(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0129742
(43) 공개일자 2018년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6848 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0150321(분할)
(22) 출원일자 2018년11월29일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-0133413
원출원일자 2016년10월14일
심사청구일자 2016년10월14일

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
임재민
경상남도 창원시 의창구 도계로 136, 201동 1003호 (명서동, 두산위브아파트)
이용일
경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 503동 404호 (상남동, 성원아파트)
김상진
대구광역시 달성군 논공읍 논공로11길 34-11
(74) 대리인
김순웅

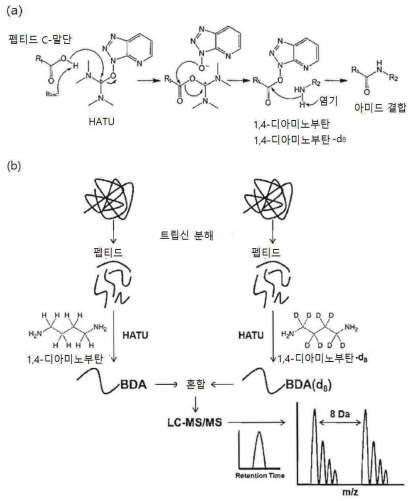
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **전자전달해리(ETD) 질량분석을 이용한 단백질의 정량분석법**

(57) 요 약

본 발명은 전자전달해리(ETD) 질량분석을 이용한 단백질의 정량분석법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 전자전달해리(ETD)-질량분석을 이용한 단백질의 정량분석법은 제1 펩티드 및 제2 펩티드의 C-말단 또는 카르복실기를 각각 디아민 및 동위원소로 표지된 디아민을 이용하여 아미드화 및 표지화를 동시에 수행함으로써, 전자전달해리(ETD) 질량분석의 효율을 증가시킴과 동시에 펩티드의 비교정량분석이 가능한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 커플링 시약의 존재 하에, 제1 펩티드와 디아민을 반응시켜 제1 펩티드의 C-말단을 아미드화하고, 제2 펩티드와 동위원소로 표지된 디아민을 반응시켜 제2 펩티드의 C-말단을 아미드화하는 단계; 및

(2) 상기 아미드화된 제1 펩티드 및 상기 아미드화된 제2 펩티드를 전자전달해리(ETD) 질량 분석기로 질량분석하여 ETD 스펙트럼을 얻고, 비교정량하는 단계;를 포함하는, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (1)단계에서, 커플링 시약은 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트인, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (1)단계에서, 제1 펩티드 및 제2 펩티드는 생물학적 시료 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류 유래의 시료로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 시료인 것을 특징으로 하는, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (2)단계에서, 비교정량은 질량 스펙트럼을 측정한 후, 피크 면적(peak area)을 계산하여 상대 정량하는 것인, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (1)단계에서, 디아민은 $(NH_2)_2C_nH_{2n}$ (n=1 내지 5)이고, 동위원소로 표지된 디아민은 $(NH_2)_2C_nX_{2n}$ (X= 중수소(D) 또는 삼중수소(T), n=1 내지 5)인, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (1)단계에서, 디아민은 1,2-디아미노에탄(1,2-diaminoethane, EDA), 1,4-디아미노부탄(1,4-diaminobutane, BDA), 또는 1,6-디아미노헥산(1,6-diaminohexane, HDA)인, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (1)단계에서, 디아민:커플링 시약:펩티드의 중량비는 500~2000:5~20:1~2인, 단백질 번역 후 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

(1) 커플링 시약의 존재 하에, 제1 펩티드와 디아민을 반응시켜 제1 펩티드의 C-말단을 아미드화하고, 제2 펩티드와 동위원소로 표지된 디아민을 반응시켜 제2 펩티드의 C-말단을 아미드화하는 단계; 및

(2) 상기 아미드화된 제1 펩티드 및 상기 아미드화된 제2 펩티드를 전자전달해리(ETD) 질량 분석기로 질량분석하여 ETD 스펙트럼을 얻고, 비교정량하는 단계;를 포함하는 단백질 번역 후 변형의 위치 지도화 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전자전달해리(ETD) 질량분석을 이용한 단백질의 정량분석법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, ETD 질량분석의 효율을 증가시키고 동시에 비교정량이 가능한 단백질의 정량분석법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 질량분석법은 중요한 단백질 분석 도구로서 식별(identification), 정량(quantification), 변형(modification) 등에 대한 다양한 단백질 정보를 제공하는 분석법이다. 특히, 최근에는 단백질의 비교 정량법(relative quantification) 및 번역 후 변형(post translational modification)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이에 따라 다양한 질량분석법이 개발되고 있다.

[0003] 현재 비교 정량법으로는 동위원소 표지법을 주로 이용하고 있으며, N-말단이나 시스틴을 가진 펩티드 등에 동위원소 표지 분자를 화학적으로 결합시키는 기술을 이용한다. 대표적으로는 N-말단 동위원소 태그법(NIT), 이중질량 태그법(TMT), 동위원소-코드된 친화도 태그법(ICAT) 등이 이용되고 있다. 또한, C-말단 펩티드에 동위원소를 표지하는 방법으로는 트립신 단백질 분해효소를 이용한 ^{18}O-원자의 C-말단 펩티드 표지법이 개발되어 있다. 이러한 기술은 대부분 정확한 분자량 정보 및 충돌유발분해(collision-induced dissociation, CID)에 의한 고유한 조각 이온을 바탕으로 단백질을 식별 및 정량을 하는 기술이다. 그러나, 최근에는 단백질의 변역 후 변형(PTM)에 대한 연구가 활발히 진행되어 단백질의 기능과 역할이 단백질의 구조적인 면에서 훨씬 복잡한 수준에서 이루어진다는 것이 밝혀졌다. 이러한 PTM의 연구에는 단백질의 특정 아미노산에 결합하는 변형 분자의 종류 및 변형 위치를 정확히 밝히는 위치 지도화(site mapping) 연구가 필수적으로 이루어져야 한다. 이를 위해, 2004년 헌트(Hunt) 교수는 전자전달분해법(electron transfer dissociation, ETD)을 개발하여 단백질 PTM의 위치 지도화 연구에 공헌을 한 바 있다. 이러한 ETD 법은 분석하고자 하는 펩티드의 전하상태가 높을수록 스펙트럼 해석에 보다 용이한 결과를 제공한다. 그러나, 대부분의 상향식 단백질 분석에서는 티로신을 이용하며, 생성되는 전하상태는 대부분 2+ 이온이기 때문에 ETD 법을 적용하기 어려운 단점이 있다. 또한, 이와 더불어 펩티드 변형, 위치 지도화 등의 정보를 제공하여 단백질의 번역 후 변형(PTM)을 밝히기 위한 비교정량적 방법에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) KR 10-2004-0082273

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 단백질의 정량분석법에 대해 탐색하던 중, 제1 펩티드 및 제2 펩티드를 각각 디아민 및 동위원소로 표지된 디아민을 이용하여 아미드화 및 표지화를 동시에 수행할 경우, 전자전달해리(ETD) 질량분석의 효율을 증가시킴과 동시에 펩티드의 비교정량분석이 가능한 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명은 전자전달해리(ETD) 질량분석을 이용한 단백질의 비교정량분석법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서,

[0008] 본 발명은,

[0009] (1) 커플링 시약의 존재 하에, 제1 펩티드를 디아민으로 처리하고, 제2 펩티드를 동위원소로 표지된 디아민으로 처리하여 각각 아미드화하는 단계; 및

[0010] (2) 상기 아미드화된 제1 펩티드 및 제2 펩티드를 질량분석기로 비교정량하는 단계;를 포함하는, 단백질의 비교정량분석법을 제공한다.

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명은 (1) 커플링 시약의 존재 하에, 제1 펩티드를 디아민으로 처리하고, 제2 펩티드를 동위원소로 표지된 디아민으로 처리하여 각각 아미드화하는 단계; 및 (2) 상기 아미드화된 제1 펩티드 및 제2 펩티드를 질량분석기로 비교정량하는 단계;를 포함하는, 단백질의 비교정량분석법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 단백질 시료를 각각 디아민 및 및 동위원소로 표지된 디아민을 이용하여 동시에 아미드화 및 표지화를 수행함으로써 전자전달해리(ETD) 질량분석의 효율을 증가시킴과 동시에 단백질의 비교정량 분석이 가능한 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 **(1)단계**는 커플링 시약의 존재 하에 제1 펩티드를 디아민으로 처리하고, 제2 펩티드를 동위원소로 표지된 디아민으로 처리하여 각각 아미드화 및 표지화를 동시에 수행하는 단계이다.

[0015] 상기 커플링 시약은 펩티드 커플링(coupling) 화학에 사용되는 아미드화 시약으로, 펩티드의 카르복실산으로부터 에스테르기를 생성한다. 이 후, 디아민의 반응을 통해 아미드 결합을 형성할 수 있다. 상기 커플링 시약으로는 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트(1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, HATU)을 사용하는 것이 바람직하다.

[0016] 상기 제1 펩티드 및 제2 펩티드는 동일하거나 서로 다른 종류의 펩티드일 수 있으며, 각각 합성된 또는 생물학적 시료 유래의 단백질을 단백질분해효소로 분해하여 생성된 것일 수 있다.

[0017] 상기 생물학적 시료는 단백질을 포함하는 시료로서, 비교정량분석을 원하는 시료일 수 있고, 구체적으로는 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 및 어류 등으로부터 유래된 시료일 수 있다.

[0018] 상기 단백질은 생물의 몸을 구성하는 고분자 유기물로 수많은 펩티드의 연결체이다. 널리 세포에 존재하고, 타액, 위액, 혈액 등의 분비액, 소화관 점막, 턱밑선 및 뇌하수체 등의 유사성 장기, 기타 결합조직, 식물의 종자, 세균의 세포벽 등에도 포함되어 있다. 피검사체로부터 얻어진 단백질을 3차 구조로 변성시키기 위해서는 환원(reduction) 및 알킬화(alkylation) 과정 같은 시료 전처리 과정을 거칠 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질은 디티오트레이톨(Dithiothreitol, DTT)을 가하여 환원될 수 있으며, 상기 환원된 단백질에 아이오도아세트아마이드(iodoacetamide)를 가하여 알킬화시킬 수 있다. 또한, 상기 단백질의 변성 과정은 단백질을 약 100℃에서 수분 동안 가열하는 방법으로 수행될 수 있다.

[0019] 상기 단백질분해효소는 단백질에 직접 작용하여, 단백질을 펩티드 단위로 분해하는 효소이다. 그 종류로는 트립신, 펩신, 키모트립신, 파파인, 피신, 브로멜라인, 수브틸펩티다아제 A, 아스페르길로펩티다아제 A, 클로스트리디오펩티나아제 등이 있으며, 카르복실기 쪽의 사슬을 절단하는 트립신인 것이 바람직하다.

[0020] 상기 디아민은 $(NH_2)_2C_nH_{2n}$ (n=1 내지 5)일 수 있으며, 바람직하게는 1,2-디아미노에탄(1,2-diaminoethane, EDA), 1,4-디아미노부탄(1,4-diaminobutane, BDA), 또는 1,6-디아미노헥산(1,6-diaminohexane, HDA)일 수 있다. 또한, 상기 동위원소로 표지된 디아민은 $(NH_2)_2C_nX_{2n}$ (X= 중수소(D) 또는 삼중수소(T), n=1 내지 5)일 수 있으며, 바람직하게는 1,2-디아미노에탄-d4(1,2-diaminoethane-d4, EDA-d4), 1,4-디아미노부탄-d8(1,4-diaminobutane-d8, BDA-d8), 또는 1,6-디아미노헥산-d12(1,6-diaminohexane-d12, HDA-d12)일 수 있다.

[0021] 상기 디아민:커플링 시약:펩티드의 중량비는 500~2000:5~20:1~2인 것일 수 있으며, 1000:10:1인 것이 바람직하다. 상기 중량비일 때, 가장 우수한 아미드화 효율을 나타낼 수 있다.

[0022] 상기 아미드화는 펩티드의 분자 내로 아미드기를 도입하는 것으로, 펩티드의 C-말단 또는 카르복실기에 디아민을 반응시켜 수행될 수 있다. 상기 아미드화를 수행함으로써 3+의 전하 상태를 갖는 이온 조각을 생성할 수 있으며, 이를 통해 우수한 전자전달해리(ETD)-질량 스펙트럼을 얻을 수 있다. 또한, 동위원소로 표지된 디아민을 처리할 경우, 펩티드의 아미드화 및 표지화를 동시에 수행할 수 있다. 일 예로, 동위원소가 표지된 디아민을 처리하여 디아민의 아민기와 펩티드의 C-말단 또는 카르복실기를 화학반응시킴으로써 아미드 결합을 형성함과 동시에 동위원소로 표지화할 수 있다.

[0023] 상기 **(2)단계**는 상기 아미드화된 제1 펩티드 및 제2 펩티드를 질량분석기로 비교정량하는 단계이다.

[0024] 상기 질량분석기는 화합물의 질량을 측정하는 분석 기기로서 화합물을 하전시켜 이온화한 후, 질량 대 전하량을 측정하여 화합물의 분자량을 결정하게 된다. 화합물을 이온화하는 방법으로는 전자빔을 이용하는 전자이온화법, 고속의 원자를 충돌시키는 방법 및 레이저를 이용하는 방법 등이 있다. 상기 질량분석기는 전자전달해리(electron-transfer dissociation) 또는 충돌유도해리(collision induced dissociation, CID) 질량분석기일 수 있으며, ETD 질량분석기인 것이 바람직하다.

[0025] 상기 질량분석법은 단백질의 식별과 정량분석에 주로 사용된다. 충돌유도해리(CID)와 전자전달해리(ETD)의 분석방법은 단백질의 변역 후 변형(PTM)과 위치 지도화에 상호보완적인 정보를 제공한다. 상기 ETD 분석방법은 1+, 2+ 전하상태인 트립신으로 분해된 펩타이드 분석에 비효율적이다. 그러나, 상기 펩티드를 디아민으로 아미드화할 경우, 3+의 전하 상태를 생성할 수 있으며, 이를 통해 우수한 ETD-질량 스펙트럼을 얻을 수 있다. 또한, 동위원소로 표지된 디아민을 처리할 경우, 펩티드의 아미드화 및 표지화를 동시에 수행할 수 있어 서로 다른 펩티드의 질량을 비교정량할 수 있다. 따라서, 본 발명의 질량분석법을 통해 서로 다른 생물학적 조건을 갖는 단백질의 번역 후 변형(PTM)과 정량분석을 동시에 할 수 있는 비교정량이 가능하다.

[0026] 상기 질량분석법에 있어서, 피크의 면적(peak area)은 성분 물질의 농도에 비례하므로, 피크의 면적을 계산하여 성분 물질의 농도를 정량 분석할 수 있다.

[0027] 상기와 같이, 본 발명의 단백질의 비교정량분석법은 펩티드의 ETD 조각화 효율을 증가시키며, 동시에 펩티드의 비교정량분석을 수행할 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 전자전달해리(ETD)-질량분석을 이용한 단백질의 정량분석법은 제1 펩티드 및 제2 펩티드의 C-말단 또는 카르복실기를 각각 디아민 및 동위원소로 표지된 디아민을 이용하여 아미드화 및 표지화를 동시에 수행함으로써, 전자전달해리(ETD) 질량분석의 효율을 증가시킴과 동시에 펩티드의 비교정량분석이 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 1,4-디아미노부탄(1,4-diaminobutane, BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(1,4-diaminobutane-d_8, BDA-d_8)를 이용한 (a) 펩티드의 C-말단 또는 카르복실 변형에 대한 메카니즘, 및 (b) 동위원소 표지에 의한 비교정량분석 실험 단계를 나타내는 도이다.

도 2는 (a) 원형, (b) EDA 변형, (c) BDA 변형, 및 (d) HDA 변형에 따른 전하상태를 나타내는 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 질량 스펙트럼을 나타내는 도이다.

도 3은 (a) 원형, (b) EDA 변형, (c) BDA 변형, 및 (d) HDA 변형에 따른 전하상태를 나타내는 트립신 처리 오브알부민(Ovalbumin) 펩티드의 질량 스펙트럼을 나타내는 도이다.

도 4는 (a) 원형, (b) EDA 변형, (c) BDA 변형, 및 (d) HDA 변형에 따른 전하상태를 나타내는 트립신 처리 오브알부민(Ovalbumin) 펩티드의 ETD(Electron-transfer dissociation) 질량 스펙트럼을 나타내는 도이다.

도 5는 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)로 변형된 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 동위원소 표지에 의한 비교질량 스펙트럼을 나타내는 도이다.

도 6은 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 및 1:8)에 따라 변형된 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 질량 스펙트럼, 및 (b) $[M+3H]^{3+}$의 질량 스펙트럼을 이용한 비교정량 검정선을 나타내는 도이다.

도 7은 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율, 1:1에 따라 변형된 GGLEPINFQTAADQAR 아미노산 서열을 갖는 오브알부민 펩티드의 동위원소 표지에 의한 비교질량 스펙트럼을 나타내는 도이다.

도 8은 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 및 1:8)에 따라 변형된 GGLEPINFQTAADQAR 아미노산 서열을 갖는 오브알부민 펩티드의 질량 스펙트럼, 및 (b) $[M+3H]^{3+}$의 질량 스펙트럼을 이용한 비교정량 검정선을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1. 시료의 준비**

[0032] C18-역상 마이크로스핀 컬럼을 네스트 사로부터 구입하였고, 시퀀싱 등급 변형된 트립신(trypsin)을 프로메가 사로부터 구입하였다. 달걀 흰자로부터 알부민을 얻고, 1,4-디티오트레이톨(1,4-dithiothreitol, DTT), 요오드아세트아미드, 안지오텐신 II 인간(angiotensin II human), 1,2-디아미노에탄(1,2-diaminoethane, EDA), 1,4-디아미노부탄(1,4-diaminobutane, BDA), 1,6-디아미노헥산(1,6-diaminohexane, HDA), 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트(1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, HATU), N-[(디메틸아미노)-1H-1,2,3-트리아졸로-[4,5-b]피리딘-1-일 메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트 N-옥시드(N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]pyridin-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide), 1,4-디아미노부탄 디히드로클로라이드 및 1,4-디아미노(부탄-d8) 디히드로클로라이드 (98%) 등의 기타 시약을 시그마-알드리치 사로부터 구입하였다.

[0033] **실시예 2. 단백질의 트립신 분해(Tryptic Digestion)**

[0034] 오브알부민(Ovalbumin)을 40 mM NH_4HCO_3 (10 μg/μl)에 용해한 후, 100℃에서 5분 동안 변성시킨 후 냉각하였다. 그 후 10mM 디티오트레이톨(Dithiothreitol, DTT)로 56℃에서 1시간 동안 환원시키고, 실온의 암흑속에서 45분 동안 55mM 아이도아세트아미드로 알킬화하였다. 시퀀싱 등급 트립신을 40 mM NH_4HCO_3에 가한 후, 37℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다 (단백질: 효소=50:1). 트립신 분해 후, 생성된 펩티드를 1% TFA(트리플루오로아세트산)로 산성화하였고, C18-역상 마이크로스핀 컬럼을 이용하여 탈염하고 건조시켰다.

[0035] **실시예 3. 펩티드의 C-말단 또는 카르복실의 아미드화 변형**

[0036] 실시예 2에 따른 건조된 펩티드를 10 μl의 80% 아세토니트릴에 용해시킨 후, DMF 내 100 μl의 1M 디아민(EDA, BDA, 및 HDA)을 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후, DMF 내 10 μl의 0.1M HATU를 첨가하였고, 다시 5분 동안 교반한 후, 실온에서 하룻밤 동안 반응시켰다 (디아민:HATU:펩티드 비율=1000:10:1). 아미드화된 펩티드를 C18-역상 마이크로스핀 컬럼을 이용하여 탈염하였다.

[0037] **실시예 4. 동위원소를 이용한 펩티드의 C-말단 또는 카르복실의 표지화**

[0038] 실시예 2에 따른 건조된 펩티드를 80% DMF 내 100 μl의 100 mM 1,4-디아미노부탄 디클로라이드 또는 100 mM 1,4-디아미노(부탄-d_8) 디클로라이드에 용해시켰다. 5분 동안 교반한 후, DMF 내 20μl의 0.1M HATU를 첨가하였고, 다시 5분 동안 교반한 후, 실온에서 하룻밤 동안 반응시켰다(디아민:HATU:펩티드 비율=2000:200:1). 아미드화된 펩티드를 C18-역상 마이크로스핀 컬럼을 이용하여 탈염하였다.

[0039] **실시예 5. 질량 스펙트럼을 이용한 비교정량분석**

[0040] C-말단 변형된 펩티드 분석을 LTQ Orbitrap XL ETD(서모피셔 과학) 질량 분석기를 이용하여 수행하였다. 또한, C-말단 변형된 펩티드의 정량 분석을 나노-LC 및 나노-전기방사 이온화 시스템을 구비한 LCQ fleet(서모피셔 과학) 질량분석기를 이용하여 수행하였다. 시료를 물 내 0.1% 포름산에 용해한 후, 변형된 펩티드 시료를 오토 샘플러를 이용하여 주입하고, 상대 정량의 시료를 샘플 루프에 주입하였다. C18 비드 셀프-팩 10 cm의 모세관 컬럼, 및 모세관 컬럼을 이용한 상대 정량 분석은 피코팁 에미터(PicoFritTM SELF/P, 300 mm, 팁:15±1 μm, New Objective)를 이용하여 수행하였고, 모세관 컬럼은 유량 150μl/분이었다.

[0041] 액체 크로마토그래피 시스템은 HPLC(고-성능 액체 크로마토그래피)를 이용하였고, 고정상으로 C18 역상 컬럼을

이용하고, 이동상으로 버퍼 A (0.1% 포름산) 및 버퍼 B (80% 아세토니트릴 내 0.1% 포름산)을 이용하였다. C-말단 변형된 펩티드의 식별은 체류 시간 90분이었고, 상대 정량 분석의 체류 시간은 180분이었다.

[0042] 질량 분석을 위해, 변형된 펩티드의 전체 질량 분석 범위는 150-2000 m/z이고, 상대 정량 분석의 전체 질량 분석 범위는 200-2000 m/z이었으며, 60000의 Orbitrap 해상도를 이용하였다. CID MS/MS는 분리 폭이 2이고, 정규화된 충돌 에너지는 38%이었고, 활성화 시간은 10ms이었다. 또한, ETD MS/MS는 분리 폭이 2이고, 정규화된 충돌 에너지는 35%이었고, 활성화 시간은 80ms이었다. 질량 분석기 모세관 파라미터 전압은 2.0kV이고, 온도는 200℃이었다. 상대 정량 분석은 CID MS/MS 단편을 이용하였고, 동적 배제 파라미터는 반복 지속 30초이고, 배제 지속 60초이었다.

[0043] C-말단 변형된 펩티드 분석은 LC-ESI-MS 스캔 유형의 모 질량 스캔을 이용하였고, 한번의 전체 MS 스캔 후, 시스템을 변경하여 2번의 MS/MS 스캔, CID MS/MS 스캔 및 ETD MS/MS 스캔을 수행하였다. C-말단 변형된 펩티드 정량 분석은 LC-ESI-MS의 데이터 의존 스캔을 수행하였다. 한번의 전체 MS 후, 각 5번의 CID MS/MS 스펙트럼을 5개의 가장 높은 피크 강도에서 스캔하였다.

[0044] 상기 실시예 1 내지 5에 따른 1,4-디아미노부탄(1,4-diaminobutane, BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(1,4-diaminobutane-d_8, BDA-d_8)를 이용한 (a) 펩티드의 C-말단 또는 카르복실 아미드화 변형에 대한 메카니즘, 및 (b) 동위원소 표지에 의한 비교정량분석 실험 단계를 도 1에 나타내었다.

[0045] 도 1(a)에 나타난 바와 같이, 펩티드의 C-말단 또는 카르복실 작용기를 HATU를 처리한 후, 선형의 지방족 디아민인 1,4-디아미노부탄(BDA) 또는 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)를 처리하여 아미드 결합을 형성할 수 있으며, 이를 통해 전하상태의 증가에 따른 ETD 스펙트럼의 효율을 평가할 수 있다. 또한, 도 1(b)에 나타난 바와 같이, 상이한 비율의 1,4-디아미노부탄(BDA) 또는 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)을 처리함으로써, 동위원소의 비를 통해 비교정량 실험을 수행할 수 있다.

[0046] **실험예 1.펩티드의 C-말단 또는 카르복실의 아미드화 변형 및 ETD 스펙트럼**의 효율 평가

[0047] **1.1 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드에 대한 평가**

[0048] DRVYIHPF의 아미노산 서열을 갖는 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드를 선형 지방족 아민인 1,2-디아미노에탄(1,2-diaminoethane, EDA), 1,4-디아미노부탄(1,4-diaminobutane, BDA), 및 1,6-디아미노헥산(1,6-diaminohexane, HDA)으로 각각 아미드화 변형시킨 후, 펩티드의 전하상태를 평가하였다.

[0049] (a) 원형, (b) EDA 변형, (c) BDA 변형, 및 (d) HDA 변형에 따른 전하상태를 나타내는 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 질량 스펙트럼을 도 2에 나타내었다.

[0050] 도 2에 나타난 바와 같이, 원형의 안지오텐신 II 펩티드는 2+ 이온 피크가 두드러지게 나타났으나 3+ 이온 피크는 상대적으로 낮게 나타났다. 이것은 원형의 안지오텐신 II 펩티드의 경우, 2+ 이온의 CID 질량 스펙트럼을 주로 나타낼 수 있으나, 3+ 이온에 의한 ETD 질량 스펙트럼은 얻기 어려운 것을 나타낸다. 그러나, 각각 EDA, BDA 및 HDA의 디아민으로 아미드화 변형시킨 안지오텐신 II 펩티드의 경우, 3+ 이온 피크가 크게 나타났으며 4+ 이온 피크도 나타내었다. 따라서, 선형의 디아민으로 아미드화 변형시킬 경우, ETD 스펙트럼을 효과적으로 나타낼 수 있음을 보여주었다.

[0051] **1.2 트립신 분해된 오브알부민 펩티드에 대한 평가**

[0052] 실제 단백질에 대한 ETD 스펙트럼의 효율 평가를 수행하기 위해, 오브알부민(Ovalbumin)을 트립신 분해하여 생성된 YPILPEYLQCVK의 아미노산 서열을 갖는 오브알부민 펩티드를 EDA, BDA 및 HDA로 각각 아미드화 변형시킨 후, 펩티드의 전하상태를 평가하였다. 또한 상기 아미드화 변형된 펩티드에 대한 ETD(Electron-transfer dissociation) 질량 스펙트럼 효율을 평가하였다.

[0053] (a) 원형, (b) EDA 변형, (c) BDA 변형, 및 (d) HDA 변형에 따른 전하상태를 나타내는 트립신 처리 오브알부민(Ovalbumin) 펩티드의 질량 스펙트럼을 도 3에 나타내었다.

[0054] 도 3에 나타난 바와 같이, 원형의 오브알부민 펩티드는 오직 2+ 이온의 피크만을 나타내었고, 3+ 이온 피크가 존재하지 않음을 나타내었다. 그러나, 각각 EDA, BDA 및 HDA의 디아민으로 아미드화 변형시킨 오브알부민 펩티드의 경우, 3+ 이온 피크를 크게 나타내었다. 따라서, 선형의 디아민으로 아미드화 변형시킬 경우, ETD 스펙트럼을 효과적으로 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0055] (a) 원형, (b) EDA 변형, (c) BDA 변형, 및 (d) HDA 변형에 따른 전하상태를 나타내는 트립신 처리 오브알부민(Ovalbumin) 펩티드의 ETD(Electron-transfer dissociation) 질량 스펙트럼을 도 4에 나타내었다.

[0056] 도 4에 나타난 바와 같이, 원형 펩티드는 오직 2+ 이온만을 가지기 때문에, 양질의 ETD 스펙트럼을 얻을 수 없었다. 그러나, 각각 EDA, BDA 및 HDA의 디아민으로 아미드화 변형시킨 오브알부민 펩티드의 경우, 3+ 이온을 주요 이온으로 가짐으로써 3+ 이온의 ETD 스펙트럼을 나타냈으며 또한, 다양한 이온 조각의 미세한 피크 분포도를 나타내었다.

[0057] 상기 결과로부터, 펩티드의 C-말단 또는 카르복실 기능기를 선형 지방족 아민인 1,2-디아미노에탄(EDA), 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,6-디아미노헥산(HDA)으로 각각 아미드화 변형시킬 경우, 전하 상태를 증가시켜 3+ 이온을 발생시킬 수 있으며, 이로 인해 3+ 이온 및 다양한 이온 조각의 미세한 ETD-질량 스펙트럼을 얻을 수 있음을 확인하였다.

[0058] **실험예 2. 동위원소를 이용한 펩티드의 C-말단 또는 카르복실 표지화 및 질**량 스펙트럼을 이용한 비교정량분석

[0059] **2.1 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드에 대한 평가**

[0060] 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 C-말단 또는 카르복실 기능기를 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 동위원소를 갖는 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)으로 각각 표지화한 후, 펩티드의 전하상태를 평가하였고, 비교정량 평가의 정량성을 검증하였다.

[0061] 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)으로 변형된 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 동위원소 표지에 의한 비교질량 스펙트럼을 도 5에 나타내었다.

[0062] 도 5에 나타난 바와 같이, 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)으로 변형된 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 경우, 8개의 중(heavy) 수소의 존재로 인해, 1,4-디아미노부탄(BDA)으로 변형된 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드에 비해 8 Da만큼 높은 질량 값을 나타내었고, 각각의 전하 상태에 있어서도 비교질량이 가능한 스펙트럼을 나타내었다. 특히, 3+ 이온의 전하 상태에서도 우수한 분해능으로 인해, 비교정량이 가능한 ETD 질량 스펙트럼을 얻을 수 있음을 나타내었다.

[0063] (a) 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 및 1:8)에 따라 변형된 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드의 질량 스펙트럼 및 (b) $[M+3H]^{3+}$의 질량 스펙트럼을 이용한 비교정량 검정선을 도 6에 나타내었다.

[0064] 도 6(a)에 나타난 바와 같이, 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율(8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 및 1:8) 변화에 따라 질량 스펙트럼은 각각 $[M+1H]^{1+}$, $[M+2H]^{2+}$, 및 $[M+3H]^{3+}$의 모두에서 우수한 분해능 및 좋은 비율 정량성을 나타내었다. 또한, 도 6(b)에 나타난 바와 같이, $[M+3H]^{3+}$의 질량 스펙트럼에 대한 비교정량 검정선에서 우수한 직선성 및 정량성을 나타내었다.

[0065]

[0066] **2.2 트립신 분해된 오브알부민 펩티드에 대한 평가**

[0067] 실제 단백질에 대한 비교정량분석의 효율을 평가를 수행하기 위해, 오브알부민(Ovalbumin)을 트립신 분해하여 생성된 GGLEPINFQTAADQAR의 아미노산 서열을 갖는 오브알부민 펩티드를 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)으로 각각 표지화한 후, 펩티드의 전하상태를 평가하였고, 이의 비교정량 평가의 정량성을 검증하였다.

[0068] 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율, 1:1에 따라 변형된 GGLEPINFQTAADQAR 아미노산 서열을 갖는 오브알부민 펩티드의 동위원소 표지에 의한 비교 질량 스펙트럼을 도 7에 나타내었다.

[0069] 도 7에 나타난 바와 같이, 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)으로 변형된 오브알부민 펩티드의 경우, 8개의 중(heavy) 수소의 존재로 인해, 1,4-디아미노부탄(BDA)으로 변형된 안지오텐신 II(angiotensin II) 펩티드에 비해 8 Da만큼 높은 질량 값을 나타내었고, 각각의 전하 상태에 있어서도 비교 질량이 가능한 스펙트럼을 나타내었다. 특히, 3+ 이온의 전하 상태에서도 우수한 분해능으로 인해, 비교 정량이 가능한 ETD-질량 스펙트럼

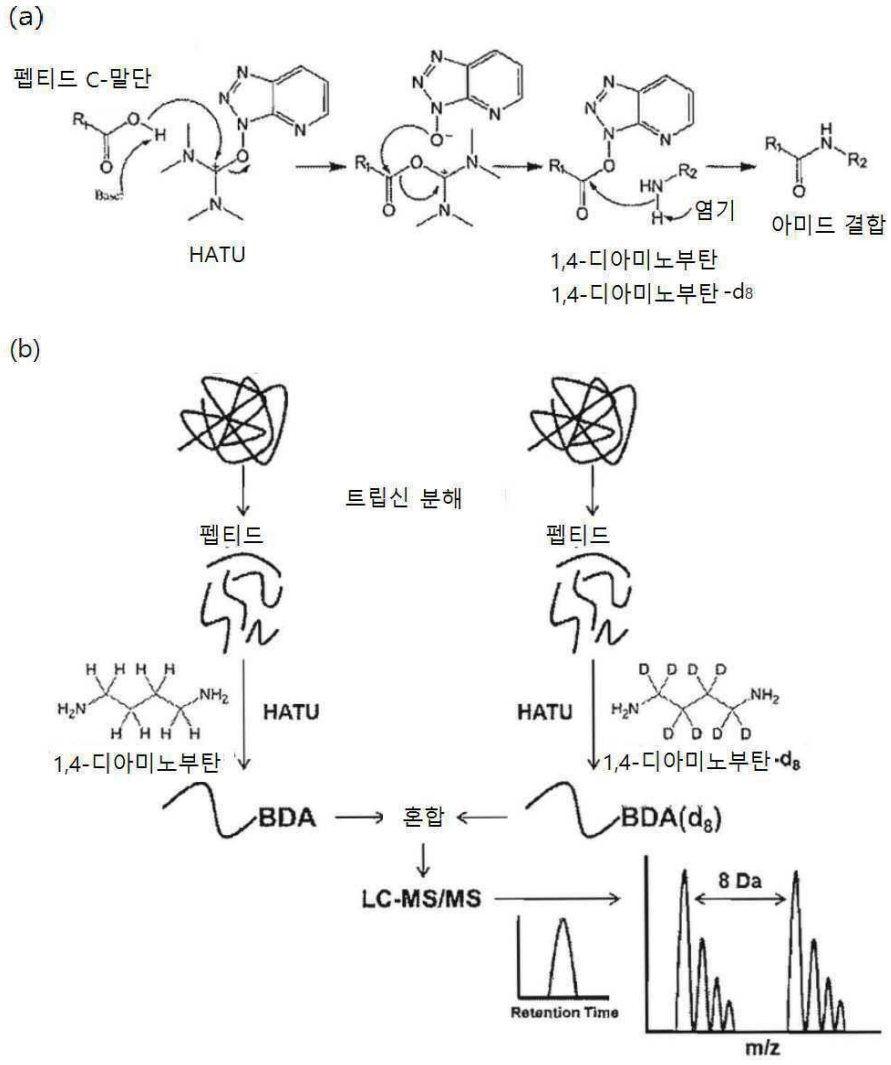
을 얻을 수 있음을 나타내었다.

[0070] (a) 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 및 1:8)에 따라 변형된 GGLEPINFQTAADQAR 아미노산 서열을 갖는 오브알부민 펩티드의 질량 스펙트럼, 및 (b) $[M+3H]^{3+}$의 질량 스펙트럼을 이용한 비교 정량 검정선을 도 8에 나타내었다.

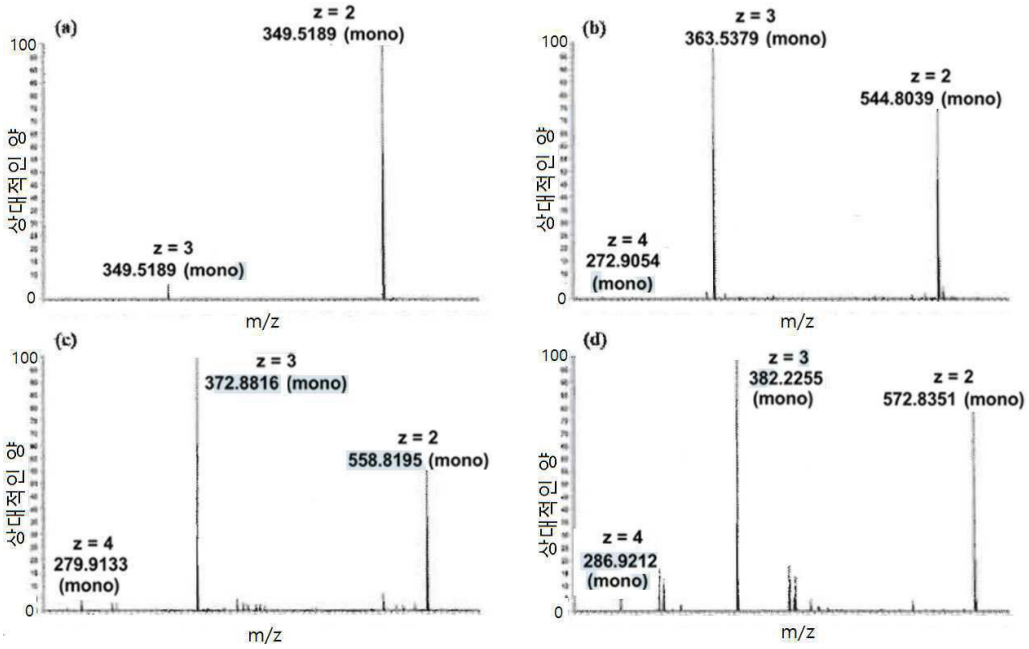
[0071] 도 8(a)에 나타난 바와 같이, 1,4-디아미노부탄(BDA) 및 1,4-디아미노부탄-d_8(BDA-d_8)의 비율(8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 및 1:8) 변화에 따라 질량 스펙트럼은 각각 $[M+1H]^{1+}$, $[M+2H]^{2+}$, 및 $[M+3H]^{3+}$의 모두에서 우수한 분해능 및 좋은 비율 정량성을 나타내었다. 또한, 도 8(b)에 나타난 바와 같이, $[M+3H]^{3+}$의 질량 스펙트럼에 대한 비교정량 검정선에서 우수한 직선성 및 정량성을 나타내었다.

도면

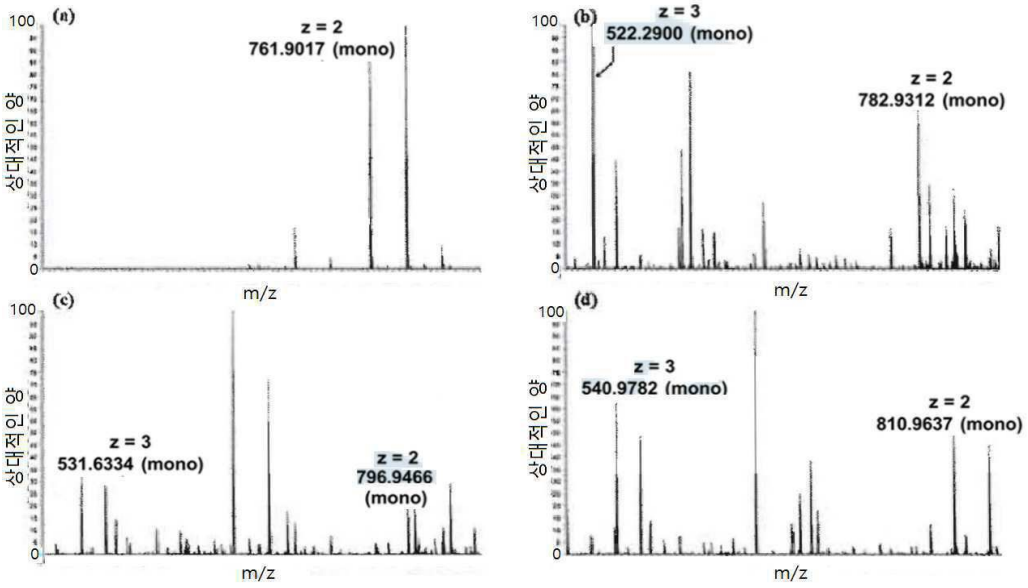
도면1



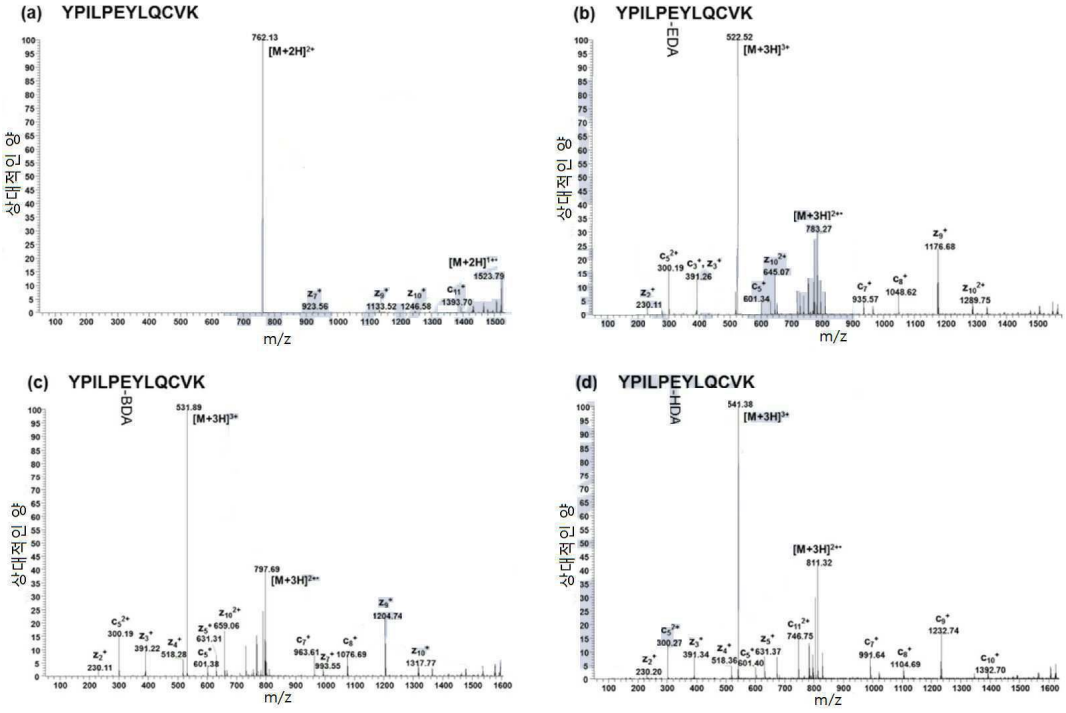
도면2


(a)
z = 2
349.5189 (mono)
z = 3
349.5189 (mono)
(b)
z = 3
363.5379 (mono)
z = 2
544.8039 (mono)
z = 4
272.9054
(mono)
(c)
z = 3
372.8816 (mono)
z = 2
558.8195 (mono)
z = 4
279.9133
(mono)
(d)
z = 3
382.2255
(mono)
z = 2
572.8351 (mono)
z = 4
286.9212
(mono)
상대적인 양
m/z
100
0

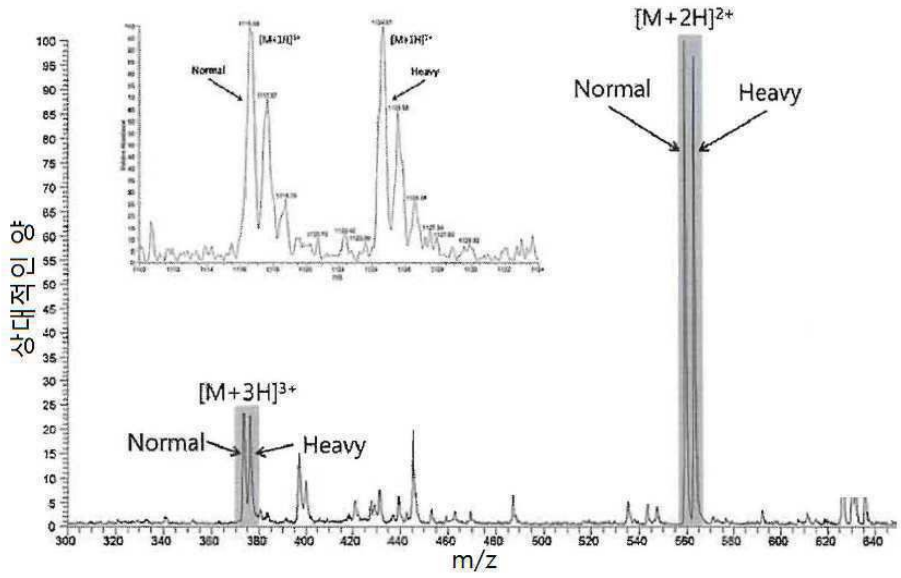
도면3


(a)
z = 2
761.9017 (mono)
(b)
z = 3
522.2900 (mono)
z = 2
782.9312 (mono)
(c)
z = 3
531.6334 (mono)
z = 2
796.9466
(mono)
(d)
z = 3
540.9782 (mono)
z = 2
810.9637 (mono)
상대적인 양
m/z
100
0

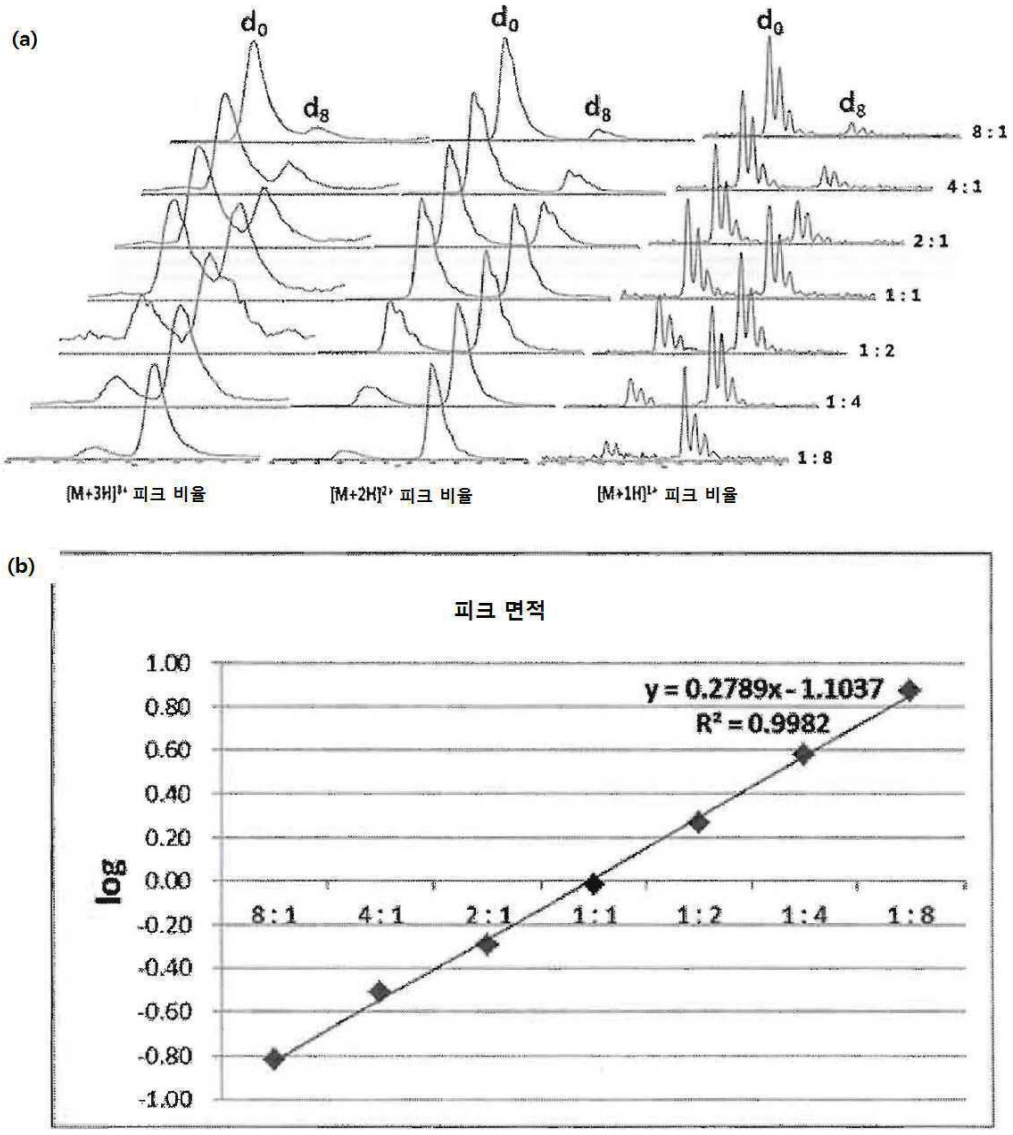
도면4


(a) YPILPEYLQCVK
762.13
[M+2H]2+
[M+2H]1+
1523.79
상대적인 양
m/z
(b) YPILPEYLQCVK
EDA
522.52
[M+3H]3+
[M+3H]2+
783.27
상대적인 양
m/z
(c) YPILPEYLQCVK
BDA
531.89
[M+3H]3+
797.69
[M+3H]2+
상대적인 양
m/z
(d) YPILPEYLQCVK
HDA
541.38
[M+3H]3+
[M+3H]2+
811.32
상대적인 양
m/z

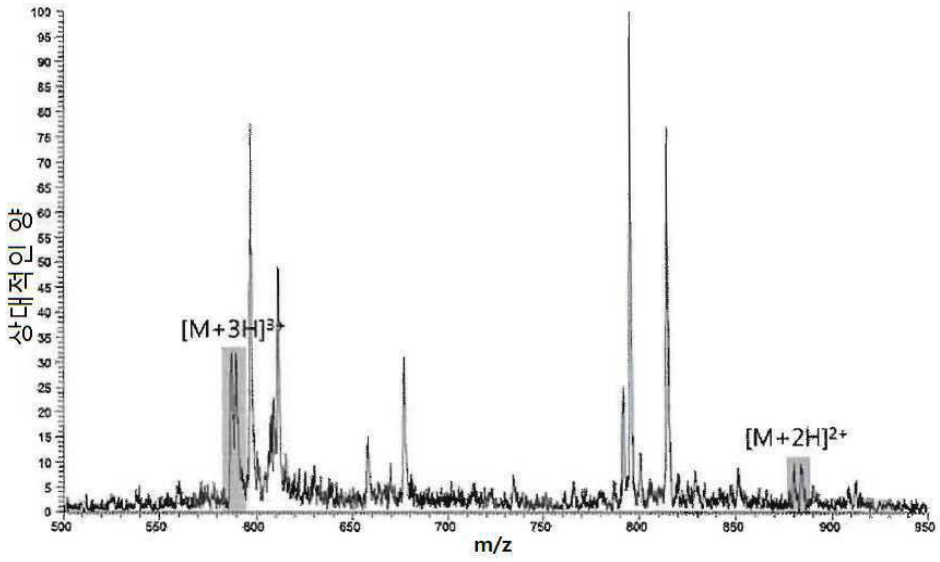
도면5


[M+2H]2+
Normal
Heavy
[M+3H]3+
Normal
Heavy
상대적인 양
m/z

도면6

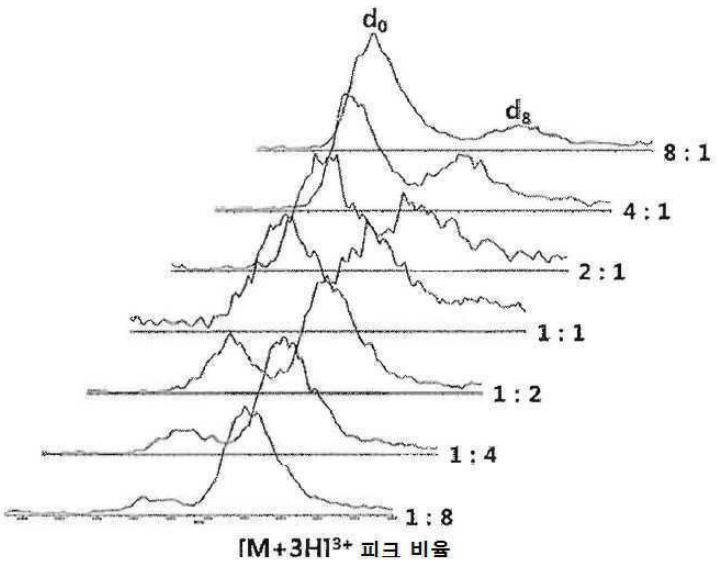

(a)
d0
d8
8 : 1
4 : 1
2 : 1
1 : 1
1 : 2
1 : 4
1 : 8
[M+3H]3+ 피크 비율
[M+2H]2+ 피크 비율
[M+1H]1+ 피크 비율
(b)
피크 면적
y = 0.2789x - 1.1037
R² = 0.9982
log
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
-0.20
-0.40
-0.60
-0.80
-1.00
8 : 1
4 : 1
2 : 1
1 : 1
1 : 2
1 : 4
1 : 8

도면7

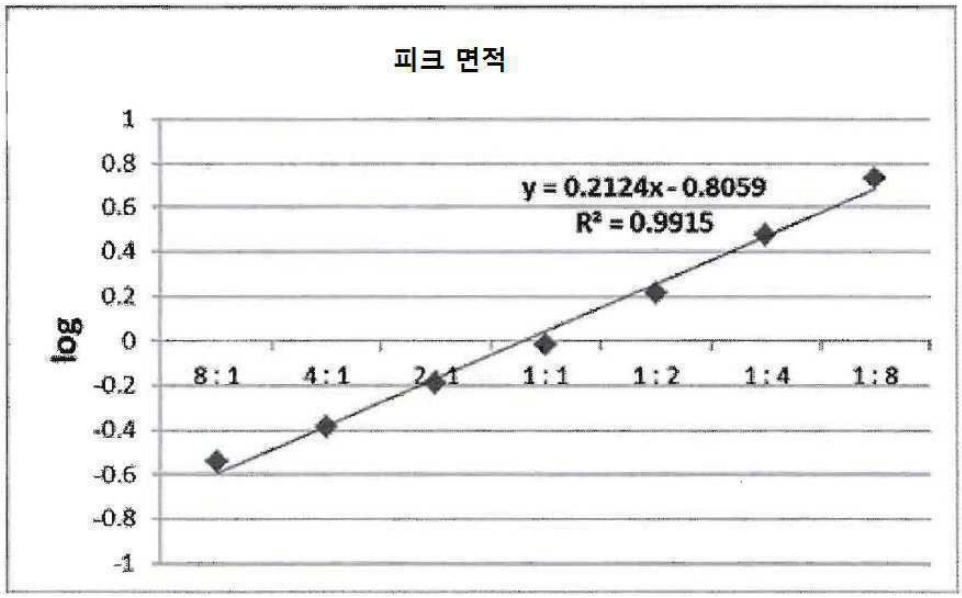

상대적인 양
[M+3H]3+
[M+2H]2+
m/z

도면8

(a)


d_0
d_8
8 : 1
4 : 1
2 : 1
1 : 1
1 : 2
1 : 4
1 : 8
$[M+3H]^{3+}$ 피크 비율

(b)


피크 면적
y = 0.2124x - 0.8059
R^2 = 0.9915
log
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
-1
8 : 1
4 : 1
2 : 1
1 : 1
1 : 2
1 : 4
1 : 8