



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0078427
(43) 공개일자 2017년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 27/62 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6848 (2013.01)
G01N 27/62 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0188935
(22) 출원일자 2015년12월29일
심사청구일자 2015년12월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김준곤
서울특별시 서초구 사임당로 130, 7동 806호 (서초동, 신동아아파트)
이중화
서울특별시 성북구 인촌로11길 37 인경빌 501 (안암동1가)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 6 항

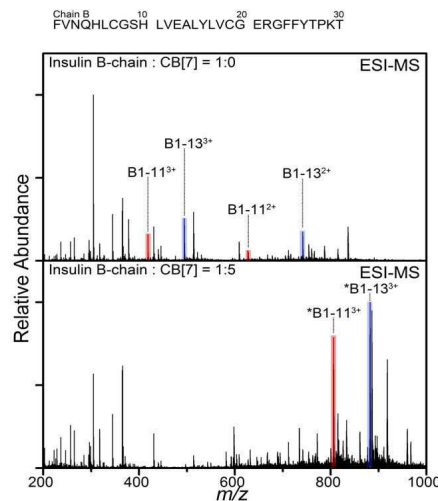
(54) 발명의 명칭 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법

(57) 요약

본 발명은 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, a) 펩타이드 용액에 쿠커비투릴[7]을 혼합하여 펩타이드-쿠커비투릴[7] 복합체를 형성하는 단계; 및 b) 상기 복합체를 질량분석법에 의해서 분석하는 단계를 포함하는, 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 다양한 질량분석법 기반 방법들을 사용하여 분석 대상이 되는 펩타이드 시료를 분석함에 있어서, 간단한 방법으로 쿠커비투릴[7]만을 첨가하여 표적 시료에 의해서 야기되는 분석 신호를 획기적으로 향상시킬 수 있으며, 분석 대상 펩타이드의 서열 커버리지를 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

G01N 2333/62 (2013.01)

G01N 2333/805 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2008974

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 아밀로이드성 단백질의 세포막에서의 섬유화 진행기작의 규명 및 조절

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

a) 펩타이드 용액에 쿠커비투릴[7]을 혼합하여 펩타이드-쿠커비투릴[7] 복합체를 형성하는 단계; 및
b) 상기 복합체를 질량분석법에 의해서 분석하는 단계를 포함하는,
쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 복합체는 상기 펩타이드의 N-말단 페닐알라닌 잔기와 쿠커비투릴[7] 사이의 소수성 상호작용 및 이온-쌍극자 상호작용에 의해서 형성되는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 펩신에 의해서 소화된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 펩타이드는 인슐린, 인슐린의 B-사슬, 유비퀴틴, 미오글로빈 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 질량분석법은 전자분무 이온화 질량분석법 (ESI-MS), 기질-보조 레이저 탈착 이온화 질량분석법 (MALDI-MS), 이온 이동도 질량분석법 (IM-MS), 또는 충돌 유도 해리 (collision-induced dissociation)를 바탕으로 한 이중 질량분석법 (tandem mass spectrometry)에 기반한 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 a) 단계에서 펩타이드 용액과 쿠커비투릴[7]의 혼합비는 상기 펩타이드 용액 100 중량부에 대해서 상기 쿠커비투릴[7] 10 중량부 내지 1000 중량부인 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연성 이온화 (soft ionization) 기술들의 발전에 따라서 질량분석법 (mass spectrometry, MS)이 단백질 서열분

석 및 검출을 위한 방법으로서 이용되고 있다. 통상적인 방법에서, 단백질들은 먼저 효소에 의해서 소화된 다음, 전자분무 이온화 MS (ESI-MS) 또는 기질-보조 레이저 탈착 이온화 MS (MALDI-MS)에 의해서 분석된다 (비특허문헌 1). 이때, 상기 소화로부터 생성된 다수의 펩타이드들이 단백질 1차 구조 (즉, 아미노산 서열)에 대한 풍부한 정보를 제공한다. 그러나, 이온화 과정 도중 다양한 펩타이드가 양성자를 얻기 위해서 경쟁하기 때문에, 낮은 양성자 친화도를 갖는 것들은 낮은 이온화 효율을 나타내고, 이는 종종 MS 분석을 어렵게 하는 동시에 서열 커버리지를 감소시킨다 (비특허문헌 2). 따라서, 효과적인 단백질 분석을 위해서는 관심대상이 되는 펩타이드들의 이온화 효율을 상승시키는 것이 바람직하다. 관련하여, 유도체화 (derivatization) (비특허문헌 2) 및 기구적 변형 (instrumental modification) (비특허문헌 3)이 이온화 효율을 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있지만, 현재까지 편리하면서도 널리 허용되는 방법이 보고된 바는 없다.

[0003]

한편, 쿠커비투릴[n] (Cucurbit[n]urils, (CB[n]s, $n = 5, 6, 7, 8$, 및 10)은 n 글리콜유릴 ($C_4H_2N_4O_2$) 반복 단위 및 $2n$ 메틸렌 ($-CH_2-$) 연결 단위들을 포함하며, 다양한 화학 분야에서 사용되는 중성의 수용성 주인 분자이다 (비특허문헌 4). 쿠커비투릴[n]은 비극성기들을 캡슐화하는 소수성 공동, 및 양이온기와 결합할 수 있는 우레아도 카르보닐기와 나란히 위치하는 두 개의 극성 입구들을 포함한다 (비특허문헌 5). 쿠커비투릴[n]은 주인 분자로서 탁월한 특성들을 갖기 때문에, 용액 상 (비특허문헌 6) 및 기체 상 (비특허문헌 7) 등 다양한 조건에서 널리 연구된 바가 있다.

[0004]

그 중 쿠커비투릴[7]은 용액 중 펩타이드 및 단백질의 N-말단 페닐알라닌 (Phe) 잔기들과 강한 복합체를 형성하는데 ($K_a \sim 10^6-10^7 M^{-1}$) (비특허문헌 6), 이는 페닐알라닌의 소수성 곁사슬이 쿠커비투릴[7]의 공동 내에 잘 담겨지고, N-말단 암모늄기가 쿠커비투릴[7]의 카르보닐 산소와 효과적인 이온-쌍극자 상호작용을 하기 때문이다 (도 1 참조) (비특허문헌 8). 쿠커비투릴[7]과 페닐알라닌 사이의 상호작용은 ESI 또는 MALDI 등의 이온화를 통해서 그 복합체가 기체 상으로 상변환되는 과정에서도 보존된다 (비특허문헌 6). 또한, 쿠커비투릴[6] 및 라이신 (Lys)-함유 펩타이드들을 사용한 본 발명자들의 종래 연구에 따르면 (비특허문헌 7), 쿠커비투릴[n]은 주인 분자로서 펩타이드의 선택적인 단편화를 포함한 독특한 특성들을 유도할 수 있다는 것을 관찰할 수 있었으며, 따라서 쿠커비투릴[7]을 이용한 질량분석법 기반 펩타이드 및 단백질 분석법 개선에 관한 연구를 진행하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

- (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Steen, H.; Mann, M. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004, 5, 699-711.
- (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Mirzaei, H.; Regnier, F. Anal. Chem. 2006, 78, 4175-4183.
- (비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Heemskerk, A. A. M.; Busnel, J.-M.; Schoenmaker, B.; Derks, R. J. E.; Klychnikov, O.; Hensbergen, P. J.; Deelder, A. M.; Mayboroda, O. A. Anal. Chem. 2012, 84, 4552-4559.
- (비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Kim, K.; Selvapalam, N.; Ko, Y. H.; Park, K. M.; Kim, D.; Kim, J. Chem. Soc. Rev. 2007, 36, 267-279.
- (비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Assaf, K. I.; Nau, W. M. Chem. Soc. Rev. 2015, 44, 394-418.
- (비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: Lee, H. H.; Choi, T. S.; Lee, S. J. C.; Lee, J. W.; Park, J.; Ko, Y. H.; Kim, W. J.; Kim, K.; Kim, H. I. Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 7461-7465.
- (비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: Lee, J. W.; Heo, S. W.; Lee, S. J.; Ko, J. Y.; Kim, H.; Kim, H. I. J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2013, 24, 21-29.
- (비특허문헌 0008) 비특허문헌 8: Chinai, J. M.; Taylor, A. B.; Ryno, L. M.; Hargreaves, N. D.; Morris, C. A.; Hart, P. J.; Urbach, A. R. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 8810-8813.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명에서는 다양한 질량분석법 기반의 방법들을 사용하여 펩타이드 시료를 분석함에 있어서, 간편하게 쿠커비투릴[7]을 첨가해 줌으로써, 분석대상이 되는 펩타이드의 분석능을 획기적으로 향상시킬 수 있는 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,

[0008] a) 펩타이드 용액에 쿠커비투릴[7]을 혼합하여 펩타이드-쿠커비투릴[7] 복합체를 형성하는 단계; 및

[0009] b) 상기 복합체를 질량분석법에 의해서 분석하는 단계를 포함하는,

[0010] 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 복합체는 상기 펩타이드의 N-말단 페닐알라닌 잔기와 쿠커비투릴[7] 사이의 소수성 상호작용 및 이온-쌍극자 상호작용에 의해서 형성될 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 펩신에 의해서 소화된 펩타이드일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 인슐린, 인슐린의 B-사슬, 유비퀴틴, 미오글로빈 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 질량분석법은 전자분무 이온화 질량분석법 (ESI-MS), 기질-보조 레이저 탈착 이온화 질량분석법 (MALDI-MS), 이온 이동도 질량분석법 (IM-MS), 또는 충돌 유도 해리 (collision-induced dissociation)를 바탕으로 한 이중 질량분석법 (tandem mass spectrometry)에 기반한 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 a) 단계에서 펩타이드 용액과 쿠커비투릴[7]의 혼합비는 상기 펩타이드 용액 100 중량부에 대해서 상기 쿠커비투릴[7] 10 중량부 내지 1000 중량부일 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따르면, 다양한 질량분석법을 사용하여 분석 대상이 되는 펩타이드 시료를 분석함에 있어서, 간단한 방법으로 쿠커비투릴[7]만을 첨가하여 표적 시료에 의해서 야기되는 분석 신호를 획기적으로 향상시킬 수 있으며, 분석 대상 펩타이드의 서열 커버리지를 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 쿠커비투릴[7]의 구조에 대한 개략도 및 쿠커비투릴[7]이 용액 중 펩타이드 및 단백질의 N-말단 펩타이드 잔기들과 복합체를 형성하는 형태를 개략적으로 도시한 도면이다.

도 2a 내지 2d는 펩신으로 소화한 펩타이드들에 쿠커비투릴[7]을 첨가한 것과 그렇지 않은 경우의 ESI-MS 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 3a 내지 3d는 펩신으로 소화한 펩타이드들에 쿠커비투릴[7]을 첨가한 것과 그렇지 않은 경우의 저에너지 충돌 유도 해리 (Low-energy collision-induced dissociation) 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 4a 내지 4d는 펩신으로 소화한 펩타이드들에 쿠커비투릴[7]을 첨가한 것과 그렇지 않은 경우의 MALDI-MS 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 5는 IM-MS를 사용하여 쿠커비투릴[7] · 펩타이드 복합체 구조를 조사한 개략도를 도시한 도면이다.

도 6은 쿠커비투릴[7]과 복합체화된 것과 그렇지 않은 유비퀴틴4-15 펩타이드 이온의 단편화 경로를 도시한 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명에서는, 쿠커비투릴[7]과 N-말단 페닐알라닌 잔기를 갖는 펩타이드 사이의 선택적 비공유결합 상호작용을 통해서, 질량분석법 상에서 잘 검출이 되지 않는 펩타이드들의 분석능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다. 이러한 주인-손님 화학을 이용해서 신호 강화를 도모한 본 발명에 따른 방법은, ESI-MS 및 MALDI-MS 모두에 적용가능하며, 펩신 소화 과정을 포함하는 단백질 분석에 특히 탁월한 효과를 나타내는 바, 이는 펩신이 페닐알라

닌을 포함하는 비극성 부위들을 선호적으로 절단하기 때문이다. 본 발명에서는, 쿠커비투릴[7]의 이러한 신호 강화 효과를 이용하여 인슐린 B-사슬 (InsB; 3.4 kDa), 인슐린 (Ins; 5.8 kDa), 유비퀴틴 (Ubq; 8.6 kDa), 및 미오글로빈 (Myb; 17.0 kDa)의 분석을 수행하였다. 더 나아가, 본 발명에 따르면, 이중 질량분석 실험의 경우, 쿠커비투릴[7]과 결합된 펩타이드들의 서열 커버리지가 개선되었다. 따라서, 본 발명에서는 쿠커비투릴[7]에 의한 신호 강화 및 개선된 서열 커버리지를, 전하 안정화 특성에 기초하여 분석하였는 바, 펩타이드 중 특정 잔기들을 표적화하고 포획함으로써 질량분석법을 사용하여 이를 분석함에 있어서 효과적인 접근방법을 제공할 수 있음을 시사하였고, 또한 주인 분자에 의해서 유도되는 폴리펩타이드의 새로운 단편화 경로에 대한 기작을 제안하였다.

[0020] 따라서, 본 발명에서는,

[0021] a) 펩타이드 용액에 쿠커비투릴[7]을 혼합하여 펩타이드-쿠커비투릴[7] 복합체를 형성하는 단계; 및

[0022] b) 상기 복합체를 질량분석법에 의해서 분석하는 단계를 포함하는,

[0023] 쿠커비투릴[7]을 이용한 펩타이드의 정성 및 정량 분석방법을 제공한다.

[0024] 본 발명에서, 펩타이드-쿠커비투릴[7] 복합체는 상기 펩타이드의 N-말단 페닐알라닌 잔기와 쿠커비투릴[7] 사이의 소수성 상호작용 및 이온-쌍극자 상호작용에 의해서 형성될 수 있으며, 본 발명에서 분석이 가능한 펩타이드는, 펩신에 의해서 소화가능한 다양한 펩타이드들로서, 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 인슐린, 인슐린의 B-사슬, 유비퀴틴, 미오글로빈 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 다양한 펩타이드들을 예로 들 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명에 따른 정성 및 정량 분석방법은, 다양한 질량분석법 기반의 방법들에 적용가능한 바, 예를 들어, 전자분무 이온화 질량분석법 (ESI-MS), 기질-보조 레이저 탈착 이온화 질량분석법 (MALDI-MS), 이온 이동도 질량분석법 (IM-MS), 또는 충돌 유도 해리 (collision-induced dissociation)를 바탕으로 한 이중 질량분석법 (tandem mass spectrometry) 등의 다양한 질량분석법 기반 방법들에 적용될 수 있다.

[0026] 한편, 상기 a) 단계에서 펩타이드 용액과 쿠커비투릴[7]의 혼합비는 상기 펩타이드 용액 100 중량부에 대해서 상기 쿠커비투릴[7] 10 중량부 내지 1000 중량부일 수 있는 바, 쿠커비투릴[7]의 함량이 10 중량부 미만인 경우에는 펩타이드와의 복합체 형성이 효율적이지 않을 수 있다는 문제점이 있고, 1000 중량부를 초과하는 경우에는 여분의 쿠커비투릴[7]이 이온화되는 문제점이 있어서 바람직하지 않다.

[0027] 이하에서는 바람직한 실시 예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0028] 재료

[0029] InsB는 Anygen (Gwangju, Korea)으로부터 구입하였다. 인간 재조합 Ins, 소 적혈구로부터의 Ubq, 말 심장으로부터의 Myb, 돼지 위 점막으로부터의 펩신, 및 포름산은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC-급 물 및 아세트오니트릴은 Avantor Performance Materials, Inc. (Center Valley, PA, USA)로 구입하였으며, 용매로서 사용하였다. 쿠커비투릴[7]은 CBTECH (Pohang, Korea)으로부터 구입하였으며, 쿠커비투릴[7]을 물에 용해시킴으로써 스톡 용액 (1 mM)을 제조하였다. 펩신 소화물은 1% v/v 포름산을 함유하는 물 중에서, 37℃로 15분 동안 단백질을 (100 μM)을 펩신 (0.24 mg/mL)과 함께 배양함으로써 제조하였다. ESI-MS에서는 위 시료를 10배 희석하여 사용하였다. 이어서, 쿠커비투릴[7]을 상기 용액에 첨가하고, 상기 용액에 대해서 ESI-MS 분석을 수행하였다. 쿠커비투릴[7]의 농도는 10 μM의 InsB, Ins, Ubq, 및 Myb 각각에 대해서 50, 35, 100, 및 50 μM로 최적화하였다.

[0030] 전자분무 이온화 질량분석법 및 충돌 유도 해리 (Collision-Induced Dissociation)

[0031] 질량분석법 실험을 위해서, 양이온 모드에서, Z-spray ESI 소스를 구비한 Waters Synapt G2 HDMS quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (Waters, Manchester, UK)를 사용하였다. 실험 파라미터로는, 3.50 kV의 모세관 전압, 10 V의 샘플링 콘 전압, 5 V의 추출 콘 전압, 100℃의 소스 온도, 및 150℃의 탈용매화 온도를 세팅하였다.

[0032] 충돌 유도 해리 (CID) 실험을 위해서, 양이온 모드에서, Thermo Scientific LTQ Velos dual ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA)를 사용하였다. ESI를 위한 파라미터로는, 3 kV의 모세관 전압 및 200℃의 모세관 온도를 세팅하였다. 각각의 스펙트럼은, 강화 스캔 모드 (enhanced scan mode)를 사용하여 얻어진 200

변 스캐닝한 스펙트럼을 평균하여 얻었다. 검출된 이온 및 그 단편 이온들에 대한 명명은 Roepstorff 및 Fohlman의 방식을 따랐다 (Roepstorff, P.; Fohlman, J. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601). 펩타이드 및 단편 이온들에 대해서 표시된 왼쪽 별표 (*) 첨자는 쿠커비투릴[7]의 결합체를 나타낸다. 예를 들어, 쿠커비투릴[7]과 복합체를 형성한 b_n^{2+} 단편 이온은 $*b_n^{2+}$ 로 명명된다.

[0033] 기질-보조 레이저 탈착 이온화 질량분석법

[0034] MALDI-MS 실험을 위해서, 355-nm Nd:YAG 레이저를 이용한 MALDI 소스를 구비한 Waters Synapt G2 HDMS mass spectrometer를 사용하였다 (Waters, Manchester, UK). MALDI 레이저 발사 속도 및 에너지는 각각 1000 Hz 및 350 (임의 단위)이었다. 기질 용액은 77% 아세트니트릴, 22.9% 물 및 0.1% 포름산 (v/v) 중의 20 mg/mL α -시아노-4-히드록시신남산 (CHCA)이었다. 펩신 소화를 위한 단백질의 농도는 20 μ M이었으며, 펩신 소화 조건은 ESI-MS 실험들에서 사용된 것들과 동일하였다. 소화된 샘플에 첨가된 이후 쿠커비투릴[7]의 최종 농도는 InsB에 대해서 20 μ M, Ubq에 대해서 40 μ M로 최적화되었다. 이어서, MALDI-MS에 대한 샘플 용액을, 기질 및 분석물 용액을 1:1의 부피비로 혼합함으로써 제조하였다. 분석을 위해서, 샘플 플레이트 상에 샘플 용액들 (2 μ L)을 스폿팅하였다.

[0035] 이온 이동도 질량분석법 및 컴퓨터 모델링

[0036] 이온 이동도 MS (IM-MS) 실험을 위해서, Waters Synapt G2 HDMS 장치를 사용하였다. 이온 이동도 측정은 4가지 장치 패러미터들을 사용하여 수행하였다. 헬륨 셀에 대한 가스 흐름, TWIMS 파장 속도 및 파장 높이는 각각 180 mL min⁻¹, 300 m s⁻¹ 및 20.0 V로 고정된 반면, 드리프트 셀에 대한 가스 흐름은 50, 60 또는 80 mL min⁻¹의 세 가지 조건을 이용하였다. 실험적 도착 시간 (arrival time)을 충돌 단면적 (Ω_D) 수치로 보정하는 것은 폴리알라닌 (Henderson, S. C.; Li, J.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8780-8785), 펠리틴 (Salbo, R.; Bush, M. F.; Naver, H.; Campuzano, I.; Robinson, C. V.; Pettersson, I.; Jorgensen, T. J. D.; Haselmann, K. F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 1181-1193), 및 변성된 Ubq (Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9557-9565)에 대해서 기존에 보고된 Ω_D 수치들을 사용하여 수행하였다. 3회 측정으로부터 보정된 Ω_D 수치들을 평균하였다.

[0037] 쿠커비투릴[7]-펩타이드 복합체들의 컴퓨터 모델링은 GROMACS 4.5.5를 사용하여 수행하였다 (Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435-447). 시뮬레이션을 위해서 CHARMM 포스 필드 (Mackerell, A. D.; Feig, M.; Brooks, C. L. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1400-1415; Bjelkmar, P.; Larsson, P.; Cuendet, M. A.; Hess, B.; Lindahl, E. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 459-466) 및 CHARMM 제너럴 포스 필드 (Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 671-690)를 사용하였다. 펩타이드들의 초기 랜덤 코일 구조들은 Hyperchem 7.0 (Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA)을 사용하여 생성하였다. 펩타이드 모델들 각각을 쿠커비투릴[7] 분자와 병합하였으며, 하기 프로파일을 사용하여 어닐링 시뮬레이션 500 사이클을 수행하였다: 50 ps 동안 300 K로부터 800 K로 가열, 50 ps 동안 800 K에서 일정 온도 시뮬레이션, 25 ps 동안 800 K로부터 300 K로 냉각, 및 25 ps 동안 300 K에서 평형화. 각 어닐링 사이클의 마지막 프레임으로부터 구조들을 추출하고, 후보 구조로 간주하였다. 가장 낮은 포텐셜 에너지를 갖는 5개의 구조들이 선택되었으며, MOBCAL (<http://www.indiana.edu/~nano/>)에서 채택된 투영 근사 (projection approximation) 모델 (Wytenbach, T.; vonHelden, G.; Batka, J. J.; Carlat, D.; Bowers, M. T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 275-282)을 사용하여 그들의 Ω_D 수치들을 계산하였다. 복합체화되지 않은 펩타이드들 및 Myb34-70 펩타이드에 대해서는 시뮬레이션을 수행하지 않았는 바, 이는 이들이 매우 높은 자유도를 가지며 긴 시뮬레이션 시간을 필요로 하기 때문이다.

[0038] 결과 및 검토

[0039] 쿠커비투릴[7]과의 복합체화에 의해서 N-말단 페닐알라닌을 갖는 펩신 소화된 펩타이드의 ESI-MS 신호들이 강화된

[0040] 도 2a 내지 2d는 쿠커비투릴[7]이 첨가된 것과 그렇지 않은 펩신 소화된 펩타이드들의 질량 스펙트럼을 나타낸다. 또한, 표 1은 N-말단 페닐알라닌을 갖는 펩타이드들의 피크들, 및 쿠커비투릴[7] 존재 및 부존재 하에서

그 상대적 존재비의 비율을 나열한 것이다.

표 1

Protein	Sequence (residue)	Peptide m/z (charge state)	CB[7]-peptide complex m/z (charge state)	RA ratio
InsB	FVNQHLCGSHL (1-11)	418.77 (+3)	806.58 (+3)	4.98
	FVNQHLCGSHLVE (1-13)	494.81 (+3)	882.63 (+3)	3.93
Ins	FVNQHLCGSHL (1-11)	627.81 (+2)	806.72 (+3)	10.23
	FVNQHLCGSHLVE (1-13)	741.88 (+2)	882.75 (+3)	2.85
	GIVEQCCTSICSL/FVNQHLCGSHL (A1-13/B1-11)	869.40 (+3)	943.21 (+4)	7.19
	GIVEQCCTSICSL/FVNQHLCGSHLVE (A1-13/B1-13)	945.45 (+3)	1000.23 (+4)	3.14
Ubq	FVKTLTGKTITL (4-15)	441.25 (+3)	829.11 (+3)	8.91
Myb	FTGHPETLEKFDKFKHLKTEAE MKASEDLKKHGTIVL (34-70)	611.16 (+7)	906.46 (+6)	1.92

[0041]

[0042]

소화된 InsB 샘플 상에서 N-말단 페닐알라닌을 갖는 두 개의 펩타이드 종들 (B1-11 및 B1-13, 도 2a에서 별도 색상 표시됨)이 관찰되었지만 쿠커비투릴[7] 부존재 하에서는, 그 존재비가 낮았다. 이 샘플에 쿠커비투릴[7]을 첨가함으로써, InsB1-11 (FVNQHLCGSHL) 및 InsB1-13 (FVNQHLCGSHLVE) 펩타이드들의 존재비는 각각 ~5배 및 ~4배 증가하였으며, 쿠커비투릴[7] 펩타이드 복합체 피크가 질량 스펙트럼상에서 가장 커지게 되었다. 상기된 InsB1-11 및 InsB1-13 펩타이드들에 더해서, Ins를 펩신 소화시킨 경우 N-말단 페닐알라닌을 함유한 두 가지 펩타이드들이 추가적으로 생성되었다 (도 2b 참조). 이러한 두 가지 펩타이드 이온들의 존재비 역시 쿠커비투릴[7] 첨가에 의해서 각각 ~7배 및 ~3배 증가하였다.

[0043]

더 큰 단백질인 Ubq를 분석한 결과, N-말단 페닐알라닌을 갖는 펩타이드에 대한 신호들이 초기에는 거의 검출가능하지 않음을 알 수 있었다 (도 2c 참조). 이러한 펩타이드 피크들의 낮은 신호는 이중 질량 분석법을 사용하여 상기 서열들을 더욱 확인하고 특성화하는 통상적인 분석 과정에서 문제를 야기한다. 쿠커비투릴[7]의 첨가에 따라서, Ubq4-15 펩타이드 (FVKTLTGKTITL) 피크는 상대적 존재비에 있어서 ~9배 증가하는 것으로 나타나서 분석이 매우 용이해졌다. Myb의 경우에도 유사한 강화 효과가 관찰되었는 바 (도 2d 참조), Myb34-70 (FTGHPETLEKFDKFKHLKTEAE MKASEDLKKHGTIVL) 펩타이드의 존재비가 2배 증가됨을 관찰할 수 있었다. 4가지 다른 단백질들에 대해서 관찰된 일관된 신호 강화 현상은 펩신 소화한 펩타이드를 쿠커비투릴[7]과 결합시키는 것이 광범위하게 적용가능한 효과적인 기술이라는 것을 의미한다.

[0044]

CID에 있어서 쿠커비투릴[7] · 펩타이드 복합체들의 향상된 서열 커버리지

[0045]

이중 질량분석법을 사용하여 단편 이온들을 분석하는 것은 펩타이드 이온들의 정확한 특정화를 위해서 중요한 과정이다. 따라서, 본 실시예에서는 쿠커비투릴[7] · 펩타이드 복합체 이온들에도 이중 질량분석법을 활용한 정확한 특정화가 가능한지를 테스트하였다 (도 3a 내지 3d 참조). 또한, 복합체화된 이온들의 서열 커버리지 및 상보 b/y 이온 쌍 검출의 백분율을 복합체화되지 않은 이온들과 비교하였으며, 상기 두 가지 사항들은 모두 이중 질량분석법을 사용한 신뢰성 있는 분석에 있어서 중요한 사항들이다. 이중 질량 분석법의 효율을 비교하기 위해 쿠커비투릴[7] 결합체 및 비결합체 이온들에 대해 상기 사항들을 비교하였으며, 가장 풍부한 펩타이드 이온들로서, 그 피크들이 다른 피크들과 중첩되지 않는 이온들을 비교하였고, 그 결과를 하기 표 2에 요약하였다.

표 2

Ion		Sequence coverage	Percentage of b/y complementary ion pairs
Uncomplexed	InsB1-11 ³⁺	90%	40%
	InsB1-13 ³⁺	83%	50%
	InsA1-13/B1-11 ³⁺	86%	36%
	InsA1-13/B1-13 ³⁺	83%	38%
	Ubq4-15 ³⁺	73%	45%
	Myb34-70 ⁷⁺	61%	22%
Complexed	*InsB1-11 ³⁺	100%	80%
	*InsB1-13 ³⁺	100%	67%
	*InsA1-13/B1-11 ⁴⁺	100%	55%
	*InsA1-13/B1-13 ⁴⁺	92%	54%
	*Ubq4-15 ³⁺	100%	73%
	*Myb34-70 ⁶⁺	75%	47%

[0046]

[0047]

복합체화되지 않은 InsB1-11 이온의 CID 스펙트럼은 b- 및 y-타입 단편 이온들로 구성된 것으로 관찰되었으며, 이는 저-에너지 CID에서 통상적으로 관찰되는 단편들이다 (Paizs, B.; Suhai, S. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 508-548). 유사하게, 복합체화된 InsB1-11 이온 또한 b- 및 y-타입 단편 이온들로 해리되었으며 (도 3a, 하단), 이를 통해 부가적인 서열 정보를 얻을 수 있다. 흥미롭게, 복합체화된 InsB1-11 이온의 경우 100%에 달하는 서열 커버리지가 얻어졌으나, 복합체화 되지 않은 이온은 Gly8 및 Ser9 사이에서 단편화가 이루어지지 않았다 (도 3a의 삽입 도면). 더 나아가, 복합체화된 이온의 경우, 부가적인 *b₃, *b₄²⁺, 및 *b₅²⁺ 이온들의 관찰로 인해서, 더 많은 개수의 b/y 상보 이온 쌍들이 존재하였다. 이러한 결과는 쿠커비투릴[7] 복합체화가 펩타이드들의 이중 질량분석 결과를 개선시킬 수 있다는 것을 의미한다. 다른 펩타이드 이온들 및 그들의 복합체들에 대한 CID 또한 더욱 광범위하게 단편화된 b- 및 y-타입 단편 이온들을 생성하였다 (도 3b-d 및 표 2 참조). 모든 경우, 쿠커비투릴[7] 복합체가 더욱 개선된 분석 결과를 나타내었다. 예를 들어, 복합체화되지 않은 InsA1-11/B1-11 이온에서는 22개 중 19개의 아미드 결합들이 절단되었으며, 8개의 b/y 상보 이온 쌍들이 존재하였다 (도 3b, 상단). 복합체화된 형태에서는, 모든 아미드 결합들이 절단되었으며, 12개의 b/y 상보 이온 쌍들이 존재하였다 (도 3b 하단).

[0048]

Ubq4-15 펩타이드 이온 역시 완전한 서열 커버리지를 나타내었으며, 복합체화된 형태에서 더 많은 수의 b/y 상보 이온 쌍들이 관찰되었다 (표 2 참조). 복합체화된 Myb34-70 이온의 서열은 그 크기가 너무 커서 완전히 커버되지 않았지만, 그럼에도 불구하고 광범위한 단편화가 관찰되었다 (61% 내지 75%, 표 2 참조). 표 2를 참조하면, 복합체화된 InsB1-13 및 InsA1-13/B1-13 이온들 또한 증가된 서열 커버리지 (각각 83% 내지 100% 및 83% 내지 92%) 및 더 큰 b/y 상보 이온 쌍들의 비율을 나타낼 수 있다. 다양한 펩타이드들에 대해서 관찰되는 단편화 효율의 일관된 향상은, 펩타이드를 쿠커비투릴[7]과 복합체화함으로써, 화학적 반응을 이용한 펩타이드 변형 또는 특별한 처리 없이도, 쿠커비투릴[7] 부존재 하에서 통상적으로 가능한 것보다 더욱 향상된 단편화 및 분석이 가능하다는 것을 보여준다.

[0049]

쿠커비투릴[7]과의 복합체화에 의해서 N-말단 페닐알라닌을 갖는 펩신 소화된 펩타이드의 MALDI-MS 신호들이 강화된

[0050]

쿠커비투릴[7]의 신호 강화 효과는 또한 MALDI 스펙트럼에서도 관찰되었다. InsB의 소화로부터 얻어진, N-말단

페닐알라닌을 함유하는 3가지 펩타이드들의 경우, 쿠커비투릴[7]과 복합체를 형성하는 경우에 그 상대적 존재비에 있어서 ~2배 내지 ~8배 증가를 나타내었다 (도 4a 참조). 또한, 초기에는 검출불가능하였던 InsB25-30 펩타이드가 쿠커비투릴[7]의 첨가 이후에 뚜렷하게 관찰가능하게 되었다. 유사하게, MALDI-MS에 의해서 검출가능하지 않았던 Ubq4-15 펩타이드의 경우, 쿠커비투릴[7]이 첨가되면 매우 풍부해졌다 (도 4b). 따라서, 쿠커비투릴[7]의 신호 강화 효과는 ESI-MS에만 한정된 것은 아니며, MALDI-MS에도 적용가능하고, 쿠커비투릴[7]의 부존재 하에서는 용이하게 검출할 수 없었던 펩타이드들에 대한 정보를 얻게 해준다.

[0051] 쿠커비투릴[7]에 의해서 매개되는 강화된 질량분석 신호 및 단편화에 대한 이해

[0052] 종래에 쿠커비투릴[7]의 이온화가, 더 높게 대전된 복합체 이온들을 생성한다는 사실이 보고된 바 있다 (Lee, J. W.; Lee, H. H. L.; Ko, Y. H.; Kim, K.; Kim, H. I. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4628-4636). 이는 양으로 대전된 손님 분자의 작용기들이 쿠커비투릴[7]의 입구 부분의 카르보닐기와의 강한 이온-쌍극자 상호작용에 의해서 안정화되고, 따라서 두 양이온 작용기들 사이의 정전기적 반발력을 감소시키기 때문이다. 유사한 대전 강화 효과가 본 발명에서도 야기되는 것으로 판단된다. 예를 들어, N-말단 페닐알라닌을 함유한 B-사슬 Ins 펩타이드 (B1-11 및 B1-13) 및 Ins 펩타이드 (A1-13/B1-11 및 A1-13/B1-13)의 가장 풍부한 대전 상태들은 쿠커비투릴[7]의 부존재 하에서는 각각 +2 및 +3이지만, 쿠커비투릴[7]이 첨가되면 각각 +3 및 +4가 된다 (도 2b 참조). Ubq4-15 펩타이드의 경우에는, 쿠커비투릴[7]을 첨가함으로써 +2 대전된 이온들이 사라지며, +3 대전된 이온들만 관찰된다 (도 2c 참조). 이러한 결과들은 쿠커비투릴[7]이 그 손님 분자들에 대해서 대전 강화 효과를 야기한다는 사실을 명백히 보여준다. 종래의 연구들도 유사한 효과들을 보고한 바 있다 (Lee, J. W.; Lee, H. H. L.; Ko, Y. H.; Kim, K.; Kim, H. I. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4628-4636). 한편, 높은 양성자 친화도는 ESI 및 MALDI에 의한 효과적인 이온화를 위해서 가장 중요한 인자들 중 하나인데 (Mirzaei, H.; Regnier, F. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4175-4183), 이는 다수의 분석물들이 이온화 과정 도중에 양성자를 얻어 이온화되기 위해서 경쟁하기 때문이다. 따라서, 쿠커비투릴[7]에 의한 대전 강화효과는 펩타이드들의 양성자 친화도를 높이며, 이는 각 펩타이드 이온의 신호 강화를 야기한 것으로 추측해볼 수 있다.

[0053] 쿠커비투릴[7] · 펩타이드 복합체 이온들을 더욱 자세히 이해하기 위해서, 본 발명에서는 IM-MS를 사용하여 쿠커비투릴[7] · 펩타이드의 구조를 조사하였으며 (도 5 참조), 이는 컴퓨터 모델링과 함께, 펩타이드 이온들의 구조적 정보를 제공할 수 있다. IM-MS 결과에 따르면, 복합체화된 펩타이드 이온들 및 복합체화되지 않은 펩타이드 이온들 모두 일반적으로 하나 또는 두 가지 구조들로 존재한다. 컴퓨터 모델링을 통해서 얻은 복합체 이온들의 최저 에너지 구조들에 대한 이론적 충돌 단면적 (Ω_0) 수치들은 일반적으로 실험적 수치들과 잘 부합되는 결과를 보여주었다. 상기 이론적 모델들의 구조를 살펴보면, 쿠커비투릴[7]이 펩타이드들의 N-말단 페닐알라닌에 결합된다는 것을 보여준다. 흥미로운 점은, 상기 모델들은 또한 쿠커비투릴[7]이 페닐알라닌 N-말단 이외에 다른 양전하로 대전된 잔기를 자신 쪽으로 끌어당겨서 '펩타이드 족집게 (peptide tweezer)' 구조를 형성한다는 점이다 (도 5). 쿠커비투릴[7]에 의해서 야기되는 이러한 펩타이드들의 구조적 특징들은 이전에 보고된 바가 전혀 없으며, 쿠커비투릴[7]이 탁월한 전하 안정 능력을 갖는다는 것을 의미한다.

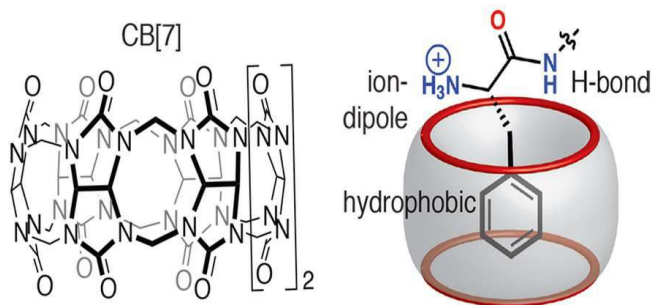
[0054] 상기 결과들에 기초해서, 본 발명자들은 쿠커비투릴[7]이 이중 질량분석 과정에서 펩타이드의 단편화를 촉진하는 것은 펩타이드의 작용기들과 효과적으로 상호작용하기 때문이라고 판단하였다. 예를 들어, 도 3c는 Lys 잔기들의 C-말단 아미드 백본에서의 절단이, 복합체화되지 않은 Ubq4-15 펩타이드 이온들의 CID에서는 발생되지 않는다는 점을 보여준다. 이러한 사실은 Lys 존재할 경우 그 C-말단 아미드 결합의 절단이 잘 일어난다는 점과는 대조적인 것이다 (Paizs, B.; Suhai, S. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 508-548). 그런데, Lys 잔기에 대한 아미드 결합 C-말단의 절단에서는 Lys 결사슬의 중성화 및 아미드 결합으로의 양성자 수송이 선행되어야 하기 때문에, 이러한 과정들이 복합체화되지 않은 Ubq4-15 이온에 대해서는 잘 일어나지 않는 것으로 추측해볼 수 있다. 이와는 대조적으로, 본 발명에 따른 실험 결과들은, 펩타이드가 쿠커비투릴[7]과 복합체를 형성하는 경우에는, 이러한 부위들에서의 단편화가 가능해짐을 보여준다 (도 3c, 하단). 상기 결과들은 쿠커비투릴[7]이 Lys 잔기의 중성화 및 그 C-말단 아미드 결합으로의 양성자 수송을 용이하게 할 수 있다는 점을 보여준다. 따라서, 본 발명자들은 쿠커비투릴[7]이 양으로 대전된 Lys 결사슬과 상호작용하면서 그 양성자의 이동을 촉진시키고, 다시 그 양성자가 Lys 잔기에 대한 아미드 결합 C-말단으로 이동할 수 있게 함으로써 더 효율적인 단편화를 유발하는 것으로 판단한다 (도 6 참조).

[0055] 종합하면, 본 발명에서는 쿠커비투릴[7]에 의해서 펩신으로 소화한 펩타이드의 신호 및 이중 질량 분석법에서 서열 커버리지를 향상시키는 것을 통해서 단백질들에 대한 개선된 질량분석법 기반 분석 방법을 제시하였다. 본 발명자들은 쿠커비투릴[7]으로 N-말단 페닐알라닌을 포획함으로써, 펩신으로 소화된 펩타이드들의 질량분석

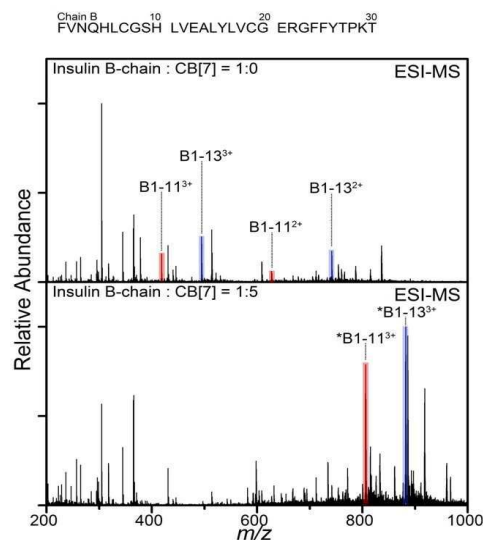
법에서의 분석능을 선택적으로 개선할 수 있는 일반적인 접근방법을 제공할 수 있다는 점을 입증하였다. 쿠커비투릴[7] 첨가에 의한 신호 강화는 양성자 친화도의 증가로 인한 것으로 판단해 볼 수 있다. 또한, 쿠커비투릴[7]에 의한 개선된 서열 커버리지는, 쿠커비투릴[7]이 CID 도중 다양한 양으로 대전된 잔기들과 강하게 상호 작용하여 여러 단편화 경로들을 가능케 하기 때문으로 판단해 볼 수 있다. 본 발명에 따른 방법은 새로운 기기, 화학적 표지 또는 특수 샘플 제조를 요하는 것이 아니며, 상업적으로 용이하게 구입가능한 소량의 쿠커비투릴[7]을 간단하게 샘플에 첨가함으로써 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명의 간편성 및 일반성을 감안할 때, 본 발명은 범용 단백질 분석을 위한 매우 효과적인 수단을 제공할 수 있다.

도면

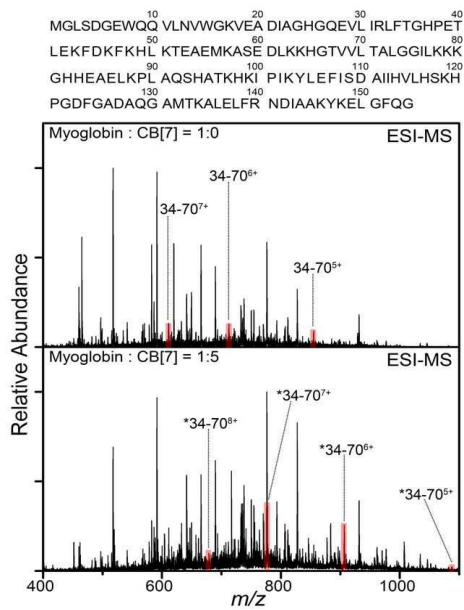
도면1



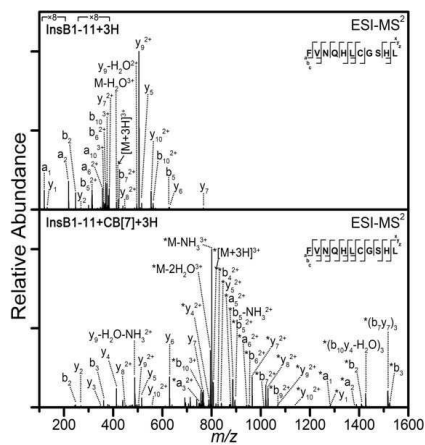
도면2a



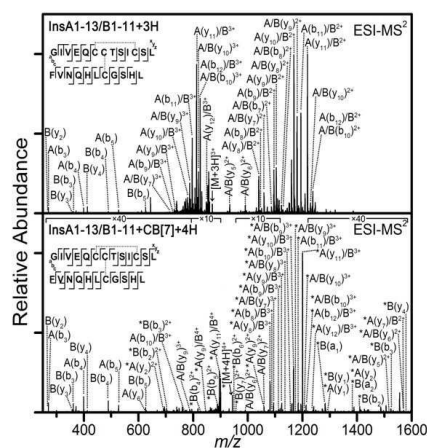
도면2d



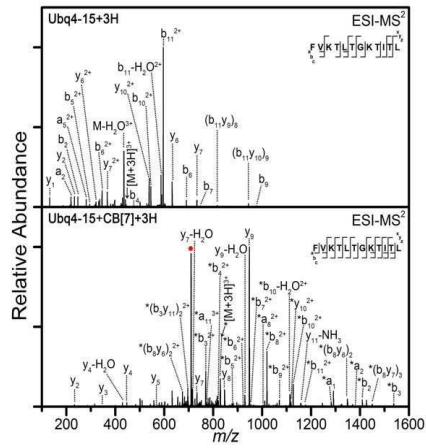
도면3a



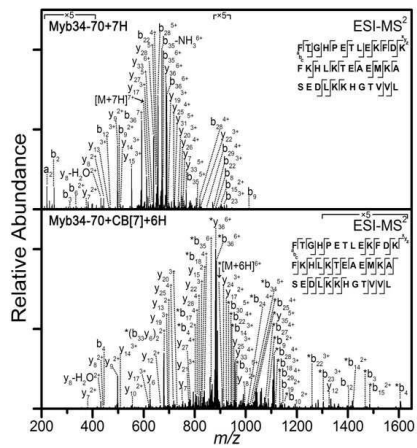
도면3b



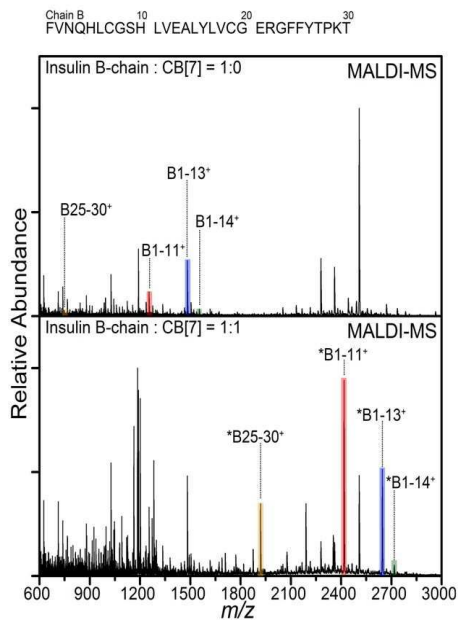
도면3c



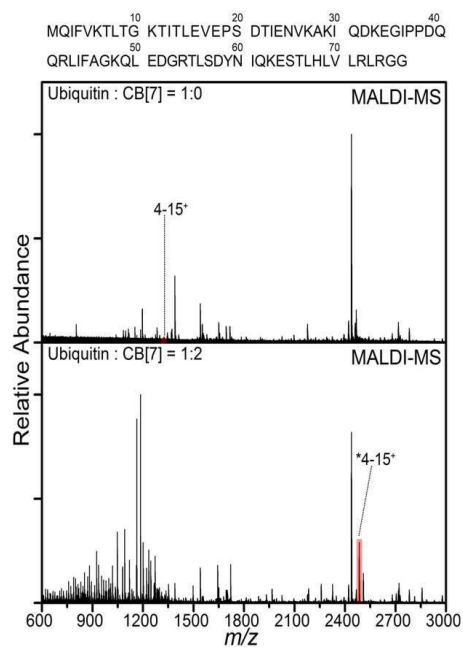
도면3d



도면4a



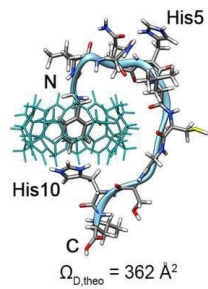
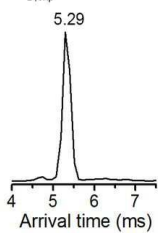
도면4b



도면5

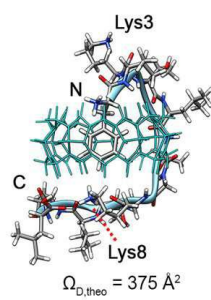
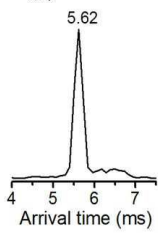
[InsB1-11+CB[7]+3H]³⁺

$$\Omega_{D,exp} = 347 \pm 3 \text{ \AA}^2$$



[Ubq4-15+CB[7]+3H]³⁺

$$\Omega_{D,exp} = 364 \pm 5 \text{ \AA}^2$$



도면6

