

AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트 및 LC/FLD/MS를 이용한 당단백질 바이오의약품의 시알산 분석



시알산 분석 간소화 및 표준화

당단백질 바이오의약품에 나타나는 글리칸의 조성은 면역원성, 약동학, 약력학 등에 영향을 미칩니다.¹ 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. 바이오의약품에서 일반적으로 발견되는 당단백질의 두 가지 형태는 N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac) 및 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc)입니다. 일반적으로 Neu5Ac가 우세한 것이며, 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.

Agilent AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트(부품 번호 GS24-SAP)는 Fc 부위에 단일 N-당사슬 결합 위치를 가진 단일 클론 항체 등과 같은 낮은 시알산화 수준의 단백질에 대해 향상된 감도를 제공합니다. 키트에는 형광 표지된 시알산 시료를 약 5시간 내에 전처리하는 데 필요한 모든 시약이 포함되어 있습니다. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼과 함께 LC/FLD 또는 LC/MS를 통해 시알산의 프로파일링 및 정량을 빠르고 쉽게 수행할 수 있습니다.

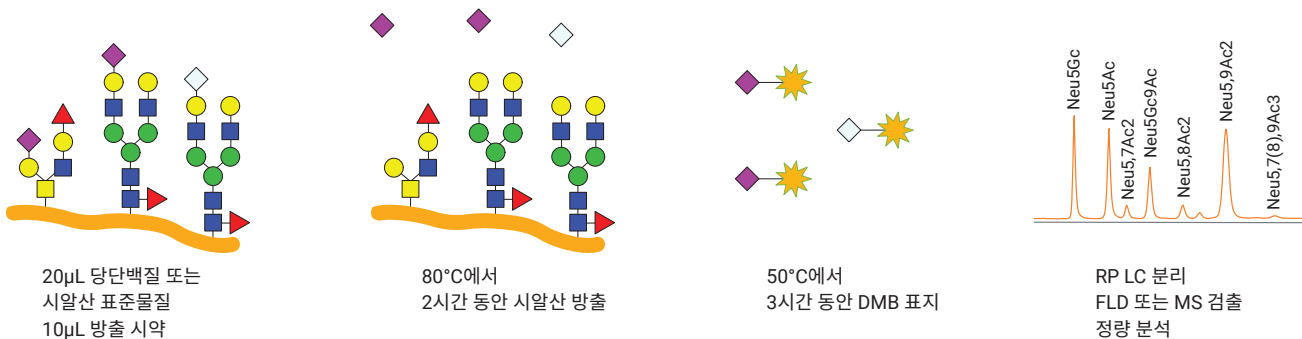


그림 1. FLD 또는 MS를 이용한 분리 및 검출에 따른 시알산 유리 및 DMB 표지 워크플로.

애질런트에서 설계 및 생산한 연속적 시알산 분석 솔루션

이 안내서에서는 시알산 분석을 시작하기 위해 필요한 소모품에 대해 알려드립니다. 이러한 소모품의 대부분은 리툽시맙 (Rituximab)(리툽산(Rituxan), mAb의 단일 클론 항체), 에타너셉트(Etanercept)(엔브렐(Enbrel), Fc 융합 단백질), 세툽시맙(Cetuximab)(얼비툽스(Erbitux), 단일 클론 항체) 및 NISTmAb에 존재하는 시알산을 평가하는 데 사용되었습니다.² 간소화된 워크플로는 LC/FLD 및 LC/MS에 의한 프로파일링 및 정량 분석을 모두 다루는 Neu5Ac 및 Neu5Gc의 절대적 및 상대적 정량을 모두 수행하는 분석법을 제공합니다.

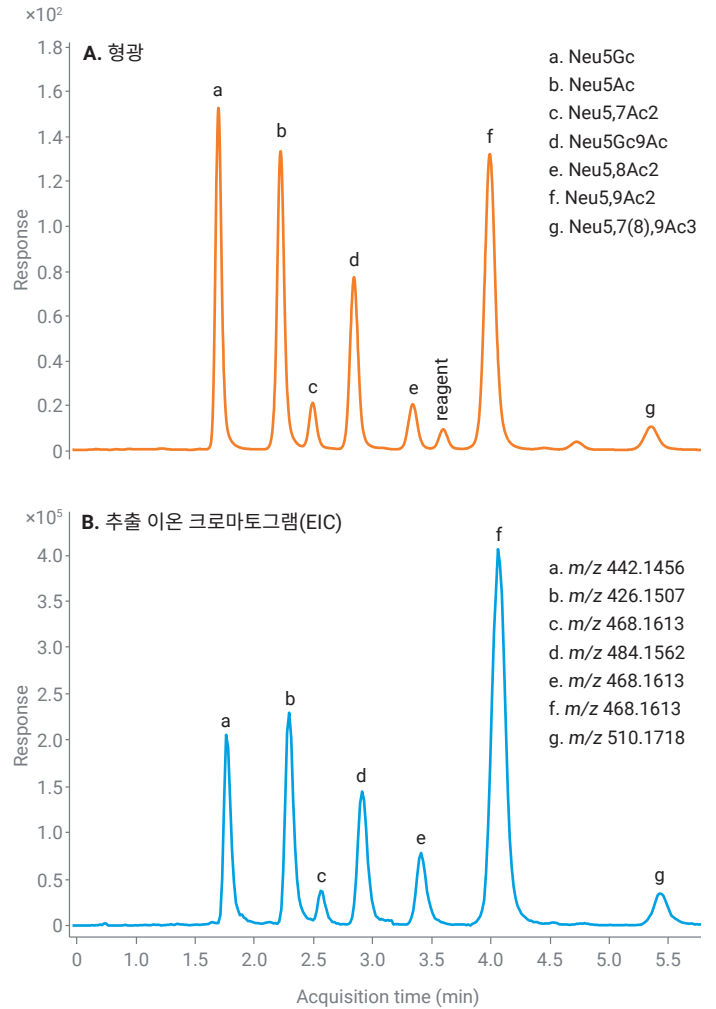
AdvanceBio 시알산 분석 워크플로 가이드는 다음과 같은 주문 정보를 제공합니다.

- AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 시료 전처리 키트. 키트에는 정성 시알산 참조 패널과 정량 NANA 및 NGNA 표준물질뿐만 아니라 시알산을 release하고 표지하는 데 필요한 시약들이 포함되어 있습니다
- 역상 액체 크로마토그래피(RPLC)를 통한 클리칸 분리용 액체 크로마토그래피 컬럼
- 용매 및 시약
- 바이알 및 캡

시알산 분석의 생산성을 향상시키는 성능:

- 5시간 내에 LC/FLD 또는 LC/MS 분석을 위한 시료 준비 완료
- 96-well 플레이트 포맷 자동화
- 유리 앰플 없는 전체 스크루 캡 용기
- 시료 주입 전 시료 건조 불필요
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼을 사용하여 10분 만에 RPLC에 의한 시알산 분리 실현
- 잘 알려진 DMB(1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene) 염료

시알산 참조 패널 내에 시알산에 대한 LC/FLD 및 LC/MS(EIC) 데이터 예시 포함. LC 및 MS 파라미터와 바이오의약품에서의 시알산 분석 예시를 포함한 자세한 내용은 참고문헌 2를 참조하세요.



	평균 상대 % 면적	표준 편차	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67

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

표 1: Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 조건.

파라미터	값				
기기	Agilent 1290 Infinity II LC 시스템				
컬럼	Agilent InfinityLab PoroShell 120EC-318, 2.1 x 7.5mm, 2.7µm(p/n 697775-902)				
컬럼 온도	30°C				
이동상	A) 메탄올:아세토니트릴:물(4:8:88) B) acetonitrile				
그라디언트 프로그램	시간 (분)	%A	%B	유속 (mL/분)	
	0.00	100	0	0.4	등용매
	6.00	100	0	0.4	용리
	6.25	20	80	0.4	
	7.30	20	80	0.4	세척
	7.50	100	0	0.4	재평형화
10.00	100	0	0.4		
주입량	10µL				
검출	Agilent 1250 Infinity II FLD λ _{EX} 373nm λ _{EM} 448nm				

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	1,400V
노즐 전압	1,800V
Fragmentor	120V
스키머	65V
질량 범위(MS)	m/z 400~1,000
질량 범위(MS/MS)	m/z 100~500
수집 모드	고분해능(4GHz)

AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트 시작하기³

시알산 시료에 대한 고려사항

- 이 키트로 측정 가능한 시료에는 당단백질, 글리코 펩타이드, 당지질, 폴리시알산, 혈청, 혈장, 조직, 또는 전체 세포가 포함됩니다
- well당 1~2,000pmol 농도의 시알산을 측정할 수 있습니다. 신호가 범위 내에 들어오도록 시료 농도를 조정해야 할 수도 있습니다
- 시료는 건조시킨 후 적은 양의 탈이온수에 재현탁하여 농축할 수 있습니다. 시료는 분석 well에서 직접 건조하거나 별도의 튜브에서 전처리할 수 있습니다

인큐베이션 하드웨어

AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트(GS24-SAP)를 사용하여 시료를 전처리하는 동안 산 방출 단계에서 시료를 80°C 까지 가열하고 50°C에서 DMB로 표지합니다. 제공된 96-well 플레이트에서 시료를 가열하기 위해 열 순환기 또는 두 개의 독립적인 드라이 블록 히터 사용을 권장합니다. 이에 대한 제안은 아래와 같습니다.

인큐베이션 하드웨어(타사 제품)	부품 번호
50°C 및 80°C 설정값 설정이 가능한 96-well 열 순환기	다양함
드라이 블록 히터, 4 블록(2개)(Troemner)	HB4DG
모듈형 가열 블록(2개)(VWR)	13259-260

데이터 분석 및 보고서 작성

데이터는 Agilent OpenLab CDS 2.3 및 MassHunter Qualitative Analysis 10.0 소프트웨어로 분석했습니다. Neu5Gc 및 Neu5Ac는 검량선을 사용해 정량했습니다.

주의: 애질런트는 현재 21 CFR Part 11을 준수하는 OpenLab ECM XT 데이터 분석 소프트웨어가 내장된 MassHunter 11을 제공합니다.

참고 문헌

1. 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.
2. 바이오의약품 중 시알산 프로파일링 및 정량을 위한 향상된 워크플로 5994-2352KO, 2020.
3. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit, User Manual, 5994-2800EN.

간편한 선택 및 주문 정보

애질런트 온라인 스토어에서 다음 표에 나열된 품목을 주문하려면 헤더의 MyList 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하세요. 그 후 필요한 제품의 수량을 기입하고 장바구니에 추가한 후 결제를 진행하세요. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다.

즐거찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있는 경우 바로 로그인할 수 있습니다. 등록된 애질런트 계정이 없는 경우 등록해 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다. 모든 품목은 각각의 부품 번호를 클릭하거나 영업 담당자 및 대리점 채널을 통해 온라인으로 주문할 수도 있습니다.

AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 소모품 MyList

설명	부품 번호
시료 전처리	
AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트, 24ct	GS24-SAP
컬럼	
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 75mm, 2.7µm, narrow bore	697775-902
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 5mm, 2.7µm, 가드 컬럼, 3/pk	821725-911
표준 용액	
Bovine Fetuin, Heat-treated (0.4mg) ^{†*}	WS0021
Agilent-NISTmAb, 1 x 25µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25µL	5191-5745
바이알, 캡 및 시약	
Vial, screw style, 2 mL, polypropylene, certified for use in PFAS-related applications, 100/pk [‡]	5191-8150
Vial insert, 300 µL, polypropylene, polymer feet, 100/pk [‡]	5182-0549
9 mm, screw style clear polypropylene cap, 100/pk [‡]	5191-8151
InfinityLab ultrapure LC/MS acetonitrile(1L)	5191-4496
InfinityLab ultrapure LC/MS water(1L)	5191-4498
InfinityLab ultrapure LC/MS methanol(1L)	5190-6896

추가 공급품

설명	부품 번호
마이크로플레이트 밀봉 장치용 옵션 항목 MyList**	
Peelable aluminum plate seal	24210-001
Filter microplate, 96-well, polypropylene with 0.45 µm polyvinylidene fluoride membrane, 300L/well, 50/pk	200981-100
컬럼 피팅 및 커넥터 MyList	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting (컬럼 주입구 연결용)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect Capillary MP35N 0.12 x 105mm(Quick Connect 피팅용)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (컬럼 배출구 연결용)	5067-5966
Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 280mm (Quick Turn 피팅용)	5500-1596
Quick Turn 피팅용 장착 도구	5043-0915
용매 여과 공급품 MyList**	
InfinityLab 용매 여과 어셈블리	5191-6776
InfinityLab solvent filtration flask, glass, 2L	5191-6781
Filter membrane, Nylon 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4341
Filter membrane, Regenerated Cellulose 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
용매 처리 공급품 MyList	
InfinityLab Stay Safe cap starter kit	5043-1222
InfinityLab solvent bottle, clear, 1L	9301-6524
InfinityLab solvent bottle, amber, 1L	9301-6526
Solvent bottle, clear, 2L	9301-6342
Solvent bottle, amber, 2L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe Purging Bottle	5043-1339
InfinityLab waste can, GL45, 6L Stay Safe cap (Charcoal 필터 5043-1193 미포함)	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g (5043-1221와 함께 사용)	5043-1193

[†] 온라인 판매용이 아닙니다. 주문 정보는 애질런트 담당자에게 문의해 주세요.

^{*} Agilent PlateLoc 마이크로플레이트 열 밀봉 장치에 대한 자세한 내용은 [여기를](#) 클릭하세요.

^{**} 표에 나열된 용매가 아닌 다른 용매를 사용하실 경우, 분석 전 InfinityLab 용매 여과 어셈블리를 사용하세요.

[‡] 무효 부피 최소화를 위해 250µL 바이알 인서트와 2mL 폴리프로필렌 바이알을 함께 사용하는 것을 권장합니다.

DE44509.431087963

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 12월 04일, 한국에서 인쇄
5994-4201KO

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