

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0116733
(43) 공개일자 2020년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 30/06 (2006.01) G01N 27/64 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 30/06 (2013.01)

G01N 27/64 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0038516

(22) 출원일자 2019년04월02일

심사청구일자 2019년04월02일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김준곤

서울특별시 서초구 서운로 104, 204동 1802호

이현희

전라북도 전주시 완산구 구룡2길 24, 204호

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 6 항

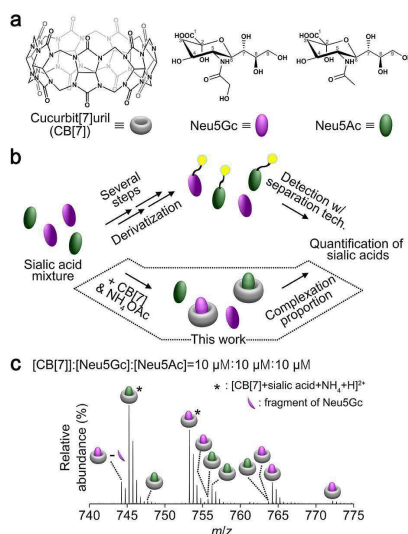
(54) 발명의 명칭 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법

(57) 요약

본 발명은 전자분무이온화 방법을 이용하여 $[CB[7]+시알산+NH_4+H]^+$ 복합체 이온을 형성한 후, 질량분석법을 이용하여 비인간 시알산의 분석능을 획기적으로 향상시킬 수 있는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법을 이용하면, 간단한 방법을 통해 시알산의 정확한 상대 정량 및 절대 정량을 가능하게 하는 효과가 있어 비인간 시알산의 분석 시간 및 비용을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 30/7266 (2013.01)
 G01N 33/6848 (2013.01)
 G01N 2030/067 (2013.01)
 G01N 2030/8831 (2013.01)
 G01N 2030/8836 (2013.01)
 G01N 2440/38 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711070839
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원(1.5억초과~3억이하)
연구과제명	생물리화학적 이해를 기반으로 한 아밀로이드성 단백질 표준 정량 기법 개발
기 여 율	80/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.04.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711079632/CAP-15-10-KRICT
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국표준과학연구원
연구사업명	연구용역
연구과제명	3차원 세포배양 세포간 작용 속도론 연구
기 여 율	20/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 시알산 용액에 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염을 혼합하여 혼합물을 생성하는 단계;
- (b) 상기 혼합물을 전자분무이온화전자분무이온화(electrospray ionization) 방법으로 이온화시켜 $[CB[7]+시알산+NH_4+H]^+$ 복합체 이온을 형성하는 단계; 및
- (c) 상기 복합체 이온을 질량분석법을 이용하여 정량 분석하는 단계;를 포함하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시알산은 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc), N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac) 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암모늄염은 아세트산암모늄, 염화암모늄, 탄산암모늄, 수산화암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계의 $[CB[7]+시알산+NH_4+H]^+$ 복합체 이온은 상기 혼합물의 전자분무이온화에 의해, 쿠커비투릴[7]의 양 입구(portal) 중 어느 하나인 제1 입구 영역과 시알산의 양성자화된 아세트아마이드기(acetamide group)의 기체상 호스트-게스트 상호작용 및 쿠커비투릴[7]의 양 입구(portal) 중 다른 하나인 제2 입구 영역과 암모늄 이온, 시알산의 수산기(hydroxyl group)의 기체상 호스트-게스트 상호작용에 의해 형성되는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 시알산의 정량 분석 시 상기 (a) 단계의 시알산 용액은 서로 다른 복수의 분석대상 시알산이 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 시알산의 정량 분석은 표준 첨가법(standard addition method)으로 도출한 검정 곡선을 통해 수행하는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 단백질에 글리코실화 되어 있는 시알산들 중 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc)와 N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac)는 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, 이들의 구조는 매우 유사하여 수산기 그룹(hydroxyl group)의 유무에 의해 구별된다. 이러한 구조적 유사성으로 인하여, Neu5Gc와 Neu5Ac가 혼합물로 존재할 경우, 물리적 특성이 유사하여 액체 크로마토그래피 상에서 용출 시간(elution time)이 겹치게 되기 때문에 이들을 정량적으로 분석하기 위해서는 Neu5Gc와 Neu5Ac의 유도체화(derivatization) 과정이 필수적으로 요구된다.
- [0003] 한편, 쿠커비투릴[7](cucurbit[7]uril, CB[7])은 합성 고분자인 쿠커비투릴 동족체의 하나이다. 쿠커비투릴 동족체는 글라이코우릴(glycouril) 단량체로 구성되어 있고, 단량체의 개수에 따라 CB[6], CB[7], CB[8] 등이 존재한다. 이 동족체들은 가운데가 구멍이 뚫린 호박 모형으로써, 그 가운데의 크기에 알맞은 여러 게스트 분자(guest molecule)들을 수용할 수 있다. 구멍의 양 입구는 부분적으로 음전하를 띄는 카르보닐기가 단량체의 개수에 맞춰 존재하고, 구멍 내부는 소수성을 띄고 있다.
- [0004] 또한, 전자분무이온화 질량분석기는 전자분무이온화 기술과 질량분석기 기술이 합쳐져 있는 기기이다. 우선, 질량분석기관 질량분석법(mass spectrometry, MS)을 사용할 수 있는 기기를 지칭한다. 질량분석법이란 시료를 이온화한 뒤 수집하여, 그 개개의 이온을 질량과 전하의 비(mass to charge ratio, m/z)에 따라 분리, 검출해서 각 m/z 에 따른 이온들의 양을 측정하는 방법이다. 또한, 전자분무이온화는 질량분석기에서 감지될 이온들을 생성하기 위한 연성이온화(soft ionization) 기술로서, 고분자나 비공유결합 복합체들이 이온화 과정 중 쪼개져 조각 이온들이 생성되는 문제가 발생하지 않는바, 생명, 의학 분야에서 널리 활용되고 있다.
- [0005] 진술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 종래 Neu5Gc와 Neu5Ac 정량 분석 방법의 문제점을 해결하기 위해 예의 연구한 결과, Neu5Gc와 Neu5Ac 혼합 용액에 CB[7]과 아세트산암모늄(ammonium acetate, NH_4OAc)을 혼합하여 전자분무이온화 질량분석법을 수행할 경우 별도의 유도체화 과정 없이도 정량 분석이 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2017-0076236호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명에서는 전자분무이온화 방법을 이용하여 $[\text{CB}[7]+\text{시알산}+\text{NH}_4\text{H}]^{2+}$ 복합체 이온을 형성한 후, 질량분석법을 이용하여 비인간 시알산의 분석능을 획기적으로 향상시킬 수 있는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0009] (a) 시알산 용액에 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염을 혼합하여 혼합물을 생성하는 단계; (b) 상기 혼합물을 전자분무이온화전자분무이온화(electrospray ionization) 방법으로 이온화시켜 $[\text{CB}[7]+\text{시알산}+\text{NH}_4\text{H}]^{2+}$ 복합체 이온을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 복합체 이온을 질량분석법을 이용하여 정량 분석하는 단계;를 포함하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명에 따르면, 상기 시알산은 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc), N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac) 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0011] 본 발명에 따르면, 상기 암모늄염은 아세트산암모늄, 염화암모늄, 탄산암모늄, 수산화암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0012] 본 발명에 따르면, 상기 (b) 단계의 $[CB[7]+시알산+NH_4H]^{2+}$ 복합체 이온은 상기 혼합물의 전자분무이온화에 의해, 쿠커비투릴[7]의 양 입구(portal) 중 어느 하나인 제1 입구 영역과 시알산의 양성자화된 아세트아마이드기(acetamide group)의 기체상 호스트-게스트 상호작용 및 쿠커비투릴[7]의 양 입구(portal) 중 다른 하나인 제2 입구 영역과 암모늄 이온, 시알산의 수산기(hydroxyl group)의 기체상 호스트-게스트 상호작용에 의해 형성되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 시알산의 정량 분석 시 상기 (a) 단계의 시알산 용액은 서로 다른 복수의 분석대상 시알산이 혼합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 시알산의 정량 분석은 표준 첨가법(standard addition method)으로 도출한 검정 곡선을 통해 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법을 이용하면, 간단한 방법을 통해 시알산의 정확한 상대 정량 및 절대 정량을 가능하게 하는 효과가 있어 비인간 시알산의 분석 시간 및 비용을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 시알산 분석을 위한 호스트-게스트 전략을 도식화한 것이다. (a)는 CB[7], Neu5Gc 및 Neu5Ac의 구조를 나타낸 것이고, (b)는 본 발명에 이용된 호스트-게스트 화학에 대한 모식도, (c)는 CB[7], Neu5Gc 및 Neu5Ac를 함유하는 혼합물의 질량 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 2는 기체상 호스트-게스트 화학을 이용한 시알산의 정량화 결과를 나타낸 것이다. (a)는 상이한 총 시알산 농도($[SA]_t$)에서의 Neu5Gc 및 Neu5Ac의 공존 비율(Complexation proportion)을 나타낸 검정 곡선이다. (b)는 상기 (a)의 검정 곡선을 기반으로 시알산 이원 혼합물을 정량한 결과를 나타낸다. x축은 이원 혼합물 내 각 시알산의 농도($[SA]_{sol}$)이고 y축은 본 발명에 따른 분석법을 통해 유추한 시알산 이원 혼합물들의 농도($[SA]_{det}$)를 나타낸다. (c)는 상기 (a)의 검정 곡선을 기반으로 단일 시알산 용액을 정량한 결과를 나타낸다. x축과 y축은 각각 용액 내 시알산의 농도($[SA]_{sol}$)와 본 발명에 따른 분석법을 통해 유추한 시알산의 농도($[SA]_{det}$)를 나타낸다.

도 3은 시알산과 CB[7]의 기체상 복합체화(Gas-phase complexation)를 나타낸 것이다. (a) CB[7]-시알산 복합체 이온 및 free CB[7] 이온의 IM 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다. 각 이온의 실험 충돌 단면(experimental collision cross section)은 각 IM 피크 상단에 표시하였다. (b)는 Neu5Gc 및 Neu5Ac의 아세트아마이드 그룹의 2가지 양자화 구조를 나타낸 것이다. (c)는 CB[7]-Neu5Gc (상부) 및 CB[7]-Neu5Ac (하부) 복합체 이온의 대표 구조를 나타낸 것이다. (d)는 시알산 이온의 상대적 결합 에너지 (ΔBEs)를 나타낸 것이다. ΔBEs 는 O-양성자화된 Neu5Gc 이온의 결합 에너지의 차이를 나타낸다. (e)는 상기 대표 구조의 확장된 구조를 나타낸 것이다.

도 4는 기체상 호스트-게스트 화학을 이용한 당 단백질 내 시알산의 정량결과를 나타낸 것이다. 모든 단백질들은 본 도면에서 생략하였다. Cetuximab (cet)의 $\mu g_{sialic\ acid}/mg_{protein}$ 값과 bovine mucin I-S (mucin)의 $mol_{sialic\ acid}/mol_{protein}$ 값은 cet 표본의 용액 상태와 mucin의 알려지지 않은 서열의 결과로 cet의 질량과 mucin의 몰 농도를 얻을 수 없기 때문에 제외하였다. 기준 농도는 이전에 보고된 농도를 평균하여 수록하였다.

도 5는 시알산 이원 혼합물에 CB[7] 및 NH_4OAc 를 첨가하였을 때의 질량 분석 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 전술한 바와 같이, 단백질에 글리코실화 되어 있는 시알산들 중 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc)와 N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac)는 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, 이들의 매우 유사한 구조로 인해 정량 분석이 어렵다는 문제가 있으며, 종래 시알산의 정량 분석 기술들은 긴 분석시간을 필요로 하는 시알산들의 유도체화(derivatization) 과정이 요구된다는 단점이 있다.

[0019] 이에, 본 발명에서는 전자분무이온화 방법을 이용하여 $[CB[7]+시알산+NH_4H]^{2+}$ 복합체 이온을 형성한 후, 질량분

석법을 이용하여 비인간 시알산의 분석능을 획기적으로 향상시킬 수 있는 쿠커비투릴[7]을 이용한 비인간 시알산의 정량 분석방법을 제공하고자 한다.

- [0020] 도 1은 본 발명에 따른 호스트-게스트 전략을 이용한 시알산의 정량 분석 방법을 도식화한 것이다.
- [0021] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 비인간 시알산의 정량 분석방법은 (a) 시알산 용액에 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염을 혼합하여 혼합물을 생성하는 단계; (b) 상기 혼합물을 전자분무이온화전자분무이온화(electrospray ionization) 방법으로 이온화시켜 $[CB[7]+시알산+NH_4+H]^+_{2+}$ 복합체 이온을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 복합체 이온을 질량분석법을 이용하여 정량 분석하는 단계;를 포함한다.
- [0022] 이때, 상기 시알산은 당업계에 공지된 시알산이라면 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc), N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac) 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 암모늄염은 암모늄 이온을 포함하는 염이라면 이에 제한되는 것은 아니지만, 바람직하게는 아세트산 암모늄, 염화암모늄, 탄산암모늄, 수산화암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 (b) 단계의 $[CB[7]+시알산+NH_4+H]^+_{2+}$ 복합체 이온은 상기 혼합물의 전자분무이온화에 의해, 쿠커비투릴[7]의 양 입구(portal) 중 어느 하나인 제1 입구 영역과 시알산의 양성자화된 아세트아마이드기(acetamide group)의 기체상 호스트-게스트 상호작용 및 쿠커비투릴[7]의 양 입구(portal) 중 다른 하나인 제2 입구 영역과 암모늄 이온, 시알산의 수산기(hydroxyl group)의 기체상 호스트-게스트 상호작용에 의해 형성될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 분석대상 시알산이 혼합되어 있는 경우에는 각 시알산별로 정량화할 수 있는데, 이때, 상기 (a) 단계의 시알산 용액은 서로 다른 복수의 분석대상 시알산이 혼합되어 있으며, 하기 실시예에서 설명하는 바와 같이 표준 첨가법(standard addition method)으로 도출한 검정 곡선을 통해 수행할 수 있다.
- [0027] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0028] **실험 방법**
- [0029] 재료
- [0030] N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc)와 N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac)의 표준 물질(standards), 쿠커비투릴[7], 아세트산암모늄(NH_4OAc), 포름산(Formic acid, FA), 아세트산($\geq 99\%$), Bovine mucin I-S, bovine transferrin, human transferrin, human $\alpha 1$ -acid glycoprotein, HEK293 세포에서 발현되는 erythropoietin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 염화수소 표준 용액 (6.0 M)은 Honeywell Fluka (Morris Plains, NJ, USA)에서 구입하였다. 제1 및 제2 인산나트륨(sodium phosphate)은 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi, South Korea)에서 구입하였다. Cetuximab (Erbix)은 고려대학교 의과대학으로부터 기증받았다. 다공성 그래파이트 탄소 (HyperSep Hypercarb SPE 카트리지)가 충전된 고상 추출 카트리지는 ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 용매로는 HPLC-등급 물과 아세토니트릴 (ACN) (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA)을 사용하였다.
- [0032] 전자분무 이온화 질량분석법(ESI-MS)
- [0033] 호스트-게스트(host-guest) 화학을 사용하여 혼합물에서 시알산을 측정하기 위한 모든 MS 실험은 양이온 모드에서, ESI (electrospray ionization) 소스를 구비한 Agilent 6560 ion mobility quadrupole time-of-flight (IM-QTOF) 질량 분광계를 사용하여 수행하였다.
- [0034] Neu5Gc 및 Neu5Ac의 정량화를 위한 $CB[7]$ -시알산 복합체의 이온화를 위해, 가스 온도, 건조 가스 유량 및 분무기 압력을 각각 325 °C, 3 L/min 및 20 psig로 설정 하였다. 시스 가스(sheath gas) 유량 및 온도는 각각 8 L/min 및 100 °C로 설정하였다. VCap, 노즐 전압, 프래그먼트 전압 및 Oct 1 RF Vpp도 각각 3500, 2000, 350 및 700V로 설정하였다. IM 실험은 헬륨으로 채워진 드리프트 셀에서 수행하였으며, 드리프트 셀 압력은 3.950 Torr로 설정하였다.

[0036] 컴퓨팅 계산 및 계산된 구조의 이론적인 CCSs 계산

[0037] 모든 MD 시뮬레이션 결과는 GROMACS 4.5.5를 사용하여 수행하였다. 시뮬레이션을 위해 CHARMM 제너럴 포스필드 (Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I. J. Comput. Chem. 2010, 31 (4), 671-690.)를 사용하였다. CB[7]-시알산 복합체 이온의 초기 구조는 Hyperchem 7.5 (Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA)를 사용하여 구성하였다. MD 시뮬레이션은 후보 구조로서 기상의 복합체 이온의 최저 에너지 구조를 얻기 위해 수행되었다. 특정 구조물에 갇히는 것을 방지하기 위해 300K와 600K 사이에서 어닐링 시뮬레이션을 수행하였다. 300 어닐링 사이클 (90 ns)의 마지막 프레임을 추출하고, 포텐셜 에너지를 기준으로 각 복합체 이온에 대한 5 개의 구조를 선택하였다. 선택된 구조는 Becke three-parameter를 이용하고, Q-Chem 4.1 계산 패키지 (Q-Chem Inc., Pittsburgh, PA, USA)를 이용한 DFT 계산을 통해 더욱 최적화하였다. 복합체 이온의 이론적인 충돌 단면은 수정된 궤도법(modified trajectory method)을 사용하여 계산하였다(Tangvoranuntakul, P.; Gagneux, P.; Diaz, S.; Bardor, M.; Varki, N.; Varki, A.; Muchmore, E. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003, 100 (21), 12045-12050.). 간략히, 이 CCS 계산 방법은 Exp-6 vdW 상호 작용 가능성을 분자 역학 포스필드(MMFF94)의 vdW 상호작용 변수와 결합한다. vdW 상호 작용 매개 변수는 다양한 이온의 정확한 CCS 예측을 위해 선형적으로 조정된다.

[0039] 당단백질(glycoprotein) 내 시알산의 분리

[0040] 당단백질 내 Neu5Gc와 Neu5Ac의 함량을 확인하기 위하여 다음의 분리 과정을 수행하였다. 우선 0.2-1.0 밀리그램의 당단백질은 HPLC grade의 수용액 120 마이크로리터에 녹였다. Cetuximab의 경우 용액으로 되어 있는 시료를 제공받았기 때문에 위 용액을 바로 실험에 사용하였다. 이후 4 몰농도의 acetic acid 100 마이크로리터를 위 당단백질 100 마이크로리터에 섞은 뒤, 해당 용액을 80 °C 오븐에 3시간 30분 동안 두었다. 남은 20 마이크로리터 당단백질 용액은 UV-Vis를 통해 용액 내 당단백질의 농도를 확인하기 위하여 사용되었다. 다음으로 오븐에 두었던 시료를 정제하기 위하여 PGC SPE cartridge를 사용하였다. 단백질을 주입하기 전에 해당 cartridge에 TFA 0.05%가 함유된 80% ACN 3 밀리미터를 주입하여 충전제를 씻어준 뒤, HPLC grade 수용액 2 밀리미터를 이어 주입하여 분리를 진행할 수 있는 환경이 되도록 준비하였다. 시료를 주입한 뒤, HPLC 수용액 1 밀리미터, 0.05% TFA가 함유된 10% ACN, 0.05% TFA가 함유된 20% ACN을 순차적으로 주입하였다. 시료를 주입한 뒤 각 elution을 e-tube에 받아 동결건조 하였으며, 건조가 완료된 시료는 100 마이크로리터 HPLC 수용액에 녹여 준비하였다. 마지막으로 Shim-pack GIS C18 column이 연결되어 있는 LCMS-8050을 이용하여 준비된 시료 내 시알산들을 분획하였다. 시알산들을 분획하기 위해 사용된 용매는 0.1% formic acid 수용액(A)과 0.1% formic acid ACN(B)이며, 해당 용매들의 변화도는 다음과 같다: 0-3.8 분, 0% B; 3.8-8.6분, B 용매가 0%부터 60%까지 선형적으로 증가; 8.6-10.6분, 60% B; 10.6-11.6분, B용매가 60%부터 0%까지 선형적으로 감소; 11.6-25.0분, 0% B. 최종적으로 얻은 분획된 용액을 동결 건조시킨 후, 표적 당 단백질의 시알산 정량에 이용하였다.

[0042] 결과 및 고찰

[0043] ESI-MS를 통해, CB[7]을 이용한 시알산의 초분자적 정량화

[0044] Neu5Gc와 Neu5Ac 혼합 용액에 CB[7](10 μ M)과 아세트산암모늄(ammonium acetate, NH_4OAc)(200 μ M)을 혼합하여 전자분무이온화 질량분석기를 통하여 분석한 결과, 기체상에서 Neu5Gc와 Neu5Ac가 모두 ESI 동안 CB [7]와 이중으로 하전된 복합체 이온을 형성 하며, 구체적으로 Neu5Gc와 Neu5Ac가 각각 CB[7]과 하나의 암모늄 이온 및 양성자와 복합체 이온을 형성함을 확인하였다(도 1c 및 도 5). Neu5Gc와 Neu5Ac의 몇 가지 복합 이온 피크는 스펙트럼에서 서로 중첩되어 관찰되었다(도 1c). 2개의 복합 이온 피크인 $[\text{CB}[7]+\text{Neu5Gc}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$ (observed: m/z 753.2409; calculated: m/z 753.2344) 와 $[\text{CB}[7]+\text{Neu5Ac}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$ (observed: m/z 745.2442; calculated: m/z 745.2458)는 그들의 단일동위원소 피크가 중첩되지 않았다. 시알산 이원혼합물의 정량을 위한 검정 곡선을 도출하기 위해, 두 시알산들의 농도를 아래의 [표 1]과 같이 준비하여 시알산 혼합물 용액을 제조한 후, 하기 식 1 내지 식 3을 이용하여 상기 시알산 이원 혼합물 용액들의 복합체 형성 비율을 도출한 후, 각 시알산의 용액 내 농도 비율을 함께 비교하여 도 2(a)의 검정 곡선으로 나타내었다:

표 1

[0045]

[Neu5Gc]+[Neu5Ac] (μ M)	[Neu5Gc] (μ M)	[Neu5Ac] (μ M)	[Neu5Gc]+[Neu5Ac] (μ M)	[Neu5Gc] (μ M)	[Neu5Ac] (μ M)
0.5	0.05	0.45	20	2	18
	0.15	0.35		6	14
	0.25	0.25		10	10
	0.35	0.15		14	6
	0.45	0.05		18	2
1.0	0.1	0.9	50	5	45
	0.3	0.7		15	35
	0.5	0.5		25	25
	0.7	0.3		35	15
	0.9	0.1		45	5
2.0	0.2	1.8	75	7.5	67.5
	0.6	1.4		22.5	52.5
	1.0	1.0		37.5	37.5
	1.4	0.6		52.5	22.5
	1.8	0.2		67.5	7.5
5.0	0.5	4.5	100	10	90
	1.5	3.5		30	70
	2.5	2.5		50	50
	3.5	1.5		70	30
	4.5	0.5		90	10
10	1	9			
	3	7			
	5	5			
	7	3			
	9	1			

[0046] [식 1]

[0047] $I_{\text{Neu5Gc}} = I_{m/z \ 753.24}$

[0048] [식 2]

[0049] $I_{\text{Neu5Ac}} = I_{m/z \ 745.24} - 0.170 \times I_{m/z \ 744.24}$

[0050] [식 3]

[0051] Complexation proportion for A = $I_A \div (I_A + I_B)$

[0052] 여기서 I_{Neu5Gc} 및 I_{Neu5Ac} 는 양성자 및 암모늄 양이온을 함유하는 Neu5Gc 및 Neu5Ac의 단일동위원소 복합체 이온 피크(monoisotopic complex ion peaks)의 강도를 나타낸다. 각각의 $I_{m/z}$ symbol은 아래 첨자에 기술된 m/z 와 함께 단일동위원소 피크의 강도를 나타낸다. I_{Neu5Gc} 는 $[\text{CB}[7]+\text{Neu5Gc}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$ 의 단일동위원소 피크 강도로부터 취득하였다(식 1). $\text{CB}[7]-\text{Neu5Ac}$ 복합체 이온의 강도는 $[\text{CB}[7]+\text{Neu5Ac}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$ 의 단일동위원소 피크 강도로부터 $[\text{CB}[7]+\text{Neu5Gc}+\text{NH}_4+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ 의 삼중동위원소 피크(tri-isotopic peak) 강도(observed: $m/z \ 744.2398$; calculated: $m/z \ 744.2381$)를 빼서, 삼중동위원소 피크와 단일동위원소 피크 사이의 중첩의 결과로서 I_{Neu5Ac} 의 증가를 배제하여 취득하였다(식 2). $\text{CB}[7]-\text{dehydrated Neu5Gc}$ 복합체의 삼중동위원소 피크의 단일동위원소 피크에 대한 강도 비율인 0.170은 복합체 이온의 동위원소 패턴으로부터 계산되었다. 시알산 (Neu5Gc 또는 Neu5Ac)에 대한 상대적인 복합체 형성 비율은 식 3을 사용하여 계산하였다. 다음으로, ESI 동안 이원 혼합물에서 Neu5Gc 및 Neu5Ac의 복합체 형성 비율을 조사하였다. 도 2a에 나타난 바와 같이, 이원 혼합물 용액에서의 복합체 형성 비율과 두 시알산들의 농도 비율은 강한 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다.

[0053] 두 시알산의 농도합과 농도비를 다르게 하며 농도비와 복합체 형성 비율 간의 직선성을 확인하였고, 그 결과 두 시알산의 농도 합이 0.5-100 μM 사이(0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 75, 100 μM)이고, Neu5Gc 대 Neu5Ac의 농도 비가 10-90% 사이(10, 30, 50, 70, 90%)일 경우 이들은 시알산과 CB[7]의 총 농도에 관계없이 우수한 선형성을 보였다($R^2 = 0.999$)(도 2a). 또한, 두 시알산의 CB[7]에 대한 복합체화 선택도는 매우 유사하였는데, 두 시알산의 농도비가 1:1일 때, ESI-MS를 사용하여 Neu5Gc와 Neu5Ac의 측정된 복합체화 비율은 각각 $47.2 \pm 0.9\%$ 와 $52.8 \pm 0.9\%$ 였다(도 2a). 또한, Neu5Gc와 Neu5Ac의 정량 한계는 각각 1.60 pmol, 0.65 pmol로 나타났으며, 확인된 linear range는 5-9,000 pmol로 측정된바, 본 발명에 따른 경우 유도체화 과정 없이도 시알산에 대한 정확한 정량 분석이 가능함을 확인하였다.

[0054] 다음으로, 농도가 알려지지 않는 Neu5Gc와 Neu5Ac의 혼합액에 농도를 알고 있는 Neu5Gc와 Neu5Ac의 표준 혼합액을 섞은 뒤 표준 혼합액의 복합체 형성비와 미지 용액과 표준 혼합액이 섞인 용액의 복합체 형성비를 비교하여 미지 용액의 Neu5Gc와 Neu5Ac의 함량의 정량이 가능한지를 시험하였다. 구체적으로, 도 2b는 도 2a의 검정 곡선을 기반으로 시알산 이원 혼합물들을 정량한 결과를 나타낸 것이다. x축은 이원 혼합물 내 각 시알산의 농도이고 y축은 정량에 따라 유추된 시알산 이원 혼합물들의 농도이다. 이원 혼합물 내 시알산들은 표준 첨가법과 아래의 식 4를 사용하여 정량을 진행하였다.

$$[\text{식 4}]: \begin{cases} \frac{I_A}{I_A + I_B} = m \times \left(\frac{c_A V_0 + c_{A:s1} V_{s1}}{V_0(c_A + c_B) + V_{s1}(c_{A:s1} + c_{B:s1})} \times 100 \right) + b \\ \frac{I_A'}{I_A' + I_B'} = m \times \left(\frac{c_A V_0 + c_{A:s2} V_{s2}}{V_0(c_A + c_B) + V_{s2}(c_{A:s2} + c_{B:s2})} \times 100 \right) + b \end{cases}$$

[0055] 여기서, I_A 와 I_B 는 표준 용액을 첨가한 시료 용액의 각 CB[7]-시알산 복합체 이온의 질량분석기에서의 세기를 의미한다. V_0 , V_s , $C_{A,s}$, $C_{B,s}$ 는 각각 표준 용액을 첨가하기 전 시료의 부피, 첨가한 표준 용액의 부피, 표준용액의 시알산 A 혹은 B의 농도를 지칭한다. 위 실험에서는 50 μM 의 Neu5Gc와 Neu5Ac가 들어 있는 표준 용액의 1-10 μl 를 분석하고자 하는 용액 50 μl 에 첨가하여 사용하였다. 측정 결과, 결정된 시알산 농도와 표준 용액 내 농도가 거의 일치함을 확인하였다(도 2b).

[0057] 다음으로, Neu5Gc 또는 Neu5Ac만 존재하는 용액에서도 같은 방법으로 정량 분석이 가능한지를 확인하였다. 구체적으로, 도 2c는 도 2a의 검정 곡선을 기반으로 시알산 용액을 정량한 결과를 나타낸 것이다. 이때, x축과 y축은 각각 용액 내 시알산의 농도와 정량에 따라 유추된 시알산의 농도이다. 각 시알산 용액은 시알산 이원 혼합물과 유사하게 표준 첨가법과 아래의 식 5를 사용하여 정량하였다.

$$[\text{식 5}]: \begin{cases} \frac{I_A}{I_A + I_B} = m \times \left(\frac{c_{A:s}}{c_{A:s} + c_{B:s}} \times 100 \right) + b \\ \frac{I_A'}{I_A' + I_B'} = m \times \left(\frac{c_A V_0 + c_{A:s}}{c_A V_0 + V_s(c_{A:s} + c_{B:s})} \times 100 \right) + b \end{cases}$$

[0059] 위 실험에서는 50 μM 의 Neu5Gc와 Neu5Ac가 들어 있는 표준 용액의 1-10 μl 를 분석하고자 하는 용액 100 μl 에 첨가하여 사용하였다. 측정 결과, 결정된 시알산 농도가 용액에서의 농도와 거의 일치함을 확인하였다(도 2c).

[0061] 기체상에서 CB[7]과 시알산 사이의 독특한 호스트-게스트 화학

[0062] 시알산과 CB[7]의 독특한 복합체 형성 특성을 이온 이동성 질량 분광법(IM-MS)을 사용하여 연구하였다. IM-MS는 중성 버퍼 가스(즉, He) 내의 약한 전기장 하에서 이온의 이동 속도로부터 결정된 충돌 단면적(CCS)에 기초하여 이온의 구조적 특징에 관한 정보를 제공할 수 있다. 도 3a는 ATDs(ion arrival time distributions)에서 결정된 CCS 값과 함께 $[\text{CB[7]} + \text{sialic acid} + \text{NH}_4\text{H}]^{2+}$ and $[\text{CB[7]} + 2\text{H}]^{2+}$ 의 이온 도착 시간 분포(ATD)를 나타낸다. 두 가지 시알산 각각의 복합체 이온들은 복합체 이온화되지 않은 CB[7] 이온($\text{CCS}_{\text{CB[7]}} = 207.0 \pm 0.6 \text{ \AA}^2$)에 비해 현저히 높은 CCS($\text{CCS}_{\text{CB[7]-Neu5Gc}} = 227.9.0 \pm 0.9 \text{ \AA}^2$; $\text{CCS}_{\text{CB[7]-Neu5Ac}} = 226.0 \pm 0.4 \text{ \AA}^2$)를 나타내었다. 이것은 시알산 게스트의 상당 부분이 CB[7] 공동(cavity) 외부에 노출되어 놓여 있음을 의미한다.

[0063] 본 발명에서는 CB[7]의 양성자와 양성자화된 아세트아미드 그룹의 암모늄 양이온(도 3b, O⁻ 및 N⁻ 양성자화)의

복합체에서 시알산의 두 가지 가능한 양성자화 구조를 연구하였다. 분자 역학 (MD) 시뮬레이션과 밀도 함수 이론 (DFT) 계산으로부터 도출된 CB[7]-시알산 복합체 이온의 대표적인 구조는 도 3c에 나타내었다. Exp-6 potential과 MMFF94 매개 변수의 조합을 사용하는 trajectory(TJ) 방법을 이용하여 계산된 이론적 CCSs 값은 실험적인 CCS 값과 일치하였다. 이것은 계산된 구조가 복합체 이온의 기체상 구조를 효과적으로 반영할 수 있음을 나타낸다. CB[7]-시알산 복합체 이온의 대표적인 구조를 통해 시알산 게스트의 대부분이 CB[7] 공동에 캡슐화되었음을 확인하였다. 복합체화되지 않은 CB[7] 이온에 비해 복합체 이온의 큰 CCSs 값은 양성자화된 아세트아미드기와 CB[7] 공동으로부터 시알산의 헥소오스 고리의 일부의 노출에 기인한 것이다. 복합체는 시알산의 양성자화된 아세트아미드 그룹과 CB [7] 입구(portal)의 카보닐 그룹 사이의 정전기적 상호작용을 통해 안정화되었다.

[0064] 복합체 이온의 대표적인 구조의 결합 에너지에 대한 연구는 기상에서 CB[7]과 2개의 시알산의 호스트-게스트 상호 작용에 대한 다른 통찰을 제공하였다. 결합 에너지는 CB[7]-시알산 복합체 이온의 에너지에서 각 성분의 최적화된 구조의 에너지를 빼서 수득하였다. 시알산과 CB[7]의 결합 에너지는 양성자화 위치에 따라 상당히 다르게 나타났다(도 3d). Neu5Gc의 경우, N-양성자화된 구조는 O-양성자화된 구조에 비해 CB [7]와의 복합체 형성을 선호하는 것으로 나타났다(도 3d). CB[7] 복합체에서 두 구조 사이의 결합 에너지의 계산된 차이(ΔBEs)는 70 kJ/mol이었다. 대조적으로, Neu5Ac의 경우, O-양성자화된 Neu5Gc와 CB[7]의 복합체화는 N-양성자화된 Neu5Gc에 비해 25 kJ/mol 만큼 에너지적으로 선호되었다.

[0065] ΔBEs 에 기초하여 Neu5Gc와 Neu5Ac 이온의 CB에 대한 복합체화 선호도는 N-protonated Neu5Gc > O-protonated Neu5Ac > N-protonated Neu5Ac > O-protonated Neu5Gc 순으로 평가되었다(도 3d). 시알산 이온의 복합체화 선호도에 대한 더 많은 통찰을 얻기 위해 복합체내에서 CB[7]과 시알산 간의 기상 호스트-게스트 상호 작용을 조사하였다. 양성자화된 아세트아미드기는 양성자화 위치에 관계없이 CB [7]의 카르보닐기와 강하게 상호 작용한다(도 3c 및 e). O-양성자화 시알산 이온의 경우, H_a 및 H_b (도 3b)는 CB[7]의 카르보닐기와 2개의 수소 결합을 형성할 수 있다(도 3b). 또한, N-양성자화 시알산의 H_c와 H_d는 CB [7] 입구(portal)과 상호 작용할 수 있다(도 3b). 이러한 상호 작용은 CB[7]-시알산 복합체 이온의 전체적인 기하학적 구조에 결정적인 영향을 미친다 (도 3c 및 e). O-양성자화 Neu5Ac의 경우, 아세트아미드 그룹은 CB[7] 포털에 인접해 있었고, H_a 및 H_b는 모두 H-결합 상호 작용이 가능하였다. 대조적으로, Neu5Ac의 N-양성자화 아세트아미드 그룹은 H_c와 H_d 및 양전하를 띠는 질소를 제외하고는 아세트아미드 그룹의 부분적으로 음으로 하전된 카르보닐 산소 때문에 CB[7] 입구와는 거리가 멀었다. CB[7]-Neu5Gc 복합체 이온의 대표적인 구조는 CB[7] 공동 내의 Neu5Gc의 구조적 특징이 C5 hydroxymethyl기의 존재 때문에 Neu5Ac의 그것과 약간 다르다는 것을 보여준다 (도 3c 및 e). O-양성자화 Neu5Gc의 경우, N-Ha ···O와 O-Hb ···O의 두 수소 결합은 CB[7]과 C5 hydroxymethyl기 사이의 상호 작용을 방해하여 복합체 이온의 구조적 안정성을 향상시켰다. 이 구조는 반대쪽 CB[7] 입구에서 Neu5Gc 이온과 CB[7]의 효과적인 정전기 상호 작용을 방해하면서 CB[7] 공동으로 O-양성자화된 Neu5Gc 이온의 더 깊은 삽입을 유도하였다. N-양성자화 Neu5Gc의 경우, C5 hydroxymethyl기는 C5 작용기의 U자 구조를 통해 CB[7] 입구와 상호 작용하였다. U형 구조의 카르보닐 산소는 N-양성자화된 Neu5Ac 복합체 이온보다 더 멀리 위치하였으며, 이것은 N-양성자화된 Neu5Gc에 대한 더 강한 복합체화 선호도를 설명한다.

[0066] 요약하면, 위의 결과를 통해 CB[7]와 시알산 이온 사이에 별개의 호스트-게스트 상호 작용이 존재하여 상이한 복합체화 선호도를 유도하며, 그들의 농도 비율과 선형 관계를 갖는 복합체 형성 비율이 유도된다는 것을 알 수 있다.

[0068] 기체상 호스트-게스트 화학을 이용한 Neu5Gc 및 Neu5Ac의 정량 분석

[0069] 전술한 기체상 호스트-게스트 화학을 이용한 정량 분석 방법을 이용하여 두 종의 단백질 치료제들(cetuximab, human erythropoietin)과 네 종의 당단백질들(bovine mucin I-S, bovine fetuin, human transferrin, human alpha-1 glycoprotein) 내 Neu5Gc와 Neu5Ac의 함량을 정량해보았다. 먼저, 당 단백질의 시알산은 산 가수분해와, 고상 추출 카트리지 및 역상 크로마토 그래피를 사용하여 추출하였다. 다음으로, 시알산 분석을 위해 CB [7]을 사용하여 샘플의 초분자 MS 스캐닝을 수행하였다. 도 4는 각각의 당단백질 내 시알산의 정량결과를 나타낸 것이다. 측정 결과, Neu5Ac와 광범위한 몰비에 걸쳐 존재하는 당단백질 결합 Neu5Gc의 농도를 정확하게 결정할 수 있음을 확인하였다 (from 0.07:1 to 21.25:1 of Neu5Gc:Neu5Ac). 또한, 종래 시알산 정량 방법을 연구한 문헌(Ghaderi, D.; Taylor, R. E.; Padler-Karavani, V.; Diaz, S.; Varki, A. Nat. Biotechnol. 2010, 28

(8), 863-867., Honda, S.; Suzuki, S. Anal. Biochem. 1984, 142 (1), 167-174.)들에 게재된 값과 Relative error%가 25% 내로 매우 유사함을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 종래 보고된 문헌들에서 확인되지 못했던 cetuximab 내 미량의 Neu5Ac가 본 발명에 따라 정밀하게 정량될 수 있음을 확인하였다.

[0071]

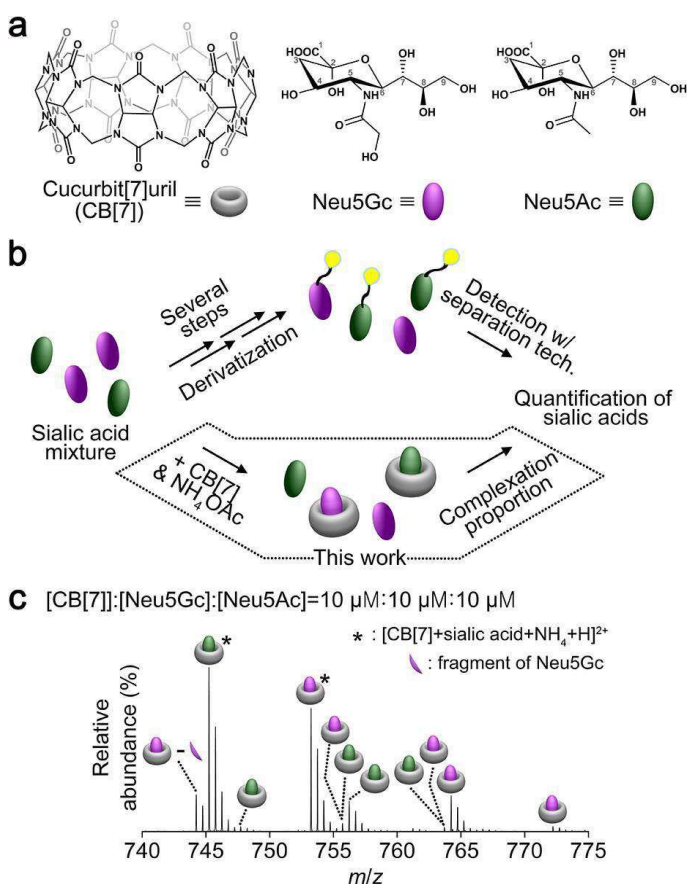
결론

[0072]

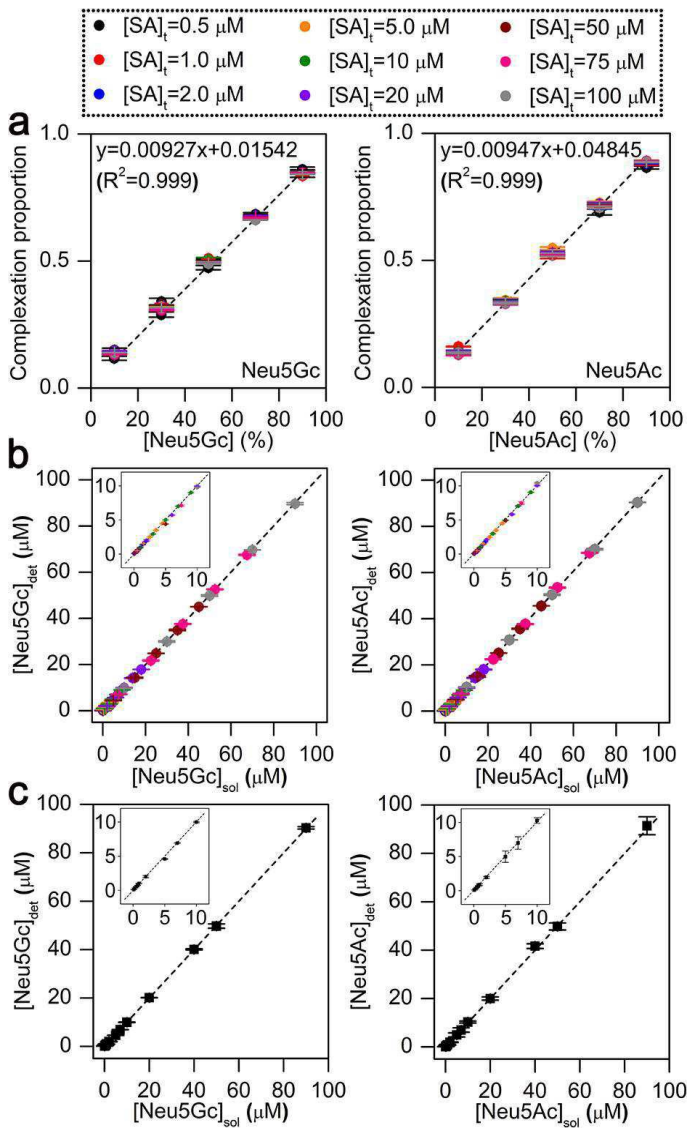
본 발명에서는 CB[7] 호스트를 이용하여 Neu5Gc와 Neu5Ac를 간단하고 정확하게 동정하고 정량화함으로써 호스트-게스트 원리의 실제 적용을 증명하였다. 기체상에서 CB[7]와 시알산 사이의 독특한 호스트-게스트 화학은 간단한 ESI-MS 스캐닝을 통한 당 단백질의 Neu5Gc 분석에 이용되었다. 시알산들과 CB[7]의 구별되는 호스트-게스트 상호 작용은 용액에서의 농도 비율과의 높은 선형 관계로 복합체화 비율을 유도하였다. 이 선형 관계는 높은 감도와 단순성으로 다양한 당단백에서 Neu5Gc와 Neu5Ac를 확인하고 정량화하기 위한 MS 방법 개발에 사용되었다. 이러한 접근법은 비인간형 글리칸의 우수한 분리 및 정량을 제공하며, 생물 치료제 개발에서 면역원성 관련 위험을 제어하는 데 유용하게 적용될 것으로 기대된다.

도면

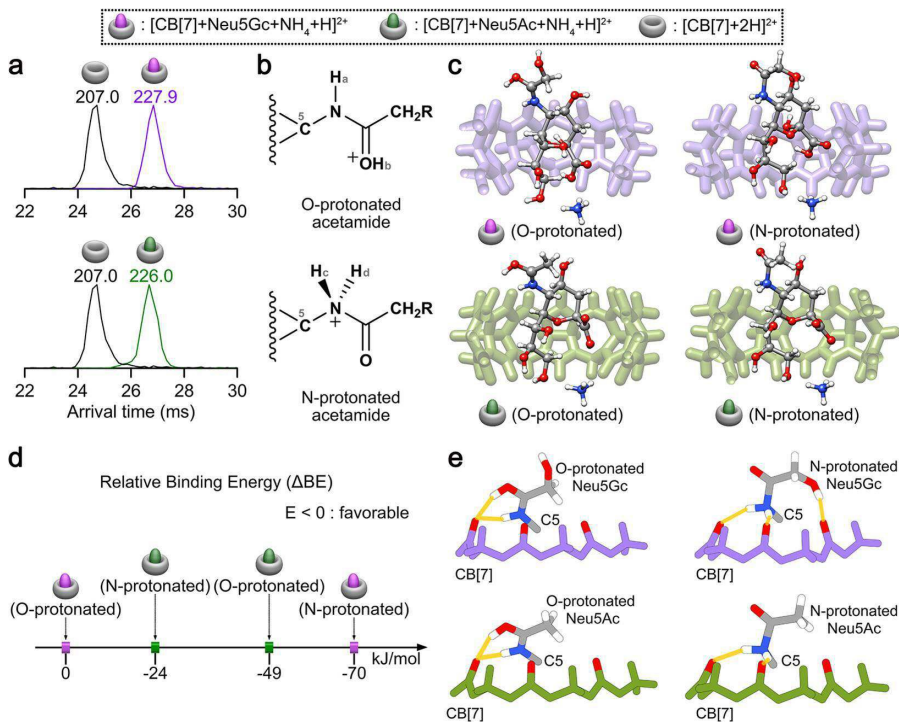
도면1



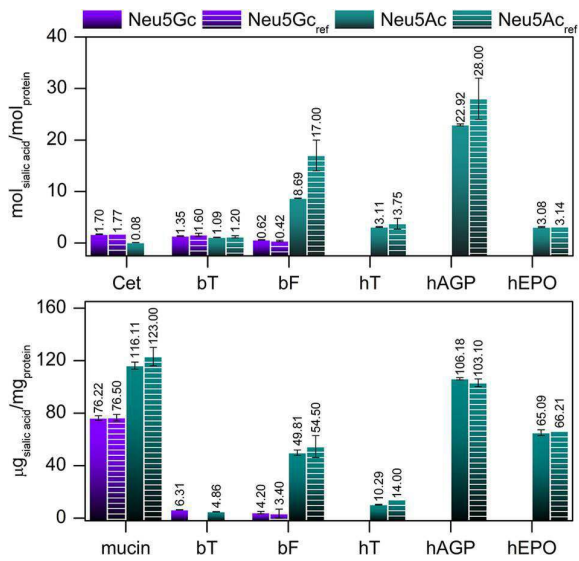
도면2



도면3



도면4



도면5

