



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월04일  
(11) 등록번호 10-1498801  
(24) 등록일자 2015년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 27/62 (2006.01) C12Q 1/00 (2006.01)  
G01N 33/48 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0083647  
(22) 출원일자 2013년07월16일  
심사청구일자 2013년07월16일  
(65) 공개번호 10-2014-0032871  
(43) 공개일자 2014년03월17일  
(30) 우선권주장  
JP-P-2012-197908 2012년09월07일 일본(JP)  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2006145519 A\*  
JP2012058002 A  
JP2010133707 A  
JP2010256101 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
도꾸리쯔교세이호징 리가가쿠 켄큐소  
일본국 사이타마현 와코시 히로사와 2-1  
가부시키가이샤 시마즈세이사쿠쇼  
일본 교토후 교토시 나카교쿠 니시노교쿠와바라쵸 1번쨰  
(72) 발명자  
우에다 고지  
일본 사이타마현 와코시 히로사와 2-1도꾸리쯔교세이호징 리가가쿠 켄큐소 내  
도야마 아츠히코  
일본 교토후 교토시 나카교쿠 니시노교쿠와바라쵸 1번쨰 가부시키가이샤 시마즈세이사쿠쇼 내  
(74) 대리인  
장수길, 박충범, 이중희

전체 청구항 수 : 총 10 항

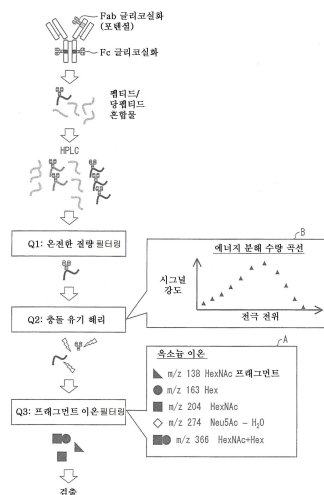
심사관 : 이에리

(54) 발명의 명칭 당쇄 구조의 해석 방법

(57) 요약

검출 감도 좋게, 당쇄 구조를 결정할 수 있는 해석 방법을 제공하기 위해서, 본 발명에 관한 방법은, CID 에너지의 값을 변화시키면서 3단계 4중극 질량 분석 측정을 행하는 공정과, 특정한 프로덕트 이온의 각각에서의 CID 에너지와 측정량의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는, 에너지 분해 프로파일을 작성하는 공정과, 참조 프로파일을 준비하는 공정과, 얻어진 에너지 분해 프로파일을 참조 프로파일과 비교함으로써, 시료의 당쇄 구조를 동정하는 공정을 포함한다.

대표도 - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

당쇄를 갖는 시료에서의 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서,

CID 에너지의 값을 변화시키면서 MS/MS 측정을 행하는 공정으로서, 상기 시료의 특정한 프로덕트 이온을, CID 에너지의 각 값에서 측정하는 측정 공정과,

상기 특정한 프로덕트 이온의 각각에서의 CID 에너지와 측정량과의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 에너지 분해 프로파일을 작성하는 작성 공정과,

당쇄를 갖는 구조 기지의 참조 시료에서의, 상기 특정한 프로덕트 이온과 동종의 프로덕트 이온의 측정량과, CID 에너지의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 참조 프로파일을 준비하는 준비 공정과,

상기 작성 공정에 의해 얻어진 상기 에너지 분해 프로파일을 상기 참조 프로파일과 비교함으로써, 상기 시료의 당쇄 구조를 동정하는 동정 공정을 포함하고,

상기 특정한 프로덕트 이온은, 양성자화한 단당 또는 이당에서 유래하는 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하고,

상기 측정 공정에서는, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는 질량 분석 장치를 이용하여 MS/MS 측정을 행하고,

상기 시료는, 당펩티드인 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 특정한 프로덕트 이온은, m/z가 각각 163, 168, 186, 204, 274, 290, 292, 308, 366, 454 및 470인 프로덕트 이온으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하는 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 3**

제2항에 있어서,

상기 특정한 프로덕트 이온은, m/z가 각각 163, 204, 274 및 366인 프로덕트 이온을 포함하는 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 특정한 프로덕트 이온은, m/z가 138인 프로덕트 이온을 더 포함하고,

상기 작성 공정에서는, m/z가 138인 상기 프로덕트 이온의 측정량을 이용해서 각 수량 곡선을 표준화하여, 상기 에너지 분해 프로파일을 작성하는 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 시료에는, 농도가 기지인 당쇄를 갖는 표준 시료가 첨가되어 있고,

상기 특정한 프로덕트 이온은, m/z가 138인 프로덕트 이온을 더 포함하고,

상기 시료에서의 m/z가 138인 상기 프로덕트 이온의 측정량과, 상기 표준 시료에서의 m/z가 138인 상기 프로덕트 이온의 측정량의 비교에 의해, 상기 시료의 정량을 행하는 정량 공정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서,

상기 정량 공정에서는, m/z가 138인 상기 프로덕트 이온의 상기 측정량이 최대가 되는 CID 에너지에서의, 상기 시료 및 상기 표준 시료 각각의, m/z가 138인 프로덕트 이온의 상기 측정량에 기초하여, 상기 시료의 정량을 행하는 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

상기 최대가 되는 CID 에너지의 값은, 당쇄를 갖는 복수의 시료에 대해서, m/z가 138인 프로덕트 이온을 CID 에너지의 값을 변화시키면서 MS/MS 측정에 의해 미리 측정하고, 그 측정량이 최대가 되는 CID 에너지의 값과, 상기 시료의 프리커서 이온의 m/z의 값을 이용하여 선형 회귀 분석에 의해 작성된 검량선으로부터, 해석 대상인 상기 시료의 프리커서 이온의 m/z의 값에 기초하여 추정되는 값인 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 측정 공정에서는, 3단계 4중극 질량 분석계를 이용하여 MS/MS 측정을 행하는 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 당펩티드는, N형 당쇄를 갖는 당펩티드인 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 당펩티드는, O형 당쇄를 갖는 당펩티드인 것을 특징으로 하는, 당쇄 구조의 해석 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은, 당쇄 구조의 해석 방법에 관한 것으로, 상세하게는, 3단계 4중극 질량 분석 측정에 의한 당쇄 구조의 해석 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 전 세계에서 300억 달러나 판매가 이루어지고 있는 치료용 항체에서의 특허의 존속 기간의 만료에 대비하여, 어떻게 하면 그 생물학적 유사 대체물이 FDA에서 인가될 수 있는지에 대해 흥미가 높아지고 있다. 이에 관해, 생물학적 유사물의 평가에 관한 안내의 최초 초안인, 2012년 2월에 미국 식품 의약품국(FDA)로부터 발행되었다. 그 중에서 강조되어 있던 것은, 생물 의약품의 유효성 및 안전성에 크게 영향을 미칠 수 있는 근소한 구조(특히 당 부가 패턴)의 차이를 평가하는 것의 중요성, 및, 로트간에서의 편차를 이해하기 위해, 복수의 로트를 이용하여 구조 해석을 실시해야 한다는 점이다.

[0003] 치료용 항체에 관해서는, 중쇄의 보존 영역(Fc)에 있는 Asn<sub>297</sub>에서 N-글리코실화가 이루어지는 공통 서열이 존재하여, N-글리코실화의 특정한 구조는 치료용 항체의 유효성 및 안전성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 코어 구조에 있어서 푸코스 부가가 없는 경우, 항체 의존성 세포 독성이 10배로 높아지는 것으로 나타

났다. 또한, 최근의 연구에 따르면, 글리코릴뉴라민산(Neu5Gc) 및 갈락토오스- $\alpha$ 1,3-갈락토오스( $\alpha$ -Gal 에피토프) 등의 비인간 올리고당 모티프는 면역원성이며, 특정한 IgE를 발현하고 있는 환자에게 있어서는 아나필락시를 야기할 수 있음이 명백해졌다. 한층 더 진행된 연구에 따르면,  $\alpha$ -Gal 에피토프의 면역원성은, 주로, 항원 결합 영역(Fab) 내에 생기는 여분의 N-글리칸에 의한 것임이 명백해졌다. 이 같은 사실을 감안하여, 항체에서의 당 부가의 불균질성 및 그 생물학적 영향을 광범위하게 조사할 필요가 있다.

[0004] 여기서, 당단백질의 당쇄에 대해서 설명하면, 당단백질의 당쇄는, 아스파라긴 잔기에 당쇄가 결합하는 N-글리코시드 결합 당쇄(N형 당쇄), 및 세린 및 트레오닌 등과 결합하는 O-글리코시드 결합 당쇄(O형 당쇄)의 2종으로 대별된다. N형 당쇄는 이하의 구조식에 나타내는 공통의 코어 구조를 갖고 있으며, 아스파라긴과 결합하는 말단은 환원 말단, 반대측의 말단은 비환원 말단이라고 불리고 있다.

**화학식 1**



[0005]

[0006] N형 당쇄에는, 코어 구조의 비환원 말단에 만노오스가 복수 결합하는 하이-만노오스형, 비환원 말단에 N-아세틸 글루코사민(이하, GlcNAc라고 함)의 가치를 1개 또는 복수 개 갖고, 또한 각각의 가치에 갈락토오스, 시알산 및 푸코스 등이 결합한 구조를 갖는 콤플렉스형, 및 하이-만노오스형 및 콤플렉스형의 양쪽의 가치를 갖는 하이브리드형이 있다. 콤플렉스형 및 하이브리드형에 대해서는, 코어 구조의 분기점이 되는 만노오스에 GlcNAc가 결합할 수 있는 것(바이섹트 GlcNAc), 및 환원 말단의 GlcNAc에 푸코스가 결합할 수 있는 것(코어 푸코스) 등이 잘 알려져 있다.

[0007] 이러한 구조 다양성은, 단일의 당단백질에서도 관측되어, Glycoform Heterogeneity 등으로 불린다. 예로서, N형 당쇄 결합 부위를 1개소 갖는 인간 혈청중 면역 글로불린 G의 당쇄 구조의 해석으로부터는, 34종류 정도의 당쇄 구조가 존재하는 것으로 보고되어 있다(비특허문헌 1).

[0008] 당단백질에 있어서 당쇄 구조의 차이가 그 기능에 크게 영향을 미치는 것이, 상술한 바와 같이 최근 들어 밝혀졌고(예를 들면, 비특허문헌 2), 다양성이 있는 당쇄 구조를 정량적으로 분석하여, 어떤 구조가 어떤 비율로 포함되는지를 고 효율로 프로파일하는 방법이 요구되고 있다.

[0009] 당쇄 구조를 해석하는 방법으로는, 당단백질로부터 화학적 또는 효소적으로 N형 당쇄를 유리시켜, 화학 수식(라벨화)을 실시하여 정제한 뒤에, HPLC 및 MALDI-TOF MS 등의 질량 분석법을 조합하여 검출하는 방법이 있다. 이 방법은, 라벨화 당쇄가 역상 또는 순상 HPLC에 의해 구조마다 분리되기 쉬운 점, 정제에 의해 협잡물이 제거되어 고감도로 측정할 수 있는 등의 이점이 있는 한편, 전 처리가 번잡한 점, 당단백질에 복수의 당쇄 부가 부위가 있는 경우에, 당쇄 부가 부위마다의 정보를 얻을 수 없는 등의 단점이 있다.

[0010] 한편, 당단백질을 트립신 등의 효소에 의해 단편화하고, 단편화된 펩티드에 당쇄가 결합한 당펩티드의 상태에서 측정에 제공하는 방법이 실시되고 있다(특허문헌 1). 이때 측정에 이용되는 것은 주로 나노 HPLC-ESI를 이온원으로 한 질량 분석계이고, 당펩티드 유래의 시그널을 적산하여 정량하는 것 외에, MS<sup>n</sup> 측정에 의한 당쇄 부가 부위의 결정 및 당쇄 구조의 추정도 가능하다. 또한, 3단계 4중극형의 질량 분석계를 이용함으로써, 당펩티드마다 특이적인 개별 이온을 멀티플 리액션 모니터링(MRM)법으로 정량성 좋게 측정하는 방법도 보고되어 있다(비특허문헌 3).

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0011] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 제2008-309501호 공보(2008년 12월 25일 공개)
- (특허문헌 0002) 일본 특허 공개 제2012-58002호 공보(2012년 3월 22일 공개)
- (특허문헌 0003) 일본 특허 공개 제2005-265697호 공보(2005년 9월 29일 공개)

(특허문헌 0004) 일본 특허 공개 제2006-145519호 공보(2006년 6월 8일 공개)

(특허문헌 0005) WO2006/043405(2006년 4월 27일 공개)

**비특허문헌**

- [0012] (비특허문헌 0001) Flynn, G. C. et al., Naturally occurring glycan forms of human immunoglobulins G1 and G2., Mol Immunol, 2010, 47, 2074-2082.
- (비특허문헌 0002) Shinkawa, T. et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity., J Biol Chem, 2003, 278, 3466-3473.
- (비특허문헌 0003) Kurogochi, M. et al., Sialic acid-focused quantitative mouseserum glycoproteomics by multiple reaction monitoring assay., Mol Cell Proteomics, 2010, 9, 2354-2368.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0013] 그러나 종래의 방법으로는, 당쇄가 부가되어 있지 않은 펩티드와 당펩티드의 혼합물에서의 당펩티드의 검출 감도가 낮다는 문제점, 나아가, 당펩티드의 MS/MS 분석에 의해서도 당쇄 구조를 확인하는 것이 곤란하다는 문제점이 있다. 또한, 당펩티드의 상태에서는, 검출 감도가 낮고, 당쇄 구조의 결정이 용이하지 않다는 문제가 있다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 상기한 문제점을 감안하여 이루어진 것이며, 그 목적은, 검출 감도가 우수한 당쇄 구조의 해석 방법을 제공하는 것에 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0015] 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법은, 상기 과제를 해결하기 위해서, 당쇄를 갖는 시료에서의 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, CID 에너지의 값을 변화시키면서 MS/MS 측정을 행하는 공정으로서, 상기 시료의 특정한 프로덕트 이온을, CID 에너지의 각 값에서 측정하는 측정 공정과, 상기 특정한 프로덕트 이온의 각각에서의 CID 에너지와 측정량과의 관계를 나타내는 수량 곡선(yield curve)을 포함하는 에너지 분해 프로파일을 작성하는 작성 공정과, 당쇄를 갖는 구조 기지의 참조 시료에서의, 상기 특정한 프로덕트 이온과 동종의 프로덕트 이온의 측정량과, CID 에너지의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 참조 프로파일을 준비하는 준비 공정과, 상기 작성 공정에 의해 얻어진 상기 에너지 분해 프로파일을 상기 참조 프로파일과 비교함으로써, 상기 시료의 당쇄 구조를 동정하는 동정 공정을 포함하고, 상기 특정한 프로덕트 이온은, 양성자화한 단당 또는 이당에서 유래하는 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하고, 상기 측정 공정에서는, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는 질량 분석 장치를 이용하여 MS/MS 측정을 행하는 구성이다.

**발명의 효과**

- [0016] 본 발명에 따르면, 검출 감도 좋게 시료에서의 당쇄 구조를 결정할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0017] 도 1은 3단계 4중극 질량 분석 장치를 이용한, 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선의 취득 도식을 나타낸 개략도이다.
- 도 2는 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일의 구체예를 나타내는 도이다.
- 도 3은 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일의 다른 구체예를 나타내는 도이다.
- 도 4는 최적 CID 에너지값과 프리커서 이온의 m/z값의 상관을 나타내는 산포도이다.

도 5는 측정 대상 시료의 주입 농도와, 내부 표준의 농도의 상관을 나타내는 도이다.

도 6은 소화한 세투스맵(cetuximab)에서, m/z=138인 옥소늄 이온을 모니터링한 MRM 크로마토그램을 나타낸 도이다.

도 7은 소화한 세투스맵(cetuximab)에서의, 갈락토오스-1,3-갈락토오스 또는 N-글리코실뉴라민산 모티프를 포함하는 당쇄로부터 얻어진 MRM 크로마토그램을 나타낸 도이다.

도 8은 Lewis x 모티프를 포함하는 2종의 당펩티드에서의, 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 나타낸 도면이다.

도 9는 치료용 항체의 로트간에서의 당 형태의 불균질성에 대해서 해석한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 0형 당펩티드에서의 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일의 구체예를 나타내는 도이다.

도 11은 선형 회귀 분석에 의한 패턴의 동일성의 예측에 이용한 당쇄 구조를 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0018] 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법의 일 실시 형태에 대해서 설명한다.
- [0019] 본 실시 형태에서의 당쇄 구조의 해석 방법은, 구조 중에 당쇄를 갖는 시료의 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, CID 에너지의 값을 변화시키면서 MS/MS 측정을 행하는 공정으로서, 시료의 특정한 프로덕트 이온을 CID 에너지의 각 값에서 측정하는 측정 공정과, 특정한 프로덕트 이온의 각각에서의 CID 에너지와 측정량의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 에너지 분해 프로파일을 작성하는 작성 공정과, 당쇄를 갖는 구조 기지의 참조 시료에서의, 특정한 프로덕트 이온과 동종의 프로덕트 이온의 측정량과 CID 에너지의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 참조 프로파일을 준비하는 준비 공정과, 작성 공정에 의해 얻어진 에너지 분해 프로파일을 참조 프로파일과 비교함으로써, 시료의 당쇄 구조를 동정하는 동정 공정을 포함하고, 특정한 프로덕트 이온은, 양성자화한 단당 또는 이당에서 유래하는 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하고, 측정 공정에서는 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는 질량 분석 장치를 이용하여 MS/MS 측정을 행하는 것이다.
- [0020] 본 해석 방법은, 상기한 측정 공정 및 작성 공정과 같은 공정에 의해 얻어지는 에너지 분해 프로파일의 패턴이, 당쇄 구조에 의해서 정해지고, 또한 당쇄 구조마다 다른 것임을 본원 발명자 등이 알아낸 것에 기초하여 완성시킨 것이다.
- [0021] 이하의 설명에서는, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는 질량 분석 장치로서 3단계 4중극 질량 분석계를 이용하여 측정을 행하는 경우를 예로 들어 설명하지만, 질량 분석계는 이것에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] (1. 측정 공정)
- [0023] 측정 공정은, CID 에너지의 값을 변화시키면서 3단계 4중극 질량 분석 측정을 행하는 공정으로서, CID 에너지의 각 값에서 특정한 프로덕트 이온을 측정하는 공정이다.
- [0024] 여기서, "CID 에너지"란, 3단계 4중극 질량 분석 장치의 제2 4중극에서, 측정 대상의 시료에 대응하는 이온(프리커서 이온)에 대하여 CID(collision induced dissociation: 충돌 유기 해리)를 일으킬 때에 가해지는 에너지를 가리킨다. CID 에너지를 조작하기 위한 파라미터는 사용하는 장치에 따라 다를 수 있는 것이다. 일반적으로는, CID를 행하는 셀 내에서 이온을 진동시키기 위한 전압을 나타낸다. 또한, 본 명세서에서 "프로덕트 이온"이란, 프리커서 이온에 대해서 CID를 행함으로써 생성되는 프래그먼트 이온을 가리킨다. 또한, 본 명세서에서 "m/z"는, 질량수(m)와 전하(z)의 비를 나타내는 것이다.
- [0025] CID 에너지를 변화시키면서 프로덕트 이온을 측정할 때에, CID 에너지는, 사용하는 장치에 의해 적당한 범위로 적절하게 설정할 수 있지만, 이하와 같이 변화시키는 것이 바람직하다.
- [0026] (i) 프리커서 이온의 상대 강도가 100(즉 프리커서 이온만이 검출됨)이 되는 에너지에서부터, 프리커서 이온의 상대 강도가 0이 되는 에너지까지 변화시킨다.
- [0027] (ii) 검출하고자 하는 각 프로덕트 이온의 검출 강도가 최대가 되는 에너지를 포함하도록 변화시킨다.
- [0028] (iii) 프로덕트 이온마다, 그것이 검출되는 최저한의 에너지로부터, 검출하고자 하는 각 프로덕트 이온의 검출 강도가 최대가 되는 에너지를 포함하고, 각 프로덕트 이온의 검출 강도가 0이 될 때까지의 에너지의 범위에서

변화시킨다.

- [0029] 본 실시 형태에서, 측정 대상이 되는 특정한 프로덕트 이온은, 시료의 프로덕트 이온 중, 양성자화한 단당 또는 이당에서 유래하는 프로덕트 이온이며, 예를 들면,  $m/z$ 가 100 내지 500의 범위에 있는 프로덕트 이온이다. 해당 프로덕트 이온의 구체예로는,  $m/z$ 가 각각 163, 168, 186, 204, 274, 290, 292, 308, 366, 454 및 470인 프로덕트 이온을 들 수 있다.  $m/z$ 가 163인 프로덕트 이온은, 헥소스(Hex)의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 168인 프로덕트 이온은, N-아세틸헥소사민- $2H_2O$ (HexNAc- $2H_2O$ )의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 186인 프로덕트 이온은, N-아세틸헥소사민- $H_2O$ (HexNAc- $H_2O$ )의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 204인 프로덕트 이온은, N-아세틸헥소사민(HexNAc)의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 274인 프로덕트 이온은, 5-아세틸뉴라민산- $H_2O$ (Neu5Ac- $H_2O$ )의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 290인 프로덕트 이온은, 5-글리콜릴뉴라민산- $H_2O$ (Neu5Gc- $H_2O$ )의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 292인 프로덕트 이온은, 5-아세틸뉴라민산(Neu5Ac)의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 308인 프로덕트 이온은, 5-글리콜릴뉴라민산(Neu5Gc)의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 366인 프로덕트 이온은, N-아세틸헥소사민+헥소스(HexNAc+Hex)의 옥소늄 이온에 상당한다.  $m/z$ 가 454인 프로덕트 이온은, 5-아세틸뉴라민산+헥소스(Neu5Ac+Hex)의 옥소늄 이온에 상당한다. 그리고,  $m/z$ 가 470인 프로덕트 이온은, 5-글리콜릴뉴라민산+헥소스(Neu5Gc+Hex)의 옥소늄 이온에 상당한다.
- [0030] 측정 대상이 되는 프로덕트 이온은 상기에 열거한 것에 한정되는 것이 아니며, 예를 들면  $m/z$ 가 138인 프로덕트 이온 등을 측정해도 좋다. 또한,  $m/z$ 가 500을 초과하는 프로덕트 이온을 측정해도 좋다.
- [0031] "특정한 프로덕트 이온은,  $m/z$ 가 각각 163, 204, 274 및 366인 프로덕트 이온을 포함한다"라는 경우, 적어도  $m/z$ 가 각각 163, 204, 274 및 366인 프로덕트 이온이 측정되면 되고, 추가적으로, 다른  $m/z$ 를 갖는 프로덕트 이온을 측정해도 좋다. 예를 들면, 이들 4개의 프로덕트 이온 외에,  $m/z$ 가 138인 프로덕트 이온을 더 측정해도 좋다. 즉, 측정 공정에서는,  $m/z$ 가 각각 163, 204, 274 및 366인 프로덕트 이온만을 측정하는 것일 수도 있고,  $m/z$ 가 각각 138, 163, 204, 274 및 366인 프로덕트 이온만을 측정하는 것일 수도 있고, 또 다른 프로덕트 이온도 포함시켜 측정하는 것일 수도 있다. 또한,  $m/z$ 가 138인 프로덕트 이온은, HexNAc의 단편의 옥소늄 이온에 상당하는 것이다.
- [0032] 본 해석 방법에서는 복수의 수량 곡선을 포함하는 에너지 분해 프로파일을 작성하기 위해, 측정 대상이 되는 프로덕트 이온은, 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하고, 적합하게는,  $m/z$ 가 각각 163, 168, 186, 204, 274, 290, 292, 308, 366, 454 및 470인 프로덕트 이온으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하고, 보다 적합하게는,  $m/z$ 가 각각 163, 168, 186, 274, 290, 292, 308, 366, 454 및 470인 프로덕트 이온으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 프로덕트 이온과,  $m/z$ 가 204인 프로덕트 이온을 포함하고, 더 적합하게는,  $m/z$ 가 각각 163, 204, 274 및 366인 프로덕트 이온을 포함한다.
- [0033] CID 에너지의 값을 변화시키면서 각 값에서 프로덕트 이온을 측정할 때, CID 에너지의 값의 변화 폭에 특별히 제한은 없으며, 예를 들면, 3 내지 5V씩 변화시킬 수 있다.
- [0034] 3단계 4중극 질량 분석 장치를 이용함으로써, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)에 의해 생기는 이하의 문제를 회피할 수 있다. 예를 들면 4중극 이온 트랩형 질량 분석계와 같은 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기는 질량 분석계를 이용한 경우, MS/MS 측정시에, 저질량 영역(예를 들면,  $m/z=100$  내지 300)의 프래그먼트 이온의 검출 감도는 프리커서 이온의  $m/z$ 에 의존한다. 그 때문에, 예를 들면 측정 대상의 시료가 당펩티드인 경우에는, 당쇄 외에도 펩티드 부분이 포함되기 때문에, 프리커서 이온의  $m/z$ 가 커져, 저질량 영역의 프래그먼트 이온군이 검출되지 않거나, 또는, 이들 검출 감도가 낮아진다는 문제가 생긴다. 또한, 측정 대상의 시료가 당펩티드인 경우에는, 동일한 당쇄 구조를 갖는 당펩티드라도, 펩티드 부분의 아미노산 서열의 차이에 의해, 당펩티드 전체의 질량이 다를 수 있다. 프리커서 이온의  $m/z$ 가 상이하면, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)에 의해, 저질량 영역의 프래그먼트 이온의 검출 감도가 다르다. 그 때문에, 당쇄 구조가 동일하고 아미노산 서열이 서로 다른 당펩티드로부터 얻어지는 후술하는 수량 곡선 및 에너지 분해 프로파일은, 서로 다른 것으로 상정된다. 그 때문에, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는, 3단계 4중극 질량 분석계를 이용하여 MS/MS 측정을 행하는 것이 바람직하다. 또한, 질량 분석 장치는, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않고, 동일한 프리커서 이온을 대상으로 CID 에너지를 바꾸면서 연속적으로 MS/MS 측정 데이터를 취득하는 것이 가능하면 되며, 3단계 4중극 질량 분석계에 한정되는 것이 아니다. 또한, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는 질량 분석계로는, 저질량 영역(예를 들면,  $m/z=100$  내지 300)의 프래그먼트 이온의 검출 감도가 프리커서 이온의  $m/z$ 에 의존하지 않는 질량 분석계이면 된다.

- [0035] 이온화법은, 예를 들면, FAB(고속 원자 충격법), CI(화학 이온화법), ESI(일렉트로 스프레이 이온화법), MALDI(매트릭스 지원 레이저 탈리 이온화법), 및 APCI(대기압 화학 이온화법) 등을 이용할 수 있고, 그 중에서도 ESI가 바람직하게 이용된다. 또한, ESI법에는 마이크로 스프레이법 및 나노 스프레이법이 있는데, 나노 스프레이법이 바람직하게 이용된다.
- [0036] 본 해석 방법의 대상이 되는 시료는, 당쇄를 갖는 시료로서, 3단계 4중극 질량 분석 측정에 제공할 수 있는 것이면 특별히 제한은 없지만, 당단백질 및 당펩티드가 바람직하게 이용된다. 당단백질 및 당펩티드는, 생체 조직 또는 세포 등으로부터 얻어진 것이어도 좋고, 인공적으로 합성한 단백질 또는 펩티드에 당쇄를 부가한 것이어도 좋다. 또한, 당펩티드는, 당단백질을 산 가수분해함으로써, 또는 효소 분해함으로써 얻은 것이어도 좋다. 당단백질을 분해하여 당펩티드를 얻는 경우, 당단백질에서 당쇄가 부가되어 있는 개소는, 1개소인 경우에 한하지 않고, 2개소 이상일 수도 있다. 또한, 당단백질을 분해하여 당펩티드를 얻는 경우, HPLC 등으로 분리 정제된 것을 이용하는 것이 바람직하다. 또한, 당단백질 및 당펩티드에서의 당쇄는, N형 당쇄 및 O형 당쇄 중 어느 것이어도 좋다. 그러나 N형 당쇄는 공통의 코어 구조를 갖고 있기 때문에, 후술하는 에너지 분해 프로파일의 베리에이션이 O형 당쇄인 경우보다 적을 것이 예상된다. 그 때문에, O형 당쇄보다 당쇄 구조의 동정이 용이해진다. 따라서, 본 해석 방법은, N형 당쇄를 갖는 당단백질 또는 당펩티드에 대해 보다 바람직하게 적용할 수 있다.
- [0037] (2. 작성 공정)
- [0038] 작성 공정에서는, 특정한 프로덕트 이온의 각각에서의 CID 에너지와 측정량의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 에너지 분해 프로파일(에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일이라고도 함)을 작성한다.
- [0039] CID 에너지와 프로덕트 이온의 측정량의 관계를 나타내는 수량 곡선(에너지 분해 수량 곡선이라고도 함)은, 예를 들면, CID 에너지의 값을 x축으로 하고, 대상 프로덕트 이온의 측정량(카운트수)을 y축으로 하여 플롯함으로써 작성할 수 있다. 플롯하는 대상 프로덕트 이온의 측정량은, 다른 프로덕트 이온에 대한 상대량일 수도 있고, 측정되는 모든 프로덕트 이온의 총 카운트수에서의 비율일 수도 있다. 본 실시 형태의 일 양태에서는, m/z가 138인 프로덕트 이온을 측정하고, 이 프로덕트 이온의 측정량을 이용하여 표준화를 행하여, 각 수량 곡선을 작성하고 있다. 보다 상세하게는, 상술한 측정 공정에서, m/z가 138인 프로덕트 이온에 대해서도 동시에 측정을 행하여, 이 프로덕트 이온의 측정량이 최대가 되는 CID 에너지를 결정한다. 그리고, 결정된 CID 에너지에서의 이 프로덕트 이온의 측정량을 100으로 하고, 다른 특정한 프로덕트 이온의 측정량을 그 상대치로서 나타냄으로써, 다른 특정한 프로덕트 이온의 측정량의 표준화를 행한다.
- [0040] 에너지 분해 프로파일은, 하나의 시료에 관하여, 상술한 특정한 프로덕트 이온의 각각의 수량 곡선을 통합한 것이다. 즉, 측정된 특정한 프로덕트 이온이 4 종류인 경우에는, 에너지 분해 프로파일은 4개의 수량 곡선을 포함하여 구성되어 있다.
- [0041] (3. 준비 공정)
- [0042] 준비 공정에서는, 당쇄를 갖는 구조 기지의 참조 시료에서의, 측정 공정에서 측정되는 특정한 프로덕트 이온과 동종의 프로덕트 이온의 측정량과 CID 에너지의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 참조 프로파일을 준비한다.
- [0043] 본 명세서에서, "참조 프로파일을 준비한다"란, 참조 프로파일을 신규로 작성하는 경우뿐만 아니라, 이미 작성이 끝난 참조 프로파일을 이용 가능한 상태로 하는 경우도 포함하는 것이다. "이용 가능한 상태로 한다"란, 이미 작성이 끝난 참조 프로파일을 취득하거나, 참조 프로파일이 보존되어 있는 서버 등에 액세스할 수 있는 상태로 하는 것을 들 수 있다. 이미 작성이 끝난 참조 프로파일은, 다른 사람이 작성한 것일 수도 있다. 또한, "동종의 프로덕트 이온"이란, m/z가 동일한 프로덕트 이온을 가리킨다.
- [0044] 참조 프로파일은, 당쇄 부분을 포함해서, 구조가 기지인 참조 시료로부터 얻어진 것이며, 에너지 분해 프로파일과 동일한 성질의 프로파일이다. 또한, 본 명세서에서 "구조"란, 당쇄에서는 당쇄의 배열 및 각 당의 연결 위치를 의미하고 있으며, 단백질 및 펩티드에 대해서는 그 아미노산 서열 및 당쇄의 결합 위치를 뜻하고 있다.
- [0045] 여기서, 참조 시료는, 본 해석 방법의 해석 대상이 되는 시료와 동종의 시료이다. 즉, 해석 대상이 되는 시료가 당펩티드인 경우에는, 참조 시료도 당펩티드이다. 또한, 해석 대상이 되는 시료가 N형 당쇄를 갖는 당펩티드인 경우에는, 참조 시료도 N형 당쇄를 갖는 당펩티드이다. 다만, 예를 들면 당펩티드인 경우에, 참조 시료와 해석 대상의 시료에 있어서 펩티드의 아미노산 서열이 동일할 필요는 없다.



- [0046] 참조 프로파일은, 상술한 측정 공정 및 작성 공정에서의 방법에 준하여 작성할 수 있다. 즉, CID 에너지의 값을 변화시키면서, 3단계 4중극 질량 분석 측정을 행하는 것으로서, 참조 시료의 프로덕트 이온 중 상술한 특정한 프로덕트 이온과 동종의 프로덕트 이온을 CID 에너지의 각 값에서 측정하고, 측정한 프로덕트 이온의 각각에 대하여, CID 에너지와 프로덕트 이온의 측정량의 관계를 나타내는 수량 곡선을 작성하여, 이들을 통합한 참조 프로파일을 작성한다. 참조 프로파일을 작성하기 위해서 측정하는 프로덕트 이온은, 상술한 특정한 프로덕트 이온과 동종의 프로덕트 이온이 포함되어 있으면 되고, 다른 m/z를 갖는 프로덕트 이온을 더 측정해도 된다. 또한, 해석 대상의 시료에서의 에너지 분해 프로파일에 있어서, 수량 곡선이 표준화되어 있는 경우에는, 참조 프로파일에서도 각 수량 곡선을 마찬가지로 하여 표준화한 것을 준비하면 된다.
- [0047] 이와 같이 하여 얻어지는 참조 프로파일은, 그 작성에 이용된 구조 기지의 시료와 관련지어진다. 즉, 어떤 참조 프로파일은, 그 작성에 이용된 시료에서의 당쇄 구조와 관련지어진다. 각 참조 프로파일은, 포함되는 수량 곡선의 패턴의 차이에 의해 서로 구별할 수 있는 것으로 된다. 따라서, 시료에서의 당쇄 구조의 차이에 의해서로 다른 패턴의 참조 프로파일이 작성되게 된다.
- [0048] 후술하는 바와 같이, 동정 공정에서는, 해석 대상의 시료의 에너지 분해 프로파일을 참조 프로파일과 비교하여 동일한 참조 프로파일이 발견된 경우에, 해석 대상의 시료의 당쇄 구조가 참조 프로파일에 관련지어져 있는 당쇄 구조라고 동정한다. 따라서, 동정 공정에서 당쇄 구조를 동정할 수 있는지 여부는, 해당 당쇄 구조에 대응하는 참조 프로파일이 준비되어 있는지 여부에 의존한다. 따라서, 보다 많은 당쇄 구조에 대해서 참조 프로파일을 작성해 두는 것이 바람직하다.
- [0049] (4. 동정 공정)
- [0050] 동정 공정에서는, 작성 공정에 의해 얻어진 에너지 분해 프로파일을 참조 프로파일과 비교함으로써, 해석 대상의 시료의 당쇄 구조를 동정한다.
- [0051] 구체적으로는, 작성 공정에 의해 얻어진 해석 대상의 시료의 에너지 분해 프로파일을 준비한 참조 프로파일과 비교한다. 그리고, 동일한 에너지 분해 프로파일을 나타내는 참조 프로파일이 발견된 경우에, 해석 대상의 시료의 당쇄 구조가 그 참조 프로파일에 관련지어진 당쇄 구조라고 동정한다. 동일한 에너지 분해 프로파일을 나타내는 참조 프로파일이 발견되지 않은 경우에는, 준비한 참조 프로파일에 관련지어진 당쇄 구조 이외의 당쇄 구조라고 판정한다.
- [0052] 에너지 분해 프로파일이 동일한지 여부의 판단은, 공지된 패턴 인식 기술을 이용하여 행하면 되며, 특정한 수법에 한정되는 것이 아니다. 공지된 패턴 인식 기술의 일례로는, 예를 들면, 선형 회귀 분석을 이용한 예측법 등을 들 수 있다.
- [0053] (5. 정량 공정)
- [0054] 본 실시 형태에서의 당쇄 구조의 해석 방법은, 상술한 각 공정 외에, 농도가 기지인 표준 시료를 이용하여 시료의 정량을 행하는 정량 공정을 더 포함하고 있다.
- [0055] 정량 공정은, 해석 대상인 시료에서의 m/z가 138인 프로덕트 이온의 측정량과, 농도가 기지인 표준 시료에서의 m/z가 138인 프로덕트 이온의 측정량의 비교에 의해, 해석 대상인 시료의 정량을 행하는 것이다. m/z가 138인 프로덕트 이온의 측정은, 이 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 된 CID 에너지에서 행해지는 것이 바람직하다. 또한, 본 명세서에서 "생성 효율이 최대가 된다"란, 생성 효율이 최대가 되는 것으로 추정되는 경우도 포함하는 것이다. 표준 시료의 농도는, UV의 흡광도 측정 등, 공지된 정량 기술에 의해 미리 측정해 두면 좋다. 해석 대상의 시료가 당펩티드인 경우에는, 표준 시료도 당펩티드인 것이 바람직하고, 해석 대상 시료의 당펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 당펩티드인 것이 보다 바람직하다.
- [0056] 후술하는 실시예에 나타낸 바와 같이, m/z=138의 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 되는 CID 에너지의 값과, 당펩티드의 m/z의 사이에는 매우 강한 직선적 상관이 있다. 그 때문에, m/z가 기지인 참조 시료에 대해서, m/z=138의 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 되는 CID 에너지의 값이 얻어지면, 그 값을 x로 하고, 참조 시료 m/z를 y로 하여, 계수 x/y를 해석 대상 시료의 m/z에 곱함으로써, 해석 대상 시료에서 m/z=138의 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 되는 CID 에너지의 값을 얻을 수 있다. m/z가 기지인 참조 시료에서의 m/z=138의 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 되는 CID 에너지의 값은, 이 참조 시료에 대해서 CID 에너지의 값을 변화시키면서 m/z=138의 프로덕트 이온의 측정을 행함으로써, 용이하게 얻을 수 있다. 여기서, 참조 시료의 구조가 해석 대상 시료의 구조와 동일한 것이면, 보다 정밀도 좋게 정량을 행할 수 있다.

- [0057] 또한,  $m/z$ 가 기지인 복수의 참조 시료 각각에 대하여  $m/z=138$ 의 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 되는 CID 에너지의 값을 구하고, 이들을 이용하여 선형 회귀 분석을 하여 검량선을 작성하여, 이 검량선 및 해석 대상 시료의  $m/z$ 에 기초하여, 해석 대상 시료에서의  $m/z=138$ 의 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 되는 CID 에너지의 값을 얻을 수 있다.
- [0058] 이상과 같이, 또한, 이하의 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명에 관한 해석 방법은, 당쇄를 포함하는 목적 물질을 시료 중에서 선택적이면서도 또한 고감도로 측정할 수 있는 방법으로 범용성이 매우 높다. 그 때문에, 당쇄를 표적으로 한 시험 및 연구 전반에 응용이 가능하다. 산업상에서는, 초거대 시장인 바이오 의약품의 당쇄 구조에 대한 품질 관리 시험의 필요성이 높아, 본 발명의 광범위한 이용이 기대된다.
- [0059] (정리)
- [0060] 이상과 같이, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법은, 당쇄를 갖는 시료에서의 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, CID 에너지의 값을 변화시키면서 MS/MS 측정을 행하는 공정으로서, 상기 시료의 특정한 프로덕트 이온을 CID 에너지의 각 값에서 측정하는 측정 공정과, 상기 특정한 프로덕트 이온의 각각에서의 CID 에너지와 측정량과의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 에너지 분해 프로파일을 작성하는 작성 공정과, 당쇄를 갖는 구조 기지의 참조 시료에서의 상기 특정한 프로덕트 이온과 동종의 프로덕트 이온의 측정량과 CID 에너지의 관계를 나타내는 수량 곡선을 포함하는 참조 프로파일을 준비하는 준비 공정과, 상기 작성 공정에 의해 얻어진 상기 에너지 분해 프로파일을 상기 참조 프로파일과 비교함으로써, 상기 시료의 당쇄 구조를 동정하는 동정 공정을 포함하고, 상기 특정한 프로덕트 이온은, 양성자화한 단당 또는 이당에서 유래하는 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하고, 상기 측정 공정에서는, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는 질량 분석 장치를 이용하여 MS/MS 측정을 행하는 구성이다.
- [0061] 상기 구성에 따르면, 해석 대상의 시료에 대해서, MS/MS 측정에서의 CID 에너지와 복수의 특정한 프로덕트 이온의 측정량과의 관계를 나타내는 에너지 분해 프로파일이 형성된다. 얻어진 에너지 분해 프로파일은, 별도로 준비한 참조 프로파일과 비교된다. 참조 프로파일은 구조 기지의 시료로부터 얻어진 것이기 때문에, 참조 프로파일에서는, MS/MS 측정에서의 CID 에너지와 특정한 프로덕트 이온의 측정량과의 관계를 나타내는 에너지 분해 프로파일과 당쇄 구조가 관련지어져 있다. 그 때문에, 얻어진 해석 대상의 시료에서의 에너지 분해 프로파일과 참조 프로파일의 비교에 의해, 얻어진 해석 대상의 시료의 동정이 가능하다. 또한, 측정하는 프로덕트 이온은, 양성자화한 단당 또는 이당에서 유래하는 프로덕트 이온이고, 즉, 이들은 당쇄에서 유래하는 옥소늄 이온이다. 그 때문에, 해석 대상의 당쇄 부분 이외의 구조 여하에 관계없이 측정을 행할 수 있다. 또한, 양성자화한 단당 또는 이당에서 유래하는 프로덕트 이온의 대부분은  $m/z$ 가 100 내지 500의 저질량 영역의 범위 내에 있다. 본 해석 방법에서는, 저-질량 컷오프(Low-mass cutoff)가 생기지 않는 질량 분석 장치를 이용하여 MS/MS 측정을 행하기 때문에, 당쇄를 해석 대상의 시료로부터 분리시키는 처리를 행하지 않아도, 이들 프로덕트 이온을 검출 감도 좋게 측정할 수 있다. 그렇기 때문에, 당쇄 구조를 갖는 복수의 프리커서 이온이 존재한 경우에, 당쇄를 사전에 분리하지 않기 때문에, 어느 쪽의 프리커서 이온에 유래하는 것인지를 구별하여 측정을 행할 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 특정한 프로덕트 이온은,  $m/z$ 가 각각 163, 168, 186, 204, 274, 290, 292, 308, 366, 454 및 470인 프로덕트 이온으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2종의 프로덕트 이온을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 특정한 프로덕트 이온은,  $m/z$ 가 각각 163, 168, 186, 274, 290, 292, 308, 366, 454 및 470인 프로덕트 이온으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 프로덕트 이온과,  $m/z$ 가 204인 프로덕트 이온을 포함하는 것이 보다 바람직하다.
- [0063] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 특정한 프로덕트 이온은,  $m/z$ 가 각각 163, 204, 274 및 366인 프로덕트 이온을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0064] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 특정한 프로덕트 이온은,  $m/z$ 가 138인 프로덕트 이온을 더 포함하고, 상기 작성 공정에서는,  $m/z$ 가 138인 상기 프로덕트 이온의 측정량을 이용하여 각 수량 곡선을 표준화하여, 상기 에너지 분해 프로파일을 작성하는 것이 바람직하다.
- [0065] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 시료에는, 농도가 기지인 당쇄를 갖는 표준 시료가 첨가되어 있고, 상기 특정한 프로덕트 이온은,  $m/z$ 가 138인 프로덕트 이온을 더 포함하고, 상기 시료에서의  $m/z$ 가 138인 상기 프로덕트 이온의 측정량과, 상기 표준 시료에서의  $m/z$ 가 138인 상기 프로덕트 이온의 측정량의 비교에 의해, 상기 시료의 정량을 행하는 정량 공정을 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0066] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 정량 공정에서는,  $m/z$ 가 138인 상기 프로덕트 이

온의 상기 측정량이 최대가 되는 CID 에너지에서의, 상기 시료 및 상기 표준 시료 각각의, m/z가 138인 프로덕트 이온의 상기 측정량에 기초하여, 상기 시료의 정량을 행하는 것이 바람직하다.

[0067] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 최대가 되는 CID 에너지의 값은, 당쇄를 갖는 복수의 시료에 대해서, m/z가 138인 프로덕트 이온을 CID 에너지의 값을 변화시키면서 MS/MS 측정에 의해 미리 측정하여, 그 측정량이 최대가 되는 CID 에너지의 값과, 상기 시료의 프리커서 이온의 m/z의 값을 이용하여 선형 회귀 분석에 의해 작성된 검량선으로부터, 해석 대상인 상기 시료의 프리커서 이온의 m/z의 값에 기초하여 추정되는 값인 것이 바람직하다.

[0068] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 측정 공정에서는, 3단계 4중극 질량 분석계를 이용하여 MS/MS 측정을 행하는 것이 바람직하다.

[0069] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 시료는, 당펩티드인 것이 바람직하다.

[0070] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 당펩티드는, N형 당쇄를 갖는 당펩티드인 것이 바람직하다.

[0071] 또한, 본 발명에 관한 당쇄 구조의 해석 방법에 있어서, 상기 당펩티드는, O형 당쇄를 갖는 당펩티드인 것이 바람직하다.

[0072] 이하에 실시예를 나타내어, 본 발명의 실시 형태에 대해서 더욱 자세히 설명한다. 물론, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것이 아니라, 세부에 대해서는 다양한 양태가 가능함은 물론이다. 또한, 본 발명은 상술한 실시 형태에 한정되는 것이 아니라, 청구항에 나타난 범위에서 다양한 변경이 가능하며, 각각 개시된 기술적 수단을 적절하게 조합하여 얻어지는 실시 형태에 대해서도 본 발명의 기술적 범위에 포함된다. 또한, 본 명세서 중에 기재된 문헌 모두가 참고로서 인용된다.

[0073] [실시예]

[0074] <실시예 1: 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일에 의한 당쇄 구조의 동정>

[0075] 3단계 4중극 질량 분석 장치를 이용한, 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선의 취득 도식을 도 1에 나타내고, 해당 취득 도식의 개략에 대해서 설명한다. 우선, 당단백질 시료(도 1에서는 면역 글로불린)를 트립신 소화함으로써 펩티드 및 당펩티드의 혼합물을 얻는다. 이것을 HPLC에 의해 분획하여, 3단계 4중극 질량 분석 장치를 이용한 질량 분석에 제공한다. 3단계 4중극 질량 분석 장치에서는, 제1 4중극(Q1)에서 특정한 질량을 갖는 당펩티드 이온을 단리한다(filtering). 단리된 당펩티드 이온은 제2 4중극(Q2)에 보내져서 CID가 야기된다. 프리커서 이온의 운동 에너지는, Q2에서의 CID의 해리 에너지 및 해리율에 영향을 미치는 것이지만, Q2로 도입할 때의 전극 전위(CID 에너지에 상당)를 변화시킴으로써 제어할 수 있다. 제3 4중극에서는, 프로덕트 이온에 필터를 걸어, 예를 들면, 도 1에서의 프레임 A 내에 나타난 당펩티드의 올리고당 유래의 옥소늄 이온을 고감도로 선택적으로 검출한다. 여기서, Q3에서의 질량 필터의 설정 각각에 대하여, 짧은 시간 간격을 두고 단계적으로, Q2로 도입할 때의 전극 전위를 변화시켜, 반복해서 측정을 행한다. 이에 의해, 옥소늄 이온마다, 도 1에서의 프레임 B 내에 나타난 바와 같은, 횡축을 Q2로 도입할 때의 전극 전위, 종축을 측정된 이온 강도로 하는 에너지 분해 수량 곡선이 얻어진다. 또한, MRM(Multiple Reaction Monitoring) 모드에 의해, 각 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선을 동시에 취득할 수 있다. 어떤 특정한 프리커서 이온에 대해서, 얻어진 각 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선을 1개로 통합한 것을 "에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일"이라 한다.

[0076] 다음으로, 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일의 구체적인 작성예에 대해서 설명한다.

[0077] 여기서는, IgG 분자 유래의 다양한 당펩티드에 대해서, 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일의 작성을 시도했다. 이러한 다양한 당펩티드는, 동일한 아미노산 서열(EEQYNSTYR; 서열 번호 1)을 갖고 있지만, 당쇄 구조가 서로 다른 복수의 당펩티드이다.

[0078] 각각의 당펩티드를, Agilent 1200 nano-HPLC 시스템(Agilent Technology, Palo Alto, California)에 접속된 3단계 4중극형 질량 분석 장치 4000 QTRAP(AB Sciex, Foster City, California)에 의해 측정하였다. 여기서는, 멀티플 리액션 모니터링 모드에 의해, 특정한 옥소늄 이온(m/z=138, 163, 204, 274 및 366)의 측정을 동시에 행하였다. 우선, IgG의 트립신 소화물을, 닛코 테크노스사(일본, 도쿄)의 내경 75 $\mu$ m 칩 일체형 모세관 칼럼에 의해, 250nL/min의 유속으로 분리하면서 이온원에 도입하였다. 나노 스프레이를 위한 이온 스프레이 전압을 2200V로 하고, 질소 가스를 커튼 가스(12psi) 및 충돌 가스로서 사용하였다. 제1 4중극(Q1)의 질량 분해능을 HIGH 모드, 제3 4중극(Q3)의 질량 분해능을 LOW 모드로 하고, 측정간의 포즈를 2밀리초로 설정하였다. CID 조

건으로서, CAD=4의 기기 파라미터가 이용되고, 디클러스터링 포텐셜 및 엔트런스 포텐셜은 각각 70V 및 10V였다. 멀티플 리액션 모니터링 측정시에 있어서, 측정 트랜지션의 설정으로서, Q1의 질량으로는 대상 당펩티드의 m/z가 설정되고, Q3에는 138.05, 163, 204, 274 또는 366이 설정되어, 특정한 조합에 대하여 CID 에너지만 3V씩 또는 5V씩 변화된 다수의 트랜지션을 설정하였다(소프트웨어의 사양으로서 중복된 질량을 설정할 수 없기 때문에, 임밀하게는 각 질량의 값을 0.001씩 어긋나게 해서 설정하고 있지만, 측정에는 영향을 주지 않는다). 또한, 하나의 측정 대상에 대해 측정 사이클 시간이 1초 내외에 들어가도록, 각 트랜지션의 이온 인출 시간(Dwell Time)을 20 내지 50밀리초의 범위 내로 설정하였다.

[0079] 각 옥소늄 이온의 측정량에 관해, m/z=138의 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선에서의 가장 강한 시그널 강도를 100으로 해서 표준화를 행하여, 다른 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선을 얻었다. 또한, 다른 큰 프래그먼트의 옥소늄 이온에 대해서도 측정을 행했지만, 단순화를 위해, 상대량이 5%를 초과하지 않는 한, 다른 큰 프래그먼트의 옥소늄 이온에 대해서는 플롯을 생략하였다.

[0080] 이상에 의해 작성된 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일의 몇 가지 예를 도 2의 (a) 내지 (d)에 나타낸다. 또한, 도 2의 (a) 내지 (d)는 모두, 어떤 일종의 당쇄 구조에 관한 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일만을 나타내는 것은 아니라, 복수의 당쇄 구조의 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 통합해서 나타내고 있다. 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일의 상측에 나타낸 당쇄의 모식 구조에 있어서, 검은 사각형은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 나타내고 있고, 검은 원은 만노오스(Man)를 나타내고 있고, 흰 원은 갈락토오스(Gal)를 나타내고 있고, 역삼각형은 푸코스(Fuc)를 나타내고 있고, 마름모꼴은 (5-아세틸뉴라민산)을 나타내고 있다. 또한, 도면 중에 나타낸 m/z의 옥소늄 이온에 대응하는 에너지 분해 수량 곡선을, 도면 중에서 m/z를 나타내고 있는 사각 프레임의 프레임 선 굵기와 거의 동일한 굵기의 선으로 나타내고 있다.

[0081] 도 2의 (a)는, 비갈락토실화 당 구조를 갖는 3종의 당펩티드에서의 각 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 통합해서 나타내고 있다. 도 2의 (b)는, 고만노오스 형태의 당쇄 구조를 갖는 3종의 당펩티드에서의 각 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 통합해서 나타내고 있다. 도 2의 (c)는, 하이브리드형의 당쇄 구조를 갖는 2종의 당펩티드에서의 각 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 통합해서 나타내고 있다. 도 2의 (d)는, 시알화형의 당쇄 구조를 갖는 2종의 당펩티드에서의 각 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 통합해서 나타내고 있다.

[0082] 도 2의 (a)에 나타낸 바와 같이, 비갈락토실화 당쇄 구조를 갖는 당펩티드에서는, m/z=204(GlcNAc)인 옥소늄 이온의 측정량이, 동일한 수의 GlcNAc를 갖는 다른 당펩티드에서의 m/z=204의 옥소늄 이온의 측정량(예를 들면, 도 2의 (c) 또는 (d) 참조)에 비해 분명히 컸다. 이것은, 프리커서 이온에 있어서, GlcNAc가 탈리기가 되도록 양성자 부가되기 때문이라고 추측된다.

[0083] 또한, 도 2의 (b)에 나타낸 바와 같이, 고만노오스형의 당쇄 구조를 갖는 당펩티드에서는, m/z=163(Hexose)인 옥소늄 이온의 측정량이, 다른 당펩티드에서의 측정량에 비해 분명히 컸다. 하이브리드형의 당쇄 구조를 갖는 당펩티드에서는 m/z=163의 옥소늄 이온이 거의 측정되지 않은 점에서(도 2의 (c)), 고만노오스형의 당쇄 구조를 갖는 당펩티드에서 m/z=163의 옥소늄 이온이 고수량으로 되는 것은, 만노오스 결합의 수에만 의하는 것은 아님을 알 수 있다. 이러한 차가 생기는 원인은, GlcNAc에 근접하는 만노오스 또는 갈락토오스에는, 옥소늄 이온을 발생시키기 위해서 필요한 불안정한 양성자가 존재하지 않기 때문이라고 추측된다.

[0084] 도 2의 (a) 내지 (d)에 도시된 바와 같이, 당쇄 구조의 특징(비갈락토실화형, 고만노오스형, 하이브리드형, 또는 시알화형)마다 특징적인 패턴이 나타나지만, 각 당펩티드는, 각각 서로 구별할 수 있는 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 나타내고 있었다.

[0085] 또한, 본 해석에 의해, 당쇄의 조성이 4[Hex]4[GlcNAc]1[Fuc]이고, 말단의 갈락토오스의 결합 위치만 다른 당펩티드의 아이소폼(한쪽은 α1-3쇄에 말단 갈락토오스가 있고, 다른 쪽은 α1-6쇄에 있는 말단 갈락토오스가 있다)에 대해서도, 양자를 구별할 수 있음을 알 수 있었다(도 3). 도 3에 도시된 바와 같이, 양자는, 적어도 m/z=366인 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선에 있어서 차가 나타났다. 즉, 말단 갈락토오스가 α1-6쇄에 있는 쪽의 아이소폼은, 말단 갈락토오스가 α1-3쇄에 있는 쪽의 아이소폼에 비해, 낮은 전극 전위에서의 m/z=366의 옥소늄 이온의 수량이 높았다. 또한, 양 아이소머의 혼합 시료(1:1 혼합, 또는 1:2 혼합)를 측정에 이용한 경우, m/z=366의 옥소늄 이온의 수량 곡선은, 각 아이소머 단독의 해석으로부터 얻어지는 m/z=366의 옥소늄 이온의 수량 곡선의 사이에 구축되었다. 이로부터, 구조 이성체의 혼합 시료에 있어서, 크로마토그래피에 의한 각 아이소머의 분리 처리를 행하지 않아도, 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 이용한 본 해석 방법을 이용함으로써, 각 아이소머의 존재비를 예측하는 것이 가능하다. 또한, 도 3 중에 나타내는 당쇄의 모식 구조의 설명은, 도 2에서의 당쇄의 모식 구조와 동일하다.

- [0086] <실시예 2: 선형 회귀 분석을 이용한 예측>
- [0087] 본 실시예에서는, 당쇄 구조 기지의 샘플에 대해서 실시예 1과 마찬가지로 측정 및 데이터 처리를 행하여, 모델 데이터를 취득하고, 이것을 이용한 선형 회귀분석을 했다.
- [0088] 우선, 도 11의 (a) 또는 (b)에 나타내는 당쇄 구조를 갖는 2종의 당펩티드를 제조하여, 각 프로덕트 이온에 대해서, 각 CID 에너지값에서의 측정치를 취득하였다. 이들 당펩티드는, 질량이 동일하고 구조가 서로 다른 것이다. 여기서, 도 11의 (a)에 나타내는 당쇄 구조를 0, (b)에 나타내는 당쇄 구조를 1이라고 편의상 설정하고, 이것을 당쇄 구조의 종류를 규정하는 목적 변수 Y라 했다. 또한, 도 11에 나타내는 당쇄의 모식 구조에 대한 설명은, 도 2에서의 당쇄의 모식 구조의 설명과 동일하다. 그리고, 각 CID 에너지값에서 측정된 프로덕트 이온 각각의 표준화된 강도(측정치)를 종속 변수 X라 했다. 구체적으로는, m/z=204의 프로덕트 이온에 대하여, 이하에 나타내는 12점의 CID 에너지값에서의 각 측정치, 및 m/z=366의 프로덕트 이온에 대하여, 이하에 나타내는 12점의 CID 에너지값에서의 각 측정치, 총 24개의 측정치를 종속 변수로 해서, 각 당쇄 구조에 대해 10회의 반복 측정을 행하여, 선형 회귀 분석을 실시하였다. 해석에 이용한 측정치에서의 12점의 CID 에너지값은, 각 프로덕트 이온 모두 다음과 같다: 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 50, 55, 60 및 65eV.
- [0089] 그 결과, 다음의 추정식이 얻어졌다.
- [0090]  $Y = -1.64X_1 + 0.817X_2 + 0.345X_3 + 0.284X_4 + 7.138X_5 + 0.297X_6 - 0.384$
- [0091] 여기서,  $X_1$  내지  $X_6$ 은, 각각 m/z=366의 프로덕트 이온에서의 CID 에너지=24eV의 측정치, m/z=204의 프로덕트 이온에서의 CID 에너지=27eV의 측정치, m/z=204의 프로덕트 이온에서의 CID 에너지=36eV의 측정치, m/z=204의 프로덕트 이온에서의 CID 에너지=42eV의 측정치, m/z=366의 프로덕트 이온에서의 CID 에너지=65eV의 측정치, m/z=204의 프로덕트 이온에서의 CID 에너지=39eV의 측정치를 나타내고 있다. 이 추정식에, 도 11의 (a)에 나타내는 당쇄 구조의 데이터가 대입되면, Y는 0에 가까운 값이 되고, 도 11의 (b)에 나타내는 당쇄 구조의 데이터가 대입되면, Y는 1에 가까운 값이 된다. 그리고 얻어지는 Y의 값이 본 모델에서의 95%의 신뢰 구간 내에 들어가는 것이면, 의미있는 판정 결과라고 판단할 수 있다.
- [0092] 여기서, 도 11의 (b)에 나타내는 당쇄 구조와 동일한 구조를 갖는 별도의 복수의 샘플(3 종류)에 대해서 각각 2회씩 측정을 행하고, 각각에 대하여 Y의 값을 구했다. 그 결과, 2종의 샘플에 대해서는, 예측치 Y가 모두 1에 가까운 값이 되어, 95% 신뢰 구간 내에 들어갔다. 그 때문에, 도 11의 (b)의 당쇄 구조를 갖는 것이라고 판정할 수 있다.
- [0093] 또한, 도 11의 (a) 및 (b) 중 어느 것도 아닌 당쇄 구조를 갖는 시료에 대해서 데이터를 취득하고, 상기한 추정식에 대입한 결과, 예측치는 거의 2가 되어, 도 11의 (a) 및 (b)에 나타내는 당쇄 구조와는 다른 구조를 갖고 있는 것으로 나타났다.
- [0094] <실시예 3: 당펩티드의 고감도 정량 시험>
- [0095] 다양한 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일에 대해서 검토를 행한 결과, m/z=138의 옥소늄 이온의 에너지 분해 수량 곡선의 형상이, 시험한 당쇄 구조간에 유사하다는 것이 판명되었다. 이것을 보다 명확히 하기 위해서, 이하의 시험을 실시하였다.
- [0096] (재료)
- [0097] 인간 면역 글로불린(IgG) 시료로서 세투스맘(Cetuximab)을 머크 세로노사(일본, 도쿄)로부터 구입하고, 트라추즈맘(Trastuzumab)을 주카이 제약 가부시끼가이샤(일본, 오오사카)로부터 구입하여, 각각 트립신 소화에 제공함으로써 다종류의 당펩티드를 포함하는 표준 시료를 얻었다. 구체적으로는, 시료 80 μg을 33 μL의 8M 요소 용액에 용해하고, 1.7 μL의 디티오프레이톨-중탄산암모늄 용액(100mM 디티오프레이톨, 1M 중탄산암모늄)을 가하여, 55℃에서 30분간 환원 처리하였다. 이어서, 3.5 μL의 0.5M 요오도아세트산을 가하여, 실온 암소에서 30분간 알킬화 처리한 후, 300 μL의 디티오프레이톨-중탄산암모늄 용액(2.5mM 디티오프레이톨, 25mM 중탄산암모늄)으로 희석하였다. 거기에, 리실렌도펩티다아제(와코 준야꾸 가부시끼가이샤)를 4 μg 가하여, 37℃에서 2시간 반응시킨 후, Trypsin Gold(프로메가 가부시끼가이샤)를 4 μg 가하고, 4시간 더 소화 반응에 제공했다. 반응 후, 3% 아세트니트릴 용액 700 μL를 가하여 희석하고, OASIS HLB 고상 추출 카트리지(닛본 워터즈 가부시끼가이샤)로 탈염 정제를 행하였다. 그때, 플로우 스트루 분획 및 15% 아세트니트릴 용출 분획을 따로따로 회수하였다. 0.1% 아세트산 용액에 의해, 플로우 스트루 분획은 2배, 용출 분획은 5배로 희석하여, 이들을 표준 측정 시료로 했다.

플로우 스루 분획에는, 아미노산 서열 EEQYNSTYR(서열 번호 1)을 갖는 당펩티드군이 포함되고, 15% 아세토니트릴 용출 분획에는 아미노산 서열 MNSLQSNDAIYYCAR(서열 번호 2)을 갖는 당펩티드군이 포함된다(세투시맙(Cetuximab)만).

[0098] (기기 설정 및 측정 방법)

[0099] 측정 시료를 나노 HPLC에 접속된 3단계 4중극형 질량 분석 장치 4000 QTRAP(AB Sciex, Foster City, California)에 의한 MRM 모드에 의해 측정하였다. 측정 조건은, 실시예 1에 기재된 것과 마찬가지로이다. 다만, Q3에는 138.05만을 설정하고, 그 동일한 조합에 대하여 CID 에너지만 3V씩 또는 5V씩 변화된 다수의 트랜지션을 설정하였다(소프트웨어의 사양으로서 중복된 질량을 설정할 수 없기 때문에, 엄밀하게는 각 질량의 값을 0.001씩 어긋나게 하여 설정하고 있지만, 측정에는 영향을 주지 않는다).

[0100] (데이터의 처리 방법)

[0101] 측정 후의 데이터를, 해석 소프트웨어 MultiQuant ver.2.02로 관독하여, 트랜지션마다 스무딩 폭 1포인트의 조건으로 메스 크로마토그램의 피크 적분을 행하였다. 적분치를 표 계산 소프트웨어에 익스포트(export)하여, CID 에너지 설정치와 적분치가 대응된 표를 작성하였다. 이때, 데이터 세트 중에서 최대의 적분치를 이용하여, 각 트랜지션의 적분치를 최대치의 백분율로서 표준화하였다. 동일한 당펩티드에 대한 측정을 3회 반복해서 행하여, 표준화된 적분값의 평균치를 구했다. 이 데이터에 기초하여, 각 당펩티드에 대해서,  $m/z=138$ 의 프로덕트 이온의 생성 효율이 최대가 되는 CID 에너지(최적 CID 에너지)를 구했다. 최적 CID 에너지의 정의는, 상술한 평균 피크 적분치가 가장 100에 가까운 트랜지션의 CID 에너지 설정치로 했다. 다만, 98 내지 100의 사이에서 동일한 적분치가 연속되는 경우는, 이들의 CID 에너지의 평균치를 최적 CID 에너지로 했다. 결과를 표 1에 나타낸다.

표 1

시료 번호	아미노산 서열	N형 당쇄의 구성				m/z	최적 CID 에너지
		HexNAc의 수	Hex의 수	Fuc의 수	SA의 수		
1	EEQYNSTYR	3	3	1	0	811.4	75
2	EEQYNSTYR	3	4	0	0	816.7	75
3	EEQYNSTYR	3	4	1	0	865.4	80
4	EEQYNSTYR	3	4	0	1	913.8	95
5	EEQYNSTYR	3	5	1	0	919.4	90
6	EEQYNSTYR	4	3	0	0	830.3	80
7	EEQYNSTYR	4	3	1	0	878.1	82.5
8	EEQYNSTYR	4	4	0	0	884.4	85
9	EEQYNSTYR	4	4	0	1	981.4	90
10	EEQYNSTYR	4	4	1	0	933.1	90
11	EEQYNSTYR	4	4	1	1	1030.1	105
12	EEQYNSTYR	4	5	0	0	938.4	95
13	EEQYNSTYR	4	5	1	0	987.1	95
14	EEQYNSTYR	4	5	0	1	1035.5	105
15	EEQYNSTYR	4	5	1	1	1084.2	100
16	EEQYNSTYR	5	3	0	0	898.1	90
17	EEQYNSTYR	5	3	1	0	952.1	100
18	EEQYNSTYR	5	4	0	0	946.8	90
19	EEQYNSTYR	5	4	1	0	1000.8	92.5
20	MNSLQSNDAIYYCAR	5	8	1	0	1092.5	109
21	MNSLQSNDAIYYCAR	5	9	1	0	1133.1	110
22	MNSLQSNDAIYYCAR	4	7	1	0	1001.3	95
23	MNSLQSNDAIYYCAR	4	6	2	0	997.3	100
24	MNSLQSNDAIYYCAR	4	6	1	0	960.7	91
25	MNSLQSNDAIYYCAR	4	5	1	1	997.1	100
26	MNSLQSNDAIYYCAR	4	4	1	0	879.7	86
27	MNSLQSNDAIYYCAR	4	5	1	0	920.2	97
28	MNSLQSNDAIYYCAR	4	3	1	0	839.2	80

HexNAc : N-아세틸헥소사민, Hex : 헥소스(6탄당), Fuc : 푸코스, SA : 시알산

[0102]

[0103]

표 1에 나타난 결과에 기초하여, X축 방향으로 당펩티드의 m/z, Y축 방향으로 최적 CID 에너지값을 플롯하여 산포도를 작성하였다(도 4). 도 4에서, GlcNAc를 3개 포함하는 당펩티드의 데이터를 원으로 나타내고, GlcNAc를 4개 포함하는 당펩티드의 데이터를 사각형으로 나타내고, GlcNAc를 5개 포함하는 당펩티드의 데이터를 삼각형으로 나타내고 있다. 또한, 흰 표시는, 당쇄가 결합하고 있는 펩티드의 아미노산 서열이 MNSLQSNDAIYYCAR(서열 번호 2)인 당펩티드에 관한 데이터이고, 검은 표시는, 당쇄가 결합하고 있는 펩티드의 아미노산 서열이 EEQYNSTYR(서열 번호 1)인 당펩티드에 관한 데이터이다. 도 4에 도시된 바와 같이, 이 산포도로부터 당펩티드의 m/z와 최적 CID 에너지값의 사이에 직선적 상관성이 시사되었다. 따라서, 선형 회귀에 의해 직선 근사를 행한 결과, 중상관 계수( $R^2$ )가 0.842라는 매우 강한 상관성이 나타났다. 산포도에서, GlcNAc의 수 및 아미노산 서열의 차이를 구별할 수 있도록 플롯하고 있는데, 모든 점이 근사 곡선 근방에 위치하고 있었다. 즉, HexNAc의 수 및 아미노산 서열의 차이라는 요소는 상관에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다. 당펩티드의 m/z와 최적 CID 에너지값의 상관에, 당쇄 구조, 펩티드의 아미노산 서열, 및 전하 수가 영향을 주지 않는다는 것은, 즉, 어떠한 시료가 대상이더라도 이 근사 곡선을 기초로 최적 CID 에너지의 추정치를 산출하는 것이 가능한 것을 뜻하고 있다.

[0104]

다음으로, 양이 기지인 당펩티드를 표준품으로 해서, 멀티플 리액션 모니터링 모드에 의해, 최적 CID 에너지로써 m/z=138인 옥소늄 이온을 측정하고, 그 검출 감도를 조사했다. 그 결과, 2종의 단리된 당펩티드에 있어서, 검출 감도 30attomol(주입량)을 관측하고, 또한 30attomol 내지 30fentomol이라는 폭넓은 범위에서 시그널 강도에 직선성이 있는 것으로 나타났다(도 5). 이 결과에 의해, m/z=138인 옥소늄 이온을 최적 CID 에너지에 의해

측정하는 본 발명의 방법이, 당펩티드를 측정하는 데에 있어서 종래 법을 훨씬 능가하는 측정 감도 및 정량성을 가져오는 것으로 나타났다. 또한, 도 5에서의 R<sup>2</sup>값은, 중앙관 계수를 나타내고 있고, 당쇄의 모식 구조의 설명은, 도 2에서의 당쇄의 모식 구조의 설명과 동일하다.

[0105] <실시에 4: 항체의 Fc 및 Fab 영역에서의 당 형태의 듀얼 · 모니터링>

[0106] 정량화를 위한 옥소늄 이온(m/z=138)의 모니터링, 및 구조 특정을 위한 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일 측정을 조합한, 당단백질의 특정 부위에서의 당쇄 구조의 해석을 시도했다. 해석 대상 시료로는, 치료용 항체인 세투시맵(Cetuximab)(머크 세로노사)를 사용하였다. 시료는, 실시예 2와 마찬가지로 하여, 변성, 및 소화를 행하였다. OASIS HLB 고상 추출 카트리지를 이용하여, 소화 처리한 시료로부터 미소화의 단백질을 제거함과 함께 탈염 정제하였다. 펩티드 용출물을 희석한 후, 나노-HPLC와 접속한 3단계 4중극 질량 분석 장치를 이용한 질량 분석에 제공했다. 3단계 4중극 질량 분석 장치에서는, MRM 모드에 의해, 현시점에서 존재가 예상되고 있는 40종 모든 당쇄 형태에 대해서 옥소늄 이온(m/z=138)을 측정하였다(도 6). 도 6의 크로마토그램에서의 횡축은, LC에서의 유지 시간을 나타내고 있고, 종축은 옥소늄 이온(m/z=138)의 강도를 옥소늄 이온의 카운트수로 나타내고 있다.

[0107] 도 6에 도시된 바와 같이, 유지 시간 13 내지 14분, 및 유지 시간 17 내지 19분에서 피크가 관찰되었다. 유지 시간 13 내지 14분에서의 피크는, Fc 영역의 당펩티드(아미노산 서열: EEQYN<sub>297</sub>STYR, 서열 번호 1)에 대응하는 피크이고, 유지 시간 17 내지 19분에서의 피크는, Fab 당펩티드(아미노산 서열: MNSLQSN<sub>88</sub>DTAIYYCAR, 서열 번호 2)에 대응하는 피크이다. 이와 같이, 당쇄 부가 부위가 서로 다른 2종의 당펩티드를, 단일한 처리 조작으로 동시에 분석하는 것이 가능하다.

[0108] 역상 HPLC에서의 유지 시간은, 주로 아미노산의 조성에 따라 정해지는 것이다. 그러나, 본 해석 방법에서는, 분자량이 거의 동일한 경우라도, 당쇄 형태의 차이에 따라 유지 시간에 폭이 생겨, 각 베이스 라인이 분리하는 것으로 관찰되었다. 예를 들면, Neu5Gc의 분자량은 307Da이고, 이것은, 헥소스 및 푸코스의 분자량을 합친 값(308Da)보다 겨우 1Da 작을 뿐이다. 그 때문에, 예상된 당쇄 구조에 Neu5Gc가 포함되는 당펩티드에서는, MRM 크로마토그램에 있어서 피크가 2종 검출되는 경우가 있다(도 7). 이것은, Neu5Gc가 헥소스 및 글루코오스로 전환된, 유사한 당펩티드에 의한 크로스토크가 있기 때문이다.

[0109] 또한, 본 해석에 의해, 고푸코실화된 당쇄 구조의 발견에 이르렀다. 또한, 이 고푸코실화가, 고갈락토실화 구조 또는 디시알화 구조에서는 생기지 않은 것도 발견하였다. 그 때문에, 추가적인 푸코실화는, 안테나 부분(코어 구조의 비환원 말단에서의 분지)의 GlcNAc에 생겼으며, 미수식의 안테나 부분에서, 말단 갈락토실화(α-Gal) 또는 시알화(Neu5Gc)와 경합적으로 생기는 것으로 추측된다. 이 GlcNAc는, Lewis x 모티프를 형성하는 것이다.

[0110] 이것을 확인하기 위해서, 안테나 부분이 2개 있는 바이안테나형(biantennary) 구조, 안테나 부분이 3개 있는 트리안테나형(triantennary) 구조에 있어서, 각 안테나 부분이 어떠한 구조인가를, 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 이용한 구조 특정, 및 옥소늄 이온(m/z=138)의 모니터링에 의한 정량화에 의해 분석하였다. 결과를 표 2에 나타낸다.



표 2

	조성			% 존재비	
	$\alpha$ -Gal	Lewis X	Neu5Gc	biantennary	triantennary
안테나 점유 = 1	1	-	-	6.4	1.1
	-	1	-	0.7	0.2
	-	-	1	7.1	0.9
안테나 점유 = 2	2	-	-	25.9	1.7
	1	1	-	2.5	1.0
	1	-	1	18.5	1.3
	-	2	-	0.2	0.1
	-	1	1	1.0	0.2
	-	-	2	3.3	0.3
안테나 점유 = 3	3	-	-	-	2.5
	2	1	-	-	1.0
	2	-	1	-	1.8
	1	2	-	-	0.2
	1	1	1	-	0.5
	1	-	2	-	0.6
	-	3	-	-	0.0
	-	2	1	-	0.1
	-	1	2	-	0.2
	-	-	3	-	N. D.

N. D. = 미검출

[0111]

[0112]

표 2 중, " $\alpha$ -Gal"의 칼럼은, 갈락토실화되어 있는 안테나 부분의 수를 나타내고 있고, "Lewis x"의 칼럼은, Lewis x 모티프가 형성되어 있는 안테나 부분의 수를 나타내고 있고, "Neu5Gc"의 칼럼은, 시알화되어 있는 안테나 부분의 수를 나타내고 있다. 또한, "biantennary"의 칼럼은, 조사한 바이안테나형 구조에 있어서, 동행 좌측에 나타내는 당 구조를 갖고 있던 것의 비율을 퍼센트로 나타내고 있고, "triantennary"의 칼럼은, 조사한 트리안테나형 구조에 있어서, 동행 좌측에 나타내는 당 구조를 갖고 있던 것의 비율을 퍼센트로 나타내고 있다. 예를 들면, 조사한 바이안테나형 구조 중, 한쪽이 갈락토실화된 안테나 부분이고, 또 한쪽이 시알화된 안테나 부분이었던 것의 비율은, 조사한 바이안테나형 구조 중의 18.5%였다.

[0113]

분석의 결과, 바이안테나형 구조에 있어서, 한쪽의 안테나 부분만 수식되어 있는 경우, 갈락토실화, 시알화 및 Lewis x 모티프의 비율은 46:50:5였다. 이것은, 필시 각각의 당 전이 효소의 상대적인 촉매 반응 속도를 반영한 것이라고 예상된다. 그러나, 다른 쪽의 안테나 부분도 수식되는 경우, 각각의 당 구조의 상대적 비율은 제1 안테나 부분의 것과 달랐다. 특히, 갈락토실화되는 경향이 강했다. 이로부터, 안테나 부분의 최초의 당 수식이, 다음의 안테나 부분의 당 수식의 반응성에 영향을 미치고 있는 것으로 시사된다.

[0114]

Lewis x 모티프를 포함하는 2종의 당펩티드에 대해서, m/z=290인 옥소늄 이온 및 m/z=512인 옥소늄 이온에 대해서도 검출 및 플롯을 행한 경우의 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일을 도 8에 나타낸다. 도 8에 나타내는 당쇄의 모식 구조에 대한 설명은, 도 2에서의 당쇄의 모식 구조의 설명과 동일하다. 도 8에 따르면, Lewis x 모티프를 포함하는 것으로 추측되는 구조는, m/z=512인 옥소늄 이온의 검출 레벨이 높아짐으로써 특징지어지는 것을 알 수 있다. m/z=512인 옥소늄 이온은, Hex+G1cNAc+Fuc에 대응하는 옥소늄 이온이다.

[0115]

본 해석으로 분명해진 세투시맵(Cetuximab)의 다른 특징은, 지금까지 보고되었던 것과 일치하고 있었다. 예를 들면, Fc 부분에서의 당쇄 구조에서 가장 많았던 구조는, 비갈락토실화의 바이안테나형 구조이고, 하이브리드형, 및 고만노오스형의 당쇄 구조에 대해서도 비교적 높은 레벨로 검출되었다.

[0116]

이상과 같이 본 해석 방법에 따르면, Fc 영역에서의 당쇄 구조 및 Fab 영역에서의 당쇄 구조 중 어느 것에 대해서도, 당쇄의 불균일을 고정밀도 및 고감도로 모니터링할 수 있다.

- [0117] <실시예 5: 치료용 항체의 로트간에서의 당 형태의 불균질성 해석>
- [0118] 본 실시예에서는, 상술한 실시 형태에서의 해석 방법에 의한, 당쇄의 불균질에 관한 로트간에서의 품질 관리에 대한 적용에 관한 평가를 행했다. 대상 시료로는, 트라츄즈맵(trastuzumab)(주가이 제약 가부시끼가이샤)의 비연속적인 4개의 로트, 및 베바사주맵(bevacizumab)(주가이 제약 가부시끼가이샤)의 비연속적인 4개의 로트를 사용하였다.
- [0119] 각 시료에 대해서, 실시예 2에서의 세투스맵(Cetuximab)와 마찬가지로 하여, 변성, 소화 및 정제를 행한 뒤, 나노-HPLC와 접속한 3단계 4중극 질량 분석 장치를 이용한 질량 분석에 제공하여, 당쇄 구조의 특정 및 정량을 행하였다. 질량 분석에서는, 서열 번호 1에 나타내는 아미노산 서열을 갖는 당펩티드를 측정 대상으로 했다. 로트 번호는, 제조 순에 따라서 첨부되어 있다. 측정은, 각 로트 3회씩 행하고, 연속된 2로트간에서의 통계적 유의성을 스튜던트의 t-검정으로 평가하였다. 결과를 도 9에 나타낸다. 도 9 중, (a)는 트라츄즈맵(trastuzumab)에 관한 결과를 나타내고 있고, (b)는 베바사주맵(bevacizumab)에 관한 결과를 나타내고 있다. 또한, 도 9에서는, (a) 및 (b)의 어느 것에서도, 3종의 당쇄 구조에 대해 그 존재 비율을 나타내고 있다. 도 9에 나타내는 당쇄의 모식 구조에 대한 설명은, 도 2에서의 당쇄의 모식 구조의 설명과 동일하다.
- [0120] 도 9에 도시된 바와 같이, 트라츄즈맵(trastuzumab) 및 베바사주맵(bevacizumab)의 어느 것에서도, 로트 1과 로트 2의 사이에서, 포함되는 당쇄 구조의 비율에 의미있는 차가 나타났다. 또한, 어느 항체든 로트 2와 로트 3의 사이에서는 거의 동일했다. 그러나, 로트 3과 로트 4의 사이에서 다시 의미있는 차가 나타났다. 또한, 도 9 중, \*는, 스튜던트의 t-검정에서  $p < 0.05$ 이었던 것을 나타내고 있다. 로트간에서 가장 변동하기 쉬웠던 것은, 바이안테나형 구조에서의 GlcNAc의 갈락토실화의 빈도였다. 이것은, 효소의 발현량 또는 항체의 생산 비율이 외부 환경에 따라 변할 수 있음을 나타내고 있다. 갈락토실화 형태의 존재량의 감소는, 비갈락토실화 형태의 존재량의 증가에 따라 보상되는 것은 분명하다. 또한, 관찰의 결과, 베바사주맵(bevacizumab)에서는, 당쇄가 부가되지 않은 펩티드(서열 번호 1에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드)도 존재하며, 그 양은 로트간에서 변동하기 쉬운 것이었다. 옥소늄 이온( $m/z=138$ )의 모니터링에 의한 당펩티드의 검출은, 당쇄가 부가되지 않은 등가물의 검출보다 10배 정도 고감도이다. 그 때문에, 실제로는 당쇄가 부가되지 않은 형태의 등가 펩티드는 수 퍼센트에 달해, 품질 관리에서의 바람직한 대상으로 될 수 있다.
- [0121] <실시예 6: O형 당쇄를 갖는 당펩티드의 해석>
- [0122] 본 실시예에서는, 인간 트랜스페린(Human Transferrin) 유래의 O형 당쇄를 포함하는 당펩티드에 대해서 해석을 행하였다.
- [0123] 트립신 소화까지는, 실시예 1에서의 인간 면역 글로불린(IgG)에 대한 처리와 마찬가지로 처리를 행하였다. 트립신 소화 후, 100℃, 10분의 가열 처리를 행하여, 트립신을 불활성화하였다. 거기에, 소화에 이용한 인간 트랜스페린의 1/20량(w/w)의 프롤린 특이적 엔도펩티다아제(도요보세키 가부시끼가이샤)를 가하여, 37℃, 8시간 반응시켰다. 반응 종료 후, 3배량(v/v)의 아세토니트릴을 가하여 75% 아세토니트릴 용액으로 했다. 이 용액을, 친수 고상 추출 플레이트 HILIC $\mu$  Elution(닛본워터즈 가부시끼가이샤)로 탈염 처리하였다. 이때, 고상의 평형화 및 세정 버퍼로서 100mM 중탄산트리에틸암모늄 75% 아세토니트릴 용액을 사용하여, 고상으로부터의 추출 버퍼로서 100mM 중탄산트리에틸암모늄 25% 아세토니트릴 용액을 사용하였다. 용출액을 Speedvac에 의해 건조 고화하여, 초순수에 재용해한 것을 질량 분석의 측정 샘플로 했다.  $m/z$  991.4인 프리커서 이온에 대하여, 실시예 1과 마찬가지로 해서 CID 에너지만이 상이한 복수의 트랜지션에 의해, 옥소늄 이온을 측정하고, 데이터 처리를 행하였다. 또한, 측정 샘플인 당펩티드의 개요는 다음과 같다: 아미노산 서열 S<sub>55</sub>DGPSVACVK(서열 번호 3, Ser52가 당쇄 부하 부위), 당쇄의 구성 HexNAc $\times$ 3, Hex $\times$ 2, Fuc $\times$ 1, Neu5Ac $\times$ 3(N형 당쇄에서는 생길 수 없는 조성), 펩티드 질량(MW) 1018.5, 당쇄 질량(MW) 1970.7, 당펩티드 질량(MW) 2971.2 (O형 당쇄 결합에 의해 -18Da), 측정 이온  $m/z=991.4(3+)$ .
- [0124] 그 결과, 도 10에 나타내는 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일은 얻어졌다. 도 10에 나타내는 에너지 분해 옥소늄 이온 프로파일은, 시알산을 갖는 N형 당펩티드로부터 얻어지는 프로파일과는 전혀 다른 것이다. 이와 같이, 당쇄 구조의 형태가 크게 다른 O형 당펩티드에서도, 당쇄 구조의 고차 정보를 얻는 것이 가능하다. 또한, O형 당펩티드에서도, 실시예 2에서 나타낸 당펩티드의  $m/z$ 와 최적 CID 에너지값의 사이의 직선적 상관관을 이용하여 본 실시예의 당펩티드에서의  $m/z$ 로부터 추정되는 최적 CID 에너지에 있어서,  $m/z$ 의 생성 효율이 최대가 되는 것이 확인되었다.

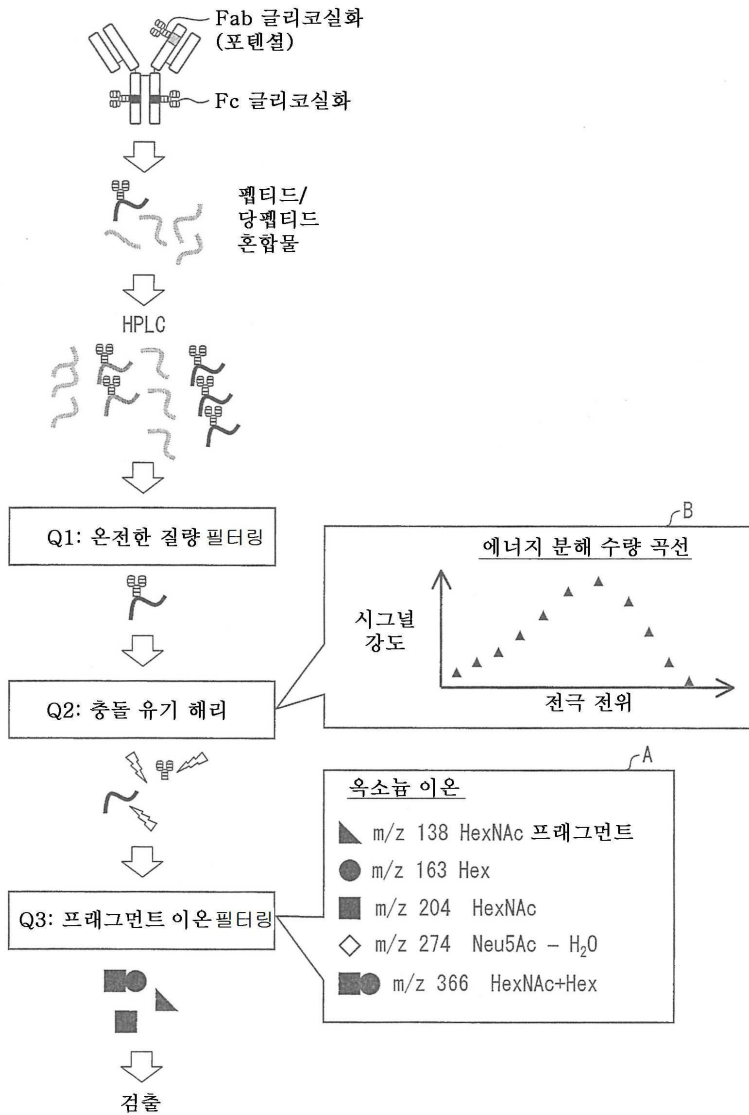
**산업상 이용가능성**

[0125]

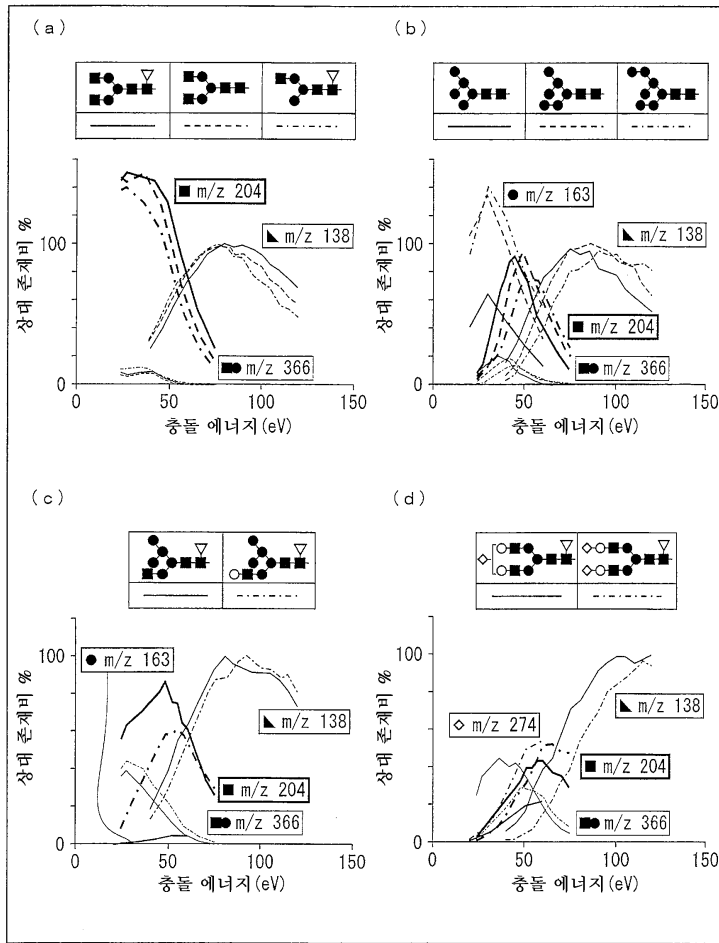
본 발명은, 당단백질에서의 당쇄 구조의 해석에 이용할 수 있으며, 예를 들면, 치료용 항체 등의 바이오 의약품의 당쇄 구조에 대한 품질 관리 시험에서 바람직하게 이용된다.

**도면**

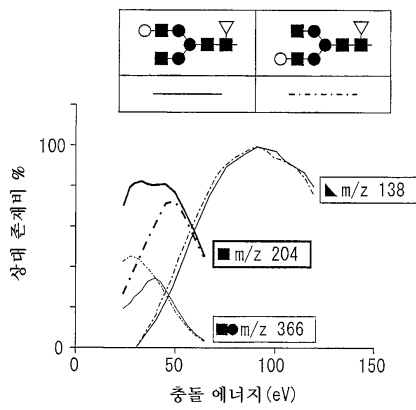
**도면1**



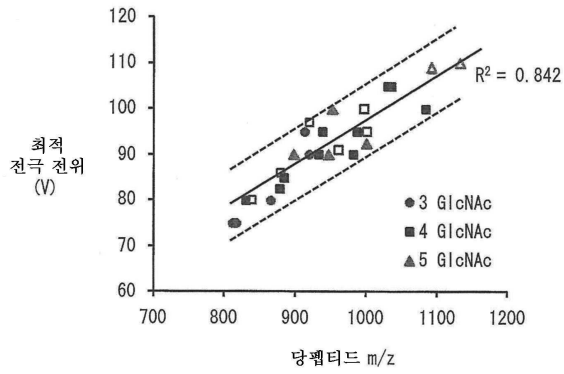
도면2



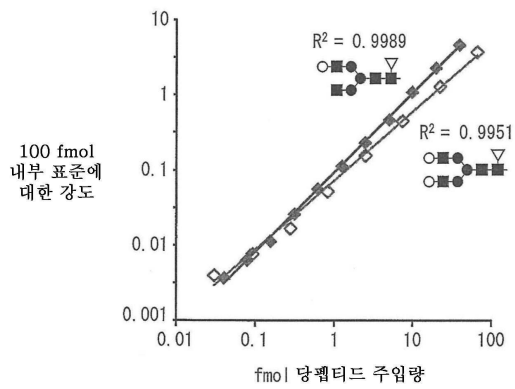
도면3



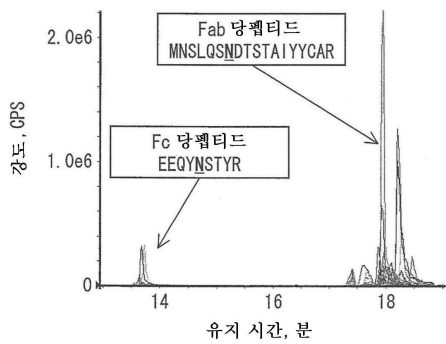
도면4



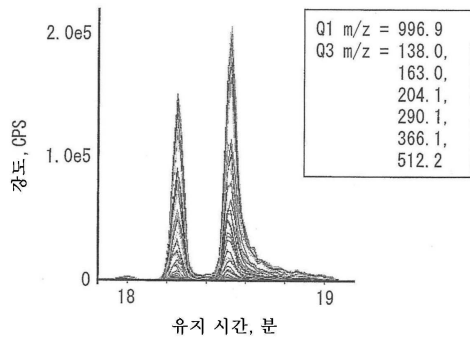
도면5



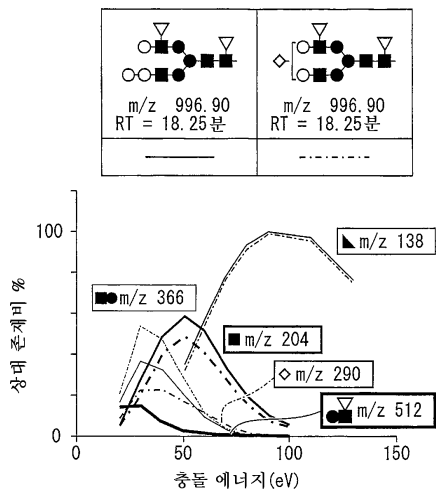
도면6



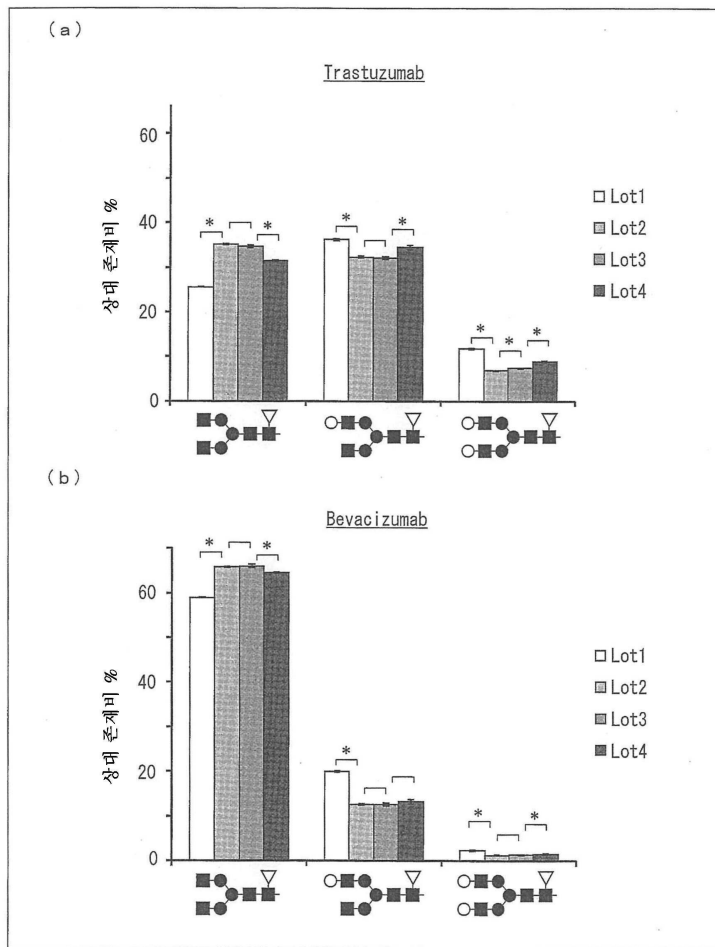
도면7



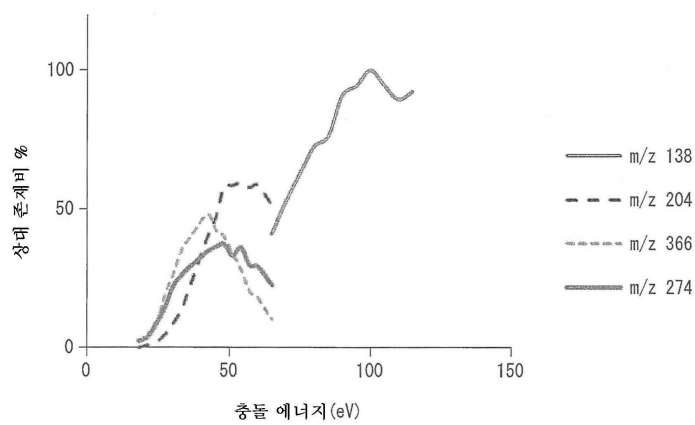
도면8



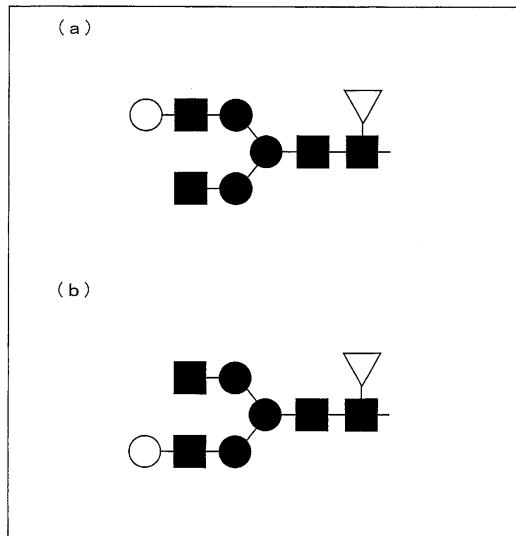
도면9



도면10



도면11



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN  
SHIMADZU CORPORATION

<120> Method of analysis of glycan structure

<130> RK13062KR

<150> JP 2012-197908

<151> 2012-09-07

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> CARBOHYD

<222> (5)..(5)

<400> 1

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

1                    5

<210> 2

<211> 16



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> CARBOHYD

<222> (7)..(7)

<400> 2

Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

1                    5                    10                    15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<400> 3

Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys

1                    5                    10