

Application News

No.SSK-LCMS-2003

LC-MS/MS

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

EZGlyco™ 키트와 액체크로마토그래피 형광검출기 및 Q-TOF 질량분석기를 이용한 N-glycan, O-glycan의 분석

(N-glycan and O-glycan profiling analysis with EZGlyco™ kit using fluorescence detection and Q-TOF mass spectrometry)

바이오의약품이란 유전자재조합기술과 세포배양기술 등 새로운 생물공학 방식을 이용해 사람이나 다른 생물체에서 유래된 단백질과 호르몬을 원료 및 재료로 하여 만든 의약품으로써, 일반적으로 합성의약품에 비해 크기가 크고 복잡한 구조를 가지며 주변 환경 변화에 민감한 특징을 가지고 있다. 또, 생물 유래 물질을 이용하여 의약품을 제조하기 때문에 고유 독성이 낮고 작용기전이 명확하여 퇴행성·난치성 질환의 치료제 및 환자 맞춤형 표적 치료제로 많이 사용되고 있다. 이렇게 사용되는 바이오의약품은 단백질의 활성이나 체내 동태 등에 영향을 미치기 때문에 당사질의 구조 분석이 중요한 부분을 차지하고 있으며, 품질관리를 위해 안정성 및 유효성 평가가 필요하다.

이 뉴스레터에서는 시마즈 고성능 액체크로마토그래피(UHPLC) 형광검출기(Fluorescence detector) 및 Q-TOF 질량분석기(Quadrupole time-of-flight mass spectrometer)를 이용하여 당단백질의 N-당사슬(이하, N-glycan)과 O-당사슬(이하, O-glycan)의 구조 특성 분석법을 소개하고자 한다.

시료는 바이오시밀러(Biosimilar)인 트라스투주맙(Trastuzumab)의 N-glycan과 페투인(Fetuin)의 O-glycan을 대상으로 하였으며, 전처리에는 S-bio사의 EZGlyco™ 전처리키트를 사용하였다.



그림 1. LCMS-9030 (Quadrupole time-of-flight mass spectrometer) system

■ Glycan전처리 방법

N-glycan분석을 위한 트라스투주맙(Trastuzumab) 및 O-Glycan 분석을 위한 페투인(Fetuin)의 전처리는 각각 S-bio사의 EZGlyco™ mAb-N Kit with 2-AB와 EZGlyco™ O-Glycan Prep Kit를 사용하였다. 전처리는 <그림 2>, <그림 3>과 같으며, 전처리 시간은 N-glycan의 경우, 약 2.5 시간, O-glycan의 경우, 약 5시간 정도 소요되었다.

Protocol : 1. Deglycosylation



Protocol : 2. 2-AB Labeling

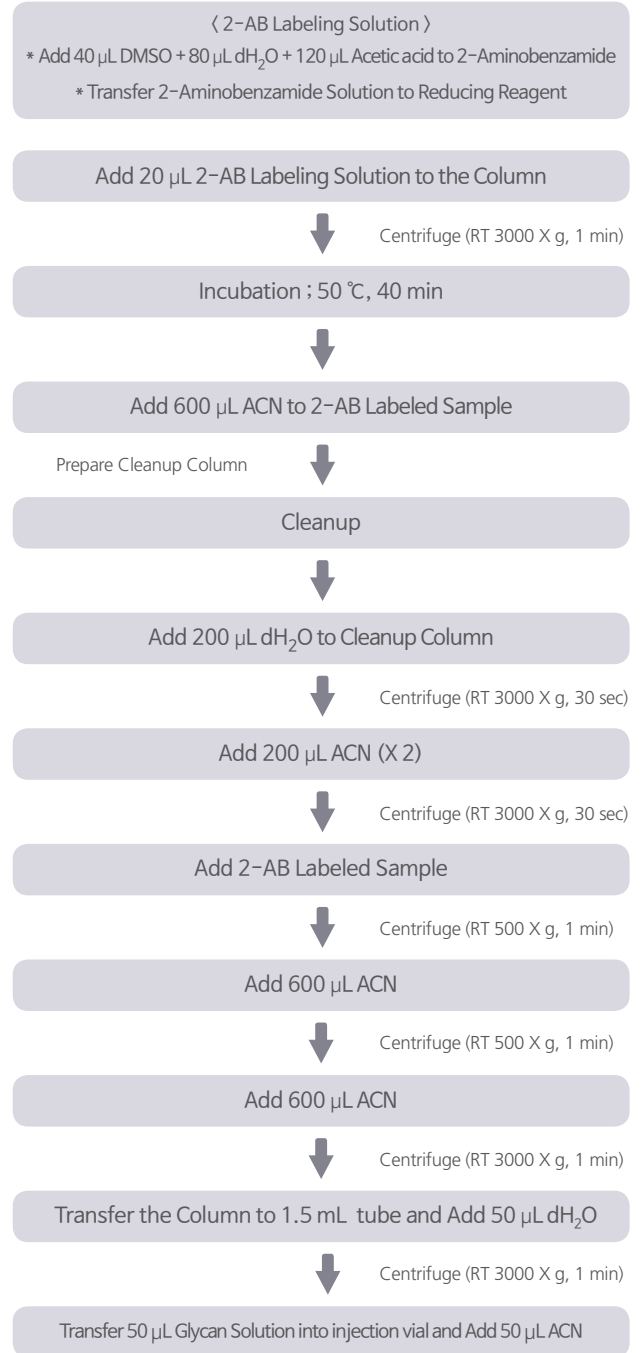


그림 2. EZGlyco™ mAb-N Kit with 2-AB 전처리 방법

Protocol : 1. Deglycosylation



Protocol : 2. 2-AB Labeling

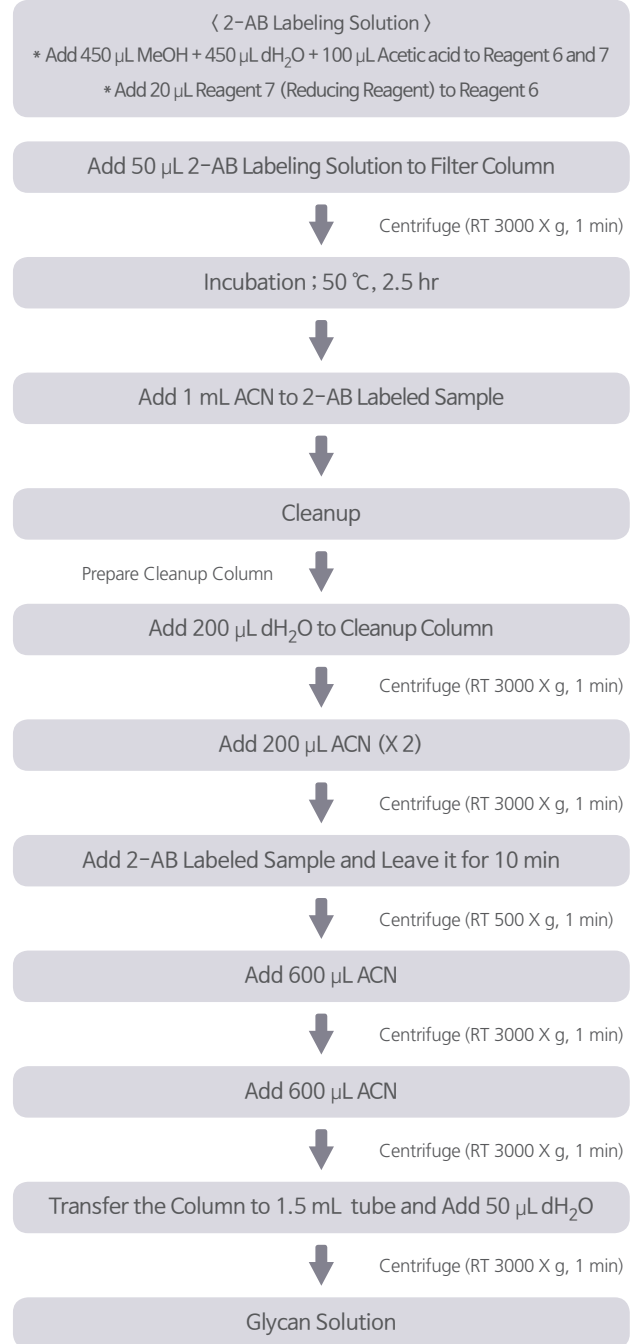


그림 3. EZGlyco™ O-Glycan Prep Kit 전처리 방법

■ UHPLC-RF-Q-TOF 시스템 구성 및 분석조건

N-glycan과 O-glycan의 분석을 위한 액체크로마토그래프-형광검출기 및 Q-TOF 질량분석기의 세부 분석 조건은 아래 <표 1>, <표 2>와 같다.

표 1. N-glycan 분석을 위한 UHPLC-RF-Q-TOF 분석조건

LC conditions	Nexera X2
Flow	0.4 mL/min (0.25 mL/min, 39.41-46.50 min)
Mobile phase A	50 mM Ammonium formate in water (pH 4.6)
Mobile phase B	Acetonitrile
Gradient	78 % B (0- 1 min) - 55.9 % B (38.50 min) – 0 % B (39.50-44.50 min)- 78 % B (46.50- 50.00 min)
Column	HILIC-Amide column
Column oven	40 °C
Injection volume	10 µL
Fluorescence detector	Excitation 330 nm, Emission 420 nm
MS conditions	LCMS-9030 (Q-TOF)
Ionization	ESI, positive
Nebulizing gas	N ₂ , 3 L/min
Heating gas	Zero air, 10 L/min
Interface temp.	300 °C
DL temp.	250 °C
Heat block temp.	400 °C
Drying gas	N ₂ , 10 L/min
Data acquisition	MS Scan mode (m/z 500 -2500) MS/MS scan mode (m/z 100 -2500), CE 50 ± 17 V

표 2. O-glycan 분석을 위한 UHPLC-RF-Q-TOF 분석조건

LC system	Nexera X2
Flow	0.25 mL/min
Mobile phase A	50 mM Ammonium formate in water (pH 4.6)
Mobile phase B	Acetonitrile
Gradient	85 % B (0- 5 min) - 50 % B (20-25 min) – 85 % B (25.01-35 min)
Column	HILIC-Amide column
Column oven	45 °C
Injection volume	1 µL
Fluorescence detector	Excitation 330 nm, Emission 420 nm
MS conditions	LCMS-9030 (Q-TOF)
Ionization	ESI, positive
Nebulizing gas	N ₂ , 3 L/min
Heating gas	Zero air, 10 L/min
Interface temp.	300 °C
DL temp.	250 °C
Heat block temp.	400 °C
Drying gas	N ₂ , 10 L/min
Data acquisition	MS Scan mode (m/z 300 -2000) MS/MS scan (m/z 100 -2000), CE 35 ± 17 V MS/MS scan (m/z 100 -2000), CE 50 ± 17 V (for precursor m/z 1451.5418)

■ N-glycan profiling 분석 결과

1-1. UHPLC-RF를 이용한 N-glycan 분석

트라스투주맙(Trastuzumab)으로부터 얻은 2-AB표지가 된 N-glycan을 형광검출기를 이용하여 3번 반복 분석한 크로마토그램을 (그림 4)에 나타내었으며, 재현성 평가 결과는 (표 3)에서 보는 것과 같이 머무름 시간은 RSD 0.1 % 이하, 피크 면적은 RSD 5 % 이하로 나타났다.

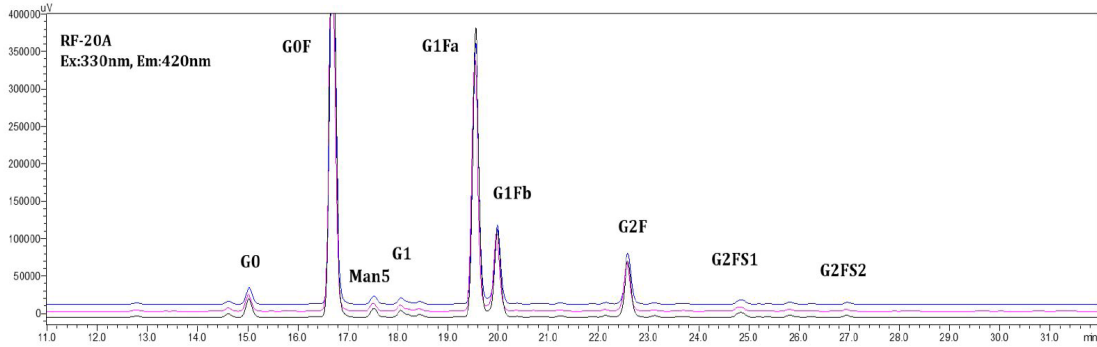


그림 4. 2-AB표지가 된 N-glycan의 UHPLC-RF 재현성 크로마토그램 (n=3)

표 3. 2-AB표지가 된 N-glycan의 피크별 재현성 평가 (n=3)

2-AB labeled N-glycan	Retention time (min) %RSD	Peak area %RSD
2AB-G0	0.047	3.8
2AB-G0F	0.052	3.9
2AB-Man5	0.049	3.9
2AB-G1	0.052	4.2
2AB-G1Fa	0.052	4.2
2AB-G1Fb	0.051	4.0
2AB-G2F	0.046	4.4
2AB-G2FS1	0.050	4.6
2AB-G2FS2	0.064	5.4

1-2. UHPLC-Q-TOF를 이용한 N-glycan 분석

분자량 확인을 위해 트라스투주맙(Trastuzumab)으로부터 2-AB 표지가 된 9개(G0, G0F, Man5, G1, G1Fa, G1Fb, G2F, G2FS1, G2FS2)의 N-glycan을 UHPLC-Q-TOF를 이용하여 분석하였다. (그림 5)에 Q-TOF 크로마토그램(아래)과 형광검출기 크로마토그램(위)에 N-glycan 구조를 나타내었으며, 분석한 각 성분에 대한 질량 대 전하비(mass-to-charge ratio: m/z)의 이론적인 값과 비교하여 평가한 질량 정확도(mass accuracy)를 (표 4)에 나타내었다.

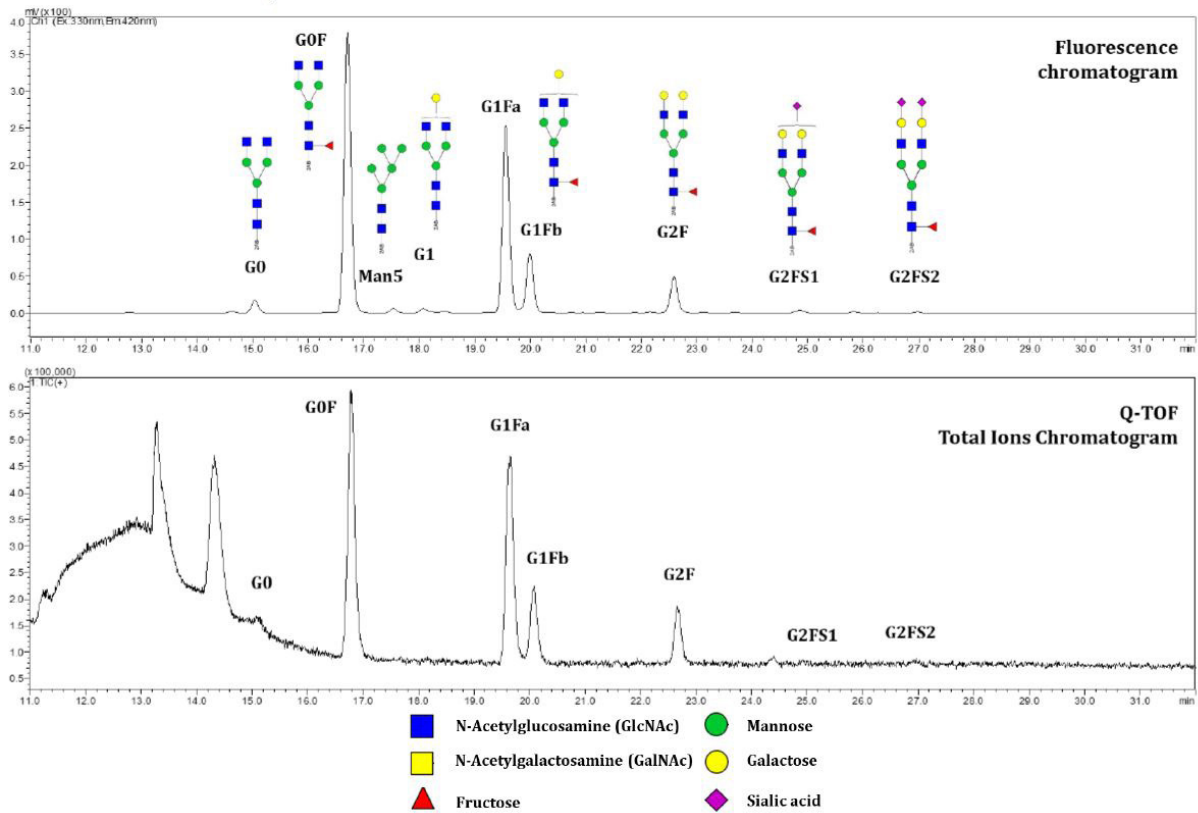


그림 5. 2-AB 표지가 된 N-glycan의 크로마토그램 (위 : 형광검출기, 아래 : Q-TOF 질량분석기)

표 4. 각 성분별 질량 정확도 (Mass accuracy)

2-AB labeled N-glycan	Theoretical mass		Observed mass		Mass error (ppm)	
	$[M+2H]^{2+}$	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+H]^+$
2AB-G0	719.2849	1437.5626	719.2856	1437.5671	0.9	3.1
2AB-G0F	792.3139	1583.6205	792.3150	1583.6253	1.4	3.1
2AB-Man5	678.2584	1355.5095	-	1355.5107	-	0.9
2AB-G1	800.3113	1599.6154	800.3122	1599.6163	1.1	0.6
2AB-G1Fa	873.3403	1745.6733	873.3415	1745.6781	1.4	2.8
2AB-G1Fb	873.3403	1745.6733	873.3417	1745.6788	1.6	3.2
2AB-G2F	954.3667	1907.7261	954.3684	1907.7322	1.8	3.2
2AB-G2FS1	1099.9144	2198.8215	1099.9163	-	1.7	-
2AB-G2FS2	1245.4621	2489.9169	1245.4648	-	2.1	-

〈그림 6〉은 2-AB 표지가 된 N-glycan 3개 성분(G0F, G1Fa/b, G2F)에 대한 MS/MS spectra와 구조를 나타낸 것이다.

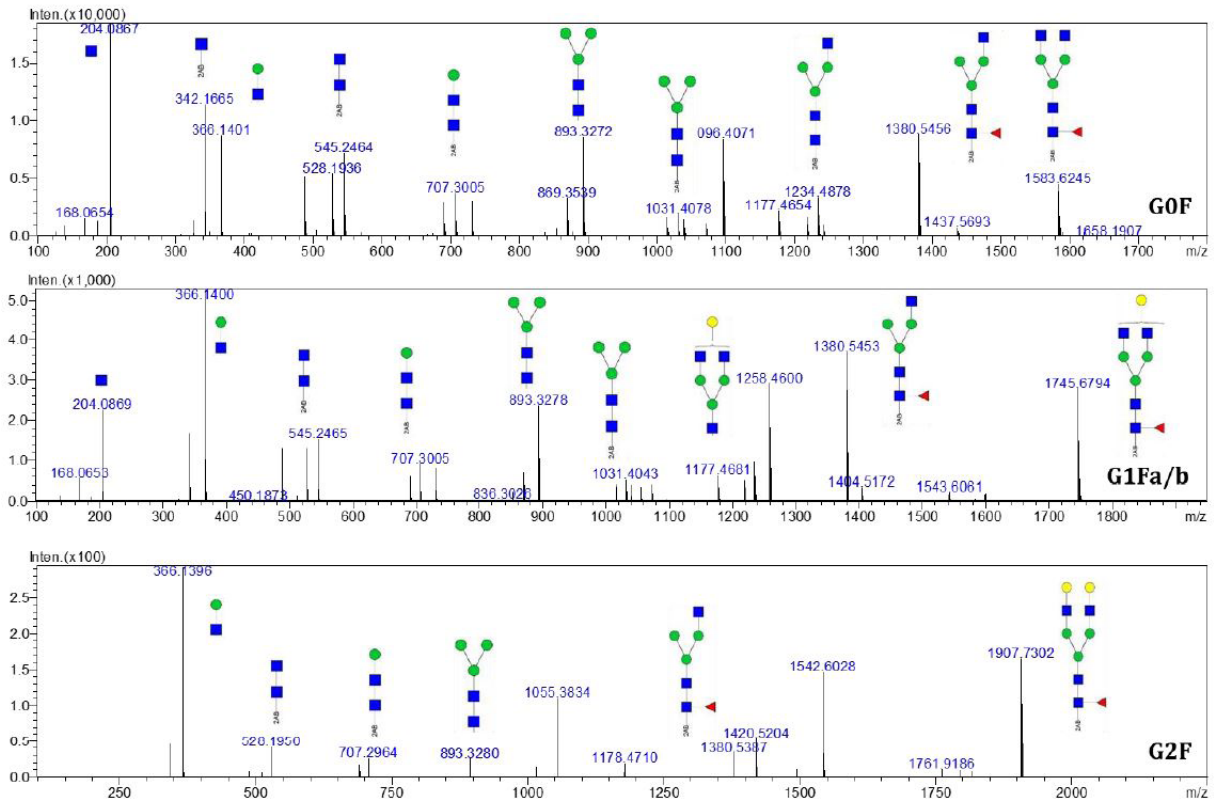


그림 6. 2-AB 표지가 된 N-glycan의 MS/MS spectra

1-3. N-glycan의 상대 정량 결과

〈그림 7〉은 트라스투주맙(Trastuzumab)에서의 N-glycan 상대량을 나타낸 것으로 G0F가 47 %로 가장 많은 양을 차지하였으며, G2Fa는 32 %, G2Fb는 10 %, G2F는 7 % 순으로 4종이 N-glycan 전체의 약 95 %를 차지하고 있는 것으로 나타났다.

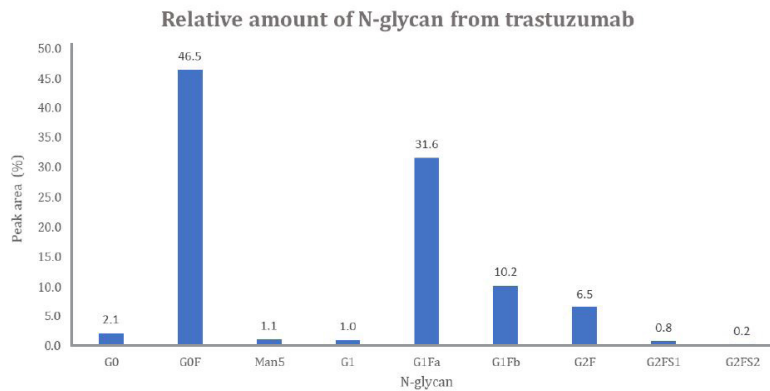


그림 7. 트라스투주맙(Trastuzumab)에서의 N-glycan 상대량

■ O-glycan profiling 분석 결과

2-1. UHPLC-RF를 이용한 O-glycan 분석

페투인(Fetuin)으로부터 얻은 2-AB표지가 된 O-glycan을 형광검출기를 이용하여 3번 반복 분석한 크로마토그램을 <그림 8>에 나타내었으며, 재현성 평가 결과는 <표 5>에서 보는 것과 같이 머무름 시간은 RSD 0.1 % 이하, 피크 면적은 RSD 2 % 이하로 나타났다.

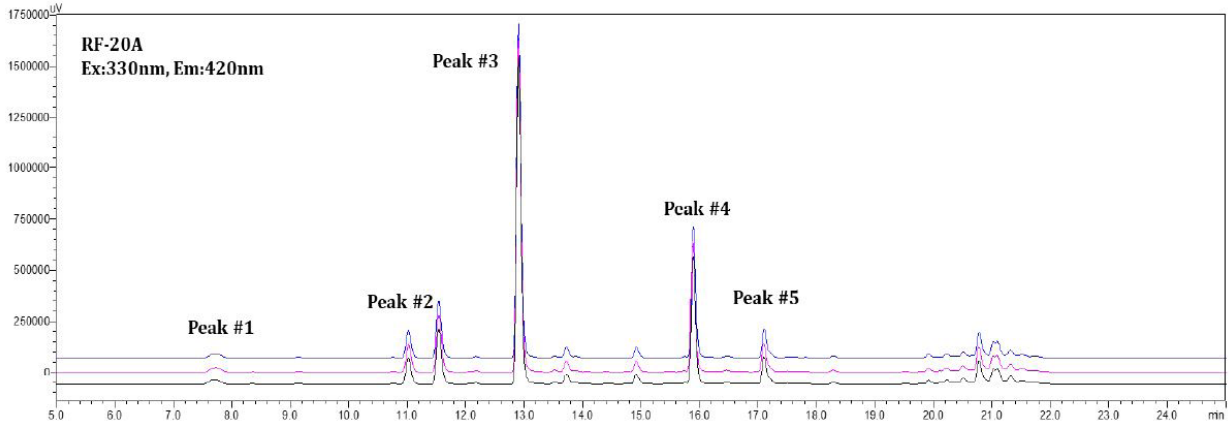


그림 8. 2-AB표지가 된 O-glycan의 UHPLC-RF 재현성 크로마토그램 (n=3)

표 5. 2-AB표지가 된 O-glycan의 피크별 재현성 평가 (n=3)

2-AB labeled O-glycan	Retention time (min) %RSD	Peak area %RSD
Peak #1 (Galβ1-3GalNAc)	0.092	1.3
Peak #2 (*'peeled glycan', Neu5Aα2-3Gal)	0.014	1.1
Peak #3 (Neu5Aα2-3Galβ1-3GalNAc)	0.004	1.2
Peak #4 (Neu5Aα2-3Galβ1-3(Neu5Aα2-6)GalNAc)	0.030	1.0
Peak #5 (Neu5Aα2-3Galβ1-3(Neu5Aα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc)	0.024	1.4

* Loss of terminal GalNAc during O-glycan release

2-2. LC-Q-TOF를 이용한 O-glycan 분석

페투인(Fetuin)으로부터 2-AB 표지가 된 5 개의 O-glycan을 UHPLC-Q-TOF를 이용하여 분석하였다. <그림 9>에 Q-TOF 크로마토그램(아래)과 O-glycan 구조를 형광검출기 크로마토그램(위)에 나타내었으며, 분석한 각 성분에 대한 질량 대 전하비(mass-to-charge ratio: m/z)의 이론적인 값과 비교하여 평가한 질량 정확도(mass accuracy)를 <표 6>에 나타내었다.

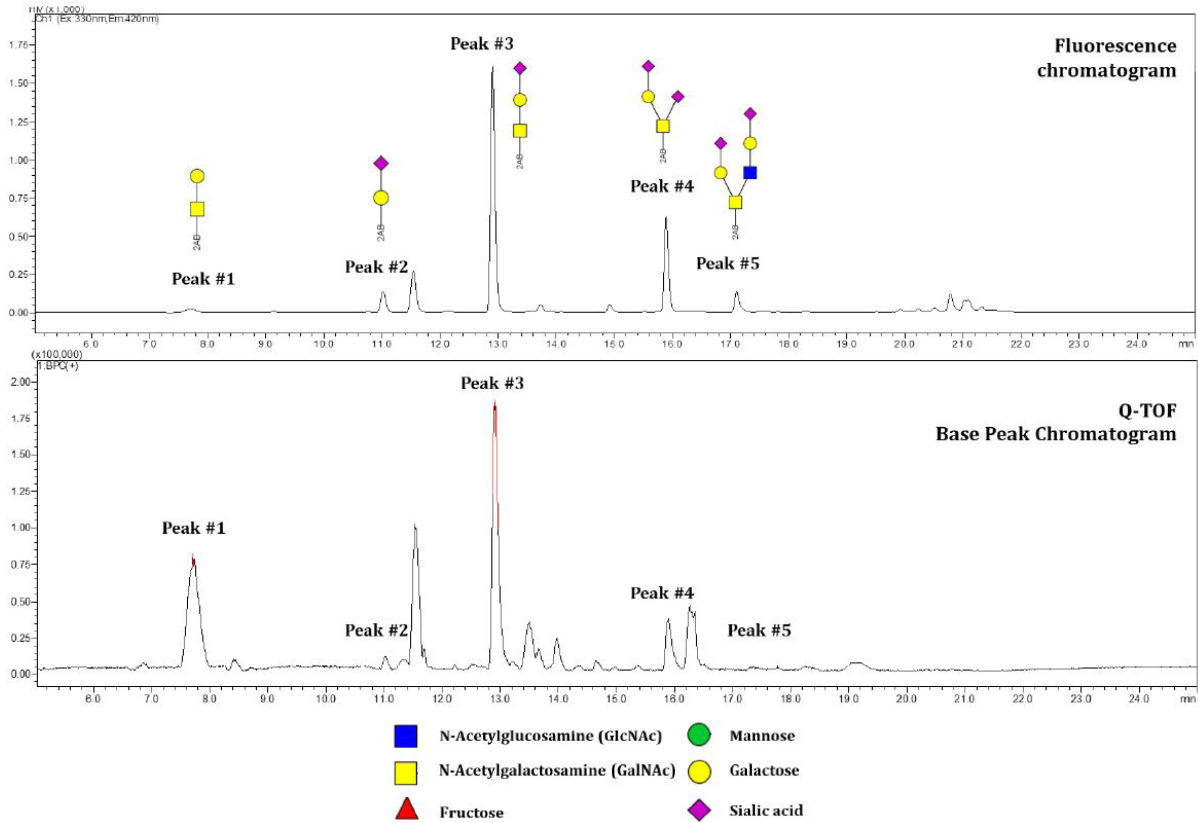


그림 9. 2-AB 표지가 된 O-glycan의 크로마토그램 (위 : 형광검출기, 아래 : Q-TOF 질량분석기)

표 6. LCMS-9030의 질량 정확도 (Mass accuracy)

2-AB labeled O-glycan	Theoretical mass	Observed mass	Mass error (ppm)
	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
Peak #1 (Galβ1-3GalNAc)	504.2188	504.2181	-1.3
Peak #2 (‘peeled glycan’*, Neu5Acα2-3Gal)	592.2348	592.2348	-0.8
Peak #3 (Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc)	795.3142	795.3137	-0.7
Peak #4 (Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAc)	1086.4096	1086.4092	-0.3
Peak #5 (Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc)	1451.5418	1451.5420	0.1

* Loss of terminal GalNAc during O-glycan release

〈그림 10〉은 2-AB 표지가 된 O-glycan 5개 성분에 대한 MS/MS spectra와 구조를 나타낸 것이다.

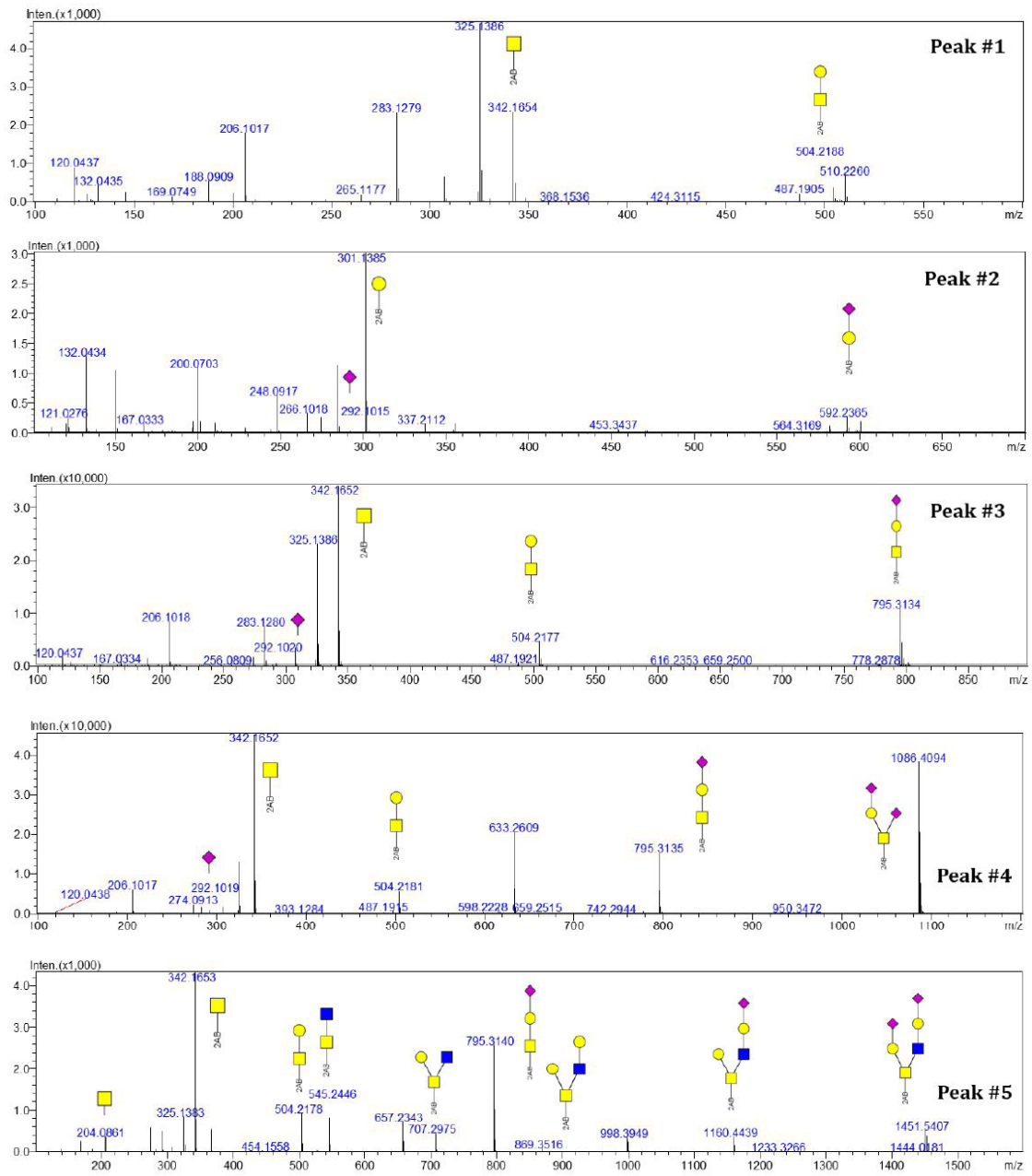


그림 10. 2-AB 표지가 된 O-glycan의 MS/MS spectra

2-3. O-glycan의 상대 정량 결과

〈그림 11〉은 페투인(Fetuin)에서의 O-glycan 상대량을 나타낸 것으로 Peak #3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc)이 52 %, Peak #4(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc)가 20 %로 이 두 성분이 전체의 70 % 이상을 차지하고 있는 것으로 나타났다.

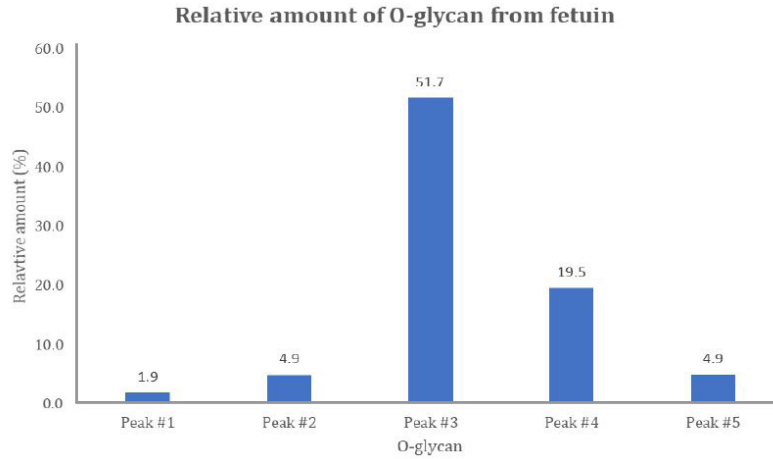


그림 11. 페투인(Fetuin)에서의 O-glycan 상대량

■ 결론

시마즈 Nexera X2와 LCMS-9030으로 구성된 UHPLC-RF-Q-TOF 시스템을 이용하여 N-glycan 및 O-glycan의 정성 분석 및 상대적 함량 분석을 수행하였다. 대상 시료는 N-glycan 분석을 위해 트라스투주맙(Trastuzumab)을 이용하였으며, O-glycan 분석을 위해 페투인(Fetuin)을 이용하였다. 또, 전처리에는 S-bio사의 EZGlyco™ 전처리 키트를 이용하여 기존 방법보다 빠르고 간편하게 수행하였다.

형광검출기 분석을 통해 N-glycan 과 O-glycan의 성분별 상대적 함량을 확인할 수 있었으며, 머무름 시간에 대한 재현성은 0.1% 이내, 피크면적에 대한 재현성은 N-glycan이 5 %, O-glycan이 2 % 수준인 것으로 나타났다. 또, Q-TOF 분석을 통해 N-glycan이 (0.6 ~ 3.2) ppm, O-glycan이 (0.1 ~ 1.3) ppm 수준의 질량 정확도를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, MS/MS spectra를 통해 glycan 구조 분석이 가능함을 확인하였다.

■ 참고 문헌

1. A Comprehensive N-Glycan Profiling Analysis of Bevacizumab Biosimilar by UHPLC with Fluorescence Detection and Q-TOF Mass Spectrometry (Yonghai Lu, Jie Xing, Zhaoqi Zhan, Application Development & Support Centre (ADSC), Shimadzu (Asia Pacific), Singapore)
2. N-glycosylation profile analysis of Trastuzumab biosimilar candidates by Normal Phase Liquid Chromatography and MALDI-TOF MS approaches. (Journal of Proteomics, April 2015)
3. S-BIO (<https://s-bio.com/>)
4. Ludger (<https://www.ludger.com/>)
5. 한국바이오의약품협회 (<http://www.kobia.kr/>)