

Application News

No. 04-AD-0295-K

Peptide Mapping Analysis of Monoclonal Antibody / LCMS-9030

LCMS-9030 Q-TOF를 이용한 단일클론 항체(mAb) 번역 후 변형(PTM) 연구를 위한 빠르고 간단한 Workflow

A Fast and Simple Workflow for Monoclonal Antibody (mAb) Post-Translational Modifications (PTM) Study Using Shimadzu LCMS-9030 Q-TOF

Shannie Tay¹, Max Kosok¹, Yu Jie Lee²
1 Shimadzu Asia Pacific, Singapore
2 National University of Singapore, Singapore

사용자 활용 포인트

- ◆ mAb의 번역 후 변형(PTMs) 연구를 위한 간단한 Workflow 이다.
- ◆ 고분해능 Q-TOF 질량 분석기 LCMS-9030와 데이터 처리를 위한 Protein Metrics 소프트웨어를 결합하여 아미노산 부위 상대적 존재비를 정확하게 정량 할 수 있다.

■ 서론

항체 치료제는 바이오의약품 산업에서 상당한 성장 잠재력을 갖고 있다. 현재, 초기부터 후기 단계의 약물 개발을 지원하기 위해 액체 크로마토그래피 질량 분석법(LC/MS)을 사용하여 단일클론 항체 (mAbs)를 특성화 하는 것에 대한 관심이 높아지고 있다. mAb는 이항화 결합으로 서로 연결된 두 개의 동일한 중쇄와 두 개의 동일한 경쇄로 구성된 거대 단백질이다. 각 mAb에는 항원에 결합하는 단편 항원 결합(Fab) 영역과 그 꼬리에 있는 단편 결정성(Fc) 영역이 포함되어 있다. mAbs는 중쇄와 경쇄에서 발견되는 고유한 상보성 결정 영역(CDR)으로 구별할 수 있다. (그림 1a)

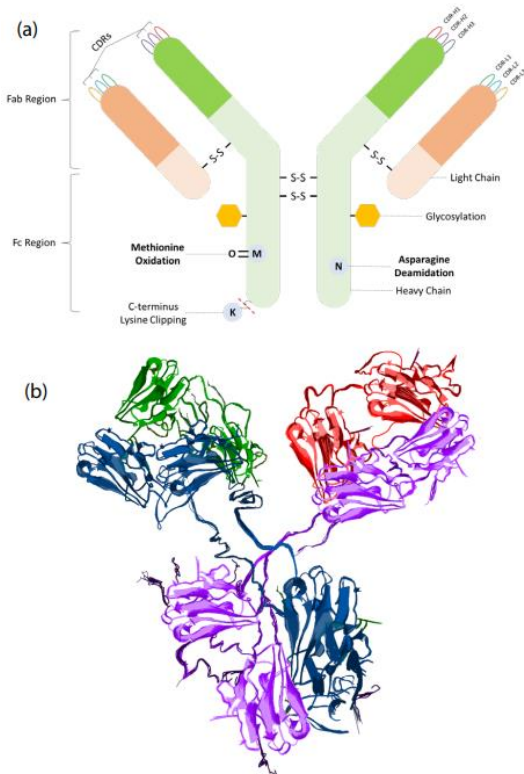


그림 1. (a) 메티오닌 산화 및 아스파라긴 탈아미노화 와 같은 일반적인 변형을 갖는 단일클론 항체의 구조. (b) mAb 구조의 3D 도식화.

이 뉴스레터에서는 NIST 단일클론 항체 (NISTmAb) 표준물질인 RM 8671을 이용하여 펩타이드 매핑 분석을 수행하였다. 샘플 준비 중에 배양 조건 및 고온에 장기간 노출 등 mAb에 인위적인 변형이 생길 수 있다. 이러한 인위적인 변형은 산화 및 탈아미노화 상대적 존재비 값을 증가시킬 수 있다. 따라서 mAbs를 올바르게 보관하고 시료 준비 배양 조건을 엄격하게 준수하는 것이 중요하다.

트립신 효소를 사용하여 mAb를 더 작은 펩타이드 단편으로 분해(digest)시켰다. 그런 다음 분해된 펩타이드를 액체 크로마토그래피를 이용하여 분리하고 Shimadzu LCMS-9030 QTOF의 Data-Dependent Acquisition(DDA) 모드를 이용하여 질량을 검출하였다(그림 2). 아미노산 부위 상대적 존재비를 정량하기 위해 Protein Metrics 소프트웨어를 사용하여 데이터를 처리하였다.



그림 2. Q-TOF mass spectrometer LCMS-9030

■ 실험

시약 및 화학물질

NISTmAbs Humanized IgG1k 단일클론 항체 표준물질 RM 8671은 Merck Pte Ltd.에서 구입하였고, Sequencing Grade Modified Trypsin(V511)은 Promega에서 구입하였다. S-Trap™ 미니 스피ن 컬럼은 Protifi에서 구입하였고, TORAST-H 바이오 바이알(370-04350-00)은 Shimadzu에서 구입하였다.

아세트니트릴 (LCMS 등급)은 상업 공급업체로부터 구입하였고, Milli-Q 물에 LCMS 등급의 포름산(>99%)을 첨가제로 넣어 이동상으로 사용하였다.

시료 준비

100 µg의 NISTmAb를 1M dithiothreitol(DTT)을 사용하여 95°C에서 10 분 동안 가열하여 환원시켰다. 그런 다음 100 mM iodoacetamide (IAM)를 사용하여 실온에서 30 분 동안 암실에서 배양하여 알킬화하였다. 12% 인산을 첨가하여 반응을 종결하였다. 다음으로, mAb를 S 트랩 미니 스피ن 컬럼으로 옮기고 100mM 트리에틸암모늄 바이카보네이트(TEAB)가 용해된 90% 메탄올로 세척하고, mAb를 S-Trap 미니 스피ن 컬럼에 포획하였다. 트립신 분해는 1:20 (w/w) 효소 대 단백질 비율을 사용하고 47°C에서 1시간 동안 배양하였다. 분해된 펩타이드는 50% 아세트니트릴: 50% 물: 0.2% 포름산 용액을 사용하여 용출하였다. 펩타이드를 4°C 에서 냉장 진공 농축을 하여 건조한 후, 저단백질 TORAST-H 바이오 바이알에 0.1% 포름산 수용액 80 µL 으로 재용해 하였다.

표 1. LCMS-9030 Q-TOF 분석 조건

| LC Conditions | |
|----------------------------------|---|
| Column | Shim-pack Arata™ Peptide C18 2.0 × 150 mm, 2.2 µm (P/N: 227-32806-03) |
| Flow Rate | 0.2 mL/min |
| Mobile Phase | A: 0.1% Formic acid in Water B: 0.1% Formic Acid in Acetonitrile |
| Elution mode | Gradient elution, 65 mins |
| Gradient Program | %B conc.: 0-2.5 min., 2%; 2.5-5.0 min., 2% to 5%; 5-50 min., 5% to 38%; 50-55 min., 38% to 90%; 55-65 min., 90% to 2% |
| Oven Temp. | 65 °C |
| Injection Vol. | 5 µL |
| Interface Conditions (LCMS-9030) | |
| Interface | Heated ESI at 4.00 kV |
| Interface Temp. | 300 °C |
| DL Temp. | 250 °C |
| Heat Block Temp. | 400 °C |
| Nebulizing Gas | 3 L/min |
| Heating Gas Flow | 15 L/min |
| Drying Gas Flow | 15 L/min |
| Data acquisition (Q-TOF) | |
| MS Mode | DDA positive |
| DDA event # | 2-8 |
| TOF m/z range | 200-2000 m/z |
| DDA m/z range | 50-2000 m/z |
| CE | 35.0 |
| CE spread | 17.0 |
| Event Time (s) | 0.100 |
| Pulser Inj. Time | 193 |

마지막으로, Shimadzu LCMS-9030 Q-TOF에 펩타이드를 주입하여 분석하였다. 분석 조건은 표 1과 같다.

데이터 처리

데이터 파일은 표 2의 파라미터에 따라 Protein Metrics PTM workflow에 업로드 하였다.

아미노산 부위 상대적 존재비 변형의 정량화는 다음 공식에 따라 Protein Metrics 소프트웨어를 사용하여 처리되었다.

$$\text{Relative abundance modification \%} = \frac{\text{Extracted-Ion Chromatograms (XICs) of modified peptide}}{\text{XICs sum of all modified peptides + wildtype peptides}} \times 100\%$$

■ 결과 및 토의

펩타이드 매핑 분석을 수행하기 위해 트립신 효소를 사용하여 NISTmAb를 작은 펩타이드 단편으로 절단하였고, 샘플 분석 clean-up은 S-Trap 미니 스피ن 컬럼을 사용하였다. 확인된 CDR 펩타이드로 100% sequence coverage 결과를 보였다 (그림 4). 펩타이드 매핑 분석을 통해 수집된 PTM 데이터는 약물 개발의 다양한 단계에서 mAbs의 특성을 모니터링하기 위한 추세를 나타낼 수 있다.

그림 3과 같이 펩타이드는 2-40분 사이에 잘 분리되어 용출되었다. 이는 MS/MS 단편화를 위해 7개의 가장 강한 전구체 이온을 선택하기 때문에 DDA 모드를 수행할 때 중요하다.

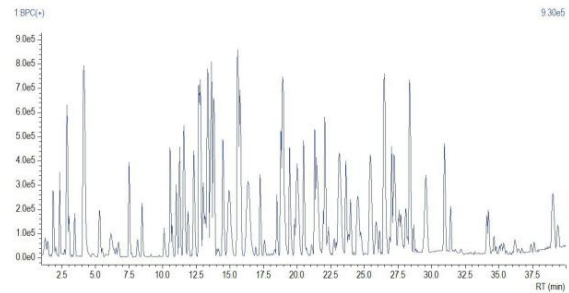


그림 3. LabSolutions Insight Explorer™을 이용한 펩타이드 매핑 분석 BPC(Base Peak Chromatogram)

표 3은 전체 계산된 아미노산 부위 상대적 존재비 백분율을 요약하였다.

Protein Metrics 소프트웨어는 변형 및 비변형 야생형 펩타이드에 해당하는 추출된 이온 크로마토그램(XICs)의 비율을 기반으로 펩타이드 상의 각 개별 변형 아미노산의 PTM의 상대적인 백분율을 자동으로 계산한다.

표 2. PTM Workflow 파라미터

| Processing Nodes | | |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Precursor Mass Tolerance | 15.00 ppm | |
| Digestion Missed Cleavages | 2 | |
| Glycans | N-glycan 59 common biantennary.txt | |
| Modifications | Targets | Fine Control |
| Carbamidomethyl +57.021464 | C | Fixed |
| Oxidation +15.994915 | M, W | Variable-common 1 |
| Deamidated +0.984016 | N, Q | Variable-common 1 |
| Gln -> pyro-Glu -17.026549 | Peptide N-term Q | Variable-common 1 |
| Gln -> pyro-Glu -18.010565 | Peptide N-term E | Variable-common 1 |
| Lys-loss -128.094963 | Protein C-term K | Variable-common 1 |



Protein sequence:

Heavy Chain Coverage: (450 of 450) 100%

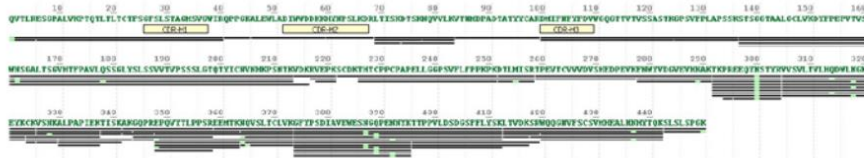
QVTLRESGPAVKPQTQLTLCTFSGFSLSTAGMSVGVWRQPPGKALEWLDIWDKDKHYNPSLKDRLTISKDTSKNVVLKVTNMDPADTATYCCARDMNFYFDVWQGGITVYSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSKDKTHPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPTDLMISRPEVTCVVDVSHEDPIVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSLVTLHQDWLNGKVEKCKVSNKALPAPIEKTSISKAKQGPREEQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Light Chain Coverage: (213 of 213) 100%

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTCASSSIVMHWYQQKPKGAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCFQGSQVPTFGGGTKVEIKRIVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQVWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSLSTLTKADYERKHKVYACVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Protein coverage:

Heavy Chain



Light Chain



그림 4. NIST amino acid sequence coverage

표 3. 아미노산 부위 상대적 존재비 %

| Protein name | Start AA ↑ | Var. Pos. Protein ↑ | Sequence (unformatted) ↑ | Mod. Names | Mod. AAs ↑ | MS Id ← | 1 |
|--------------|------------|------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|---------------|-------|
| | | | | | | MS Alias name | NIST |
| Heavy Chain | 1 | 1 | QVTLR | Gln->pyro-Glu/-17.0265 | Q | | 99 |
| | | | QVTLRESGPAVKPQTQLTLCTFSGFSLSTAGMSVGVWR | Gln->pyro-Glu/-17.0265 | Q | | 1.04 |
| | 137 | 162 | STSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK | Deamidated/0.9840 | N | | 2.81 |
| | | 162,178 | STSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK | Deamidated/0.9840; Deamidated/0.9840 | N,Q | | 12.4 |
| | 252 | 255 | DTLMISR | Oxidation/15.9949 | M | | 2.88 |
| | | 278 | 289 | FNWYVDGVEVHNAK | Deamidated/0.9840 | N | |
| | 292 | 300 | TKPREEQYNSTYR | NGlycan/1079.4017 | N | | 5.57 |
| | | | | NGlycan/1241.4545 | N | | 23.2 |
| | | | | NGlycan/1403.5073 | N | | 9.23 |
| | | | | NGlycan/1444.5339 | N | | 33.4 |
| | | | | NGlycan/1606.5867 | N | | 17.2 |
| | | | | NGlycan/1768.6395 | N | | 3.86 |
| | | | | NGlycan/876.3223 | N | | 1.9 |
| | 296 | 300 | EEQYNSTYR | NGlycan/1241.4545 | N | | 100 |
| | 305 | 314 | VVSIVTLVHLDWLNK | Deamidated/0.9840 | Q | | 0.659 |
| | | | | Deamidated/0.9840 | Q | | 2.1 |
| | | | | Deamidated/0.9840 | N | | 0.942 |
| | | | | Deamidated/0.9840 | N | | 26 |
| | | | | Deamidated/0.9840 | N | | 2.2 |
| | 326 | 328 | VSNKALPAPIEK | Deamidated/0.9840 | N | | 0.767 |
| | | | | Deamidated/0.9840 | N | | 1.79 |
| | 348 | 348 | EPQVYTLPPSREEMTK | Glu->pyro-Glu/-18.0106 | E | | 1.59 |
| | | | | EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK | Glu->pyro-Glu/-18.0106 | E | |
| 364 | 364 | NQVSLTCLVK | Deamidated/0.9840 | N | | 3.14 | |
| | | | Deamidated/0.9840 | Q | | 3.14 | |
| | | | Deamidated/0.9840 | N | | 13.8 | |
| 374 | 387 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840 | N | | 4.95 | |
| | | | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840 | N | | 6.51 |
| | 387,389 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840; Deamidated/0.9840 | N,Q | | 5.57 | |
| | | | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840 | Q | | 11.7 |
| | 389 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840 | Q | | 3.8 | |
| | | | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840 | Q,N | | 6.51 |
| | 392 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840 | N | | 11.7 | |
| | | | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | Deamidated/0.9840 | N | | 3.8 |
| | 413 | 437 | LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK | Deamidated/0.9840 | N | | 3.1 |
| | 420 | 437 | WQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK | Deamidated/0.9840 | N | | 5.4 |
| 443 | 450 | SLSLSPGK | Lys-loss/-128.0950 | K | | 76.4 | |
| Light Chain | 108 | 136 | TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR | Deamidated/0.9840 | N | | 4.26 |
| | 126 | 136 | SGTASVCLLNNFYPR | Deamidated/0.9840 | N | | 5.16 |
| | 145 | 151,154 | VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLISK | Deamidated/0.9840; Deamidated/0.9840 | N,Q | | 21.3 |
| | | 157 | VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLISK | Deamidated/0.9840 | N | | 4.03 |
| | 207 | 209 | SFNRGEC | Deamidated/0.9840 | N | | 2.33 |

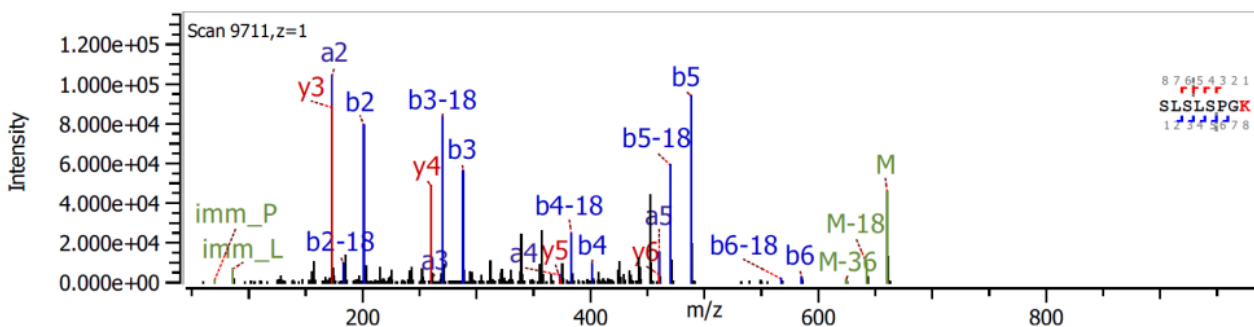


그림 5. 중쇄 아미노산 위치 450에서 아미노산 라이신(K)이 손실된 변형된 펩타이드의 MS 스펙트럼

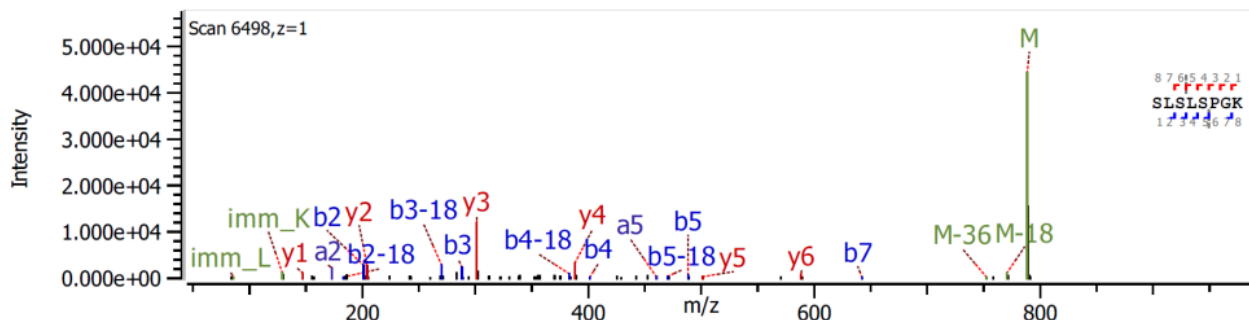


그림 6. 중쇄 아미노산 위치 450에서 아미노산 라이신(K)의 손실이 없는 변형되지 않은 야생형 펩타이드의 MS 스펙트럼

중쇄 위치 300에서 C-말단 라이신 클리핑 및 N-글리코실화 컨센서스 NXS/T ("X"는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기를 나타냄)와 같은 일반적인 변형 핫스팟은 75% 이상의 높은 상대적 존재비를 보여준다. 이는 mAbs의 기본 특성과 일치한다. 펩타이드 서열 'DTLMISR'은 산화에 대해 유일하게 확인된 펩타이드이며 5% 미만의 낮은 상대적 존재비 값을 나타낸다. 탈아미드화의 전반적인 상대적 존재비 값은 30% 미만이다.

그림 5 및 그림 6은 중쇄 아미노산 위치 450에서 라이신이 손실된 변형된 펩타이드와 변형되지 않은 야생형 펩타이드 사이의 MS 스펙트럼의 차이를 보여준다. Protein Metrics 소프트웨어는 녹색의 이미늄 이온에 해당하는 아미노산을 자동으로 표시한다. M-X로 표시된 녹색 피크는 X에 중립 손실이 있음을 의미한다. X는 물 1개 손실인 M-18 또는 물 2개 손실인 M-36 일 수 있다.

■ 결론

약물 개발 중에는 메티오닌(M) 산화 또는 아스파라긴(N) 탈아미드화와 같은 PTM 아미노산 상대 부위 존재비 백분율 값의 변화를 면밀히 모니터링하는 것이 중요하다. 이는 mAb의 효능, 안정성 및 면역원성에 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

이 연구는 펩타이드 매핑 분석을 사용하여 아미노산 부위 상대적 존재비를 정량하는 간단한 workflow를 설명하였다. Protein Metrics 소프트웨어와 결합된 Shimadzu LCMS-9030 QTOF 질량 분석기는 높은 질량 분해능을 제공하여 질량 이동 차이가 작은 변형된 펩타이드를 정확하게 정성, 분리 및 정량 할 수 있다.

PTM 연구에 펩타이드 매핑 분석을 사용하면 mAbs 특성에 대한 통찰력을 제공하여 초기부터 후기 단계의 약물 개발을 지원할 수 있다.

■ 참고문헌

1. Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NISTmAb, Trina Mouchahoir, John E. Schiel, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2018) 410:2111-2126
2. Microheterogeneity of Recombinant Antibodies: Analytics and Functional Impact, Beate Beyer, Manfred Schuster, Alois Jungbauer, and Nico Lingg, Biotechnol. J. 2017, 1700476



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/

Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. See <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> for details.

Third party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".

Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.