



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0055414
(43) 공개일자 2018년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6818 (2013.01)

G01N 33/6848 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0153257

(22) 출원일자 2016년11월17일

심사청구일자 2016년11월17일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

오한빈

서울특별시 구로구 경인로 619-3 신도림3차푸르지오아파트 908호

문봉진

경기도 고양시 일산동구 강송로 196 강촌마을1단지아파트 108동 1202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

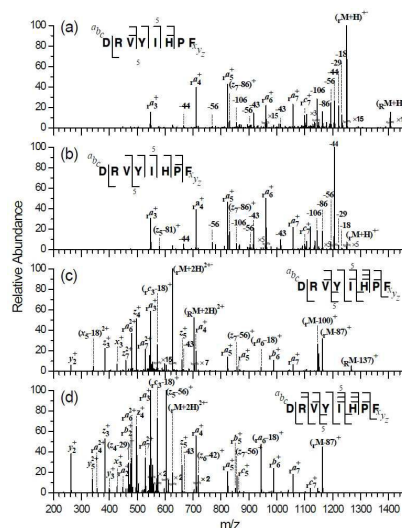
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 자유라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱을 이용한 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석방법

(57) 요약

본 발명은 자유라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱을 이용한 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 양이온 모드에서 질량분석기 내에서 1회의 충돌 활성화를 통해 라디칼 종을 포함하는 펩타이드 골격 분해를 진행함으로써, 라디칼 종을 포함하는 펩타이드 골격 분해를 진행 하여 분자 이온 단편의 질량분석 스펙트럼을 얻고, 상기 질량분석 스펙트럼의 분석을 통해 분석대상 펩타이드의 서열을 분석하는 방식을 포함하는, 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석을 이용한 펩타이드 서열의 분석 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 2560/00 (2013.01)

(72) 발명자

이지혜

충청남도 천안시 서북구 두정상가4길 32-6 미소마을 609호

황보송

경기도 수원시 장안구 수성로328번길 15, 401호

이충식

경기도 고양시 덕양구 충장로 118-30 샘터마을2단지아파트 226동 1804호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201632003

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 C1가스리파이너리

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공동시험 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 분석대상 펩타이드와 상기 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$), 또는 상기 분석대상 펩타이드가 함유한 라이신 잔기의 아민($-NH_2$)과 반응을 할 수 있으며, 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 반응을 통해 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 제조하는 단계;

(b) 상기 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 질량분석기에 도입하는 단계;

(c) 양이온 모드에서 상기 질량분석기 내에서 1회의 충돌 활성화를 진행함으로써, 라디칼 종을 포함하는 펩타이드 골격 분해를 진행 하여 분자 이온 단편의 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및

(d) 상기 질량분석 스펙트럼의 분석을 통해 분석대상 펩타이드의 서열을 분석하는 단계;를 포함하는, 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석을 이용한 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드의 골격분해는 *a-*, *c-*, *x-*, *z-*타입 중에서 선택되는 적어도 하나의 라디칼 기반 펩타이드 골격분해에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서의 펩타이드 골격 분해는 기체 상(gas phase)에서 수행되는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서의 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물;과 상기 분석대상 펩타이드;의 반응은 수용액에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물;은 분자내 일 말단에는 N-O 결합을 포함하는 라디칼 개시 그룹;을 포함하며,

타 말단에는 펩타이드 N-말단의 일차 아민($-NH_2$) 또는 라이신 잔기의 아민 그룹($-NH_2$)과 콘쥬게이션할 수 있는 활성화 에스터(Activated Ester)기를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화합물의 활성화 에스터는 N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시설포숙신이미드 에스터, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페닐 에스터, 4-설포-2,3,5,6-테트라플루오로페닐 에스터, 아실 아자이드, 또는 아실 할라이드에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 분석대상 펩타이드는 이황화 결합을 포함하는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 펩타이드의 골격분해는 분석대상 펩타이드내 이황화 결합 및 펩타이드의 골격을 한 회의 충돌유발로 동시에 분해할 수 있는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 분석대상 펩타이드는 단일 단백질이거나 또는 적어도 2종 이상의 단백질이 혼합된 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체는 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물;과 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하도록 하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 화합물과 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하기 위해, 라이신이 포함된 펩타이드에 대해서는 라이신 잔기를 구아니딘기로 전환함으로써, 라이신이 포함된 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하도록 하는 것을 특징으로 하는 펩타이드 서열의 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자유라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱을 이용한 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 양이온 모드에서 단일 단계 충돌활성화를 통해 자유라디칼 개시 펩타이드 서열 분석이 가능한 신규한 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 펩타이드를 탠덤질량분석을 통해 골격분해하고 생성된 파편이온을 통해 펩타이드의 일차구조 및 모단백질을 확인하는 방법은 비약적으로 발전하여 최근에는 매우 보편적인 펩타이드/단백질 질량분석법으로 활용되고 있다.

[0003] 이러한 탠덤 질량분석법은 크게 충돌유발 분해법과 라디칼 기반 질량분석법으로 나뉘 수 있으며, 충돌유발 분해법은 펩타이드 및 그 유도체를 질량분석기 도입부 또는 내부에서 가속시키고, 가속된 펩타이드 및 그 유도체를 다양한 기체 (질소, 헬륨, 아르곤 등) 또는 고체 표면과 충돌시킴으로써 펩타이드 및 그 유도체의 내부에너지를 증가시켜 펩타이드의 골격분해를 유도하는 방법이며, 라디칼 기반 질량분석법은 펩타이드 및 그 유도체의 열적 기반 내부에너지 증가에만 의존하는 것이 아니라, 펩타이드 및 그 유도체에 라디칼 사이트를 형성하고, 펩타이드 고유의 라디칼 화학에 기반하여 펩타이드의 골격분해를 유도하는 방법을 총칭한다.

[0004] 한편, 상기 라디칼 기반 질량분석은 다시 전자기반 질량분석법과 비전자-기반 질량분석법으로 나뉘 수 있다. 전자기반 질량분석법은 전자포획분해법 (Electron capture dissociation, ECD) 또는 전자전달분해법 (Electron transfer dissociation, ETD)와 같이 전자를 펩타이드에 전달함으로써, 펩타이드에 라디칼 사이트를 생성시키고 이를 통해 펩타이드 골격분해를 유도하는 방법이고, 이에 반해, 비전자-기반 질량분석법은 직접적인 전자 포획,

전달에 의해서가 아니라 다양한 라디칼 유발 방법들을 통해 펩타이드에 라디칼 사이트를 도입함으로써 펩타이드 골격분해를 유도하는 탠덤질량분석법을 지칭한다.

[0005] 일반적으로 충돌유발 분해법을 통해 펩타이드는 골격 분해되어 주로 *b*-, *y*-타입의 펩타이드 파편이온을 생성하며, 반면에 라디칼 기반 질량분석법들은 주로 *a*-, *c*-, *x*-, *z*-타입의 파편이온을 생성한다. 따라서, 파편이온들을 관찰함으로써 유발된 펩타이드 골격분해가 단순 충돌유발분해법에 의해 또는 라디칼 기반 질량분석법에 의해 진행됨을 역으로 추정할 수 있다.

[0006] 또한, 상기 비전자-기반 탠덤질량분석법은 다수의 방법론이 존재하는데, 그 중 라디칼 유발 전구체를 합성하여 이 전구체를 펩타이드의 N-말단 또는 라이신 잔기의 일차아민과의 반응을 통해 펩타이드에 결합시키고, 이 펩타이드 유도체에 충돌활성화를 가함으로써 라디칼 방식의 펩타이드 골격분해를 광범위하게 시키는 방법이 최근 연구되고 있다.

[0007] 이러한 펩타이드의 골격분해를 통한 질량분석방법을 이용한 펩타이드 서열을 분석하는 방법과 관련된 종래기술로서, 등록특허 10-1063981(2011.09.14.)에서는 라디칼 유발 전구체로서(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)benzoic acid N-hydroxysuccinimide (*o*-TEMPO-Bz-C(O)-NHS)를 사용함으로써 2차에 걸친 충돌유발 활성화를 통해 매우 효과적으로 라디칼 기반 펩타이드 골격분해 파편이온을 생성하도록 하여 펩타이드 서열을 분석하는 방법이 제시되었고, 등록특허 10-1500488(2015.03.18.)에서는 분석하고자 하는 펩타이드를 음이온화 함으로써 단 한번의 충돌 활성화만으로 펩타이드 서열의 동정이 가능한 TEMPO-기반 FRIPS(free radical-initiated peptide sequencing) 기술을 이용하는 단일 단계 자유 라디칼-개시 펩타이드 시퀀싱 질량분석을 통해 펩타이드 서열을 분석하는 방법이 제시되어 있다.

[0008] 그러나, 이러한 선행기술들은 양이온 모드에서 2차에 걸친 충돌유발 활성화가 필요하거나, 단일 충돌유발 활성화를 통한 파편화는 아직까지 음이온 모드에만 한정되어 있어, 이보다 효율적인 방식으로, 양이온 모드에서 단일 충돌단계만 적용하더라도 펩타이드 서열분석에 요구되는 펩타이드 골격분해 파편화가 일어나도록 하는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0009] 상기 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-NHS이 결합된 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-peptide는 양이온화된 후, 이온트랩방식의 질량분석기내에서 충돌활성화 될 때, TEMPO의 산소와 벤질탄소 사이의 결합이 동중분해 (homolytic cleavage)가 매우 쉽게 일어나 $\bullet$ TEMPO 라디칼과 $\bullet$ Bz-C(O)-peptide 라디칼을 생성하며, 다른 생성물은 거의 생성되지 않고, 거의 대부분이 동중분해반응으로 진행된다. 이와 같이 생성된 $\bullet$ Bz-C(O)-peptide 양이온에 대해 다시 한번 충돌활성화를 가할 때, 비로소 다수의 펩타이드 골격분해 파편이온들이 생성된다. 이를 이용한 ‘자유라디칼 기반 펩타이드 시퀀싱 질량분석법(Free radical initiated peptide sequencing mass spectrometry, FRIPS-MS)’은 파편이온 생성 효율이 충돌유발분해법에 비해 현저하게 우수하며, 전자기반 질량분석법보다도 더 파편이온 생성 효율이 높은 것으로 파악되고 있고, 펩타이드 골격분해 효율이 높을 뿐만 아니라, 이황결합(disulfide)을 포함하는 펩타이드의 골격분해에도 매우 우수한 효율을 보이며, 단순 펩타이드 동정 뿐만 아니라, 단백질체 분석(Proteomics)에 활용될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 또한, 상기 자유라디칼 기반 펩타이드 시퀀싱 질량분석법은 별도의 하드웨어의 구입 또는 설치 없이 단순한 생화학반응을 통해서 기존의 전자기반 질량분석법과 동일하거나 우수한 펩타이드 시퀀싱 능력을 보여줌이 입증되고 있어, 많은 관심의 대상이 되고 있다.

[0010] 그러나, 대부분의 질량분석기 운용과 질량분석법들이 양이온 모드에 최적화되어 있으며, 이러한 양이온 모드에서의 열역학적 컨트롤을 통해 보다 효율적이고 신규한 자유라디칼 기반 펩타이드 시퀀싱 질량분석법을 통해 프로티오믹스 연구에서 널리 쓰일 수 있는, 개선된 펩타이드 서열의 분석 방법에 대한 개발의 필요성은 지속적으로 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 등록특허 10-1063981(2011.09.14.)

(특허문헌 0002) 등록특허 10-1500488(2015.03.18.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서 본 발명은 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$), 또는 상기 펩타이드가 함유한 라이신 잔기의 아민($-NH_2$)과 반응을 할 수 있으며, 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물 및 펩타이드와의 반응을 통해 얻어지는, 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체에 대해 1 회만의 충돌 활성화를 진행함으로써, 광범위한 펩타이드 골격분해를 유발하며, 펩타이드 골격분해 파편이온들이 라디칼 기반 a^- , c^- , x^- , z^- -타입의 파편이온이 되도록 하는 것에 기반한 질량분석을 통해, 펩타이드 뿐만 아니라, 비교적 큰 작은 단백질에도 용이하게 적용할 수 있는 펩타이드의 서열 분석 방법을 제공하는 것을 발명의 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 (a) 분석대상 펩타이드와 상기 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$), 또는 상기 분석대상 펩타이드가 함유한 라이신 잔기의 아민($-NH_2$)과 반응을 할 수 있으며, 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물;의 반응을 통해 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 제조하는 단계; (b) 상기 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 질량분석기에 도입하는 단계; (c) 양이온 모드에서 상기 질량분석기내에서 1회의 충돌 활성화를 진행함으로써, 라디칼 중을 포함하는 펩타이드 골격 분해를 진행하여 분자 이온 단편의 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 (d) 상기 질량분석 스펙트럼의 분석을 통해 분석대상 펩타이드의 서열을 분석하는 단계;를 포함하는, 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석을 이용한 펩타이드 서열의 분석 방법을 제공한다.

[0014] 일 실시예로서, 상기 펩타이드의 골격분해는 a^- , c^- , x^- , z^- -타입 중에서 선택되는 적어도 하나의 라디칼 기반 펩타이드 골격분해에 의해 이루어질 수 있다.

[0015] 일 실시예로서, 상기 (c) 단계에서의 펩타이드 골격 분해는 기체 상(gas phase)에서 수행될 수 있다.

[0016] 일 실시예로서, 상기 (a) 단계에서의 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물;과 상기 분석대상 펩타이드;의 반응은 수용액에서 이루어질 수 있다.

[0017] 일 실시예로서, 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물;은 분자내 일 말단에는 N-O 결합을 포함하는 라디칼 개시 그룹;을 포함하며, 타 말단에는 펩타이드 N-말단의 일차 아민($-NH_2$) 또는 라이신 잔기의 아민 그룹($-NH_2$)과 콘쥬게이션할 수 있는 활성화 에스터(Activated Ester)기를 포함할 수 있고, 이 경우에 상기 화합물의 활성화 에스터는 N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시설포숙신이미드 에스터, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페닐 에스터, 4-설포-2,3,5,6-테트라플루오로페닐 에스터, 아실 아자이드, 또는 아실 할라이드에서 선택되는 어느 하나이다.

[0018] 또한 본 발명에서의 상기 분석대상 펩타이드는 이황화 결합을 포함할 수 있고, 이 경우에 상기 펩타이드의 골격분해는 분석대상 펩타이드내 이황화 결합 및 펩타이드의 골격을 한 회의 충돌유발로 동시에 분해할 수 있다.

[0019] 일 실시예로서, 상기 분석대상 펩타이드는 단일 단백질이거나 또는 적어도 2종 이상의 단백질이 혼합된 것일 수 있다.

[0020] 일 실시예로서, 상기 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체는 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물과 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하도록 하여 얻어지는 것일 수 있고, 이 경우에 상기 화합물과 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하기 위해, 라이신이 포함된 펩타이드에 대해서는 라이신 잔기를 구아니딘기로 전환함으로써, 라이신이 포함된 펩타이드 내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하도록 하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 펩타이드의 서열 분석 방법은 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$), 또는 상기 펩타이드가 함유한 라이신 잔기의 아민($-NH_2$)과 반응을 할 수 있으며, 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물 및 펩타이드와의 반응을 통해 얻어지는, 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체에 대해 1 회만의 충돌 활성화를 진행함으로써, 광범위한 펩타이드 골격분해를 유발하여, 이에 기반한 질량분석을 통해 보다 효율적이고 신규한 방법에 의해, 펩타이드 뿐만 아니라 비교적 큰 작은 단백질의 서열을 분석할 수 있는 장점이 있

다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드의 서열 분석 방법은 현재까지 개발된 자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱(free radical initiated peptide sequencing, FRIPS)을 확장시켜 펩타이드내 N-말단 아미노 그룹에만 TEMPO 유도체를 반응시키고 이를 충돌활성화시켜 질량분석을 진행시킴으로써, 종래기술보다 효율적이고 신규한 펩타이드의 서열을 분석할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물(p-TEMPO-Bn-Suc-NHS)의 반응성을 도시한 그림이다.

도 2는 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 반응성을 도시한 그림이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 p-TEMPO-Bz-Suc-Angiotensin II (DRVYIHPF) +1가 이온의 (a) MS/MS, (b) MS³ 및 +2가 이온의 (c) MS/MS, (d) MS³ 질량분석 스펙트럼들을 도시한 그림이다.

도 4는 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 p-TEMPO-Bz-Suc-des-Pro2-bradykinin(RPGFSPFR)의 질량분석 스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 5는 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 p-TEMPO-Bz-Suc-glycoprotein IIb fragment (296-306) (TDVNGDGRHDL)의 질량분석 스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 6은 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 p-TEMPO-Bz-Suc-kinetensin (IARRHPYFL)의 질량분석 스펙트럼을 도시한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있는 바람직한 실시예를 포함한 발명의 구성을 상세히 설명한다. 본 발명의 바람직한 실시예에 대한 원리를 상세하게 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.

[0026] 일반적으로, “자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱(free radical initiated peptide sequencing, FRIPS)”은 기체상에서 펩타이드의 서열을 동정하는 방법으로, 본 발명에서의 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석을 이용한 펩타이드 서열의 분석 방법은 상기 자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱(FRIPS) 기술을 이용하며, 다음 과정을 통해 펩타이드 서열을 동정할 수 있다.

[0027] (a) 분석대상 펩타이드와 상기 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민(-NH₂), 또는 상기 분석대상 펩타이드가 함유한 라이신 잔기의 아민(-NH₂)과 반응을 할 수 있으며, 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 반응을 통해 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 제조하는 단계; (b) 상기 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 질량분석기에 도입하는 단계; (c) 양이온 모드에서 상기 질량분석기내에서 1회의 충돌 활성화를 진행함으로써, 라디칼 종을 포함하는 펩타이드 골격 분해를 진행하여 분자이온 단편의 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 (d) 상기 질량분석 스펙트럼의 분석을 통해 분석대상 펩타이드의 서열을 분석하는 단계;를 포함한다.

[0028] 본 발명에서의 상기 (a) 단계는 분석대상 펩타이드와 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 반응을 통해 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 제조하는 단계로서, 본 발명에서의 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물은 분자내 일 말단에는 N-O 결합을 포함하는 라디칼 개시 그룹을 포함하고 있으며, 타 말단에는 펩타이드 N-말단의 일차 아민(-NH₂) 또는 라이신 잔기의 아민 그룹(-NH₂)과 치환반응을 통해 상기 펩타이드와 공유결합할 수 있는 활성화 에스터기(AE, Activated Ester)를 포함할 수 있다.

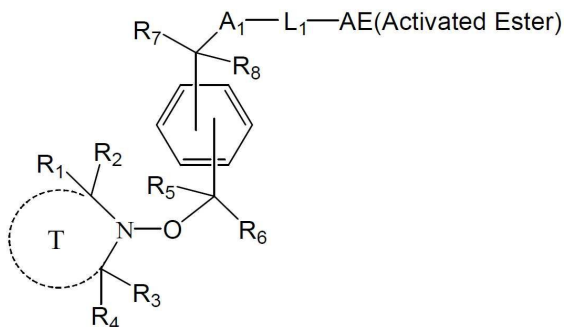
[0029] 여기서, 상기 ‘N-O 결합을 포함하는 라디칼 개시 그룹;’은 분자내에 N-O 결합을 포함하며, 질량분석기내에서 충돌 활성시 라디칼을 생성할 수 있는 그룹이면 종류에 제한되지 않고 사용될 수 있으며, 충돌 활성화에 의해

벤질 위치 탄소에 라디칼을 생성시킬 수 있는 입체장애가 큰 나이트록시기를 포함할 수 있다.

[0030] 또한, 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물은 상기 라디칼 개시 그룹과 활성화 에스터기의 사이를 연결시켜주는 링커 그룹으로서, ‘*-CR₅R₆-C₆H₄-CR₇R₈-A₁-L₁-*’ 그룹을 포함한다.

[0031] 이를 보다 구체적으로 설명하면, 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물;은 아래 화학식 A로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0032] [화학식 A]



[0033]

[0034] 상기 화학식 A에서,

[0035] 상기 A₁은 O-C(=O)-, N(R₉)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₉)-, -O- 중에서 선택되는 연결기이고

[0036] 치환기 R₁ 내지 R₉는 각각 동일하거나 상이하며, 서로 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 10의 시클로알킬기 및 탄소수 6 내지 12의 치환 또는 비치환된 아릴기에서 선택되는 치환기이고, 여기서, 상기 R₁ 및 R₂는 서로 연결되어 고리를 형성가능하고 또한 상기 R₃ 및 R₄는 서로 연결되어 고리를 형성가능하며,



[0037] 상기 고리그룹 T는 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 12의 알킬렌기로서, 상기 알킬렌기의 양말단은 상기 R₁ 및 R₂에 결합된 탄소원자 및 R₃ 및 R₄에 결합된 탄소원자와 각각 결합되며, 상기 알킬렌기는 상기 질소원자를 포함하는 고리이외의 추가의 고리를 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있으며,

[0038] 상기 L₁은 하기 구조식 C로 표시되는 연결기이고,

[0039] [구조식 C]

[0040] -L₂-(La-L₃)_m-(L₄)_n-

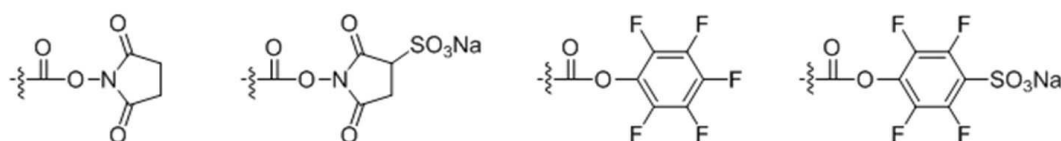
[0041] 상기 구조식 C에서,

[0042] 연결기 L₂ 내지 L₄는 각각 동일하거나 상이하며, 서로 독립적으로, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 10의 시클로알킬렌기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 12의 아릴렌기, 및 치환 또는 비치환된 탄소수 7 내지 12의 아릴알킬렌기로부터 선택되며,

[0043] 상기 m 및 n은 각각 0 또는 1의 정수이고,

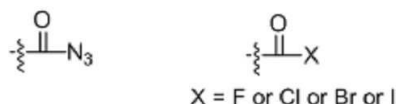
[0044] 상기 La는 O-C(=O)-, C(=O)-O-, -O-, N(R₁₀)-C(=O)-, -C(=O)N(R₁₀)- 중에서 선택되는 연결기로서, 상기 R₁₀은 앞서 정의한 R₉와 동일한 치환기이고.

[0045] 상기 활성화 에스터기(AE, Activated Ester)는 하기 구조식 D 내지 구조식 I에서 선택되는 어느 하나이다.



[0046]

[0047] [구조식 D] [구조식 E] [구조식 F] [구조식 G]



[0048]

[0049] [구조식 H] [구조식 I]

[0050] 여기서, 상기 [화학식 A]에서의 ‘치환 또는 비치환된’에서의 ‘치환’은 중수소, 시아노기, 할로젠기, 히드록시기, 니트로기, 탄소수 1 내지 6의 알킬기, 탄소수 1 내지 6의 할로겐화된 알킬기, 탄소수 6 내지 10의 아릴기, 탄소수 7 내지 11의 아릴알킬기, 탄소수 1 내지 6의 알콕시기, 탄소수 1 내지 24의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 24의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 10의 아릴옥시기로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 치환기로 치환되는 것을 의미한다.

[0051] 본 발명에서의 상기 화학식 A의 연결기내 링커 그룹의 ‘*-CR5R6-C6H4-CR7R8-’ 부분은 N-O 결합을 포함하는 라디칼 개시 그룹에 연결되는 부분으로서, 질량분석기 내에서 생성되는 라디칼의 반응성을 단일단계 충돌 활성화에 의해 펩타이드 골격 분해가 가능하도록 하기 위해 상기 벤젠고리(C6H4)에 연결되는 R5, R6, R7, R8 부분중에서 적어도 하나는 수소인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 이들 모두가 수소로 이루어지는 것일 수 있다.

[0052] 한편, 상기 화학식 A의 활성화 에스터 [activated ester (AE)]는 펩타이드 N-말단의 아미노 그룹(-NH₂) 또는 라이신 잔기의 아민 그룹(-NH₂)과의 친핵체 치환반응에 의해 카르보닐기(-C(=O))를 남겨두고 이탈할 수 있는 이탈기를 포함하며, 상기 이탈기 대신에 펩타이드내의 NH 기가 결합되게 된다.

[0053] 이러한 활성화 에스터의 바람직한 예로서, 수용액 또는 수용액과 유기용액의 혼합 용매에서 선택적으로 잘 반응한다고 알려진 N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시설포숙신이미드 에스터, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페닐 에스터, 4-설포-2,3,5,6-테트라플루오로페닐 에스터, 아실 아자이드, 또는 아실 할라이드에서 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다.

[0054] 따라서, 상기 화학식 A로 표시되는 화합물에 한정하여 앞서 기재된 ‘N-O 결합을 포함하는 라디칼 개시 그룹;’



을 살펴보면, 이는 고리그룹 ; 및 치환기 R1 내지 R4와 N-O 를 포함하는 부분에 해당하며, 이의 대표적인 치환기로서는, 템포(TEMPO, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) 그룹이 포함될 수 있고, 이러한 템포 그룹은 질량분석기내에서 충돌 활성화시 N-O 결합이 동중분해되어 용이하게 라디칼을 생성할 수 있게 된다.

[0055] 한편, 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 타말단에 포함되는 활성화 에스터는 상기 화학식 A의 AE 부분을 의미하며, 상기 화합물의 벤젠 고리(C6H4)와 활성화 에스터기(AE) 사이에 위치한 연결기(-A1-L1-)는 활성화 에스터의 반응성을 높이기 위해 일정 길이의 입체장애가 적은 알킬 또는 아릴기를 포함하며, 또한 상기 화합물의 물에 대한 용해도, 친핵체 치환반응 및 충돌활성화 반응시의 반응성을 높이기 위해 극성이 큰 에스터기(O-C(=O)-), 아마이드기(N(R9)-C(=O)-) 또는 에터(-O-)기를 적어도 하나 이상을 포함할 수 있고, 바람직하게는 1개 내지 3개를 포함할 수 있다.

[0056] 즉, 상기 연결기(-A1-L1-)에서 유래되는 극성이 큰 에스터기(O-C(=O)-), 아마이드기(N(R9)-C(=O)-) 및 에터(-O-)기로부터 선택되는 관능기 및 상기 활성화 에스터에 존재하는 카르보닐기(-C(=O)-)에 의해 상기 화학식 A로 표시되는 화합물의 물에 대한 용해도를 높일 수 있어, 수용액에서의 반응수율이 높아지며, 프로티오믹스의 정량 분석 연구시, 수용액에서의 반응이 가능하며, 또한 질량분석기 내에서의 매우 높은 효율성을 가지고 골격분해가 일어날 수 있는 장점이 있다.

[0057] 이를 위해서, 바람직하게는 본 발명에서의 화학식 A내의 연결기(-A1-L1-)는 1 내지 2개의 에스터기 또는 아마이드기를 포함할 수 있다.



[0058] 한편, 상기 화학식A내 고리그룹 는 바람직하게는, 치환 또는 비치환된 탄소수 6의 알킬렌기이고, 이때의 상기 R1 내지 R4는 바람직하게는, 각각 서로 동일하거나 상이하며, 바람직하게는, 탄소수 1 내지 4의 알킬기일

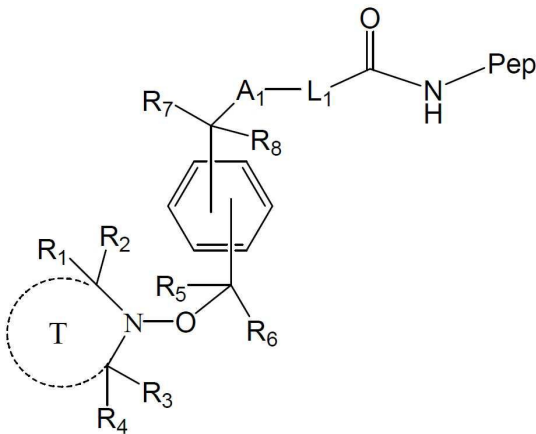
수 있다. 여기서 상기 R1 내지 R4가 메틸기이고 고리그룹 가 트라이메틸렌인 경우에 화학식 A내 N-O 결합을 포함하는 라디칼 개시 그룹은 템포 그룹이 된다.

[0059] 또한, 상기 구조식 C내 m 및 n 은 바람직하게는 0 일 수 있고, 또한 연결기 L2는 바람직하게는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기일 수 있다.

[0060] 한편, 본 발명에서 상기 화학식 A로 표시되는 화합물과 분석대상 펩타이드와의 친핵체 치환 반응에 의해 하기 펩타이드(Pep-NH₂)의 아민기가 상기 화학식 A내 활성화 에스터의 카르보닐기를 공격하여 아마이드 결합을 형성함으로써, 하기 화학식 C로 표시되는 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체가 제조될 수 있고, 이를 하기 반응식 A로 나타내었다.

[0062] [반응식 A]

[0063] [화학식 A] + Pep-NH₂ → [화학식 C]



[0064]

[0065] [화학식 C]

[0066] 상기 화학식 C에서,

[0067] 치환기 R1 내지 R8, 고리그룹 , 연결기 A1 및 L1은 상기 화학식 A에서 정의된 바와 동일하며,

[0068] 상기 'Pep'은 펩타이드 N-말단에서 아미노 그룹(-NH₂)을 제외한 펩타이드 부분이거나, 또는 라이신 잔기의 아민 그룹(-NH₂)을 제외한 라이신을 포함하는 펩타이드 부분이다.

[0069] 한편, 본 발명에서 상기 분석대상 펩타이드는 단일 단백질이거나 또는 적어도 2종 이상의 단백질이 혼합된 것을 사용할 수 있고, 상기 분석대상 펩타이드는 이황화 결합을 포함할 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명에서의 상기 반응식 A에 따른 친핵체 치환반응은, 펩타이드내 아미노 또는 아민기 중 비공유 전자쌍을 가지는 질소원자가 친핵체가 되어 활성화 에스터와 반응함으로써 아마이드를 생성하는 반응(aminolysis)를 통해 이루어진다.

[0071] 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, 수용액(H₂O) 중에서 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합물 하에서 실시하고, 더욱 바람직하게는 수용액에서 이루어질 수 있다. 여기서, 펩타이드 분석시의 정량 분석 연구 등에서 다양한 장점을 가질 수 있도록 수용액에서 이루어지도록 하는 것이 더욱 바람직할 수 있다.

[0072] 한편, 상기 반응 온도는 0 도 내지 100도, 바람직하게는 5도 내지 60도에서 실시하며, 반응시간은 5분 내지 5시간, 바람직하게는 10분내지 2시간 동안 반응시킬 수 있다.

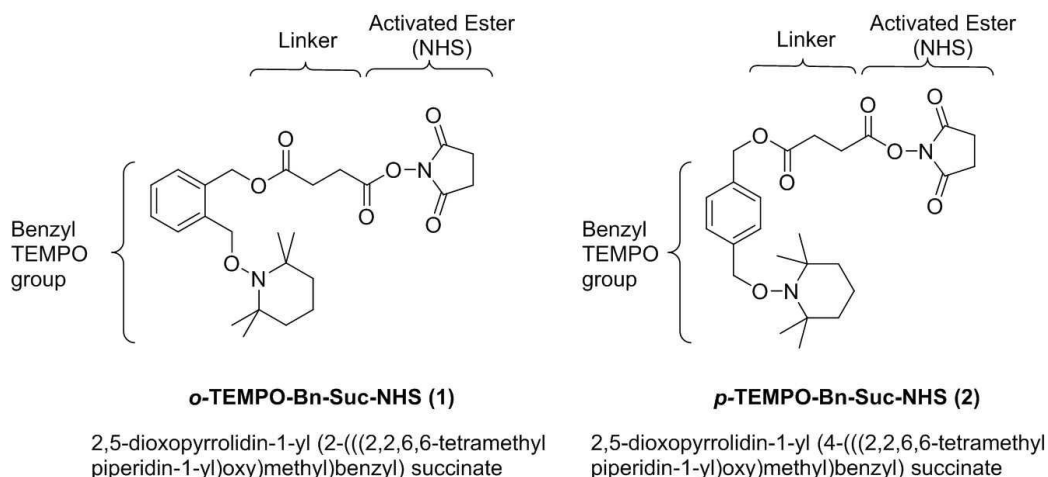
- [0073] 본 발명에서의 두 번째 단계는 상기 (a) 단계를 통해 얻어지는 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 질량분석기에 도입하는 단계로서, 여기에서 사용되는 질량분석기는 충돌활성화 조건을 실행가능한 질량분석기(mass spectrometer)에 해당하면 종류에 제한되지 않고 사용가능하다.
- [0074] 일반적으로 질량 분석기는 프로테오믹스에 많이 사용되는 화학적, 생물학적 실험기기에 해당하며, 펩타이드와 같은 고분자 물질을 강한 전자빔, 충돌활성분해법, 적외선 다광자 분해법, 전자포획분해법, 전자전달분해법, 및 자외선 레이저 등으로 단편화시켜 각 이온 단편의 질량을 계산하여 고분자 물질을 동정할 수 있으며, 분석대상 물질을 질량대 전하의 비(m/z)로 측정한다.
- [0075] 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 차이로 두 이온을 서로 다른 신호로 구분할 수 있는 능력을 의미한다.
- [0076] 이러한 질량분석기의 종류로는 사중극자 분석기(quadrupole analyzer), 이온 트랩 질량분석기(quadrupole ion trap), 이중 초점 자기 섹터 질량분석기(double-focusing magnetic sector), 비행시간차 질량분석기(time-of-flight mass spectrometer, TOFMS) 및 푸리에 변환 이온 사이클로트론 공명 질량분석기(Fourier transform-ion cyclotron resonance)가 있으며, 분석대상 물질이 이온화되는 경우 자기장에 의해 분리되어 분자량에 따라 전자 증배관(electron multiplier), 페러데이 컵(Faraday cup), 어레이 검출기(array detector) 및 포톤 증배관(photon multiplier) 등의 이온검출기에서 검출이 가능하다.
- [0077] 본 발명에서의 상기 질량분석기에 도입하는 단계;에 대한 예시적인 실시예로서, 상기 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체는 이온-트랩 질량분광기(LTQ, Thermo, San Jose, CA, USA)를 이용하여 수행될 수 있고, 상기 펩타이드 유도체는 물 또는 물과 유기용매의 혼합액에서 희석되어 샘플화 할 수 있으며, 적절한 주입속도에 의해 ESI(electrospray ionization)방법을 통해 가스형태의 이온으로 변환되어 질량분석기에 주입될 수 있다.
- [0078] 본 발명에 따른 펩타이드 서열의 분석 방법의 세 번째 단계는 양이온 모드에서 상기 질량분석기내에서 1회의 충돌 활성화를 진행함으로써, 라디칼 종을 포함하는 펩타이드 골격 분해를 진행하여 분자 이온 단편의 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계로서, 통상적으로 기체 상(gas phase)에서 수행될 수 있고, 상기 펩타이드의 골격분해는 a^- , c^- , x^- , z^- 타입 중에서 선택되는 적어도 하나의 라디칼 기반 펩타이드 골격분해에 의해 이루어지게 된다.
- [0079] 본 발명에 따른 펩타이드 서열의 분석 방법은 양이온 모드에서 1회의 충돌 활성화를 진행하여 FRIPS를 수행할 경우, 성공적인 펩타이드 골격 분해가 일어날 수 있어, 이는 본 발명의 기술적 특징에 해당되는 것으로, 종래의 충돌활성 분해(collision-activated dissociation, CAD) 방법에 비해 보다 효율적인 분석이 가능한 장점이 있다.
- [0080] 한편, 본 발명에서 상기 분석대상 펩타이드가 이황화(S-S)결합을 포함하는 경우에 상기 펩타이드의 골격분해는 분석대상 펩타이드내 이황화 결합 및 펩타이드의 골격을 한 회의 충돌유발로 동시에 분해할 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명에서 상기 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체는 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물과 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하도록 하여 자유라디칼 개시 펩타이드 서열분석을 위한 펩타이드 유도체를 얻어낼 수 있다.
- [0082] 이 경우에는 분석 대상 펩타이드가 라이신 잔기의 아민($-NH_2$)을 포함하지 않거나 또는 라이신 잔기의 아민을 포함하는 경우에는 상기 라이신 잔기를 구아니딘과 같은 다른 관능기로서 변환함으로써, 상기 화학식 A내의 활성화 에스터와 반응하지 않도록 함으로써, 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)과 선택적으로 반응하도록 할 수 있다.
- [0083] 이를 위한 예시적인 방법으로서, 상기 화합물과 분석대상 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하기 위해, 라이신이 포함된 펩타이드에 대해서는 라이신 잔기를 구아니딘기로 전환함으로써, 라이신이 포함된 펩타이드내 N-말단의 일차 아민($-NH_2$)만이 반응하도록 할 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석을 이용한 펩타이드 서열의 분석 방법의 마지막 단계는 상기 (c) 단계를 통해 얻어진 질량분석 스펙트럼의 분석을 통해 분석대상 펩타이드의 서열을 분석하는 단계로서, 이는 일반적인 질량분석 기술을 통해 분석함으로써 얻어낼 수 있는 결과물에 해당하므로 이에 대해서는 통상의 공

지된 기술들을 이용할 수 있다.

[0086] 이하에서는 본 발명에 따른 단일단계 펩타이드 시퀀싱 질량분석을 이용한 펩타이드 서열의 분석 방법의 예시적 실시예에 대해 설명하며, 이는 본 발명의 예시적 실시예로서 본 발명에 대한 권리범위는 아래의 실시예에 한정되지 않고 다양하게 확장될 수 있음은 통상의 기술자에게 자명한 것에 해당할 것이다.

[0088] <제조예 1 및 2 : *o*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (1)와 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)의 합성 >

[0089] 본 발명에서 제안된 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 예시적 화합물로서 두 개의 화합물(*o*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (1) 및 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2))를 합성하였고, 이를 하기 그림 A에 도시하였다.

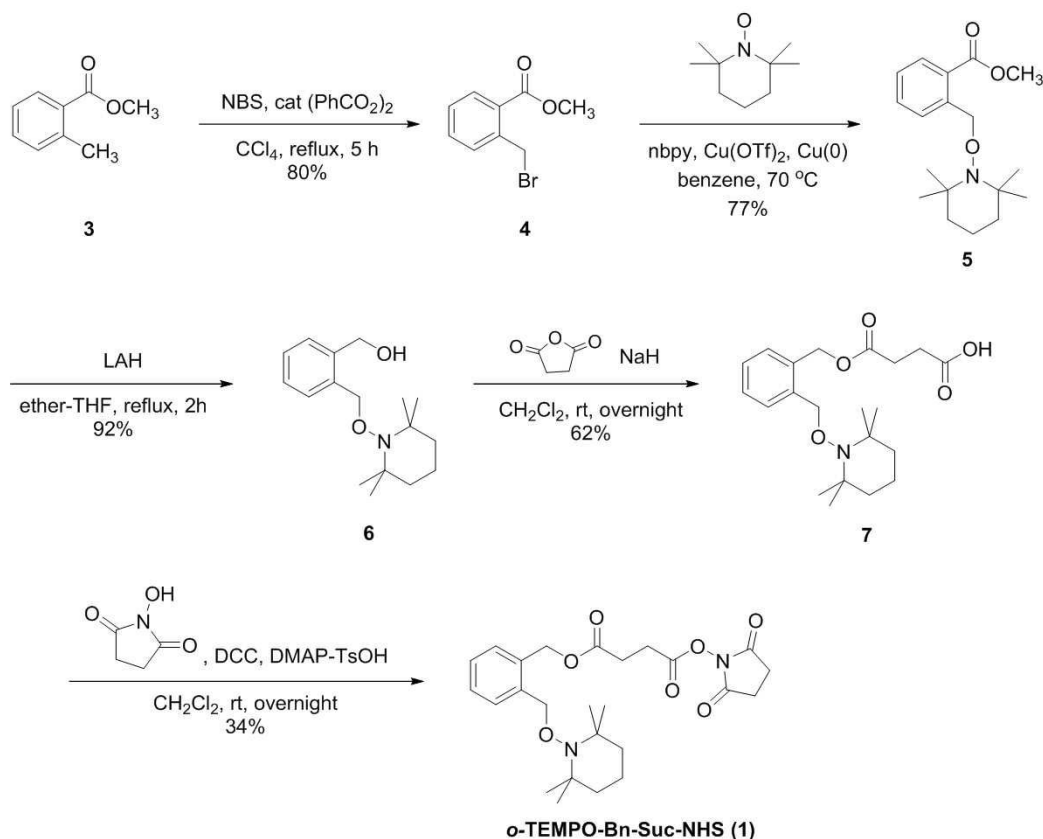


[0091] [그림 A]

[0093] 본 발명에 따른 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물은 질량분석기 내에서 충돌유발분해(CID: collision induced dissociation) 조건에서 라디칼을 생성시킬 수 있도록 벤질 위치에 TEMPO(tetramethylpiperidinyloxy)기가 치환된, 벤질 TEMPO기를 가지고 있고, 물이나 DMSO에서의 용해도를 향상시키고 펩타이드와의 콘주게이션 반응을 촉진시키기 위한 연결기로서 두 개의 카르보닐기를 가지는 숙신산(succinate)기를 포함하며, 그리고 분석대상 펩타이드의 아민기와 반응할 수 있는 이탈기로서, 활성 에스터 중의 하나인 N-하이드록시숙신이미드 에스터기 (N-hydroxysuccinimide(NHS) ester기)를 포함한다.

[0095] 1) 제조예 1 : *o*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (1)의 합성

[0096] 아래 반응식 1에 도시된 바와 같이 Methyl 2-methylbenzoate (3)를 출발물질로하여 *o*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (1)를 제조하였다.



[0097]

[0098] [반응식 1]

[0099] **Methyl 2-(bromomethyl)benzoate (4):** Methyl 2-methylbenzoate (3) (520 mg, 3.46 mmol), *N*-bromosuccinimide (NBS) (677 mg, 3.81 mmol)과 벤질 퍼옥사이드 (10 mg, 0.034 mmol)을 벤젠 (50 mL)에 녹인 후 12시간 동안 환류시킨다. 반응이 끝나면 상온으로 식힌 후 NaHCO₃ 포화 용액 (15 mL)을 넣어준 후 CH₂Cl₂ (20 mL x 3)으로 추출한다. 유기 용매층을 포화 소금물로 씻고, 무수 황산 마그네슘을 넣어 수분을 없애주고 필터를 한다. 필터된 여과액을 진공에서 줄인 후 남은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (Hexanes : EtOAc = 9:1)로 정제하여 methyl 2-(bromomethyl)benzoate (4)를 얻는다 (634 mg, 2.77 mmol, 80%).

[0100] R_f = 0.6 (Hex:EtOAc = 9:1)

[0101] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.38 (td, *J* = 7.8 and 1.2 Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.95 (s, 3H)

[0103] **2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)-benzoic acid methyl ester (5):** 술텁크 플라스크에 methyl 2-(bromomethyl)benzoate (4) (1.07 g, 4.68 mmol), TEMPO (877 mg, 5.61 mmol), Cu(OTf)₂ (169 mg, 0.47 mmol), copper powder (299 mg, 4.68 mmol), 4,4'-dinonyl-2,2'-bipyridyl (Nbpy) (765 mg, 1.88 mmol)을 넣고 벤젠 50 mL에 녹인다. 반응 용액에 아르곤을 주사바늘을 통해 10분 동안 불어주면서 용액 내의 산소를 제거해준다. 술텁크 플라스크를 밀봉한 후에 70 °C에서 16시간 동안 가열해준다. 상온으로 식힌 후 반응 혼합물을 짧은 실리카겔 컬럼을 통해 에틸 아세테이트를 사용해 필터를 해준다. 여과액을 회전 증발기로 줄인 후 잔류액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물 5를 하얀색 고체로 얻었다 (1.11g, 3.62 mmol, 77%).

[0104] R_f=0.7(Hex:EtOAc=9:1)

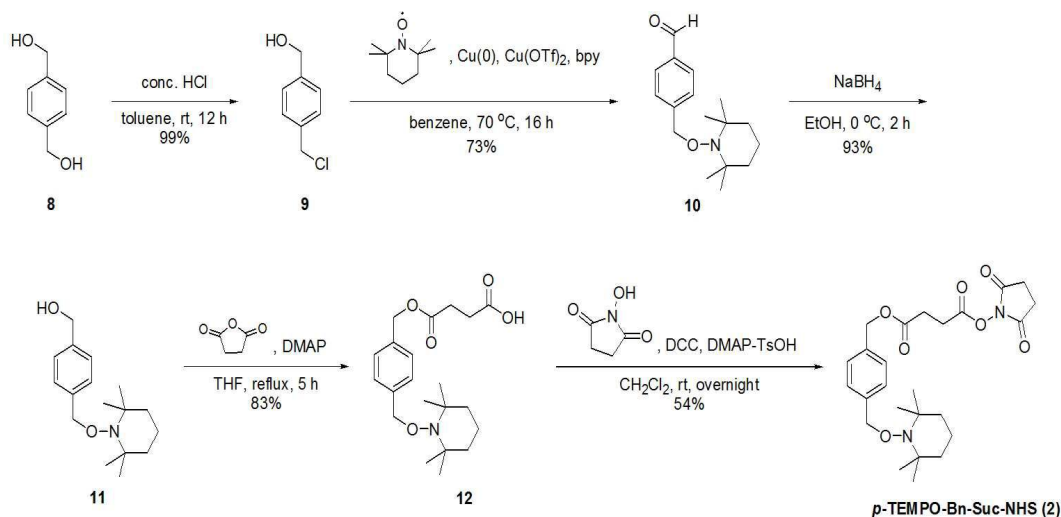
[0105] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.49 (br s, 4H), 1.37 (br s, 1H), 1.32 (br s, 1H), 1.18 (s, 12H)

- [0107] **[2-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)phenyl]methanol (6):** 반응 용기에 lithium aluminum hydride (LAH, 93 mg, 2.45 mmol)을 넣어준 후 아르곤을 불어 아르곤 환경을 만들어 준다. 고무 셉텀을 통해 주사기로 무수 에터 (5 mL)를 넣어준 후 2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)benzoic acid methyl ester (5) (463 mg, 1.52 mmol)를 무수 THF (3 mL)에 녹여서 주사기를 통해 천천히 넣어주었다. 반응 용액을 40 °C 정도로 환류시키면서 2시간 동안 가열하였다. 반응이 끝난 후 상온으로 식혀주고 물 (93 μ L), 15% NaOH 수용액 (93 μ L), 물 (186 μ L)을 순차적으로 넣어주었다. 30분 정도 교반을 시킨 후 생성된 하얀색 고체를 거름종이 필터를 통해 제거한 후 여과된 여과액을 회전 증발기로 농축하면 생성물 6이 하얀 고체로 얻어졌다. (409 mg, 1.47 mmol, 92%).
- [0108] $R_f=0.7$ (Hex:EtOAc=1:1, 10%MeOH)
- [0109] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.42-7.30 (m, 4H), 4.94 (s, 2H), 4.68 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 1.57 (s, 2H), 1.55-1.1.49 (br m, 4H), 1.36-1.34 (br m, 2H), 1.23 (s, 6H), 1.10 (s, 6H)
- [0110] $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 140.34, 136.07, 130.45, 129.53, 128.63, 128.16, 78.27, 63.74, 60.16, 39.93, 33.19, 20.65, 17.23
- [0112] **Succinic acid mono-[2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)benzyl] ester (7):** 반응 용기에 [2-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)phenyl] methanol (6) (250 mg, 0.90 mmol), succinic anhydride (108 mg, 1.08 mmol), sodium hydride (43 mg, 1.79 mmol)을 넣은 후 밀봉하여 무수 질소 분위기에서 무수 THF (5 mL)를 넣어 혼합하였다. 5시간 동안 환류시키면서 가열한 후 상온으로 식힌 다음 10% HCl을 넣어 반응을 종료하였다. 그 혼합물을 CH_2Cl_2 (20 mL x 3)으로 추출하고 유기 용매층을 포화 NaCl 용액으로 씻어준다. 유기 용매층을 무수 MgSO_4 를 넣어 수분을 제거한 후 필터하고 여액을 회전증발기를 사용하여 농축하였다. 농축된 생성물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 (Hex:EtOAc=1:1, 10% MeOH) 생성물 succinic acid mono-[2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) benzyl] ester (7)을 하얀색 고체로 얻었다 (210 mg, 62%).
- [0113] $R_f=0.6$ (Hex:EtOAc=1:1, 10% MeOH)
- [0114] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.50 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.37-7.28(m, 3H), 5.21 (s, 2H), 4.90 (s, 2H), 2.68 (s, 4H), 1.56-1.50 (br m, 5H), 1.37-1.34 (br m, 1H), 1.23 (s, 6H), 1.14 (s, 6H)
- [0116] **2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (2-(((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxy)methyl) benzyl) succinate (o-TEMPO-Bn-Suc-NHS; 1):** 반응 용기에 succinic acid mono-[2-(2,2,6,6-tetramethyl piperidin-1-yloxymethyl)benzyl] ester (7) (210 mg, 0.56 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (64 mg, 0.56 mmol), DMAP-TsOH (9 mg, 0.029 mmol)를 넣은 후 질소 환경 하에서 무수 CH_2Cl_2 (8 mL)를 첨가하여 녹인다. 반응 용기를 얼음물을 사용하여 0 ° C로 식힌 후 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (138 mg, 0.67 mmol)를 CH_2Cl_2 (3 mL)에 녹인 용액을 천천히 적가하였다. 상온에서 12시간 동안 반응시킨 후 반응 혼합물을 거름 종이를 이용하여 필터를 하여 침전물을 제거한 후 여액을 회전증발기를 사용하여 농축하였다. 농축된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc=1:1)를 이용하여 정제함으로써 원하는 생성물 1을 하얀색 고체로 얻었다 (91 mg, 34%).
- [0117] $R_f=0.4$ (Hex:EtOAc=1:1)
- [0118] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.49 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.38-7.30 (m, 3H), 5.24 (s, 2H), 4.90 (s, 2H), 2.98 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.79 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.49-1.48 (br m, 4H), 1.37-1.33 (br m, 2H), 1.23 (s, 6H), 1.13 (s, 6H)

[0119] ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 170.89, 169.00, 167.76, 137.05, 133.19, 129.26, 128.63, 128.58, 127.66, 76.32, 64.81, 60.04, 39.77, 33.13, 28.74, 26.30, 25.63, 20.37, 17.17

[0121] 2) 제조예 2 : *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)의 합성

[0122] 아래 반응식 2에 도시된 바와 같이 1,4-Benzenedimethanol를 출발물질로 하여 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)를 제조하였다.



[0124] [반응식 2]

[0125] 4-(chloromethyl)benzyl alcohol (9): 반응 용기에 1,4-Benzenedimethanol (8) (3 g, 0.022 mol)을 넣고 톨루엔 (108 mL)에 녹인다. 반응 용기를 얼음물을 사용하여 0 ° C로 식힌 후 35% HCl (11.2 mL, 0.13 mol)를 적가하였다. 상온에서 12시간 동안 반응시킨 후 NaHCO_3 수용액을 넣어 반응을 종료하였다. 그 혼합물을 CH_2Cl_2 (20 mL x 3)으로 추출하고 유기 용매층을 포화 NaCl 용액으로 씻어준다. 유기 용매층을 무수 MgSO_4 를 넣어 수분을 제거한 후 필터하고 여액을 회전증발기를 사용하여 농축하였다. 생성물 4-(chloromethyl)benzyl alcohol (9)를 하얀색 고체로 얻었다 (3.38 g, 0.022 mol, 99%).

[0126] $R_f=0.4$ (Hex:EtOAc=2:1)

[0128] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.40 (d, J = 6.8 Hz, 2H), δ 7.38 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.71 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.59 (s, 2H), 1.65 (t, J = 5.6 Hz)

[0130] 4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)-benzaldehyde (10): 실텀크 플라스크에 4-(chloromethyl)benzyl alcohol (9) (1.00 g, 6.39 mmol), TEMPO (1.2 g, 7.66 mmol), $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (230 mg, 0.64 mmol), copper powder (406 mg, 6.39 mmol), 2,2-bipyridine (bpy) (399 mg, 2.55 mmol)을 넣고 벤젠 (5 mL)에 녹인다. 반응 용액에 아르곤을 주사바늘을 통해 10분 동안 불어주면서 용액 내의 산소를 제거해준다. 실텀크 플라스크를 밀봉한 후에 70 °C에서 16시간 동안 가열해준다. 상온으로 식힌 후 반응 혼합물을 짧은 실리카겔 컬럼을 통해 에틸 아세테이트를 사용해 필터를 해준다. 여과액을 회전 증발기로 줄인 후 잔류액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물 10을 하얀색 고체로 얻었다 (1.29 g, 4.68 mmol, 73%).

[0131] $R_f=0.7$ (Hex:EtOAc=2:1)

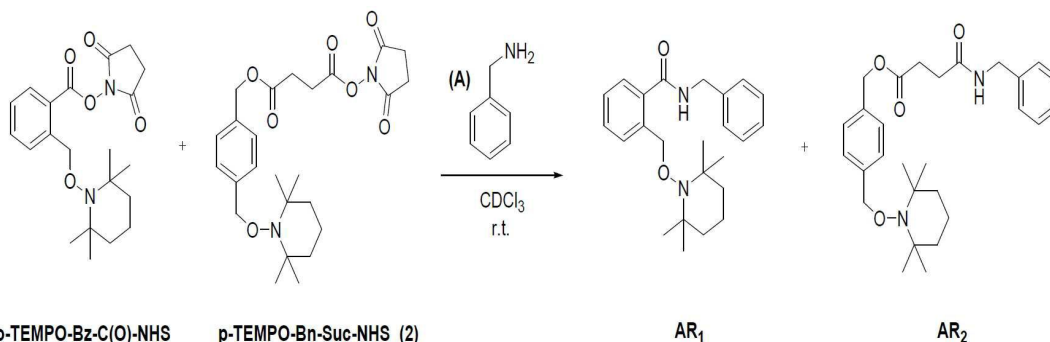
- [0133] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 10.01 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4.92 (s, 2H), 1.51-1.49 (br m, 4H), 1.28-1.26 (br m, 2H), 1.23 (s, 6H), 1.18(s, 6H)
- [0134] **[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)-phenyl]methanol (11):** 반응 용기에 4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)-benzaldehyde (10) (538 mg, 1.95 mmol)를 넣은 후 에탄올 (2.5 mL)에 녹인다. 반응 용기를 얼음물을 사용하여 0°C 로 식힌 후 sodium borohydride (147 mg, 3.89 mmol)를 적가하였다. 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 10% HCl을 넣어 반응을 종결하였다. 그 혼합물을 CH_2Cl_2 (20 mL x 3)으로 추출하고 유기 용매층을 포화 NaCl 용액으로 씻어준다. 유기 용매층을 무수 MgSO_4 를 넣어 수분을 제거한 후 필터하고 여액을 회전증발기를 사용하여 농축하였다. 농축된 생성물을 실리카젤 컬럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc=1:2)를 이용하여 정제함으로써 원하는 생성물 11을 하얀색 고체로 얻었다 (510 mg, 1.84 mmol, 93%).
- [0135] $R_f=0.4$ (Hex:EtOAc=2:1)
- [0137] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.35 (br s, 4H), 4.82 (s, 2H), 4.69 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 1.62-1.48 (br m, 4H), 1.36-1.33 (br m, 2H), 1.25 (s, 6H), 1.14 (s, 6H)
- [0139] **Succinic acid mono-[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)benzyl] ester (12):** 반응 용기에 [4-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) phenyl]methanol (11) (230 mg, 0.83 mmol), succinic anhydride (83 mg, 0.83 mmol), 4-dimethylaminopyridine (60 mg, 0.41 mmol)을 넣은 후 밀봉하여 무수 질소 분위기에서 무수 tetrahydrofuran (THF) (7 mL)를 넣어 혼합하였다. 24시간 동안 환류시키면서 가열한 후 상온으로 식힌 다음 10% HCl을 넣어 반응을 종료하였다. 그 혼합물을 CH_2Cl_2 (20 mL x 3)으로 추출하고 유기 용매층을 포화 NaCl 용액으로 씻어준다. 유기 용매층을 무수 MgSO_4 를 넣어 수분을 제거한 후 필터하고 여액을 회전증발기를 사용하여 농축하였다. 생성물 Succinic acid mono-[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)benzyl] ester (12)을 무색 오일로 얻었다 (260 mg, 0.69 mmol, 83%).
- [0140] $R_f=0.6$ (Hex:EtOAc=1:1, 10% MeOH)
- [0142] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.82 (s, 2H), 2.69 (br s, 4H), 1.54-1.48 (br m, 4H), 1.36-1.24 (br m, 2H), 1.24 (s, 6H), 1.14 (s, 6H)
- [0144] **Succinic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester 4-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-yl oxymethyl)-benzyl ester (*p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS; 2):** 반응 용기에 Succinic acid mono-[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl)benzyl] ester (12) (260 mg, 0.69 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (80 mg, 0.69 mmol), DMAP-TsOH (10 mg, 0.034 mmol)를 넣은 후 질소 환경 하에서 무수 CH_2Cl_2 (6 mL)를 첨가하여 녹인다. 반응 용기를 얼음물을 사용하여 0°C 로 식힌 후 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (170 mg, 0.83 mmol)를 CH_2Cl_2 (2 mL)에 녹인 용액을 천천히 적가하였다. 상온에서 24시간 동안 반응시킨 후 반응 혼합물을 거름 종이를 이용하여 필터를 하여 침전물을 제거한 후 여액을 회전증발기를 사용하여 농축하였다. 농축된 생성물을 실리카젤 컬럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc=1:1)를 이용하여 정제함으로써 원하는 생성물 2를 하얀색 고체로 얻었다 (123 mg, 0.37 mmol, 54%).
- [0145] $R_f=0.4$ (Hex:EtOAc=1:1)
- [0147] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.36 (d, $J = 5$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 5$ Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.82 (s, 2H),

2.98 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.84 (br s, 4H), 2.79 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.49-1.46 (br m, 4H), 1.36-1.33 (br m, 2H), 1.26 (s, 6H), 1.15(s, 6H)

[0148] ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 170.97, 169.02, 167.82, 138.70, 134.57, 128.53, 127.73, 78.45, 66.92, 60.13, 39.79, 33.19, 28.88, 26.38, 25.68, 20.40, 17.21

[0150] < 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 반응속도 실험 >

[0151] 앞서 제조한 두 개의 화합물 중 **p-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)**를 종래에 알려진, TEMPO 그룹을 포함하는 화합물(2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 에스테르, 이하 o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS' 라 함)과 대비하여 벤질아민과의 반응성을 평가하였다.



[0152]

[0153]

[0154] 1) p-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)=10당량, o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS=10당량, 벤질 아민 (A)=1당량 반응

[0155] 실험방법: o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS (3.3 mg, 8.50 mol), p-TEMPO-Bn-Suc-NHS (4 mg, 8.43 mol)을 클로로포름-d (0.6 mL)에 녹인후 벤질 아민 (0.93 μl)를 가하여, 시간에 따른 반응의 진행정도를 H-NMR 분광법으로 분석하여, 이 결과를 하기 표 1 및 도 1에 도시하였다.

[0157] 실험원리:

[0158] 벤질 아민(A) + o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS $\rightarrow$ AR₁ k_1

[0159] 벤질 아민(A) + p-TEMPO-Bn-Suc-NHS $\rightarrow$ AR₂ k_2

[0160] $d[\text{AR}_1]/dt = k_1[\text{A}][\text{o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS}]$

[0161] $d[\text{AR}_2]/dt = k_2[\text{A}][\text{p-TEMPO-Bn-Suc-NHS}]$

[0162] $d[\text{AR}_1]/d[\text{AR}_2] = (K_1/K_2) \times ([\text{o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS}]/[\text{p-TEMPO-Bn-Suc-NHS}])$

[0163] 따라서, o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS, p-TEMPO-Bn-Suc-NHS 과량이면 AR₁, AR₂ 비율(생성물비율) = 반응속도 상수비

[0165] 하기 표 1에서는 시간에 따른 벤질아민과 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 반응성을 반응시간에 따른 상대적 %반응진행도로 나타내었다.

표 1

시간	o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS와 A의 반응	p-TEMPO-Bn-Suc-NHS와 A의 반응
0 min	0%	0%
4 min	0%	75%
7 min	0%	85%
16 min	0%	100%

[0166]

[0167]

상기 표 1에 따르면, 상온에서 벤질 아민(A)은 16분만에 p-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)와 모두 반응했으며, o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS, p-TEMPO-Bn-Suc-NHS가 벤질 아민(A)보다 과량이기 때문에 AR1, AR2 비율(생성물 비율) = 반응 속도상수비 = 0:1이다.

[0168]

즉, 상기 표1은 1당량의 벤질 아민에 몰비가 [p-TEMPO-Bn-Suc-NHS]과 [o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS]을 각각 10 당량씩 동시에 섞어주어 생성되는 각각에 해당되는 치환생성물의 양을 반응 시간에 따라 %로 나타낸 것이며, 이때 용매는 CDCl₃를 사용하였고, 반응 진행도는 H-NMR 분광기를 이용하여 측정하였다.

[0169]

상기 표 1 및 도 1에서 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물 p-TEMPO-Bn-Suc-NHS가 종래기술에 따른 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물(o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS)에 비하여 아민 화합물에 대해 현저히 높은 반응성을 나타냄을 알 수 있다.

[0171]

2) p-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)=1당량, o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS=1당량, 벤질 아민(A)=1당량 반응

[0173]

실험방법: o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS (35.6 mg, 0.092 mmol), p-TEMPO-Bn-Suc-NHS (43.4 mg, 0.091 mmol)을 클로로포름 (0.6 mL) 녹인후 벤질아민(benzylamine) (1 μ l)를 가하여, 시간에 따른 반응의 진행정도를 H-NMR 분광법으로 분석하여, 이 결과를 하기 표 2 및 도 2에 도시하였다.

[0174]

하기 표 2에서는 시간에 따른 벤질아민과 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 반응성을 반응시간에 따른 상대적 %반응진행도로 나타내었다.

표 2

time	o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS와 A의 반응	p-TEMPO-Bn-Suc-NHS와 A의 반응
0 h	0.0%	0.0%
0.07 h	1.5%	58.5%
1 h	4.0%	75.5%
6 h	9.5%	84.5%
18 h	22.0%	86.5%

[0175]

[0176]

상기 표 2에 따르면, p-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)이 o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS보다 벤질 아민(A)과의 반응속도가 현저히 개선되었음을 알 수 있다.

[0177]

즉, 상기 표 2는 몰비가 1:1인 [p-TEMPO-Bn-Suc-NHS] : [o-TEMPO-Bz-C(O)-NHS] 혼합물에 1당량의 벤질 아민을 넣어 생성되는 각각에 해당되는 치환생성물의 양을 반응 시간에 따라 %로 나타낸 것이다. 용매는 CDCl₃를 사용하였고, 반응 진행도는 H-NMR 분광기를 이용하여 측정하였다. 이 도면의 결과 역시 신규 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물 p-TEMPO-Bn-Suc-NHS는 기존 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물(o-TEMPO-Bz-

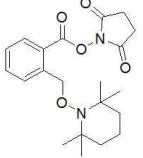
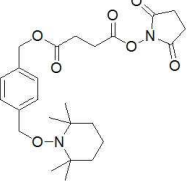
C(O)-NHS)에 비하여 낮은 농도의 아민 화합물에 대해서도 현저히 높은 반응성을 나타냄을 보여준다.

[0179] <용해도 실험 데이터 >

[0180] 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)가 종래기술에 따른 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-NHS보다 DMSO/H₂O 의 혼합용매에서 용해도가 현저히 개선되었음을 보이기 위해 이 혼합용매에서 상대적인 용해도 차이를 실험하였다. 이를 위해서, 상기 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-NHS와 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)를 각각 같은 몰수 (0.013 mmol)로 취한 다음 각각 같은 양의 DMSO (100 μ L)로 녹인 후, 여기에 H₂O를 용액이 혼탁해질 때까지 적가하면서 혼탁점(cloudy point)까지 적가된 H₂O의 양을 측정하였다.

[0181] 그 결과로서, 종래기술에 따른 화합물인 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-NHS는 22 μ L의 물을 적가하였을 때 용액이 혼탁해지는 반면, 앞서 제조한 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)는 70 μ L의 물이 적가될 때까지 용액이 혼탁해지지 않았으며, 이를 통해 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)가 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-NHS 보다 DMSO와 H₂O에 더 잘 녹는 것을 알 수 있으며, 상세한 결과를 아래 표 3에 나타내었다.

표 3

 <i>o</i>-TEMPO-Bz-C(O)-NHS	분자량 [g/mol]	무게 [mg]	몰수 [mmol]	DMSO (μ L)	H ₂ O (μ L)
	388.46	5.0	0.013	100	22
 <i>p</i>-TEMPO-Bn-Suc-NHS (2)	분자량 [g/mol]	무게 [mg]	몰수 [mmol]	DMSO (μ L)	H ₂ O (μ L)
	474.55	6.0	0.013	100	70

[0183] 이러한 용해도 특성은 펩타이드와 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물을 반응시킬 때 펩타이드를 녹일 수 있는 DMSO/H₂O에서 시약이 충분히 녹는 성질이 있어야 콘주게이션 반응이 잘 일어나므로 이들 용매에서의 용해도 특성은 단백질 분석에 있어, 매우 중요한 성질이라 할 수 있다.

[0185] < 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물의 질량분석을 통한 펩타이드 분석 실험 >

[0186] 본 발명에 따른 상기 자유라디칼 개시 가능 치환기를 가지는 화합물을 이용하여 몇가지 펩타이드(Angiotensin II, des-Pro²-bradykinin, Kinetensin, Glycoprotein IIb)에 대해 MS/MS와 MS³ 실험을 실시하였다.

[0187] 각 펩타이드들에 대해 앞서 제조된 *p*-TEMPO-Bz-Suc-를 결합시킨 후, 이들 펩타이드들의 +1가, +2가 이온들에 대해 이온트랩 질량분석기에서 MS/MS와 MS³ 실험을 시행하였다.

[0188] 이때 물에 녹인 펩타이드를 펩타이드의 5당량에 해당하는, DMSO 또는 아세토니트릴(acetonitrile)에 녹인 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS를 첨가하여 반응을 3시간 진행시켰다.

[0189] 보다 구체적으로, 상기 분석결과에 따른 질량분석 스펙트럼으로서, 도 3에서는 본 발명의 일 실시예에 따른 *p*-TEMPO-Bz-Suc-Angiotensin II (DRVYIHPF) +1가 이온의 (a) MS/MS, (b) MS³ 및 +2가 이온의 (c) MS/MS, (d) MS³ 질량분석 스펙트럼들을 도시하였다.

[0190] 이를 보다 상세히 살펴보면, 상기 도 3에서는 +1가 전구체 피크, (R M+H)⁺ m/z 1405.8에 대해 MS/MS를 실시한 결

과, C-O 결합이 끊어지면서 TEMPO 그룹이 떨어져 나가며, $(rM+H)^+$ m/z 1249.6가 생성되었고, 더불어 많은 펩타이드 골격분해 파편이온들이 관측되었다.

[0191] 여기서, M과 파편이온의 왼쪽 아래첨자 “R” 과 “r” 은 펩타이드 전구체 M과 파편이온들에 *p*-TEMPO-Bz-Suc-C(O)- 와 Bz-Sc-C(O)- 이 각각 붙어있음을 의미하며, 이 결과는 종래 기술에 따른 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-peptides에서 일어났던 현상과 현저히 다른 결과로 볼 수 있다.

[0192] 즉 상기 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-peptides에서는 MS/MS때 오로지 C-O 결합분해만 선택적으로 일어나서, 파편이온들은 관측되지 않았으며, MS³ 실험을 시행할 때만, 다종의 파편이온들이 관측되었다. 하지만, 상기 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS를 결합시키는 경우, (*p*-TEMPO-Bz-Suc-C(O)-Angiotensin II 의 경우), C-O 결합 동일분해 (homolysis) 뿐만 아니라, 연속적으로 펩타이드 골격분해가 일어나 $(rM+H)^+$ 와 많은 골격파편이온들이 관측되었다.

[0193] 도 3에서 보여지는 바와 같이, 펩타이드 골격분해 파편이온들은 주로 **a**-와 **c**-타입의 이온들로 나타나고 있다. 예를 들어, $r\mathbf{a}_3^+$, $r\mathbf{a}_4^+$, $r\mathbf{a}_5^+$, $r\mathbf{a}_6^+$, $r\mathbf{a}_7^+$, 등과 $r\mathbf{c}_7^+$ 등이 관측되었으며, 이들은 C-O 결합분해가 일어나고, 이 분해로 인해 생성된 벤질 라디칼(Bz-Suc-C(O)-peptide)이 추가적인 충돌활성 없이도 연속적으로 골격분해를 일으켜 생성된 것이다.

[0194] 이것은 종래 기술에 따른 상기 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-peptides 이 음이온모드에서 MS/MS에서 많은 펩타이드 골격분해를 일으킨 것과 동일한 현상이다. 이는 기존의 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-가 *p*-TEMPO-Bz-Suc-C(O)-로 변환되면서 생성된 현상인데, 벤젠링에서의 TEMPO 그룹의 위치가 ortho에서 para 위치로 변한 것은 아무런 영향을 미치지 아니한 것이고, 오로지 *o*-TEMPO-Bz-C(O)-peptides의 벤젠고리에 알콕시 카르보닐기가 치환되어 생성되는 라디칼이 상대적으로 안정한 반면, 본 발명에서의 상기 *p*-TEMPO-Bn-Suc-NHS의 벤젠고리에는 알콕시 카르보닐기 대신 알킬기가 치환되어 있어 열역학적으로 더 불안정한 라디칼을 생성시킴으로써 일어난 현상이다.

[0195] 한편, 상기 벤젠링에서의 ortho/para에 따른 치환기 위치는 영향이 없다는 것은 이미 보고된 바 있으므로, 이와 같이 벤젠고리의 연결기를 바꿈으로써, 생성되는 벤질 라디칼의 열역학적 안정성을 조절함으로써 두단계 골격분해가 일단계 골격분해로 유도될 수 있다.

[0196] 상기 도 3a와 3b를 비교해 볼 때 *p*-TEMPO-Bz-Suc-C(O)- 이 결합된 펩타이드의 경우, MS/MS와 MS³의 파편이온의 골격분해 양상이 매우 비슷함을 쉽게 관측할 수 있는데, 각각의 파편이온들의 절대세기는 물론 다르지만, 상대세기들의 패턴은 도 3a와 3b가 매우 유사하다.

[0197] 이는 *p*-TEMPO-Bz-Suc-C(O)- 이 결합된 펩타이드의 경우, 두 단계로 일어나던 펩타이드 골격분해가 일단계에서 연속적으로 발생하고 있음을 드러내는 증거로 판단된다.

[0198] 또한, 라디칼 기반 펩타이드 질량분석법의 특징인 small-group 손실이 소위 (M-X)⁺ 지역에서 광범위하게 관측되었다. 예를 들어, -44 Da (CO₂) 손실은 Asp(D)으로부터, -29 Da (C₂H₅) 손실과 56 Da C₄H₈) 손실은 Ile(I)로부터, -86 Da (C₃H₈N₃) 손실은 Arg(R)으로부터, -106 Da (C₇H₆O) 손실은 Tyr (Y)으로부터 도 1의 소위 (M-X)⁺ 지역에서 관측되고 있다. 또한, 펩타이드 골격분해 파편이온 주변의 small group 손실이 관측되었다: $(r\mathbf{a}_1-44)^+$, $(r\mathbf{a}_5-56)^+$, $(r\mathbf{a}_6-43)^+$, $(r\mathbf{a}_6-56)^+$, $(r\mathbf{a}_6-106)^+$, $(r\mathbf{a}_7-43)^+$, $(z_7-86)^+ = w_7^+$. 이들 파편이온 주변의 small group 손실은 Leu (-43Da), Asp (-44Da), Ile (-56Da), Arg (-86Da), Tyr (-106 Da)에서 발생한 것이다.

[0200] 도 3c와 3d는 +2가 Angiotensin II 이온의 MS/MS, MS³ 스펙트럼을 보여주고 있다. +1가 이온에 대한 도 3a와 3b에서 볼 수 있듯이, C-O 결합분해가 잘 일어나 $(rM+H)^{2+}$ 이온들이 관측되었으며, 이와 더불어 다양한 펩타이드 골격분해 파편이온들과 다양한 small group 손실에 해당하는 피크들이 관측되었다. 펩타이드 골격분해는 주로 **a**-, **x**-, **c**- and **z**-타입의 파편이온들이 관측되었다.

[0201] 예를 들어, $(x_5-18)^{2+}$, z_7^{2+} , $r\mathbf{a}_6^{2+}$, $r\mathbf{a}_7^{2+}$, z_3^+ , x_3^+ , z_4^+ , $r\mathbf{a}_3^+$, $(r\mathbf{c}_3-18)^+$, $(r\mathbf{a}_1-44)^+$, z_4^+ , $(z_4-29)^+=w_4^+$, z_5^+ , $(z_5-$

$56)^+$, ${}_ra_4^+$, ${}_ra_5^+$, ${}_rc_5^+$, $({}_ra_6-18)^+$, $({}_z_6-43)^+$, $({}_z_7-56)^+$, ${}_rc_7^+$, and ${}_ra_7^+$. 또한, **b**/**y**-타입의 파편이온들도 관측되었다:

[0202] y_2^+ , y_5^{2+} , y_3^+ , ${}_rb_2^+$, ${}_rb_5^+$, ${}_rb_6^+$. **b**/**y**-타입의 파편이온들이 관측된다는 것은 소위 Charge-directed 펩타이드 골격 분해 경로가 MS^3 시행시 충분한 충돌에너지가 공급되어 활성화된 결과로 생각된다.

[0203] 통상적으로, radical-directed 펩타이드 골격분해 경로가 charge-directed 펩타이드 골격분해 경로가 서로 경쟁하게 되는데, 본 발명에서는 radical-directed 펩타이드 골격분해 상대적으로 낮은 에너지 경로라서 낮은 충돌 에너지가 가해졌을 때는 이에 해당하는 골격분해 파편이온들이 생성되나, 충분히 높은 충돌에너지가 가해졌을 때는 점차로 charge-directed 펩타이드 골격분해 파편이온들이 점차 생성된 것으로 생각된다.

[0204] 한편, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 *p*-TEMPO-Bz-Suc-des-Pro2-bradykinin(RPGFSPFR)의 질량분석 스펙트럼을 도 4에 도시하였고, *p*-TEMPO-Bz-Suc-glycoprotein IIb fragment (296-306) (TDVNGDGRHDL)의 질량분석 스펙트럼을 도 5에 도시하였으며, *p*-TEMPO-Bz-Suc-kinetensin (IARRHPYFL)의 질량분석 스펙트럼을 도 6에 도시하였다.

[0205] 즉, 상기 도 4에는 +1가와 +2가 이온의 des-pro2-bradykinin(RPGFSPFR)을, 도 5에는+1가와 +2가 이온의 glycoproteinIIb fragment (296-306) (TDVNGDGRHDL)을, 상기 도 6에는 +1가와 +2가 이온의 kinetensin (IARRHPYFL)에 대한 MS/MS와 MS^3 양이온 스펙트럼들을 각각 보여주고 있다.

[0206] 상기 도 4 내지 도 6에서 볼 수 있듯이 모든 펩타이드들은 MS/MS에서 $({}_rM+H)^+$ 와 펩타이드 골격분해 파편이온들을 보여 주고 있는 바, 이는 상기 도 3의 Angiotensin II에서와 마찬가지로 MS^3 적용 없이 MS/MS만으로 많은 펩타이드 골격분해를 보여주고 있음을 보여주고 있다.

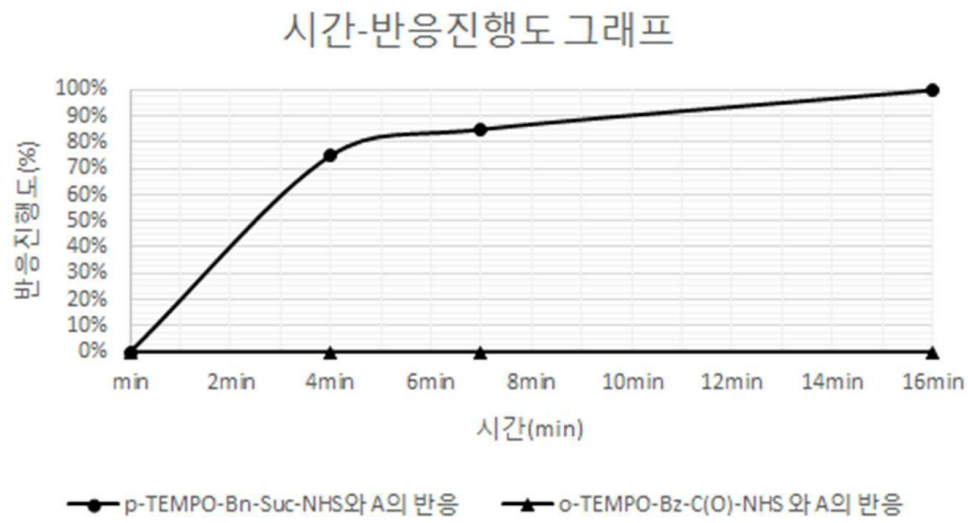
[0207] 또한, MS/MS와 MS^3 에서 나타나는 펩타이드 골격분해 파편이온들이 주로 **a**-, **c**-**x**-, **z**-타입의 이온들임을 확인할 수 있었고, 매우 적은 비율로 **b**-와 **y**-타입의 골격파편이온들이 관측되었다. 이 결과는 Angiotensin II와 마찬가지로 라디칼 기반 펩타이드 골격분해가 주로 일어나고 있음을 의미한다.

[0208] 또한, 상기 도 4 내지 도 6에서는 도 3에서와 마찬가지로 MS/MS와 MS^3 에서 많은 small group 손실을 소위 (M-X) 지역에서 관측할 수 있었다.

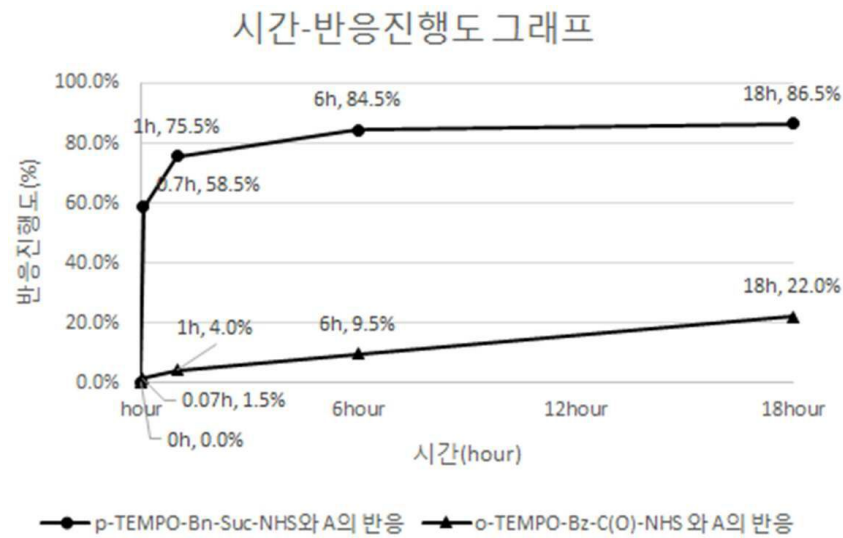
[0209] 예를 들어, 도 4(des-Pro2-bradykinin)에서는 Arg (-72, -86, -99 Da 손실), COOH+NH₃ (-62 Da), Asp (-44 Da 손실), Ser (-30 Da 손실), CO (-28 Da 손실), H₂O (-18 Da 손실)들이 관측되었고, 또한, 도 5(glycoprotein IIb)에서는 Arg (-72, -86, -99/100 Da 손실), Ile/Leu (-56 Da 손실), Asp/C-terminus (-45 Da, -62 (+NH₃)Da 손실), Leu (-43 Da 손실), NH₃ (-17 Da 손실), H₂O (-18 Da 손실)이 관측되었으며, 또한 상기 도 7(kinetensin)에서는 Tyr (-92, -106 Da 손실), Phe (-90 Da 손실), Arg (-72, -86/87, -99/100 Da 손실), His (-67 Da 손실), Ile/Leu (-56 Da 손실), Leu (-43 Da 손실), CO (-28 Da 손실), H₂O (-18 Da 손실), NH₃ (-17 Da 손실), Ala (-15 Da 손실) 등이 관측되었다.

도면

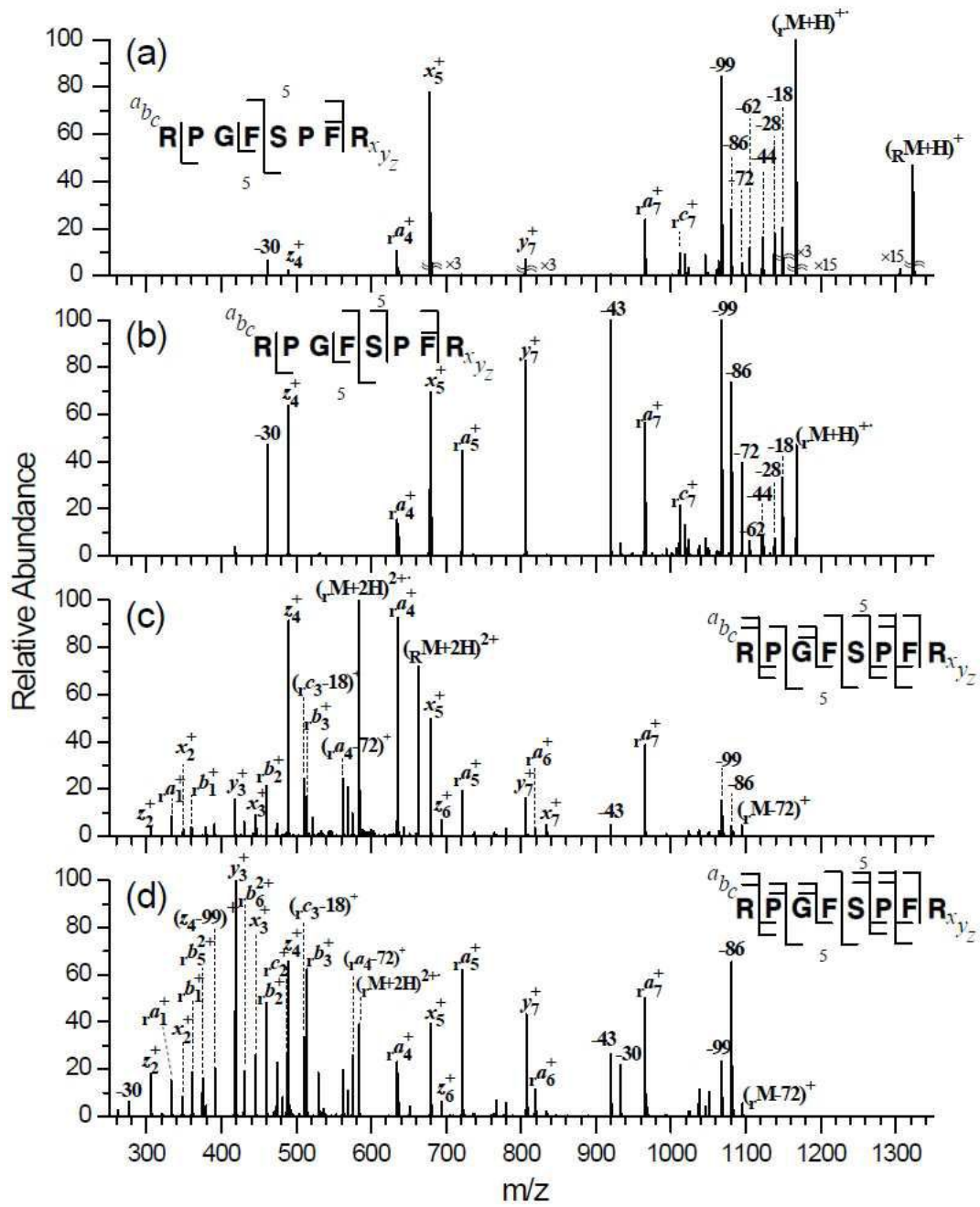
도면1



도면2



도면4



도면6

