



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년09월14일
(11) 등록번호 10-1063981
(24) 등록일자 2011년09월02일

(51) Int. Cl.

C07D 211/92 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0002440

(22) 출원일자 2009년01월12일

심사청구일자 2009년01월12일

(65) 공개번호 10-2010-0083072

(43) 공개일자 2010년07월21일

(56) 선행기술조사문헌

논문: J. Am. Chem. Soc.

논문: Macromolecules

논문: Biochemistry

논문: 학위논문

(73) 특허권자

서강대학교산학협력단

서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교

(72) 발명자

오한빈

경기도 고양시 일산서구 주엽동 15 문촌마을건영 11단지 1102-404

문봉진

서울특별시 관악구 신림동 1730 신림 푸르지오 아파트 105동 903호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 11 항

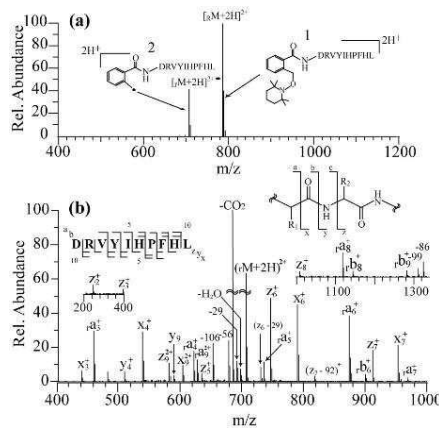
심사관 : 최원철

(54) 자유 라디칼 개시제 및 이를 이용한 펩타이드 서열의 동정방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 자유 라디칼 개시제 및 이를 이용한 펩타이드 서열의 동정방법에 관한 것이다. 종래의 디아조 또는 퍼옥시도 기능기를 도입한 전구체들과 비교할 때, 본 발명의 화합물을 기반으로 한 전구체는 열역학적으로 용이하게 라디칼종을 생성할 수 있으며, 더 광범위한 펩타이드 서열동정이 가능한 장점을 가지고 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드 서열 동정 방법은 이화화 결합이 존재하는 펩타이드의 서열을 동정할 수 있다는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강민혁

서울특별시 강남구 청담동 60 삼성청담공원아파트
104동 201호

이민희

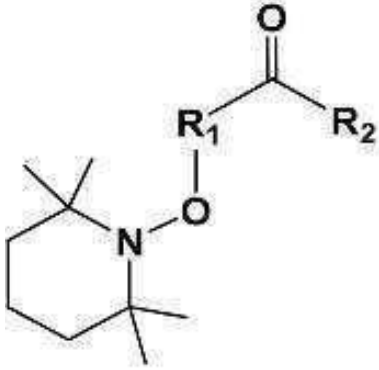
경기도 수원시 장안구 조원동 750-33

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

화학식 1



상기 화학식에서 R1은 직쇄 또는 분쇄의 C1-4 알킬로 치환되거나 비치환된 페닐이고, R2는 2,5-디옥소-1-피롤리디닐옥시, 2,5-디옥소-3-설포닐-1-피롤리디닐옥시, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페녹시, 4-설포-2,3,5,6-테트라플루오로페녹시 또는 아자이드이다.

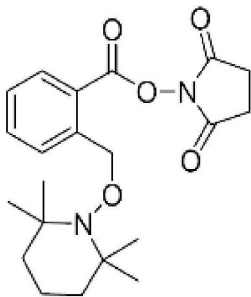
청구항 2

삭제

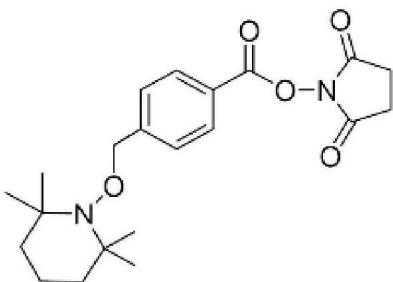
청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물:

화학식 2



화학식 3



청구항 4

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 화합물은 펩타이드 N-말단의 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 아민 그룹에 컨쥬게이션 되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 화합물은 펩타이드 서열 동정의 자유 라디칼 개시제로 사용되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 펩타이드 서열의 동정방법:

- (a) 상기 제 1 항 또는 제 3 항의 화합물을 펩타이드와 컨쥬게이션하는 단계;
- (b) 상기 컨쥬게이션된 펩타이드를 1차 충돌로 활성화시켜 최소한 하나의 자유 라디칼 종을 포함하는 분자 단편을 형성하는 단계;
- (c) 상기 분자 단편을 2차 충돌에 의해 해리(dissociation)하여 이온 단편을 형성하는 단계; 및
- (d) 상기 이온 단편의 질량을 분석하는 단계.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 화합물은 펩타이드 N-말단의 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 아민 그룹에 컨쥬게이션 되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 이온은 아미노산 가지 쇠의 단편화로부터 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 이온 단편은 a , b , c , x , y 및 z 타입으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 6 항에 있어서, 상기 방법은 가스 상(gas phase)에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 6 항에 있어서, 상기 단계 (b)-(d)는 질량분석기(mass spectrometer)에서 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 6 항에 있어서, 상기 펩타이드는 이황화 결합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 자유 라디칼 개시제 및 이를 이용한 펩타이드 서열의 동정방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 질량분석법은 프로테오믹스의 새로운 장을 여는데 가장 핵심적인 역할을 하였다. 단백질체의 확인 및 특성 조사는 단백질 분해 효소에 의해 잘려진 펩타이드의 기체상 시퀀싱(gas-phase sequencing)에 주로 의존한다. 펩타이드의 충돌활성분해(CAD)는 시퀀싱에 있어서 가장 널리 사용되는 방법이다. 최근 몇 년 사이 전자포획분해(electron capture dissociation, ECD) 및 전자전달분해(electron transfer dissociation, ETD)가 CAD의 대체적인 방법으로 많은 주목을 받았으며, 특히 일반적인 펩타이드 분석뿐만 아니라 단백질의 전사후 변형 (post-translational modification, PTM)의 특성을 분석하는 데에 유용하게 사용되었다.

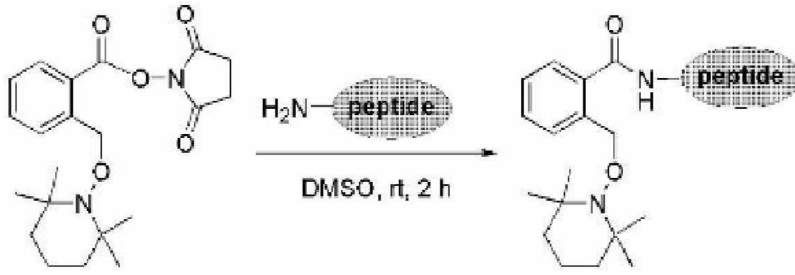
[0003] ECD에 의한 인젝트 단백질의 하향 분석은 PTM의 완전한 조사가 가능하다는 점에서 특히 매력적이다. ECD 및 ETD 모두 펩타이드 골격 분해를 위한 전구체로서 홀-전자 라디칼 양이온 펩타이드를 만든다는 공통점을 가지고 있다. ECD 및 ETD에서는 라디칼 펩타이드 중들이, 각각 분리된 전자 소스로부터 또는 음이온 종과의 충돌을 통해서 제공된 전자를 포획함으로써 형성된다. ECD/ETD에서는 펩타이드 골격의 절단 주 생성물들로서 c/z 이온들이 생성되며, a/x 이온들은 부 생산물로서 특징 지워진다. 반면에 b 및 y 이온들은 CAD를 포함한 충돌-기반의 분해 방법의 주 생산물이다.

[0004] 또 다른 라디칼 양이온 종의 생성 방법으로는 전이금속-펩타이드 콤플렉스의 충돌활성을 들 수 있다. 이 방법 또한 ECD/ETD-펩타이드 분해 경로와 유사하게 라디칼 종을 생성하며, 뒤따른 충돌활성은 a , c , x 및 z 이온을 만들어낸다. Laskin 등은 이 방법이 차지-리모트 단편화 경로를 따라 펩타이드 골격 분해가 일어남을 보고한 바 있다. (Anal.Chem.2007,79,6607) 생성된 라디칼 사이트는 펩타이드 백본의 수소 원자를 제거하며, 뒤이어 골격 절단이 일어난다. 이 방법은 ECD 및 ETD의 분해 경로와 비슷하게 홀-전자 분해경로를 따른다.

[0005] 라디칼 종을 도입하는 또 다른 방법은 펩타이드 자체에 자유 라디칼 개시제를 부착하는 것이다. Porter 등은 라이신 잔기의 N-말단 아민을 피옥시카바메이트로 바꾸었다. (J.Am.Chem.Soc.2004,126,720, Med.Chem.2006,14,6213, J.Am.Soc.Mass Spectrom.2007,18,807) 리튬, 소듐, 칼륨 또는 은 이온과 함께 착물형태로 존재하는 피옥시카바메이트 펩타이드는 충돌 활성에 의해 라디칼 종을 생성한다. 이 라디칼 종은 라디칼 개시제가 결합된 라이신 잔기의 손실에 의해 형성되는 것이다. 생성된 라디칼 종의 뒤따른 단편화에서는 b 이온들의 m/z 값이 변화하게 되는데, 이는 N-말단 잔기가 분해되는 위치가 달라짐에 따라 상응하는 b 이온의 m/z 값의 변화가 나타나는 것이다. 이러한 변화에 의해 라벨링된 b 이온은 SALSA 알고리즘을 이용하여 분석하는데, 이는 펩타이드의 드 노보 분석에 유용하다. 또한 Beauchamp 그룹도 펩타이드 및 단백질 구조 결정을 위한 방법으로 자유 라디칼 반응을 조사하였다. (J.Am.Chem.Soc. 2005,127,12436) 그들은 수용성 자유 라디칼 개시제인 Vazo 68을 펩타이드의 N-말단에 컨쥬게이션하였다. Vazo 68이 컨쥬게이션된 펩타이드는 MS/MS과정에 의해서 자유 라디칼 종들을 생성하는데, 이것은 아조 탄소의 분해에 의해 이루어진다. 이렇게 얻어진 라디칼 종들은 CAD에 의해 a 및 z 이온을 포함한 많은 단편 이온들을 생성하는데, 이는 홀-전자 라디칼에 의해 야기된 단편화 경로에 의한 것이다. 이러한 접근 방법을 자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱이라 명명한다(free radical initiated peptide sequencing, FRIPS).

[0006] 본 발명자들은 N-말단 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 N-말단 아민에 ‘지속 라디칼’ 전구체를 도입함으로써 FRIPS 방법을 확장시켰다. 도입된 지속 라디칼은 2, 2, 6, 6-테트라메틸피페리딘-1-옥실(2, 2, 6, 6-Tetramethylpiperidine-1-oxy1, TEMPO)이며, 이는 고분자 화학에서 자유 라디칼 개시제 뿐만 아니라 전자 스핀 공명 분광법에서 구조 프로브로서 널리 사용되는 안정한 라디칼이다(반응식 1).

[0007] 반응식 1



o-TEMPO-Bz-NHS (1)

o-TEMPO-Bz-conjugated peptide

[0008]

[0009]

디아조 또는 퍼옥시로 기능기를 도입한 전구체들과 비교할 때, TEMPO-기반의 전구체는 열역학적으로 용이하게 라디칼종을 생성할 수 있다. 게다가 라디칼 사이트의 위치를 벤질 고리의 원하는 부분에 TEMPO 그룹을 위치시키는 것으로 쉽게 지정할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010]

본 발명자들은 단백질체의 확인 및 특성 조사를 위한 펩타이드의 기체상 시퀀싱 방법 중 현재까지 개발된 자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱(free radical initiated peptide sequencing, FRIPS)을 확장시켜 N-말단 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 N-말단 아민에 TEMPO-기반의 전구체를 도입함으로써 종래의 전구체들보다 열역학적으로 용이하게 라디칼종을 생성할 수 있는 화합물을 합성(발견) 하였으며, 이를 통해 펩타이드의 서열을 동정할 수 있는 방법을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011]

따라서, 본 발명의 목적은 신규한 펩타이드 서열 동정의 자유 라디칼 개시제를 제공하는 데 있다.

[0012]

본 발명의 다른 목적은 신규한 자유 라디칼 개시제를 이용한 펩타이드 서열의 동정방법을 제공하는데 있다.

[0013]

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

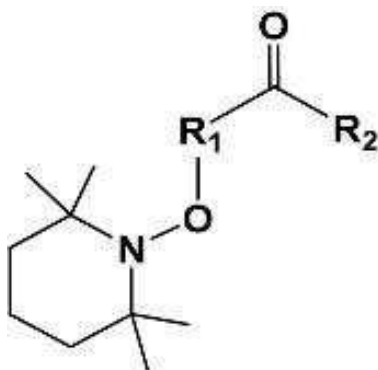
과제 해결수단

[0014]

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[0015]

화학식 1



[0016]

[0017]

상기 화학식에서 R₁은 직쇄 또는 분쇄의 C₁₋₁₀ 알킬, 비치환 또는 치환된 아릴, 비치환 또는 치환된

[0018]

헤테로 아릴 또는 4 내지 8개 멤버의 카보사이클 고리이고, R₂는 하이드록시석신이미드, 하이드록시 석신이미딜

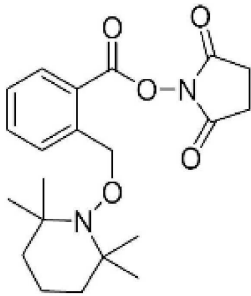
에스테르, 하이드록시 설펜-석신이미딜 에스테르, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페놀 에스테르, 4-설펜-2,3,5,6-테트라플루오로페놀 에스테르, 산무수화물, 아자이드, 아졸리드, 카보이마이드, 할라이드, 이미다졸 또는 이미데이트이다.

[0019] 본 발명자들은 단백질체의 확인 및 특성 조사를 위한 펩타이드의 기체상 시퀀싱 방법 중 현재까지 개발된 자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱(free radical initiated peptide sequencing, FRIPS)을 확장시켜 N-말단 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 N-말단 아민에 TEMPO-기반의 전구체를 도입함으로써 종래의 전구체들보다 열역학적으로 용이하게 라디칼종을 생성할 수 있는 화합물을 발견하였다. 또한, 이를 통해 다양한 펩타이드의 서열을 동정할 수 있는 방법을 발견하였다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어, “자유 라디칼 개시 펩타이드 시퀀싱(free radical initiated peptide sequencing, FRIPS)”은 기체상에서 펩타이드를 시퀀싱하는 방법으로, 일반적으로 다음 과정을 통해 펩타이드 서열을 동정한다: (a) 펩타이드 또는 단백질의 N-말단에 자유 라디칼 개시제를 컨쥬게이션 하고, (b) 컨쥬게이션된 펩타이드 또는 단백질은 질량분석기에 전기분무를 한 다음, (c) 1차 충돌을 통해 라디칼 종을 얻고, (d) 2차 충돌로 상기 라디칼 종을 해리하여 단편 이온들을 생성하여, 얻어진 단편 이온들을 일반적인 질량분석 기술을 통해 분석함으로써 펩타이드의 서열을 동정한다.

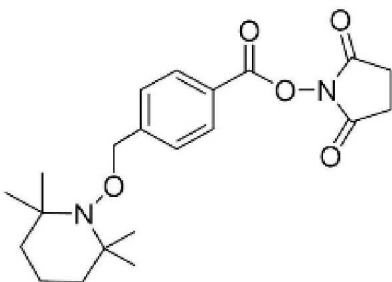
[0021] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 상기 R₁은 직쇄 또는 분쇄의 C₁₋₅ 알킬, 비치환된 아릴, 비치환된 헤테로 아릴 또는 4 내지 8개 멤버의 카보사이클 고리이고, R₂는 하이드록시석신이미드, 하이드록시 석신이미딜 에스테르, 하이드록시 설펜-석신이미딜 에스테르, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페놀 에스테르, 4-설펜-2,3,5,6-테트라플루오로페놀 에스테르, 산무수화물, 아자이드, 아졸리드, 카보이마이드, 할라이드, 이미다졸 또는 이미데이트이다. 가장 바람직하게는, 상기 화합물은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물이다:

[0022] **화학식 2**



[0023]

[0024] **화학식 3**



[0025]

[0026] 상기 화합물은 카르복실기에 결합되어 있는 R₂는 카르복실기를 활성화시키는 그룹이다.

[0027] 본 명세서에서 화합물을 언급하면서 사용되는 용어 “C₁-C₁₀ 알킬”은 탄소수 1-10의 직쇄 또는 분쇄 포화 탄화수 소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐 및 데실 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 명세서에서 용어 “아릴”은 전체적으로 또는 부분적으로 불포화된 치환 또는 비치환된 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄소 고리를 의미하며, 바람직하게는 모노아릴 또는 비아릴이다. 모노아릴은 탄소수 5-6을 갖는

것이 바람직하며, 비아틸은 탄소수 9-10을 갖는 것이 바람직하다. 모노아틸, 예컨대, 페닐이 치환되는 경우에는, 다양한 위치에서 다양한 치환체에 의해 치환이 이루어질 수 있으나, 바람직하게는, 할로, 히드록시, 니트로, 시아노, C₁-C₄ 치환 또는 비치환된 직쇄 또는 분쇄 알킬, C₁-C₄ 직쇄 또는 분쇄 알콕시, 알킬 치환 설페닐, 페녹시, C₃-C₆ 사이클로헥테로알킬 또는 치환 또는 비치환 아미노기에 의해 치환될 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 용어 “헤테로아틸”은 헤테로사이클릭 방향족기로서, 헤테로원자로 질소, 산소 또는 황 원자를 포함한다. 용어 “니트로”는 -NO₂를 의미하며, 용어 “할로겐”은 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 포함하는 것을 의미한다.

[0030] 본 명세서의 용어, “카보사이클”은 4 내지 8개의 탄소 원자로 이루어진 비방향족 고리형 탄화수소 라디칼을 의미하며, 5 내지 8개의 탄소 원자를 포함하는 고리는 구조내에 이중 결합을 포함하거나, 2개의 고리를 형성할 수 있다. 예컨대, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥테닐, 사이클로헥실 및 사이클로헵틸 등이 있으나 이에 한정되지는 아니한다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 화합물은 펩타이드 N-말단의 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 아민 그룹에 컨쥬게이션 되어 있다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 화합물은 펩타이드 서열 동정의 자유 라디칼 개시제로 사용된다.

[0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 펩타이드 서열의 동정방법을 제공한다. : (a) 상술한 본 발명의 화합물을 펩타이드와 컨쥬게이션 하는 단계; (b) 상기 컨쥬게이션된 펩타이드에 1차 충돌을 통해 자유 라디칼 종을 형성하는 단계; (c) 상기 라디칼 종을 2차 충돌을 통해 분해(dissociation)하여 단편 이온들을 형성하는 단계; 및 (d) 상기 단편 이온들의 질량을 분석하는 단계.

[0034] 본 발명에서 펩타이드 서열을 동정하기 위해서는 먼저 상기 화합물을 펩타이드와 컨쥬게이션 해야 한다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 화합물은 펩타이드 N-말단의 아미노 그룹 또는 라이신 잔기의 아민 그룹에 컨쥬게이션 되어 있다.

[0036] 펩타이드와 상기 화합물의 컨쥬게이션은 극성 유기 용매 하에서 실시하며, 바람직하게는 디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈, 디클로로메탄, 디메틸설폭시드, 디메틸아세트아미드, 테트라하이드로퓨란 하에서 실시하고, 더욱 바람직하게는 디메틸포름아미드, 디메틸설폭시드, 디메틸아세트아미드 하에서 실시하며, 가장 바람직하게는 디메틸설폭시드 용매 하에서 실시한다. 반응 온도는 상온에서 실시하며, 30분 내지 1시간 동안 반응시키는 것이 가장 바람직하다.

[0037] 이후, 상기 컨쥬게이션된 펩타이드를 1차 충돌을 통해 자유 라디칼 종을 형성한 다음, 상기 라디칼 종을 2차 충돌을 통해 분해(dissociation)하여 단편 이온들을 형성한다.

[0038] 이온화 과정은 분석 물질을 질량 분석기 내부로 주입하는데 필수적인 과정으로, 내부 에너지의 전달 조건이 이온화 과정에서 가장 중요한 요소이다. 중성 분자의 이온화는 전자의 방출, 전자의 포획, 수소이온의 흡착, 수소이온의 탈착 또는 이온의 탈착을 통해 이루어진다. 이온화 방법의 종류로는 전자 이온화법(electron ionization, EI), 화학 이온화법(chemical ionization, CI), 고속 원자 충격법(fast atom bombardment, FAB), 열분무법(thermospray), 전기분무법(electrospray, ESI), 대기압 화학 이온화법(atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 및 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화법(matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)이 있으며, 펩타이드의 서열 동정에 사용하는 분석법은 전자빔, 충돌활성분해법, 적외선 다광자 분해법, 및 자외선 레이저 조사법이다.

[0039] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 이온은 펩타이드의 주쇄 분해반응에 의해 형성된다.

[0040] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 이온 단편은 a, b, c, x, y 및 z 타입으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0041] 본 발명의 화합물이 컨쥬게이션된 펩타이드는 1차 충돌에 의해 자유 라디칼 펩타이드를 생성하는데, 이는 템포의 산소 및 벤질의 탄소 사이에 존재하는 결합의 분해에 의해 얻어진다. 즉, 벤질 라디칼이 가지 쇠의 H를 떼어내어 탄소 라디칼 펩타이드를 생성하게 된다. 이 라디칼 펩타이드가 α-탄소 및 카르보닐 탄소 사이의 결합을 끊게 되는 β-단편화(2차 충돌)가 일어나면, a 및 x 타입의 이온들을 생성하게 되며, 아미드 질소 및 α-탄

소 사이의 결합을 끊는 β -단편화의 경우 c 및 z 파편 이온들을 생성한다.

- [0042] 형성된 상기 이온 단편의 질량을 분석함으로써 미지의 펩타이드 서열을 동정할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 방법은 가스상(gas phase)에서 수행한다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 단계 (b) 내지 (d)는 질량분석기(mass spectrometer)에서 실시된다.
- [0045] 질량 분석기는 프로테오믹스에 많이 사용되는 화학적, 생물학적 실험기기로, 펩타이드와 같은 고분자 물질을 강한 전자빔, 충돌활성분해법, 적외선 다광자 분해법, 전자포획분해법, 전자전달분해법, 및 자외선 레이저 등으로 단편화시켜 각 이온 단편의 질량을 계산하여 고분자 물질을 동정한다. 질량분석기는 물질을 질량 대 전하의 비(m/z)로 측정한다. 질량분석기의 중요한 특징은 질량 분석 상한선(upper mass limit), 투과 효율(transmission) 및 분해능(resolution)으로, 질량분석 상한선은 결정될 수 있는 질량 대 전하의 비(m/z ratio)에서 가장 높은 값을 의미하고, 투과 효율은 이온원으로부터 검출기에 도달하는 이온의 비율을 의미하며, 분해능은 작은 분자량의 차이로도 두 이온을 서로 다른 신호로 구분할 수 있는 능력을 의미한다.
- [0046] 이온원이 다양한 것처럼 질량분석기의 종류 또한 다양한데, 그 종류로는 사중극자 분석기(quadrupole analyzer), 이온 트랩 질량분석기(quadrupole ion trap), 이중 초점 자기 섹터 질량분석기(double-focusing magnetic sector), 비행시간차 질량분석기(time-of-flight mass spectrometer, TOFMS) 및 푸리에 변환 이온 싸이클로트론 공명 질량분석기(Fourier transform-ion cyclotron resonance)가 있다.
- [0047] 이온이 질량분석기에 의해 분리되어 신호를 만들면 이온검출기에서 이를 확인할 수 있다. 이온 검출기의 종류로는 전자 증배관(electron multiplier), 페러데이 컵(Faraday cup), 어레이 검출기(array detector) 및 포톤 증배관(photon multiplier)이 있다.
- [0048] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 펩타이드는 이황화 결합을 포함한다.
- [0049] 이황화 결합은 두 개의 sistein 아미노산 사이에 생성되는 공유결합으로 이황화 결합이 포함되어 있는 펩타이드의 서열을 동정하는 경우, 일반적인 충돌활성분해법에서는 이황화 결합의 분해가 거의 발생하지 않기 때문에 펩타이드 서열의 분석이 어렵다. 그러나, 본 발명의 화합물을 이용한 펩타이드의 동정 방법은 이황화 결합이 분해됨으로써 펩타이드의 서열 분석이 가능하다.

효 과

- [0050] 본 발명의 특징 및 이점(advantages)를 요약하면 다음과 같다:
- [0051] (i) 본 발명은 신규한 자유 라디칼 개시제 및 이를 이용한 펩타이드 서열의 동정방법에 관한 것이다.
- [0052] (ii) 종래의 디아조 또는 퍼옥시도 기능을 도입한 전구체들과 비교할 때, 본 발명의 화합물을 기반으로 한 전구체는 열역학적으로 용이하게 라디칼종을 생성할 수 있으며, 더 광범위한 펩타이드 서열동정이 가능한 장점을 가지고 있다.
- [0053] (iii) 또한, 본 발명의 펩타이드 서열 동정 방법은 이황화 결합이 존재하는 펩타이드의 서열을 동정할 수 있다는 장점이 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0054] 이하, 도면을 참고한 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- [0055] **실시예**

[0056] 1. 실험 재료 및 실험 방법

[0057] 실험 재료

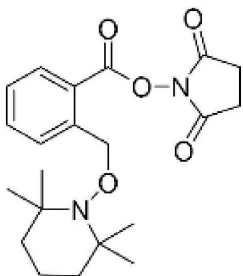
[0058] 상업적으로 구입한 모든 용매 및 시약은 더 이상의 정제 과정을 거치지 아니하고 사용하였다. 안지오텐신 I, 안지오텐신 II, 브래디키닌, 인터리킨 및 코르티스탄틴-14는 시그마-알드리치로부터 구입하여 사용하였다. 건조된 메틸렌 클로라이드는 칼슘 하이드라이드로부터 증류하여 얻었다. Merck 실리카 겔 60 F₂₅₄ 글라스 플레이트를 이용하여 분석 박층 크로마토그래피(TLC)를 수행하였으며, Merck 실리카 겔 60(70-230 메시)을 이용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

[0059] ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼은 Varian Gemini-300(¹H에 대해 300 MHz, ¹³C에 대해 75 MHz) 또는 Varian Inova-500(¹H에 대해 500 MHz, ¹³C에 대해 125 MHz)을 사용하여 얻었다. 화학적 이동(chemical shift)은 테트라메틸 실란 피크(δ 0.00) 또는 용매 피크(¹H NMR에서 CDCl₃에 대해 δ 7.26, ¹³C NMR에서 CDCl₃에 대해 δ 77.2)에 비례하여 결정하였다. IR 스펙트럼은 싱글-바운스 ATR(Ge crystal) 악세서리(Smart MIRacle)를 가진 Thermo-Nicolet Avatar-330 IR 분광기를 사용하여 얻었다. 고해상도 질량 스펙트럼은 4.7 Tesla IonSpec ESI-FTMS 또는 Micromass LCT ESI-TOF 질량 분석기를 사용하여 얻었다. 원소 분석은 서강대학교의 유기화학 연구센터에서 Carlo Erba EA 1180 원소 분석기를 사용하여 수행하였다.

[0060] 실험 방법

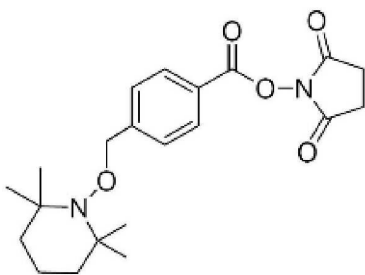
[0061] 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 새로운 라디칼 개시제들을 (Free radical initiator) 포함한 화합물을 이용하였다. 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물은 각각 벤젠고리의 오쏘 및 파라 위치에 TEMPO 그룹이 부착된 형태의 화합물이다. 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물은 본 발명자들이 직접 합성하였으며, 화학식 1로 표시되는 화합물은 2-(2, 2, 6, 6-테트라메틸피페리딘-1-일 옥시메틸)-벤조산 2, 5-디옥소파이롤리딘-1-일 에스테리이고, 화학식 2로 표시되는 화합물은 4-(2, 2, 6, 6-테트라메틸피페리딘-1-일 옥시메틸)-벤조산 2, 5-디옥소파이롤리딘-1-일 에스테리이다. 이 화합물을 DMSO 용매 하에서 상온에서 40분 동안 시퀀싱을 하고자 하는 펩타이드와 반응시켜 TEMPO가 포함된 화합물을 펩타이드의 N-말단 아미노 그룹에 부착하였다.

[0062] 화학식 1



[0063]

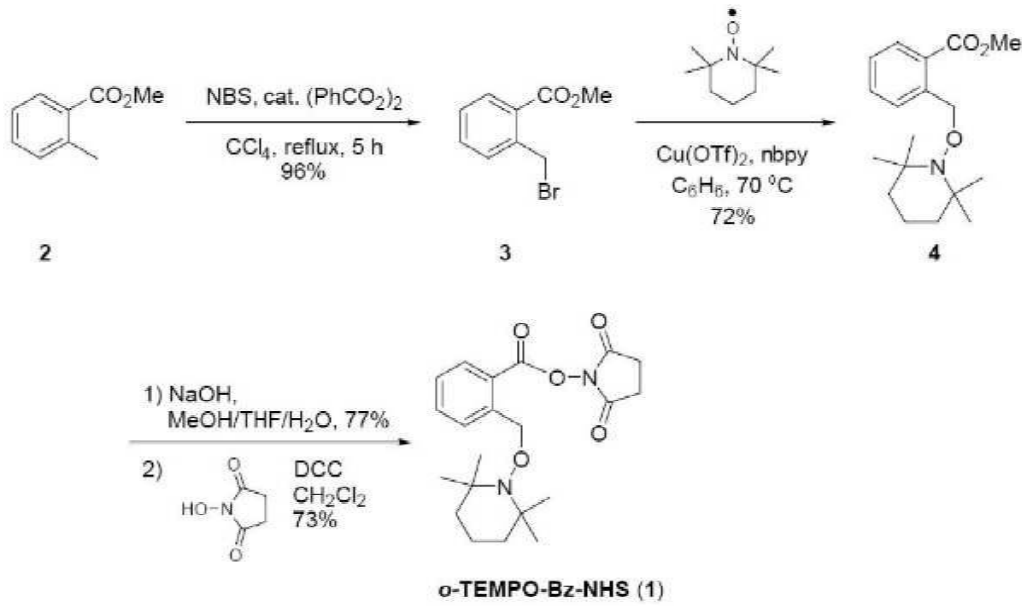
[0064] 화학식 2



[0065]

[0066] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 화학식 2로 표시되는 화합물이 부착된 펩타이드의 합성경로는 하기 반응식 2와 같으며, 각각에 대한 상세한 합성 과정은 다음과 같다:

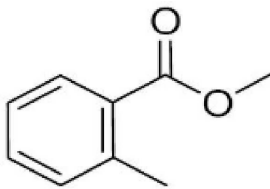
[0067] 반응식 2



[0068]

[0069] 2-메틸벤조산 메틸에스테르의 제조

[0070] 화학식 3

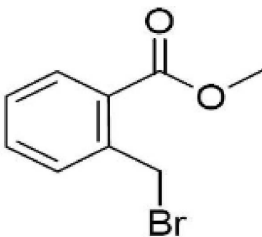


[0071]

[0072] 오쏘-메틸 벤조산(500 mg, 3.67 mmol), 디메틸 설페이트(Me_2SO , 695 mg, 5.51 mmol) 및 K_2CO_3 (558 mg, 4.04 mmol)을 둥근바닥 플라스크에 넣고 10 ml의 아세톤으로 희석하였다. 상기 혼합물을 아르곤 가스를 이용하여 5 분 동안 불순물을 제거한 다음 2시간 동안 가온 환류하였다. 반응 혼합물을 식힌 후 아세톤을 제거하기 위해 감압 상태에서 농축시켰다. 농축된 반응 물질에 물을 첨가한 다음 용액을 3x 에틸 아세테이트로 추출하였다. 추출물을 염수로 세척한 다음 무수 MgSO_4 로 건조하고, 여과한 후 진공 상태에서 농축하였다. 반응 생성물은 실리카겔 상에서 속성 크로마토그래피에 의해 정제하여(헥산:에틸아세테이트=9:1) 75%의 수율로 흰색 고체의 2-메틸벤조산 메틸에스테르 415 mg을 수득하였다(화학식 3): $R_f = 0.5$ (헥산:에틸아세테이트= 9:1); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.91(dd, $J = 8.4$ 및 1.8 Hz, 1H), 7.40(td, $J = 7.5$ 및 1.5 Hz, 1H), 7.24(m, 2H), 3.89(s, 3H), 2.60(s, 3H).

[0073] 2-(브로모메틸)벤조산 메틸에스테르의 제조

[0074] 화학식 4



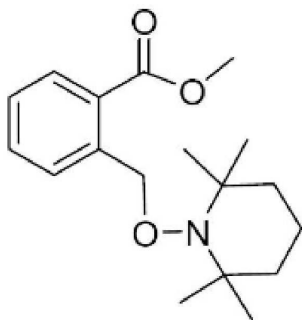
[0075]

[0076] 2-메틸벤조익 액시드 메틸에스테르(582 mg, 3.88 mmol), N-브로모숙신이미드(NBS)(759 mg, 4.26 mmol) 및 벤조 일 퍼옥사이드(13 mg, 0.04 mmol)를 10 ml의 CCl_4 에서 5시간 동안 교반하면서 환류하였다. 상온까지 식힌 다

음 반응 혼합물을 3x의 CH₂Cl₂로 추출하였다. 추출물을 염수로 세척한 다음 무수 MgSO₄로 건조하고, 여과한 후 진공 상태에서 농축하였다. 반응 생성물은 실리카겔 상에서 속성 크로마토그래피에 의해 정제하여(헥산:에틸아세테이트=9:1) 96%의 수율로 흰색 고체의 2-(브로모메틸)벤조익 액시드 메틸에스테르 850 mg을 수득하였다(화학식 4): R_f = 0.6(헥산:에틸아세테이트= 9:1); ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 7.97(d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.48(m, 2H), 7.38(td, J = 7.8 및 1.2 Hz, 1H), 4.96(s, 2H), 3.95(s, 3H). [lit.₂ δ 7.97(m, 1H), 7.40(m, 3H), 4.96(s, 2H), 3.95(s, 3H)].

[0077] 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조익 액시드 메틸에스테르의 제조

[0078] 화학식 5



[0079]

[0080] 2-(브로모메틸)벤조산 메틸에스테르(922 mg, 4.33 mmol), TEMPO(825 mg, 5.28 mmol), Cu(OTf)₂(157 mg, 0.433 mmol), 구리 파우더(275 mg, 4.33 mmol), 4,4'-디노닐-2,2'-디피리딜(Nbpy, 708 mg, 1.73 mmol) 및 10 ml의 벤젠을 슈렌크 플라스크(Schlenk flask)에 첨가하였다. 반응 혼합물은 5분 동안 아르곤을 버블링하여 가스를 제거하였으며, 70℃에서 12시간 동안 열을 가하였다. 반응 혼합물을 상온이 될 때까지 식한 다음, 에틸아세테이트를 사용하여 실리카겔의 짧은 패드를 통해 여과하였다. 여과물은 진공 상태에서 농축하였으며 남은 물질은 9:1의 비율로 혼합된 헥산:에틸아세테이트를 사용하여 속성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 흰색 고체의 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산 메틸에스테르는 72%의 수율로 946 mg을 수득하였다(화학식 5): 녹는점 65℃; R_f = 0.7 (헥산:에틸아세테이트 = 9:1); ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 7.92(d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.79(d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.54(t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.31(t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.21(s, 2H), 3.89(s, 3H), 1.49(br s, 4H), 1.37(br s, 1H), 1.32(br s, 1H), 1.18(s, 12H); ¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃) 167.79, 141.21, 132.34, 130.42, 127.79, 127.36, 126.54, 76.69, 60.10, 52.16, 39.89, 33.09, 20.62, 17.34. IR (neat): 2928 (w), 1712 (s), 1467 (w), 1429 (w), 1359 (w), 1271 (s), 1199 (w), 1139 (m), 1089 (w), 1034 (s), 952 (w), 820 (w), 740 (s) cm⁻¹ Anal. Calcd for C₂₁H₂₈N₂O₅: C, 70.79; H, 8.91; N, 4.59, Found; C, 70.87; H, 8.91; N, 4.49.

[0081] 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 에스테르(o-TEMPO-Bz-NHS)의 제조

[0082] 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 에스테르(946 mg, 3.1 mmol)을 1:1의 THF/메탄올에 희석하였다. 희석한 용액에 상온에서 25%의 NaOH 수용액을 첨가하였다. 24시간 후에 10%의 HCl을 첨가하여 산성 반응을 시키고 3x의 CH₂Cl₂로 추출하였다. 추출물을 염수로 세척한 다음 무수 MgSO₄로 건조하고, 여과한 후 진공 상태에서 농축하였다. 반응 생성물은 속성 크로마토그래피에 의해 정제하여(헥산:에틸아세테이트=1:1) 77%의 수율로 흰색 고체의 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산 697 mg을 수득하였다: R_f = 0.6(헥산:에틸아세테이트=1:1); ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 8.01(d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.59(d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.53(t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.39(t, J = 7.5 Hz, 1H), 5.27(s, 2H), 1.69-1.46(br m, 6H), 1.22(s, 12 H). 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산(697 mg, 2.39 mmol)

및 N-하이드록시숙신이미드(330 mg, 2.87 mmol)을 아르곤 기체 하에서 10 ml의 건조된 CH₂Cl₂에 용해하였다. 여기에 N,N'-디사이클로헥실카보디이미드(DCC)(592 mg, 2.87 mmol) 용액을 0°C에서 천천히 첨가하였다. 10시간 동안 교반한 다음 반응 혼합물은 CH₂Cl₂를 사용하여 실리카겔의 짧은 패드를 통해 여과하였으며, 여과물을 농축하여 생성물을 수득하였다. 생성물의 정제는 실리카겔에서 컬럼 크로마토그래피에 의해 수행하였으며(헥산:에틸아세테이트=2:1), 그 결과 73%의 수율로 흰색 고체의 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 에스테르 680 mg을 수득하였다(화학식 1): 녹는점=145°C; R_f=0.5(헥산:에틸아세테이트=2:1); ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 8.17(d, J=7.8 Hz, 1H), 7.92(d, J=7.8 Hz, 1H), 7.68(t, J=7.8 Hz, 1H), 7.38(t, J=7.5 Hz, 1H), 5.22(s, 2H), 2.90(s, 4H), 1.48(br s, 4H), 1.36(br s, 1H), 1.32(br s, 1H), 1.19(s, 6H), 1.17(s, 6H); ¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃) 169.48, 161.45, 143.56, 134.61, 131.29, 127.39, 126.78, 121.73, 76.07, 60.14, 39.86, 33.07, 25.86, 20.64, 17.29; IR(neat): 2932(w), 1767(m), 1741(s), 1468(w), 1375(w), 1229(m), 1207(s), 1132(w), 1071(m), 983(S), 843(w), 737(s), 647(m) cm⁻¹ Anal. Calcd for C₂₁H₂₈N₂O₅: C, 64.93; H, 7.27; N, 7.21, Found; C, 64.95; H, 7.15; N, 7.10.

[0083] 펩타이드 유도체의 제조 방법

[0084] 본 실시예에서 사용된 안지오텐신 I, 안지오텐신 II, 브래디키닌, 인테리킨 및 코르티스탄틴-14 등의 펩타이드는 Sigma로부터 구입하여 사용하였다. 먼저 상기에에서 준비된 2-(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일옥시메틸)-벤조산 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 에스테르(o-TEMPO-Bz-NHS)를 DMSO에 녹인 용액 (10 mM, 100 μL)과 콘쥬게이션 시키고자 하는 펩타이드를 DMSO에 녹인 용액 (1 mM, 100 μL)을 섞은 후 상온에서 2시간 이상 섞어준다. 그 이후에 용매를 진공을 걸어주어 제거하고 남은 펩타이드 유도체를 30 μM 농도가 되도록 메탄올:물:아세트산 (49:49:2 부피비)으로 희석하여 주었다.

[0085] 상기 방법으로 준비된 펩타이드 유도체를 30 μM 농도로 49:49:2의 부피 비를 갖는 물:메탄올:아세트산 용액에 녹였다. 이 혼합 용액을 직접 주사방식을 통해(direct infusion) 전기 분무(electrospray)하였다. 직접 주사는 실린지 펌프를 이용하여 분당 3 μl의 속도로 실시하였다. 모든 실험은 이온트랩 질량분석기(LCQ, Thermo, USA)를 이용하여 수행하였다. 샘플을 주입할 때 질량분석기의 실험조건은 다음과 같다; 스프레이 전압 5.0-5.5 kV, 모세관 온도 140°C, 튜브 렌즈 오프셋 전압 0 kV. 충돌활성분해법(CAD)을 이용한 MS/MS 및 MS³ 분석은 질량분석기의 'Advanced scan function' 을 통해 실시하였다. 샘플을 주입하고 질량선택과정을 통해 원하는 이온만을 고립(isolation)시킨 후, 헬륨 기체와 충돌하도록 하였다. 고립시키는 이온의 질량범위는 ±5-7 Da으로 하였고, 충돌에너지는 18-20%로 하였다. 총 2회의 충돌활성분해법을 수행하여 펩타이드를 단편화하였다. 1차 충돌을 통해서 라디칼 개시제를 분해시켜 홀-전자 상태 라디칼 펩타이드로 활성화시키고, 이 라디칼 펩타이드 이온을 다시 한 번 진공 중에서 선택적으로 고립시킨 다음 2차 충돌에 의해 펩타이드의 골격(backbone)을 단편화 하였다.

[0086] 실험 결과

[0087] 템포-컨쥬게이트-안지오텐신 I 펩타이드 양이온

[0088] 도 1은 TEMPO-컨쥬게이트 펩타이드의 텐덤 질량 분석기의 결과의 대표적인 예로써 오쏘-TEMPO-안지오텐신 I 2+ 컨쥬게이트 펩타이드의 MS/MS 및 MS³ 질량분석 스펙트럼을 보여준다. 도 1a에 나타난 것과 같이 오쏘-TEMPO-안지오텐신 I이 MS/MS에 의해 분해될 때, 가장 큰 절편으로써 오쏘-TEMPO가 떨어져 나간(156 Da의 손실) 벤질-컨쥬게이트 자유 라디칼 펩타이드가 생성되었다(도 1a). 이 라디칼과 더불어 열역학적으로 매우 안정한 '지속 라디칼(persistent radical)' 인 TEMPO 라디칼이 함께 생성되었다. 생성된 자유 라디칼 펩타이드에 대해 85%가 분해 되게 하는 충돌에너지에 해당하는 CAD(collisional activation dissociation), 즉, MS³를 가하였고, 이때 얻어진 질량스펙트럼이 도 1b이다.

[0089] 도 1b에 나타난 파편이온들을 분석한 결과, 많은 a, b, x, y 및 z 타입의 이온들이 생성됨을 확인하였다. 일반적으로 펩타이드의 파편 이온들은 펩타이드 골격에서 잘라지는 부분에 따라 명명되어진다. 이온들의 아래 첨자에 쓰여진 숫자들은 a, b 및 c 이온들의 경우 N-말단으로부터의 아미노산 서열순서를 의미하며, x, y 및 z

이온들의 경우 C-말단으로부터의 아미노산 서열순서를 의미한다(도 2). 이들 파편이온들의 질량 값을 분석한 결과, 인셋(inset)의 시퀀스 맵에 표현된 것과 같이 안지오펜신 I의 골격 중 많은 부분들이 잘라져 나가 드 노보 시퀀싱이 가능함 알 수 있었다. *a*, *c*, *x* 및 *z* 이온들은 라디칼이 중간체로 생성되는 ECD/ETD 등의 이온분해법에서 주로 생성되는 파편이온들이고, *b* 및 *y* 이온들은 내부에너지 증가를 이용해 펩타이드의 골격을 자르는 CAD 등에서 주로 생성되는 파편이온이다. 도 1b에서 보는 바와 같이 *a*, *x* 및 *z* 파편이온들이 주된 파편이온들이라는 점은 오쏘-TEMPO-퀸주게이트 펩타이드의 MS/MS의 결과로써 생성된 이온이 라디칼 이온이라는 것을 의미하며, 본 실험결과에서 나온 주된 이온타입 결과는 Beauchamp 그룹의 Vazo 68-퀸주게이트 펩타이드의 MS³ 결과와도 일치한다.

[0090] 또한, 이들 파편이온들의 이온타입을 살펴보면 *b*-이온은 r_b^+ , r_b^+ , r_b^+ , 총 3개의 단편들이 생성되었음을 알 수 있다. 이 파편이온의 경우 벤질 라디칼이 α -탄소의 수소를 떼어내어 α -탄소 라디칼이 생성되고, 카르보닐 탄소 및 아미드 질소사이의 결합이 끊어져 *b* 및 *y* 타입의 파편이온이 생성되었다.(도3)

[0091] **다른 TEMPO-퀸주게이트 펩타이드 양이온**

[0092] 안지오펜신 I 이외의 다른 펩타이드의 경우에도 위와 동일한 결과를 나타내는지 확인해 보기 위해 몇 가지 펩타이드를 선택하여 그 결과를 분석해 보았다. 도 4는 오쏘-TEMPO-안지오펜신 II 2+퀸주게이트 펩타이드, 도 5 오쏘-TEMPO-브라디키닌 2+퀸주게이트 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 보여준다. 도 4 및 도 5에 나타난 파편이온들을 분석한 결과, 안지오펜신 I과 같이 많은 *a*, *b*, *x*, *y* 및 *z* 타입의 이온들이 생성됨을 확인되었다. 안지오펜신 II는 *a*₃, *a*₄, *a*₅, *a*₆, *a*₇, *b*₆, *X*₃, *X*₄, *X*₅, *Y*₂, *Y*₃, *Z*₃, *Z*₄ 및 *z*₅의 총 14개 단편들로 분해되었고, 아미노산의 잔기가 분해되어 -56(Leu), -106(Tyr), -86 및 -99(Arg)의 손실이 관찰되었다. 브라디키닌은 *a*₁, *a*₂, *a*₃, *a*₅ 및 *z*₆의 총 19개 단편들로 분해되었고, 아미노산 잔기가 분해되어 -16, -30(Ser), -72, -86 및 -99(Arg)의 손실이 관찰되었다. 이는 도 1을 통해 보았던 오쏘-TEMPO-안지오펜신 I 2+퀸주게이트 펩타이드 분석결과와 동일한 패턴을 갖는 결과임을 알 수 있었다.

[0093] 한편, 펩타이드의 N말단에 결합되는 TEMPO는 아미노산 라이신의 잔기에 존재하는 아민기에도 결합할 수 있다. 따라서 라이신을 포함하는 펩타이드의 경우에도 시퀀스 분석이 가능한지를 확인하기 위해 몇 가지 펩타이드를 추가로 분석해 보았다. 선택한 3가지 펩타이드와 각각의 시퀀스는 서브스탄스 P(RPKPQQFFGLM), 인터리킨(VQGEESNDK), FRAG 펩타이드(DYKDDDDK)이다. 서브스탄스 P는 시퀀스 중간에 하나의 라이신을 포함하는 펩타이드이고, 인터리킨은 말단에 라이신을 포함하는 펩타이드로서 트립신 분해에 의해 생성될 수 있는 시퀀스 구조이다. FRAG 펩타이드는 시퀀스의 말단 및 중간에 각 2개의 라이신을 포함하는 펩타이드이다. 도 6은 오쏘-TEMPO-서브스탄스 P 2+퀸주게이트 펩타이드, 도 7는 오쏘-TEMPO-인터리킨 2+퀸주게이트 펩타이드, 도 8는 오쏘-TEMPO-FRAG 펩타이드 2+퀸주게이트 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

[0094] 각각의 펩타이드를 분석한 결과, TEMPO는 펩타이드 말단과 라이신 말단에 모두 결합가능하다는 것을 실험적으로 확인할 수 있었다. 시퀀스 분석을 위해서 하나의 TEMPO만 결합된 펩타이드를 질량분석기 내에서 고립시켜 MS³ 질량분석 스펙트럼을 얻었다. 분석 결과, 고립시킨 라디칼 분자에는 TEMPO가 펩타이드 말단에 결합된 것과 라이신 말단에 결합된 것이 함께 존재함을 확인할 수 있었다. 펩타이드의 시퀀스 분석 결과는 도 6, 도 7 및 도 8에 나타난 바와 같다.

[0095] **동중 류신 및 이소류신 아미노산 잔기들+ 오쏘-TEMPO 및 파라-TEMPO-퀸주게이트 펩타이드 양성자의 차이**

[0096] 오쏘-TEMPO-펩타이드의 MS³ 단편화 메커니즘을 도 3과 같다고 볼 수 있는 가장 큰 요인은 결합에너지 차이에 의한 것으로 볼 수 있다. 홀 전자를 갖는 라디칼 분자의 경우 분자내의 H의 이동이 발생하게 된다. 펩타이드의 경우 α 및 β 위치의 H중에서 상대적으로 결합 에너지가 작은 β 위치의 H의 이동이 쉽게 일어나 도 3과 같은 β -단편화가 주된 메커니즘으로 작용하게 된다. β 위치 뿐 아니라 아미노산 잔기에 메틸기가 존재하는 경우, 잔기가 분해되는 반응이 일어난다. 앞에서 제시한 펩타이드들의 분석결과를 보면 류신, 이소류신, 아르기닌 및 라이신 등의 아미노산의 잔기 분해반응은 주된 분해 반응중 하나임을 알 수 있다.

[0097] 특히, 류신 및 이소류신의 잔기 분해반응이 일어남은 펩타이드 시퀀스 분석에 있어서 특별한 효과를 제공한다. 아미노산들 중에서 류신 및 이소류신은 구조이성질체관계이다. 즉, 분자식은 같지만 잔기의 분자구조가 다른 분자이다. 분자식이 같은 류신 및 이소류신은 같은 질량을 가지므로 질량분석기를 이용하여 펩타이드 시퀀스를 분석할 경우 두 아미노산의 구분이 불가능하다. 이때 류신 및 이소류신의 잔기 분해반응이 일어난다면, 구조적 차이로 인해 서로 다른 분해물을 생성하여 두 아미노산의 구별이 가능해진다. 도 1의 (z_6-29) 피크를 통해 안지오텐신 I의 5번째 아미노산이 이소류신임을 알 수 있는데, $-29Da$ 는 이소류신에서만 생성될 수 있는 분해물($-CH_2CH_3$)의 질량 값이기 때문이다.

[0098] 본 발명자들이 앞서 실험한 TEMPO는 펩타이드의 말단에 컨쥬게이션 된 벤조산의 오쏘 위치에 라디칼을 형성한다. 펩타이드의 단편화 과정에 있어서 라디칼의 입체적 요인이 미치는 영향을 알아보기 위하여 *para*-TEMPO-안지오텐신 I 을 분석해 보았다. 오쏘-TEMPO의 경우 라디칼이 벤젠 링의 오쏘 위치에 생성되고, *para*-TEMPO의 경우 라디칼이 벤젠 링의 *para* 위치에 생성된다. 오쏘-TEMPO 및 *para*-TEMPO의 결과를 비교해보기 위한 거울상의 그래프를 도 9와 같이 나타내었다. 실험 결과, 오쏘, *para*의 경우 생성되는 각각의 단편 이온들의 종류에 약간의 차이가 있긴 했지만, 구조적 요인에 의한 특별한 차이라고 볼 수 있는 결과는 존재하지 않았다.

[0099] **TEMPO FRIPS MS에서 이황화 결합의 절단**

[0100] 두 시스테인 아미노산 사이에 생성되는 이황화 결합이 존재하는 펩타이드의 분석을 관찰하기 위하여 TEMPO-코르티스탄틴을 MS³하여 질량분석 스펙트럼을 얻었다(도 10). 이황화 결합의 분해는 다른 MSⁿ 방법에서는 드물게 일어나는데, TEMPO FRIPS의 경우 펩타이드의 주쇄 분해뿐만 아니라 이황화 결합의 분해도 일어남을 관찰 할 수 있었다.

[0101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술 하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1에서 (a)는 *o*-TEMPO-Bz이 컨쥬게이션된 안지오텐신 1 2+ 양이온의 CAD MS/MS 스펙트럼을 나타낸 것이며, (b)는 *o*-TEMPO-Bz이 컨쥬게이션된 안지오텐신 1 2+ 양이온의 MS³ 스펙트럼을 나타낸 것이다. 단편 이온 타입의 왼쪽 아래첨자 'r', 예컨대 r_{a3+} 은 라디칼 부분 $CH_2C_6H_4CO-$ 가 이온에 부착되어 있음을 의미한다.

[0103] 도 2는 펩타이드가 단편화되는 경우 펩타이드 골격에서 잘라지는 부분에 따른 파편 이온들의 명칭을 나타낸다.

[0104] 도 3은 FRIP을 통해 생성된 *a*, *b*, *c*, *x*, *y* 및 *z* 파편 이온들의 생성 기작을 나타낸다.

[0105] 도 4는 *o*-TEMPO-안지오텐신 II 2+ 컨쥬게이션 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

[0106] 도 5는 *o*-TEMPO-브래디키닌 2+ 컨쥬게이션 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

[0107] 도 6는 *o*-TEMPO-서브스탄스 P 2+ 컨쥬게이션 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

[0108] 도 7는 *o*-TEMPO-인터리킨 2+ 컨쥬게이션 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

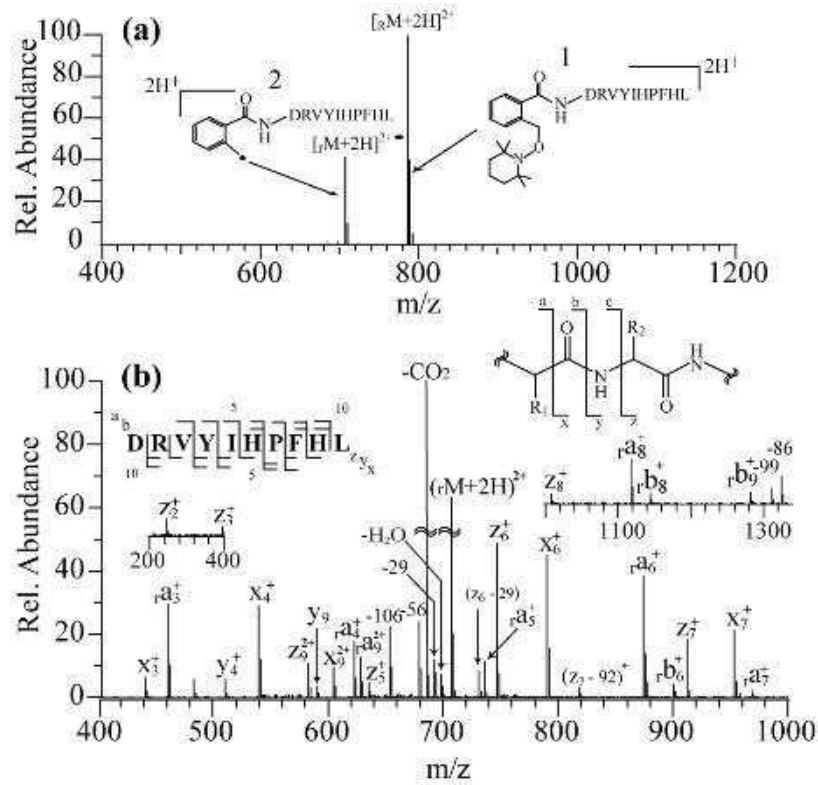
[0109] 도 8는 *o*-TEMPO-FRAG 펩타이드 2+ 컨쥬게이션 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

[0110] 도 9는 *o*-TEMPO-안지오텐신 I 및 *p*-TEMPO-안지오텐신 I의 MS³ 질량분석 스펙트럼 결과 그래프를 거울상으로 나타낸 것이다.

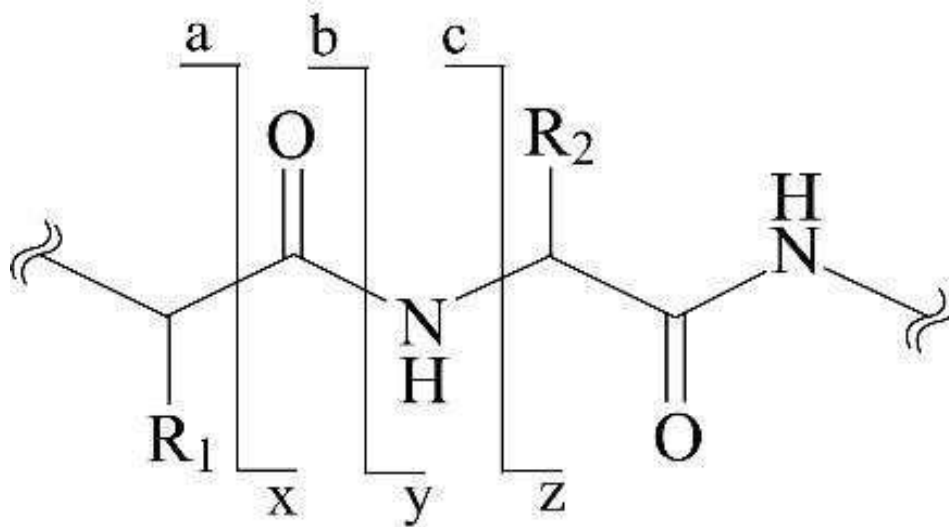
[0111] 도 10은 이황화 결합이 포함되어 있는 *o*-TEMPO-코르티스탄틴 2+ 컨쥬게이션 펩타이드의 MS³ 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

도면

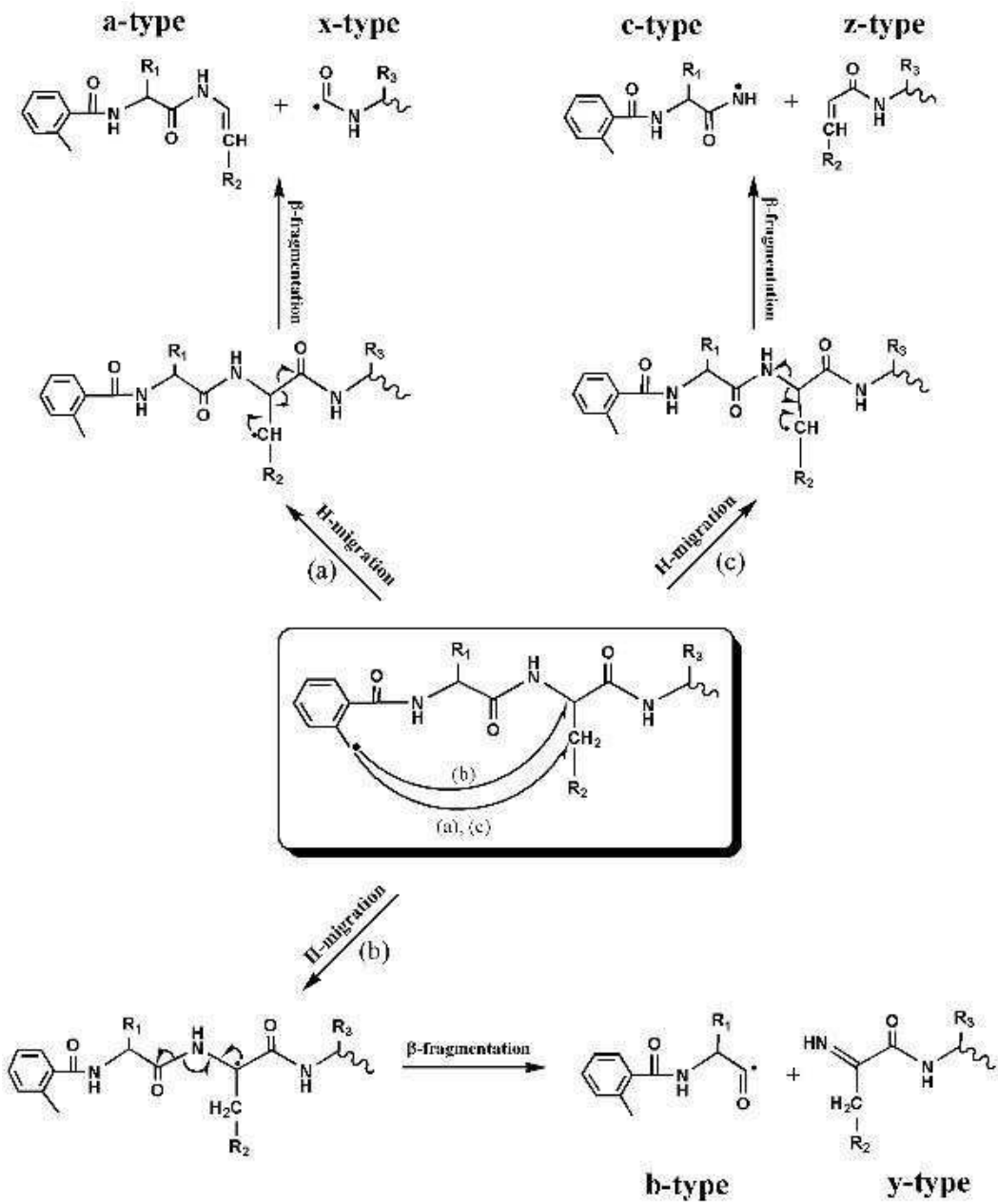
도면1



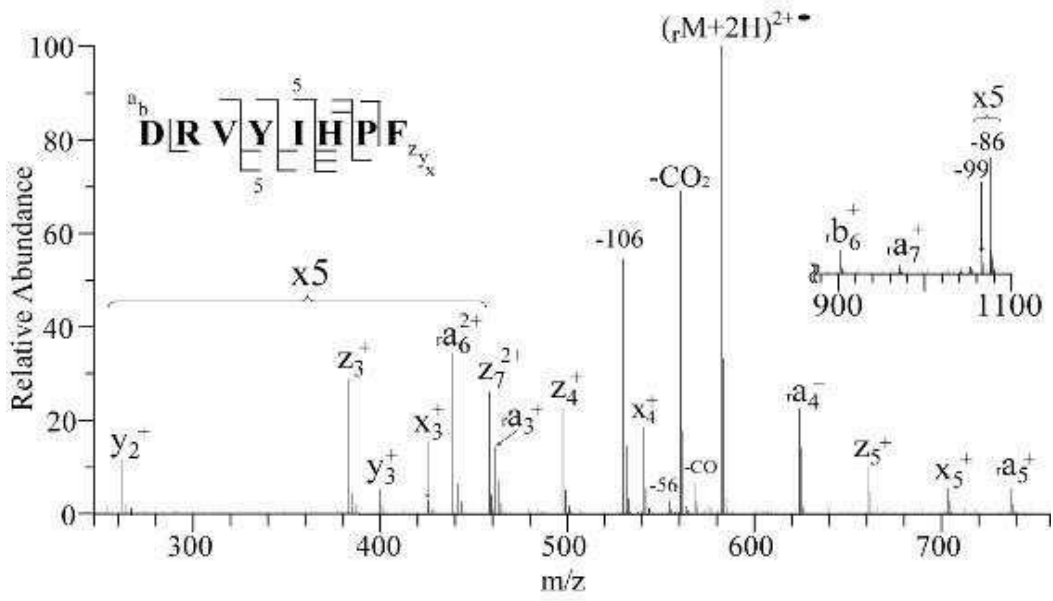
도면2



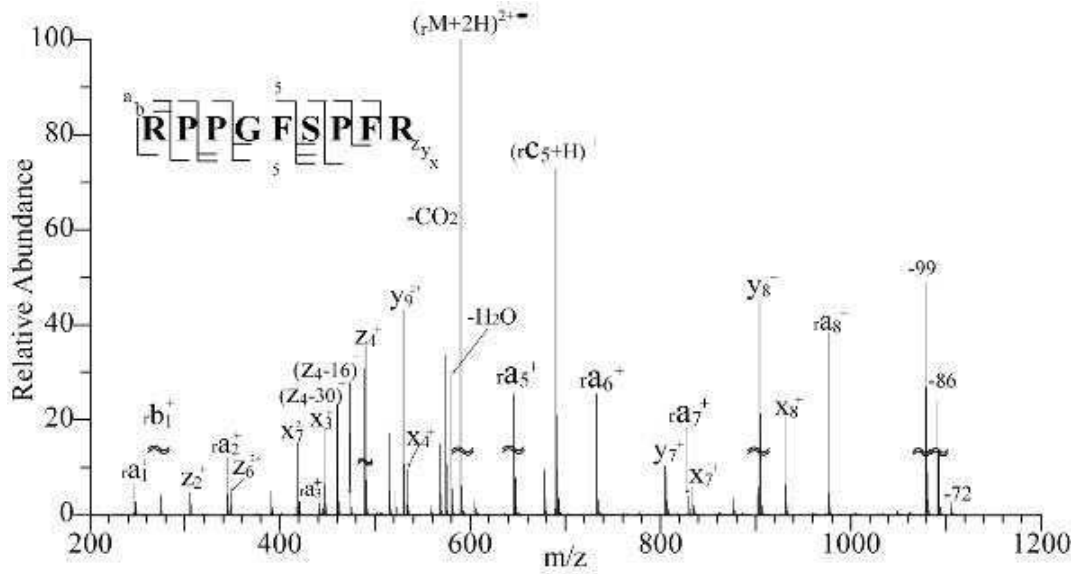
도면3



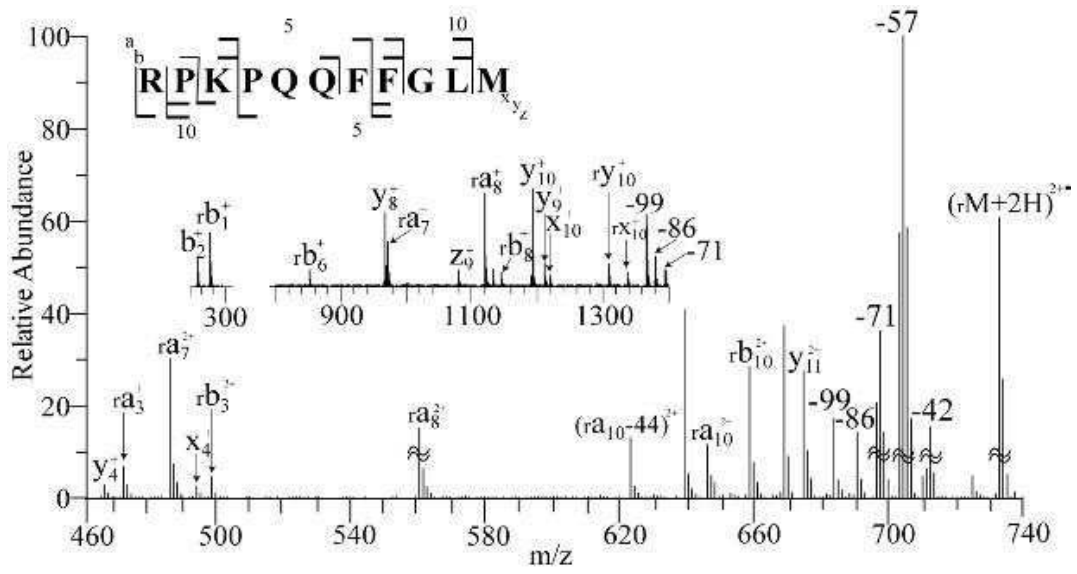
도면4



도면5



도면6



도면7

