

LC-MS/MS를 이용한 단백질 의약품 맵핑 교수법

Educational Peptide Mapping of Protein-based Biopharmaceuticals by using LC-MS/MS

김준석*

한국폴리텍대학 분당융합기술교육원 생명의료시스템과

Junseok Kim*

Department of Biomedical Systems Engineering, Korea Polytechnics, Gyeonggi 13122, Korea

[요약]

본 실험은 효용성이 넓어지고 있는 바이오의약품 시장에서 질량분석기를 이용한 정밀 분석법을 제시한다. 단백질 의약품인 인성장호르몬(Somatotropin)을 분석하는 다양한 기술 중, 생화학적 시료 전처리를 통해 펩티드화 시킨 단백질을 LC-MS/MS 분석법으로 분석하였다. 분석과정은 액체크로마토그래피를 이용한 분리분석과 질량분석을 이용한 MS 및 MS/MS 분석으로 수행하였다. 인성장호르몬의 경우 21개의 트립틱 펩티드로 절단할 수 있는데, 본 실험을 통해 이들 중 13개의 펩티드가 평균 1 ppm 에러 이내로 이론적 예측치와 일치하였다.

[Abstract]

This experiment presents a precise analysis method using a mass spectrometer in the biopharmaceutical market, where utility is expanding. Among various techniques for analyzing the protein drug, somatotropin, the peptide fragments through biochemical sample preparation was analyzed by LC-MS/MS characterization. The analysis process was performed by separation analysis using nanoUPLC and MS/MS analysis using Orbitrap. In the case of somatotropin with 21 tryptic peptides, 13 of them were consistent with theoretical predictions within an average of 1 ppm error.

Key Words: LC-MS/MS, Protein drug, Somatotropin, Tryptic peptide

<http://dx.doi.org/10.14702/JPEE.2022.327>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Received 21 June 2022; **Revised** 11 August 2022

Accepted 22 August 2022

***Corresponding Author**

E-mail: junskim@kopo.ac.kr

I. 서론

의약품 시장은 21세기에 들어와 바이오 의약품 시장으로 그 영역을 확대하고 있다. 하지만, 생산 기술 측면에서 바이오 의약품의 난이도는 화학 기반의 의약품보다 훨씬 많은 기술이 필요하여진다. 특히, 세포 내에서의 배양과정을 통해 잘 정제된 의약품을 생산하고, 의약품으로써의 효능을 확인하는데 상당한 시간과 비용이 발생한다. 질량분석기의 출현은 이러한 복잡한 과정에서 발생할 수 있는 어려움을 정밀한 특성 분석을 통해 더 정확한 바이오 의약품 생산에 도움을 주고 있다 [1,2].

LC-MS/MS는 세포나 혈장 혹은 정제되어 얻어진 복잡한 시료를 액체크로마토그래피를 이용해 분리하고, 질량분석기를 통해 이온화된 분자를 MS로, 쪼개진 분자를 MS/MS로 검출하는 분석기술이다[3-5]. 화학 기반의 의약품이 보통 100~500 Da 사이인 데 반해 바이오 의약품은 10 KDa~150 KDa인데, 분자의 크기로 인해 바이오 의약품 분석은 상당한 생화학적 지식과 분석화학적 지식이 요구된다. LC-MS/MS를 이용해 정확한 분석 할 수 있는 분자량의 크기는 현재로서는 20 KDa 이하이다. 따라서, 바이오 의약품은 액체크로마토그래피의 특성과 질량분석기의 특성에 맞게 시료 전처리를 통해 정밀한 분석이 가능하다[1,3-6].

먼저, 시료 전처리에서 거대분자들은 LC-MS/MS에서 분석이 용이하게 트립신과 같은 효소를 이용해 펩티드로 절단된다. 이렇게 절단된 펩티드들은 C18기반의 역상크로마토그래피에서 효과적인 분리가 일어나고, 트립신에 의해 절단된 라이신(K)과 아르기닌(R)은 N말단과 잔기에 의해 산성 조건에서 양성자를 얻어 이온화가 이루어진다. 이렇게 이온화된 분자를 질량분석기에서 질소와의 충돌로 쪼개져 MS/MS로 분석이 가능하게 된다. 이후 펩티드 이론 서열 기반으로 예측한 절편들의 질량 값과 펩티드의 MS/MS 실측 값을 비교

하여 검출 가능 여부를 판단한다[1,3,4,6].

본 논문에서는 인성장호르몬을 이용해 바이오 의약품을 LC-MS/MS 기술로 특성 분석을 하는 방법을 소개함과 동시에 점점 더 발전되어가는 바이오 의약품 시장에서 질량 분석 기술을 이용해 어떠한 정보까지 얻을 수 있는가를 보여주고, 이화학분석과 바이오 분석의 융합적 첨단기술이 바이오 의약품 시장에 어떻게 활용되어 질 수 있는가를 보여줄 것이다.

II. 결과

A. 시료 전처리

사이즈가 큰 분자의 경우는 효소를 이용한 절단이 필요한데, 그에 앞서 Urea 혹은 Guanidine과 같은 변성제와 1,4-dithiothreitol(DTT)나 Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride(TCEP)와 같은 환원제를 이용하여 1차 구조의 단백질을 준비한다. 이황화결합을 환원 시킨 후에는 재결합을 방지하기 위해 iodoacetamide(IAA)로 알킬화를 시켜준다. 본 실험에 사용된 인성장호르몬의 경우도 동일한 방법을 사용했다. 이후, 트립신 효소를 이용해 표 2와 같이 트립틱 펩티드로 만든 후, solid phase extraction(SPE)을 이용해 LC-MS/MS 전 염을 완전히 제거하였다.

B. 크로마토그램

준비된 시료는 LC-MS/MS를 이용해 분리후 질량측정을 하였다. 그림 1은 단백질을 펩티드화 한 후, 측정된 Total ion

표 1. FPTIPLSR의 이론적 쪼개짐 형태

Table 1. Theoretical fragments of FPTIPLSR

#	Immon.	b	Seq.	y	#
1	120.08		F	930.54	8
2	70.07	245.13	P	783.47	7
3	74.06	346.18	T	686.42	6
4	86.1	459.26	I	585.37	5
5	70.07	556.31	P	472.29	4
6	86.1	669.4	L	375.23	3
7	60.04	756.43	S	262.15	2
8	129.11		R	175.12	1

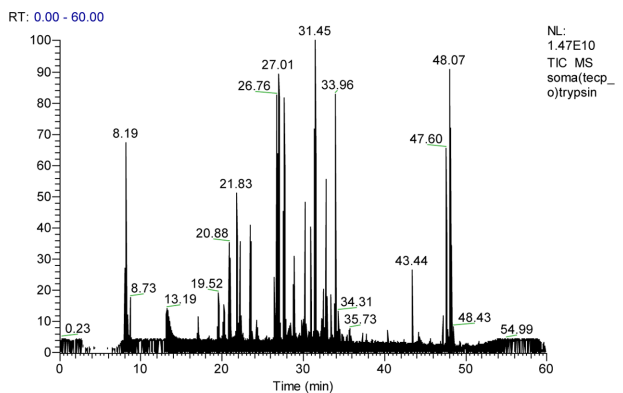


그림 1. 인성장호르몬 펩티드 절편에 대한 전체 이온 크로마토그램
Fig 1. Total ion chromatogram (TIC) of somatotropin digests.

표 2. 인성장호르몬의 펩티드 맵핑

Table 2. Peptide mapping of somatotropin

ID	Sequence	charge	Theoretical (m/z)	Measured (m/z)	Mass error (ppm)	RT (min)
T1	FPTIPLSR	1	930.540702	930.54101	-0.33099	22.96
		2	465.773989	465.77497	-2.106172	22.96
T2	LFDNAMLR	1	979.502938	979.50293	0.0081674	22.96
		2	490.255107	490.25568	-1.168779	22.30
T3	AHR	1	383.214968			
		2	192.111122			
T3-T4-T5	AHRHLQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK	2	1546.267207			
		3	1031.180563			
		4	773.637242	773.63959	-3.035014	23.61
T4	LHQLAFDTYQEFEEAYIPK	1	2342.133885			
		2	1171.570581			
		3	781.382813			
T5	EQK	1	404.213965			
		2	202.610621			
T6	YSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNR	1	2673.261279			
		2	1337.134278	1337.13464	-0.270728	28.04
T7	EETQK	1	762.362807			
		2	381.685042			
T8	SNLELLR	1	844.488669			
		2	422.747973	422.74832	-0.82082	20.13
T9	ISLLLIQSWLEPVQFLR	1	2055.20005			
		2	1028.103663	1028.10397	-0.298608	38.39
T10	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	1	2262.1288			
		2	1131.568038	1131.56836	-0.284561	30.44
T11	DLEEGIQTLMGR	1	1361.672909			
		2	681.340093	681.34039	-0.435906	29.09
T12	LEDGSPR	1	773.378791			
		2	387.193034	387.19322	-0.480381	12.64
T13	TGQIFK	1	693.392983			
		2	347.20013			
T14	QTYSK	1	626.314402			
		2	313.660839			
T15	FDTNSHNDALLK	1	1489.69173			
		2	745.349503			
		3	497.235428			
T16	NYGLLYCFR	1	1205.57716			
		2	603.292218	603.2926	-0.633192	25.99
T17	K	1	147.112799			
T18	DMDK	1	508.207165			
		2	254.607221			

표 2. 계속

Table 2. Continued

ID	Sequence	charge	Theoretical (m/z)	Measured (m/z)	Mass error (ppm)	RT (min)
T18-T19	DMDKVETFLR	1	1253.619419			
		2	627.313348	627.31434	-1.581347	22.17
T19	VETFLR	1	764.430095			
		2	382.718686			
T20	IVQCR	1	675.360636	675.37152	-16.11583	18.53
		2	338.183956			
T21	SVEGSCGF	1	842.334876	842.33612	-1.476847	18.59
		2	421.671076			

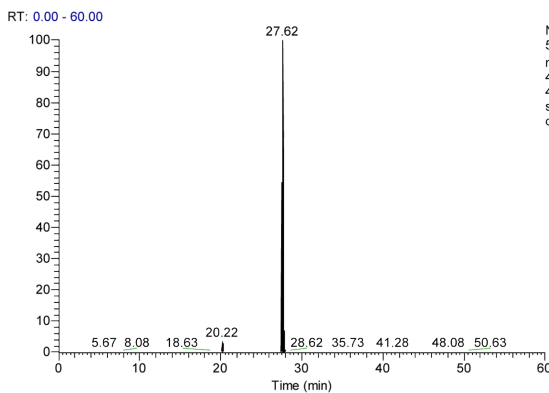


그림 2. FPTIPLSR에 대한 이온 추출 크로마토그램

Fig. 2. Extracted ion chromatogram (XIC) of FPTIPLSR.

chromatogram (TIC)을 보여준다. 질량분석기로부터 얻는 데이터는 양이온으로 이온화가 이루어진 펩티드들에 대한 결과를 잘 보여주기 때문에, 그에 앞서 액체크로마토그래피의 정교한 분리분석을 정밀히 해줘야 한다. 본 실험에서는 C18 기반의 레진을 이용한 펩티드 분리분석을 수행하였다. 분리를 진행 한 후, 표 2와 같이 맵핑된 펩티드의 검출 여부를 분석하기 위해 인성장호르몬의 하나의 펩티드인 FPTIPLSR를 이용해 Extracted ion chromatogram (XIC) 분석하였다(그림 2).

C. MS spectrum

XIC로부터 얻은 펩티드 피크가 실제 FPTIPLSR 펩티드 인지를 확인하기 위해, 이론적으로 계산된 1+와 2+를 실험적으로 얻어진(그림 3과 4) 데이터와 비교하였다. 그림 3에서는 465.77과 930.54 m/z가 관측되었는데, 이는 각각 2+와 1+가의 이론적 값과 매치가 되었다. 분석의 정확도를 높이기

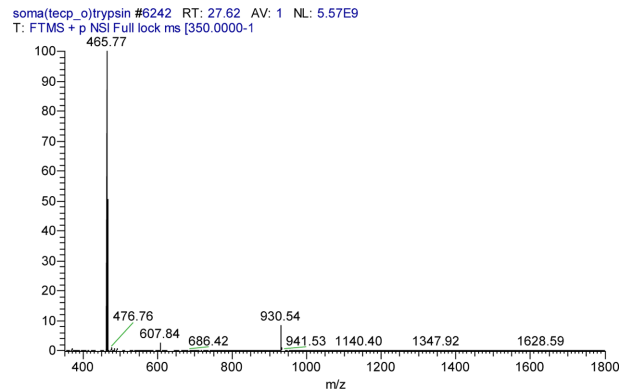


그림 3. FPTIPLSR에 대한 MS 스펙트럼

Fig. 3. MS spectrum of FPTIPLSR.

위해 데이터들을 확대하여 보았다(그림 4). 분석 결과 465.77 m/z의 경우, 동위원소간 0.5 m/z의 차이를 나타내어 2+임을 알 수 있었고, 930.54 m/z의 경우는 1 m/z의 차이로 1+임을 확인 할 수 있었다.

D. MS/MS spectrum

MS로 확인된 FPTIPLSR 펩티드의 정확성을 높이기 위해 MS/MS분석을 수행하였다(그림 5). 정확성 높은 분석을 위해 먼저 FPTIPLSR에 대한 이론적 조각짐을 표 1과 같이 이론적으로 예측하였으며, 측정된 (그림 5) MS/MS 스펙트럼과 비교하여 이론적 데이터와 실험적 데이터의 매치를 확인하였다. 표 1의 빨간색으로 표시된 부분은 이론과 실험적 데이터 간에 매치된 부분을 나타내고 있다. 14개의 이론적 MS/MS 조각 중 9개(64.3%)가 실험적 데이터와 일치하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 27.62분에 TIC에서 나온 피크는 상당히

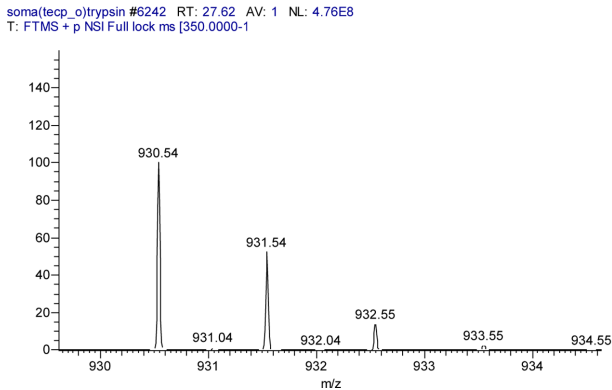
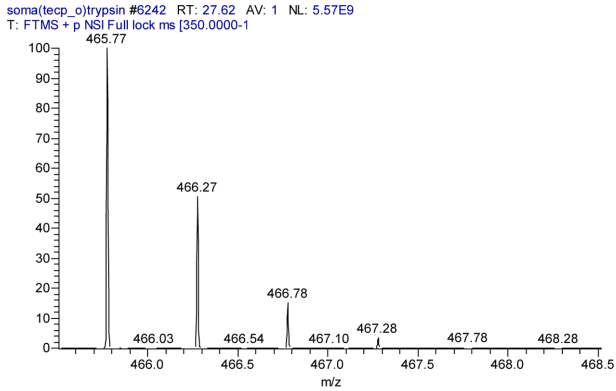


그림 4. 465.77 m/z (위)와 930.54 m/z (아래)에 대한 동위원소 패턴

Fig. 4. Isotopic pattern of 465.77 m/z (top) and 930.54 m/z (bottom).

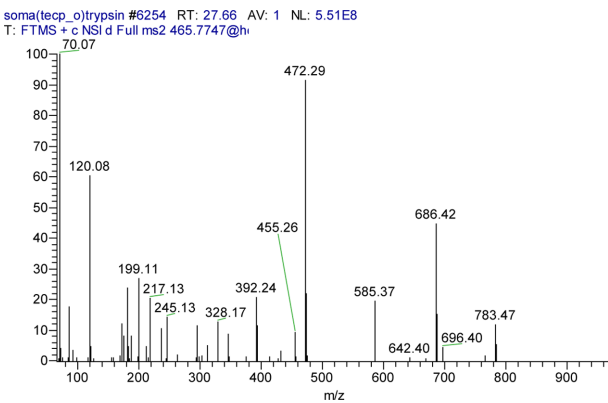


그림 5. FPTIPLSR에 대한 MS/MS 스펙트럼

Fig. 5. MS/MS spectrum of FPTIPLSR.

높은 확률로 FPTIPLSR 펩티드에 대한 피크임을 확인할 수 있었다.

E. Peptide mapping

인성장호르몬의 경우, 트립신 효소로 절단했을 때 표 2와 같이 21개의 이론적인 펩티드 조각을 얻을 수 있다. 인성장호르몬의 첫 번째 트립틱 펩티드 조각인 T1은 N말단의 첫 펩티드로써 그림 2~5와 같은 분석 방식으로 되었다. 나머지 T2~T21까지의 펩티드들도 마찬가지로 분석을 진행하였고, 21개 중 13개의 펩티드가 이번 실험에서 관측되었다.

III. 결론

본 실험을 통해 인성장호르몬을 LC-MS/MS로 펩티드 맵핑을 수행하였다. 실험은 생화학적 시료 전처리 과정을 통해, 액체크로마토그래피를 이용한 분리분석, MS를 이용한 패턴분석, MS/MS를 이용한 쪼개짐 분석 순으로 수행하였고, 21개의 트립틱 펩티드 중에서 8개의 펩티드는 이 번 실험을 통해 관측되지 않았다. 이는 두 가지 원인이 있는데 펩티드가 너무 짧아 칼럼에 머물지 않고 용출되어 관측이 안되거나, T15와 같이 펩티드의 소수성이 너무 커서 LC-MS/MS 분석시간내에 용출이 되지 않아 관측이 안된 경우이다. 두 번째 원인으로 펩티드의 이온화로 인한 것인데, 본 실험에서는 대부분의 펩티드가 N말단과 C말단의 라이신과 아르기닌 잔기에 의해 이온화에는 문제가 없던 것으로 판단된다. 따라서 액체크로마토그래피와 펩티드간의 상호작용에 의한 문제가 8개의 펩티드 관측에 어려움을 제공했다. 이를 극복하기 위해서는 트립신과 같은 하나의 효소를 이용하는 것보다, chymotrypsin, LysC, LysN, AspN, GluC와 같은 다양한 종류의 효소를 이용하여 크로마토그래피적 한계를 극복할 수 있다. 하지만, 다른 효소의 경우 질량분석기에서의 이온화 효율에 한계가 있을 수 있어 이 부분은 향후 연구에 관찰이 필요하다.

참고문헌

[1] S. H. Han, J. S. Kim, Y. Lee, H. Choi, J. W. Kim, D. L. Na, E. G. Yang, M. H. Yu, D. Hwang, C. Lee, and I. Mook-Jung, "Both targeted mass spectrometry and flow sorting analysis methods detected the decreased serum apolipoprotein E level in Alzheimer's disease patients," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 13, no. 2, pp. 407-419, February 2014.

- [2] T. Mouchahoir and J. E. Schiel, "Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NISTmAb," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 410, no. 8, pp. 2111-2126, March 2018.
- [3] J. S. Kim, H. S. Ahn, S. M. Cho, J. E. Lee, Y. Kim, and C. Lee, "Detection and quantification of plasma amyloid- β by selected reaction monitoring mass spectrometry," *Analytica Chimica Acta*, vol. 840, pp. 1-9, August 20 2014.
- [4] J. J. Kennedy, S. E. Abbatiello, K. Kim, P. Yan, J. R. Whiteaker, C. Lin, J. S. Kim, Y. Zhang, X. Wang, R. G. Ivey, L. Zhao, H. Min, Y. Lee, M.-H. Yu, E. G. Yang, C. Lee, P. Wang, H. Rodriguez, Y. Kim, S. A. Carr, and A. G. Paulovich, "Demonstrating the feasibility of large-scale development of standardized assays to quantify human proteins," *Nature Methods*, vol. 11, no. 2, pp. 149-155, February 2014.
- [5] N. L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, T. Gatlin, R. S. Tirumalai, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, J. N. Adkins, J. G. Pounds, R. Fagan, and A. Lobley, "The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 3, no. 4, pp. 311-326, April 2004.
- [6] J. S. Kim, Y. Lee, M. Y. Lee, J. Shin, J. M. Han, E. G. Yang, M.-H. Yu, S. Kim, D. Hwang, and C. Lee, "Multiple reaction monitoring of multiple low-abundance transcription factors in whole lung cancer cell lysates," *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 6, pp. 2582-2596, June 2013.



김 준 석 (Junseok Kim)_정회원

2002년 2월 : 경기대학교 화학과 학사

2008년 8월 : Georgia State University 화학과 박사

2015년 8월 ~ 현재 : 한국폴리텍대학 부교수

<관심분야> 분석화학, 질량분석학, 크로마토그래피, 바이오의약품