



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0122447

(43) 공개일자 2014년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 211/92 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

G01N 27/62 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0039125

(22) 출원일자 2013년04월10일

심사청구일자 2013년04월10일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

오한빈

서울 구로구 경인로 619-3, 908호 (신도림동, 신
도림3차푸르지오)

문봉진

경기 고양시 일산동구 강송로 196, 108동 1202호
(마두동, 강촌마을1단지아파트)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 10 항

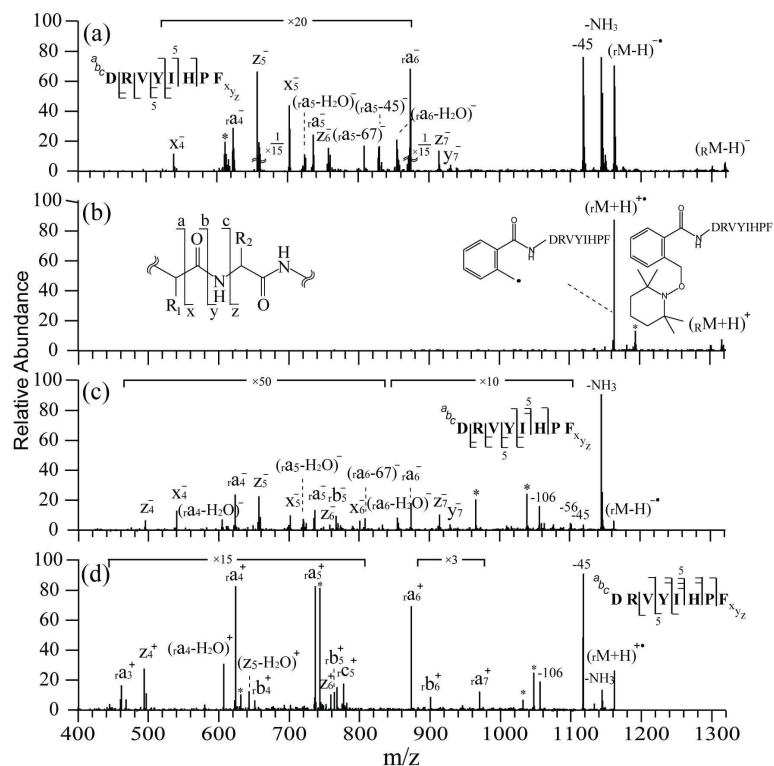
(54) 발명의 명칭 음이온 모드를 이용한 원스텝 자유 라디칼-개시 펩타이드 시퀀싱 질량분석

(57) 요약

본 발명은 분석하고자 하는 펩타이드를 음이온화 함으로써 단 한번의 충돌 활성화만으로 펩타이드 서열의 동정이 가능한 TEMPO-기반 FRIPS(free radical-initiated peptide sequencing) 방법에 관한 것이다.

본 발명은 단일 충돌 활성화 에너지의 부하를 통해 TEMPO 라디칼의 제거 및 펩타이드 골격 절편화가 모두 수행되어, 긴 duty-cycle을 필요로 하던 기존의 FRIPS 방법의 단점을 훌륭하게 극복함으로써, 효율적인 단백질 구조 분석 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



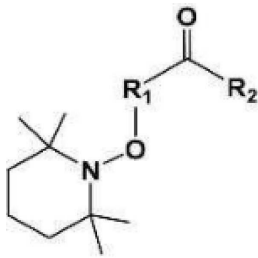
특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 펩타이드 서열의 동정방법:

(a) 분석하고자 하는 펩타이드와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 컨쥬게이션하는 단계:

화학식 1



상기 화학식에서 R_1 은 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_4 알킬이고, R_2 는 2,5-디옥소-1-피롤리디닐옥시, 2,5-디옥소-3-설폰닐-1-피롤리디닐옥시, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페녹시, 4-설폰-2,3,5,6-테트라플루오로페녹시, 할라이드 또는 아자이드이다;

(b) 상기 컨쥬게이션된 펩타이드를 음이온화하는 단계:

(c) 상기 음이온화된 컨쥬게이션된 펩타이드를 충돌로 활성화시켜 라디칼 종을 포함하는 분자 이온 단편을 형성하는 단계;

(d) 상기 분자 이온 단편의 질량을 분석하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 상기 펩타이드의 아미노산 잔기를 단일 탈수소화(single-deprotonation)하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 펩타이드 N-말단의 아미노기 또는 라이신 잔기의 아민기에 컨쥬게이션하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 1회의 충돌 활성화를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 분자 이온 단편은 a^- , c^- , x^- , z^- 및 y^- 형 이온으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 기체 상(gas phase)에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)-(d)는 질량분석기(mass spectrometer)에서 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R_1 은 C_6-C_{10} 아릴메틸이고, R_2 는 2,5-디옥소-1-피롤리딘옥시인 것을 특징으로 하는 방법.

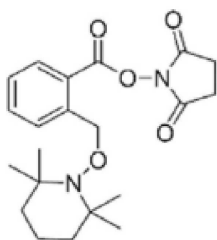
청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R_1 은 페닐메틸인 것을 특징으로 하는 방법.

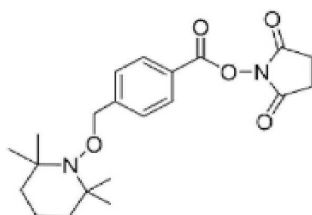
청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물:

화학식 2



화학식 3



명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 분석하고자 하는 펩타이드에 대한 단일 단계(one-step) 충돌 활성화를 통해 자유 라디칼-개시 펩타이드 시퀀싱을 수행하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

지난 10년 간, 다양한 라디칼-기반 탠덤 질량 분석방법(radical-based tandem mass spectrometry)이 개발되어 왔다. 가장 주목할만한 것은, 전자포획분해(electron capture 분해, ECD)[1-6] 및 전자전달분해(electron transfer 분해, ETD)[7,8]가 광범위한 펩타이드 및 단백질 골격 분해를 위해 성공적으로 적용되었다는 것이다. 이들 방법은 가장 널리 사용되는 펩타이드의 충돌활성 분해(collision-activated dissociation, CAD) 방법을 보완한다. 나아가, 전자-유도 분해(electron-induced dissociation, EID)[9,10] 및 전자 분리 분해(electron detachment dissociation, EDD)[11-14] 방법은 펩타이드[11], 글리코사미노글리칸[12,13] 및 올리고뉴클레오타이드[14]와 같은 음전하를 띄는 생물학적 분석물을 조사하는 데에 매우 유용한 것으로 밝혀졌다.

- [0003] 이러한 방법과 함께, 화합물-기반 라디칼 탠덤 질량분석방법이 개발되어오고 있다. 첫째, 펩타이드 및 보조 리간드의 삼중 금속복합체에 대한 CAD에 의해 펩타이드-라디칼 양이온(M^+)이 형성됨이 밝혀졌다[15]. 기체상에서 삼중 금속복합체의 산화환원 반응은 M^+ 형태의 수소-결합 펩타이드 라디칼종을 형성하는 데에 깊이 관여하고 있으며, 다양한 전이금속 원소, 특히 다중 산화수를 가지는 Cu^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{3+} , Fe^{3+} 및 Co^{3+} 가 이 방법에 사용될 수 있다[16]. 충돌 에너지가 제공되면, 형성된 펩타이드 라디칼종 M^+ 이 펩타이드 골격 절편을 생성하며, 이들의 주요 절편 형태는 x^- , c^- 및 z^- 이온이다. 뿐만 아니라, $[GGG]^+$, $[GGG]^+$ 및 $[GGG]^+$ 와 같은 명확한 초기 라디칼 사이트를 가지는 펩타이드 올리고머 라디칼들은 이러한 방법을 통해 생성되어 이들 이성질체 간의 상호전환을 연구할 수 있다[17,18]. $[GGG]^+$ 이성질체 간의 높은 전환 에너지로 인하여, 상응하는 CAD 스펙트럼들이 서로 상당히 상이하다. 뿐만 아니라, DFT(density functional theory)계산을 통하여 $[GGG]^+$ 이성질체가 $[GGG]^+$ 및 $[GGG]^+$ 에 비하여 각각 7.6 및 13.4 kcal/mol 만큼 더 안정하다는 것이 밝혀졌다[17]. 첫번째 글라이실기의 α -탄소 위치에 라디칼종을 가지는 $[GGG]^+$ 이성질체의 안정성은 N-말단에서의 전자주개(electron-donating) NH_2 -기 및 전자끌개(electron-withdrawing) $[-C(OH)NH]^+$ 기의 복합적인 영향으로 인한 captodative 효과[19]에 기인한다. 또한, $[GGW]^+/[GGW]^+$ 및 $[GGY]^+/[GGY]^+$ 라디칼 양이온 이성질체 쌍을 생성함으로써 α -탄소-centered 및 π -centered 라디칼 간의 상호전환을 연구할 수 있었으며, 그 결과 이들의 상호전환이 가능하지 않다는 사실이 밝혀졌다[20,21].
- [0004] 광분해성 라디칼 전구체들 역시 펩타이드-라디칼 이온의 생성에 이용된다. 요오드화된 나프틸기를 가진 18-크라운-6와 복합체를 이루는 비공유 펩타이드들을 266-nm UV 광선으로 조사한다[22]. UV 광선은 직접적으로 탄소-요오드 결합을 끊고 비공유 복합체는 온전한 상태로 남긴다. 뒤이은 충돌 활성화는 펩타이드로부터 H-원자를 이탈시키고, 결국 비공유 복합체가 18-크라운-6 유도체 및 펩타이드로 분리되도록 한다. 이후 생성된 펩타이드 라디칼 이온에 충돌 활성화를 시키면 펩타이드 골격의 광범위한 절편화가 일어나고 측쇄(side-chain)가 상실된다. 특히, 생성된 펩타이드 골격 절편은 다른 라디칼-기반 탠덤 질량분석방법에서 얻은 그것과 매우 유사하다. 한편, 요오드-표지된 펩타이드/단백질은 266-nm UV 광선에 의해 직접적으로 광분해된다. 일반적으로, 티로신이나 히스티딘의 측쇄는 이러한 방법을 통해 요오드-표지된다[23,24]. 생성된 펩타이드 라디칼종의 충돌 활성화는 최초 라디칼 사이트가 펩타이드 골격으로 이동하도록 하여 결과적으로 펩타이드 골격의 분해 및 측쇄 상실을 야기한다. 최근에, 이러한 광분해성 라디칼 전구체 기반-방법은 온전한 단백질 이온의 특성을 조사하는 데에 이용될 수 있음이 밝혀졌다[23, 25].
- [0005] 한편, 펩타이드 음이온으로부터 전자의 광-분리를 통해 펩타이드 라디칼 음이온이 생성됨이 밝혀졌다[26-28]. 펩타이드의 UV-흡광은 방향성 아미노산 내에서 $\pi\pi^*$ 전자 전이를 통해 펩타이드 음이온으로부터 전자를 이탈시킨다. 뒤이어 생성된 펩타이드 라디칼 음이온의 광자 흡수 또는 충돌 활성화로 인해 라디칼-유도 펩타이드 골격 절편화가 일어나 a^- 및 x^- 형 음이온 절편을 생성한다.
- [0006] 다른 중요한 접근으로, 충돌 활성화에 특히 민감한 라디칼 전구체를 분석하고자 하는 펩타이드에 태깅하는 방법이 있다. 예를 들어, Porter 등은 tert-부틸 퍼옥시카바메이트기를 라이신 측쇄 또는 펩타이드의 N-말단에 결합시켰다[29-31]. 리튬이온화된 펩타이드가 충돌 활성화에 노출되면, 펩타이드 골격은 분해되어 a^- , c^- 및 z^- 형 절편과 측쇄 절편을 생성한다. 충돌 에너지는 즉각적으로 라디칼 사이트를 생성하고, 이에 의해 펩타이드 골격의 분해가 이루어진다. 또 다른 예로써, 수용성 자유라디칼 개시제인 Vazo 68 (DuPont)가 화학적 태그로서 이용될 수 있다[32]. 이 라디칼 전구체는 충돌 활성화시 라디칼 사이트를 형성하는 열 민감성의 아조(azo)기를 가진다. Vazo 68-변형된 펩타이드 이온의 CAD는 아조기가 결합한 탄소 위치에서 자유라디칼 사이트를 형성하고 뒤이은 충돌 활성화는 펩타이드 골격 절편을 생성한다. 생성된 펩타이드 절편 또한 주로 a^- 및 z^- 형으로, 라디칼-유도 펩타이드 골격 분해가 펩타이드 골격 절편화에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 이 방법은 “자유 라디칼-개시 펩타이드 시퀀싱(free radical-initiated peptide sequencing, FRIPS)”으로 명명되었다. 유사한 접근이 시토신 및 트립토판 잔기의 S- 또는 N-니트로소화를 이용하여 이루어졌다[33-35]. S- 및 N-니트로소화 펩타이드는 충돌 활성화에 의해 NO기를 잃음으로써 각각 타이(thiyl) 및 아미닐(aminy) 라디칼을 쉽게 생성하였다.
- [0007] 펩타이드에서 라디칼 사이트를 생성하기 위하여, 본 발명자들은 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)라디칼의 높은 안정성[36,37]에 기반한 라디칼 전구체-태깅 전략을 사용하였다. 우선, 본 발명자들은 분

석하고자 하는 펩타이드의 N-말단을 *o*-TEMPO-벤질-NHS(ortho-TEMPO-메틸 벤조익에시드 N-하이드록시숙시니미드)를 이용한 전통적인 화학적 태깅방법을 통하여 *o*-TEMPO-벤질기와 접합시켰다. 충돌 에너지가 가해졌을 때, 라디칼 사이트를 생성하는 균일분해(homolytic cleavage) 과정이 완료되었다. TEMPO 라디칼 종의 높은 열화학적 안정성은 충돌-활성화 반응이 균일 라디칼 생성 분해반응으로 잘 진행되도록 하여, 벤질 탄소에 자유 라디칼이 생성되도록 한다. 뒤이은 펩타이드 라디칼 종에 대한 충돌 활성화는 광범위한 골격 분해 및 측쇄 상실로 이어진다. 나아가, 본 발명자들은 TEMPO-기반 FRIPS가 S-S 결합 또는 이황화물 결합에 인접한 C-S 결합을 우선적으로 절단한다는 사실을 발견하였다[37].

[0008] TEMPO-기반 FRIPS 방법은 프로테오믹스 연구를 위한 유용한 도구가 될 수 있다. 그러나, 첫째 FRIPS 방법은 좀 더 보완이 필요하다. 무엇보다도, FRIPS 방법에서 종래의 CAD에 비해 더 긴 duty-cycle(예를 들어 MS→MS/MS→MS/MS/MS vs MS→MS/MS)이 필요하다는 점은 개선될 필요가 있다. FRIPS에서는 라디칼 생성을 위해 추가적인 탠덤 질량분석 단계가 요구된다. 본 발명자들은 이러한 duty-cycle 문제를 해결하기 위한 연구를 지속하였다. 본 발명에서, FRIPS 질량분석이 음이온 모드에서 수행될 경우 라디칼-기반 펩타이드 시퀀싱이 단 한번의 MS/MS 단계를 통해 이루어질 수 있음이 밝혀졌다. 본 발명자들은 한 번의(single-step) 충돌 에너지 부하로 펩타이드 음이온이 *o*-TEMPO-벤질-C(O)-기에서 *o*-TEMPO 부분이 떨어져 나가게 되고, 나머지 벤질-C(O)-펩타이드 부분이 부가적인 충돌 에너지 부하 없이 광범위한 펩타이드 골격 분해로 이어질 수 있음을 보였다. Bowie 등이 보고한 바와 같이, 음전하를 띤 펩타이드 이온의 CAD에 있어, FRIPS의 분해 경향은 음이온 모드에서 잘 나타나는 특유의 열역학적 및 동력학적 특성에 의해 좌우된다[38, 39]. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 양이온 및 음이온 모드에서의 라디칼 생성 에너지 차이의 관점에서 이러한 개선을 해석하기 위하여 잔여비율 분석(survival fraction analysis)을 이용하였다. 본 발명자들은 화학-기반 라디칼-유도 탠덤 질량분석방법의 프로테오믹스 도구로서의 실용화를 향한 디딤돌을 제공하고자 한다.

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 펩타이드 서열의 동정에 있어서, 종래의 자유 라디칼-개시 펩타이드 시퀀싱(free radical-initiated peptide sequencing, FRIPS) 방법을 보다 효율적으로 개선하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, FRIPS 질량분석이 음이온 모드에서 수행될 경우 라디칼-기반 펩타이드 시퀀싱이 단 한번의 MS/MS 단계를 통해 이루어질 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 펩타이드 서열의 동정방법을 제공하는 데 있다.

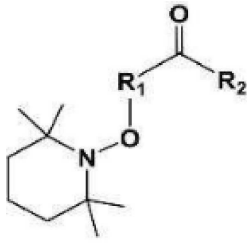
[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 펩타이드 서열의 동정방법을 제공한다:

[0014] (a) 분석하고자 하는 펩타이드와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 컨쥬게이션하는 단계:

[0015] 화학식 1



[0016]

[0017]

상기 화학식에서 R₁은 C₆-C₁₀ 아릴 C₁-C₄ 알킬이고, R₂는 2,5-디옥소-1-피롤리딘옥시, 2,5-디옥소-3-설폰일-1-피롤리딘옥시, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페녹시, 4-설폰-2,3,5,6-테트라플루오로페녹시, 할라이드 또는 아자이드이다;

[0018]

(b) 상기 컨쥬게이션된 펩타이드를 음이온화하는 단계;

[0019]

(c) 상기 음이온화된 컨쥬게이션된 펩타이드를 충돌로 활성화시켜 라디칼 종을 포함하는 분자 이온 단편을 형성하는 단계;

[0020]

(d) 상기 분자 이온 단편의 질량을 분석하는 단계.

[0021]

본 발명자들은 펩타이드 서열의 동정에 있어서, 종래의 자유 라디칼-개시 펩타이드 시퀀싱(free radical-initiated peptide sequencing, FRIPS) 방법을 보다 효율적으로 개선하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, FRIPS 질량분석이 음이온 모드에서 수행될 경우 라디칼-기반 펩타이드 시퀀싱이 단 한번의 MS/MS 단계를 통해 이루어질 수 있음을 발견하였다.

[0022]

본 발명에 따르면, 분석하고자 하는 펩타이드를 탈수소화(deprotonation)하여 음이온 모드에서 FRIPS를 수행할 경우, 낮은 충돌 활성화 에너지에서도 TEMPO 라디칼의 제거가 일어나 잔여 열에너지를 통해 추가적인 펩타이드 골격 절편화가 일어남으로써, 결과적으로 한 번의(single-step) 충돌 에너지 부하로 성공적인 펩타이드 골격 분해가 일어날 수 있다. 이는 TEMPO-기반 FRIPS 방법이 종래의 충돌활성 분해(collision-activated dissociation, CAD) 방법에 비해 더 긴 duty-cycle을 필요로 한다는 단점을 훌륭하게 극복한다.

[0023]

본 명세서에서 용어 “자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱(free radical initiated peptide sequencing, FRIPS)”은 기체상에서 펩타이드의 서열을 동정하는 방법으로, 종래에는 일반적으로 다음 과정을 통해 펩타이드 서열을 동정하였다: (a) 펩타이드 또는 단백질의 N-말단에 자유 라디칼 개시제를 컨쥬게이션 하고, (b) 컨쥬게이션된 펩타이드 또는 단백질은 질량분석기에 전기분무를 한 다음, (c) 1차 충돌을 통해 라디칼 종을 얻고, (d) 2차 충돌로 상기 라디칼 종을 해리하여 단편 이온들을 생성하여, 얻어진 단편 이온들을 일반적인 질량분석 기술을 통해 분석함으로써 펩타이드의 서열을 동정한다. 즉, 종래에는 분석 대상의 펩타이드 N-말단에 컨쥬게이션된 자유라디칼 개시제를 균일 분해(homolytic cleavage)하는 펩타이드 라디칼 생성 단계(1차 충돌) 및 생성된 라디칼로부터 이온 단편을 생성하는 절편화 단계(2차 충돌)에 각각의 충돌화 에너지 부하가 필요하였다.

[0024]

본 명세서에서 용어 “음이온화(negative ionization)”는 양으로 대전(positively-charged)되거나 대전되지 않은(non-ionic) 펩타이드가 음이온을 띠도록 양성자(proton)를 제거하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명의 단계 (b)에서의 음이온화는 펩타이드의 아미노산 잔기를 단일 탈수소화(single-deprotonation)하여 이루어진다.

[0025]

펩타이드를 음이온화하는 단계는 예를 들어, pH 7 이상의 염기성 유기 용매를 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 분자 내 양성자성 수소(Protic H)를 제거하는 방법으로서 당업계에 알려진 모든 방법에 의해 실시될 수 있다.

[0026]

본 발명에서 펩타이드 서열을 동정하기 위해서는 상기 단계 (a)와 같이 본 발명의 화합물을 펩타이드와 컨쥬게이션 해야 한다. 본 발명의 화합물은 이후 충돌 활성화에 의하여 펩타이드와 균일 분해를 일으키면서 이탈되어, 홀전자를 가진 펩타이드 라디칼을 생성한다.

[0027]

본 발명의 화학식 1의 화합물을 정의함에 있어서, 용어 “아릴”은 본 명세서에서 용어 “아릴”은 전체적으로 또는 부분적으로 불포화되고 방향성(aromaticity)를 가지는 치환 또는 비치환된 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄소 고리를 의미한다. C₆-C₁₀ 아릴은 탄소수 6 내지 10의 방향성 고리를 의미하며, C₆-C₁₀ 아릴이 치환된 클릭

치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

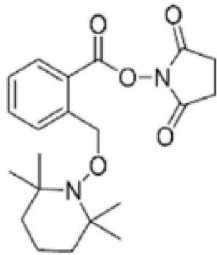
- [0028] 본 발명의 화학식 1의 화합물을 정의함에 있어서, 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸 또는 헥실 등을 포함한다. C_1 - C_4 알킬은 탄소수 1 내지 4의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C_1 - C_4 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.
- [0029] 본 발명의 화학식 1의 화합물을 정의함에 있어서, 용어 “ C_6 - C_{10} 아릴 C_1 - C_4 알킬”은 C_6 - C_{10} 아릴로 치환된 C_1 - C_4 알킬기를 의미한다. 다시 말해서, R_1 이 C_6 - C_{10} 아릴 C_1 - C_4 알킬인 경우는 본 발명의 화학식 1의 카르보닐 탄소, C_6 - C_{10} 아릴, C_1 - C_4 알킬 및 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)기 순서대로 결합되어 있음을 의미한다.
- [0030] 후술하는 바와 같이, 본 발명의 화학식 1의 화합물과 분석하고자 하는 펩타이드 간의 컨쥬게이션 반응은 친핵성 치환반응이므로, 본 발명의 화학식 1의 R_2 는 친핵체가 카르보닐기와 반응할 시 다시 카르보닐기의 탄소-산소 간 이중결합이 잘 회복되도록 이탈될 수 있는 작용기여야 한다. 따라서, R_2 는 친핵성 치환반응의 좋은 이탈기(good leaving group)라면 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 2,5-디옥소-1-피롤리딘옥시, 2,5-디옥소-3-설폰-1-피롤리딘옥시, 2,3,4,5,6-헵타플루오로페녹시, 4-설폰-2,3,5,6-테트라플루오로페녹시, 할라이드 또는 아자이드이고, 가장 바람직하게는 2,5-디옥소-1-피롤리딘옥시이다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (a)는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 펩타이드 N-말단의 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 아민 그룹에 컨쥬게이션하여 이루어진다. 컨쥬게이션 단계는 펩타이드의 아미노 또는 아민기 중 비공유 전자쌍을 가지는 질소원자가 친핵체가 되어 화학식 1의 카르보닐기와 반응함으로써 아마이드를 생성하는 가아민 반응(aminolysis)을 통해 이루어진다. 따라서, 펩타이드와 상기 화합물의 컨쥬게이션은 친핵성 치환반응을 잘 일어나도록 하는 어떠한 극성 유기 용매 하에서도 실시할 수 있으며, 바람직하게는 디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈, 디클로로메탄, 디메틸설폭시드, 디메틸아세트아미드, 테트라하이드로퓨란 하에서 실시하고, 더욱 바람직하게는 디메틸포름아미드, 디메틸설폭시드, 디메틸아세트아미드 하에서 실시하며, 가장 바람직하게는 디메틸설폭시드 용매 하에서 실시한다. 반응 온도는 상온에서 실시하며, 30분 내지 1시간 동안 반응시키는 것이 가장 바람직하다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (c)는 1회의 충돌 활성화를 통해 이루어진다.
- [0033] 본 발명에 따르면, 본 발명은 음이온 모드에서 충돌 활성화를 시도함으로써 1회의 활성화 에너지의 부하 만으로도 자유라디칼 개시제의 균일분해 및 펩타이드 골격 분해 반응을 완료할 수 있다. 본 발명을 통해서, FRIPS에서 필수적인 단계로 여겨지던 광범위한 펩타이드 이온 절편 생성을 위한 추가적인 직렬 질량 분석 단계가 생략되어 펩타이드 서열 동정을 위한 전체 공정이 크게 간소화 될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 분자 이온 단편은 a^- , c^- , x^- , z^- 및 y^- 형 이온으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 기체 상(gas phase)에서 수행한다.
- [0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (c)-(d)는 질량분석기(mass spectrometer)에서 실시된다. 질량 분석기는 프로테오믹스에 많이 사용되는 화학적, 생물학적 실험기기로, 펩타이드와 같은 고분자 물질을 강한 전자빔, 충돌활성분해법, 적외선 다광자 분해법, 전자포획분해법, 전자전달분해법, 및 자외선 레이저 등으로 단편화시켜 각 이온 단편의 질량을 계산하여 고분자 물질을 동정한다. 질량분석기는 물질을 질량대 전하의 비(m/z)로 측정한다. 질량분석기의 중요한 특징은 질량 분석 상한선(upper mass limit), 투과 효율(transmission) 및 분해능(resolution)으로, 질량분석 상한선은 결정될 수 있는 질량 대 전하의 비(m/z ratio)에서 가장 높은 값을 의미하고, 투과 효율은 이온원으로부터 검출기에 도달하는 이온의 비율을 의미하며, 분해능은 작은 분자량의 차이로도 두 이온을 서로 다른 신호로 구분할 수 있는 능력을 의미한다.
- [0037] 이온원이 다양한 것처럼 질량분석기의 종류 또한 다양한데, 그 종류로는 사중극자 분석기(quadrupole analyzer), 이온 트랩 질량분석기(quadrupole ion trap), 이중 초점 자기 섹터 질량분석기(double-focusing magnetic sector), 비행시간질량분석기(time-of-flight mass spectrometer, TOFMS) 및 푸리에 변환 이온 싸이클로트론 공명 질량분석기(Fourier transform-ion cyclotron resonance)가 있다.

[0038] 이온이 질량분석기에 의해 분리되어 신호를 만들면 이온검출기에서 이를 확인할 수 있다. 이온 검출기의 종류로는 전자 증배관(electron multiplier), 페러데이 컵(Faraday cup), 어레이 검출기(array detector) 및 포톤 증배관(photon multiplier)이 있다.

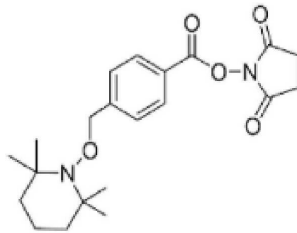
[0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 R_1 은 C_6-C_{10} 아릴메틸이고, R_2 는 2,5-디옥소-1-피롤리딘일옥시이고, 보다 바람직하게는, R_1 은 페닐메틸이다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물이다:

[0040]

화학식 2



화학식 3



[0041]

발명의 효과

[0042] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0043] (a) 본 발명은 분석하고자 하는 펩타이드를 음이온화 함으로써 단 한번의 충돌 활성화만으로 펩타이드 서열의 동정이 가능한 TEMPO-기반 FRIPS(free radical-initiated peptide sequencing) 방법을 제공한다.

[0044] (b) 본 발명은 단일 충돌 활성화 에너지의 부하를 통해 TEMPO 라디칼의 제거 및 펩타이드 골격 절편화가 모두 수행되어, 긴 duty-cycle을 필요로 하던 기존의 FRIPS 방법의 단점을 훌륭하게 극복함으로써, 효율적인 단백질 구조 분석 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 *o*-TEMPO-Bz-안지오텐신 II(DRVYIHPF)의 MS/MS 스펙트럼을 나타낸 그림이다: (a) 단일-탈수소화된 음이온 및 (b) 단일-수소화된 양이온; (c) 음이온 MS^3 스펙트럼; 및 (d) 양이온 MS^3 스펙트럼.

도 2는 *o*-TEMPO-Bz-키네텐신(IARRHPYFL)의 MS/MS 스펙트럼을 나타낸 그림이다: (a) 단일-탈수소화된 음이온 및 (b) 단일-수소화된 양이온; (c) 음이온 MS^3 스펙트럼; 및 (d) 양이온 MS^3 스펙트럼.

도 3은 *o*-TEMPO-Bz-글리코프로테인 IIb 절편(296306)(TDVNGDGRHDL)의 MS/MS 스펙트럼을 나타낸 그림이다: (a) 단일-탈수소화된 음이온 및 (b) 단일-수소화된 양이온; (c) 음이온 MS^3 스펙트럼; 및 (d) 양이온 MS^3 스펙트럼.

도 4는 *o*-TEMPO-Bz-des-Pro²-브래디키닌(RPGFSPFR)의 MS/MS 스펙트럼을 나타낸 그림이다: (a) 단일-탈수소화된 음이온 및 (b) 단일-수소화된 양이온; (c) 음이온 MS^3 스펙트럼; 및 (d) 양이온 MS^3 스펙트럼.

도 5는 23.6(a), 20.0(b), 22.0(c) 및 24.0(d) NCE(Normalized Collision Energy)에서의 키네텐신 음이온에 대한 MS/MS(도 5a) 및 MS^3 질량 스펙트럼(도 5b-5d)을 나타낸 그림이다.

도 6은 4개의 서로 다른 *o*-TEMPO-Bz-C(0)-펩타이드에 대해 NCE를 가해준 후 모이온(parent ion)의 잔여비율(survival fraction)을 나타낸 그림이다; (a)키네텐신, (b)des-Pro²-브래디키닌, (c)안지오텐신 II, (d)글리코프로테인 IIb 절편(290306). 왼쪽의 곡선은 양이온 잔여 분획을, 오른쪽의 곡선은 음이온 잔여 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0047] 실시예**[0048] 실험재료**

[0049] *Ortho*-TEMPOBzNHS는 종래에 보고된 바와 같이 합성하였다[36,37]. 안지오텐신 II(Angiotensin II), 키네텐신(kinetensin), 글리코프로틴 IIb 절편(296306) 및 des-Pro²-브래디키닌(bradykinin)은 상업적으로 구입(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)하여 추가적인 정제 없이 사용하였다.

[0050] 실험방법**[0051] 펩타이드와 *o*-TEMPOBzNHS의 접합**

[0052] DMSO(20 μ L)에 용해시킨 *o*-TEMPOBzNHS (~0.1 mg)용액을 0.1 M NaHCO₃ 완충액에서 분석하고자 하는 펩타이드 용액과 혼합하고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 진공 하에서 용매를 제거하고, 수득한 고형물을 메탄올/물(50:50 v/v, 1 mL)에 용해시켜 20 μ M 용액을 만들어 1-cc OASIS HLB 추출 카트리지(Waters Corp., Milford, MA, USA)에서 통과시켰다. 카트리지는 메탄올/물(50:50 v/v, 1 mL)로 세척하고 추출한 용액을 수집하여 진공 하에서 농축함으로써 얻고자 하는 *o*-TEMPO-Bz-접합 펩타이드를 수득하였다.

[0053] 질량 분광분석

[0054] 질량 분광분석 실험은 양이온 및 음이온 모드에서 이온-트랩 질량분광기(LCQ Deca, Finnigan, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. *o*-TEMPOBz접합 펩타이드는 물/메탄올/아세트산(20 μ M, 49:49:2 v/v/v) 용액에서 희석하였다. 제작한 샘플은 ESI(electrospray ionization)에 3 μ L/min의 유속으로 주입하였다. 접합된 펩타이드 이온을 분리하여 CAD를 이용한 추가적인 직렬 질량분석을 수행하였다. 다음과 같은 질량 분석 파라미터가 이용되었다: ESI 전압, $\pm 4.55.5$ kV; 캐필러리(capillary) 온도, 200°C; 튜브 렌즈 off-set 전압, 0 $\pm$ 30 V 외피 기체 유속 (arb), 20 분리 너비, 23 Da; 캐필러리 전압, ± 3060 V. 스캐닝된 50100의 스펙트럼의 평균을 구하여 ESI 질량 스펙트럼을 구했다.

[0055] 실험결과

[0056] 음이온 모드에서 *o*-TEMPO-Bz-접합 펩타이드의 펩타이드 골격 분해 경향을 조사하기 위하여, 양이온 및 음이온 모드에서 다양한 접합 펩타이드를 대상으로 한 FRIPS 질량분석을 수행하였다.

[0057] MS/MS 펩타이드 골격 분해 경향의 비교

[0058] *o*-TEMPO-Bz-접합 펩타이드의 분석의 예로서, 도 1은 각각 단일-탈수소화된 음이온 및 단일-수소화된 양이온의 *o*-TEMPO-Bz-접합 안지오텐신 II (DRVYIHPF)의 MS/MS 및 MS³ 질량 스펙트럼을 보여준다. 음이온 및 양이온 모드에서의 분해 경향의 차이를 보여주기 위해 탈수소화된 음이온 및 수소화된 양이온에 대한 MS/MS 질량 스펙트럼을 각각 도 1a 및 도 1b에 나타내고, 음이온과 양이온의 MS³ 질량 스펙트럼은 각각 도 1c 및 도 1d에 나타내었다. 도 1 a 및 도 1b에 나타난 스펙트럼은 탈수소화 및 수소화된 접합 펩타이드 이온의 분해 경향의 두드러진 차이를 보여준다. 출동 활성화 하에서, m/z 1319.7, (R M+H)⁺에서 수소화된 분자의 이온(도 1b)은 m/z 1163.7

에서 피크 $[(M+H)^+]$ 를 보였으며, 이는 TEMPO·라디칼기(예를 들어 $(M+H156)^+$)가 분리된 결과 나타난 것이다. 여기서, “M” 좌측의 “R” 및 “r”은 TEMPOBzCO 및 ·BzC(O)가 각각 펩타이드의 N-말단에 결합하였음을 나타낸다. 이전의 연구결과와 마찬가지로[36,37], 펩타이드 골격 분해로 인해 다른 측정 가능한 피크가 나타나지는 않았다. 반면, m/z 1317.7, $(R_{MH})^-$ 에서의 탈수소화된 분자 음이온의 충돌 활성화는 m/z 1161.7에서의 $(r_{MH})^-$ 피크 이외에도 많은 피크가 형성되었다. 대부분의 이들 새로운 피크는 펩타이드 골격 및 TEMPO 산소와 벤질 탄소간 결합이 동시에 끊어지기 때문에 생성된다(도 1a). 펩타이드 골격 절편은 m/z 가 증가하는 순서대로 x_4^- , $r_{a_4}^-$, z_5^- , x_5^- , $r_{a_5}^-$, z_6^- , $r_{a_6}^-$, z_7^- 및 y_7^- 를 포함한다. 특히 주목할 점은 N-말단 절편인 $r_{a_4}^-$, $r_{a_5}^-$ 및 $r_{a_6}^-$ 가 원래의 TEMPOBz접합기가 아닌 벤질기(BzC(O))를 포함한다는 것이다. 이들 절편은 연속적인 두 단계에 의해 잘 형성된다. 우선, 접합 펩타이드로부터 TEMPO기가 균일 분해되어 BzC(O)펩타이드를 형성하고, 이어서 BzC(O)펩타이드 라디칼 음이온이 추가적인 충돌 활성화 없이 펩타이드 골격 분해를 하였다. 펩타이드 골격 절편을 관찰하기 위해 수소화된 양이온에 있어서 두 번의 연속적인 충돌 활성화가 필요한 반면, 음이온 모드에서 이들 두 단계가 한번의 직렬 질량분석 단계를 통해 이루어진다는 것은 매우 놀라운 발견이다.

[0059] 도 1a에 나타난 펩타이드 골격 절편의 조사 결과는 y -형이 소수이고 a^- , x^- 및 z^- 형 이온이 주요 형태임을 보여준다. 이러한 결과는 a^- , c^- , x^- 및 z^- 형 이온의 형성이 주요 절편화 과정임을 보여준 이전의 양이온-모드 MS^3 FRIPS 결과와 일치하는 것이다[36, 37]. FRIPS MS에서 a^- , c^- , x^- 및 z^- 형 이온의 형성 기작은 라디칼-유도 경로를 따를 것이라 예상된 바 있다[36]. 아울러 주목할 만한 점은 측쇄의 상실에 의한 몇몇 피크[예를 들어 아스파르트산(59 Da) 및 히스티딘(67 Da)]은 이전의 양이온 모드 MS^3 FRIPS 결과의 두드러진 특징이라는 점이다. 상술한 a^- , x^- 및 z^- 형 이온의 주된 생성 및 측쇄의 상실이라는 두가지 특징은 라디칼 유도 펩타이드 골격 분해가 o-TEMPOBz접합 안지오텐신 II의 음이온 모드 MS/MS에서 중요한 역할을 한다는 증거를 제공한다[40].

[0060] 도 1c 및 도 1d는 각각 탈수소화 및 수소화된 ·BzC(O)펩타이드 이온에 대한 충돌 활성화에 의해 얻어진 MS^3 결과를 나타내며, 이들은 접합 분자 이온에서 TEMPO기가 이탈함으로써 형성된 것이다. 예상한 바 대로, 이들 두 질량 분광은 많은 펩타이드 골격 절편을 보여주었으며, a^- , x^- 및 z^- 형 이온들이 주요 절편-이온 형태였다. 특정 절편 및 그 양에 있어 몇몇 차이는 있었지만, 음이온-모드 MS^3 결과(도 1c)는 양이온-모드 FRIPS 결과만큼이나 펩타이드 이온의 시퀀싱에도 효과적이었다(도 1d).

[0061] 음이온 FRIPS에서의 다른 펩타이드

[0062] 양이온-및 음이온 모드에서의 분해 경향의 차이가 일반적인 현상인지를 조사하기 위해, 본 발명자들은 몇몇 다른 o-TEMPOBzC(O)펩타이드를 MS/MS 및 MS^3 로 분석하였다

[0063] 도 2 내지 4는 각각 접합 키네티신(IARRHPYFL), 글리코프로테인 II Ib 절편(290306)(TDVNGDGRHDL) 및 des-Pro2-브래디키닌(RPGFSPFR)에 대한 MS/MS 및 MS^3 스펙트럼을 보여준다. 비교를 위해 도 2 내지 4의 MS/MS 및 MS^3 스펙트럼은 도 1에서와 같은 순서로 나열하였다. 음이온 모드에서 o-TEMPOBz접합 펩타이드는 모두 펩타이드 골격 절편을 생성시킨 반면, 양이온 접합 펩타이드에서는 TEMPO 라디칼이 분리되었을 뿐이다(도 2, 도 3, 도 4a 및 4 b). 도 1 a에서와 같이, a^- , c^- , x^- 및 z^- 형 이온이 도 2, 도 3 및 도 4 a에서도 주요 절편이온 형태였다. 측쇄가 분리된 분자량에 상응하는 많은 피크들도 함께 관찰되었다: 티로신(106 Da), 아르기닌(86 및 99 Da)(도 2a), 아스파르트산(45 da), 히스티딘(67 및 81 Da), 아르기닌(86 Da)(도 3a), 세린(30 Da), 아르기닌(43, 72, 86 및 99 Da)(도 4a). 따라서, 음이온 MS/MS 분해 경향은 많은 양의 펩타이드 골격 절편을 생성하며 측쇄 분리가 일어난다는 점에서 양이온의 경우와 확연히 구별된다.

[0064] 다른 한편, 이들 세 개의 접합 펩타이드 음이온에 대한 MS^3 질량 분석은 a^- , c^- , x^- , 및 z^- 형 이온과 같은 라디칼-유도 펩타이드 골격 절편을 생성하고, 유의한 수준의 측쇄 손실을 보여주었다는 점에서 양이온의 경우와 매우 유사한 분해 패턴을 보여주었다(도 2, 도 3, 도 4c 및 4d). 이 시점에서, MS/MS 스펙트럼과 MS^3 질량 스펙트럼을 비교하는 것은 유용할 것이다. 이를 위해, 각각 다른 표준 충돌 에너지(normalized collision energy,

NCE)에서의 탈수소화된 음이온에 대한 MS³ 질량 스펙트럼을 획득하였다. 도 5는 23.6(도 5a), 20.0(도 5b), 22.0(도 5c) 및 24.0(도 5d) NCE에서의 키네텨신 음이온에 대한 MS/MS(도 5a) 및 MS³ 질량 스펙트럼(도 5b-5d)을 나타낸다. 도 5a 및 도 5b의 스펙트럼은, 몇몇 불일치점이 있으나, 절편 이온족과 이들의 양에 있어 매우 유사한 패턴을 보여주었다. 이러한 결과는 도 5a의 MS/MS 질량 스펙트럼이 MS/MS만이 적용되었음에도 불구하고 MS³에서 나타난 생성물을 포함하고 있음을 보여준다. 다시 말해서, 23.6 NCE에서의 MS/MS로 얻은 열에너지가 TEMPO 라디칼을 분해하여 BzC(O)키네텨신을 생성하였으며, 남은 열에너지가 펩타이드를 절편화한 것이다; 그러나, 전반적인 펩타이드 골격 절편화 패턴은 20.0 NCE에서의 MS³의 그것과 매우 유사했다.

[0065]

도 5c 및 5d는 MS³에서 가해진 NCE 값이 증가할수록 몇몇 절편 피크의 상대적인 양도 증가함을 보여준다. 예를 들어, 도 5c 및 5d에서 z₅⁻, r₆⁻, r₇⁻, z₈⁻ 및 r₈⁻ p가 주로 나타났다. 나아가, y₄⁻, x₄⁻, c₄⁻, b₅⁻, y₆⁻, b₇⁻ 및 y₈⁻와 같은 몇몇 절편들은 24.0 NCE의 MS/MS 스펙트럼에서 나타나지 않았다. 다른 펩타이드들에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었다(데이터 없음).

[0066]

분해 에너지론

[0067]

본 발명자들은 MS/MS FRIPS의 음이온 및 양이온 모드에서 다른 양상을 보이는 원인에 대해 알아보려고 하였다. 우선, 본 발명자들은 MS/MS 및 MS³에서의 양이온 및 음이온 모드의 o-TEMPO-Bz-펩타이드 분해 에너지를 비교하였다. 도 6은 4개의 서로 다른 o-TEMPO-Bz-C(O)-펩타이드인 (a)키네텨신, (b)des-Pro2-브래디키닌, (c)안지오텨신 II, (d)글리코프로테인 IIb 절편(290306)에 대해 NCE를 가해진 후 모이온(parent ion)의 잔여비율(survival fraction)(식 1)을 나타낸 그림이다.

[0068]

식 1

$$\text{Survival fraction} = \frac{\text{The ion abundance of the precursor ions}}{\text{Total ion abundances of the precursor and fragments}}$$

[0069]

[0070]

도 6에 나타난 곡선(좌측)은 MS/MS 및 MS³로 획득한 양이온 잔여비율을 나타내고, 우측에 음이온 잔여비율 값을 나타내었다. 대표적인 예로서, 단일 전하를 가진 키네텨신 이온의 잔여비율을 도 6a에 나타내었다. 양이온에 있어서, TEMPO 라디칼의 제거(예를 들어 MS/MS)는 비교적 낮은 NCE 값에서 일어난다. NCE_{1/2} 즉, o-TEMPOBzC(O)키네텨신 모분자의 50% 분해를 일으키는 NCE 값은 19.6(임의 단위)이다. 한편, MS₃(예를 들어 생성된 BzC(O)키네텨신 라디칼 이온을 펩타이드 골격 절편으로 분해하는 2차 충돌 활성화 과정)에 요구되는 NCE 값은 1차 충돌 활성화 과정의 그것(NCE_{1/2}= 22.1)보다 매우 높았다. 1차 및 2차 충돌 활성화 과정 동안의 단일 수소화된 키네텨신 이온에 대한 분해 반응은 다음과 같이 이해될 수 있다. 1차 활성화 단계에서 제공된 충돌 에너지(예를 들어 19.6 NCE) 중 상당 부분이 TEMPO 산소와 벤질 탄소 간의 결합을 끊는 데 소모된다. 이 결합이 끊어진 후, 일부 에너지가 떨어진 두 작용기(예를 들어 TEMPO 및 BzC(O)키네텨신)의 병진 에너지(translational energy)로 전이된다. 그 결과, 분해된 BzC(O)키네텨신 이온은 추가적인 펩타이드 골격 절편화를 유도하기 위한 충분한 에너지가 부족해진다. 이러한 이유로, 양이온 FRIPS에 있어서 펩타이드 골격 절편화를 위해 두 번의 별개 충돌 활성화 단계가 필요하다. 다른 한편, 음이온에 있어서는, 1차 충돌 활성화 단계(예를 들어 MS/MS)가 일반적으로 1차 충돌 활성화 단계보다 높은 NCE 값을 필요로 한다. 예를 들어, 단일 탈수소화된 o-TEMPOBzC(O)-키네텨신의 MS/MS에서 NCE_{1/2}는 23.1임에 반해, MS₃ 과정에서 BzC(O)브래디키닌의 연속적인 펩타이드 골격 분해는 22.2의 NCE_{1/2} 값이 소모된다. 음이온 MS/MS에서 요구되는 NCE 값은 양이온 모드에서의 NCE_{1/2} 값보다도 유의하게 높다. 2차 충돌 활성화 과정에서의 음이온 에너지 필요량이 1차 충돌 활성화 과정보다 낮기 때문에, TEMPO 제거 후의 잔여 열에너지는 추가적인 펩타이드 골격 절편화를 위해 충분한 양이다. 이러한 경향은 키네텨신의 경우만큼 명확하지는 않지만 도 6에 나타난 나머지 세 개의 펩타이드인 (b) des-Pro2-브래디키닌, (c) 안지오텨신 II 및 (d) 글리코프로테인 IIb 절편(296306)에서도 나타났다.

[0071]

요약하자면, 음이온 모드의 MS/MS 과정에서 상대적으로 높은 에너지 필요량이 단일 충돌 활성화만으로 FRIPS-매

개 펩타이드 골격 절편화를 가능하게 하는 반면, 양이온 FRIPS에서는 양이온 모드의 1차 충돌 활성화 과정에서의 상대적으로 낮은 에너지 필요량으로 인해 결과적으로 두 번의 연속적인 충돌 활성화가 필요하게 되는 것이다.

[0072] 결 론

[0073] 음이온 모드에서, 자유 라디칼로 개시된 펩타이드 시퀀싱(FRIPS)은 단일 MS/MS 과정을 통해 성공적으로 수행되었다. 음이온 모드에서의 MS/MS 펩타이드 골격 분해 경향은 양이온 모드에서의 그것과, 후자가 두 번의 별개의 연속적인 충돌 활성화를 필요로 한다는 점에서 차이가 났다. 두 개의 반대 이온에서의 상이한 분해 경향은 MS/MS 및 MS₃의 분해 에너지론으로 설명될 수 있다. 음이온 모드에서, MS₃에 요구되는 에너지는 MS/MS의 그것과 동일하거나 낮은 것으로 밝혀졌다. 따라서, 충분한 충돌 에너지가 o-TEMPO-Bz-C(O)-펩타이드에 전달되면, 균일분해 반응이 쉽게 진행되어 BzC(O)펩타이드를 생성한다. 라디칼 생성반응 후, 추가적인 충돌 활성화 없이 라디칼-유도 펩타이드 골격 분해 반응이 일어난다. 반면, 양이온 모드에서는 MS₃에 요구되는 에너지가 MS/MS에 비하여 훨씬 높다. 이러한 이유로 인해, 펩타이드 시퀀싱을 위해 두 개의 별개 CAD가 요구된다.

[0074] 참고문헌

- [0075] 1. Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, *120*, 3265.
- [0076] 2. Zubarev, R. A.; Horn, D. M.; Fridriksson, E. K.; Kelleher, N. L.; Kruger, N. A.; Lewis, M. A.; Carpenter, B. K.; McLafferty, F. W. *Anal. Chem.* 2000, *72*, 563.
- [0077] 3. Oh, H. B.; Breuker, K.; Sze, S. K.; Ying, G.; Carpenter, B. K.; McLafferty, F. W. *Proc.Nat' l.Acad.Sci.U.S.A.* 2002, *99*, 15863.
- [0078] 4. Zubarev, R. A. *MassSpectrom.Rev.* 2003, *22*, 57.
- [0079] 5. Ture, F. Syrstad, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 3353.
- [0080] 6. Cooper, H. J.; H, K.; Marshall, A. G. *Mass Spectrom. Rev.* 2005, *24*, 201.
- [0081] 7. Syka, J. E.; Coon, J. J.; Schoeder, M. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. *Proc.Nat' l.Acad.Sci.U.S.A.* 2004, *101*, 9528.
- [0082] 8. Coon, J. J.; Syka, J. E.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. *Biotechniques* 2005, *38*, 519.
- [0083] 9. Budnik, B. A.; Haselman, K. F.; Elkin, Y. N.; Gorbach, V. I.; Zubarev, R. A. *Anal.Chem.* 2003, *75*, 5994-6001.
- [0084] 10. Yoo, H. J.; Liu, H.; H, K. *Anal. Chem.* 2007, *79*, 7858-7899.
- [0085] 11. Budnik, B. A.; Haselmann, K. F.; Zubarev, R. A. *Chem.Phys.Lett.* 2001, *342*, 299-302.
- [0086] 12. Wolff, J. J.; Chi, L.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Anal.Chem.* 2007, *79*, 2015-2022.
- [0087] 13. Oh, H. B.; Leach, F. E. III; Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Venot, A.; Boons, G.-J.; Amster, I. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011, *22*, 582-590.
- [0088] 14. Yang, J.; Mo, J. T.; H, K. *Anal. Chem.* 2005, *77*, 1876.
- [0089] 15. Chu, I. K.; Rodriguez, C. F.; Lau, T. C.; Hopkinson, A. C.; Siu, K. W. M. *J. Phys. Chem. B* 2000, *104*, 3393.
- [0090] 16. Barlow, C. K.; McFadyen, W. D.; O' Hair, R. A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 6109-6115.
- [0091] 17. Chu, I. K.; Zhao, J.; Xu, M.; Siu, S. O.; Hopkinson, A. C.; Siu, K. W. M. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, *130*, 7862-7872.
- [0092] 18. Siu, C. K.; Zhao, J.; Laskin, J.; Chu, C. K.; Hopkinson, A. C.; Siu, K. W. M.

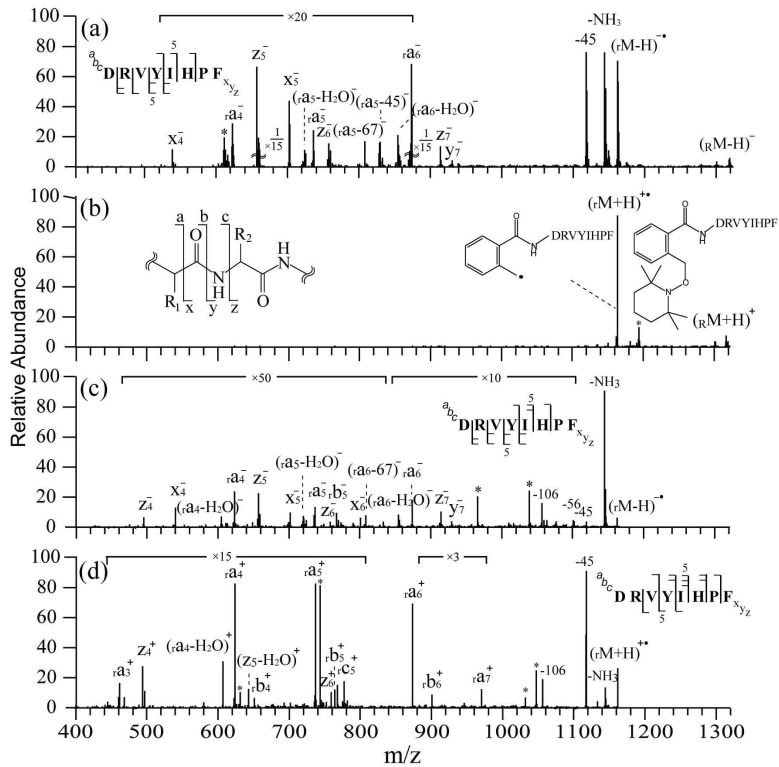
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009, 20, 996-1005.

- [0093] 19. Viehe, H. G.; Janousek, Z.; Mers, R. *Acc. Chem. Res.* 1985, 18, 148-154.
- [0094] 20. Ng, D. C. M.; Song, T.; Siu, S. O.; Siu, C. K.; Laskin, J.; Chu, I. K. *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 2270-2280.
- [0095] 21. Song, T.; Ng, D. C. M.; Quan, Q.; Siu, C.-K.; Chu, I. K. *Chem. Asian J.* 2011, 6, 888-898.
- [0096] 22. Sun, Q.; Nelson, H.; Ly, T.; Stoltz, B. M.; Julian, R. R. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 958-966.
- [0097] 23. Ly, T.; Julian, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 351-358.
- [0098] 24. Ly, T.; Julian, R. R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20, 1148-1158.
- [0099] 25. Ly, T.; Julian, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 8602-8609.
- [0100] 26. Joly, L.; Antoine, R.; Allouche, A. R.; Dugourd, P. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13832-13833.
- [0101] 27. Larraillet, V.; Antoine, P.; Dugourd, P.; Lemoine, J. *Anal. Chem.* 2009, 81, 8410-8416.
- [0102] 28. Brunet, C.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Canon, F.; Giuliani, A.; Nahon, L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012, 23, 274-281.
- [0103] 29. Masterson, D. S.; Yin, H.; Chacon, A.; Hachey, D. L.; Norris, J. L.; Porter, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 720-721.
- [0104] 30. Chacon, A.; Masterson, D. S.; Yin, H.; Liebler, D. C.; Porter, N. A. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 6213-6222.
- [0105] 31. Yin, H.; Chacon, A.; Porter, N. A.; Masterson, D. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18, 807-816.
- [0106] 32. Hodyss, R.; Cox, H. A.; Beauchamp, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12436-12437.
- [0107] 33. Hao, G.; Gross, S. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006, 17, 1725-1730.
- [0108] 34. Zhao, J.; Siu, K. W. M.; Hopkinson, A. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008, 10, 281-288.
- [0109] 35. Ryzhov, V.; Lam, A. K. Y.; O' Hair, R. A. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20, 985-995.
- [0110] 36. Lee, M.; Kang, M.; Moon, B.; Oh, H. B. *Analyst* 2009, 134, 1706-1712.
- [0111] 37. M. Lee, M.; Lee, Y.; Kang, M.; Park, H.; Seong, Y.; Sung, B. J.; Moon, B.; Oh, H. B. *J. Mass Spectrom.* 2011, 46, 830-839.
- [0112] 38. Bowie, J. H.; Brinkworth, C. S.; Dua, S. *Mass Spectrom. Rev.* 2002, 21, 87-107.
- [0113] 39. Wang, T.; Nha, T. T.; Calabrese, A. N.; Bowie, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, 1832-1840.
- [0114] 40. Laskin, J.; Yang, Z.; Lam, C.; Chu, I. K. *Anal. Chem.* 2007, 79, 6607-6614.

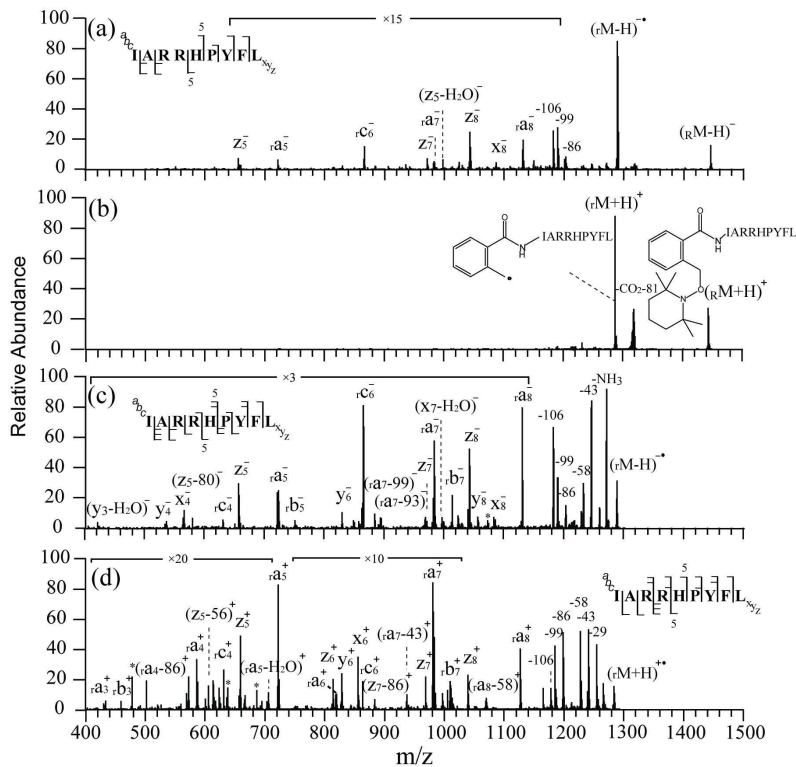
[0115] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

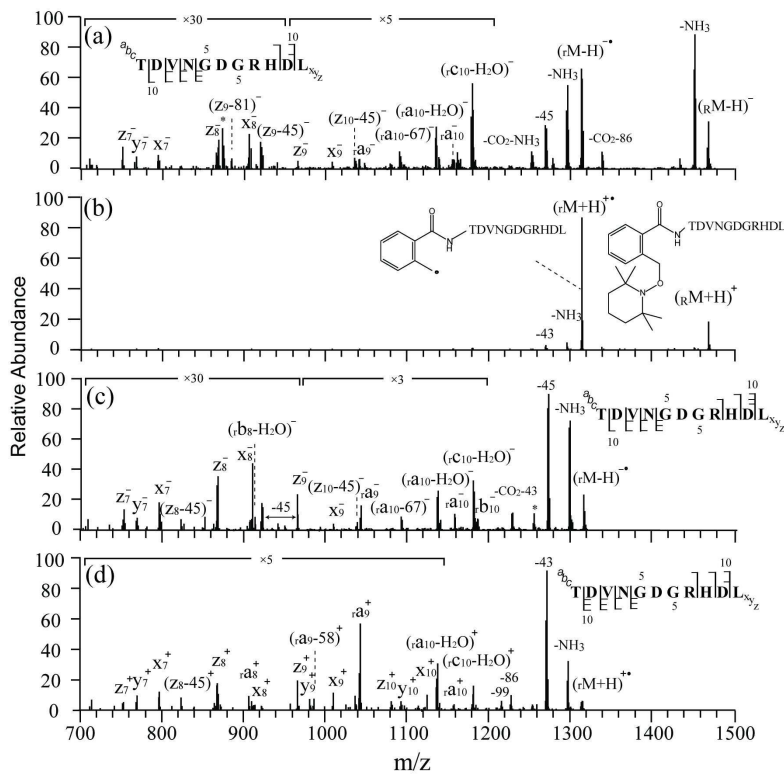
도면1



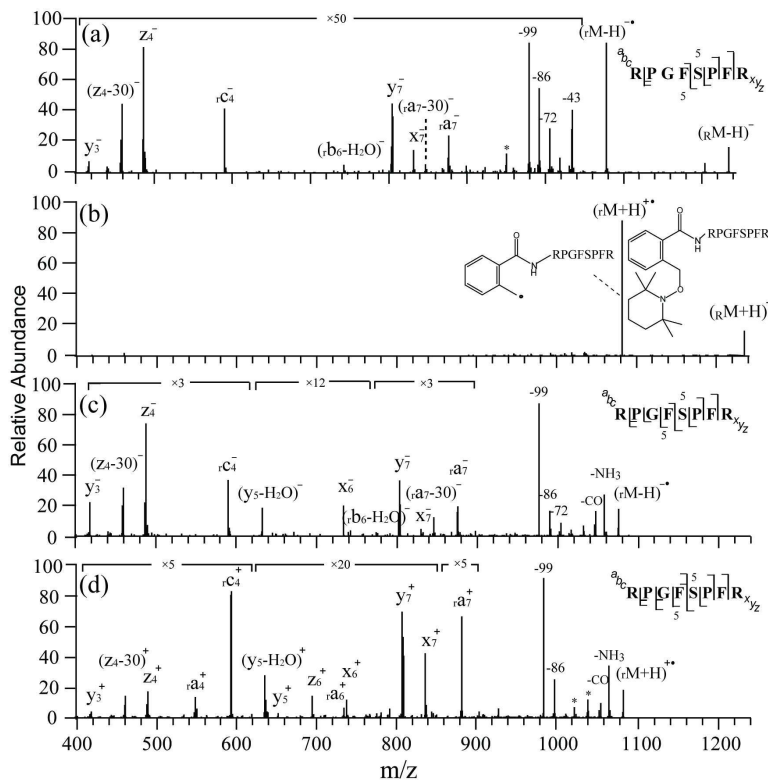
도면2



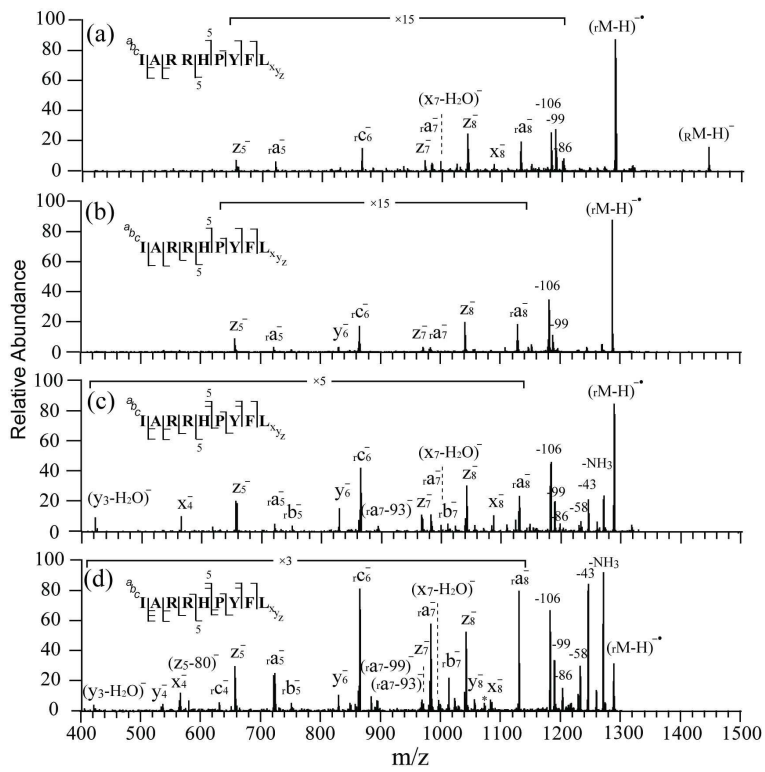
도면3



도면4



도면5



도면6

