



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

HPLC-FLD, Q-TOF-MS,
exoglycosidase array digestion 을 이용한
에타너셉트 N-당사슬 분석법 연구

Etanercept N-glycosylation Analysis using
HPLC-FLD, Q-TOF-MS and exoglycosidase
array digestion

2015 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

이 새 봄

약학석사학위논문

HPLC-FLD, Q-TOF-MS,
exoglycosidase array digestion 을 이용한
에타너셉트 N-당사슬 분석법 연구

Etanercept N-glycosylation Analysis using
HPLC-FLD, Q-TOF-MS and exoglycosidase
array digestion

지도교수 박정일

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2015 년 8 월
서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
이 새 봄

이새봄의 약학석사학위논문을 인준함

2015 년 8 월

위 원 장	<u>송 준 명</u>	(인)
부위원장	<u>권 성 원</u>	(인)
위 원	<u>박 정 일</u>	(인)

국 문 초 록

에타너셉트 (Etanercept, Enbrel®)는 폴리펩티드 (polypeptide)의 특정 아스파라긴 (Asn, asparagine) 잔기에 N-당사슬 (N-glycan)이 결합되어 있는 당단백질의약품 (therapeutic glycoprotein)이다. 당단백질의약품에 존재하는 N-glycan 은 구조적 다양성을 지니며, 의약품의 안정성 (stability), 효능 (efficacy), 항원성 (immunogenicity)과 같은 약리학적 중요 요소에 큰 영향을 미치기 때문에 N-glycan 의 불균일성 (heterogeneity)을 입증하기 위한 정성 및 정량적 분석법은 당단백질의약품의 효과적인 품질관리 (QC, quality control)에 있어 매우 중요하다.

본 연구에서는 당단백질의약품 중 Etanercept에 존재하는 N-glycan 의 구조 및 상대정량 분석을 수행하였다. 대상 의약품에 펩티드 N-탈당쇄효소 F (PNGase F)를 처리하여 N-glycan 을 유리시킨 후, 유리된 N-glycan 에 2-아미노벤즈아미드 (2-AB, 2-aminobenzamide) 형광 표지 (fluorescence labeling)를 한 다음, 고체상 추출 (SPE, solid phase extraction)을 이용하여 2-AB 표지된 N-glycan 혼합물 (mixture)을 분리 정제 하였다. 분리 정제된 2-AB 표지된 N-glycan mixture 를 고성능액체크로마토그래피-친수성 상호작용

액체크로마토그래피법 (HPLC-HILIC, high performance liquid chromatography-hydrophilic interaction liquid chromatography)을 이용하여 분리하고, 연결된 형광검출기 (FLD, fluorescence detector)와 질량분석기 (MS, mass spectrometry)로 분석하였다. 분석 과정 시 각 피크의 머무름 시간 (retention time, RT, min)에 해당하는 당 단위 값 (glucose unit)을 구하기 위하여 2-AB 표지된 당 사다리 (2-AB labeled dextran ladder)를 분석하였다. 2-AB 표지된 N-glycan 의 구조 분석을 위하여 glucose unit 과 online database 와 비교하여 얻은 구조와, Q-TOF-MS 를 통해 얻은 각 피크의 정확한 분자량 (이론값 대비 오차범위 0.01 Da 미만)에 대한 정보, 그리고 하나 이상의 엑소글라이코시다아제 (exoglycosidase)를 동시에 처리했을 때 나타난 피크 면적 변화에 대한 정보들을 모두 조합하여 N-glycan 의 구조분석을 수행하였다. 3 회 반복실험을 하여 구조가 규명된 각 피크 면적에 대한 상대정량값 (relative peak intensity, %)의 평균표준편차 (relative intensity, RSD, %)값을 구하여 본 분석법의 재현성을 검증하였다 (RSD < 10%).

주요어: 당단백질의약품, N-glycan, exoglycosidase, fluorescence, mass spectrometry

학번: 2013-23465

목 차

국문초록.....	i
목차.....	iii
List of Figures.....	v
List of Tables.....	vi
I. 서론.....	1
II. 실험.....	3
1. 시료.....	3
2. 시약 및 기기.....	3
2-1. 시약.....	3
2-2. 장비 및 도구.....	4
3. 실험 방법.....	6
3-1. Enbrel 에서 Etanercept 의 선택적 분리.....	6
3-2. 단백질 변성 (protein denaturation).....	7
3-3. Etanercept 으로부터 N-glycan 유리 (Enzymatic deglycosylation).....	8
3-4. 에탄올 침전법을 이용한 N-glycan 정제 (Ethanol precipitation)	9
3-5. 2-AB labeling.....	10

3-6. Solid phase extraction 를 이용한 2-AB 표지된 N-glycan 정제.....	11
3-7. Exoglycosidase array digestion.....	13
3-8. Instrumental Analysis.....	15
III. 결과.....	17
1. 고정상 선정.....	17
2. 2-AB 표지 N-glycan 구조 동정.....	19
2-1. Overview.....	19
2-2. HPLC-FLD 과 GlycoBase 를 이용한 2-AB 표지된 N-glycan 구조 예측.....	21
2-3. Q-TOFMS 를 이용한 2-AB 표지된 N-glycan 구조 동정.....	23
2-4. Exoglycosidase 를 이용한 2-AB 표지된 glycan 결합 종류 규명.....	24
3. N-glycan 분석법 재현성 검증.....	27
IV. 결론.....	29
V. 참고문헌.....	30
Abstract.....	33

List of Figures

Figure 1. Enbrel 부형제 제거.....	6
Figure 2. Etanercept 단백질 변성	7
Figure 3. PNGase F를 이용한 탈당화.....	8
Figure 4. 에탄올 침전법을 이용한 N-glycan 정제.....	9
Figure 5. N-glycan에 2-AB 형광표지.....	10
Figure 6. 2-AB 표지된 N-glycan 정제.....	12
Figure 7. Exoglycosidase array digestion.....	14
Figure 8. Bare silica HILIC column vs amide HILIC column.....	18
Figure 9. Workflow of 2-AB labeled N-glycan structure identification.....	20
Figure 10. Dextran ladder를 이용하여 GU value로의 환산.....	21
Figure 11. Exoglycosidase array digestion 결과.....	26
Figure 12. Etanercept의 2-AB 표지된 N-glycan의 상대정량 결과.....	27

List of Tables

Table 1. Glycobase와 비교하여 얻은 N-glycan 예상 구조.....	22
Table 2. QTOF-MS를 이용한 N-glycan 동정.....	23
Table 3. 상대정량값의 재현성 결과 Relative standard deviation (RSD, %).....	28

I. 서론

유전자재조합기술 (recombinant DNA technology)의 발달로 유전자재조합 단백질의약품이 개발되었다. 미생물이나 포유류 세포에서 발현시켜 생산되는 당단백질은 구조적, 물리화학적, 면역학적, 생물학적 성질이 인체에서 생산되는 단백질과 차이가 날 수 있다. 또한, 단백질은 번역 후 수식 (post-translational modification) 과정과 생산 공정 과정에서 구조가 달라 질 수 있고, 이는 단백질의약품의 안전성과 유효성에 영향을 미친다.

단백질의약품에서의 당사슬은 안정성, 효능, 항원성, 약리학에 영향을 준다 (1). 예를 들어, 시알릭산 (sialic acid) 함량이 높은 당사슬을 포함하고 있는 재조합 인간 에리스포이에틴 (recombinant human erythropoetin)의 반감기는 증가하는 것으로 알려져 있고 (2), 만노오스 (mannose)가 많은 당사슬은 면역원성을 나타낸다는 보고가 있다 (3).

당단백질은 숙주세포의 종류, 배양 조건에 따라 다양한 형태의 당사슬이 생성되어 생산 공정의 차이에 따른 불균일성 (heterogeneity)이 발생하게 된다. 당사슬 구조가 서로 다른 당단백질의 경우 생체 내 동태와 생리 활성, 안정성에 차이가 생길 수 있으므로 당단백질의약품의 당화 여부와 당사슬 구조에 대한 특성분석은 매우 중요하다. N-glycan 은 두 개의 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc, N-

acetylglucosamine) 잔기와 3 개의 만노오스 (mannose) 잔기들로 구성된 기본구조를 가지고 있으며, 여기에 다양한 당이 결합하여 확장된 구조로 high mannose type, complex type, hybrid type 으로 분류된다. Glycan 의 구조적 다양성과 화학적 유사성은 N-glycan 구조의 규명을 어렵게 하는 원인이 된다.

에타너셉트 (Etanercept, Enbrel®)는 류마티스관절염, 건선성 관절염, 강직성 척추염의 치료제로, 종양 괴사 인자 알파 (TNF - α , tumor necrosis factor - α) 억제제이다. TNF receptor 2 와 면역글로불린 (IgG1, immunoglobulin G1)의 Fc 조각 (Fc fragment)이 연결된 융합단백질 (fusion protein)로 N-glycan 이 부착되어 있는 당자리 (glycosylation site)가 총 6 개가 존재한다. 본 연구에서는 HPLC-FLD 와 HPLC-MS 를 이용하여 Etanercept 에 존재하는 N-glycan 에 대한 정성 및 상대 정량 분석을 수행하였다. 또한, 특정한 결합만을 절단하는 exoglycosidase 를 이용하여 N-glycan 내 결합 방식을 규명하였다. 본 연구에서 수행한 과정과 결과는 당단백질 의약품 당 구조분석 연구에 기여할 수 있을 것이다.

II. 실험

1. 시료

- Etanercept (Enbrel®)

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

- Water (J.T. Baker, USA)
- Acetonitrile, ACN (J.T. Baker, USA)
- Ethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Acetic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Sodium cyanoborohydride (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- 2-Aminobenzamide (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Peptide N-glycosidase F, PNGase F (New England Biolab, Inc., P0705S)
- Streptococcus pneumonia sialidase, NAN1 (ProZyme, Inc., Hayward, CA, USA, GK80020)
- Arthrobacter ureafaciens sialidase, ABS (ProZyme, Inc.,

Hayward, CA, USA, GK80040)

- Bovine kidney α -fucosidase, BKF (ProZyme, Inc., Hayward, CA, USA, GKX-5006)
- Bovine kidney β -galactosidase, BTG (ProZyme, Inc., Hayward, CA, USA, GKX-5013)
- Streptococcus pneumonia β -galactosidase, SPG (ProZyme, Inc., Hayward, CA, USA, GKX-5014)
- Streptococcus pneumonia hexosamidase, GUH (ProZyme, Inc., Hayward, CA, USA, GK80050)
- Jack bean mannosidase, JBM (ProZyme, Inc., Hayward, CA, USA, GKX-5010)
- Dextran calibration ladder standard (Waters Corp., Miliford, MA, USA, 186006841)

2-2. 장비 및 도구

- Centrifuge 5415R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Vacuum Oven OV-01 (Jeio Tech, Seoul, South Korea)
- Automatic Environmental SpeedVac System AES 2010 (Thermo Savant)
- Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

- Amicon Ultra–0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel–3 membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Glyko® GlycoClean™ S Cartridges (ProZyme, Inc., Hayward, CA USA, GKI–4726)
- PerkinElmer Flexar® FX–10 UHPLC system with PerkinElmer Series 200a Fluorescence detector
- Agilent 1260 HPLC instrument coupled with a 6530 Q–TOF mass spectrometer
- Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide column (1.7 μ m particle, 2.1 x 100 mm)

3. 실험 방법

3-1. Enbrel 에서 Etanercept 의 선택적 분리

시중에 판매하는 Enbrel 의 원료약품에는 Etanercept (분자량 51,234.9) 이외에 만니톨 (분자량 182.2), 백당 (분자량 342.3), 트로메타민 (분자량 121.1)이 부형제로 포함되어 있다. 비교적 큰 분자량을 갖는 Etanercept 에 비하여 부형제의 분자량은 모두 1,000 이하이기 때문에, 본 연구에서는 10,000 이상의 분자량을 갖는 물질만을 선택적으로 분리할 수 있는 10K Amicon 을 이용하여 Enbrel 용액 (1 g/L) 50 μ L 를 14000 x g 로 15 분 동안 원심분리 하여 Etanercept 만을 선택적으로 취하였다 (Figure 1).

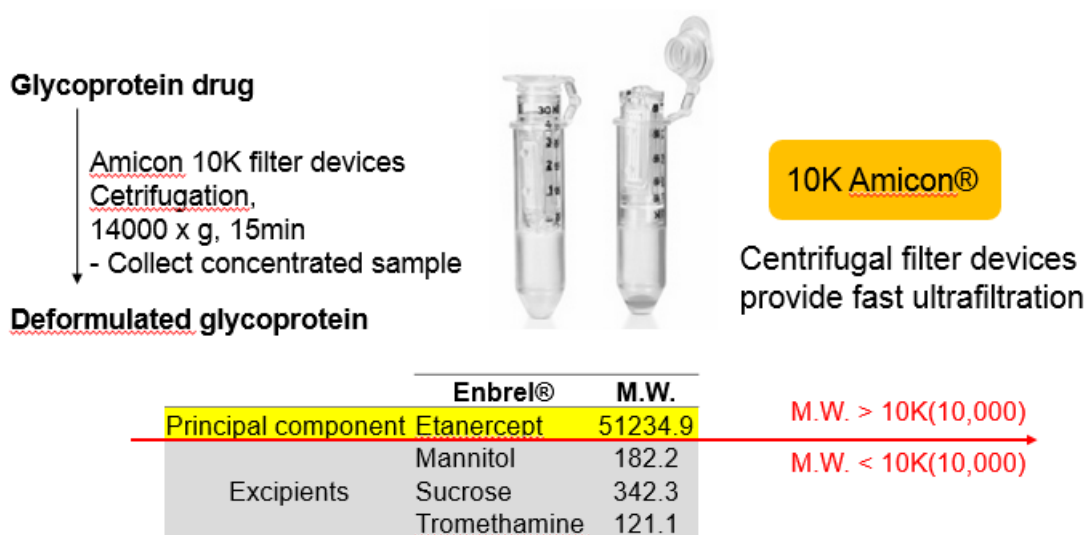


Figure 1. Enbrel 부형제 제거

3-2. 단백질 변성 (protein denaturation)

Etanercept 에서 N-glycan 을 효과적으로 분리하기 위하여 시료 50 μg 을 EP tube 에 넣고, PNGase F (NEB)에 동봉된 denaturing buffer (10x)를 10 배 희석 시킨 용액 10 μL 를 넣었다. 그리고 heat block 에서 100 $^{\circ}\text{C}$, 10 분간 반응시켜 당단백질을 변성시켰다. Denaturing buffer 의 구성은 이온 계면활성제인 sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.5%)와 환원제인 dithiothreitol (DTT, 0.4 mM)의 혼합액이다 (Figure 2).

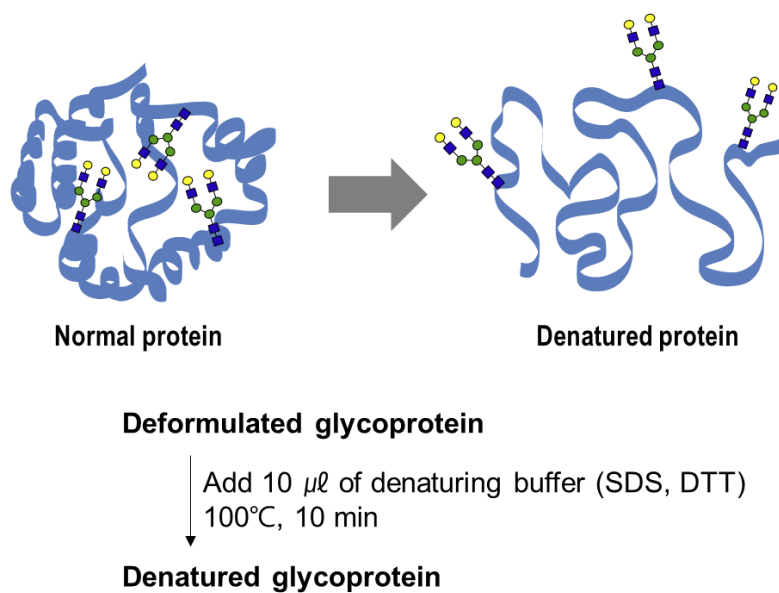


Figure 2. Etanercept 단백질 변성

3-3. Etanercept 으로부터 N-glycan 유리 (Enzymatic deglycosylation)

당단백질의 asparagine (Asn) 잔기에 결합되어 있는 N-glycan 을 선택적으로 분리하기 위해선 효소를 이용하는 방법과 화학적 방법이 있으며, 효소적인 방법의 효율이 더 높은 것으로 알려져 있다 (4). 변성된 Etanercept 시료를 상온에서 식힌 후, PNGase F (NEB)에 동봉된 10 X GlycoBuffer 2 (0.5 M sodium phosphate, pH 7.5) 2 μ L, 10% NP-40 2 μ L, PNGase F 1 μ L (500 U)를 넣고 37 ° C 에서 18 시간 동안 반응시켰다 (Figure 3).

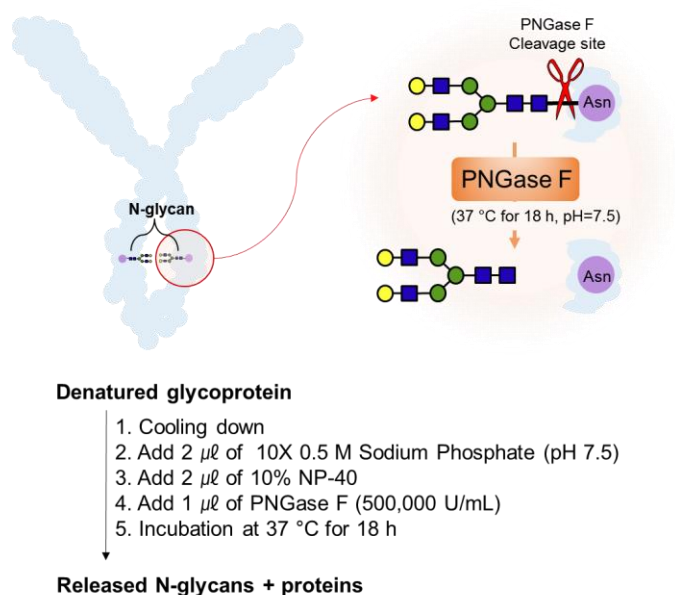


Figure 3. PNGase F 를 이용한 탈당화

3-4. 에탄올 침전법을 이용한 N-glycan 정제 (Ethanol precipitation)

PNGase F 효소를 이용하여 N-glycan 분리가 끝난 시료에서 N-glycan 만을 정제하기 위해 고농도의 에탄올에서 단백질이 응집하는 성질을 이용한 에탄올 침전법을 도입하였다. 300 μ L cold ethanol 용액을 시료에 넣은 후 -75°C 에서 한 시간 동안 방치하여 단백질을 침전시켰다 (5) (Figure 4). 원심분리기로 4°C , 15,000 rpm 으로 2 분 동안 원심분리하고, 단백질 pellet 을 제외한 N-glycan 이 포함된 상등액 (supernatant) 만을 취해 새로운 EP tube 에 옮겨 담아 speedvac 을 이용하여 건조시킨다 (centrifugal evaporation).

Released N-glycans + proteins

1. Chilled ethanol 300 μ l
2. -75°C freezer for one hour
3. Centrifugation at 15,000 rpm for 2 min, 4°C
4. Transfer N-glycan solution to another Eppendorf tube

Isolated N-glycans pool

Centrifugal evaporation

Dried released N-glycans

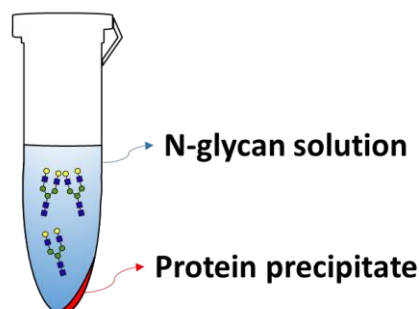


Figure 4. 에탄올 침전법을 이용한 N-glycan 정제

3-5. 2-AB labeling

N-glycan 은 본래 chromophore 가 없기 때문에 분광광도계 (spectrometer)를 통한 검출이 용이하지 않다. 따라서 본 연구에서는 데이터베이스가 가장 잘 만들어진 2-aminobenzamide (2-AB) 형광발색단을 N-glycan 에 표지하였다. DMSO 350 μL 와 acetic acid 150 μL 를 혼합한 후 100 μL 을 취해 2-AB 6 mg 과 sodium cyanoborohydride 6 mg 을 녹여 2-AB labeling 용액을 제조하였다. 제조한 용액 10 μL 를 건조된 N-glycan 에 넣고 37 ° C 에서 16 시간 동안 반응시켰다 (6) (Figure 5).

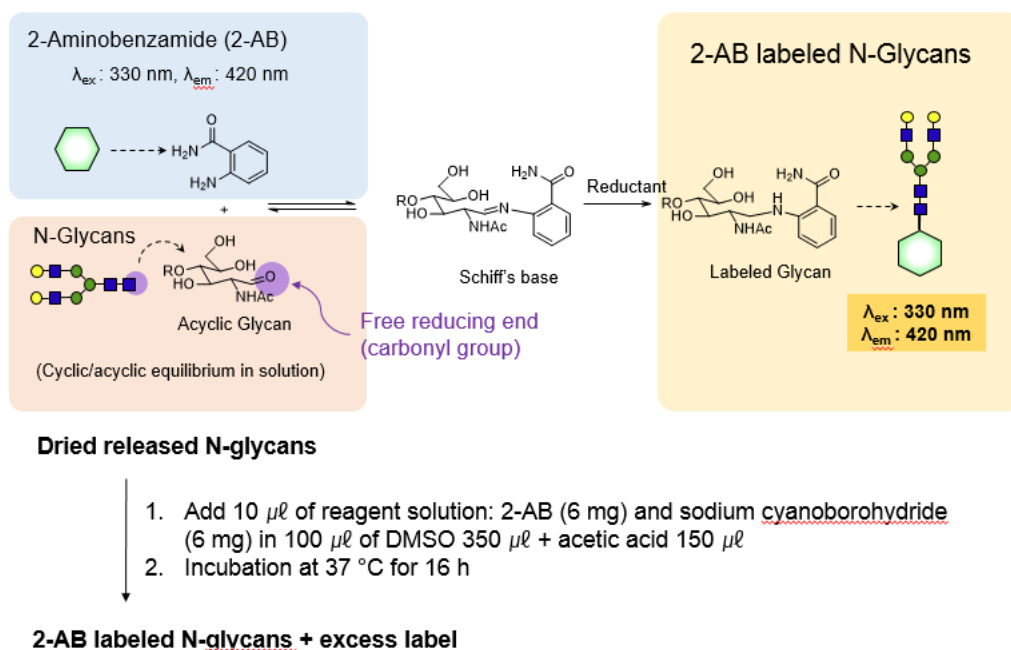


Figure 5. N-glycan 에 2-AB 형광표지

3-6. Solid phase extraction 를 이용한 2-AB 표지된 N-glycan 정제

형광 표지 과정 중 첨가된 과량의 2-AB 는 기기분석 시 2-AB 표지된 N-glycan 의 분석을 방해하기 때문에, 형광표지에 참여하지 않은 과다의 2-AB 를 제거하고 2-AB 표지된 N-glycan 만을 정제하기 위하여 cellulose paper 가 패키징 된 GlycoClean S cartridges 를 이용한 solid phase extraction (SPE) 과정을 다음과 같이 수행하였다. GlycoClean S cartridge 에 1 mL 의 water, 5 mL 의 acetic acid, 4 mL 의 ACN 을 순서대로 넣어주어 활성화 시킨다. 2-AB 반응이 완료된 시료를 상온에서 식힌 후 cartridge 에 넣고 15 분간 상온에서 방치하여 흡착시킨다. 1 mL 의 ACN 과 4 mL 의 96% CAN 을 cartridge 에 넣고 과량의 2-AB 만을 제거한다. Cartridge 에 water 0.5 mL 를 3 번 넣고 2-AB 표지된 N-glycan 만을 새로운 EP tube 에 받아 내고 speed vac 으로 건조시킨다 (7) (Figure 6).

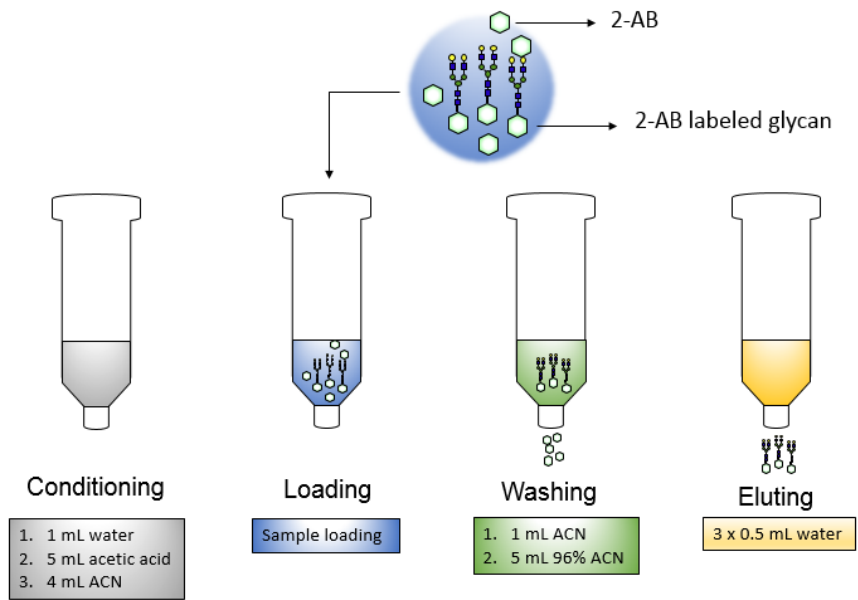


Figure 6. 2-AB 표지된 N-glycan 정제

3-7. Exoglycosidase array digestion

본 연구에서는 2-AB표지된 N-glycan 의 서열 및 입체화학 (stereochemistry)적 구조규명을 위하여 exoglycosidase를 처리하여 말단에 있는 당을 제거하고, 이를 HPLC-FLD 로 분석하고, N-glycan peak의 양상과 상대정량값을 통해 구조규명을 수행하였다. 이때 다음과 같이 총 7종의 exoglycosidase를 사용하였다: α (2-3) 결합 sialic acid만을 절단하는 NAN1 (*Streptococcus pneumonia* sialidase), α (2-3,6,8) 결합 sialic acid를 절단하는 ABS (*Arthrobacter ureafaciens* sialidase), α (1-2,6) 결합 fucose만을 절단하는 BFK (*bovine kidney* α -fucosidase), β (1-3,4) 결합 galactose만을 절단하는 BTG (*bovine testis* β -galactosidase), β (1-4) 결합 galactose만을 절단하는 SPG (*Streptococcus pneumonia* β -galactosidase), β (1-2,3,4,6) 결합 N-acetylglucosamine을 절단하는 GUH (*Streptococcus pneumonia* hexosaminidase), α (1-2,3,6) 결합 mannose를 절단하는 JBM (*jack bean* mannosidase). 본 연구에서는 2-AB표지된 N-glycan에 하나 이상의 exoglycosidase 를 동시에 처리하여 500 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) 아래에 37 ° C에서 18시간 동안 반응시키는 exoglycosidase array digestion 법을 사용하여 구조규명을 진행하였으며 각 조합은

다음과 같았다 (8).

(a) 2 μ L buffer, 8 μ L water (b) 1 μ L NAN1, 2 μ L buffer, 7 μ L water (c) 1 μ L ABS, 2 μ L buffer, 7 μ L water (d) 1 μ L ABS, 1 μ L BKF, 2 μ L buffer, 6 μ L water (e) 1 μ L ABS, 1 μ L BKF, 4 μ L BTG, 2 μ L buffer, 2 μ L water (f) 1 μ L ABS, 1 μ L BKF, 4 μ L SPG, 2 μ L buffer, 2 μ L water (g) 1 μ L ABS, 1 μ L BKF, 4 μ L SPG, 1 μ L GUH, 2 μ L buffer, 1 μ L water (h) 1 μ L ABS, 1 μ L BKF, 4 μ L SPG, 1 μ L GUH, 1 μ L JBM, 2 μ L buffer. (a)~(h)의 조합을 갖는 exoglycosidase로 분해시키고 3K Amicon으로 exoglycosidase를 제거한 후 speed vac으로 건조시킨다 (9) (Figure 7).

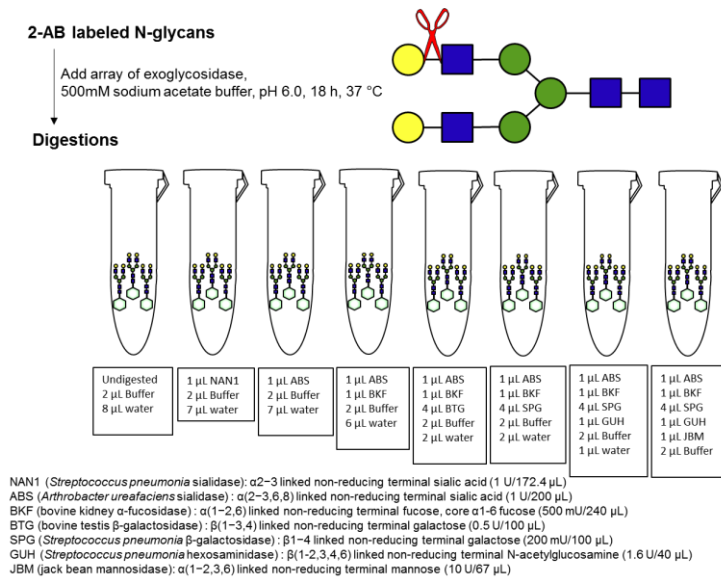


Figure 7. Exoglycosidase array digestion

3-8. Instrumental Analysis

친수성 상호작용 액체 크로마토그래피법 (HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography)은 glycan 과 같은 친수성 물질들을 분리하는데 오랫동안 사용되어 왔다. 이 기법은 일반적으로 친수성 고정상과 70% 이상의 물과 나머지 소수성 유기용매와의 혼합액으로 구성된 이동상을 이용한다. 본 연구에서는 2-AB 표지된 N-glycan 의 효과적인 분석을 위한 HILIC 고정상을 선택하고자 silica 기반 HILIC phase 와 silica 에 amide 잔기를 유도체화 시킨 amide 기반 HILIC phase 를 비교하였다. 건조시킨 2-AB 표지된 N-glycan 을 100 μ L 의 이동상 초기조건에 녹이고 HILIC HPLC 분석을 실행하였다. Silica 기반 HILIC 컬럼으로 Waters Acquity UPLC BEH HILIC (1.7 μ m, 2.1 x 100 mm)을 사용하였고, 이동상 A (100 mM ammonium formate, pH 4.5), 이동상 B (100% ACN)를 다음과 같은 용매 기울기 조건으로 2-AB 표지된 N-glycan 을 분리하였다. 2 분간 용매 A 30%로 유지시키고, 43 분에 걸쳐 용매 A 47%로 증가시킨다. 그리고 10 분에 걸쳐 다시 용매 A 80%로 증가시키고 5 분간 유지한다. Amide 기반 HILIC 컬럼으로 Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide (1.7 μ m, 2.1 x 100 mm, waters)를 사용하였고, 이동상 A (50 mM ammonium formate, pH 4.5), 이동상 B (100% ACN)을 다음과 같은 용매 기울기 조건으로

2-AB 표지된 N-glycan 을 분리하였다. 1.5 분간 용매 A 30%로 유지시키고, 45 분에 걸쳐 용매 A 47%로 증가시킨다. 그리고 다시 1 분에 걸쳐 용매 A 70%로 증가시키고, 1 분동안 유지한다. 두 조건 모두 유속은 0.2 mL/min 으로 유지시켰다 (10).

2-AB 표지된 N-glycan 의 정성분석을 위해 HILIC HPLC 와 연결된 고분해능 질량분석기 (high-resolution mass spectrometry)의 일종인 사중극자 비행시간 질량분석기 (QTOF-MS, quadrupole time of flight mass spectrometry)를 사용하였고, Exoglycosidase 로 분해시킨 2-AB 표지된 N-glycan 의 정성 및 정량적 분석을 위해 HILIC HPLC 와 연결된 형광 검출기 (FLD, fluorescence detector)를 사용하였다. QTOF-MS 의 분석 조건은 다음과 같다. 500~3200 m/z 범위의 스캔모드를 적용하였고, 350 ° C 의 가스 온도, 10 L/min 의 가스 유속, 30 psi 의 분무기압, 350 ° C 의 차단가스 (sheath gas) 온도, 12 L/min 의 차단가스 유속을 적용하였다. 형광 검출기의 분석조건은 여기 (excitation) 파장 330 nm, 방출 (emission) 파장 420 nm 로 설정하였다.

III. 결과

1. 고정상 선정

2-AB 표지된 N-glycan 의 효과적인 분석을 위한 HILIC 고정상을 선정하기 위하여 silica 기반 HILIC 컬럼과 silica 에 amide 잔기를 유도체화 시킨 amide 기반 HILIC 컬럼으로 2-AB 표지된 N-glycan 을 각각 분석하여 분리 양상을 비교하였다. 각 고정상을 이용한 HPLC-QTOF-MS 분석 결과 total ion chromatogram (TIC) 상에서 검출된 2-AB 표지 N-glycan 은 Figure 8 과 같이 amide 기반 고정상에서 효과적인 분리양상을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 2-AB 표지 N-glycan 의 분리를 위한 고정상으로 amide 기반 HILIC 컬럼이 더 적합함을 확인하였다.

TIC of HPLC-QTOF-MS

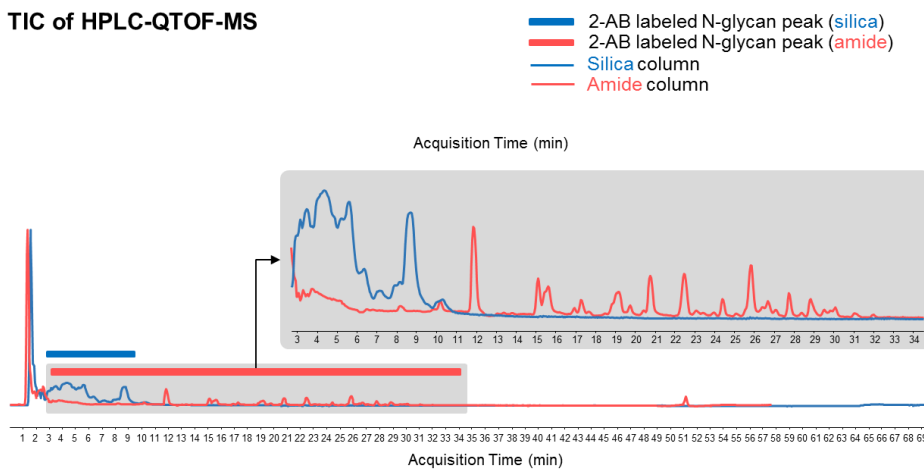


Figure 8. Bare silica HILIC column vs amide HILIC column

2. 2-AB 표지 N-glycan 구조 동정

2-1. Overview

2-AB 표지된 N-glycan 의 구조 동정 과정을 Figure 9 와 같이 진행하였다. HPLC-FLD 를 이용하여 Etanercept 의 2-AB 표지된 N-glycan 의 전체 프로파일을 확인하였고, 분석 과정 시 외부 표준물질 (external standard)로 다양한 길이의 당사슬로 이루어진 dextran ladder 를 함께 분석하였다. Dextran ladder 를 통해 2-AB 표지된 N-glycan peak 이 검출되는 머무름 시간 (retention time, RT)을 당 단위 값 (glucose unit value, GU value)으로 환산하였다. 환산한 2-AB 표지된 N-glycan 의 GU value 를 무료 온라인 glycan library 인 GlycoBase (11) 에서 검색하여 N-glycan 의 구조를 일차적으로 예측하였다. QTOF-MS 분석을 통해 얻은 정확한 분자량으로 구조를 동정하였다. 추가적으로 특정한 결합만을 절단시키는 exoglycosidase 원리를 이용하여 당사슬 내 결합 방식을 규명하였다.

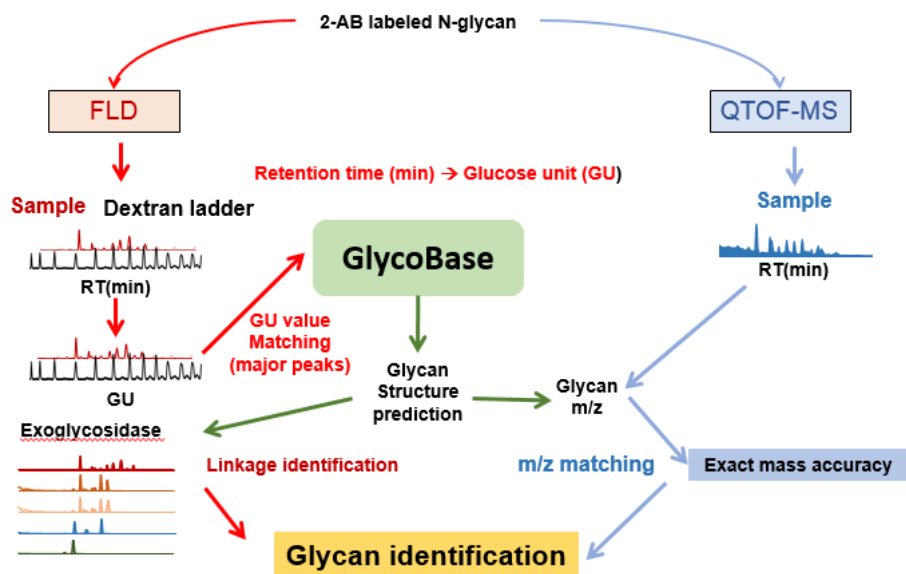


Figure 9. Workflow of 2-AB labeled N-glycan structure identification.

2-2. HPLC-FLD 과 GlycoBase 를 이용한 2-AB 표지된 N-glycan 구조 예측

2-AB 표지한 Etanercept N-glycan 시료를 HPLC-FLD 로 분석하여 각 peak 의 RT 와 intensity 를 얻었다. 각 peak 의 RT 가 dextran ladder ladder 의 GU value 2~12 에 해당하는 RT 범위 내에서 검출되었기 때문에 본 연구에서는 GU value 2~12 와 해당하는 RT (min) 값을 이용하여 5 차항 최소자승 회귀분석 (5th order polynomial least square regression)을 통하여 5 차 다항식을 세우고 이 식을 이용하여 2-AB 표지된 N-glycan 의 RT 를 GU value 로 환산하였다 (Figure 10).

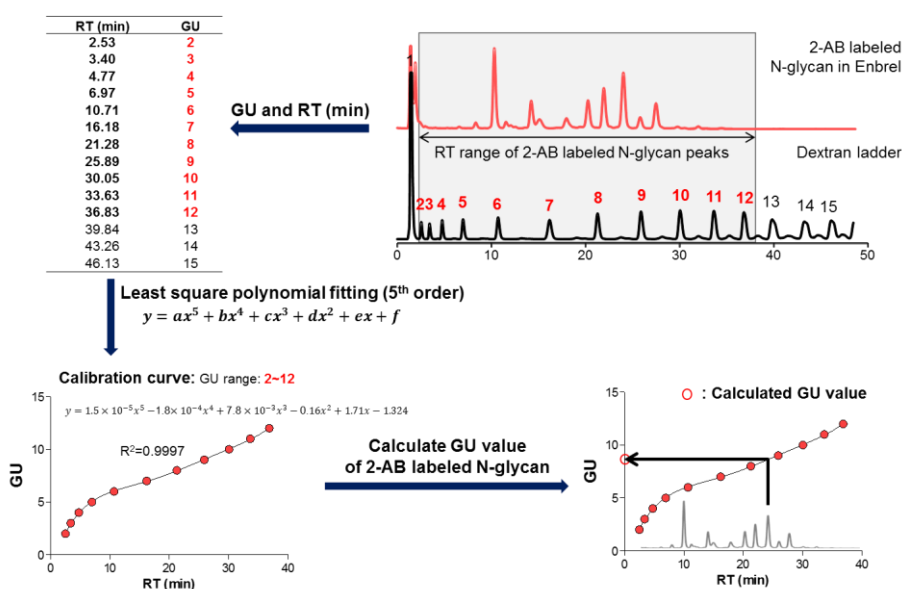


Figure 10. Dextran ladder 를 이용하여 GU value 로의 환산

본 연구에서는 2-AB 표지한 N-glycan 의 GU value 를 GlycoBase 에서 비교하여 N-glycan 구조를 예상할 수 있었다 (오차 GU value 범위: 0.01 ~ 0.34). 또한, 이들의 분자식을 기반으로 한 2-AB 표지된 N-glycan 의 m/z 이론값은 다음과 같았다(Table 1).

Table 1. Glycobase 와 비교하여 얻은 N-glycan 예상 구조

RT (min)	GU (Mean)	GU (in GlycoBase)	Delta GU	M/Z(Theo)	Identity
5.26	4.23	4.31	0.08	1031.4039	M3
6.54	4.86	4.87	0.01	1234.4822	A1
8.28	5.48	5.44	0.04	1437.5615	A2
9.81	5.87	5.91	0.04	1583.6217	FA2
11.93	6.27	6.2	0.07	1355.5087	M5
14.36	6.66	6.73	0.07	873.3427	FA2G1
18.01	7.28	7.23	0.05	881.3402	A2G2
19.67	7.61	7.65	0.04	954.3687	FA2G2
21.68	8.04	7.91	0.13	1026.8878	A2G2S1
23.82	8.53	8.32	0.21	1099.9169	FA2G2S1
25.65	8.96	8.67	0.29	1172.4358	A2G2S2
27.37	9.37	9.03	0.34	1245.4630	FA2G2S2

2-3. Q-TOFMS 를 이용한 2-AB 표지된 N-glycan 구조 동정

2-AB 표지한 Etanercept N-glycan 시료를 HPLC-QTOFMS 로 분석을 수행한 결과, 2-AB 표지된 N-glycan 예상 구조와 근접한 GU 값을 지니는 피크들의 m/z 실험값이 m/z 이론값과 일치하였으며 0.01 m/z 미만의 오차범위를 지니었다. 이를 통해 GU 값을 기반으로 예상한 N-glycan 구조를 mass 값을 이용하여 검증하였다 (Table 2).

Table 2. QTOF-MS 를 이용한 N-glycan 동정

RT (min)	GU (Mean)	GU (in glycobase)	Delta GU	M/Z(Theo)	M/Z (Exp)	Delta M/Z	Identity
5.26	4.23	4.31	0.08	1031.4039	1031.4061	0.0022	M3
6.54	4.86	4.87	0.01	1234.4822	1234.4817	0.0005	A1
8.28	5.48	5.44	0.04	1437.5615	1437.5625	0.0010	A2
9.81	5.87	5.91	0.04	1583.6217	1583.6214	0.0003	FA2
11.93	6.27	6.2	0.07	1355.5087	1355.5059	0.0028	M5
14.36	6.66	6.73	0.07	873.3427	873.3434	0.0007	FA2G1
18.01	7.28	7.23	0.05	881.3402	881.3404	0.0002	A2G2
19.67	7.61	7.65	0.04	954.3687	954.3685	0.0002	FA2G2
21.68	8.04	7.91	0.13	1026.8878	1026.8882	0.0004	A2G2S1
23.82	8.53	8.32	0.21	1099.9169	1099.9184	0.0015	FA2G2S1
25.65	8.96	8.67	0.29	1172.4358	1172.4337	0.0021	A2G2S2
27.37	9.37	9.03	0.34	1245.4630	1245.4647	0.0017	FA2G2S2

2-4. Exoglycosidase 를 이용한 2-AB 표지된 glycan 결합 종류 규명

2-3. 에서 검증한 2-AB 표지한 N-glycan 의 당사슬 내 결합 종류를 규명하기 위하여 본 연구에서는 exoglycosidase array digestion 을 수행하고 HPLC-FLD 로 확인하였다 (Figure 11). 비환원 말단에 있는 당부터 차례대로 절단하면서 결합 종류를 규명하기 위해 sialidase, fucosidase, galactosidase, hexosaminidase 를 하나 이상 조합하여 처리하고 peak 의 양상을 확인하였다.

ABS 를 처리하였을 때와 NAN1 을 처리하였을 때의 spectrum 이 동일했고, 이것으로 Etanercept 의 N-glycan 의 sialic acid 는 모두 $\alpha 2-3$ 결합으로 연결되어 있다는 것을 확인하였다. ABS 와 BKF 를 처리하였을 때 다수의 peak 의 이동이 있었고, 모든 fucose 가 절단된 것을 확인하였다. 이를 통해 다수의 Etanercept N-glycan 이 core fucose 를 가지고 있다는 것을 확인하였다. ABS+BKF+BTG 와 ABS+BKF+SPG 를 처리하였을 때 spectrum 이 거의 동일했으며, 이것은 거의 모든 galactose 가 $\beta 1-4$ 결합으로 연결되어 있다는 것을 의미하였다. 향후 실험에서 galactosidase 의 양을 조금 더 증가시켰을 때 두 spectrum 의 양상이 완전히 동일한지 확인해볼 필요가 있다. ABS+BKF+SPG+GUH 를 처리하였을 때, peak 이 M3 로 거의

수렴하였고, 이것은 Etanercept 의 N-glycan 이 거의 모두 biantennary 형태임을 의미하였다.

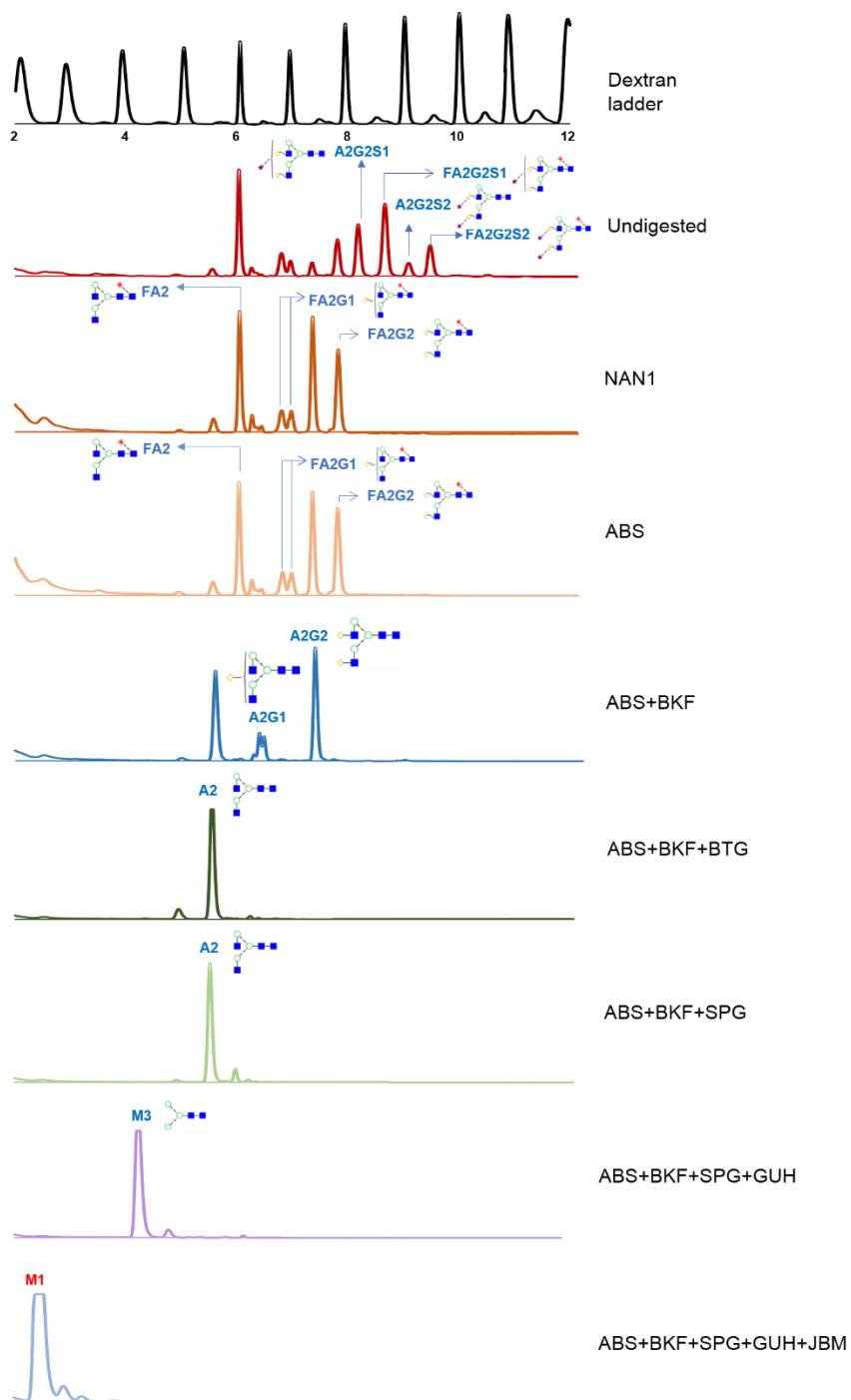


Figure 11. Exoglycosidase array digestion 결과

3. N-glycan 분석법 재현성 검증

Etanercept 을 3 번 독립적으로 PNGase F 를 처리하고, 2-AB 를 표지하여 총 3 개의 시료를 만들고 각각을 HPLC-FLD 로 분석하였다. 2-2,3. 에서 규명한 12 종의 2-AB 표지된 N-glycan 의 상대정량값을 구하였다 (Figure 12). 또한, 상대정량값을 이용하여 재현성 분석을 수행한 결과 아래 그림과 같이 M3, A1, FA2G1 을 제외한 나머지 9 종의 N-glycan 들의 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD, %) 값이 10% 미만을 나타냄에 따라 본 연구에서 수행된 N-glycan 분석법이 만족할만한 재현성을 나타냄을 확인하였다 (Table 3)

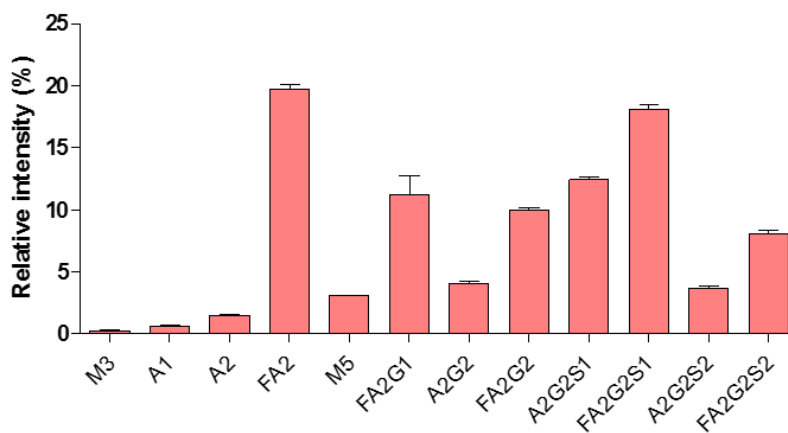


Figure 12. Etanercept 의 2-AB 표지된 N-glycan 의 상대정량 결과

Table 3. 상대정량값의 재현성 결과 Relative standard deviation (RSD, %)

Identity	RSD(%)
M3	25.4
A1	30.1
A2	5.0
FA2	3.4
M5	3.2
FA2G1	23.4
A2G2	8.9
FA2G2	2.5
A2G2S1	4.0
FA2G2S1	3.0
A2G2S2	7.8
FA2G2S2	5.1

IV 결론

본 연구에서는 Etanercept 에 존재하는 N-glycan 의 구조 및 상대정량분석을 수행하였다. 분석 과정에서 Amide 기반 HILIC 고정상을 이용한 HILIC HPLC 법이 Etanercept 의 2-AB 표지된 N-glycan 을 효과적으로 분리하는 것을 확인하였다. 또한, 2-AB dextran ladder external standard 를 이용하여 2-AB 표지된 N-glycan 의 구조의 GU 값을 얻고 이를 온라인 데이터베이스 (GlycoBase) 검색을 통해 총 12 종의 N-glycan 구조를 예측하였다. QTOF-MS 를 이용하여 m/z 실험값과 분자식을 기반으로 하는 m/z 이론값 간의 비교분석을 통해 예측한 구조를 확인하였다. 추가적으로 exoglycosidase 를 이용하여 2-AB 표지된 N-glycan 내 당사슬 결합 방식 규명을 수행하였다. 3 회의 반복실험에서 12 종의 2-AB 표지 N-glycan 들 중 9 종의 RSD (%) 값이 10% 미만으로 나타냄에 따라 본 분석법의 재현성을 검증 하였다. 따라서 본 연구에서 수행한 N-glycan 분석법은 향후 바이오의약품의 품질관리에 기여할 것이라 기대된다.

V. 참고문헌

1. Leurs U, Mistarz UH, & Rand KD (2015) Getting to the core of protein pharmaceuticals – Comprehensive structure analysis by mass spectrometry. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93(0):95–109.
2. Sethuraman N & Stadheim TA (2006) Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology* 17(4):341–346.
3. Kilgore BR, Lucka AW, Patel R, Andrien Jr BA, & Dhume ST (2008) Comparability and monitoring immunogenic N-linked oligosaccharides from recombinant monoclonal antibodies from two different cell lines using HPLC with fluorescence detection and mass spectrometry. *Post-translational Modifications of Proteins*, (Springer), pp 333–346.
4. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, & Rudd PM (2010) A systematic approach to protein glycosylation analysis: a

- path through the maze. *Nature chemical biology* 6(10):713–723.
5. Morelle W & Michalski J–C (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat. Protocols* 2(7):1585–1602.
 6. Shang TQ, *et al.* (2014) Development and Application of a Robust N–Glycan Profiling Method for Heightened Characterization of Monoclonal Antibodies and Related Glycoproteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103(7):1967–1978.
 7. Mathieu–Rivet E, *et al.* (2013) Exploring the N–glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* unravels novel complex structures. *Molecular & Cellular Proteomics* 12(11):3160–3183.
 8. Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, & Rudd PM (2007) Detailed structural analysis of N–glycans released from glycoproteins in SDS–PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions.

Glycobiology protocols, (Springer), pp 125–143.

9. Montesino R, *et al.* (2012) Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody Nimotuzumab through process development. *Biologicals* 40(4):288–298.
10. Houel S, *et al.* (2013) N- and O-glycosylation analysis of etanercept using liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry equipped with electron-transfer dissociation functionality. *Analytical chemistry* 86(1):576–584.
11. Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, & Rudd PM (2008) GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics* 24(9):1214–1216.

Abstract

Etanercept N-glycosylation Analysis using HPLC-FLD, Q-TOF-MS and exoglycosidase array digestion

Sae Bom Lee

Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis

The Graduate School

Seoul National University

Etanercept is a therapeutic glycoprotein that contains N-glycans on its asparagine residue of polypeptide chain. N-glycans that attached to the therapeutic glycoprotein have structural microheterogeneity and exert influence on drug stability, efficacy and immunogenicity. Thus, qualitative and quantitative analyses characterizing N-glycan microheterogeneity play vital role in quality control of therapeutic glycoproteins.

In the current study, structure elucidation and relative quantification of N-glycans in Etanercept were performed using liquid chromatography/fluorescence (LC/FLR) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) methods. At first, N-glycans were released by peptide N-glycosidase F followed by 2-aminobenzamide (2-AB) fluorescence labeling. 2-AB labeled N-glycan mixture was purified through solid phase extraction (SPE) method and separated using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC-HPLC). The retention time of each glycan peak were converted to glucose unit (GU) by comparison with 2-AB labeled dextran ladder, and the preliminary glycan structures were assigned by searching through Glycobase. These structures were confirmed by mass value obtained from quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF-MS). The linkage information was determined by exoglycosidase array digestions. The reproducibility of this analytical method was validated by

relative standard deviation (RSD,%) of relative peak intensity (%) acquired from 3 replicates.

Keywords: therapeutic glycoprotein, N-glycan, exoglycosidase, fluorescence, mass spectrometry

Student Number: 2013-23465