

나노 액체크로마토그래피-텐덤 질량분석기를 이용하여 N-당질화 위치 및 N-당사슬 구조 규명을 위한 방법

조영은 · 김숙경* · 백문창#

경북대학교 의과대학 분자의학교실, *한국표준과학연구원

(Received May 21, 2013; Revised August 17, 2013; Accepted August 17, 2013)

A Sensitive Method for Identification of N-Glycosylation Sites and the Structures of N-Glycans Using Nano-LC-MS/MS

Young-Eun Cho, Sook-Kyung Kim* and Moon-Chang Baek#

Department of Molecular Medicine, Cell and Matrix Biology Research Institute, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea

*Health Metrology Group, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon 305-340, Korea

Abstract — Biosimilars are important drugs in medicine and contain many glycosylated proteins. Thorough analysis of the glycosylated protein is a prerequisite for evaluation of biosimilar glycan drugs. A method to assess the diversity of N-glycosylation sites and N-glycans from biosimilar glycan drugs has been developed using two separate methods, LC-MS/MS and MALDI-TOF MS, respectively. Development of sensitive, accurate, and efficient methods for evaluation of glycoproteins is still needed. In this study, analysis of both N-glycosylation sites and N-glycans of glycoprotein was performed using the same LC-MS/MS with two different nano-LC columns, nano-C18 and nano-porous graphitized carbon (nano-PGC) columns. N-glycosylated proteins, including RNase B (one N-glycosylation site), Fetuin (three sites), and α -1 acid glycoprotein (four sites), were used, and small amounts of each protein were used for identification of N-glycosylation sites. In addition, high mannose N-glycans (one type of typical glycan structure), Mannose 5 and 9, eluted from RNase B, were successfully identified using nano-PGC-LC MS/MS analysis, and the abundance of each glycan from the glycoprotein was calculated. This study demonstrated an accurate and efficient method for determination of N-glycosylation sites and N-glycans of glycoproteins based on high sensitive LC-MS/MS using two different nano-columns; this method could be applied for evaluation of the quality of various biosimilar drugs containing N-glycosylation groups.

Keywords □ Biosimilar, N-glycan, N-glycosylation site, nano-LC-MS/MS

당질(Glycans)은 세포간의 신호전달, 단백질간의 상호작용, 세포 간의 표적작용 등 다양한 생물학적 과정에 참여하며 중요한 역할을 한다.^{1,2)} 최근에는 이러한 당질을 포함하는 당단백질이 암 전이 및 여러 가지 질병상태에서 특히 많이 존재하며, 이를 이용하여 질병을 진단하는 바이오마커로써 이용 가능하게 된다.³⁾

바이오시밀러(biosimilar)는 단백질 의약품의 복제약 개념으로 다른 말로 바이로직스(Biologics) 또는 바이오제네릭스(biogenerics)라고 부르며, 유전자 재조합기술을 이용한 최초의 단백질 의약품이 출시된 이후 이들의 제품의 특허가 완료됨에 따라 바이오시밀러 시장이 점점 더 부각되고 있다.⁴⁾ 바이오시밀러는 작은 크

기의 단백질 의약품과는 달리, 일반적으로 크기가 큰 단백질로 구성되어 있으며, Erythropoetin(EPO)와 Interferon(IFN)를 포함하여 다양한 치료용 항체 및 효소 치료제와 같은 당단백질 의약품들이 있다.¹⁰⁾ 이런 당단백질 의약품은 당단백질의 활성도, 반감기, 생리화학적 적합성 그리고 온도 등 여러 가지 요인들에 영향을 받으므로 의약품 당단백질 분석을 위한 확립된 기술이 요구된다.⁴⁾ 또한 바이오시밀러 의약품은 제약회사마다 다른 방법으로 만들기 때문에, 당단백질의 의약품을 생산할 때에는 배치(batch)마다 당사슬이 일정하게 부착되었는지 품질을 평가하고 관리하는 것이 중요하다. 따라서, 바이오시밀러 의약품에서 당단백질 분석 기술 방법의 체계화 및 표준화가 필요하다.

일반적으로, 당단백질 의약품들의 안전성은 당단백질의 당사슬 구조 및 당질화 위치분석을 통해서 평가된다. 이전의 당단백질 분석은 일반적으로 matrix-assisted laser desorption/ionization

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-420-4948 (팩스) 053-426-4944
(E-mail) mcbaek@knu.ac.kr

(MALDI)을 이용하여 분석되어왔다.⁵⁾ 그러나, 이 방법은 시료의 소실 및 오염을 일으키는 문제점 때문에 복잡한 당단백질 분석하는 연구에는 적용하기 어렵다. nano-LC를 이용한 방법은 적은 양의 당단백질을 이용하여 분석이 가능하며, 기존의 방법보다 더 정확하고 효율적인 결과를 얻을 수 있다. 또한, 단순한 당단백질 뿐만 아니라 복잡한 당단백질까지 분석 할 수 있다는 이점이 있다.⁶⁾ 따라서 기존의 한계점을 극복하기 위해서 nano-LC를 이용한 분석이 필요하다.

본 연구는 N-당질화 위치와 N-당사슬 구조를 nano-scale LC-MS/MS를 이용한 효율적인 방법을 개발하고자 하였다. 이 목표를 수행하기 위해서 세 개의 표준 단백질인 Fetuin, RNase B, 그리고 α -1 acid glycoprotein를 이용하였다. 표준 단백질의 N-당질화 위치 및 N-당사슬 구조를 규명하기 위해서 nano-C18와 nano-porous graphitized carbon(nano-PGC) MS/MS를 이용하여 분석하였다. 본 실험을 통해서 nano-scale LC-MS/MS를 기반으로 미량의 바이시밀러 의약품 이용하여 이들에 존재하는 당단백질 구조 분석하는 방법으로 적용 가능하다.

실험방법

액체상태의 효소 반응을 통해 N-당질화 위치를 함유한 펩타이드 분리

표준 당단백질(1 μ g)를 단백질 용해시킨 후, 환원(reduction)을 위해 10 mM dithiothreitol(DTT) 3 μ l를 56°C에서 20분 동안 반응시키고 알킬화(alkylation)를 위해 55 mM iodoacetamide(IAA) 3 μ l를 실온에서 20분 동안 처리하여 반응시켰다. 그 다음에, 당사슬을 절단을 위해서 PNGase F(protein : PNGase F=100 : 1, g/g)를 넣어 37°C에 12시간 동안 반응 하였다. 단백질을 절단하기 위해서 트립신(protein : trypsin=50 : 1, g/g)을 처리하여 37°C에 16시간 동안 반응 시켰다. 추출된 당질화 위치를 함유한 펩타이드는 감압건조기를 이용하여 완전히 건조시켰다.

젤상태의 효소 반응을 통해 N-당질화 위치를 함유한 펩타이드 분리

당질화를 함유한 펩타이드는 절단은 본 실험실에서 구축된 방법⁷⁾을 이용하여 실시하였다. Fetuin(1 μ g)는 단백질 용해를 위해 6 M urea, 5 mM EDTA, 2%(w/v) SDS/0.1 M triethylammonium bicarbonate(TEABC)를 넣어 37°C에서 30분을 반응시켰다. 그리고, 환원을 위해 10 mM DTT를 56°C에서 20분을 반응시키고, 알킬화를 위해 55 mM IAA를 실온에서 20분을 처리하여 반응시켰다. 반응한 단백질은 acrylamide/bisacrylamide solution(30%, v/v, 29 : 1)에 10%(w/v) ammonium persulfate와 100% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED)을 넣고 고형화한 후 작은 조각으로 잘라 TEABC가 포함된 50%(v/v)

acetonitrile(ACN) 1 ml로 세 번 씻어주고, 감압건조기를 이용하여 완전히 건조시켰다. 건조된 젤 조각에 PNGase F(protein : PNGase F=100 : 1, g/g)를 처리하여 37°C에서 12시간 동안 반응시키고 후에 트립신 완충액(protein : trypsin=50 : 1, g/g)을 처리하여 37°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 이 후 25 mM TEABC와 ACN을 이용하여 당질화 위치를 포함한 펩타이드를 추출하였다. 당질화를 함유한 펩타이드는 감압건조기를 이용하여 완전히 건조시켰고, 분석 직전에 A 완충액(0.1% formic acid)에 녹여 질량분석기로 분석하였다.

Graphitized carbon SPE를 이용하여 N-당사슬 구조 분리

RNase B(1 μ g)는 0.1 M TEABC 100 μ l에 녹인 후, 10 mM DTT 3 μ l를 56°C에서 20분을 반응시키고, 55 mM IAA 3 μ l를 실온에서 20분 동안 처리하여 반응시켰다. 그 다음에, PNGase F(protein : PNGase F=100 : 1, g/g)를 넣어 37°C에 12시간 동안 반응하였다. 분리한 N-당사슬 구조는 graphitized carbon(GC) solid-phase extraction(SPE) 주사기로 분리를 하였다. GC 주사기에 0.05%(v/v) trifluoroacetic acid, 80% ACN/water(v/v)를 넣어 씻는다. 그 다음 GC 주사기에 시료를 로딩하고, 물로 씻어 주었다. 그리고 N-당사슬 구조는 20% ACN/water(v/v)로 분리하였다. 분리된 N-당사슬 구조는 감압건조기를 이용하여 완전히 건조시킨 후 MS 분석을 하였다.

나노 초 고성능 액체 크로마토그래피(nano ultra performance liquid chromatography)

N-당질화 펩타이드들은 C18 nano column(75 μ m id, 250 mm length, 1.7 μ m particle size, Waters Corporation, Milford, MA)으로 분리하였으며, A 용액(0.1% formic acid 수용액)과 B 용액(0.1% formic acid를 포함한 ACN)의 농도구배에 따라 분리하였다. 각 용액들은 분당 0.3 μ l의 유속으로 0% B 용액에서 16% B 용액(2.5~10분)으로, 후에 44% B 용액(30분), 100% 용액(35~45분), 차례로 증가시켰다.

N-당사슬 구조들을 분리하기 위해서, trap column(180 μ m id, 30 mm length, 1.7 μ m particle size, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA)에 넣어서 trap column(100 μ m id, 100 mm length, 1.7 μ m particle size, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA)으로 분리하였다.⁸⁾ A 용액(0.1% formic acid 수용액)과 B 용액(0.1% formic acid를 포함한 ACN)의 농도구배에 따라 분리하였다. 각 용액들은 분당 0.3 μ l의 유속으로 2% B 용액에서 20% B 용액(3~8분)으로, 후에 80% B 용액을 증가시켰다.

질량분석기

위의 방법에 따라 분석된 당질화 위치 또는 당사슬 구조는 nanoUPLC와 연결된 nano-전자분부(ESI) 사극자(quadrupole) 이

온 비행 시간차 분석기(TOF) 질량분석기를 사용하여 이루어졌다(Q-TOF Premier, Waters). 모든 분석은 양이온 모드로 분석하였다. 각각의 이온들은 순차적으로 Z 형태의 이온화 부분을 통해 질량 분석기 내부로 들어간다. 들어간 이온은 사극자에 도달하여 MS scan을 통해 선구 이온(precursor ion)의 m/z를 확인한다. 사극자에는 직류전하와 라디오 전자기파가 동시에 흐르게 되는데 양전하를 띤 펩타이드 이온들은 사극자 내의 전자기장 내에서 회전하면서 이동하며 이를 바탕으로 각 이온을 정렬하여 선구 이온의 m/z를 얻을 수 있다. Data는 초당 이온 검출강도가 가장 높은 강도를 보이는 3개를 선택하여 충돌관(collision cell)에서 높은 전압의 충돌 에너지를 주어 선구 이온을 토막 이온을 조각 내었다. Scan은 1초 간격으로 이루어 졌으며 MS spectra는 m/z 400에서 m/z 3,000까지 받아졌다. Mass의 정확도는 LockSpray에서 reference인 GFP(Glu-Fibrinopeptide B, Sigma)를 이용하여 30초 간격으로 스캔 함으로써 유지된다.

데이터 변환

질량분석기로 얻은 데이터는 Mascot(Matrix Science; version 2.3.2, Boston, MA)를 이용하여 단백질을 동정하였다. 이때 당단백질 분석을 위해 Swiss-Prot 데이터베이스(version 51.6; 157,964 sequences; 93,947,433 residues)를 사용하였다. 단백질 동정을 위한 파라미터로는 fixed modification에 carbamidomethyl C,

variable modification 에 deamidation을 선택하였고, missed cleavage는 2개, 이온 허용 한계는 0.1 Da으로 설정하였다. 또한 당질화 위치를 포함한 펩타이드 분석결과는 이온 허용 한계는 0.1 Da와 Mascot ion score를 30 이상으로 하여 정확도를 가지는 것을 당질화 위치를 확인하는데 이용하였다. 또한 당단백질을 동정하기 위해서 SimGlycan(version 2.5.5.) 소프트웨어를 이용하여 단백질을 동정하였다. RNase B의 당단백질의 점유율은 구입한 표준당사슬인 Mannose 5와 9를 이용하여 여러 가지 농도로 표준곡선을 그린 후 계산을 하였다.

실험결과 및 고찰

본 연구는 바이오시밀러 의약품의 당단백질 분석방법을 확립하기 위해서 표준 당단백질을 이용하여 nano-LC-MS/MS로 분석하는 것을 목표로 하였다. 본 실험에서는 Fetuin, RNase B, 그리고 α -1 acid glycoprotein(AGP)를 포함하여 당단백질의 N-당질화 위치를 nano-C18-MS/MS를 이용하여 분석하였고, RNase B에 많이 함유되어 있는 N-당사슬 구조를 nano-PGC-MS/MS로 분석하였다.

표준단백질의 Fetuin을 이용하여 단백질 절단하는 방법 확립

두 가지 다른 단백질의 트립신 절단 방법으로, 액체와 젤 상태

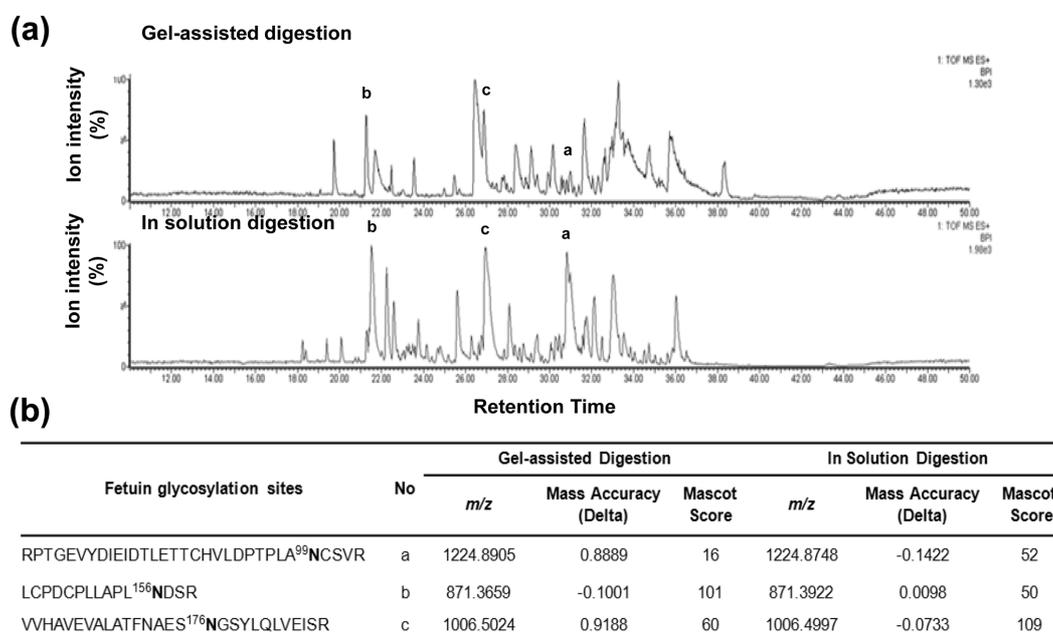


Fig. 1 – BPI (Base peak ion intensity) patterns of tryptic peptides from Fetuin in LC-MS and a summary of peptides that contain N-glycosylation sites. Fetuin (1 μ g) was tryptic-digested using two different methods, gel-assisted and in-solution digestion. The tryptic peptides were treated with PNGase for detachment of N-glycan groups. Nano-C18 MS/MS was used for analysis of peptides. (a) Two different BPI patterns of tryptic-peptides generated using gel-assisted (above) and in-solution digestion (bottom). (b) Peptides identified from Fetuin that contain N-glycosylation sites. N (glycosylated amino acid) is changed to D when the N-glycosylation is detached by PNGase treatment. The Mascot search was performed based on this phenomenon (molecular weight shift with +0.98 Da).

에서 절단하는 방법들로, 이 두 방법을 비교 하였다. 액체로 단백질을 절단하는 방법으로, Fetuin을 먼저 용해시키고 트립신으로 절단시킨 다음 PNGase F를 이용하여 당사슬을 절단하였다. 젤 상태에서 단백질을 절단하는 방법으로, Fetuin을 acrylamide/bisacrylamide와 APS 그리고 TEMED을 젤을 만들어서 트립신으로 절단시킨 다음 PNGase F를 이용하여 당질화를 절단하였다. PNGase F를 처리하면 일반적으로 당분자가 붙기 때문에, asparagine(Asn)에서 aspartic acid(Asp)로 deamination이 되어서 결과적으로 당사슬 그룹이 분비된다.⁹⁾ 효소로 분비된 N-당질화는 aspartic acid로 deamination되어서 0.98 Da이 증가하여 당단백질의 N-당질화의 위치에 대한 정보를 준다.¹⁰⁾

당단백질의 N-당질화의 위치를 동정하기 위해서 Mascot를 이용하였다. 당단백질 동정 파라미터로는 fixed modification에 Carbamidomethyl C를 선택하였고, variable modifications에 asparagine을 넣어서 분석하였다. 또한, N-당질화의 위치 정확하게 알기 위해서, 분석요건을 0.1 ppm과 Mascot ion 점수가 30 이상인 것을 사용하였다.

Fetuin을 액체 상태와 젤 상태에서 단백질 절단하여 분석한 결

과 N-당질화의 위치로 ⁹⁹Asn, ¹⁵⁶Asn, 그리고 ¹⁷⁶ASN를 모두 동정하였다(Fig. 1).¹¹⁾ 복잡한 시료에서 액체상태의 단백질 절단보다 젤 상태의 단백질 절단에서 단백질 절단이 효율적으로 증가된다고 보고되었다.¹²⁾ 그러나, 본 연구결과에서는 액체와 젤 상태에서 단백질 절단한 시료 둘 다 잘 분리된 결과를 확인하였다. 이 결과는 복잡한 시료에서는 젤상태의 시료가 보다 효율적으로 절단이 되지만, 단순한 당구조를 분석할 때는 액체와 젤 상태 모두 정확하게 분석이 가능한 것으로 보였다.

특히, Fig. 1b에 Fetuin의 2개 당단백질 펩타이드, RPTGEVYDIEIDTLETTCHVLDPTPLA⁹⁹NCSVR와 VVHAVEVALATFNAES¹⁷⁶NGSYLQLVEISR, 액체상태의 단백질 절단보다 젤 상태의 단백질 절단에서 더 높은 MASCOT 점수를 보여주었다. 또한, LCPDCPLLAPL¹⁵⁶NDSR의 한 개 펩타이드는 젤 상태의 단백질 절단보다 액체상태의 단백질 절단했을 때 더 높은 MASCOT 점수를 나타냈다. 더불어, Fig. 1a에서 표준 당단백질 펩타이드의 BPI(base peak intensity)가 액체와 젤 상태에서 단백질 절단한 시료 둘 다 잘 분리된 결과를 확인하였다. 따라서, 다른 표준 당단백질인 RNase B와 AGP를 방법이 간단한 액체상태에서 단

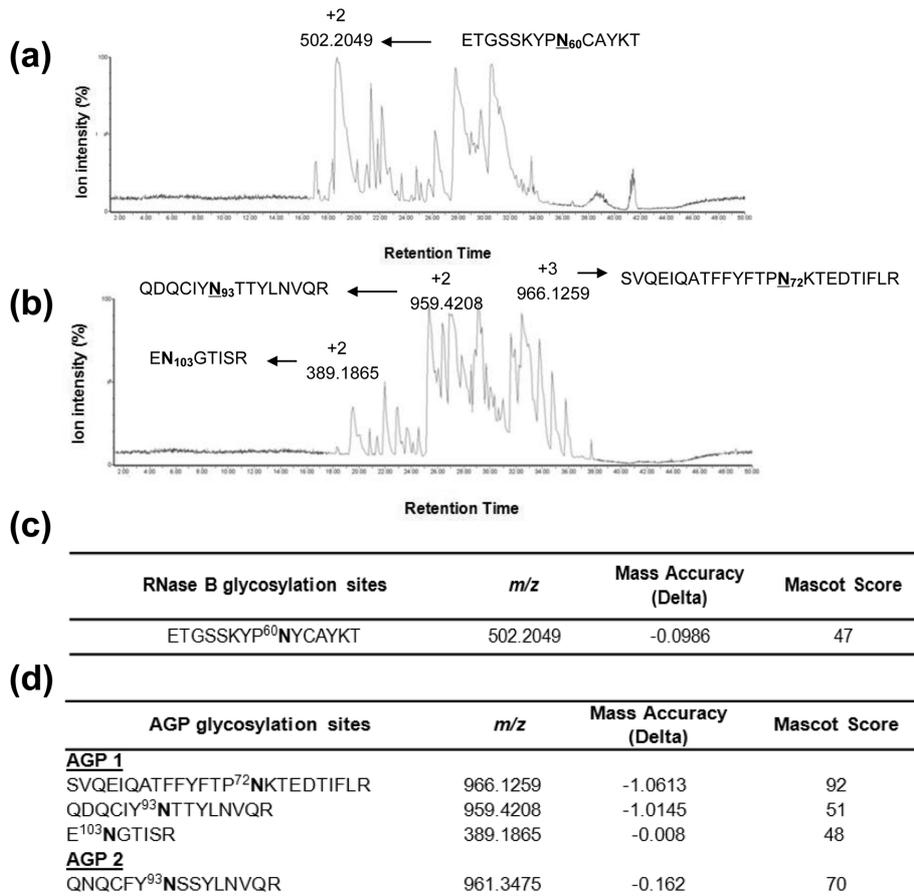


Fig. 2 – BPI patterns of tryptic peptides from RNase B (a) and α1-acid glycoprotein (AGP, b) in LC-MS. Summary of peptides that contain glycosylation sites, from RNase B (c) and AGP (d). RNase B (1 μg) and AGP (1 μg) were tryptic-digested using in-solution digestion, followed by treatment with PNGase. One peptide from RNase B and four peptides from two forms of AGP have been identified.

백질 절단을 하기로 선택하였다.

당단백질의 N-당질화 위치 동정

앞에서 확립된 방법을 이용하여, RNase B와 AGP의 N-당질화 위치를 동정하였다. 두 당단백질의 BPI(base peak intensity)를 Fig. 2a와 b에서 확인하였다. N-당질화 위치, mass 정확성 및 mascot 점수 등 정보는 Fig. 2c와 d에서 보여주었다.

RNase B의 한 개의 N-당질화를 가진 펩타이드(ETGSSKYP⁶⁰NCAKYT)로 N-당질화 위치를 동정하였다. AGP는 AGP1와AGP2 두 가지 다른 형태를 가지고 있다. AGP1는 3개의 N-사이트와 AGP2의 1개의 N-사이트를 가지는 것이 알려져 있으며, 실험을 통해서 모든 N-당질화 위치가 동정 되었다.⁹⁾

게다가, Fig. 3에서 당단백질에서 3개의 N-당질화를 가진 펩

타이드(LCPDCPLLAPL¹⁵⁶NDSR from Fetuin, ETGSSKYP⁶⁰NCAKYT from RNase B, SVQEIQATFFFYFTP⁷²NKTEDTIFLR from AGP1)를 한번 더 확인하기 위해서 tandem mass(MS/MS) 스펙트럼을 보여주었다. 이전의 보고에서는 표준당시슬을 분석하기 위해서 10~25 µg 정도 필요하였으나, 본 실험에서는 적은 양(1 µg)을 시작하여 nano-LC MS/MS 분석을 하였다. 또한 이전에 보고된 결과와 마찬가지로 성공적으로 N-당질화 위치 동정 하였다.^{13,14)}

RNase B의 N-당시슬 구조 동정과 이 당단백질의 점유율 계산법

PGC는 amine/amide phases로 고정상태에서 당시슬 구조를 분리하여 분석하는데 이용되어져 왔다.¹⁵⁾ PGC는 중성과 산성 상

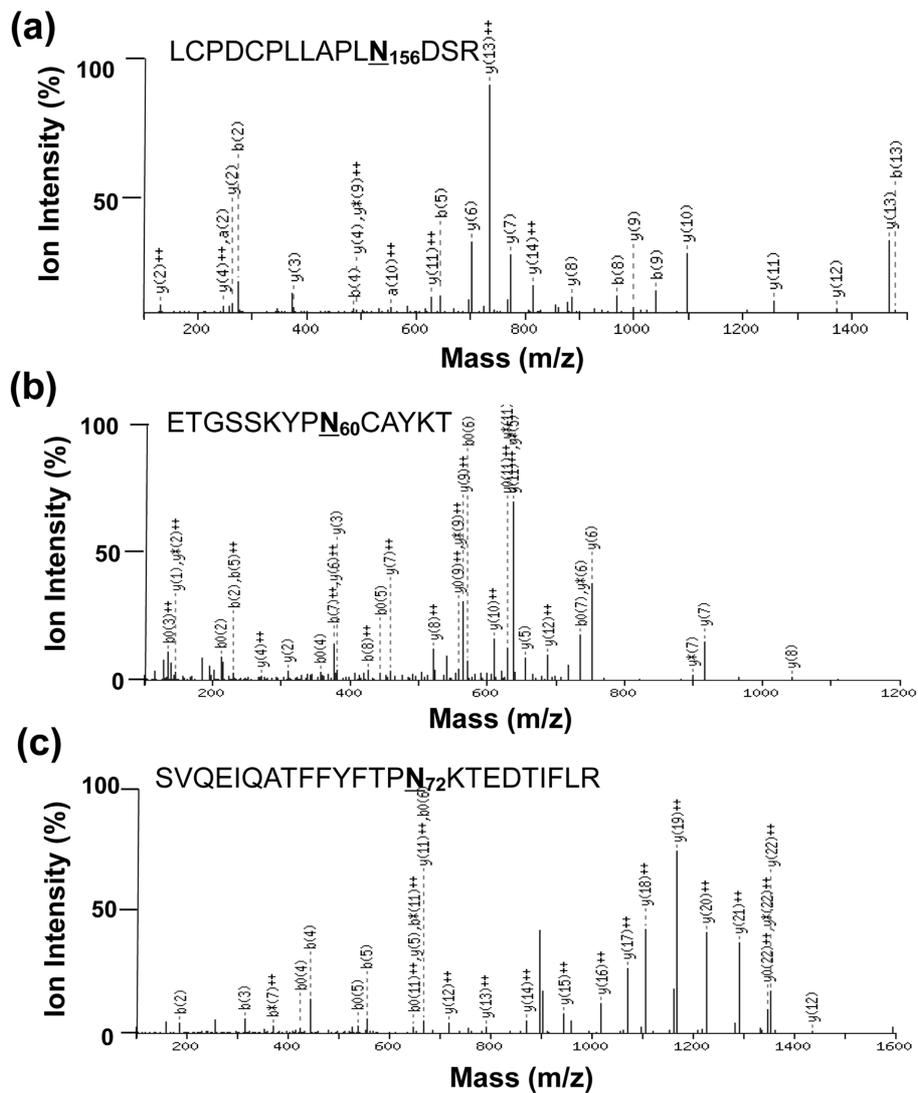


Fig. 3 – Tandem mass spectra of one peptide from Fetuin, RNase B, and AGP, respectively. Fragmentation patterns of LCPDCPLLAPLNDSR (m/z 871.2659), ETGSSKYPNCAKYT (502.2049), and SVQEIQATFFFYFTP⁷²NKTEDTIFLR (m/z 966.1259) from Fetuin (a), RNase B (b), AGP (c) are shown. b and y ion series were precisely detected to support the amino acid sequences for each peptide.

태의 당사슬 구조를 고정상태에서 분리하는 장점이 있다.¹⁶⁾ 특히, 다양한 형태의 당단백질들을 성공적으로 분리 가능하다. 본 실험에서는 PGC 시스템의 2가지 방법인 PGC cartridge를 이용하여 당사슬을 분리하고, nano-PGC LC를 이용하여 당사슬을 분석하였다.¹⁷⁾

PGC 시스템을 효율적으로 확인하기 위해서 우선 가장 간단한 형태의 표준단백질인 RNase B를 이용하였다. RNase B(1 µg)에 PNGase를 처리하고, PGC cartridge에 로딩하여 당사슬 구조를 분리하였다. 분리한 당사슬은 nano-PGC-MS/MS로 분석한 후 SimGlycan(version 2.5.5.) 소프트웨어를 이용하여 당사슬 구조를 분석하였다.

RNase B에서 주요한 펩타이드들의 m/z는 1236.11(+1)와 942.83(+1)가 나타났으며, 이 결과는 구입한 표준당사슬을 가지고 분석한 결과 1236.11(+1)와 942.86(+1)와 거의 비슷한 결과를 얻었다(Fig. 4a와 b). 또한 구입한 표준 당사슬의 단편화된 결과(Fig. 4에 삽입된 그림)는 RNase B로부터 분리된 당사슬과 비슷한 단편화 그림을 보여주었다. 또한 단편화된 펩타이드를 MS/MS 분석을 한번 더 확인하였다. 그 결과 대부분 단편화된 m/z 204(HexNAc+H)⁺와 m/z 163(Hex+H)⁺를 포함하였다.

또한, RNase B의 ⁶⁰N에서 2개 다른 당사슬을 통해서 점유를 계산하기 위해서, 표준 당사슬을 nano-PGC MS/MS에서 분석하여 이온화 세기를 가지고서 표준 곡선을 그렸다. RNase B로부

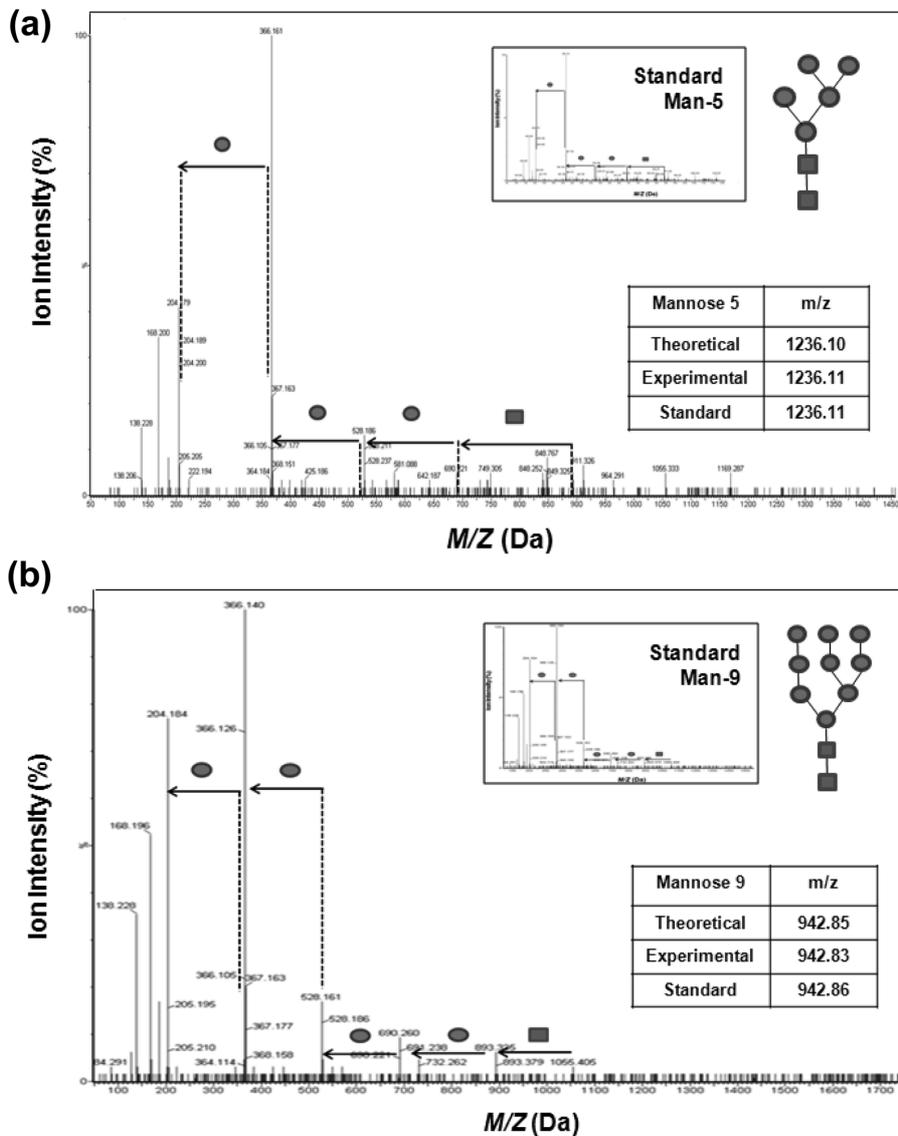


Fig. 4 – Tandem mass spectra of two glycan structures, Mannose 5 and 9. Glycans from RNase B were released by PNGase treatment, enriched by a PGC cartridge, and analyzed using nano-PGC MS/MS. The fragmentation patterns of Hex5-HexNAc2 (a) and Hex9-HexNAc2 (b) are shown. Fragment ions derived from two precursor ions, m/z of 1236.11 and 942.83, supported each correct N-glycan composition.

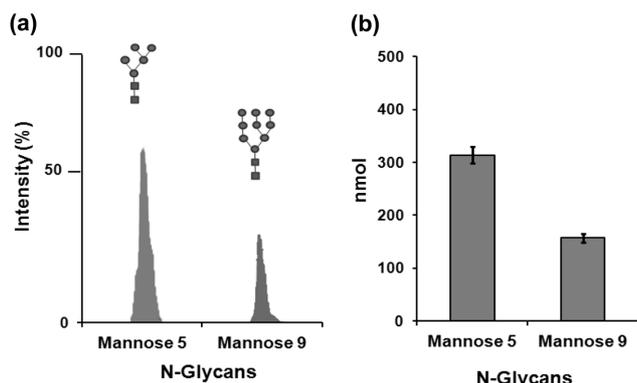


Fig. 5 – The abundance of Mannose 5 and 9 on the ^{60}N position of RNase B. (a) The mass intensities of each glycan are shown. (b) Using standard glycans, calculation of the amounts of each glycan was based on ion intensities.

터 분리된 만노즈 5와 9의 MS 세기는 Fig. 5a에서 보여주었다. RNase B에서 만노즈 5가 314 nmol/1 pmol(약 67%)을 함유하고 있었으며, 만노즈 9는 157 nmol/1 pmol(33%)를 포함하고 있었다 (Fig. 5b). 따라서, RNase B는 만노즈 5와 9를 대부분 함유하고 있었으며, nano-PGC-MS/MS를 이용하여 효과적으로 할 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 당단백질의 다양한 당질화 위치 및 당사슬 구조와 그것들의 점유율에 대한 특징을 효율적으로 연구하기 위하여 본 연구에서 nano-scale LC-MS/MS를 사용하였다. 적은 양의 표준당단백질, 트립신절단 방법비교, 당사슬 구조 분리, nano-C18, nano-PGC LC-MS/MS, 그리고 소프트웨어를 포함한 다양한 방법들을 확립하였다. 또한, RNase B로부터 분리된 만노즈 5와 9를 nano-PGC-MS/MS로 효율적으로 동정을 하였으며, 구입한 표준 당사슬 구조로 한 번 더 확인하였다. 구입한 표준 당사슬 구조를 이용하여 RNase B의 당사슬 구조의 함량을 얻었다. 본 실험을 통해서 표준 당단백질의 N-당질화 위치 및 N-당사슬 구조의 특징을 잘 보여주었으며, 이 효율적인 방법을 통해서 미량의 바이오시밀러 의약품의 당질화 위치 및 당사슬 구조를 평가하는데 사용 가능할 것이다.

감사의 말씀

이 논문은 2011년도 주요사업 위탁연구 과제(12011019)로부터 지원받아 수행된 연구임.

참고문헌

1) Bosques, C. J., Tschampel, S. M., Woods, R. J. and Imperiali, B. :

Effects of glycosylation on peptide conformation: a synergistic experimental and computational study. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8421 (2004).

- 2) Dwek, R. A. : Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem. Reviews* **96**, 683 (1996).
- 3) An, H. J., Froehlich, J. W. and Lebrilla, C. B. : Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Cur. Opi. Chem. Biology* **13**, 421 (1996).
- 4) Roger, S. D. : Biosimilars: current status and future directions. *Exp. Opi. Bio. Therapy* **10**, 1011 (2010).
- 5) Mayampurath, A. M., Wu, Y., Segu, Z. M., Mechref, Y. and Tang, H. : Improving confidence in detection and characterization of protein N-glycosylation sites and microheterogeneity. *Rap. Com. Mass Spectrom.* **25**, 2007 (2011).
- 6) Heo, S. H., Lee, S. J., Ryoo, H. M., Park, J. Y. and Cho, J. Y. : Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC-MS/MS. *Proteomics* **7**, 4292 (2007).
- 7) Cho, Y. E., Singh, T. S., Lee, H. C., Moon, P. G., Lee, J. E., Lee, M. H., Choi, E. C., Chen, Y. J., Kim, S. H. and Baek, M. C. : In-depth identification of pathways related to cisplatin-induced hepatotoxicity through an integrative method based on an informatics-assisted label-free protein quantitation and microarray gene expression approach. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111 010884 (2012).
- 8) Seipert, R. R., Dodds, E. D., Clowers, B. H., Beecroft, S. M., German, J. B. and Lebrilla, C. B. : Factors that influence fragmentation behavior of N-linked glycopeptide ions. *Ana. Chem.* **80**, 3684 (2008).
- 9) Segu, Z. M., Hussein, A., Novotny, M. V. and Mechref, Y. : Assigning N-glycosylation sites of glycoproteins using LC/MSMS in conjunction with endo-M/exoglycosidase mixture. *J. Proteome. Res.* **9**, 3598 (2010).
- 10) Zhang, H., Li, X. J., Martin, D. B. and Aebersold, R. : Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **21**, 660 (2003).
- 11) Hagglund, P., Bunkenborg, J., Elortza, F., Jensen, O. N. and Roepstorff, P. : A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J. Proteome. Res.* **3**, 556 (2004).
- 12) Han, C. L., Chien, C. W., Chen, W. C., Chen, Y. R., Wu, C. P., Li, H. and Chen, Y. J. : A multiplexed quantitative strategy for membrane proteomics: opportunities for mining therapeutic targets for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1983 (2008).
- 13) Imre, T., Schlosser, G., Pocsfalvi, G., Siciliano, R., Molnar-Szollosi, E., Kremmer, T., Malorni, A. and Vekey, K. :

- Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry* **40**, 1472 (2005).
- 14) Lin, C. Y., Ma, Y. C., Pai, P. J. and Her, G. R. : A comparative study of glycoprotein concentration, glycoform profile and glycosylation site occupancy using isotope labeling and electrospray linear ion trap mass spectrometry. *Ana. Chi. Acta* **728**, 49 (2012).
- 15) Davies, M., Smith, K. D., Harbin, A. M. and Hounsell, E. F. : High-performance liquid chromatography of oligosaccharide alditols and glycopeptides on a graphitized carbon column. *J. Chromatogr.* **609**, 125 (1992).
- 16) Packer, N. H., Lawson, M. A., Jardine, D. R. and Redmond, J. W. : A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *J. Glycoconjugate* **15**, 737 (1998).
- 17) Ruhaak, L. R., Deelder, A. M. and Wuhrer, M. : Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Ana. Bio. Chem.* **394**, 163 (2009).