(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월09일
(11) 등록번호 10-2832087
(24) 등록일자 2025년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/08 (2006.01) *C07H 1/00* (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 37/003 (2013.01)
C07H 1/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0149399
(22) 출원일자 2024년10월29일
심사청구일자 2024년10월29일
(56) 선행기술조사문헌
TETRAHEDRON LETTERS 57 (2016) 5446?5448
MICROCHEMICAL JOURNAL 170 (2021) 106655
GLYCOFORUM. 2023 VOL.27 (2), A6

(73) 특허권자
국립창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
임재민
경상남도 창원시 성산구 원이대로579번길 13, 용지아이파크 108동 1104호
트랜 타이 호앙
경상남도 창원시 의창구 사림로149번길 6-10, (사림동) 101호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인에스알비

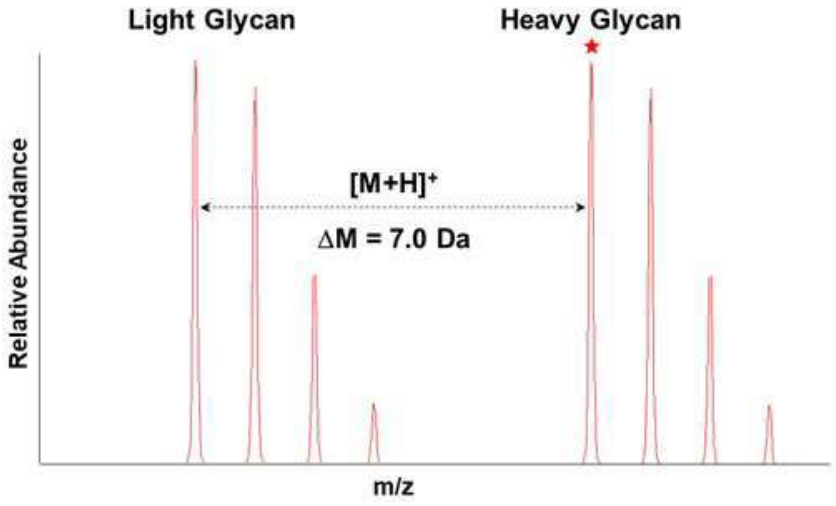
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 박인섭

(54) 발명의 명칭 **동위원소표지 글리칸 이미다졸린을 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법**

(57) 요 약

본 발명은 동위원소표지 글리칸 이미다졸린(Isotope-labeled glycan imidazoline; ILGI) 및 이를 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법에 관한 것으로, 구체적으로는 과메틸 글리칸 옥사졸린을 정상 및 동위원소표지 일차 알킬 아민과 반응시켜 합성한 정상 및 동위원소표지 글리칸 알킬 이미다졸린을 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3b



(52) CPC특허분류
C07H 15/26 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
(72) 발명자
김진일
경상남도 창원시 진해구 풍호로35번길 11, 102동 703호
김도현
경상남도 김해시 김해대로1765번길 7, (삼계동) 해반천한라비발디 104동 1903호
강선영
경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 중리상곡로 20-1, 1101동 604호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345362833
과제번호 2021R1I1A3060501
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 화학적 · 대사적 동위원소표지에 의한 글리칸의 비교 및 절대정량 질량분석법 개발
과제수행기관명 국립창원대학교 산학협력단
연구기간 2021.06.01 ~ 2024.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2340010002
과제번호 2023R1A6C101B022
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국기초과학지원연구원
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 핵심연구지원센터조성지원과제(경남생명항노화 핵심연구지원센터)
과제수행기관명 국립창원대학교 산학협혁단
연구기간 2023.06.01 ~ 2029.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2340013021
과제번호 00444460
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축 (G-램프(LAMP)사업)
연구과제명 국립창원대학교 G-램프(LAMP)사업단
과제수행기관명 국립창원대학교 산학협력단
연구기간 2024.09.01 ~ 2029.08.31

명 세 서

청구범위

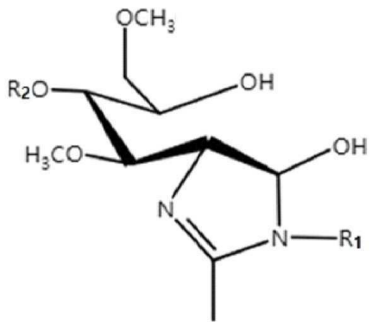
청구항 1

글리칸의 환원성 말단에 이미다졸린이 형성된 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 C_3 내지 C_{10}의 알킬기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고,

R_2는 Man5, Man6, Man7, Man8 및 Man9로 이루어진 군으로부터 선택되는 고만노스(high mannose) 잔기, 복합형(complex) 또는 하이브리드형(hybrid) N-연결 글리칸 잔기이다.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 글리칸은 N-글리칸인 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 과메틸 글리칸 프로필 이미다졸린, 과메틸 부틸 이미다졸린, 과메틸 펜틸 이미다졸린, 과메틸 헥실 이미다졸린, 과메틸 헵틸 이미다졸린, 과메틸 옥틸 이미다졸린, 과메틸 노닐 이미다졸린 및 과메틸 데실 이미다졸린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 알킬기에 동위원소표지된 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 동위원소는 ^{2}H 및 ^{13}C로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린.

청구항 7

다음을 포함하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 제조방법:

글리칸의 환원성 말단에 옥사졸린을 형성시키는 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

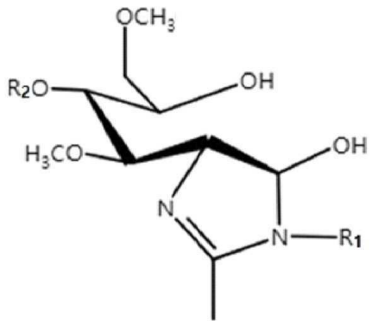
상기 글리칸 옥사졸린을 과메틸화 시키는 과메틸 글리칸 옥사졸린 합성 단계; 및

상기 과메틸 글리칸 옥사졸린과 아민을 반응시켜 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 제조방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 C_3 내지 C_{10}의 알킬기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고,

R_2는 Man5, Man6, Man7, Man8 및 Man9로 이루어진 군으로부터 선택되는 고만노스(high mannose) 잔기, 복합형(complex) 또는 하이브리드형(hybrid) N-연결 글리칸 잔기이다.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 아민은 프로필 아민, 부틸 아민, 펜틸 아민, 헥실 아민, 헵틸 아민, 옥틸 아민, 노닐 아민 및 데실 아민으로 이루어진 군으로부터 선택된 일차 알킬 아민인 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 아민은 동위원소표지된 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 동위원소는 ^{2}H 및 ^{13}C로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 제조방법.

청구항 12

다음을 포함하는 상대 정량 질량분석법:

글리칸의 환원성 말단에 옥사졸린을 형성시키는 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

상기 글리칸 옥사졸린을 과메틸화 시키는 과메틸 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

상기 과메틸 글리칸 옥사졸린을 정상 아민 및 동위원소표지 아민과 각각 반응시켜 정상 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단

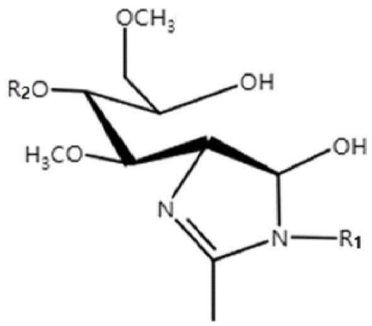
계; 및

상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계에서 합성한 정상 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 질량스펙트럼을 비교하여 상대 정량 질량분석하는 상대 정량 질량분석 단계.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 상대 정량 질량분석법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 C_3 내지 C_{10}의 알킬기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고,

R_2는 Man5, Man6, Man7, Man8 및 Man9로 이루어진 군으로부터 선택되는 고만노스(high mannose) 잔기, 복합형(complex) 또는 하이브리드형(hybrid) N-연결 글리칸 잔기이다.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 정상 아민 또는 동위원소표지 아민은 프로필 아민, 부틸 아민, 펜틸 아민, 헥실 아민, 헵틸 아민, 옥틸 아민, 노닐 아민 및 데실 아민으로 이루어진 군으로부터 선택된 일차 알킬 아민인 것인, 상대 정량 질량분석법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 동위원소는 ^{2}H 및 ^{13}C로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 상대 정량 질량분석법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 동위원소표지 글리칸 이미다졸린(Isotope-labeled glycan imidazoline; ILGI) 및 이를 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법에 관한 것으로, 구체적으로는 과메틸 글리칸 옥사졸린을 정상 및 동위원소표지 일차 알킬 아민과 반응시켜 합성한 정상 및 동위원소표지 글리칸 알킬 이미다졸린을 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 단백질의 번역 후 변형(post-translational modifications, PTMs)은 단백질의 구조나 기능 변화를 유도하여 다양한 생명현상을 나타내는 중요한 과정이다. 이러한 PTM 중 하나인 글리코실화(glycosylation)는 당단백질(glycoprotein)을 합성하는 중요한 생합성 과정이며 진핵세포의 50% 이상의 단백질에서 발견되고, 단백질의 특정한 잔기에 복합 탄수화물(complex carbohydrate)이 공유결합되는 변형이다. 그 중, N-연결 글리코실화는 단백

질의 아스파라진(Asn, N) 잔기의 질소에 당을 연결하는 과정으로 -Asn-X-Ser/Thr- 형태의 공통서열(consensus sequence)에서 주로 일어나는 효소적 글리코실화 반응이다.

[0003] 당단백질의 글리코실화는 단백질의 번역 후 변형으로 생명체의 발달 및 유전자의 발현뿐만 아니라 생리학적 상태에 따라 다양한 패턴으로 발현된다. 당단백질의 구조적, 기능적 변화를 유도하는 단백질의 글리코실화가 암 및 면역 등의 질병과 깊은 관련이 있다는 것이 밝혀지면서 당단백질의 정성적, 정량적 분석의 중요성이 대두되고 있다.

[0004] 특히 병리학적 상태가 다른 세포에서 발생한 글리코실화 정도에 대한 초기의 연구는 1969년 정상 및 비정상 섬유세포에서 추출된 당단백질로부터 수행되었으며, 이후 암과 글리코실화의 연관성이 연이어 밝혀지면서 급격한 주목을 받기 시작했다. 질병상태의 유기체에서 발생하는 글리코실화 정도는 정상상태의 것과 다르며 질병의 종류마다 특이적인 패턴의 글리칸(glycan)을 가지는 당단백질을 구성하므로 글리칸의 발현을 분석하는 것은 질병에 대한 신속한 진단이 가능하여 중요한 바이오마커(biomarker)로 활용되고 있다.

[0005] 이에, 암과 같은 질병 상태에 따른 단백질의 글리코실화를 이해하기 위해 구조적으로 다양한 글리칸의 분석이 절대적으로 필요하여 많은 분석법이 개발되었으며, 그 중 가장 강력한 고감도의 글리칸 분석법인 질량분석법이 주로 이용되고 있다.

[0006] 글리칸의 생합성 과정은 중요한 생리학적 정보를 함유하고 있어 글리칸의 정성적, 정량적 분석은 세포 생리학적으로 중요한 연구 과정이며 고감도의 강력한 분석 기술이 요구된다. 이런 이유로 질량분석법(mass spectrometry, MS)은 당단백질의 글리칸과 같은 생체고분자에 대해 가장 유용하고 독보적인 고감도 분석기법이 되었고 질량분석법에 의한 글리칸의 정성적, 정량적 분석의 수행을 통하여 당생명과학에 많은 발전을 이끌고 있다.

[0007] 특히 글리칸의 정량적 질량분석법의 개발은 글리칸에 동위원소를 표지하여 내부표준법의 방법으로 정밀도를 향상시키는 상대 정량 연구가 지금까지 활발하게 수행되고 있으며 다양한 화학적, 효소적, 대사적 동위원소표지 상대 정량 질량분석법이 보고되고 있다.

[0008] 질량분석법은 다양한 동위원소표지법과 결합되어 오믹스(omics) 영역에서 상대 정량 분석을 목적으로 이용되고 있고, 그 중 글리칸의 화학적 동위원소표지법은 글리칸의 상대 정량 분석을 위한 가장 일반적인 기술이다. 효소적, 대사적 동위원소표지법이 특이적 효소의 확보와 특정 조건의 배양 시스템 확립이 어려워 제한적으로 적용되는 반면, 글리칸의 화학적 동위원소표지법은 화학적으로 잘 알려진 탄수화물의 기초적인 반응 메커니즘의 활용을 통하여 비교적 광범위하게 동위원소를 표지할 수 있는 장점이 있어 가장 많은 분석법이 개발되었다.

[0009] 글리칸의 화학적 동위원소표지법으로 가장 잘 알려진 반응은 환원성 아민화 반응(reductive amination)으로 일반적으로 동위원소표지 페닐기를 가진 친핵성 일차 아민과 같은 표지 키트에 의한 환원성 아민화를 통해 환원말단의 글리칸에 동위원소를 표지하는 기술이다.

[0010] 일반적으로 글리칸은 2단계 환원성 아민화 공정으로 표지되며 유리 환원당을 갖는 글리칸은 고리형 또는 닫힌 고리와 비고리형 또는 열린 고리 구조 사이에서 평형을 이루고 있어 첫번째 단계에서는 비고리형 환원당의 카르보닐 탄소가 아민의 친핵성 공격을 받아 안정적인 쉬프 염기(Schiff's base)가 형성된다. 쉬프 염기가 형성된 후, 생성된 이민 그룹(imine group)은 소듐 시아노보로하이드라드(sodium cyanoborohydride, $NaBH_3CN$)를 사용하면 독성 화합물인 시안화수소(hydrogen cyanide)가 방출되며 반응 최적 조건인 산성 조건(glacial acetic acid 최대 30%)과 반응 온도(60℃ 조건에 의하여 시알산(sialic acid) 손실과 같은 글리칸 분해 반응을 초래한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자는 글리칸 옥사졸린과 동위원소표지 일차 알킬 아민을 이용하여 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 효과적인 글리칸의 동위원소표지법을 고안하였고, 정상 및 동위원소표지 글리칸 알킬 이미다졸린 사이의 질량 차이와 존재비로 글리칸의 상대 정량이 가능한 상대 정량 질량분석법에 관한 본 발명을 완성하였다.

[0012] 이에, 본 발명의 목적은 글리칸의 환원성 말단에 이미다졸린이 형성된 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 다음을 포함하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 제조방법을 제공하는 것이다:

[0014] 글리칸의 환원성 말단에 옥사졸린을 형성시키는 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

[0015] 상기 글리칸 옥사졸린을 과메틸화 시키는 과메틸 글리칸 옥사졸린 합성 단계; 및

[0016] 상기 과메틸 글리칸 옥사졸린과 아민을 반응시켜 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 다음을 포함하는 상대 정량 질량분석법을 제공하는 것이다:

[0018] 글리칸의 환원성 말단에 옥사졸린을 형성시키는 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

[0019] 상기 글리칸 옥사졸린을 과메틸화 시키는 과메틸 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

[0020] 상기 과메틸 글리칸 옥사졸린을 정상 아민 및 동위원소표지 아민과 각각 반응시켜 정상 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계; 및

[0021] 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계에서 합성한 정상 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 질량스펙트럼을 비교하여 상대 정량 질량분석하는 상대 정량 질량분석 단계.

과제의 해결 수단

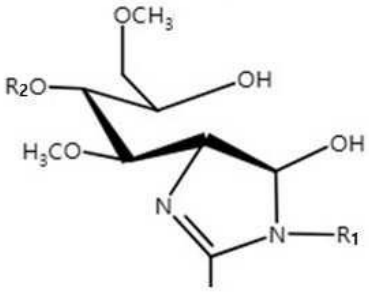
[0022] 본 발명은 동위원소표지 글리칸 이미다졸린(Isotope-labeled glycan imidazoline; ILGI) 및 이를 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법에 관한 것으로, 구체적으로는 과메틸 글리칸 옥사졸린을 정상 및 동위원소표지 일차 알킬 아민과 반응하여 합성한 정상 및 동위원소표지 글리칸 알킬 이미다졸린을 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법에 관한 것이다.

[0023] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0024] 본 발명의 일 양태는 글리칸의 환원성 말단에 이미다졸린이 형성된 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다:

[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 상기 화학식 1에서,

[0029] R_1은 C_3 내지 C_{10}의 알킬기이고,

[0030] R_2는 Man5, Man6, Man7, Man8 및 Man9로 이루어진 군으로부터 선택되는 고만노스(high mannose) 잔기, 복합형(complex) 또는 하이브리드형(hybrid) N-연결 글리칸 잔기이다.

[0031] 본 발명에 있어서 상기 글리칸은 N-글리칸인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 명세서 상의 용어 "N-글리칸(N-glycan)"은 N-결합된 올리고당류, 예컨대 폴리펩타이드의 아스파라긴 잔기에 아스파라긴-N-아세틸글루코사민 결합을 통해 부착된 올리고당류를 의미한다. N-결합된 당단백질은 단백질의 아

스파라긴 잔기 중의 아미드 질소에 결합된 N-아세틸글루코사민 잔기를 포함한다.

[0033] 통상적으로, N-글리칸 구조는 비-환원 말단을 왼쪽으로, 환원 말단을 오른쪽으로 하여 제시되며, N-글리칸의 환원 말단은 단백질 상의 글리코실화 부위를 구성하는 Asn 잔기에 부착되어 있는 말단이다. N-글리칸은 "트리만노스 코어", "펜타사카라이드 코어" 또는 "소수-만노스 코어"로도 지칭되는 $Man_3GlcNAc_2$ 코어 구조에 주변당이 부가될 수 있으며, 이에 따라 다양한 개수의 분지를 포함할 수 있다.

[0034] 상기 N-글리칸은 그의 분지형 구성성분에 따라 고만노스(high mannose), 하이브리드(hybird) 또는 복합(complex) 글리칸으로 분류될 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 과메틸 글리칸 프로필 이미다졸린, 과메틸 부틸 이미다졸린, 과메틸 펜틸 이미다졸린, 과메틸 헥실 이미다졸린, 과메틸 헵틸 이미다졸린, 과메틸 옥틸 이미다졸린, 과메틸 노닐 이미다졸린 및 과메틸 데실 이미다졸린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 알킬기에 동위원소표지된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에 있어서 상기 동위원소는 ^{2}H 및 ^{13}C로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 다른 일 양태는 다음을 포함하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 제조방법에 관한 것이다:

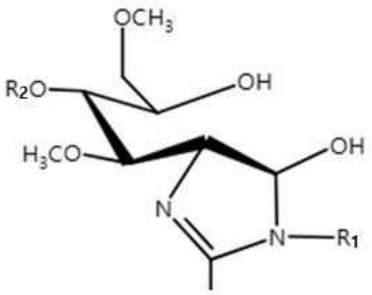
[0039] 글리칸의 환원성 말단에 옥사졸린을 형성시키는 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

[0040] 상기 글리칸 옥사졸린을 과메틸화 시키는 과메틸 글리칸 옥사졸린 합성 단계; 및

[0041] 상기 과메틸 글리칸 옥사졸린과 아민을 반응시켜 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계.

[0042] 본 발명에 있어서 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0043] [화학식 1]



[0044]

[0045] 상기 화학식 1에서,

[0046] R_1은 C_3 내지 C_{10}의 알킬기이고,

[0047] R_2는 Man5, Man6, Man7, Man8 및 Man9로 이루어진 군으로부터 선택되는 고만노스(high mannose) 잔기, 복합형(complex) 또는 하이브리드형(hybrid) N-연결 글리칸 잔기이다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 글리칸 옥사졸린 합성 단계는 글리칸을 CDMBI(2-chloro-1,3-dimethylbenzimidazolinium chloride)와 반응시킴으로써, 글리칸의 아노머 탄소의 수산기를 선택적으로 제거하여 글리칸의 환원성 말단에 글리칸 옥사졸린 유도체를 합성하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 과메틸 글리칸 옥사졸린 합성 단계는 글리칸 옥사졸린을 염기 조건에서 아이오도메테인(Iodomethane)과 반응시킴으로써, 글리칸 옥사졸린을 과메틸화하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계는 과메틸 글리칸 옥사졸린을 ACN(acetonitrile) 용매 및 염기 조건에서 아민과 반응시킴으로써 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에 있어서 상기 아민은 프로필 아민, 부틸 아민, 펜틸 아민, 헥실 아민, 헵틸 아민, 옥틸 아민, 노닐 아민 및 데실 아민으로 이루어진 군으로부터 선택된 일차 알킬 아민인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명에 있어서 상기 아민은 동위원소표지된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에 있어서 상기 동위원소는 ^{2}H 및 ^{13}C로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 또 다른 일 양태는 다음을 포함하는 상대 정량 질량분석법에 관한 것이다:

[0055] 글리칸의 환원성 말단에 옥사졸린을 형성시키는 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

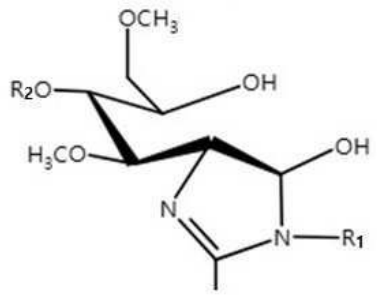
[0056] 상기 글리칸 옥사졸린을 과메틸화 시키는 과메틸 글리칸 옥사졸린 합성 단계;

[0057] 상기 과메틸 글리칸 옥사졸린을 정상 아민 및 동위원소표지 아민과 각각 반응시켜 정상 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계; 및

[0058] 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성 단계에서 합성한 정상 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 질량스펙트럼을 비교하여 상대 정량 질량분석하는 상대 정량 질량분석 단계.

[0059] 본 발명에 있어서 상기 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0060] [화학식 1]



[0061]

[0062] 상기 화학식 1에서,

[0063] R_1은 C_3 내지 C_{10}의 알킬기이고,

[0064] R_2는 Man5, Man6, Man7, Man8 및 Man9로 이루어진 군으로부터 선택되는 고만노스(high mannose) 잔기, 복합형(complex) 또는 하이브리드형(hybrid) N-연결 글리칸 잔기이다.

[0065] 본 발명에 있어서 상기 정상 아민 또는 동위원소표지 아민은 프로필 아민, 부틸 아민, 펜틸 아민, 헥실 아민, 헵틸 아민, 옥틸 아민, 노닐 아민 및 데실 아민으로 이루어진 군으로부터 선택된 일차 알킬 아민인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명에 있어서 상기 동위원소는 ^{2}H 및 ^{13}C로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0067] 글리칸의 옥사졸린과 일차 알킬 아민의 친핵성 반응으로 글리칸 알킬 이미다졸린의 안정적인 합성 및 정제 방법

을 확립하였으며, 이를 이용한 글리칸의 상대 정량 질량분석법을 개발하였다. 따라서, 화학적 동위원소표지에 의한 정량적 질량분석법을 통해 글리칸의 정량적 정보를 제공할 수 있어 글리칸의 다양한 생명현상에 관한 연구를 이끌 수 있고, 글리칸 바이오마커의 발굴로 질병의 조기 진단에 기초가 되어 의학 및 질병 검진의 발전에 이바지할 것으로 생각된다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 글리칸으로부터 과메틸 글리칸 이미다졸린을 옥사졸린을 합성하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 과메틸 글리칸 옥사졸린에 동위원소표지 일차 알킬 아민을 반응시켜 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 과메틸 글리칸 옥사졸린에 각각 정상 및 동위원소표지 프로필 아민을 반응시켜 정상 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하여 상대 정량 질량분석을 수행하는 단계를 나타낸 모식도이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따라 Man7 글리칸의 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따라 과메틸 Man7 옥사졸린의 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 Man7 프로필 이미다졸린의 조각화 해석을 위한 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따라 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린의 조각화 해석을 위한 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 Man7 프로필 이미다졸린의 질량스펙트럼을 나타낸 그리프이다.

도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따라 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린의 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린의 혼합 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린을 1:2의 비율로 혼합하여 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린을 1:4의 비율로 혼합하여 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8c는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린을 1:8의 비율로 혼합하여 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8d는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린을 2:1의 비율로 혼합하여 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8e는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린을 4:1의 비율로 혼합하여 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8f는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린을 8:1의 비율로 혼합하여 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린의 비율에 따른 질량스펙트럼에 대한 검정곡선을 나타낸 그래프이다.

도 10a는 본 발명의 일 실시예에 따라 오브알부민의 고만노스(high mannose) 글리칸에 대한 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린의 혼합 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 10b는 본 발명의 일 실시예에 따라 오브알부민의 하이브리드(hybrid) 글리칸에 대한 정상 및 동위원소표지

글리칸 프로필 이미다졸린의 혼합 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 10c는 본 발명의 일 실시예에 따라 오브알부민의 복합(complex) 글리칸에 대한 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린의 혼합 질량스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0072] **실시예 1. 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린의 합성**

[0073] 동위원소표지에 의한 글리칸의 정량 질량분석을 위해, 도 1의 과정에 따라 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성하였다.

[0074] 구체적으로, 해리 글리칸의 아노머 탄소의 수산기를 제거하여 옥사졸린을 합성하는 반응을 일차적으로 수행하였다. 글리칸 옥사졸린화 반응은 많은 연구를 통하여 잘 알려져 있으며 글리칸을 수용액 상태에서 탈수제인 CDMBI와 반응시키면 글리칸의 아노머 탄소의 수산기를 선택적으로 제거하고 오각형 헤테로 고리화합물인 글리칸 옥사졸린 유도체를 높은 수율로 합성할 수 있다. 이후, 반응의 완결을 위하여 염기조건(Na_3PO_4), 0℃ 조건에서 2시간 동안 반응시키고 이를 세 번 반복하여 글리칸 옥사졸린을 확보하였다.

[0075] 이후 합성된 글리칸 옥사졸린을 DMSO(dimethylsulfoxide) 용매와 염기조건(NaOH)에서 아이오도메테인(iodomethane)과 반응하여 과메틸화하고, 추출에 의한 정제를 수행하여 과메틸 글리칸 옥사졸린을 얻었다. 이러한 글리칸 옥사졸린의 과메틸화는 글리칸의 소수성에 의한 염 제거 및 보호 효과와 아민기의 선택적 친핵성 공격을 위하여 수행된다.

[0076] 이후, 정제된 과메틸 글리칸 옥사졸린을 일차 알킬 아민과 ACN(acetonitrile) 용매, 염기조건(TEA, triethylamine), 상온 조건에서 24시간 동안 반응하여 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성한 후, 과메틸 글리칸 옥사졸린을 과량의 일차 알킬 아민과 반응시킴으로써 옥사졸린의 아마이드(amide) 탄소에 친핵성 공격으로 고리 열림과 아미딘(imidine) 중간체를 생성하고 양성자 이동에 의해 열역학적으로 안정한 고리형 이미다졸린을 형성하여 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린을 합성할 수 있다.

[0077] 이 때, 도 2와 같이 ^{2}H 또는 ^{13}C와 같은 동위원소로 표지된 일차 알킬 아민을 사용함으로써 동위원소표지된 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린 합성이 가능하고, 이를 정상 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린과 비교함으로써 글리칸의 정량 질량 분석이 가능하다.

[0078] 상기의 과정을 통해 합성된 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린은 페닐기가 없는 일차 알킬 아민을 이용하여 동위원소를 표지하므로 별도의 정제 과정 없이 건조에 의한 잔류 알킬 아민의 휘발만으로 쉽게 정제가 가능한 장점이 있다.

[0080] **실시예 2. 동위원소표지 과메틸 글리칸 프로필 이미다졸린을 이용한 정량 질량분석**

[0081] 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린에 의한 글리칸의 정량 질량분석능을 평가하기 위해, 정상 및 동위원소 과메틸 글리칸 프로필 이미다졸린을 합성하여 질량스펙트럼을 분석하였다.

[0082] 구체적으로, 도 3a에 나타난 것과 같이 글리칸의 옥사졸린화 및 과메틸화 반응 후 정제된 과메틸 글리칸 옥사졸린에 일차 알킬 아민인 프로필(propyl) 아민을 휘발성 유기용매 조건에서 반응시켜 과메틸 글리칸 프로필 이미다졸린을 합성하였고, 정량 질량분석을 위해 ^{2}H로 표지된 프로필 아민을 이용하여 동위원소표지 과메틸 글리칸 프로필 이미다졸린을 합성하였다.

[0083] 정상 프로필 아민(d_0) 및 동위원소표지 프로필 아민(d_7)에 의해 합성된 정상 글리칸 프로필 이미다졸린(d_0, light glycan) 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린(d_7, heavy glycan)을 질량스펙트럼(mass spectrum)을 통해 정량 분석한 결과, 도 3b와 같이 충분한 질량이동(mass shift)이 관찰되었으며, 7.0 Da의 질량 차이가 발생한 것을 확인할 수 있었다.

[0084] 종래의 질량분석법을 이용한 글리칸의 분석은 정제된 과메틸 글리칸에 염(NaOH)을 첨가하는 이온화 방법을 사용하여 2+ 양이온으로 검출되므로 염에 의한 이온화 억제를 고려하여야 하지만, 본 발명의 과메틸 글리칸 알킬 이미다졸린에 의한 글리칸의 질량분석법은 글리칸의 이미다졸린 부분에 의하여 양성자화가 쉽다는 장점이 있어 1가 양이온의 생성이 가능한 휘발성 산성 유기용매(0.1% formic acid + 80% ACN)에 의한 이온화가 가능하므로, 염에 의한 이온화 억제를 피할 수 있다.

[0085] 위와 같이, 동위원소 표지 글리칸 알킬 이미다졸린을 이용하여 정제가 간단하면서도 염에 의한 이온화 억제 우려가 없는 새로운 상대 정량 질량분석법을 개발하였고, 이를 ILGI (Isotope-labeled glycan imidazoline)법으로 명명하였다.

[0087] **실시예 3. 정상 및 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린 합성 및 상대 정량 질량분석능 확인**

[0088] Man7 글리칸에 대한 ILGI법의 상대 정량 질량분석능을 확인하기 위해, 정상 및 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린의 질량스펙트럼을 분석하였다.

[0089] 구체적으로, 100 pmol의 Man7 글리칸 두 개를 준비하여 각각 CDMBI를 이용하여 옥사졸린을 합성하고, 과메틸화와 정제 과정을 거쳐 과메틸 Man7 옥사졸린을 준비하였다. 도 4a 및 도 4b와 같이, Man7 글리칸 및 과메틸 Man7 옥사졸린의 질량스펙트럼 분석을 통해 성공적으로 과메틸 Man7 옥사졸린의 합성 및 과메틸화가 이루어진 것을 확인하였다.

[0090] 그 후, 과메틸 Man7 옥사졸린에 같은 양의 정상(d_0) 및 동위원소표지(d_7) 프로필 아민을 각각 첨가하여 정상(Light) 및 동위원소표지(Heavy) Man7 프로필 이미다졸린을 합성하였다. 도 5a 및 5b와 같이, 과메틸 Man7 옥사졸린 및 프로필 아민의 반응에 의해 합성된 정상 및 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린의 MS/MS 질량스펙트럼의 조각화 해석을 통해 과메틸 Man7 옥사졸린에 프로필 아민이 성공적으로 결합하여 과메틸 Man7 이미다졸린이 합성된 것을 확인하였다.

[0091] 도 6a 및 도 6b에서 볼 수 있듯이, 정상(d_0) 및 동위원소표지(d_7) 프로필 아민에 의하여 합성된 정상 및 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린은 양성자화에 의하여 각각 1979.032 Da 과 1986.077 Da의 질량스펙트럼이 나타났고, 정확히 7.0 Da의 질량이동이 이루어짐을 관찰할 수 있다.

[0093] **실시예 4. 정상 및 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린 혼합에 따른 상대 정량 질량분석능 확인**

[0094] 정상 및 동위원소표지된 알킬 글리칸 이미다졸린의 혼합에 따른 ILGI법의 상대 정량 질량분석능을 확인하기 위해, 정상 및 동위원소표지 Man7 프로필 이미다졸린을 1:1로 혼합한 후 질량스펙트럼을 분석하였다.

[0095] 도 7에서 볼 수 있듯이, 정상 및 동위원소표지 글리칸 사이에 7.0 Da의 질량 차이가 명확하게 나타나 충분한 질량 간격으로 동위원소 클러스터에 의한 간섭을 피할 수 있음을 확인하였고, 정상(Light) 및 동위원소표지(Heavy) Man7 프로필 이미다졸린의 1:1 혼합에 대한 질량스펙트럼의 피크면적의 비율(Light/Heavy) 역시 0.98±0.03으로 나타나 우수한 상대 정량성을 보여주었다.

[0097] **실시예 5. 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린의 비율에 따른 상대 정량 질량분석능 평가**

[0098] 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린의 비율에 따른 ILGI법의 상대 정량 질량분석능을 확인하기 위하여, 정상 및 동위원소표지 글리칸 프로필 이미다졸린의 비율을 다르게 하여 질량스펙트럼을 분석하였다.

[0099] 구체적으로, Man7 및 오브알부민(ovalbumin) 글리칸을 이용하여 정상(Light) 및 동위원소표지(Heavy) Man7 프로필 이미다졸린을 합성하였고, 각각 1:2, 1:4, 1:8, 2:1, 4:1, 및 8:1의 비율로 혼합한 후 질량스펙트럼을 도 8a 내지 8f에 나타내었다.

[0100] 각 혼합시료의 스펙트럼에서 얻어진 정상 및 동위원소표지의 피크 면적 비율을 통해 계산된 Light/Heavy 비율은 이론적 비율에 대해 실험적 비율로 나타내었으며 도 9에서 볼 수 있듯이, 검정곡선의 선형측정범위에 대한 기울기는 1.00에 가까운 1.12, 상관계수(R^2)의 값은 0.996으로 높은 정확도 및 우수한 직선성이 나타났다.

[0102] **실시예 6. 오브알부민의 글리칸 상대 정량 질량분석**

[0103] 실제 시료에 대한 ILGI(Isotope-labeled glycan imidazoline)법의 적용 가능성을 증명하기 위하여 당단백질로 잘 알려진 오브알부민(ovalbumin)을 모델로 하여 정량성을 검증하였다.

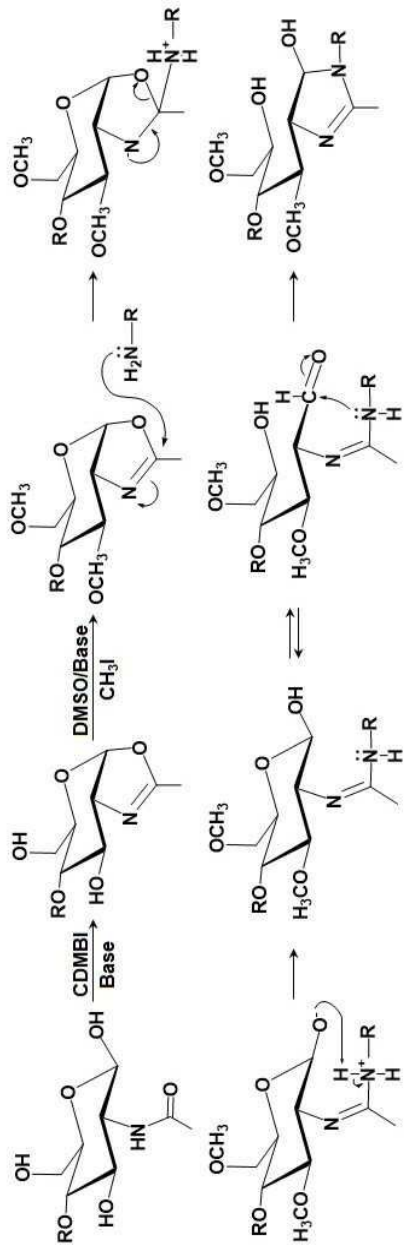
[0104] 오브알부민으로부터 글리칸의 정제는 일반적으로 잘 알려진 과정을 거쳐 준비되었으며 일정량의 글리칸을 옥사

졸린화하고 과메틸화하여 정제한 후 프로필 아민과 반응하여 글리칸 프로필 이미다졸린을 합성하였다. 이 때, 글리칸 프로필 이미다졸린은 정상 및 동위원소표지 프로필 아민의 비율을 1:1로 혼합하여 이중 질량스펙트럼을 얻었으며, 오브알부민의 대표적인 글리칸 중 i)고만노스(high mannose), ii)하이브리드(hybrid), iii)복합(compex) 글리칸 3종류에 대한 질량스펙트럼을 확인하였다.

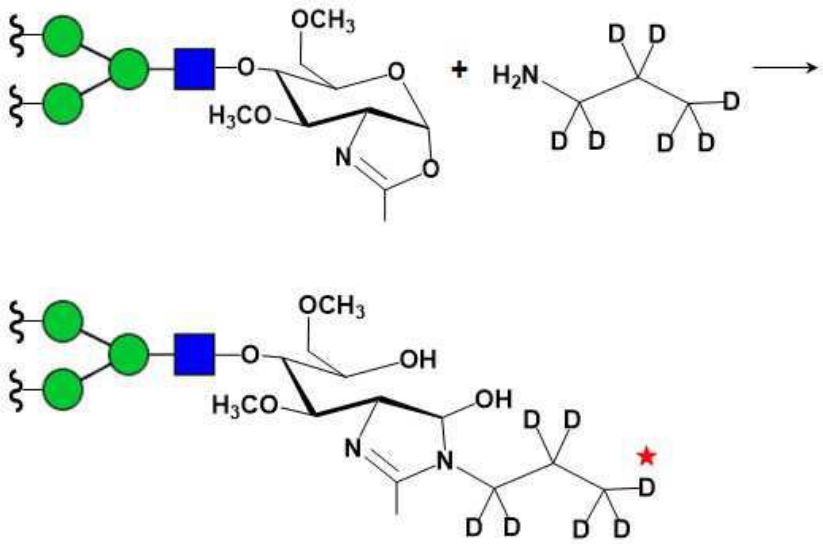
[0105] 도 10a 내지 10c에서 볼 수 있듯이, 다른 질량의 다양한 글리칸에 대하여 동위원소표지에 의해 7.0 Da의 질량 차이가 나타남을 확인하였고, 또한 충분한 질량 차이를 제공함으로써 정상 및 동위원소표지 글리칸 사이의 간섭이 없음을 보여주고 있으며, 모두 이론적 혼합비인 1.0에 근접하는 혼합비를 얻음으로써 실제 시료에 대한 우수한 정량 성능을 보여주고 있음을 확인하였다.

도면

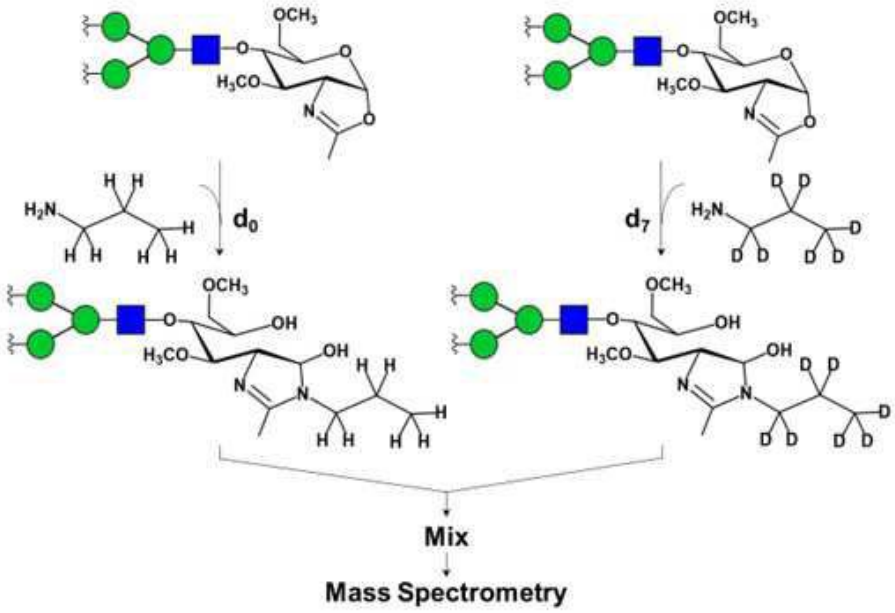
도면1



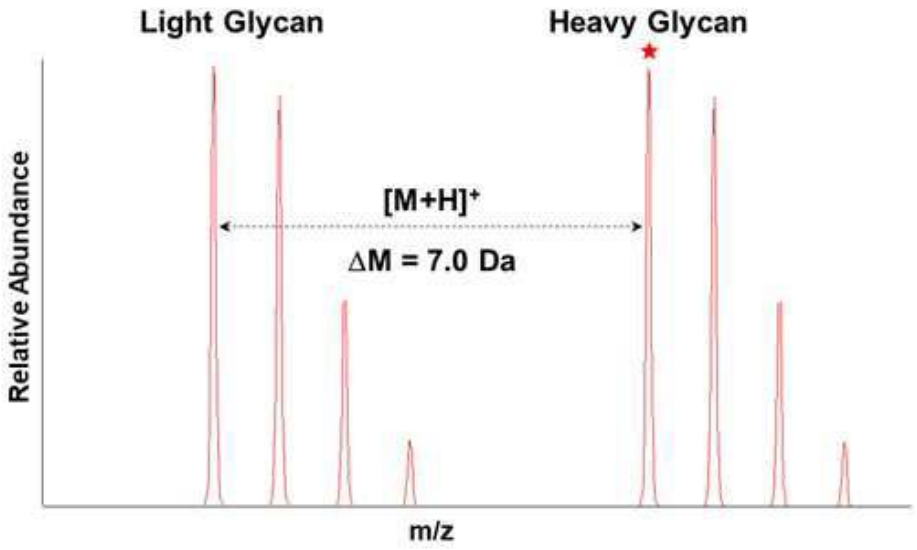
도면2


OCH3
O
H3CO
N
O
+
H2N
D
D
D
D
D
D
D
OCH3
O
OH
H3CO
OH
N
N
D
D
D
D
D
D
D

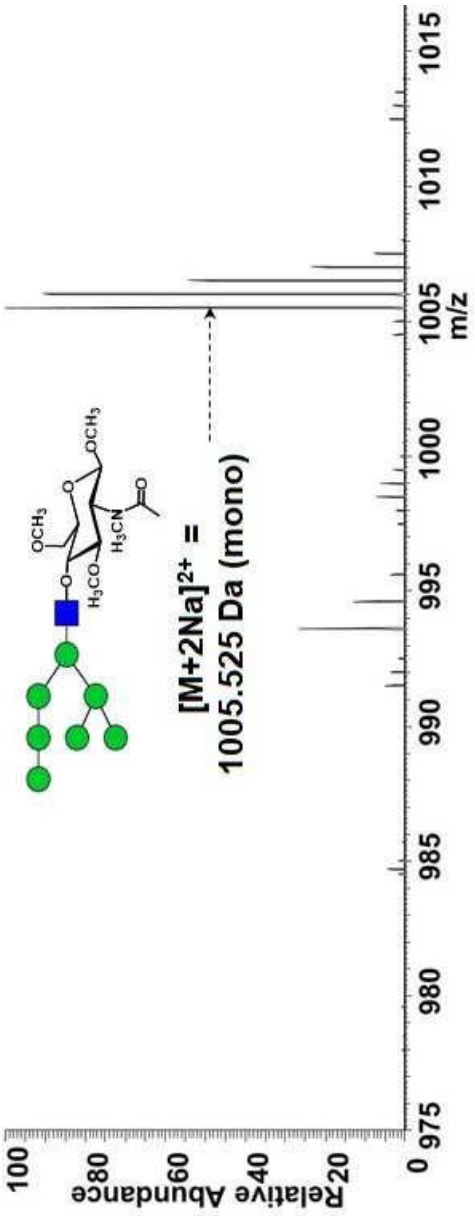
도면3a


OCH3
O
H3CO
N
O
H2N
H
d0
d7
D
OH
Mix
Mass Spectrometry

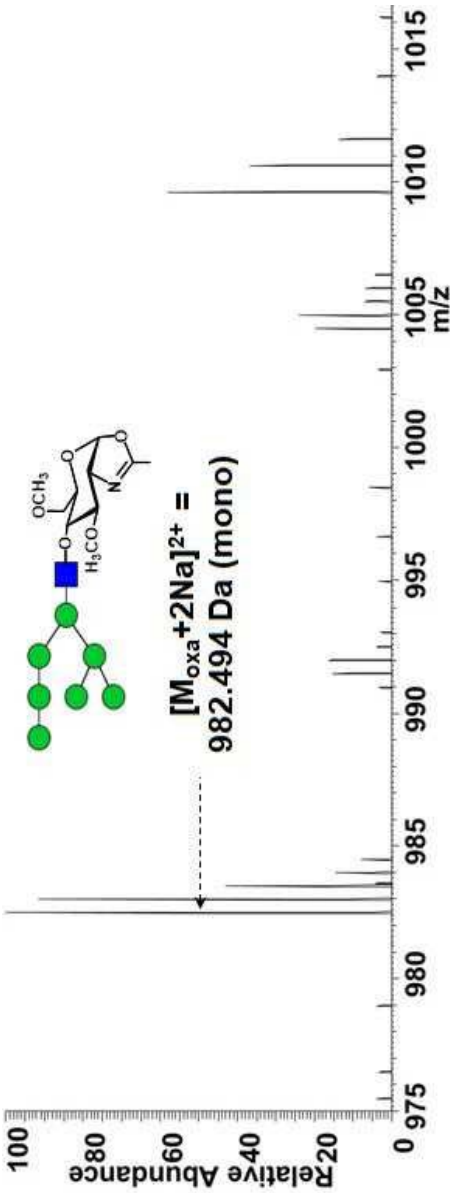
도면3b



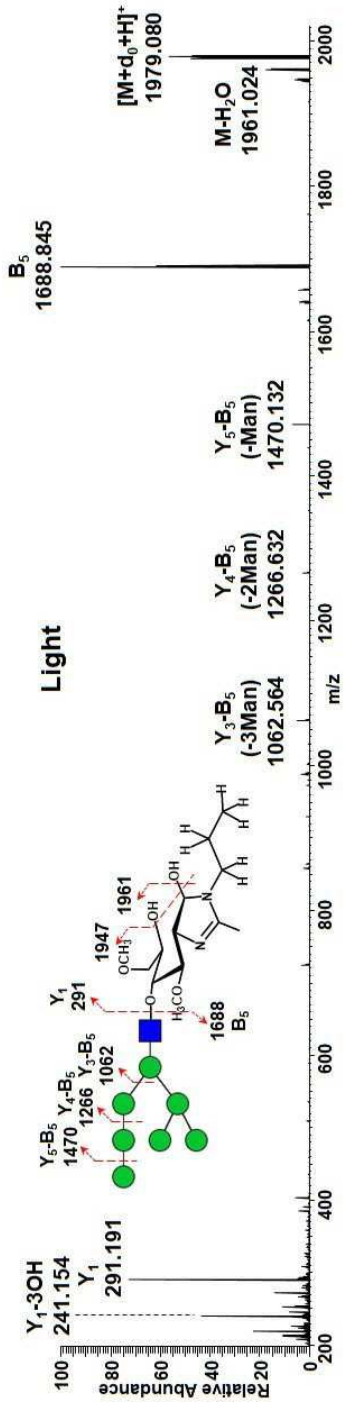
도면4a


Relative Abundance
100
80
60
40
20
0
975
980
985
990
995
1000
1005
1010
1015
m/z
[M+2Na]2+ =
1005.525 Da (mono)
OCH3
OCH3
H3CO
H3CN

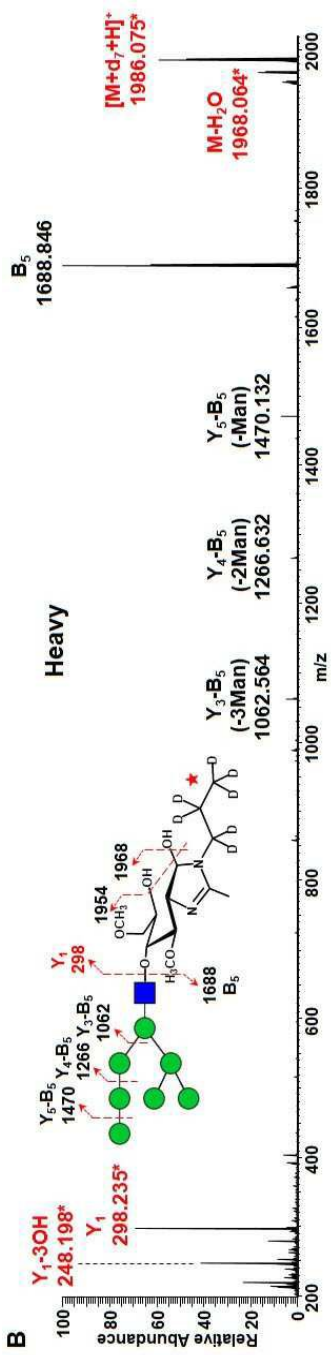
도면4b


Relative Abundance
100
80
60
40
20
0
975
980
985
990
995
1000
1005
1010
1015
m/z
[Moxa+2Na]2+ =
982.494 Da (mono)
OCH3
H3CO

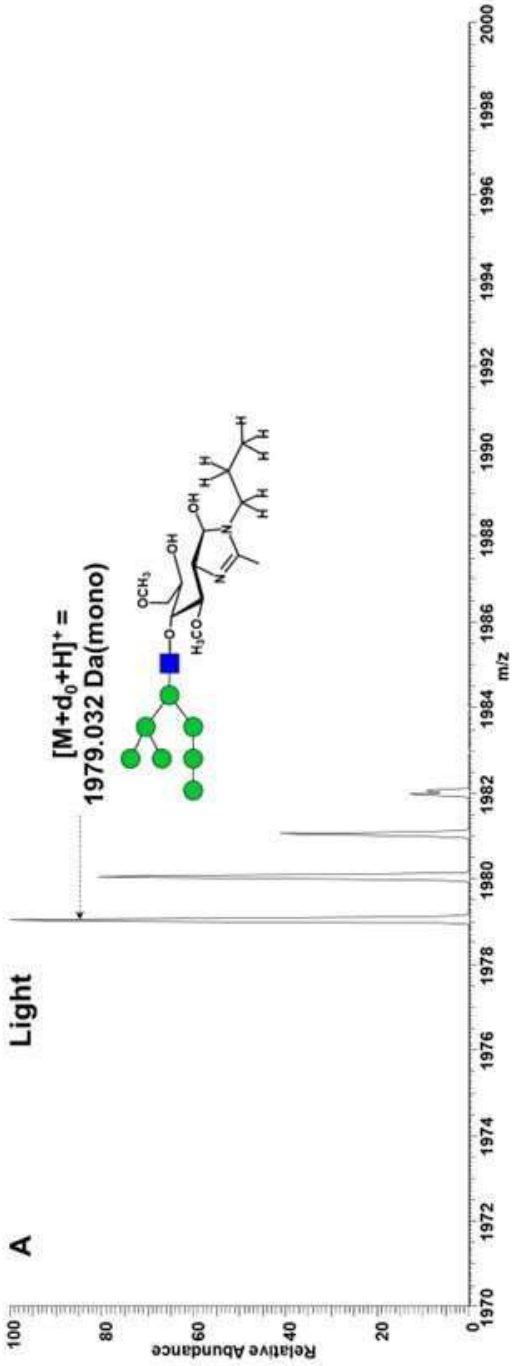
도면5a


Light
Relative Abundance
m/z
Y1-3OH
241.154
Y1
291.191
B5
1688.845
[M+d0+H]+
1979.080
M-H2O
1961.024
Y5-B5
(-Man)
1470.132
Y4-B5
(-2Man)
1266.632
Y3-B5
(-3Man)
1062.564
Y1
291
1947
1961
1688
B5
Y5-B5
1470
Y4-B5
1266
Y3-B5
1062

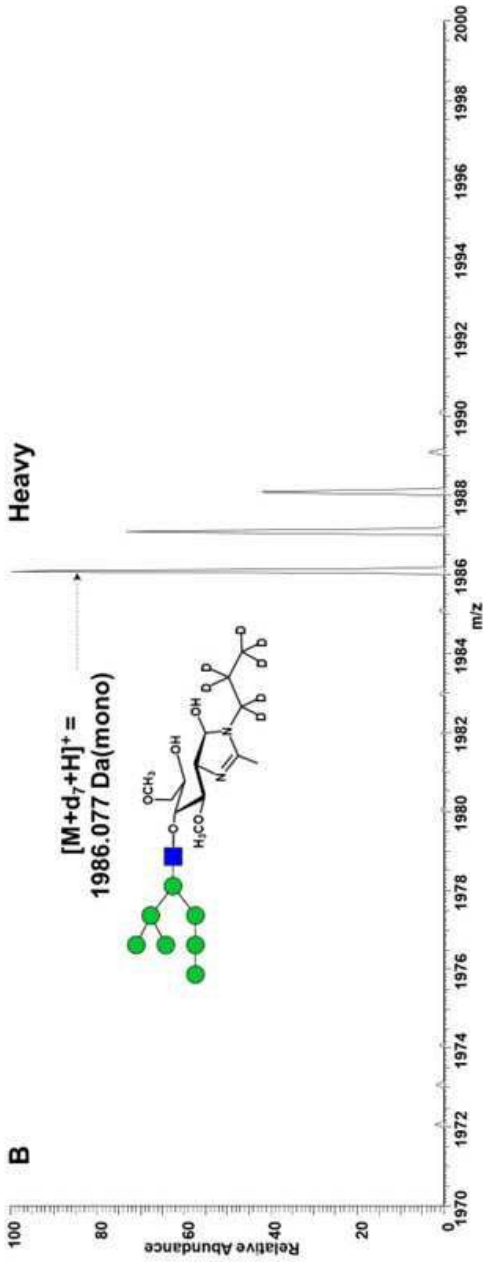
도면5b


B
Relative Abundance
m/z
Heavy
Y1-3OH
248.198*
Y1
298.235*
Y5-B5
1470
Y4-B5
1266
Y3-B5
1062
Y1
298
1954
1968
1688
B5
Y3-B5
(-3Man)
1062.564
Y4-B5
(-2Man)
1266.632
Y5-B5
(-Man)
1470.132
B5
1688.846
M-H2O
1968.064*
[M+d7+H]+
1986.075*

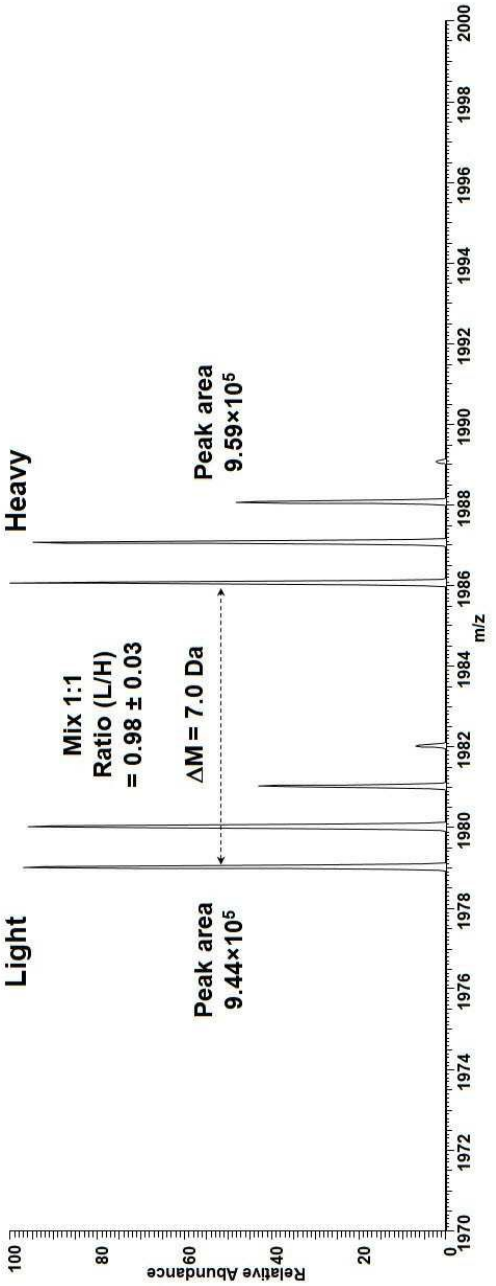
도면6a


A
Light
[M+d0+H]+ =
1979.032 Da(mono)
Relative Abundance
m/z
100
80
60
40
20
0
1970
1972
1974
1976
1978
1980
1982
1984
1986
1988
1990
1992
1994
1996
1998
2000
OCH3
OH
OH
H3CO
O
N
N

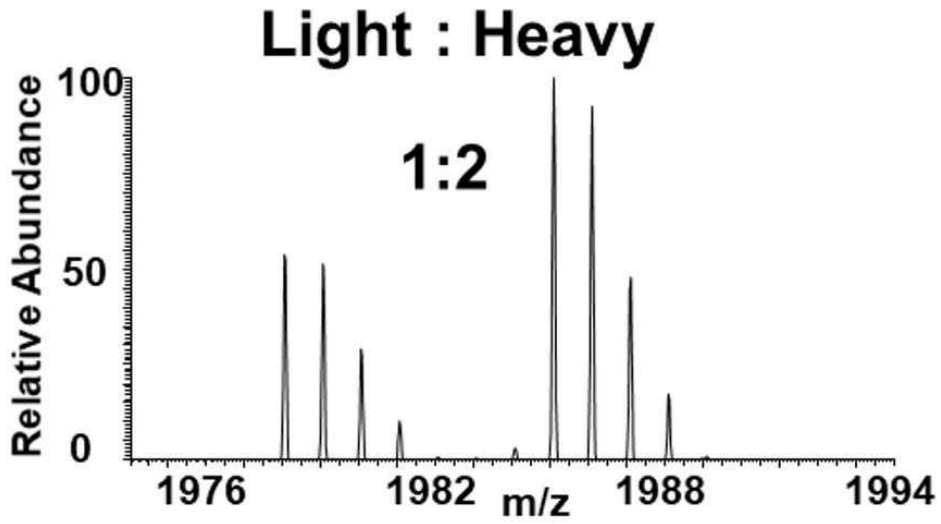
도면6b


B
Heavy
[M+d7+H]+ =
1986.077 Da(mono)
Relative Abundance
m/z
100
80
60
40
20
0
1970
1972
1974
1976
1978
1980
1982
1984
1986
1988
1990
1992
1994
1996
1998
2000
OH
OCH3
H3CO
N
O
D
d

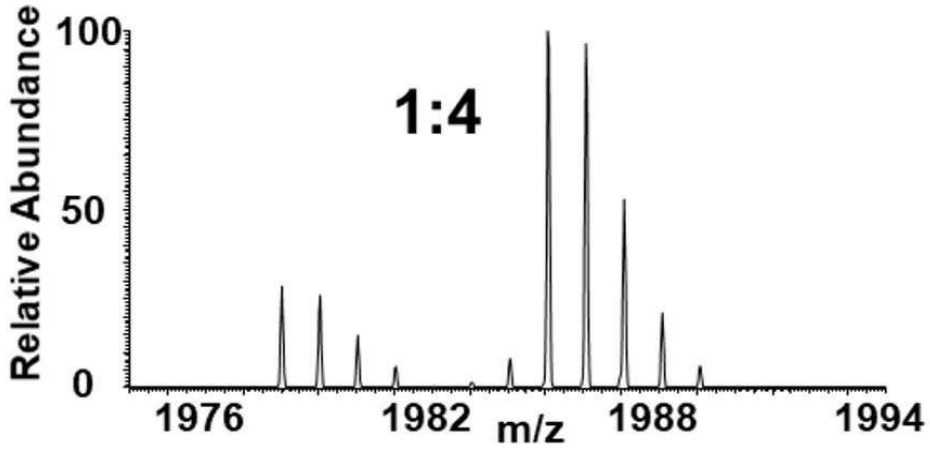
도면7


Heavy
Peak area
9.59×10⁵
Mix 1:1
Ratio (L/H)
= 0.98 ± 0.03
ΔM = 7.0 Da
Light
Peak area
9.44×10⁵
Relative Abundance
m/z
100
80
60
40
20
0
1970
1972
1974
1976
1978
1980
1982
1984
1986
1988
1990
1992
1994
1996
1998
2000

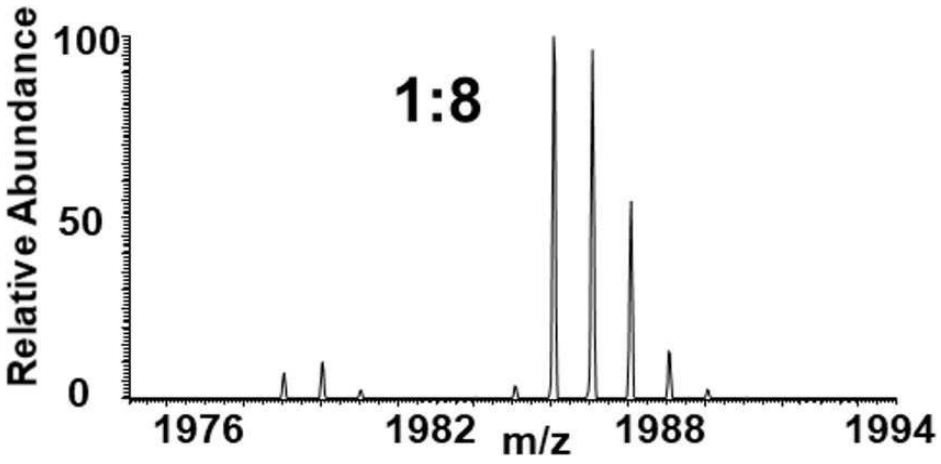
도면8a



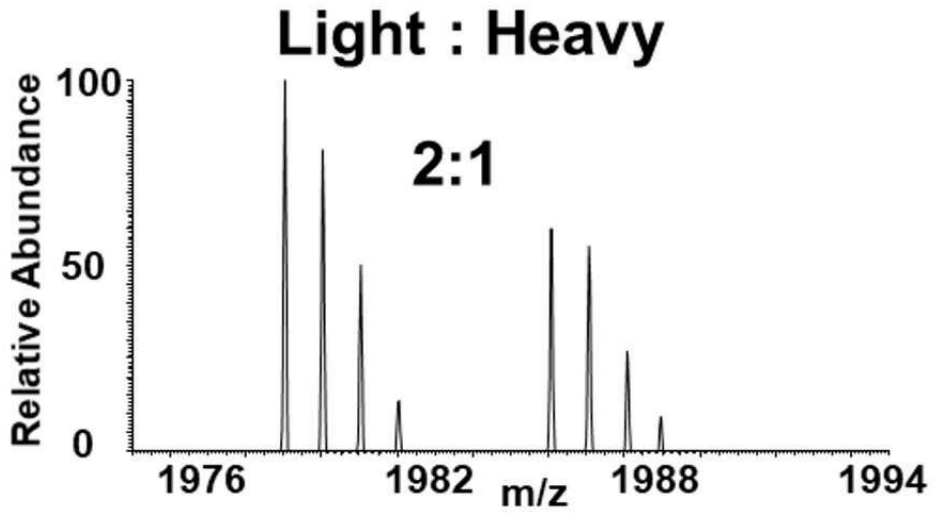
도면8b



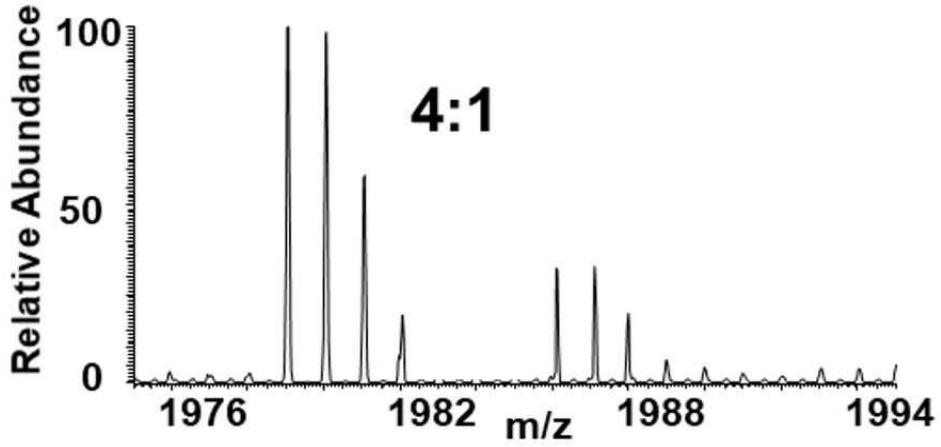
도면8c



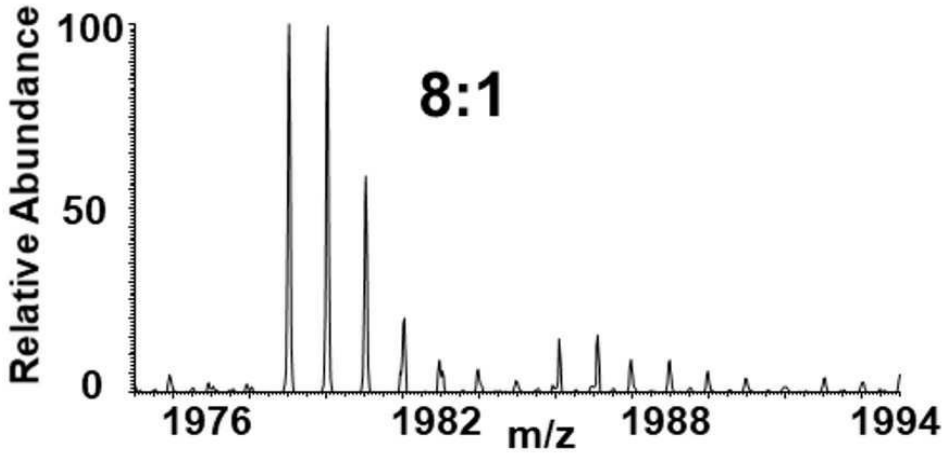
도면8d



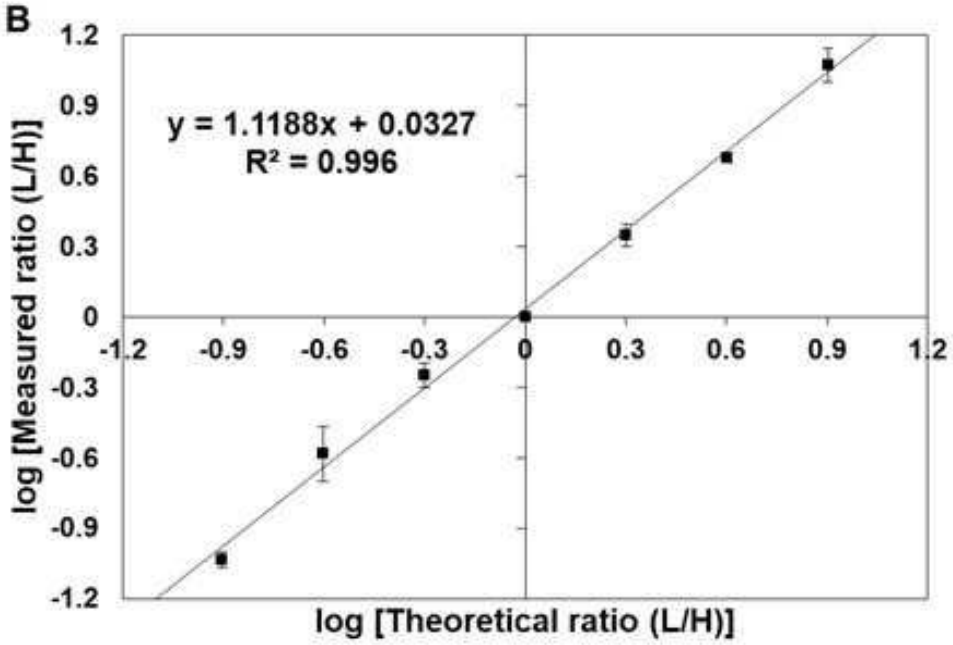
도면8e



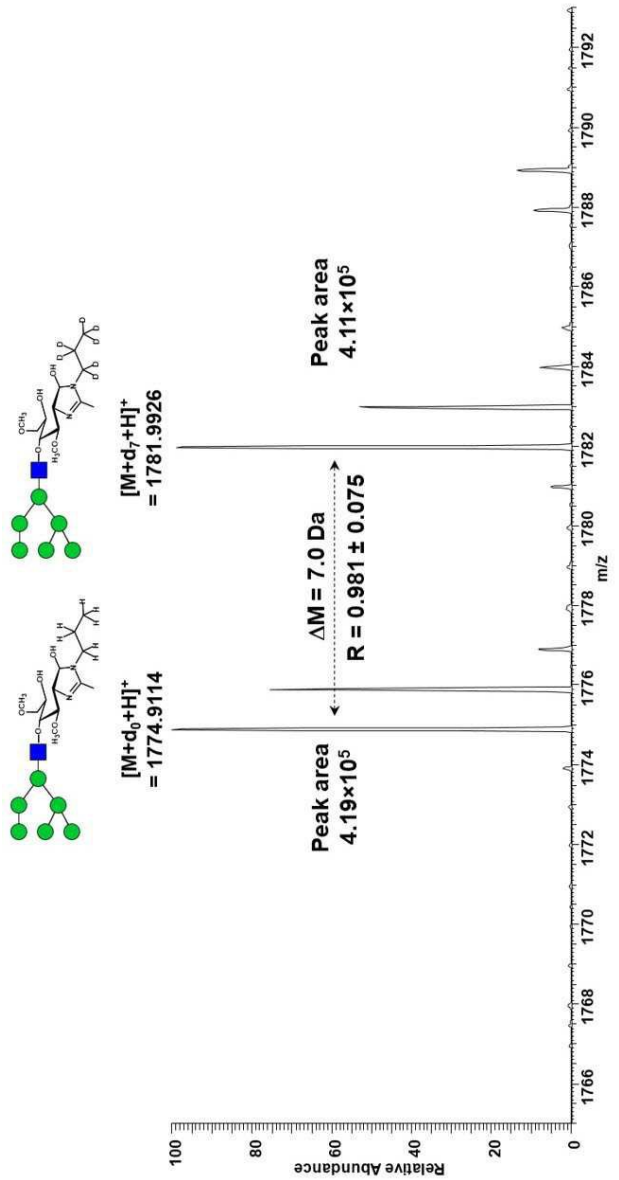
도면8f



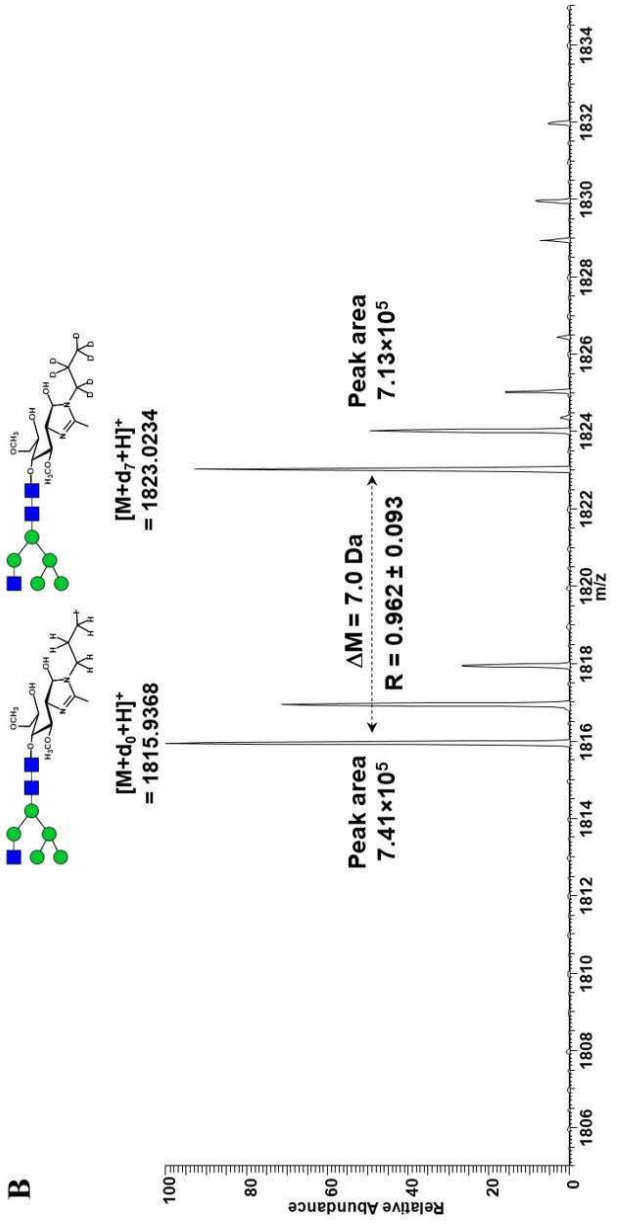
도면9


B
y = 1.1188x + 0.0327
R² = 0.996
log [Measured ratio (L/H)]
log [Theoretical ratio (L/H)]
1.2
0.9
0.6
0.3
0
-0.3
-0.6
-0.9
-1.2
-1.2
-0.9
-0.6
-0.3
0
0.3
0.6
0.9
1.2

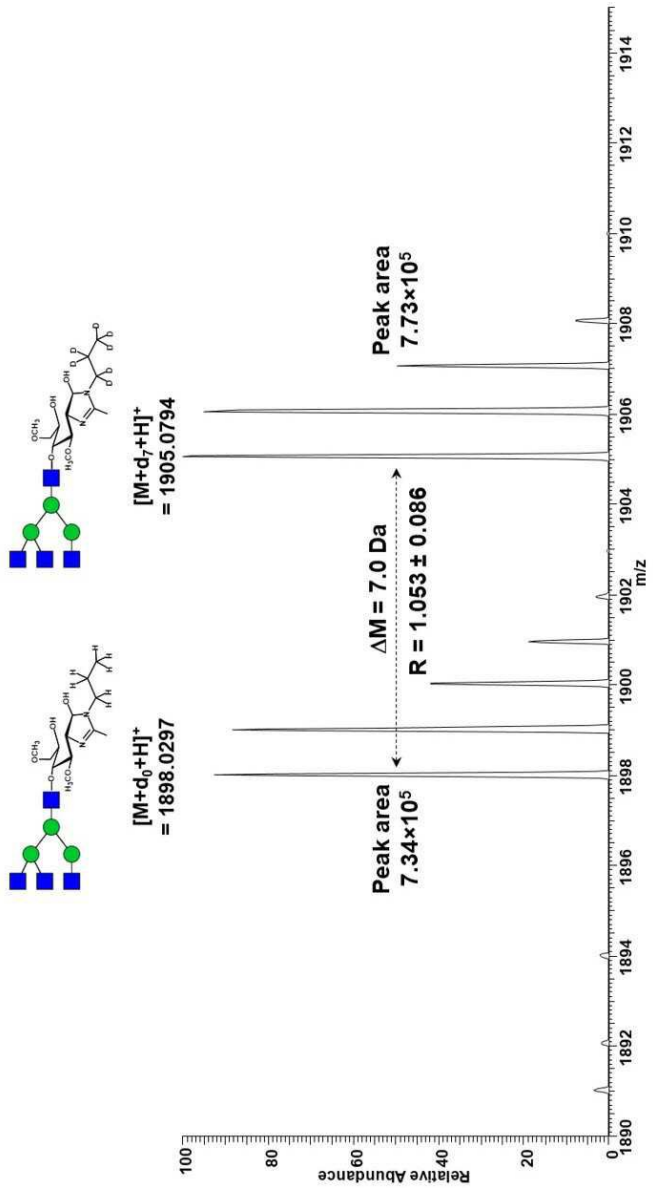
도면10a


[M+d0+H]+
= 1774.9114
[M+d7+H]+
= 1781.9926
ΔM = 7.0 Da
R = 0.981 ± 0.075
Peak area
4.19×10^5
Peak area
4.11×10^5
Relative Abundance
m/z
100
80
60
40
20
0
1766
1768
1770
1772
1774
1776
1778
1780
1782
1784
1786
1788
1790
1792

도면10b


B
[M+d0+H]+
= 1815.9368
[M+d7+H]+
= 1823.0234
Peak area
7.41×10^5
Peak area
7.13×10^5
ΔM = 7.0 Da
R = 0.962 ± 0.093
Relative Abundance
m/z
0
20
40
60
80
100
1806
1808
1810
1812
1814
1816
1818
1820
1822
1824
1826
1828
1830
1832
1834

도면10c


[M+d0+H]+
= 1898.0297
[M+d7+H]+
= 1905.0794
ΔM = 7.0 Da
R = 1.053 ± 0.086
Peak area
7.34×10^5
Peak area
7.73×10^5
Relative Abundance
m/z
100
80
60
40
20
0
1890
1892
1894
1896
1898
1900
1902
1904
1906
1908
1910
1912
1914