

Biopharma / LCMS-9030 (Q-TOF)

**Q-TOF 질량 분석기를 이용한 단일클론 항체(mAb)의 이황화 결합 특성 분석**  
Disulfide Bond Characterization of Monoclonal Antibody (mAb) using Q-TOF Mass Spectrometer

Yonghai Lu and Zhaoqi Zhan  
Application Development & Support Centre, Shimadzu (Asia Pacific), Singapore

■ 서론

단일클론 항체(mAb)는 광범위한 치료 및 진단 응용 분야에서 가장 빠르게 성장하는 바이오치료제 카테고리 중 하나로 떠오르고 있다. mAb의 고차 구조는 효능과 안전성에서 중요한 역할을 한다. 예를 들어, 이황화 결합의 수와 그 위치는 mAb의 핵심 품질 특성(CQA)이다. 잘못된 이황화 결합 형성으로 인해 생물학적 활성이 손실되거나 숙주로부터 면역 반응이 유발될 수도 있기 때문이다. 이 뉴스레터에서는 비환원 조건과 환원 조건의 비교 분석을 통해 mAb 바이오시밀러의 이황화 결합을 정확하게 특성화하는 LCMS 방법을 설명한다. 이 방법은 ProteaseMAX™ 계면활성제를 사용하여 단백질을 변성시키고 트립신을 사용하여 환원 및 알킬화 유무에 따라 분해한다. 펩타이드를 구배 용리하고 MS 스캔 및 MS/MS 분석을 위해 Shimadzu LCMS™-9030 Q-TOF 질량 분석기를 사용하였다.

■ 실험

A. 환원 조건

**mAb 용액:** 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액으로 bevacizumab 바이오시밀러를 5 mg/mL 농도로 용해한다.

**샘플 용액:** 샘플은 mAb 용액 20 µL을 취하여 50 mM 탄산수소암모늄 (ABC) 용액으로 5 배 희석하여 조제한다.

**변성:** ProteaseMAX™ (0.5%, w/w) 10 µL을 첨가하고 60°C에서 배양하여 mAb를 변성 시킨다.

**환원 및 알킬화:** 이황화 결합을 환원시키기 위해 디티오프레일 (DTT, 0.2 M) 10 µL을 첨가하고, 요오드아세트아미드 (IAM, 0.2 M) 30 µL을 첨가하여 알킬화를 시킨다.

**희석:** 샘플을 50 mM ABC 용액으로 최종 부피 478 µL로 희석한다.

**분해:** 시퀀싱 등급의 트립신 20 µL을 첨가하여 37°C에서 하룻밤 동안 단백질 분해를 시킨다.

**중지:** 트립신 활성을 중지하기 위해 트리플루오로아세트산 (TFA) 2 µL을 첨가한다.

**분석:** LCMS-9030 (Q-TOF)에 대한 분석 조건은 표 1과 같다.

B. 비환원 조건

비환원 조건의 과정은 환원 및 알킬화 단계가 없다는 점을 제외하면 환원 조건에서 사용된 절차와 동일하다.

표 1. LCMS-9030 (Q-TOF) 분석 조건

Column	: Shim-pack™ GISS-HP, 3 µm, 150 × 3.0 mm
Mobile phase	: (A) 0.1% FA + 0.01% TFA in water : (B) 0.1% FA + 0.01% TFA in acetonitrile
Flow rate	: 0.5 mL/min
Gradient program	: B Conc. 0% (0-2 min) → 15% (10 min) → 35% (23 min) → 45% (30 min) → 75% (35-40 min) → 0% (40.1-45 min)
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 20 µL
Interface	: Heated ESI (positive mode)
MS Mode	: MS scan
Interface voltage	: 4.5 kV
TOF mass range	: 100 – 2000 (m/z)
Heat block temp.	: 400 °C
DL temp.	: 250 °C
Interface temp.	: 300°C
Nebulizing gas	: N <sub>2</sub> , 3 L/min
Drying gas	: N <sub>2</sub> , 10 L/min
Heating gas	: Zero air, 10 L/min

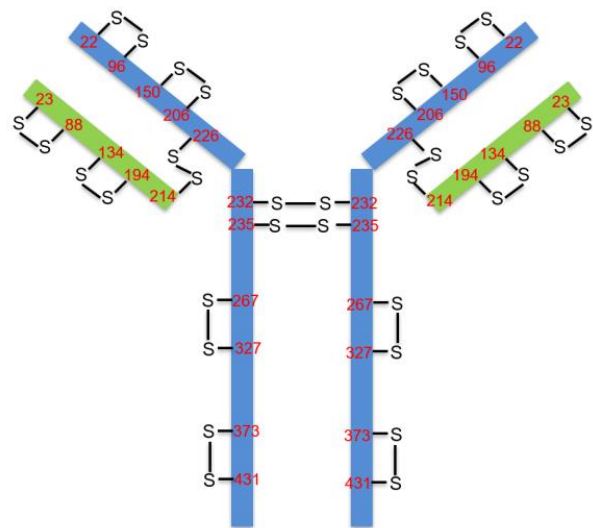


그림 1. Bevacizumab의 이황화 결합 연결 구조

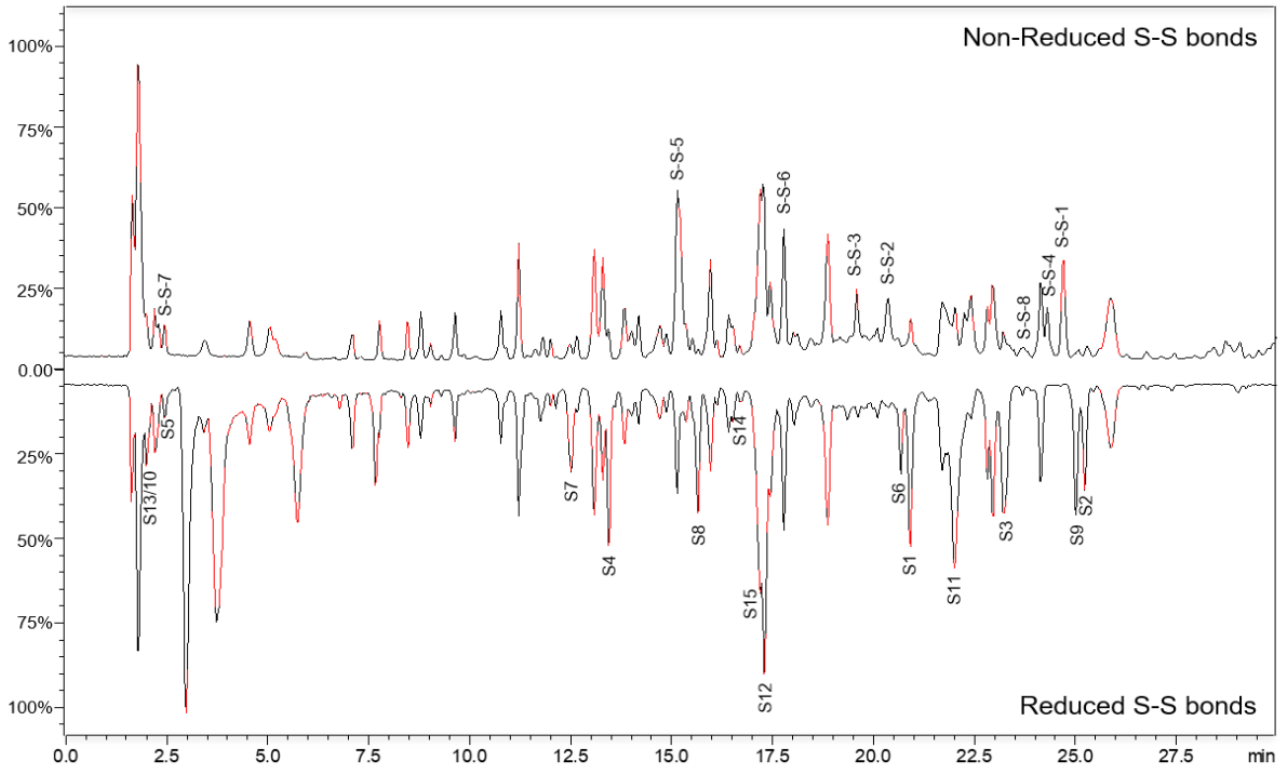


그림 2. 비환원 조건과 환원 조건에서 Bevacizumab 바이오시밀러의 이황화 결합 펩타이드의 총 이온 크로마토그램(TIC) 비교  
피크 #는 표 3과 4에 나타냄

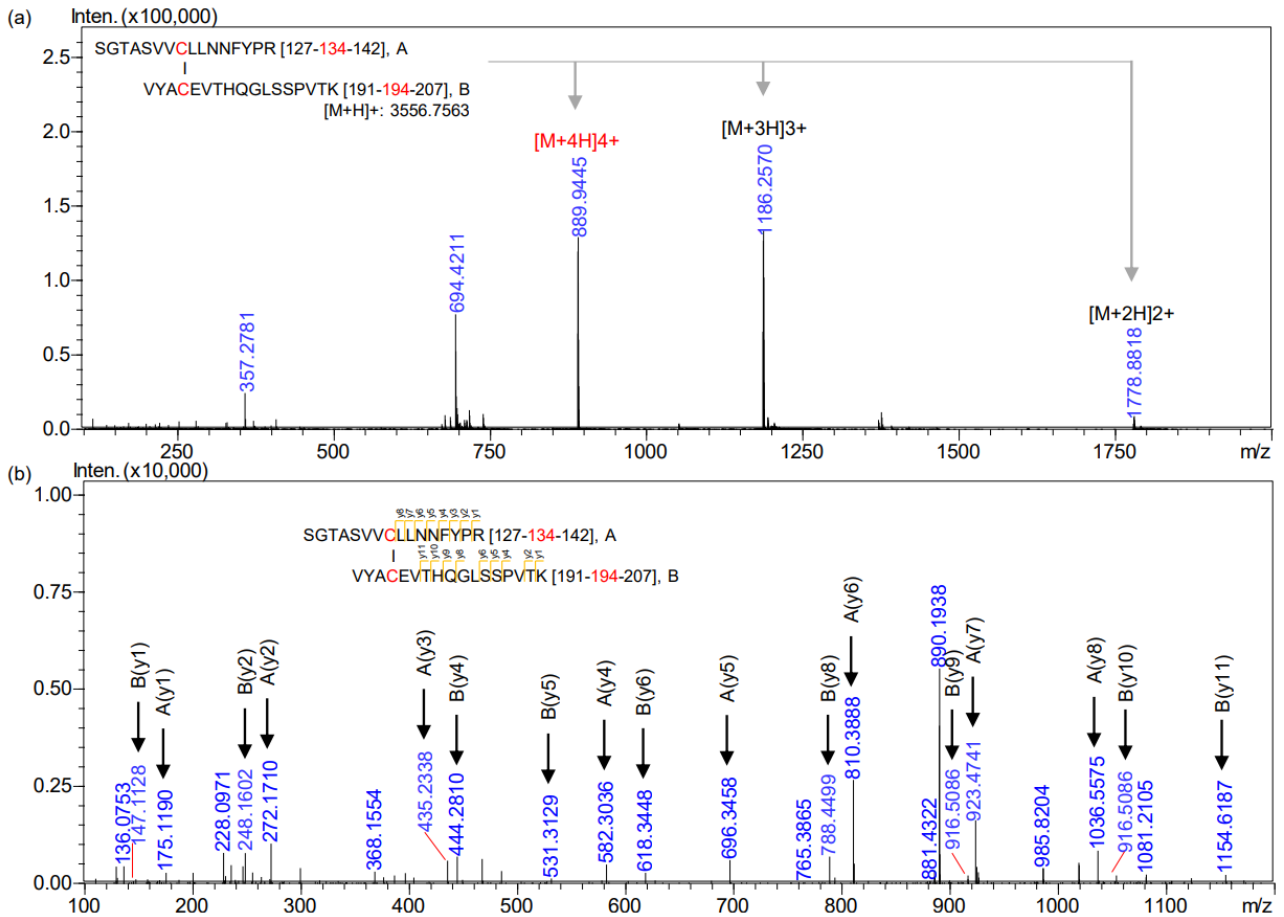


그림 3. Bevacizumab 바이오시밀러의 비환원 이황화 결합 펩타이드(S-S-2)의 MS(a) 및 MS/MS(b) 스펙트럼

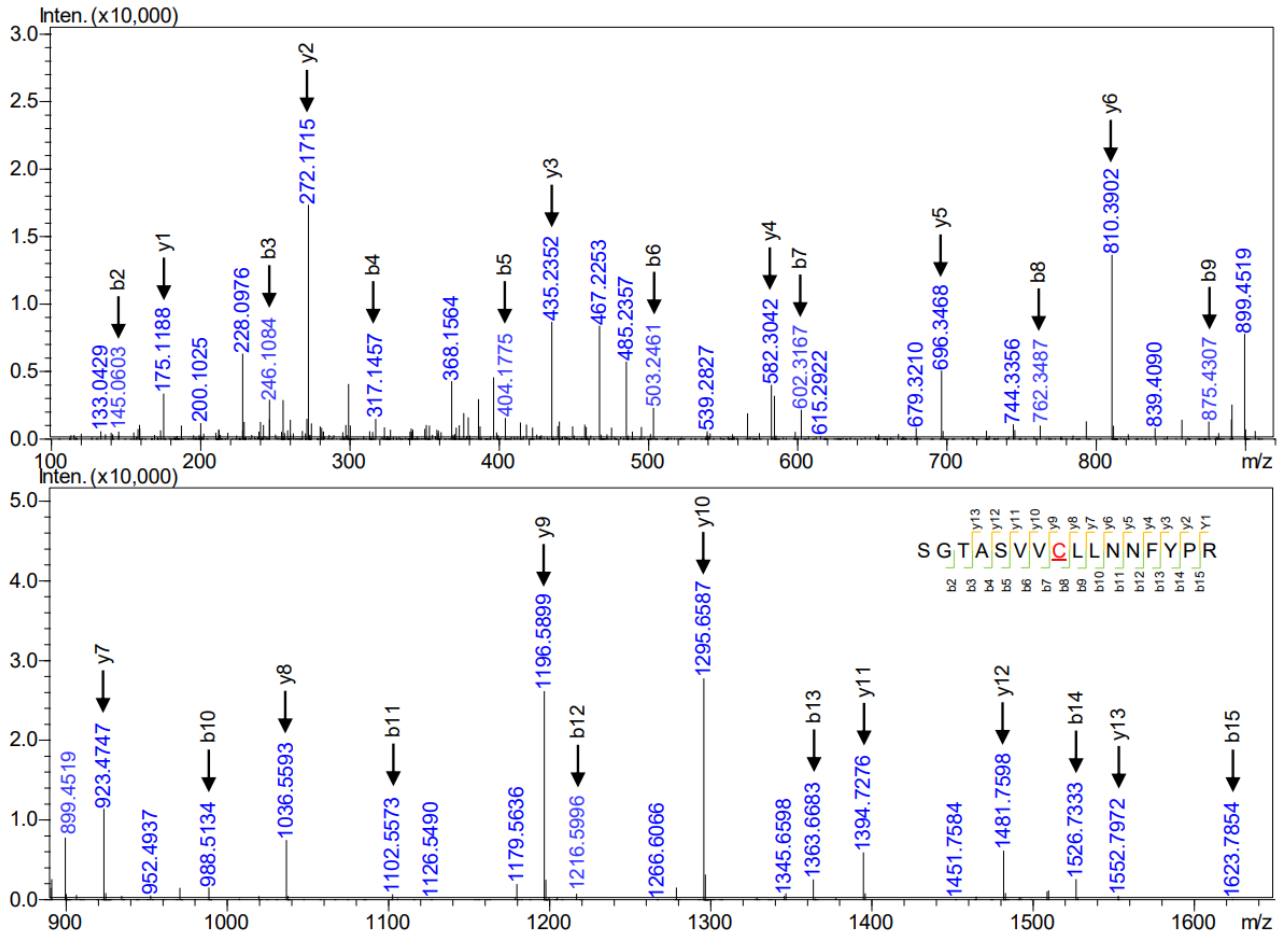


그림 4. Bevacizumab 바이오시밀러의 환원된 이황화 결합 (Cys 포함) 펩타이드(S3)의 MS/MS 스펙트럼

표 3. Bevacizumab 바이오시밀러의 비환원 이황화 결합 펩타이드의 검출

Peak No.	RT (min)	Peptide [AA numbers]	Peptide m/z	Adduct Ion
S-S-1	24.7	Light chain, [19-23-42] VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK   FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTK [62-88-103], Light chain	1469.6837	[M+5H]5+
S-S-2	20.4	SGTASVCLLNIFYPR [127-134-142], Light chain   VYACEVTHQGLSSPVTK [191-194-207], Light chain	889.9428	[M+4H]4+
S-S-3	19.6	LSCAASGYFTFTNYGMNWVR [20-22-38], Heavy chain   AEDTAVYYCAK [88-96-98], Heavy chain	1124.4967	[M+3H]3+
S-S-4	24.3	Heavy chain, [140-150-153] STSGGTAALGCLVK   DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTYYICNV NHKPSNTK [154-206-216], Heavy chain	1584.3884	[M+5H]5+
S-S-5	15.2	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK [262-267-280], Heavy chain   CK [327-328], Heavy chain	777.0393	[M+3H]3+
S-S-6	17.8	NQVSLTCLVK [367-373-376], Heavy chain   WQQGNVFSCSMHEALHNHYTQK [423-431-445], Heavy chain	962.2111	[M+4H]4+
S-S-7	2.5	GEC [212-214], Light chain   SCDK [225-226-228], Heavy chain	379.1272	[M+2H]2+
S-S-8	23.7	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK [229-232-235-254], Heavy chain   THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK [229-232-235-254], Heavy chain	1364.7007	[M+4H]4+

표 4. Bevacizumab 바이오시밀러의 환원된 이황화 결합 (Cys 포함) 펩타이드 검출

Peak No.	RT (min)	Peptide [AA numbers]	Peptide m/z	Adduct Ion
S1	20.9	R.VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK.A [19, 42] Light chain	934.4560	[M+3H] <sup>3+</sup>
S2	25.3	R.FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTK.V [62, 103] Light chain	1554.0400	[M+3H] <sup>3+</sup>
S3	23.3	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E [127, 142] Light chain	899.4510	[M+2H] <sup>2+</sup>
S4	13.6	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S [191, 207] Light chain	938.4664	[M+2H] <sup>2+</sup>
S5	2.5	R.GEC.- [212, 214] Light chain	365.1119	[M+H] <sup>+</sup>
S6	20.7	R.LSCAASGYTFTNYGMNWVR.Q [20, 38] Heavy chain	1099.4914	[M+2H] <sup>2+</sup>
S7	12.5	R.AEDTAVYYCAK.Y [88, 98] Heavy chain	645.7863	[M+2H] <sup>2+</sup>
S8	15.7	K.STSGGTAALGCLVK.D [140, 153] Heavy chain	661.3433	[M+2H] <sup>2+</sup>
S9	25.0	K.DYFPEPVTYSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTK.V [154, 216] Heavy chain	1679.0810	[M+4H] <sup>4+</sup>
S10	2.1	K.SCDK.T [225, 228] Heavy chain	509.2016	[M+H] <sup>+</sup>
S11	22.0	K.THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK.D [229, 254] Heavy chain	948.8226	[M+3H] <sup>3+</sup>
S12	17.3	R.TPEVTCVVVDVSHEDPEVK.F [262, 280] Heavy chain	713.6804	[M+3H] <sup>3+</sup>
S13	2.0	K.CK.V [327, 328] Heavy chain	307.1429	[M+H] <sup>+</sup>
S14	16.8	K.NQVSLTCLVK.G [367, 376] Heavy chain	581.3172	[M+2H] <sup>2+</sup>
S15	17.2	R.WQQGNVFSQVMHEALHNNHYTK.S [423, 445] Heavy chain	934.4253	[M+3H] <sup>3+</sup>

■ 결과 및 토의

A. Bevacizumab의 이황화 결합 연결

Bevacizumab의 일반적인 구조는 그림 1에 나타내었다. 이는 총 16개의 이황화 결합을 포함하며, 그 중 12개는 intra-chain 결합 (경쇄에 4개, 중쇄에 8개)인 반면, 나머지 4개의 이황화 결합은 inter-chain 결합이다 (두 개의 경쇄와 중쇄 연결, 힌지 영역의 두개의 중쇄 연결). 환원 시약 DTT를 사용함으로써 mAb (환원된 이황화 결합)로부터 15개의 Cys를 포함한 트립신 분해 펩타이드가 생성될 수 있었다. DTT에 의한 환원 없이, 8개의 온전한 이황화 결합이 연결된 펩타이드가 생성될 수 있었다 (비환원 이황화 결합).

B. 이황화 결합 펩타이드의 검출

환원된 시료에서는 Bevacizumab 바이오시밀러의 S-S 결합이 절단된 반면, 환원되지 않은 시료에서는 온전한 S-S 연결된 펩타이드가 남아있다. 이러한 이황화 결합 펩타이드를 확인하기 위해 환원된 샘플과 비환원된 샘플을 모두 준비하고 동일한 분석 조건에서 LCMS-9030(Q-TOF)으로 분석하였다.

그림 2는 비환원 시료와 환원 시료 모두의 총 이온 크로마토그램 (TIC)을 보여준다. 거울 플롯은 두 샘플 사이의 서로 다른 주요 피크를 명확하게 나타낸다. 환원된 샘플과 비교하여, 비환원 샘플에서는 용리 시간이 더 긴 여러 개의 큰 펩타이드 분자가 측정되었다. Skyline s/w를 사용하여 트립신 처리된 이황화 결합 펩타이드의 이론적 질량을 비교한 결과, Bevacizumab 바이오시밀러의 8개의 온전한 S-S 연결된 펩타이드 (S-S-1/8)와 15개의 Cys를 포함한 펩타이드 (S1/15)는 LCMS-9030 (Q-TOF)을 이용하여 3ppm 미만의 질량 오류로 정확하게 측정되었다. 펩타이드 시퀀스와 정확한 질량은 표 3과 4에 정리하였다.

C. 이황화 결합 펩타이드의 MS/MS 시퀀싱 분석

표 3 및 4에 나열된 모든 이황화 결합 펩타이드의 *de novo* 시퀀싱 분석을 수행하였다. 여기서는 비환원 S-S-2와 환원 S-S-3의 결과를 대표적인 예로 나타내었다. 그림 3은 조각 이온 주석이 포함된 MS/MS 스펙트럼을 통해 Bevacizumab 바이오시밀러 경쇄의 비환원 이황화 결합 펩타이드(S S-2)의 *de novo* 시퀀싱을 보여준다. 다중 전하 이온(2+, 3+, 4+)의 펩타이드 시퀀스와 정확한 m/z 값이 상단 패널에 표시된다. 4+ 이온 (m/z 889.9445)의 펩타이드 시퀀스를 기반으로 일치하는 단편에 대한 설명(y 이온)과 함께 MS/MS 스펙트럼이 하단 패널에 표시된다. 비환원 이황화 결합 펩타이드 외에도 환원된 이황화 결합 펩타이드에 대한 *De novo* 시퀀싱도 수행하였다. 그림 4는 S-S-2를 형성하는 환원된 펩타이드(S3)의 MS/MS 스펙트럼을 나타내었다.

■ 결론

mAb 바이오시밀러의 정확한 이황화 결합 펩타이드 특성 분석을 위한 간단한 LCMS 기반의 분석 방법은 LCMS-9030 (Q-TOF)을 이용하여 확립하였다. 단편화 데이터가 포함된 MS/MS 스펙트럼은 시퀀싱 분석에 대한 신뢰도 있는 결과를 제공한다. Bevacizumab 바이오시밀러의 비환원 및 환원된 이황화 결합의 검출 및 *de novo* 시퀀싱 분석으로 mAb 바이오시밀러의 구조적 특성 분석에 대한 실행 가능성을 입증하였다.



Shimadzu Corporation  
www.shimadzu.com/an/

Shimadzu Scientific Korea  
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. See <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> for details.

Third party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".

Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

AD-0214-K