



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월14일
(11) 등록번호 10-2100158
(24) 등록일자 2020년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/88 (2006.01) G01N 30/06 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 30/88 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0028111(분할)
- (22) 출원일자 2020년03월06일
심사청구일자 2020년03월06일
- (65) 공개번호 10-2020-0028917
- (43) 공개일자 2020년03월17일
- (62) 원출원 특허 10-2018-0099334
원출원일자 2018년08월24일
심사청구일자 2018년08월24일
- (56) 선행기술조사문헌
KR101484969 B1*
KR1020150013996 A*
KR1020160146102 A*
JP2015535304 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
김재한
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
안현주
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
서나리
대전광역시 유성구 어은로57번길, 127동 1202호 (어은동, 한빛아파트)
- (74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 박성철

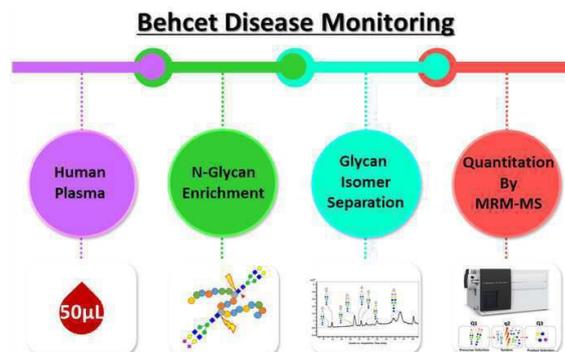
(54) 발명의 명칭 N-당사슬 크로마토그램 피크의 상대정량에 의한 질병 스크리닝 방법

(57) 요약

과제: 종래 당사슬 조성의 차이를 이용하여 질병 유무를 확인하는 방법은 각 질병에 특이적인 당사슬 조성이 많지 않으며, 분석에 시간이 많이 소요되는 문제점이 있다.

과제해결방법: 본 발명은 당사슬 조성이 동일하더라도 정량값에 차이를 보이는 당사슬 이성질체들이 존재함을 밝혀내어 이를 특정 질병의 마커로 이용할 수 있음을 밝혔다. 본 발명은 선택적으로 유리된 체액 내 N-당사슬 중 시알산 (NeuAc)을 함유한 당사슬을 분리·농축한 다음, 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기기와 다중 반응 모니터링 분석방법으로 질량분석하여 얻어진 각 당사슬 이성질체 정량 값의 비율을 확인, 비교하여 특정 질병에 걸렸는지를 확인하는 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

G01N 2030/067 (2013.01)

G01N 2030/8836 (2013.01)

G01N 2400/00 (2013.01)

G01N 2800/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 318017-03-01-HD030

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 글라이코믹스를 활용한 반려동물 관절염 조기진단을 위한 유도 바이오마커 개발

기여율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2018.04.26 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

가) 특정 질병 환자군과 정상 대조군으로부터 각각 체액을 얻고, 체액 내 단백질을 변성하여 시료를 준비하는 단계;

나) 상기 시료에 효소를 처리하여 시료로부터 N-당사슬을 분리하는 단계;

다) 분리한 N-당사슬을 정제 또는 농축하는 단계;

라) 정제 또는 농축된 N-당사슬을 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기기와 다중 반응 모니터링 분석방법으로 아래 a) 내지 d) 단계를 거쳐 질량분석하는 단계;

a) 농도구배 용리를 이용하여 다공성 흑연화 탄소 충전 컬럼으로 시알산 함유 N-당사슬을 동일한 당 조성 및 동일한 분자량을 갖는 시알산 함유 N-당사슬 별로 각각 분리하는 단계;

b) 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기기의 첫 번째 4중극 (quadrupole)에서 상기 a) 단계에서 분리한 각 시알산 함유 N-당사슬에 해당하는 이온 중 하나를 선택하여 통과시키는 단계;

c) 첫 번째 4중극을 통과한 시알산 함유 N-당사슬에 해당하는 이온을 두 번째 4중극인 충돌 셀에서 특정 에너지를 가하여 단편화하여 단편 이온 (fragment ion)을 생성하는 단계; 및

d) 상기 충돌 셀에서 생성된 단편 이온 중 표적 물질에 특이적인 단편 이온만 세 번째 4중극을 통과시켜 검출하여 시알산 함유 N-당사슬의 질량분석 크로마토그램을 얻는 단계;

마) 상기 라)의 d) 단계에서 얻은 시알산 함유 N-당사슬 질량분석 크로마토그램에서 피크로 나타나는 이성질체 중 환자군과 정상 대조군 간 차이를 보이는 이성질체의 피크 면적 비율을 비교하는 단계; 및

바) 비교 결과 환자군과 정상 대조군 간에 특정 N-당사슬 크로마토그램 피크 정량 값이 유의한 차이가 있는 경우 상기 특정 N-당사슬 크로마토그램 피크를 상기 특정 질병의 마커로 선정하는 단계;를 포함하며,

상기 b) 단계의 시알산 함유 N-당사슬은 당사슬 조성이 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁인 단일 시알산화 복합형 N-당사슬, 당사슬 조성이 Hex₅HexNAc₄Fuc₁NeuAc₁인 단일 시알산화 단일 푸코실화 복합형 N-당사슬 및 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂인 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 중 하나인 것을 특징으로 하는 시알산 함유 N-당사슬 크로마토그램 피크를 이용한 질병 스크리닝 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 바) 단계 이후

사) 시험 대상인의 체액 시험 시료를 채취하여 상기 가) 내지 라) 단계를 수행하고, 질량분석으로 얻은 크로마토그램 피크 중 상기 바) 단계에서 특정 질병의 마커로 선정된 크로마토그램 피크의 면적 비율을 정상 대조군의 값과 비교하여 유의한 차이가 있는 경우 시험 대상인이 특정 질병에 걸린 것으로 확인하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 시알산 함유 N-당사슬 크로마토그램 피크를 이용한 질병 스크리닝 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 나) 단계는

a) 시료에 PNGase F 효소를 16~24시간 처리하여 N-당사슬을 분리하는 단계;

b) a) 단계를 거친 시료 내의 단백질을 침전하는 단계; 및

c) 단백질을 침전시킨 시료를 원심분리하고 상층액을 얻는 단계;를 순차적으로 포함함을 특징으로 하는 시알산 함유 N-당사슬 크로마토그램 피크를 이용한 질병 스크리닝 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 특정 질병은 자가면역질환임을 특징으로 하는 시알산 함유 N-당사슬 크로마토그램 피크를 이용한 질병 스크리닝 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 자가면역질환은 베체트병임을 특징으로 하는 시알산 함유 N-당사슬 크로마토그램 피크를 이용한 질병 스크리닝 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 마) 단계의 시알산 함유 N-당사슬 질량분석 크로마토그램에서 피크로 나타나는 이성질체는 $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_1$ 에 해당하는 6개의 이성질체, $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1\text{NeuAc}_1$ 에 해당하는 3개의 이성질체 및 $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_2$ 에 해당하는 2개의 이성질체 중 선택된 하나 이상의 이성질체인 것을 특징으로 하는 시알산 함유 N-당사슬 크로마토그램 피크를 이용한 질병 스크리닝 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 특정 질병이 베체트병인 경우,

상기 바) 단계의 마커는 N-당사슬 조성 $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_1$ 에서 말단 시알산이 말단 갈락토오스와 (α 2, 3) 결합으로 연결된 이성질체 중 단당류의 헤미아세탈형 고리구조의 형성으로 인해 생기는 아노머 이성질체 두 개 및 당사슬 조성 $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_2$ 인 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 (Di-sialylated complex-type N-glycan) 이성질체 중 말단 시알산 두 개가 두 개의 말단 갈락토오스와 각각 (α 2, 3) 결합과 (α 2, 6) 결합으로 연결된 이성질체 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 시알산 함유 N-당사슬 크로마토그램 피크를 이용한 질병 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 선택적으로 유리된 혈장 내 N-당사슬 (N-glycan) 중 시알산 NeuAc를 함유한 N-당사슬들의 이성질체를 분리하고, 다중 반응 모니터링 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 질량분석 측정으로 얻어진 이성질체 각각의 정량 값의 비율을 비교하여 특정 질병을 확인하는 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 혈액 내 단백질의 60% 이상은 표면에 당사슬이 존재하는 당단백질 (glycoprotein)이며, 이뮤노글로불린 G, 합토글로빈, 알파-1-에시드 당단백질, 혈청 아밀로이드 A 등과 같이 면역과 염증반응과 연관된 대부분의 단백질 또한 당단백질이다. 단백질 당쇄화의 위치와 구조적 다양성은 체내의 환경에 민감하게 반응하므로 당사슬을 이용한 질병관련 연구 및 질병 진단 시스템 개발이 현재 활발히 진행되고 있다.

[0004] 당단백질은 단백질이 합성된 후 소포체 (Endoplasmic Reticulum)에서 기본 골격이 합성된 뒤 골지체 (Golgi Apparatus)로 이동 후 다양한 당전이 효소 (글라이코실트랜스퍼레이즈, glycosyltransferase)에 의해 당이 부가된다. 하지만, 질병과 같은 생물학적 변화 상태에 따라 촉매나 전이물질로 인해 특정 당쇄화가 비정상적으로 발현되거나 비정상적인 당쇄화가 일어나 세포 변이 및 기능의 소실을 일으키게 된다. 또한, 당사슬 생합성 과정은 효소 간의 경쟁 반응으로 수많은 당사슬 및 이성질체가 존재할 수 있으며, 각 당사슬의 특징도 매우 다양하다. 따라서 질병과 당사슬의 관계를 밝히기 위해서는 이성질체 정보를 포함한 정성·정량 분석이 반드시 필요하다. 그러나 현재까지의 당사슬 기반 질병관련 연구는 인간의 체액 (혈액, 소변, 눈물, 침 등) 및 조직에서 N- 또는 O-당사슬을 유리하여 이성질체 정보를 배제한 당사슬의 전체적인 프로파일링 분석을 통한 특성 비교에 주력해 오고 있다. 이와 같은 방법은 많은 시간이 소비될 뿐만 아니라, 수많은 당사슬 중 질병 특이적인 당사슬을 찾는 것이 매우 어렵다. 따라서, 당사슬과 질병 간의 연관성을 확인하기 위해서는 당사슬 이성질체를 고려한 정성 정보와 함께 정량적 특성을 반영한 새로운 접근이 필요하다.

[0005] 다공성 흑연화 탄소 (Porous Graphitized Carbon) 컬럼 기반 액체크로마토그래피는 기존 당사슬 분석에 많이 사용되는 역상 컬럼 (Reverse Phase; C18) 또는 친수성 상호반응 컬럼 (Hydrophilic Interaction Chromatography; HILIC)에 비해 추가 유도체화 단계 없이 전처리가 간편하며, 이성질체 분리에 탁월하다.

[0006] 또한, 다중 반응 모니터링 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 질량분석은 삼중-사중극자 탠덤 질량분석기 (Triple Quadrupole Mass Spectrometry, QQQ)를 통해 수행되는 정량이 가능한 질량분석 기법 중의 하나로 선택성과 민감도가 매우 우수하다. 질량분석기 첫 번째 사중극자 (Q1) 파트에서 타겟하는 물질의 이온 (Precursor ion, m/z) 만을 필터한 뒤, 두 번째 사중극자 (Q2)에서 비활성 기체와 전기적 에너지를 이용한 충돌을 일으켜 (Fragmentation, Tandem, MS/MS) 조각 이온 (Product ion, m/z)을 생산한다. 마지막 사중극자 (Q3) 파트에서 생성된 조각 이온들 중 타겟하는 물질의 특징적 이온을 선택하여 스캔하는 과정으로 이뤄진다. 이 분석기법은 매트릭스 등 간섭물질의 영향을 최소화할 수 있어 좀 더 고감도로 표적 물질을 분석할 수 있으며, 이온 모니터링을 통해 도출된 면적을 통하여 절대 정량분석이 가능하다.

[0007] 베체트병은 주로 중동 및 아시아 지역에서 100,000명당 10~300명 유병률이 보고되는 원인불명의 자가 면역 질환으로 구강, 성기, 안구, 피부의 염증을 유발하여 합병증으로 사망까지 이르는 특징이 있다. 현재까지 정확한 질병의 원인이나 병태생리가 밝혀져 있지 않고, 검증된 진단 가이드라인이 확립되어 있지 않으며, 특이 치료법이 없다. 따라서 베체트병을 특이적으로 정확히 진단하고, 질병활성도 측정 및 특이 치료제 개발에 활용될 수 있는 진단법이 필요한 실정이다.

[0008] 본 발명은 베체트병을 특이적으로 확인할 수 있는 당사슬 이성질체 관점의 진단방법에 대해 설명하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허공보 10-1452730호
- (특허문헌 0002) 한국공개특허공보 10-2016-0146102호

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) De Leoz, Maria Lorna A., et al. "High-mannose glycans are elevated during breast

cancer progression." Molecular & Cellular Proteomics (2010): mcp-M110.

(비특허문헌 0002) Trbojevic Akmacic, Irena, et al. "Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome." Inflammatory bowel diseases 21.6 (2015): 1237-1247.

(비특허문헌 0003) Miyamoto, Suzanne, et al. "Multiple Reaction Monitoring for the quantitation of serum protein glycosylation profiles: Application to Ovarian Cancer." Journal of proteome research 17.1 (2017): 222-233.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 베체트병 진단을 위해 사용되었던 체외증상을 표준화한 간접적인 가이드라인의 제한점 및 한계점을 해결하고자, 혈장 시료로부터 N-당사슬을 추출한 뒤, N-당사슬 이성질체 간의 정량 비율을 확인하는 베체트병 특이적 진단법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 체액 시료로부터 특정 당단백질이 아닌 전체 당단백질의 N-당사슬을 추출한 다음, N-당사슬을 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기와 다중 반응 모니터링 분석방법으로 질량분석하여 N-당사슬 이성질체를 분리하고, 이성질체 피크 간의 정상 대조군과 환자군 간에 유의한 차이가 있는 경우, 이 피크를 바이오마커로 삼아 피검체의 질병 유무를 분석하는 방법을 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제 해결을 위하여 본 발명자들은 약 90여명의 혈장에서 산성 단당류 (시알산, sialic acid)를 함유한 N-당사슬을 분리·분석하고 정상과 환자 간의 특이적인 당사슬 이성질체 비율을 비교하여, 이를 통해 베체트병 확인을 위한 마커를 선정하였다.

[0016] 본 발명은

[0017] 가) 특정 질병 환자군과 정상 대조군으로부터 체액 시료를 준비하는 단계;

[0018] 나) 상기 시료에 효소를 처리하여 N-당사슬을 분리하는 단계;

[0019] 다) 분리한 N-당사슬을 정제 또는 농축하는 단계;

[0020] 라) 정제 또는 농축된 N-당사슬을 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기와 다중 반응 모니터링 분석방법으로 질량분석하는 단계;

[0021] 마) 상기 라) 단계에서 얻어진 N-당사슬 이성질체 각각의 정량 값 비율을 비교하는 단계; 및

[0022] 바) 환자군과 정상 대조군 간에 특정 N-당사슬 이성질체 정량 값 비율이 유의한 차이가 있는 경우 상기 특정 N-당사슬 이성질체를 상기 특정 질병의 마커로 선정하는 단계;를 포함하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명은 상기 가) 단계 이후 나) 단계 이전 시료의 단백질을 변성하는 단계;가 추가되는 것을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 상기 바) 단계 이후

[0025] 사) 시험 대상인의 체액 시험 시료를 채취하고, 시험 시료에서 N-당사슬을 분리하며, 분리한 N-당사슬을 정제 또는 농축하며, 정제 또는 농축된 N-당사슬을 액체 크로마토그래피 - 다중 반응 모니터링 질량분석한 후, 질량분석으로 얻어진 N-당사슬 이성질체의 정량 값 비율을 상기 마) 단계에서 얻은 정상 대조군 및 환자군의 정량 값 비율과 비교하여 정상 대조군의 비율과 유의한 차이가 있는 경우 시험 대상인이 특정 질병에 걸린 것으로 확인하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명은 상기 나) 단계가

[0027] a) 체액 시료에 단백질 변성 시약을 처리하여 단백질을 변성하는 단계;

- [0028] b) 시료에 PNGase F 효소를 16~24시간 처리하여 N-당사슬을 분리하는 단계;
- [0029] c) b) 단계를 거친 시료 내의 단백질을 침전하는 단계; 및
- [0030] d) 단백질을 침전시킨 시료를 원심분리하고 상층액을 얻는 단계;를 순차적으로 포함함을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계가
- [0032] a) 다공성 흑연화 탄소 컬럼을 정제용 용매로 세척하는 단계;
- [0033] b) 상기 a)의 컬럼을 트리플루오로아세트산이 든 아세토나이트릴 용액으로 세척하는 단계;
- [0034] c) 상기 b) 단계를 거친 컬럼을 정제용 용매로 세척하는 단계;
- [0035] d) c) 단계를 거친 컬럼에 시료를 로딩하는 단계;
- [0036] e) 시료를 로딩한 컬럼을 정제용 용매로 세척하는 단계; 및
- [0037] f) e) 단계를 거친 컬럼에 농도구배 용액을 흘려주어 시료를 용출하는 단계;를 순차적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 라) 정제 또는 농축된 N-당사슬을 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기기와 다중 반응 모니터링 분석방법으로 질량분석하는 단계가
- [0039] a) 농도구배 용리(Gradient Elution)를 이용하여 다공성 흑연화 탄소 충전 컬럼으로 시알산을 함유한 N-당사슬 이성질체를 분리하는 단계;
- [0040] b) 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기기의 첫 번째 4중극 (quadrupole)에서 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁인 단일 시알산화 복합형 N-당사슬, 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄Fuc₁NeuAc₁인 단일 시알산화 단일 푸코실화 복합형 N-당사슬, 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂인 이중 시알산화 복합형 N-당사슬에 해당하는 이온을 선택하여 통과시키는 단계;
- [0041] c) 첫 번째 4중극을 통과한 이온을 두 번째 4중극인 충돌 셀에서 특정 에너지를 가하여 단편화하여 단편 이온 (fragment ion)을 생성하는 단계;
- [0042] d) 상기 충돌 셀에서 생성된 단편 이온 중 표적 물질에 특이적인 단편 이온만 세 번째 4중극을 통과시켜 검출하는 단계;
- [0043] e) 상기 d) 단계에서 검출된 단편 이온의 이성질체 간 크로마토그램 면적 비율을 비교하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 특정 질병이 자가면역질환임을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0045] 또한, 본 발명은 상기 자가면역질환이 베체트병임을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 d) 단계의 표적 물질에 특이적인 단편 이온이 이론적 분자량 203.0794 Da이며 당사슬 조성 HexNAc₁인 단편 이온 및 이론적 분자량 365.1322 Da이며 당사슬 조성 Hex₁HexNAc₁인 단편 이온 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 e) 단계가 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁에 해당하는 6개의 이성질체 피크, Hex₅HexNAc₄Fuc₁NeuAc₁에 해당하는 3개의 이성질체 피크 또는 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂에 해당하는 2개의 이성질체 피크 각각의 크로마토그램 면적의 비율을 도출하는 단계; 및 상기 단계에서 도출된 각 당사슬 이성질체 피크의 정량 값 비율을 비교하여 정상인 대조군에 비하여 환자군에서 발현량 2배 이상의 차이를 나타내는 경우 질병에 걸린 것으로 확인하는 단계;를 포함하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0048] 나아가, 본 발명은 상기 특정 질병이 베체트병인 경우, 상기 바) 단계의 마커는 N-당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁에서 말단 시알산이 말단 갈락토오스 중 한 개와 (α 2, 3) 결합으로 연결된 이성질체 중 단당

류의 헤미아세탈형 고리구조의 형성으로 인해 생기는 아노머 이성질체 두 개 및 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂ 인 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 (Di-sialylated complex-type N-glycan) 이성질체 중 말단 시알산 두 개가 말단 갈락토오스 두 개와 각각 (α 2, 3) 결합과 (α 2, 6) 결합으로 연결된 이성질체 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0050] 본 발명의 구성을 좀 더 구체적으로 설명하면, 본 발명은
- [0051] 가) 체액, 바람직하게는 혈장 또는 혈청 50 μ l에 PNGase F 효소를 처리하여 시료 내의 N-당사슬을 분리하는 단계;
- [0052] 나) 다공성 흑연화 탄소 고체상 추출로 상기 가) 단계를 거친 시료를 탈염하고 시알산 (NeuAc, NeuGc)을 함유한 N-당사슬을 분리, 정제 및 농축하는 단계;
- [0053] 다) 농축된 시알산 함유 N-당사슬을 다공성 흑연화 탄소 기반 액체크로마토그래피 - 다중 반응 모니터링 질량분석 (PGC-LC/MRM-MS)으로 정량분석하는 단계;
- [0054] 라) 질량분석으로 얻어진 시알산 함유 N-당사슬 이성질체 각각의 정량 값 비율을 비교하는 단계;를 포함하는 베타트병 여부 확인방법에 관한 것이다.
- [0055] 또한, 본 발명은 상기 가) 단계의 효소 처리방법이
- [0056] a) 50 μ l의 체액 시료를 취하는 단계;
- [0057] b) 시료에 단백질 변성 시약을 가하고 90~110 $^{\circ}$ C로 1~3분간 처리하여 단백질을 변성하는 단계;
- [0058] c) 시료에 PNGase F 효소 2 μ l를 16 - 24시간 처리하여 N-당사슬을 분리하는 단계;
- [0059] d) 시료 내의 단백질을 침전하는 단계; 및
- [0060] e) 단백질을 침전시킨 시료를 원심분리하고 상층액을 얻는 단계;를 순차적으로 포함함을 특징으로 한다.
- [0061] 또한, 본 발명은 상기 나) 단계의 다공성 흑연화 탄소 고체상 추출이
- [0062] a) 다공성 흑연화 탄소 컬럼을 정제수 2.5 ~ 3.5ml로 2회 이상 세척하는 단계;
- [0063] b) 상기 a)의 컬럼을 0.1% 트리플루오로아세트산이 든 80% 아세토나이트릴 용액 3ml로 2회 이상 세척하는 단계;
- [0064] c) 상기 b) 단계를 거친 컬럼을 정제수 2.5 ~ 3.5ml로 2회 이상 세척하는 단계;
- [0065] d) 시료를 로딩하는 단계;
- [0066] e) 정제수 2.5~3.5ml로 2회 이상 세척하는 단계;
- [0067] f) 10% 아세토나이트릴 용액 2.5~3.5ml로 2회 이상 세척하는 단계; 및
- [0068] g) 20% 아세토나이트릴 용액 2.5~3.5ml로 2회 이상 세척하는 단계; 및
- [0069] h) 0.05% 트리플루오로아세트산이 든 40% 아세토나이트릴 용액 2.5~3.5ml로 2회 이상 시료를 용출하는 단계;를 순차적으로 포함하는 시알산을 함유한 N-당사슬 당사슬 분리·정제 방법에 관한 것이다.
- [0070] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계의 다공성 흑연화 탄소 기반 액체크로마토그래피 - 다중 반응 모니터링 질량분석이
- [0071] a) 용매 A (0.1% 포름산이 든 3% 아세토나이트릴) 와 용매 B (0.1% 포름산이 든 90% 아세토나이트릴)의 농도구배 용리(Gradient Elution)를 이용하여 다공성 흑연화 탄소 충전 컬럼으로 시알산을 함유한 N-당사슬 이성질체를 액체크로마토그래피로 분리하는 단계;
- [0072] b) 사중극자 질량분석기 (QQ-MS) 의 첫 번째 4중극 (quadrupole; Q1)에서 단일 시알산화 복합형 N-당사슬 (이론적 분자량 1931.6876 Da, 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁), 단일 시알산화 단일 푸코실화 복합형 N-당사슬 (이론적 분자량 2077.7455 Da, 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄Fuc₁NeuAc₁), 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 (이론적 분자량 2222.7830 Da, 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂) 에 해당하는 이온을 선택, 통과시키는 단계;
- [0073] c) 충돌 셀 (collision cell 즉, 두 번째 4중극; q2)에서 선택된 분자에 특정한 에너지를 가하여 단편화

(fragmentation)하여 단편 이온 (fragment ion)을 생성하는 단계;

- [0074] d) 세 번째 4중극 (Q3)에서는 충돌 셀에서 생성된 단편 이온 중 표적 물질에 특이적인 단편 이온 (이론적 분자량 203.0794 Da, 당사슬 조성 HexNAc₁ / 이론적 분자량 365.1322 Da, 당사슬 조성 Hex₁HexNAc₁)들만 통과시켜 검출하는 단계;
- [0075] e) 상기 d) 단계에서 얻어진 단편 이온의 이성질체 간 크로마토그램 면적 비율을 비교하는 단계;를 포함하는 시알산을 함유한 N-당사슬 정량분석 방법에 관한 것이다.
- [0076] 또한, 본 발명은 상기 e) 상기 d) 단계에서 얻어진 단편 이온의 이성질체 간 크로마토그램 면적의 비율을 비교하는 단계가 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁에 해당하는 6개의 이성질체 피크, Hex₅HexNAc₄Fuc₁NeuAc₁에 해당하는 3개의 이성질체 피크 또는 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂에 해당하는 2개의 이성질체 피크 각각의 크로마토그램 면적의 비율을 도출하는 단계; 및 도출된 각 표적 당사슬 이성질체 피크의 면적 비율에서 베체트병 환자의 마커인 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁의 첫 번째 이성질체, 두 번째 이성질체, Hex₅HexNAc₄NeuAc₂의 첫 번째 이성질체 중 하나 이상에 대하여 베체트병 환자군 시료와 베체트병이 아닌 정상인 대조군 시료의 차이를 비교 확인하는 결과 해석 단계;
- [0077] f) 정상인 대조군에 비하여 환자군에서 발현량 5배 이상의 차이를 나타내는 경우 베체트병으로 확인하는 단계;를 포함하는 특이적 베체트병 스크리닝 분석방법에 관한 것이다.
- [0078] 참고로, 상기 "첫 번째" 이성질체, "두 번째" 이성질체는 컬럼에서 용출되는 순서를 기준으로 하는 표현으로서, 이하 발명의 설명 및 청구범위에서 동일한 의미로 사용하였다.

발명의 효과

- [0080] 종래 베체트병 진단법은 기존 임상환자들의 증상 및 치료 예후의 결과를 표준화된 분류표를 사용하기에 부정확한 결과를 도출할 가능성이 있다. 본 발명은 상대적으로 적은 양의 체액, 바람직하게는 혈장 50 마이크로리터 (μl)를 사용하여, 시알산을 함유한 N-당사슬 이성질체의 정량 값의 비율을 확인하여 베체트병을 특이적으로 정확히 진단하는 방법으로, 질병 활성도 측정 및 특이 치료제 개발에 활용할 수 있다.
- [0081] 본 발명은 혈장 시료에서 표적으로 하는 시알산을 포함하는 N-당사슬만을 분리한 후 정제 및 농축단계를 거치므로 다른 방해 물질 없이 고감도로 정확하게 정량분석할 수 있다.
- [0082] 또한, 본 발명은 다공성 흑연화 탄소 기반 액체크로마토그래피를 통해 당사슬의 구조 이성질체를 분리한 후 다중 반응 모니터링 질량분석 기반으로 정량분석하므로 각각의 당사슬 이성질체를 특이적으로 정량할 수 있다.
- [0083] 또한, 본 발명은 종래 표준품의 정량 곡선을 통해 절대 정량하는 분석법이 아니라 도출된 이성질체의 면적 값을 비율로 환산하여 이성질체 간의 빈도 및 발현량을 비교하는 분석법으로서, 표준품이 극히 제한적인 글라이코믹스 (Glycomics) 분야의 한계를 극복할 수 있는 새로운 데이터 해석방법이다.
- [0084] 본 발명의 특이적 진단방법은 정량을 위해 필요한 표준품 구매에 소요되는 비용 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 정확한 비율로 환산하는 방법이기 때문에 추후 병원 및 의료기관에서 베체트병 진단에 활용하는 경우 누구나 사용할 수 있는 유용한 방법이다.
- [0085] 본 발명은 소량의 혈청을 사용하여 베체트병을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 현재 베체트병을 특이적으로 진단할 수 있는 방법이 없는 상황에서 매우 유용하다.
- [0086] 본 발명의 방법은 채액으로부터 특정 단백질의 당사슬이 아닌 총 N-당사슬을 분리하고, 이를 트리플 퀴드러플 LC/MS 분석기와 다중 반응 모니터링 분석방법으로 N-당사슬 이성질체 피크를 분리하고 피크 간 비율을 비교하여 질병 유무를 분석는 것으로서, 현재까지의 질병 진단방법에서 찾아볼 수 없는 새로운 방식이다. 또한, 본 발명의 방법은 장기 및 조직 등을 채취하는 생검검사 등의 불편함이 없으며, 정량분석에서 반드시 필요한 표준품 준비에 대한 불편함과 부담감이 없는 편리한 방법이다.

도면의 간단한 설명

- [0088] 도 1은 본 발명의 N-당사슬 이성질체의 상대정량을 이용한 베체트병 진단방법의 실시예를 도식화한 흐름도이다.
- 도 2는 본 발명의 방법으로 정상인과 베체트병 환자의 혈장을 시료로 하여 시알산을 함유한 당사슬 이성질체를 분리·분석한 대표적인 크로마토그램 결과이다.

도 3은 본 발명의 방법으로 정상과 베체트병 환자의 시알산을 함유한 당사슬 이성질체의 정량 값의 비율을 비교한 결과이다.

도 4는 정상인과 베체트병 환자 90여명 시료에서 확인된 단일 시알산화 복합형 N-당사슬 (Mono-sialylated complex-type N-glycan) Hex₅HexNAc₄NeuAc₁의 첫 번째와 두 번째 이성질체, 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 (Di-sialylated complex-type N-glycan) Hex₅HexNAc₄NeuAc₂의 첫 번째 이성질체 비율에 대한 박스 위스커스 (box whiskers) 플롯이다.

도 5는 베체트병 특이적 당사슬의 이성질체 구조를 확인한 크로마토그램 결과이다.

도 6은 베체트병 환자의 표시인자인 Mono-sialylated complex-type N-glycan (Hex₅HexNAc₄NeuAc₁) 의 첫 번째 두 번째 이성질체, Di-sialylated complex-type N-glycan (Hex₅HexNAc₄NeuAc₂) 의 첫 번째 이성질체의 베체트병 환자의 혈장과 베체트병이 아닌 사람의 차이를 비교를 나타내는 Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve 분석 결과이다.

도 7은 본 발명의 스크리닝 방법을 도식화한 것이다.

도 8은 본 발명의 방법을 통하여 베체트병의 마커로 선정된 N-당사슬 이성질체 3종을 도식화한 것이다.

도 2,4,5,7,8 등에 나타난 도형 중 녹색 원은 만노스 (Man), 노란색 원은 갈락토오스 (Gal), "OAc"는 O-아세틸화를 의미하며, 청색 네모는 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), 빨간색 삼각형은 푸코스 (Fuc), 보라색 마름모는 N-아세틸뉴라민산 (NeuAc)(또는 시알산이라고도 함)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 아래에서는 본 발명의 구성을 구체적인 실시예를 들어 좀 더 자세히 설명한다. 단, 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0091] **1. 시료 전처리**

[0092] 1) 인간 혈장 50 μ l에 단백질 변성 시약을 가하고 90 ~ 110 $^{\circ}$ C로 1~3분간 처리하여 단백질을 변성시켰다.

[0093] 2) 1) 단계를 수행한 시료에 PNGase F 2 μ l (1000 units)를 넣고 항온수조에서 37 $^{\circ}$ C로 16시간 효소반응을 진행하였다.

[0094] 3) 2) 단계를 수행한 시료에 차가운 에탄올 (-42 $^{\circ}$ C) 800 μ l를 가하고, -20 ~ -80 $^{\circ}$ C에 1시간 방치 후 원심분리 (14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 ~ 30분)하여 당사슬이 분리된 단백질을 제거하였다.

[0095] 4) 다공성 흑연화 탄소 (porous graphitic carbon, "PGC") 카트리지를 이용한 고체상 추출법을 통해 0.05% 트리플루오로아세트산이 든 40% 아세토나이트릴 용액 2.5~3.5ml로 2회 이상 시료를 용출하여 시알산을 함유한 당사슬을 분리·농축하였다.

[0097] **2. 분석방법**

[0098] 1) 위 전처리에서 얻은 시알산을 함유한 당사슬 시료에 대하여 LC/QqQ MS (Triple Quadrupole MS)의 다중 반응 모니터링 (Multiple Reaction Monitoring; MRM)을 이용하여 정량분석을 수행하였다. 더 자세한는 희석된 시알산을 함유한 당사슬을 오토샘플러 (4 $^{\circ}$ C로 유지됨), 초고압 펌프 및 컬럼 오븐으로 구성된 UPLC-MS/MS 시스템을 이용하여 분석하였다. PGC 컬럼 (100 \times 2.1mm, 3 μ m)을 사용하였고, 크로마토그래피 방법에 의한 분리는 최적화된 분리 조건에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 시료를 로딩한 후 시알산을 포함한 당사슬 용출 농도구배 용액을 분당 0.3ml씩 흘려주었다. 농도구배 용액은 (A) 0.1% 포름산 (v/v)을 포함한 3.0% 아세토나이트릴 용매 및 (B) 0.1% 포름산 (v/v)을 포함한 90% 아세토나이트릴 용매를 사용 각각 아래 시각에 아래 농도로 사용하였다: 0 ~ 0.25 min; 7% B, 0.25 ~ 10 min; 7 ~ 15% B, 25 ~ 30 min; 15 ~ 40% B, 30 ~ 35 min; 40 ~ 100% B. 최종적으로 분석 컬럼은 7% B로 10분간 재평형화하였다. 컬럼 온도는 다음과 같이 유지하였다: 30~60 $^{\circ}$ C. 농도구배의 일례를 표 1에 나타내었다.

표 1

Time (min)	Solvent B (%)	Flow rate (ml/min)
0	7	0.3
0.25	7	0.3
10	15	0.3
25	40	0.3
30	100	0.3
35	100	0.3
35.1	7	0.3
45	7	0.3

2) 다중 반응 모니터링 (MRM)은 QqQ MS에서 사용할 수 있는 선택적인 분석법 중 하나로, 첫 번째 4중극 (quadrupole)에서는 분석하고자 하는 물질의 분자만을 통과시켜 충돌 셀 (collision cell)(즉, 두 번째 4중극)에 보내고, 충돌 셀에서 특정한 에너지를 가하여 선택된 분자를 단편화 (fragmentation)하여 단편 이온 (fragment ion)을 생성한다. 세 번째 4중극에서는 충돌 셀에서 생성된 단편 이온 중 표적 물질에 특이적인 단편 이온만 통과시켜 검출한다. 다중 반응 모니터링을 사용할 경우 매트릭스의 간섭물질에 영향을 최소화할 수 있어 좀 더 고감도로 표적 물질을 분석할 수 있으며, 복수의 단편 이온을 모니터링할 경우 이들의 면적비를 통하여 물질의 정량에도 활용할 수 있다. 본 당사슬 이성질체 정량분석을 위한 MRM 전이 조건은 표 2와 같다.

표 2

Target (Hex_HexNAc_Fuc_NeuAc)	Quantitative ion	Qualitative ion
5_4_0_1	644.9 -> 366.1	644.9 -> 274.1
5_4_1_1	1039.9 -> 366.1	1039.9 -> 274.1
5_4_0_2	741.9 -> 366.1	741.9 -> 274.1

3) 분석된 데이터는 Masshunter 소프트웨어 버전 7을 이용하여 처리하였다.

4) 대조군과 환자군 간의 차이와 강도를 조사하기 위하여 Student's t-test 분석법을 이용하여 수행하였다. 또한, $P < 10^{-20}$ 인 경우에 의미가 있는 것으로 판별하였다.

아래에서는 위와 같은 시료 전처리 및 분석방법을 통해 얻어진 결과를 나타내는 도 2 내지 도 3에 대하여 설명한다.

도 1: 혈청 내 산성 N-당사슬의 정제·분석 단계

도 1은 본 발명의 산성 N-당사슬 분리·분석에 해당하는 전 과정의 흐름도이다. 본 방법에서는 인간 혈청에 함유된 당단백질의 N-당사슬을 N-글라이코시데이즈 (PNGase F)라는 효소에 의해 분리하는 단계를 일차적으로 진행한다. 효소에 의해 단백질로부터 분리된 N-당사슬들은 PGC가 충전된 카트리지를 기반으로 극성이 다른 용매에 의해 당사슬의 크기 및 극성의 차이로 분획되며, 바람직한 일 실시예에서는 0.05% TFA를 포함하는 40% 아세트나이트릴 수용액에 의해 산성 당사슬만을 선택적으로 용출시켜 분석한다. 분리·농축된 산성 당사슬의 이성질체를 PGC-LC로 분리하고, MRM 질량분석하여 표적 당사슬의 면적 값을 통해 상대 정량을 수행한다.

도 2: 베체트병 환자와 정상인의 혈청 산성 N-당사슬 프로파일링

47개의 베체트병 환자 혈청 (남: 26명; 여: 21명), 47개의 건강한 대조군 혈청 (남: 26명; 여: 21명) 시료를 당사슬 기반 베체트병 진단 연구에 사용하였다.

본 발명의 실시예에 따라 정상과 베체트병 환자의 혈청에서 분리된 산성 당사슬의 PGC-LC/MRM-MS 분석 대표 크로마토그램은 도 2와 같다.

혈청에 함유되어 있는 주요 산성 N-당사슬 3종인 단일 시알산화 복합형 N-당사슬 (Mono-sialylated complex-type N-glycan) Hex₅HexNAc₄NeuAc₁, 단일 시알산화 단일 푸코실화 복합형 N-당사슬 (Mono-sialylated monofucosylated complex-type N-glycan) Hex₅HexNAc₄Fuc₁NeuAc₁, 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 (Di-sialylated complex-type N-glycan) Hex₅HexNAc₄NeuAc₂ 의 이성질체를 모두 포함하는 11개의 크로마토그래피 피크 (Peak)를

확인하였다. 환자군과 정상 대조군에 존재하는 당사슬 이성질체의 수는 유사하였으나, Hex₅HexNAc₄NeuAc₁의 첫 번째와 두 번째 이성질체, Hex₅HexNAc₄NeuAc₂의 첫 번째 이성질체에 해당하는 총 세 개의 피크에서 이온 강도 즉, 면적 값의 차이를 확인하여 환자와 정상을 구별할 수 있는 마커로서의 가능성을 확인하였다.

[0115] **도 3: 각 이성질체 면적의 비율을 통한 베체트병 환자와 정상 간의 비교**

[0116] 베체트병 환자와 정상인 대조군 간의 직접적인 비교를 위해 관찰된 이성질체 각각의 면적 값은 각 구조 이성질체의 총 면적 값에 의해 표준화되었다. 이성질체 정보를 배제한 N-글라이칸 구조별로 환자와 대조군을 비교할 경우 뚜렷한 차이가 발생하지 않았으며, 각 구조 이성질체의 면적 값을 직접적으로 비교한 경우 환자와 대조군의 차이를 확인하는 통계분석 (t-test)에서 결과 값이 본 발명의 데이터 해석보다 낮은 차별성을 나타내었다. 그러나, 본 발명의 방법을 통해 얻은 결과는 정상과 환자의 차이를 보여주는 이성질체의 P-값이 10⁻²⁰ 이하로서 의미가 있음을 확인할 수 있다.

[0118] **도 4: 베체트병 환자에서 마커 이성질체의 변화**

[0119] 도 5는 총 94명 시료에서 확인된 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁의 첫 번째와 두 번째 이성질체, Hex₅HexNAc₄NeuAc₂의 첫 번째 이성질체 비율에 대한 박스 위스커스 (box whiskers) 플롯으로 환자와 대조군 간의 극명한 차이를 나타낸다. 이들은 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁₋₂로 이루어진 당사슬의 이성질체로서 정상의 경우보다 환자의 경우 4-5배 증가하였다. 흥미롭게도 이러한 차이는 여성군보다 남성군에서 확실히 나타났다. 위 세 가지 이성질체의 베체트병 환자와 대조군을 차이를 나타내는 P-값은 10⁻²⁰ 이상으로 나타났고, 이 세 가지 이성질체를 베체트병 진단 마커로 결정하였다.

[0121] **도 5: 베체트병 특이적 당사슬 구조 확인**

[0122] 혈청에 존재하는 주요 N-당사슬의 시알산은 말단의 갈락토오스와 α-2,3 또는 α-2,6 결합을 하고 있다. 본 발명에서 확인한 베체트병 특이적 당사슬의 구조를 밝히기 위해 시알산을 함유한 N-당사슬 시료에 시알산 분해 효소 (Neuraminidase 또는 Sialidase) 처리를 수행하였다. 도 5는 α-2,3 구조 특이적 분해 효소를 처리하기 전과 후를 비교한 크로마토그램이다. 효소 처리 전 (위)과 비교하여 효소 처리 후 (아래) Hex₅HexNAc₄NeuAc₁의 구조를 가진 1번과 2번 피크, 그리고 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂의 구조를 가진 1번 피크가 감소하였음을 볼 수 있다. 이 결과를 통해 베체트병 진단 마커의 당사슬 이성질체는 α-2,3로 결합되어 있는 시알산을 함유하고 있음을 알 수 있다.

[0124] **도 6: 베체트병 진단 방법의 평가**

[0125] 질병 탐지를 위한 바이오마커의 성능을 평가하는 도구는 ROC (Receiver Operating Characteristic) 커브이다. 도출된 AUC 결과 값이 0.6 이상인 ROC 커브는 정상과 환자를 구별하는 타당성을 가진 것으로 판단한다. 본 발명에서 베체트병 환자의 바이오마커로 선정된 단일 시알산화 복합형 N-당사슬 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁의 첫 번째와 두 번째 이성질체, 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂의 첫 번째 이성질체 비율에 대하여 각각 ROC 커브를 통해 AUC를 계산하였다. 그 결과, 본 발명에서 선정한 당사슬 마커 세 종류 모두 0.98 이상의 뛰어난 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 본 발명의 베체트병 진단 방법과 마커가 베체트병을 판정하는데 유용함을 말해 준다.

[0127] **도 7: 당사슬 이성질체 프로파일링을 통한 베체트병 진단방법**

[0128] 본 발명의 방법은 먼저 인간의 체액, 바람직하게는 혈장이나 혈청을 소량 취하여, 효소 처리 등으로 N-당사슬을 농축한 다음, 당사슬 이성질체를 분리하고, 분리된 당사슬 이성질체에 대하여 MRM 질량분석을 실시하여 이성질체의 비율을 정량함으로써 질병에 걸렸는지의 여부를 진단하는 것이다.

[0130] **도 8: 베체트병의 마커로 선정된 N-당사슬 이성질체 3종**

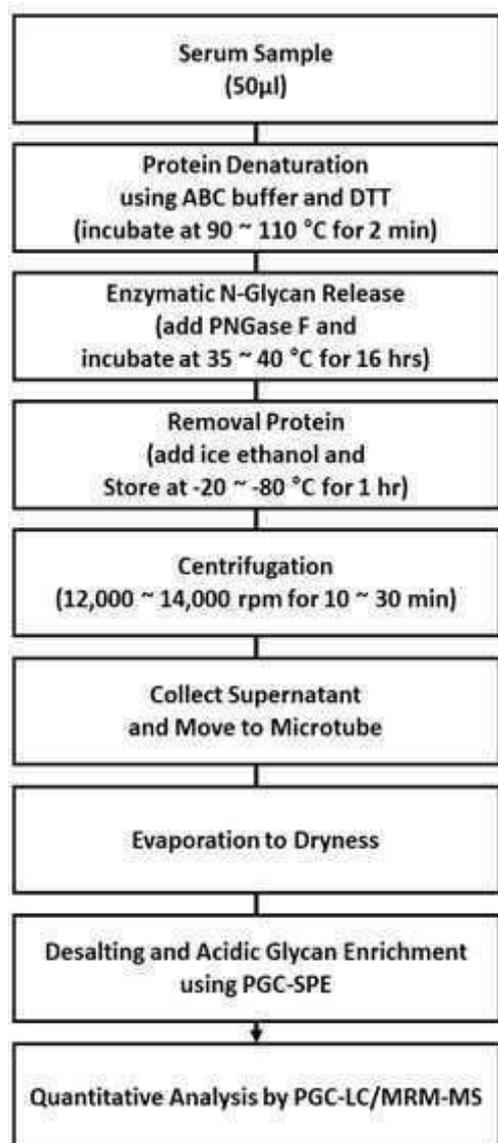
[0131] 질량분석으로 확인된 이성질체의 질량 값을 통해 당사슬을 이루고 있는 당의 구성요소를 확인할 수 있다. 또한, PGC 컬럼을 이용하여 N-당사슬을 분리·분석한 기존 논문을 참고하고 특정 구조의 시알산을 분리하는 효소 처리를 통하여 추가로 확인한 결과, 본 발명에서 선택한 질병 특이적 당사슬의 이성질체를 도 8과 같이 설명할 수 있다. 이때, 5401-1과 5401-2는 단당류의 헤미아세탈형 고리구조의 형성으로 인해 생기는 아노머 이성질체 관계이다.

[0132]

즉, 본 발명의 N-당사슬 이성질체를 이용한 질병 스크리닝 방법에서 구체적인 예로서 베타병 스크리닝에 이용할 수 있는 N-당사슬 이성질체 마커는 도 8과 같이, N-당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁에서 말단 시알산이 말단 갈락토오즈와 (α 2, 3) 결합으로 연결된 이성질체 중 단당류의 헤미아세탈형 고리구조의 형성으로 인해 생기는 아노머 이성질체 두 개 및 당사슬 조성 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂인 이중 시알산화 복합형 N-당사슬 (Di-sialylated complex-type N-glycan) 이성질체 중 말단 시알산 두 개가 두 개의 말단 갈락토오즈와 각각 (α 2, 3) 결합과 (α 2, 6) 결합으로 연결된 이성질체 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.

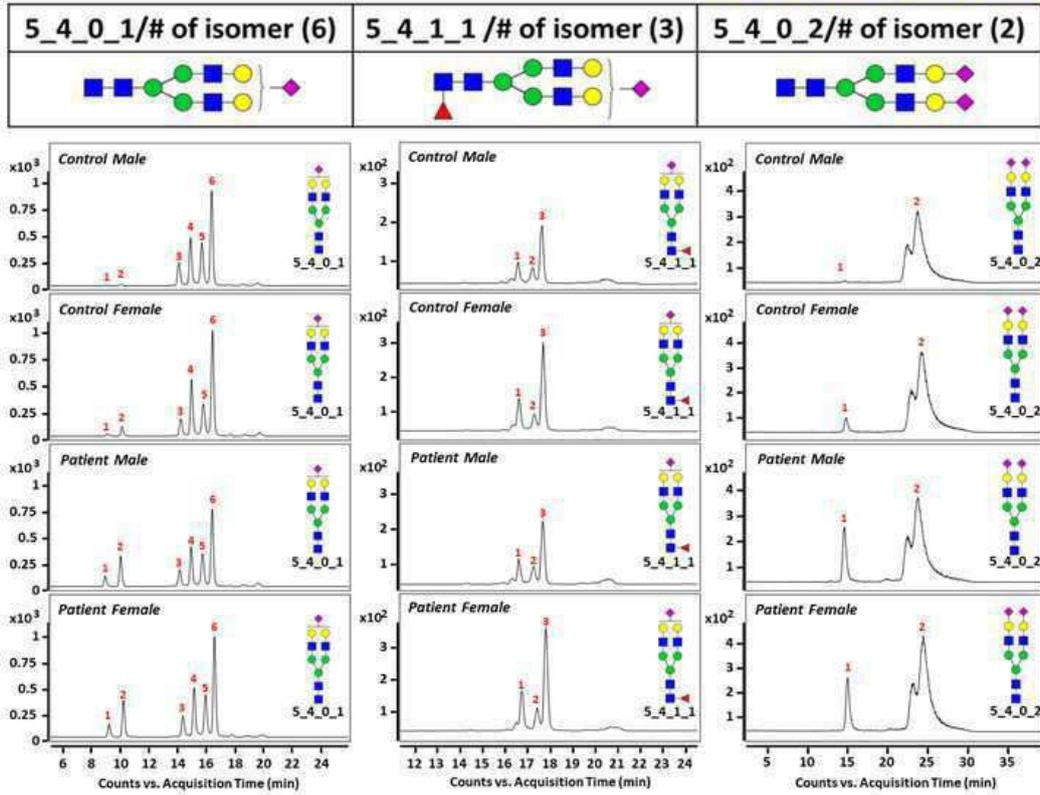
도면

도면1



도면2

Hex_HexNAc_Fuc_NeuAc



도면3

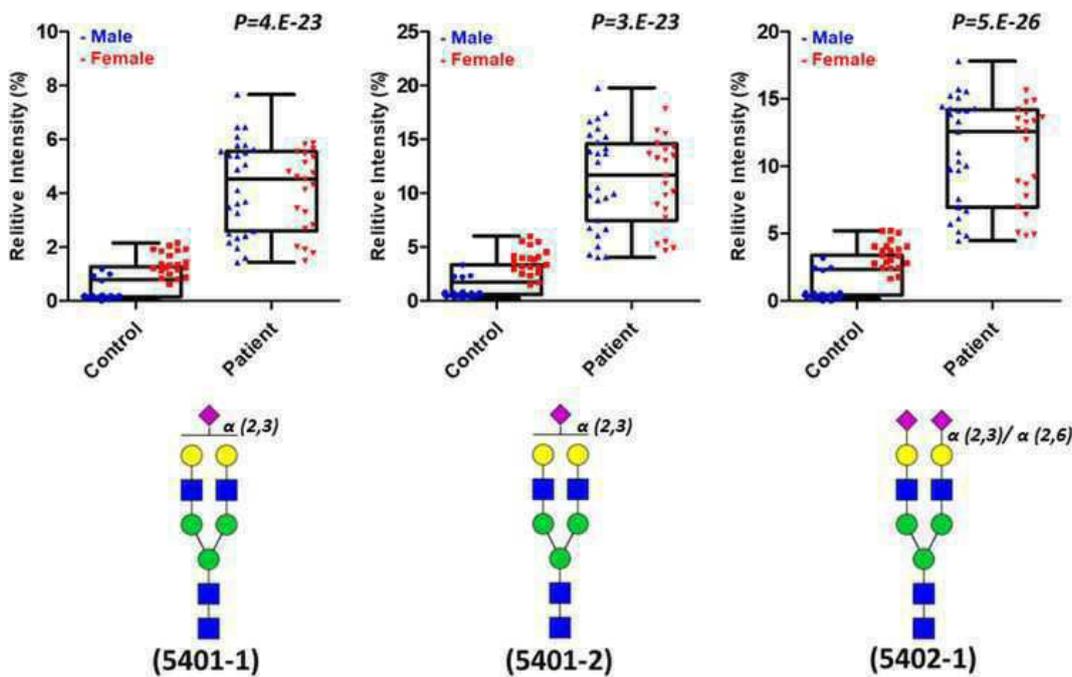
<Glycan Composition 정리>

Glycan Composition (Hex:HexNAc:Fuc:Neu5Ac)	Control			Patient			P-value
	Average	±	SD	Average	±	SD	
5401	39.254	±	5.222	35.897	±	2.026	9.E-05
5411	5.553	±	0.987	5.293	±	1.449	3.E-01
5402	55.193	±	5.344	58.810	±	2.412	6.E-05

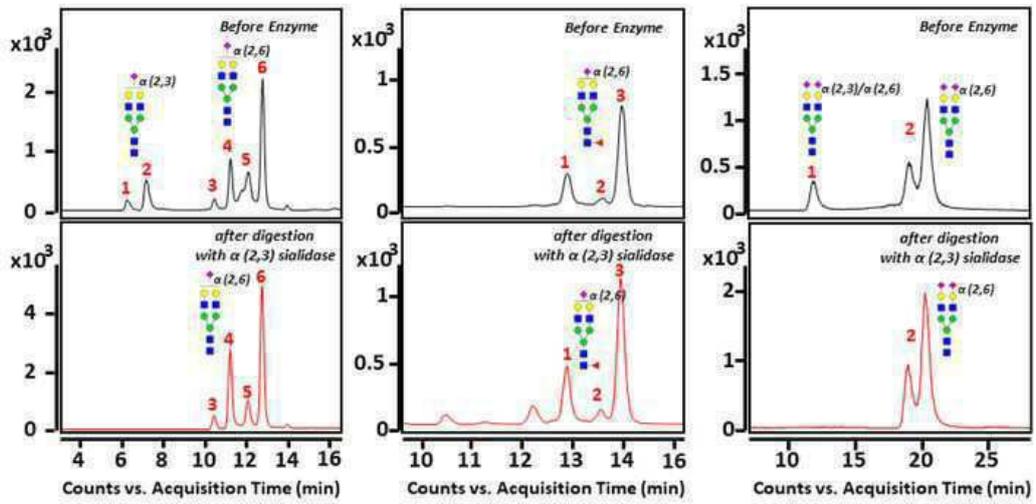
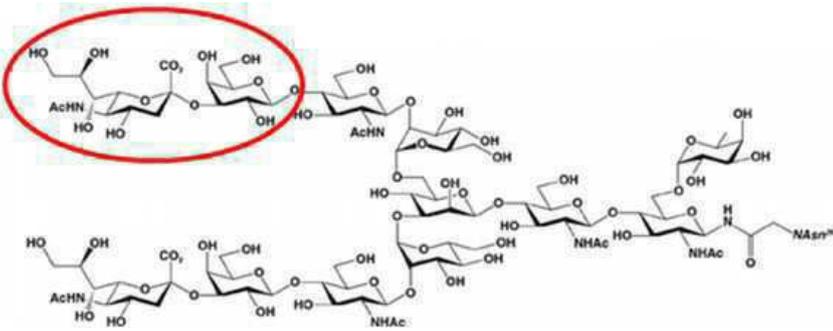
<Glycan Isomer 정리>

Glycan Composition (Hex:HexNAc:Fuc:Neu5Ac)	Control		Patient		P-value	ROC	Linkage
	Average(%)±	SD	Average(%)±	SD			
5401_1	0.769	± 0.672	4.170	± 1.621	4.E-23	0.985	Sia α (2,3)
5401_2	2.125	± 1.720	11.225	± 4.329	3.E-23	0.986	Sia α (2,3)
5401_3	10.692	± 1.223	9.017	± 0.989	1.E-10	0.848	Sia α (2,6)
5401_4	22.017	± 0.851	19.172	± 1.411	4.E-20	0.952	Sia α (2,6)
5401_5	20.849	± 2.198	17.730	± 1.946	1.E-10	0.844	Sia α (2,6)
5401_6	43.548	± 1.910	38.686	± 2.817	6.E-16	0.916	Sia α (2,6)
5411_1	24.462	± 0.627	24.227	± 0.709	9.E-02	0.601	Sia α (2,6)
5411_2	16.335	± 3.862	15.326	± 2.627	1.E-01	0.581	Sia α (2,6)
5411_3	59.204	± 3.876	60.447	± 2.590	7.E-02	0.596	Sia α (2,6)
5402_1	1.927	± 1.673	10.982	± 3.853	5.E-26	0.994	Sia α (2,3) /Sia α (2,6)
5402_2	98.073	± 1.673	89.018	± 3.853	5.E-26	0.994	Sia α (2,6) /Sia α (2,6)

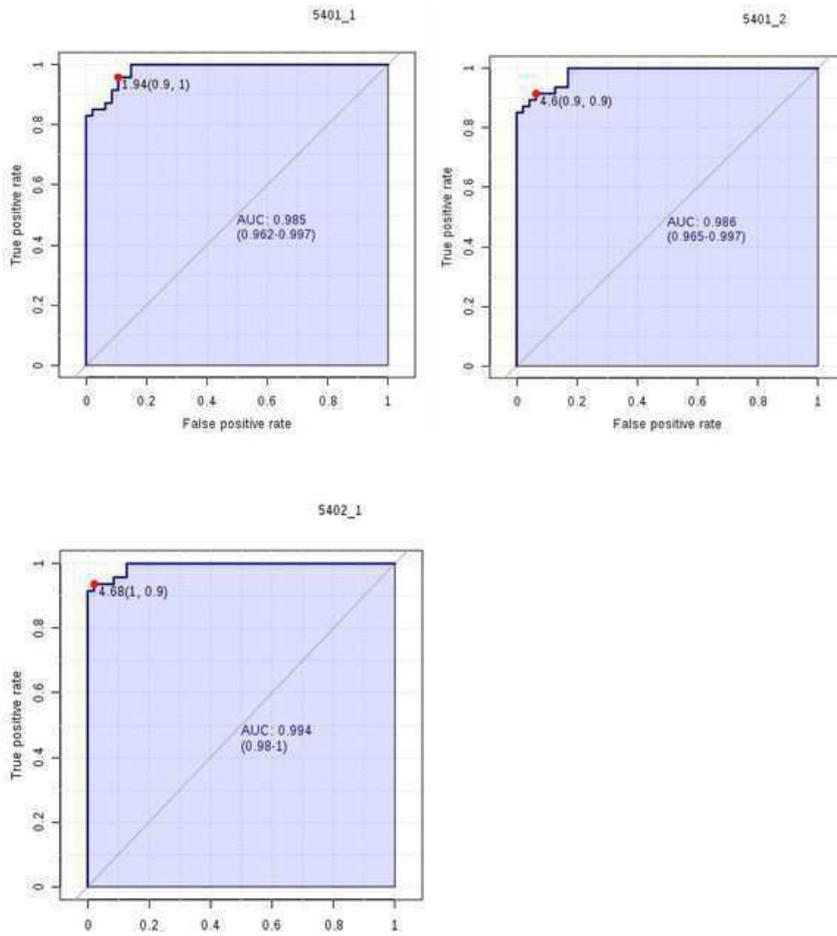
도면4



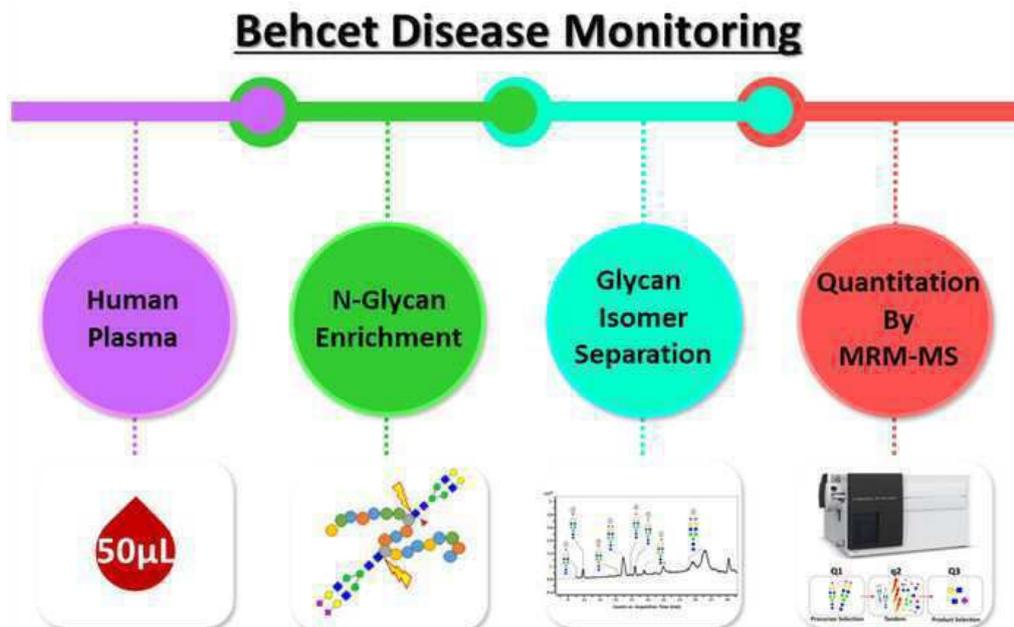
도면5



도면6



도면7



도면8

