

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 이윱한 다양한 단일 클론 항체의 글리코펩타이드 특성 규명

저자

David L. Wong
Agilent Technologies, Inc.

서론

단일 클론 항체(mAb)와 이들의 유도체는 매우 복잡하지만 광범위한 응용 분야의 중요한 바이오횰약품 분자를 나타냅니다. mAb는 본질적으로 비균질인 분자이기 때문에 종합적인 분석적 특성 규명이 필요합니다. 전체 범위의 바이오횰약품 특성 규명에는 일반적으로 단백질 시퀀스, 번역 후 변형(PTM) 위치 및 상대 정량 정보가 포함됩니다. 단백질 글리코실화는 mAb의 주요 PTM 중 하나이며, 치료 효과와 면역원성 뿐만 아니라 많은 생물학적 조절 과정에 관여합니다¹. 따라서 의약품 바이오 프로세싱을 위한 다양한 글리칸의 분포와 조성을 이해하는 것이 중요합니다.

Quadrupole Time-of-Flight(Q-TOF) 액체 크로마토그래피/질량 분석기(LC/MS) 시스템은 종종 원형 mAb 및 mAb subunit을 분석하고, mAb 펩타이드 시퀀스 맵핑을 수행하며, 고질량 범위에서 우수한 질량 정확도와 분리능으로 PTM의 특성을 규명하는 데 사용됩니다^{2,3}.

일반적으로 글리코형/글리칸 특성 규명을 위한 4개 레벨의 LC/MS 워크플로가 사용됩니다.

- 레벨 1과 레벨 2는 원형 및 환원 mAb 분자에 대한 글리코형 분석에 초점을 맞춥니다. 원형 mAb 워크플로는 원형 mAb의 주요 글리코형을 신속하게 평가하고, mAb subunit 워크플로는 G0F, G1F 및 G2F와 같은 개별 글리칸에 대한 자세한 정량 정보를 제공합니다
- 레벨 3은 mAb의 단백질 분해에 의해 생성된 글리코펩타이드의 분석이며, 일반적으로 펩타이드 시퀀스 맵핑 워크플로의 일부입니다⁴. 이 워크플로는 글리칸 상대 정량뿐만 아니라 N-글리코실화 위치 정보에 대한 결과를 보여줍니다
- 레벨 4는 효소 분해 또는 다른 메커니즘에 의해 분리된 글리칸의 특성입니다. 이는 글리칸 분석을 위한 높은 분석 감도와 최적의 정량을 제공합니다(그림 1)⁵

mAb의 펩타이드 맵핑은 단백질 바이오의약품의 종합적인 특성 규명을 위한 분석 기법으로 널리 사용되어 왔습니다. 이 기술은 mAb와 그 변이의 완전한 아미노산 시퀀스 뿐만 아니라 PTM 및 위치에 대한 정보 또한 제공합니다. 일상적인 분석에서 단백질 분해에 의해 생성된 펩타이드는 일반적으로 역상(RP) 크로마토그래피를 이용해 분리됩니다. RP-C18 또는 C8 컬럼은 일반적인 펩타이드 뿐만 아니라 산화 및 탈아미화 같은 PTM을 가진 펩타이드에도 뛰어난 크로마토그래피 분리 능력을 보이므로 가장 일반적으로 사용됩니다.

그러나 일부 단백질 변형은 RP 유형 분리를 통해 분리하기가 쉽지 않습니다. 상대적으로 높은 친수성을 나타내는 글리코펩타이드는 RP 컬럼에서 매우 낮은 머무름과 분리능을 보여줍니다. 이 경우 글리코실화 펩타이드에 훨씬 더 많은 머무름을 제공할 수 있기 때문에 아미드 결합 고정상의 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)를 사용하곤 합니다.

본 연구에서는 AssayMAP Bravo 액체 처리 로봇, Agilent 1290 Infinity II LC 시스템, Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 이용한 mAb 글리코펩타이드 특성 규명 (레벨 3)을 위한 최적화된 LC/MS 워크플로와 다양한 글리코펩타이드 식별 및 상대 정량을 위해 Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 이용한 자동 데이터 분석을 보여줍니다(그림 2). Agilent Petipide Mapping(RP-C18) 컬럼과 Agilent AdvanceBio Glycan Mapping (HILIC) 컬럼 모두에서 3가지 mAb(NISTmAb, Trastuzumab, A CHO 세포에서 배양한 인간 IgG1 mAb)에서 글리코펩타이드의 HPLC 분리를 비교했습니다.

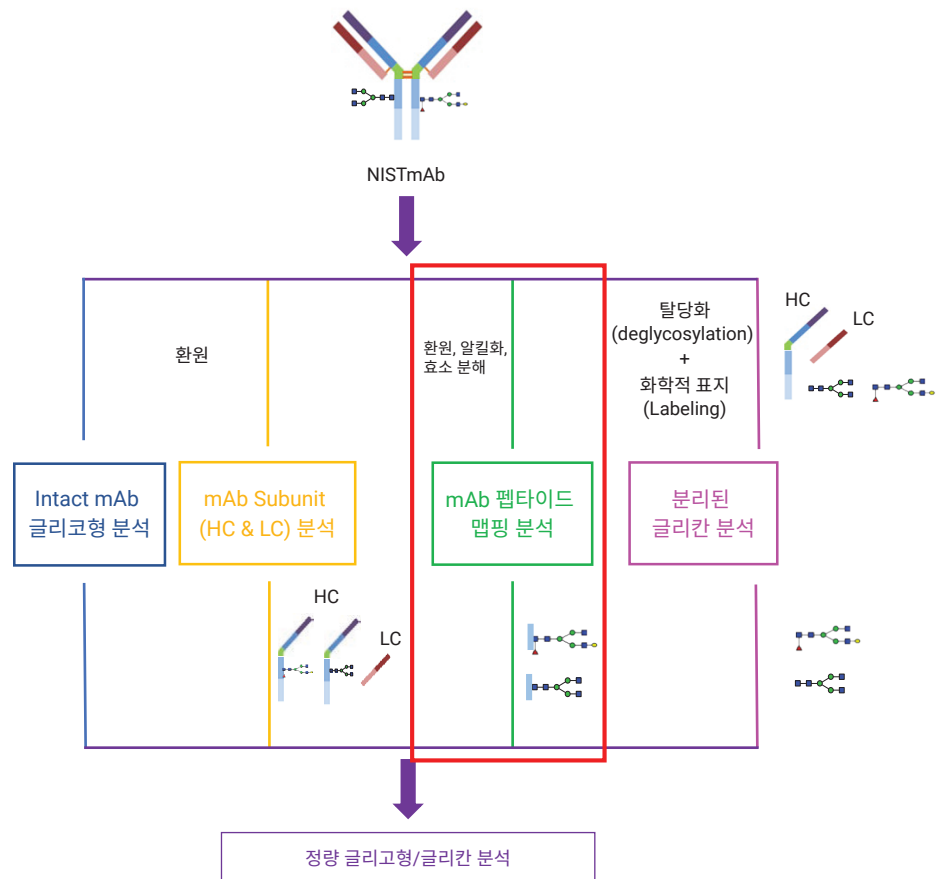


그림 1. 다양한 글리코형/글리칸 정량 분석 워크플로. 글리코펩타이드 워크플로는 빨간색 박스로 강조 표시했습니다.



그림 2. mAb 글리코펩타이드 특성 규명 워크플로의 분석 구성 요소.

실험

재료 및 분석법

본 연구에서는 세 가지 mAb 시료를 사용했습니다:

- MAb 표준 물질인 RM 8671은 NISTmAb라고도 알려진 National Institute of Standards & Technology(NIST) 제품입니다
- Formulated Herceptin (Trastuzumab)은 Genentech(So. San Francisco, California, USA) 제품입니다
- CHO mAb1(A-mAb)은 협력업체로부터 제공받았습니다

2,2,2-Trifluoroethanol(TFE), DL-dithiothreitol(DTT), iodoacetamide (IAA), *tris*(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride(TCEP)는 Sigma-Aldrich 에서 구매했습니다. 고품질 질량 분석 등급 Trypsin/Lys-C 효소 혼합물은 Promega로부터 제공받았습니다. AssayMAP C18 카트리지는 Agilent Technologies의 제품입니다.

시료 전처리 전에 모든 mAb 시료를 AssayMAP Bravo 액체 처리 시스템을 사용하여 탈이온수로 1.0µg/µL가 되게 희석했습니다.

기기

- Agilent AssayMAP Bravo 시스템 (G5542A)
- Agilent 1290 Infinity II LC 시스템 구성:
 - Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II multisampler (G7167B)
 - Agilent 1290 Infinity II 항온 컬럼 장치(G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

시료 전처리

AssayMAP Bravo 액체 처리 시스템은 mAb 시료의 희석, 분해, 탈염에 사용했습니다⁶. 그런 다음 시료를 건조시키고 Peptide Mapping 컬럼으로 분석하기 위해 탈이온수에서 0.1% 포름산 (FA)으로 재부유시켰습니다. Glycan Mapping(HILIC) 컬럼으로 분석해야 했던 분해된 시료는 80% 아세토니트릴 용액으로 재부유시켜 효과적으로 시료를 로드하고 크로마토그래피 분리가 개선되었습니다.

LC/MS 분석

LC/MS 분석은 Dual Agilent Jet Stream 소스의 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템과 결합된 1290 Infinity II LC 시스템에서 수행되었습니다.

AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼 (2.1 × 150mm, 2.7µm) 또는 AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼(2.1 × 150mm, 2.7µm)을 사용하여 LC 분리를 수행했습니다. 표 1~3에 사용한 LC/MS 파라미터가 정리되어 있습니다. 약 2µg의 단백질 분해제를 Peptide Mapping 컬럼에 주입했으며, 글리코펩타이드 분석을 위해 5µg의 단백질 분해제를 Glycan Mapping 컬럼에 주입했습니다.

글리코펩타이드 정량 분석을 위해 두 개의 별도 시료의 데이터를 수집했습니다. 하나는 펩타이드 식별을 위한 MS/MS 데이터 수집 모드(표 3의 음영 처리된 파라미터 사용)를 사용한 것이고, 다른 하나는 MS 전용 수집 모드를 사용한 글리코펩타이드 정량을 위한 것입니다.

표 1. 액체 크로마토그래피 파라미터.

1290 Infinity II LC 시스템		
컬럼	AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 150mm, 2.7µm, (p/n 653750902)	AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150mm, 2.7µm, (p/n 683775913)
항온 장치	4°C	4°C
용매 A	0.1% 포름산 수용액	0.1% 포름산 첨가 아세토니트릴 용액
용매 B	0.1% 포름산 첨가 아세토니트릴 용액	0.1% 포름산 수용액
그라디언트	0~15분, 0~10 %B 15~45분, 10~40 %B 45~55분, 40~90 %B	0~30분, 5~40 %B 30~40분, 40~60 %B 40~55분, 60~90 %B
컬럼 온도	60°C	50°C
유속	0.4mL/분	0.4mL/분
주입량	8.0µL	20µL
컬럼의 상대 주입량 (on-column)	2µg	5µg

표 2. MS 수집 파라미터.

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템	
가스 온도	250°C
건조 가스	10L/분
Nebulizer	25psig
Sheath 가스 온도	250°C
Sheath 가스 유속	12L/분
VCap	3,500V
노즐 전압	0V
Fragmentor	170V
Skimmer	65
Quad AMU	95
기준 질량	121.0509 922.0098

데이터 처리

LC/MS/MS에서 수집한 raw 데이터는 MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어를 사용하여 처리하였습니다. 이 소프트웨어는 데이터 분석을 단순화하여 모든 주요 바이오의약품 워크플로에 대해 표적 생체 분자를 자동으로 식별하고 상대 정량할 수 있도록 지원합니다.

결과 및 토의

일상적인 펩타이드 맵핑 접근법을 통한 mAb 글리코형 프로파일링은 널리 사용되는 분석법입니다. 기존의 RP-C18 컬럼과 비교하여 HILIC 컬럼을 통한 글리코펩타이드 분리의 효과를 입증하기 위해 본 연구에서는 3가지 인간화 IgG-1 유형의 mAb를 선택했습니다. AssayMAP Bravo 액체 처리 시스템에서 동일한 프로토콜을 사용하여 모든 mAb를 환원, 알킬화, Trypsin + Lys-C 효소 혼합물로 분해했습니다. 그런 다음 분해된 mAb 시료를 동일한 HPLC 실행 시간(60분)으로 RP-C18 및 HILIC 컬럼으로 주입 및 분리했습니다. 그림 3과 4는 RP-C18 및 HILIC 조건에서 일반 펩타이드와 글리코펩타이드 사이의 크로마토그래피 머무름 차이를 보여줍니다.

일상적인 RP HPLC 조건에서 펩타이드는 소수성에 의해 분리됩니다. 소수성이 강한 펩타이드보다 소수성이 약한 펩타이드가 더 빨리 용리됩니다. HPLC 그레디언트가 mAb 트립신 분해 시료에 최적화되었기 때문에 HPLC 실행에서 대부분의 펩타이드가 잘 분리되었습니다. 글리코펩타이드는 친수성이 더 강하여 RP 컬럼에서 머무름 시간이 더 짧습니다. 그림 3은 모든 글리코펩타이드가 약 1분 정도의 머무름 시간 구간과 함께 초기 그레디언트에서 용리되었음을 보여줍니다.

표 3. MS/MS 수집 파라미터.

파라미터	값
수집 모드	확장된 측정 범위(2GHz)
질량 범위	m/z 150~1,700
수집 속도	8스펙트럼/초
Auto MS/MS 범위	m/z 50~1,700
최소 MS/MS 수집 속도	3스펙트럼/초
분리 폭	좁음(~1.3m/z)
전구체/주기	상위 10
Collision energy	3.6*(m/z)/100~4.8
MS/MS 임계값	2,000카운트, 0.001%
동적 예외	On, 3번 반복 후 0.2분 동안 예외
전구체 존재비 기반 스캔 속도	예
타겟	25,000
MS/MS 측정 시간 제한 사용	예
순도	100% 엄격성, 30% 컷오프
동위원소 모델	펩타이드
전구 이온 정렬	존재비만 기준; +2, +3, >+3

글리코펩타이드 정량 분석을 위한 데이터는 MS 전용 수집 모드를 사용해 획득했습니다. 강조 표시된 파라미터는 펩타이드 식별에 사용되었습니다.

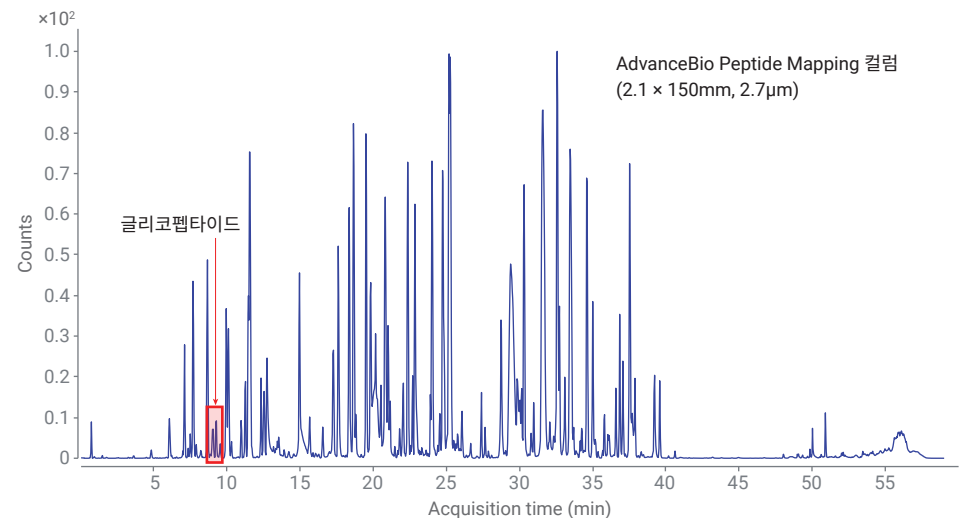


그림 3. AdvanceBio Peptide Mapping(RP-C18, 2.1 x 150mm, 2.7μm) 컬럼에서 Trypsin/Lys-C로 분해한 NISTmAb 펩타이드의 MS TIC.

HILIC 분리는 HPLC 그라디언트를 역으로 사용하는 RP에 대한 직교 분석법입니다. 동결건조된 mAb 분해물은 시료 로드 머무름을 개선하기 위해 높은 유기물 함량의 용액에 용해되어야 합니다. 분리 시 높은 분리능을 달성했으며, 모든 주요 글리코펩타이드 피크는 그림 4와 같이 28~34분 사이에 용리되었습니다.

LC/MS 데이터 분석을 위해 MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어의 Peptide Digest 워크플로를 사용했습니다. 이 소프트웨어 프로그램은 배치 시료 분석을 위한 빠른 설정을 지원합니다. 산화, 탈아미드화 및 personal compound database (PCD)에서 가져온 여러 글리칸을 포함하여 대부분의 주요 PTM의 변형 파일을 쉽게 생성할 수 있습니다. 생체 분자의 식별에는 애질런트의 독자적인 Peptide Feature Extraction(PFE) 알고리즘 7을 사용했으며, 이 알고리즘은 단백질 데이터베이스의 알려진 mAb 시퀀스를 기반으로 측정된 질량과 이론적 질량을 매칭하여 확인되었습니다. 식별된 모든

펩타이드(글리코펩타이드 포함)에 대한 상대 정량 또한 질량 스펙트럼의 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 자동으로 계산되었습니다. 그림 5는 BioConfirm 10.0 소프트웨어 레이아웃의 화면 캡처로 NISTmAb의

매칭된 글리코펩타이드의 화합물 목록을 보여줍니다. 이 프로그램을 통해 질량, 머무름 시간, 시퀀스, 변형, 점수, 피크 높이 또는 피크 면적별 정량 결과를 포함한 세부적인 펩타이드 정보를 빠르게 검토할 수

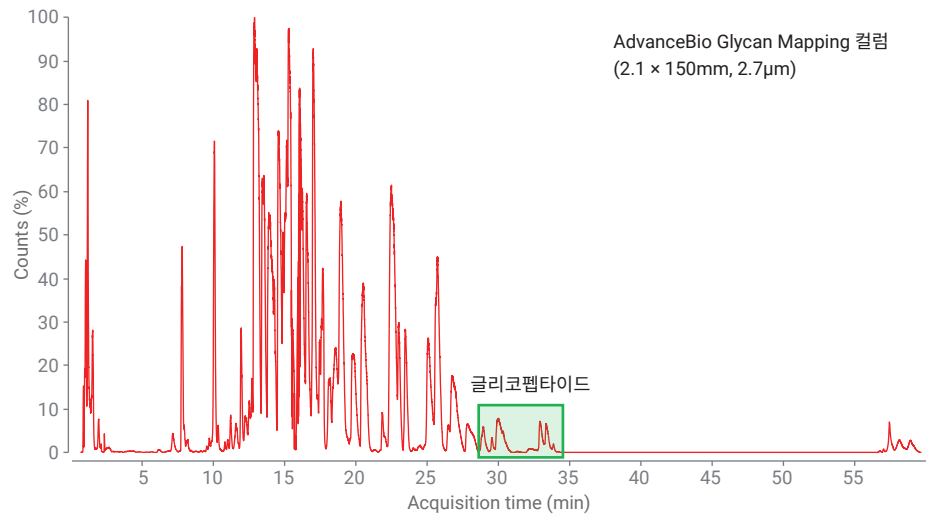


그림 4. AdvanceBio Glycan Mapping (HILIC, 2.1 × 150mm, 2.7µm) 컬럼에서 Trypsin/Lys-C로 분해한 NISTmAb 펩타이드의 MS TIC.

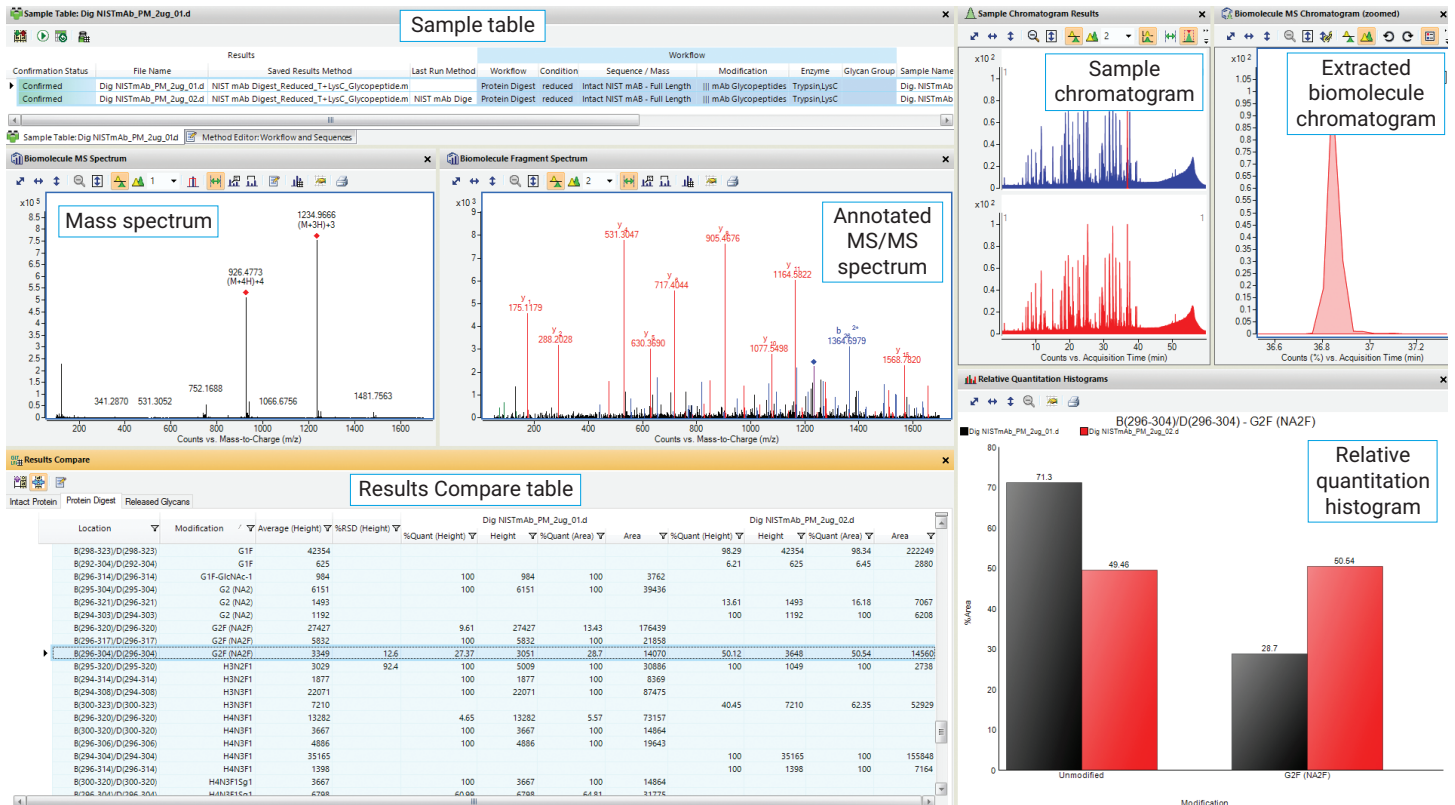


그림 5. 대표적인 글리코펩타이드 프로파일링 결과 및 글리코펩타이드 상대 정량 히스토그램과 MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어의 화면 캡처.

있습니다. BioConfirm 10.0 소프트웨어의 특징 중 하나는 사용자가 상대 정량 분석에서 그룹화를 위해 특정 펩타이드를 선택하거나 선택을 취소할 수 있다는 것이며, 결과는 히스토그램 형식으로 표시됩니다.

그림 3과 4의 raw MS 데이터를 자세히 연구한 결과, 아스파라긴(heavy chain의

N300) 위치에 다양한 글리칸이 부착된 글리코펩타이드의 두 가지 주요 그룹 (EEQY**N**STYR 및 TKPREEQY**N**STYR)이 존재했음을 알 수 있습니다. RP 분리에서는 EEQY**N**STYR 시퀀스를 갖는 3개의 글리코펩타이드와 TKPREEQY**N**STYR 시퀀스를 갖는 6개의 글리코펩타이드가

식별되었습니다(그림 6). 그러나 동일한 그룹의 글리코펩타이드가 동시에 용리되었고, 낮은 크로마토그래피 분리능이 관찰되었습니다. 반대로, HILIC 컬럼은 동일한 글리코펩타이드 세트의 분리에 대해 우수한 분리능을 보였습니다(그림 7).

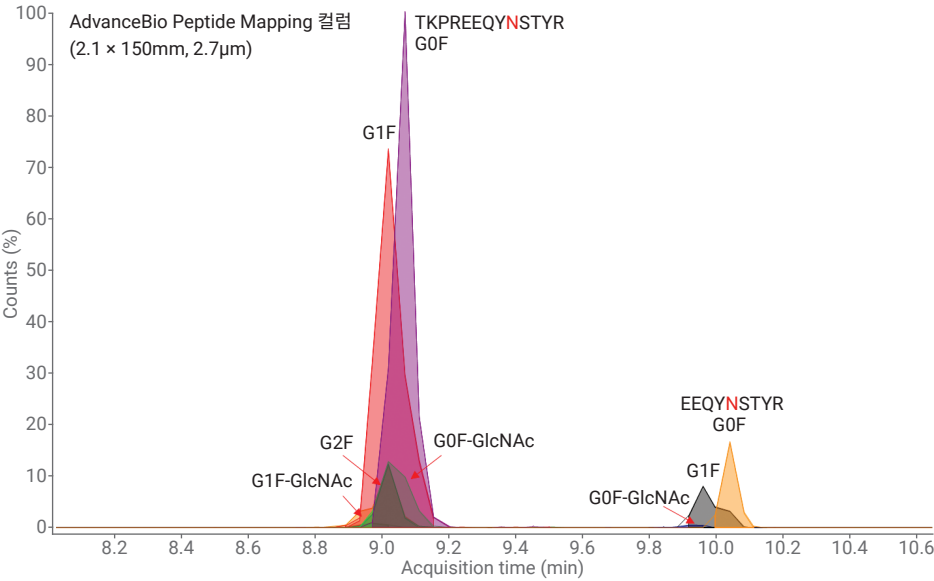


그림 6. MS 추출 화합물의 크로마토그램(ECC) 및 RP LC 분리로부터 식별된 글리코펩타이드의 상대 % 정량결과. 기타 발행물에는 H5N3F1*을 FM4A1G1 또는 FA1G1Ga1로 표기할 수 있습니다.

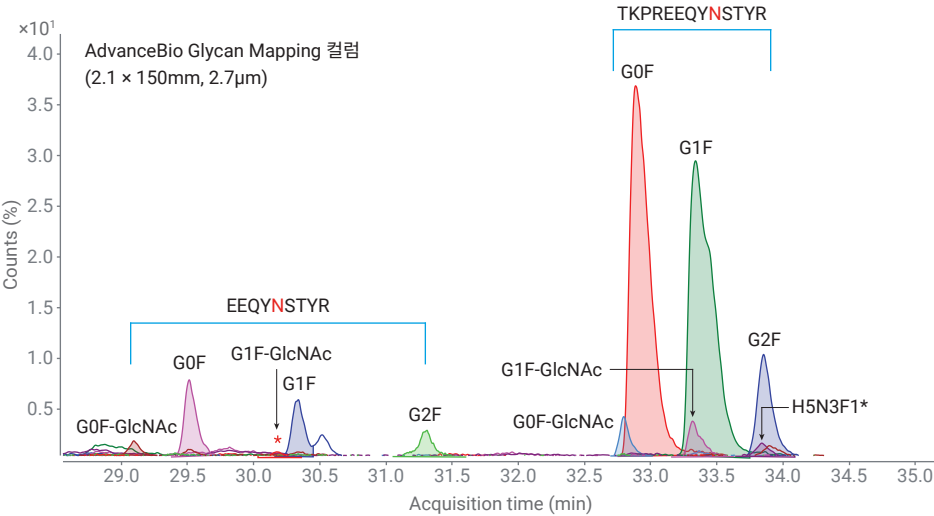


그림 7. MS ECC 및 HILIC 분리로부터 식별된 글리코펩타이드의 상대 % 정량결과.

서로 다른 LC 조건에서 9개 이상의 글리코펩타이드(그림 6 및 7)가 검출 및 식별되었지만, TKPREEQY**N**STYR 시퀀스를 가진 6개의 주요 풍부한 글리코펩타이드 세트를 선택하여 상대 정량 분석(그림 6 및 7의 표)을 실시하여 공정한 비교 결과를 얻었습니다.

그림 8에는 각각 2 μ g(RP-C18)과 5 μ g(HILIC) 시료를 3회 반복 주입한 후 NISTmAb의 6개 주요 글리코펩타이드의 상대 정량 및 재현성 결과가 요약되어 있습니다. RP 분석법의 피크 면적을 통해 얻은 정량 결과는 HILIC 분석법의 정량 결과와 유사합니다. 그러나 개선된 글리코펩타이드 분리로 인해, HILIC 결과는 모든 글리코펩타이드에 대해 더 높은 정량 정확도와 더 작은 평균 표준 편차(SD) (<0.2%)를 나타냈으며, RP 분석법 결과의 평균 SD는 약 0.56%였습니다.

동일한 HILIC 분석법을 사용하여 3개의 mAb(NISTmAb, Herceptin, A-mAb)의 글리코펩타이드 상대 정량 결과를 비교했습니다. 그림 9는 가장 풍부한 상위 6개 글리코펩타이드의 상대적인 % 양을 보여줍니다. 유사한 G0F 및 G1F 함량(43% 및 40%)의 NISTmAb와 달리, Herceptin 시료는 매우 높은 농도의 G0F(>65%)와 낮은 농도의 G2F(~2%)를 포함했습니다. 또한 Herceptin 또는 A-mAb 시료에서는 H5N3F1이 검출되지 않았습니다. A-mAb 시료에서도 두 개의 분해된 글리칸 분자(G0F-GlcNAc 및 G1F-GlcNAc)가 극미량으로(<0.5%) 발견되었습니다.

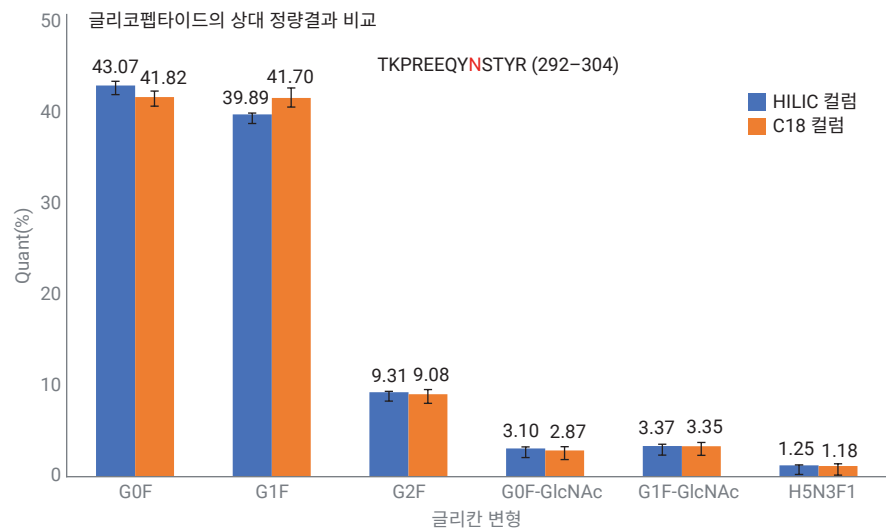


그림 8. NISTmAb 글리코펩타이드 분석의 상대 정량결과 비교(RP-C18 대 HILIC, 3회 반복 실험).

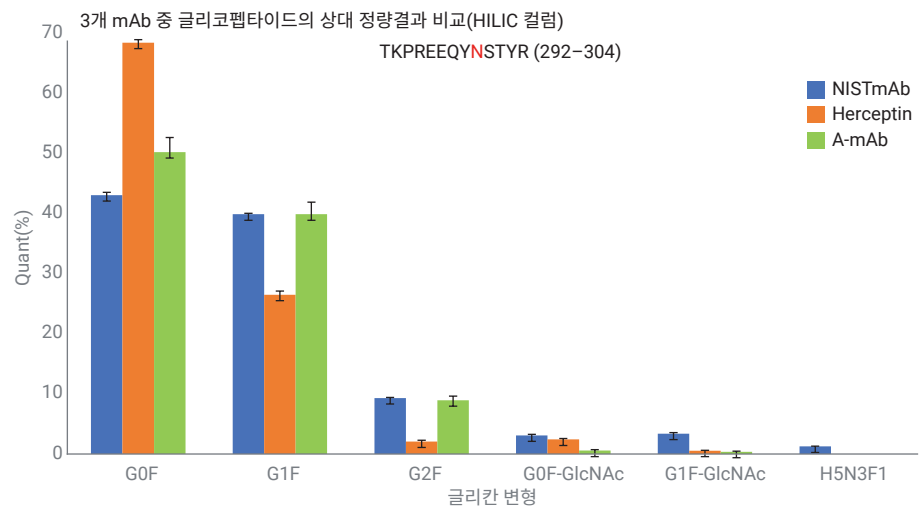


그림 9. 3개의 mAb 시료 각각에서 상위 6개의 글리코펩타이드의 상대 % 양. 모든 분해된 mAb 시료는 HILIC 컬럼으로 분리되었습니다(3회 반복실험).

결론

AssayMAP Bravo 액체 처리 플랫폼, 1290 Infinity II LC, 6545XT Advanced Bio LC/Q-TOF 및 MassHunter BioConfirm 소프트웨어를 통합하여 mAb 글리코펩타이드 특성 규명을 위한 완벽한 워크플로 솔루션이 개발되었습니다. 이 새로운 워크플로의 주요 이점은 다음과 같습니다.

- AdvanceBio Glycan Mapping(HILIC) 컬럼은 친수성 글리코펩타이드에 대한 강력한 머무름과 향상된 분리능을 보여주었습니다. 동일한 펩타이드의 다양한 글리코형이 잘 분리되었습니다
- 펩타이드 맵핑 워크플로를 통한 글리코펩타이드 분석은 글리칸 상대 정량뿐만 아니라 N-글리코실화 위치 정보까지 도출했습니다
- BioConfirm 10.0의 자동 데이터 처리 기능을 통해 정확한 글리코펩타이드 프로파일링(식별 및 상대 정량)이 가능했습니다. 시료 배치 또는 다른 mAb 분해물을 쉽게 분석하고 비교할 수 있습니다

참고 문헌

1. Rademacher, T. W; Williams, P; DwekMark, R. A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *P. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 6123-6127.
2. Precise Characterization of Intact Monoclonal Antibodies by the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, *Agilent Technologies*, publication number 5991-7813EN.
3. Making Peptide Mapping Routine with the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, *Agilent Technologies*, publication number 5991-7815EN.
4. Dong, Q; et al. In-Depth Characterization and Spectral Library Building of Glycopeptides in the Tryptic Digest of a monoclonal Antibody Using 1D and 2D LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **2016**, 15, 1472-1486.
5. A Comprehensive Approach for Monoclonal Antibody N-linked Glycan Analysis from Sample Preparation to Data Analysis, *Agilent Technologies*, publication number 5991-8550EN.
6. Automation for LC/MS Sample Preparation: High Throughput In-Solution Digestion and Peptide Cleanup Enabled by the Agilent AssayMAP Bravo Platform, *Agilent Technologies*, publication number 5991-2957EN.
7. Highly Confident Peptide Mapping of Protein Digests Using Agilent LC/QTOFs, *Agilent Technologies*, publication number 5991-8552EN.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 5월 31일, 한국에서 인쇄
5994-0372KO

한국에질런트테크놀로지스(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