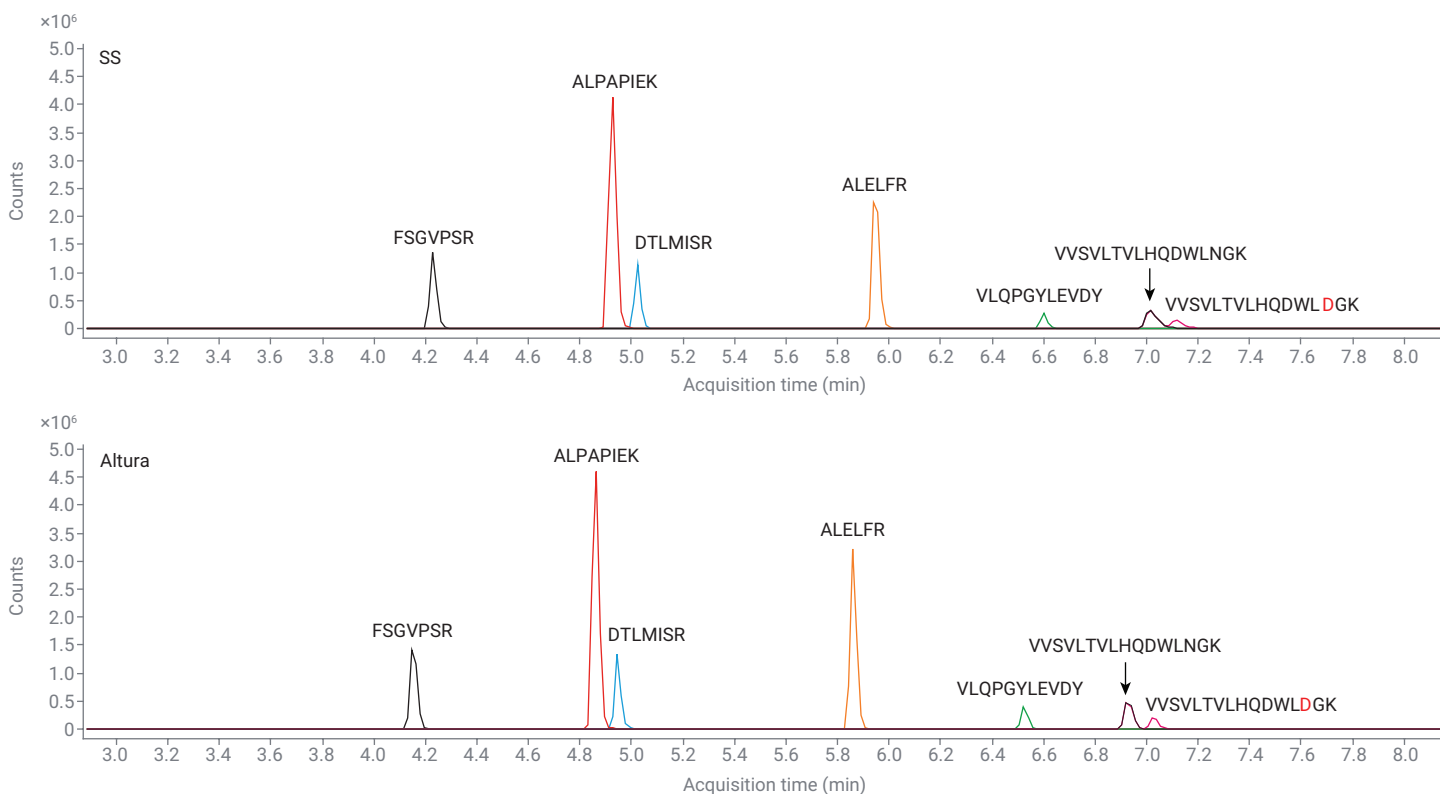


그림 1. 스테인리스 스틸(SS) 및 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼 하드웨어를 사용한 합성 단일클론 항체 펩타이드의 크로마토그래피 분리.

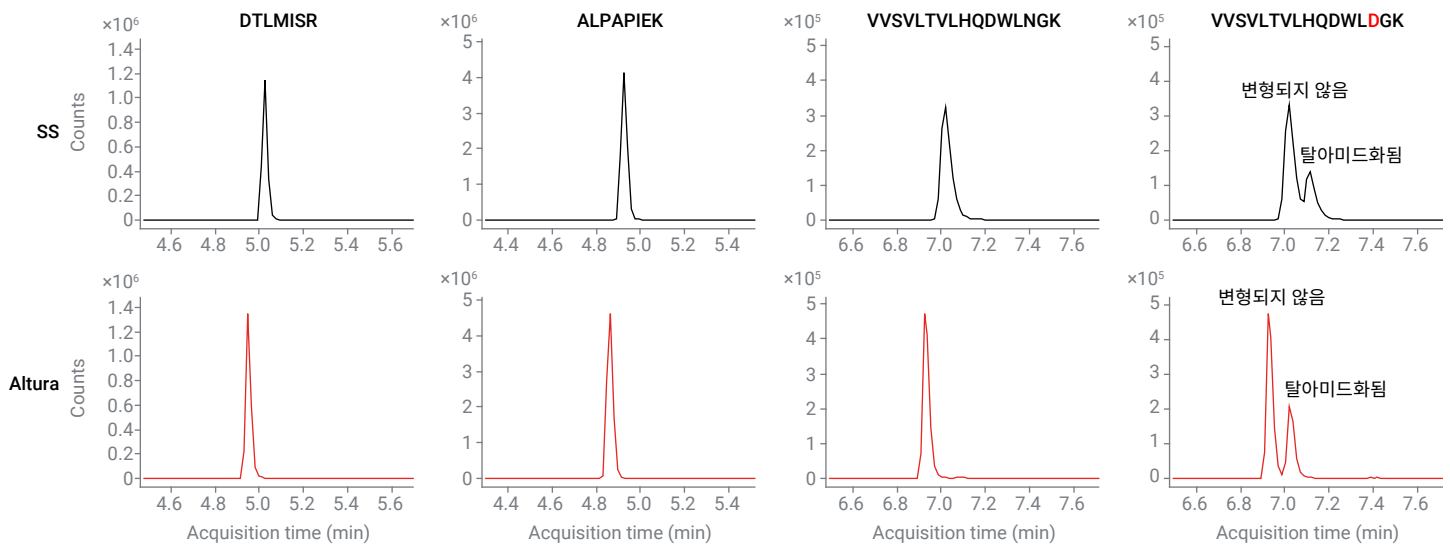


그림 2. Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼 하드웨어를 사용했을 때 스테인리스 스틸(SS) 컬럼 하드웨어에 비해 탈아미드화된 펩타이드의 피크 모양과 분리능이 향상되었습니다.

14번 위치의 아스파라긴이 아스파르트산으로 변환된 탈아미드화 변이체 VVSVTLVLHQDWLDGK에 대한 추가 분석 결과, Altura 컬럼을 사용했을 때 변형되지 않은 변이체에 비해 분리능이 향상된 것으로 나타났습니다. 이처럼 향상된 분리능은 특히, 바이오 의약품 개발에서 반드시 규명해야 하는 중요 품질 속성인 탈아미드화와 같은 번역 후 변형 및 화학적 변형을 감지하는 데 매우 유용합니다.

비활성 컬럼 하드웨어에 어느 정도의 이점이 있는지 확인하기 위해 새로운 SS 및 Altura 컬럼에 빠른 컨디셔닝을 위해 1회의 블랭크 주입을 실시한 후 합성 mAb 펩타이드 혼합물을 30회 연속 주입했습니다(그림 3). 이러한 결과는 SS 컬럼이 ALPAPIEK 및 DTLMISR에 대해 Altura 컬럼과 유사한 피크 면적 회수율을 달성하려면 최소 10회 주입이 필요하다는 사실을 보여주었습니다. 소수성/염기성이 더 강한 펩타이드인 VVSVTLVLHQDWLNGK의 경우, SS 컬럼이 Altura 컬럼 성능과 동등해지려면 거의 20회의 주입이 필요했는데, 이는 비활성 컬럼이 더 빠르게 안정화되고 재현성이 우수하다는 것을 보여줍니다.

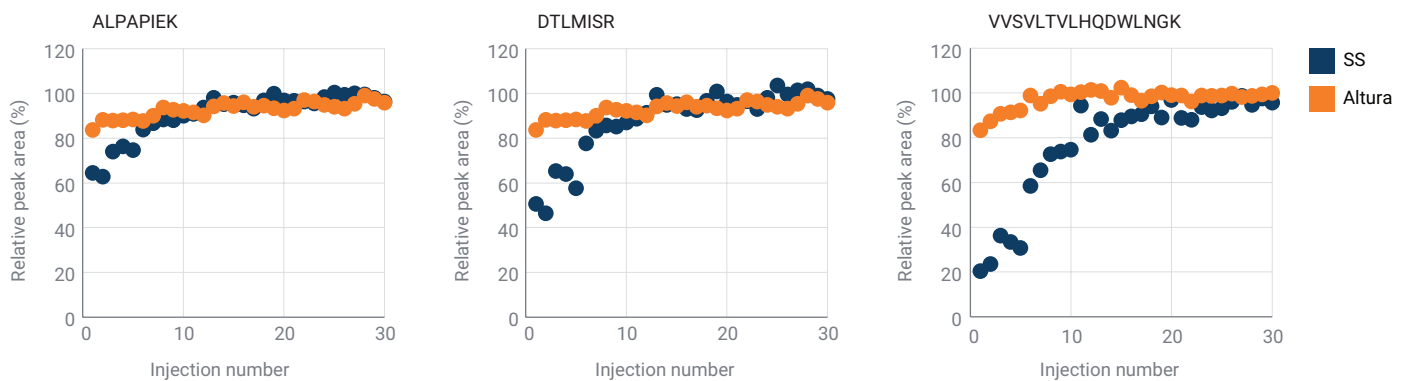


그림 3. 스테인리스 스틸(SS) 및 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼을 사용한 합성 펩타이드의 정량적 비교. 상대적 피크 면적 추세를 30회 주입에 걸쳐 그래프로 나타냈습니다. Altura 하드웨어는 SS 컬럼에 비해 특히 소수성 및 염기성 펩타이드의 경우 더 빠른 안정화와 더 높은 재현성을 보여줍니다.

피크 비대칭성을 정량화하는 데 사용되는 지표인 테일링 인자 (TF)와 같은 크로마토그래피 성능 지표는 이러한 결과를 더욱 뒷받침했습니다(그림 4). ALPAPIEK와 DTLMISR의 TF는 두 컬럼에서 유사했으며, 이는 피크 모양이 비슷함을 나타냅니다. 그러나 VVSVLTVLHQDWLNGK는 SS 컬럼(평균 TF = 1.7, n = 30)에 비해 Altura 컬럼(평균 TF = 1.3, n = 30)에서 유의미하게 더 나은 TF를 보였습니다. 이는 그림 2의 정성적 관찰 결과와 잘 일치하며, 비활성 하드웨어가 까다로운 펩타이드의 피크 대칭성을 향상시킨다는 것을 시사합니다.

30회 주입에 걸쳐 TF를 그래프로 나타낸 결과, SS 컬럼은 컨디셔닝을 통해 점차 성능이 향상되어 결국 Altura 컬럼의 성능에 근접하는 것으로 나타났습니다. 하지만 SS 컬럼에서 초기 피크 모양이 좋지 않아 탈아미드화된 펩타이드 VVSVLTVLHQDWLNGK와 변형되지 않은 펩타이드처럼 근접하게 용출되는 분석 물질의 분리에 부정적인 영향을 미쳤습니다. 그림 4C에서 볼 수 있듯이, Altura 컬럼은 이러한 변이체들 간의 분리능을 향상시켜 화학적 변형을 더욱 확실하게 식별할 수 있도록 했습니다.

상대적으로 가파른 그레디언트(6분 동안 6% B/min)를 사용했음에도 불구하고, Altura 컬럼은 우수한 분리능을 보여주었습니다. 이러한 결과는 그레디언트를 확장하거나 기울기를 줄여 분리능을 더욱 향상시키는 방식으로 추가적인 최적화가 가능하다는 것을 시사합니다. 전반적으로 이러한 결과는 Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼이 PTM의 크로마토그래피 성능과 화학적 변형 분리능을 향상시킬 뿐만 아니라 더 높은 시료 처리량과 더 나은 불순물 프로파일링을 지원하여 견고한 펩타이드 맵핑 워크플로에 유용한 도구임을 보여줍니다.

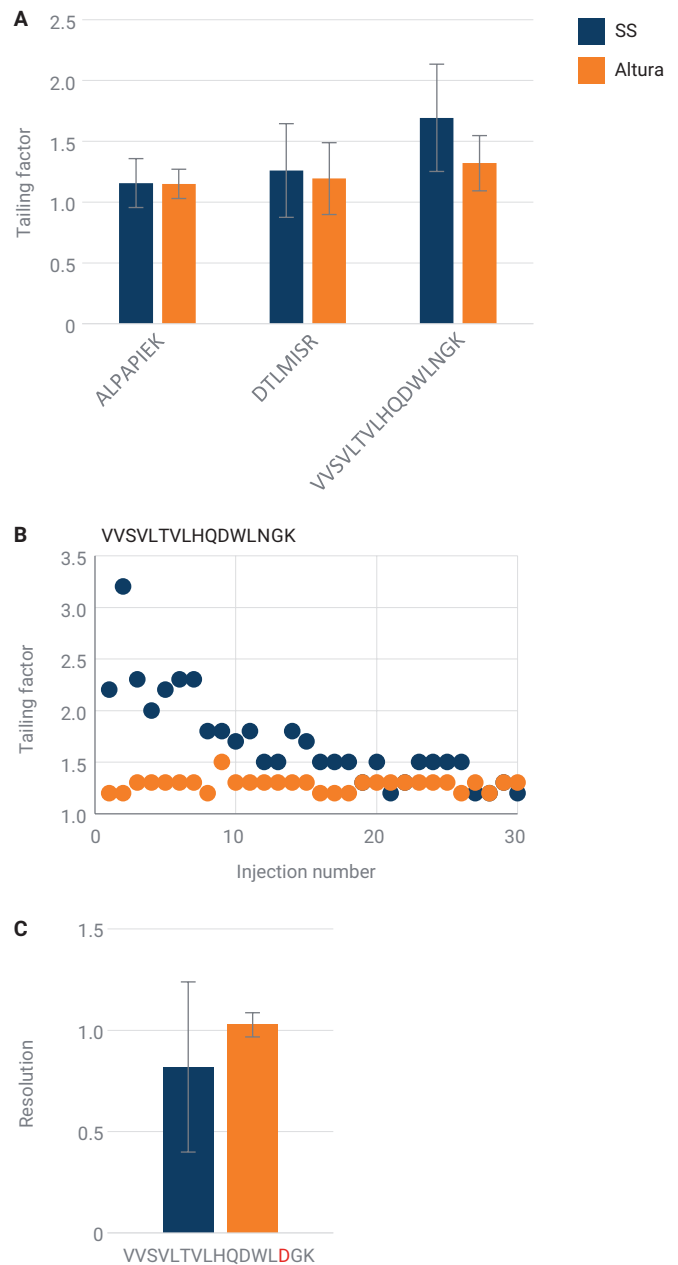
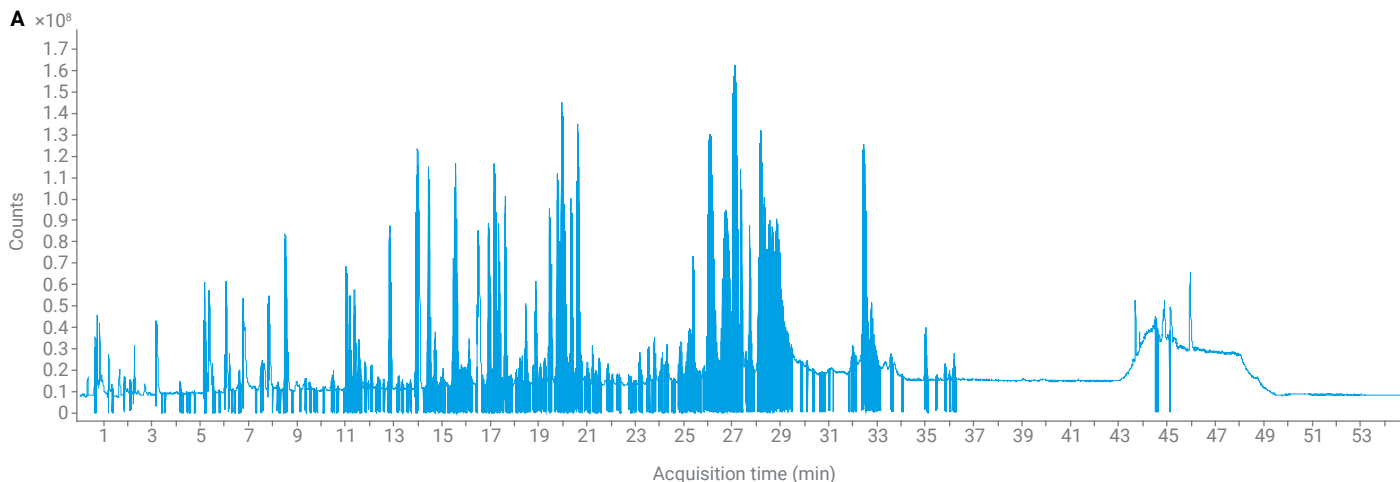


그림 4. 스테인리스 스틸(SS) 및 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼을 사용한 합성 펩타이드의 크로마토그래피 성능 지표. (A) ALPAPIEK, DTLMISR 및 VVSVLTVLHQDWLNGK에 대한 평균 테일링 인자. (B) 30회 주입에 걸쳐 테일링 인자 추세를 보여주는 그래프. (C) 탈아미드화된 펩타이드 쌍 VVSVLTVLHQDWLNGK와 VVSVLTVLHQDWLNGK 사이의 분리능. Altura 컬럼은 SS 하드웨어에 비해 향상된 피크 대칭성과 근접 용출되는 변이체의 분리 개선을 보여줍니다.

트립신 분해된 허셉틴의 펩타이드 맵핑

Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼의 입증된 장점을 바탕으로, 우리는 이 기술을 트립신 분해된 허셉틴 시료의 펩타이드 맵핑에 적용했습니다. 분해된 시료는 Altura 컬럼을 사용한 LC/MS/MS로 분석했으며, 그 결과로 얻은 총 이온 크로마토그램 (TIC)과 시퀀스 커버리지를 그림 5에 나타내었습니다. 분석 결과 87.03%의 시퀀스 커버리지가 확인되었으며, 누락된 트립신 펩타이드는 길이가 더 짧고 친수성이 더 높은 것으로 나타났습니다.

실험 섹션에서 설명한 바와 같이 LC/MS/MS 분석 전에 수행된 C18 정제 단계가 이러한 짧은 친수성 펩타이드의 손실에 영향을 미쳤을 가능성이 있다는 점에 주목할 필요가 있습니다. 이러한 관찰 결과는 포괄적인 시퀀스 커버리지를 목표로 하는 향후 실험 설계에 중요한 고려 사항을 제시합니다. 허셉틴 분해에 시료 정제를 사용하지 않은 이전의 응용 자료에서는 약 98%의 시퀀스 커버리지를 얻을 수 있었습니다.⁴



B 트립신을 이용한 허셉틴의 펩타이드 맵핑(시퀀스 커버리지: 87.03%)

중쇄

1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR
51	IYPTNGYTRY	ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LMNSLRAED	TAVYYCSRWG
101	GDGFYAMDYW	GQGLTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
151	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
201	YICNVNHNKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKHTTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP
251	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
351	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV
401	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSLSPG

경쇄

1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
51	ASFLYSGVPS	RFGSGRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ
101	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN	RGEC			

그림 5. Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼을 사용하여 트립신 분해된 허셉틴의 펩타이드 맵핑을 수행했습니다. (A) 트립신 분해된 허셉틴의 LC/MS/MS 분석에 대한 총 이온 크로마토그램(TIC). (B) 진한 파란색 텍스트로 식별된 펩타이드를 포함하여 87.03%의 커버리지를 보여주는 시퀀스 커버리지 맵. 누락된 트립신 펩타이드(연한 파란색 텍스트)는 C18 정제 단계에서 시료 손실이 발생하기 쉬운 짧고 친수성인 화학적 특징을 가지고 있습니다.

그림 6은 탈아미드화된 형태의 펩타이드 NTAYLQMDSLRL에 대한 CID MS/MS 스펙트럼을 보여줍니다. 조각 이온 데이터를 통해 8번 위치의 탈아미드화 부위를 확실하게 규명할 수 있었으며, 이는 MS/MS가 번역 후 변형 및 화학적 변형을 특성화하는 데 유용한 도구임을 보여줍니다.

탈아미드화된 펩타이드를 특성화하는 데 크로마토그래피 분리의 중요성을 강조하기 위해 그림 7은 자연적 형태와 탈아미드화된 형태 모두에서 NTAYLQMNSLR의 EIC를 보여줍니다. 질량 변화가 0.98 Da로 작고 탈아미드화 변이체의 신호 강도가 상대적으로 낮기 때문에 크로마토그래피를 통해 이러한 형태를 분리하는 것이 매우 중요합니다. 질량 분석법만으로는 이들을 효과적으로 구별할 수 없습니다. 탈아미드화된 펩타이드의 단일 동위원소 피크(656.3221 m/z)가 원래 펩타이드의 두 번째 동위원소 피크(단일 동위원소 피크: 655.8318 m/z , 두 번째 동위원소 피크: 656.3328 m/z)와 겹치기 때문입니다(16ppm 차이). 따라서, 비활성 컬럼 하드웨어를 이용한 고분리능 크로마토그래피 분리는 펩타이드 탈아미드화의 정확한 식별 및 정량화에 필수적입니다.

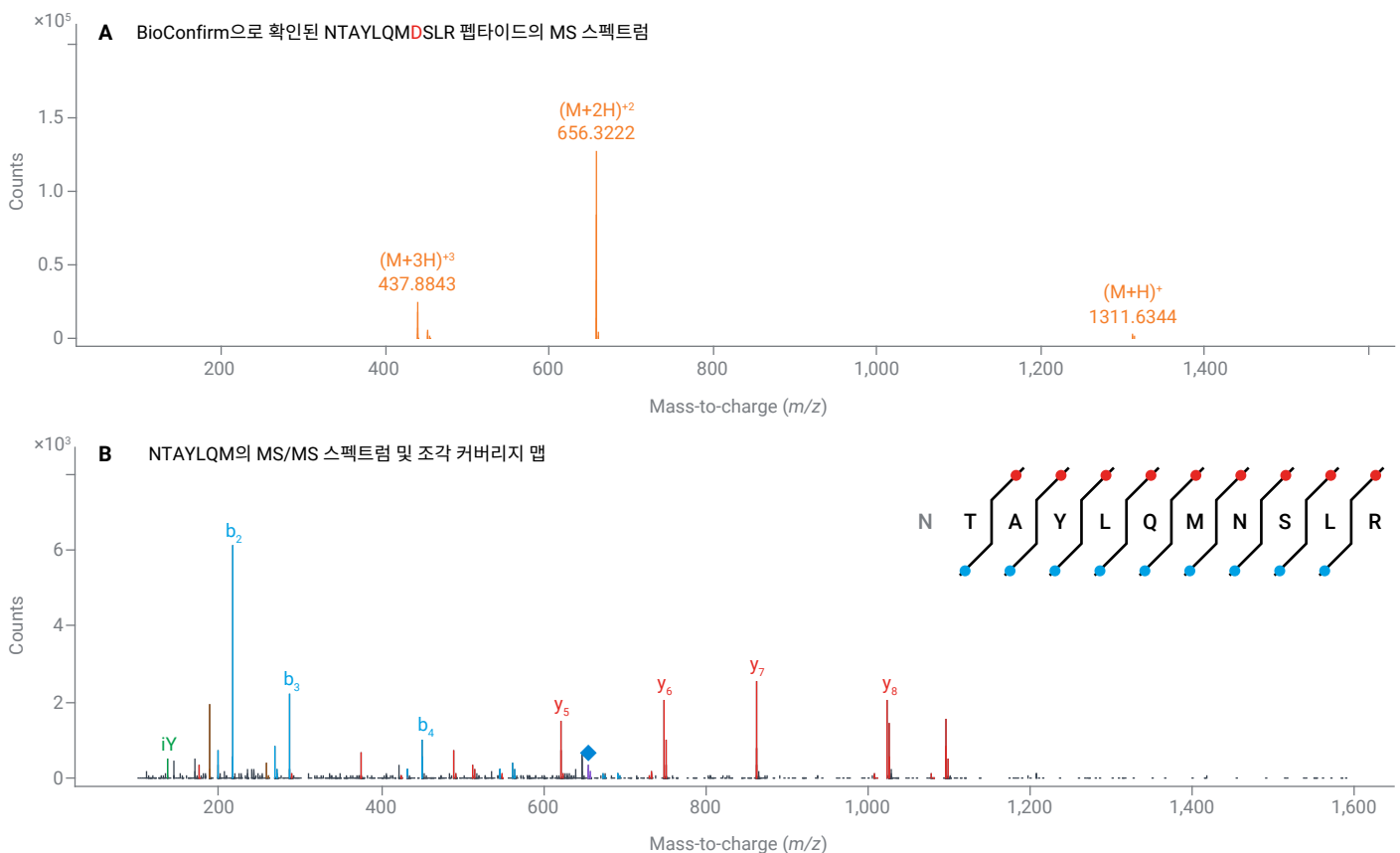


그림 6. NTAYLQMDSLRL 펩타이드의 MS 스펙트럼 및 조각 커버리지 맵. 파편화 데이터는 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 사용하여 8번 위치에서 탈아미드화를 확인하는 데 사용되었습니다.

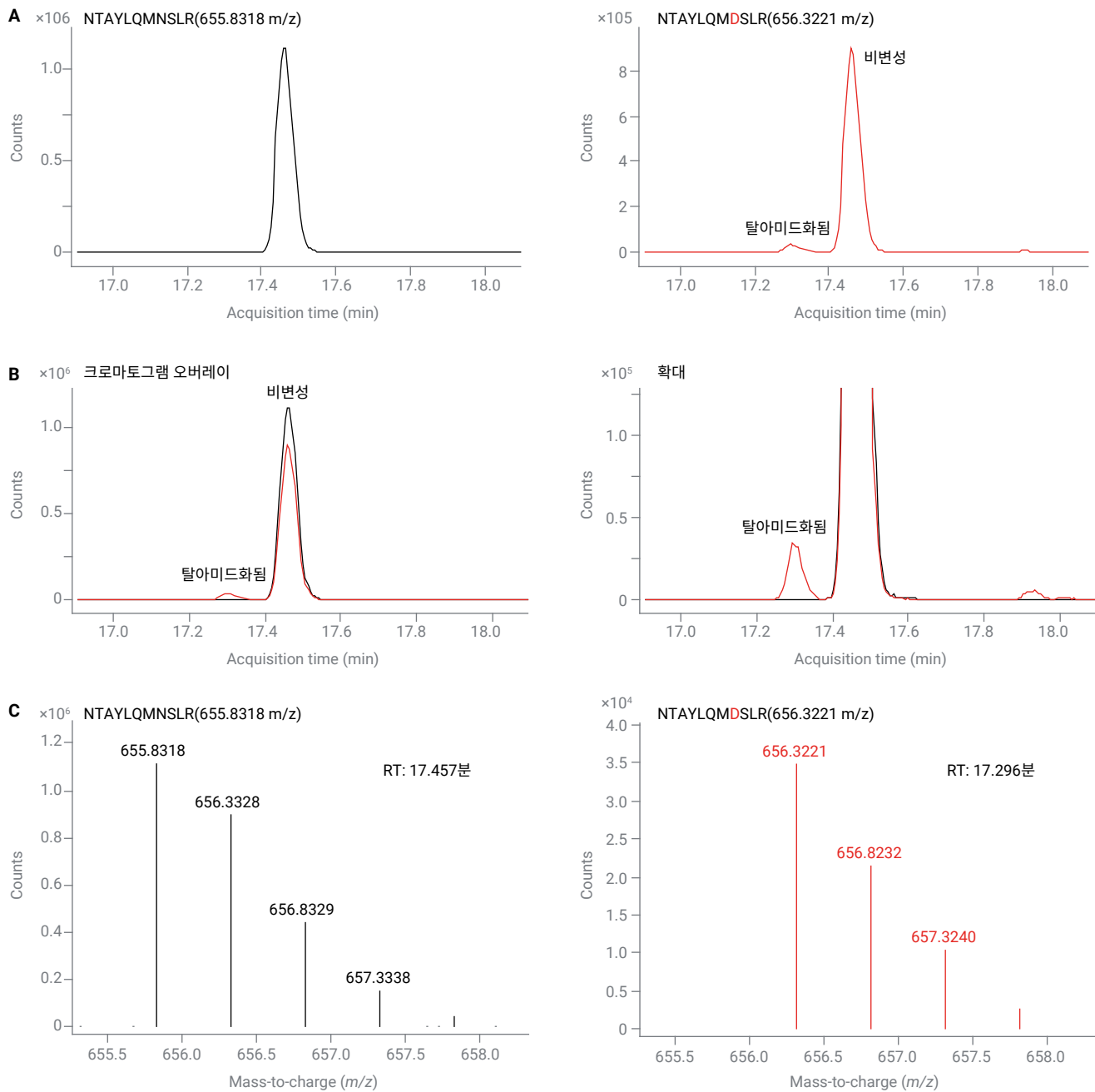


그림 7. 자연적 형태와 탈아미드화된 형태 모두에서 NTAYLQMNSLR 펩타이드의 크로마토그래피 분리. (A) 2+ 전하 상태에서 자연적 형태(655.8318 m/z)와 탈아미드화된 형태(656.3221 m/z)의 전구체 질량을 사용하여 추출한 이온 크로마토그램(EIC). (B) 개별 크로마토그램을 겹쳐서 자연적 펩타이드와 탈아미드화된 펩타이드 간의 크로마토그래피 분리를 나타내었으며, 확대된 크로마토그램은 저농도 불순물의 분리를 강조합니다. (C) 자연적 펩타이드와 탈아미드화된 펩타이드의 질량 스펙트럼은 탈아미드화된 형태를 자연적 형태로부터 크로마토그래피적으로 분리해야 할 필요성을 보여주기 위해 나타냈습니다. 그렇지 않으면 질량 스펙트럼만으로는 두 형태가 함께 용출될 경우 구별할 수 없습니다.

결론

본 연구에서는 특히 mAb 펩타이드 및 번역 후 변형과 화학적 변형 분석에서 펩타이드 맵핑 워크플로와 관련해 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼 하드웨어에 상당한 이점이 있음을 입증했습니다. 기존 SS 컬럼 하드웨어와 비교했을 때, Altura 컬럼은 특히 소수성 및 변형 펩타이드 분석에서 피크 모양 개선, 변동성 감소, 분리능 향상이라는 일관된 결과를 보여주었습니다.

30회 연속 주입에서 얻은 정량적 데이터는 Altura 하드웨어를 사용했을 때 컬럼 안정화 속도가 더 빠르고 재현성이 우수함을 보여주었으며, 테일링 인자 및 분리능과 같은 크로마토그래피 지표는 Altura 하드웨어가 근접하게 용출되는 물질들을 더 잘 분리할 수 있음을 확인시켜 주었습니다. 이러한 이점은 트립신 분해된 허셉틴의 펩타이드 맵핑에서 추가로 검증되었으며, Altura 컬럼을 통해 탈아미드화된 변이체를 확실하게 식별할 수 있었습니다.

전반적으로, Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 비활성 컬럼은 1290 Infinity II Bio LC 및 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템과 함께 고처리량 펩타이드 맵핑 및 변형 특성 분석을 위한 견고하고 신뢰할 수 있는 솔루션을 제공하여 바이오 의약품 개발에서 분석 정밀도와 운영 효율성을 모두 지원합니다.

참고 자료

1. Hsiao, J.; *et al.* 비활성 HPLC 컬럼 하드웨어를 사용한 크로마토그래피 분리의 경계 확장. *Agilent Technologies 응용 자료*, 5994-8618EN, **2025**.
2. Vanluchene, H.; *et al.* 저흡착 유로에서 IP-RPLC-MS를 사용한 mRNA 맵핑. *Agilent Technologies 응용 자료*, 5994-8055KO, **2025**.
3. Feith, A. 견고하고 신뢰할 수 있는 펩타이드 맵핑. *Agilent Technologies 응용 자료*, 5994-2718EN, **2024**.
4. Sciuto, S. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 사용한 트라스투주맙 트립신 분해물 펩타이드 맵핑. *Agilent Technologies 응용 자료*, 5994-7969EN, **2024**.

www.agilent.com

DE-010885

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
2025년 11월 18일, 한국에서 인쇄
5994-8776KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
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