



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0121616
(43) 공개일자 2014년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/00 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0038046
(22) 출원일자 2013년04월08일
심사청구일자 2013년04월08일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학교 20(퇴촌동)
(72) 발명자
임재민
경상남도 창원시 의창구 도계로 136, 201동 1003호 (명서동, 두산위브아파트)
이용일
경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 503동 404호 (상남동, 성원아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김종선, 이형석

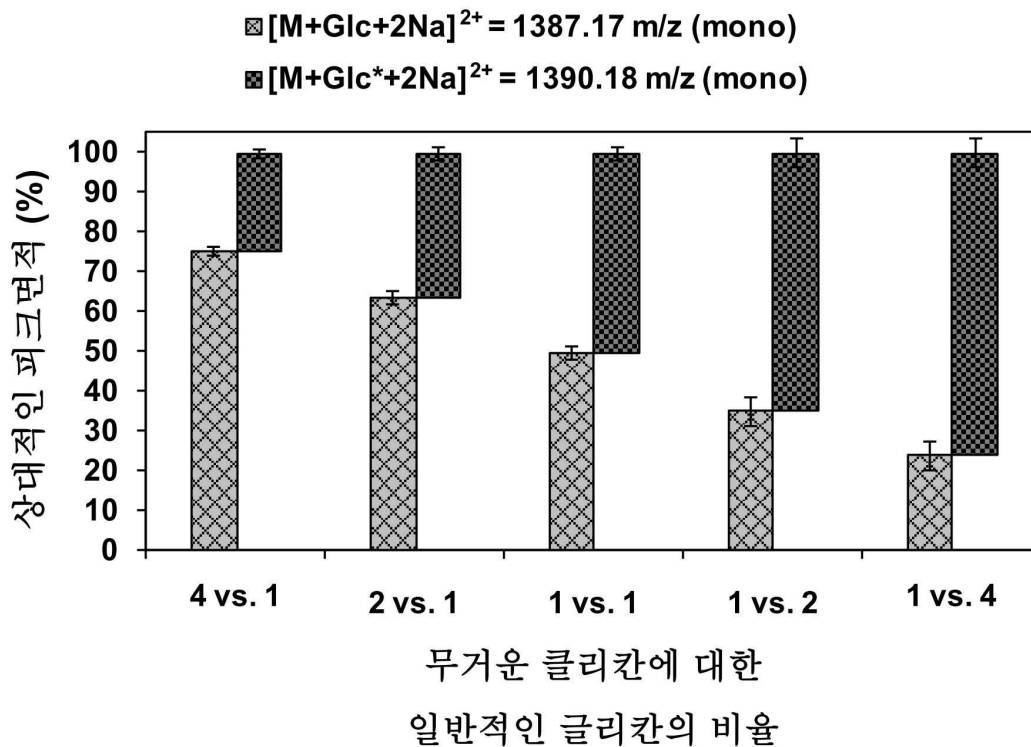
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 새로운 질량값을 갖는 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸과 이의 제조방법, 및 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석방법

(57) 요약

본 발명은 당단백질에 효소인, 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))를 첨가하여 가수분해 및 글리코시드전이시킨 N-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석 방법을 제공하는 것으로, 1390.18 m/z의 새로운 질량값을 갖는 N-연결형 글리칸은 글리칸의 비교정량 분석 시 내부표준물질로 활용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸의 비교정량 및 구조분석하는데 적용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

박성하

경상남도 창원시 의창구 도계로 136, 201동 1003호
(명서동, 두산위브아파트)

정수희

경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 삼계5길 30,
101동 1302호 (대동아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345146330

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원

연구과제명 Endoglycosedase 효소반응에 의한 N-linked 당단백체와 복합다당류의 분석법 개발

기 여 율 2/3

주관기관 창원대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029634

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소 지원사업

연구과제명 차세대 다기능성 산화물 하이브리드 재료개발 및 특성연구

기 여 율 1/3

주관기관 창원대학교 산학협력단

연구기간 2010.12.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

동위원소 표지된 글루코오스를 포함하고, 질량값이 1390.18 m/z인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 글리칸은 N-연결형 글리칸인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 동위원소 표지된 글루코오스는 효소반응에 의해서 포함되는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 N-연결형 글리칸은 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 효소는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 동위원소 표지된 글리칸을 이용하여 비교정량 질량분석하는 방법.

청구항 7

글리칸에 효소를 첨가하여 상기 글리칸을 가수분해시키는 단계; 및

동위원소로 표지된 글루코오스를 상기 가수분해된 글리칸에 첨가하여 글리코시드 전이시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 글리칸은 N-연결형 글리칸인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 효소는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))인 것을 특징으로 하는 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 N-연결형 글리칸은 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 11

제 7항에 있어서,

상기 동위원소 표지된 글리칸의 질량값이 1390.18 m/z인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 12

글리칸에 효소를 첨가하여 상기 글리칸을 가수분해시키는 단계;

제 1 글루코오스 및 동위원소로 표지된 제 2 글루코오스를 상기 가수분해된 글리칸에 첨가하여 글리코시드 전이시키는 단계; 및

상기 제 1 글루코오스를 포함하는 제 1 글리칸 및 상기 제 2 글루코오스를 포함하는 제2 글리칸을 포함하는 글리칸 혼합물을 제조하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 글리칸 혼합물에서 제 1 글리칸 및 제 2 글리칸의 질량차이는 6Da인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 제 1 글리칸 및 제 2 글리칸은 각각 N-연결형 글리칸인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 효소는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 16

제 14항에 있어서,

상기 N-연결형 글리칸은 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸인것을 특징으로하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 17

제 12항에 있어서,

상기 제 2 글리칸의 질량값이 1390.18 m/z인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸과 이의 제조방법, 및 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 동위원소 표지된 글루코오스(heavy glucose)와 결합된 N-연결형 글리칸을 통해 미시시료의 글리칸에 대한 비교정량 및 구조분석이 가능한 새로운 형태의 비교정량 질량분석법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 포스트 게놈 연구 시대가 시작되면서 과학은 단백질의 번역 후 변형(PTM)을 포함한 프로테오믹스 접근에 더욱 집중되기 시작했다. 그러나 대부분의 프로테오믹스 프로젝트는 단백질, 지질, 프로테오글리칸의 글리코실화반응에 대해 분석학적, 기능학적인 면에서 상세하게 설명하지 못해 왔다. 이러한 프로테오믹스 프로젝트의 단점을 보완하고 실질적인 생물학의 이해를 높이기 위하여 글리코믹스(glycomics)라고 불리는 당생물학(glycobiology), 당쇄공학(glycotechnology) 형태의 개념이 소개되었다. 글리코믹스는 당단백질의 글리칸을 연구하는 학문으로 현재 바이오시밀러와 같은 의학분야 연구에 핵심적인 연구분야이다. 글리코믹스에서 진행되고 있는 연구분야는 당단백질의 발현에 따른 글리칸의 구조와 생합성에 대해, 글리칸이 어떻게 정량적으로 변하는 지에 대해 결정하는 것으로, 글리칸의 정량적인 변화는 많은 질병의 진단과 연관되어 있기 때문에 글리칸의 정량 분석에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 글리칸의 정량 분석에 있어서, 고감도 분석법을 제공하는 중요한 분석기술 중 하나가 질량분석법(mass spectrometry, MS)이다. 질량분석기는 복잡한 글리칸의 구조 분석 및 비교정량을 분석하기에 빠르고 믿을 수 있는 분석정보를 제공하고있어 글리코믹스 연구 분야에 많이 이용되고 있다.

[0004] 일반적으로 질량분석법은 입자의 질량 값의 직접 측정 또는 스펙트럼 데이터를 이용한 다른 물리적 양의 측정으로, 입자의 질량 값을 결정한다. 질량 분석법은 흔히 이온화된 분자 또는 성분의 질량 대 전하 비를 결정하는 것을 포함한다. 이온화된 입자의 전하가 알려져 있다면, 질량 값들의 스펙트럼으로부터 입자의 질량을 결정할 수 있다.

[0005]

[0006] 지금까지 개발된 글리칸의 비교정량 질량분석법은 동위원소 표지를 이용한 ^{13}C 아이오도메테인($^{13}\text{CH}_3\text{I}$), QUIBL(Quantification by Isobaric Labeling), IDAWG(Isotopic Detection of Aminosugars With Glutamine)와 같은 기술로 생물학적으로 다른 조건의 시료에 대한 응용에 이용되고 있다. 그러나 이와 같은 분석법 외에 본 발명의 새로운 비교정량 질량분석법에 대한 요구가 있어 왔다. 따라서, 본 발명의 비교정량 질량분석법 개발은 향후 글리코믹스 연구의 획기적인 발전에 기여할 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) [문헌1] 미국공개공보 12/595888 (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.CAMBRIDGE, US) 2008.4.15

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은, 상기와 같은 요구에 부응하고자 개발된 것으로서, 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))의 가수분해 및 글리코실전이반응을 시킴으로써 새로운 질량값을 갖는 동위원소 표지된 글리칸을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명의 두번째 목적은 새로운 질량값을 갖는 동위원소 표지된 글리칸을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 세번째 목적은 새로운 질량값을 갖는 동위원소 표지된 글리칸을 이용한 N-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석법 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위한, 본 발명에 따른 글리칸은 동위원소 표지된 글루코오스를 포함하고, 질량값은 1390.18 m/z이다.

[0012] 바람직하게는 상기 글리칸은 N-연결형 글리칸이다.

[0013] 더욱 바람직하게는 상기 N-연결형 글리칸은 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸인것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸이다. 상기 동위원소 표지된 글루코오스와 글리칸은 효소반응에 의해서 결합되고, 상기 효소는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))인 것이 바람직하다. 또한, 본 발명은 상기 동위원소 표지된 글리칸을 이용하여 비교정량 질량분석하는 방법을 제공한다.

[0014] 상기의 두번째 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 동위원소 표지된 글리칸을 제조하는 방법은, 글리칸에 효소를 첨가하여 상기 글리칸을 가수분해시키는 단계;

[0015] 동위원소로 표지된 글루코오스를 상기 가수분해된 글리칸에 첨가하여 글리코시드 전이시키는 단계;를 포함한다.

[0016] 바람직하게는 상기 글리칸은 N-연결형 글리칸이고, 더욱 바람직하게는 상기 N-연결형 글리칸은 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸이다.

[0017] 가수분해 및 글리코시드전이 반응을 일으키는 상기 효소는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))인 것이 바람직하다. 상기 제조방법에 의한 결과물인, 동위원소가 표지된 글루코오스를 포함한 N-연결형 글리칸의 질량값은 1390.18 m/z이다.

[0018] 또한, 상기의 세 번째 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법은 본 발명은 글리칸에 효소를 첨가하여 상기 글리칸을 가수분해시키는 단계;

[0019] 제 1 글루코오스 및 동위원소로 표지된 제 2 글루코오스를 상기 가수분해된 글리칸에 첨가하여 글리코시드 전이시키는 단계; 및

[0020] 상기 제 1 글루코오스를 포함하는 제 1 글리칸 및 상기 제 2 글루코오스를 포함하는 제2 글리칸을 포함하는 글리칸 혼합물을 제조하는 단계; 를 포함한다. 상기 글리칸 혼합물에서 제 1 글리칸 및 제 2 글리칸의 질량 차이는 6 Da인 것이 바람직하다.

- [0021] 더욱 바람직하게는 상기 제 1 글리칸 및 제 2 글리칸은 각각 N-연결형 글리칸이고, 특히 바람직하게는 상기 N-연결형 글리칸은 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸이다.
- [0022] 상기 제 2 글리칸의 질량값은 1390.18 m/z이다.
- [0023] 상기 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법에서 상기 효소는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))인 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 당단백질에 효소인, 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(*endo-β-N-acetylglucosaminidases*(Endo-M))를 첨가하여 가수분해 및 글리코시드전이시킨 N-연결형 글리칸의 비교정량분석을 위한 새로운 방법을 제공할 수 있다.
- [0025] 기존의 글리칸의 비교정량 질량분석법과는 달리, 동위원소 표지된 글루코오즈($^{13}\text{C}_6$)와 결합한, 새로운 질량값(1390.18 m/z)을 갖는 N-연결형 글리칸의 동위원소 표지 비교정량 질량분석법으로 다양한 생물학적 시료에 적용이 가능할 것으로 보인다. 특히 본 기법은 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸만을 선택적으로 비교정량함으로써 생물학적인 원인을 규명하는데 중요한 역할을 할 수 있다는 특징이 있다. 또한, 동위원소가 표지된 글리칸을 얻을 수 있어 자연에 존재하는 글리칸에 대하여 동위원소가 표지된 글리칸은 질량스펙트럼의 방해로 피할 수 있어 비교대상 시료에 대한 글리칸 분석에 표준물질로 활용될 수 있는 조건을 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 Endo-M의 가수분해 및 글리코시드전이를 이용한 글리칸의 비교정량을 위한 글루코오즈 결합을 나타낸 것이다.
- 도 2는 Endo-M의 글리코시드전이를 이용한 글리칸의 비교정량을 위한 글루코오즈 결합 및 비교정량 질량분석법 기술개발의 요약도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 제 1 글루코오즈 및 제 2 글루코오즈가 결합된 글리칸의 질량스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 4는 제 1 글루코오즈 및 제 2 글루코오즈가 결합된 글리칸의 비교정량 실험을 나타낸 것이다.
- 도 5는 질량 분석법에 의한 6개의 단당류 수용체에 Endo-M의 가수분해 및 글리코실전이에 의한 글리칸 생성물의 상대전 피크 면적을 나타낸 것이다.
- 도 6은 질량 분석법에 의한 6개의 단당류 수용체에 Endo-M의 가수분해 및 글리코실전이에 의한 글리칸 생성물의 질량분석 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 7은 Endo-M의 글리코실화전이에 미치는 글루코오즈 농도의 효과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 Endo-M의 글리코실화전이에 미치는 반응시간의 효과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 MS/MS 스펙트럼에 의한 일반적인 글루코오즈가 표지된 N-링크형 글리칸의 구조적 특성을 나타낸 것이다.
- 도 10은 MS/MS 스펙트럼에 의한 무거운 글루코오즈가 표지된 N-연결형 글리칸의 구조적 특성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명은 동위원소 표지된 글루코오즈를 포함하고, 질량값이 1390.18 m/z인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸을 제공한다.
- [0029] 동위원소란, 아이소토프(isotope) 또는 동위체라고도 하며 서로 화학적으로 거의 구별할 수가 없으나 그것을 구

성하고 있는 원자의 질량이 서로 다른 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 일반적인 글루코오스는 $^{12}\text{C}_6$ 로 동위원소가 표지된 무거운 글루코오스인 $^{13}\text{C}_6$ 와는 원자번호는 같으나 서로 다른 질량을 갖는다.

- [0030] 글루코오스는 알데하이드기(aldehyde group)를 가지는 단당류의 일종으로, 일반적으로 포도당이라 한다. 글루코오스의 분자식은 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 로 탄소 수가 6개이기 때문에 육탄당(헥소오스, hexose)이라 부른다. 탄수화물은 그것을 구성하는 당의 수에 따라 단당류·이당류·다당류로 구분하는데, 포도당은 단당류의 일종으로 녹말을 형성하는 기본 단위가 되기도 한다. 글루코오스는 생체 내에서 세포 호흡을 통해 분해, 에너지를 생산하고, 그 에너지는 ATP의 형태로 저장, 발효·호흡 등에 사용된다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "N-연결형 글리칸"이란, 시퀀(sequon)의 아스파라진의 곁사슬에 질소(N)가 부착되어 있는것을 의미한다. 시퀀은 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr 시퀀스를 말하며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 아미노산 및 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스, 뉴라민산, N-아세틸글루코사민, 프룩토오스, 마노스, 푸코스, 및 다른 단당류로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따라 제조된 N-연결형 글리칸은 더욱 바람직하게는, 시알산을 더 포함하는 시알레이트 N-연결형 글리칸인것을 특징으로한다. 따라서, 본 발명에 따른 기법은 완전히 시알레이트된 N-연결형 글리칸만을 선택적으로 비교정량 함으로써 생물학적인 원인을 규명하는데 중요한 역할을 할 것으로 보인다
- [0033] 본 발명에 따른, 동위원소 표지된 글루코오스를 포함하는 N-연결형 글리칸의 질량값은 1390.18 m/z 이다. 이는 자연에 존재하지 않는 새로운 질량을 가지는 유일한 물질로, 질량스펙트럼의 방해를 피할 수 있어 글리칸 내부 표준물질로 활용될 수 있는 장점이 있다.
- [0034] 상기와 같은 동위원소가 표지된 글리칸의 제조방법으로, 글리칸에 효소를 첨가하여 상기 글리칸을 가수분해시키는 단계;
- [0035] 동위원소로 표지된 글루코오스를 상기 가수분해된 글리칸에 첨가하여 글리코시드 전이시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지된 글리칸을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 첫 번째 단계는 글리칸에 효소를 첨가하여 글리칸을 가수분해 시키는 단계이다. 더 상세하게는 상기 효소는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다아제(이하, Endo-M)로, 다양한 당단백질의 아스파라진에 결합된 N-연결형 글리칸의 코어(core) 구조인 다이아세틸키토바이오제(diacetylchitobiose)를 가수분해 하는 효소이며 가수분해된 글리칸의 환원 말단(reducing end)에 적절한 수용체(예로, Glc, GlcNAc)를 결합시키는 글리코실전이 능력을 동시에 가지고 있다. 본 발명에 따른 가수분해 반응으로, N-연결형 글리칸의 코어(core) 구조인 다이아세틸키토바이오제가 가수분해되어 글리코실전이가 일어날 사이트(site)를 제공한다. 본 발명에서는 N-연결형 글리칸에 대한 Endo-M의 기질 특이성으로 인하여 시알레이트된 N-연결형 글리칸만을 선택적으로 정량분석할 수 있는 장점이 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어 "당단백질"은, 당과 단백질로 되어 있는 일군의 화학물질의 총칭이며 2 내지 6 종류의 단당으로 되어 있는 당 부분과 단백질이 공유결합으로 결합하고 있다. 더욱 상세하게는 단백질과 단당류, 올리고당, 또는 다당류가 결합된것을 당단백질(glycoprotein)이라 한다. 이러한 당단백질은 글리코실화(glycosylation)에 의한 생물학적 시스템에서 가장 많은 단백질로 세포-세포 인식, 세포 속 이동, 면역 및 염증과 같은 생물학적 기능면에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 당단백질은 합성되고 있는 단백질에 글리칸이 부가됨으로서 만들어지며, 글리칸이 부가되는 방식에 따라 N-연결형 글리코실화와 O-연결형 글리코실화로 나누어진다.
- [0038] 상기 두 번째 단계의 "글리코시드전이 반응"은 일반적으로 글리코실기(G)와 아글리콘(R)으로 이루어지는 배당체, RG가 별개의 물질(A)에 글리코실기를 전이시켜 AG를 만드는 반응이다. 그 예로, $\text{RG} + \text{A} \rightarrow \text{R} + \text{AG}$ 를 말하며, 글리코실전이반응이라고도 한다. 이는 글리칸의 사슬을 개조하기 위해 유용한 기법으로 다양한 구조의 글리칸을 수용체와 함께 효소 반응으로 변형시킬 수 있다. 구체적으로 N-글리코실화는 Asn-X-Ser/Thr 아미노산 서열의 아스파라진(Asn)에 14개의 당으로 구성된 글리칸이 부가되는 과정으로 소포체 내에서 일어난다. 이는 진행 세포

에 적절한 단백질 접힘에 매우 중요한 역할을 한다. 14개의 당은 추가적인 변형과정을 거쳐 high-mannose(고 마노즈), complex(복합), hybrid(혼성) 3 종류의 글리칸이 된다. 고 마노즈 유형은 핵 구조에 하나 또는 몇 개의 마노즈가 연결되어 있는 형태로 구성되고, 복합 유형은 핵 구조에 몇 개의 헥소오스(hexoses), N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine), 시알산(sialic acid) 등이 연결된 구조를 포함하고 있다. 혼성 유형은 고 마노즈 유형과 복합 유형의 유사성을 공유하고 있는 형태이다.

[0039] 상세하게는 본 발명에 따른 글리코시드전이 반응으로 가수분해된 N-연결형 글리칸의 환원 말단에 글루코오스가 결합된다.

[0040] 상기 각 단계에 따라 합성된 동위원소 표지된 글루코오스가 결합된 N-연결형 글리칸의 질량값은 1390.18 m/z로, 이는 자연에 존재하지 않는 새로운 질량을 가지는 유일한 물질로, 질량스펙트럼의 방해를 피할 수 있어 글리칸 내부표준물질로 활용될 수 있다.

[0041] 상기 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석방법은

[0042] 글리칸에 효소를 첨가하여 상기 글리칸을 가수분해시키는 단계;

[0043] 제 1 글루코오스 및 동위원소로 표지된 제 2 글루코오스를 상기 가수분해된 글리칸에 첨가하여 글리코시드 전이시키는 단계; 및

[0044] 상기 제 1 글루코오스를 포함하는 제 1 글리칸 및 상기 제 2 글루코오스를 포함하는 제 2 글리칸을 포함하는 글리칸 혼합물을 제조하는 단계;를 포함한다.

[0045]

[0046] 상기 동위원소 표지된 N-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석방법의 각 단계를 도 1 및 도 2를 참조하여 설명한다.

[0047] 도 1은, 이론적으로 한정된 것은 아니지만, 글리칸의 비교정량을 위하여 Endo-M의 가수분해 및 글리코시드전이를 이용한 글루코오스 결합을 나타낸 것이다. 글리칸에 Endo-M을 첨가하면 가수분해 및 글리코시드전이 반응이 일어난다. 가수분해된 글리칸의 환원말단에 일반적인 글루코오스인 제 1 글루코오스를 Endo-M의 글리코시드전이 반응으로 결합시킨다. 제 1 글루코오스가 결합된 제 1 글리칸은, 질량이 2가 이온에 대해 $[M+Glc+2Na]^{2+} = 1387.17 \text{ m/z}$ 로, 동위원소 표지된 제 2 글루코오스가 결합된 제 2 글리칸의 질량, $[M+Glc^*+2Na]^{2+} = 1390.18 \text{ m/z}$ 과는 약 3 Da 차이를 나타낸다. 이 질량 차이를 이용하여 미지시료의 글리칸에 대한 비교정량 및 구조분석이 가능하다.

[0048] 도 2는, 상기 제 1 글리칸 및 제 2 글리칸을 이용한 비교정량 질량분석법의 요약도를 나타낸 것이다. Endo-M의 가수분해 및 글리코시드전이반응을 통해 당단백질을 상기 제 1 글루코오스 및 제 2 글루코오스를 각각 결합시키고 상기 제 1 글루코오스를 포함하는 제 1 글리칸 및 상기 제 2 글루코오스를 포함하는 제 2 글리칸을 포함하는 글리칸 혼합물을 제조한다. 질량분석 결정 전에 글리칸 혼합물을 퍼메틸레이션(permethylation)시킨다. 질량분석 전 글리칸 혼합물을 퍼메틸레이션시키는것은 글리칸의 세부 구조 확인 및 이온화를 증가시켜 검출한계를 낮추기 위함이다. 도 2에서와 같이 퍼메틸화된 글리칸은 MS를 통해 분석한다. Full MS로 글리칸의 질량을 확인한 후 제 1 글리칸과 제 2 글리칸을 비교정량하고 이에 의한 정량화 결과, 두 글리칸의 질량 차이는 $\Delta [M+Glc+2Na]^+ = 6.02 \text{ Da}$ 이다. 또한, 글리칸의 구조를 확인하기 위해 MS/MS에 의한 질량분석 데이터 또한 얻을 수 있다. N-연결형 글리칸의 구조적 특성을 파악하기 위한 구체적인 MS/MS 스펙트럼의 결과는 도 9 및 도 10에 나와있다.

[0049] 본 발명에서 사용된 질량분석기는 "ESI - 이온 트랩 질량분석기" 이다. ESI(electrospray)는 이온화 방법 중 하나로, 대기압 하에서 이온화하여 질량분석기로 이온을 전달하는 방식이다. 강한 전기장(3~6 kV)을 모세관을 통과하는 낮은 유속의(1~10 $\mu\text{L}/\text{min}$) 액체에 걸어 10^6 V/m 정도의 전기장을 생성한다. 이 전기장은 모세관 끝에 위치한 액체 표면에 전하를 축적하여 이 액체를 분해한다. 수직으로 주입된 낮은 유속의 가스는 스프레이로부터

분무를 돕고, 이 방울들은 가열된 비활성 기체 또는 가열된 모세관을 통하여 마지막 용매분자를 제거한다. 스프레이는 설정된 전압으로부터 시작되며 용매의 표면장력에 의존한다. 낮은 전압에서 방울은 구의 형태를 띠다가 센 전압에서는 축적된 전하에 의해 모양이 변하고 스프레이가 시작된다. 방울의 용매가 증발하면서 방울이 점점 줄어들고, 줄어드는 방울에서는 coulombic force가 늘어나 방울의 분산을 유도하여 점점 방울이 작아지게 된다. 방울 표면의 전기장이 충분히 커지면 표면에서 이온의 탈착이 일어난다. 이처럼 이온의 탈착은 방울의 표면에서 일어나므로 감도는 그 분석물질이 방울의 표면에 많이 존재하는 것일수록 좋다.

[0050] 이온 트랩(ion trap) 질량분석기는 동일 주파수의 사중극자 범위에 원하는 이온을 잡아 넣고 나머지는 방출시킨다. 일정 범위의 이온들을 고리 전극(ring electrode)과 두 끝자리 전극(endcap electrode) 사이의 공간에 가두고 그 이외의 이온들을 검출기를 향해 방출시키게 된다. 이때 트랩되는 이온들의 m/z 비율의 범위는 사중극자 분석기처럼 전압의 진폭과 진동수에 의해 결정된다. 이온 트랩의 가장 유용한 점은 이 선택된 이온의 분리이며, 분리된 이온은 충돌가스에 의해 분열된다. 또한 이온 트랩 질량분석기는 작은 크기의 이온을 잡아서 축적시키는 능력이 있어, 그 신호대 잡음비가 매우 낮은 것 또한 장점 중 하나이다.

[0051] 상기에서 설명했듯이 글리칸의 비교정량 질량분석법은 동위원소 표지를 이용한 ^{13}C 아이오도메테인($^{13}\text{CH}_3\text{I}$), QUIBL(Quantification by Isobaric Labeling), IDAWG(Isotopic Detection of Aminosugars With Glutamine)와 같은 기술이 있다. ^{13}C 아이오도메테인을 이용한 방법은 퍼메틸레이션 및 ^{13}C 로 표지된 메틸아이오다이드($^{13}\text{CH}_3\text{I}$)를 갖는 올리고당의 동위원소 표지로 시작한다. 올리고당의 분리된 표본은 ^{12}C 또는 ^{13}C 메틸 아이오다이드이고, 표지된 글리칸과 표지되지 않은 글리칸을 알려진 비율로 혼합한 후 MS로 분석한다. QUIBL(Quantification by Isobaric Labeling) 방법은, $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ 또는 $^{12}\text{CH}_2\text{DI}$ 를 갖는 글리칸의 퍼메틸레이션이, 동일한 질량을 갖는 동종의 유도체 쌍으로 일어나면서 시작된다. 이 경우, 메틸레이션이 일어나는 각각의 위치는 0.002922 Da의 질량 차이를 갖는다. 글리칸은 여러개의 메틸레이션 사이트를 갖고 있기 때문에, 총 질량 차이는 대략 $30000\text{ m}/\Delta\text{m}$ 의 분해능에서 분리 및 정량이 가능하다. 또한, 이 방법은 배아 줄기세포의 분화와 관련하여 글리코믹스 변화를 정량화 하는데 적용할 수 있다. IDAWG(Isotopic Detection of Aminosugars With Glutamine) 방법에서, 아미드- ^{15}N -Gln를 포함하는 배지는 무거운 질소로 표지된 세포의 아미노당이 사용된다. Gln의 아미드 결합 사슬은 GlcNAc, GalNAc, 및 살리실산의 생합성을 위한 질소의 유일한 소스이기 때문에, 아미드- ^{15}N -Gln 배지에서 72시간동안 배양되는 배아 줄기세포의 N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸은 ^{15}N 와 거의 완벽한 결합이 일어난다. 동위원소의 무거운 단당류 잔여물은 글리칸 분열을 해석하는데 추가적인 정보를 제공하고 MS로 정량화 할 수 있게 한다. 따라서, IDAWG는 이행하기 쉽고, 아직까지 글리코믹스에서 강력한 정량적 도구로 사용되고 있다.

[0052] 상기 N-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석방법에 따른 질량분석 결과를 도 3 및 도 4를 참조하여 설명한다.

[0053] 도 3은 상기 제 1 글리칸 및 제 2 글리칸의 비교정량을 위하여 각각 1:1의 글리칸의 시료에 대하여 상기 제 1 글루코오즈 및 제 2 글루코오즈를 표지한 다음 혼합한 글리칸의 질량스펙트럼으로, 6 Da의 질량차이로 인하여 제 1 글리칸과 제 2 글리칸의 스펙트럼에 대한 겹침을 피할 수 있어 보다 정확한 스펙트럼의 면적을 계산할 수 있어, 비교정량 시 큰 장점이 될 수 있다.

[0054] 도 4는 Endo-M의 글리코시드전이에 의한 제 1 글루코오즈 및 제 2 글루코오즈가 결합된 글리칸의 비교정량 실험을 나타낸 것이다. 이는 실질적인 응용을 위하여 글리칸의 비율을 달리(그 예로, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4)하여 Endo-M을 반응시킨 후 제 1 글리칸 및 제 2 글리칸의 질량스펙트럼에 대한 면적의 비를 비교정량한 결과로 적절한 정량성을 확인할 수 있음을 보여준다.

[0055] [실시예 1]

[0056] 글리코시드전이 반응의 수용체 특이성을 위해 6개의 단당류, 글루코오즈(Glc), 갈락토오즈(Gal), 마노즈(Man), N-아세틸글루코사민(GlcNAc), N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 및 N-아세틸만노사민(ManNAc) 사용하였다. Endo-M의 글리코시드전이에 의해 합성된 글리칸의 생성 비율은 일정한 SGP 농도에 대해 다양한 농도 비율을 갖는 단

당류(1:1 내지 1:32, wt/wt)를 사용하여 분자이온 클러스터로부터 모든 피크 면적의 합으로 측정하였다. Endo-M의 글리코시드전이를 위한 수용체로써 6개의 단당류는 질량 분석법 사용에 의해 글리칸 생성물 형성을 측정하였다.

[0057] 본 발명의 글리칸에 일반적인 글루코오즈 또는 무거운 글루코오즈를 이동시키기 위해서, 일반적인 글루코오즈는 Endo-M의 글리코시드전이 반응을 위해 실시하였다. 글리코시드전이 생성물의 수율은 글루코오즈 농도가 증가할수록 점차 증가한다. 도 5에서 알 수 있듯이, 가수분해 및 글리코시드전이된 생성물의 상대적인 양이 각각 44.1% 및 55.9%인 경우, 접점에서의 SGP에 대한 글루코오즈의 농도 비율이 1:16(wt/wt)으로 측정되었다. 이는 비교정량에 있어서, 글리코시드전이를 위한 최상의 조건으로써 무거운 글루코오즈의 사용을 최소화하기 위해 SGP에 대한 글루코오즈의 농도를 1:16 비율로 선택하여 실시하였다.

[0058] Endo-M의 반응시간과 관련하여, 공여 기질(SGP)은 즉시 가수분해되고 70%의 글루코오즈 수용체로 이동한다. 또한, 글리코시드전이 생성물은 약 30분에 최대값에 다다르고 점차적으로 효소적 가수분해로 인해 시간에 따라, 줄어든다.

[0059] [실시예 2: Endo-M의 효소적 반응(동위원소 표지된 글루코오즈를 포함한 글리칸의 제조)]

[0060] 질량분석에 앞서, 글리코시드전이는 총 부피 30 μ L의 100mM 포타슘포스페이트 완충용액(pH 6.0), 시알리글리코펩티드(sialylglycopeptide, 이하, SGP) 20 μ g, 글루코오즈 320 μ g, 1mU Endo - M로 구성된 혼합물에서 반응이 일어난다. 상기와 같은 이유로, 시알리글리코펩티드와 글루코오즈의 비율은 1:16으로 실시하고 37 ° C에서 30분간 인큐베이션 후에, 블럭 히터 내에서 100 ° C, 3분 동안 끓임으로써 비활성화시켰다. 글리칸은 퍼메틸레이션하기 위해 감압 하에서 동결 건조하였다.

[0061] 비교예 1: N-아세틸글루코사민(GlcNAc)

[0062] 상기 실시예 2에서, 글루코오즈 320 μ g 대신에 N-아세틸글루코사민 320 μ g를 첨가한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일하게 제조되었다.

[0063] 비교예 2: 갈락토오즈(Gal)

[0064] 상기 실시예 2에서, 글루코오즈 320 μ g 대신에 갈락토오즈 320 μ g를 첨가한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일하게 제조되었다.

[0065] 비교예 3: N-아세틸갈락토사민(GalNAc)

[0066] 상기 실시예 2에서, 글루코오즈 320 μ g 대신에 N-아세틸갈락토사민 320 μ g를 첨가한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일하게 제조되었다.

[0067] 비교예 4: 마노즈(Man)

[0068] 상기 실시예 2에서, 글루코오즈 320 μ g 대신에 마노즈 320 μ g를 첨가한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일하게 제조되었다.

- [0069] 비교예 5: N-아세틸만노사민(ManNAc)
- [0070] 상기 실시예 2에서, 글루코오즈 320 μg 대신에 N-아세틸만노사민 320 μg 을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일하게 제조되었다.
- [0071] 평가
- [0072] 실시예 1의 결과, 도 5에서 보듯이, 글루코오즈를 글리코시드전이의 수용체로써 실시한 경우, Endo-M은 글루코오즈에 SGP의 시알레이트 글리칸을 72.8% 이동시킨것을 알 수 있다. 즉, Endo-M의 글리코시드전이에 의해 글루코오즈가 수용체인 경우, 72.8%의 글루코오즈가 결합된 시알레이트 N-연결형 글리칸이 생성된 것이다.
- [0073] 비교예 1의 N-아세틸글루코사민을 수용체로써 Endo-M의 효소반응을 실시한 경우, 도 5에서 보듯이, Endo-M은 글루코오즈에 SGP의 시알레이트 글리칸을 74.6% 이동시킨것을 알 수 있다. 즉, 74.6%의 N-아세틸글루코사민이 결합된 시알레이트 N-연결형 글리칸이 생성된 것임을 확인할 수 있다.
- [0074] 비교예 2의 경우, 그 결과 갈락토오즈는 Endo-M의 반응에서 수용체로써 작용하지 못하는 것을 알 수 있다. 갈락토오즈가 수용체인 경우, $[\text{M} + \text{Hex} + \text{N2a}]^{2+}$ 의 생성이 없음을 도 5에서도 확인할 수 있다.
- [0075] 비교예 3의 경우, 그 결과, N-아세틸갈락토사민 또한 Endo-M의 반응에서 수용체로 작용하지 못하는 것을 알 수 있다. N-아세틸갈락토사민이 수용체인 경우, $[\text{M} + \text{HexNAc} + \text{N2a}]^{2+}$ 의 생성이 없음을 도 5에서도 확인할 수 있다.
- [0076] 비교예 4의 경우, 도 5에서 보듯이, Endo-M은 마노스로 SGP의 시알레이트 글리칸을 36.3% 이동시킨것을 알 수 있다. 즉, Endo-M의 글리코시드전이에 의해, 36.3%의 마노스가 결합된 시알레이트 N-연결형 글리칸이 생성되었다.
- [0077] 비교예 5의 경우, 도 5에서 보듯이, Endo-M은 N-아세틸만노사민으로 SGP의 시알레이트 글리칸을 68.6% 이동시킨것을 알 수 있다. 즉, Endo-M의 글리코시드전이에 의해, 68.6%의 N-아세틸만노사민이 결합된 시알레이트 N-연결형 글리칸이 생성되었다.
- [0078] Fan *et al* 및 Tomabechei *et al* (EndoM-22, 6)에 의한 이전 조사들을 기초로, 결론적으로 이 결과는 수평방향의 (equatorial) C-4 하이드록시 및 C-5 하이드록시메틸기가 글리코시드전이에 중요함을 알 수 있다. 따라서, 단당류 중에서도 수용체로써 일반적인 글루코오즈만을 본 발명의 목적에 따라 선정하여 실시하였다.
- [0079] 그 결과, 상기와 같은 이유로, 일반적인 반응조건, SGP:단당류 = 1:16 wt/wt, 30분, 37 ° C에서, 가수분해 및 글리코시드전이가 일어난 글리칸 생성물은 대부분 수용체로써의 글루코오즈를 갖고 형성된다.
- [0080] 한편, 도 4는 SGP로부터의 N-연결형 글리칸의 비교정량을 보여준다. 이는 일반적인 글루코오즈 및 동위원소 표지된 무거운($^{13}\text{C}_6$)글루코오즈를 사용하여 Endo-M의 효소적 반응으로 동위원소 표지에 의해 수행되었다. 본 발명에서, 비교정량 데이터는 서로 다른 SGP 농도에서(그 예로, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 및 1:4, wt/wt) 피크 면적의 총 합으로부터 일반적인 글루코오즈와 무거운 글루코오즈의 비율로 얻어진다. 모든 실험은 독립적으로 3번 실시하였다.
- [0081] [실시예 2: 글리칸의 퍼메틸레이션]
- [0082] MS에 의한 올리고당의 분석을 위해서, Endo-M에 의해 SGP로부터 노출된 글리칸은 상기 설명한 것처럼 퍼메틸레이션시켰다. 글리칸은 200 μL 의 무수 DMSO 및 250 μL 의 NaOH/DMSO 시약(2mL의 무수 DMSO에 50 mg NaOH 혼합물)에서 서스펜드되었다. 초음파처리 및 질산 기체 하에서 볼텍싱(vortexing)한 후에, 100 μL 의 아이오도메탄

(iodomethane)을 첨가하였고 그 혼합물을 5분동안 격렬하게 볼텍스 해줬다. 그 후, 증류수 2mL를 첨가하였고 과도한 아이오도메탄을 질소 스트림(stream)으로 버블링함으로써 제거하였다. 또한 2mL의 디클로로메탄(dichloromethane)을 첨가하였다. 격렬한 혼합 및 원심분리에 의한 상 분리 후, 상층의 물 층을 제거하고 버렸다. 샘플을 증류수로 4번 추출하였고 퍼메틸레이트된 글리칸은 건조를 위해 원심성의 증발기로 증발시켰다.

[0083] [실시예 3: 글리칸의 질량분광법 분석]

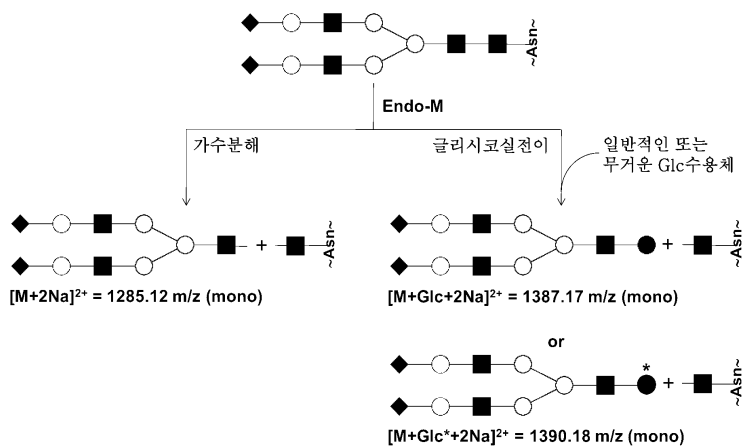
[0084] 상기 실시예 2의 퍼메틸레이트된 글리칸을 이용하여, 하기와 같이 질량분석을 실시하였다.

[0085] 퍼메틸레이트된 글리칸은 1 mM의 NaOH를 포함하는 80%(v/v)의 50 μ L에서 재구성되었고 용융된 실리카 에미터(emitter)(360 X 75 X 30 μ m, SilicaTip™ New Objective, MA)를 갖는 나노스케일의 전기스프레이(nano electrospray) 이온 소스를 사용하여, 2.0 kV 커필러리(capillary) 전압, 200 ° C 커필러리(capillary) 온도, 및 시린지 펌프에 의한 0.5 μ L/분의 유입속도에서 이온 트랩 질량 분석기(LCQ Fleet, Thermo Scientific Inc., San Jose, CA)에 직접 주입하였다. 양이온 및 프로파일 모드에서 기록된, Full MS 스펙트럼은 5 마이크로스캔(microscan) 및 150의 최대 주입 속도에서 30초 동안 400 내지 2000 m/z에서 수집되었다. 해상도 향상을 위해 좁은 질량 창(mass window, 20 Da/charge 미만)의 관심 이온들은 줌-스캔 모드로 측정되었다. 충돌로 유발된 분해(CID)에 따라, 중심 MS/MS 스펙트럼은 정규화된 충돌 에너지의 40%를 N-연결형 글리칸의 구조를 특징짓기 위해 얻을 수 있다.

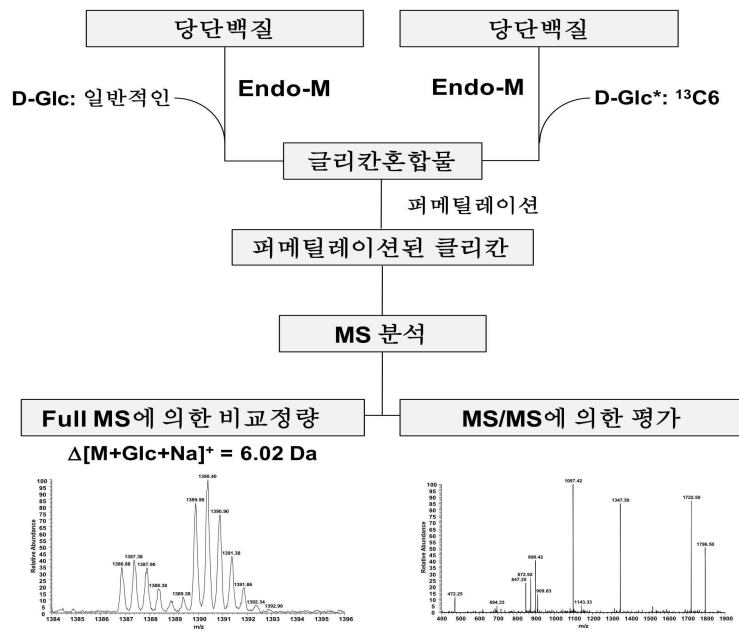
[0086] 글리칸에 무거운 글루코오스에 대한 일반적인 글루코오즈의 표지 비율은 도 3과 같이 Endo-M의 가수분해 및 글리코시드전이 후에 퍼메틸레이트된 N-연결형 글리칸의 줌 스캔에서 MS 스펙트럼으로 비교하였다. 이 두개의 이온 클러스터는 무거운 글루코오즈로 표지된, 완전히 시알레이트된 바이안테너리(biantennary) N-연결형 글리칸 이온이 단일 차지 이온에서는 6.0 Da, 이중 차지 이온에서는 3.0 Da이 증가됨을 보여주었다. 일반적인 글루코오즈로 표지된 N-연결형 글리칸의 아이소토프 엔벨로프(isotope envelope)는 무거운 글루코오즈가 표지된 N-연결형 글리칸에서의 1390.1 m/z의 모노아이소토프 피크에서 혼합된 이온 클러스터의 총 면적의 1.2% 미만으로 겹쳐졌다. 무거운 글루코오즈가 결합된 N-연결형 글리칸에서의 결합은 1389.6 m/z에서 이온 클러스터의 총면적의 2.1%으로 관찰되었다. 이 겹침의 방해 및 무거운 글루코오즈(¹³C₆, 99%)의 퍼센트 순도는 일반적인/무거운 종의 상대적인 비율에 대한 수학적 계산으로 수정되었다. N-연결형 글리칸의 단편화로 인한 MS/MS 스펙트럼으로 일반적인 글루코오즈 및 무거운 글루코오즈 표지와 일치하는 글리칸의 구조를 확인하였다.

도면

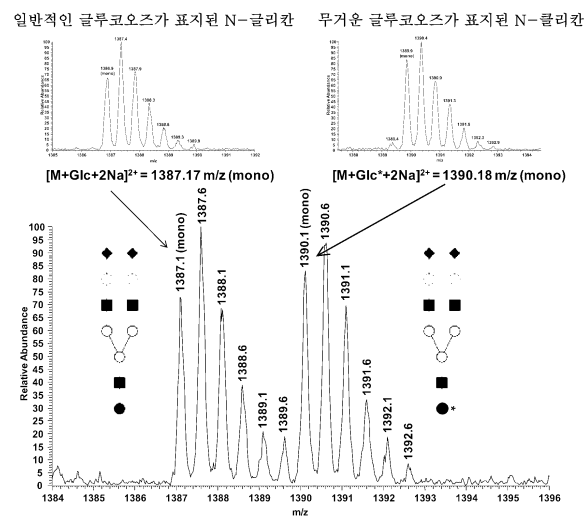
도면1



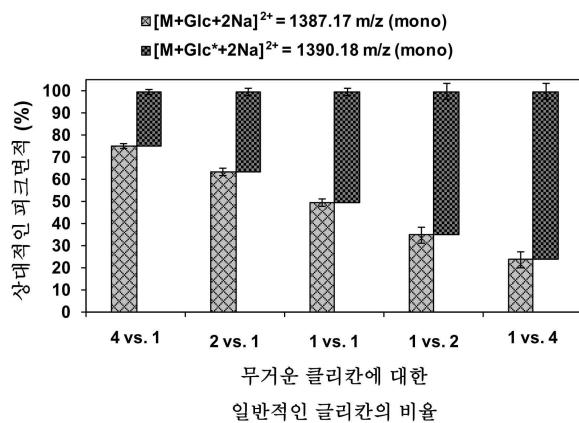
도면2



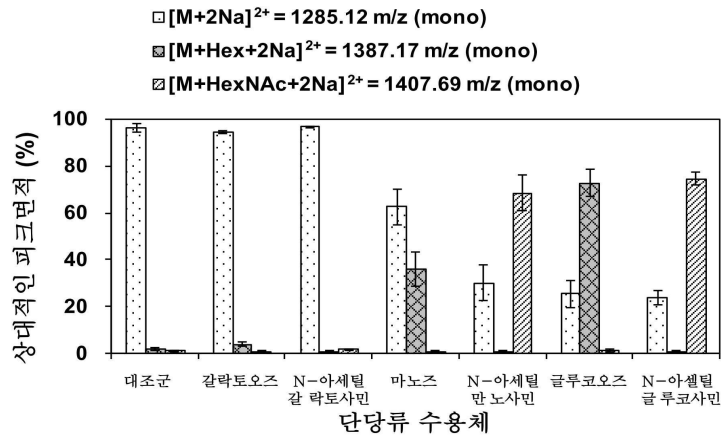
도면3



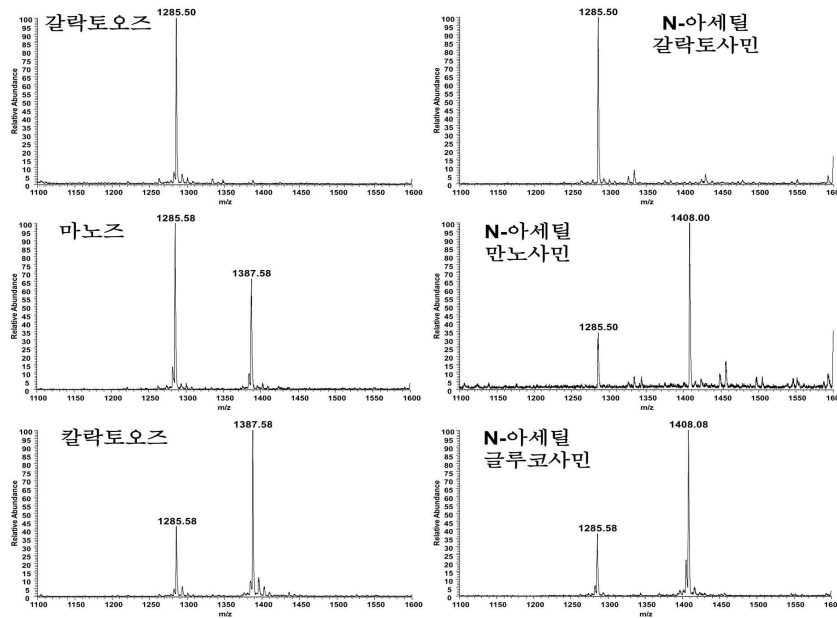
도면4



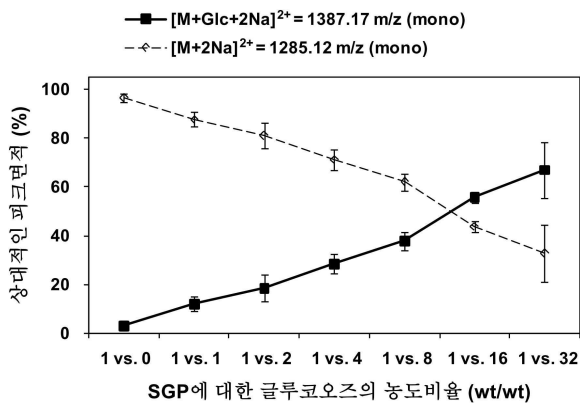
도면5



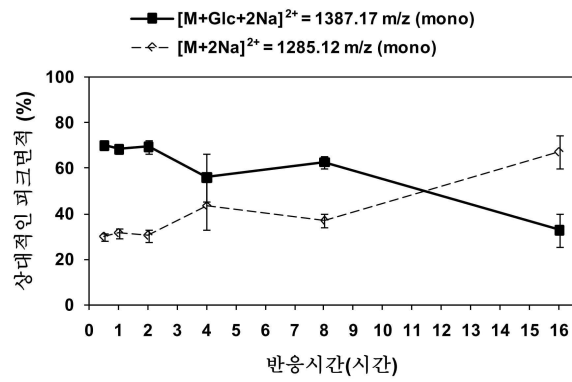
도면6



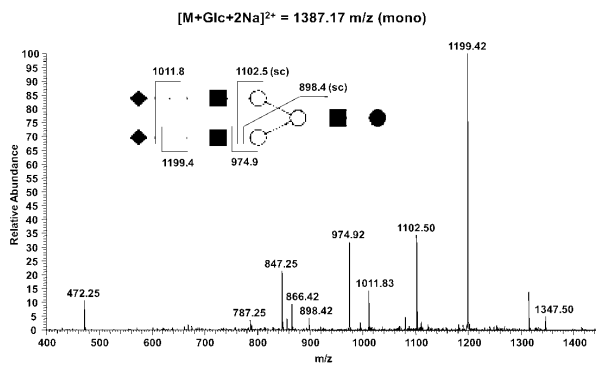
도면7



도면8



도면9



도면10

