

# Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 이용한 펩타이드와 글리칸 맵핑 간 자동 전환

단일 클론 항체의 특성 규명에서 생산성 및 유연성 향상

## 저자

Gerd Vanhoenacker, Aurélie  
Terrier, Gianni Vandenborre,  
Pat Sandra, Koen Sandra  
RIC Biologics  
President Kennedypark 26  
B-8500 Kortrijk  
Belgium

Sonja Schipperges,  
Sonja Schneider, Udo Huber  
Agilent Technologies  
Hewlett-Packard Strasse 8  
D-76337 Waldbronn  
Germany

## 개요

글리칸과 펩타이드 맵핑은 단일 클론 항체(mAbs)와 같은 치료용 단백질의 구조적 특성 규명에 있어 핵심적인 분석법입니다. 이 응용 자료에서는 모드 전환 시 사용자의 개입 없이 동일한 시스템에서 수행한 mAbs의 글리칸 및 펩타이드 맵핑을 설명합니다. 컬럼 스위칭 밸브, 형광 검출기(FLD), 다이오드 어레이 검출기(DAD), Quadrupole Time-of-Flight 질량 분석기(Q-TOF MS)가 장착된 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템에서 분석을 수행합니다. Agilent AdvanceBio Peptide Plus와 Glycan Mapping 컬럼을 사용하며, 컬럼은 신속한 글리칸 방출 및 라벨링을 가능하게 하는 InstantPC 키트와 함께 사용합니다. 이러한 기기 설정은 다양한 mAb 시료에서 확인할 수 있는 것처럼, 단일 분석 시퀀스에서 글리칸 및 펩타이드 맵핑을 수행할 수 있는 뛰어난 유연성과 생산성을 제공합니다.

## 서론

MAbs는 암과 자가 면역 질환 및 전염병을 포함해 생명을 위협하는 질병 치료에 중요한 치료제로 떠올랐습니다. 치료 잠재력은 매우 높지만, 구조적 복잡성이 상당하여 분석이 매우 까다롭습니다. 글리칸 및 펩타이드 맵핑은 mAbs와 관련된 구조적 복잡성을 밝히는 데 매우 중요한 분석 도구입니다.<sup>1-3</sup>

FLD 및 2-aminobenzamide(2-AB) 라벨링을 결합한 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)는 mAbs에서 기인한 N-글리칸 분석을 위한 절대 표준으로 간주됩니다.<sup>4</sup> 이 분석법은 25년된 다음 논문에서 출발했습니다. "글리칸 혼합물 분리 및 올리고당 프로파일 분석을 위한 고속 고분해능 고성능 액체 크로마토그래피 분석법".<sup>5</sup> 아마이드 작용기가 있는 5 $\mu$ m의 실리카 기반 입자로 채운 컬럼에서 분리가 이루어졌습니다. 당시 pH 4.4의 포름산 암모늄 완충액을 사용했음에도 불구하고 순상 HPLC 분석법으로 간주되었습니다. 현재 이 LC 모드는 HILIC라고 불립니다. 최근에 애질런트에서는 아마이드 화학을 기반으로 하고 각각 UHPLC(1,200bar) 및 HPLC(600bar)와 호환되는 1.8 $\mu$ m 완전 다공성 및 2.7 $\mu$ m 표면 다공성 형식 모두에서 사용할 수 있도록 특별하게 설계된 컬럼인 AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼을 소개했습니다. 원래 논문에서 사용된 고속 및 고분해능이라는 용어가 지속적으로 재정의되었습니다. 사실 2 $\mu$ m 미만의 완전 다공성 및 3 $\mu$ m 미만의 표면 다공성 입자를 통한 확산 거리 감소 덕분에 뛰어난 고속 분리가 가능합니다.<sup>6</sup>

형광 및/또는 질량 분석법(MS)을 통한 크로마토그래피 거동 및 검출을 개선하기 위해 글리칸 라벨링이 수행됩니다. 2-AB를 통한 라벨링이 많은 실험실에서 적용되었지만, 최근에는 procainamide(PC)와 같이 보다 민감한 MS 측정을 가능하게 하는 다른 표지의 도전을 받고 있습니다. 과거에는 시료 전처리가 분석 프로세스에서 병목 현상을 일으켜 탈당화, 환원 아미노화를 통한 라벨링 및 클린업과 같은 노동 집약적인 시료 조작에 며칠이 필요했습니다. 글리칸 글리코실아민 형태와 반응하는 최신 글리칸 시약(InstantPC) 및 간소화된 탈당화 프로토콜(AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep)을 사용하면 처리 시간이 1시간 이하로 감소하기 때문에 처리량을 크게 늘릴 수 있습니다.<sup>7</sup>

글리칸 맵핑 다음으로 mAbs에서 수행되는 일반적이고 중요한 기법은 LC/MS 기반 펩타이드 맵핑입니다. 아미노산 시퀀스, N- 및 O-당화, 당화반응, N- 및 C-말단 처리, 탈아미드화(아스파라긴, 글루타민), aspartate 이성질화 및 산화(메티오닌, tryptophan)와 같은 중요한 1차 구조적 특징을 LC/MS 데이터에서 바로 추출할 수 있습니다.<sup>1-3</sup> mAbs의 트립신 분해물과 관련된 복잡성 때문에 상당한 분리 능력이 필요합니다. 역상 액체 크로마토그래피(RPLC)는 소수성, 크기, 전하 관점에서 속성이 다양하고, 넓은 측정 범위 전반에 존재하는 많은 수의 펩타이드를 분리하기 위해 선택하는 방법입니다. 이동상 첨가제 trifluoroacetic acid(TFA)는 이러한 기본 용질의 피크 모양과 크로마토그래피 분리능을 개선하는 데 있어 그 가치를 계속해서 입증해 왔지만, 이온화 억제로 인해 MS 감도가 감소하는 문제가 있습니다. 후자를 포름산으로 대체하면 MS 감도가 크게 개선되지만, 기존의 역상 컬럼에서의 크로마토그래피 성능이 감소합니다.

최근에 소개한 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 컬럼은 양전하를 띠는 하이브리드 엔드캡핑 C18 고정상이 특징인 3 $\mu$ m 미만 표면 다공성 입자를 기반으로 하며, 이동상 첨가제로 MS 친화적인 포름산을 사용해 우수한 크로마토그래피 성능을 제공합니다.<sup>8</sup>

일반적인 바이오제약 특성 규명 워크플로는 글리칸 및 펩타이드 맵핑을 모두 수행해야 하기 때문에 동일한 분석 시퀀스 내에서 동일한 분석 설정을 사용해 이러한 분석을 가능하게 하는 데 이점이 있습니다. 이 응용 자료에서는 컬럼 스위칭 밸브, FLD, DAD, Q-TOF MS가 장착된 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 사용하여 AdvanceBio Glycan Mapping 및 Peptide Plus 컬럼에서 사용자의 개입 없이 mAbs의 순차적인 펩타이드 및 글리칸 맵핑을 수행하는 방법을 설명합니다.

## 실험

### 기기

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 Agilent Jet Stream ESI 소스가 장착된 Agilent 6545 LC/Q-TOF와 함께 사용했습니다. LC 시스템은 다음 모듈 및 옵션으로 구성되었으며 기기 구성 및 분석 유동 경로는 그림 1과 같습니다.

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
  - 시료 온도 조절 장치(옵션 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(MCT) (G7116B)
  - 밸브 드라이브(옵션 #058)
- Agilent InfinityLab Quick Change 밸브, 2-포지션/6-포트, 1,300bar(G4231C)

- Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(G7117B)
  - Max-Light 카트리지 10mm, 1μL(G4212-6008)
- Agilent 1260 Infinity II 형광 검출기 (G1321A)
  - 표준 플로우 셀 8μL(G1321-60005)

MCT에 설치된 컬럼 스위칭 밸브는 Glycan Mapping 또는 Peptide Plus 컬럼 및 각 분석을 선택하는 데 사용됩니다. 펩타이드 �핑 용출액은 분할 없이 연속으로 DAD 및 MS를 통과합니다. 글리칸 �핑 용출액은 ZDV T-piece(Agilent)를 통해 FLD와 MS로 분할됩니다. 잘 깨지기 쉬운 FLD 플로우 셀을 보호하기 위해 분할이 필요합니다.

### 컬럼

- Agilent AdvanceBio Glycan Map, 2.1 × 150mm, 2.7μm (제품 번호 683775-913)
- Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150mm, 2.7μm(제품 번호 695775-949)

### 소프트웨어

- Agilent MassHunter 워크스테이션 (B09.00)
- Agilent MassHunter 정성 분석(B07.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm(B07.00)

### 화학물질 및 시약

아세트오닐트릴(HPLC-S), 물(ULC/MS), 포름산(ULC/MS)은 Biosolve에서 구입했습니다. 포름산 암모늄(LC/MS 등급), guanidine-HCl, DL-dithiothreitol(DTT), 2-iodoacetamide(IAA)는 Sigma에서 구입했습니다. Tris-HCl(1M, pH 7.5)는 Invitrogen에서, Trypsin(시퀀싱 등급)은 Promega에서 구입했습니다. Type I 물은 Sartorius의 arium pro Ultrapure Lab Water 시스템으로 수돗물을 처리해 얻었습니다. Gly-X Deglycosylation Module, Gly-X InstantPC Labeling Module, Gly-X InstantPC Cleanup Module로 구성된 AdvanceBio Gly-X with InstantPC Dye 키트(GX96-IPC)는 Agilent Technologies에서 구입했습니다.

### 시료 및 시료 전처리

이 설정에서 총 9개의 mAb 시료 (오리지네이터 및 바이오시밀러)를 분석했습니다. 이러한 시료는 아래에서 간략하게 설명하는 것처럼 각 분석을 위해 전처리했습니다. 전처리한 시료를 분석 전까지 -20°C에서 보관했습니다. Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-glycan library(GKPC-020)를 글리칸 맵핑을 위한 대조군 시료로 사용했습니다.

### 글리칸 맵핑

시료는 사용자 설명서에 기술된 프로토콜에 따라 전처리했습니다. 요약하면, 40μg의 mAb를 3분 동안 90°C에서 변성하고 PNGase F를 사용해 50°C에서 5분 동안 탈글리코실화했습니다. 방출된 글리칸을 1분 동안 50°C에서 InstantPC로 표지했습니다. 표지된 N-글리칸을 HILIC 고정상 추출(SPE) 클린업 모듈을 사용해 정제했습니다.

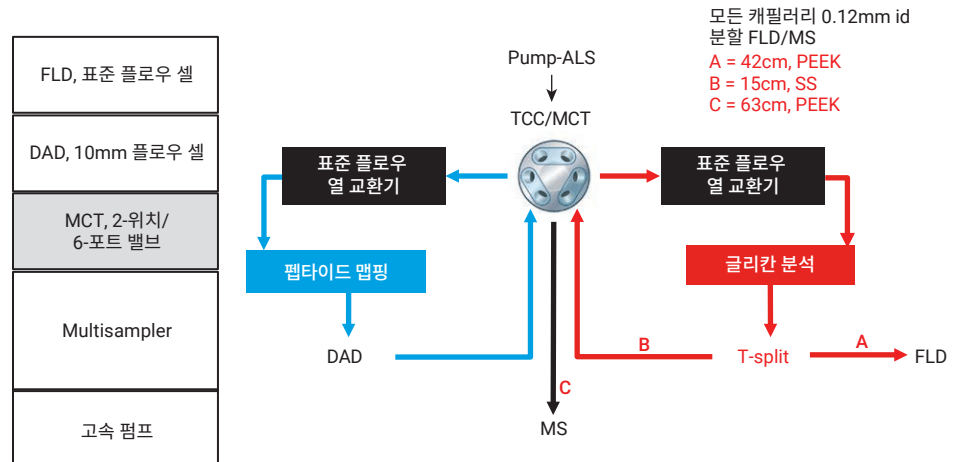


그림 1. 펩타이드 및 글리칸 분석 간의 자동 전환을 위한 분석 유동 경로.

분석법 파라미터

글리칸 분석			
LC			
MCT 밸브	위치 1(글리칸 컬럼 및 분할 FLD-MS 방향)		
컬럼	Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150mm, 2.7μm		
이동상	A) 50mM 포름산 암모늄, pH 4.4 수용액 B) 아세트오니트릴		
유속	0.5mL/min		
그레디언트	글리칸 맵핑		전환 후 글리칸 컨디셔닝
	0~2분	80~75% B	0~10분 ~ 50% B 10~12분, 50~80% B 12~25분, 80% B
	2~38분	75~65% B	
	38~39분	65~40% B	
	39~41.5분	40~80% B	
	41.5~55분	80% B	
온도	40°C		
주입	1μL, 5°C, 니들 세척: 5초, 물/아세트오니트릴(50/50), 플러시 포트		
검출			
FLD			
파장	Ex 285nm, Em 345nm		
피크 폭	>0.05분(1초 응답 시간, 9.26Hz)		
PMT Gain	10		
MS			
MS에 연결된 전환 밸브	5~39분		
소스			
건조 가스 온도	150°C		
건조 가스 유속	8L/분		
Sheath 가스 온도	300°C		
Sheath 가스 유속	10L/분		
Nebulizer 압력	30psi		
캐필러리 전압	2,500V		
노즐 전압	500V		
Fragmentor	120V		
수집			
이온 극성	양이온		
수집 모드	확장된 측정 범위(2GHz)		
질량 범위	m/z 600~3,000		
스캔 속도	1스펙트럼/초		
기준 질량	비활성화됨		

펩타이드 맵핑				
LC				
MCT 밸브	위치 2(펩타이드 컬럼 및 DAD/MS 방향)			
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150mm, 2.7μm			
이동상	A) 0.1% 포름산 수용액 B) 0.1% 포름산 아세트오니트릴 용액			
유속	0.3mL/min			
그레디언트	펩타이드 맵핑		전환 후 펩타이드 컨디셔닝	
	0~1분	2% B	0 ~ 15분	50% B
	1~41분	2~47% B	15 ~ 16분	50~95% B
	41~42분	47~95% B	16 ~ 20분	95% B
	42~47분	95% B	20 ~ 21분	95~2% B
	47~48분	95~2% B	21 ~ 30분	2% B
	48~55분	2% B		
온도	50°C			
주입	5μL, 5°C, 니들 세척: 5초, 물/아세트오니트릴(50/50), 플러시 포트			
검출				
DAD				
파장	214/8nm, 220/8nm, 280/8nm			
피크 폭	>0.025분(0.5초 반응 시간, 10Hz)			
MS				
MS에 연결된 전환 밸브	0~42분			
소스				
건조 가스 온도	325°C			
건조 가스 유속	12L/min			
Sheath 가스 온도	300°C			
Sheath 가스 유속	12L/min			
Nebulizer 압력	45psi			
캐필러리 전압	4,000V			
노즐 전압	0V			
Fragmentor	175V			
수집				
이온 극성	양이온			
수집 모드	확장된 측정 범위(2GHz)			
기준 질량	비활성화됨			
수집 MS				
질량 범위	m/z 100~3,000			
스캔 속도	2스펙트럼/초			
수집 MS/MS				
자동 MS/MS 질량 범위	m/z 100~3,000			
자동 MS/MS 스캔 속도	4스펙트럼/초			
분리 폭	배지(~m/z 4)			
전하 상태 기본 설정	2/3/>3/Unk			
충돌 에너지	모두: 4(기울기) 및 -4.8(오프셋)			
최대 전구체/사이클	5			
Prec. 임계값 Abs/Rel%	1,000/0.010			
동위원소 모델	펩타이드			
능동 배제	0.5분 동안 두 개의 스펙트럼 후			
전구체 정렬	오직 양으로만			
순도	엄격도: 100%, 컷오프: 30%			

## 펩타이드 맵핑

요약하면 100 $\mu$ g의 mAb를 100mM Tris-HCl pH 7.5의 3M guanidine-HCl를 사용해 변성하고, 60°C에서 30분 동안 5mM DTT를 사용해 환원하고, IAA를 사용해 37°C에서 1시간 동안 알킬화했습니다. 시료는 1:25의 효소:단백질 비율을 사용해 37°C에서 하룻밤 동안의 트립신 분해 전에 젤 여과를 사용해 탈염화했습니다.

## 분석 시퀀스 및 분석법 전환

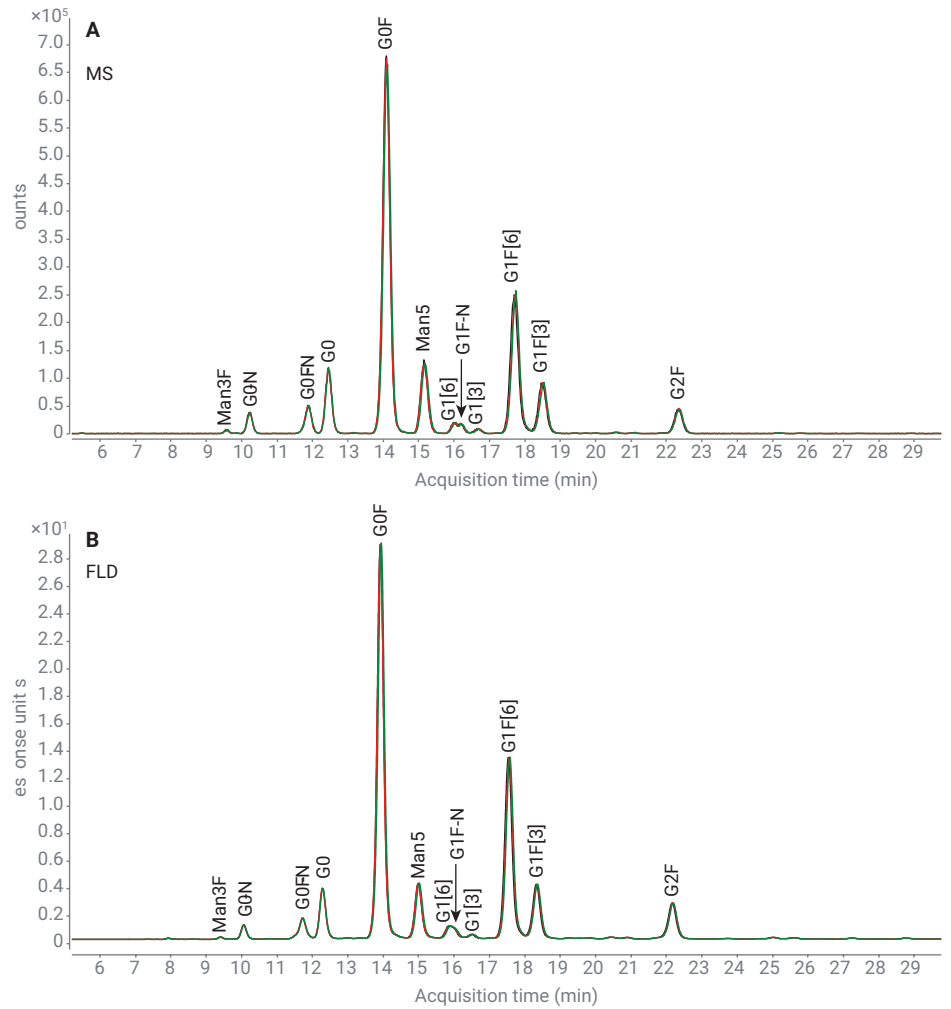
아래에서 설명한 분석을 사용자 개입 없이 단 하나의 분석 인스턴스에서 수행했습니다. 이 실험에서는 펩타이드에서 글리칸 맵핑으로, 글리칸에서 펩타이드 맵핑으로 자동 전환이 여러 번 수행되었습니다. 하나의 분석법에서 다른 분석법으로 전환하는 즉시 이후 분석을 위한 시스템 및 컬럼 컨디셔닝을 위해 중간 분석법이 실행되었습니다.

라인	시료	방법
1	블랭크	글리칸
2	글리칸 CHO 대조군	글리칸
3	글리칸 CHO 대조군	글리칸
4	글리칸 CHO 대조군	글리칸
5	Trastuzumab 오리지네이터	글리칸
6	Trastuzumab 바이오시밀러(대조군)	글리칸
7	Trastuzumab 바이오시밀러(4x)	글리칸
8	Trastuzumab 바이오시밀러(8x)	글리칸
9	Trastuzumab 바이오시밀러(16x)	글리칸
10	Trastuzumab 바이오시밀러(24x)	글리칸
11	블랭크	글리칸에서 펩타이드로 전환
12	블랭크	펩타이드
13	Trastuzumab 오리지네이터	펩타이드
14	Trastuzumab 오리지네이터	펩타이드
15	Trastuzumab 오리지네이터	펩타이드
16	Trastuzumab 바이오시밀러(대조군)	펩타이드
17	Trastuzumab 바이오시밀러(4x)	펩타이드
18	Trastuzumab 바이오시밀러(8x)	펩타이드
19	Trastuzumab 바이오시밀러(16x)	펩타이드
20	Trastuzumab 바이오시밀러(24x)	펩타이드
21	블랭크	펩타이드에서 글리칸으로 전환
22	블랭크	글리칸
23	Rituximab 오리지네이터	글리칸
24	Rituximab 바이오시밀러 1	글리칸
25	Rituximab 바이오시밀러 2	글리칸
26	블랭크	글리칸에서 펩타이드로 전환
27	블랭크	펩타이드
28	Rituximab 오리지네이터	펩타이드
29	Rituximab 바이오시밀러 1	펩타이드
30	Rituximab 바이오시밀러 2	펩타이드
	보관	

## 결과 및 토의

### 글리칸 맵핑

분석 시퀀스는 일련의 글리칸 맵핑 실험으로 시작했습니다. 그림 2는 표면 다공성 2.7 $\mu$ M AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼에서 획득한 InstantPC CHO mAb N-glycan library에 대한 3회 HILIC 분석을 통해 동시에 획득한 FLD 및 MS 극미량 성분을 보여줍니다. 고분해능과 그에 따른 N-당사슬을 FLD 및 MS 프로파일 모두에서 자세하게 확인할 수 있습니다. InstantPC 표지 글리칸은 중합도에 따라 용리됩니다 (즉 글리코시드 결합 수가 많아질수록 머무름이 길어집니다). 선택성 차이가 충분하기 때문에 복합형 글리칸의  $\alpha$ 1-3 또는  $\alpha$ 1-6 가지에 갈락토오스 잔기가 다르게 배치되는 G1F[3] 및 G1F[6]와 같은 이성질체 화합물을 포함해 중합도가 동일한 화합물을 분리할 수 있습니다. 그림 3은 선택한 보조 및 주요 InstantPC-표지 N-글리칸의 대표적인 MS 스펙트럼을 보여줍니다. 깨끗하고 강한 스펙트럼이 관찰되었으며, 이는 PC 기본 꼬리(3차 아민)의 높은 양성자 친화도로 설명할 수 있습니다. 표 1 및 2에는 각각 MS 및 FLD 머무름 시간이 나와 있으며, InstantPC-표지 N-글리칸을 3회 분석해 확보한 피크 면적 및 피크 면적% 정밀도도 나와 있습니다. 뛰어난 상대 표준 편차(RSD) 값도 표시되어 있습니다. 피크 면적%은 MS 및 FLD 검출 간에 약간 다르지만, 이는 MS 이온화 차이로 설명할 수 있습니다. MS 극미량 성분은 주로 식별 목적으로 사용되고 FLD 극미량 성분은 정량화 목적으로 사용됩니다.



**그림 2.** 표면 다공성 2.7 $\mu$ M Agilent AdvanceBio Glycan Mapping 컬럼에서 Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-glycan library의 Triplicate HILIC-MS(A) 및 HILIC-FLD(B) 크로마토그램. MS 극미량 성분의 경우 기본 피크 크로마토그램(BPC)이 나타납니다. 애질런트 발행물 5994-2202KO에 따른 글리칸 명명법.<sup>9</sup>

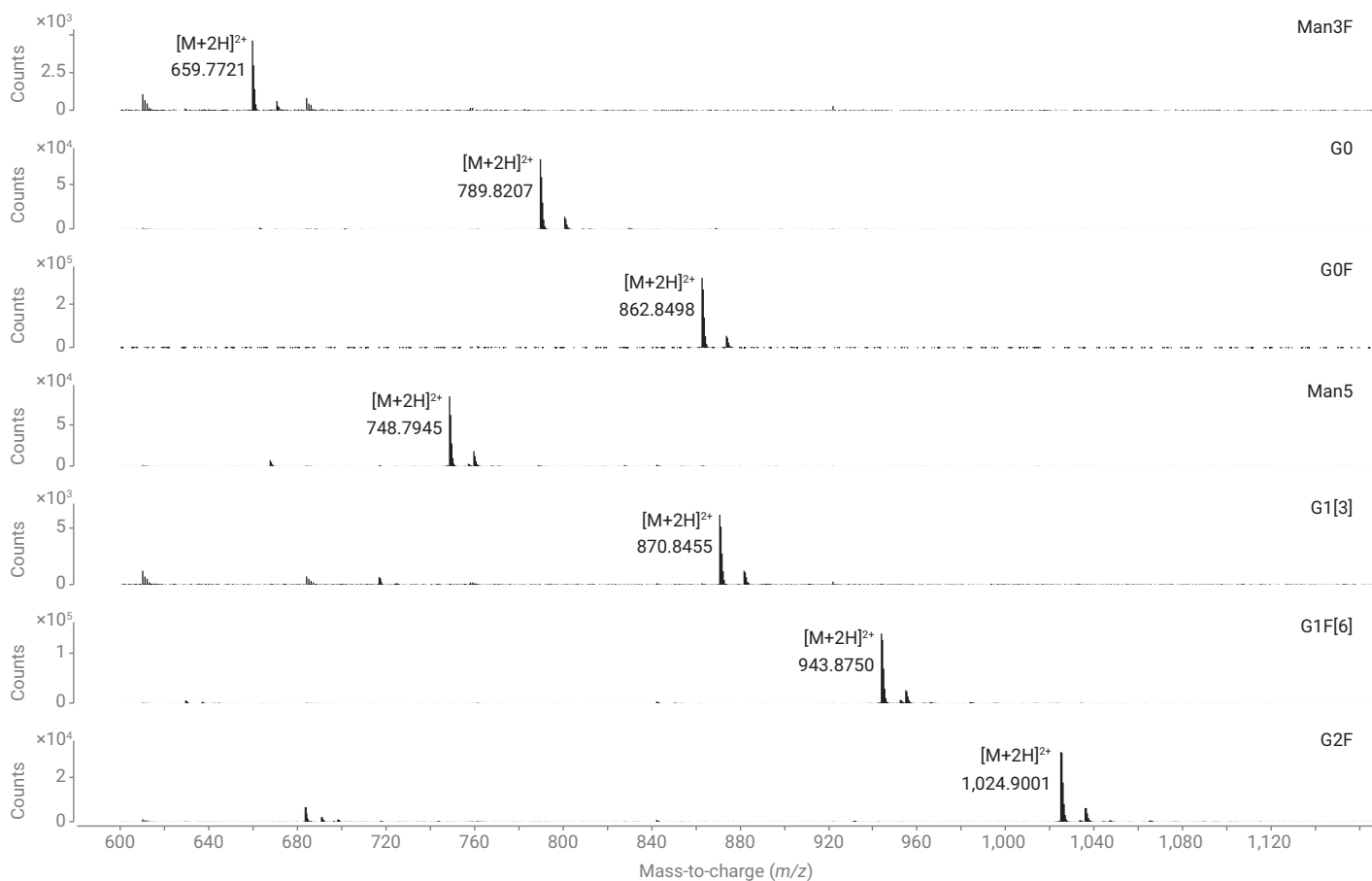


그림 3. 그림 2에서 확인할 수 있는 것처럼, Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-glycan library에서 관찰된 선택한 보조 및 주요 글리칸 피크와 일치하는 MS 스펙트럼.

표 1. Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-glycan library의 3회 분석에 대한 MS 머무름 시간, 피크 면적, 피크 면적% RSD 값.

	머무름 시간(분)				면적				면적%			
	Inj1	Inj2	Inj3	RSD%	Inj1	Inj2	Inj3	RSD%	Inj1	Inj2	Inj3	RSD%
Man3F	9.57	9.57	9.61	0.24	63,179	60,303	57,197	4.97	0.29	0.29	0.27	3.77
G0-N	10.22	10.23	10.23	0.06	438,962	407,010	425,035	3.78	2.04	1.93	2.03	3.12
G0F-N	11.89	11.89	11.89	0.00	677,744	650,350	641,947	2.85	3.15	3.08	3.06	1.58
G0	12.45	12.45	12.47	0.09	1,482,185	1,491,906	1,493,663	0.42	6.90	7.07	7.12	1.67
G0F	14.09	14.09	14.11	0.08	10,089,817	9,847,418	9,847,909	1.41	46.96	46.64	46.97	0.40
Man5	15.15	15.15	15.18	0.11	1,879,904	1,847,418	1,829,999	1.37	8.75	8.75	8.73	0.14
G1[6]	15.99	16.01	16.04	0.16	225,860	242,203	235,501	3.50	1.05	1.15	1.12	4.51
G1F-N	16.18	16.19	16.21	0.09	201,264	181,045	186,695	5.50	0.94	0.86	0.89	4.45
G1[3]	16.67	16.69	16.71	0.12	121,670	113,030	110,855	4.97	0.57	0.54	0.53	3.69
G1F[6]	17.70	17.73	17.75	0.14	4,091,308	4,068,838	4,015,420	0.96	19.04	19.27	19.15	0.60
G1F[3]	18.49	18.51	18.53	0.11	1,486,906	1,477,715	1,412,363	2.79	6.92	7.00	6.74	1.96
G2F	22.33	22.35	22.37	0.09	727,378	726,061	710,476	1.30	3.39	3.44	3.39	0.88

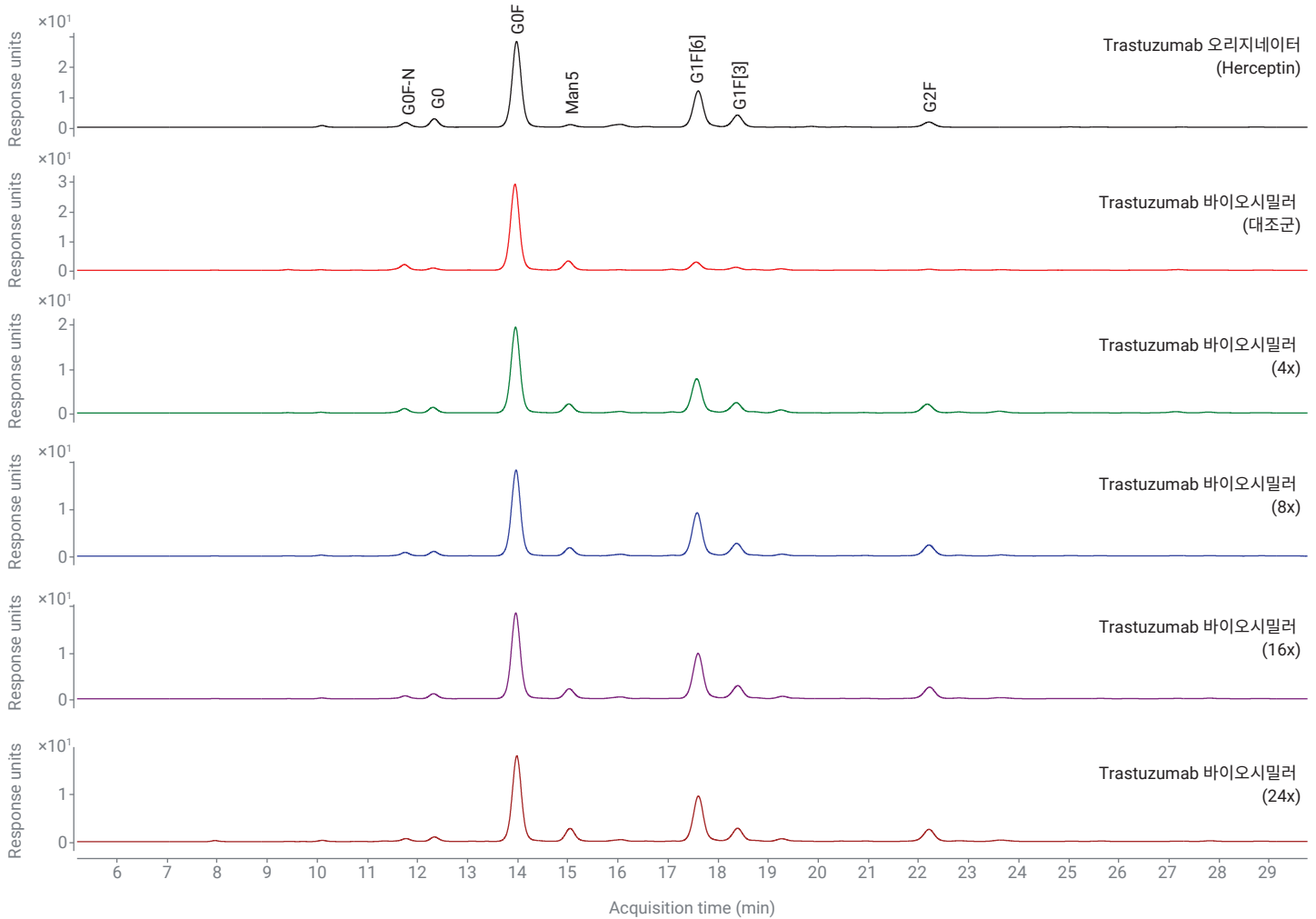




그림 5는 다양한 갈락토오스, 우리딘, 염화망간 농도(4x, 8x, 16x, 24x)에서 CHO clone을 생성하는 바이오시밀러를 성장시켜 확보한 N-글리칸 프로파일을 보여줍니다.<sup>12</sup> 이들은 갈락토오스 잔기를 G0F 및 G1F

수용체에 기부하는 galactosyltransferase의 기질 및 활성화제입니다. 다양한 시료의 N-글리칸 상대 감도는 그림 6에 나와 있습니다. 갈락토오스, 우리딘, 염화망간 농도가 증가할수록 G1F/G0F 비율이

증가하는 것으로 관찰되었습니다. 이러한 결과를 바탕으로 볼 때 오리지네이터 사양 내에서 바이오시밀러의 당화 피팅을 가능하게 하는 조건을 찾을 수 있는 것으로 결론낼 수 있습니다.



**그림 5.** 다양한 갈락토스, 우리딘, 염화망간 농도에서 CHO clone을 성장시켜 얻은 trastuzumab 오리지네이터 및 후보물질 바이오시밀러의 HILIC-FLD N-글리칸 프로파일.

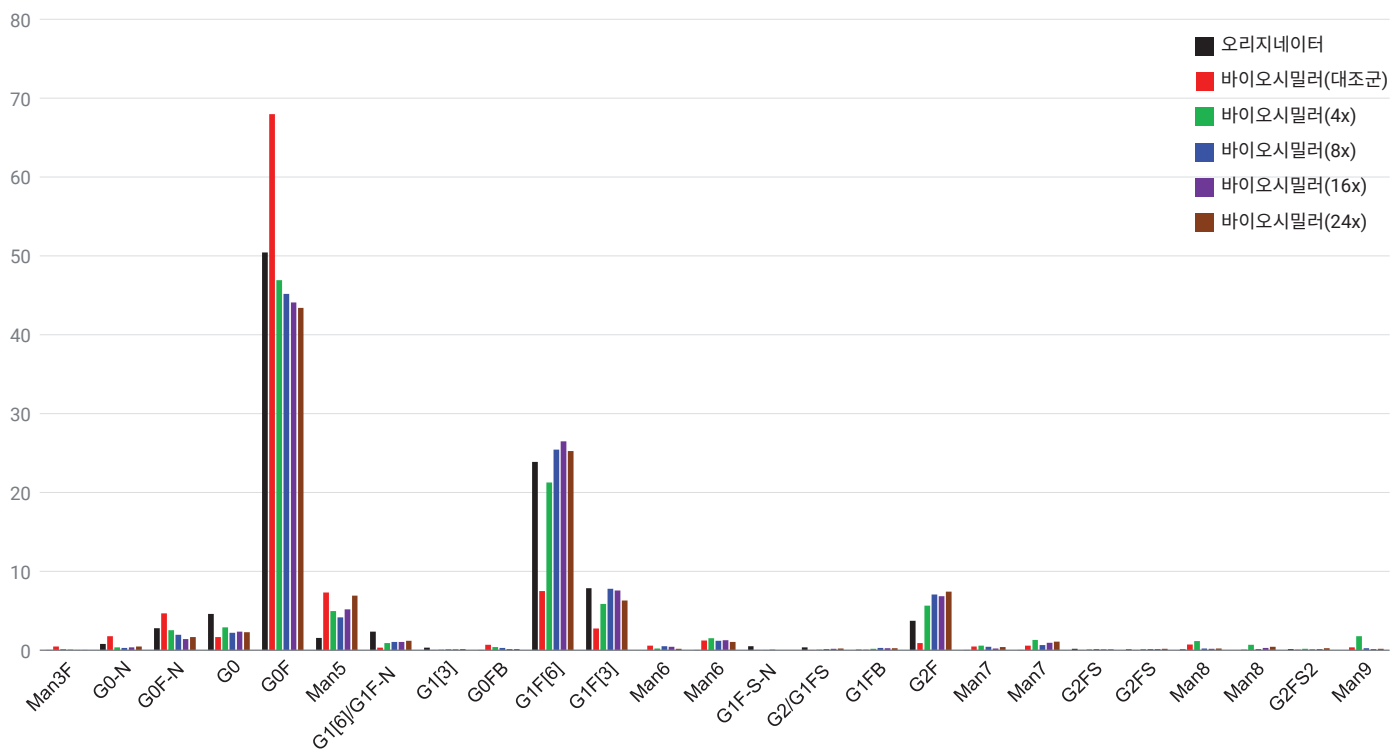
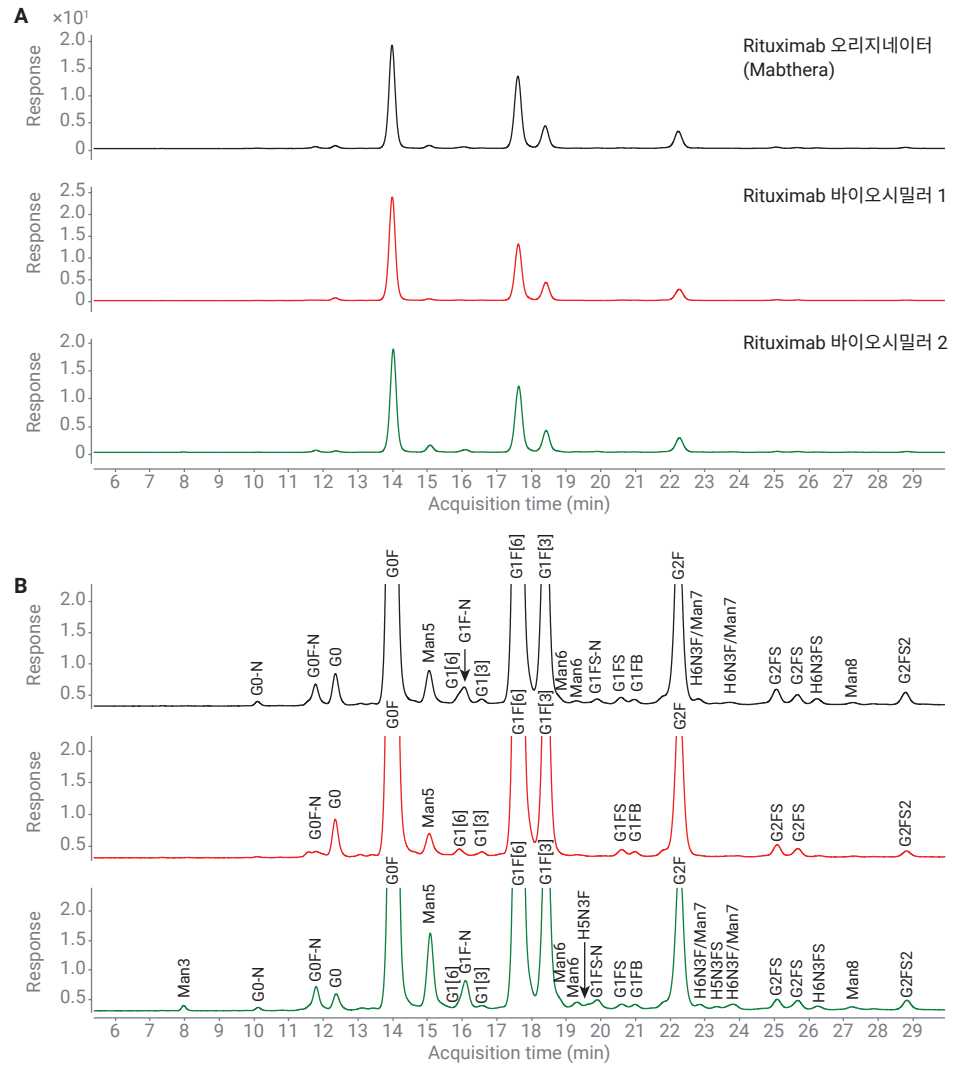


그림 6. 다양한 갈락토스, 우리딘, 염화망간 농도에서 CHO clone을 성장시켜 얻은 trastuzumab 오리지네이터 및 바이오시밀러의 상대적 글리칸 감도.

그림 7은 일련의 펩타이드 맵핑 실험을 따르는 설정에서 분석한 rituximab 오리지네이터(Mabthera) 및 2개의 승인된 바이오시밀러의 HILIC-FLD N-글리칸 프로파일을 보여줍니다. 고품질 데이터를 확보했으며, 다양한 복합체 및 고 만노스형 N-글리칸의 존재가 드러났습니다. 관찰된 N-글리칸은 정성적 관점에서는 시료 간에 비슷하지만, 그림 8에서 확인할 수 있는 것처럼, 정량적 관점에서는 약간 다릅니다.



**그림 7.** Rituximab 오리지네이터(Mabthera) 및 승인된 바이오시밀러에서 효소적으로 방출된 InstantPC-표지 N-글리칸의 HILIC-FLD 크로마토그램. 애질런트 발행물 5994-2202KO에 따른 글리칸 명명법.<sup>9</sup> H, N, F, S는 각각 hexose, N-acetylglucosamine, fucose, N-acetylneuraminic acid에 해당합니다.

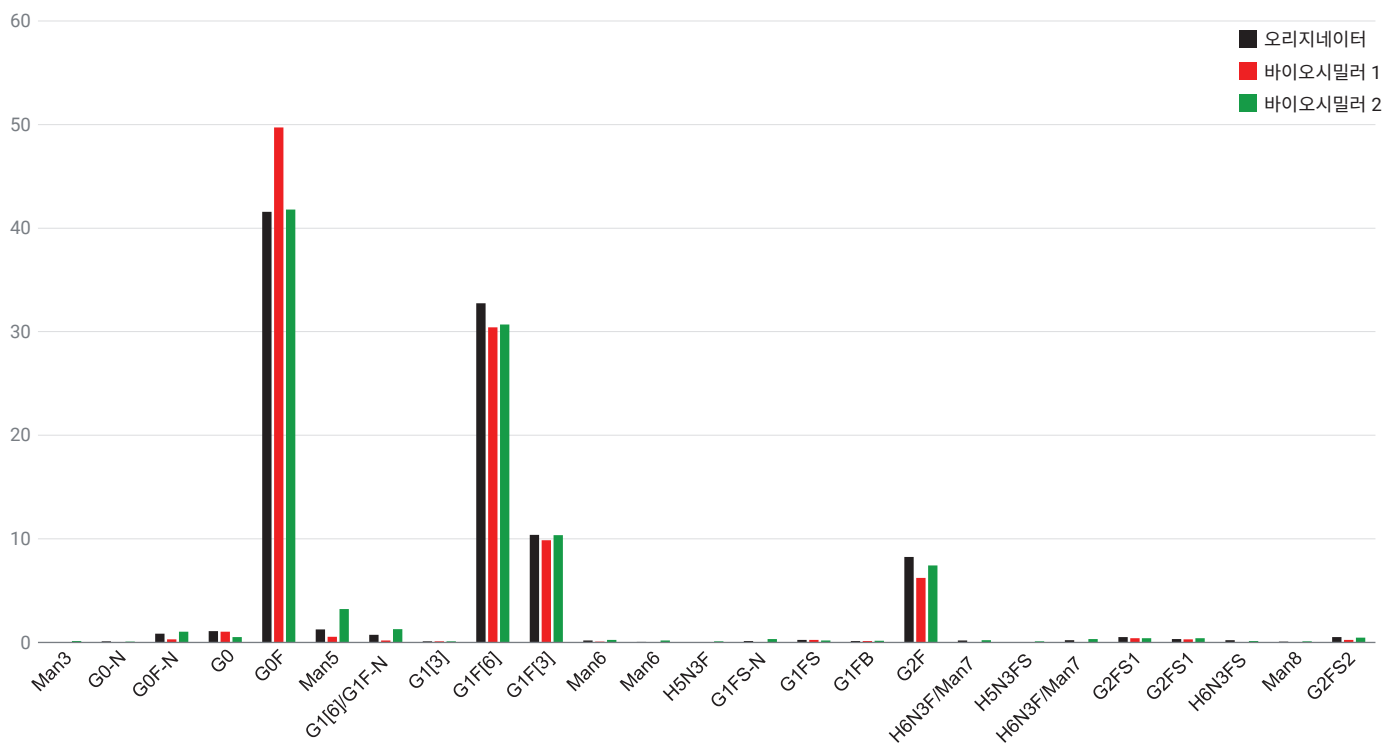


그림 8. Rituximab 오리지네이터(Mabthera) 및 승인된 바이오시밀러의 상대적인 글리칸 감도.

## 펩타이드 맵핑

Trastuzumab 오리지네이터 및 후보물질 바이오시밀러 시료에 대한 글리칸 맵핑 실험에 따라 펩타이드 맵핑을 위한 설정 조건을 수립했습니다. 그림 9는 표면

다공성 2.7 $\mu$ m AdvanceBio Peptide Plus 컬럼에서 trastuzumab 오리지네이터 트립신 분해물에 대한 반복 LC/MS 분석을 보여줍니다. 98.5% 이상의 시퀀스 커버리지가 일관되게 확보되었고, 다른

무엇보다도 당화, 산화, 탈아미드화, N-말단 고리화, C-말단 라이신 절단과 같은 번역 후 변형이 정확하게 확인되었습니다. 표 3은 선택한 변형 및 비변형 펩타이드에 대한 정밀성 데이터를 제공합니다.

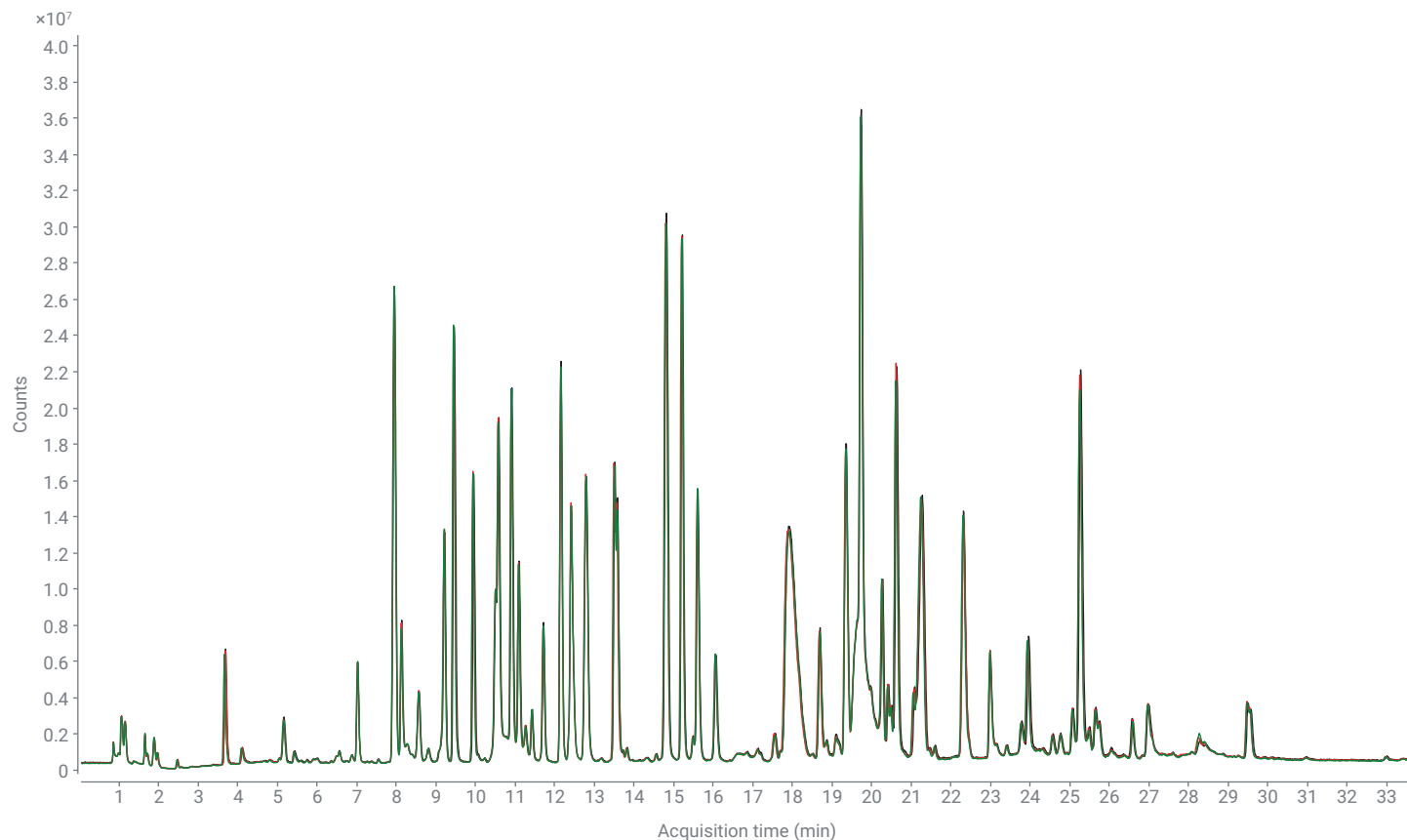


그림 9. 표면 다공성 2.7 $\mu$ m Agilent AdvanceBio Peptide Plus 컬럼에서 3회 분석된 trastuzumab 오리지네이터 트립신 분해물의 LC/MS TIC 극미량 성분.

표 3. 선택한 trastuzumab 오리지네이터 펩타이드의 LC/MS 머무름 시간 및 피크 면적 정밀도 데이터(n = 3).

펩타이드	변형	위치	머무름 시간(분)				면적			
			Inj1	Inj2	Inj3	RSD%	Inj1	Inj2	Inj3	RSD%
EVQLVESGGGLVQPGGSLR		Hc(001-019)	15.22	15.20	15.21	0.07	21,543,578	21,568,171	21,271,169	0.77
EVQLVESGGGLVQPGGSLR	Pyroglutamate(E1)	Hc(001-019)	19.73	19.73	19.73	0.00	227,186	225,778	230,268	1.01
QAPGK		Hc(039-043)	1.07	1.07	1.07	0.00	1,270,928	1,265,079	1,224,080	2.04
IYPTNGYTR		Hc(051-059)	7.03	7.02	7.02	0.08	5,876,176	5,956,977	5,921,920	0.68
IYPTNGYTR	탈아미드화(N55)	Hc(051-059)	7.82	7.82	7.81	0.07	75,634	77,128	78,682	1.98
IYPTNGYTR	탈아미드화(N55)	Hc(051-059)	8.28	8.27	8.28	0.07	1,929,925	1,908,310	1,914,802	0.58
IYPTNGYTR	탈아미드화(N55)	Hc(051-059)	9.12	9.12	9.12	0.00	312,718	311,721	316,366	0.78
VEPK		Hc(218-221)	1.07	1.07	1.07	0.00	323,901	330,331	316,162	2.19
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK		Hc(226-251)	17.92	17.89	17.91	0.09	17,363,016	17,015,571	16,981,394	1.23
DTLMISR	산화(N255)	Hc(252-258)	7.55	7.55	7.56	0.08	255,300	259,876	251,521	1.64
DTLMISR		Hc(252-258)	9.22	9.21	9.21	0.06	11,595,004	11,749,527	11,800,546	0.91
TPEVTCVVVDVSHEDPEVK		Hc(259-277)	14.82	14.80	14.81	0.07	37,674,640	37,729,504	37,213,192	0.76
EEQYNSTYR		Hc(296-304)	4.90	4.90	4.88	0.24	16,934	16,324	17,492	3.45
EEQYNSTYR	G0F(N300)	Hc(296-304)	5.17	5.16	5.16	0.11	110,472	105,261	107,652	2.42
VSNK		Hc(326-329)	1.07	1.07	1.07	0.00	356,697	359,808	350,322	1.36
EPQVYTLPPSR		Hc(348-358)	10.55	10.55	10.60	0.27	10,424,387	10,429,544	10,360,028	0.37
NQVSLTCLVK		Hc(364-373)	12.16	12.15	12.16	0.05	33,731,609	33,604,345	33,486,848	0.36
NQVSLTCLVK	탈아미드화(N364)	Hc(364-373)	14.37	14.35	14.37	0.08	182,196	185,270	186,655	1.24
NQVSLTCLVK	탈아미드화(N364)	Hc(364-373)	15.65	15.64	15.64	0.04	812,465	809,927	811,612	0.16
TPPVLDSDGSFFLYSK		Hc(396-412)	19.36	19.35	19.36	0.03	17,785,338	17,610,740	17,615,308	0.56
SLSLSPG	K-truncation(K450)	Hc(443-449)	10.51	10.50	10.50	0.05	15,601,783	15,393,916	15,630,806	0.83
SLSLSPGK		Hc(443-450)	6.49	6.49	6.49	0.00	118,037	112,418	112,434	2.83
SGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK		Lc(067-103)	22.33	22.33	22.31	0.05	2,007,854	1,993,328	2,014,568	0.54
VEIK		Lc(104-107)	1.65	1.65	1.65	0.00	1,635,756	1,644,870	1,694,386	1.90
TVAAPSVFIFPPSDEQLK		Lc(109-126)	19.65	19.64	19.64	0.03	10,494,089	10,075,113	10,090,599	2.32
VDNALQSGNSQESVTEQDSK		Lc(150-169)	8.14	8.13	8.13	0.07	3,067,119	2,974,891	2,835,943	3.93
VYACEVTHQGLSSPVTK		Lc(191-207)	9.47	9.45	9.45	0.12	23,190,381	23,107,936	22,919,049	0.60

Rituximab 오리지네이터 및 승인된 바이오시밀러의 트립신 분해물과 관련된 LC/MS TIC는 그림 10과 같습니다. 선택한 변형 및 비변형 펩타이드의 추출 이온 크로마토그램(EIC)은 그림 11과 같습니다. 경사슬 및 중사슬 N-말단 고리화, 중사슬

C-말단 라이신 절단, 프롤린 아마이드화뿐만 아니라 N-당사슬 부위 점유에서의 차이가 시료 간에 드러났습니다. 그 후 측정의 경우 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼에서 흥미로운 선택성이 확인되었습니다(즉 고 만노스 및 복합형 N-글리칸으로 꾸민

당펩타이드 간에 비글리코실 펩타이드 (EEQYNSTYR)가 용리됩니다). Rituximab 시료의 글리칸 맵핑에 따라 이러한 측정이 이루어졌습니다.

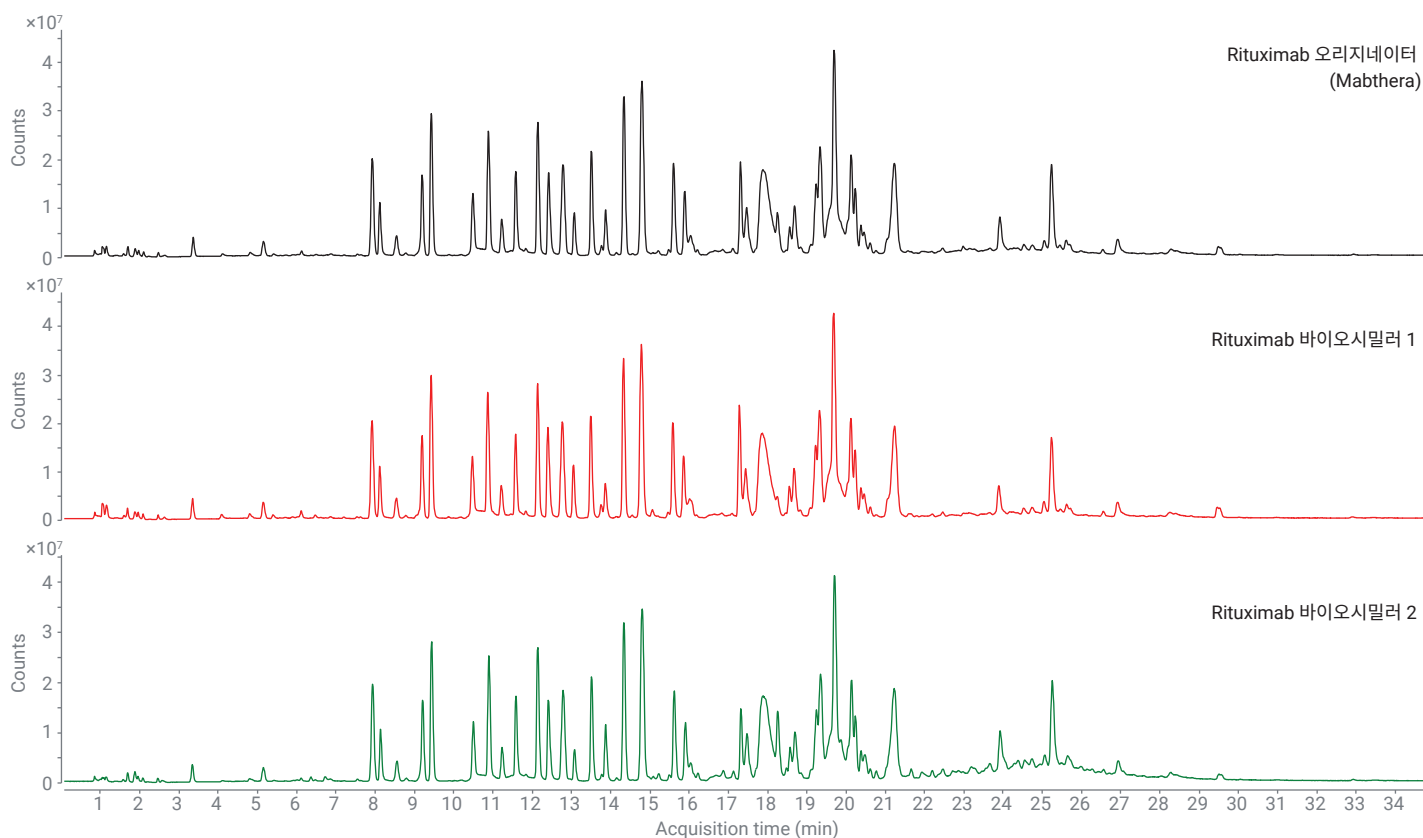
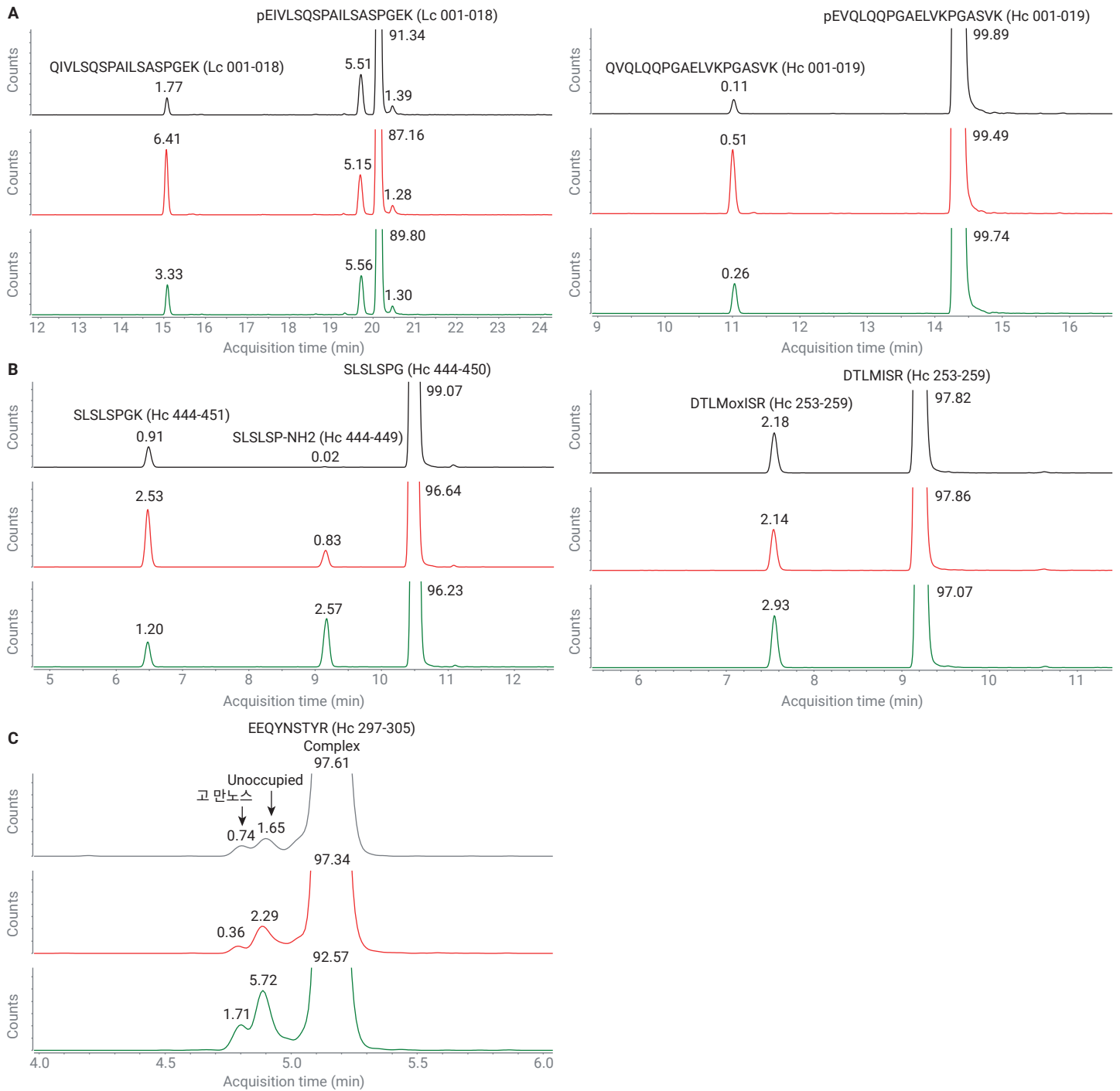


그림 10. Rituximab 오리지네이터(Mabthera) 및 승인된 바이오시밀러의 LC/MS 펩타이드 맵(TIC).



**그림 11.** Rituximab 오리지네이터(Mabthera)(A) 및 승인된 바이오시밀러 1(B) 및 바이오시밀러 2(C)에서 관찰된 선택한 변성 및 비변성 펩타이드의 EIC. EIC는 10ppm의 질량 정확도에서 추출하였습니다. 피크 주석에는 합산된 면적%가 표시되어 있습니다.



## 결론

컬럼 스위칭 밸브, 형광 검출기(FLD), 다이오드 어레이 검출기(DAD), Quadrupole Time-of-Flight 질량 분석기(Q-TOF MS)가 장착된 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 사용자의 개입 없이 mAbs의 순차적인 펩타이드 및 글리칸 매핑을 위해 사용했습니다. Agilent AdvanceBio Peptide Plus와 신속한 글리칸 방출 및 라벨링을 가능하게 하는 InstantPC 키트와 함께 사용하는 Glycan Mapping 컬럼은 많은 정보의 정밀한 데이터를 제공합니다. 이 설정은 바이오의약품 특성 규명 연장 통해 추가된 좋은 연장이라고 할 수 있습니다.

## 참고 문헌

1. Sandra, K.; Vandenheede, I.; Sandra, P. Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1335, 81–103.
2. Fekete, S. *et al.* Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88(1), 480–507.
3. Beck, A. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal. Chem.* **2013**, 85(2), 715–736.
4. D'Atri, V. *et al.* Hydrophilic Interaction Chromatography for the Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies at Protein, Peptide, and Glycan Levels. *LC-GC Europe* **2017**, 30(8), 424–434.
5. Guile, G. R. *et al.* A Rapid High-Resolution High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles. *Anal. Biochem.* **1996**, 240(2), 210–226.
6. Martosella, J. *et al.* A Novel HILIC Column for High Speed N-linked Glycan Analysis. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-4886EN, **2017**.
7. Yan, J.; Jones, A. Streamlined Workflows for N-Glycan Analysis of Biotherapeutics Using Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC and 2-AB Express Sample Preparation with LC/FLD/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1348KO, **2019**.
8. Potter, O.; Qin, V. Separation of Deamidated Peptides with an Agilent AdvanceBio Peptide Plus Column. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2971EN, **2021**.
9. AdvanceBio Glycan Standards InstantPC, 2-AB, 2-AA, APTS, InstantAB, InstantQ, Unlabeled. *Agilent Technologies flyer*, publication number 5994-2202EN, **2019**.
10. Dumont, E. *et al.* Cell Clone Selection Using the Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-5124EN, **2014**.
11. Dumont, E. *et al.* Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-5125EN, **2014**.
12. Gramer, M. J. *et al.* Modulation of Antibody Galactosylation Through Feeding of Uridine, Manganese Chloride, and Galactose. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108(7), 1591–1602.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

DE44487.2770486111

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
2021년 11월 23일, 한국에서 인쇄  
5994-4339KO

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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)