

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07D 495/04

(11) 공개번호 10-2005-0065540
(43) 공개일자 2005년06월29일

(21) 출원번호 10-2005-7004021

(22) 출원일자 2005년03월09일

번역문 제출일자 2005년03월09일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2003/009973

(87) 국제공개번호 WO 2004/022565

국제출원일자 2003년08월06일

국제공개일자 2004년03월18일

(30) 우선권주장 JP-P-2002-00263414 2002년09월09일 일본(JP)
JP-P-2003-00190637 2003년07월02일 일본(JP)

(71) 출원인 도꾸리쓰교세이호징 가가꾸 기쥬쓰 신키 기꼬
일본 사이따마켄 가와구찌시 혼쇼 4쵸메 1방 8고
고쿠리츠 다이가쿠 호우진 카고시마 다이가쿠
일본, 890-8580 카고시마 카고시마-시 고리모토 1-21-24

(72) 발명자 슈다, 야수오
일본, 890-0005, 카고시마, 카고시마시 시모이시키, 1-13-1-106
아라노, 아키오
일본, 457-0817, 아이치 나고야시, 미나미쿠 모토시바타니시마치, 3-1-3-612
하야시, 히데키
일본, 771-0130, 토쿠시마, 토쿠시마-시, 와와우치-초, 카가수노, 463-30, E-310
큐슈모토, 소이치
일본, 562-0041, 오사카, 미누시, 사쿠라, 4-15-6-209
소벨, 마이클
미국, 윌링턴 98112, 이스트 시애틀, 피치 코트 1624

(74) 대리인 이세진
김성남

심사청구 : 있음

(54) 다용도형 링커 화합물 및 리간드, 그리고 그 제조방법

명세서

기술분야

본 발명은 칩 테크놀로지나 크로마토그래피, 바이오프로브 등에서 당을 사용할 때, 당의 도입을 적합하고 효율적으로 하기 위해 사용되는 다용도형 링커 화합물 및 그 다용도형 링커 화합물에 당을 도입하여 이루어지는 리간드, 리간드 담체, 그리고 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

생체 내에 존재하는 여러 가지 당은 특정한 단백질과 상호작용하여, 생물의 활동이나 생명을 유지하기 위한 메커니즘 속에서 중요한 역할을 수행하고 있다. 그 때문에, 당과 단백질의 상호작용을 조사하는 것은 당의 생물활성을 조사함에 있어서 중요하다.

당과 상호작용하는 단백질은 예를 들면, 이하의 방법에 의해 검출된다. 즉, 표면 플라즈몬 공명(이하, SPR이라 기재한다)법에 의하면, 표면에 당이 고정되어 있는 센서 칩을 사용하여 그 당과 단백질의 생화학적 결합을 조사할 수 있다. 그리고 친화성 크로마토그래피의 담체에 당을 고정화시키면, 당과 특이적으로 상호작용하는 단백질을 분리 정제할 수 있다. 또한, 유전공학에서 사용되는 바이오프로브로서 당을 사용하면, 당과 상호작용하는 단백질을 검출할 수 있다.

본 발명자들은 지금까지 「일본화학회 제79회 춘계연회-강연예고집Ⅱ, 사단법인 일본화학회, 2001년 3월 15일, p.1042」에 개시되어 있는 바와 같이, 상기 SPR의 센서칩이나 친화성 크로마토그래피의 담체 등의 단백질 분석용의 지지체에 여러 가지 올리고당을 한 단계로 도입하여 고정 가능한 링커 화합물 및 그 링커 화합물에 올리고당을 도입하여 이루어지는 리간드를 발견하였다.

상기 링커 화합물은 방향족 아민 부위와 비오틴 부위를 가지고 있다. 이 중, 상기 방향족 아민 부위는 올리고당을 도입하기 위해 사용된다. 그리고, 상기 비오틴 부위는 비오틴-스트렙토아비딘(또는 아비딘) 결합을 이용하여, 단백질 분석용 지지체 표면에 고정화하기 위해 사용된다. 따라서 상기 링커 화합물을 통합함으로써, 올리고당을 단백질 분석용 지지체에 고정화할 수 있다.

그런데, 올리고당은 1분자만으로는 활성이 그다지 높지 않기 때문에 올리고당의 생물활성을 평가할 경우에는 통상, 상기 단백질 분석용 지지체에 3단위 이상의 올리고당을 집합화시켜 도입하는 것이 필요하게 된다. 그래서, 상기 링커 화합물을 통해, 올리고당을 상기 지지체에 고정화할 경우에는, 상기 링커 화합물에 당이 도입되어 이루어지는 리간드를 상기 지지체 표면에 집합화시키므로써, 3단위 이상의 올리고당을 집합화시키지 않으면 안된다.

또한, 당 고리의 집합화 및 그 링커 합성법에 관해, 일본특허 공개공보 2002-080488호(2002년 3월 19일 공개)에 개시되어 있다. 또, 당 고리의 고정화방법 및 그 링커, 그리고 당 고리 리간드 합성법에 관해서는 일본특허 공개공보 2003-83969호(2003년 3월 19일 공개)에 개시되어 있다. 그리고 칩에 고정화된 당 고리와 단백질의 상호작용의 표면 플라즈몬 공명법을 사용한 해석에 관해서는 「H.Mach, D.B.Volkin, C.J.Burke, C.R.Middaugh, R.J.Linhardt, J.R.Fromm, D.Loganathan, Biochemistry, 32, 5480-5489(1993)」에 개시되어 있다. 또한, 당 고리를 집합화한 분자의 효과에 관해서는 「Eric K.Wollker and Mary J.Cloninger, Org.Lett., 4, 7-10(2000)」에 개시되어 있다. 또한, 당 고리의 집합방법에 관해서는 「K.Matuura, H.Kitakouji, A.Tsuchida, N.Sawada, H.Ishida, M.Kiso and K.Kobayashi, J.Am.Chem.Soc., 122, 7406-7407(2000)」와 「S.Koshida, Y.Suda, Y.Fukui, J.Ormsby, M.Sobel, S.Kusumoto, Tetrahedron Lett., 40 5725-5728(1999)」에 개시되어 있다. 또한, 다용도형 링커 분자의 합성방법에 관해서는 「D.H.Tomalía, H.Barker and J.Roeck, Polymer.Journal., 17, 117-132(1985)」와 「Christof Wornner and Rolf Mulhaupt, Angew.Chem.Int.Ed.Engl., 32, 1306-1311(1993)」에 개시되어 있다.

그러나 상기 종래의 링커 화합물을 포함하여 이루어지는 리간드를 사용했을 경우, 올리고당의 당 고리를 센서칩 표면에 2차원적으로 집합화시켜 배열시키는 것은 가능하나, 그 집합상태를 제어하여 재현성있게 배열시키는 것이 곤란하다는 기술적 과제가 남겨져 있다.

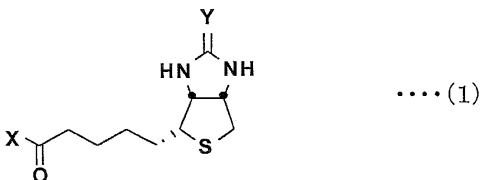
즉, 단백질 분석용 지지체 표면에 고정화된 올리고당을 사용하여 그 올리고당의 생물활성을 정밀도 있게 관측하기 위해서는, 올리고당의 당 고리의 집합상태를 동일하게 하고, 올리고당과 단백질 간의 상호작용을 재현성 있게 관측하는 것이 요구된다. 그러나 상기 종래의 리간드를 사용했을 경우, 3단위 이상의 올리고당의 당 고리의 집합상태는 리간드의 집합상태에 의존하게 되어, 3단위 이상의 올리고당의 당 고리의 집합상태를 항상 동일하게 할 수 없을 가능성이 있다. 올리고당의 당 고리의 집합상태가 다르면, 관측되는 올리고당과 단백질의 상호작용도 다르게 되어 올리고당의 생물활성을 재현성 있게 평가하는 것이 곤란해진다.

본 발명은 상기의 과제를 해결하기 위해 이루어진 것으로서, 그 목적은 단백질 분석용 지지체 상에 당을 재현성 있게 2차원적으로 배열할 수 있는 신규의 다용도형 링커 화합물 및, 그 링커 화합물에 당 분자가 도입되어 이루어지는 신규의 리간드, 리간드 담체, 그리고 그 제조방법, 나아가 이들을 이용하여 당 분자와 다른 물질과의 상호작용을 측정하는 방법을 제공하는 데 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토한 결과, 4단위 이상의 당 분자를 도입 가능한 부위로서 네 개의 방향족 아미노기를 가지며, 또한, 당 분자와 특이적으로 상호작용하는 단백질의 검출과 분리를 행할 때에 사용되는 단백질 분석용 지지체에 결합 가능한 부위로서 비오틴 부위 또는 이미노 비오틴 부위(이하, 비오틴 부위와 총칭하여 기재한다)를 갖는 신규의 다용도형 링커 화합물을 사용함으로써, 상기 지지체에 4단위 이상의 당 분자를 재현성 있게 2차원적으로 배열시킬 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

즉, 본 발명의 다용도형 링커 화합물(이하, 링커 화합물이라 기재한다)은 상기 과제를 해결하기 위해, 일반식(1)



(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 갖는다)에 나타내는 구조를 가지며, 상기 X는 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 동시에 주쇄에 탄소-질소 결합을 가질 수도 있는 탄화수소 유도쇄를 4쇄 포함하여 이루어지는 다분기(多分岐) 부위의 구조를 구비하고 있는 것을 특징으로 하고 있다.

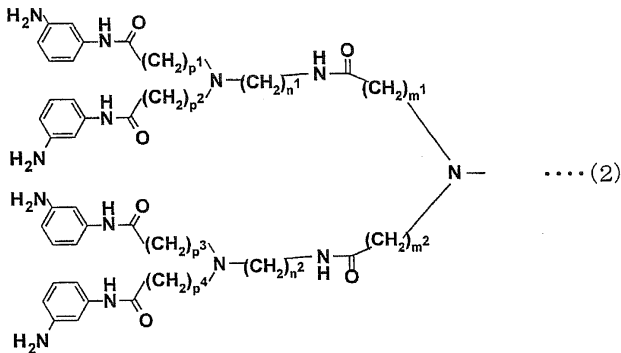
상기 탄화수소 유도쇄란 탄소 및 수소로 된 탄화수소쇄에서, 일부의 탄소와 수소가 다른 원자와 치환기로 치환되어 있을 수도 있는 것을 가리키는 것으로 한다. 즉, 상기 탄화수소 유도쇄란 말단에 방향족 아미노기를 가지며, 탄화수소쇄의 주쇄 구조인 탄소-탄소결합(C-C결합)의 일부가 탄소-질소결합(C-N결합), 탄소-산소결합(C-O결합) 또는 아미드결합(CO-NH결합)으로 치환되어 있을 수도 있음을 가리킨다.

상기 구성에 의하면, 상기 링커 화합물은 상기 단백질 분석용 지지체에 고정화 가능한 부위로서 비오틴 부위를 가지고 있다. 이 비오틴 부위는 스트렙토아비딘 또는 아비딘(이하, 아비딘이라 총칭하여 기재한다)에 높은 친화성을 나타낸다. 그 때문에, 아비딘이 고정화되어 있는 지지체 표면에서 비오틴-아비딘 결합이 형성되므로, 상기 링커 화합물을 상기 지지체 표면 상에 간단히 고정화할 수 있다.

그리고 상기 링커 화합물은 여러 가지 당 분자를 간편하게 도입할 수 있는 부위로서, 방향족 아미노기를 가지고 있다. 상기 방향족 아미노기는 각 탄화수소 유도쇄에 포함되어 있으므로, 상기 링커 화합물에는 4단위 이상의 당 분자를 도입할 수 있다. 또, 도입된 당 분자는 하나의 링커 화합물에 도입되어 있으므로, 도입된 4단위 이상의 당 분자 사이를 소정의 간격으로 유지할 수 있다. 이로써, 상기 링커 화합물을 통해 단백질 분석용 지지체 상에 도입되는 당 분자의 배열을 재현성 있게 얻을 수가 있다.

또한, 상기 링커 화합물을 사용하면, 상기 지지체 표면에 4단위 이상의 당 분자를 집합화시킬 수 있으므로, 당 분자를 재현성 있게 배열시킬 수 있으며, 그로써 당 분자의 충분한 생물활성을 얻을 수가 있다. 이에 의해, 당 분자와 단백질의 상호 작용을 검출하는 것이 가능해지며, 당 분자의 생물활성을 재현성 있게 평가하는 것이 가능해진다.

상기 일반식(1)에 나타난 링커 화합물에 있어서, 상기 X는 일반식 (2)



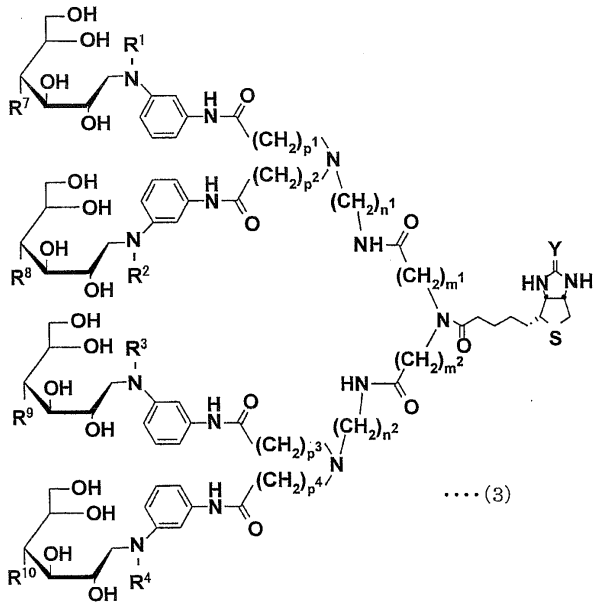
(식 중, $m^1, m^2, n^1, n^2, p^1, p^2, p^3, p^4$ 는 각각 독립적이며, 1 이상 6 이하의 정수)에 나타난 구조를 가지는 것이 바람직하다.

상기 링커 화합물의 X는 상기 탄화수소 유도쇄를 4쇄 가지고 있으므로, 이 링커 화합물을 통해, 상기 지지체 상에 4단위 이상의 당 분자를 도입하는 것이 가능하다. 그 때문에, 상기 링커 화합물을 사용함으로써, 상기 지지체 표면에 도입된 당 분자 간의 간격을 제어하여, 이들 당 분자를 집합화시킬 수 있다. 그 때문에, 상기 지지체 표면에 당 분자의 배열을 재현성 있게 얻을 수가 있다.


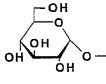
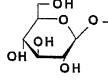
따라서 상기 링커 화합물을 사용함으로써, 재현성 있는 당 분자의 생물활성을 얻는 것이 가능해진다. 이로써, 당 분자의 생물활성을 이용하는 SPR이나 친화성 크로마토그래피, 바이오프로브 등에서 여러 가지 당 분자와 단백질의 특이적 상호 작용을 적합하게 검출하는 것이 가능해진다.

그리고 본 발명의 리간드는 상기 과제를 해결하기 위해, 상기의 어느 하나의 링커 화합물의 방향족 아미노기에 당 분자를 도입하여 이루어지는 것임을 특징으로 하고 있다.

상기 리간드는 구체적으로는, 일반식(3)

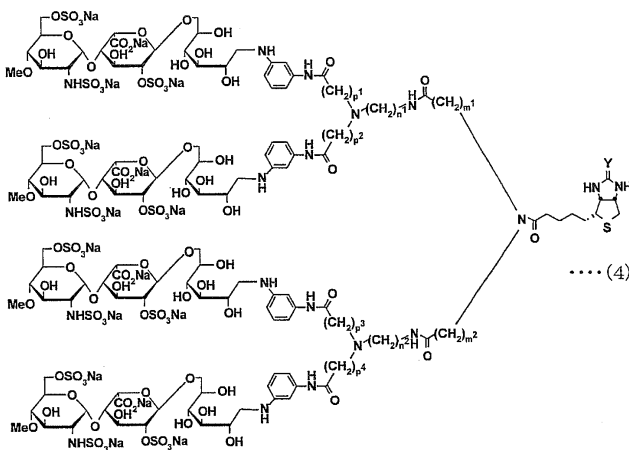


.... (3)

(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 가지며, R¹, R², R³, R⁴는 각각 독립적이며, H- 또는  로 나타내어지는 구조이며, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰은 HO- 또는  또는  로 나타내어지는 구조로 된 군에서 선택되는 구조를 갖는다)

(식 중, m¹, m², n¹, n², p¹, p², p³, p⁴는 각각 독립적이며, 1 이상 6 이하의 정수)에 나타낸 구조를 가지는 것이 바람직하다.

또는, 상기 리간드는 일반식(4)



.... (4)

(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 가지며, m¹, m², n¹, n², p¹, p², p³, p⁴는 각각 독립적이며, 1 이상 6 이하의 정수)에 나타낸 구조를 가지는 것이 바람직하다.

상기 리간드 중 어느 하나를 사용함으로써, 상기 단백질 분석용 지지체 표면에 4단위(일반식(4)에 나타낸 구조를 가지는 리간드의 경우) 또는 4단위 이상(일반식(3)에 나타낸 구조를 가지는 리간드의 경우)의 당 분자를 고정화할 수가 있다. 그리고 하나의 리간드는 4단위 이상의 당 분자를 가지고 있으므로, 상기 지지체 표면에 2차원적으로 4단위 이상의 당 분자를 집합화시킴과 동시에, 재현성 있게 배열시킬 수가 있다. 그 때문에, 상기 리간드를 사용함으로써, SPR이나 친화성 크로마토그래피, 바이오프로브 등에서 여러 가지 당 분자와 단백질의 특이적 상호작용을 효율적으로 검출하는 것이 가능해진다.

그리고 본 발명의 링커 화합물의 제조방법은 상기 과제를 해결하기 위해, 비오틴계 화합물과 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 4쇄 갖는 아민 화합물과의 축합반응을 수행하는 단계와, 상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호하는 단계를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다.

상기 비오틴계 화합물이란 아민 화합물의 2급 아미노기와 반응할 수 있도록 비오틴 구조 또는 이미노 비오틴 구조에 치환기를 도입하여 활성화되어 있는 것을 가리킨다.

상기 방법에 의하면, 아비딘이 고정되어 있는 단백질 분석용 지지체에 고정화가 가능한 비오틴 부위와 당 분자를 간편하게 도입할 수 있는 방향족 아미노기를 가지고 있는 본 발명의 링커 화합물을 얻을 수가 있다.

그리고 본 발명의 리간드의 제조방법은 상기 링커 화합물 중 어느 하나와 당 분자를 사용하여, 환원 아미노화 반응을 수행하는 것을 특징으로 하고 있다.

상기 방법에 의하면, 환원 아미노화 반응에 의해 링커 화합물에 간편하게 당 분자를 도입하여, 본 발명의 리간드를 얻을 수가 있다.

그리고 본 발명의 당 분자의 도입방법은 상기 리간드를 포함하는 용액과 표면에 스트렙토 아비딘 또는 아비딘을 고정화한 지지체를 접촉시키는 것을 특징으로 한다.

상기 방법에 의하면, 상기 리간드(리간드에 포함되는 링커 화합물)의 비오틴 부위 또는 이미노비오틴 부위와 상기 지지체 표면의 스트렙토 아비딘 또는 아비딘을 결합시킴으로써, 지지체 표면에 상기 리간드를 고정화할 수가 있다. 따라서 리간드를 포함하는 용액과 지지체를 접촉시킨다는 간단한 방법으로, 링커 화합물에 결합된 당 분자를 지지체의 표면에 배열시킬 수가 있다.

그리고 본 발명의 리간드 담체는 리간드를 비오틴 부위 또는 이미노 비오틴 부위와, 스트렙토 아비딘 또는 아비딘의 결합인 비오틴-아비딘 결합을 통해 표면에 고정화시켜서 이루어지는 것을 특징으로 하고 있다.

상기 구성에 의하면, 비오틴 부위 또는 이미노 비오틴 부위와 스트렙토 아비딘 또는 아비딘과의 결합인 비오틴-아비딘 결합을 통해, 지지체 표면에 리간드를 공고하게 고정할 수 있으므로, 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당 분자를 재현성 있게 배열시켜서 이루어지는 리간드 담체를 제공할 수가 있다. 따라서 상기 리간드 담체를 사용하면, 리간드에 포함되는 당 분자와, 그 당 분자와 상호작용하는 단백질 등의 물질과의 상호작용을 재현성 있게 관측할 수 있으므로 당 분자의 생물활성의 정량적인 평가가 가능하게 된다.

그리고 본 발명의 표면 플라즈몬 공명의 측정방법은 말단 구조가 다른 당 분자가 도입되어 이루어지는 적어도 두 개의 센서칩을 사용하며, 상기 적어도 두 개의 센서칩은 제 1 당 분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어지는 제 1 센서칩과 상기 제 1 당 분자와는 말단 구조가 다른 제 2 당 분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어지는 제 2 센서칩을 포함하며, 제 1 센서칩을 사용하여 얻어진 검출결과와 제 2 센서칩을 사용하여 얻어진 검출결과와의 차이를 측정하여 당 분자의 상호작용을 측정하는 것을 특징으로 한다.

그리고 본 발명의 표면 플라즈몬 공명의 측정방법은 상기 센서칩에 상기 동일 구조의 링커 화합물을 사용하여 당 분자가 고정화되는 것을 특징으로 한다.

상기 방법에 의하면, 당 분자 이외에는 같은 구조의 리간드를 갖는 적어도 두 개의 센서칩을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)측정을 할 수가 있기 때문에, 적어도 두 개의 센서칩 상호작용의 차이는 당 분자에 기인한 것으로써 관측된다. 따라서 상기 측정방법을 사용하면, 당 분자 이외의 부분과 다른 물질과의 비특이적인 상호작용을 줄이고, 당 분자와 다른 물질과의 특이적 상호작용을 관측할 수가 있다.

본 발명의 또 다른 목적, 특징 및 우수한 점은 이하에 나타난 기재에 의해 충분히 이해할 수 있을 것이다. 그리고 본 발명의 이익은 첨부 도면을 참조한 다음의 설명에서 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에서의 리간드를 도입하기 위해, 아비딘을 고정화시킨 표면 플라즈몬 공명(SPR)의 센서칩을 작성하는 공정을 나타낸 사시도이다.

도 2는 본 발명에 따른 리간드 도입 칩의 사시도이며, (a)는 단백질과의 상호작용이 없는 경우를 나타내고, (b)는 단백질과의 상호작용이 있는 경우를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 리간드의 SPR측정에 사용한 「2-채널해석법」의 모식도이다.

도 4는 본 발명의 리간드 담체를 얻는 공정에서의 SPR측정의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 리간드(Mal-Bio)와 비교예의 리간드(Ace-Ma1)의 상호작용을 나타내는 SPR측정의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 리간드 5.3-Mal 및 8-Glc와, 콘카나발린 A의 상호작용을 나타내는 SPR측정의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명에서의 리간드 담체를 갖는 친화성 칼럼을 작성하는 공정을 나타낸 그림이다.

도 8은 친화성 크로마토그래피의 순서를 나타낸 그림이다.

도 9는 4-Mal과 단백질의 결합에 대한 SDS-PAGE의 결과를 나타낸 그림이다.

실시에

이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명하겠으나, 본 발명은 이들에 의해 어떠한 한정을 받는 것은 아니다.

본 발명의 다용도형 링커 화합물(이하, 링커 화합물)은 올리고당 등의 당(이하, 당 분자라고 기재한다)의 생물활성을 이용하는 SPR이나 친화성 크로마토그래피, 유전 공학에서의 바이오프로브 등과 같이 당 분자와 특이적으로 상호작용하는 단백질의 검출이나 분리를 행할 경우에, 단백질 분석용 지지체에 당 분자의 도입을 적합하게 하기 위해 사용되는 것이다. 그리고 상기 링커 화합물은 단백질과의 비특이적 상호작용을 가지고 있지 않기 때문에, 상기와 같은 단백질의 검출이나 분리에 적합하게 사용할 수가 있다.

즉, 본 발명의 링커 화합물은 구체적으로는, 상기 일반식(1)에 나타낸 바와 같이, 상기 단백질 분석용 지지체에 고정화가 가능한 부위로서, 비오틴 부위 또는 이미노 비오틴 부위(이하, 비오틴 부위라 총칭)를 가지며, 당 분자를 도입 가능한 부위로서, 방향족 아미노기를 가지고 있다.

비오틴 또는 이미노 비오틴(이하, 비오틴이라 총칭)은 염기성의 당 단백질인 스트렙토아비딘 또는 아비딘(이하, 이들을 총칭하여 아비딘이라 기재한다)과 특이적으로 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 그 때문에, 아비딘이 고정화되어 있는 지지체 표면에, 비오틴 부위를 갖는 상기 링커 화합물을 접촉시키면, 비오틴-아비딘 결합이 형성되어 상기 링커 화합물을 상기 지지체 표면에 간단히 고정화할 수가 있다.

그리고 상기 링커 화합물은 상기 일반식(1)에 X로 나타내어진 구조를 가지고, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 동시에 주쇄에 탄소-질소 결합을 가질 수도 있는 탄화수소 유도쇄를 4쇄 포함하여 이루어지는 다분기 부위를 가지고 있다. 이 다분기 부위에 포함되는 방향족 아미노기의 아미노기(-NH₂기)는 당 분자 중의 평행에 의해 생기는 알데히드기(-CHO기) 또는 케톤기(-CR'O기, R'는 탄화수소기)와 반응한다. 그리고 이 반응에 의해 형성된 슈프염기(Schiff base)를 계속 환원함으로써, 방향족 아미노기에 당 분자가 도입되게 된다. 상기 X는 네 개의 방향족 아미노기 말단을 가지고 있으므로, 상기 링커 화합물에는 후술하는 바와 같이, 4단위 이상의 당 분자를 도입할 수가 있다.

상기 X는 구체적으로는, 상기 일반식(2)에 나타낸 바와 같이, 2쇄의 탄화수소 유도쇄가, 방향족 아미노기와는 반대쪽의 말단에서, 하나의 질소(N)에 결합한 2분기 구조를 두 개 가지고 있다. 그리고 이 두 개의 2분기 구조의 상기 질소가 -CO-(CH₂)_m-(여기서, m은 1~6의 정수이다)을 통해, 하나의 질소(N)에 결합함으로써 다분기 구조를 형성하고 있다. 또한, 상기 일반식(2)에 있어서, m¹, m²는 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 서로 같은 정수일 수도 있다. 이 중, 제조의 간편성이라는 점에서, m¹, m²는 서로 같은 정수인 것이 바람직하며, 특히 2인 것이 바람직하다. 그리고 n¹, n²는 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 서로 같은 정수일 수도 있다. 이 중, 제조의 간편성이라는 점에서 n¹, n²는 서로 같은 정수인 것이 바람직하며, 특히 2인 것이 바람직하다. 그리고 p¹~p⁴는 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 일부 또는 전부가 같은 정수일 수도 있다. 이 중, 상기 다분기 부위를 갖는 화합물의 제조시의 간편함이라는 점에서, 상기 p¹~p⁴는 서로 같은 정수인 것이 바람직하며, 특히 2인 것이 바람직하다.

이와 같이, 상기 X는 탄소나 질소 등의 원자에서 상기 탄화수소 유도쇄를 복수 결합하여 분기구조를 형성하고 있는 다분기 부위의 구조를 구비하고 있다. 또한, 상기 X에 포함되는 복수의 탄화수소 유도쇄는 모두 동일한 것이 바람직하나, 말단에 방향족 아미노기를 가지고 있다면, 서로 다른 구조를 가질 수도 있다.

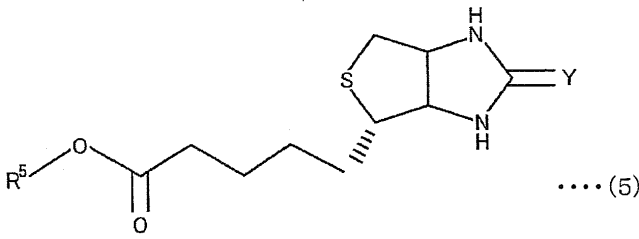
이상과 같이, 일반식(1)에 나타내어진 구조를 가지고 있는 링커 화합물은 비오틴 부위와 방향족 아미노기 말단을 가지고 있다. 이로써, 상기 링커 화합물을 통해, 상기 단백질 분석용 지지체 상에 당 분자를 공고하고 간단하게 결합시킬 수가 있다.



그리고 상기 링커 화합물은 다분기 부위를 가지며, 그 다분기 부위의 각 말단에 방향족 아미노기를 가지고 있다. 그 때문에, 상기 링커 화합물에 당 분자를 도입하여 이루어지는 리간드(후술)를 사용함으로써, 상기 지지체 표면에 효율적으로 4단위 이상의 당 분자를 집합화시킬 수가 있다. 또, 하나의 링커 화합물에는 4단위 이상의 당 분자를 도입할 수 있으므로, 상기 리간드를 지지체 표면에 결합시켰을 경우에, 복수의 당 분자를 재현성 있게 배열시킬 수가 있다.

또한, 상기 링커 화합물은 단백질과의 비특이적 상호작용의 영향을 거의 무시할 수가 있다. 그 때문에, 본 발명의 링커 화합물을 사용함으로써, 당 분자의 생물학적 활성을 재현성 있게 평가하는 것이 가능해진다.

상기 링커 화합물은 이하에 나타내는 제조방법에 의해 제조된다. 즉, 상기 링커 화합물은 비오틴계 화합물과 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 4쇄 갖는 아민 화합물과의 축합반응을 수행하며, 이후, 상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호함으로써 제조된다.

상기 비오틴계 화합물로는 하기 일반식(5)



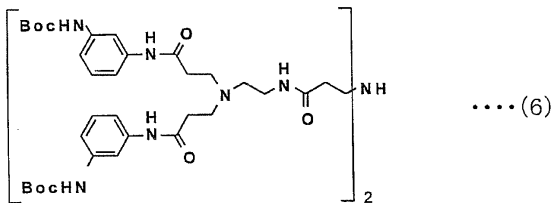
(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 가지며, R⁵는  기(Pfp) 또는  기(Su)로 나타내어지는 구조를 갖는다)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 화합물을 들 수 있다. 상기 비오틴계 화합물은 펜타플로로페닐기(Pfp) 또는 숙신이미드기(Su)를 갖는 에스테르 화합물이다. 그 때문에, 상기 비오틴계 화합물은 이들 치환기에 의해 활성화되어 있으므로, 아민 화합물의 2급 아미노기(-NH기)와 반응할 수 있다.

그리고 상기 아민 화합물은 2급 아미노기와 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 갖는 분기쇄를 포함하고 있다면 특별히 한정되는 것은 아니며, 상기 링커 화합물의 다분기 부위(일반식(1)의 X)에 상당하는 구조를 가지고 있으면 된다.

따라서 상기 분기쇄는 상기의 탄화수소 유도쇄에 포함되는 방향족 아미노기 대신에, 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 갖는 것 외에는, 상기 탄화수소 유도쇄에 포함되는 구조를 가지고 있으면 된다. 즉, 상기 분기쇄는 탄소 및 수소로 된 탄화수소쇄에 일부의 탄소나 수소가 다른 원자나 치환기로 치환되어 있을 수도 있는 것이다. 보다 구체적으로는, 상기 분기쇄는 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 가진과 동시에, 탄화수소쇄의 주쇄 구조인 탄소-탄소 결합(C-C결합)의 일부가 탄소-질소 결합(C-N결합)일 수도 있는 것이다.

그리고 상기 보호기란 방향족 아미노기의 아미노기가 상기 축합반응에 의해 반응하지 않도록 도입되는 치환기이다. 이와 같은 보호기는 2급 아미노기의 보호기를 탈보호할 때에 영향을 받지 않는 것이라면, 특별히 한정되는 것은 아니다. 상기 보호기로는 예를 들면, t-부톡시카르보닐기(-COOC(CH₃)₃기; Boc기라 기재한다), 벤질기, 아틸카르바메이트기(-COOCH₂CH=CH₂, Alloc기) 등을 들 수가 있다.

상기 아민 화합물로는 예를 들면, 하기 일반식(6)



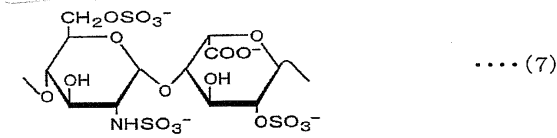
로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 화합물을 들 수 있다. 또한, 이 아민 화합물의 합성방법에 대해서는 후기의 실시예에서 상술한다.

상기 비오틴계 화합물과 아민 화합물의 축합반응에 의해 비오틴계 화합물의 Pfp나 Su 등의 치환기와 아민 화합물의 2급 아미노기가 축합하여 아미드 결합이 형성된다. 이후, 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호하여 보호기를 분리하고, 방향족 아미노기로 함으로써, 상기의 링커 화합물을 얻을 수가 있다.

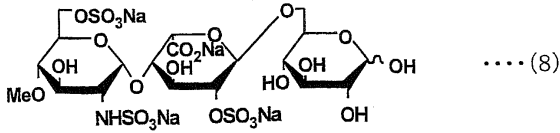
다음으로, 상기 링커 화합물의 방향족 아미노기에 당 분자가 도입되어 이루어지는 리간드에 대해 설명한다. 본 발명의 리간드는 링커 화합물의 아미노기가 당 분자 중의 평형에 의해 발생하는 알데히드기 또는 케톤기와 반응하여, 이 반응에 의해 형성된 쉬프염기를 계속해서 환원함으로써, 방향족 아미노기에 당 분자가 도입되게 된다.

본 발명의 리간드에 포함되는 당 분자는 환원당이라면 특별히 한정되지 않는다. 당 분자로는 예를 들면, 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스 등의 단당류, 결합하고 있는 당의 수가 2당~10당인 말토오스, 락토오스, 후술의 황산화 올리고당 등의 올리고당류, 단당류나 올리고당류가 조합되어 당 수가 11이상인 헤파린, 콘드로이친 황산, 헤파란 황산 등의 다당류를 들 수 있다.

그리고 상기 올리고당류로서, 항혈액응고 활성을 갖는 것으로 알려져 있는 황산화 다당헤파린 중의 하기 일반식(7)



로 나타내어지는 특정의 부분 2당 구조(GlcNS6S-IdoA2S)를 갖는 황산화 올리고당이나 그 황산화 올리고당의 환원 말단에 글루코오스를 결합시켜 이루어지는 하기 일반식(8)



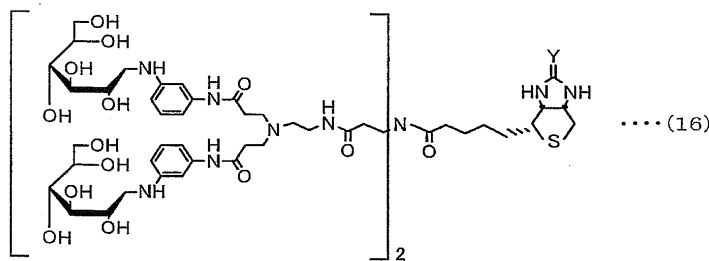
로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 올리고당을 들 수 있다.

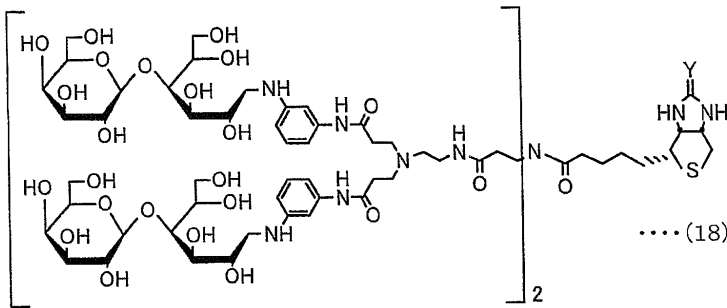
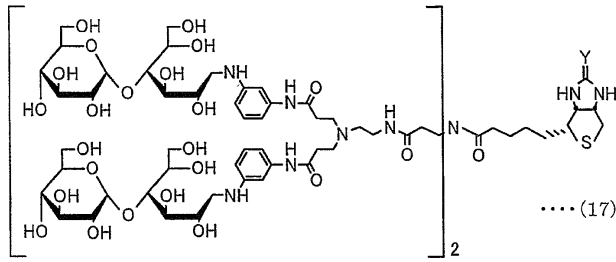
또한, 상기 올리고당류나 다당류는 동일한 단당분자로 된 단일 올리고당이나 단일 다당일 수도 있고, 여러 단당 분자나 그 유도체로 된 복합당질이나, 여러 단당 분자나 그 유도체, 올리고당류를 포함하여 이루어지는 복합 다당류일 수도 있다. 그리고 상기 당 분자는 어느 것이나, 자연계에서 단리 정제되어 얻어지는 여러 천연 당일 수도 있고, 인공적으로 합성된 당일 수도 있다.

본 발명의 리간드는 구체적으로는 상기 일반식(3)으로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 것이다. 이 일반식(3)으로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드는 상기 일반식(1)로 나타내어지며, X가 상기 일반식(2)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 링커 화합물에 당 분자로써 글루코오스 또는 말토오스 또는 락토오스를 도입하여 이루어지는 것이다. 일반식(2)로 나타내어지는 X는 4개의 탄화수소 유도체를 포함하는 구조를 가지고 있다. 상기 각 탄화수소 유도체의 방향족 아미노기에는 1단위 또는 2단위의 당 분자를 도입할 수가 있다. 그 때문에, 일반식(3)으로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드는 상기 링커 화합물에 4단위 이상 8단위 이하의 당 분자가 결합한 것이 된다. 또한, 상기 일반식(3)에 있어서, m¹, m²는 일반식(2) 중의 m¹, m²와 마찬가지로, 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 서로 같은 정수일 수도 있다. 그리고 n¹, n²는 일반식(2) 중의 n¹, n²와 마찬가지로, 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 서로 같은 정수일 수도 있다. 그리고 p¹~p⁴는 일반식(2) 중의 p¹~p⁴와 마찬가지로, 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 일부 또는 전부가 같은 정수일 수도 있다.

상기 링커 화합물의 탄화수소 유도체의 방향족 아미노기에 도입되는 당 분자로는 글루코오스, 말토오스, 락토오스로 된 군에서 선택된 하나 이상의 당 분자를 예로 들 수가 있다. 따라서 일반식(3)으로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드는 일반식(3)의 R⁷~R¹⁰의 구조에 따라, 상기 링커 화합물에 글루코오스, 말토오스, 락토오스로 된 군에서 선택된 당 분자가 4단위 이상 8단위 이하 도입되어 있는 구조를 가지고 있다.

또한, 상기 링커 화합물의 탄화수소 유도체의 각 방향족 아미노기에 도입되는 당 분자는 서로 다를 수도 있고, 일부 또는 전부가 같을 수도 있으나, 당 분자의 도입의 간편성이라는 점에서, 모두 같은 것이 바람직하다. 그 때문에, 예를 들면 일반식(3)에서의 m¹, m², n¹, n², p¹, p², p³, p⁴가 모두 2로, 링커 화합물에 4단위의 당 분자가 도입될 경우에, 당 분자가 글루코오스라면 하기 일반식(16)으로 나타내어지는 리간드가 바람직하다. 마찬가지로, 4단위의 당 분자가 도입될 경우에 당 분자가 말토오스라면 하기 일반식(17)로 나타내어지는 리간드가 바람직하며, 당 분자가 락토오스라면 하기 일반식(18)로 나타내어지는 리간드가 바람직하다.





일반식(16)~(18) 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 갖는다.

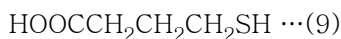
그리고 본 발명의 다른 리간드는 상기 일반식(4)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 것이다. 이 일반식(4)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드는 상기 일반식(1)로 나타내어지며, X가 상기 일반식(2)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 링커 화합물에 상기 일반식(8)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 당 분자를 도입하여 이루어지는 것이다. 일반식(2)로 나타내어지는 X는 4개의 탄화수소 유도쇄를 포함하는 구조를 가지고 있으므로, 일반식(4)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드는 상기 링커 화합물에 4단위의 당 분자가 결합한 것이 된다. 또한, 상기 일반식(4)에 있어서 m^1 , m^2 는 일반식(2) 중의 m^1 , m^2 와 마찬가지로, 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 서로 같은 정수일 수도 있다. 그리고 n^1 , n^2 는 일반식(2) 중의 n^1 , n^2 와 마찬가지로, 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 서로 같은 정수일 수도 있다. 그리고 $p^1 \sim p^4$ 는 일반식(2) 중의 $p^1 \sim p^4$ 와 마찬가지로, 1 이상 6 이하의 정수라면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수일 수도 있고, 일부 또는 전부가 같은 정수일 수도 있다.

상기 리간드는 어느 것이나 링커 화합물과 당 분자를 포함하여 이루어져 있으므로, 링커 화합물 내의 비오틴 부위에 아비딘을 가지고 있는 단백질 분석용 지지체와 비오틴-아비딘 결합에 의해 결합할 수가 있다. 이로써, 상기 비오틴-아비딘 결합을 통해, 상기 지지체 표면에 4단위 당 분자를 집합화하여 고정화되어 이루어지는 리간드 담체를 제공할 수가 있다. 따라서 상기 리간드를 사용함으로써, 예를 들면 단백질 분석용 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당 분자를 재현성 있게 배열하여 리간드 담체를 얻고, 그 리간드 담체를 사용함으로써, 당 분자의 생물활성을 재현성 있게 평가하는 것이 가능해진다. 그 때문에, 본 발명의 리간드는 SPR이나 친화성 크로마토그래피, 바이오프로브 등에 여러 당 분자를 간단하게 도입하기 위해 적절하게 사용할 수가 있다.

이와 같이, 본 발명의 리간드를 비오틴-아비딘 결합을 통해 지지체의 표면에 고정화시켜 이루어지는 리간드 담체도 본 발명에 포함된다. 이 리간드 담체는 단백질 분석의 용도에 한정되지 않고, 당 분자와의 상호작용을 조사하기 위한 단백질 이외의 물질의 분석 용도로서 사용할 수도 있다.

상기 리간드는 그 리간드를 포함하는 리간드 용액에 아비딘을 고정화시킨 단백질 분석용 지지체를 소정 시간 침지하거나, 또는 상기 지지체에 리간드용액을 주입함으로써, 상기 지지체 표면에 도입할 수 있으며, 상기 지지체 표면에 4단위 이상의 당 분자를 집합화하여 고정화되어 이루어지는 리간드 담체를 제공할 수가 있다.

예를 들면, SPR의 센서칩에 상기 리간드를 도입하여 이루어지는 리간드 담체를 얻을 경우에는 우선, 아비딘을 고정화시킨 센서칩을 제조한다. 즉, 도 1(a)에 나타낸 바와 같이, 표면에 금(Au)이 코팅된 유리기판(1)을 사용한다. 이어서, 도 1(b)에 나타낸 바와 같이, 하기 일반식(9)



로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 4-티오락산을 금-유황 결합(Au-S결합)을 이용하여, 유리기판(1) 상에 고정화시킨다. 또한, 이 4-티오락산을 고정화시킨 유리기판(1) 대신, 카르복실기를 갖는 폴리머가 입혀진 기판을 사용할 수도 있다.

이어서, 도 1(c)에 나타낸 바와 같이, 카르보다이미드 시약의 존재 하에, 유리기관(1) 상에 고정된 4-티오락산과 N-히드록시 숙신이미드를 반응시킨다. 이후, N-히드록시숙신이미드 부위와 아비딘(2)이 갖는 말단 아미노기를 축합시키고, 도 1(d)에 나타낸 바와 같이, 아비딘(2)을 유리기관(1) 상에 고정화시킨다. 이로써, 아비딘을 유리기관(1) 상에 고정시킨 센서칩이 얻어진다.

다음으로, 이 센서칩을 본 발명의 리간드가 포함된 리간드용액에 접촉시킨다. 구체적으로는, 상기 센서칩을 리간드용액에 침지시키거나, 또는 센서칩 표면에 리간드용액을 흐르게 한다. 이로써, 특이적 상호작용으로써 알려져 있는 비오틴-아비딘 결합에 의해, 도 2(a)에 나타낸 바와 같이, 상기 센서칩 상에 리간드(3)를 고정화시킨 리간드 담체(4)를 얻을 수가 있다.

또한, 리간드용액에 사용하는 용매로는 특별히 한정되는 것은 아니나, 예를 들면 PBS(인산 완충용액) 등의 완충용액을 들 수 있다. 리간드용액에 침지할 경우의 침지시간은, 0.5시간~1.5시간 정도면 된다. 그리고 리간드용액을 주입할 경우의 주입량은 0.006mg~0.06mg정도면 된다.

상기와 같이, 리간드(3)를 고정화시켜 이루어지는 리간드 담체(4)를 사용하여 그 리간드 담체와 단백질(5)을 접촉시키고(도 2(b)), 통상의 방법에 따라, 표면 플라즈몬 공명장치를 사용하여 공명각도를 측정하면, 그 리간드 담체(4)와 단백질(5)의 결합동작을 관측할 수 있다. 또한, SPR측정에 사용하는 센서칩으로는, 예를 들면 유리, 플라스틱 등을 사용할 수 있으며, 특히 유리가 적절하게 사용된다. 그리고 리간드 담체와 단백질의 접촉은 예를 들면, 단백질을 런닝 버퍼에 용해시킨 용액을 그 리간드 담체의 표면에 유입시키거나, 또는 상기 단백질을 런닝 버퍼에 용해시킨 용액 중에 상기 리간드 담체를 침지시키는 것에 의해 실시하면 된다. 이 런닝 버퍼로는 예를 들면 PBS 등의 완충용액을 들 수 있다.

그리고 예를 들면 친화성 크로마토그래피에 사용하는 친화성 컬럼으로써, 상기 리간드를 도입시킨 리간드 담체를 얻을 경우, 우선, 아비딘을 고정화시킨 컬럼을 제조한다. 상기 제조방법은 통상의 방법(예를 들면, 문헌 Amersham Pharmacia Biotech Inc. 편저, 「초보자를 위한 리간드 커플링 핸드북」(2002년) 등 참조)으로 실시하면 된다. 예를 들어, 아미노기를 갖는 화합물을 고정화시키기 위해 적합한 담체가 충전되어 있는 컬럼(예를 들면, N-히드록시 숙신이미드가 고정화된 겔 담체가 충전되어 있는 컬럼)에 아비딘함유 용액을 흐르게 함으로써, 상기 담체에 아비딘을 고정화시킬 수 있다. 상기 아비딘이 고정화되어 이루어진 담체(이하, 아비딘 부가체)에 본 발명의 리간드가 포함된 리간드용액을 주입한다. 이로써, 특이적 상호작용으로써 알려져 있는 비오틴-아비딘 결합에 의해 아비딘 부가체에 리간드를 고정화하여 이루어진 리간드 담체를 얻을 수가 있다.

또한, 상기 아비딘 함유 용액에 사용되는 용매로는, 예를 들면 염화나트륨함유의 아세트산나트륨 수용액 등을 들 수 있다. 그리고 상기 리간드용액에 사용하는 용매로는, 예를 들면 PBS 등의 완충용액을 들 수 있다.

이와 같이, 본 발명의 리간드는 비오틴 부위를 가지고 있으므로, 상기와 같이 예를 들면 단백질 분석용 지지체 표면에 한 단계로 간단히 당 분자를 도입하여 고정화함으로써 본 발명의 리간드 담체를 얻을 수가 있다.

상기와 같이, 리간드를 고정화하여 이루어진 리간드 담체를 갖는 친화성 컬럼을 사용하여 친화성 크로마토그래피를 실시하기 위해서는, 이하와 같이 하면 된다. 즉, 아비딘을 고정화하여 이루어진 담체(아비딘 부가체)가 충전되어 이루어진 친화성 컬럼에 단백질 용액을 주입하고, 통상의 방법에 따라 친화성 크로마토그래피를 실시하면, 리간드 담체에 결합하는 단백질과 결합하지 않는 단백질을 분리할 수 있다. 또한, 상기 단백질 용액에 사용되는 용매로는, 예를 들면 PBS 등의 완충용액을 들 수 있다. 그리고 리간드 담체에 결합하지 않는 단백질의 친화성 컬럼에서의 용출에 사용되는 용출용 용액으로는, 예를 들면 PBS 등의 완충용액을 사용하면 된다.

또한, 상기와 같이 SPR법의 센서칩이나 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용하는 친화성 컬럼에 충전되는 아비딘 부가체 등의 지지체에 당 분자를 도입하는 방법도 본 발명에 포함된다.

이상과 같이, 본 발명의 리간드 담체는 상기 리간드를 가지고 있으므로, 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당 분자를 재현성 있게 배열할 수 있다. 그 때문에, 당 분자의 생물학적 활성을 재현성 있게 관측할 수 있고, 당 분자의 구조의 해명이나, 당 분자의 생물학적 활성에 대해 정량적인 평가를 할 수가 있다.

그리고 지지체 표면에 당 분자가 고정화되어 있는 센서칩을 사용하여, 당 분자의 특이적 상호작용을 검출하는 SPR 측정 방법도 본 발명에 포함된다. 이는 말단구조가 다른 당 분자가 도입되어 이루어진 적어도 두 개의 센서칩을 사용하여, 당 분자와 단백질 등의 물질과의 상호작용을 관측한다. 또한, 당 분자의 말단이란 센서칩에 고정화되어 있지 않은 쪽을 말한다. 그리고 당 분자와의 상호작용을 관측하는 물질은 단백질에 한정되지는 않는다.

상기의 방법을 사용하여, 당 분자의 종류가 다른 두 개의 센서칩을 사용하여 SPR 측정을 하기 위해서는, 예를 들면 이하와 같이 실시하면 된다. 제 1 당 분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어진 제 1 센서칩과 상기 제 1 당 분자와는 말단 구조가 다른 제 2 당 분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어진 제 2 센서칩을 준비한다. 이는 상기한 바와 같이, 센서칩 상에 리간드를 고정화시킨 리간드 담체(센서칩)를 작성한 것과 마찬가지로 얻어진다. 이들 센서칩은 고정화되는 당 분자가 다른 리간드를 사용하면 된다. 비교하는 당 분자로는 예를 들면 락토오스와 글루코오스, 말토오스와 글루코오스, 코지비오스와 글루코오스 등을 들 수 있다. 센서칩에 고정화되는 당 분자가 다른 리간드는 예를 들면, 상기 일반식(16)~(18)에 나타낸 리간드를 들 수 있다. 또한, 리간드는 본 발명에 따른 것에 제한되지 않으며 다른 리간드를 사용하여도 무방하다.

그리고 예를 들면, 제 1 당 분자에 특이적으로 작용하는 단백질 등을 사용하여, 측정조건을 일정하게 하고, 상기 두 개의 센서칩에 작용시켜 양자의 공명각도를 관측한다. 이 양자의 공명각도의 차이를 검출함으로써, 당 분자와 단백질 등과의 특이적 상호작용으로써 측정하는 것이 가능하다.

상기에서는 두 종류의 센서칩을 동시에 측정하였으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 2종류 이상의 센서칩을 측정해도 무방하며, 동시에 측정하지 않아도 무방하다. 그리고 적어도 하나의 센서칩에 당 분자를 도입하지 않은 것을 사용하여도 좋다. 예를 들면, 링커 화합물만을 고정화시킨 것을 사용해도 좋다.

이와 같이, 본 발명의 SPR 측정의 방법은 비특이적 상호작용을 줄이고, 당 분자와 다른 물질과의 특이적 상호작용을 측정하는 것이 가능하다.

이하, 실시예 및 비교예에 의해, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하겠으나, 본 발명은 이들에 의해 어떠한 한정을 받는 것은 아니다.

또한, 하기의 실시예에 있어서, 각종 스펙트럼, 선광도의 측정, 전기영동에는 다음의 기기를 사용하였다.

*)핵자기공명(NMR) 스펙트럼:JEOL EX 270, JNM-LA 500 NMR spectrometer(상품명)

*)질량분석:Mariner(등록상표) Biospectrometry(등록상표) Work station(상품명, ESI-TOF MS, PE Biosystems, CA, USA) VOYAGER-DERP(상품명, MALDI-TOF MS, PE Biosystems, CA, USA)

*)선광도:Perkin Elmer model 241 polarimeter(상품명)

*)자외가시분광 광도계:JASCO V-530 UV/Vis spectrophotometer(상품명)

*)표면 플라즈몬 공명 바이오센서:SPR670(상품명, Nippon Laser & Electronics LAB)

*)전기영동장치:ATTO CompactPAGE AE-7300(상품명)

*)전기영동용 기성 겔:ATTO PAGEL-Compact AE-6000(12.5%) Lot:244S024(상품명)

그리고 크로마토그래피에는 다음의 실리카겔을 사용하였다.

*)박층 크로마토그래피:Merck Silica gel 60 F254(No.5715)(상품명)

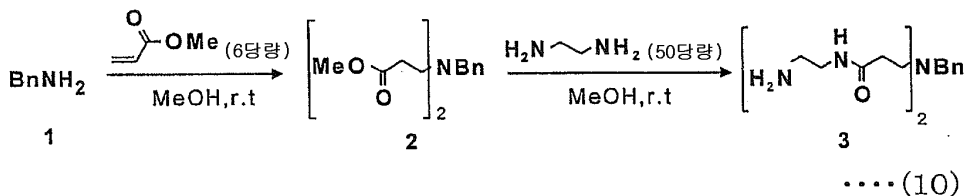
*)조제적 박층 크로마토그래피: Merck Silica gel 60 F254(No.5744)(상품명)

*)중압 컬럼 크로마토그래피: Merck Silica gel 60(No.9385, 0.040-0.063mm, 230-400 mesh)(상품명)

실시예 1. 링커 화합물의 합성

본 발명의 링커 화합물은 이하의 순서로 합성하였다.

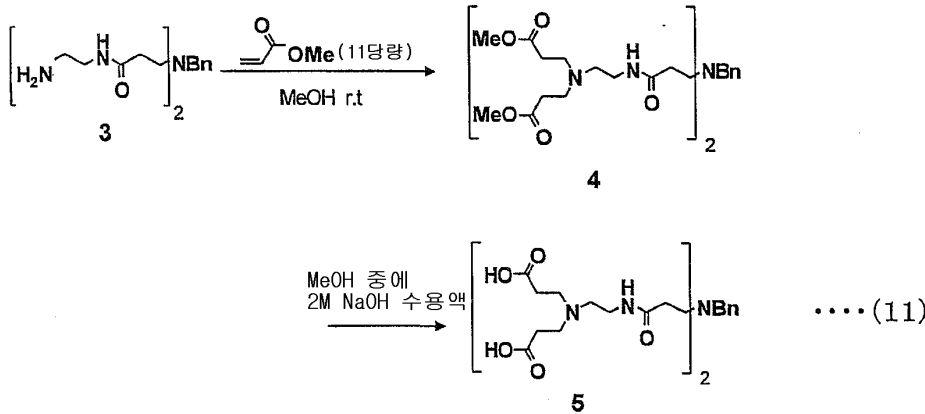
하기 일반식(10)에 나타낸 바와 같이, 실온조건 하에, 메탄올(식 중, MeOH) 중에서 벤질아민(화합물 1, 식 중 Bn은 벤질기를 가리킨다)과 6당량의 아크릴산 메틸을 반응시키고, 상기 벤질아민에 2단위의 아크릴산 메틸을 마이클 부가시켜 수율 93%로 화합물 2를 얻었다. 이 후, 실온조건 하에 그 화합물 2가 포함되어 있는 메탄올 중에, 과잉(50당량)의 에틸렌디아민을 첨가하고, 그 에틸렌디아민을 화합물 2에 축합시켜 화합물 3을 얻었다. 또한, 과잉(50당량)의 에틸렌디아민을 첨가하는 것은 에틸렌디아민의 두 개의 아미노기에 동시에 화합물 2가 축합하는 것을 방지하기 위함이다.



화합물 2를 얻기 위해, 구체적으로는 벤질아민(4.7mL, 44.6mmol)의 메탄올용액(143mL)에 아크릴산 메틸(8.52mL, 104mmol)을 첨가하여 실온에서 질소분위기 하에 8시간 교반시키고, 아크릴산 메틸(3.87mL, 47mmol)을 추가하여 12시간 실온에서 교반시켰다. 이 교반시킨 용액에, 이 후, 추가로 아크릴산 메틸(7.47mL, 94mmol)을 첨가하여 밤새도록 교반시키고, 메탄올/아크릴산 메틸 반응용액을 얻었다. 메탄올/아크릴산 메틸 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 중압 실리카겔 크로마토그래피(300g, 톨루엔:아세트산 에틸=5:1~3:1)로 정제하여, 무색 오일상태의 용액으로서 화합물 2를 얻었다.

얻어진 화합물 2는 수득량 11.7g(수율 95%)이었다. 그리고, 얻어진 화합물 2의 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD)측정을 행한 결과, δ7.28-7.20(5H, m, aromatic), δ4.79(6H, s, OMe*x2), δ3.57(2H, d, J=4.6Hz, NCH₂*Ph), δ2.76(4H, td, J_{gem}=4.6, J_{vic}=6.8Hz, CH₂*NBn), δ2.46(4H, td, J_{gem}=4.6, J_{vic}=6.8Hz, COCH₂*CH₂NBn)이었다. 또한, 각 화학실프트 δ는 H가 복수개 존재하는 것에는 *를 붙인 프로톤, 즉 H*에 대한 측정치를 나타내고 있으며, 이하의 기재에 대해서도 마찬가지이다. 그리고 ESI-MS(positive) 측정(비행시간형 질량분석계 측정)을 행한 결과, m/z(질량/전하비) 302.1 [(M+ Na)⁺]이었다.

이어서, 하기 일반식(11)에 나타낸 바와 같이, 상기 화합물 3이 포함되어 있는 메탄올 중에 실온조건 하에, 11당량의 아크릴산 메틸을 첨가하고, 화합물 3에 아크릴산 메틸을 4단위 부가하여 수율 81%로 화합물 4를 얻었다. 이 후, 메탄올에 2M의 수산화나트륨 수용액을 첨가한 알칼리 조건 하에 화합물 4의 메틸 에스테르를 가수분해하고, 말단에 카르복실기(-COOH기)를 4단위 갖는 화합물 5를 수율 96%로 얻었다.



화합물 4를 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 화합물 2(9.97g, 35.7mmol)를 메탄올(120mL)에 용해시켜 질소분위기 하에 0℃로 5분간 교반하고, 여기에 무수 에틸렌디아민(60mL, 1.11mol)을 첨가하여 0℃에서 50분간 교반한 후 실온에서 밤새도록 교반하고, 나아가 무수 에틸렌디아민(50mL, 0.93mol)을 첨가해서 실온에서 밤새도록 교반하여 화합물 2/무수 에틸렌디아민 반응용액을 얻었다. 이 화합물 2/무수 에틸렌디아민 반응용액을 농축하여 황색 오일상태의 잔류물을 얻었다. 상기 황색 오일상태의 잔류물에 메탄올(120mL)을 첨가하여 용해시키고, 아크릴산 메틸(19.3mL, 234mmol)을 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반하고, 나아가 아크릴산 메틸(19.3mL, 234mmol)을 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반하고, 황색 오일상태의 잔류물/아크릴산 메틸 반응용액을 얻었다. 상기 황색 오일상태의 잔류물/아크릴산 메틸 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 중압 실리카겔 크로마토그래피(700g, 클로로포름:메탄올=20:1~7:1)로 정제하여 화합물 4로서 황색 오일상태의 용액을 얻었다.

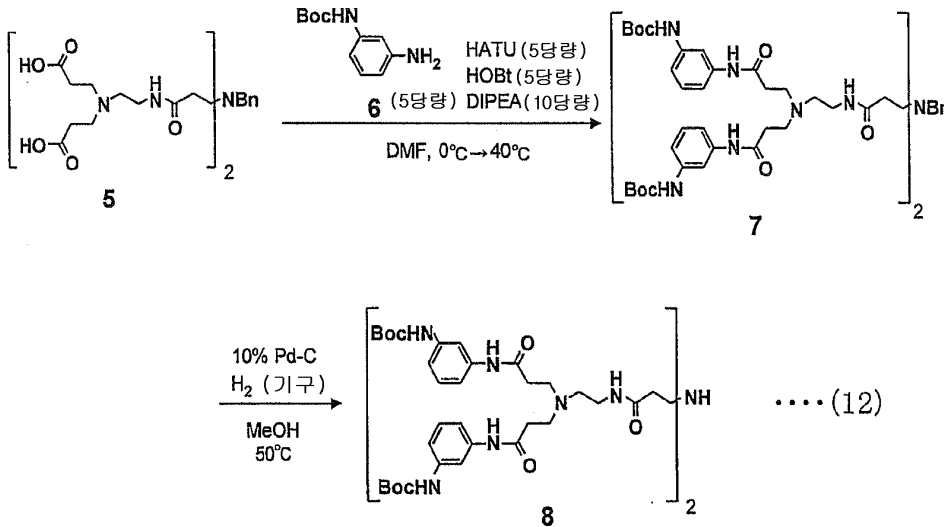
얻어진 화합물 4의 수득량은 24.5g(수율 81%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 4의 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD)측정을 행한 결과, δ7.29-7.28(5H, m, aromatic H), δ3.66(12H, s, OMe*x4), δ3.27(4H, q, J=6.1Hz, CH₂*NHCO), δ2.81(4H, t, J=6.8Hz, CH₂*NBn), δ2.75(8H, t, CH₂x4, J=6.8Hz, CH₂*NCH₂), δ2.52(4H, t, CH₂x2, J=5.9, 6.1Hz, CH₂*CH₂NHCO), δ2.41(12H, t, CH₂x(2+4), J=6.8, 6.6Hz, NCOCH₂*CH₂NHCO, MeOCOCH₂*)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 680.4 [(M+ H)⁺]이었다.

그리고 화합물 5를 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 화합물 4(1.0mg, 1.47mmol)를 메탄올(7.4mL)에 용해시키고, 여기에 4M 수산화나트륨 수용액(7.4mL)을 첨가해서 아르곤가스 분위기 하에 0℃로 2시간 교반하여 화합물 4/수산화나트륨 반응용액을 얻었다. 이 화합물 4/수산화나트륨 반응용액에 4M 염산(7mL)을 첨가하여 pH시험지로 pH3을 확인한 후, 화합물 4/수산화나트륨 반응용액을 감압 농축하여 잔류물의 수용액을 동결 건조시켰다. 얻어진 동결 건조시킨 잔류물을 HP-20(300mL, H₂O~H₂O:메탄올=1:1~메탄올)으로 정제하고, H₂O/메탄올로 용출시킨 분획을 모아 감압 농축하였다. 이 후, 감압 농축시킨 잔류물을 동결 건조하여, 화합물 5로서 담황색의 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 5는 수득량 878mg(수율 96%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 5의 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD)측정을 행한 결과, δ7.54-7.38(5H, m, aromatic H), δ3.60(2H, s, NCH₂*Ph), δ3.58(2H, t, J=6.1Hz, CH₂*NHCO), δ3.34-3.24(16H, m, CH₂x8, CH₂*NBn, MeOCOCH₂CH₂*N, NCH₂CH₂*NHCO), δ2.79(4H, t, CH₂x2, J=7.0Hz, COCH₂*CH₂NBn), δ2.60(8H, t, CH₂x4, J=6.4Hz, MeOCOCH₂*)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 624.3 [(M+ H)⁺]이었다.

또한, 본 실시예에서는 화합물 5는 카르복실기가 4단위인 것까지 밖에 합성하고 있지 않으나, 필요하다면 화합물 4의 메틸 에스테르를 가수분해하지 않고, 에틸렌디아민을 다시 축합하여 아크릴산 메틸을 부가시키는 반응을 계속하면, 말단에 8, 16, 32단위의 카르복실기를 갖는 골격구조를 용이하게 합성하는 것이 가능하다.

이어서, 하기 일반식(12)에 나타난 바와 같이, 5당량의 1-히드록시 벤조 트리아졸(식 중, HOBt) 및 10당량의 디이소프로필 에틸아민(식 중, DIPEA)을 포함하는 N, N-디메틸 폼아미드(DMF) 중에 0°C에서 40°C로 온도 변화시키면서, 활성 화제로서 5당량의 o-[7-아자벤조 트리아졸-1-일]-N, N, N', N'-테트라메틸 우로늄 헥사플루오로 포스페이트(식 중, HATU)를 사용하여 상기 화합물 5의 말단의 카르복실기에 한 쪽의 아미노기가 t-부톡시 카르보닐기(식 중, Boc, 이하, Boc기로 기재)로 보호된 페닐렌디아민 유도체(화합물 6, 5당량)를 축합시켜 화합물 7을 얻었다(수율 57%). 이어서, 수소분위기 하에, 50°C의 메탄올 중에서, 팔라듐(10%의 Pd-C)을 사용하여 화합물 7의 접착 환원을 행하고, 그 화합물 7의 2급 아미노기의 보호기인 벤질기를 탈보호하여 수율 80%로 화합물 8을 얻었다.



화합물 6을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, m-페닐렌디아민(7.81g, 72.2mmol)을 메탄올(240mL)에 용해시키고, 디-t-부톡시 카르보네이트(16.5mL, 71.8mmol)와 트리에틸아민(10mL, 71.5mmol)을 첨가하여 아르곤가스 분위기 하에, 차광하여 0°C에서 30분간 교반하고, 이 후 실온에서 밤새도록 교반하고, m-페닐렌디아민 반응용액을 얻었다. 이 m-페닐렌디아민 반응용액을 감압 농축하여 잔류물을 중압 실리카겔 크로마토그래피(500g, 클로로포름:메탄올=10:1~7:1)로 정제하여 화합물 6으로서 황백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 6은 수득량 13.3g(수율 88%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 6의 ¹H NMR(400MHz, CDCl₃)측정을 행한 결과, δ7.03(1H, dd, J=7.8, 8.1Hz, aromatic H), δ6.54(1H, d, J=8.1Hz, aromatic H), δ6.36(1H, t, J=7.8Hz, aromatic H), δ3.67(μ2H, s, NH₂), δ1.51(9H, m, CH₃x3 of BOC)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 209.1 [(M+H)⁺]이었다.

그리고 화합물 7을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 화합물 5(54.8mg, 87.9μmol)와 1-히드록시 벤조트리아졸(66.4mg, 492μmol)을 무수 디메틸폼아미드(0.9mL)에 질소분위기 하에서 용해시키고, 0°C에서 15분간 교반하여 화합물 5/1-히드록시 벤조트리아졸 반응용액을 얻었다. 이 화합물 5/1-히드록시 벤조트리아졸 반응용액에, HATU(168mg, 441μmol)와 디이소프로필 에틸아민(150mL, 882μmol)과 화합물 6(98.2mg, 471μmol)을 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반하고, 50°C에서 5시간 교반하여 화합물 5/화합물 6 반응용액을 얻었다. 이 화합물 5/화합물 6 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 중압 실리카겔 크로마토그래피(80g, 클로로포름:메탄올=15:1~5:1)로 정제하여 화합물 7로서 백색 결정을 얻었다.

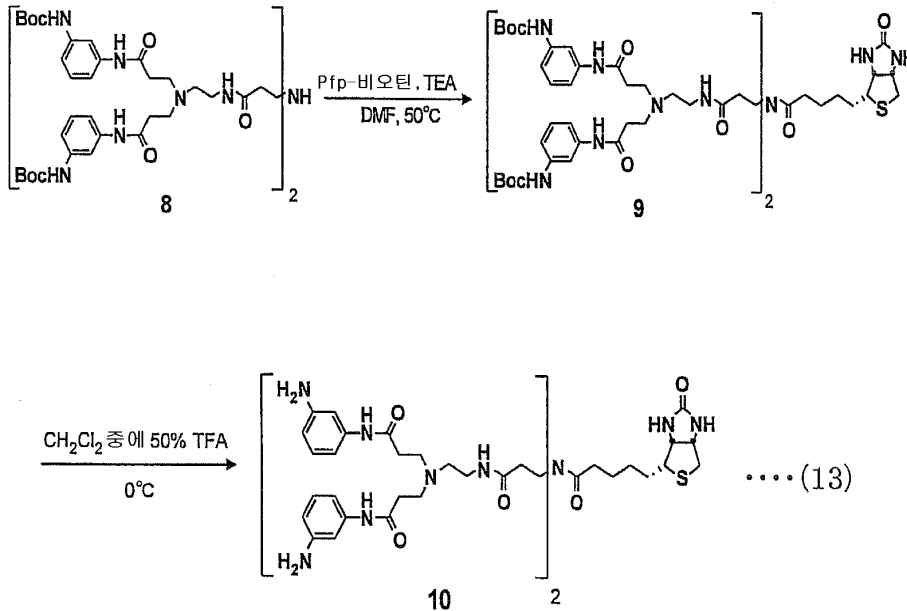
얻어진 화합물 7은 수득량 69.2mg(수율 57%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 7의 ¹H NMR(400MHz, CDCl₃)측정을 행한 결과, δ7.39(4H, s, 1Hx4, aromatic H), δ7.39-6.53(21H, m, aromatic H), δ3.63(2H, s, NCH₂*Ph), δ3.15(4H, d, CH₂x2, J=6.2Hz, CH₂*NHCO), δ2.76(8H, t, CH₂x4, J=6.2Hz, MeOCOCH₂CH₂*N), δ2.49(8H, t, CH₂x4, J=6.2Hz, MeOCOCH₂*CH₂N), δ2.45(4H, t, CH₂x2, J=6.4Hz, CH₂*NBn), δ2.38(4H, t, μ CH₂x2, J=6.6Hz, NCH₂CH₂*NHCO), δ2.03(4H, t, CH₂x2, J=6.4Hz, NHCOCH₂*CH₂NBn), δ1.48(36H, s, CH₃x12, Me of BOC)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 693.3[(M+2H)²⁺]이었다.

화합물 8을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 화합물 7(49.8mg, 36.0μmol)에 10%Pd-C(70.2mg)의 메탄올 현탁액을 첨가하고, 수소분위기 하에, 실온에서 밤새도록 교반하여 화합물 7 반응용액을 얻었다. 화합물 7 반응용액을 멤브레인 필터로 여과하고 여과액을 감압 농축하여 화합물 8로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 8은 수득량 36.8mg(수율 80%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 8의 ¹H NMR(400MHz, CD₃CD)측정을 행한 결과, δ7.64(4H, s, 1Hx4, aromatic H), δ7.05-6.91(12H, m, aromatic H), δ3.40(4H, t, CH₂x2, J=5.4Hz, CH₂*NHCO), δ3.19(8H, br, CH₂x4, MeOCOCH₂CH₂*N), δ2.98(4H, br, CH₂x2, NCH₂CH₂*NHCO), δ2.89(4H, t,

CH₂x2, J=5.6Hz, CH₂CH₂*NH), δ2.71-2.70(4H, br, CH₂x2, J=5.6Hz, MeOCOCH₂*CH₂N), δ2.36(4H, t, CH₂x2, J=5.4Hz, NHCOCH₂*CH₂NBn), δ1.39(36H, s, CH₃x12, Me of BOC)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 647.9[(M+ 2H)²⁺]이었다.

다음으로, 하기 일반식(13)에 나타낸 바와 같이 온도 50°C, 트리에틸아민(식 중, TEA)의 존재 하에, DMF 중에서 탈보호되어 자유로워진 화합물 8의 아미노기에 펜타플로로페닐기(Pfp)로 활성화한 비오틴을 축합시켜 화합물 9를 얻었다(수율 63%). 이 후, 0°C의 온도조건 하에, 트리플로로아세트산(식 중, TFA)을 포함하는 CH₂Cl₂ 중에서 화합물 9의 Boc기를 탈보호하여 화합물 10을 본 발명의 링커 화합물로서 얻었다.



화합물 9를 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 비오틴(80.1mg, 0.397mmol), 디시클로헥실 카르보디이미드(80.8mg, 0.39mmol)를 무수 디메틸 포름아미드(1mL)에 아르곤가스 분위기 하에 용해시켜 50°C에서 4시간 교반하고, 펜타플로로페닐(120mg, 0.65mmol)을 첨가하여 50°C에서 밤새도록 교반하여 비오틴 반응용액을 얻었다. 비오틴 반응용액에 화합물 8(70.6mg, 54.5mmol), 트리에틸아민(60μL, 0.811mmol)을 첨가하고, 50°C에서 밤새도록 교반하여 화합물 8 반응용액을 얻었다. 화합물 8 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 아세트산 에틸 100ml에 용해시켜 포화식염수(50mLx3)로 세정한 후, 유기상으로 황산 나트륨을 첨가하여 건조하였다. 이 건조시킨 잔류물로부터 건조제를 여과 제거한 후, 여과액을 감압 농축하여 잔류물을 중압 실리카겔 크로마토그래피(25g, 클로로포름:메탄올=10:1~5:1)로 정제하여, 화합물 9로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 9는 수득량 52.3mg(수율 63%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 9의 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD)측정을 행한 결과, δ7.61(2H, s, aromatic H), δ7.57(2H, s, aromatic H), δ7.06-6.95(12H, m, aromatic), δ4.31(1H, dd, J_{B7/B6}=4.3, J_{B7/B3}=6.6Hz, Biotin NHCH*CH₂S), δ4.09(1H, dd, J_{B3/B4}=4.5, J_{B3/B7}=6.6Hz, Biotin NHCH*CHS), δ3.35(4H, t, CH₂x2, J=6.8Hz, CH₂CH₂*NCH₂CH₂CONHPh), δ3.19-3.17(4H, m, CH₂x2, NCH₂*CH₂CONHCH₂CH₂), δ2.98-2.93(1H, m, J_{B4/B3}=4.5Hz, Biotin NHCHCH*S), δ2.78-2.72(9H, m, CH+ CH₂x4, J_{B6a/B6b}=10Hz, J_{B6a/B7}=4.3Hz, Biotin NHCHCH₂*S, NCH₂*CH₂CONHPh), δ2.53-2.50(4H, br, CH₂x2, CH₂*CH₂NCH₂CH₂CONHPh), δ2.44-2.40(9H, m, CH+ CH₂x4, J_{B6b/B6a}=10Hz, Biotin NHCHCH₂*S, NCH₂CH₂CONHPh), δ2.20(2H, t, J_{B12/B11}=7.6Hz, Biotin CH₂CH₂CH₂CH₂*CO), δ2.16(4H, t, CH₂x2, J=6.8Hz, CH₂CH₂*NCH₂CH₂CONHPh), δ1.55-1.51(4H, br, CH₂x2, Biotin CH₂*CH₂CH₂*CH₂CO), δ1.40(36H, s, CH₃x12, Me of BOC), δ1.28-1.24(2H, m, CH₂x1, Biotin CH₂CH₂*CH₂CH₂CO)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 761.4[(M+ 2H)²⁺]이었다.

그리고 화합물 10을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 화합물 9(52.3mg, 34.4μmol)을 디클로로메탄(1.5mL)에 용해시키고, 트리플로로아세트산(1mL)를 첨가해서 0°C에서 1시간 교반하여 화합물 9/트리플로로아세트산 반응용액을 얻었다. 이 화합물9/트리플로로아세트산 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 LH20(140mL, 메탄올 용출)을 사용하여 정제하여 화합물 10으로서 황색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 10은 수득량 50.9mg(수율 94%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 10의 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD)측정을 행한 결과, δ7.51(4H, s, aromatic H), δ7.21(8H, s, aromatic H), δ6.83-6.81(4H, m, aromatic H), δ4.32(1H, dd, J_{B7/}

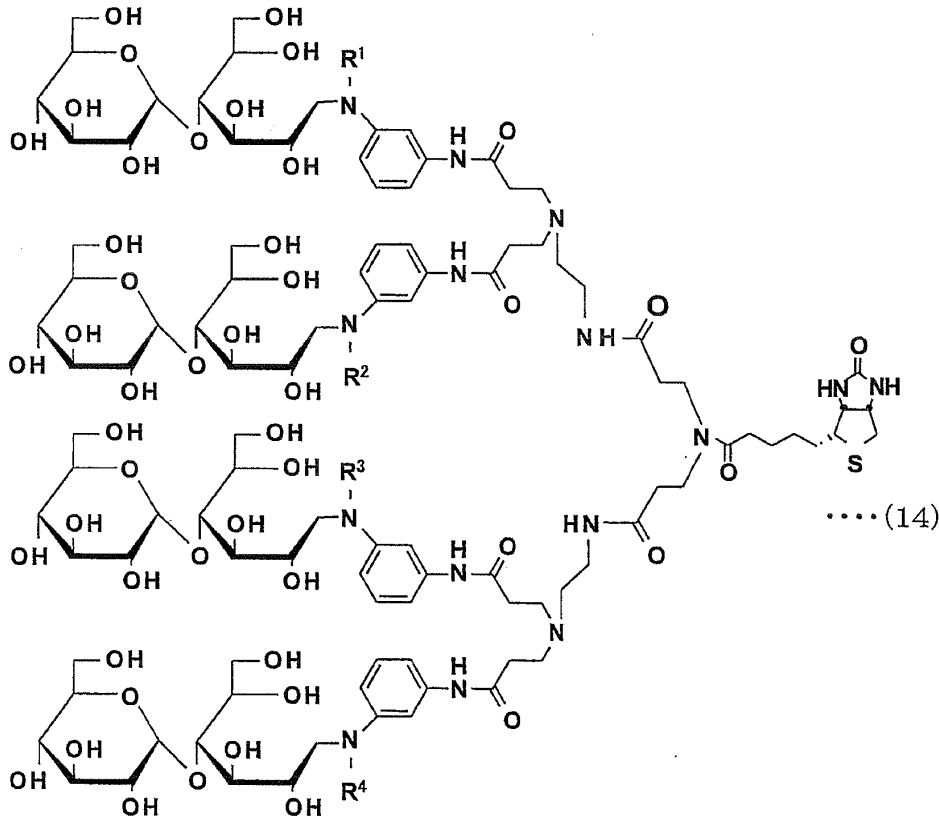
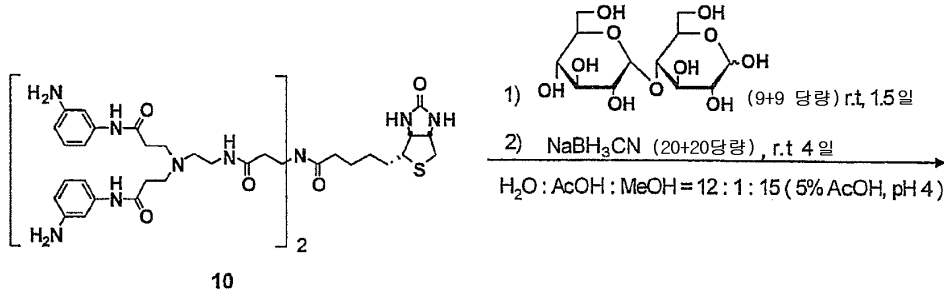
$J_{B6}=4.3$, $J_{B7/B3}=8.0\text{Hz}$, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), $\delta 4.14(1\text{H}, \text{dd}, J_{B3/B4}=4.4, J_{B3/B7}=8.0\text{Hz}$, Biotin NHCH^*CHS), $\delta 3.59-3.52(12\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2 \times 6, \text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}, \text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh})$, $\delta 3.47-3.37(4\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2 \times 2, \text{CONCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH})$, $\delta 3.35-3.33(4\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh})$, $\delta 3.02(1\text{H}, \text{dt}, J_{B4/B9}=4.9\text{Hz}$, Biotin NHCHCH^*S), $\delta 2.92-2.89(8\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2 \times 4, \text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh})$, $\delta 2.79(1\text{H}, \text{dd}, J_{\text{gem}}=12.8, J_{\text{vic}}=5.0\text{Hz}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), $\delta 2.58(1\text{H}, \text{d}, J_{\text{gem}}=12.8\text{Hz}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), $\delta 2.37(2\text{H}, \text{t}, J=7.0\text{Hz}$, $\text{CONCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$), $\delta 2.31(2\text{H}, \text{t}, J=7.1\text{Hz}$, $\text{CONCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$), $\delta 2.21(2\text{H}, \text{t}, \text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), $1.48-1.19(6\text{H}, \text{br}, \text{CH}_2 \times 3$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2^*\text{CH}_2^*$)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 1142.6 $[(\text{M}+\text{Na})^{2+}]$ 이었다. 그리고 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +0.947$ (c 0.972, MeOH)이었다.

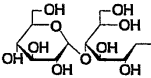
그리고 얻어진 화합물 10은 ESI-MS(positive) $m/z=1120.62[\text{M}+\text{H}]^+$ 이며, 일반식(13)에 화합물 10으로서 나타낸 구조를 가지고 있음을 확인하였다. 그리고 NMR측정을 하여 얻어진 NMR데이터로부터도 상기 화합물 10으로서 나타낸 구조를 가지고 있음을 확인하였다.

실시예 2. 리간드의 합성

실시예 1에서 얻어진 링커 화합물(화합물 10)을 사용하여 상기 일반식(3)으로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드를 이하의 순서로 합성하였다.

하기 일반식(14)에 나타낸 바와 같이, 용매로서 물:아세트산(AcOH):메탄올=12:1:15(5%의 아세트산 용액, pH4)를 사용하여 상기 화합물 10에 대해, 9당량의 말토오스를 첨가하여 실온에서 1.5일간 교반하였다. 이 후, 비행시간형 질량분석기로 4단위의 쉬프염기가 형성되었음을 확인한 후, 환원제로서 20당량의 NaBH_3CN 을 2회로 나눠 첨가하고, 실온에서 4일간 교반하여 환원 아미노화 반응을 행하였다. 얻어진 화합물을 HP-20(다이아 이온)을 사용해서 정제하여 본 발명의 리간드로서 화합물 11을 얻었다(수율 89%). 이 화합물 11은 말토오스가 5단위~7단위 집합하여 된 혼합물로서 얻어졌다.

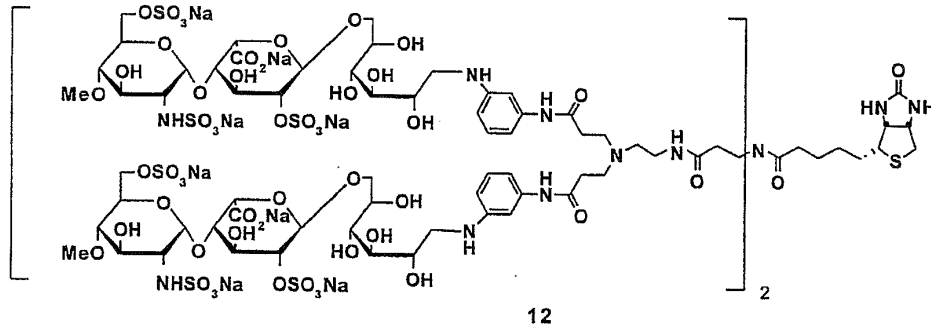
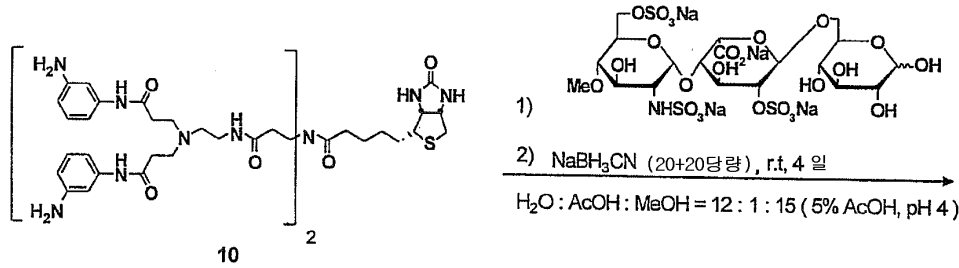


(식 중, R¹, R², R³, R⁴는 각각 독립적이며, H- 또는  로 나타내어지는 구조를 갖는다)

실시예 3. 리간드의 합성

실시예 2에서 얻어진 링커 화합물(화합물 10)을 사용하여, 상기 일반식(5)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드를 이하의 순서로 합성하였다.

하기 일반식(15)에 나타낸 바와 같이, 말토오스 대신 상기 일반식(8)에 나타내어지는 당 분자를 사용한 것 외에는, 실시예 2와 동일하게 조작을 하여 화합물 12를 얻었다.



.... (15)

구체적으로 화합물 12를 얻기 위해, 이하의 조작을 하였다. 즉, 링커 화합물 10(2.4mg, 2.1 μmol)과 상기 일반식(8)로 나타내어지는 당 분자(GlcNS6S-IdoA2S-Glc로 약칭, 11.0mg, 12.8 μmol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=12/1/15, 0.4mL)에 용해시켜 실온에서 이틀간 교반하였다. 링커화합물 10/GlcNS6S-IdoA2S-Glc 반응용액에 수산화 시아노붕소 나트륨(약 3mg, 40 μmol)을 첨가하여 실온에서 이틀간 교반한 후, 다시 수산화 시아노붕소 나트륨(약 2mg, 40 μmol)을 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반하고 환원하였다. 환원된 링커 화합물 10/GlcNS6S-IdoA2S-Glc 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 SephadexG-50 fine[100mL 용출액:0.85M 식염수+PBS(1/1 vol.) 혼합용액]을 사용하여 정제하고, 254nm에서의 UV흡수가 인정된 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켰다. 여기서 얻은 동결 건조시킨 잔류물을 HP-20(60mL)을 사용하여 탈염하고, 물/메탄올=1/1로 용출시킨 분획을 모아 농축하고 동결 건조시켰다. 여기서 얻은 동결 건조시킨 분획을 SephadexG-10(20mL)을 사용하여 다시 탈염하고, 254nm에서의 UV흡수가 인정된 분획을 모아 농축하고, 동결 건조시켜서 화합물 12로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 12는 수득량 4.99mg(수율 42%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 12의 ^1H NMR(500MHz, D_2O)측정을 행한 결과, 87.14-7.12(4H, br, aromatic H), 86.91-6.59(12H, br, aromatic H), 85.36-5.34(4H, br, H-1''), 85.12(4H, br, H-1'), 84.51(4H+1H, d, $J=2.6\text{Hz}$, H-5', Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), 84.29(4Hx2, d, $J_{\text{gem}}=9.3\text{Hz}$, H-6''b, H-2'), 84.19(4Hx3, d, $J_{\text{gem}}=9.3\text{Hz}$, H-6''a, H-3', Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), 84.05(4H, d, $J=2.5\text{Hz}$, H-4'), 84.00-3.93(4Hx3, m, H-5'', H-1b, H-6b), 83.86-3.85(4H, m, H-5), 83.78-3.72(4H, m, H-4), 3.70(4H, t, H-3''), 83.67-3.59(4Hx2, m, H-3, H-6b), 83.56-3.52(4H, br, Link $\text{PhNHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2^*$), 83.42(4H, t, $J=6.6\text{Hz}$, Link $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), 83.36-3.30(4Hx2+8H, m, H-2, H-4'', Link $\text{PhNHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{N}$), 83.25(4H, dd, $J=10.3, 3.3\text{Hz}$, H-2''), 83.18-3.05(1Hx2, br, H-1a, Biotin NHCHCH^*S), 82.93-2.90(4H, br, Link $\text{PhNHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2^*\text{CH}_2$), 82.89(1H, br, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), 82.82(4H, t, $J=6.6\text{Hz}$, Link $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{NCO}$), 82.72-2.70(1H, br, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), 82.58(8H, t, $J=6.6\text{Hz}$, Link $\text{PhNHCOCH}_2^*\text{CH}_2\text{N}$), 82.05(2H, br, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 81.53(2H, t, $J=7.6\text{Hz}$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*$), 81.30(2H, t, $J=6.9\text{Hz}$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2$), 81.17(2H, t, $J=7.1\text{Hz}$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2$)이었다.

이와 같이 중수(D_2O)중에서 500MHz에서 NMR측정을 하여 목적물을 동정하였다. 집합화도는 NMR의 이드우론산 부분의 1위 프로톤과 링커 구조 내의 방향족 프로톤(16H를 기준)의 강도비로부터 계산하였다. 양자의 강도비는 4.1:16이 되며, GlcNS6S-IdoA2S-Glc가 평균적으로 4.1분자 집합하여 있다고 추정되었다. GlcNS6S-IdoA2S-Glc가 n분자 집합한 화합물의 분자량(Mw)은 화합물 10의 분자량 1120.4와 GlcNS6S-IdoA2S-Glc가 1분자 집합할 때의 분자량 증가 840.97을 이용하여 수학적 6과 같이 나타내어진다.

수학식

$$M_w = 1120.4 + 840.97n$$

상기 수학식 6에 n=4.1을 대입하고, 분자량 4568.4를 얻어 이를 기초로 수율을 계산하면 상기와 같이 42%로 구해진다.

실시예 4. 리간드의 합성

실시예 1에서 얻어진 링커 화합물인 화합물 10(이하, 비오틴 링커 10이라 부른다)에 관해, 당 분자의 집합도의 차이에 의한 락틴과의 상호작용을 SPR측정하기 위해 리간드를 합성하였다.

(4-1. 당 분자의 단위를 정하지 않은 리간드의 합성)

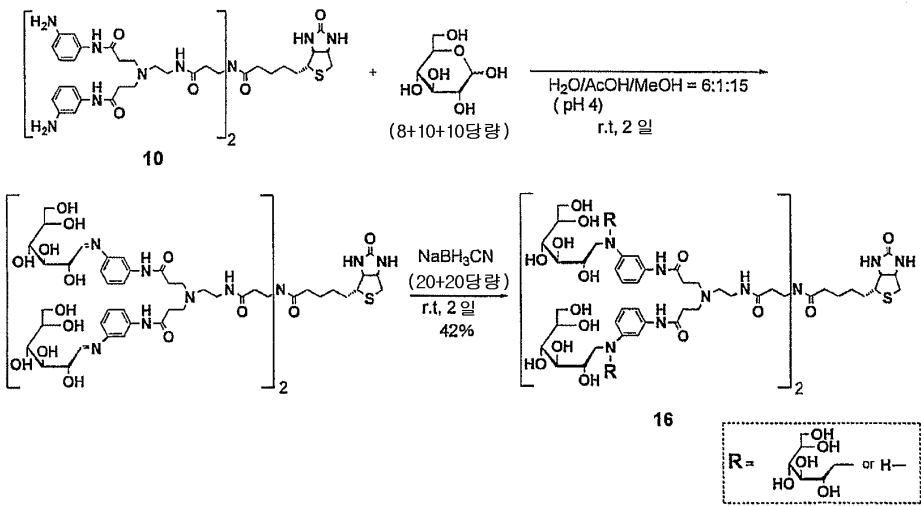
비오틴 링커 10을 사용하여 당 분자를 집합화시켜 리간드를 얻었다. 비오틴 링커 10은 메탄올에는 용해되나 물에는 불용성이기 때문에, 당을 집합시키는 환원 아미노화 반응의 용매는 물, 아세트산, 메탄올의 혼합용매로 하고, pH4의 조건에서 반응을 수행하였다.

처음에, 비오틴 링커 10에 집합시키는 당 분자로서 글루코오스를 선택하고, 하기 일반식(19)에 있어서 화합물 16으로 나타내어지는 리간드를 이하의 순서로 합성하였다.

하기 일반식(19)에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에서 얻어진 비오틴 링커 10에 대해 8당량(1-아미노기 당 2당량, 8.0mg, 44μmol)의 글루코오스를 사용하여, 양자를 혼합용매에 용해시키고 실온에서 밤새도록 교반하여 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액을 얻었다. 반응의 추적은 ESI-MS측정을 하였다. 반응 중의 상기 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액을 소량 꺼내어 메탄올에서 희석시킨 샘플을 측정하고, 쉬프염기의 형성을 확인한 결과, 이 단계에서는 대부분의 비오틴 링커 10은 아미노기가 유리된 채로 존재하고, 쉬프염기의 생성율은 작았다. 그래서 상기 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액에 글루코오스를 순차적으로 추가하고, 최종적으로 28당량의 글루코오스를 반응시키면, ESI-MS측정의 결과, 비오틴 링커 10은, 쉬프염기의 형태로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 또한, 비오틴 링커 10에 4잔기인 아미노기 전부가 쉬프염기가 된 것이 아니라, 그 외에 3 또는 2 또는 1잔기의 아미노기만이 쉬프염기가 된 화합물도 존재하고 있었다.

이 단계에서, 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액에 환원제로서 수소화 시아노붕소 나트륨을 첨가하여 쉬프염기를 환원하였다. 환원반응 종료 후 HP-20(상품명)을 사용하여 환원된 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액을 정제하여 본 발명의 리간드로서 화합물 16을 얻었다.

얻어진 화합물 16을 ESI-MS측정한 결과, 글루코오스가 7 또는 8분자 집합한 화합물이 합성되어 있었음을 알았다. 이는 글루코오스를 과잉으로 첨가하였기 때문에, 쉬프염기가 환원되어 생긴 2급 아미노기에 추가적으로 글루코오스가 반응하였기 때문이다. ESI-MS측정의 결과에서 상기 화합물 16은 글루코오스를 7 또는 8단위(분자) 갖는 리간드의 혼합물임을 알았다. 또한, 얻어진 상기 화합물 16의 수율은 화합물이 8분자 집합체라고 가정했을 경우 42%이다. 상기 화합물 16을 이하 8-Glc라 약칭한다.



....(19)

화합물 16을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 비오틴 링커 10(6.0mg, 5.4μmol)과 글루코오스(8.0mg, 44μmol)를 혼합 용매(물/아세트산/메탄올=6/1/15, 0.4mL)에 용해시켜 실온에서 밤새도록 교반한 후, 글루코오스(10mg, 55μmol)를 추가하고, 6 시간 후에 다시 글루코오스(10mg, 55μmol)를 첨가해서 밤새도록 교반하여 비오틴 링커

10/ 글루코오스 반응용액을 얻었다. 이 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액에 수소화 시아노붕소나트륨(10mg, 160 μ mol)을 첨가해서 실온에서 밤새도록 교반하여 환원 반응시켰다. 이 환원 반응시킨 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(701mL)을 사용하여 정제하고, 물/메탄올=1/1로 용출시킨 분획을 모아 농축하고, 동결 건조시켜 화합물 16으로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 16은 수득량 5.1mg(수율 42%, 8치환체로서 계산)이었다. 그리고 얻어진 화합물 16의 ^1H NMR(400MHz, D_2O)측정을 행한 결과, δ 6.92(4H, d, $J=7.6\text{Hz}$, aromatic H), δ 6.73(4H, s, aromatic H), δ 6.50-6.45(8H, br, aromatic H), δ 4.30-4.27(1H, m, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.05-4.02(1H, br, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.95-3.91(8H, m, H-2'), δ 3.76-3.71(8H, m, H-5'), δ 3.65-3.59(8Hx2, m, H-3', H-6'b), δ 3.58-3.45(8Hx3, m, H-6'a, H-4', H-1'b), δ 3.25(8H, dd, $J_{\text{gem}}=15.0$, $J_{\text{vic}}=9.6\text{Hz}$, H-1'a), δ 3.19-3.16(8H, br, Link $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 2.96-2.86(1H, m, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.72-2.68(9H, br, $\text{CH}_2\text{x}4+1\text{H}$, Link $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{NHCOPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.54-2.49(5H, br, $\text{CH}_2\text{x}2+1\text{H}$, Link $\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.41(8H, br, $\text{CH}_2\text{x}4$, Link $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 2.07(2H, br, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 2.00(4H, br, Link $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 1.32(4H, br, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2^*$), δ 1.17-1.16(2H, br, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2$)이었다. 그리고, ESI-MS(positive) m/z 1217.5[($\text{M}8+2\text{H}$) $^{2+}$], 1135.0[($\text{M}7+2\text{H}$) $^{2+}$]이었다. 또한, M7: 글루코오스를 7분자 갖는 리간드의 분자량, M8: 글루코오스를 8분자 갖는 리간드의 분자량이다.

다음으로, 비오틴 링커 10에 말토오스를 집합화시켜 리간드를 얻었다.

실시예 1에서 얻어진 비오틴 링커 10을 사용하여 상기 일반식(14)로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드를 이하의 순서로 합성하였다.

상기 일반식(14)에 나타낸 바와 같이, 말토오스의 당량(처음 9당량 추가로 9당량용)을 사용한 것 외에는, 상기 실시예 2와 동일하게 조작을 하여 본 발명의 리간드로서 화합물 11을 얻었다.

얻어진 화합물 11 중의 말토오스의 집합화도는 그 혼합물의 NMR을 측정하고, 말토오스 비환원 말단 1위 프로톤과 링커 내의 방향족 프로톤(16H를 기준)과의 강도비로부터 계산하였다. 양자의 강도비는 5.3:16이 되며, 말토오스가 평균적으로 5.3분자 집합하여 있다고 추정되었다. 말토오스가 n분자 집합한 화합물의 분자량(Mw)은 비오틴 링커 10의 분자량 1120.4와 말토오스가 1분자 집합할 때의 분자량 증가 326.3을 이용하여, 하기의 수학적 식 1과 같이 나타내어진다.

$$\text{수학적 식} \\ \text{Mw} = 1120.4 + 326.3n$$

상기 수학적 식 1에 $n=5.3$ 을 대입하여 분자량 2849.8을 얻고, 이를 기초로 상기 화합물 11의 수율을 계산하면, 88%로 구해졌다. 이 화합물 11을 이하 5.3-Mal로 약칭한다.

화합물 11을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 행하였다. 즉, 비오틴 링커 10(3.2mg, 2.9 μ mol)과 말토오스(9.4mg, 26 μ mol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=6/1/15, 0.2mL)에 용해시켜 실온에서 8시간 교반 후, 추가로 말토오스(9.3mg, 26 μ mol)를 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반하여 비오틴 링커 10/말토오스 반응용액을 얻었다. 이 비오틴 링커 10/말토오스 반응용액에 수소화 시아노붕소나트륨(약 5mg, 80 μ mol)을 첨가해 실온에서 밤새도록 교반한 후, 다시 수소화 시아노붕소나트륨(약 5mg, 80 μ mol)을 첨가하고 실온에서 밤새도록 교반하여 환원하였다. 이 환원된 비오틴 링커 10/말토오스 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(70mL)을 사용하여 정제하고, 물/메탄올=1/1로 용출시킨 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켜 화합물 11로서 백색결정을 얻었다.

얻어진 화합물 11은 수득량 7.81mg(수율 89%, 5.3치환체로서 환산)이었다. 그리고 얻어진 화합물 11의 ^1H NMR(500MHz, D_2O)측정을 행한 결과, δ 7.31-6.51(16H, br, aromatic H), δ 5.05(1Hx5.3, br, H-1), δ 4.56-4.44(1H, br, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.25-4.20(1H, br, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.92-3.91(1Hx5.3, br, H-2'), δ 3.84-3.82(1Hx5.3x3, br, H-5, H-5', H-6b), δ 3.78(1Hx5.3x2, dd, $J_{\text{gem}}=13.7$, $J_{\text{vic}}=4.5\text{Hz}$, H-6a, H-6'b), δ 3.72-3.69(1Hx5.3x3, br, $J_{3/4}=8.2\text{Hz}$, H-6'a, H-3', H-3), δ 3.67-3.62(1Hx5.3, br, H-4'), δ 3.53(1Hx5.3, d, $J_{2/1}=10.0\text{Hz}$, H-2), δ 3.41(1Hx5.3, t, $J_{4/3}=9.5\text{Hz}$, H-4), δ 3.37-3.36(4H, br, Link $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 3.33-3.30(4H, br, Link $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 3.27-3.24(1Hx5.3, br, H-1'b), δ 3.17-3.05(1Hx5.3+1H, m, $J_{\text{gem}}=13.1$, $J_{\text{vic}}=6.2\text{Hz}$, H-1'a, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.88-2.84(9H, br, $\text{CH}_2\text{x}4+1\text{H}$, Link $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{NHCOPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.77-2.70(1H, br, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.60-2.65(4H, br, Link $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 2.56(8H, br, $\text{CH}_2\text{x}4$, Link $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 2.20(2H, t, $J_{\text{B}12/\text{B}11}=5.0\text{Hz}$, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 2.18-2.13(4H, br, Link $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOPh}$), δ 1.59-1.55(2H, br, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 1.54-1.43(2H, br, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*$), δ 1.28-1.27(2H, br, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2$)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 1702.2[($\text{M}8+2\text{H}$) $^{2+}$], 1540.3[($\text{M}7+2\text{H}$) $^{2+}$], 1376.9[($\text{M}6+2\text{H}$) $^{2+}$]이었다. 또한, M6: 말토오스를 6분자 갖는 리간드의 분자량, M7: 말토오스를 7분자 갖는 리간드의 분자량, M8: 말토오스를 8분자 갖는 리간드의 분자량이다.

상기 수학적 식 2에 $n=4.2$ 를 대입해 분자량 1809.2를 얻고, 이를 기초로 계산하면 화합물 19의 수율은 24%로 구해졌다. 수율이 낮은 것은 HP-20을 사용한 정제 시에 손실이 있었기 때문이다. 이와 같이 당량을 조정함으로써 글루코오스가 거의 4분자 집합한 화합물을 합성할 수 있었다. 이하, 말단에 글루시톨형의 화합물을 4.2분자 갖는 화합물 19를 4-Glc로 약칭한다.

화합물 19를 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 비오틴 링커 10(4.91mg, 3.11mmol)과 글루코오스(3.45mg, 19.2mmol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=12/1/15, 0.2mL)에 용해시키고, 실온에서 8시간 교반하여 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액을 얻었다. 이 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액에 추가로 글루코오스(1.64mg, 9.1mmol)를 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반한 후, 수소화 시아노붕소나트륨(4mg, 48mmol)을 첨가하고 실온에서 밤새도록 교반하여 환원하였다. 환원된 비오틴 링커 10/글루코오스 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(70mL)을 사용하여 정제하고, 메탄올로 용출시킨 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켜 화합물 19로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 19는 수득량 2.77mg(수율 35%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 19의 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, D_2O)측정을 행한 결과, δ 7.05-7.02(4H, m, aromatic H), δ 6.86-6.52(12H, m, aromatic H), δ 4.44(1H, dd, $J_{\text{B7/B6}}=5.3$, $J_{\text{B7/B3}}=7.5\text{Hz}$, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.17(1H, dd, $J_{\text{B3/B4}}=4.5$, $J_{\text{B3/B7}}=7.9\text{Hz}$, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.92(4H, td, $J=8.6$, 4.7Hz, H-2), δ 3.80-3.73(12H, m, H-3, 6b, 5), δ 3.68-3.60(8H, m, 1Hx4x2, H-6a, 4), δ 3.30-3.25(20H, m, 1Hx4+ $\text{CH}_2\text{x}2\text{x}2$, H1a, Link $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, $\text{CONCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$), δ 3.07(4H, 1Hx4, dd, $J_{\text{gem}}=13.2$, $J_{\text{vic}}=8.2\text{Hz}$, H1b), δ 3.06-3.04(1H, m, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.86-2.83(8H, $\text{CH}_2\text{x}4$, br, Link $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.63-2.61(4H, m, 2Hx2, Link $\text{CONCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$), δ 2.54-2.53(8H, br, $\text{CH}_2\text{x}4$, Link $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 2.21-2.06(6H, br, $\text{CH}_2\text{x}3$, Link $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 1.55(2H, br, $\text{CH}_2\text{x}1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 1.43-1.42(2H, br, $\text{CH}_2\text{x}1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2$), δ 1.30-1.23(2H, br, $\text{CH}_2\text{x}1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*$)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 911.4[(M+2Na) $^{2+}$]이었다. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +0.373$ (c 0.0295, H_2O)이었다.

다음으로, 실시예 1에서 얻어진 비오틴 링커 10을 사용하여 상기 일반식(17)에서 Y가 O로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 리간드를 이하의 순서로 합성했다.

상기 일반식(20)에 나타낸 바와 같이, 글루코오스로 바꾸어 말토오스를 8당량 사용한 것 외에는, 상기 실시예 4의 (4-1)과 동일하게 조작을 하여 본 발명의 리간드로서 화합물 20을 얻었다. 얻어진 화합물 20은 그 NMR에 있어서 말단 글루코오스 1위 프로톤과 방향족 프로톤의 강도비가 4.1:16이 되고, 평균적으로 말토오스가 4.1분자 집합한 화합물이라고 추정되었다. 화합물 20의 수율은 상기(식①)에 집합화도 4.1을 대입해 화합물 19의 경우와 마찬가지로 계산하면, 69%로 구해졌다. 이하, 말단에 α -글루코오스를 4.1분자 갖는 화합물 20을 4-Mal로 약칭한다.

화합물 20을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 비오틴 링커 10(25.0mg, 15.8 μmol)과 말토오스(34.3mg, 95.1 μmol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=15/1/15, 0.55mL)에 용해시키고, 실온에서 9시간 교반하여 비오틴 링커 10/말토오스 반응용액을 얻었다. 비오틴 링커 10/말토오스 반응용액에, 추가로 말토오스(10.7mg, 29.7 μmol)를 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반 후, 수소화 시아노붕소나트륨(15mg, 240 μmol)을 첨가해 실온에서 밤새도록 교반하여 환원시켰다. 환원된 비오틴 링커 10/말토오스 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(70mL)을 사용하여 정제하고, 물/메탄올=1/1 및 메탄올로 용출된 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켜, 화합물 20으로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 20은 수득량 26.7mg(수율 70%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 20의 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, D_2O)측정을 행한 결과, δ 7.06-7.01(4H, m, aromatic H), δ 6.78-6.77(4H, m, aromatic H), δ 6.70-6.66(4H, m, aromatic H), δ 6.51-6.50(4H, m, aromatic H), δ 5.04(4H, d, 1Hx4, $J_{\text{vic}}=2.7\text{Hz}$, H-1), δ 4.43(1H, dd, $J_{\text{B7/B6}}=8.0$, $J_{\text{B7/B3}}=4.9\text{Hz}$, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.19-4.17(1H, br, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.92-3.90(8H, m, $\text{CHx}4\text{x}2$, H-2', 5'), δ 3.83-3.80(8H, m, $\text{CHx}4\text{x}2$, H-5, 6'a), δ 3.73(8H, dd, $\text{CHx}4\text{x}2$, $J_{3/2}=5.2$, $J_{3'/2}=5.0\text{Hz}$, H-3, 3'), δ 3.60(4H, dd, $\text{CHx}4$, $J=7.4$, 11.7Hz, H-4'), δ 3.53(4H, dd, $\text{CHx}4$, $J_{2/3}=8.0$, $J_{2/1}=3.7\text{Hz}$, H-2), δ 3.41(4H, t, $\text{CHx}4$, $J=9.5\text{Hz}$, H-4), δ 3.30-3.22(12H, m, 1Hx4+ $\text{CH}_2\text{x}2\text{x}2$, H1'b, Link $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, $\text{CONCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$), δ 3.14(4H, dd, 1Hx4, $J_{\text{gem}}=12.9$, $J_{\text{vic}}=8.0\text{Hz}$, H1'a), δ 3.06(1H, m, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.84-2.83(9H, br, $\text{CH}+\text{CH}_2\text{x}4$, Link $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.70-2.66(5H, br, $\text{CH}+\text{CH}_2\text{x}4$, Link $\text{CONCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.62-2.60(4H, br, $\text{CH}_2\text{x}2$, Link $\text{CONCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$), δ 2.53-2.52(8H, br, $\text{CH}_2\text{x}4$, Link $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 2.20-2.04(6H, br, $\text{CH}_2\text{x}3$, Link $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 1.55(2H, br, $\text{CH}_2\text{x}1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 1.43-42(2H, br, $\text{CH}_2\text{x}1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2$), δ 1.30-1.23(2H, br, $\text{CH}_2\text{x}1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*$)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 817.0[(M+3H) $^{3+}$]이었다. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +5.11$ (c 0.243, H_2O)이었다. Calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{165}\text{N}_{15}\text{O}_{48}\text{S} \cdot 11.9 \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}$, 47.30;H7.16;N, 7.96%. Found:C, 47.30;H, 6.88;N, 7.86%.

다음으로, 실시예 1에서 얻어진 비오틴 링커 10을 사용하여 상기 일반식(18)에서 Y가 O로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 리간드를 이하의 순서로 합성하였다.

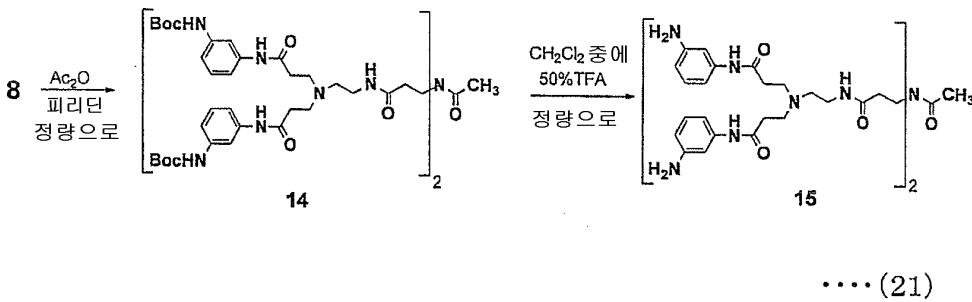
상기 일반식(20)에 나타난 바와 같이, 글루코오스 대신, 락토오스를 8당량 사용한 것 외에는, 상기 (4-1)과 동일하게 조작을 하여 본 발명의 리간드로서 화합물 21을 얻었다. 얻어진 화합물 21은 NMR측정에 있어서, 갈락토오스 1위 프로톤과 방향족 프로톤 강도비는 4.2:16이 되고, 락토오스가 평균적으로 4.2분자 집합한 화합물이라고 추정되었다. 이 경우도 상기 식①에 의한 분자량의 계산이 가능해져 집합화도 4.2를 대입해 분자량 2477.8을 얻고, 이를 기초로 하여 계산하면 수율은 57%로 구해졌다. 이하, 말단에 β-갈락토오스를 4.2분자 갖는 화합물 21을 4-Lac로 약칭한다.

화합물 21을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 비오틴 링커 10(7.88mg, 5.0μmol), 락토오스(10.6mg, 29.4μmol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=20/1/15, 0.4mL)에 용해시키고, 실온에서 10시간 교반하여 비오틴 링커 10/락토오스 반응용액을 얻었다. 이 비오틴 링커 10/락토오스 반응용액에 추가로 락토오스(3.59mg, 10.0μmol)를 첨가하여 실온에서 밤새도록 교반한 후, 수소화 시아노붕소나트륨(5mg, 80μmol)을 첨가해 실온에서 밤새도록 교반하여 환원했다. 환원된 비오틴 링커 10/락토오스 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(70mL)을 사용하여 정제하고, 물/메탄올=1/1 및 메탄올로 용출시킨 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켜 화합물 21로서 백색결정을 얻었다.

얻어진 화합물 21은 수득량 7.08mg(수율 59%)이었다. 얻어진 화합물 21의 ¹H NMR(600MHz, D₂O)측정을 행한 결과, δ6.99(4H, d, J=8.3Hz, aromatic H), δ6.72(4H, d, J=6.9Hz, aromatic H), δ6.65(4H, d, J=8.3Hz, aromatic H), δ6.47(4H, t, J=6.2Hz, aromatic H), δ4.38(4H, d, 1Hx4, J_{vic}=7.7Hz, H-1), δ4.35(1H, m, Biotin NHCH*CH₂S), δ4.09(1H, dd, J_{B3/B4}=4.4, J_{B3/B7}=7.9Hz, Biotin NHCH*CHS), δ3.97-3.94(4H, m, CHx4, H-2'), δ3.84-3.81(8H, m, CHx4x2, H-5,5'), δ3.79(8H, d, CHx4x2, J_{4/3}=3.0Hz, H-4, 6a), δ3.75-3.73(12H, m, CHx4x3, H-3', 6'a, 6b), δ3.63(4H, dd, CHx4, J_{4/3'}=6.1Hz, H-4', 6'b), δ3.57-3.56(4H, m, CH₂x4, Link CH₂*CH₂NCH₂CH₂CONHPh), δ3.52(4H, dd, J_{3/2}=10.0, J_{3/4}=3.5Hz, H-3), δ3.49(4H, t, CH₂x2, J=6.3Hz, Link CH₂CH₂*NCH₂CH₂CONHPh), δ3.46(4H, dd, J_{2/1}=7.7, J_{2/3}=10.0Hz, H-2), δ3.29-3.19(12H, br, CHx4+CH₂x4, Link NCH₂*CH₂CONHPh, H-1'b), δ3.02-2.98(5H, m, Biotin NHCHCH*S, H-1'a), δ2.81-2.75(9H, br, CH+CH₂x4, Link NCH₂*CH₂CONHPh, Biotin NHCHCH₂*S), δ2.59(1H, d, J_{gem}=13.2Hz, Biotin NHCHCH₂*S), δ2.48(8H, br, Link NCH₂CH₂*CONHPh), δ2.13-2.03(6H, br, Link CONCH₂CH₂*CONH, Biotin COCH₂*CH₂CH₂CH₂), δ1.47(2H, br, CH₂x1, Biotin COCH₂CH₂*CH₂CH₂), δ1.35(2H, br, CH₂x1, Biotin COCH₂CH₂CH₂CH₂*), δ1.18(2H, br, CH₂x1, Biotin COCH₂CH₂CH₂*CH₂)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 831.3[(M+3Na)³⁺]이었다. [α]_D²²=-11.3(c 0.292, H₂O)이었다. Calcd for C₁₀₄H₁₆₅N₁₅O₄₈S · 10.4 H₂O:C, 47.78;H, 7.12;N, 8.04%. Found:C, 47.78;H, 6.95;N, 8.00%.

비교예 1. 아세틸 링커를 사용한 리간드

본 실시예에서는 대조 화합물로서, 비오틴 대신 아세틸기를 도입한 링커 화합물을 합성하였다. 즉, 하기 일반식(21)에 나타난 바와 같이, 비오틴을 도입하기 전의 2급 아민인 화합물 8에 피리딘 중 무수 아세트산을 반응시켜 아세틸화하여 화합물 14를 얻었다. 이후, 화합물 14의 말단의 Boc기를 앞에서와 같은 조건으로 탈보호하여 링커 화합물 15를 정량적으로 얻었다. 이하 본 링커 화합물 15를 아세틸 링커 15로 약칭한다.



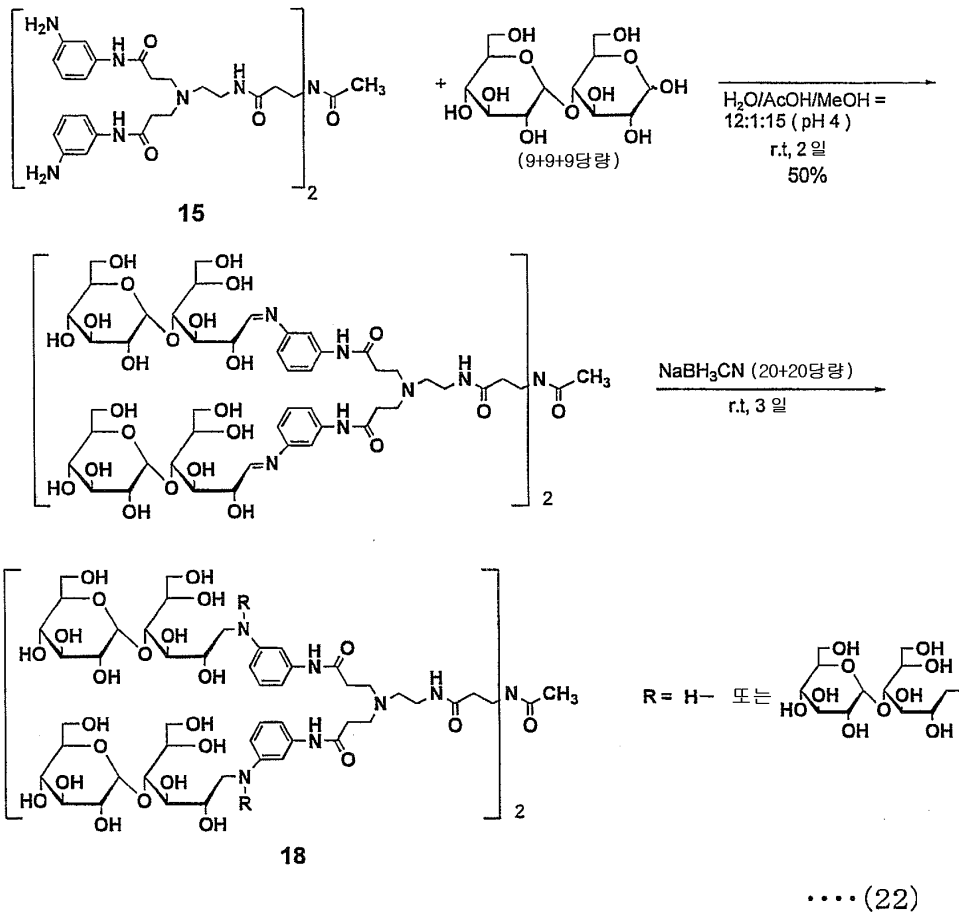
화합물 14를 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 화합물 8(13.1mg, 54.5μmol)을 피리딘(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 무수 아세트산(0.5mL, 5.3mmol)을 첨가하여 실온에서 4시간 교반하였다. 반응용액을 감압 농축하고, 톨루엔으로 2회 모두 끓이고, 잔류물을 중압 실리카겔 크로마토그래피(5g, 클로로포름:메탄올=10:1~5:1)로 정제하여 화합물 14로서 황색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 14는 수득량 12.8mg(수율 95%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 14의 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD)측정을 행한 결과, δ7.60(4H, s, aromatic H), 7.09-6.97(12H, m, aromatic H), δ3.32(4H, t, J=6.6Hz, AceNCH₂*CH₂CONH), δ3.19-3.17(4H, br, AceNCH₂CH₂CONHCH₂*), δ2.77(8H, t, J=6.1Hz, NCH₂CH₂*CONHPh), δ2.52(4H, t, J=6.4Hz, AceNCH₂CH₂CONHCH₂CH₂*), δ2.42(8H, d, J=6.1Hz, NCH₂*CH₂CONHPh), δ2.12(4H, t, J=6.6Hz, AceNCH₂CH₂*CONH), δ1.90(s, 3H, Me of Ace), δ1.40(s, 36H, Me of Boc)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 668.9[(M+2H)²⁺]이었다.

그리고 아세틸 링커 15를 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 화합물 14(12.8mg, 9.6 μ mol)를 디클로로메탄(0.5mL)에 용해시키고, 트리플로로 아세트산(0.5mL)을 첨가해 0 $^{\circ}$ C에서 1시간 교반하여 화합물 14/트리플로로 아세트산 반응용액을 얻었다. 이 화합물 14/트리플로로 아세트산 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 LH20(140mL, 메탄올 용출)을 사용해 정제하여 아세틸 링커 15로서 황색 결정을 얻었다.

얻어진 아세틸 링커 15는 수득량 14.9mg(100%)이었다. 그리고 얻어진 아세틸 링커 15의 ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) 측정을 행한 결과, δ 7.50(4H, s, aromatic H), δ 7.27-7.19(8H, m, aromatic H), δ 6.86-6.81(4H, m, aromatic H), δ 3.57-3.51(12H, br, $\text{AceNCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2^*$, $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 3.40(4H, dd, $J=6.4\text{Hz}$, $\text{AceNCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$), δ 3.35-3.32(4H, br, $J_{5/4}=5.1\text{Hz}$, $\text{AceNCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2^*$), δ 2.91(4H, t, $J_{7/6}=6.1\text{Hz}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 1.88(s, 3H, Me of Ace)이었다. ESI-MS(positive) m/z 647.8[(M+2H) $^{2+}$]이었다.

상기와 같이 얻어진 아세틸 링커 15를 사용하여 말토오스를 집합화시켜 리간드를 얻었다. 하기 일반식(22)에 나타낸 바와 같이, 비오틴 링커 10에 글루코오스를 반응시킨 대신, 아세틸 링커 15에 대해 합계로 27당량의 말토오스를 반응시킨 것 외에는, 상기 실시예 4의 (4-1)과 동일하게 조작을 하여 화합물 18을 얻었다.



얻어진 화합물 18은 그 NMR에 있어서 말토오스 비환원 말단 1위 프로톤과 링커 유래의 방향족 프로톤의 강도비가 7.9:16이 되고, 평균적으로 말토오스가 7.9분자 집합한 화합물이라고 추정되었다. 말토오스가 n분자 집합한 화합물의 분자량(Mw)은 아세틸 링커 15의 분자량 936.1과 말토오스가 1분자 집합할 때의 분자량 증가 326.3을 이용하여 수학적 식 3과 같이 나타내어진다.

수학적
 $M_w = 936.1 + 326.3n$

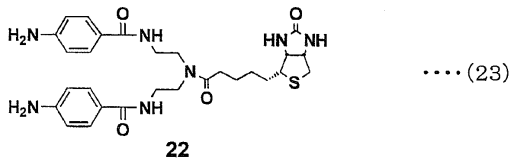
상기 수학적 식 3에 n=7.9를 대입해, 분자량 3562.8을 얻고, 이를 기초로 화합물 18의 수율을 계산하면 50%로 구해졌다. 이하 본 화합물 18을 Ace-8-Mal로 약칭한다.

화합물 18을 얻기 위해서, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 아세틸 링커 15(3.73mg, 7.3 μ mol)와 말토오스(11.5mg, 33.6 μ mol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=6/1/15, 0.25mL)에 용해시키고 실온에서 밤새도록 교반한 후, 추가로 말토오스(13.0mg, 38.0 μ mol)를 첨가해 실온에서 교반하고, 7시간 후에 다시 말토오스(14.7mg, 42.9 μ mol)를 첨가하고 나서 수소화 시아노붕소나트륨(20mg, 320 μ mol)을 첨가해 실온에서 밤새도록 교반하여 반응용액을 얻었다. 이 반응용액에, 수소화 시아노붕소나트륨(20mg, 320 μ mol)을 다시 첨가해 실온에서 밤새도록 교반하였다. 이 다시 수소화 시아노붕소나트륨을 첨가한 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(70mL)를 사용해 정제하고, 물/메탄올=1/1로 용출시킨 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켜 화합물 18로서 백색결정을 얻었다.

얻어진 화합물 18은 수득량 7.02mg(50%, 8치환체로서 환산)이었다. 그리고 얻어진 화합물 18의 ¹H NMR(500MHz, D₂O)측정을 행한 결과, δ 7.09-7.04(4H, br, J=7.6Hz, aromatic H), δ 6.93-6.91(4H, br, aromatic H), δ 6.65-6.58(8H, br, aromatic H), δ 5.05(1Hx8, d, J_{1/2}=2.3Hz, H-1), δ 3.88(1Hx8x2, br, H-2', 5'), δ 3.83(1Hx8, br, H-5), δ 3.82(1Hx8, br, H-6b), δ 3.74(1Hx8x2, dd, J_{gem}=12.4, J_{vic}=5.5Hz, H-6'b, H-6a), δ 3.69(1Hx8, br, J_{3/4}=9.4Hz, H-3), δ 3.67-3.64(1Hx8x2, br, H-3', 6'a), δ 3.59-3.57(1Hx8, br, H-4'), δ 3.53(1Hx8, dd, J_{2/1}=9.9, J_{2/3}=3.5Hz, H-2), δ 3.41(1Hx8, t, J_{4/3}=9.6Hz, H-4), δ 3.30(8H, br, Link CH₂*CH₂NCH₂CH₂CONHPh, NHCOCH₂CH₂*NCO), δ 3.24(1Hx8, br, H-1'b), δ 3.15(1Hx8, br, H-1'a), δ 2.87-2.82(8H, br, Link NCH₂*CH₂CONHPh), δ 2.66(4H, br, J=8.0Hz, Link CH₂CH₂*NCH₂CH₂CONHPh), δ 2.57(8H, br, Link NCH₂CH₂*CONHPh), δ 2.10-2.08(4H, br, J=7.1Hz, Link NHCOCH₂*CH₂NCO), δ 1.88(3H, s, Me of Ace)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 1190.4[(M+2Na+H)³⁺], 1081.1[(M7+2H+Na)³⁺]이었다. 또한, M7:말토오스를 7분자 갖는 리간드의 분자량, M8:말토오스를 8분자 갖는 리간드의 분자량이다.

비교예 2. 방향족 아미노기를 2잔기 갖는 비오틴 링커를 사용한 리간드

비교 대조를 위해, 하기 일반식(23)에 나타낸 바와 같이 특허 문헌 2에 기재된 말단에 방향족 아미노기를 2잔기 갖는 링커 화합물 22(divalent type, 비오틴 링커22라 부른다)를 사용하여 당 분자를 2단위(분자) 집합시켜 리간드를 합성하였다.



상기 실시예 4의 (4-2)에서 얻은 당 분자 4단위를 집합시킨 리간드의 경우와 같게 하고, 비오틴 링커 22를 사용하여 당 분자를 2단위 집합시킨 리간드를 합성하였다. 또한, 2단위 집합시키는 당에는 글루코오스와 말토오스를 선택하였다.

처음에, 비오틴 링커 22에 글루코오스를 집합시켜 리간드인 화합물 23을 얻었다. 하기 일반식(24)에 나타낸 바와 같이, 비오틴 링커 10에 대해 글루코오스를 반응시키는 대신, 비오틴 링커 22에 대해 4당량의 글루코오스를 반응시킨 것 외에는, 상기 실시예 4의 (4-1)과 동일하게 조작을 하여 화합물 23을 얻었다. 화합물 23의 집합화도는 화합물 23의 NMR측정에 있어서 글루코오스 환원체인 글루시톨 1위 프로톤과 비오틴 링커 22 내의 방향족 프로톤(8H를 기준)의 강도비로부터 계산하였다. 양자의 강도비는 2.1:8이 되고, 화합물 23에는 글루코오스가 평균적으로 2.1분자 집합하여 있다고 추정되었다. 글루코오스가 n분자 집합한 화합물의 분자량(Mw)은 비오틴 링커 22의 분자량 567.7과 글루코오스가 1분자 집합할 때의 분자증가 164.1을 이용하여 수학적 식 4 같이 나타내어진다.

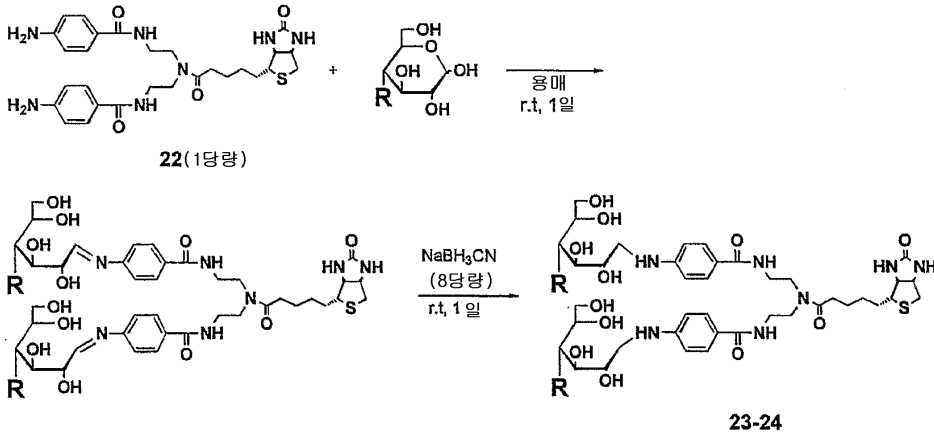
$$\text{수학적 식} \\ \text{Mw}=567.7+164.1n$$

상기 수학적 식 4에 n=2.1을 대입해 분자량 912.3을 얻고, 이를 기초로 화합물 23의 수율을 계산하면 73%로 구해졌다. 이하, 화합물 23을 2-Glc로 약칭한다.

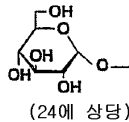
다음으로, 비오틴 링커 22에 말토오스를 집합시켜 리간드인 화합물 24를 얻었다. 하기 일반식(24)에 나타낸 바와 같이, 글루코오스 대신 말토오스를 사용한 것 외에는, 상기 화합물 23을 얻은 조작과 동일하게 말토오스를 집합화시켜 화합물 23을 얻었다. 화합물 24의 NMR측정에 있어서, 말단 글루코오스 1위 프로톤과 비오틴 링커 22 내의 방향족 프로톤(8H를 기준)의 강도비는 2.0:8이 되고, 화합물 24에는 말토오스가 평균적으로 2.0분자 집합하여 있다고 추정되었다. 말토오스가 n분자 집합한 화합물의 분자량(Mw)은 비오틴 링커 22의 분자량 567.7과 말토오스가 1분자 집합할 때의 분자량 증가 326.3을 이용하여 수학적 식 5와 같이 나타내어진다.

수학식
Mw=567.7+326.3n

상기 수학식 5에 n=2.0를 대입해 분자량 1207.2를 얻고, 이를 기초로 화합물 24의 수율을 계산한 결과, 76%로 구해졌다. 이하, 화합물 24를 2-Mal로 약칭한다.



R = HO- 또는 (24)
(23에 상당)



화합물 23을 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 비오틴 링커 22(4.14mg, 7.3 μ mol)와 글루코오스(3.84mg, 21.3 μ mol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=6/1/15, 0.25mL)에 용해시키고, 실온에서 6시간 교반하여, 비오틴 링커 22/글루코오스 반응용액을 얻었다. 이 비오틴 링커 22/글루코오스 반응용액에 추가로 글루코오스(1.38mg, 7.66 μ mol)를 첨가해 실온에서 밤새도록 교반한 후, 수소화 시아노붕소나트륨(6mg, 96 μ mol)을 첨가해 실온에서 밤새도록 교반하여 환원하였다. 이 환원된 비오틴 링커 22/글루코오스 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(70mL)를 사용해 정제하고, 물/메탄올=1/1로 용출시킨 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켜, 화합물 23으로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 23은 수득량 4.84mg (수율 74%)이었다. 얻어진 화합물 23의 ¹H NMR(600MHz, D₂O)측정을 행한 결과, δ 7.51(4H, d, J=6.6Hz, aromatic H), δ 6.62(4H, d, J=9.1Hz, aromatic H), δ 4.33(1H, dd, J_{B7/B4}=3.0, J_{B7/B6}=5.0Hz, Biotin NHCH*CH₂S), δ 3.88(2H, dd, J_{2/1}=4.4, J_{2/3}=4.9Hz, H-2), δ 3.84(1H, dd, J_{B3/B4}=4.4, J_{B3/B7}=3.7Hz, Biotin NHCH*CHS), δ 3.75(2H, dd, J_{3/2}=4.9, J_{3/4}=3.2Hz, H-3), δ 3.74-3.72(2H, m, H-6b), δ 3.72-3.69(4H, br, CH₂x2, Link NCH₂CH₂*NHCOPh), δ 3.69-3.67(2H, m, H-5), δ 3.64(4H, t, CH₂x2, J=4.6Hz, Link NCH₂*CH₂NHCOPh), δ 3.60(2H, dt, J_{4/3}=2.5, J_{4/5}=7.7Hz, H-4), δ 3.53(2H, dd, J=2.2, 6.0Hz, H-6a), δ 3.33-3.29(2H, dt, J_{gem}=13.7, J_{vic}=4.7Hz, H-1a), δ 3.11(2H, dt, J_{gem}=11.2, J_{vic}=3.3Hz, H-1b), δ 2.72(1H, dd, J_{gem}=12.9, J_{vic}=5.0Hz, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.57(1H, d, J_{gem}=13.2Hz, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.55-2.53(1H, m, J=3.3Hz, Biotin NHCHCH* S), δ 2.14(2H, t, J_{B12/B11}=7.0Hz, Biotin COCH₂*CH₂CH₂CH₂), δ 1.22-1.10(4H, m, CH₂x2, Biotin COCH₂CH₂*CH₂CH₂*)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 470.7[(M+2Na)²⁺]이었다. [a]_D²²=+ 6.61(c 0.145, H₂O)이었다. Calcd for C₄₀H₆₁N₇O₁₄S · 6.5 H₂O:C, 47.45;H, 7.31;N, 9.69%. Found:C, 47.44;H, 6.580;N, 9.60%.

그리고 화합물 24를 얻기 위해, 구체적으로 다음과 같은 조작을 하였다. 즉, 비오틴 링커 22(4.12mg, 7.3 μ mol)와 말토오스(7.9mg, 22.1 μ mol)를 혼합용매(물/아세트산/메탄올=12/1/15, 0.25mL)에 용해시키고 실온에서 밤새도록 교반하여 비오틴 링커 22/말토오스 반응용액을 얻고, 이후 수소화 시아노붕소나트륨(6mg, 96 μ mol)을 첨가해 실온에서 밤새도록 교반하여 환원하였다. 이 환원된 비오틴 링커 22/말토오스 반응용액을 감압 농축하고, 잔류물을 HP-20(70mL)를 사용해 정제하고, 물/메탄올=1/1로 용출시킨 분획을 모아 농축하고, 잔류물을 동결 건조시켜 화합물 24로서 백색 결정을 얻었다.

얻어진 화합물 24는 수득량 6.71mg(수율 75%)이었다. 그리고 얻어진 화합물 24의 ¹H NMR(500MHz, D₂O)측정을 행한 결과, δ7.60(4H, d, J=4.5Hz, aromatic H), δ6.74(4H, d, J=8.8Hz, aromatic H), δ5.09(2H, d, J_{1/2}=3.7Hz, H-1), δ4.44(1H, dd, J_{B7/B6}=4.8, J_{B7/3}=3.1Hz, Biotin NHCH*CH₂S), δ3.95-3.93(2H, br, H-2'), δ3.91-3.90(2H, br, H-5'), δ3.90-3.89(2H+ 1H, br, Biotin NHCH*CHS, H-3'), δ3.87-3.86(2H, br, H-5), δ3.82(2H, d, J_{gem}=12.7Hz, H-6a), δ3.76(2H, dd, J_{gem}=12.5, J_{vic}=5.2Hz, H-6b), δ3.72(4H, m, 1Hx2x2, J_{gem}=12.1, J_{3/4}=9.3Hz, H-6'a, H-3), δ3.66(4H, br, CH₂x2, Link NCH₂CH₂*NHCOPh), δ3.62(4H, d, J_{gem}=11.8Hz, H-6'b, H-4'), δ3.58-3.54(6H, m, CH₂x2+ 1Hx2, Link NCH₂*CH₂NHCOPh, H-2), δ3.42(2H, t, J_{4/3}=9.6Hz, H-4), δ3.37(2H, dt, J_{gem}=13.7, J_{vic}=4.8Hz, H-1'b), δ3.29(2H, td, J_{gem}=7.4, J_{vic}=3.0Hz, H-1'a), δ2.83(2H, dd, J_{gem}=13.0, J_{vic}=5.1Hz, Biotin NHCHCH₂*S), δ2.67(2H, d, J_{gem}=12.8Hz, Biotin NHCHCH₂*S), δ2.65-2.62(2H, m, Biotin NHCHCH*S), δ2.24(2H, t, J_{B12/B11}=7.0Hz, Biotin COCH₂*CH₂CH₂CH₂), δ1.31-1.19(4H, m, CH₂x2, J_{B11/B12}=7.0, J_{B9/B10}=7.4Hz, Biotin COCH₂CH₂*CH₂CH₂*), δ0.95-0.91(2H, m, Biotin COCH₂CH₂CH₂*CH₂)이었다. 그리고 ESI-MS(positive) m/z 632.8[(M+ 2Na)²⁺]이었다. [α]_D²²=+ 6.95(c 0.222, H₂O)이었다. Calcd for C₅₂H₈₁N₇O₂₄S · 9.1 H₂O:C, 45.13;H, 7.17;N, 7.09%. Found:C, 45.13;H, 6.63;N, 7.37%.

이상과 같이, 당 분자를 4단위 혹은 2단위 집합시킨 리간드를 합성하였다. 이하 이들 리간드를 사용하여 단백질과의 상호작용을 SPR측정에 의해 해석하였다.

실시예 5. SPR법을 이용한 당 분자와 단백질과의 특이적 상호작용

SPR측정에서는 분석대상물질이 리간드 이외의 분자와 비특이적으로 상호작용하는 경우가 많다. 그 때문에 실제의 측정에서는 특이적인 상호작용과 비특이적인 것이 합쳐진 공명각도 변화를 관측하고 있다. 비특이적인 상호작용을 저감시키고, 특이적인 상호작용을 관측한다는 것이 측정 상의 최대 문제점이 된다. 본 발명자들은 이 문제점을 다음의 방법(2채널 해석법이라 칭한다)에 의해 해결할 수 있지 않는가라고 생각했다.

본 실시의 형태에서 사용하는 STR측정을 실시하는 장치 SPR 670(상품명, Nippon Laser & Electronics LAB)에는 (S), (R)이라는 2개의 채널이 있으며, 도 3에 나타낸 바와 같이, 각각의 표면 상의 리간드와 분석대상물질과의 상호작용을 동시에 관측할 수 있다. 예를 들면, 한 쪽 표면은 4-Mal를, 다른 한 쪽에는 4-Glc를 고정화하여 글루코오스에 결합하는 렉틴인 콘카나발린 A (Concanavalin A, Con A)를 이들 두 표면에 동시에 같은 조건으로 흐르게 한다고 한다. Con A는 4-Mal의 말단에 존재하는 글루코피라노즈와 결합하나, 이를 갖지 않는 4-Glc와는 결합하기 어렵다고 생각된다. 4-Mal과 4-Glc란, 말단에 존재하는 당의 유무 외에는 동일한 구조이므로, Con A와의 상호작용에 차이가 있다고 한다면, 4-Mal에 존재하는 글루코피라노즈에 기인한다고 생각된다. 즉, 관측되는 (S), (R)의 공명각도 변화의 차이가 글루코피라노즈와 Con A의 특이적인 상호작용에 상당한다.

이와 같이 2종류의 다른 리간드를 (S)와 (R)에 각각 고정화하여 양자의 상호작용의 차이를 관측한다고 하는 종래의 수법을 응용하여 말단의 당의 유무 외에는 동일한 구조를 갖는 화합물을 리간드로서 사용하는 것에 의해 당 분자와 단백질의 특이적인 상호작용을 검출할 수 있음을 본 발명자들은 발견해냈다.

(5-1 리간드 도입 칩의 제작)

처음에, SPR측정에 의해 당 분자와 단백질의 상호작용 해석을 하기 위해, 센서칩에 리간드를 고정화하였다. 즉, 실시예 4에서 합성한 리간드를 비오틴-아비딘의 결합을 이용하여 칩 상에 고정화시켜 리간드 도입 칩(리간드 담체)을 얻었다. 또한, 아비딘을 SPR 센서칩 상에 고정화시킨 후 리간드를 고정화하였다.

구체적으로 리간드 도입 칩을 얻기 위해, 이하와 같은 조작을 하였다. 즉, 처음에 13x20x0.7mm의 유리기반에 50nm의 금 박막을 증착한 일본레이저전자주식회사 제조의 센서칩을 UV 오존 클리너(상품명:NL-UV253, 일본레이저전자주식회사)에 넣어 자외선을 20분간 조사하여 오존으로 센서칩의 표면을 세정했다. 다음으로, 이 센서칩을 100μM의 4,4'-디티오락산 에탄올용액이 들어간 살레에 담귀 실온에서 30분간 완만하게 진탕시켰다(상품명:Bio Dancer, New Brunswick Scientific사). 칩에 4-티오락산을 금-유황 결합을 이용해 고정화시켰다. 이 칩을 에탄올로 3회 세정한 후, 160mM 수용성 카르보다이미드 수용액 1mL와 13mM의 N-히드록시 숙신이미드 1,4-Dioxan용액 9mL와의 혼합용액이 들어간 살레에 담귀 실온에서 30분간 완만하게 진탕시켰다. 살레에 물 10mL를 첨가하고 실온에서 5분간 진탕시켜 활성화 반응을 종료시켰다. 칩을 물로 4회 세정해 바람으로 건조시킨 후, SPR 670의 센서칩 카트리지에 장착했다. 센서칩 카트리지에 장착한 칩에 런닝 버퍼를 흐르게 하고, 레이저광을 금막에 조사시켜 그 때 관측되는 표면 플라즈몬 공명각도 변화를 모니터링했다. 또한, 런닝 버퍼는 pH 7.4의 인산 완충용액(PBS)을 사용하고, 샘플을 흐르게 할 때 외에는, 항상 런닝 버퍼를 유속 5mL/min로 칩 상에 흐르게 했다. 그리고 SPR측정은 모두 일정 온도(25℃)로 행하고, 측정에서 사용하는 샘플용액은 모두 실린지 필터(Whatman(copyright) PURADISC(등록상표) 25TF 0.2mm PTFE Membrane filter)를 사용하여 여과하고 나서 사용하였다.

상기 칩에 런닝 버퍼를 흐르게 하여 공명각도 변화가 일정하게 되고 나서, 0.1mg/mL 뉴트로 아비딘(PIERCE, NeutrAvidin(등록상표), CA47105) 아세트산나트륨 수용액(10mM, pH5.5)을 유속 5μL/min로 60μL씩 3회 흐르게 하였다. SPR로 샘플 용액을 흐르게 한 후에는 런닝 버퍼로 전환하고, 여분의 샘플을 씻어 내어 공명각도 변화가 일정하게 되고 나서 다음의 조작을 하였다. 잔존하는 활성 에스테르를 불활성화(캡핑)하기 위해, 1.0M 아미노 에탄올을 포함하는 PBS용액(pH8.5)을 유속 5μL/min로 60μL씩 2회 흐르게 하여, 아비딘 부가 칩(아비딘 부가체)을 얻었다.

계속해서, 여러 가지 농도의 실시예 4에서 얻은 리간드의 PBS용액을 유속 10 μ L/min로 60 μ L씩 순차적으로 흐르게 하고, 상기 아비딘 부가 칩 상에 리간드를 고정화시켜 리간드 도입 칩(리간드 담체)을 얻었다. 또한, 리간드의 고정화는 SPR 센서 그래프로 레조넌스 유니트의 상승이 인정받지 못하게 될 때까지 반복하였다.

리간드를 고정화시킬 때까지의 SPR 센서그래프의 일례를 도 4에 나타내었다. 여기서는, S채널(이하, (S)로 약칭한다)에는 상기 실시예 4의 (4-3)에서 얻은 4-Mal, R채널(이하, (R)로 약칭한다)에는 4-Glc를 고정화시켰을 때의 센서그래프를 표시하였다. 센서그래프는 가로축은 시간, 세로축은 공명각도 변화(Response(RU;Response Unit))를 나타내고 있다.

분석대상물질을 첨가할 때 외에는, 칩 상에 런닝버퍼로서 인산 완충용액(pH7.4, 이하, PBS라 약칭한다)이 유속 5 μ L/min로 끊임없이 흐르고 있다. 칩 상에 분석 대상 물질의 첨가가 종료되면, 자동적으로 PBS가 흐르고, 결합에 관여하지 않았던 여분의 분석대상물질을 세정하도록 하였다. 0.1mg/mL의 뉴트로 아비딘 아세트산나트륨 용액(10mM 아세트산나트륨, pH5.5)을 유속 5 μ L/min로 60 μ L 흐르게 하면, 공명각도의 증가가 관측되며, 뉴트로 아비딘이 상기 칩에 고정화되었음을 알았다.

이 후, 칩 상에 잔존하는 활성 에스테르를 캡핑하기 위해, 1.0M 에탄올 아민을 포함하는 PBS용액을 유속 5 μ L/min로 60 μ L 흐르게 하였다. 캡핑 후, 공명각도 변화가 일정해진 시점과 뉴트로 아비딘 용액을 흘리기 전과 후의 공명각도 변화량을 고정화량으로 하였다. 이 센서그래프에서의 고정화량은 (S)가 3690RU, (R)이 3480RU가 되었다.

다음으로, (S)에는 4.9 μ M, 16.3 μ M, 49 μ M의 4-Mal용액을 (R)에는 0.49 μ M, 4.9 μ M의 4-Glc용액을 유속 10 μ L/min로 60 μ L 흘려서 고정화하였다. 고정화되지 않은 과잉의 리간드를 씻어 내어 공명각도 변화가 일정해진 시점과, 고정화 전의 공명각도 변화량을 리간드의 고정화량으로 하였다. 또한, 리간드의 고정화는 집합체를 흘려도 고정화량이 증가하지 않는 상태에 이를 때까지 반복적으로 행하였다. 이 센서그래프에서의 4-Mal의 고정화량은 220RU, 4-Glc의 고정화량은 220RU가 되어 2종류의 다른 리간드가 같은 정도로 고정화된 리간드 도입 칩을 제작할 수 있었다. 같은 방법으로 리간드가 다른 여러 가지의 리간드 도입 칩을 제작하였다.

(5-2 리간드의 고정화에 대한 검증)

합성한 리간드가 비오틴-뉴트로 아비딘의 결합에 의해 칩 상에 고정되어 있는지의 여부를 비오틴을 갖지 않는 비교예 1에서 얻은 아세틸 링커 15에 의해 말토오스를 집합화시킨 화합물 18(Ace-8-Mal)을 사용하여 SP측정으로 검증하였다. 즉, 5.3-Mal과 같은 조건에서 Ace-8-Mal을 뉴트로 아비딘이 고정화된 칩 상에 흐르게 하고, 이것이 고정화되지 않으면, 비특이적 리간드의 고정화가 없음을 확인할 수 있다.

우선, 상기 (5-1)과 마찬가지로 뉴트로 아비딘을 고정화시킨 아비딘 부가 칩을 제작하였다. 이 때의 뉴트로 아비딘의 고정화량은 (S)가 6620RU, (R)이 6330RU였다. 이 칩의 (S)에 순차적으로 0.61 μ M의 Ace-8-Mal용액, 5.48 μ M의 Ace-8-Mal용액, 0.61 μ M의 5.3-Mal용액, 5.48 μ M의 5.3-Mal용액을 유속 10 μ L/min로 60 μ L 흐르게 하고, (R)에는 PBS만을 계속 흘렸다. 이 때의 (S)와 (R)의 차이에 상당하는 (D)의 센서그래프를 겹쳐 그린 것이 도 5이다. 또한, 동 도면에서는 Ace-8-Mal은 Ace-Mal로, 5.3-Mal은 Bio-Mal로 표기하고 있다.

도 5에 나타낸 바와 같이, SPR측정의 결과로부터 비오틴을 포함하는 5.3-Mal이 특이적으로 칩 상에 고정화되고, 비오틴을 포함하지 않는 Ace-8Mal은 전혀 고정화되지 않았다. 따라서 비오틴 링커를 사용하여 당 분자를 집합화한 화합물(리간드)은 비오틴-아비딘(뉴트로 아비딘)의 결합에 의해 특이적으로 칩 상에 고정화할 수 있었다.

(5-3 리간드 도입 칩을 이용한 당 분자와 렉틴과의 상호작용)

상기 (5-1)에서 얻어진 리간드 도입 칩에 여러 농도의 단백질의 PBS용액을 유속 20 μ L/min로 60 μ L씩 흘려 SPR측정에 의해 리간드 도입 칩과 단백질의 결합 및 해리의 동작을 관측하였다. 또한, 사용한 단백질은 이하와 같다.

- * BSA(SIGMA ALBUMIN, BOVINE)
- * Concanavalin A(콘카나발린 A, SEIKAGAKU KOGYO)
- * Pea Lectin (완두콩 렉틴, SEIKAGAKU KOGYO)
- * Peanut Lectin (피넛 렉틴, SEIKAGAKU KOGYO)
- * RCA120(아주까리 콩 렉틴, SEIKAGAKU KOGYO)

또한, 상기 단백질이 도입된 리간드 도입 칩은 그 리간드 도입 칩 표면에, 10mM의 수산화나트륨 수용액을 60 μ L/min로 60 μ L 흐르게 함으로써 해리시키고 재생시켜 재사용하였다. 이 조작도 센서그래프에서 렉틴을 흘리기 전의 레조넌스 유니트(Response(RU;Response Unit))가 될 때까지, 1~3회 반복적으로 행하였다.

처음에, 상기 (5-1)에서 얻어진 5.3-Mal과 8-Glc를 사용한 리간드 도입 칩으로 Con A와의 상호작용을 조사하였다. 우선, 상기 (5-1)과 마찬가지로 칩에 뉴트로 아비딘을 고정화시켜 아비딘 부가 칩을 얻었다. 이 때의 뉴트로 아비딘의 고정화량은 (S)가 5470RU, (R)이 4380RU였다. 이 후, 아비딘 부가 칩의 (S)에 5.3-Mal을 (R)에 8-Glc를 고정화하여 리간드 도입 칩을 얻었다. 또한, 리간드의 고정화량은 (S)는 390RU, (R)은 390RU였다.

이와 같이 작성한 리간드 도입 칩에 1.0M의 Con A용액을 유속 10 μ L/min로 60 μ L 흘렸다. 이 때 관측된 (S), (R) 및 양자의 차이에 상당하는 (D)의 공명각도 변화를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, Con A용액을 흘리면 리간드 도입 칩 상의 리간드와 Con A가 결합하고, (S), (R) 모두 공명각도가 상승하였다. 다음으로, 결합에 관여하지 않았던 Con A를 씻어 내어 PBS를 유속 10 μ L/min로 약 1000초 흘린 후, 10mM 수산화나트륨 수용액을 유속 60 μ L/min로 60 μ L 흐르게 하여 리간드에 결합한 Con A를 해리시켰다. 해리에 따르는 공명각도의 급격한 감소가 보이며, 공명각도가 Con A를 흘리기 전의 베이스 라인과 같은 레벨로 일정하게 된 것으로부터 Con A가 완전하게 해리된 것을 알 수 있었다. 동 도면 중의(D)는 결합, 해리를 나타내는 전형적인 SPR센서그램과 같게 되었다. 즉, 이 계통에서 Con A와 글루코 필라노스의 특이적 상호작용을 관측할 수 있었다.

또한, 상기 리간드 도입 칩에 여러 농도의 Con A를 작용시켜 상호작용을 SPR측정하였다. 그리고 BSA 및 PSA와의 상호작용에 대해서도 SPR측정하여 공명각도 변화를 관측하였다.

이상의 결과로부터, 이하의 점이 분명해졌다. 즉, 합성한 비오틴 링커에 의해 당 분자를 집합화시킨 리간드는 아비딘(뉴트로 아비딘)을 고정화시킨 칩 상에 고정화할 수 있다. 그리고 Con A와 글루코 필라노스의 특이적 상호작용을 해석할 수 있다.

그리고 리간드 도입 칩을 이용한 「2채널 해석법」에 의해 단백질과의 비특이적 상호작용을 부인할 수 있다고 결론지었다. 또, Con A와 같이, 글루코 필라노스 인식 렉틴으로 여겨지는 PSA가 특이적으로 상호작용하지 않았던 점으로부터, 당 인식 성능을 갖는 렉틴에서도 칩 상에 고정화된 당 분자와는 결합의 정도에 차이가 생긴다는 것을 알 수 있었다.

또, 본 발명의 4-Mal 및 4-Glc와 비교예인 2-Mal 및 2-Glc를 고정화시킨 리간드 도입 칩을 제작하고, 이를 이용해 여러 농도의 Con A, BSA, PSA, RCA120, PNA용액을 흘려서 SPR측정하여 공명각도 변화를 관측하였다.

당 분자의 집합화 정도에 의한 렉틴과의 상호작용의 차이에 대해 얻어진 결과를 정리하여 표 1에 나타내었다.

표 1.

리간드	단백질	$K_D/\mu M$	$k_a/s^{-1}M^{-1} \times 10^4$	$k_d/s^{-1} \times 10^{-2}$
4-Mal, 4-Glc	1.0 μ M Con A	0.59 \pm 0.06	1.2 \pm 0.12	0.72 \pm 0.021
2-Mal, 2-Glc	1.0 μ M Con A	0.96 \pm 0.05	1.5 \pm 0.86	1.4 \pm 0.86

$K_D(k_d/k_a)$: 해리상수, k_a : 결합속도상수, k_d : 해리속도상수

표 1로부터 해리상수(KD)는 값이 작을수록 분자 간의 결합이 강한 것을 나타내고 있다. 표 1을 이용하여 같은 분석대상 물질에 대한 해리상수를 비교하면, 4단위의 당 분자가 집합한 계통이 2단위 계통의 약 2/3의 값인 것을 알 수 있다. 즉 당을 보다 많이 집합화시킴으로써, Con A와의 결합이 강해졌음이 확인되었다.

더욱 상세한 검토를 하기 위해 Con A와 리간드의 결합속도 정수(k_a), 해리속도 정수(k_d)를 비교하자 다음의 사실이 명백해졌다. 즉 양자의 결합속도에는 차이가 없지만, 해리속도는 당 분자를 4단위 갖는 리간드가 2단위인 것의 약 1/2의 값이며, 비교적 큰 차이가 보여졌다. 즉 당 분자를 4단위 갖는 리간드에서는 결합한 Con A가 해리하기 어려운 상황에 있다는 것을 알 수 있었다. 집합화시키는 당 분자의 수를 늘리면 결합속도에는 변화는 생기지 않으나, 한 번 결합한 Con A가 해리한 후에 재결합할 기회가 증가하여 해리속도가 저하되고, 이 영향에 의해 해리정수가 작은 값이 되었다고 생각된다. 이 결과로부터 본 발명의 링커 화합물은 당 분자를 집합화시켜 클러스터 효과에 의해 상호작용하는 분자와의 결합을 강하게 하는 것이 확인되었다.

다음으로, 당 분자를 바꿔 갈락토오스와 갈락토오스 인식 렉틴의 상호작용을 해석하였다. 상기 (5-1)에서 얻은 말단의 갈락토오스의 유무만이 다른 4-Lac와 4-Glc를 뉴트로 아비딘 칩에 고정화한 리간드 도입 칩을 이용하였다. 농도가 다른 RCA120, 그리고, PNA를 이용하여 상기와 같은 SPR측정을 실시하였다. 또, 4-Lac과 4-Glc의 리간드 도입 칩에 다양한 농도의 Con A, BSA, PSA, RCA120, PNA용액을 흘려 SPR측정을 행하여 공명각도 변화(D)를 관측하였다. 이들의 관측 결과로부터 락토스를 집합화시킨 리간드를 사용하면, 갈락토오스와 갈락토오스 결합 렉틴 RCA120 및 PNA와의 특이적 상호작용을 해석할 수 있음이 분명해졌다.

이상에 의해 얻어진 SPR측정의 결과로부터 이하의 점을 논할 수 있다.

1) 본 연구에서 합성한 링커를 사용하여 당 분자를 집합화시킨 리간드를 비오틴-아비딘(뉴트로 아비딘)의 결합에 의해 SPR 센서칩 상에 고정화시킬 수 있었다.

2) 2채널 해석법이라고 칭해지는 말단의 당 분자 이외가 같은 구조인 대조 리간드를 이용하는 방법에 의해 SPR측정에서 가장 문제가 되는 비특이적 상호작용을 상쇄하고, 당과 단백질의 특이적 상호작용을 검출하는 것을 가능하게 하였다.

3) 집합화도가 다른 당 리간드를 고정화시킨 당 칩을 이용함으로써, 클러스터 효과에 의한 당 분자와 렉틴의 결합의 증강을 관찰할 수 있었다.

이상과 같이, 본 발명의 링커 화합물은 당 분자를 집합화하여 얻어지는 집합체(리간드 도입 칩)는 SPR측정에 의한 렉틴과 당의 상호작용 해석에 충분히 적용할 수 있는 것이다.

실시예 6. 친화성 크로마토그래피

(6-1 친화성 컬럼 제작)

실시예 4에서 합성한 리간드를 이용하여 친화성 컬럼을 제작하였다.

일반적으로 행해지고 있는 친화성 컬럼의 제작법에 따라, 실시예 4에서 얻어진 리간드 4-Mal을 고정화한 친화성 컬럼을 제작하였다. 컬럼 담체는 AmerSham사제 Hitrap NHS-activated Hp(컬럼 부피 1mL)를 사용하였다. 이는 겔 매트릭스에 스페이서를 통해 활성기로서 N-히드록시 숙신이미드가 고정화되어 있어(겔 1mL당 10mmol NHS기) 아미노기를 갖는 화합물을 담체 상에 고정화시키는데 적합하다. 친화성 컬럼의 제작 순서의 개략을 도 6에 나타낸다.

컬럼에 용액의 주입은 컬럼에 접속한 1mL 혹은 5mL의 실린지(상품명:테르모 실린지, 감마선 멸균을 마친 1mL, 5mL)를 사용하여 컬럼의 하단으로부터 유출하는 용액이 매초 1방울의 유속이 되도록 수동으로 행하였다. 그리고 모든 용액은 실린지 필터(Millex-GS SyringeDriveFilterUnit 0.22µm)를 사용하여 여과한 것을 사용하였다. 버퍼로서 이하의 1~3의 용액을 조제하였다.

- 1) 뉴트로 아비딘 커플링 버퍼(0.5M 염화나트륨 함유의 10mM 아세트산 나트륨 수용액 pH5.5)
- 2) 블로킹 버퍼(0.5M 염화나트륨 함유의 0.5M 에탄올아민 수용액 pH8.3)
- 3) 세정 버퍼(0.5M 염화나트륨 함유의 0.1M 아세트산 나트륨 수용액 pH4.0)

N-히드록시 숙신이미드가 겔 담체에 고정화된 겔 담체를 충전되어 있는 활성화 컬럼(Amersham사제 Hitrap NHS-activated HP) 1mL에 병행한 1mM 염산 1mL를 통해 충전되어 있던 이소프로판올을 제거하였다. 이후 곧 2.0mg/mL의 뉴트로 아비딘 커플링 버퍼용액 1mL를 통과하고, 뚜껑을 밀봉하여 실온에서 30분 방치하였다. 다음으로 블로킹 버퍼 6mL를 통과해 뚜껑을 밀봉하여 실온에서 30분 방치한 뒤, 세정 버퍼 6mL, 블로킹 버퍼 6mL, PBS 6mL를 순차적으로 통과하였다. 이후 0.5mg/mL의 리간드(4-Mal) PBS용액을 1mL 통과하고, 뚜껑을 밀봉하여 실온에서 30분 방치하였다. 이후 PBS 5mL를 통과해 과잉의 리간드를 씻어 내었다.

(6-2 친화성 크로마토그래피)

상기 (6-1)에서 얻어진 친화성 컬럼을 이용하여 리간드와 상호작용하는 단백질과 상호작용하지 않는 단백질을 분리하였다. 또한, 사용한 단백질은 이하의 3종류이다.

- *) BSA(SIGMA ALBUMIN, BOVINE)
- *) Concanavalin A(Con A, SEIKAGAKU KOGYO)
- *) Pea Lectin(PSA, SEIKAGAKU KOGYO)

실시예 5의 (5-3)의 SPR측정의 결과로부터, Con A는 4-Mal과 강하게 결합하고, 수산화나트륨 수용액에 의해 해리하는 것을 알 수 있다. 그리고 PSA 및 BSA는 특이적으로 상호작용하지 않는 것도 알 수 있다.

이상으로부터, 이들 단백질의 혼합용액을 친화성 컬럼에 통과시키면, Con A만이 4-Mal에 결합하여 컬럼에 유지되고, 이외의 것들은 그냥 통과하여 용출된다고 예상하였다. 유지된 Con A는 수산화나트륨을 포함하는 PBS용액을 컬럼에 통과함으로써 용출된다고 생각된다. 또는 결합 저해제로서 글루코오스 용액을 컬럼에 통과시켜도 용출된다고 생각하였다. 또한, 이 친화성 크로마토그래피의 순서를 도 7에 나타내었다.

처음에, (6-1)에서 제작한 컬럼에 각각의 단백질의 최종 농도가 1mM가 되도록 조정된 단백질 혼합 PBS용액 1mL를 통과하고, 뚜껑을 밀봉하여 5분간 실온에서 방치하였다.

계속해서 PBS 5mL를 통과하여 유출액을 1mL씩 모았다(Mix-1.2.3.4.5로 하였다). 다음으로 해리제로서 순차적으로 0.1mM, 1.0mM, 10mM, 1M 글루코오스 PBS용액을 5mL씩 통과하여 각각의 유출액을 1mL씩 모았다(순차적으로 0.1Glc-1~5, 1Glc-1~5, 10Glc-1~5, 1000Glc-1~5로 하였다). PBS 5mL를 통과하고 컬럼을 세정 후, 10mM 수산화나트륨 PBS용액 5mL를 통과하여 유출액을 1mL씩 모았다(NaOH-1.2.3.4.5로 하였다).

(6-3. 단백질의 동정)

상기 (6-2)의 친화 크로마토그래피에 의해 모은 분획은 자외선 분광계를 이용해 파장 280nm에서의 흡광도를 측정하고, 흡수가 인정된 분획을 이하와 같이 SDS-PAGE를 거쳤다.

처음에 이하의 용액을 조제하였다. 또한, 모든 용액은 시린지 필터(Millex-GS Syringe Drive Filter Unit 0.22mm)를 사용하여 여과하고 나서 사용하였다.

*) 0.5M Tris-HCl 완충용액 pH6.8

*) 영동조용 완충용액 (나카라이테스크제 영동용 완충용액 사용)

*) 샘플 조정용 버퍼(SDS 0.3mg, 2-메르캅토에탄올 0.3mL, 글리세린 6mL, 50mM Tris-HCl 완충용액 3mL, 이온 교환수 1mL)

*) 마커 색소용액(브롬페놀 블루 1mg, 글리세린 0.1mL, 이온 교환수 0.9mL)

*) 쿠마시 브릴리언트 블루 염색액(나카라이테스크제래피드스테인 CBB키트 사용)

모은 분획 1mL를 동결 건조하고 나서 이온 교환수 100μL를 첨가한 후 다시 용해시켰다. 이 용액 20μL와 샘플 조정용 버퍼 10μL를 혼합하여 95℃로 10분간 가열해 샘플 용액을 조정하였다. 영동용 완충용액을 충전한 전기 영동조에 기성 겔(ATTO PAGEL-Compact AE-6000(SDS 12.5%함유))을 세트하여, 각 레인에 마커 색소용액을 1μL와 변형시킨 샘플 용액을 10μL씩 넣어 20mA의 일정 전류로 영동시켰다. 스탠다드로서 Prestained protein maeke r. Low range(나카라이테스크제)를 동시에 영동하였다. 영동 종료 후 겔을 꺼내 쿠마시 브릴리언트 블루 염색액에 침지시켜 실온에서 50분간 진탕시켰다(New Brunswick Scientific사제 Bio Dancer사용). 진탕 후 겔을 이온 교환수로 세정하고, 나아가 60℃의 이온교환수에 담겨 탈색시켰다. 탈색된 겔은 건조시켜 보존하였다.

구체적으로는 12.5% 아크릴아미드 겔(ATTO PAGEL-Compact AE-6000)을 사용해 SDS-PAGE를 행하고, 쿠마시 브릴리언트 블루에 의해 염색하였다. 이 결과도 도 8이다. 도 8에 나타난 바와 같이 Mix-2 분획까지는 Con A, PSA, BSA의 3개 밴드를 볼 수 있어 이들이 용출되어 있음을 알 수 있다. Mix-3에서는 BSA, PSA의 밴드가 사라지고 Con A의 밴드만이 나타나 있다. 그 이후의 분획에는 BSA, PSA의 밴드는 보이지 않고, Mix-4, Mix-5, 10Glc-1, NaOH-2의 어느 분획에도 Con A의 밴드가 보였다. 이들 결과로부터, 다음의 2가지 점을 알 수 있었다.

(1) BSA, PSA는 컬럼을 그냥 통과하였다.(과잉량의 단백질을 어플라이했기 때문에 흡착되어야 할 Con A의 일부 도용출되어 있어 Mix-2에도 3개의 단백질 모두가 보였다.)

(2) 대부분의 Con A는 담체 상의 4-Mal와 결합해 유지되고, 용리제에 의해 컬럼으로부터 용출한다.

이상의 결과로부터 알 수 있듯이, 4-Mal를 고정화시킨 친화성 컬럼을 사용하여 Con A와 PSA와 BSA의 혼합용액에서 Con A만을 선택적으로 분리할 수 있었다.

또한, 발명을 실시하기 위한 최선의 형태의 항에 있어서 이루어진 구체적인 실시형태 또는 실시예는 어디까지나, 본 발명의 기술 내용을 분명히 하는 것이며, 그러한 구체적인 예에게만 한정해 협의로 해석되어야 할 것이 아니라, 본 발명의 정신과 다음에 기재하는 특허 청구의 범위 내에서, 여러가지로 변경하여 실시할 수 있는 것이다.

산업상 이용 가능성

본 발명의 링커 화합물은 이상과 같이, 4단위 이상의 당 분자를 도입 가능한 부위로서, 4개의 방향족 아미노기를 가지고 있다. 또, 당 분자와 특이적으로 상호작용하는 단백질의 검출이나 분리를 행할 때에 사용되는 단백질 분석용의 지지체에 결합 가능한 부위로서, 비오틴 부위 또는 이미노 비오틴 부위를 가지고 있다. 또, 상기 링커 화합물은 단백질과의 비특이적 상호작용의 영향을 거의 무시할 수 있다.

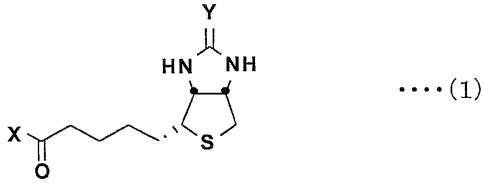
또, 본 발명의 리간드는 상기 링커 화합물에 당 분자를 도입하여 이루어지는 것이다.

따라서 본 발명은 링커 화합물이나 리간드를 이용하여 생체분자의 상호작용을 검출하는 바이오 테크놀로지 산업에 이용하는 것이 가능해진다. 특히, 칩 테크놀로지나 친화성 컬럼을 사용하는 분야에 이용할 수 있다. 또, 바이오프로브나 바이오 센서를 이용하는 분야, 나아가 제약 분야나 진단·검사 등의 의료기술에도 이용하는 것이 가능해진다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

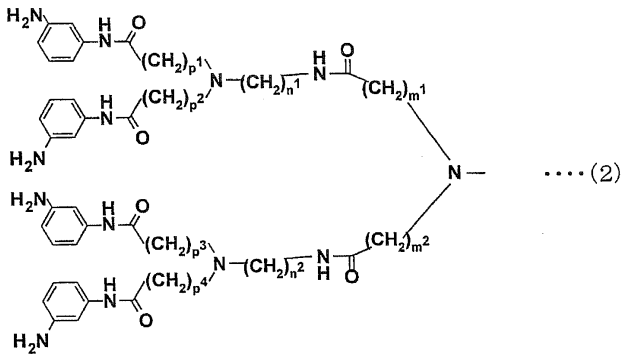
일반식(1)



(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 갖는다)에 나타내는 구조를 가지며, 상기 X는 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 동시에 주쇄에 탄소-질소 결합을 가질 수도 있는 탄화수소 유도쇄를 4쇄 포함하여 이루어지는 다분기 부위의 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하는 다용도형 링커 화합물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 X는 일반식 (2)



(식 중, $m^1, m^2, n^1, n^2, p^1, p^2, p^3, p^4$ 는 각각 독립적이며, 1 이상 6 이하의 정수)에 나타낸 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하는 다용도형 링커 화합물.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 일반식 (2)의 $m^1, m^2, n^1, n^2, p^1, p^2, p^3, p^4$ 는 모두 2로 나타내어지는 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하는 다용도형 링커 화합물.

청구항 4.

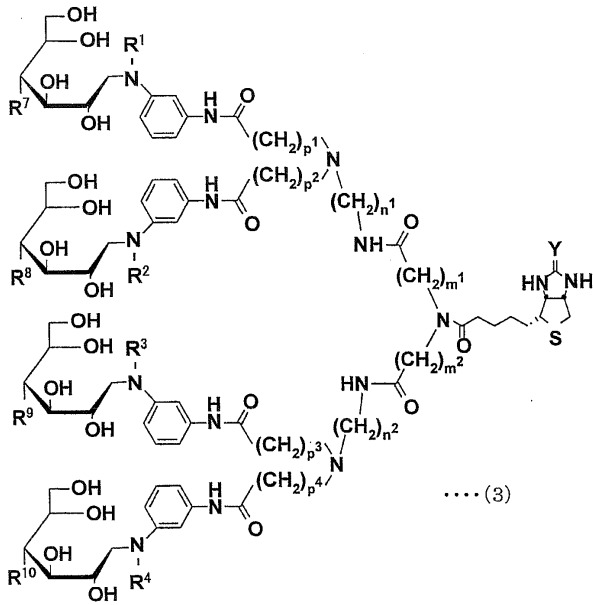
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 다용도형 링커 화합물의 방향족 아미노기에 당 분자를 도입하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 당 분자는 단당류, 올리고당류, 다당류 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 6.

일반식(3)



(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 가지며, R¹, R², R³, R⁴는 각각 독립적이며,

H- 또는 로 나타내어지는 구조이며,

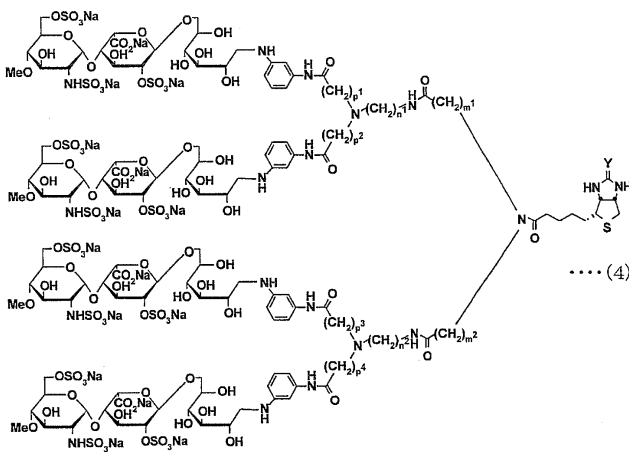
R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰은

HO- 또는 또는 로 나타내어지는 구조로 된 군에서 선택되는 구조를 갖는다)

(식 중, m¹, m², n¹, n², p¹, p², p³, p⁴는 각각 독립적이며, 1 이상 6 이하의 정수)에 나타낸 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 7.

일반식(4)



(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 가지며, m¹, m², n¹, n², p¹, p², p³, p⁴는 각각 독립적이며, 1 이상 6 이하의 정수)에 나타낸 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 8.

비오틴계 화합물과 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 4쇄 갖는 아민 화합물과의 축합반응을 수행하는 단계와,

상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호하는 단계를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 다용도형 링커 화합물의 제조방법.

청구항 9.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 다용도형 링커 화합물과 당 분자를 사용하여, 환원 아미노화 반응을 수행하는 것을 특징으로 하는 리간드의 제조방법.

청구항 10.

당 분자를 지지체의 표면에 배열시키는 당 분자의 도입방법으로서,

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 리간드를 포함하는 용액과 표면에 스트렙토 아비딘 또는 아비딘이 고정되어 있는 지지체를 접촉시키는 것을 특징으로 하는 당 분자의 도입방법.

청구항 11.

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 리간드를 비오틴 부위 또는 이미노비오틴 부위와 스트렙토 아비딘 또는 아비딘의 결합인 비오틴-아비딘 결합을 통해 지지체의 표면에 고정화시켜서 이루어지는 것을 특징으로 하는 리간드 담체.

청구항 12.

제 11항에 있어서, 상기 지지체에는 스트렙토 아비딘 또는 아비딘이 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 리간드 담체.

청구항 13.

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 표면 플라즈몬 공명 측정용의 센서칩으로서 사용되는 리간드 담체.

청구항 14.

제11항 또는 제12항에 있어서, 친화성 크로마토그래피용의 컬럼에 사용되는 리간드 담체.

청구항 15.

지지체 표면에 당 분자가 고정화되어 있는 센서칩을 사용하여 당 분자의 특이적 상호작용을 검출하는 표면 플라즈몬 공명의 측정방법으로서,

말단구조가 다른 당 분자가 도입되어 이루어진 적어도 두 개의 센서칩을 사용하며,

상기 적어도 두 개의 센서칩은 제1의 당 분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어진 제1의 센서칩과 상기 제1의 당 분자와는 말단구조가 다른 제2의 당 분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어진 제2의 센서칩을 포함하고,

제1의 센서칩을 사용하여 얻어진 검출결과와 제2의 센서칩을 사용하여 얻어진 검출결과의 차이를 측정하는 것을 특징으로 하는 표면 플라즈몬 공명의 측정방법.

청구항 16.

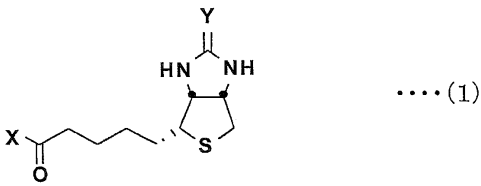
제15항에 있어서, 상기 센서칩에 제1항 또는 제3항의 동일 구조의 링커 화합물을 사용하여 당 분자가 고정화되는 것을 특징으로 하는 표면 플라즈몬 공명의 측정방법.

청구항 17.

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 센서칩에 약 동일한 수의 당 분자가 고정화되는 것을 특징으로 하는 표면 플라즈몬 공명의 측정방법.

요약

다용도형 링커 화합물은 하기의 일반식(1)



(식 중, Y는 O 또는 NH로 나타내어지는 구조를 갖는다)에 나타내는 구조를 가지고 있다. 상기 X는 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 동시에 주쇄에 탄소-질소 결합을 가질 수도 있는 탄화수소 유도체를 4쇄 포함하여 이루어지는 다분기 부위의 구조를 가지고 있다. 상기 다용도형 링커 화합물은 단백질 분석용의 지지체 표면상에 당 분자를 재현성 있게 2차원적으로 배열할 수 있다. 또한, 리간드는 상기 다용도형 링커 화합물에 당 분자가 도입되어 이루어진다.

대표도

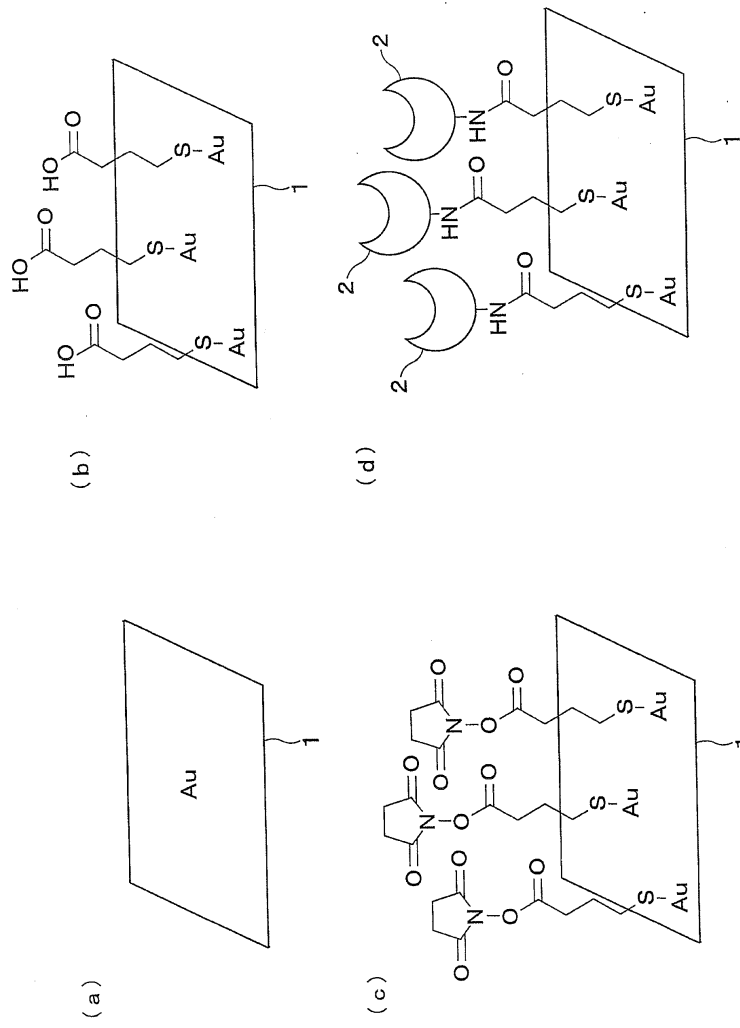
도 1

색인어

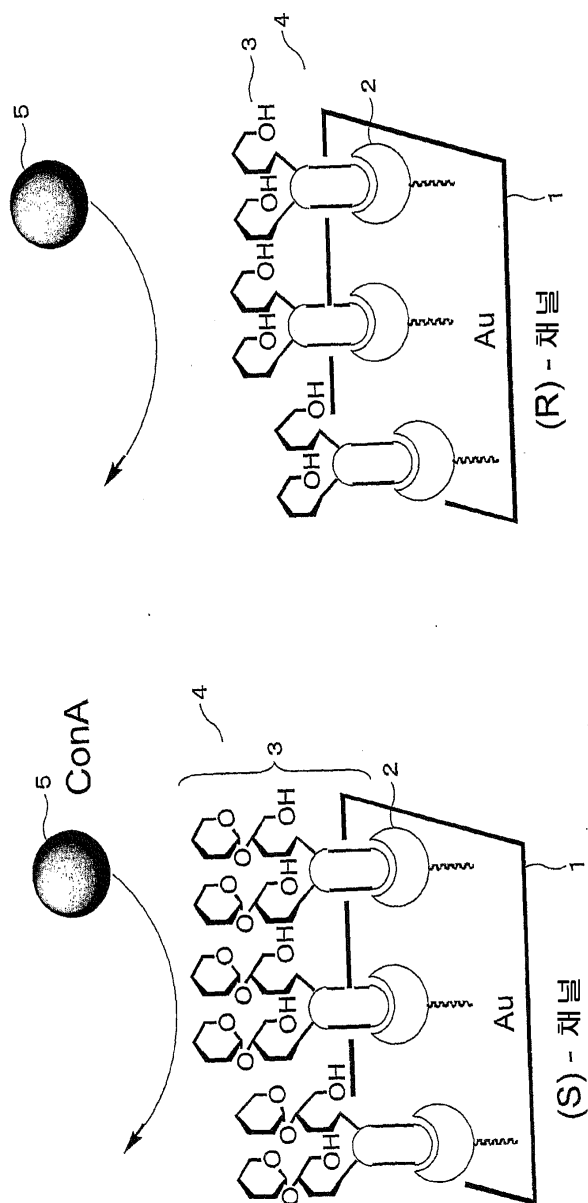
다용도형 링커 화합물

도면

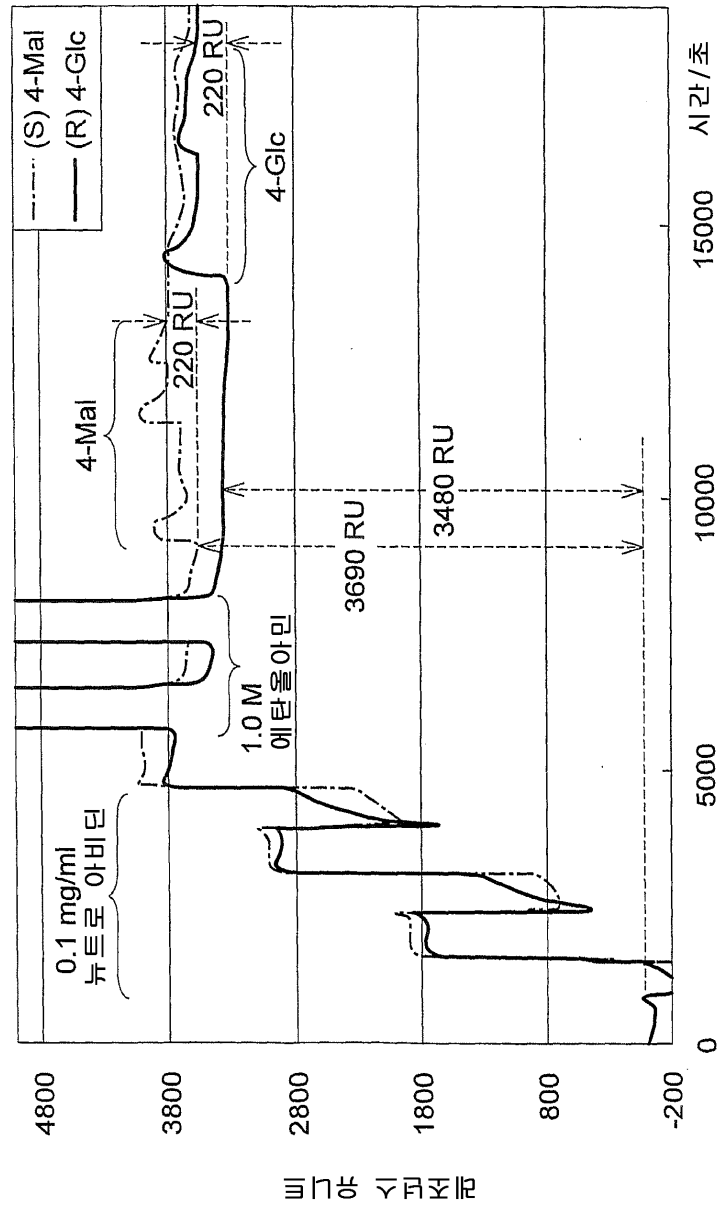
도면1



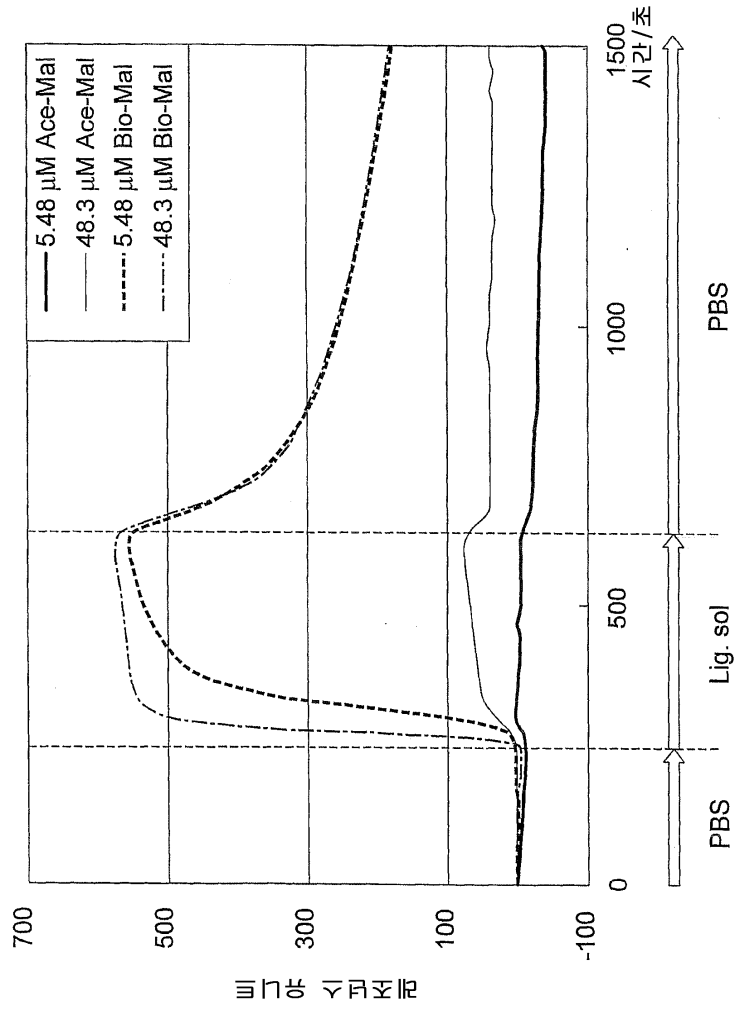
도면3



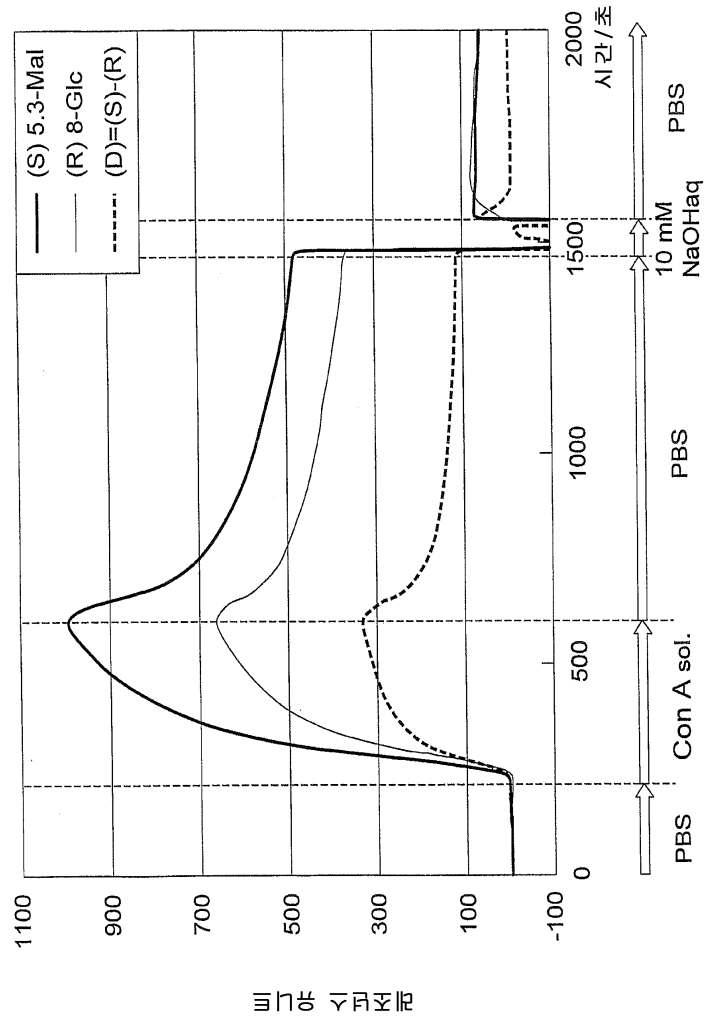
도면4



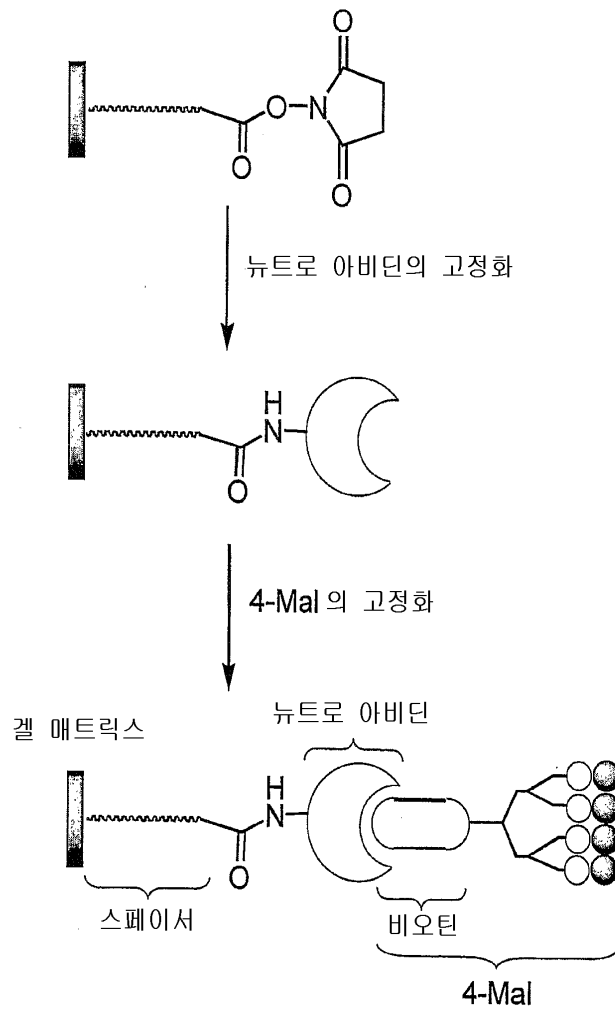
도면5



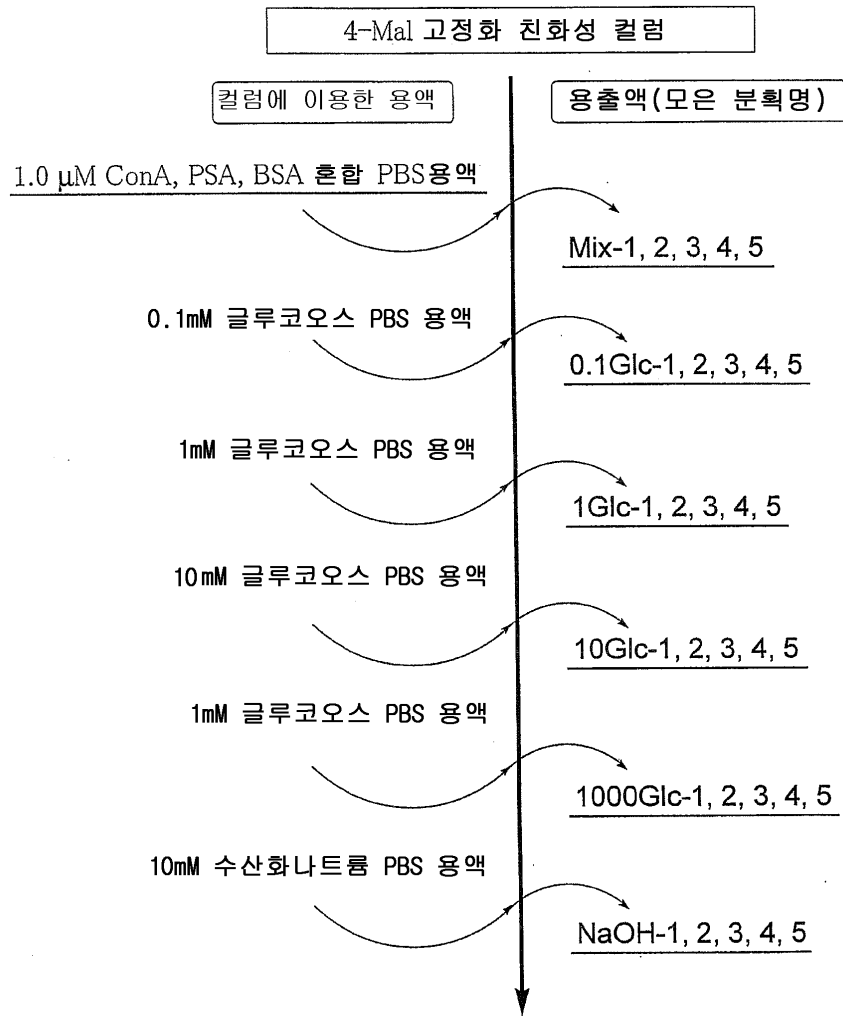
도면6



도면7



도면8



도면9

