(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월06일
(11) 등록번호 10-1479622
(24) 등록일자 2014년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 1/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0076237
(22) 출원일자 2014년06월23일
심사청구일자 2014년06월23일
(56) 선행기술조사문헌
US20140135235 A1
JP2012189439 A
WO2014040066 A1
Nature protocols Vol. 2, No. 7, Pages 1585-1602(2007.)

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
안현주
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
김재한
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

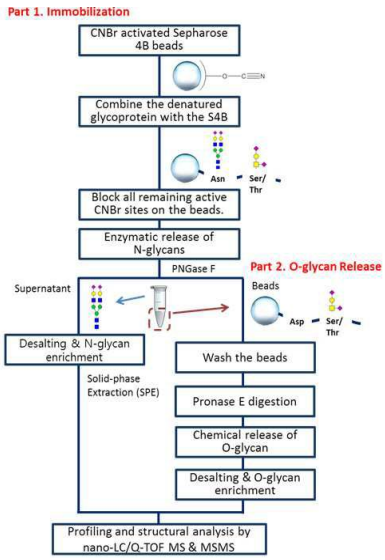
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **선택적이고 비파괴적인 O-당쇄 분리방법**

(57) 요 약

본 발명은 비드 고정화 (Bead Immobiliization) 방법을 이용하여 N-당쇄와 O-당쇄가 동시에 존재하는 당단백질에서 O-당쇄만을 선택적으로 추출 및 분리할 수 있는 방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로는 N-당쇄와 O-당쇄가 모두 존재하는 당단백질을 비드에 고정시키고 N-당쇄만 선택적으로 분리할 수 있는 특이적 효소인 PNGase F를 이용하여 N-당쇄를 제거한 후 β-제거 (β-elimination)를 통해 O-당쇄만을 선택적으로 분리하는 것이다. 본 발명의 비파괴적인 O-당쇄 분리방법은 다양한 당단백질에서 O-당쇄 분석에 효과적으로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

정하늘

광주광역시 남구 회재로1186번길 29, 22동 306호 (현대아파트)

오명진

대전 유성구 도안동로 523, 206동 1904호 (봉명동, 호반베르디움)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2013M3A9B6075933
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글리칸 조절을 통한 글로벌 바이오의약품 혁신 기반기술 개발 사업
연구과제명	당단백질 의약품의 당 변이체 특성분석 및 당 분석과학기술법 개발
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2013.11.01 ~ 2014.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

a) 비드를 활성화하는 단계;

b) 활성화된 비드에 변성된 당단백질을 혼합하고 결합반응시키는 단계;

c) 당단백질과 반응하지 않은 비드의 활성부위를 블로킹하는 단계;

d) N-당쇄 특이적 효소를 처리하여 N-당쇄를 비드와 결합된 당단백질로부터 분리하는 단계;

e) 분리된 N-당쇄가 포함된 상층액을 분리하는 단계;

f) 비드를 포함하는 침전을 세척하는 단계;

g) 침전에 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 비드로부터 O-당펩타이드를 분리하는 단계; 및

h) 비드에서 분리된 O-당펩타이드에서 β-제거 방법으로 O-당쇄를 분리하는 단계;를 포함하는 O-당쇄를 선택적이고 비파괴적으로 분리하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

d) 단계의 N-당쇄 특이적 효소는 PNGase F임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

g) 단계의 비특이적 단백질 분해효소는 프로네이즈 E임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

h)의 O-당쇄 분리단계 이후 O-당쇄 고체상 추출 단계가 부가됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

a) 비드를 활성화하는 단계는 산을 가하여 수행함을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 비드는 비이온성 고분자 겔로 이루어진 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 비드는 아가로즈 겔로 이루어진 것임을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비드 고정화 방법을 이용하여 N-당쇄와 O-당쇄가 동시에 존재하는 당단백질에서 O-당쇄만을 선택적으로 추출 및 분리할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당쇄화(Glycosylation)는 단백질의 기능을 결정하는 중요한 요소로서, 생화학적 환경에 매우 민감하게 반응하여 암과 같은 생물학적 변화에 따라 인간의 당쇄화 양상이 변한다. 이러한 변화는 암뿐만 아니라 다양한 질병에 대한 잠재적인 바이오마커로서의 역할을 하기 때문에 임상실험이나 생물학적 연구에서 당쇄화를 기반으로 한 질병의 진단법 개발의 중요성이 대두되고 있다. 또한, 당쇄화 모니터링을 위해서는 이를 분석할 수 있는 분석법이 매우 중요하다.

[0003] 당쇄(Glycan)는 크게 N-당쇄와 O-당쇄로 나눌 수 있는데 그 중에서 N-당쇄는 아스파라긴(asparagine)에 결합되어 있고 2개의 GluNAc(N-AcetytGlucosamine)과 3개의 만노스(Mannose)로 이루어진 코어를 가진다. 이러한 코어를 기준으로 전형적인 구조를 형성하고 있고, PNGase F라는 N-당쇄만을 선택적으로 분리할 수 있는 특이적 효소가 존재하여 이미 다양한 질병이나 암의 바이오마커 연구에 많이 이용되고 있다. 반대로 O-당쇄는 세린(serine)이나 트레오닌(threonine)에 결합되어 있으며 N-당쇄와는 다르게 1개가 아닌 8개의 코어를 가짐으로써 분석에 어려움이 있다. 예를 들어, 코어 3, 5, 6, 7과 같은 경우 서로 다른 구조의 코어이지만 질량 값이 정확하게 일치하기 때문에 MS 분석으로는 이들의 코어를 구분하기가 어렵다는 특징이 있다.

[0004] 질병과 관련된 O-당쇄 연구로는 안구 질환 (Ocular Rosacea)에서 황산이 결합된 O-당쇄가 증가하며 (S. Ozcan *et al.*, Characterization of novel O-glycans isolated from tear and saliva of ocular rosacea patients. *Journal of proteome research* 12, 1090 (Mar 1, **2013**).), 신장암 (Renal cel carcinoma)에서는 MUC1 발현이 증가하고 (Y. Gao *et al.*, O-glycan profiling of serum glycan for potential renal cancer biomarkers. *Science China. Life sciences* 56, 739 (Aug, **2013**).), 위암에서는 MUC6과 MUC5AC가 변화한다 (Kazuo Shiratsu *et al.*, Loss of gastric gland mucin-specific O-glycan is associated with progression of differentiated-type adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Science* 105, 126 (Jan , **2014**), Fumitoshi Karasawa *et al.*, Essential role of gastric land mucin in preventing gastric cancer in mice. *Journal of Clinical Investigation* 122, 923 (Mar 1, **2012**).). MUC(뮤신)은 O-당쇄가 다량으로 결합되어 있는 생물 고분자 물질로, 최근 연구에서 뮤신의 당쇄화가 많은 질병의 생물학적 과정에 영향을 끼친다고 알려져 있다. 따라서 뮤신과 암세포에 관한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 질병에 걸렸을 때 특정한 뮤신이 증가하거나 뮤신에 다량으로 결합해 있는 특이적인 구조를 가지는 O-당쇄가 증가하는 경향을 보인다. 유방암에서는 세포 타입에 따라 코어 1 O-당쇄가 증가하거나 감소하는 경향이 나타나며, O-당쇄의 시알산화 (sialylation), 퓨코실화 (fucosylation)가 증가한다 {S. J. Storr *et al.*, The O-linked glycosylation of secretory/shed MUC1 from an advanced breast cancer patient's serum. *Glycobiology* **18**, 456 (Jun, 2008), H. J. An, S. R. Kronewitter, M. L. de Leoz, C. B. Lebrilla, Glycomics and disease markers. *Current opinion in chemical biology* **13**, 601 (Dec, 2009)}. 또한, 대장암에서는 코어 3 O-당쇄와 코어 3에 황산이 결합한 O-당쇄가 감소한다 {H. Kawashima, Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer. *Biological & pharmaceutical bulletin* **35**, 1637 (2012), J. M. Yang *et al.*, Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* **4**, 873 (Dec, 1994)}. 뿐만 아니라 췌장암, 난소암, 자궁내막암, 전립선암, 폐암 등에서도 O-당쇄의 변화가 관찰되었다 {I. Brockhausen, Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* **1473**, 67 (Dec 6, 1999).}

[0005] O-당쇄의 분리 분석시에도 O-글라이카네이즈(glycanase)라는 분해효소가 있지만, 이 효소는 시알산(sialic

acid)이 결합되어 있는 O-당쇄에는 작용을 하지 못하기 때문에 사용하기 전에 먼저 시알리데이즈(sialidase)를 사용하여 시알산을 제거해야 한다. 또한, O-글라이카네이즈(glycanase)라는 분해효소는 코어-1,3 구조를 가지는 중성 O-당쇄만 분리분석이 가능하기 때문에 사용이 매우 제한적이다. 암을 비롯한 다양한 질병에 따라 시알산이 결합된 당쇄(Sialylated glycan)가 변화한다. 또한, 시알산의 경우 바이오의약품의 약효나 지속성에 영향을 줄 수 있는 중요한 인자이기 때문에 O-당쇄의 전체적인 프로파일링을 위해서는 시알산이 결합되어 있는 상태의 O-당쇄를 비파괴적으로 분리하고 분석하는 방법의 개발이 필요하다.

[0006] 이러한 이유들로 인해 O-당쇄를 분리하는 데는 효소를 이용한 추출 분리법보다 화학적 처리 방법을 많이 이용하고 있다 (아래 표 1 참조). 현재는 화학적 처리 방법 중 가장 대표적인 방법인 β-제거(elimination) 방법을 이용하여 O-당쇄를 분석하고 있지만, 이 화학적 처리 방법은 O-당쇄만을 선택적으로 분리하는 것이 아니라, N-당쇄와 O-당쇄를 비특이적으로 분리시키기 때문에 분리 분석이 어렵다 (Kozak, R. P. et al., Suppression of peeling during the release of O-glycans by hydrazinolysis. *Analytical biochemistry* 2012, *423* (1), 119-128, Ozcan, S. et al., Characterization of novel O-glycans isolated from tear and saliva of ocular rosacea patients. *Journal of proteome research* 2013, *12* (3), 1090-1100). 그리고 혈액, 침, 눈물과 같은 체액에서의 경우, N-당쇄가 O-당쇄에 비해 정량적으로 당쇄화가 더 많이 되어 있다고 알려져 있기 때문에 비특이적인 방법에 의해 분리할 경우 N-당쇄가 동시에 분리되어 상대적으로 양이 많은 N-당쇄에 의해 O-당쇄가 방해를 받게 되어 분석이 어렵다. 따라서, O-당쇄만을 선택적으로, 또한 비파괴적으로 분리하여 분석하는 것은 당생물학에서 반드시 해결해야 할 과제로 남아 있으며, 따라서 비파괴적이고 선택적인 O-당쇄의 추출 및 분리방법 개발이 절실하게 필요한 상황이다.

표 1

O-당쇄 추출법	제한점	참고자료	비고
효소 처리 (O-glycanase)	코어 1 구조를 가지는 중성 O-당쇄나 시알산이 결합되어 있는 당쇄에는 효소의 사용이 제한적이다.	(1-3)	효소처리 방법을 제외한 화학적 처리 방법은 N-당쇄도 함께 추출하므로 선택성이 매우 낮다.
화학적 처리 1 Hydrazinolysis method	하이드록시 그룹을 가지는 O-당쇄는 말단의 단당이 떨어지는 Peeling반응이 일어나기 쉽고, 시약 자체가 폭발성이 있어서 실험실 내 사용이 제한적이다.	(4,5)	
화학적 처리 2 Nonreduced method	에틸아민, 암모니아, 수산화리튬을 이용한 방법은 당쇄 추출 효율이 낮다.	(6-8)	

(1) H. Geyer, R. Geyer, Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation, Biochim. Biophys. Acta 1764 (2006) 1853–1869.
(2) H. Iwase, K. Hotta, Release of O-linked glycoprotein glycans by endo-a-Nacetylgalactosamidase, Methods Mol. Biol. 14 (1993) 151–159.
(3) R.A. Dwek, C.J. Edge, D.J. Harvey, M.R. Wormald, R.B. Parekh, Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides, Annu. Rev. Biochem. 62 (1993) 65– 100.
(4) A.H. Merry, D.C.A. Neville, L. Royle, B. Matthews, D.J. Harvey, R.A. Dwek, P.M. Rudd, Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis, Anal. Biochem. 304 (2002) 91–99.
(5) T. Patel, J. Bruce, A. Merry, C. Bigge, M. Wormald, A. Jaques, R. Parekh, Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins, Biochemistry 32 (1993) 679–693.
(6) W. Chai, T. Feizi, C.T. Yuen, A.M. Lawson, Nonreductive release of O-linked oligosaccharides from mucin glycoproteins for structure/function assignments as neoglycolipids: application in the detection of novel ligands for E-selectin, Glycobiology 7 (1997) 861–872.
(7) Y. Huang, Y. Mechref, M.V. Novotny, Microscale nonreductive release of Olinked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis, Anal. Chem. 73 (2001) 6063–6069.
(8) K. Yamada, S. Hyodo, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi, Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples, Anal. Chem. 82 (2010) 7436–7443.

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기 O-당쇄 분리방법의 문제점을 해결하고 O-당쇄만을 특이적으로 분리하는 방법을 제공하는 것을

목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 O-당쇄의 변형 없이 비파괴적으로 O-당쇄를 분리하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 비드 고정화(bead immobilization)를 이용하여 N-당쇄를 먼저 상 분리로 제거한 다음, 남은 당단백질을 화학적으로 처리하여 O-당쇄만을 선택적으로 추출 및 분리할 수 있는 분석법을 발명하였다.

[0011] 본 발명자들은 N-당쇄만 결합되어 있는 인간 IgG와 O-당쇄만 결합되어 있는 κ-카제인을 1:1의 비율로 혼합하여 당단백질 혼합물(glycoprotein cocktail)을 제조하였다. 당단백질 혼합물을 비드에 결합시킨 후 N-당쇄 특이적 분해효소인 PNGase F를 처리하고 상분리하면 비드에는 N-당쇄가 제거된 당단백질 혼합물이 결합되어 있게 된다. 이를 화학적 처리 방법인 β-제거(elimination)로 O-당쇄만을 선택적으로 추출 및 분리하였다. 이러한 방법으로 N-당쇄를 먼저 제거하고 상 분리함으로써 기존의 β-제거 방법만을 사용했을 때 발생할 수 있는 N-당쇄에 의한 O-당쇄의 억제 영향을 줄여 O-당쇄만을 선택적으로 분리할 수 있게 된다.

[0012] 본 발명은

[0013] a) 비드를 활성화하는 단계;

[0014] b) 활성화된 비드에 변성된 당단백질을 혼합하고 결합반응시키는 단계;

[0015] c) 당단백질과 반응하지 않은 비드의 활성부위를 블로킹하는 단계;

[0016] d) N-당쇄 특이적 효소로 N-당쇄를 비드와 결합된 당단백질로부터 분리하는 단계;

[0017] e) N-당쇄가 포함된 상층액을 분리하는 단계;

[0018] f) 비드를 포함하는 침전을 세척하는 단계;

[0019] g) 비특이적 단백질 분해효소를 처리하여 비드로부터 O-당펩타이드를 분리하는 단계; 및

[0020] h) 비드에서 분리된 O-당펩타이드에서 β-제거 방법으로 O-당쇄를 분리하는 단계;를 포함하는 O-당쇄를 선택적이고 비파괴적으로 분리하는 방법을 제공한다.

[0021] 상기 비특이적 단백질 분해효소는 특정 펩타이드 결합에만 작용하는 특이적 단백질 분해효소가 아닌 단백질 분해효소를 말하며, 예컨대 돼지 엘라스테이즈 (porcine elastase), 파파인 (papain), 돼지 펩신 (porcine pepsin), 프로네이즈 (pronase), 프로테이네이즈 K (proteinase K), 섭틸리신 (subtilisin), 써모라이신 (thermolysin) 등이 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 d) 단계의 N-당쇄 특이적 효소가 PNGase F임을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 g) 단계의 비특이적 단백질 분해효소가 프로네이즈 E임을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 h) 단계의 O-당쇄 분리단계 이후 고체상 추출 단계가 부가됨을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 a) 비드를 활성화하는 단계는 HCl 등의 산을 가하여 수행함을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 비드가 비이온성 고분자 겔로 이루어진 것임을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 구체적으로는 덱스트린 겔, 폴리아크릴아마이드 겔, 아가로즈 겔, 폴리스티렌 겔, 아크릴 겔 등을 말한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 비드가 아가로즈 겔로 이루어진 것임을, 좀 더 바람직하게는 세파로즈 4B임을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 방법에 의하면, 당단백질로부터 O-당쇄를 분리함에 있어서 N-당쇄의 오염도를 최소한으로 낮추고 O-

당쇄만을 선택적으로 분리할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 방법에 의하면, O-당쇄의 시알산을 제거하지 않고도 O-당쇄를 분리할 수 있다.

[0030] 따라서, 본 발명의 방법은 당단백질로부터 O-당쇄를 선택적이고 비파괴적으로 분리할 수 있으므로, O-당쇄와 관련된 질병의 진단 등에 유용하게 응용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명에서 N-당쇄와 O-당쇄를 모두 가지고 있는 당단백질로부터 O-당쇄를 특이적으로 분리하는 방법에 대한 개념도이다.

도 2는 본 발명에 따른 O-당쇄 분리방법의 흐름도이다.

도 3은 당단백질의 고정화 효율을 나타내는 그래프이다.

도 4는 N-당쇄를 가진 당단백질과 O-당쇄를 가진 당단백질의 혼합물을 종래 방법인 β-제거 방법으로 분리한 결과와 본 발명의 방법으로 분리한 결과를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0033] <실시예>

[0034] 1. CNBr로 활성화된 세파로즈 4B 비드 (Sepharose 4B bead) 150㎎을 준비하여 1㎖ 1mM HCl로 활성화시켰다.

[0035] 2. 당단백질 200㎍과 30㎕의 200mM 중탄산암모늄(ammonium bicarbonate) 및 10mM DTT(dithiothreitol)를 반응시켜 변성된 당단백질을 활성화시킨 비드에 부착시켰다.

[0036] 3. 부착시키고 남은 당단백질을 제거하기 위해 1.5 ㎖ 0.1M PBS(Phosphate buffer solution) (pH 7.5)로 3회 씻어낸 후, 1M 에탄올아민 (pH 9)을 이용하여 2시간 동안 반응시켜 남아있는 활성부위를 블로킹하였다.

[0037] 4. 1M 에탄올아민을 1.5㎖ PBS (pH 7.5)로 3회 씻어낸 후, 특이적 N-당쇄 분리효소인 PNGase F 2 ㎕를 첨가하여 37℃에서 300rpm으로 24시간 반응시켰다.

[0038] 5. 분리된 N-당쇄를 20% ACN(acetonitrile)으로 3회 씻어낸 후 비특이적 단백질 분해효소 200㎍ (1:1)를 첨가하여 37℃로 1시간 동안 반응시켜 비드에서 당펩타이드를 분리시켰다.

[0039] 6. 분리시킨 당펩타이드를 20% ACN을 이용하여 회수한 후, 20㎕의 1M 중탄산나트륨을 첨가하여 42℃로 16시간 반응시켰다.

[0040] 7. 얻어진 O-당쇄는 다공성 흑연화 탄소 카트리지(Porous Graphitized Carbon Cartridge)를 이용하여 고체상 추출 (Solid Phase Extraction) 하였다. 좀 더 자세히는 흑연화 탄소 카트리지를 80% 아세토나이트릴 및 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) 수용액으로 세척한 후 순수로 헹구었다. O-당쇄 수용액을 카트리지에 로딩한 후 염과 완충액 제거를 위해 약 1㎖/min의 속도로 순수로 워싱하였다. O-당쇄는 20%(v/v) ACN (acetonitrile) 과 40% ACN (acetonitrile) 및 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)를 함유한 용액으로 용출하여 O-당쇄만 선택적으로 분리하였다.

[0041] 8. nanoLC chip/Q-TOF MS 분석을 통하여 이성질체를 분리하고, 구조를 분석하여 당쇄 구성을 확인하고 정량적인 프로파일링을 수행하였다. 더 자세히는 분리된 O-당쇄를 물에 재용해하여 오토샘플러 (4 ℃로 유지됨), 모세관 펌프, 나노펌프, HPLC-Chip/MS 인터페이스 및 6530 Q-TOF MS 탐지기를 갖춘 HPLCChip/Q-TOF(Chip Quadrupole Time-of-Flight) MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 분석하였다. 9 × 0.75 ㎜ 농축용 컬럼 및 43 × 0.075 ㎜ 분석용 컬럼의 정지상 (stationary phase)으로 통합된 나노-ESI 스프레이 팁과 함께 5 ㎛ 다공성 흑연화 탄소 칩을 패킹하여 사용하였다.

[0042] 9. 크로마토그래피 방법에 의한 분리는 종래 최적화된 방법에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 시료를 로딩한 후, 빠른 O-당쇄 용출 농도구배 용액을 분당 0.3 ㎕씩 흘려주었다. 농도구배 용액은 (A) 3.0% 아세토나이트

릴 및 0.1% 포름산(v/v) 수용액, 및 (B) 90.0% 아세토나이트릴 및 0.1% 포름산(v/v) 수용액이고, 각각 아래 시각에 아래 농도로 처리하였다: 0% B, 0~2.5min; 0~16% B, 2.5~20min; 16~44% B, 20~30min; 및 44~100% B, 30~35min. 남아있는 O-당쇄는 100% B 용액으로 10분간 씻어내었다. 최종적으로 분석용 컬럼은 0% B로 20분간 재평형화하고, 농축용 컬럼은 0% B로 20분간 재평형화하였다.

[0043] 10. 건조가스 온도는 325℃로 조정하고 흐름 속도는 4 ℓ/min(여과한 질소가스 2 ℓ와 여과한 건조 압축공기 2 ℓ)로 하였다. MS 스펙트럼은 스펙트럼당 1.5초의 획득시간 (acquisition time)으로 m/z 300-2000의 질량 범위로 양성 이온화 모드에서 얻었다.

[0044] 11. 분석한 후, LC/MS의 원래 데이타는 Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.04.00 SP2, Agilent Technologies)에 포함된 분자 특성 추출 알고리즘 (Molecular Feature Extractor algorithm)을 이용하여 처리되었다. MS 피크는 5.0의 신호 대 노이즈 비율로 여과되었고, 개별 이온 종으로 분석되었다.

[0045] 12. 예상 동위원소 분포 (expected isotopic distribution)를 이용하여 전위상태 정보 및 머무름 시간, 단일 화합물과 연관된 모든 이온종 예컨대, 이중 양성자화된 이온, 삼중 양성자화된 이온 및 모든 관련 동위 이성질체(isotopologue)를 함께 합산하여 화합물의 중성질량 (neutral mass)을 계산하였다. 이 정보를 이용하여, 크로마토그래피 피크 면적에 의해 나타나는 양으로 시료 내 모든 화합물 피크의 리스트를 생성하였다. O-당쇄는 GlycoX 알고리즘에 기반한 본 발명자들의 소프트웨어 툴로 확인하였다. 5ppm 이내의 질량 내성 (mass tolerance)으로 가능한 O-당쇄의 당쇄 구조를 확인하였다.

[0046] <비교예: 비환원 β-제거방법에 의한 O-당쇄 분리방법>

[0047] Y. Huang 등의 방법 {Microscale nonreductive release of Olinked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis, Anal. Chem. 73 (2001) 6063-6069}에 따라 O-당쇄를 다음과 같이 분리하였다.

[0048] 1. 1mg 당단백질을 1mℓ의 28% 수용성 수산화암모늄 용매에 녹였다.

[0049] 2. 100mg 고체상 암모늄 카보네이트를 첨가하고 60℃에서 40시간 반응시켰다.

[0050] 3. 용매를 증발시킨 후, 0.5 M 붕산을 처리하여 37℃, 30분 반응시켰다.

[0051] 4. 메탄올과 같은 용매를 더하면서 질소가스로 시료를 건조하였다.

[0052] 5. 50㎕의 물을 넣고 원심분리하여 상층액만 분리하였다.

[0053] 6. 초산/다이메틸술폭사이드 (3:7)의 용액에 녹인 0.35 M 2-아미노벤즈아마이드(2-aminobenzamide; 2AB)와 1 M 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride) 용액을 각각 5㎕씩 넣고 60℃, 4시간 반응시켰다 (2AB labeling).

[0054] 7. MWCO-500 투석막을 사용하여 투석하고 건조하였다.

[0055] 8. 분리한 O-당쇄는 질량분석기를 이용하여 분석하였다.

[0056] 도 1은 N-당쇄와 O-당쇄가 있는 당단백질로부터 O-당쇄만을 분리하는 방법에 대한 개념도를 나타낸다. 당쇄는 크게 N-당쇄와 O-당쇄로 구성되어 있는데, N-당쇄는 아스파라긴 잔기에, O-당쇄는 세린 또는 트레오닌 잔기에 결합되어 있다. 이러한 당쇄는 비균질성(heterogeneity) 특성에 의해 한 아미노산에 하나의 당쇄가 결합되어 있는 것이 아니라 다양한 종류의 당쇄가 서로 다른 양으로 결합되어 있어 매우 복잡한 구조를 이루고 있다. 인간 체액과 같은 경우 일반적으로 O-당쇄에 비해 N-당쇄가 더 많이 존재하여 분석시 N-당쇄에 의해 O-당쇄 이온 억제 현상이 일어나기 때문에 O-당쇄를 효율적으로 분리분석할 수 있는 분석방법 개발이 필요하다.

[0057] 이를 해결하기 위해 N-당쇄와 O-당쇄가 결합되어 있는 당단백질에서 N-당쇄를 먼저 제거하고 상 분리 후 비특이적 화학처리 방법인 β-제거를 통해 O-당쇄를 분리함으로써 N-당쇄의 영향을 최소화하여 O-당쇄를 효율적으로 분리하는 것이 본 발명의 기본적인 개념이다.

[0058] 도 2는 본 발명의 O-당쇄 분리방법을 나타내는 흐름도이다. 먼저, 활성화한 비드에 변성시킨 당단백질을 결합·고정한 후, 당단백질이 결합되지 않은 활성 부위는 에탄올아민을 이용하여 블로킹시켰다.

[0059] 당단백질이 결합된 비드에 N-당쇄만을 선택적으로 분리할 수 있는 특이적 효소인 PNGase F를 처리하여 N-당쇄를 을 분리하고 비드를 가라앉혀 N-당쇄만을 제거하기 위해 상 분리하였다. 즉, N-당쇄가 포함된 상층액을 분리하였다.

[0060] 남아 있는 비드에 결합되어 있는 당단백질에는 O-당쇄만 결합되어 있게 되고, 비특이적 단백질 분해효소인 프로네이즈 E (Pronase E)를 처리하여 비드에서 O-당펩타이드를 분리하였다.

[0061] 비드에서 분리한 O-당펩타이드를 화학적 처리 방법인 β-제거 (elimination)로 O-당쇄만을 분리한 후 고체상 추출 (Solid Phase Extraction) 과정을 통해 선택적으로 추출 및 분리하여 nanoLC/Q-TOF MS 분석하였다.

[0062] 비드 고정화 (Bead immobilization) 방법은 N-당쇄와, N-당쇄가 제거되고 남은 O-당펩타이드를 효율적으로 분리시킬 수 있다는 장점이 있다. 따라서, 비드 고정화 방법을 이용하면 N-당쇄와 O-당쇄가 모두 존재하는 당단백질에서도 N-당쇄를 먼저 제거하기 때문에 비특이적인 화학적 처리방법인 β-제거 방법을 사용하여도 O-당쇄만을 선택적으로 분리할 수 있게 된다.

[0063] 도 3은 당단백질의 고정화 효율을 분석한 결과이다. 비드에 당단백질이 고정되었는지 확인하기 위해 단백질 정량을 통해 효율을 계산한 그래프이다. 활성화한 비드에 변성시킨 당단백질을 반응시키고 0, 0.5, 1, 2, 6, 24h 단위로 2반복하여 상층액의 단백질을 형광정량하여 고정화 효율을 계산하였다.

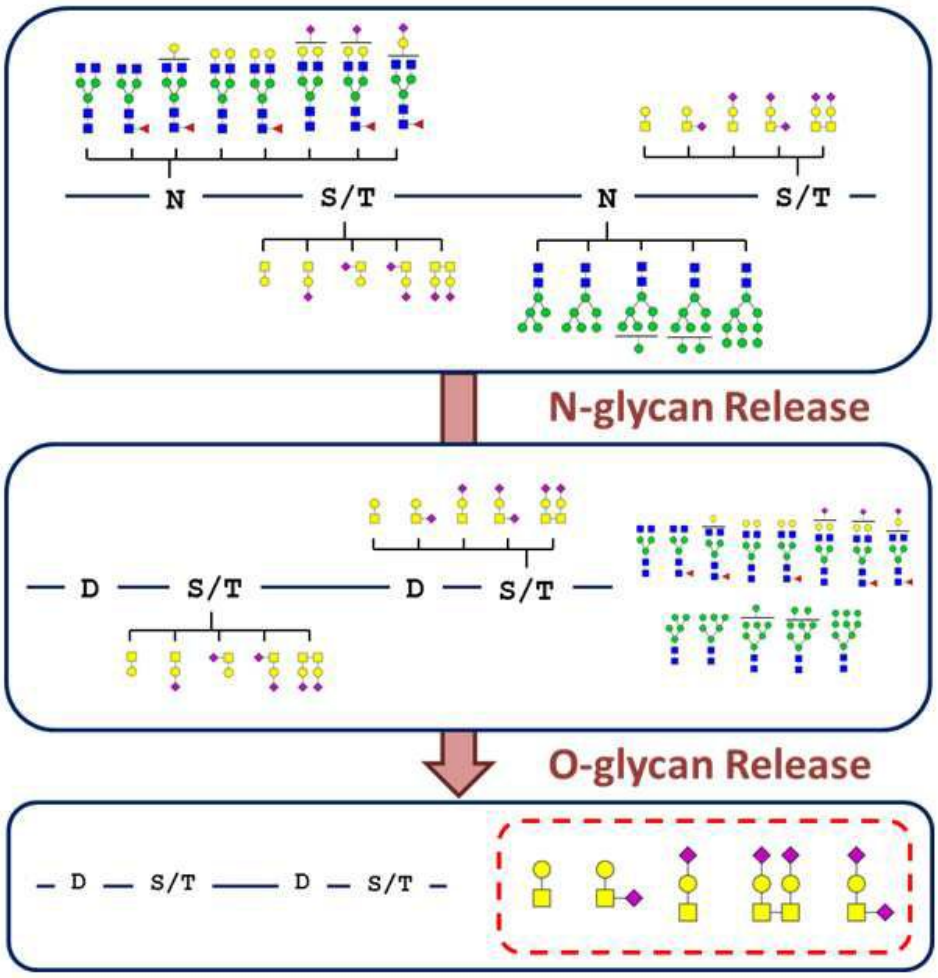
[0064] 단백질을 정량한 결과 2시간이 지났을 때 95.96% 이상의 효율과 3% 이내의 오차를 보이는 것으로 나타났다. 본 발명에서 당단백질 고정화 효율성을 고려한 결과, 반응시간을 2시간으로 선정하여 실험을 진행하였다.

[0065] 도 4는 본 발명의 실시예와 종래 방법인 비교예의 β-제거 방법을 통해 분리한 O-당쇄의 양을 비교한 그래프이다. 일반적으로 O-당쇄를 분석할 때 널리 쓰이는 분리방법인 β-제거 방법과 본 발명의 방법의 효율성을 비교하고자 하였다. 이를 위하여 N-당쇄만 결합되어 있는 인간 IgG와 O-당쇄만 결합되어 있는 κ-카제인을 1:1 비율로 혼합하여 N-당쇄와 O-당쇄가 모두 존재하는 당단백질 혼합물(Glycoprotein cocktail)을 제조하여 실험에 사용하였다. 전체 당쇄의 양에서 N-당쇄와 O-당쇄가 차지하는 비율을 계산해 봤을 때 β-제거 방법은 O-당쇄가 N-당쇄에 비해 1.37 배 정도 더 추출되었고, 본 발명의 방법으로는 O-당쇄가 N-당쇄에 비해 25.57 배 정도 더 추출되었다. 기존의 β-제거 방법을 이용한 분리시 N-당쇄도 동시에 분리 및 검출된다. 전체 당쇄의 양에서 N-당쇄가 차지하는 비율을 계산해 봤을 때 β-제거 방법은 검출된 당쇄 중 N-당쇄가 전체의 42.09 % 정도 차지하였으나, 본 발명의 방법으로는 N-당쇄가 전체의 3.76 % 정도 차지하였다. 이를 통해 본 발명의 방법이 일반적인 방법에 비해 N-당쇄에 의한 영향이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있다.

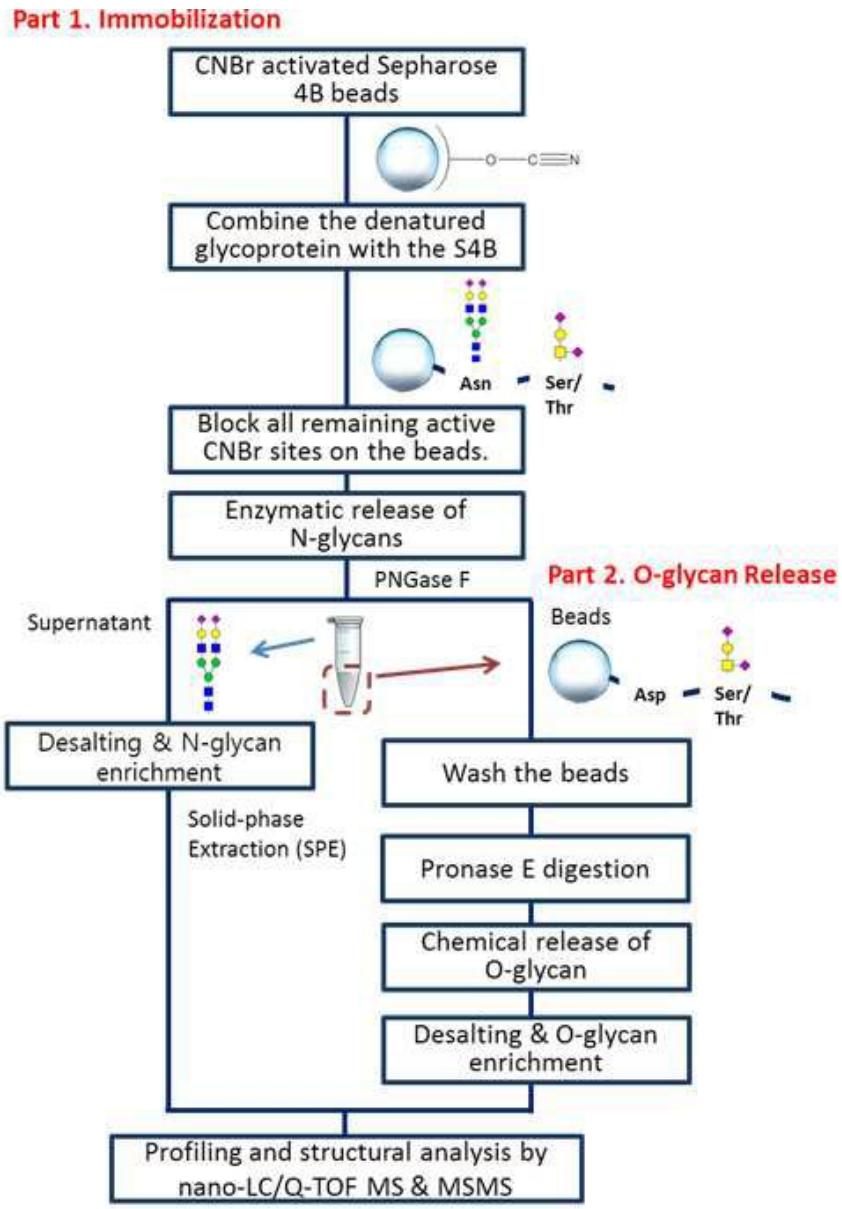
[0066] 즉, 일반적인 O-당쇄 추출 방법인 β-제거방법으로 당단백질 혼합물에서 O-당쇄를 추출하였을 때 상대적으로 양이 많은 N-당쇄에 의해 O-당쇄가 저해(suppression)되어 O-당쇄를 효율적으로 분석할 수 없었지만, 본 발명의 방법을 적용하면 N-당쇄가 먼저 제거되어 상 분리되기 때문에 O-당쇄를 선택적으로 추출 및 분석할 수 있었다.

도면

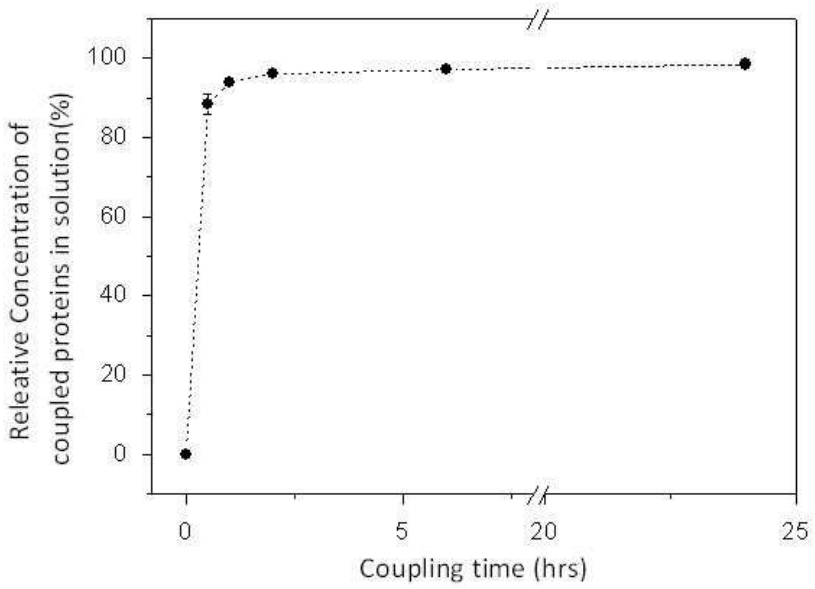
도면1



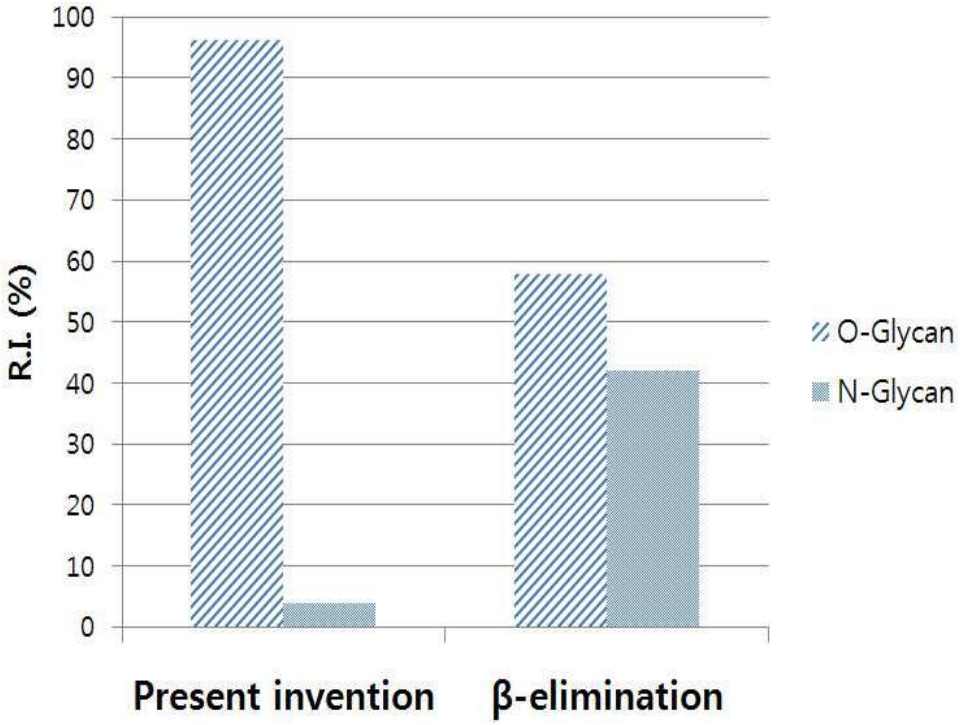
도면2


Part 1. Immobilization
CNBr activated Sepharose 4B beads
Combine the denatured glycoprotein with the S4B
Asn
Ser/ Thr
Block all remaining active CNBr sites on the beads.
Enzymatic release of N-glycans
PNGase F
Part 2. O-glycan Release
Supernatant
Beads
Asp
Ser/ Thr
Desalting & N-glycan enrichment
Wash the beads
Solid-phase Extraction (SPE)
Pronase E digestion
Chemical release of O-glycan
Desalting & O-glycan enrichment
Profiling and structural analysis by nano-LC/Q-TOF MS & MSMS

도면3


Releative Concentration of coupled proteins in solution(%)
100
80
60
40
20
0
0
5
20
25
Coupling time (hrs)

도면4


R.I. (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
O-Glycan
N-Glycan
Present invention
β-elimination