

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2017.3.2.54>

Simple measurement the chelator number of antibody conjugates by MALDI-TOF MS

Eunbi Shin,¹ Ji Woong Lee,² Kyo Chul Lee,² Jae Hoon Shim,¹ Sangwon Cha,³ and Jung Young Kim^{1,2*}

¹Korea Drug Development Platform using radio-isotope, Seoul 139-706, Korea

²Department of RI-Convergence Research, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul 139-706, Korea

³Department of Chemistry, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Korea

ABSTRACT

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) is one of the powerful methods that enable analysis of small molecules as well as large molecules up to about 500,000 Da without severe fragmentation. MALDI-TOF MS, thus, has been a very useful analytical tool for the confirmation of synthetic molecules, probing PTMs, and identifying structures of a given protein. In recent nuclear medicine, MALDI-TOF MS liner ion mode helps researcher calculate the average number of chelator(or linkage) per an antibody conjugate, such as DOTA-(or DFO-) trastuzumab for labeling a medical radioisotope. This simple technique can be utilized to improve the labeling method and control the quality at the development of antibody-based radiopharmaceuticals, which is very effected to diagnosis and therapy for in vivo tumor cells, with radioisotopes like ⁸⁹Zr, ⁶⁴Cu, and ¹⁷⁷Lu. To minimize the error, MALDI-TOF MS measurement is repeatedly performed for each sample in this study, and external calibration is carried out after data collection.

Key Word: MALDI-TOF MS, chelator number, trastuzumab, antibody conjugate, radioisotope

Introduction

질량분석법(Mass Spectrometry, MS)은 진공상에서 이온의 질량대-전하 비율(mass-to-charge ratio: m/z)을 측정해 분자량을 결정하는 주요한 분석 방법이며, 일반적으로 화합물을 확인하거나 생체 분자를 분석하는데 많이 사용된다(1). 또한 Tandem MS(or MS/MS, MS²)를 이용하여 펩티드 내의 아미노산 서열이나 다당류 내의 당의 서열과 같은 구조적인 정보도 얻을 수 있는 분석기술이다(2-4). 최근에는 생체분자의 공간분포를 각각의 분자량으로 시각화한 Imaging Mass Spectrometry(IMS)가 개발되어 단백질, 펩티드, 지질, 약물 등의 분석에 활용되고 있다[5-7].

질량분석기는 이온화 소스(Ionization Source), 질량분리기(Mass Analyzer), 검출기(Detector)의 3가지로 주요하게 구성된다(figure 1). 이 장비의 기본적인 원리는 시료 주입구(Sample Inlet)에 주입된 시료가 이온화 소스에서 먼저 이온화되고, 생성된 기체상의 이온이 질량분리기로 들어가 각각의 m/z 값에 따라 분리되고, 검출기를 통해 검출되는 것이다. 이 때 이온화 소스에서 검출기까지의 과정은 이온과 공기 분자 사이의 충돌을 방지하기 위해 10^{-5} Pa 정도의 높은 진공이 요구된다.

질량분석기에서 가장 중요한 과정은 전기적으로 중성인 분석물질을 이온으로 만드는 것이다. 일반적으로 작고 간단한 중성분자들은 기체상에서 쉽게 이온화가 되지만, 크고 복잡한

Received: September 27, 2017 / Revised: November 20, 2017 / Accepted: December 23, 2017

Corresponding Author : Jung Young Kim, Ph.D. Department of RI-Convergence Research, Korea Institute of Radiological & Medical Science, 75 Nowon-gil Gongneung-dong, Nowon-Gu, Seoul, Republic of Korea 139-706
Tel: +82-2-970-1624, Fax: +82-2-970-1341, E-mail: jykim@kirams.re.kr

Copyright©2017 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

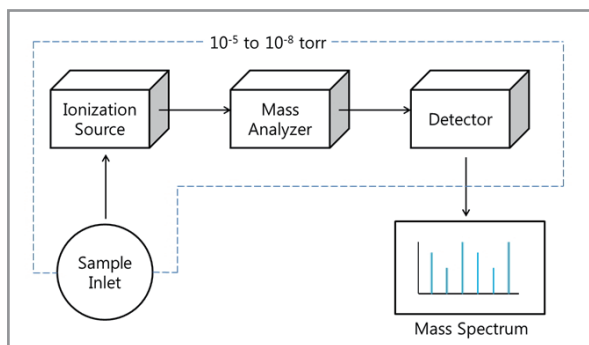


Figure 1. The basic component of a mass spectrometer. The sample is ionized first in the ionization source. And then generated ions are introduced into mass analyzer and separated according to their mass-to-charge (m/z) ratio.

한 화학종들은 이온화 과정에서 조각이온(Fragment Ion)을 형성해 원상태의 시료를 분석하는데 어려움이 있다. 하지만 1980년대 중반 MALDI(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)와 ESI(Electrospray Ionization)가 개발되면서, 50,000 Da 이상의 고 분자량의 시료를 조각이온 없이 기체 상의 이온으로 만들 수 있게 되었다(1,8).

MALDI의 이온화 기술에 대해 정확히 알려진 바는 없지만 일반적으로 분석물질은 매트릭스에 의해 이온화 된다고 알려져 있다(9). 과량의 매트릭스와 시료에 의해 생긴 결정에 UV-레이저 빔을 조사하면 그 에너지가 매트릭스를 통해 시료로 전달되어 약한 이온화가 발생된다. 이때 매트릭스의 역할은 레이저 빔에 의해 조사된 에너지를 축적하고 흡수하여 분석물질이 분해되는 것을 막아주는 것이다(figure 2).

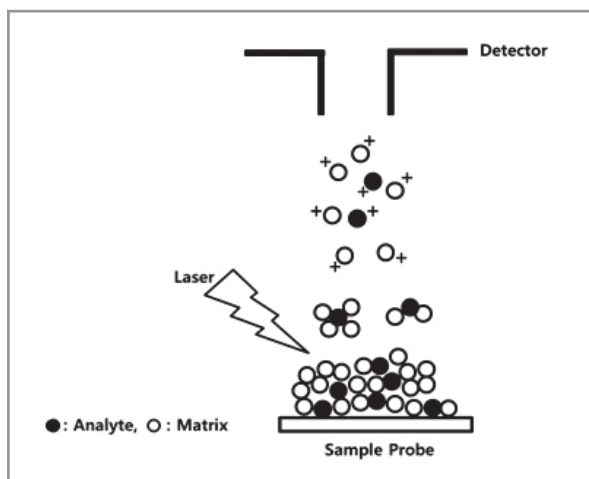


Figure 2. Scheme of MALDI mechanism. Analyte is mixed with excess of matrix and dried onto a plate. The crystals are heated rapidly and sublimated when pulsed laser is applied onto them. During this process, some molecules are ionized in the gas phase.

이온화 소스에서 성공적인 이온화 이후, 질량분리기의 역할은 이온을 m/z 값에 따라 분리하고 검출기로 이동시키는 것이다. 모든 과정은 진공에서 진행하여 이온이 이동하는 동안 충돌하거나 다른 이온들과 반응하는 일이 없도록 해야 한다. 일반적으로 MALDI에서 많이 사용되는 질량분리기는 TOF(Time-of-Flight)이며, Linear mode와 Reflector mode로 나눌 수 있다(10,11). TOF analyzer는 분석 이온들의 비행시간에 따라 m/z 값을 결정하는데, 수식에서 알 수 있듯이 m/z 값은 t^2 에 비례하므로 t^2 을 측정해 m/z 값을 계산할 수 있다.

$$\text{Kinetic Energy (KE)} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot V$$

$$\text{여기서 } v = \frac{L}{t} \text{ 이기 때문에, } \frac{m}{z} = \frac{(2 \cdot e \cdot V)}{L^2} \cdot t^2 \text{ 이다.}$$

그러므로 TOF 분리기는 모든 이온들이 동시에 가속화되지만 각각이 가지는 m/z 값에 따라 검출기에 도달하는 시간이 다른 원리를 이용한 것이다. 이 때 큰 m/z 값을 가지는 이온이 작은 m/z 값을 가지는 이온보다 늦게 검출기에 도달하게 된다. 하지만 질량은 같지만 운동에너지가 다른 두 시료를 Linear-TOF analyzer로 분석할 경우, 두 개의 속력 차이로 인해 m/z 값이 약간씩 차이나 피크가 넓어진다. 하지만 Reflector-TOF analyzer의 경우, 튜브 끝에 이온과 반대의 전하를 띠는 거울이 있어서 속도가 높은 시료가 drift tube에 더 깊이 들어가서 두 시료의 속도 차이를 줄여줄 수 있다. 그래서 Reflector-TOF analyzer를 사용할 경우, Linear-TOF analyzer보다 더 높은 분해능(Resolution)을 보여준다. 하지만 분자량이 큰 시료를 분석하게 되면, Reflectron 내에서 에너지를 받으며 시료가 깨질 수 있다는 단점이 있다(figure 3).

그러므로 MALDI-TOF 질량분석기술은 최근 핵의학에서 활발하게 연구되는 질환표적 진단이나 치료목적을 위한 생체분자 기반 방사성금속(^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{177}Lu , ^{90}Y 등) 표지 방사성의약품 개발에서 매우 유용하게 사용할 수 있다. 상기 분석기술은 무기화합물의 분자량도 정밀하게 측정가

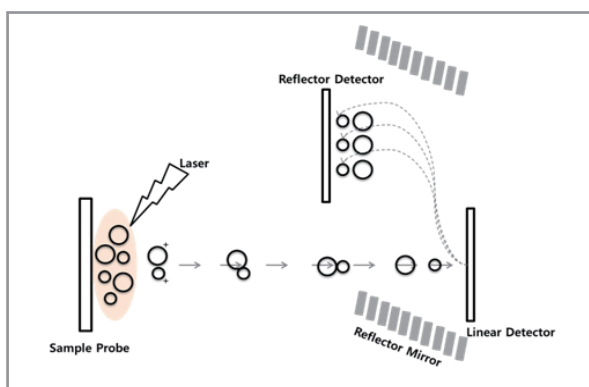


Figure 3. The scheme of time-of-flight mass analyzer. Ions are separated according to their mass-to-charge (m/z) ratio, not mass itself. Light ions are accelerated by a higher velocity than heavy ions. The reflector detector can focus ions of the same mass but different velocities.

능하며, 특히 종양 표적형 항체(trastuzumab, rituximab, cetuximab 등)를 이용한 방사성의약품 연구에서 킬레이터(Chelator)-항체 콘주게이트의 질량을 분석하여 콘주게이트의 정량화 및 확인뿐만 아니라, 단일 항체당 평균적인 킬레이터 비율과 같은 유용한 정보를 제공할 수 있다. 여기서 킬레이터 비율의 평균값은 방사성금속의 표지효율 및 체내 안정성, 항체의 물성변화 등의 분석에 매우 유용하며, 연구자임상 시험 또는 임상시험에서도 필수적인 결과이다. 따라서, 본 연구는 항체 이용 방사성의약품 연구에서 MALDI-TOF 질량 분석기술의 적용원리, 시료처리 및 분석법을 구체적으로 소개하고, 아울러 실제 실험을 통해 단일 항체 콘주게이트에서 킬레이터 비율을 분석하는 기술을 보여준다.

Materials and Methods

1. 기기 및 재료

MALDI-MS 분석에 필요한 재료인 trifluoroacetic acid(TFA), acetonitrile(ACN), MALDI matrix(sinapinic acid, SA), bovine serum albumin(BSA)는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 사용한 기기는 ABI4800 Plus MALDI-TOF/TOF analyzer(Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA)이다. 구리(^{64}Cu)와 지르코늄(^{89}Zr)은 한국원자력의학원의 50 MeV 사이클로트

론 (Scantronix사, 1985년)으로 핵반응 $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ 및 $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ 에 의해 생산되었다.

2. 항체접합체 합성

본 연구에서주요하게사용한항체는trastuzumab(Herceptin, Roche사)를 사용하였고, 킬레이터 DOTA(DOTA-NHS ester, 2,2',2''-(10-(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid), DFO(p-Isothiocyanatobenzyl-deferoxamine)는 (주)퓨처캡사로부터 구입하여 콘주게이션에 활용하였다. 또한 항체와 킬레이터의 접합반응은 유정수 교수 연구팀의 선행연구(12)에 따라 반응조건을 동일하게 설정하여 수행하였다.

3. MALDI MS 분석

먼저, MALDI MS 분석에 사용한 매트릭스는 고 분자량 시료 분석에 주로 사용되는 SA(Sinapinic acid)로 50% ACN/0.1% TFA에 20 mg/mL가 되도록 만들어준다. Spotting 방법은 dried droplet 방법으로 분석물질과 매트릭스를 1:1의 부피 비로 섞어준 후, 2 μL 를 384-well MALDI target plate(ASTA INC., Suwon, KOREA)에 spotting하고 진공을 이용해 말려준다. 질량분석기는 20 kV 가속전압에서 positive linear mode로 작동시키고 스펙트럼은 1200 laser shot을 평균하여 얻었다. 각각의 시료는 5번의 반복실험을 통해 평균과 표준편차를 구하고, 데이터 수집 후 data explorer을 이용해 외부 보정(External calibration)을 한다. 외부 보정에 사용되는 단백질은 분석항체와 비슷한 분자량을 가진 BSA(M+H = 66,431, 2M+H = 132,861)이다.

Results and Discussion

MALDI Reflector mode로 고 분자량의 항체를 찍을 경우, 항체의 조각 이온이 생겨 정확한 분석이 어려워지기 때문에 Linear mode로 분석해야 한다. 하지만 Linear mode

에서는 약간의 오차가 발생하므로, 정확한 분자량의 분석이 필요할 경우는 오차를 줄이는 방법이 필요하다. 그래서 우리는 항체와 비슷한 분자량을 가지는 표준(standard) 물질로 보정(calibration)을 진행하였다. 우리가 분석하고자 하는 항체는 trastuzumab으로 분자량이 140,000 Da 정도이므로 BSA(M+H = 66,431, 2M+H = 132,861)로 calibration을 하였다. MALDI에서 보정은 외부(external)와 내부(internal)에서 모두 가능한데, 이 실험에서는 외부보정을 진행하였고 추가로 더 정확한 분자량을 측정하기 위해 data explorer 소프트웨어를 이용해 다시 한 번 보정을 진행하였다. 그리고 찍을 때마다 질량 값이 약간씩 차이가 나기 때문에 5번의 반복 실험을 진행하였고 측정시료의 분자량에 대한 평균과 표준편차를 구하였다. 표준편차가 50 Da 이하로 합성에 사용된 킬레이터의 분자량과 차이가 적으면 데이터가 신뢰할 수 있다고 판단하였다. 킬레이터 개수를 파악하는 방법은 먼저 기준 항체와 합성한 항체 각각을 MALDI를 이용해 분석하고 두 값의 차이를 킬레이터 분자량으로 나누어 계산하였다. 여기서 SW은 항체의 분자량이고, CAW은 킬레이터-항체(또는 금속-킬레이터-항체 콘주게이트)의 분자량이고, CW은 사용된 킬레이터의 분자량을 의미한다.

단일 항체당 결합된 킬레이터의 평균 개수

$$= (\text{CAW} - \text{SW})/\text{CW}$$

우리가 분석하고자 하는 시료는 ^{64}Cu -DOTA-trastuzumab과 ^{89}Zr -DFO-trastuzumab으로 앞에서 설명했듯이 보다 정확한 분석을 위해 5번의 반복 실험을 진행하였고, 그 결과를 table 1에 나타냈다.

결과에서 알 수 있듯이 기준항체인 trastuzumab과 분석하고자 하는 시료 모두 표준편차가 50이하로 실험결과에 큰

Table 1. The average molecular weight and standard deviation of antibody conjugates.

Targeted Antibody	m/z	Average	SD
Trastuzumab	147860.20 147898.11 147858.11 147862.76 147865.11	147868.86	16.56
^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab	150598.88 150591.67 150503.89 150600.06 150611.30	150581.16	43.76
^{89}Zr -DFO-Trastuzumab	149168.48 149163.51 149052.89 149137.30 149110.56	149126.55	47.23

Table 2. Calculation the number of chelators per antibody(trastuzumab) molecule.

Targeted Antibody	Conjugate M.W	Antibody M.W	Chelator M.W	Chelator ratio
^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab	150581.16	147868.86	467.41	5.80
^{89}Zr -DFO-Trastuzumab	149126.55	147868.86	752.33	1.67

영향을 미치지 않을 것이라고 판단하고 다음 실험을 진행하였다.

우선, ^{64}Cu -DOTA-trastuzumab의 결과(figure 5)를 보면 trastuzumab의 mass spectrum(figure 4)와 비교했을 때 singly charged ion mass가 2,712 Da정도 차이 나는 것을 알 수 있다. 여기에 ^{64}Cu -DOTA의 분자량인 467.41을 대입하면 항체와 결합한 킬레이터의 수가 약 5.8개라는 결과를 얻을 수 있다.

다음으로 ^{89}Zr -DFO-trastuzumab의 결과(figure 6)를 같은 방법으로 계산하면 singly charged ion mass가 1,257 Da정도 차이 나고, 항체에 결합한 킬레이터의 수가 약 1.7개라는 것을 알 수 있다.

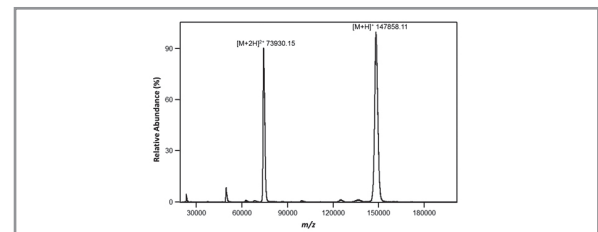


Figure 4. The MALDI mass spectrum of trastuzumab.

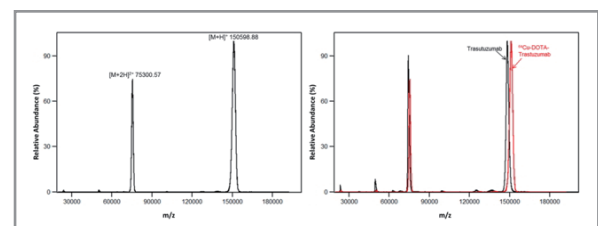


Figure 5. Measurement of DOTA chelates in trastuzumab by MALDI-TOF MS. Comparison of mass spectra displaying trastuzumab (black trace) and ^{64}Cu -DOTA-trastuzumab (red trace).

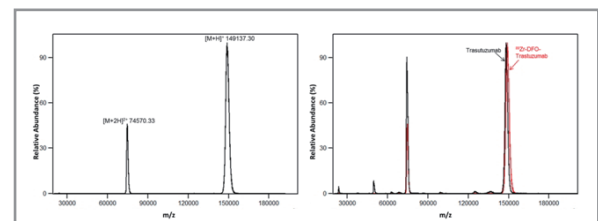


Figure 6. Measurement of DFO chelates in trastuzumab by MALDI-TOF MS. Comparison of mass spectra displaying trastuzumab (black trace) and ^{89}Zr -DFO-trastuzumab (red trace).

Conclusion

본 연구에서는 MALDI-TOF MS를 활용하여 trastuzumab와 ^{64}Cu -DOTA, ^{89}Zr -DFO 킬레이터가 결합한 항체간의 질량 차이를 분석하여 각 킬레이터의 함량을 분석하였다. 5번의 반복실험으로 평균과 표준편차를 구하고 external calibration 과 data explorer 소프트웨어를 이용하여 MALDI Linear mode에서 생길 수 있는 오차를 줄여 보다 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 이는 항체 콘주게이트에서 킬레이트의 개수를 정량화하는 것뿐 아니라 의료용 방사성동위원소 표지결과 분석과 항체 콘주게이트의 화학적 변화 등에 대한 유용한 정보를 제공할 것이라 기대된다.

Acknowledgments

이 논문은 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받은 국책연구사업을 통하여 수행된 연구임(No. 17110483142, No. 2017M2A2A6A02019904).

Reference

1. Michael K, Franz H. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60:2299-2301
2. Yu W, Vath JE, Huberty MC, Martin SA. Identification of the facile gas-phase cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx peptide bonds in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 1993;65:3015-3023
3. Huberty M, Vath J, Yu W, Martin S. Site-specific carbohydrate identification in recombinant proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem.* 1993;65:2791-2800
4. Ouyang Z, Takáts Z, Blake TA, Gologan B, Guymon AJ, Wiseman JM, Oliver JC, Davisson VJ, Cooks RG. Preparing protein microarrays by soft-landing of mass-selected ions. *Science* 2003;301:1351-1354
5. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem.* 1997;69:4751-4760
6. Balluff B, Schöne C, Höfler H, Walch A. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: technological advancements and recent applications. *Histochem Cell Biol.* 2011;136:227-244
7. Wang S, Chen X, Luan H, Gao D, Lin S, Cai Z, Liu J, Liu H, Jiang Y. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of cell cultures for the lipidomic analysis of potential lipid markers in human breast cancer invasion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2016;30:533-542
8. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71
9. Vertes A, Levine RD. Sublimation Versus Fragmentation in Matrix-assisted laser desorption. *CHEM. Phys. Lett.* 1990;171:284-290
10. Lubman DM, Bell WE, Kronick MN. Linear mass reflectron with a laser photoionization source for time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 1983;55:1437-1440
11. Cornish TJ, Cotter RJ. A curved-field reflectron for improved energy focusing of product ions in time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1993;7:1037-1040
12. Pandya DN, Bhatt N, Dale AV, Kim JY, Lee H, Ha YS, Lee JE, An GI, Yoo J. New bifunctional chelator for ^{64}Cu -immuno-positron emission tomography. *Bioconjugate Chemistry.* 2013;24:1356-1366