

바이오의약품 중 시알산 프로파일링 및 정량을 위한 향상된 워크플로

저자

Anna Fong, John Yan,
Ace G. Galermo, Tom Rice,
Aled Jones, Ted Haxo
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 Agilent AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트 (p/n GS24-SAP)를 사용해 당 단백질 바이오의약품 및 NISTmAb 내 시알산에 대한 프로파일링 및 절대 정량을 수행하는 방법에 대해 설명합니다. 이 키트는 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene(DMB)로 표지(labeling)된 시알산의 전처리, 분리, 검출을 위해 한층 개선된 새로운 고처리량 워크플로를 사용합니다. N- 또는 O-글리칸의 비환원 말단에서 시알산 커플링은 당단백질 바이오의약품의 효과를 매개하는 데 중요한 역할을 할 수 있습니다.¹

여기에서 설명하는 워크플로는 AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트로 산 가수분해를 통해 말단 시알산을 방출시키고 DMB 표지와 정성 및 정량 분석을 수행합니다. 시료와 표준물질 내 DMB 표지된 시알산은 역상 액체 크로마토그래피(LC)로 분리되고, 형광 검출(FLD)를 사용해 정량 분석되며, 질량 분석기(MS)를 사용해 구조적으로 확인됩니다.

서론

당단백질 바이오의약품에 나타나는 글리칸의 조성은 면역원성, 약동학, 약력학 등에 영향을 미칩니다.² 글리칸은 조성 및 결합 위치에 따라 여러 가지 가능한 올리고당 구조로 배열된 단당류로 구성된 탄수화물입니다. 분자 및 용도에 따라, 말단 시알산은 제거율을 감소시키거나 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 활성도를 감소시키거나 항염증 작용을 나타낼 수 있습니다.³⁻⁵ 바이오의약품 내에서 가장 일반적으로 발견되는 2가지 형태는 N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac)와 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc)입니다. 일반적으로 Neu5Ac가 우세한 종이며, Neu5Gc는 인체 내에서 합성이 안되지만 바이오의약품에 존재할 경우에는 면역원성이 될 수 있습니다. 따라서 시알산의 절대량과 더불어 당단백질 의약품에 존재하는 다양한 시알산 종의 수준을 모니터링하는 것이 중요합니다.

여기에서는 rituximab, etanercept, NISTmAb, cetuximab 등을 예로 사용하여 당단백질 의약품의 시알산을 방출, 표지(labeling) 및 분석하는 96-well plate 포맷 기반의 새로운 고처리량 워크플로를 설명합니다. 시알산 잔류물을 방출한 후 2단계의 절차를 통해 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB)로 표지합니다. DMB 표지 시알산을 그 다음 정량하기 위해 역상 초고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC) 및 FLD 검출기 기반의 고속 10분 분석법으로 분리 및 분석하고 옵션으로 질량 분석하기 위해 MS 검출을 합니다. 이 워크플로는 Neu5Ac와 Neu5Gc 정량 표준물질을 사용한 picomole 수준 감도의 절대적 정량법 뿐만 아니라, Neu5Ac, Neu5Gc 및 시알산 참조 패널(SARP)을 사용한 기타 시알산 종의 정성적

특성 규명 방법도 제공합니다. 이 워크플로는 시알산 프로파일링 및 정량화를 위해 재현성 높고 믿을 수 있는 고처리량 시료 전처리가 가능하게 합니다. 이 키트는 낮은 수준의 시알산화로 분자에 대한 한층 향상된 감도와 광범위한 검출 범위를 제공합니다.

실험

시료 전처리

시료는 96-well plate 포맷을 사용해 전처리합니다. 시알산은 rituximab(Rituxan, 로트 번호 M190170), etanercept(Enbrel, 로트 번호 M190088), NISTmAb(로트 번호 14HB-D-002), Erbitux(cetuximab, 로트 번호 Mi60886)에서 산 가수분해 작용을 통해 방출됩니다. 이 방법에서는 건조 단계가 불필요하므로, 전체 시료 전처리 시간은 1~2시간 가량 줄어듭니다. 일반적으로 시료량은 시알산화 수준이 낮은 당단백질 200µg, 시알산화 수준이 높은 당단백질 5µg입니다. 시알산 참조 표준물질 Neu5Ac 및 Neu5Gc의 연속적 희석(Serial dilution)을 사용해 표준 곡선을 준비했으며, 이를 통해 정량 한계(LOQ) 및 검출 한계(LOD)를 평가하였습니다. 방출된 시알산, SARP, 표준물질은 그 후 그림 1에 묘사된 워크플로에서처럼 DMB로 유도체화됩니다. 방출 및 표지 단계는 thermocycler 내에서 수행됩니다.

DMB 표지 시알산의 LC/FLD/MS 분석

Rituxan, Enbrel, NISTmAb, Erbitux에서 유래한 DMB 표지 시알산은 정량을 위해 형광 검출기(FLD)를 갖춘 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템에서 역상(RP) 분리로 분석되었습니다. 모든 RP-UHPLC 분리는 표 1에 정리된 조건에서 수행하였습니다. 추가로 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 질량 분석기(표 2)도 같은

라인에서 분석하여 SARP 내에 존재하는 DMB 표지 시알산 종의 용출 순서를 확인하였습니다. 고정 flow splitter를 FLD뒤에 장착하여, 흐름의 50%는 폐기되고 50%는 MS로 보내졌습니다. 데이터는 Agilent OpenLab CDS 2.3 및 MassHunter Qualitative Analysis 10.0 소프트웨어로 분석했습니다. Neu5Gc 및 Neu5Ac는 검량선을 사용해 정량했습니다.

재료

아세토니트릴(LC/MS 등급, Honeywell Burdick & Jackson)은 VWR에서 구입했습니다. 메탄올(Optima LC/MS 등급)은 Fisher Scientific에서 구입했습니다. 모든 실험에는 직접 실험실에서 제조한 초순수를 사용하였습니다.

기기

DMB 표지 시알산 시료는 다음의 Agilent LC/MS 구성에서 표 1의 세부 분석법으로 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼(2.1 × 75 mm, 2.7 µm; p/n 697775-902)을 사용하여 분리하였습니다.

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
- Agilent Infinity multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)
- Agilent 1260 Infinity 형광 검출기 (G1321B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (파라미터는 표 2 참조)

소프트웨어

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0

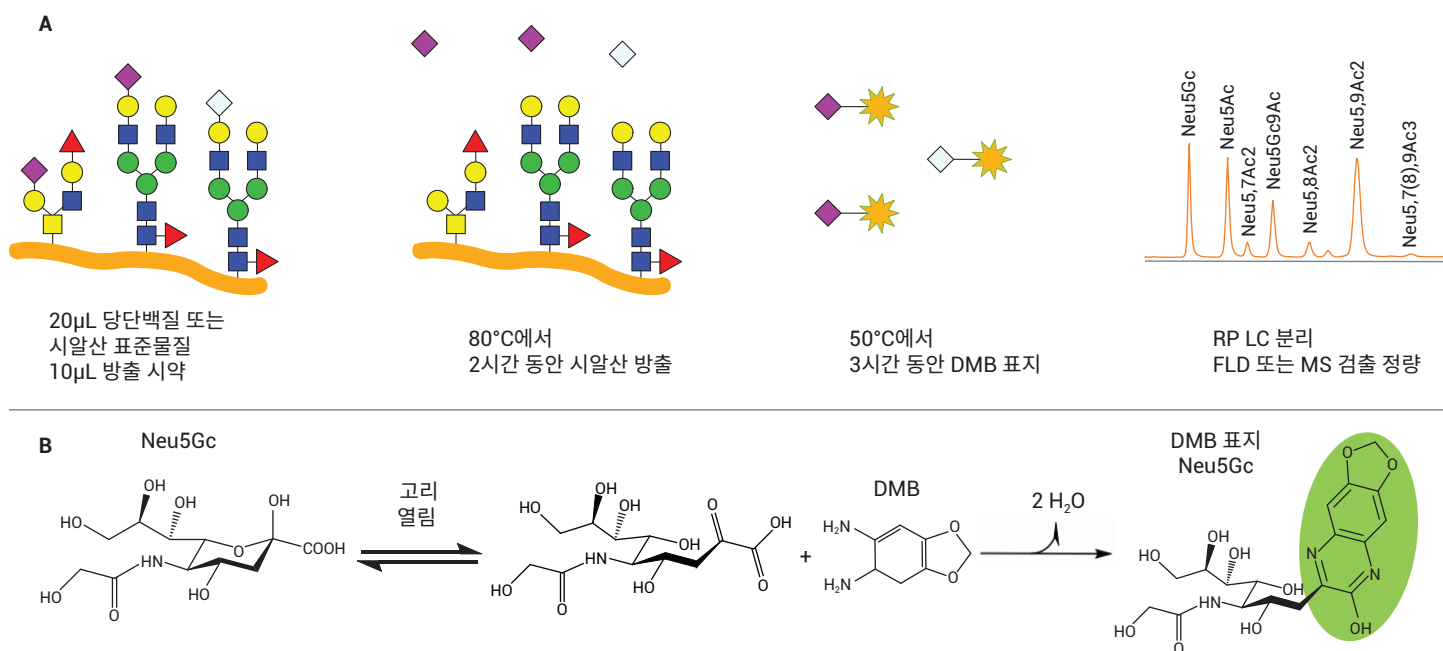


그림 1. 시알산 방출 및 DMB 표지 워크플로 (A) 개요 (B) 시알산 Neu5Gc의 DMB 표지 메커니즘.

표 1. 역상 UHPLC 조건.

파라미터	값																															
기기	Agilent 1290 Infinity II LC 시스템																															
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C18, 2.1 × 75 mm, 2.7 μm (p/n 697775-902)																															
컬럼 온도	30°C																															
이동상	A) 메탄올:아세트니트릴:물 (4:8:88) B) 아세트니트릴																															
그라디언트 프로그램	<table><thead><tr><th>시간 (분)</th><th>%A</th><th>%B</th><th>유속 (mL/분)</th><th></th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td><td rowspan="3">Isocratic elution</td></tr><tr><td>6.00</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td></tr><tr><td>6.25</td><td>20</td><td>80</td><td>0.4</td></tr><tr><td>7.30</td><td>20</td><td>80</td><td>0.4</td><td rowspan="3">Wash Re-equilibration</td></tr><tr><td>7.50</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td></tr><tr><td>10.00</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td></tr></tbody></table>	시간 (분)	%A	%B	유속 (mL/분)		0.00	100	0	0.4	Isocratic elution	6.00	100	0	0.4	6.25	20	80	0.4	7.30	20	80	0.4	Wash Re-equilibration	7.50	100	0	0.4	10.00	100	0	0.4
시간 (분)	%A	%B	유속 (mL/분)																													
0.00	100	0	0.4	Isocratic elution																												
6.00	100	0	0.4																													
6.25	20	80	0.4																													
7.30	20	80	0.4	Wash Re-equilibration																												
7.50	100	0	0.4																													
10.00	100	0	0.4																													
주입 부피	10μL																															
검출	Agilent 1260 Infinity II FLD λ _{Ex} 373 nm, λ _{Em} 448 nm																															

표 2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 파라미터.

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
소스	Dual AJS ESI
가스 온도	350 °C
건조 가스 유속	11L/분
Nebulizer	15psi
Sheath 가스 온도	400 °C
Sheath 가스 유속	12L/분
Vcap	1,400 V
노즐 전압	1,800 V
Fragmentor	120 V
스키머	65 V
질량 범위(MS)	m/z 400~1,000
질량 범위(MS/MS)	m/z 100~550
수집 모드	고분해능 (4 GHz)

결과 및 토의

DMB 표지 시알산의 LC/FLD/MS 분석

DMB 표지 SARP의 RP-UHPLC 분석은 7개의 시알산 유도체를 분리 및 검출합니다. Neu5Gc, Neu5Ac, Neu5,7Ac2, Neu5Gc,9Ac, Neu5,8Ac2, Neu5,9Ac2, Neu5,7(8),9Ac3. 컬럼, 유속, 용매, 실험실 조건 등의 차이로 인한 머무름 시간 차이가 있었으나, DMB 유도 시알산의 용출 순서는 일정하게 유지되었습니다. 시료 시퀀스를 시작할 때 크로마토그래피 시스템의 분리능과 정확성을 평가하기 위해 참조 패널을 사용했습니다. DMB 표지 SARP의 전형적인 FLD 크로마토그램이 그림 2A에 나와있습니다. DMB 시알산 유도체의 식별은 질량 분석법으로 확인되었습니다 (그림 2B).

바이오효약품 및 NISTmAb의 시알산 함량 분석

이 워크플로를 통해 Rituxan, Enbrel, NISTmAb, Erbitux에서 식별된 DMB 표지 시알산은 그림 3에 나와 있습니다. Rituxan (그림 3A)과 Enbrel(그림 3B)에는 모두 주로 Neu5Ac가 포함되어 있으며, NISTmAb (그림 3C)와 Erbitux(그림 3D)에는 주로 Neu5Gc가 포함되어 있습니다. Enbrel과 Erbitux의 DMB 표지 시료의 주요 피크 질량 스펙트럼은 이들이 각각 Neu5Ac와 Neu5Gc라는 것을 증명합니다(그림 4).

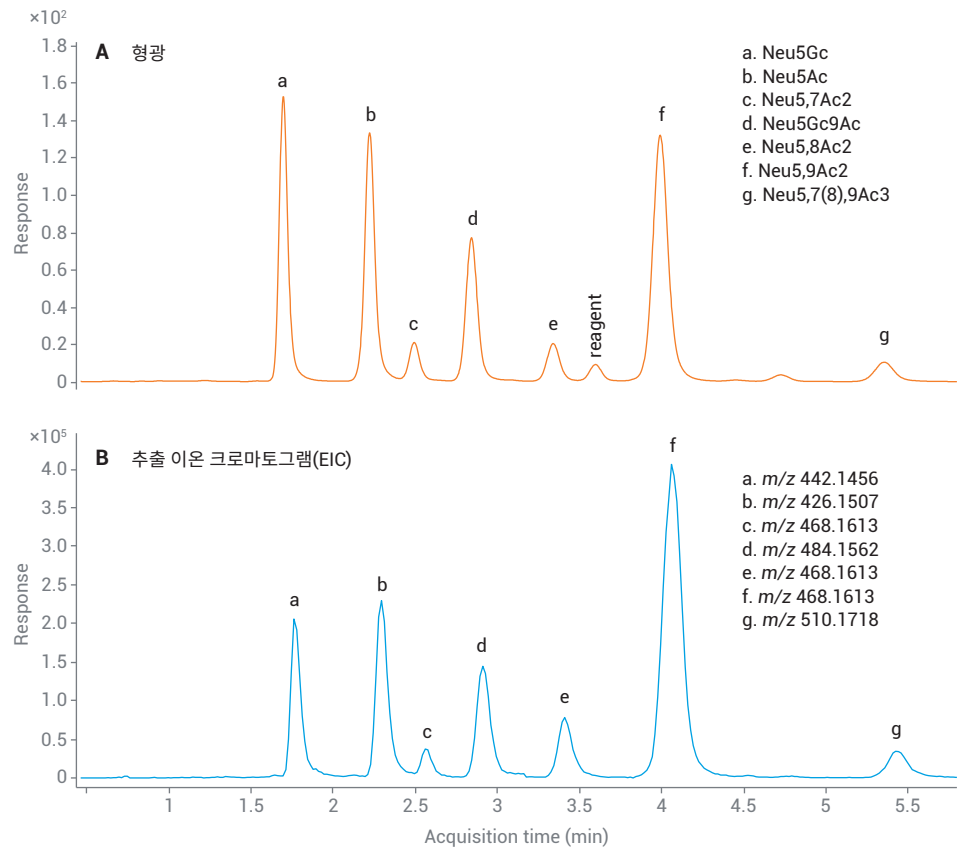


그림 2. DMB 표지 SARP의 UHPLC 크로마토그램. (A) 형광; (B) DMB 표지 시알산 중 $[M + H]^+$ 의 추출 이온 크로마토그램.

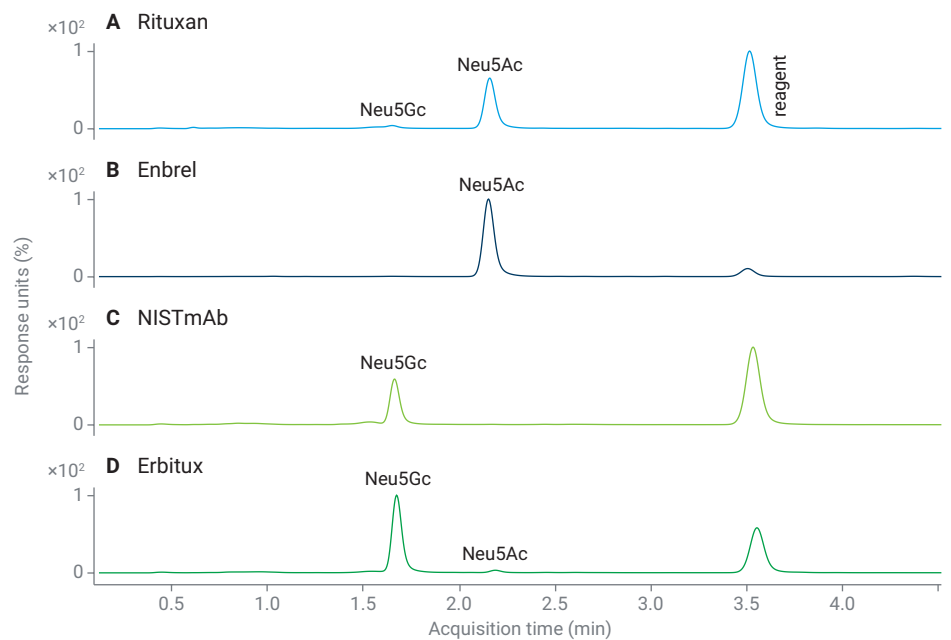


그림 3. 여러 당단백질의 DMB 표지 시알산의 UHPLC 형광 프로파일 (A) Rituxan; (B) Enbrel; (C) NISTmAb; (D) Erbitux.

시알산 함량의 정량 분석

DMB 표지 Neu5Ac 및 Neu5Gc 표준물질의 크로마토그래피 분리와 형광 반응을 기초로, 정량 검량선이 생성되었습니다(그림 5). LOD 및 LOQ는 OpenLab CDS 2.3에서 P2P 노이즈 계산을 통해 측정되었습니다. Rituxan, Enbrel, NISTmAb 및 Erbitux에서 검출 가능한 Neu5Gc 및 Neu5Ac의 몰 질량은 적분된 피크 면적을 기반으로 측정되었고 표 3에 나열되어 있습니다. 시알산 정량의 총 결과는 AdvanceBio 총 시알산 정량 키트(p/n GS48-SAQ)에서 얻은 결과와 일치했습니다(표 4). 키트는 또한 시료당 당단백질 농도를 증가시키고 분석 전 시료 희석 감소를 통한 DMB 표지 시알산의 형광 시그널 상승으로, 기존 DMB 표지 워크플로(p/n GKK-407) (표 5)에 비해 향상된 성능을 보여줍니다.

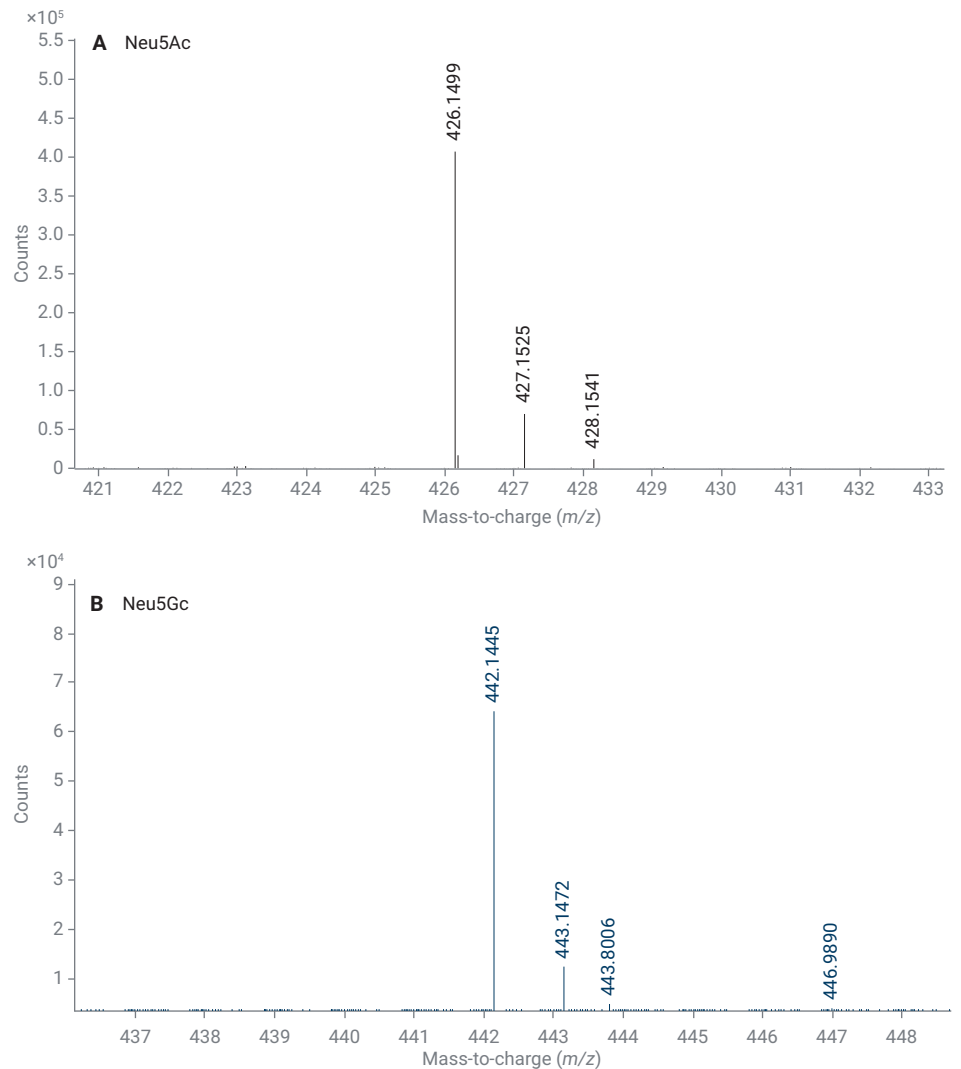


그림 4. Enbrel의 DMB 표지 시알산 (A) Neu5Ac 및 Erbitux의 (B) Neu5Gc 질량 스펙트럼.

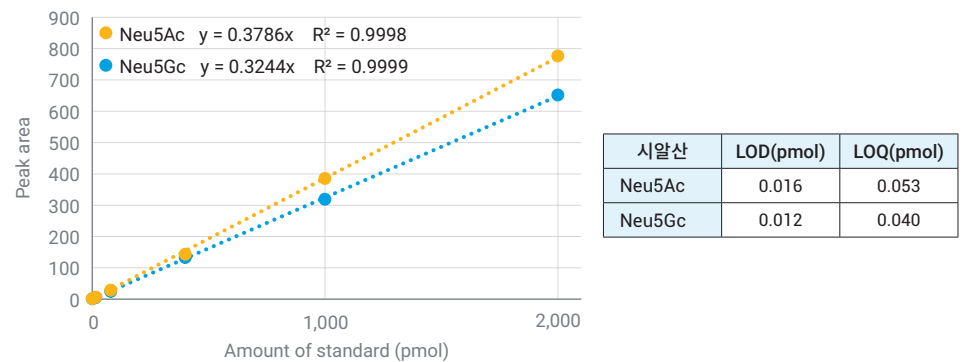


그림 5. Neu5Ac 및 Neu5Gc 검량선, n=2. Neu5Ac 및 Neu5Gc의 LOD 및 LOQ를 표에 나타냈습니다.

표 3. 각 당단백질의 Neu5Ac 및 Neu5Gc 평균 pmol/μg이 표에 나와 있습니다, n=3.
ND = 불검출.

	농도 (mg/mL)	시료 질량 (μg)	Neu5Ac (pmol/μg)	%CV	Neu5Gc (pmol/μg)	%CV
Rituxan	10	200	0.60	4.2%	0.02	1.8%
Enbrel	0.25	5	228	6.9%	ND	-
NIST mAb	10	200	ND	-	0.36	1.8%
Erbix	2	40	0.12	10.9%	3.72	7.1%

표 4. Agilent AdvanceBio 총 시알산 정량 키트(p/n GS48-SAQ)와 Agilent AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트(p/n GS24-SAP)를 사용하여 얻은 총 시알산(Neu5Ac 및 Neu5Gc)의 값 비교, n=3.

	Agilent AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트		Agilent AdvanceBio 총 시알산 정량 키트	
	pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
Rituxan	0.62	4.17%	0.47	5.04%
Enbrel	220	1.65%	210	12.34%
Erbix	3.80	7.26%	3.49	0.69%
Fetuin	226	4.45%	232	7.39%

표 5. Agilent AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트(p/n GS24-SAP)와 Signal DMB 시알산 표지 키트(p/n GKK-407)를 사용한 Neu5Ac 및 Neu5Gc 정량 값(pmol/μg) 비교, n=3. ND = 불검출.

		GKK-407		Agilent AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트	
당단백질	시알산	pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
Rituxan	Neu5Gc	ND	-	0.02	1.76%
	Neu5Ac	0.58	1.12%	0.60	4.25%
Enbrel	Neu5Ac	226	3.57%	223	2.92%
Erbix	Neu5Gc	ND	-	3.68	1.02%
	Neu5Ac	ND	-	0.12	4.46%
Fetuin	Neu5Gc	ND	-	4.78	4.90%
	Neu5Ac	201	1.47%	222	4.44%

결론

AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트는 Fc 부위에 단일 N-당사슬 결합 위치를 가진 단일 클론 항체 등과 같은 낮은 시알산화 수준의 단백질에 대해 향상된 감도를 제공합니다. 새로운 DMB 표지 워크플로는 시료의 건조 단계를 제거하여, 시료 전처리 시간을 단축하였습니다.

이 워크플로를 통해 바이오의약품에 존재하는 Neu5Ac 및 Neu5Gc의 절대적 및 상대적 정량을 모두 수행할 수 있습니다. 시료 전처리는 재현성이 높은 고처리량 시료 전처리를 위해 96-well plate 포맷을 사용합니다. 정량 데이터는 예전의 DMB

표지 워크플로(GKK-407) 및 AdvanceBio 총 시알산 정량 키트(GS48-SAQ)의 결과와 비슷합니다.

참고 문헌

- Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, 14(8), 351-360.
- Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104(6), 1866-1884.
- Li, Y. et al. Sialylation on O-glycans Protects Platelets from Clearance by Liver Kupffer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2017**, 114(31), 8360-8365.
- Scallon, B. J. et al. Higher Levels of Sialylated Fc Glycans in Immunoglobulin G Molecules can Adversely Impact Functionality. *Mol. Immunol.* **2007**, 44(7), 1524-1534.
- Kaneko, Y. et al. Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, 313, 670-673.

www.agilent.com/chem

DE.7541782407

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
2021년 3월 23일 한국에서 인쇄
5994-2352KO

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

 **Agilent**
Trusted Answers