

# MALDI-MS 기반 당단백질 당쇄의 정량분석 기술 개발 연구 동향

김경진, 김윤우, 황철환, 박한규, 정재현, 김윤곤\*

## Recent Advances in MALDI-MS Based Quantitative Targeted Glycan Analysis

Kyoung-Jin Kim, Yoon-Woo Kim, Cheol-Hwan Hwang, Han-Kyu Park, Jae Hyun Jeong, and Yun-Gon Kim\*

Received: 6 August 2014 / Revised: 21 September 2015 / Accepted: 5 October 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Abnormal glycosylation can significantly affect the intrinsic functions (i.e., stability and solubility) of proteins and the extrinsic protein interactions with other biomolecules. For example, recombinant glycoprotein therapeutics needs proper glycosylation for optimal drug efficacy. Therefore, there has been a strong demand for rapid, sensitive and high-throughput glycomics tools for real-time monitoring and fast validation of the biotherapeutics glycosylation. Although liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is one of the most powerful tools for the characterization of glycan structures, it is generally time consuming and requires highly skilled personnel to collect the data and analyze the results. Recently, as an alternative method, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-MS), which is a fast, robust and easy-to-use instrumentation, has been used for quantitative glycomics with various chemical derivatization techniques. In this review, we highlight the recent advances in MALDI-MS based quantitative glycan analysis according to the chemical derivatization strategies. Moreover, we address the application of MALDI-MS for high-throughput glycan analysis in many fields of clinical and biochemical engineering.

**Keywords:** MALDI-MS, Recombinant glycoprotein drug, Glycan, Quantitative analysis, Chemical derivatization, High-throughput analysis

### 1. INTRODUCTION

#### 1.1. 당단백질 당쇄의 역할 및 기능

단백질의 번역 후 변형 (post-translational modification) 과정을 통하여 생성되는 당쇄 (glycan)는 단백질 고유의 활성 부여 및 구조의 안정성 유지와 세포-단백질간, 세포-세포간의 상호인식 과정 등에 직접 관여를 한다 [2,5]. 따라서, 당단백질 (glycoprotein)에 결합된 당쇄는 생체 분자들이 스스로의 항상성을 유지하고 분자 인식을 통한 다양한 면역 반응 매개 프로세스 등에 있어서 매우 중요한 역할을 수행한다 [22,31]. 각종 질병으로 인한 세포 내 생리 대사활동의 변화는 당전이 효소 (glycosyltransferase)의 비정상적 활동을 야기하게 되어 전체적인 당쇄 프로파일을 변화시키므로, 비정상적 당쇄 프로파일 분석은 특정 질병에 대한 조기 진단 연구 및 치료법 개발에 활발히 활용되고 있다 [26]. 또한, 유전자 조작 기술을 통해 제조되는 재조합 당단백질 의약품 (biosimilar)의 안정성이나 유효성 평가에 있어서 당쇄 분석은 필수적이다 [33,37]. 유전자 재조합 기술로 얻어지는 당단백질 의약품은 같은 프로토클을 통해 단백질을 생산하더라도 세포 배양 공정 및 정제 과정 중 발생할 수 있는 여러 오차 원인들로 인해 최종 제품의 안전성이나 유효성에 치명적인 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 오리지널 바이오 의약품이 가지고 있는 당쇄의 정성 및 정량적 프로파일과의 비교를 통해 재조합 당단백질 의약품

숭실대학교 화학공학과  
Department of Chemical Engineering, Soongsil University, Seoul 159-743, Korea  
Tel: +82-2-828-7099, Fax: +82-2-812-5378  
e-mail: ygkim@ssu.ac.kr

의 안전성 및 생리 활성을 1차적으로 증명 할 수 있다.

## 1.2. 재조합 당단백질 의약품의 효과적인 당쇄 정량 분석 기술의 필요성 및 중요성

재조합 당단백질 의약품의 경우 숙주세포 (e.g., 세균, 효모)의 종류와 생산 공정 (배지, 용량, 온도)에 따라 매우 민감하게 특정 당쇄의 발현 여부나 당쇄의 구조가 달라질 수 있다 [7]. 재조합 당단백질 의약품의 당쇄 구조가 오리지널 바이오 의약품이 갖는 당쇄와 정성 및 정량적으로 다를 경우, 투약 후 인체 내에서의 생리 활성이 크게 달라질 수 있으며 길항 작용을 하는 등 여러 생리학적인 문제를 야기 할 수 있다 [3]. 따라서 이러한 재조합 당단백질 의약품이 치료제로서 승인을 받기 위해서는 공인된 당쇄 분석 시험법으로 오리지널 당단백질 의약품의 당쇄 프로파일과 비교한 결과가 반드시 첨부 되어야 한다. 또한, 재조합 당단백질 의약품의 각 생산 공정에서 샘플링하여 당쇄의 프로파일을 실시간으로 고속 모니터링 할 수 있는 기술은 현장에서 매우 효율적으로 활용될 수 있을 것이다. 기존의 High (Ultra)-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) 기반의 당쇄 분석 방법은 정확하고 자세한 정성 및 정량 결과를 얻을 수 있으나, 분석 과정 및 결과 해석에 있어서 매우 숙련된 기술자가 요구되며 분석 프로세스에 있어 많은 시간이 소모된다 [39,40]. 따라서 재조합 단백질 의약품 생산 현장에서

LC-MS/MS를 이용하여 당쇄의 실시간 모니터링 및 대량의 최종 제품의 품질 검사에 적용하기에는 어려움이 있다. 최근 이러한 문제점들을 해결하기 위해 시료 준비과정이 간단하며 대량의 시료를 빠른 시간 내에 처리할 수 있고 극 미량의 시료로도 고감도로 분석할 수 있는 matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-MS) 기반의 당쇄 정성 및 정량 분석 기술이 꾸준히 개발되고 있다 (Table 1) [13,23,24]. 본 총설에서는 MALDI-MS 기반의 효과적인 당쇄 정량 분석 방법과 재조합 단백질 의약품의 당쇄 분석 활용 예시, 그리고 질병 진단을 위한 임상시료의 초고속 대용량 (high-throughput) 당쇄 분석 시스템에 대해 기술하고자 한다 (Table 2).

## 2. MALDI-MS 기반의 당쇄 정량 분석 방법

### 2.1. 당쇄의 permethylation 기술 및 MALDI-MS 기반 당쇄 정량 분석

질량분석기 기반의 당쇄 분석에서 당쇄의 화학적 유도체화 (chemical derivatization)의 대표적인 방법으로 permethylation이 있다. 당쇄의 permethylation은 당쇄의 잔기 중 극성을 나타내는 하이드록실기(-OH), 아민기(-NH), 카르복실기(-COOH)에서 수소부분을 메틸기(-CH<sub>3</sub>)로 치환하여 당쇄가 보다 소

**Table 1.** Various chemical derivatization methods for MALDI-MS analysis

Chemical Derivatization method		Chemical name	Reference
Permethylation		Methyl iodide (CH <sub>3</sub> I)	[4, 10, 12, 14, 16, 24]
Permanent charge labeling	Positive charge	Girard reagent T (GT)	[9, 11, 19]
		Girard reagent P (GP)	[17]
Neutralization of sialic acid	Methyl amidation	(7-azabenzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyAOP)+Methylamine	[21, 25]
	Amidation	Aminopyridine 2-(2-pyridilamino) ethylamine (PAEA) Acetohydrazide (Ah)	[27, 32] [6] [35], [8]
Methyl esterification		CH <sub>3</sub> I	[11]
Isotopic labeling		CD <sub>3</sub> I, CH <sub>3</sub> I	[15]
		<sup>12</sup> CH <sub>3</sub> I, <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> I	[1]
		<sup>12</sup> [C <sub>6</sub> ]-aniline, <sup>13</sup> [C <sub>6</sub> ]-aniline <sup>12</sup> [C <sub>6</sub> ]-2-AA, <sup>13</sup> [C <sub>6</sub> ]-2-AA	[41] [18, 29, 34, 44]

**Table 2.** Comparison with LC-MS/MS and MALDI-MS analysis

	LC-MS/MS	MALDI-TOF MS
장점	민감도가 매우 뛰어나 Tandem mass spectrometry 분석을 통해 당쇄의 화학적 구조 확인 가능 (비표적 당쇄분석) Liquid chromatography의 고분해능으로 인해 이성질체 정량 분석이 가능	분석시간이 매우 짧아 대용량 시료 분석에 유리함 전문적인 기술 없이도 시료 준비 및 분석이 용이함 분석 시 시료 내 염(salts)에 대해 내성을 가짐
	단점	
	분석시간이 많이 소요됨 분석 및 결과해석에 있어서 전문적인 기술이 필요함 시료 내 salts로 인해 민감도가 떨어질 수 있음 분석 시 시료간 오염이 발생할 수 있음	시료 건조시 결정의 불균질성으로 인해 분석에 방해받을 수 있음 Matrix의 영향으로 저분자 물질 분석이 제한적임 같은 질량을 갖는 이성질체 물질 구분이 어려움

수성을 띄게 하여 질량분석 시 민감도를 크게 높여주는 효과가 있다. 특히, 이 방법은 당쇄의 비환원 말단 (non-reducing end)에 있는 시알산 (sialic acid)의 카르복실기를 중성화 함으로써 다른 중성 당쇄들과 함께 positive mode에서 동시에 분석할 수 있게 한다[10]. 현재 많이 사용되고 있는 프로토콜은 보스턴 대학의 Costello 그룹에서 개발한 방법이다. Costello 그룹에서는 sodium hydroxide powder를 녹인 DMSO용액에 methyl iodide를 넣어 liquid phase 형태의 일반적인 permethylation방법을 정립하였다 [4]. 하지만, liquid phase permethylation의 강한 알칼리성 반응 과정은 일부 시알산 당쇄의 깨짐 현상들을 야기시키는 문제가 있다 [4,14,43].

미국 인디애나 대학의 Novotny 그룹에서는 이와 같은 시알산 당쇄의 깨짐 현상을 방지하고자 microscale에서 sodium hydroxide beads를 사용하는 solid phase permethylation 방법을 제안하였다 [14] (Fig. 1). Spin column에 채운 sodium hydroxide beads의 양과 spin column을 통과하는 시료의 횟수 및 methyl iodide/dimethylsulfoxide과 water/dimethylsulfoxide의 비율을 최적화하여 짧은 반응시간에도 불구하고 liquid phase permethylation과 같은 효율성을 갖게 하였다 [16]. 이를 통해 중성화된 시알산 당쇄는 깨짐 현상이 크게 줄어들고 전체적인 당쇄 검출 민감도가 향상되는 효과가 있었다. 또한, MALDI-MS 분석을 통해 얻은 당쇄 프로파일이 HPLC를 이용한 당쇄 정량 값과 매우 유사한 모습을 보였으며 특히 HPLC에서는 검출이 되지 않는 매우 소량의 당쇄도 상대적으로 정량이 가능하여 이후 MALDI-MS 기반의 당쇄 정량 연구에 적극 활용되게 되었다 [14,16,24]. 하지만, 이때 사용되는 sodium hydroxide beads는 조해성을 가지고 있기 때문에 실험

과정에 있어서 보다 세심한 주의가 요구되며 숙련된 기술을 가지고 있지 않는 자가 실험을 진행할 경우 전체 당쇄의 permethylation이 완벽하게 이루어지지 않는 문제가 발생한다.

## 2.2. 시알산 당쇄의 정량 분석을 위한 시알산의 선택적 중성화 기술

최근, MALDI-MS을 통한 당쇄 정량 분석을 위해 전체 당쇄가 아닌 시알산만의 선택적 중성화 기술로서 시알산의 카르복실기 아미드화 기술 [6,8,27,32,35], 메틸 아미드화 기술 [21, 25,44]과 메틸에스터화 기술 [11] 등이 개발되었다. 2009년 일본 기타자토 대학의 Shin-ichi Endo 교수 연구팀은 2-(2-pyridilamino)ethylamine (PAEA)를 이용한 시알산 당쇄의 중성화 기술을 제안하였다 [6] (Fig. 2a). 시알산의 카르복실기가 PAEA의 아민기와 만나 아미드화되면서 시알산만을 선택적으로 중성화시키는 기술로 시알릴락토오스 (sialyllactose)와 강글리오시드 (ganglioside)에 이를 적용하여 positive mode에서 MALDI-MS 분석을 수행하였다. 당쇄가 화학적 유도체화되기 전에는  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M-H+2Na]^+$  등의 알칼리 금속 부가이온들이 결합된 형태로 감지가 되었지만, PAEA로 화학적 유도체화가 된 후에는  $[M+Na]^+$ 가 우세하게 증가함에 따라 간소화된 MALDI spectrum을 얻을 수 있었다. PAEA 이외에 시알산 중성화를 위해 acetohydrazide (Ah) [8,35]와 methylamine, (7-azabenzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyAOP)가 사용되었다 [21,25] (Fig. 2b). Ah를 이용한 시알산의 중성화는 약산성 조건 하에서 이루어지며 Ah의 아민기와 시알산의 카르복실기가 만나 아미드화 되면서 시알산의 중성화가 이루어진다. Kameyama 그

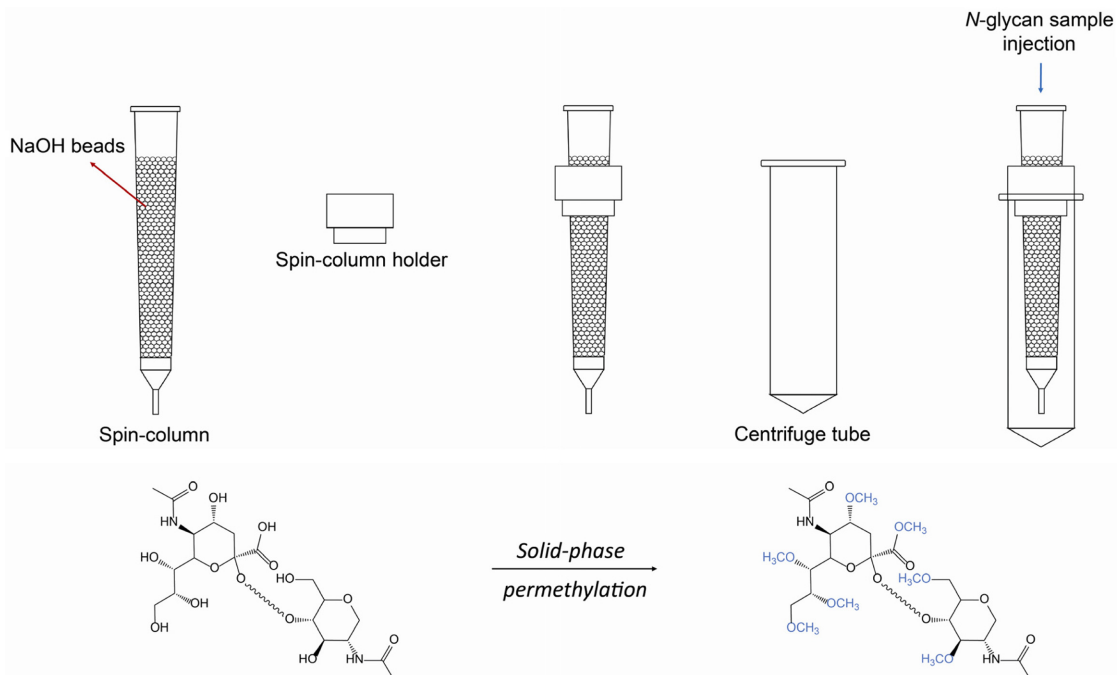


Fig. 1. A schematic design of solid-phase permethylation and the derivatized N-glycan structure by the solid-phase permethylation.

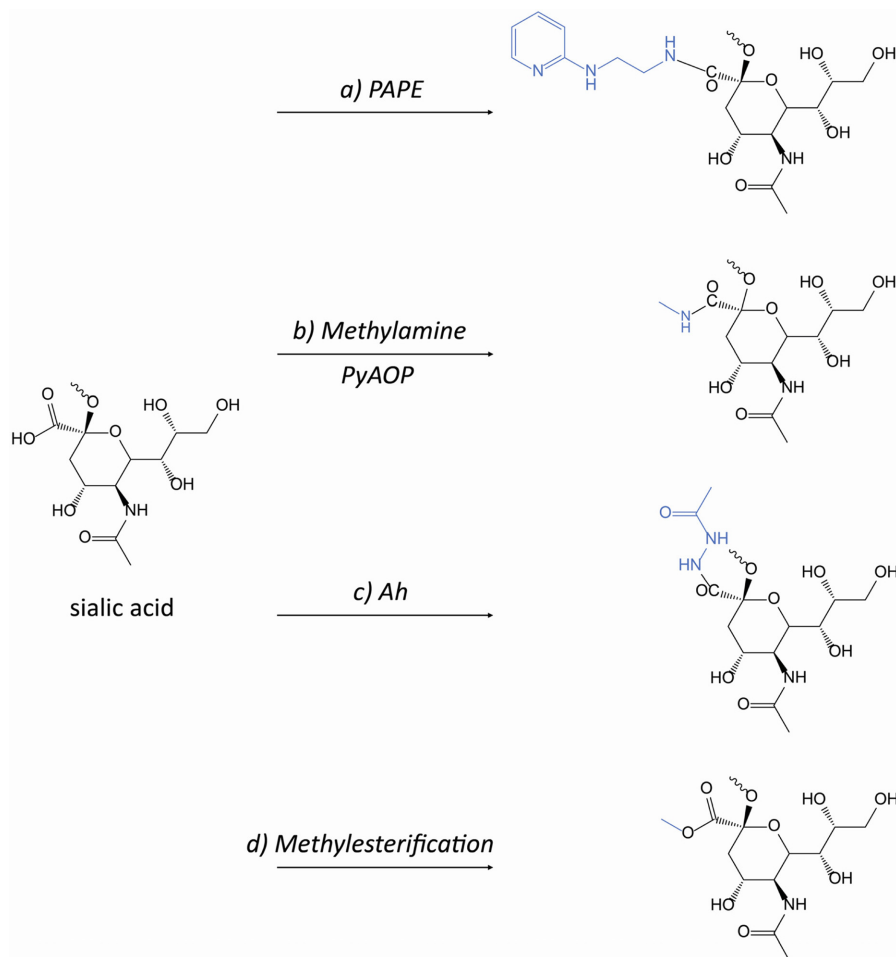


Fig. 2. Specific neutralization techniques of sialic acids using a) PAEA, b) methylamine + PyAOP, c) Ah and d) methylesterification.

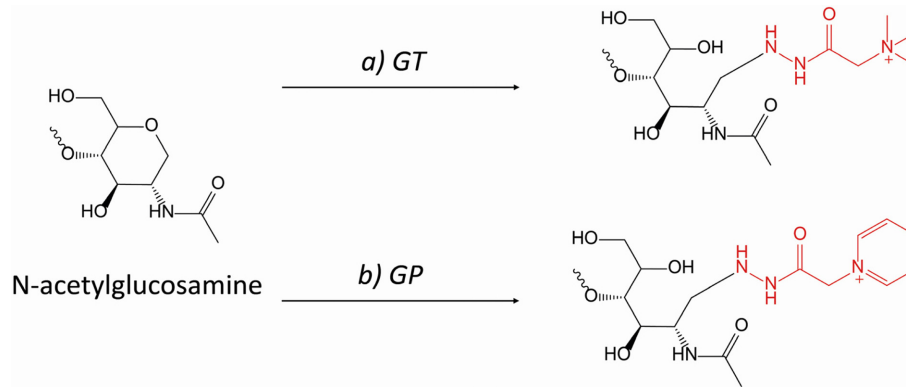
룹에서는 Ah를 당쇄의 시알산 잔기에 결합시켜줌으로써  $\alpha$  2,6 및  $\alpha$ 2,3 결합 시알산 당쇄를 모두 중성화시켜 MALDI-MS로 분석할 수 있는 방법을 개발하였다 [35]. 이를 bovine fetuin 당쇄에 적용하여 시알산이 깨지지 않고 중성화되는 것을 확인하였으며 positive mode의 MALDI-MS로 분석하였을 때 수소 및 칼륨보다 나트륨이 결합된 당쇄 ( $[M+Na]^+$ )가 우세하게 감지가 된다는 것을 보고하였다. 이후 네브라스카 대학 Van Cott 교수 연구 그룹에서는 당쇄에 존재하는 시알산을 Ah로 중성화시키는 것과 동시에 당쇄의 환원 말단 (reducing end)을 2-aminobenzoic acid (2-AA)로 화학적 유도체화시켜 negative mode에서 MALDI-MS로 정량 분석을 수행하였다 [8] (Fig. 2c). Human IgG와 recombinant human blood coagulation Factor IX (tg-FIX)의 당쇄 분석에 이 기술을 적용하였고 negative mode에서  $[M-H]^-$ 의 당쇄 이온만이 감지되는 MALDI spectra를 얻을 수 있었다. 또한 당쇄의 중성화를 위한 화학적 유도체화를 96-well microfilter plate상에서 수행하고 이를 MALDI-MS 기반으로 정량 분석 함으로써 초고속 대용량 당쇄 정량 기술로서의 응용 가능성을 성공적으로 보여주었으며, 정량 결과에 있어서도 HPLC를 이용한 당쇄 분석

결과와 동일한 당쇄 정량성을 보임을 입증하였다.

위에서 소개한 시알산 중성화 기술들을 통해서 전체 당쇄 MALDI 프로파일을 positive 또는 negative mode에서 한번에 얻는데까지는 성공하였으나, 여전히 당쇄 구조간 (complex-, hybrid- and high mannose type) 이온화도 차이 및 알칼리 금속 부가이온들에 의해 MALDI-MS를 이용한 당쇄 정량에 어려움이 남아 있었다. 이와 같은 문제를 해결하고 MALDI-MS 분석에서의 민감성 (sensitivity)을 증가시키기 위하여, 시알산 잔기를 선택적으로 중성화시키는 기술과 당쇄의 환원 말단을 영구적 전하를 갖는 화학 물질로 유도체화시키는 기술을 더하여 당쇄를 MALDI-MS만으로도 정성 및 정량 분석할 수 있는 기술이 소개되었다.

### 2.3. 영구적 전하 유도체화 도입을 통한 당쇄 정량 분석

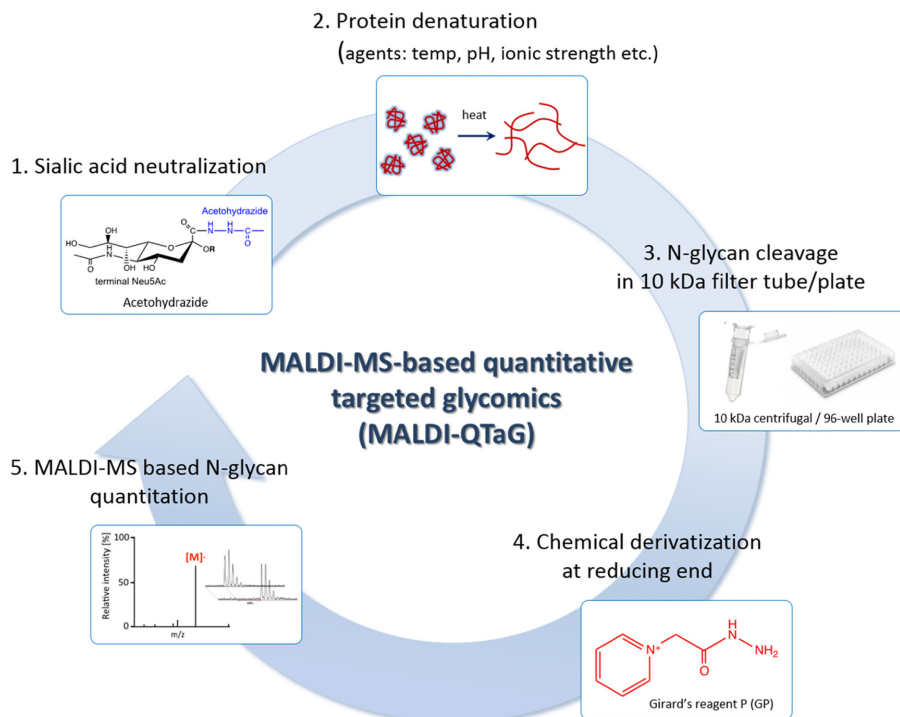
당쇄의 환원 말단에 영구적 양전하를 갖는 화학 물질의 도입은 추가적인 수소 또는 알칼리 금속 부가 이온의 형성을 억제시킬 뿐만 아니라, 모든 당쇄의 이온화 경향성을 동일화시켜 당쇄 검출의 민감도를 크게 높일 수 있다. 서울대학교 김병기 교수 그룹은 먼저 시알산이 없는 중성 당쇄의 환원 말단에



**Fig. 3.** Chemical derivatization of N-glycan residue (N-acetylglucosamine) using a) Girard's reagent T (GT) and b) Girard's reagent P (GP).

Girard's Reagent T (GT, carboxymethyl trimethylammonium hydrazide)를 도입하여 당쇄가 영구적 양전하를 띄게 하고 이를 positive mode MALDI-MS를 이용하여 중성 당쇄를 정량 분석하였다 [9] (Fig. 3a). 이 과정에서 추가적인 정제단계 (i.e., solid-phase extractions) 없이도 MALDI-MS로 분석이 가능하였으며, MALDI spectrum에서는 금속 부가 이온 peak 없이 민감도가 10배 이상 증가하는 것을 확인하였다. 또한, MALDI-MS peak의 넓이를 이용한 정량 분석에 있어서 당쇄 구조에 따라 동위원소 분포도가 달라지므로 보다 정확한 정량을 위해서 당쇄마다 첫 번째부터 세 번째까지 isotopic peak의 넓이를 합산하여 정량하는 것을 처음 제안하였다. 하지만, 이 연구는 시알산이 없는 중성 당쇄에만 적용한 방법으로 시알산

당쇄의 정량 분석을 위해서는 추가적인 시알산 중성화 기술이 요구되었다. 이후 같은 연구그룹에서 두 종류의 중국 햄스터 난소세포 (CHO cell, Chinese Hamster Ovary Cell)로부터 발현시킨 재조합 당단백질 의약품의 생물학적 특성을 확인하기 위해 시알산 당쇄가 포함된 N-glycan을 MALDI-MS를 이용하여 정량 분석을 하였다 [11] (Fig. 2d, 3a). 두 종류의 세포주 (CHO-1 cell, CHO-2 cell)에서 얻은 당단백질 의약품의 당쇄를 mild methyl esterification을 이용하여 시알산 당쇄만을 선택적으로 중성화시킨 후, Girard's reagent T로 영구적 양전하를 나타내도록 유도체화 하였다. CHO-1 cell에서의 시알산 당쇄의 비율은 22.5%를 나타내어 5.2%로 확인된 CHO-2 cell에서의 시알산 당쇄의 비율보다 높음을 확인하였다. 이러



**Fig. 4.** A simple workflow of MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG).

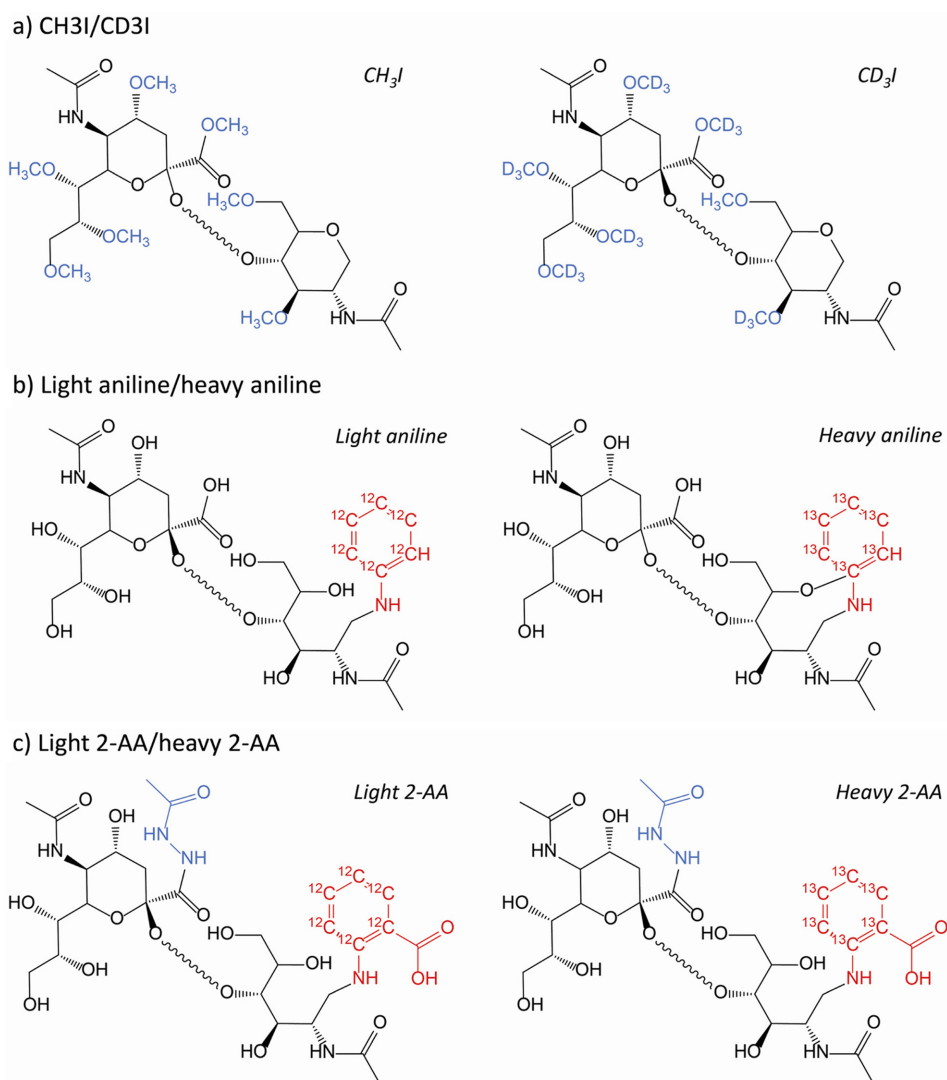
한 당쇄의 정량적인 차이는 재조합 단백질 의약품의 특성을 반영하므로 단백질의약품 제조 시 공정의 실시간 모니터링이나 완성된 제품의 품질검사에 적용될 수 있다.

2015년 김윤곤 교수 연구팀은 Ah를 이용하여 시알산을 선택적으로 중성화시킨 후에 당쇄 환원 말단에 Girard's reagent P(GP)로의 화학적 유도체화를 통하여 영구적인 양전하를 부여해주는 기술을 개발하였다 (Fig. 4). 별도의 정제 과정 없이도 GP와의 반응 후 바로 MALDI-MS로 분석할 수 있기 때문에 빠른 분석이 가능하였으며, 이전에 GT를 이용한 방법과 비교하여 보다 신속하게 MALDI plate 상에서 분석 시료가 건조 및 균일하게 결정화되어 분석 시간을 현저히 단축시켜줄 수 있었다. Normal cord blood와 human hepatocellular carcinoma (HCC) cell에서 발현시킨  $\alpha$ -fetoprotein을 추출하여 당쇄를 비교 정량 분석함으로써 HCC cell에서 core-fucosylation의 상대적 정량값이 크게 증가함을 보여주었다. 이는 MALDI-

MS 기반의 당쇄 정량 분석 기술이 질병의 진단 및 모니터링과 바이오 의약품 제조과정 평가 기술로의 응용 가능성을 제시해주었다 [17].

#### 2.4. Stable isotopic labeling을 통한 당쇄의 상대 정량 분석

동위 원소 표지 (stable isotopic labeling)를 이용한 당쇄의 상대 정량은 정상인과 특정 질병을 갖고 있는 환자 시료의 분석, 또는 오리지널 당단백질 의약품과 바이오 시밀러의 동등성 시험 분석 등에서 매우 효율적으로 응용이 가능하다. 대표적으로 isotopical permethylation[1,15]과 화학적 유도체화를 기반으로 한 reductive amination이 있다. 2007년 인디애나 주립 대학의 Novotny 교수 연구팀은 정상인 혈액과 유방암 환자 혈액으로부터 얻은 N-glycan을 각각 isotopic iodomethane ( $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{CD}_3\text{I}$ )으로 permethylation 시키고 동일 양을 섞어 준 후, 이를 MALDI-MS로 상대 정량 분석하는 기술을 개발하였다



**Fig. 5.** Stable isotopic labeling methods using a) isotopic methyl iodide ( $\text{CH}_3\text{I}/\text{CD}_3\text{I}$ ), b) aniline (light aniline/heavy aniline) and c) 2-AA (light 2-AA/heavy 2-AA).

[15] (Fig. 5a). 정상인과 유방암 환자 사이에 당쇄의 상대적 정성 및 정량 차이를 직접 비교함으로써 질병의 단계별 진행 상황을 효과적으로 모니터링 할 수 있는 기술로 활용이 가능함을 보여주었다. 하지만, 당쇄에 존재하는 hydroxyl group, amine groups과 carboxyl groups에 수소의 개수가 다르기 때문에 당쇄의 구조에 따라 isotopic permethylation에 의한 질량 차이가 일정하지 않아 다수의 당쇄 구조를 갖는 시료들 간의 상대 정량 비교에 있어서 매우 복잡한 MALDI spectrum을 얻게 되어 분석에 어려움이 있다.

최근 isotopic reagents를 이용하여 당쇄의 환원 말단만을 유도체화시켜 서로 다른 시료로부터 얻은 당쇄 사이에 모든 당쇄가 일정한 질량 차이를 갖도록 하는 reductive amination 방법이 개발되었다 [18,29,34,41,44]. 2009년에 미국 Emory 대학의 Cummings 교수 연구팀은 질량이 6Da 차이가 나는  $^{12}[C_6]$ -aniline과  $^{13}[C_6]$ -aniline를 이용한 당쇄의 화학적 유도체화 방법이 개발하여 인간과 쥐 혈액 샘플로부터 얻은 당쇄를 각각 유도체화시켜 혼합한 후 MALDI-MS로 정량 분석을 수행하였다 [41] (Fig. 5b). 이는 기존의 isotopic deuterium 치환 방법보다 높은 resolution과 민감도 (sub-picomole levels)를 보였을 뿐만 아니라, 두 시료를 직접 섞어서 MALDI-MS로 분석을 수행함에 있어서도 다수의 당쇄 peak들간에 서로 방해가 주지 않아 분석에 용이한 프로파일을 얻을 수 있었다. 2010년에 암젠사의 Cockrill 그룹은 상용화가 된  $^{13}[C_6]$ -2-aminobenzoic acid ( $^{13}[C_6]$ -2-AA)와  $^{12}[C_6]$ -2-aminobenzoic acid ( $^{12}[C_6]$ -2-AA)를 이용하여 당단백질 바이오 의약품의 당쇄 스크리닝에 활용하고자 하였다 [29] (Fig. 5c). 특히, 이 기술에서는 당쇄 정제를 위한 자동화 기계 플랫폼을 도입하여 동시에 여러 isotopic labeled 시료를 고속으로 정제함으로써 전처리 과정을 간소화시키고 전체 분석 시간을 획기적으로 단축시켰다. 이를 통해 ESI-MS/MS<sup>n</sup>을 이용하여 당쇄 구조 분석이 이미 완료된 당단백질 바이오 의약품의 경우 MALDI-MS 분석만으로도 오리지널 바이오 의약품과의 동등성 평가 및 생산과정 중 모니터링이 가능함을 보여주었다. 2014년에 하버드 의과대학의 Lee 교수 연구팀은  $^{12}[C_6]$ -2-AA와  $^{13}[C_6]$ -2-AA를 이용한 당쇄 환원 말단의 유도체화와 함께 시알산 잔기의 메틸아미드화를 동시에 적용하여 시알산 당쇄를 포함한 모든 N-glycan의 상대 정량 분석을 수행하였다 [44] (Fig. 2b, 5c). 먼저 human IgG로부터 얻은 N-glycan을 isotopic 2-AA로 각각 화학적 유도체화시킨 후, 메틸아미드화를 통해 시알산 당쇄를 중성화시켰다. 또한, urine 속 존재하는 당쇄의 정량 패턴이 아침과 저녁 사이의 변화를 모니터링 한 결과, 전체 당쇄들의 상대 정량적 편차가 5% 이내에 있음을 확인하였다.

최근 숭실대학교 김윤곤 교수 연구팀에서는 당쇄 환원 말단의 동위원소 표지와 시알산 중성화 기술을 동시에 적용한 MALDI-MS 기반 당쇄 정량 분석 방법 (Stable isotopic labeling-based quantitative targeted glycomics (i-QTaG))을 소개하였다 (Fig. 2c, 5c). 먼저 Ah로 시알산 중성화가 이루어진 혈액 당단백질 샘플을 각각 isotopic 2-AA로 유도체화한 후 다양한 물 비율 ( $^{12}[C_6]$ -2-AA:  $^{13}[C_6]$ -2-AA=1:1, 1:2, 1:5)로 섞고 MALDI-

MS로 분석하여 상대적 정량값이 이론적 물비율과 동일함을 보여줌으로써 기술의 정확성을 입증하였다. 그리고 더 나아가 전립선 암 환자와 정상인의 혈액 속 전체 당쇄를 동시에 비교 정량 분석하였다. Fucose가 존재하는 당쇄 (w/o sialic acid)의 상대적 정량값이 전립선 암 환자에서 감소하는 것과, 특히 sialyl Lewis type 당쇄의 상대적 정량값이 대략 82% 감소하는 것을 확인하였다. i-QTaG 기술은 바이오 의약품뿐만 아니라 특정 질병을 실시간으로 모니터링 할 수 있는 대량신속처리 기술로 적용될 수 있을 것으로 사료된다 [18].

## 2.5. MALDI-MS와 high-throughput platform 기반의 당쇄 분석 시스템

96-well plate 플랫폼으로 당쇄 분석을 처음 시도한 영국 옥스퍼드 대학의 Rudd 그룹 (현재 NIBRT)은 당쇄의 분리부터 2-AB labeling까지의 전처리 과정을 96-well plate에서 수행할 수 있는 프로세스를 개발하여 당쇄 분석 과정을 최대 2일 이내로 획기적으로 단축시켰다 [30]. 당단백질의 변성, 당쇄 추출 및 유도체화, 정제 과정까지 96-well plate 상에서 대량 시료를 빠른 시간 안에 동시에 처리할 수 있다. 특히 많은 수의 시료 분석이 요구되는 임상 시료 분석에 있어서 미량 (5 mL)의 혈액만으로도 당쇄 프로파일링이 가능한 시스템을 개발하였다. Rudd 그룹에서는 이를 glucose unit 기반의 HPLC를 이용한 당쇄 분석에 활용하였으며, 최근 이러한 96-well plate 플랫폼을 MALDI-MS에 적용하여 당쇄의 정성 및 정량 분석에 활용한 사례들이 보고되고 있다.

2009년 서울대학교 김병기 교수 연구 그룹은 PVDF membrane 96-well plate 상에서 porous graphite carbon solid-phase extraction (PGC-SPE)과 GT 유도체화를 사용하여 난소암 환자와 정상인의 serum에서 추출한 당쇄를 정량 분석하였다 [19]. 그 결과 난소암 환자의 serum에서 추출한 당쇄에서 core-fucosylated된 당쇄가 정상인보다 증가한다는 기존 연구들과 동일한 결과를 얻었을 뿐만 아니라 96-well plate를 사용하여 MALDI-MS 분석까지의 시료의 전처리 시간을 2일 이내로 단축시켰으며 많은 수의 임상 시료에도 적용할 수 있다는 것을 확인하였다. 이어서 PVDF membrane 96-well plate 상에서 solid-phase permethylation을 직접 수행하여 이를 전립선 암 환자의 serum 당쇄를 분석하는데 적용하였다 [12] (Fig. 1). PGC-SPE를 통한 당쇄 정제 과정 및 solid-phase permethylation까지의 과정이 1시간 이내로 가능하였으며 최대 96개의 시료가 동시에 처리되었다. 그리고 permethylation을 통한 시알산 당쇄의 중성화를 통해 매우 민감하게 (picomole level) 전체 N-glycan의 정성 및 정량분석이 MALDI-MS를 통해 가능하였다.

## 3. CONCLUSION

당단백질의 당쇄는 단백질 내적인 기능 (intrinsic function)으로 구조적 안정성 및 3차 구조 형성을 위한 접힘 (folding)에

있어서 매우 중요한 역할을 한다. 또한 당쇄의 단백질 외적인 기능 (extrinsic function)으로서는 세포-세포간 또는 세포-당단백질간의 결합에 있어서 최외곽에서 직접 상호인식과 상호정보교환의 역할을 수행함으로써 종합적으로는 생체 내에서 일어나게 되는 다양한 생물학적 및 면역학적 반응들에 관여하게 된다. 따라서 재조합 당단백질 의약품의 오리지널 바이오 의약품과 동등성 시험에 있어서 당쇄의 정성 및 정량 분석 결과가 매우 중요한 평가 요소로 여겨지고 있다. 당단백질 의약품의 허가를 위한 당쇄 분석에 있어서는 기존의 ESI-MS/MS [28,36,38] 또는 exoglycosidase digestion [20,42]을 통해 보다 자세한 당쇄의 구조 (i.e., monosaccharide sequence, a/b linkage) 및 정량 분석이 필수적이지만, 이후 생산공정 중 품질 관리를 위한 당쇄 분석에 있어서는 MALDI-MS 기반의 초고속 당쇄 정량 분석 기술이 보다 효과적으로 활용될 수 있을 것이다. 또한 질병 진단을 위해 많은 수의 샘플 분석이 필요한 임상 시료 분석에 있어서도 96-well plate 기반의 대용량 당쇄 분석 시스템은 그 활용도가 매우 높을 것으로 기대된다.

## Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단 (NRF-2103R1A1A1004998, NRF-2015R1A2A2A04006014)의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사 드립니다.

## REFERENCES

- Alvarez-Manilla, G., N. L. Warren, T. Abney, J. Atwood, 3rd, P. Azadi, W. S. York, M. Pierce, and R. Orlando (2007) Tools for glycomics: Relative quantitation of glycans by isotopic permethylation using 13CH3I. *Glycobiology* 17: 677-687.
- Blom, N., T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4: 1633-1649.
- Chirino, A. J., M. L. Ary, and S. A. Marshall (2004) Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* 9: 82-90.
- Ciucanu, I. and C. E. Costello (2003) Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 16213-16219.
- Edelman, G. M. (1983) Cell adhesion molecules. *Science* 219: 450-457.
- Endo, S., M. Morita, M. Ueno, T. Maeda, and T. Terabayashi (2009) Fluorescent labeling of a carboxyl group of sialic acid for MALDI-MS analysis of sialyloligosaccharides and ganglioside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378: 890-894.
- Ghaderi, D., M. Zhang, N. Hurtado-Ziola, and A. Varki (2012) Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 28: 147-175.
- Gil, G. C., B. Iliff, R. Cerny, W. H. Velander, and K. E. Van Cott (2010) High throughput quantification of N-glycans using one-pot sialic acid modification and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 82: 6613-6620.
- Gil, G. C., Y. G. Kim, and B. G. Kim (2008) A relative and absolute quantification of neutral N-linked oligosaccharides using modification with carboxymethyl trimethylammonium hydrazide and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 379: 45-59.
- Hakomori, S. (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* 55: 205-208.
- Jang, K. S., Y. G. Kim, G. C. Gil, S. H. Park, and B. G. Kim (2009) Mass spectrometric quantification of neutral and sialylated N-glycans from a recombinant therapeutic glycoprotein produced in the two Chinese hamster ovary cell lines. *Anal. Biochem.* 386: 228-236.
- Jeong, H. J., Y. G. Kim, Y. H. Yang, and B. G. Kim (2012) High-throughput quantitative analysis of total N-glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 84: 3453-3460.
- Kam, R. K., T. C. Poon, H. L. Chan, N. Wong, A. Y. Hui, and J. J. Sung (2007) High-throughput quantitative profiling of serum N-glycome by MALDI-TOF mass spectrometry and N-glycomic fingerprint of liver fibrosis. *Clin. Chem.* 53: 1254-1263.
- Kang, P., Y. Mechref, I. Klouckova, and M. V. Novotny (2005) Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 3421-3428.
- Kang, P., Y. Mechref, Z. Kyselova, J. A. Goetz, and M. V. Novotny (2007) Comparative glycomic mapping through quantitative permethylation and stable-isotope labeling. *Anal. Chem.* 79: 6064-6073.
- Kang, P., Y. Mechref, and M. V. Novotny (2008) High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 721-734.
- Kim, K. J., Y. W. Kim, C. H. Hwang, H. G. Park, Y. H. Yang, M. Koo, and Y. G. Kim (2015) A MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG) for total N-glycan analysis. *Biotechnol. Lett.* 37: 2019-2025.
- Kim, K. J., Y. W. Kim, Y. G. Kim, H. M. Park, J. M. Jin, Y. Hwan Kim, Y. H. Yang, J. Kyu Lee, J. Chung, S. G. Lee, and A. Saghatelyan (2015) Stable isotopic labeling-based quantitative targeted glycomics (i-QTaG). *Biotechnol. Prog.* 31: 840-848.
- Kim, Y. G., H. J. Jeong, K. S. Jang, Y. H. Yang, Y. S. Song, J. Chung, and B. G. Kim (2009) Rapid and high-throughput analysis of N-glycans from ovarian cancer serum using a 96-well plate platform. *Anal. Biochem.* 391: 151-153.
- Kuster, B., T. J. Naven, and D. J. Harvey (1996) Rapid approach for sequencing neutral oligosaccharides by exoglycosidase digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 31: 1131-1140.
- Liu, X., H. Qiu, R. K. Lee, W. Chen, and J. Li (2010) Methylamidation for sialoglycomics by MALDI-MS: A facile derivatization strategy for both alpha2,3- and alpha2,6-linked sialic acids. *Anal. Chem.* 82: 8300-8306.
- Lowe, J. B. (2001) Glycosylation, Immunity, and Autoimmunity. *Cell* 104: 809-812.
- Matsumoto, K., C. Shimizu, T. Arao, M. Andoh, N. Katsumata, T. Kohno, K. Yonemori, F. Koizumi, H. Yokote, K. Aogi, K. Tamura,



- K. Nishio, and Y. Fujiwara (2009) Identification of predictive biomarkers for response to trastuzumab using plasma FUCA activity and N-glycan identified by MALDI-TOF-MS. *J. Proteome. Res.* 8: 457-462.
24. Morelle, W., V. Faid, F. Chirat, and J. C. Michalski (2009) Analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 534: 5-21.
25. Nishikaze, T., S. Kawabata, and K. Tanaka (2014) In-depth structural characterization of N-linked glycopeptides using complete derivatization for carboxyl groups followed by positive- and negative-ion tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 86: 5360-5369.
26. Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855-867.
27. Okamoto, M., K. Takahashi, T. Doi, and Y. Takimoto (1997) High-sensitivity detection and postsorce decay of 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 2919-2926.
28. Pabst, M., J. S. Bondili, J. Stadlmann, L. Mach, and F. Altmann (2007) Mass + retention time = structure: a strategy for the analysis of N-glycans by carbon LC-ESI-MS and its application to fibrin N-glycans. *Anal. Chem.* 79: 5051-5057.
29. Prien, J. M., B. D. Prater, Q. Qin, and S. L. Cockrill (2010) Mass spectrometric-based stable isotopic 2-aminobenzoic acid glycan mapping for rapid glycan screening of biotherapeutics. *Anal. Chem.* 82: 1498-1508.
30. Royle, L., M. P. Campbell, C. M. Radcliffe, D. M. White, D. J. Harvey, J. L. Abrahams, Y. G. Kim, G. W. Henry, N. A. Shadick, M. E. Weinblatt, D. M. Lee, P. M. Rudd, and R. A. Dwek (2008) HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal. Biochem.* 376: 1-12.
31. Rudd, P. M., T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, and R. A. Dwek (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* 291: 2370-2376.
32. Sekiya, S., Y. Wada, and K. Tanaka (2005) Derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS. *Anal. Chem.* 77: 4962-4968.
33. Swiech, K., V. Picanco-Castro, and D. T. Covas (2012) Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr. Purif.* 84: 147-153.
34. Tep, S., M. Hincapie, and W. S. Hancock (2012) A general approach for the purification and quantitative glycomic analysis of human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 2687-2700.
35. Toyoda, M., H. Ito, Y. K. Matsuno, H. Narimatsu, and A. Kameyama (2008) Quantitative derivatization of sialic acids for the detection of sialoglycans by MALDI MS. *Anal. Chem.* 80: 5211-5218.
36. Viseux, N., E. de Hoffmann, and B. Domon (1997) Structural analysis of permethylated oligosaccharides by electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 3193-3198.
37. Walsh, G., and R. Jefferis. (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.* 24: 1241-1252.
38. Weiskopf, A. S., P. Vouros, and D. J. Harvey (1998) Electrospray ionization-ion trap mass spectrometry for structural analysis of complex N-linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Chem.* 70: 4441-4447.
39. Wu, S., R. Grimm, J. B. German, and C. B. Lebrilla (2011) Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *J. Proteome. Res.* 10: 856-868.
40. Wuhler, M., C. A. Koeleman, and A. M. Deelder (2009) Two-dimensional HPLC separation with reverse-phase-nano-LC-MS/MS for the characterization of glycan pools after labeling with 2-aminobenzamide. *Methods Mol. Biol.* 534: 79-91.
41. Xia, B., C. L. Feasley, G. P. Sachdev, D. F. Smith, and R. D. Cummings (2009) Glycan reductive isotope labeling for quantitative glycomics. *Anal. Biochem.* 387: 162-170.
42. Xie, Y., K. Tseng, C. B. Lebrilla, and J. L. Hedrick (2001) Targeted use of exoglycosidase digestion for the structural elucidation of neutral O-linked oligosaccharides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12: 877-884.
43. York, W. S., L. L. Kiefer, P. Albersheim, and A. G. Darvill (1990) Oxidation of oligoglycosyl alditols during methylation catalyzed by sodium hydroxide and iodomethane in methyl sulfoxide. *Carbohydrate Res.* 208: 175-182.
44. Zhou, H., P. G. Warren, J. W. Froehlich, and R. S. Lee (2014) Dual modifications strategy to quantify neutral and sialylated N-glycans simultaneously by MALDI-MS. *Anal. Chem.* 86: 6277-6284.