



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0112457
(43) 공개일자 2016년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6848 (2013.01)
C07K 1/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0038222
(22) 출원일자 2015년03월19일
심사청구일자 2015년03월19일

(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

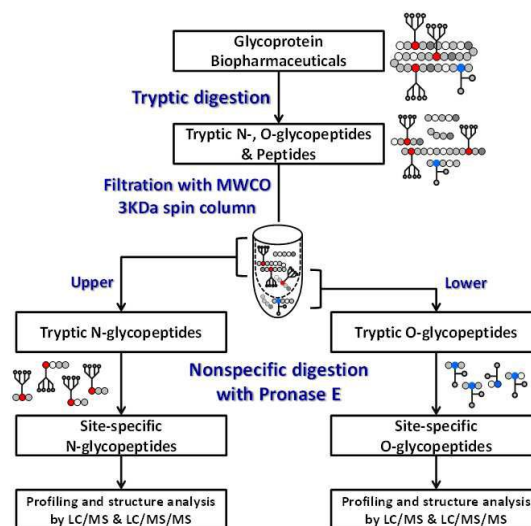
전체 청구항 수 : 총 16 항

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

(57) 요약

본 발명은 당단백질에서 당사슬 다양성을 포함한 당자리 위치를 확인하고 분석하는 방법에 관한 것으로서, 좀 더 자세히는 바이오의약품 등으로 이용되는 당단백질을 단백질 분해효소를 이용하여 N-당펩타이드와 O-당펩타이드로 분리할 수 있는 분석법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 다중화 분해효소를 처리하고 및 특정 분자량 추출법(Molecular Weight Cut Off filtration)을 이용하여 당펩타이드를 생성하고, 이를 분리하여 N-당펩타이드와 O-당펩타이드의 동시 분석이 가능하며, 인접한 당자리도 완벽히 분리하여 확인할 수 있다. 본 발명의 분석방법에 따라 얻어진 결과를 이용하여 당단백질 의약품에서 당자리에 따른 당사슬의 조성 및 정량정보를 나타내는 당단백질 의약품의 2D 도식도를 제작할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 1/34 (2013.01)

G01N 33/15 (2013.01)

(72) 발명자

오명진

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

서영숙

전라북도 전주시 완산구 거마산2길 7-11, 1층

서나리

경기도 군포시 산본로 210-1, 나동 102호(
새한연립)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A9B6075933

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 당단백질 의약품의 당 변이체 특성분석 및 당 분석과학기술법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.11.20 ~ 2015.11.19이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A6A9067028

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 연구장비엔지니어양성사업

연구과제명 연구장비 전문교육기관 지원

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 당단백질에 대하여 트립신을 처리하는 단계;
- b) 트립신 처리로 얻어진 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리하는 단계;
- c) 분리된 N-당펩타이드와 O-당펩타이드 각각에 대해 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드를 분획하는 단계; 및
- d) 분획된 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드에 대하여 각각 질량분석하는 단계;를 포함하는 당단백질의 부위-특이적 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 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 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 b) 단계는 분획분자량 여과(Molecular weight cut-off filtration)로 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 분획분자량 여과는 막 스핀 컬럼을 이용하여 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계의 비특이적 단백질 분해효소는 엘라스테이스 (elastase), 파파인 (papain), 펩신 (pepsin), 프로네이즈 (pronase), 프로티네이즈 K (proteinase K), 섭틸리신 (subtilisin) 및 써모라이신 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계 이후 d) 단계 이전에 분획한 각 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드에 대하여 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 이용한 고체상 추출을 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 d)의 질량분석은 액체크로마토그래피 질량분석임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 9

a) 당단백질에 대하여 트립신을 처리하는 단계;

b) 트립신 처리로 얻어진 N-당펩타이드에 대해 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 부위-특이적 N-당펩타이드를 분획하는 단계; 및

c) 분획된 부위-특이적 N-당펩타이드에 대하여 각각 질량분석하는 단계;를 포함하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

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

청구항 11

청구항 9에 있어서,

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

청구항 12

청구항 9에 있어서,

상기 b) 단계의 비특이적 단백질 분해효소는 엘라스테이스 (elastase), 파파인 (papain), 펩신 (pepsin), 프로네이스 (pronase), 프로테이네이스 K (proteinase K), 썬틸리신 (subtilisin) 및 썬모라이신 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서,

상기 b) 단계 이후 c) 단계 이전에 분획한 각 부위-특이적 N-당펩타이드에 대하여 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 이용한 고체상 추출을 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 14

청구항 9에 있어서,

상기 c)의 질량분석은 액체크로마토그래피 질량분석임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법.

청구항 15

- a) 당단백질에 대하여 트립신을 처리하는 단계;
- b) 트립신 처리로 얻어진 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리하는 단계;
- c) 분리된 N-당펩타이드와 O-당펩타이드 각각에 대해 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드를 분획하는 단계;
- d) 분획된 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드에 대하여 각각 질량분석하는 단계; 및
- e) 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드의 질량분석 결과를 근거로 당단백질에 대한 당사슬 지도를 구축하는 방법.

청구항 16

- a) 당단백질에 대하여 트립신을 처리하는 단계;
- b) 트립신 처리로 얻어진 N-당펩타이드에 대해 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 부위-특이적 N-당펩타이드를 분획하는 단계;
- c) 분획된 부위-특이적 N-당펩타이드에 대하여 각각 질량분석하는 단계; 및
- d) 부위-특이적 N-당펩타이드의 질량분석 결과를 근거로 당단백질에 대한 당사슬 지도를 구축하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것으로서, 좀 더 자세히는 바이오의약품 등으로 이용되는 당단백질을 단백질 분해효소를 이용하여 N-당펩타이드와 O-당펩타이드로 분리하여 부위-특이적 당펩타이드 생성이 가능하고, 당단백질 의약품에서 당자리에 따른 당사슬의 조성 및 정량정보를 나타내는 당단백질 의약품의 2D 도식도를 제작할 수 있다.

배경 기술

[0002] 당쇄화(Glycosylation)는 단백질 번역 후 변형과정(Posttranslational modification)에 속하며 단백질의 기능을 결정하는 중요한 요소로서, 생화학적 환경에 매우 민감하게 반응하여 당사슬의 분해 및 합성 효소들의 경쟁에 의해 진행된다. 또한, 당쇄화는 하나의 당자리에 여러 종류의 당사슬이 결합되는 당사슬의 다양성(Glycan heterogeneity)을 가지게 된다. 또한 당단백질의 당사슬은 N-당사슬 또는 N-과 O-당사슬을 동시에 가지고 있다(도 1).

[0003] 당사슬(Glycan)은 크게 N-당사슬과 O-당사슬로 나눌 수 있는데 그 중에서 N-당사슬은 아스파라긴(asparagine)에 결합되어 있고 2개의 GlcNAc (N-Acetylglucosamine)와 3개의 만노스(Mannose)로 이루어진 코어를 가진다. N-당사슬은 이러한 코어를 기준으로 전형적인 구조를 형성하고 있고, PNGase F(peptide N-glycosidase F)라는 N-당사슬만을 선택적으로 분리할 수 있는 특이적 효소가 존재한다. O-당사슬은 세린(serine)이나 트레오닌

(threonine)에 결합되어 있으며 N-당사슬과는 다르게 1종이 아닌 8종의 코어를 가진다.

[0004] 바이오 의약품산업의 세계시장 규모는 2013년 기준 1,350억 달러에 달하는 고부가가치사업이며 이중 약 70%는 당단백질 의약품으로 치료용 항체, 조혈인자(erythropoietin, EPO), 인터페론, 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte-colony stimulating factor; G-CSF), 난포자극호르몬, 효소치료제 등이 있다. 당단백질 바이오의약품의 당사슬 성분과 구조가 인체에서 생성된 것과 다를 경우 치료 효능, 체내 지속성 및 조직 분포가 달라지는 등 약효 및 안정성 등에 크게 영향을 미치므로 당사슬의 정확한 특성 분석이 필요하다. 예컨대 당단백질 의약품 중 치료용 항체에서의 당사슬은 암세포 사멸을 유도하는 항체 의존성 세포 매개성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)과 보체 의존적 독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 반응에 관여한다. 또한, 신장병 환자의 적혈구 생성을 돕는 조혈인자(erythropoietin, EPO)의 경우 높은 시알산의 함량은 생체 내에서 반감기를 늘려주어 약효의 효능을 더욱 길게 하는 효과가 있다.

[0005] 유전자 재조합 기술을 이용하여 단백질을 대량생산하는 과정에서 생산 속도에 의해 당사슬이 달라질 수 있으며 비균질한 당사슬에 의해 치료 효능, 체내 지속성, 타겟팅 및 면역반응 등의 품질에 문제가 생길 수 있다. 따라서 국제 수준의 ICH(International Conference on Harmonization) 가이드라인에서는 당단백질 의약품에 부착된 당사슬의 비균질성을 규명하고, 각 일회 생산분(batch)마다 재현성 있게 생산된다는 것을 증명하도록 요구하고 있다. 특히 당단백질 바이오의약품에서 당쇄화가 가능한 당자리는 하나 이상 존재하게 된다. 예컨대 당단백질 바이오의약품 중 항체의약품의 경우 하나의 N-당쇄화 자리가 있으며, 효소치료제의 경우 여러 개의 N-당쇄화 자리, EPO 의약품의 경우 여러 개의 N-당쇄화 자리와 O-당쇄화 자리가 있다. 각 당쇄화 자리마다 결합된 당사슬의 조성과 양은 재현성 있게 생산되어야 하지만 의약품 생산 세포주, 배양 온도, pH 등 배양환경에 따라 차이가 발생할 수 있다. 또한 오리지널 의약품과 동일한 약품을 생산하고자 하는 바이오시밀러의 개발 및 생산에 있어서도 당쇄화 자리마다 당사슬이 동일하게 생산되어야 한다.

[0006] 당자리에 따른 당쇄화의 유사성을 정확하게 분석하는 것은 매우 중요하지만, 각 당자리에 따른 당펩타이드를 분리 분석할 수 있는 분석법은 제한되어 있는 상태이다. 현재 당자리 확인을 위해 가장 많이 이용되는 분석법은 프로테오믹스 기반의 간접적인 N-당자리 확인법이다. 간접적인 방법이라 함은 단백질 분해효소인 트립신과 N-당사슬 분해효소인 PNGase F를 사용하여 당사슬이 결합된 펩타이드에서 N-당사슬을 제거할 경우, 당자리 아스파라긴(Asparagine)이 아스파르트산(Aspartic acid)으로 변경되며 1Da의 질량값 차이로 당자리를 확인할 수 있는 방법이다. 이 방법으로는 N-당사슬이 존재했던 위치만 확인될 뿐 각각의 당자리에 발생된 당사슬 조성, 정량정보 및 구조 확인은 불가능하며, 더욱이 O-당자리에 대한 확인이 불가능하다(ref. *J. Mass Spectrom.* 2007; 42: 370379).

[0007] 한편 트립신을 이용하여 라이신 잔기, 아르기닌 잔기를 절단하여 당펩타이드를 직접생산하여 분석하는 경우 하나의 당펩타이드에 여러 개의 당자리가 존재하는 경우는 직접적인 당자리와 그에 따른 당사슬의 다양성을 확인할 수 없는 제한이 있다(ref. *Anal Bioanal Chem*, 2014; 406:6265-6274). 또한, N-당쇄화와 O-당쇄화가 동시에 이루어진 당단백질 의약품의 경우 O-당펩타이드와 N-당펩타이드를 동시에 분석하는 경우 당쇄화된 양 및 이온화 효율에 따라 질량분석시 상호 억제이 일어날 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명은 다중 당자리를 함유한, 특히 N-과 O-당자리를 동시에 포함하고 있는 당단백질에서 당자리 특이적 당펩타이드의 생성 방법을 제공하려는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 화학적 성질이 다른 N- 및 O-당펩타이드를 간단한 방법으로 분리 및 분석하는 방법을 제공하려는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 각 당단백질의 전체 당사슬 지도를 간단히 구축하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은

[0012] a) 당단백질에 대하여 트립신을 처리하는 단계;

- [0013] b) 트립신 처리로 얻어진 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리하는 단계;
- [0014] c) 분리된 N-당펩타이드와 O-당펩타이드 각각에 대해 비특이적 단백질 분해효소를 처리하고 각 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분획하는 단계; 및
- [0015] d) 분획하여 얻어진 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드에 대하여 각각 질량분석하는 단계; 를 포함하는 당단백질의 부위 특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 O-당쇄화 부위가 없는 당단백질에 대해서도 같은 방식으로 유사하게 적용 가능하다.
- [0017] 상기 비특이적 단백질 분해효소는 특정 펩타이드 결합에만 작용하는 특이적 단백질 분해효소가 아닌 단백질 분해효소를 말하며, 예컨대 돼지 엘라스테이스 (porcine elastase), 파파인 (papain), 돼지 펩신 (porcine pepsin), 프로네이즈 (pronase), 프로티네이즈 K (proteinase K), 섭틸리신 (subtilisin), 썬모라이신 (thermolysin) 등이 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 a) 단계 이전 당단백질의 불순물을 제거하는 단계;가 추가되는 것을 특징으로 하는 당단백질의 부위 특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다. 예컨대, 당단백질을 포함하는 의약품의 경우 당단백질 외에도 안정화제, 보존제 등의 성분이 포함되어 있는 경우가 있으므로, 이를 먼저 제거한다. 불순물 제거는 스핀 컬럼 등 다양한 방법을 이용할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 b) 단계를 막 스핀 컬럼(Membrane spin column) 등의 분획분자량 여과(Molecular weight cut-off filtration)를 통하여 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위 특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 c) 단계의 비특이적 단백질 분해효소가 엘라스테이스 (elastase), 파파인 (papain), 펩신 (pepsin), 프로네이즈 (pronase), 프로티네이즈 K (proteinase K), 섭틸리신 (subtilisin) 및 썬모라이신 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 당단백질의 부위 특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 c) 단계 이후 상기 d) 단계 이전에 분획한 각 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드에 대하여 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 이용한 고체상 추출을 수행함을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 d)의 질량분석이 다양한 액체 크로마토그래피 질량분석법 중 한 가지, 더욱 바람직하게는 나노LC 칩/Q-TOF 질량분석임을 특징으로 하는 당단백질의 부위-특이적 당펩타이드 생성 및 분석방법에 관한 것이다.
- [0023] 뿐만 아니라, 본 발명은
- [0024] a) 당단백질에 대하여 트립신을 처리하는 단계;
- [0025] b) 트립신 처리로 얻어진 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리하는 단계;
- [0026] c) 분리된 N-당펩타이드와 O-당펩타이드 각각에 대해 비특이적 단백질 분해효소를 처리하고 각 당펩타이드를 분획하는 단계;
- [0027] d) 얻어진 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드에 대하여 각각 질량분석하는 단계; 및
- [0028] e) 질량분석된 부위-특이적 N-당펩타이드와 부위-특이적 O-당펩타이드를 근거로 당단백질에 대한 당사슬 지도를 구축하는 방법에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명의 당단백질에 대한 당사슬 지도를 구축하는 방법은 O-당쇄화 자리가 없는 당단백질에 대해서도 유사한 방법으로 적용 가능하다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 방법에 따르면, 당단백질 분석에서 간단한 방법으로 하나의 시료에서 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리할 수 있고, N-당펩타이드와 O-당펩타이드의 동시 분석이 가능하며, 당사슬이 결합된 모든 당자리를 확인할 수 있는 장점이 있다.
- [0031] 본 발명의 방법에 따르면, 시료인 당단백질에 대해 트립신 처리 및 비특이적 단백질 분해효소 처리를 수행하

로 두 개 이상의 당자리를 포함하는 당펩타이드가 생성되지 않고, 하나의 당자리를 포함하는 당펩타이드만 생성된다.

- [0032] 본 발명의 방법에 따르면, 시료인 당단백질에 대해 트립신 처리 및 비특이적 단백질 분해효소 처리를 수행하므로 생성되는 당펩타이드의 분자량이 작아져 질량분석이 용이해진다.
- [0033] 또한, 본 발명의 방법에 따르면, N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리하는 단계가 있으므로, 상대적 함량이 높거나 이온화 효율이 높은 당펩타이드에 의해 질량분석시 신호 억제(signal suppression)가 발생하는 현상이 없으므로, 정확한 질량분석이 가능해진다.
- [0034] 또한, 본 발명의 방법에 따르면, 하나의 당단백질에 대하여 N-당펩타이드와 O-당펩타이드의 분석이 가능하므로, 분석 결과를 조합하면 당단백질 시료에 대한 전장(full-length) 당사슬 지도를 구축할 수 있다.
- [0035] 이와 같이 구축된 당단백질에 대한 전장 당사슬 지도는 당단백질 의약품 등의 품질 관리 등에 유용하다. 당단백질에 있어서 당자리에 따른 당사슬의 분포를 한번에 표현할 수 있는 방법이 필요하나 현재까지는 효과적인 표현 방법이 없었으나 본 발명의 방법에 의하면, 본 발명 도 9의 조혈인자(EPO)뿐만 아니라 다양한 당단백질에서 당자리 위치를 당단백질 크기를 기준으로 상대적 위치로 표기함으로써 한번에 당사슬 분포도를 확인할 수 있다. 특히, 바이오의약품에서는 표준품과 바이오시밀러 또는 생산 배치(batch) 간에 당자리에 따른 당사슬의 분포를 비교함으로써 당자리에 따른 당사슬의 유사성을 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 당단백질로부터 각 당자리에 당사슬이 결합된 당펩타이드를 생성하고 분리하는 종래의 방법과 본 발명의 방법에 대한 개념도이다.
- 도 2는 본 발명에 따라 당펩타이드를 분리 및 분석하는 방법의 흐름도이다.
- 도 3은 하나의 N-당쇄화 자리를 가진 당단백질에 본 발명의 방법을 적용한 개념도이다.
- 도 4는 여러 개의 N-당쇄화 자리를 가진 당단백질 의약품을 본 발명의 방법에 따라 분석한 결과이다.
- 도 5는 여러 개의 N-당쇄화 자리와 O-당쇄화 자리를 동시에 가진 당단백질 의약품을 본 발명법에 따라 분석한 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 방법에 따라 생성된 EPO의 N-당펩타이드를 확인한 것이다.
- 도 7은 여러 개의 N-당쇄화 자리와 O-당쇄화 자리를 가진 의약품 EPO에 존재하는 N-당펩타이드의 상대적 양을 비교분석한 표이다.
- 도 8은 여러 개의 N-당쇄화 자리와 O-당쇄화 자리를 가진 의약품 EPO에 존재하는 O-당펩타이드의 상대적 양을 비교분석한 것이다.
- 도 9는 EPO의 당자리에 따른 당사슬 지도를 구축한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0038] 실험방법 (도 2)
- [0039] 1. 당단백질 의약품에 포함되어 있는 안정화제 및 보존제 등의 불순물을 스핀 컬럼(Spin Column, MWCO 10kDa)을 이용하여 제거하였다.
- [0040] 2. 당단백질 30 μ g에 550mM DTT(Dithiothreitol)와 450mM IAA(Iodoacetamide)를 사용하여 단백질 폴딩을 유지하고 있는 이황화결합(disulfide bond)을 절단하여 단백질 분해효소의 작용이 용이한 1차 구조를 만들었다. 이후 선택적 단백질 분해효소인 트립신 1 μ g를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C로 16시간 동안 반응시켜 당펩타이드를 얻었다.
- [0041] 3. 100 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 가열하여 단백질 분해효소 트립신을 변성시켰다. 특정 분자량 추출법(Molecular Weight

Cut Off filtration)을 이용하여, O-당펩타이드와 N-당펩타이드를 분리하였다.

- [0042] 4. O-당펩타이드와 N-당펩타이드 각각에 다중분해효소 30 μ g을 첨가하여 37℃로 6시간 동안 반응시켜 하나의 당 자리에 당사슬을 포함하고 있는 짧은 당펩타이드를 확보하였다.
- [0043] 실례로 적용한 에리트로포이에틴 의약품에 선택적 단백질 분해효소 트립신만 처리했을 경우, 3개 또는 2개의 당 자리를 포함하고 있는 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 얻게 되어 정확한 당자리를 확인하기에는 제한이 있었으나, 본 발명의 방법에 따라 O-당펩타이드와 N-당펩타이드를 분리한 후 각각 다중분해효소를 처리해 줌으로써 4개 이하의 짧은 펩타이드에 하나의 당사슬이 결합된 당펩타이드를 확보할 수 있었다.
- [0044] 5. 얻어진 당펩타이드는 다공성 흑연화 탄소 카트리지(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.
- [0045] 6. nanoLC chip/Q-TOF MS 분석을 통하여 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리하고, 당사슬의 위치 확인 및 결합된 당사슬의 구조를 분석하여 에리트로포이에틴에 존재하는 N-당펩타이드 및 O-당펩타이드의 구성을 확인하고 정량적으로 프로파일링하였다. 좀 더 자세히는 분리된 N-당펩타이드와 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 43×0.075mm 분석 컬럼의 정지상(stationary phase)으로 통합된 나노-ESI 스프레이 팁과 함께 5 μ m 다공성 흑연화 탄소가 패킹된 칩을 사용하였다. 크로마토그래피 방법에 의한 분리는 최적화된 분리 조건에 따라 수행되었다. 간단히 설명하면, 시료를 로딩한 후 빠른 N-당펩타이드 또는 O-당펩타이드 용출 농도구배 용액을 분당 0.3 μ l씩 흘려주었다. 농도구배액은 (A) 3.0% 아세트나이트릴 및 0.5% 포름산(v/v) 수액, 및 (B) 90.0% 아세트나이트릴 및 0.5% 포름산(v/v) 수액이고, 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-당펩타이드 또는 O-당펩타이드는 99.9% B 액으로 10분간 씻어내었다. 최종적으로 분석 컬럼은 6% B로 20분간 재평형화하고, 농축 컬럼은 0% B로 20분간 재평형화하였다.
- [0046] 7. 질량분석한 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 처리되었다.
- [0047] 도 1은 본 발명에서 N-과 O-당쇄화를 모두 가지고 있는 당단백질의 경우(일례: 바이오의약품 2세대 EPO 의약품) 각 당자리에 당사슬이 결합된 당펩타이드의 생성 및 분리 방법에 대한 개념도이다.
- [0048] 종래 방법인 선택적 단백질 분해효소 트립신을 이용하여 라이신(Lys, K)과 아르기닌(Arg, R) 뒤의 아마이드 결합(amide bond)을 절단함으로써 당펩타이드를 생성하지만 아래와 같은 한계점이 있다.
- [0049] i) 아미노산 서열에 따라 당쇄화가 될 수 있는 당자리가 하나 또는 두 개 이상 존재하는 당펩타이드를 생성할 수 있다.
- [0050] ii) 또한 당사슬의 입체장애 때문에 효소가 잘못 절단(missed cleavage)될 수 있으며, 이로 인해 질량분석에서 검출할 수 있는 질량값보다 큰 펩타이드를 얻게 되어 질량분석으로 검출되지 않는 경우가 있을 수 있다.
- [0051] iii) 더욱이 N-당펩타이드와 O-당펩타이드가 동시에 생성되므로 O-당펩타이드나 N-당펩타이드 중 상대적 함량이 높거나 이온화 효율이 높은 당펩타이드에 의해 질량분석시 신호 억제(signal suppression)가 발생하게 되어 부위 특이적이지 않은 당펩타이드를 생성하게 된다.
- [0052] 이를 극복하기 위해 본 발명에서는 당단백질에 트립신을 처리하여 당펩타이드를 생성한 후 당펩타이드의 분자량을 이용하여 O-당펩타이드와 N-당펩타이드가 분리된 시료를 확보한다. 각각에 대해 다중분해효소를 처리하여 하나의 당자리에 당사슬이 결합된 부위 특이적 당펩타이드를 생성하여 각 당자리에 따른 당사슬의 다양성을 확보한다. 본 발명은 하나의 시료로부터 O-당펩타이드와 N-당펩타이드의 동시분석이 가능하며, 당사슬이 결합된 모든 당자리를 확인할 수 있는 장점이 있다.

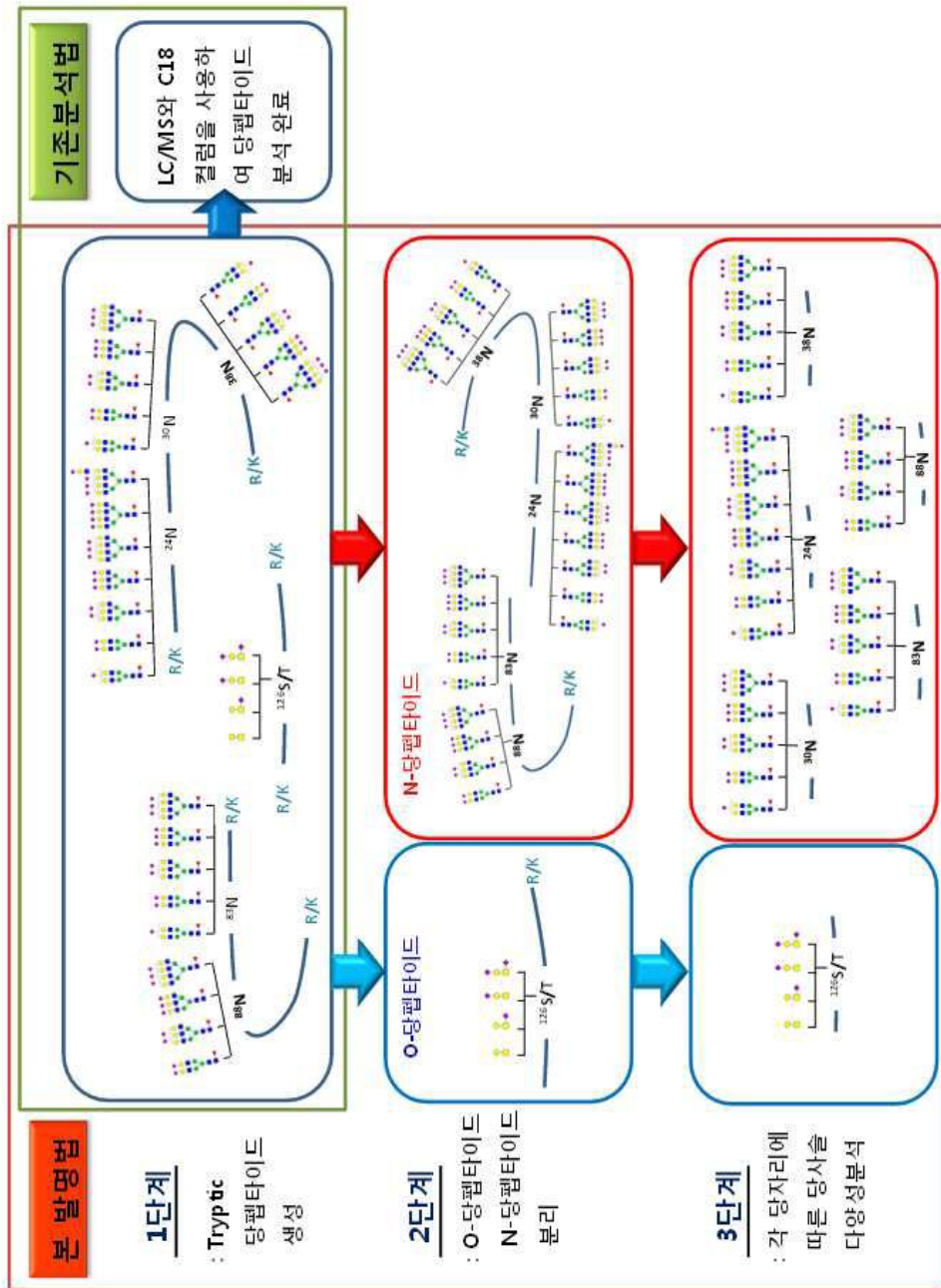
- [0053] 도 2는 본 발명에 따라 당펩타이드를 분리 및 분석하는 방법의 흐름도이다. 당단백질 의약품을 트립신 처리하여 N-과 O-당펩타이드를 생성하였다. 얻어진 당펩타이드를 막 스핀 컬럼(Membrane spin column, MWCO 3kDa)을 이용하여 O-당펩타이드와 N-당펩타이드로 분리하였다. 이때, 3,000Da 이하의 작은 분자량을 가지는 O-당펩타이드는 필터 아래로, 3,000Da 이상의 큰 분자량을 가지는 N-당펩타이드는 필터 위로 분리가 되었다.
- [0054] 분리된 O-당펩타이드와 N-당펩타이드에 각각 다중분해효소를 추가적으로 반응시켜 부위 특이적 당펩타이드를 생성하였다. 이때 당사슬에 4개 이하의 짧은 펩타이드가 꼬리표(tag)처럼 붙은 형태로 생성됨으로써 질량분석시 적합한 분자량을 가지게 된다.
- [0055] 당을 효과적으로 용리할 수 있는 특징을 가진 다공성 흑연화 탄소 카트리지(Porous Graphitized Carbon Cartridge)를 이용한 고체상 추출(Solid Phase Extraction)을 하여 당펩타이드만 선택적으로 추출하였다. 정제한 N-당펩타이드 및 O-당펩타이드는 각각 LC/MS를 이용하여 프로파일링하고, LC/MS/MS를 통한 정확한 구조를 분석하였다.
- [0056] 도 3은 하나의 N-당쇄화 자리를 가진 당단백질을 본 분석법에 적용시킨 개념도이다. 하나의 N-당쇄를 가진 대표적인 당단백질 의약품으로 항체를 들 수 있다. 종래 방법인 선택적 단백질 분해효소인 트립신을 이용하여 당펩타이드를 생성하게 되면 큰 펩타이드 조각으로 생성되어 질량분석상의 이온화가 되기 어려운 문제가 있다. 하지만 본 발명에 따른 분석법을 적용할 경우 N-당펩타이드는 종래방법보다 작은 펩타이드 조각으로 생성되기 때문에 좀 더 쉽게 질량분석 할 수 있다.
- [0057] 도 4는 여러 개의 N-당쇄화 자리를 가진 의약품을 본 발명법에 따라 분석한 결과이다. 현재 시판되고 있는 당단백질 의약품 파브라자임(Fabrazyme™, agalsidase β)은 3개의 N-당자리를 가지고 있는 당단백질이다. 파브라자임은 종래방법에 따라 선택적 단백질분해효소(트립신)만 처리할 경우, 하나의 N-당사슬 자리(아미노산 108, 161, 184번 위치)를 가지고 있는 3개의 N-당펩타이드를 확보할 수 있으나 펩타이드의 길이가 길어 질량분석하기에 어려움이 있다. 본 발명에 따른 분석법을 적용할 경우 N-당펩타이드는 5개의 아미노산으로 구성된 짧은 펩타이드에 당사슬이 결합된 형태로 생성되어 당자리의 당사슬 다양성 확인이 가능하다.
- [0058] 도 5는 여러 개의 N-당쇄화 자리와 O-당쇄화 자리를 동시에 가진 당단백질 의약품을 본 발명법에 따라 분석한 결과이다. 현재 시판되고 있는 2세대 에리스로포이에틴(Darbepoetin alfa, NESP)은 5개의 N-당자리와 1개의 O-당자리를 가지고 있는 당단백질이다. 종래 방법에 따라 선택적 단백질분해효소(트립신)만 처리할 경우, 여러 개의 N-당사슬 자리를 가지고 있는 N-당펩타이드(아미노산 24, 30, 28번 위치에 N-당사슬을 가지고 있는 당펩타이드와 아미노산 83, 88번 위치에 N-당사슬을 가지고 있는 당펩타이드) 2개와 하나의 O-당사슬 자리(아미노산 126번 위치)를 가진 O-당펩타이드 1개를 확보할 수 있다.
- [0059] 본 발명에 따라 막 스핀 컬럼(Membrane spin column, MWCO 3kDa)을 사용하여 N-당펩타이드와 O-당펩타이드를 분리한 후 다중분해효소(예:Pronase E)를 추가 처리하였다. N-당펩타이드의 경우 하나의 당자리에 당사슬이 결합된 5개의 N-당펩타이드를 확보함으로써 각각의 당자리에 결합된 당사슬의 종류 및 상대적인 함량을 확인할 수 있었으며, O-당펩타이드의 경우 질량분석 기반의 분리분석에 적합한 짧은 펩타이드를 가진 당펩타이드를 확보할 수 있었다.
- [0060] 도 6은 본 발명의 방법에 따라 생성된 EPO의 당펩타이드를 확인한 것이다. 종래방법에 따라 트립신만 처리했을 경우, 아미노산 83번 및 88번의 N-당자리들이 포함된 당펩타이드가 생성되어 각각의 당자리에 존재하는 당사슬의 구조를 확인하는 것은 불가능했다.
- [0061] 그러나, 본 발명의 방법을 이용할 경우 하나의 당자리에 당사슬이 결합된 당펩타이드로 분리 분석이 가능함을 탠덤질량분석법을 수행하여 확인하였다. 예컨대 m/z 1018.127 (z4)에 해당되는 당펩타이드는 아미노산 83번 아스파라긴(Asn)에 당사슬이 결합되어 있으며, 당사슬의 구조는 4개의 시알산과 코어 위치의 퓨코스를 가지고 있는 당펩타이드이다. 본 발명자들은 이와 같은 LC/MS/MS 방법으로 각각의 당자리에 당사슬이 존재한다는 직접적

인 결과를 확보하였다.

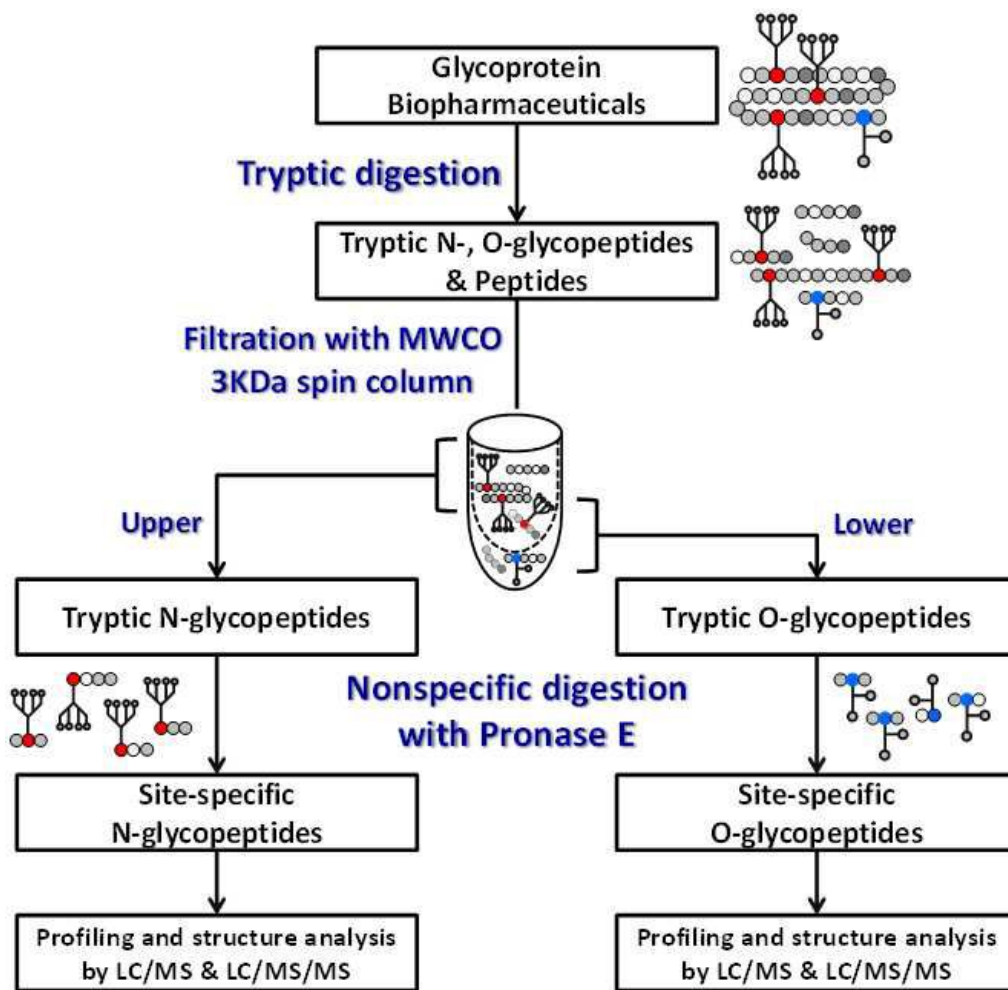
- [0062] 도 7은 여러 개의 N-당쇄화 자리와 O-당쇄화 자리를 가진 의약품 EPO에 존재하는 N-당펩타이드의 상대적 양을 비교분석한 것이다. 2세대 EPO 의약품은 총 5개의 N-당자리와 하나의 O-당자리를 가지고 있으며 당펩타이드 분석결과 서로 다른 당사슬이 다른 정량분포도를 가지고 결합되어 있는 것을 확인하였다. 모든 당자리에 존재하는 가장 대표적인 당사슬은 7_6_1_4_0(Hex_HexNAc_Fuc_NeuAc_OAc) 구조로서 4개의 시알산을 가진 테트라-안테나리(tetra-antennary) 구조이다. 각 당자리마다 주로 트리-안테나리(tri-antennary) 또는 테트라-안테나리(tetra-antennary) 구조에 3 또는 4개의 시알산을 포함하고 있으며 O-아세틸화(acetylation)된 당사슬의 변이체까지 확인하였다. 표의 NESP는 차세대 EPO인 다베포이에틴(darbepoietin)의 상표명이다.
- [0063] 도 8은 여러 개의 N-당쇄화 자리와 O-당쇄화 자리를 가진 의약품 EPO에 존재하는 O-당펩타이드의 상대적 양을 비교분석한 것이다. EPO의 O-당사슬은 아미노산 126번 세린에서 발생되며, O-당펩타이드의 90% 이상이 시알산을 함유하고 있다. N-당펩타이드와 유사하게, O-당펩타이드에서 O-아세틸화된 당사슬 구조를 확인하였다.
- [0064] 도 9는 당자리에 따른 당사슬 지도를 구축한 것이다. 분석결과를 이용하여 당단백질 의약품에서 당자리에 따른 당사슬의 조성 및 정량정보를 나타내는 당단백질 의약품의 2D 도식도를 제작하였다. 일례로 EPO 아미노산의 길이에 맞게 원형을 제작하여 상대적인 당자리 위치와 각 당자리에 따라 결합된 주요 당사슬을 표시하여 도식화하였다.

도면

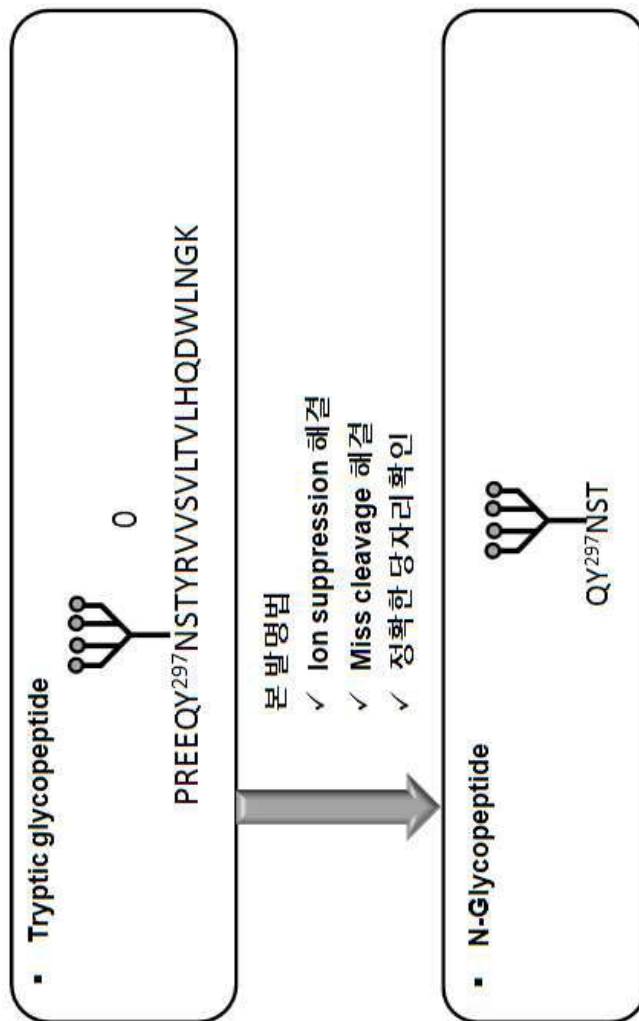
도면1



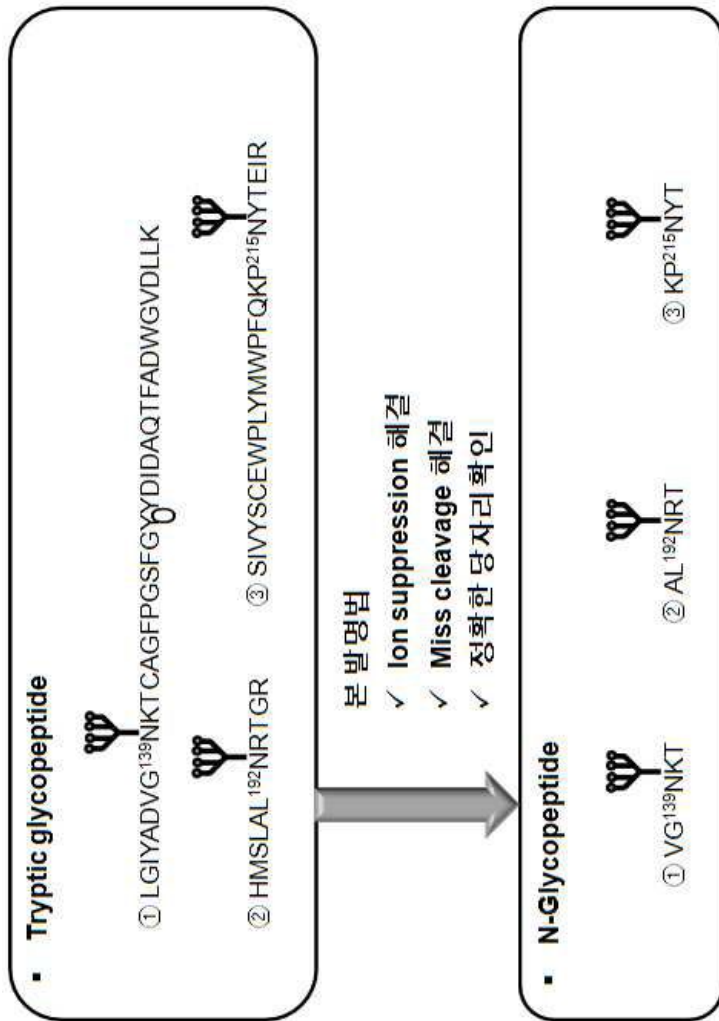
도면2



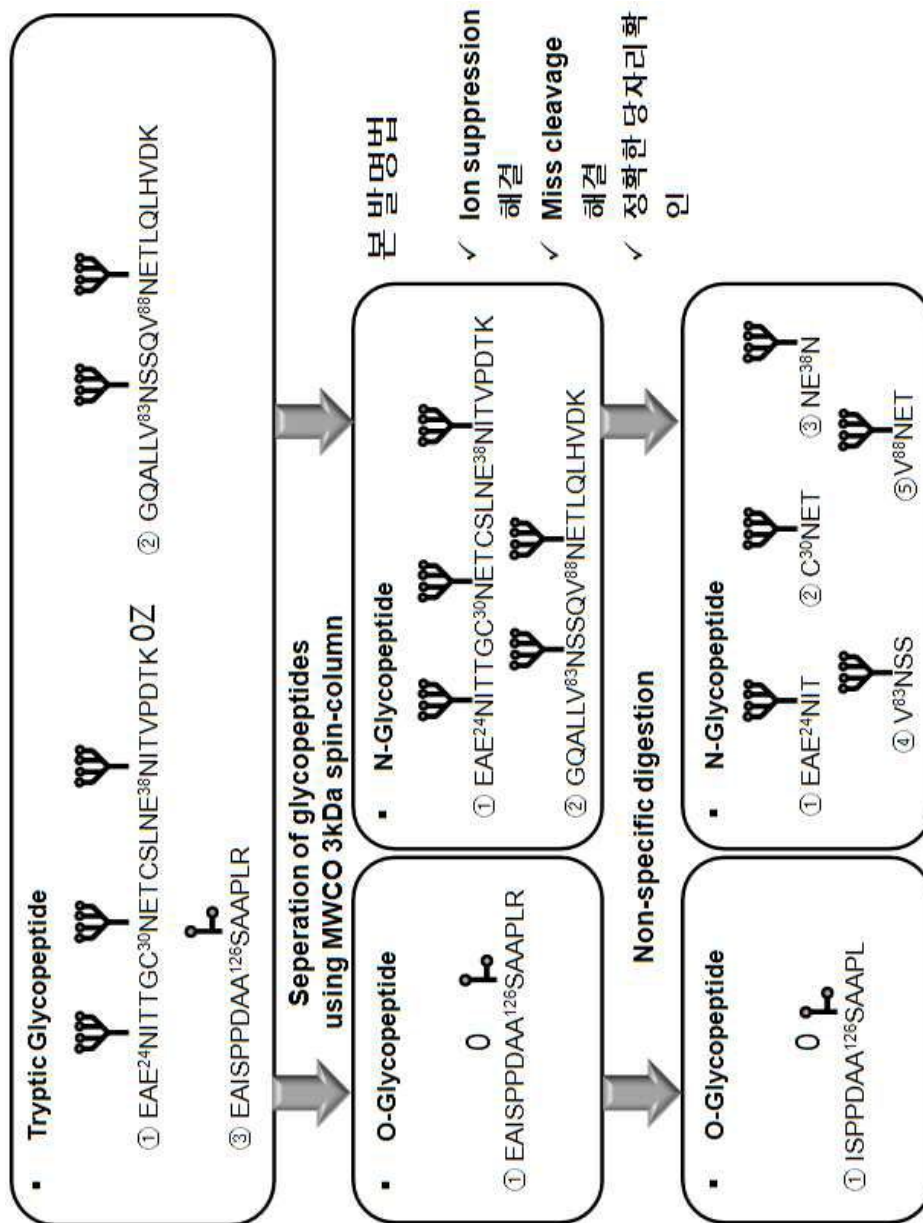
도면3



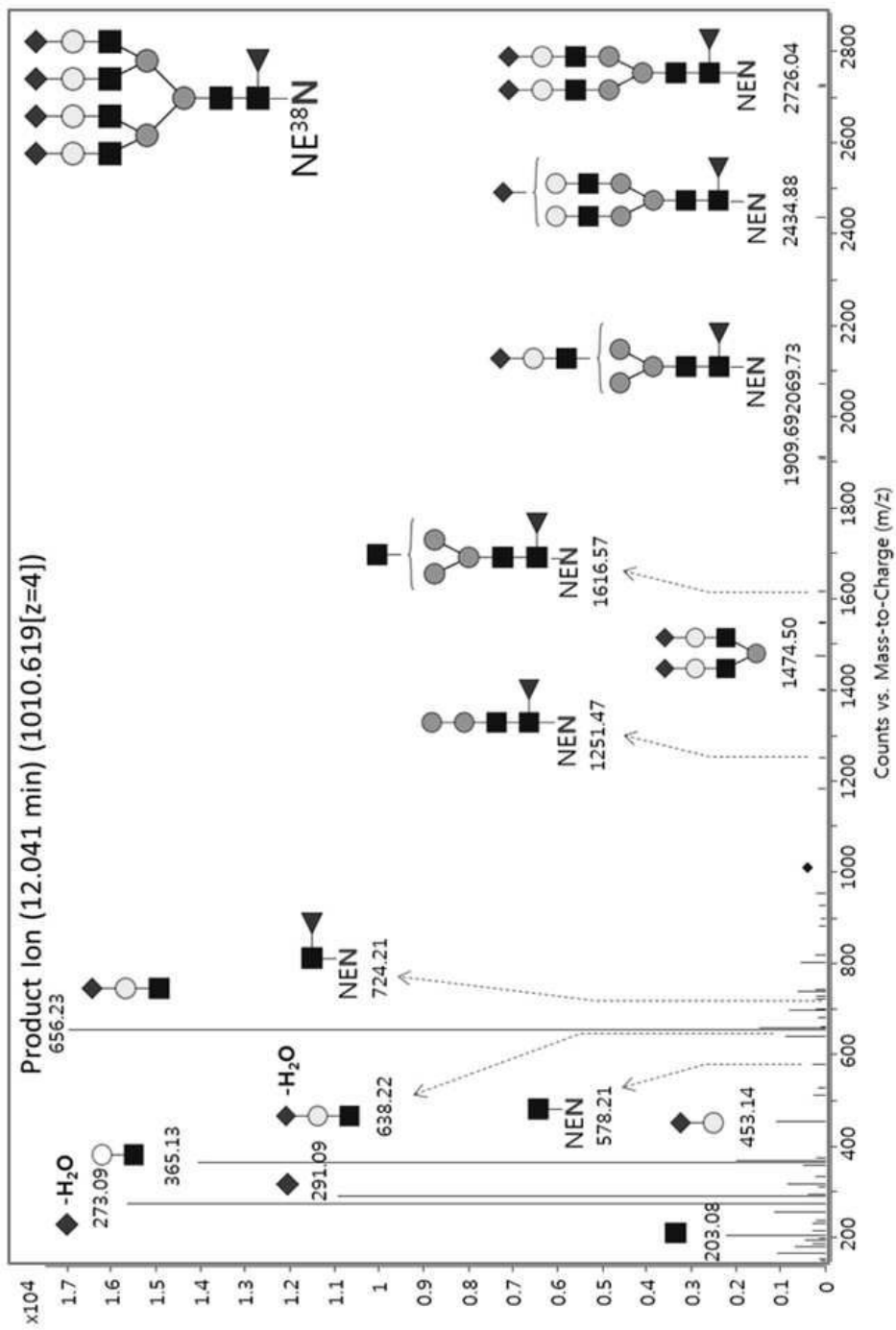
도면4



도면5



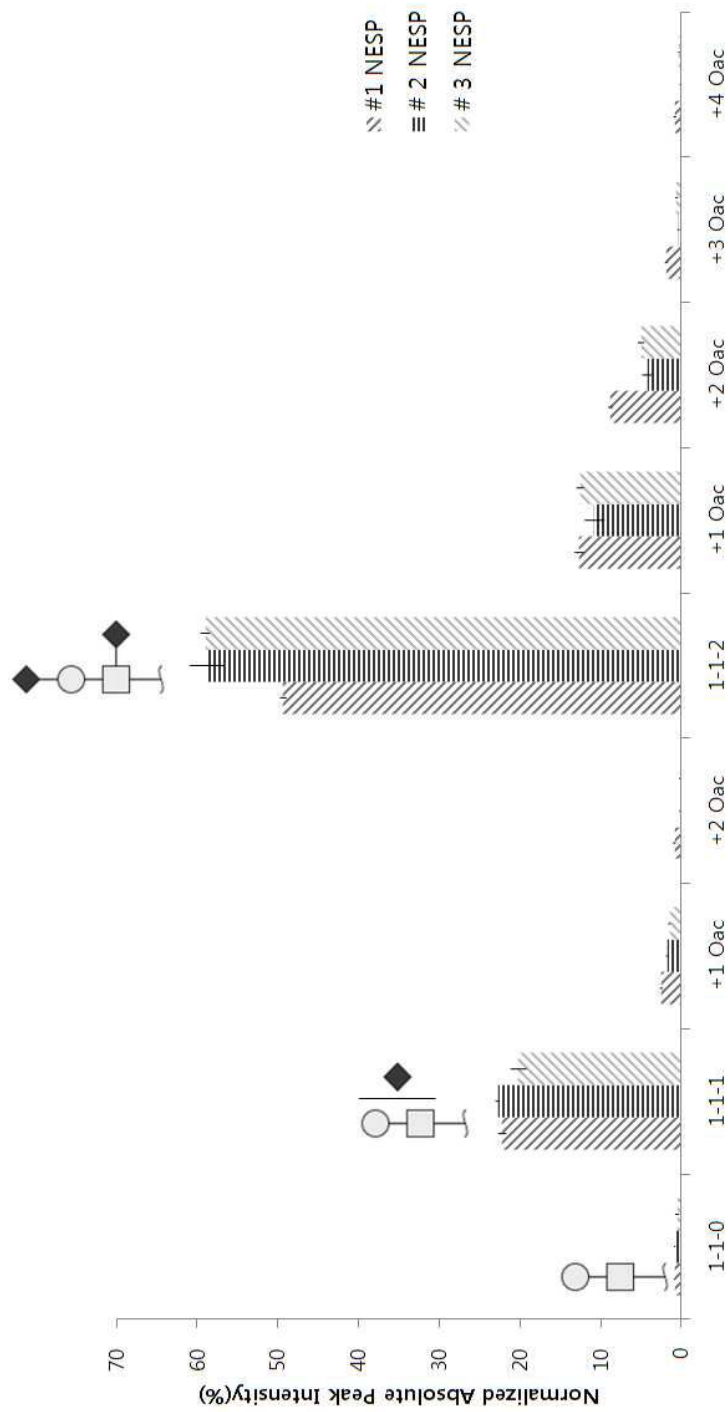
도면6



도면7

NESP						
Hexose	HexNAc	Fucose	NeuAc	OAc	AVE	SE
24 ASN						
7	5	1	3	0	0.27	0.03
7	6	1	4	0	1.73	0.17
7	6	1	4	1	0.23	0.01
38 ASN						
6	5	1	3	0	1.32	0.03
7	6	1	3	0	2.06	0.11
7	6	1	4	0	11.99	1.06
7	6	1	4	1	3.48	0.09
7	6	1	4	2	2.85	0.20
7	6	1	4	3	1.43	0.02
8	7	1	4	0	0.85	0.05
83 ASN						
7	6	1	2	0	0.06	0.00
7	6	1	3	0	3.18	0.17
7	6	1	4	0	9.75	0.37
7	6	1	4	1	5.68	0.15
7	6	1	4	2	1.76	0.13
7	6	1	4	3	1.94	0.26
88 ASN						
5	4	1	2	0	1.01	0.04
6	5	1	2	0	2.29	0.08
6	5	1	3	0	4.59	0.19
6	5	1	3	1	0.75	0.19
7	6	1	3	0	3.34	0.39
7	6	1	3	1	0.83	0.06
7	6	1	4	0	13.48	0.50
7	6	1	4	1	7.02	0.26
7	6	1	4	2	3.85	0.60
7	6	1	4	3	2.69	0.22
8	7	1	4	0	0.50	0.06
Total(%)					88.94	

도면8



도면9

