

Application News

No. 01-00474-K

High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-9030

Q-TOF 질량분석기를 이용한 항체의 다중 전하 이온 분석

Multi-Charged Ion Analysis of Intact Antibodies Using a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer

사용자 활용 포인트

- ◆ 정확한 질량을 얻을 수 있는 LCMS-9030을 이용하여 온전한 항체의 분석을 수행 할 수 있다.
- ◆ LabSolutions Insight Explore™CSD에 설치된 ReSpect 알고리즘을 사용하면 단백질과 같은 고분자 화합물의 다중 전하 이온 분석 (charge deconvolution)이 가능하다.
- ◆ 이 워크플로우를 사용하면 단일클론 항체의 당사슬 패턴의 재구성된 스펙트럼을 검출할 수 있다.

■ 서론

최근에는 표적분자에 대한 특이성이 높고 부작용이 적은 단일클론 항체, 항체 약물 접합체 등의 항체 의약품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 화학 합성을 통해 대량생산이 가능한 저분자 의약품과 달리 항체 의약품은 동물 세포를 이용해 생산된다. 따라서 구조적 이질성을 방지하는 것이 어렵고, 항체 의약품의 연구 개발에 있어서 특성화는 필수적이다. 질량 분석법에 의한 특성화 항목에는 온전한 항체의 분자량 확인 및 글리코실화 분석이 포함된다.

이 뉴스레터에서는 사중극자 비행시간 질량분석기 LCMS-9030 (그림 1)을 이용한 단일클론 항체 약물인 Trastuzumab의 분석을 예로 소개한다. 분석 소프트웨어 LabSolutions Insight Explore CSD를 사용하여 얻은 질량 스펙트럼에 대한 다중 전하 이온 분석 (charge deconvolution) 을 하였다.



그림 1. LCMS-9030

■ 시료 준비

이 분석에서는 단백질 A 컬럼에서 정제된 Trastuzumab을 사용하였다. 컬럼 정제 후 시료를 0.1% 포름산 수용액으로 희석하여 0.5 µg/µL 농도로 조제하였다.

■ Trastuzumab 분석

HPLC 및 MS 조건은 표 1에 나타내었다. 전환 밸브를 사용하여 시료를 0-4.9분의 측정 시간에 폐액으로 버리고, 5-15분의 측정 시간에 질량 분석기로 이동시켰다.

Trastuzumab의 질량 크로마토그램은 그림 2에 나타내었으며, 머무름 시간 약 8.2분에서 피크가 검출되었다.

표 1. 분석 조건

UHPLC (Nexera™ X3 system)	
Column:	Triart Bio C4 (2.1 mm I.D. x 150 mm L., S-3 µm, 300 Å, YMC)
Mobile Phase A:	0.1 % Formic acid - Water
Mobile Phase B:	0.1 % Formic acid - Acetonitrile
Gradient Program:	B Conc. 0 % (0-5 min) - 70 % (9 min) - 95 % (9.5-10.5 min) - 0 % (10.51 -15 min)
Flow rate:	0.4 mL/min
Column Temp.:	50 °C
Injection Volume:	1 µL

MS (LCMS-9030)	
Ionization:	ESI positive
Nebulizing Gas Flow:	3.0 L/min
Drying gas Flow:	10.0 L/min
Heating gas Flow:	10.0 L/min
Interface Temp.:	300 °C
DL Temp.:	250 °C
Block Heater Temp.:	400 °C
MS Scan Range:	m/z 1000-4000

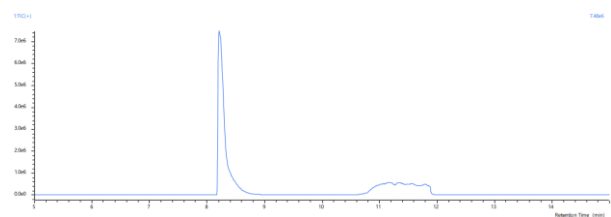


그림 2. Trastuzumab의 TIC 크로마토그램

■ 다중 전하 이온 분석

다중 전하 이온은 단백질과 같은 거대분자 화합물의 질량 스펙트럼에 분포한다. LabSolutions Insight Explore CSD에 탑재된 ReSpect 알고리즘 (Positive Probability Ltd.)은 다중 전하 이온이 분포되어 있는 질량 스펙트럼에서 각 분자의 질량을 분석할 수 있다.

그림 3은 Trastuzumab (분자량: 약 148,000)의 다중 전하 이온 분석 결과를 나타낸다. 결과는 분석할 질량 스펙트럼의 원시 데이터가 상단에 표시되고 (그림 3-A), 결과로 재구성된 영 전하 (zero charge) 스펙트럼이 그 아래에 표시된다 (그림 3-B). 재구성된 영 전하 스펙트럼에서 얻은 피크는 왼쪽 하단에 나열되며 (그림 3-C), 이 목록에서 선택한 행에 해당하는 질량 스펙트럼 피크 정보는 오른쪽 하단에 표시된다 (그림 3-D).

이 결과, 재구성된 영 전하 스펙트럼 (그림 3-B)에서 분석 전 질량 스펙트럼의 피크 패턴에 해당하는 5개의 피크가 얻어졌다 (그림 3-E, 그림 3-A의 확대한 그림).

파란색 숫자 (그림 3-B)는 fucose (평균 분자량: 146)와 galactose (평균 분자량: 162)의 피크로 간주되는 피크 간의 질량 차이를 나타낸다.

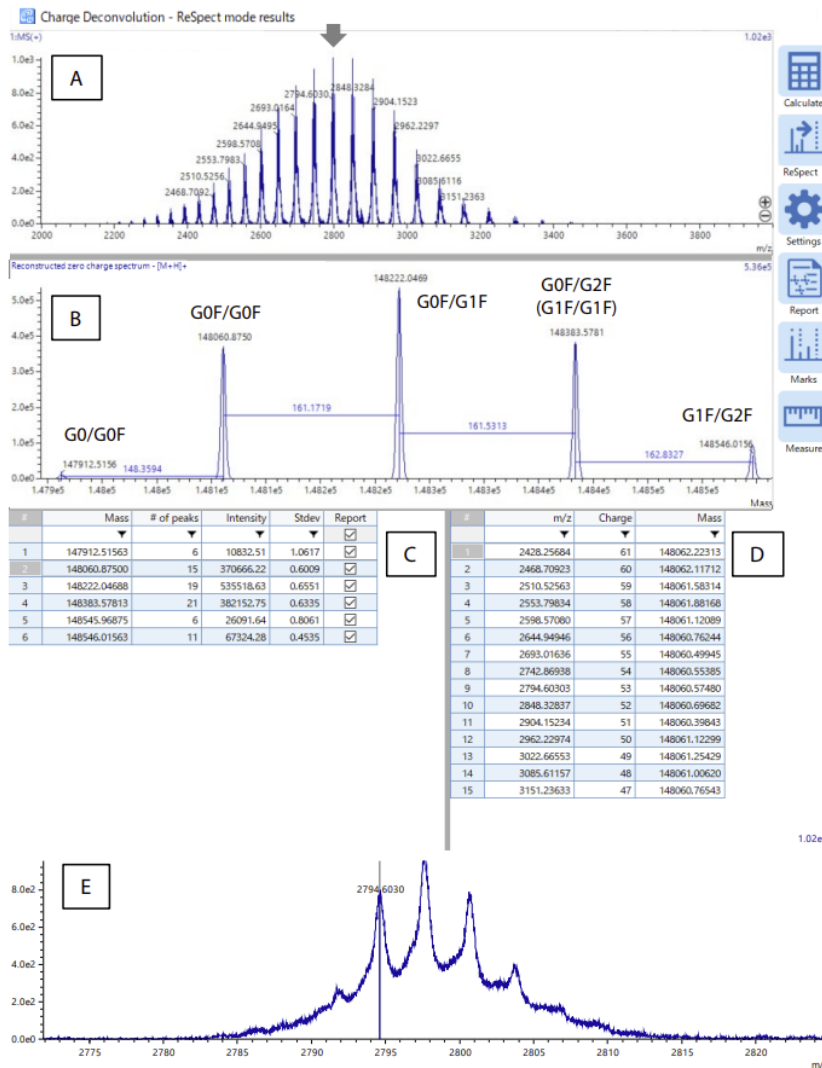


그림 3. Trastuzumab에 대한 다중 전하 이온 분석 결과
 A: 분석 전 원시 질량 스펙트럼, B: 재구성된 영 전하 스펙트럼, C: 다중 전하 이온 분석 스펙트럼 목록,
 D: 목록(C)에서 선택한 행에 해당하는 질량 스펙트럼 피크 목록, E: (A)에서 회색 화살표로 표시된 피크의 확대한 질량 스펙트럼

■ 결론

Trastuzumab의 분석은 사중극자 비행시간 질량 분석기 LCMS-9030을 이용하여 수행하였다. 재구성된 당사슬 (Glycoform) 패턴의 영 전하 스펙트럼은 LabSolutions Insight Explore CSD에 설치된 ReSpect 알고리즘에 의해 다중 전하 이온 분석의 결과로 검출할 수 있다. 이 방법은 온전한 단일클론 항체 및 항체 약물 접합체의 분석에 적용 가능하다.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Yusuke Masuo (Faculty of Pharmacy, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Japan) for generously providing us with the sample.)

