

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2012년 10월 18일 (18.10.2012)



(10) 국제공개번호  
**WO 2012/141553 A2**

(51) 국제특허분류:

A61K 47/02 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61K 31/4985 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002865

(22) 국제출원일: 2012년 4월 16일 (16.04.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2011-0034776 2011년 4월 14일 (14.04.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **단국대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION, DANKOOK UNIVERSITY)** [KR/KR]; 경기도 용인시 수지구 죽전로 152 (죽전동, 단국대학교 내), 448-701 Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김형진 (KIM, Hyung Gun)** [KR/KR]; 서울시 강남구 청담동 65 진흥아파트 5동 108호, 135-100 Seoul (KR). **김학림 (KIM, Hak Rim)** [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 비산 1동 비산삼성래미안아파트 111동 1903호, 431-760 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한일국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

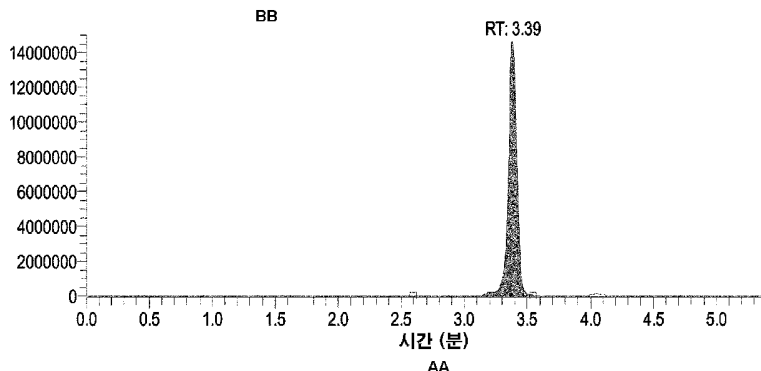
[다음 쪽 계속]

(54) Title: STABILIZING COMPOSITION FOR TETRAHYDROBIOPTERIN, AND METHOD FOR ANALYZING TETRAHYDROBIOPTERIN USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 테트라히드로비오테린의 안정화 조성물 및 이를 이용한 테트라히드로비오테린의 분석방법

[Fig. 5]

BH4 500ng/mL + DTE 0.01% + Ascorbic Acid 0.01%



AA ... Time (minutes)

BB ... BH4 500 ng/mL + DTE 0.01% + Ascorbic Acid 0.01%

(57) Abstract: The present invention relates to a stabilizing composition for tetrahydrobiopterin, comprising dithioerythritol and acid compounds having a pH of 1.5 to 6.5. The present invention also relates to a method for analyzing tetrahydrobiopterin using the stabilizing composition. According to the present invention, low-density tetrahydrobiopterin existing in a sample may be directly analyzed using a mass spectrometer, and such an analysis may be effectively used in the study of unknown physiological and pathological functions of tetrahydrobiopterin.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

**규칙 4.17 에 의한 선언서:**

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

**공개:**

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 디티오에리트리톨(dithioerythritol) 및 pH 1.5 내지 6.5 의 산성 화합물을 포함하는 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin)의 안정화 조성물 및 상기 안정화 조성물을 이용하여 테트라히드로비오테린을 분석하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 질량분석기를 통하여 시료 내에 존재하는 낮은 농도의 테트라히드로비오테린을 직접 분석할 수 있어, 테트라히드로비오테린의 아직 밝혀지지 않은 생리병리학적 기능 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 테트라히드로비오테린의 안정화 조성물 및 이를 이용한 테트라히드로비오테린의 분석방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 디티오에리트리톨(dithioerythritol) 및 pH 1.5 내지 6.5의 산성 화합물을 포함하는 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin)의 안정화 조성물 및 상기 안정화 조성물을 이용하여 테트라히드로비오테린을 분석하는 방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin)은 천연적으로 생성되는 프테린 계열의 생물 기원 아민이고, 페닐알라닌 수산화효소, 티로신 수산화효소, 트립토판 수산화효소 및 산화질소 생합성효소를 포함한 많은 다른 효소를 위한 보조인자로서 다양한 질환과 관련된다.
- [4] 테트라히드로비오테린과 관련되는 대표적인 질환으로 비정형성 페닐케톤뇨증(atypical phenylketonuria)이 알려져 있다. 이는 유전적으로 테트라히드로비오테린 생합성에 결함이 있는 신생아들에서 페닐알라닌 수산화효소(phenylalanine hydroxylase)가 제대로 기능을 발휘하지 못하여 혈액 내 페닐알라닌의 농도가 증가하는 질환이다. 이 환자들은 또한 타이로신과 트립토판 수산화효소의 기능이 저하되어 뇌에서 도파민, 세로토닌과 같은 신경전달물질들의 생합성이 제대로 일어나지 않게 된다.
- [5] 이외에도 테트라히드로비오테린의 결함은 유전성 신경질환인 도파-반응성 근긴장이상(dopa-responsive dystonia)을 야기시키며, 파킨슨 질환과도 연관이 있는 것으로 밝혀지고 있다. 또한, 알츠하이머 질환, 우울증 환자들에서 체액 내 테트라히드로비오테린의 농도가 정상인보다 낮은 것으로 알려져 있으며, 상피세포에서 멜라닌 색소가 결핍되는 백색증 환자도 테트라히드로비오테린 생합성의 저하에서 비롯되는 것으로 알려져 있다.
- [6] 또한, 테트라히드로비오테린은 당뇨병, 고혈압, 심근경색, 뇌졸중과 같은 내피혈관세포의 기능장애와 밀접한 연관이 있다. 이는 테트라히드로비오테린이 심혈관 기능에서 중요한 역할을 하는 일산화질소 생합성효소의 조효소이자 조절자로서 중요한 역할을 하기 때문이다.
- [7] 이와 같이, 비정형 페닐케톤뇨증, 근긴장이상, 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 우울증, 백색증, 내피혈관세포 기능장애 등의 다양한 질환의 진단 및 테트라히드로비오테린과 질환과의 관련성의 분석을 위하여, 환자의 시료, 예를 들어 혈액(혈청), 뇌척수액, 기타 조직에서 테트라히드로비오테린을 효율적으로 분석하는 것이 필요하다.

- [8] 한편, 테트라히드로비오테린은 생체 내에서 테트라히드로(tetrahydro) 상태의 환원된 형태로서 활성을 나타내며, 쉽게 디히드로(dihydro) 또는 완전히 산화된 형태인 비오테린(biopterin)으로 전환된다. 따라서, 생체 내에는 테트라히드로비오테린 및 그의 산화된 형태인 디히드로비오테린(dihydrobiopterin)과 비오테린(biopterin)이 혼재하여 존재한다. 특히, 산화스트레스가 주요한 원인으로 알려진 심혈관 질환에서는 테트라히드로비오테린의 산화가 심각한 문제로 대두되고 있으며, 단순히 테트라히드로비오테린의 농도보다 그의 산화물과의 농도비가 중요하게 취급되고 있다. 따라서, 생체시료에서 테트라히드로비오테린을 그의 산화물들로부터 구별하여 분석하는 것이 중요하다.
- [9] 생체시료 중 테트라히드로비오테린의 분석은 일반적으로 그의 산화물이 형광을 가지는 특성에 기초하여 이루어지고 있다. 즉, 테트라히드로비오테린을 산화시켜 고성능액체크로마토그래피(HPLC: High Performance Liquid Chromatography)로 분리한 후 형광분석기를 통해 정량분석을 수행한다. 그러나, 이러한 분석방법은 테트라히드로비오테린 뿐만 아니라 그의 산화물 즉, 디히드로비오테린 및 비오테린도 함께 분석되기 때문에, 테트라히드로비오테린만을 선택적으로 분석할 수 없는 문제점이 있다.
- [10] 또한, 테트라히드로비오테린의 분석방법으로서 역상 고성능액체크로마토그래피(reverse-phase HPLC), 전기화학적 방법(Electrochemical detection), 형광 기법(Fluorescence detection) 등을 기존에 사용하였다. 이러한 기존의 분석방법에서는 테트라히드로비오테린의 산화에 따른 불안정성의 문제로 인하여 직접적으로 테트라히드로비오테린만을 측정하기 힘들기 때문에 디히드로비오테린이나 비오테린을 측정하여 간접적인 방법으로 테트라히드로비오테린을 측정하여 테트라히드로비오테린의 실제량을 측정하는 방법으로서 한계 및 제한이 따르게 된다. 또한, 시료마다 편차가 심하고 별도의 시료처리 장치를 부착하여야 하는 등의 문제점이 있었다.
- [11] 상기 문제점들로 인하여 테트라히드로비오테린만을 선택적으로 측정할 수 있는 방법이 당업계에 요구되고 있다.

[12]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [13] 본 발명자들은 테트라히드로비오테린을 직접적으로 측정할 수 있는 방법을 찾고자 예의 노력한 결과, 디티오에리트리티톨과 산성의 화합물을 처리하여 테트라히드로비오테린을 안정화시키고, 이를 이용하여 매트릭스(matrix)로부터 테트라히드로비오테린을 분리하여, 질량분석기로 테트라히드로비오테린을 직접 분석할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[14]

## 과제 해결 수단

- [15] 본 발명의 목적은 디티오에리트리톨(dithioerythritol) 및 pH 1.5 내지 6.5의 산성 화합물을 포함하는 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin)의 안정화 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 검체로부터 채취한 테트라히드로비오테린을 포함하는 시료에 상기 안정화 조성물을 처리하여 테트라히드로비오테린을 안정화하는 단계; 상기 시료를 액체 크로마토그래피(LC)의 컬럼에 주입하는 단계; 액체 크로마토그래피의 이동상을 흘려주어 테트라히드로비오테린을 분리하는 단계; 및 분리된 테트라히드로비오테린을 질량분석기로 분석하는 단계를 포함하는 테트라히드로비오테린의 분석방법을 제공하는 것이다.

[17]

## 발명의 효과

- [18] 본 발명에 의하면, 질량분석기를 통하여 시료 내에 존재하는 낮은 농도의 테트라히드로비오테린을 직접 분석할 수 있어, 테트라히드로비오테린의 아직 밝혀지지 않은 생리병리학적 기능 연구에 유용하게 사용할 수 있는 이점이 있다. 또한, 본 발명에 따라 제공되는 테트라히드로비오테린의 측정방법을 통하여 테트라히드로비오테린을 타겟으로 하는 약물의 스크리닝을 위한 고속검색시스템(HTS: high throughput system)으로 적용하여 신약후보 물질의 약효 검증과 선정에 유용하게 활용할 수 있다.

[19]

## 도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 10ng/g에서 2000ng/g까지의 테트라히드로비오테린의 표준곡선을 나타낸다.
- [21] 도 2는 디티오에리트리톨과 염산 처리시 온도와 시간에 따른 테트라히드로비오테린의 상대적 안정성을 보여주는 그래프를 나타낸다.
- [22] 도 3은 아세트나이트릴로 처리한 테트라히드로비오테린의 크로마토그램의 감도를 나타낸다.
- [23] 도 4는 디티오에리트리톨과 염산 처리시 테트라히드로비오테린의 크로마토그램의 감도를 나타낸다.
- [24] 도 5는 디티오에리트리톨과 아스코르브산 처리시 테트라히드로비오테린의 크로마토그램의 감도를 나타낸다.
- [25] 도 6a 및 6b는 복합 반응 모니터링(multiple reaction monitoring)을 이용한 산물의 이온 질량 스펙트럼을 나타낸다. 도 6a는 테트라히드로비오테린의 이온 질량 스펙트럼으로서 전구물 이온의 m/z는 242.2이며, 도 6b는 입실론-아세타미도카프로익산의 이온 질량 스펙트럼으로서 전구물 이온의 m/z는 174.1이다.
- [26] 도 7a 내지 7d는 테트라히드로비오테린과

입실론-아세타미도카프로익산(내부표준, internal standard)에 관한 랫드 두뇌의 크로마토그램을 나타낸다(IS: 입실론-아세타미도카프로익산, BH4: 테트라히드로비오테린).

- [27] 도 7a은 약물을 처리하지 않은 랫드 두뇌의 크로마토그램을 나타낸다.
- [28] 도 7b 및 7c는 테트라히드로비오테린과 입실론-아세타미도카프로익산을 주입한 랫드의 두뇌의 크로마토그램(도 7b: 테트라히드로비오테린 10 ng/g, 도 7c: 테트라히드로비오테린 200ng/g)을 나타낸다.
- [29] 도 7d는 랫드 두뇌 선조체의 크로마토그램을 나타낸다.
- [30]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 상기 목적을 달성하기 위하여, 하나의 양태로서, 본 발명은 디티오에리트리톨(dithioerythritol) 및 pH 1.5 내지 6.5의 산성 화합물을 포함하는 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin)의 안정화 조성물을 제공한다.
- [32] 본 발명에서 용어, "디티오에리트리톨"은  $C_4H_{10}O_2S_2$ , 분자량 154.25의 디티오트레이톨의 광학이성질체의 일종으로, 환원제로서 단백질 SH기의 보호나 2황화 화합결합의 절단에 디티오트리톨과 같이 사용하는 물질로서, 본 발명의 목적상 테트라히드로비오테린을 안정화하는 물질을 의미한다.
- [33] 본 발명에서 용어, "산성 화합물"은 pH 1.5 내지 6.5 범위의 화합물, 바람직하게는 pH 3.0 내지 5.5 범위의 약산성 화합물일 수 있다.
- [34] 상기 산성 화합물은 이에 제한되지는 않으나, 염산, 아스코르브산, 입실론-아세타미도카프로익산( $\epsilon$ -acetamidocarproic acid), 아세트산, 시트르산, 젖산 및 포름산으로 이루어진 군에서 선택된 화합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 염산, 아스코르브산 및 입실론-아세타미도카프로익산으로 이루어진 군에서 선택된 화합물을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 아스코르브산 또는 입실론-아세타미도카프로익산을 사용할 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 아스코르브산을 사용할 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 실시예에서는, 디티오에리트리톨과 상기 산성 화합물로 아스코르브산을 사용하여 테트라히드로비오테린을 안정화한 후, 질량분석기(LC-MS/MS)를 사용하여 테트라히드로비오테린을 질량 분석한 경우, 질량 분석시 크로마토그램의 감도가 5배 이상 증가하였음을 확인하였다(도 5). 이러한 결과는 본 발명의 디티오에리트리톨과 산성 화합물을 포함하는 안정화 조성물은 테트라히드로비오테린을 안정화하여 테트라히드로비오테린을 분석하는 데에 유용함을 보여준다.
- [36] 본 발명의 안정화 조성물은 디티오에리트리톨(dithioerythritol) 및 산성 화합물을 포함하는 조성물이고, 바람직하게는 상기 디티오에리트리톨 및 산성 화합물은 아세토나이트릴(acetonitrile)에 포함되어 제공될 수 있다. 바람직하게, 상기 디티오에리트리톨과 산성 화합물을 포함하는 아세토나이트릴은

- 테트라히드로비오테린의 1 내지 20배의 부피일 수 있다.
- [37] 테트라히드로비오테린의 안정화 조성물을 제공하기 위하여, 테트라히드로비오테린이 함유된 매트릭스(matrix)에 디티오에리트리톨 및 pH 1.5 내지 6.5의 산성 화합물을 포함하는 아세트나이트릴을 1 내지 20배, 바람직하게는 5 내지 10배의 부피로 가하여 테트라히드로비오테린의 안정화 조성물을 제조할 수 있다. 상기 아세트나이트릴을 20배 이상의 부피로 가할 경우, 추출된 테트라히드로비오테린의 농도가 낮아져 분석 효율이 떨어질 수 있다.
- [38]
- [39] 다른 하나의 양태로써, 본 발명은 (a) 검체로부터 채취한 테트라히드로비오테린을 포함하는 시료에 본 발명에 따른 안정화 조성물을 처리하여 테트라히드로비오테린을 안정화하는 단계; (b) 상기 시료를 액체 크로마토그래피(LC)의 컬럼에 주입하는 단계; (c) 액체 크로마토그래피의 이동상을 흘려주어 테트라히드로비오테린을 분리하는 단계; 및 (d) 분리된 테트라히드로비오테린을 질량분석기로 분석하는 단계를 포함하는 테트라히드로비오테린의 분석방법을 제공한다.
- [40] 상기 시료는 테트라히드로비오테린을 포함하는 시료이면 어느 시료나 이용할 수 있으며, 예컨대 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [41] 본 발명에서 상기 (a) 단계는 검체로부터 채취한 테트라히드로비오테린을 포함하는 시료에 본 발명에 따른 안정화 조성물을 처리하여 테트라히드로비오테린을 안정화하는 단계로서, 상등액을 얻는 단계를 포함한다. 구체적으로, 테트라히드로비오테린을 포함하는 시료에 디티오에리트리톨(dithioerythritol) 및 산성 화합물을 포함하는 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin)의 안정화 조성물을 처리하고, 상기 조성물을 10초 내지 2분, 바람직하게는 30초 내지 1분 동안 볼텍스(vortex)한 후, 3000 내지 20000 rpm, 바람직하게는 10000 내지 15000 rpm, 온도는 2 내지 20°C, 바람직하게는 4 내지 8°C, 시간은 1 내지 20분, 바람직하게는 5 내지 10분으로 원심분리하여 상등액을 얻을 수 있다.
- [42] 본 발명에서 상기 (b) 단계는 상기 시료를 액체 크로마토그래피(LC)의 컬럼에 주입하는 단계이다.
- [43] 본 발명에서 용어, "액체 크로마토그래피"는 크로마토그래피를 어떤 액체성분의 이동상에 의해 수행하는 방법의 일종으로서, 이동상을 기체로 사용하는 가스크로마토그래피와 대비되는 크로마토그래피를 의미하며, 고정상의 형태, 고정상-이동상 사이의 물질분배기구 등에 근거하여 여러가지로 분류할 수 있다.
- [44] 바람직하게, 상기 컬럼은 친수성 액상 크로마토그래피 컬럼(Hydrophilic Interaction chromatography HPLC column, HILIC column)을 사용할 수 있으며,

이는 테트라히드로비오테린의 친수성을 이용하여 매트릭스로부터 테트라히드로비오테린을 분리하는데 유용하다.

- [45] 본 발명에서 상기 (c) 단계는 액체 크로마토그래피의 이동상을 흘려주어 테트라히드로비오테린을 분리하는 단계이다.
- [46] 바람직하게, 상기 이동상(mobile phase)은 물, 아세트나이트릴 및 개미산(formic acid)의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 혼합용매는 물 1 내지 50, 아세트나이트릴 99 내지 50의 비율(v/v)로 구성될 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 물 20 내지 30, 아세트나이트릴 80 내지 70의 비율(v/v)로 구성될 수 있다. 테트라히드로비오테린의 분리는 크로마토그램을 통하여 확인할 수 있다.
- [47] 본 발명에서 상기 (d) 단계는 분리된 테트라히드로비오테린을 질량분석기로 분석하는 단계이다.
- [48] 본 발명에서 용어, "질량분석기"는 양극선에 자장과 전장을 걸어 그 진로를 구부림으로써 질량이 다른 분자나 원자를 정량적으로 분석하는 장치를 의미한다.
- [49] 바람직하게, 상기 질량분석기는 전자 분무 이온화 장치가 되어 있는 4극자 텐덤 질량분석기(ESI-MS-MS, electrospray ionization-mass spectrometer-mass spectrometer)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [50] 상기와 같이, 테트라히드로비오테린의 안정화 조성물을 이용하여 시료내 테트라히드로비오테린을 안정화하고 질량분석기로 질량 분석한 결과, 디티오에리트ريت올과 아스코르브산을 함께 첨가한 경우에 감도가 5배 이상 증가함을 확인할 수 있었다(도 5).
- [51] 또한, 본 발명에서 확립된 테트라히드로비오테린의 측정방법을 이용하여 랫드 두뇌 조직에 존재하는 테트라히드로비오테린의 함량을 측정한 결과, 기존에 발표된 논문들과 유사한 결과를 보여주고 있음을 확인함으로써, 본 발명에서 확립된 테트라히드로비오테린의 측정방법이 적절함을 간접적으로 확인할 수 있었다.
- [52] 이러한 결과는, 테트라히드로비오테린의 안정화 조성물을 이용하여 질량분석을 통한 측정방법을 제공함에 따라, 보다 정확하고 빠른 분석이 가능함으로써, 본 발명이 테트라히드로비오테린의 연구에 널리 활용될 수 있음을 나타낸다.
- [53] 상기와 같은 본 발명의 분석방법을 통하여 테트라히드로비오테린의 분석하는 경우, 테트라히드로비오테린이 중요한 역할을 하는 질환과 관련하여 치료제 개발을 위한 약물검색 HTS(high throughput system)로 적용이 가능하며, 상기 질환의 진단이나 예후, 치료 효과를 확인할 수 있는 생체표식자(biomarker)의 검출에 활용될 수 있다.

[54]

**발명의 실시를 위한 형태**



- [55] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [56]
- [57] **실시예 1: 실험재료의 준비**
- [58] 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin, BH4)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사에서 구입한 것을 사용하였고, 내부표준(internal standard, IS)인 입실론-아세타미도카프로익산( $\epsilon$ -acetamidocarproic acid, AACA)은 건일제약(서울, 한국)에서 구입한 것을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q 증류수 정제 시스템 (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 정제하였다. 다른 모든 화합물과 시약은 분석용을 사용하였으며, 더 이상의 정제를 하지 않고 사용하였다.
- [59] 테트라히드로비오테린(1mg/ml)의 모액(stock solution)을 50% 아세토나이트릴로 제조하고, 모액의 희석은 100% 아세토나이트릴을 사용하여 수행하였다. 랫드(rat)의 두뇌에서 테트라히드로비오테린의 표준 용액(standard solution)은 최종 농도가 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 및 2000ng/g 가 되도록 희석된 테트라히드로비오테린의 모액을 적절한 부피(전체 두뇌 부피의 10% 미만)로 섞어 준비하였다. 테트라히드로비오테린의 표준 곡선은 도 1과 같았다.
- [60]
- [61] **실시예 2. 디티오에리트리톨(DTE)과 염산 처리시 온도에 따른 테트라히드로비오테린(BH4)의 안정성 비교**
- [62] 랫드의 두뇌에서 테트라히드로비오테린의 함량이 높은 부분인 흑체 및 선조체를 선별적으로 제거한 후 뇌 전체를 분쇄기로 균질하게 분쇄한 후 상온에서 하루 방치하여 잔여 테트라히드로비오테린이 모두 없어지게 하여 이것을 랫드 두뇌 매트릭스로 사용하였다. 화학량량 저울을 이용하여 매트릭스 45mg을 마이크로 튜브(microtube)에 계량하고, 계량된 매트릭스에 디티오에리트리톨과 몇몇 농도가 다른 염산을 가하였다. 디티오에리트리톨과 염산이 첨가되지 않은 경우(표 1 및 6), 디티오에리트리톨만 첨가된 경우(표 2), 디티오에리트리톨과 염산이 함께 첨가된 경우(표 3 내지 5 및 7)를 만들었다. 테트라히드로비오테린이 10 $\mu$ g/ml 농도로 포함된 아세토나이트릴을 5 $\mu$ l를 오토피펫으로 취하여 앞서 계량된 매트릭스 45mg에 가하여 테트라히드로비오테린 1000ng/g을 제조하였다.
- 입실론-아세타미도카프로익산(내부표준, internal standard, 250ng/ml)의 5 $\mu$ l 부분표본(aliquot)과 500 $\mu$ l의 아세토나이트릴을 제조된 매트릭스에 첨가하였다. 60초간 균질화 혼합하고, 60초간 초음파 분해한 후, 혼합물을 10분간 12000rpm, 4°C에서 원심분리하였다. 상등액(100 $\mu$ l)을 깨끗한 96-웰 플레이트(well plate)에 옮겨주고, 10 $\mu$ l의 용액 부분표본을 LC-MS/MS 장치에 주입하였다. 하기 실시예 4에 제시된 방법에 의해 LC-MS/MS 장치로 테트라히드로비오테린의 함량을 측정하였다.

[63]

[64]      상기와 같이 4°C와 25°C 에서 각각 디티오에리트리톨과 염산을 첨가하여 테트라히드로비오테린의 안정성을 평가한 결과는 표 1 내지 표 7과 같았다. 그 결과, 25°C 조건과 비교하였을 때 4°C의 조건에서 보다 안정한 결과를 보였으며, 디티오에리트리톨과 염산을 처리하였을 때 안정성과 감도가 높아진 결과를 확인할 수 있었다(도 2).

[65]

[66]      표 1

[Table 1]

4°C에서 BH<sub>4</sub>의 안정성(n=5)

시간 (hr)	평균 (%)	표준편차
0	100.0	0.0
1	105.0	2.9
2	97.3	2.4
4	86.8	2.3
6	76.2	2.9
8	72.1	1.6
12	64.6	0.8
20	55.20	2.05

[67]      표 2

[Table 2]

4°C에서 DTE가 첨가된 BH<sub>4</sub>의 안정성(n=5)

시간 (hr)	평균 (%)	표준편차
0	100.0	0.0
1	78.4	2.7
2	75.1	3.8
3	67.6	2.4
4	65.2	2.2
6	62.1	2.2
8	51.6	3.6
20	61.31	6.07

[68]      표 3

[Table 3]

4℃에서 DTE 및  $1 \times 10^{-5}$  N HCl이  
첨가된 BH4의 안정성(n=5)

시간(hr)	평균 (%)	표준편차
0	100.0	0.0
1	57.3	4.5
2	47.1	5.0
3	42.1	4.3
4	40.2	4.8
6	33.9	4.8
8	32.6	6.1
20	36.27	1.54

[69] 표 4

[Table 4]

4℃에서 DTE 및  $1 \times 10^{-4}$  N HCl이  
첨가된 BH4의 안정성(n=5)

시간(hr)	평균 (%)	표준편차
0	100.0	0.0
1	100.1	4.6
2	102.5	8.7
3	95.5	5.8
4	89.8	2.8
6	74.7	4.2
8	68.4	5.6
20	109.44	13.41

[70] 표 5

[Table 5]

4°C에서 DTE 및  $1 \times 10^{-3}$  N HCl이  
첨가된 BH<sub>4</sub>의 안정성(n=5)

시간(hr)	평균 (%)	표준편차
0	100.0	0.0
1	103.4	4.4
2	96.2	7.7
3	100.8	3.3
4	89.4	5.4
6	84.0	6.0
8	76.7	5.9
20	84.66	11.12

[71] 표 6

[Table 6]

25°C에서 BH<sub>4</sub>의 안정성(n=5)

시간(hr)	평균 (%)	표준편차
0	100.0	0.0
1	72.5	3.7
2	60.6	5.7
4	43.2	4.9
6	35.8	3.2
8	15.6	3.6
20	4.5	1.4

[72] 표 7

[Table 7]

25℃에서 DTE 및  $1 \times 10^{-5}$  N HCl이  
첨가된 BH4의 안정성(n=5)

시간(hr)	평균 (%)	표준편차
0	100.0	0.0
1	89.5	7.4
2	85.3	3.7
4	71.2	3.4
6	57.6	2.6
8	46.3	1.7
20	20.4	2.1

[73]

[74]

실시예 3: 디티오에리트리톨과 염산, 아스코르브산 처리시  
테트라히드로비오테린의 크로마토그램 안정성 및 감도 평가

[75]

상기 실시예 2에서 얻은 매트릭스에 디티오에리트리톨과 염산 또는 디티오에리트리톨과 아스코르브산을 처리하여 테트라히드로비오테린의 크로마토그램 안정성 및 감도 평가를 실시하였다. 테트라히드로비오테린이 10 $\mu$ g/ml 농도로 포함된 아세트나이트릴을 5 $\mu$ l를 오토피펫으로 취하여 상기 매트릭스 45mg에 가하여 테트라히드로비오테린 1000ng/g을 제조하였다. 입실론-아세타미도카프로익산(내부표준, internal standard, 250ng/ml)의 5 $\mu$ l 부분표본(aliquot)과 500 $\mu$ l의 아세트나이트릴을 제조된 매트릭스에 첨가하였다. 60초간 균질화 혼합하고, 60초간 초음파 분해한 후, 혼합물을 10분간 12000rpm, 4℃에서 원심분리하였다. 상등액(100 $\mu$ l)을 깨끗한 96-웰 플레이트(well plate)에 옮겨주고, 10 $\mu$ l의 용액 부분표본을 LC-MS/MS 장치에 주입하였다. 하기 실시예 4에 제시된 방법에 의해 LC-MS/MS 장치로 테트라히드로비오테린의 크로마토그램을 얻었다.

[76]

[77]

상기와 같이 질량분석기를 통한 테트라히드로비오테린의 질량 분석시 크로마토그램의 안정성 및 감도를 비교한 결과는 도 3 내지 5와 같았다. 테트라히드로비오테린에 아세트나이트릴 첨가시의 크로마토그램 결과와 비교하였을 때, 디티오에리트리톨과 염산을 함께 첨가한 경우에는 약 2배의 감도 증가를 보였으며(도 4), 디티오에리트리톨과 아스코르브산을 함께 첨가한 경우에는, 5배 이상의 감도 증가를 보이는 결과를 확인할 수 있었다(도 5). 이러한 결과는 디티오에리트리톨과 산성 화합물을 처리하여 테트라히드로비오테린을 안정화시키는 경우 테트라히드로비오테린의 크로마토그램의 감도가 현저히 상승함을 나타내며, 질량분석기를 통하여 시료 내에 존재하는

테트라히드로비오테린을 직접 측정할 수 있음을 나타낸다.

[78]

[79] 실시예 4. 본 발명의 안정화 조성물을 사용하여 LC-MS/MS 시스템을 통한 테트라히드로비오테린의 측정

[80]

[81] 4-1. 실험 방법

[82] 입실론-아세타미도카프로익산(내부표준, internal standard, 250ng/ml)의 5 $\mu$ l 부분표본(aliquot)과 디티오에리트리톨을 포함하는 500 $\mu$ l의 아세트나이트릴을 50mg의 두뇌 부분표본에 첨가하였다. 60초간 균질화 혼합하고, 60초간 초음파 분해한 후, 혼합물을 10분간 12000rpm, 4°C에서 원심분리하였다. 상등액(100 $\mu$ l)을 깨끗한 96-웰 플레이트(well plate)에 옮겨주고, 10 $\mu$ l의 용액 부분표본을 LC-MS/MS 장치에 주입하였다.

[83]

[84] 액체 크로마토그래피 장치는 용매이동모듈(solvent delivery module)이 장치되어 있는 Accela(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 장치, 자동샘플러(autosampler)가 있는 Nanospace SI-2 3133(Shiseido Inc., Japan)를 사용하였고, Discovery Max(Thermo Fisher Scientific Inc.) 전자분무 이온화 장치가 되어 있는 4극자 탠덤 질량분석기(ESI-MS-MS, electrospray ionization-mass spectrometer-mass spectrometer)에 연결시켰다. 장치 조절과 데이터의 분석은 Xcalibur(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하였다. 크로마토그래피 분리는 보호 컬럼(guard column, Phenomenex C<sub>18</sub>, 4mm × 2mm, Phenomenex)에 의해 보호되는 친수성 액상 크로마토그래피 컬럼(Hydrophilic Interaction chromatography HPLC column; Luna 3u HILIC 200A(3.0mm × 150mm, i.d., 3 $\mu$ l particle size, Phenomenex, Torrance, CA, USA))을 사용하였다. 컬럼 오븐(column oven; Nanospace SI-2 3004, Shiseido, Japan)은 온라인을 이용하였다. 0.1% 포름산-아세트나이트릴/물(75:25, v/v)의 이동상(mobile phase)은 300 $\mu$ l/분의 유량속도로 흘려보냈다.

[85]

전자 분무 이온화(electrospray ionization, ESI) 질량분석기는 양이온 모드(positive ion mode)로 운용하였다. 테트라히드로비오테린 m/z 242.1에서 m/z 166.0, 입실론-아세타미도카프로익산 m/z 174.1에서 m/z 114.0까지의 전구물-산물 이온 전이(precursor-product ion transition)의 복합 반응 모니터링(MRM: Multiple reaction monitoring)을 정량측정을 위하여 사용하였다. 충돌에너지는 테트라히드로비오테린은 20.0V, 입실론-아세타미도카프로익산은 14V를 이용하였다. 최적화 조건으로서, ESI needle spray 전압은 4000V, sheath 가스압력은 35 unit, 보조가스압력은 20 unit, 모세관 온도는 206°C, 충돌가스(Ar) 압력은 1.5 mTorr, skimmer offset은 5V, 크로마토그래피 필터의 정점의 폭은 10s이었다. 스캔은 centroid mode with SIM width(0.700 FWHM), 스캔시간(0.200초), 및 스캔 너비(0.5 Da)에서 수행하였다.

[86]

[87] **4-2. 실험 결과**

[88] 복합 반응 모니터링(MRM)을 이용한 테트라히드로비오테린과 입실론-아세타미도카프로익산의 이온 질량분석 스펙트럼을 얻었다. 그 결과, 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이 LC-MS/MS 시스템을 통한 질량분석 스펙트럼이 도출되었다.

[89] 한편, 도 7a 내지 7d를 통하여 LC-MS/MS 분석이 적절하게 수행되었음을 확인할 수 있었다. 도 7a는 약물을 처리하지 않은 랫드 두뇌의 크로마토그램이며, 테트라히드로비오테린의 피크가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 반면, 도 7b 및 7c는 테트라히드로비오테린 및 입실론-아세타미도카프로익산을 주입한 랫드 두뇌의 크로마토그램으로써, 테트라히드로비오테린의 피크를 확인할 수 있었다. 또한, 도 7d에서는 랫드 조직 중 선조체를 사용하여 크로마토그램의 피크를 확인한 결과, 동일한 피크를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 본 발명의 안정화 조성물을 사용하면 테트라히드로비오테린을 안정화시킴으로써 직접 분석이 가능함을 확인할 수 있었다.

[90]

[91] 랫드 두뇌 조직 중에서 선조체(corpus striatum), 흑질(substantia nigra), 중뇌(mid brain), 소뇌(cerebellum), 해마(hippocampus), 전두 피질(frontal cortex), 후두엽(occipital lobe)에 존재하는 테트라히드로비오테린의 함량을 측정한 결과는 표 8과 같았다. 이러한 결과는 기존에 발표된 논문들(S. Milstienz and S. Kaufman. The Biosynthesis of Tetrahydrobiopterin in Rat Brain. The J. of Biol. Chem., Vol. 264, No. 14, pp. 8066-8073, 1989)과 유사한 결과를 보여주고 있으므로 본 발명에서 확립된 테트라히드로비오테린의 측정방법은 적절하다는 것을 간접적으로 보여준다.

[92]

[93] 표 8

[Table 8]

랫드 두뇌 조직의 BH4의 농도 (n=10)

두뇌 조직	BH4 (ng/g)	
	평균 $\pm$ SE	BQL (n)
Corpus striatum	215 $\pm$ 38.2	0
Substantia nigra	157 $\pm$ 34.2	0
Mid brain	116 $\pm$ 44.7	0
Cerebellum	43.8 $\pm$ 5.40	0
Hippocampus	42.0 $\pm$ 18.24	4
Frontal cortex	19.5 $\pm$ 4.02	2
Occipital lobe	14.2 $\pm$ 2.65	3

\*BQL : 정량한계 이하.

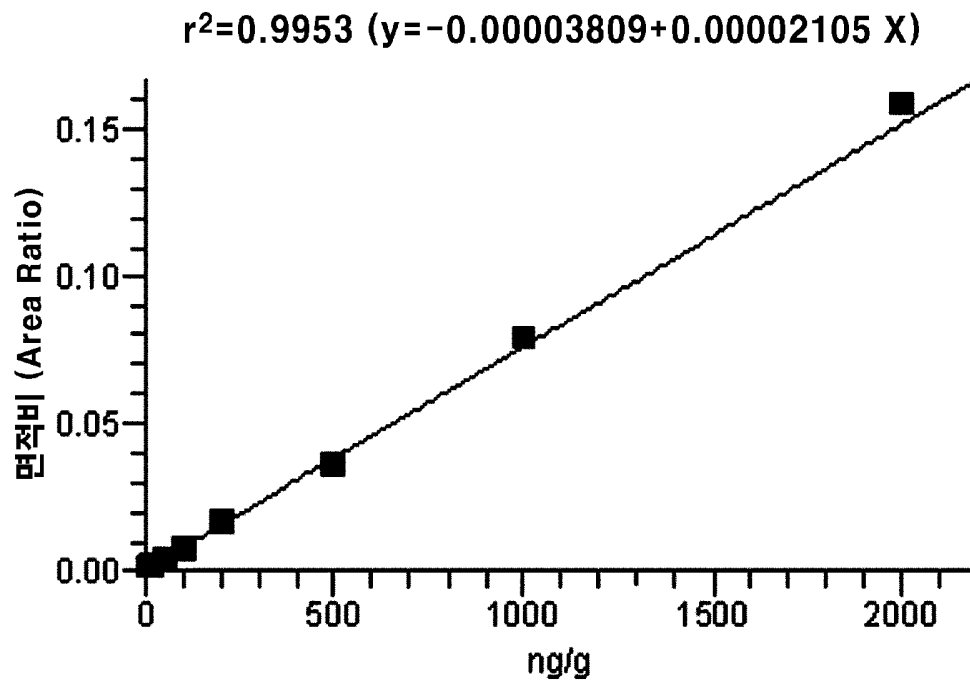
[94]



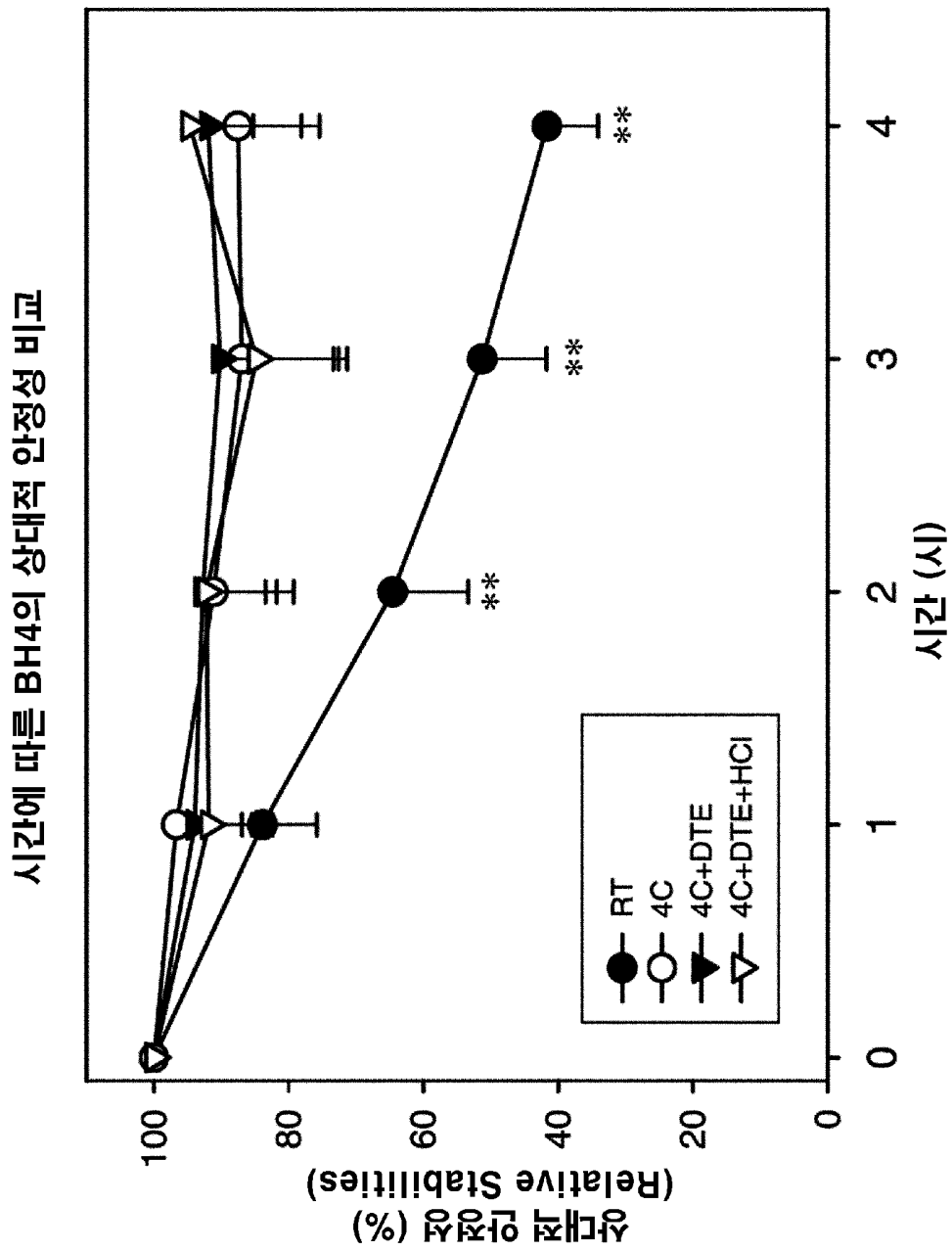
## 청구범위

- [청구항 1] 디티오에리트리톨(dithioerythritol) 및 pH 1.5 내지 6.5의 산성 화합물을 포함하는 테트라히드로비오테린(tetrahydrobiopterin)의 안정화 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 산성 화합물은 염산인 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 산성 화합물은 pH 3.0 내지 5.5의 약산성 화합물인 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 약산성 화합물은 아스코르브산(ascorbic acid)인 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 디티오에리트리톨 및 산성 화합물은 아세토나이트릴(acetonitrile)에 포함되어 제공되는 것인 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 조성물은 테트라히드로비오테린의 1 내지 20배의 부피의 아세토나이트릴을 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 7] (a) 검체로부터 채취한 테트라히드로비오테린을 포함하는 시료에 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물을 처리하여 테트라히드로비오테린을 안정화하는 단계;  
(b) 상기 시료를 액체 크로마토그래피(LC)의 컬럼에 주입하는 단계;  
(c) 액체 크로마토그래피의 이동상을 흘려주어 테트라히드로비오테린을 분리하는 단계; 및  
(d) 분리된 테트라히드로비오테린을 질량분석기로 분석하는 단계를 포함하는 테트라히드로비오테린의 분석방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 온도를 2 내지 20°C로 유지하는 것인 방법.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 액체 크로마토그래피의 컬럼이 친수성 액상 크로마토그래피 컬럼(HILIC column)인 것인 방법.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서, 상기 이동상은 물, 아세토나이트릴 및 개미산(formic acid)의 혼합용매인 것인 방법.
- [청구항 11] 제 7항에 있어서, 액체크로마토그래피-탠덤 질량분석기(LC-MS/MS)를 이용하는 것인 방법.

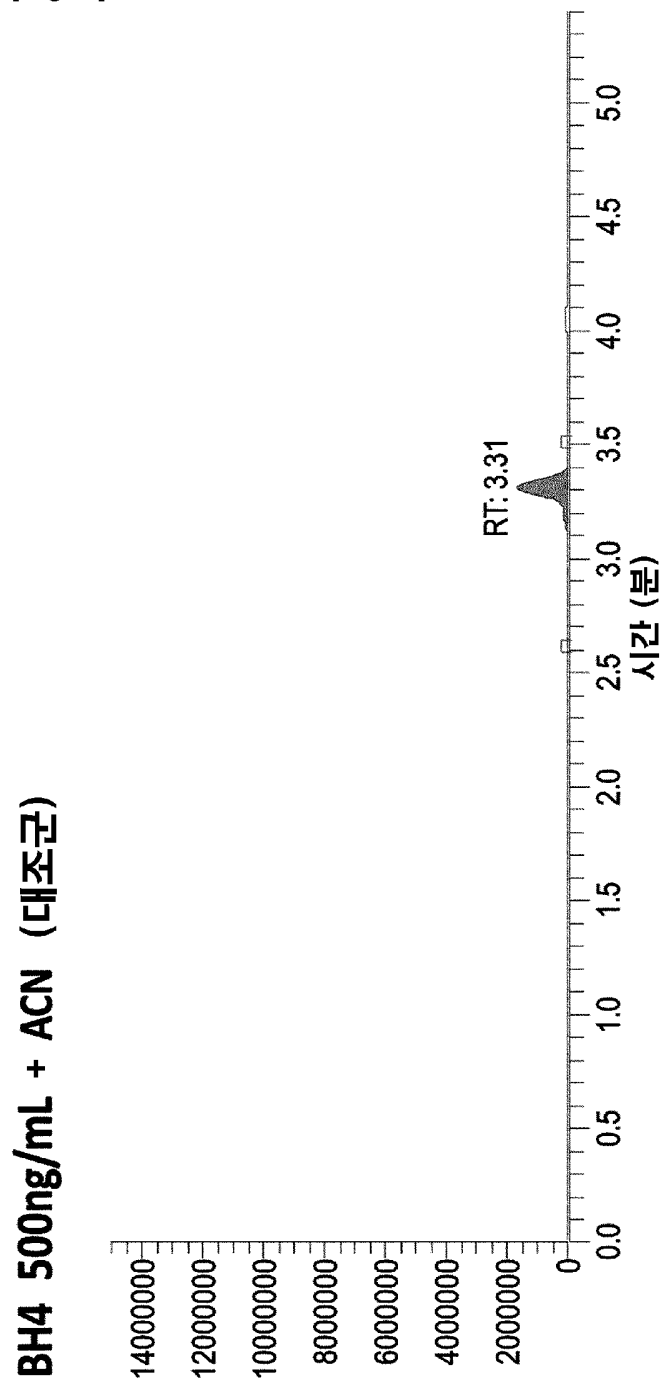
[Fig. 1]



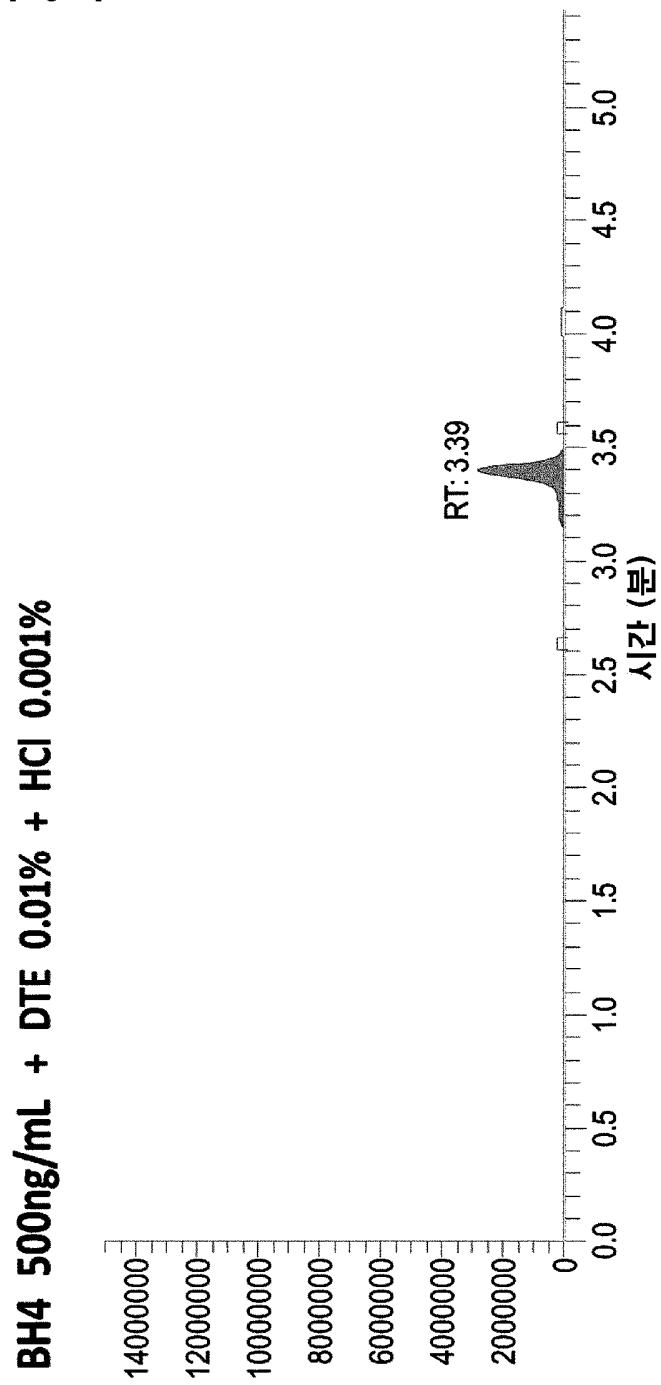
[Fig. 2]



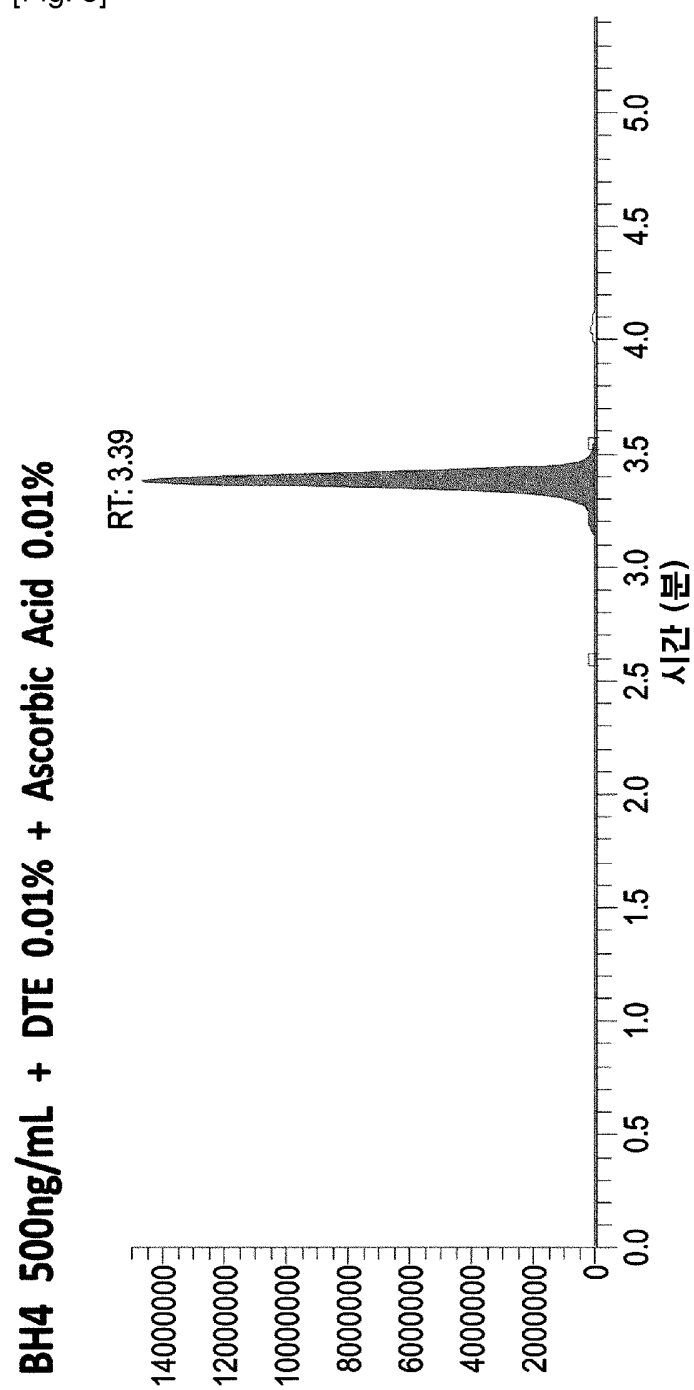
[Fig. 3]



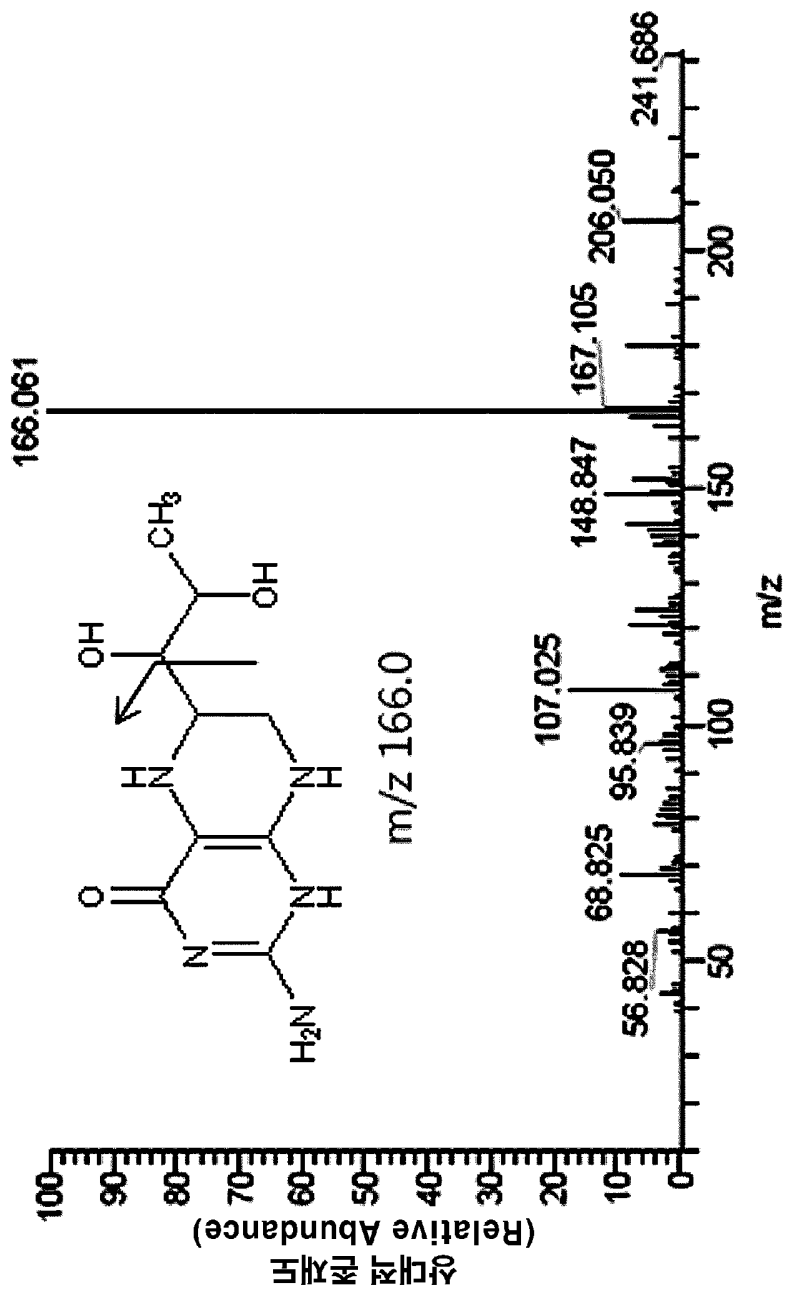
[Fig. 4]



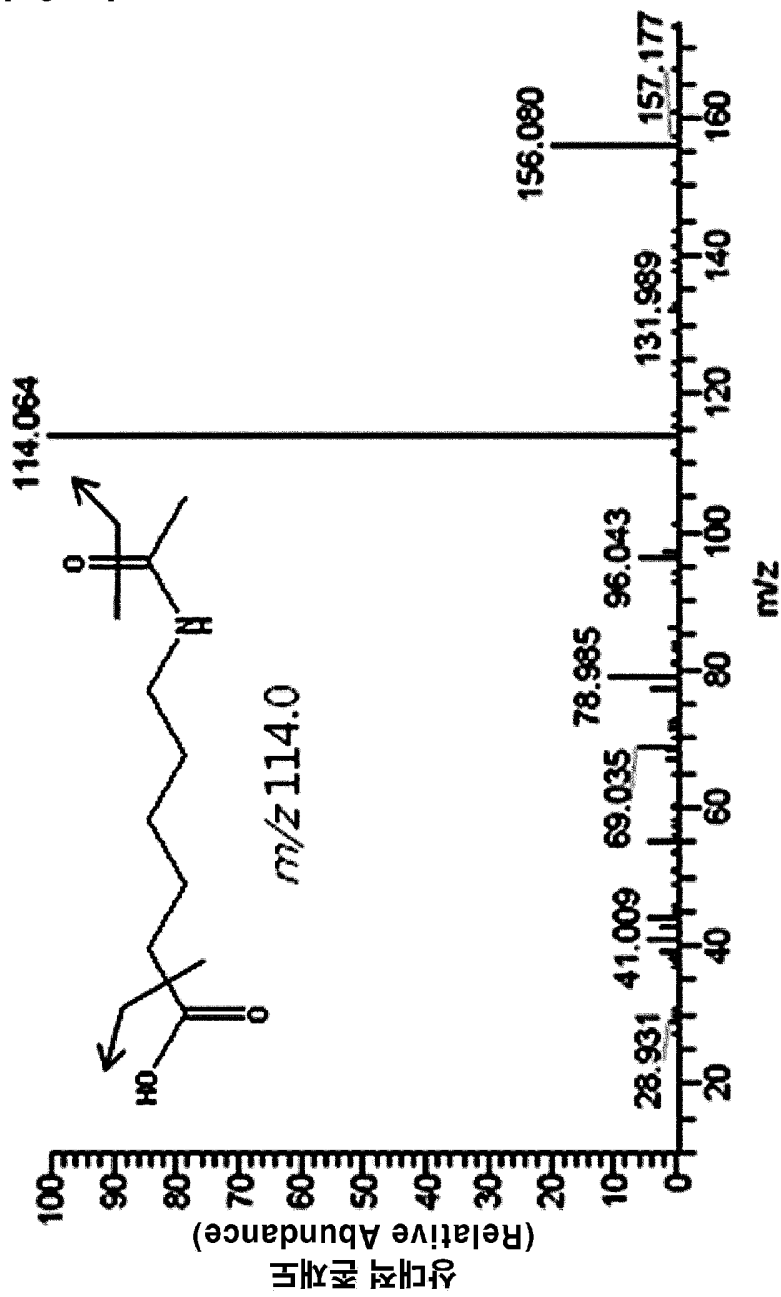
[Fig. 5]



[Fig. 6a]

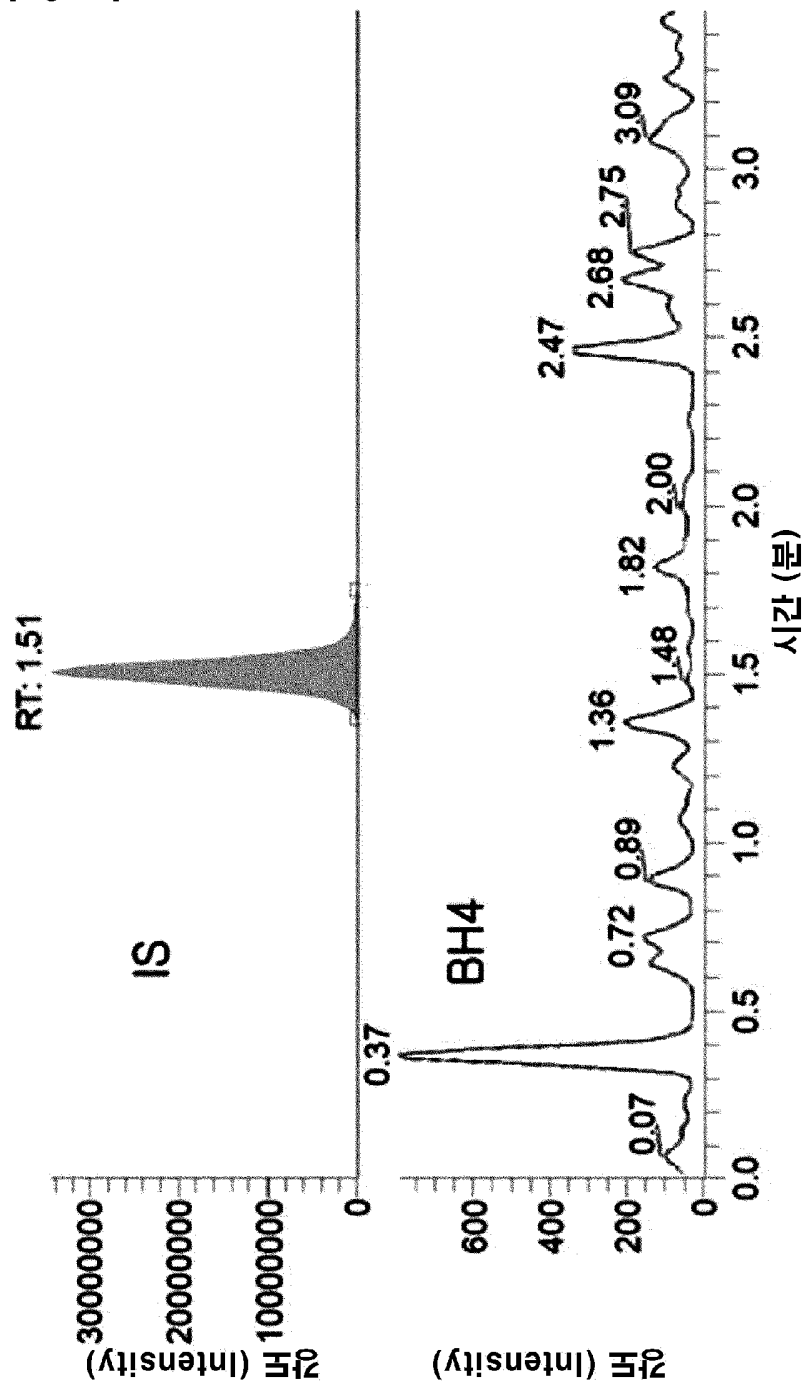


[Fig. 6b]

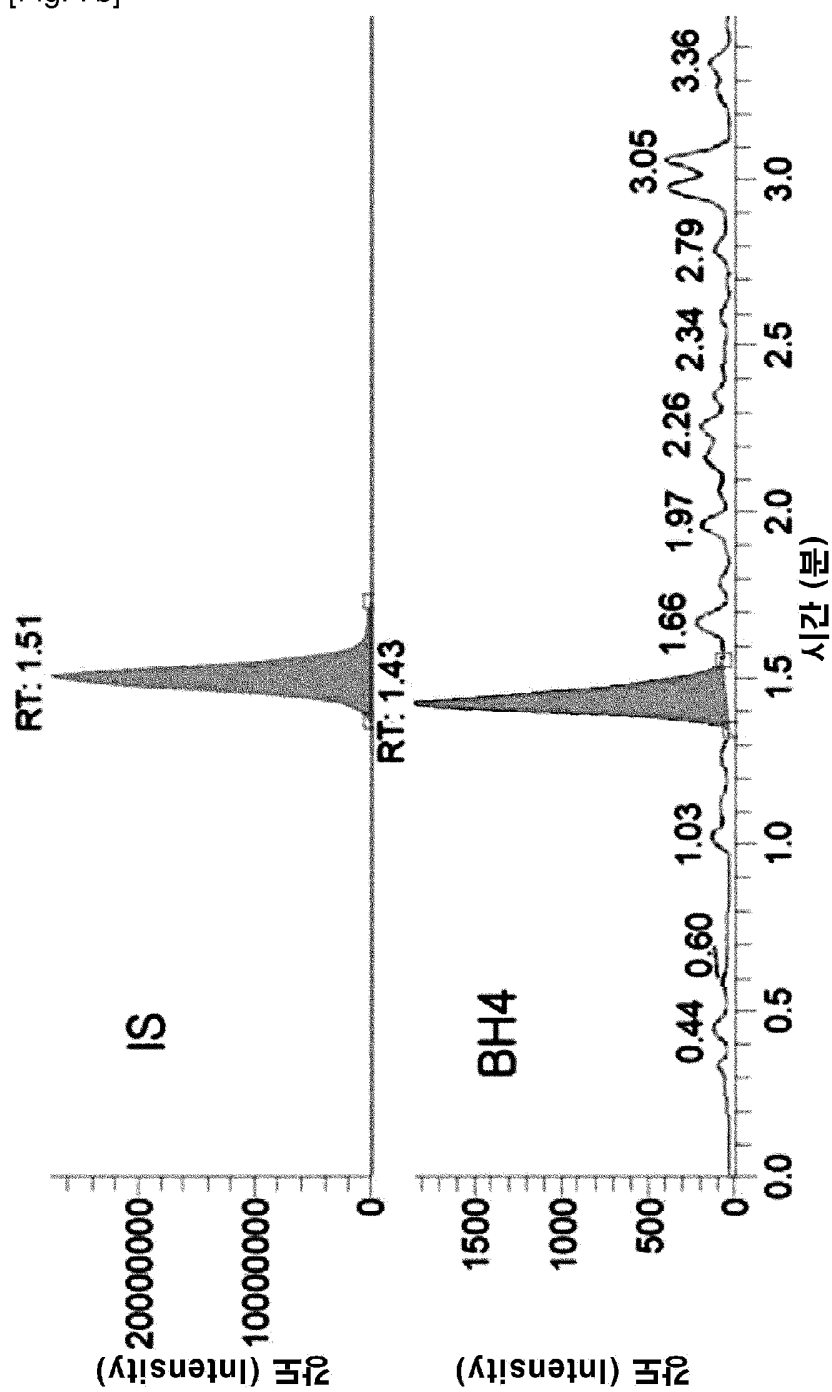




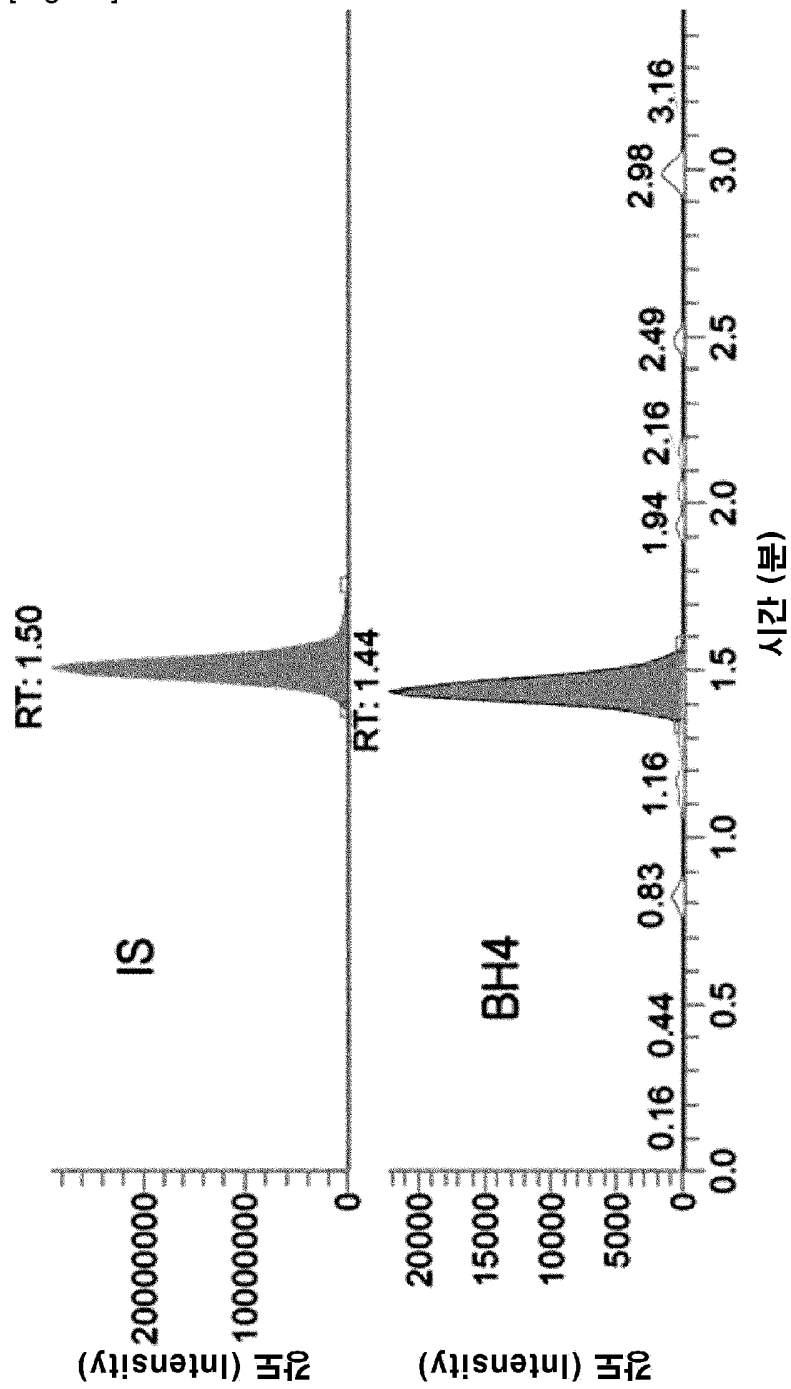
[Fig. 7a]



[Fig. 7b]



[Fig. 7c]



[Fig. 7d]

