



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0015660
(43) 공개일자 2017년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/12 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/12 (2013.01)
C07K 1/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0107823
(22) 출원일자 2015년07월30일
심사청구일자 2015년07월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
안현주
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
김재한
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
(74) 대리인
강성혜

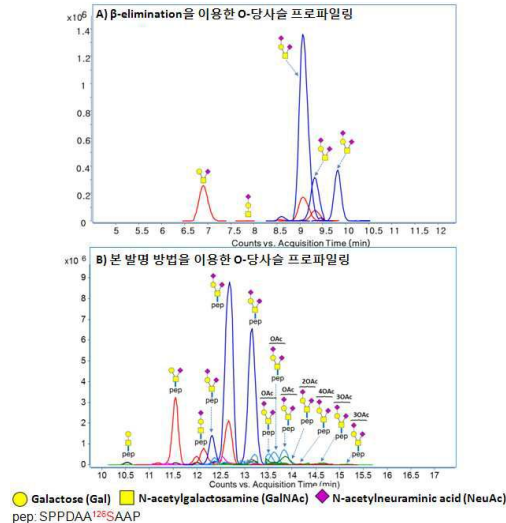
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법

(57) 요약

본 발명은 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 비특이적 단백질분해효소 처리를 이용하여 O-당펩타이드를 생성하여 당사슬이 결합된 위치를 확인할 수 있을 뿐 아니라 당자리에 결합된 당사슬의 종류, 당사슬 변이체 및 당사슬의 구조를 포함한 O-당사슬의 다양성을 정량적으로 프로파일링 할 수 있는 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명은 종래 β -제거를 통한 O-당사슬 다양성 분석 방법에 비하여 시료 처리시간이 짧고, 생성된 O-당펩타이드는 펩타이드 길이가 짧아 질량분석기 적용이 용이하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 30/7233 (2013.01)

G01N 33/6848 (2013.01)

(72) 발명자

오명진

대전 유성구 도안동로 523, 206동 1904호 (봉명동,
호반베르디움)

김운용

경기도 안산시 상록구 충장로 565 110동 506호 (월
피동, 주공1단지아파트)

서영숙

전라북도 전주시 완산구 삼천동 1가 거마산2길
7-11, 1층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A9B6075933

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오. 의료기술개발사업

연구과제명 당단백질 의약품의 특성분석을 위한 질량분석기반 당분석과학기술법 개발(100%)

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.11.20 ~ 2015.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 당단백질에 대하여 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 당단백질을 펩타이드로 절단하는 단계;
- b) 절단된 펩타이드 중 당펩타이드만을 분리하는 단계;
- c) 분리된 당펩타이드를 각각 분획하는 단계; 및
- d) 부위-특이적 O-당펩타이드 분획에 대하여 각각 질량분석하는 단계;를 포함하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 a) 단계 이전 당단백질과 혼합된 불순물을 제거하는 단계;가 부가되는 것을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 a) 단계 이전에 당단백질의 이황화 결합을 절단 처리하는 단계가 부가되는 것을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 a) 단계의 비특이적 단백질 분해효소는 엘라스테이스 (elastase), 파파인 (papain), 펩신 (pepsin), 프로 네이즈 (pronase), 프로티네이즈 K (proteinase K), 쉼틸리신 (subtilisin) 및 쉼모라이신 중 선택된 1종 이상 임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 b) 단계는 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 이용한 고체상 추출로 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계는 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 이용한 고체상 추출시 유기용매 농도구배를 이용하여 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 b) 단계와 c) 단계를 동시에 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계의 질량분석은 LC/MS 및 LC/MS/MS임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당단백질의 부위-특이적 O-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것으로서, 고속으로 당단백질에서 시알산 변이체를 포함한 O-당사슬 다양성을 스크리닝하며 동시에 당자리 및 당자리 함량까지 확인할 수 있는 분석법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당쇄화(Glycosylation)는 단백질의 번역 후 변형과정(Posttranslational modification)에 속하며 단백질의 기능을 결정하는 중요한 단계로서, 생화학적 환경에 매우 민감하게 반응하여 당사슬의 분해 및 합성 효소들의 경쟁에 의해 진행된다. 또한, 당쇄화는 경우에 따라 하나의 당자리에 여러 종류의 당사슬이 결합되어 당사슬의 다양성 (Glycan heterogeneity)을 나타내게 된다. 당단백질은 N-당사슬 또는 N-과 O-당사슬을 동시에 가지고 있다.

[0003] 당사슬(Glycan)은 크게 N-당사슬과 O-당사슬로 나눌 수 있는데 그 중에서 N-당사슬은 아스파라긴(asparagine)에 결합되어 있고 2개의 GlcNAc (NAcetylGlucosamine) 과 3개의 만노스(Mannose)로 이루어진 코어를 가진다. 이러한 코어를 기준으로 전형적인 구조를 형성하고 있고, PNGase F라는 N-당사슬만을 선택적으로 분리할 수 있는 특이적 효소가 존재한다. O-당사슬은 세린(serine)이나 트레오닌(threonine)에 결합되어 있으며 N-당사슬과는 다르게 1개가 아닌 8개의 코어를 가진다.

[0004] O-당사슬의 경우 O-글라이카네이즈(O-glycanase)라는 O-당사슬 분리효소가 있지만, 시알산이 결합되어 있는 O-당사슬의 경우 이 효소가 작용하지 못한다. 따라서 이 효소를 이용하여 분석하기 위해서는 O-당사슬에서 시알산을 제거하는 과정이 필요하다. 또한, O-글라이카네이즈의 경우 코어 1 및 코어 3 구조를 가지는 중성 O-당사슬만 분리 분석할 수 있기 때문에 사용이 제한적이다.

[0005] 이러한 이유들로 인하여 O-당사슬은 효소를 이용한 유리법보다는 화학적 처리 방법을 주로 사용하여 분석하고 있다. 현재 화학적 처리 방법 중 가장 대표적 방법인 β -제거(elimination) 방법을 이용하여 당단백질로부터 O-당사슬을 유리하여 분석하고 있지만, NaBH_4 존재 하에 NaOH 를 이용하여 단백질로부터 O-당사슬을 유리하는 이 방법은 화학적 처리 중 화학적 환경에 민감한 시알산 및 시알산 변이체가 분해되거나, 필링 반응(peeling reaction)과 같은 부반응이 일어날 수 있으며, 반응의 수율이 낮고, 당사슬이 결합되어 있는 당단백질의 구조가 분해되어 당자리 확인이 불가능하여(ref. Meth. Enzymol. 1994; 230:57-66) β -제거(elimination) 방법을 이용할 경우 정확한 O-당사슬 다양성 분석이 어렵다.

[0006] 다양한 질병이나 암에 따라 O-당사슬의 시알산에 변화가 발생하기도 하며, 백혈병에서 O-아세틸화(acetylation)된 시알산 변이체는 약물 내성과 관련이 있다는 사실이 밝혀졌다. 또한, 당단백질 의약품의 경우에는 시알산 및 시알산의 변이체가 약효와 약효의 지속성에 영향을 미치는 주요 인자이다. 따라서, 질병의 바이오마커 발굴이나 당단백질 의약품의 약효 등을 평가하기 위하여 O-당사슬 및 그 변이체의 구조를 온전히 유지하며 프로파일링할 수 있는 분석법이 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기 0-당사슬 분리방법의 문제점을 해결하고 0-당사슬만을 특이적으로 분리하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 0-당사슬의 변형 없이 비파괴적으로 0-당사슬을 분리하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 위와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 비특이적 단백질분해효소 처리를 이용하여 0-당펩타이드를 생성하여 당사슬이 결합된 위치를 확인할 수 있을 뿐 아니라 당자리에 결합된 당사슬의 종류, 당사슬 변이체 및 당사슬의 구조를 포함한 0-당사슬의 다양성을 정량적으로 프로파일링 할 수 있는 분석법을 발명하였다.
- [0010] 본 발명은 종래 β -제거를 통한 0-당사슬 다양성 분석 방법에 비하여 시료 처리시간이 짧고, 생성된 0-당펩타이드는 펩타이드 길이가 짧아 질량분석기 적용이 용이하다.
- [0011] 본 발명은
- [0012] a) 당단백질에 대하여 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 당단백질을 펩타이드로 절단하는 단계;
- [0013] b) 절단된 펩타이드 중 당펩타이드만을 분리하는 단계;
- [0014] c) 분리된 당펩타이드를 각각 분획하는 단계; 및
- [0015] d) 부위-특이적 0-당펩타이드 분획에 대하여 각각 질량분석하는 단계;를 포함하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 a) 단계 이전 당단백질과 혼합된 불순물을 제거하는 단계;가 추가되는 것을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 a) 단계 이전에 당단백질의 이황화 결합을 절단 처리하는 단계가 추가되는 것을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 a) 단계의 비특이적 단백질 분해효소가 엘라스테이즈 (elastase), 파파인 (papain), 펩신 (pepsin), 프로네이즈 (pronase), 프로티네이즈 K (proteinase K), 쉼틸리신 (subtilisin) 및 썬모라이신 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 b) 단계를 다공성 흡착화 탄소 카트리지를 이용한 고체상 추출로 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 c) 단계를 다공성 흡착화 탄소 카트리지를 이용한 고체상 추출시 유기용매 농도구배를 이용하여 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 b) 단계와 c) 단계를 동시에 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 c) 단계의 질량분석을 LC/MS 및 LC/MS/MS임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 0-당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명을 이용하면 일반적인 생물학적 환경과 당단백질 의약품에서 많이 발견되는 0-당사슬의 시알산 및 시알산 변이체를 비파괴적으로 신속하게 스크리닝할 수 있다.

- [0024] 또한, 본 발명에 의하면 단 한 번의 효소처리를 통하여 생성된 O-당펩타이드를 이용하여 분석을 진행하므로 시료처리 방법이 단순하고 시료처리 소요시간이 종래 O-당사슬 분석방법들보다 매우 짧아 신속하게 O-당사슬의 다양성을 확인할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명에 의하면 효소반응을 이용하여 생성된 O-당펩타이드에 대하여 분석을 진행하므로, β -제거 반응에서 확인할 수 없었던 시알산 및 시알산 변이체를 완벽히 스크리닝할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에 의하면 다량의 N-당사슬 존재 하에서도 N-당사슬의 방해 없이 O-당사슬을 고감도로 분석할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 방법은 O-당사슬에 시알산 변이체가 존재하거나 존재하지 않거나 관계없이 모든 당단백질의 O-당사슬 다양성 프로파일링에 보편적으로 적용 가능하다.
- [0028] 또한, 본 발명에 의하면 생성된 O-당펩타이드를 이용하여 O-당사슬 스크리닝과 동시에 당자리 및 당자리 함량까지 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 O-당사슬을 가지고 있는 당단백질에서 각 당자리에 당사슬이 결합된 O-당펩타이드의 생성 및 분리 방법에 대한 개념도 및 본 발명과 종래기술을 비교한 비교표이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 O-당펩타이드를 분리 및 분석하는 방법의 흐름도이다.
- 도 3은 O-당사슬의 시알산에 O-아세틸화된 변이체를 가진 당단백질을 본 발명 방법에 적용한 개념도이다.
- 도 4는 에리스로포이에틴에 관하여 종래 방법과 본 발명의 방법을 이용하여 O-당펩타이드 당사슬 프로파일링을 수행한 결과를 비교한 것이다.
- 도 5는 시판 중인 에리스로포이에틴을 당단백질 시료로 하여 O-아세틸화된 시알산 변이체를 갖는 O-당사슬의 구조를 텐덤 질량분석법을 이용하여 구조를 확인한 결과이다.
- 도 6은 서로 다른 배치(batch)의 다르베포에틴 알파(darbepoetin alfa: 에리스로포이에틴의 합성형)에 존재하는 O-당펩타이드의 양을 상대적으로 비교분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정된 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0031] **실험방법** (도 2 참조)
- [0032] 1. 당단백질 의약품 (본 실시예에서는 에리스로포이에틴을 사용함)에 포함되어 있는 안정화제 및 보존제 등의 불순물을 Spin Column (MWC0 10kDa)을 이용하여 제거하였다.
- [0033] 2. 당단백질 의약품에 비특이적 단백질을 분해효소를 처리 (사용된 의약품과 동량의 비특이적 단백질을 분해효소를 첨가하여 37℃로 6시간 동안 반응시킴)하여 O-당사슬을 포함하는 당펩타이드를 확보하였다.
- [0034] 3. 얻어진 당펩타이드는 다공성 흑연화 탄소 카트리지를(Porous Graphitized Carbon Cartridge)를 이용하여 고체상 추출 (Solid Phase Extraction) 하였다. 좀 더 자세히는 흑연화 탄소 카트리지를 80% 아세트나이트릴 및 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) 수액으로 세척한 후 3차 증류수로 행구었다. 당펩타이드 시료를 카트리지에 로딩한 후 염과 불순물 제거를 위해 3차 증류수로 세척하였다. 40% ACN (acetonitrile) 및 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)를 함유한 용액을 이용하여 당펩타이드만 선택적으로 추출한 후 건조하였다. 이때 유기용매 농도구배를 이용하면 N-당펩타이드를 좀 더 효과적으로 배제할 수 있다. N-당펩타이드는 높은 농도의 유기용매 분획에서 용출된다.
- [0035] 4. nanoLC chip/Q-TOF MS 분석을 통하여 O-당펩타이드를 분리하고, 당사슬의 위치 확인 및 결합된 당사슬의 구조를 분석하여 에리스로포이에틴에 존재하는 O-당펩타이드의 구성을 확인하고 정량적으로 프로파일링하였다. 더

자세히는 분리된 O-당펩타이드를 물에 재용해하여 오토샘플러 (4℃로 유지됨), 세관 펌프, 나노펌프, HPLC-Chip/MS 인터페이스 및 6530 Q-TOF MS 탐지기를 갖춘 HPLC Chip/Q-TOF(Chip Quadrupole Time-of-Flight) MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 분석하였다. 9×0.75mm 농축 컬럼 및 43×0.075 mm 분석 컬럼의 정지상 (stationary phase)으로 통합된 나노-ESI 스프레이 팁과 함께 5μm 다공성 흑연화 탄소가 패키징된 칩을 사용하였다. 크로마토그래피 방법에 의한 분리는 최적화된 분리 조건에 따라 수행되었다. 간단히 설명하면, 시료를 로딩한 후 빠른 O-당펩타이드 용출 농도구배 용액을 분당 0.3μl씩 흘려주었다. 농도구배액은 (A) 3.0% 아세트나이트릴 및 0.5% 포름산(v/v) 수액, 및 (B) 90.0% 아세트나이트릴 및 0.5% 포름산(v/v) 수액 이고, 각각 아래 시각에 아래 농도로 처리하였다: 6% B, 0~2.5min; 6~35% B, 2.5~10min; 35~70% B, 10~40min; 및 70~99.9% B, 40~50min. 남아있는 N-당펩타이드는 99.9% B 액으로 10분간 씻어내었다. 최종적으로 분석 컬럼 은 6% B로 20분간 재평형화하고, 농축 컬럼은 0% B로 20분간 재평형화하였다.

[0036] 5. 질량분석 후, LC/MS의 원래 데이터는 Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.06.00 SP2, Agilent Technologies)에 포함된 분자 특성 추출 알고리즘 (Molecular Feature Extractor algorithm)을 이용하여 처리하였다.

[0037] <결과 및 데이터 설명>

[0038] 1. 도 1은 O-당사슬을 가지고 있는 당단백질에서 각 당자리에 당사슬이 결합된 O-당펩타이드의 생성 및 분리 방법에 대한 개념도 및 본 발명과 종래기술을 비교한 비교표이다.

[0039] 종래 O-당사슬 분석방법은 β-제거를 이용하여 당단백질로부터 O-당사슬을 분리하나 다음과 같은 한계점이 있다. 첫째, 시알산 O-아세틸화 (acetylation)와 같이 화학적 처리에 민감한 시알산 변이체의 분해가 일어날 수 있다. 둘째, β-제거 반응이 당단백질로부터 O-당사슬을 유리하는데 그치지 않고, 유리된 당사슬 말단부분의 당을 추가적으로 유리하는 필링 반응 (peeling reaction)이 일어날 수 있다. 셋째, β-제거에 의하여 당단백질의 구조를 분해하기 때문에 당사슬 구조 외에 단백질 내에 O-당사슬이 위치하고 있던 당자리를 확인할 수 없다.

[0040] 이를 극복하기 위해 본 발명은 당단백질 시료에 비특이적 단백질분해효소를 처리하여 당펩타이드를 생성한 후 O-당펩타이드를 확보한다. 본 발명법의 장점은 첫째, O-당펩타이드 생성시 비특이적 단백질분해효소가 당사슬의 구조에 영향을 미치지 않아 O-당사슬 및 그 변이체를 완벽히 프로파일링 할 수 있고 둘째, 비특이적 단백질분해 효소에 의하여 O-당펩타이드가 생성되므로, O-당사슬 프로파일링과 동시에 O-당사슬이 위치한 당자리를 확인할 수 있으며, 셋째, 종래의 β-제거 O-당사슬 유리방법과 비교하여 시료처리가 간편하며, 빠르고 정확하게 다양한 O-당사슬을 정량적으로 프로파일링 할 수 있다. 뿐만 아니라, 다량의 N-당사슬이 함께 존재하더라도 별도의 시료 처리과정 없이 O-당사슬을 고감도로 분석할 수 있다.

[0041] 2. 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 O-당펩타이드를 분리 및 분석하는 방법의 흐름도이다. 이 실시예에서는 당단백질 시료로서 당단백질 의약품을 선택하여 이를 비특이적 단백질분해효소로 처리하여 O-당펩타이드를 생성하였다. 이때 O-당사슬의 영향으로 짧은 펩타이드가 꼬리표처럼 붙은 형태인 O-당펩타이드가 생성되게 된다. 또한 비특이적 단백질분해효소 처리에 의하여 생성된 O-당펩타이드는 질량분석기 적용에 용이한 질량값을 갖는다.

[0042] 비특이적 단백질분해효소를 이용할 경우 당이 붙어있지 않은 부분의 펩타이드는 하나 또는 두 개의 아미노산 단위로 잘리게 되므로, O-당펩타이드 분석시 당사슬이 없는 펩타이드에 의한 영향을 받지 않는다. 또한, 생성된 N-당펩타이드는 3~6개의 아미노산과 12~21개의 단당류의 결합으로 이루어져 질량값이 2,500~5,000의 값을 가지는 반면, O-당펩타이드의 경우 7~11개의 아미노산과 2~4개의 단당류의 결합으로 이루어져 1,200~2,000의 질량값을 가지므로 질량분석시 이온화에 적합한 크기로 생성된다. 또한, O-당펩타이드의 펩타이드 길이가 N-당펩타이드의 펩타이드보다 길어 질량분석시 이온화 효율이 높기 때문에 상대적으로 N-당펩타이드 신호는 억제되는 현상이 발생한다. 따라서, 본 발명의 방법을 이용하면 N-당펩타이드가 다량 존재하더라도 O-당펩타이드를 고감도로 분석할 수 있다.

[0043] 효소 처리 이후에는 당을 효과적으로 용리할 수 있는 특징을 가진 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 (Porous Graphitized Carbon Cartridge)를 이용하여 고체상 추출 (Solid Phase Extraction)을 하여 당펩타이드만 선택적으로 추출하였다. 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 사용할 경우 펩타이드 및 아미노산은 세척과정 중에 제거되어 당펩타이드를 선택적으로 추출할 수 있다. 또한, N-당펩타이드의 경우 O-당펩타이드보다 유기용매 함량이 높은 부분에서 용출되기 때문에 고체상 추출 과정에서 유기용매 함량을 조절하여 용출할 경우 질량분석시 N-당펩

타이드의 영향을 최소화할 수 있다. 정제된 O-당펩타이드에 대하여 LC/MS를 이용하여 시알산 및 시알산 변이체를 포함한 O-당사슬을 프로파일링하고, LC/MS/MS를 통하여 정확한 구조분석을 진행하였다.

[0044] 3. 도 3은 O-당사슬의 시알산에 O-아세틸화된 변이체를 가진 당단백질을 본 발명 방법에 적용한 개념도이다. 시알산 O-아세틸화 변이체를 가진 대표적인 당단백질 의약품으로 에리스로포이에틴(EPO)을 들 수 있다. 본 발명에 따른 분석방법을 적용한 경우, 시알산 변이체를 포함한 O-당사슬을 구조 분해 없이 완벽하게 프로파일링할 수 있다. 또한, 다량의 N-당사슬 존재하에서도 별도의 시료처리 과정 없이 O-당사슬을 고감도로 분석할 수 있다. 종래의 β -제거 방법과 비교하여 시료 처리방법이 간단하고, 시료 처리시간이 짧아 신속하게 O-당사슬을 스크리닝할 수 있으며, 당사슬에 붙어있는 펩타이드 조각을 이용하여 당쇄화 자리를 확인할 수 있다.

[0045] 4. 도 4는 에리스로포이에틴에 관하여 종래 방법과 본 발명의 방법을 이용하여 O-당펩타이드 당사슬 프로파일링을 수행한 결과를 비교한 것이다. 현재 시판되고 있는 당단백질 의약품 에리스로포이에틴(erythropoietin; EPO)은 하나의 O-당자리를 가지고 있는 당단백질이다. 또한, EPO의 당사슬에는 시알산 하나당 최대 2개의 O-아세틸화된 변이체가 존재한다. 종래 방법인 β -제거 방법을 이용하여 O-당사슬을 유리하게 되면 화학반응에 의하여 시알산의 변이체가 분해되어 온전한 당사슬 프로파일링이 불가능하다. 종래 방법을 이용할 경우 시알산 변이체의 존재를 확인할 수 없었으며, 1_1_1_0 (Hexose1_HexNAc1_NeuAc1_OAc0) 및 1_1_2_0(Hexose1_HexNAc1_NeuAc2_OAc0)의 구성을 갖는 O-당사슬만을 확인할 수 있었다. 그러나, 본 발명에 따른 분석법을 적용한 경우 시알산에 O-아세틸화된 변이체를 포함한 O-당사슬을 온전히 확보할 수 있었으며, O-당사슬에 최대 4개까지 O-아세틸화된 시알산 변이체를 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, O-당쇄화 자리(아미노산 126번 위치)를 가진 O-당펩타이드를 확보할 수 있어 O-당사슬 다양성 프로파일링과 동시에 당자리를 확인할 수 있었다.

[0046] 5. 도 5는 시판 중인 에리스로포이에틴을 당단백질 시료로 하여 O-아세틸화된 시알산 변이체를 갖는 O-당사슬의 구조를 텐덤 질량분석법을 이용하여 구조를 확인한 결과이다. 본 발명의 방법을 이용할 경우 화학적 환경에 민감한 시알산 및 시알산 변이체의 구조에 영향 없이 분리 분석이 가능함을 확인하였다.

[0047] 예컨대, m/z 948.88 (z2)에 해당되는 당펩타이드는 아미노산 126번 세린(Ser)에 당사슬이 결합되어 있으며, 당사슬은 1_1_2_2 (Hex1_HexNAc1_NeuAc2_OAc2) 구조로서 2개의 시알산에 각각 O-아세틸화 되어 있다. 시알산에 하나의 O-아세틸화가 된 변이체의 경우 텐덤 질량스펙트럼에서 m/z 316 또는 m/z 334의 피크를 확인할 수 있으며, 두 개가 O-아세틸화된 변이체는 m/z 358 또는 m/z 376 피크를 확인할 수 있다. 이러한 진단 이온(diagnostic ion)을 통하여 시알산 변이체를 빠르게 스크리닝할 수 있다. 본 발명자들은 이와 같은 LC/MS/MS 방법으로 당자리에 각각의 당사슬 및 그의 변이체들이 분해되지 않고 존재한다는 직접적인 결과를 확보하였다.

[0048] 6. 도 6은 서로 다른 배치(batch)의 다르베포에틴 알파(darbepoetin alfa: 에리스로포이에틴의 합성형)에 존재하는 O-당펩타이드의 양을 상대적으로 비교분석한 결과이다. EPO의 O-당사슬은 아미노산 126번 세린에 결합되어 있으며, 다르베포에틴 알파의 O-당사슬의 87%가 두 개의 시알산을 가지고 있다. 시알산 하나를 갖는 O-당사슬의 경우 최대 두 개의 O-아세틸화된 변이체가 존재하고, 시알산 두 개를 갖는 O-당사슬의 경우 최대 네 개의 O-아세틸화된 시알산 변이체가 존재하는 것을 확인하였다.

[0049] 아래 표 1은 본 발명의 방법과 종래의 β -제거 방법을 비교한 것이다.

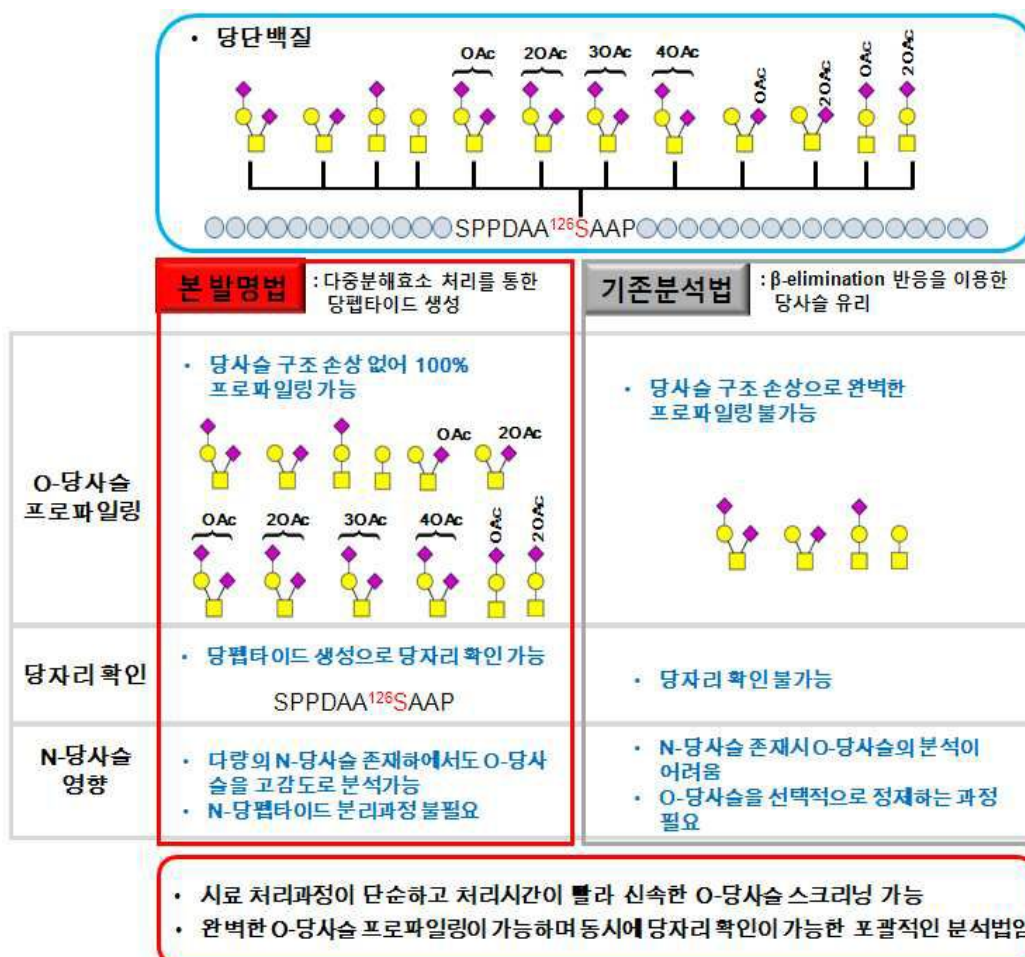
표 1

구분	본 발명 방법	종래 O-당사슬 분석방법
시료처리 과정	비특이적 단백질 분해효소 처리 (6 hours)-> 탈염 (4 hours) -> LC/MS/MS (1 hour)	β -elimination (16 hours)-> 탈염(4 hours) -> LC/MS/MS (1 hour)

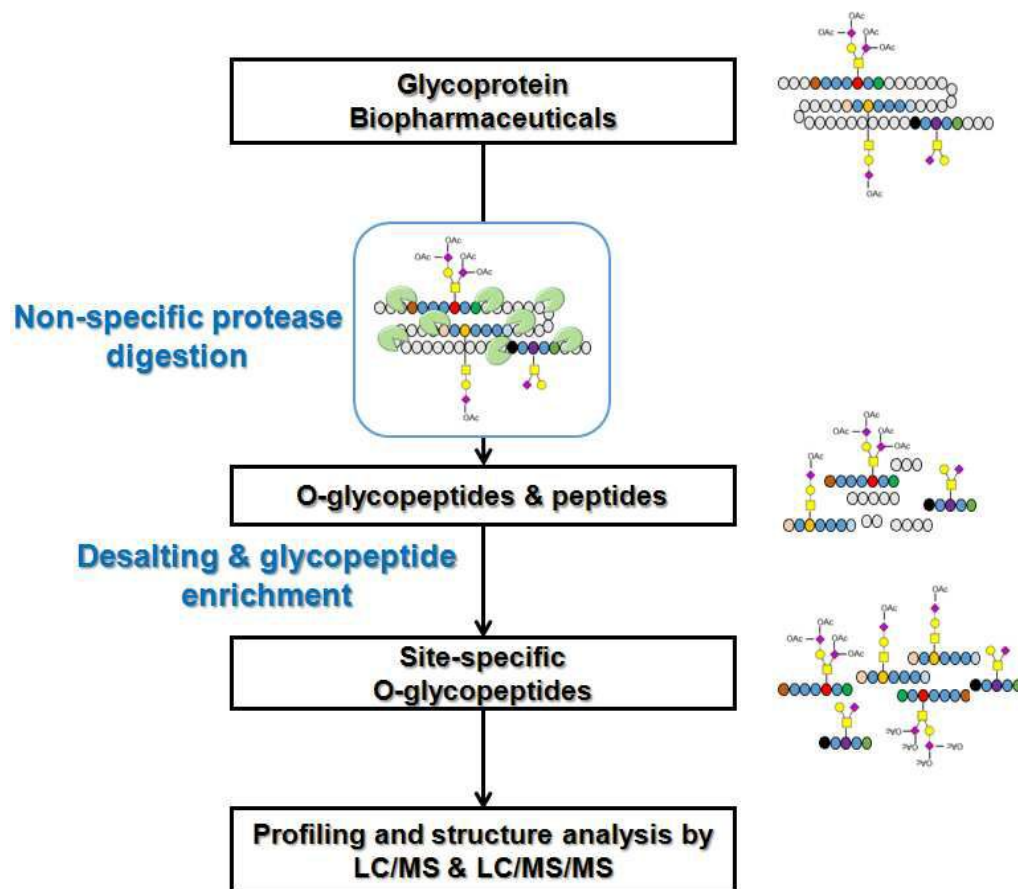
분석소요 시간	총 11.5시간	총 21시간
특징	- 다량의 N-당사슬 존재하에서도 O-당사슬을 고감도로 분석할 수 있음 -> N-당펩타이드 분리하는 과정 불필요함. - 기존의 O-당사슬 분석법 및 이전 발명법에 비하여 시료 처리 방법이 단순하며, 시료 처리 시간이 매우 짧아 좀 더 빠른 스크리닝이 가능함. - 화학적 반응에 민감한 시알산 및 그 변이체 구조의 손상 없이 당사슬 다양성을 완벽히 프로파일링할 수 있음. - 당펩타이드 생성으로 O-당사슬 다양성 뿐만 아니라 당사슬이 결합되어있는 당자리까지 동시에 확인 가능함.	- 당단백질에서 O-당사슬을 유리하기 위하여 보편적으로 사용되는 방법. - 화학적으로 당사슬을 유리하는 과정에서 O-당사슬에 존재하는 시알산 및 그 변이체 구조가 분해되어 O-당사슬 다양성 분석을 완벽히 할 수 없음. - 당사슬 유리 중 단백질 구조의 분해로 당자리 확인이 불가능함.

도면

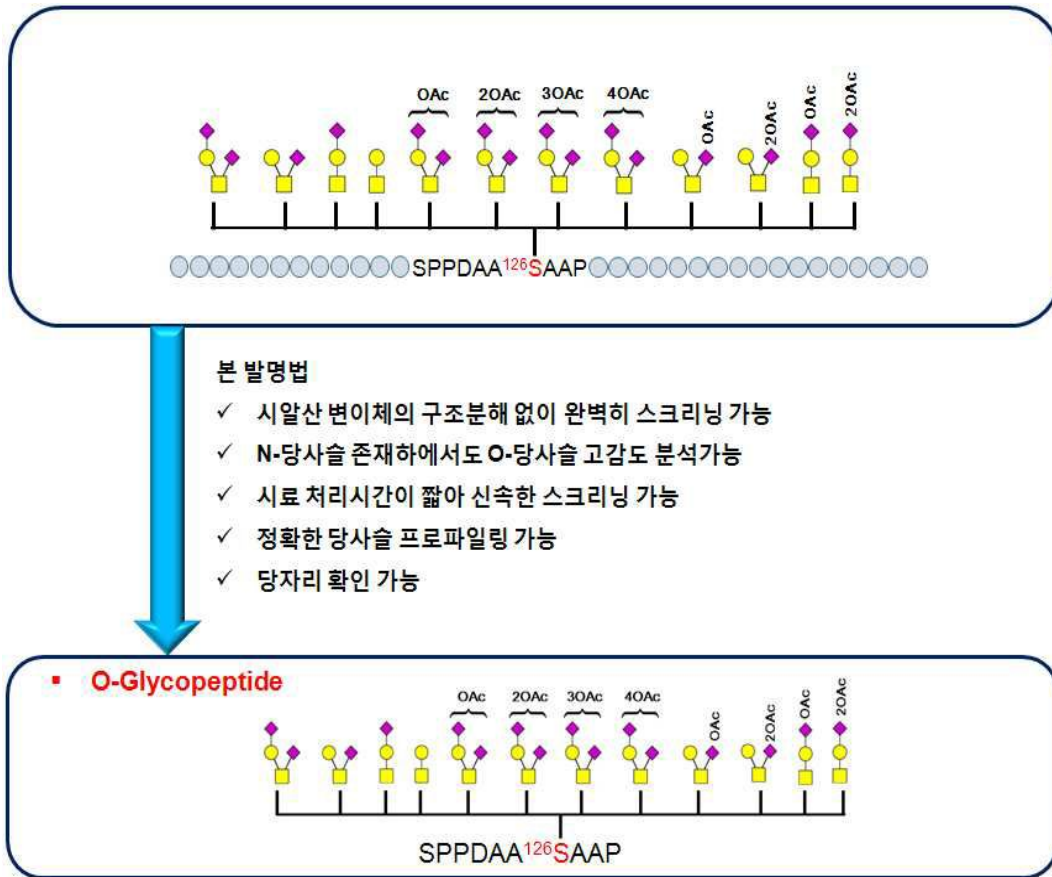
도면1



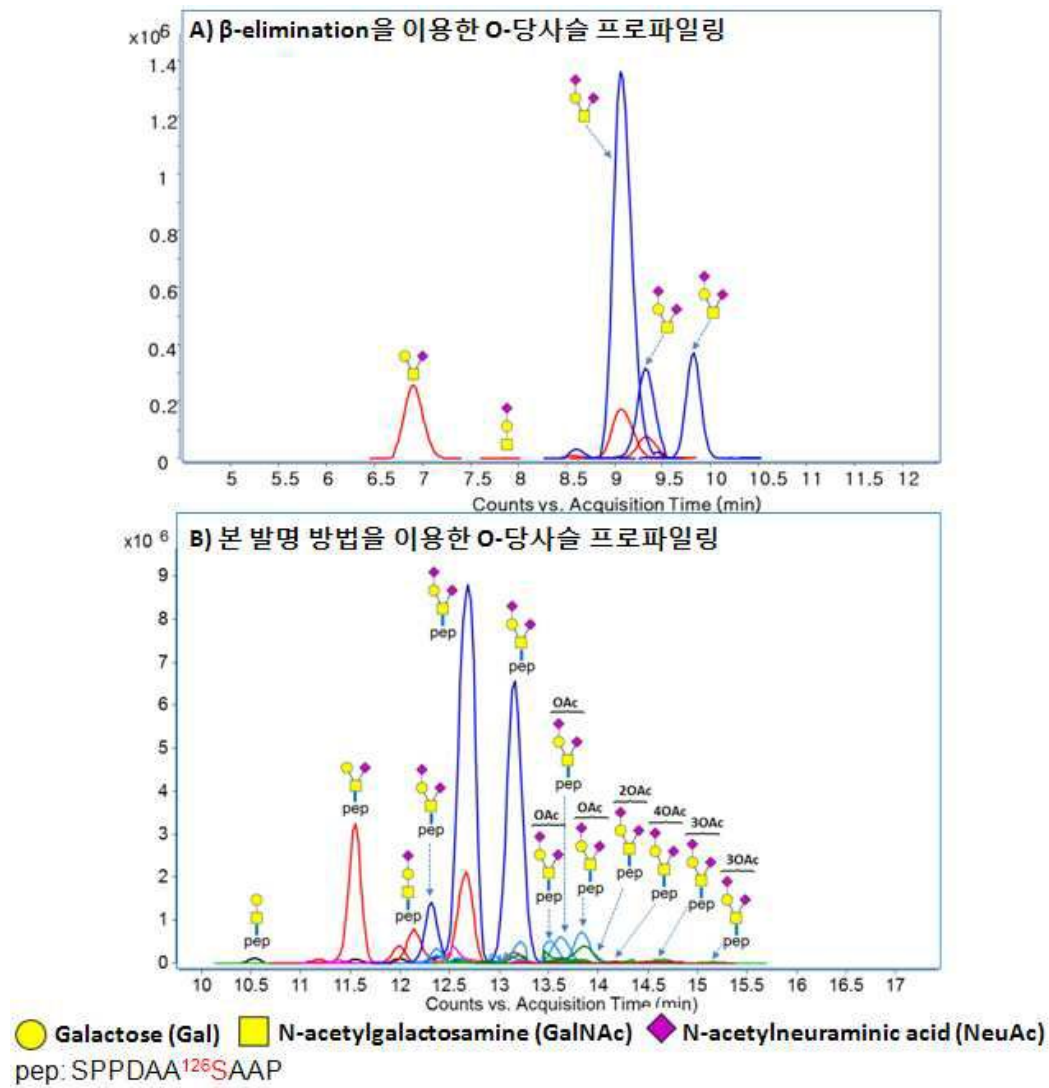
도면2



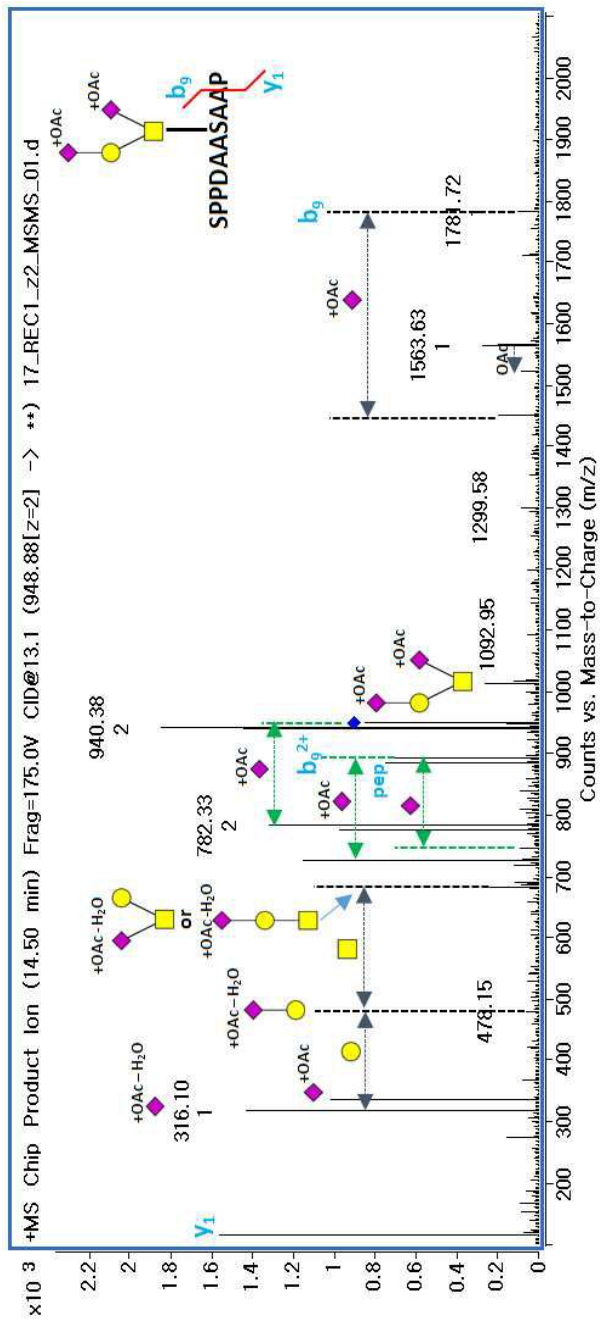
도면3



도면4



도면5



도면6

