(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월05일
(11) 등록번호 10-2691545
(24) 등록일자 2024년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6848 (2013.01)
G01N 2458/15 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0194984
(22) 출원일자 2023년12월28일
심사청구일자 2023년12월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020210098504 A
KR100789430 B1
KR1020230135370 A

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김현수
대전광역시 유성구 대학로 99 생명시스템과학대학 113호 (궁동)
김우진
충청남도 천안시 서북구 불당19로 95, 102동 1404호 (불당동, 천안불당린스트라우스1단지)
손아름
미국 캘리포니아 라호야 스크립스 리서치 SR 302B 노스 토리 파인즈 로드 10550
(74) 대리인
최규환

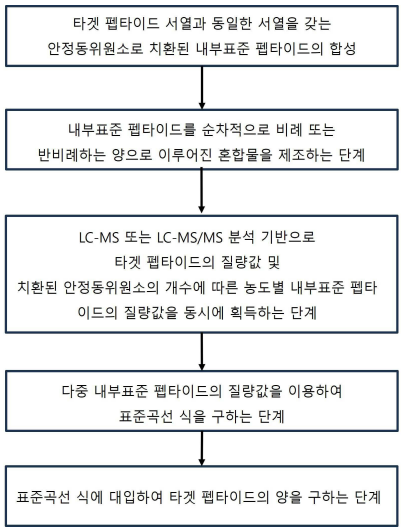
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법**

(57) 요 약

본 발명은 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법에 관한 것으로, 서열을 알고 있는 표적 펩타이드에 대한 정량 시, 표적 펩타이드와 동일 서열로 이루어지고, 동위원소로 치환된 다양한 아미노산을 포함하는 표준 펩타이드를 합성한 후, 다양한 농도로 표적 펩타이드와 혼합하고, 상기 혼합물의 LC-MS 분석을 통해 혼합된 시료에서 단일분석으로 내부표준곡선 생성과 표적(내재성) 펩타이드를 동시에 분석하여, 이를 통해 획득되는 각각의 피크면적으로부터 표적(내재성) 펩타이드의 양을 정확하게 정량하는 방법이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711194258
과제번호	00209456
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	다종양 단일세포 구조단백체 분석을 통한 면역항암제 치료표적 발굴
기 여 율	50/100
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711172806
과제번호	2022R1F1A1074235
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	구조단백체 데이터 기반의 간암 치료표적 신규 발굴
기 여 율	25/100
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711179294
과제번호	RS-2022-000155857
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	정보통신기획평가원
연구사업명	인공지능융합혁신인재양성(R&D)
연구과제명	인공지능융합혁신인재양성(충남대학교)
기 여 율	25/100
과제수행기관명	충남대학교산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2025.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 정량하려는 표적 펩타이드의 아미노산 수가 n개 일 때, 상기 표적 펩타이드와 동일한 아미노산 서열로 이루어지고, 양 말단 또는 어느 한쪽 말단의 아미노산이 안정동위원소로 치환되며, 치환된 아미노산의 개수가 n개 이하인 복수종의 내부표준 펩타이드를 합성하는 단계;

(2) 정량하려는 표적 펩타이드가 포함된 시료에, 상기 단계 (1)에서 합성한 내부표준 펩타이드를 첨가하되, 상기 내부표준 펩타이드의 첨가량은 치환된 안정동위원소를 포함하는 아미노산의 개수에 따라, 일정하게 비례 또는 반비례하는 내부표준 펩타이드 양을 첨가하여 혼합하는 단계;

(3) 상기 단계 (2) 이후에, 상기 내부표준 펩타이드 및 표적 펩타이드를 포함하는 시료에 대한 LC(Liquid Chromatography)-MS(Mass Spectrometry) 또는 LC-MS/MS 분석을 수행하는 단계;

(4) 상기 단계 (3)에서 수행한 LC-MS 분석으로부터 획득한 표적 펩타이드의 피크 면적(peak area) 값; 및 서로 다른 양을 갖는 안정동위원소로 치환된 내부표준 펩타이드 각각의 피크 면적 값을 획득하는 단계;

(5) 상기 단계 (4)에서 획득한, 서로 다른 양을 갖는 내부표준 펩타이드의 면적 값으로부터 내부표준곡선(Internal Standard Curve, Calibration Curve) 식을 구하는 단계; 및

(6) 상기 단계 (5)에서 구한 내부표준곡선 식에, 상기 단계 (4)에서 획득한 표적 펩타이드의 면적값을 대입하여 정량하는 단계;를 포함하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안정동위원소는 ^{13}C 및 ^{15}N 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 펩타이드의 개수는 1~4,000개 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 정량하려는 표적 펩타이드는 6~80개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 정량하려는 표적 펩타이드는 단백질분해효소(protease)를 처리하여, 내부 절단된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 단백질분해효소(protease)는 트립신(trypsin), 키모트립신(Chymotrypsin), 펩신(Pepsin), LysC 또는 ArgC인 것을 특징으로 하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법.

청구항 7

(1) 판별하려는 표적 펩타이드의 아미노산 수가 n개 일 때, 상기 표적 펩타이드와 동일한 서열로 이루어지고, 양 말단 또는 어느 한쪽 말단의 아미노산이 안정동위원소로 치환되며, 치환된 아미노산의 개수가 n개 이하인 복

수종의 내부표준 펩타이드를 합성하는 단계;

(2) 판별하려는 표적 펩타이드가 포함된 시료에, 상기 단계 (1)에서 합성한 내부표준 펩타이드를 첨가하되, 상기 내부표준 펩타이드의 첨가량은 치환된 안정동위원소를 포함하는 아미노산의 개수에 따라, 일정하게 비례 또는 반비례하는 내부표준 펩타이드 양을 첨가하여 혼합하는 단계;

(3) 상기 단계 (2) 이후에, 상기 내부표준 펩타이드 및 표적 펩타이드를 포함하는 시료에 대한 LC(Liquid Chromatography)-MS(Mass Spectrometry) 또는 LC-MS/MS 분석을 수행하는 단계;

(4) 상기 단계 (3)에서 수행한 LC-MS 분석으로부터 획득한 표적 펩타이드의 피크 면적(peak area) 값; 및 서로 다른 양을 갖는 안정동위원소로 치환된 내부표준 펩타이드 각각의 피크 면적 값을 획득하는 단계;

(5) 상기 단계 (4)에서 획득한, 서로 다른 양을 갖는 내부표준 펩타이드의 면적 값으로부터 내부표준곡선(Internal Standard Curve, Calibration Curve) 식을 구하는 단계; 및

(6) 상기 단계 (5)에서 구한 내부표준곡선 식에, 상기 단계 (4)에서 획득한 표적 펩타이드의 면적값을 대입하여 정량하는 단계;를 포함하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 판별 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폴리펩타이드 혼합물의 질량분석은 질량 스펙트럼의 해석을 통하여 혼합물 내의 단백질을 판별(identification)하거나 정량분석(quantification)이 가능하다. 질량 스펙트럼 데이터의 피크(peak)들은 혼합물에 들어있는 폴리펩타이드의 질량 대 전하량 비(m/z)와 세기(intensity)로 정의되고, 폴리펩타이드 혼합물은 질량 분석 장비를 통해서 양성자 H^+들이 붙어 양(+)의 전하량을 띄는 이온이 되며, 폴리펩타이드 이온들은 직접적인 질량 대신 질량을 전하량으로 나눈 질량 대 전하량 비(m/z)와 해당 이온의 세기가 질량 스펙트럼에 검출된다. 질량 대 전하량 비(m/z)와 단편화된 펩타이드의 질량 대 전하량 비(m/z) 값을 미리 정의한 다음 질량분석을 통해 표적 폴리펩타이드를 정량할 수 있다.

[0003] 폴리펩타이드의 질량은, 예를 들어, 해당 폴리펩타이드를 구성하는 탄소(C), 수소(H), 질소(N), 산소(O), 황(S) 원자들의 질량 합으로 정의되며, 단동위원소 질량(monoisotopic mass)을 대표값으로 사용한다. 단동위원소 질량이란 폴리펩타이드를 구성하는 원자들이 모두 가장 가벼운 동위원소로 이루어진 경우를 가정한 원자들의 질량 합을 말한다. 자연계에 존재하는 모든 원소들은 동위원소를 갖는데, 예를 들면 같은 탄소 원소라도 ^{12}C, ^{13}C 동위원소가 존재하고 ^{13}C의 경우 1%의 존재비율을 갖는다. 따라서, 같은 폴리펩타이드라도 어떤 원자들이 무거운 동위원소에 해당된다면 스펙트럼 상에는 질량값이 다른 여러 개의 피크가 검출될 수 있다. 이와 같은 이유로 폴리펩타이드의 질량을 대표하는 값으로 단동위원소 질량을 사용한다. 그러나, 실제 스펙트럼 상에는 여러 폴리펩타이드들의 동위원소 질량 차이에 의한 피크들이 복잡하게 겹쳐서 나타날 수 있고 또한 폴리펩타이드의 질량이 커질수록 구성 원자들이 모두 가장 가벼운 동위원소로 이루어질 확률이 낮아지기 때문에 스펙트럼 상에서 직접 단동위원소 질량에 해당하는 피크를 찾아내는 것은 어려운 문제이다.

[0004] 한편, 한국 등록특허 제0789430호에 복잡한 폴리펩타이드 혼합물의 질량스펙트럼으로부터 폴리펩타이드의 동위원소집단을 찾아 단동위원소 질량을 결정하는 방법 및 기록 매체가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2023-0135370호에 정량질량분석법을 위한 엔도글리코시다제의 트랜스글리코실화와 동위원소 표지 아미노당 옥사졸린에 의한 당단백질의 동위원소 표지법이 개시되어 있으나, 아직까지는 본 발명의 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법을 제공하고, 서열을 알고 있는 표적 펩타이드에 대한 정량 시, 표적 펩타이드와 동일 서열로 이루어지고, 동위원소로 치환된 다양한 아미노산을 포함하는 표준 펩타이드를 합성한 후, 다양한 농도로 표적 펩타이드와 혼합하고, 상기 혼합물의 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS) 분석을 통해 획득되는 각각의 피크면적으로부터 표적(내재성) 펩타이드의 양을 정량하는 방법을 확립함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 정량하려는 표적 펩타이드의 아미노산 수가 n개 일 때, 상기 표적 펩타이드와 동일한 서열로 이루어지고, 안정동위원소로 치환된 아미노산 개수가 1개부터 n개 이하까지이며, 안정동위원소의 치환이 일정한 규칙성을 갖도록 내부표준 펩타이드를 합성하는 단계;

[0007] (2) 정량하려는 표적 펩타이드가 포함된 시료에, 상기 단계 (1)에서 합성한 내부표준 펩타이드를 첨가하되, 상기 내부표준 펩타이드의 첨가량이 치환된 안정동위원소의 개수에 연속적으로 일정한 비율로, 비례 또는 반비례하는 내부표준 펩타이드의 양을 첨가하여 혼합하는 단계;

[0008] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 상기 내부표준 펩타이드 및 표적 펩타이드를 포함하는 시료에 대한 LC(Liquid Chromatography)-MS(Mass Spectrometry) 또는 LC-MS/MS 분석을 수행하는 단계;

[0009] (4) 상기 단계 (3)에서 수행한 LC-MS 분석으로부터 획득한 표적 펩타이드의 피크 면적(peak area) 값; 및 서로 다른 양을 갖는 안정동위원소로 치환된 내부표준 펩타이드 각각의 피크 면적 값을 획득하는 단계;

[0010] (5) 상기 단계 (4)에서 획득한, 서로 다른 양을 갖는 내부표준 펩타이드의 면적 값으로부터 내부표준곡선(Internal Standard Curve, Calibration Curve) 식을 구하는 단계; 및

[0011] (6) 상기 단계 (5)에서 구한 내부표준곡선 식에, 상기 단계 (4)에서 획득한 표적 펩타이드의 면적값을 대입하여 정량하는 단계;를 포함하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (1) 판별하려는 표적 펩타이드의 아미노산 수가 n개 일 때, 상기 표적 펩타이드와 동일한 서열로 이루어지고, 안정동위원소로 치환된 아미노산 개수가 1개부터 n개 이하까지이며, 안정동위원소의 치환이 일정한 규칙성을 갖도록 내부표준 펩타이드를 합성하는 단계;

[0013] (2) 판별하려는 표적 펩타이드가 포함된 시료에, 상기 단계 (1)에서 합성한 내부표준 펩타이드를 첨가하되, 상기 내부표준 펩타이드의 첨가량이 치환된 안정동위원소의 개수에 연속적으로 일정한 비율로, 비례 또는 반비례하는 내부표준 펩타이드의 양을 첨가하여 혼합하는 단계;

[0014] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 상기 내부표준 펩타이드 및 표적 펩타이드를 포함하는 시료에 대한 LC(Liquid Chromatography)-MS(Mass Spectrometry) 또는 LC-MS/MS 분석을 수행하는 단계;

[0015] (4) 상기 단계 (3)에서 수행한 LC-MS 분석으로부터 획득한 표적 펩타이드의 피크 면적(peak area) 값; 및 서로 다른 양을 갖는 안정동위원소로 치환된 내부표준 펩타이드 각각의 피크 면적 값을 획득하는 단계;

[0016] (5) 상기 단계 (4)에서 획득한, 서로 다른 양을 갖는 내부표준 펩타이드의 면적 값으로부터 내부표준곡선(Internal Standard Curve, Calibration Curve) 식을 구하는 단계; 및

[0017] (6) 상기 단계 (5)에서 구한 내부표준곡선 식에, 상기 단계 (4)에서 획득한 표적 펩타이드의 면적값을 대입하여 정량하는 단계;를 포함하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 판별 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법에 관한 것으로, 본 발명의 정량 방법은 서열을 알고 있는 표적 펩타이드에 대한 정량 시, 동시에 여러 종류의 펩타이드(단백질)가 혼합된 시료에서 단일분석으로 내부표준곡선 생성과 표적 펩타이드를 동시에 분석하여, 각각의 펩타이드펩타이드를 정확하게 정량이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 안정동위원소 다중표지 내부 표준물질 기반 펩타이드의 정량 방법에 대한 모식도이다.

도 2는 표적 펩타이드(LASVADVAAK) 및 이의 안정동위원소가 다중 표지된 내부표준 펩타이드의 동시 분석한 LC-MS에서의 LC 결과이다.

도 3은 내부표준 펩타이드의 질량값을 이용하여 확립한 LASVADVAAK 서열에 대한 내부표준 곡선이다.

도 4는 본 발명의 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법에 대한 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 (1) 정량하려는 표적 펩타이드의 아미노산 수가 n개 일 때, 상기 표적 펩타이드와 동일한 서열로 이루어지고, 안정동위원소로 치환된 아미노산 개수가 1개부터 n개 이하까지이며, 안정동위원소의 치환이 일정한 규칙성을 갖도록 내부표준 펩타이드를 합성하는 단계;

[0021] (2) 정량하려는 표적 펩타이드가 포함된 시료에, 상기 단계 (1)에서 합성한 내부표준 펩타이드를 첨가하되, 상기 내부표준 펩타이드의 첨가량이 치환된 안정동위원소의 개수에 연속적으로 일정한 비율로, 비례 또는 반비례하는 내부표준 펩타이드의 양을 첨가하여 혼합하는 단계;

[0022] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 상기 내부표준 펩타이드 및 표적 펩타이드를 포함하는 시료에 대한 LC(Liquid Chromatography)-MS(Mass Spectrometry) 또는 LC-MS/MS 분석을 수행하는 단계;

[0023] (4) 상기 단계 (3)에서 수행한 LC-MS 분석으로부터 획득한 표적 펩타이드의 피크 면적(peak area) 값; 및 서로 다른 양을 갖는 안정동위원소로 치환된 내부표준 펩타이드 각각의 피크 면적 값을 획득하는 단계;

[0024] (5) 상기 단계 (4)에서 획득한, 서로 다른 양을 갖는 내부표준 펩타이드의 면적 값으로부터 내부표준곡선(Internal Standard Curve, Calibration Curve) 식을 구하는 단계; 및

[0025] (6) 상기 단계 (5)에서 구한 내부표준곡선 식에, 상기 단계 (4)에서 획득한 표적 펩타이드의 면적값을 대입하여 정량하는 단계;를 포함하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 정량 방법에 관한 것이다(도 4).

[0026] 상기 안정동위원소는 ^{13}C 및 ^{15}N 중에서 선택된 하나 이상인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0027] 상기 단계 (2)에서, 상기 내부표준 펩타이드의 첨가량이 치환된 안정동위원소의 개수에 연속적으로 일정한 비율로, 비례 또는 반비례하는 내부표준 펩타이드의 양을 첨가하여 혼합량은 일례로, 안정동위원소가 1개 치환된 내부표준 펩타이드를 기준으로, 치환개수가 증가할 때마다, 10배, 100배, 1000배 또는 10000배 증가시키거나, 반대로, 10^{-1}배, 10^{-2}배, 10^{-3}배 또는 10^{-4}배 증가시킬 수 있으며, 이와 같은 방식으로, 증가시키는 배수는 일정 기준으로 증가 또는 감소시킨 양으로 혼합할 수 있다. 또한, 치환하는 위치는 양 말단을 기준으로 어느 한쪽을 기준으로 치환하는 것이 바람직하지만, 어느 위치를 기준으로 하더라도 무방하다(도 1).

[0028] 상기 표적 펩타이드의 개수는 1~4,000개 중에서 선택된 하나 이상이 것이 바람직하고, 상기 정량하려는 표적 펩타이드는 6~80개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0029] 상기 정량하려는 표적 펩타이드는 단백질분해효소(protease)를 처리하여, 내부 절단된 펩타이드를 포함하며, 상기 단백질분해효소(protease)는 트립신(trypsin), 키모트립신(Chymotrypsin), 펩신(Pepsin), LysC 또는 ArgC이지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명은 (1) 판별하려는 표적 펩타이드의 아미노산 수가 n개 일 때, 상기 표적 펩타이드와 동일한 서열로 이루어지고, 안정동위원소로 치환된 아미노산 개수가 1개부터 n개 이하까지이며, 안정동위원소의 치환이 일정한 규칙성을 갖도록 내부표준 펩타이드를 합성하는 단계;

[0031] (2) 판별하려는 표적 펩타이드가 포함된 시료에, 상기 단계 (1)에서 합성한 내부표준 펩타이드를 첨가하되, 상기 내부표준 펩타이드의 첨가량이 치환된 안정동위원소의 개수에 연속적으로 일정한 비율로, 비례 또는 반비례하는 내부표준 펩타이드의 양을 첨가하여 혼합하는 단계;

[0032] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 상기 내부표준 펩타이드 및 표적 펩타이드를 포함하는 시료에 대한 LC(Liquid Chromatography)-MS(Mass Spectrometry) 또는 LC-MS/MS 분석을 수행하는 단계;

[0033] (4) 상기 단계 (3)에서 수행한 LC-MS 분석으로부터 획득한 표적 펩타이드의 피크 면적(peak area) 값; 및 서로 다른 양을 갖는 안정동위원소로 치환된 내부표준 펩타이드 각각의 피크 면적 값을 획득하는 단계;

[0034] (5) 상기 단계 (4)에서 획득한, 서로 다른 양을 갖는 내부표준 펩타이드의 면적 값으로부터 내부표준곡선(Internal Standard Curve, Calibration Curve) 식을 구하는 단계; 및

[0035] (6) 상기 단계 (5)에서 구한 내부표준곡선 식에, 상기 단계 (4)에서 획득한 표적 펩타이드의 면적값을 대입하여 정량하는 단계;를 포함하는 안정동위원소가 표지된 내부 표준 펩타이드를 이용한 질량분석 기반의 표적 펩타이드의 판별 방법에 관한 것이다. 본 발명에서의 판별은 특정 혼합물 내에 표적 펩타이드가 포함되어 있는지 여부와 양적인 정도(정량값)를 판별하는 것을 의미한다.

[0036] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0037] **실시예 1. 정량하려는 표적 펩타이드 및 이와 동일한 서열로 이루어지고, 안정동위원소가 다중 표지된 내부 표준 펩타이드 합성**

[0038] 펩타이드 합성기를 이용하여 하기 표 1에 개시한 표적 펩타이드(LASVADVAAK)를 합성하였다. 불화산화과망상산염(Fmoc), tBoc 등의 화학물질을 이용하여 다양한 길이의 펩타이드를 합성하였다. 펩타이드 합성에서 사용되는 보호기(protecting group)를 제거한 다음 N-방향부터 합성을 시작하여 펩타이드 연쇄를 확장하고, 다른 보호기로 보호된 아미노산을 결합하였다. 이후, 반응물, 부산물, 보호기 및 기타 불순물을 제거하고 마지막 결합 반응 이후, Fmoc으로 보호되지 않은 마지막 아미노산을 산화하여 이황화결합을 형성하였다. 합성된 펩타이드를 resin에서 제거하고, 이 단계를 여러 번 반복하여, 원하는 길이의 펩타이드를 합성하였다.

표 1

[0039]

펩타이드 서열	주입 양	피크 면적 값
LASVADVAAK (표적 펩타이드)	Unknown	699822
LASVADVAA*K*	1 pmol	82
LASVADVA*AK*	10 pmol	936
LASVADV*AAK*	100 pmol	1847
LASVAD*VAAK*	1,000 pmol	8621
LASVA*DVAAK*	10,000 pmol (1 nmol)	99727
LASV*ADVAAK*	100,000 pmol (10 nmol)	869503
LAS*VADVAAK*	1,000,000 pmol (100 nmol)	1763243
LA*SVADVAAK*	10,000,000 pmol (1,000 nmol)	18209334

[0040] **실시예 2. 안정동위원소 다중표지 내부표준 펩타이드 디자인 및 합성**

[0041] 표적 펩타이드와 상보적인 안정동위원소로 표지된 합성 펩타이드는 아미노산의 ^{12}C와 ^{14}N을 각각 ^{13}C와 ^{15}N(Stable Isotope-labeled Standard, SIS)로 치환한 아미노산을 이용하여 내부표준 펩타이드를 합성하였다. 상기 표 1에서 안정동위원소는 밑줄 및 진하게 표시하였고, 혼합한 양을 안정동위원소가 치환된 개수가 1개 증가할 때마다 10배량이 되도록 혼합하였다.

[0042] 한편, 표 2에 개시한 바와 같이, 안정동위원소로 치환된 아미노산과 치환되지 않은 아미노산의 질량 값을 계산하였다. 이와 같이, 펩타이드 또는 단백질의 서열을 알고 있는 경우, 안정동위원소가 치환되는 정도에 따른 펩타이드의 질량값을 이론적으로 계산할 수 있으며, 이와 같은 계산값에 대비하여 질량분석 결과 획득되는 실험적 질량값으로부터 펩타이드 서열을 맵핑(특정)할 수 있다.

표 2

[0043] 안정동위원소 치환에 따른 질량 값의 차이

아미노산 종류	^{13}C 및 ^{15}N이 치환된 Monoisotopic 질량 값 차이	^{13}C이 치환된 Monoisotopic 질량 값 차이	^{15}N이 치환된 Monoisotopic 질량 값 차이 질량 값 차이
Alanine (Ala, A)	4.007099 Da	3.010065 Da	0.997035 Da
Cysteine (Cys, C)	4.007099 Da	3.010065 Da	0.997035 Da
Aspartic Acid (Asp, D)	5.010454 Da	4.013419 Da	0.997035 Da
Glutamic Acid (Glu, E)	6.013809 Da	5.016774 Da	0.997035 Da
Phenylalanine (Phe, F)	10.027228 Da	9.030194 Da	0.997035 Da
Glycine (Gly, G)	3.003745 Da	2.00671 Da	0.997035 Da
Histidine (His, H)	9.011234 Da	6.020129 Da	2.991105 Da
Isoleucine (Ile, I)	7.017164 Da	6.020129 Da	0.997035 Da
Lysine (Lys, K)	8.014199 Da	6.020129 Da	1.99407 Da
Leucine (Leu, L)	7.017164 Da	6.020129 Da	0.997035 Da
Methionine (Met, M)	6.013809 Da	5.016774 Da	0.997035 Da
Asparagine (Asn, N)	6.007489 Da	4.013419 Da	1.99407 Da
Proline (Pro, P)	6.013809 Da	5.016774 Da	0.997035 Da
Glutamine (Gln, Q)	7.010844 Da	5.016774 Da	1.99407 Da
Arginine (Arg, R)	10.008269 Da	6.020129 Da	3.98814 Da
Serine (Ser, S)	4.007099 Da	3.010065 Da	0.997035 Da
Threonine (Thr, T)	5.010454 Da	4.013419 Da	0.997035 Da
Valine (Val, V)	6.013809 Da	5.016774 Da	0.997035 Da
Tryptophan (Trp, W)	13.030973 Da	11.036903 Da	1.99407 Da
Tyrosine (Tyr, Y)	10.027228 Da	9.030194 Da	0.997035 Da

[0044] 본 실시예 1에서는 LASVADVAAK 서열에 대한 정량을 위하여, ^{13}C 및 ^{15}N이 치환된 아미노산 개수에 따라 연속적으로 서로 다른 양(농도)의 내부 표준 펩타이드를 합성한 후(안정동위원소가 치환된 아미노산은 밑줄로 표시함) 이들의 혼합물을 제조하였다.

[0045] 안정동위원소로 표지된 아미노산과 표지되지 않은 아미노산 사이에 Monoisotopic 질량 값 차이를 계산하였다. 펩타이드 질량값(MS1, Precursor ion) 및 조각난 펩타이드(MS2, Product ion)의 질량 값을 계산하였다.

[0046] 분석하고자 하는 표적 펩타이드가 들어있는 시료에 안정동위원소 다중표지 내부표준물질을 첨가하였다. 질량 값이 서로 다른 표적 펩타이드와 안정동위원소 표지 내부표준 물질을 LC-MS로 동시에 분석을 실시하였다.

[0047] 그 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 표적 펩타이드(1개)와 서로 다른 형태로 안정동위원소로 표지된 8개의 합성 펩타이드는 물리화학적인 성질이 동일하여 동일한 머무름 시간(retention time, RT)에서 동시에 검출되었다.

[0048] 표적 펩타이드의 분석값과 내부표준물질의 분석값을 각각 피크 면적(peak area) 값으로 산출한 다음, 서로 다른 양을 갖는 내부표준물질의 분석값을 이용하여 내부표준곡선(Internal Standard Curve, Calibration Curve) 식(1)을 확보하였다(도 3).

[0049] 표적 펩타이드의 분석 값(피크 면적)을 내부표준곡선 식에 대입하여 표적 펩타이드의 양(농도)을 최종 산출하였다.

[0050] 내부표준곡선 식(1)

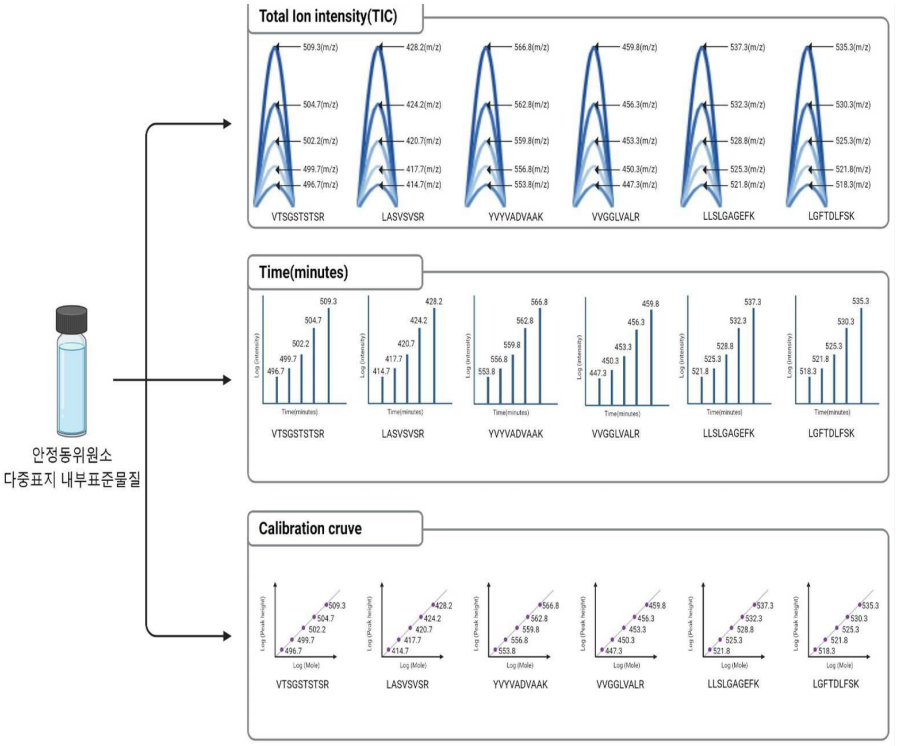
[0051] $y = 1.8094\ x + 106140$

[0052] 상기 식(1)에서, y는 피크 면적이고, x는 분석하고자 하는 시료(펩타이드)의 양(농도)이다.

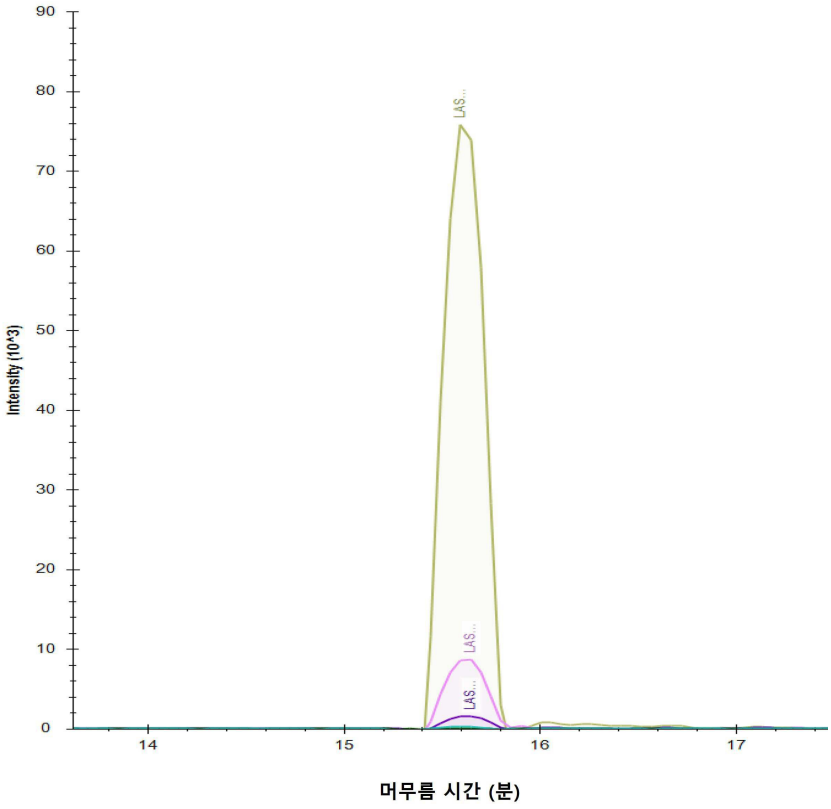
[0053] 따라서, 본 발명의 실시예에서 획득한 피크면적(699822)을 대입함으로써, 펩타이드의 양이 328,109.87 pmol인 것을 확인하였다.

도면

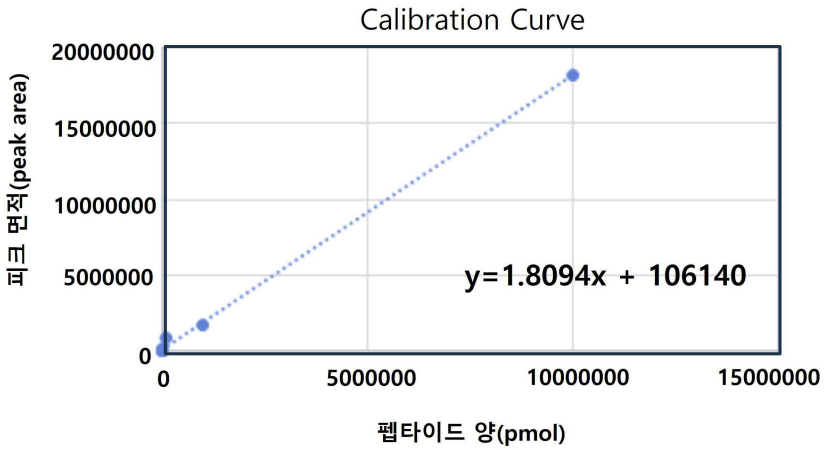
도면1


Total Ion intensity(TIC)
VTSGSTSTSR
LASVSVSR
YVYVADVAAK
VVGGLVALR
LLSLGAGEFK
LGFTDLFSK
Time(minutes)
VTSGSTSTSR
LASVSVSR
YVYVADVAAK
VVGGLVALR
LLSLGAGEFK
LGFTDLFSK
Calibration cruve
VTSGSTSTSR
LASVSVSR
YVYVADVAAK
VVGGLVALR
LLSLGAGEFK
LGFTDLFSK
안정동위원소
다중표지 내부표준물질

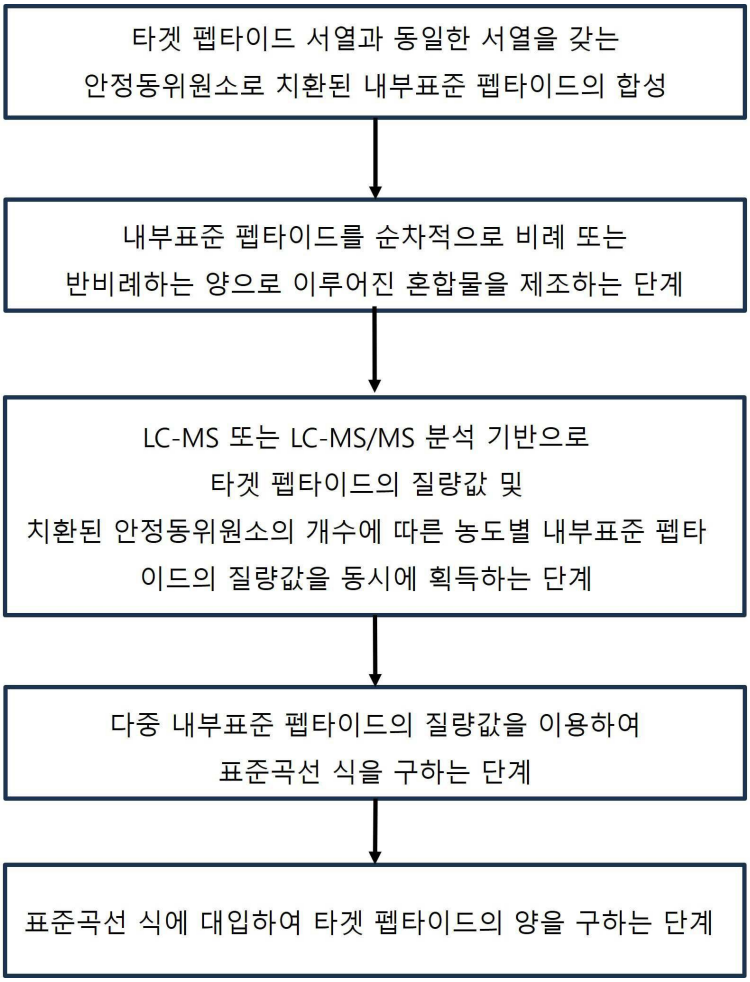
도면2


Intensity (10^3)
머무름 시간 (분)

도면3


Calibration Curve
20000000
15000000
10000000
5000000
0
피크 면적(peak area)
y=1.8094x + 106140
0
5000000
10000000
15000000
펩타이드 양(pmol)

도면4


타겟 펩타이드 서열과 동일한 서열을 갖는
안정동위원소로 치환된 내부표준 펩타이드의 합성
내부표준 펩타이드를 순차적으로 비례 또는
반비례하는 양으로 이루어진 혼합물을 제조하는 단계
LC-MS 또는 LC-MS/MS 분석 기반으로
타겟 펩타이드의 질량값 및
치환된 안정동위원소의 개수에 따른 농도별 내부표준 펩타
이드의 질량값을 동시에 획득하는 단계
다중 내부표준 펩타이드의 질량값을 이용하여
표준곡선 식을 구하는 단계
표준곡선 식에 대입하여 타겟 펩타이드의 양을 구하는 단계