



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0018876
C07D 339/04 (2006.01) (43) 공개일자 2007년02월14일

(21) 출원번호	10-2006-7018117	(87) 국제공개번호	WO 2005/075453
(22) 출원일자	2006년09월05일	(43) 공개일자	2005년08월18일
심사청구일자	2006년09월05일		
번역문 제출일자	2006년09월05일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP2005/001726		
국제출원일자	2005년02월04일		

(30) 우선권주장 JP-P-2004-00029562 2004년02월05일 일본(JP)

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

(72) 발명자 수다, 야수오
일본 890-0005 카고시마 카고시마시 시모이시키 1-13-1-106
아라노, 아키오
일본 457-0817 아이치 나고야시 미나미구 모토시바타니시마치3-1-3-612
쿠수모토, 소이치
일본 562-0041 오사카 미노시 사쿠라 4-15-6-209
소벨, 마이클
미국 워싱턴주 98112 피치 코트 이스트 시애틀 1624
와카오, 마사히로
일본 890-0025 카고시마 카고시마시 하라라 1284-1-103

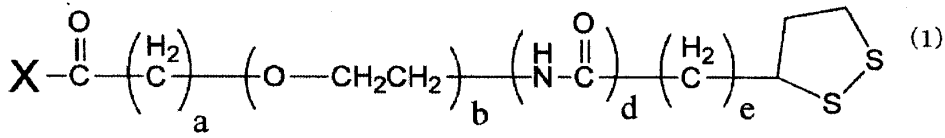
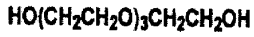
(74) 대리인 이래호

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 링커 화합물 및 리간드 복합체, 및 그것들의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 비특이적인 소수성(疎水性) 상호작용을 극력 억제하고, 또한 금속 결합에 제공되는 디설파이드기까지의 길이를 용이하게 조정가능하도록 함으로써, 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있는 신규 링커 화합물, 및, 신규 리간드 복합체, 리간드 담지체, 및 이것들의 제조 방법을 제공한다. 링커 화합물은, 하기 일반식 (1) (식 중, a, b, d, e는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있다. 상기 X는, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방향 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 포함하여 이루어지는 다분기(多分岐) 구조 부위인 구조를 구비하고 있다. 또한, 리간드 복합체는, 상기 링커 화합물에 당분자(糖分子)가 도입되어 이루어지는 것이다.

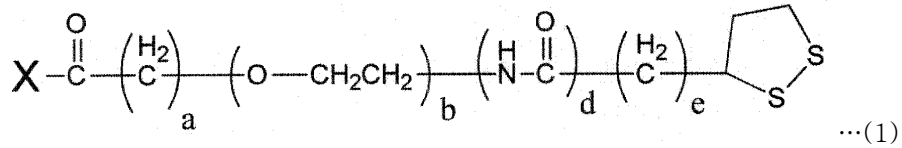


특허청구의 범위

청구항 1.

일반식 (1)

화학식 1



(식 중, a, b, d, e는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고,

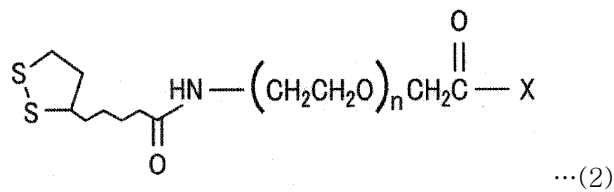
상기 X가, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방향 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 포함하여 이루어지는 다분기(多分岐) 구조 부위인 구조를 구비하고 있는 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

일반식 (2)

화학식 2



(식 중, n은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고,

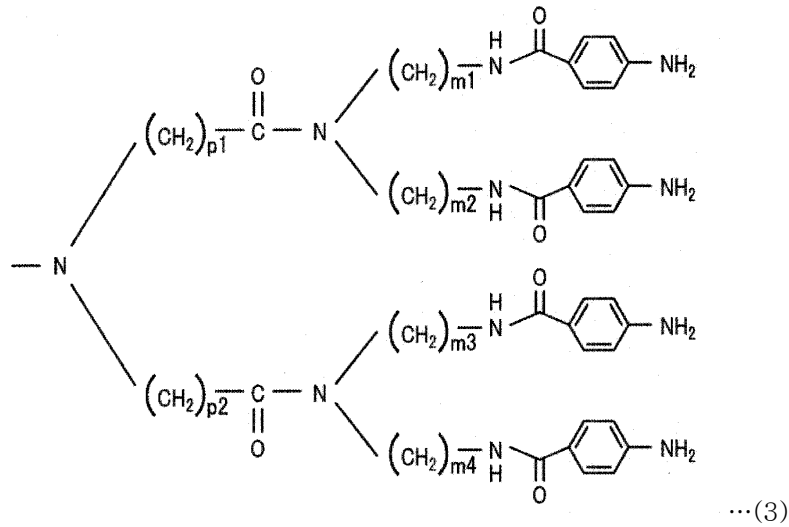
상기 X가, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방향 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 포함하여 이루어지는 다분기 구조 부위인 구조를 구비하고 있는 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 X는, 일반식 (3)

화학식 3



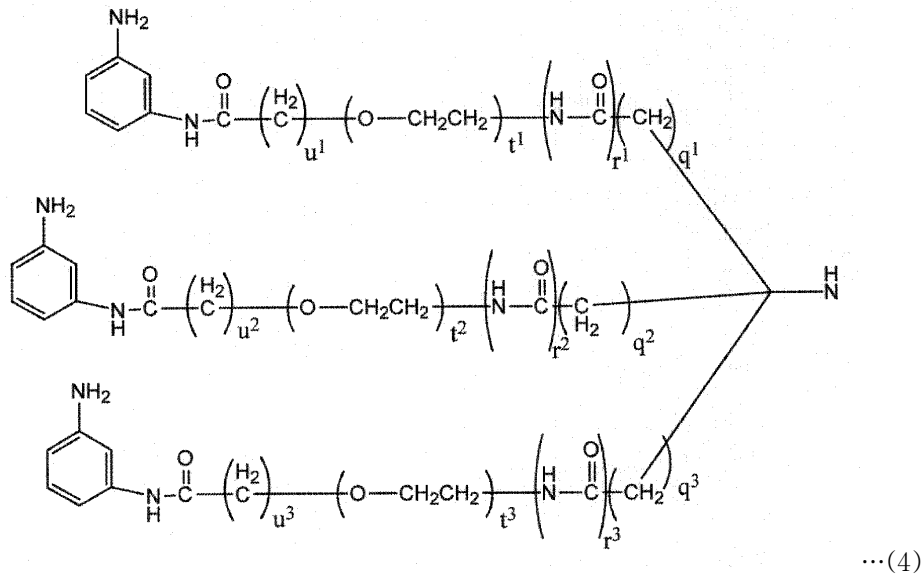
(식 중, $m^1, m^2, m^3, m^4, p^1, p^2$ 는 각각 독립적으로, 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

청구항 4.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 X는, 일반식 (4)

화학식 4



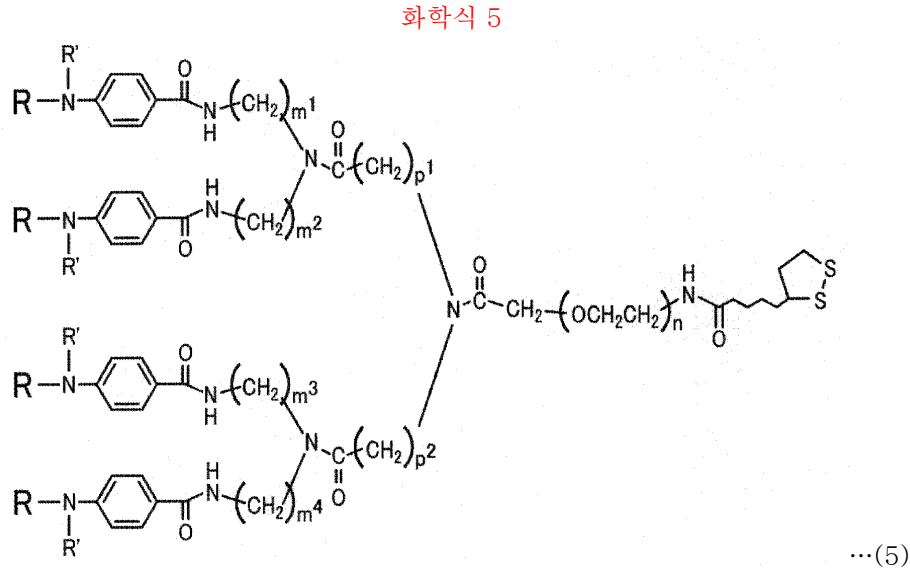
(식 중, $q^1, q^2, q^3, r^1, r^2, r^3, t^1, t^2, t^3, u^1, u^2, u^3$ 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하인 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 기재된 링커 화합물의 방향족 아미노기에 당분자(糖分子)를 도입함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 6.

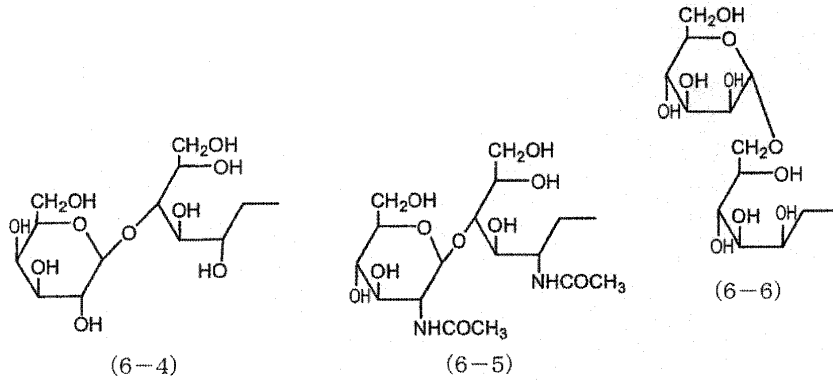
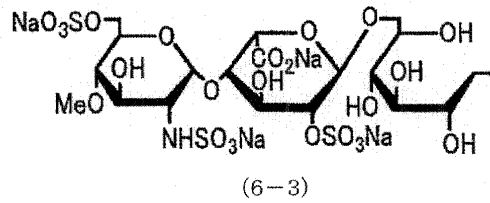
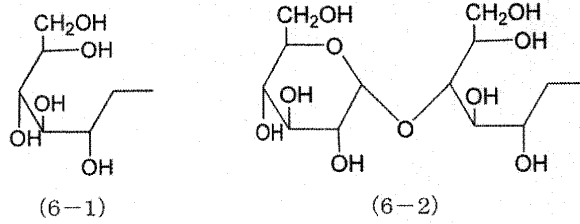
일반식 (5)



(식 중, $m^1, m^2, m^3, m^4, n, p^1, p^2$ 는 각각 독립적으로, 1 이상 6 이하의 정수. R'는 수소(H) 또는 R.)로 나타내어지는 구조를 구비하고,

상기 R이 식 (6-1) 내지 식 (6-6)

화학식 6

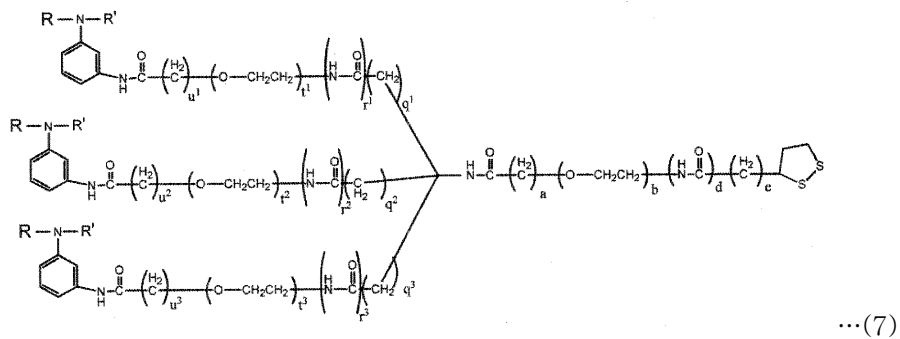


으로부터 선택되는 올리고당 유래 화합물인 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 7.

일반식 (7)

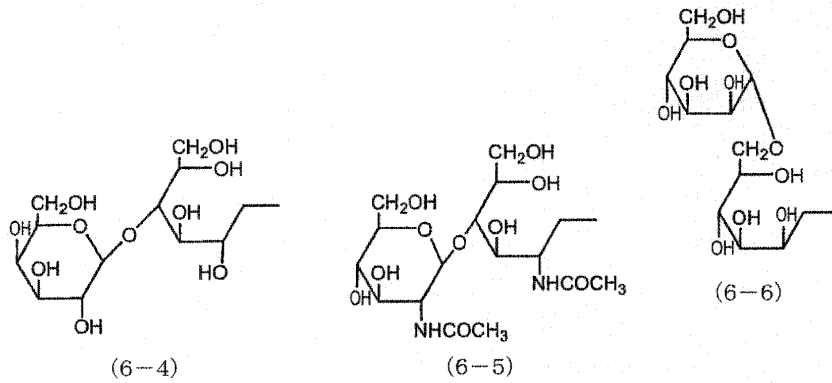
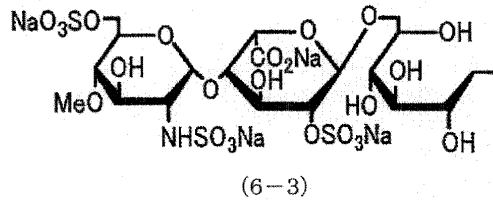
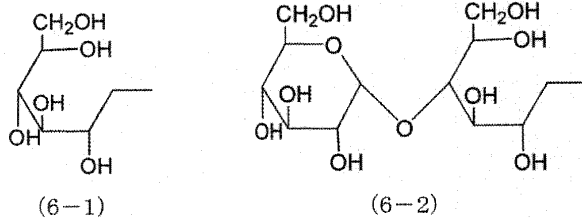
화학식 7



(식 중, a, b, d, e, q¹, q², q³, r¹, r², r³, t¹, t², t³, u¹, u², u³는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수. 단, b가 0일 때에 t¹, t² 및 t³는 0이 아니고, t¹, t², 및 t³가 0일 때에 b는 0이 아니다. 또한, R'는 수소(H) 또는 R.)로 나타내어지는 구조를 구비하고,

상기 R이 식 (6-1) 내지 식 (6-6)

화학식 8



으로부터 선택되는 올리고당 유래 화합물인 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 8.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 기재된 링커 화합물의 제조 방법으로서,

치옥트산(thioctic acid)과, 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 3쇄 이상 가지는 아민 화합물의 축합 반응을 행하는 단계와,

상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호하는 단계를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 링커 화합물의 제조 방법.

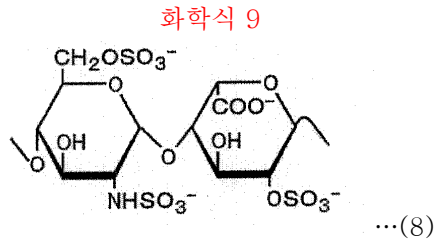
청구항 9.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 기재된 링커 화합물과 당분자를 이용하여 환원아미노화 반응을 행하는 것을 특징으로 하는 리간드 복합체의 제조 방법.

청구항 10.

제 9항에 있어서,

상기 당분자로서, 일반식 (8)

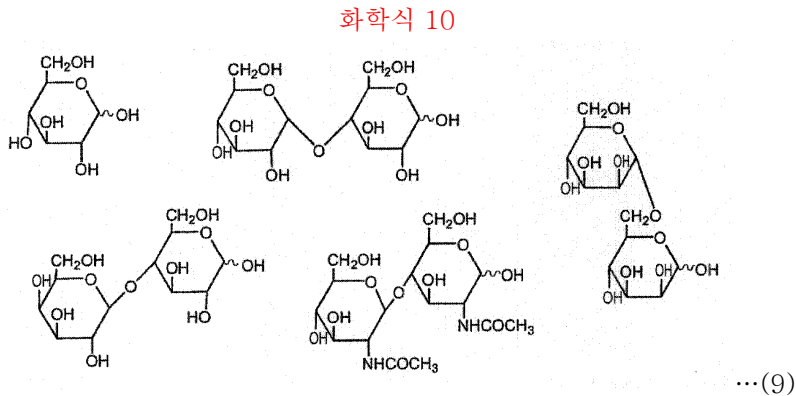


로 나타내어지는 헤파린 부분 2당 구조를 가지는 황산화 올리고당을 이용하는 것을 특징으로 하는 리간드 복합체의 제조 방법.

청구항 11.

제 9항에 있어서,

상기 당분자로서, 군 (9)



로부터 선택되는 올리고당의 적어도 1개를 이용하는 것을 특징으로 하는 리간드 복합체의 제조 방법.

청구항 12.

당분자를 지지체의 표면에 배열시키는 당분자의 도입 방법으로서,

제 5항 내지 제 7항 중 어느 1항에 기재된 리간드 복합체를 포함하는 용액과 표면에 금속을 가지는 지지체를 접촉시키는 것을 특징으로 하는 당분자의 도입 방법.

청구항 13.

제 5항 내지 제 7항 중 어느 1항에 기재된 리간드 복합체를 표면에 금속을 가지는 지지체 위에 고정화시킴으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 리간드 담지체.

명세서

기술분야

본 발명은 표면 플라즈몬 공명 센서 칩 등의 단백질 분석용 지지체에 올리고당 등의 당쇄를 고정하는 것이 가능한 링커 화합물, 및 이 링커 화합물에 당쇄를 도입하여 이루어지는 리간드 복합체, 리간드 담지체, 및 이것들의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

생체 내에 존재하는 여러 가지 당쇄는 생물의 활동이나 생명을 유지하기 위한 메커니즘 중에서 중요한 역할을 하고 있다. 이와 같은 당쇄의 기능을 정밀하게 설명하기 위해서는 당쇄의 복잡한 구조에 근거하여 그들의 기능을 해석할 필요가 있다. 당쇄의 기능 해석에는 구조가 해명되어 있는 올리고당을 이용하여 당쇄의 구조를 일부씩 재현하고, 이에 의해 당쇄 전체의 구조와 기능의 관계를 밝히는 기법이 사용된다.

상기 당쇄의 기능 해석 기법으로서는, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(이하, SPR이라 기재한다)법이 알려져 있다. 즉, 당쇄의 일부를 모의(模擬)한 올리고당을 포함하여 이루어지는 리간드 복합체를 센서 칩 표면에 고정화하고, 이에 의해 올리고당이 고정화되어 이루어지는 센서 칩을 이용하여 올리고당과 특이적으로 상호작용하는 단백질 등의 물질을 특정한다. 이에 의해, 올리고당 구조에 근거하는 생물 활성의 올바른 평가를 행할 수 있다.

그러나, 올리고당은 1분자만으로는 활성이 그다지 높지 않기 때문에 올리고당의 생물 활성을 평가할 경우에는 올리고당쇄를 센서 칩 상에 집합화시키는 것이 필요하게 된다. 즉, 집합화된 올리고당쇄를 이용하여 단백질과의 상호작용을 해석함으로써 올리고당쇄의 생물 활성의 평가를 행하는 것이 가능해진다.

여기서, 본 발명자들은 지금까지 센서 칩 표면에 고정가능한 부위 및 올리고당쇄를 도입가능한 부위를 분자 내에 가지는 링커 화합물을 얻고, 이 링커 화합물에 1단위 또는 2단위의 올리고당쇄를 도입하여 이루어지는 리간드 복합체를 얻었다. 그리고 이 리간드 복합체를 이용함으로써 센서 칩 상에 올리고당쇄를 집합화하여 도입하는 것이 가능함을 발견하였다(예를 들어, 특허문헌 1, 비특허문헌 1 등을 참조).

[특허문헌 1] 일본 특허 공개 제 2003-836969호 공보(2003년 3월 19일 공개)

[비특허문헌 1] 「일본 화학회 제 79회 춘계 연회-강연 예고집 II」 사단법인 일본 화학회, 2001년 3월 15일, p. 1042

그러나, 상기 특허문헌 1과 비특허문헌 1에 기재된 리간드 복합체에서는 올리고당의 당쇄를 센서 칩 표면에 2차원적으로 배열시키는 것은 가능하나, 그 배열을 높은 재현성으로 얻는 것이 곤란하다는 기술적 과제가 남아 있다.

즉, 상기와 같이, 센서 칩 표면에 복수 분자의 올리고당쇄를 집합화시켜 올리고당쇄의 생물 활성을 해석하는 경우에는, 올리고당의 당쇄의 집합화 상태를 동일하게 하여 올리고당쇄와 단백질 간의 상호작용을 높은 재현성으로 관측하는 것이 요구된다. 특히, 올리고당쇄의 생물 활성을 관측하기 위해서는 센서 칩 표면에 3단위 이상의 올리고당쇄를 집합화하고, 이들 센서 칩 위에서 높은 재현성으로 2차원적으로 배열시킴으로써 올리고당쇄의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 중요해진다.

그러나, 상기 비특허문헌 1에 기재된 리간드 복합체에서는, 1개의 리간드 복합체가 가지는 올리고당쇄는 1단위 또는 2단위로 이루어져 있다. 바꾸어 말하면, 상기의 리간드 복합체는 1개의 링커 화합물에 대하여 1개 또는 2개의 올리고당쇄가 결합되어 이루어지는 것이다. 따라서, 올리고당쇄의 생물 활성을 관측하기 위해서는 상기 리간드 복합체를 센서 칩 표면에 배열시킬 때에, 리간드 복합체 농도를 높여 리간드인 당쇄끼리를 집합화시킴으로써 센서 칩 표면에 3단위 이상의 올리고당쇄를 집합화시킬 필요가 있다.

이와 같은 기법에 따라 올리고당쇄를 집합화시켰을 경우, 올리고당의 당쇄 간을 소정 간격으로 제어하여 올리고당의 배열을 높은 재현성으로 얻는 것이 곤란하다. 따라서, 상기 종래의 리간드 복합체에서는 올리고당의 생물 활성을 높은 재현성으로 관측하는 것이 불가능하여, 당 구조의 해명이나 올리고당의 생물 활성의 평가를 행하는 경우에 곤란이 따를 가능성이 있다.

본 발명은, 상기 과제를 해결하기 위하여 이루어진 것으로, 그 목적은 센서 칩 표면상의 당쇄간 거리를 제어하고, 올리고당을 높은 재현성으로 2차원적으로 배열할 수 있는 신규 링커 화합물, 및, 이 링커 화합물에 당분자(糖分子)가 도입되어 이루어지는 신규 리간드 복합체, 리간드 담지체, 및 이것들의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

발명의 상세한 설명

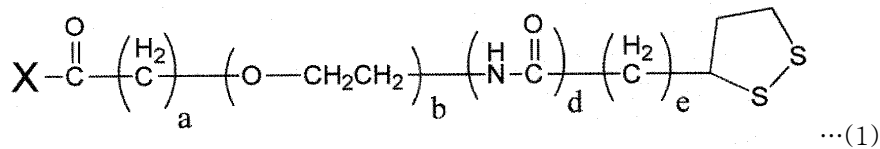
본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 3단위 이상의 당분자를 도입가능한 부위를 가지고, 또한 표면 플라즈몬 공명(SPR) 센서 칩이나 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)의 담체 등의 단백질 분석용 지지체에 결합가능한 부위를 가지는 신규 링커 화합물을 이용함으로써, 상기 지지체에 3단위 이상의 당분자를 높은 재현성으로 2차원적으로 배열시킬 수 있음을 발견하였다.

한편, 본 발명자들은 선출원(출원 번호: 일본 특허 출원 제 2003-190568호, 공개 번호: 일본 특허 공개 제 2004-157108호(공개일: 2004년 6월 3일), 본 출원의 우선일(2004년 2월 5일) 시점에서 미공개)에서 상기의 문제점을 해결하는 것을 목적으로 하여 발견된 다른 링커 화합물을 개시하고 있다. 그러나, 이 다른 링커 화합물은 소수성(疏水性)이 매우 강한 단백질 등을 분석할 때에 링커부의 알킬기와 비특이적으로 결합하여 상호작용하는 문제점이 있다. 또한, 이 다른 링커 화합물은 링커부를 형성하고 있는 알킬기의 길이가 충분하지 않아, 고정화되는 올리고당쇄가 큰 경우에는 올리고당쇄류의 입체적 장애로 인하여 효율적으로 금속-유황 결합이 형성되지 않는 문제점을 가지고 있다.

여기서, 본 발명자들은 링커부에 올리고에틸렌옥사이드기를 더 도입하여 비특이적인 소수성 상호작용을 극력 억제하고, 또한 금속 결합에 제공되는 디설파이드기까지의 길이를 용이하게 조정가능하도록 하여, 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하는데 이르렀다.

즉, 본 발명에 따른 링커 화합물은, 상기 과제를 해결하기 위하여, 일반식 (1)

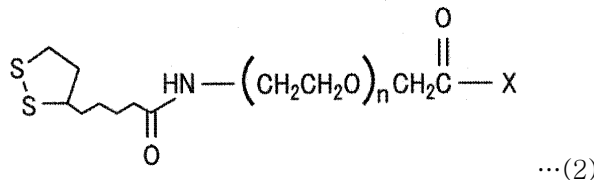
화학식 11



(식 중, a, b, d, e는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 X가, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방한 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 포함하여 이루어지는 다분기(多分岐) 구조 부위인 구조를 구비하고 있는 것을 특징으로 하고 있다.

또한, 본 발명에 따른 링커 화합물은, 일반식 (2)

화학식 12



(식 중, n은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 X가, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방한 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 포함하여 이루어지는 다분기 구조 부위인 구조를 구비하고 있는 것이라도 된다.

여기서 상기 탄화수소 유도쇄란, 탄소 및 수소로 이루어지는 탄화수소쇄에서 일부의 탄소나 수소가 다른 원자나 치환기로 치환되어 있어도 되는 것을 가리키는 것으로 한다. 즉, 상기 탄화수소 유도쇄란, 말단에 방향족 아미노기를 가지고, 탄화수소쇄의 주쇄 구조인 탄소-탄소 결합(C-C 결합)의 일부가 탄소-질소 결합(C-N 결합), 탄소-산소 결합(C-O 결합), 아미드 결합(CO-NH 결합)으로 치환되어 있어도 되는 것을 가리킨다.

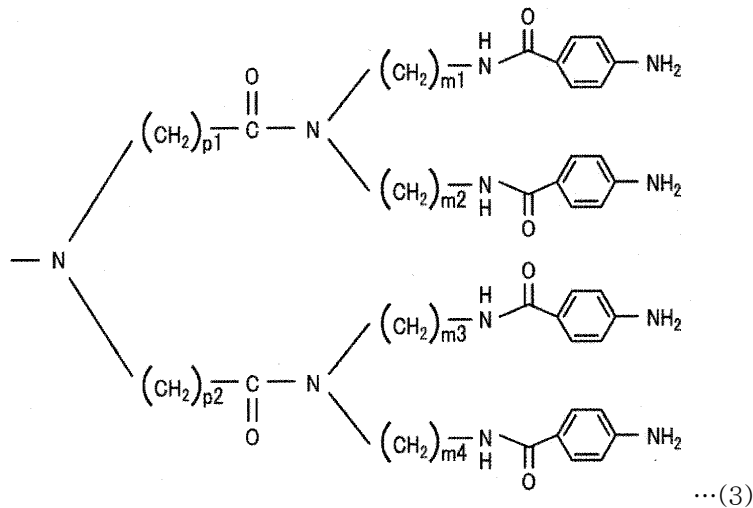
상기 구성에 따르면, 상기 링커 화합물은 당분자를 간편하게 도입할 수 있는 부위로서 방향족 아미노기를 가지고 있다. 상기 방향족 아미노기는 각 탄화수소 유도체에 포함되어 있기 때문에 상기 링커 화합물에는 3단위 이상의 당분자를 도입할 수 있다. 또한, 상기 단백질 분석용 지지체에 고정가능한 부위로서 S-S 결합을 가지고 있다.

따라서, 상기 링커 화합물을 통하여 상기 지지체에 3단위 이상의 당분자를 집합화시켜 도입할 수 있다. 또한, 3단위 이상의 당분자가 1개의 링커 화합물에 도입되어 있기 때문에 상기 지지체 표면에 3단위 이상의 당분자를 높은 재현성으로 배열시킬 수 있다. 이에 의해, 상기 지지체 표면상에서 당분자와 단백질의 상호작용의 관측이 가능해짐과 함께 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해진다.

또한, 상기 링커 화합물은, 링커부에 올리고에틸렌옥사이드기를 가지고 있기 때문에 링커부에 알킬기를 가지고 있는 경우에 비하여, 소수성이 높은 분석 대상물과 비특이적인 상호작용을 일으킬 가능성을 대폭으로 저하시킬 수 있다. 또한, 상기 링커부가 올리고에틸렌옥사이드로 구성되어 있기 때문에 금속 결합에 제공되는 디설파이드기로부터 아미노 말단에 결합되는 올리고당쇄까지의 길이를 용이하게 조절할 수 있다. 이에 의해, 디설파이드기가 올리고당쇄의 영향을 받는 일 없이 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있다.

상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물에 있어서, 상기 X는, 일반식 (3)

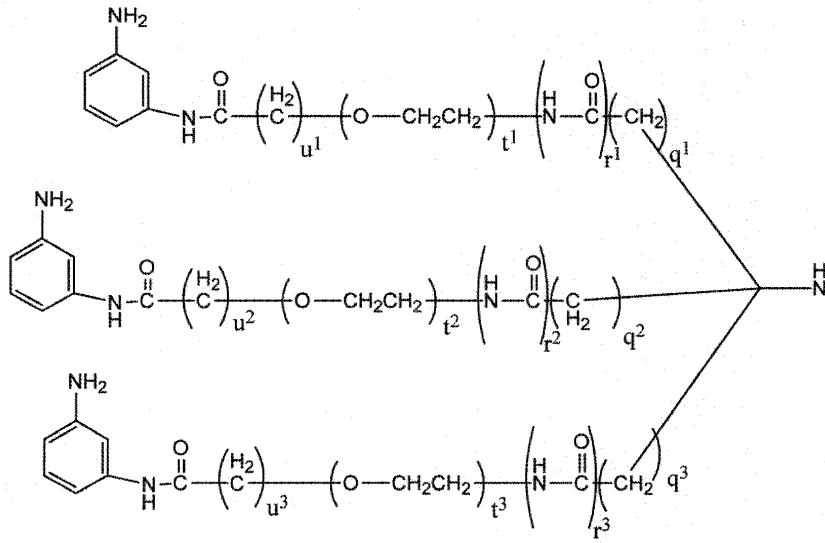
화학식 13



(식 중, $m^1, m^2, m^3, m^4, p^1, p^2$ 는 각각 독립적으로, 1 이상 6 이하의 정수)으로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것이 바람직하다.

또한, 상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물에 있어서, 상기 X는, 일반식 (4)

화학식 14



...(4)

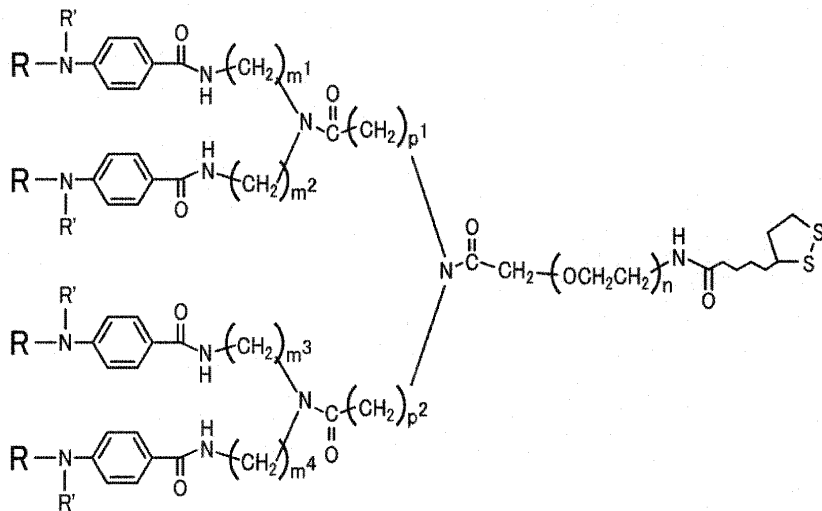
(식 중, $q^1, q^2, q^3, r^1, r^2, r^3, t^1, t^2, t^3, u^1, u^2, u^3$ 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것이 바람직하다.

상기 링커 화합물의 X는 상기 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 가지고 있기 때문에 이 링커 화합물을 통하여 상기 지지체 위에 3단위 이상의 당분자 도입이 가능하다. 따라서, 상기 지지체 표면에서 3단위 이상의 당분자 간의 간격을 제어함으로써 당분자의 배열을 높은 재현성으로 얻을 수 있기 때문에 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해진다.

또한, 본 발명의 리간드 복합체는, 상기 과제를 해결하기 위하여 상기한 것 중 어느 링커 화합물의 방향족 아미노기에 당분자를 도입하여 이루어지는 것인 것을 특징으로 하고 있다.

그리고, 상기 리간드 복합체가, 구체적으로, 일반식 (5)

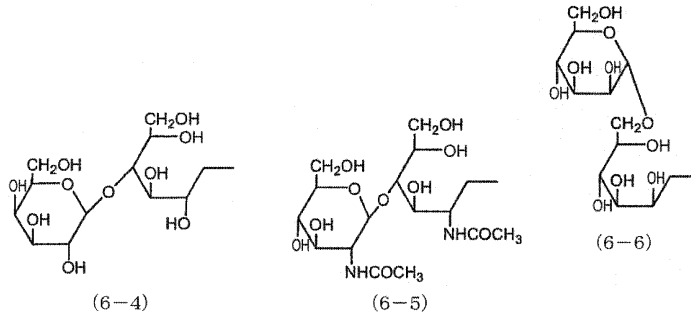
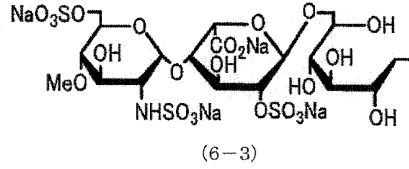
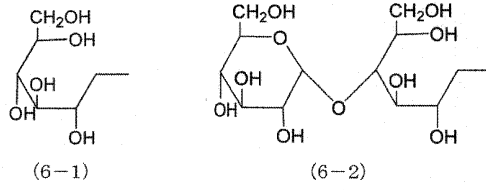
화학식 15



...(5)

(식 중, $m^1, m^2, m^3, m^4, n, p^1, p^2$ 는 각각 독립적으로, 1 이상 6 이하의 정수. R'는 수소(H) 또는 R.)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 R이 식 (6-1) 내지 식 (6-6)

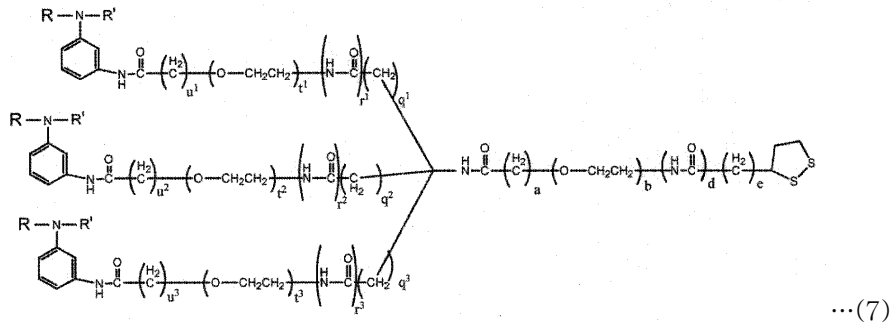
화학식 16



으로부터 선택되는 올리고당 유래 화합물인 것이 바람직하다.

또한, 상기 리간드 복합체가, 구체적으로, 일반식 (7)

화학식 17



(식 중, a, b, d, e, q¹, q², q³, r¹, r², r³, t¹, t², t³, u¹, u², u³는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수. 단, b가 0일 때에 t¹, t² 및 t³는 0이 아니고, t¹, t² 및 t³가 0일 때에 b는 0이 아니다. 또한, R'는 수소(H) 또는 R.)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 R이 상기 식 (6-1) 내지 식 (6-6)으로부터 선택되는 올리고당인 것이 바람직하다.

상기 리간드 복합체를 이용함으로써 상기 단백질 분석용 지지체 표면에 3단위 이상 또는 4단위 이상(일반식 (5) 또는 일반식 (7)에 나타내는 구조를 구비하고 있는 리간드 복합체를 이용한 경우)의 당분자를 집합화하여 고정화할 수 있다. 이와 같이, 1개의 리간드 복합체가 3단위 이상의 당분자를 가지고 있기 때문에, 상기 리간드 복합체들을 상기 지지체 표면에 집합화하는 일없이 1개의 리간드 복합체를 이용함으로써 3단위 이상의 당분자를 집합화시킬 수 있다. 따라서, 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 측정하는 것이 가능해진다. 또한, 상기 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당분자를 높은 재현성으로 배열할 수 있다. 따라서, 본 발명의 리간드 복합체가 고정되어 이루어지는 단백질 분석용 지지체를 이용함으로써 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해진다.

또한, 본 발명의 링커 화합물의 제조 방법은, 상기 과제를 해결하기 위하여 치옥트산(thioctic acid)과 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 3쇄 이상 가지는 아민 화합물의 축합 반응을 행하는 단계와, 상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호하는 단계를 포함하고 있는 것을 특징으로 하고 있다.

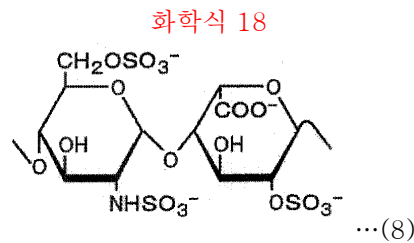
상기 방법에 따르면, 상기 단백질 분석용 지지체에 고정가능한 부위로서의 S-S 결합과, 당분자를 간편하게 도입할 수 있는 부위로서의 방향족 아미노기를 가지고 있는 본 발명의 링커 화합물을 얻을 수 있다.

또한, 본 발명의 리간드 복합체의 제조 방법은, 상기 과제를 해결하기 위하여 상기 링커 화합물과 당분자를 이용하여 환원 아미노화 반응을 행하는 것을 특징으로 하고 있다.

상기 방법에 따르면, 환원 아미노화 반응에 의해 링커 화합물에 간편하게 당분자를 도입하여, 본 발명의 리간드 복합체를 얻을 수 있다.

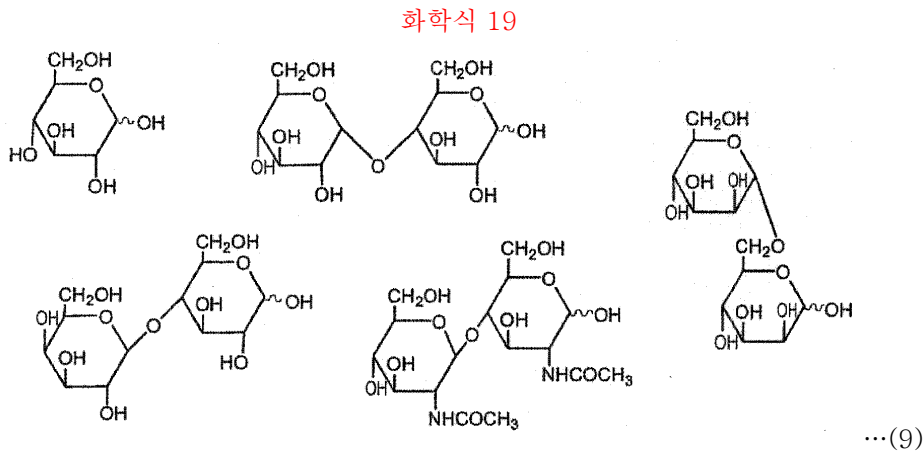
한편, 상기 당분자로서는, 환원 말단을 가지는 모든 종류의 당분자를 이용할 수 있다.

상기 당분자로서 구체적으로, 일반식 (8)



로 나타내어지는 헤파린 부분 2당 구조를 가지는 황산화 올리고당을 이용하는 것이 바람직하다.

또한, 상기 당분자로서 구체적으로, 군 (9)



로부터 선택되는 올리고당의 적어도 1개를 이용하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명의 당분자의 도입 방법은, 상기 과제를 해결하기 위하여 상기 리간드 복합체를 포함하는 용액과 지지체 표면의 금속을 접촉시키는 것을 특징으로 하고 있다.

상기 방법에 따르면, 상기 리간드 복합체에 포함되는 링커 화합물의 S-S 결합을 상기 지지체 표면의 금속과의 결합으로 변환하고, 지지체 표면에 리간드인 당쇄를 고정할 수 있다. 따라서, 리간드 복합체를 포함하는 용액과 지지체를 접촉시키는 간편한 방법으로 링커 화합물에 결합된 당분자를 지지체 표면에 배열시킬 수 있다.

또한, 본 발명의 리간드 담지체는, 상기 과제를 해결하기 위하여 상기 리간드 복합체를 표면에 금속을 가지는 지지체 위에 고정화시켜 이루어지는 것을 특징으로 하고 있다.

상기 구성에 따르면, 금속-유황 결합을 통하여 지지체 표면에 리간드 복합체를 견고하게 고정할 수 있으므로 지지체 표면에 복수의 당분자를 높은 재현성으로 배열시켜 이루어지는 리간드 담지체를 제공할 수 있다. 따라서, 상기 리간드 담지체를 이용하면 리간드 복합체에 포함되는 당분자와, 이 당분자와 상호작용하는 단백질 등의 물질의 상호작용을 높은 재현성으로 관측할 수 있기 때문에 당분자의 생물 활성의 정량적인 평가가 가능해진다.

본 발명의 또 다른 목적, 특징, 및 탁월한 점은 이하에 기술하는 기재에 의해 충분히 알 수 있다. 또한, 본 발명의 이점은 첨부 도면을 참조한 하기의 설명으로부터 알 수 있다.

실시예

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

본 발명의 링커 화합물은, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 센서 칩이나 친화성 크로마토그래피의 담체 등의 단백질 분석용 지지체와 올리고당 등의 당(이하, 당분자라 기재한다) 사이에 개재하여 상기 지지체 위에 당분자를 고정화하기 위하여 사용된다. 따라서, 상기 링커 화합물은, 상기 지지체에 고정가능한 부위, 및, 당분자를 간편하게 도입할 수 있는 부위를 분자 내에 가지고 있을 필요가 있다.

또한, 상기 SPR이나 친화성 크로마토그래피에서는 당분자와 특이적으로 상호작용하는 단백질 등의 물질을 특정하거나 분리하는 것을 목적으로 하고 있다. 따라서, 상기 링커 화합물은 단백질 등의 물질과의 비특이적인 상호작용을 가지고 있지 않은 것이어야 한다.

그래서, 본 발명의 링커 화합물은, 상기 지지체에 고정가능한 부위로서 상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)에 나타내는 바와 같이, 디설파이드 결합(S-S 결합)을 가지고 있다. 이 디설파이드 결합의 유황(S)은, 예를 들어, 단백질 분석용 지지체 표면에 코팅된 금(Au) 등의 금속과 금속-유황 결합을 형성하여 상기 지지체에 견고하게 결합할 수 있다.

또한, 상기 링커 화합물은, 단백질 분석용 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당분자를 배열함과 함께, 개개의 당분자의 당쇄 간의 거리를 제어하기 위하여, 당분자를 간편하게 도입할 수 있는 부위로서 복수의 아미노기를 포함하여 이루어지는 다분기 부위를 가지고 있다. 즉, 본 발명의 링커 화합물의 다분기 부위는, 상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)의 X로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 부위이며, 이 X는, 상술한 바와 같이, 말단에 방향족 아미노기를 가진과 함께 주쇄에 탄소-질소 결합이나 아미드 결합을 가지고 있어도 무방한 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 포함하고 있는 구조를 구비하고 있다.

상기 방향족 아미노기의 아미노기(-NH₂기)는, 올리고당 등의 당분자와의 환원 아미노화 반응에 의해 상기 링커 화합물에 당분자를 도입하기 위한 반응기가 된다. 즉, 당분자 중의 평형에 의해 발생하는 알데히드기(-CHO기) 또는 케톤기(-CRO기, R은 탄화수소기)와, 상기 링커 화합물이 가지는 아미노기가 반응한다. 그리고 이 반응에 의해 형성된 시프 염기(Schiff's base)를 계속해서 환원시킴으로써 방향족 아미노기에 용이하게 당분자를 도입할 수 있다.

따라서, 상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)의 X는, 상기와 같은 탄화수소 유도쇄를 3쇄 이상 포함함으로써 당분자를 도입가능한 방향족 아미노기를 복수개 가지는 다분기형 부위인 구조를 구비하고 있다. 이 다분기형 부위에 포함되는 각 방향족 아미노기에 올리고당 등의 당분자가 도입되므로, 상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물을 통하여 단백질 분석용 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당분자를 높은 재현성으로 배열하는 것이 가능해진다.

또한, 본 발명의 링커 화합물은, 상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)에 나타내는 바와 같이, 디설파이드기와 방향족 아미노기 사이에 올리고에틸렌옥사이드를 가지고 있다. 이에 의해, 비특이적인 소수성 상호작용을 극력 억제하고, 또한 금속 결합에 제공되는 디설파이드기까지의 길이를 용이하게 조정가능하도록 함으로써 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있다. 한편, 상기 일반식 (1)에 있어서, a, b, d, e는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수이면 된다. 단, b가 0인 경우에는 X의 내부에 올리고에틸렌옥사이드를 가지고 있을 필요가 있다. 상기 일반식 (2)에서 n은 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않는다.

구체적으로, 상기 X는, 상기 일반식 (3)으로 나타내는 바와 같이, 2개의 탄화수소 유도쇄가 방향족 아미노기와는 반대측의 말단에, 1개의 질소(N)에 결합된 2분기 구조를 2개 가지고 있는 구조를 구비하고 있어도 된다. 이 경우, 2개의 2분기 구조의 상기 질소가, 예를 들어, $-CO-CH_2-$ 를 개재하여 1개의 질소(N)에 결합됨으로써 분기 구조를 형성한다. 이에 의해, 상기 X는, 4개의 탄화수소 유도쇄를 구비한 다분기형 부위인 구조를 구비하게 된다. 한편, 상기 일반식 (3)에 있어서, m^1 , m^2 , m^3 , m^4 는 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 되고 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 무방하다. 이 중, 상기 다분기 부위를 가지는 화합물의 제조시의 편의상 상기 $m^1 \sim m^4$ 는 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 2인 것이 바람직하다. 또한, p^1 , p^2 는, 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 되고 서로 같은 정수라도 무방하다. 이 중, 제조의 편의상 p^1 , p^2 는 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 1인 것이 바람직하다.

한편, 상기 일반식 (3)에 나타내는 4개의 탄화수소 유도쇄를 구비한 X에 있어서, 각 탄화수소 유도쇄 중에 올리고에틸렌옥사이드를 가지는 구조로 하는 것도 가능하다. 예를 들어, 상기 일반식 (4)와 같이, 각 탄화수소 유도쇄의 CH_2 와 NH 사이에 올리고에틸렌옥사이드를 가지는 구조로 할 수 있다.

또한, 상기 X는, 상기 일반식 (4)로 나타내는 바와 같이, 3개의 탄화수소 유도쇄가 방향족 아미노기와는 반대측의 말단에, 1개의 탄소(C)에 결합된 3 분기 구조를 가지고 있는 구조를 구비하고 있어도 된다. 이 경우, 3분기 구조의 상기 탄소가, 예를 들어, $-C-N-$ 을 개재하여 1개의 질소(N)에 결합함으로써 분기 구조를 형성한다. 이에 의해, 상기 X는 3개의 탄화수소 유도쇄를 구비한 다분기형 부위인 구조를 구비하게 된다.

한편, 상기 일반식 (4)에 있어서, q^1 , q^2 , q^3 는 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 되고 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 무방하다. 이 중, 상기 다분기 부위를 가지는 화합물 제조시의 편의상, 상기 $q^1 \sim q^3$ 는 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 2인 것이 바람직하다. 또한, r^1 , r^2 , r^3 는 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 되고 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 된다. 이 중, 제조의 편의상, 상기 $r^1 \sim r^3$ 는 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 1인 것이 바람직하다. 또한, u^1 , u^2 , u^3 는 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 되고 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 된다. 이 중, 제조의 편의상 상기 $u^1 \sim u^3$ 는 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 1인 것이 바람직하다. 또한, t^1 , t^2 , t^3 는 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 되고 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 된다. 단, 상기 일반식 (1)에 있어서 X가 당해 일반식 (4)인 경우, 상기 일반식 (1)의 b가 0일 때에는 t^1 , t^2 , t^3 는 1 이상 6 이하의 정수인 것이 바람직하다. 제조의 편의상 상기 $t^1 \sim t^3$ 는 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 4인 것이 바람직하다.

이와 같이, 상기 X는, 탄소나 질소 등의 원자로 상기 탄화수소 유도쇄를 복수개 결합하여 분기 구조를 형성하고 있는 다분기형 부위인 구조를 구비하고 있다. 한편, 상기 X에 포함되는 복수의 탄화수소 유도쇄는 모두 동일한 것이 바람직하나, 말단에 방향족 아미노기를 가지고 있으면 서로 다른 구조라도 무방하다.

상기와 같이, 일반식 (1) 또는 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물은, 단백질 분석용 지지체에 결합가능한 S-S 결합과, 올리고당쇄 등의 당분자에 결합가능한 아미노기를 가지고 있다. 따라서, 예를 들어, Au-S 결합 등의 금속-유황 결합에 의해 상기 링커 화합물이 단백질 분석용 지지체 위에 고정되므로, 상기 링커 화합물을 통하여 상기 지지체 위에 당분자를 견고하고 또한 간단히 결합시킬 수 있다.

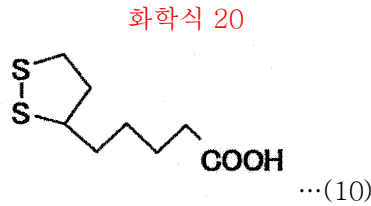
또한, 상기 링커 화합물은, 다분기형 부위를 가지고, 이 다분기형 부위의 각 말단에 방향족 아미노기를 가지고 있다. 따라서, 상기 링커 화합물에 당분자를 도입하여 이루어지는 리간드 복합체(후술)를 이용함으로써, 상기 지지체 표면에 효율적으로 당분자를 집합화시킬 수 있다. 또한, 다분기형 부위를 가지고 있으므로 링커 화합물을 포함하여 이루어지는 리간드 복합체를 지지체 표면에 결합시켰을 경우에 2차원적으로 복수의 당분자를 높은 재현성으로 배열시킬 수 있다.

또한, 상기 링커 화합물은, 단백질과의 비특이적인 상호작용의 영향을 거의 무시할 수 있다. 따라서, 본 발명의 링커 화합물을 이용함으로써 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해진다.

또한, 상기 링커 화합물은, 상기 일반식 (1) 또는 일반식 (2)에 나타내는 바와 같이, 디설파이드기와 방향족 아미노기 사이에 올리고에틸렌옥사이드를 가지고 있다. 이에 의해, 비특이적인 소수성 상호작용을 극력 억제하고, 또한 금속 결합에 제공되는 디설파이드기까지의 길이를 용이하게 조정가능하도록 함으로써 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있다.

상기 링커 화합물은, 이하에 나타내는 제조 방법에 의해 제조된다. 즉, 상기 링커 화합물은, 치옥트산과, 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 3쇄 이상 가지는 다분기 구조를 포함하여 이루어지는 아민 화합물의 축합 반응을 행하고, 상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호함으로써 제조된다.

상기 치옥트산은, 하기 일반식 (10)



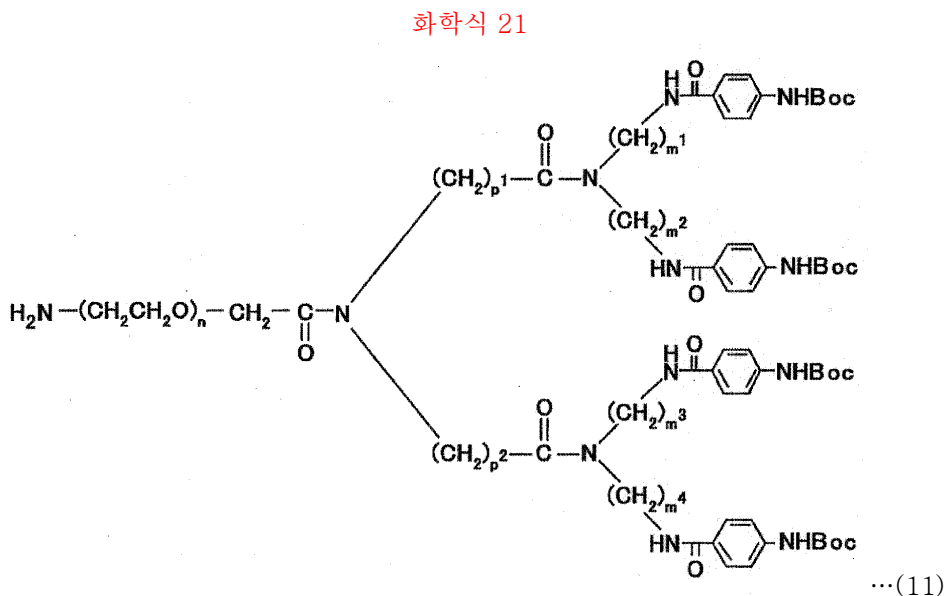
으로 나타내어지는 구조를 구비하고 있다.

또한, 상기 아민 화합물은, 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 가지는 분기쇄를 포함하고 있으면 특별히 한정되는 것은 아니며, 상기한 링커 화합물의 다분기 부위에 상당하는 구조를 포함하고 있으면 된다.

따라서, 상기 분기쇄는, 상기한 탄화수소 유도쇄에 포함되는 방향족 아미노기 대신에 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 가지는 점 이외에는, 상기 탄화수소 유도쇄에 포함되는 구조를 가지고 있으면 된다. 즉, 상기 분기쇄는, 탄소 및 수소로 이루어지는 탄화수소쇄로, 일부의 탄소나 수소가 다른 원자나 치환기로 치환되어 있어도 되는 것이다. 보다 구체적으로, 상기 분기쇄는, 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 가짐과 함께 탄화수소쇄의 주쇄 구조인 탄소-탄소 결합(C-C 결합)의 일부가 탄소-질소 결합(C-N 결합), 또한 탄소-산소 결합(C-O 결합)으로 치환되어 있어도 된다.

또한, 상기 보호기란, 방향족 아미노기의 아미노기가 상기 축합 반응에 의해 반응하지 않도록 도입되는 치환기이다. 이와 같은 보호기는 2급 아미노기의 보호기를 탈보호할 때에 영향을 받지 않는 것이면 특별히 한정되는 것은 아니다. 상기 보호기로서는, 예를 들어, t-부톡시카르보닐기(-COOC(CH₃)₃기;Boc기라 기재한다), 벤질기, 아릴카르바메이트(aryl carbamate)기(-COOCH₂CH=CH₂, Alloc기) 등을 들 수 있다.

상기 아민 화합물로서는, 예를 들어, 하기 일반식 (11)



로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 화합물을 들 수 있다. 한편, 상기 일반식 (11) 중의 $n, m^1 \sim m^4, p^1, p^2$ 는 각각 독립적으로, 1 이상 6 이하의 정수이다. 이들 아민 화합물의 합성 방법에 대해서는 이후에 기술하는 실시예에서 상술한다.

상기 치옥트산과 아민 화합물의 축합 반응에 의해 치옥트산의 카르복실기(-COOH기)와, 아민 화합물의 아미노기(-NH₂기)가 축합되어 아마이드 결합이 형성된다. 그 후, 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호하여 보호기를 떼어내어 방향족 아미노기로 함으로써 상기한 링커 화합물을 얻을 수 있다.

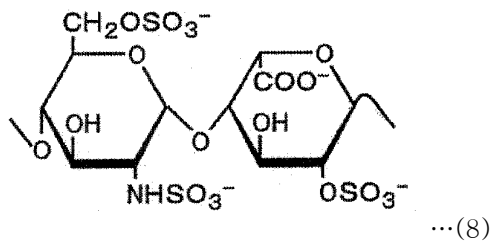
한편, 상기 링커 화합물은, 상술한 바와 같이, 링커 부분에 올리고에틸렌옥사이드를 구비한 구조로 되어 있기 때문에, 그 제조 방법에 있어서는 올리고에틸렌옥사이드 구조를 포함하여 이루어지는 물질을 원료로 이용하는 것이 바람직하다. 이 원료로는, 예를 들어, 비스[2-(2-히드록시에톡시)에틸]에테르(실시예의 화합물 1), 분자량이 서로 다른 시판의 폴리에틸렌글리콜(Mw:200, 300, 400, 600, 1000)(Sigma社 제품) 등을 들 수 있고, 이 중에서도 특히, 중합도가 완전히 제어된, 즉, 길이가 제어된 구조를 가진다는 이유에서, 비스[2-(2-히드록시에톡시)에틸]에테르(실시예의 화합물 1)를 이용하는 것이 바람직하다.

이어서, 본 발명 리간드 복합체에 대하여 설명한다. 여기서, ‘리간드 복합체’란, 상기 링커 화합물의 방향족 아미노기에 당분자가 도입되어 이루어지는 것을 의미하는 것으로 한다. 본 발명의 리간드 복합체에 있어서는, 링커 화합물의 아미노기가 당분자 중의 평형에 의해 발생하는 알데히드기 또는 케톤기와 반응하고, 이 반응에 의해 형성된 시프 염기를 계속해서 환원시킴으로써 방향족 아미노기에 당분자를 도입할 수 있다. 즉, 이 환원 아미노화 반응에 의해 상기 링커 화합물과 당분자가 결합된다.

본 발명의 리간드 복합체에 포함되는 당분자로서는, 환원 말단을 가지는 환원당이면 특별히 한정되는 일 없이 모든 종류의 당분자를 이용할 수 있다. 상기 당분자로서, 구체적으로, 예를 들어, 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스(mannose) 등의 단당류, 결합하고 있는 당의 수가 2당 ~ 10당인 말토오스(maltose), 락토오스(lactose), 후술하는 황산화 올리고당 등의 올리고당류, 단당류나 올리고당류가 조합되어 당수가 11 이상인 헤파린, 콘드로이틴(chondroitin) 황산, 헤파란(heparan) 황산 등의 다당류를 들 수 있다.

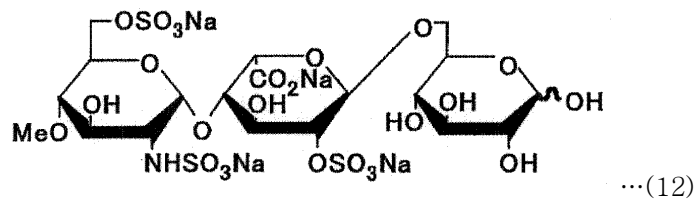
또한, 상기 올리고당류로서, 항혈액응고 활성을 가지는 것으로 알려져 있는 황산화 다당 헤파린 중의 하기 일반식 (8)

화학식 22



로 나타내어지는 특정의 부분 2당 구조(‘GlcNS6S-IdoA2S’라 한다)를 가지는 황산화 올리고당, 이 황산화 올리고당의 환원 말단인 수산기에 글루코오스를 도입하여 이루어지는 하기 일반식 (12)

화학식 23



로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 올리고당을 들 수 있다.

한편, 상기 올리고당류나 다당류는, 동일한 단당 분자로 이루어지는 단일 올리고당이나 단일 다당이라도 되고, 여러 가지의 단당 분자나 그 유도체로 이루어지는 복합 당질, 여러 가지의 단당 분자나 그 유도체, 올리고당류를 포함하여 이루어지는 복합 다당류라도 된다. 또한, 상기 당분자는, 모두 자연계로부터 분리·정제하여 얻어지는 여러 가지의 천연 당이라도 되고, 인공적으로 합성된 당이라도 된다.

구체적으로, 본 발명의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (5)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것이다. 이 일반식 (5)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 리간드 복합체는 상기 일반식 (2)로 나타내어지고, X가 상기 일반식 (3)으로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물에 당분자를 도입하여 이루어지는 것이다. 당분자는, 환원 말단을 가지는 환원당이면 한정되지 않으나, 일반식 (9)나 일반식 (12)로부터 선택되는 것이 바람직하다. 일반식 (3)으로 나타내어지는 X는, 4개의 탄화수소 유도쇄를 가지고 있는 구조를 구비하고 있으므로, 일반식 (5)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 리간드 복합체는, 상기 링커 화합물에 4단위 이상의 당분자가 결합된 것이다. 한편, 상기 일반식 (5)에 있어서, $m^1 \sim m^4$ 는 일반식 (3) 중의 $m^1 \sim m^4$ 와 마찬가지로, 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 되고 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 된다. 또한, n은 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되지 않는다. 또한, R'는 수소(H) 또는 올리고당 유래 화합물이면 된다.

또한, 본 발명의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (7)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것이다. 이 일반식 (7)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 리간드 복합체는 상기 일반식 (1)로 나타내어지고, X가 상기 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물에 당분자를 도입하여 이루어지는 것이다. 당분자는, 환원 말단을 가지는 환원당이면 한정되지 않으나, 일반식 (9)나 일반식 (12)로부터 선택되는 것이 바람직하다. 일반식 (7)에서 나타내어지는 X는, 3개의 탄화수소 유도쇄를 가지고 있는 구조를 구비하고 있으므로, 일반식 (7)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 리간드 복합체는 상기 링커 화합물에 3단위 이상의 당분자가 결합한 것이다.

상기의 리간드 복합체는, 모두 링커 화합물과 당분자를 포함하여 이루어지므로, 링커 화합물 내의 S-S 결합에서 단백질 분석용 지지체 표면의 금속과 금속-유황(s) 결합, 예를 들어, 금-유황(Au-S) 결합에 의해 결합될 수 있다. 이에 의해, 이 Au-S 결합을 통하여 상기 지지체 표면에 3단위 이상의 당분자를 집합화하여 고정화되어 이루어지는 리간드 담지체를 제공할 수 있다. 그러므로, 상기 리간드 복합체를 이용함으로써, 예를 들어, 단백질 분석용 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당분자를 높은 재현성으로 배열하여 리간드 담지체를 얻고, 이 리간드 담지체를 이용함으로써 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해진다. 한편, 상기 지지체 표면의 금속으로서, 상기 Au 외에, Cu, Ag, Pt 등의 금속을 이용할 수 있으며, 특히 Au를 이용하는 것이 바람직하다.

또한, 상기의 리간드 복합체는, 링커부에 올리고에틸렌옥사이드를 가지고 있다. 이에 의해, 비특이적인 소수성 상호작용을 극력 억제하고, 또한 금속 결합에 제공되는 디설파이드기까지의 길이를 용이하게 조정가능하도록 함으로써 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있다.

이와 같이, 본 발명의 리간드 복합체를 금속-유황 결합을 통하여 지지체의 표면에 고정화시켜 이루어지는 리간드 담지체도 본 발명에 포함된다. 이 리간드 담지체는 단백질 분석 용도로 한정되지 않으며, 당분자와의 상호작용을 조사하기 위해 단백질 이외의 물질의 분석용으로 이용할 수도 있다.

상기 리간드 담지체는, 이 리간드 복합체를 포함하는 용액과 표면에 금속막을 가지는 지지체를 접촉시킴으로써 리간드 복합체의 S-S 결합의 각 S 원자가 지지체 표면의 금속과 금속-유황 결합에 의해 결합하여, 지지체 표면에 상기 리간드 복합체가 도입된다. 구체적으로, 상기 리간드 복합체 용액에 단백질 분석용 지지체를 소정 시간 침지하거나, 혹은, 상기 지지체에 리간드 복합체 용액을 주입(지지체 표면에 리간드 복합체 용액을 흘린다)함으로써, 상기 리간드 복합체에 포함되는 링커 화합물의 S-S 결합을 상기 지지체 표면의 금 등과의 Au-S 결합으로 변환하여 지지체 표면에 상기 리간드 복합체를 고정할 수 있다.

리간드 복합체 용액에 이용하는 용매로서는, 특별히 한정되는 것은 아니나, 예를 들어, 메탄올, 물, 디메틸아세트아미드(DMAc)나, 이것들의 혼합 용매 등을 들 수 있다. 또한, 침지 시간은 0.5시간 ~ 12시간 정도이면 되고, 주입 농도는 $1\mu\text{M} \sim 1\text{mM}$ 정도이면 된다.

이와 같이, 본 발명의 리간드 복합체는, S-S 결합을 가지고 있으므로 단백질분석용 지지체 표면에 간단히 고정화할 수 있고, 상기 지지체 위에 당분자를 간단히 도입할 수 있다.

한편, 상기와 같이 지지체에 당분자를 도입하는 방법도 본 발명에 포함된다.

본 발명의 리간드 담지체는, 당분자와, 예를 들어, 단백질 등의 다른 물질과의 상호작용의 분석에 이용가능하다. 구체적으로, 상기 리간드 담지체는, SPR 측정, 친화성 크로마토그래피 등에 적용할 수 있다.

예를 들어, 단백질 분석으로서 SPR 측정을 행하려면 하기와 같이 하면 된다. 즉, 금 박막 등의 금속 박막을 증착한 지지체에 본 발명의 리간드 복합체를 고정화하여 이루어지는 리간드 담지체를 이용하여, 이 리간드 담지체와 단백질을 접촉시키고, 통상의 방법에 따라 표면 플라즈몬 공명 장치를 이용하여 공명 각도를 측정하면, 이 리간드 담지체와 단백질의 결합 거동을 관측할 수 있다. 한편, SPR 측정에 이용하는 상기 지지체(센서 칩)로서는, 예를 들어, 글래스, 플라스틱 등을 이용할 수 있고, 특히 글래스가 바람직하게 이용된다. 또한, 리간드 담지체와 단백질의 접촉은, 예를 들어, 단백질을 런닝 버퍼에 용해한 용액을 이 리간드 담지체 표면에 유입함으로써 행하면 된다. 이 런닝 버퍼로서는, 예를 들어, 인산 완충 용액 등을 들 수 있다.

본 발명의 리간드 담지체는, 상기 리간드 복합체를 가지고 있으므로 지지체 표면에 2차원적으로 복수의 당분자가 높은 재현성으로 배열되어 있다. 그러므로, 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 관측할 수 있어 당분자의 구조의 해명이나 당분자의 생물활성에 대하여 정량적인 평가를 행할 수 있다.

또한, 본 발명의 리간드 담지체로서 당쇄를 고정화한 센서 칩은, 예를 들어, 하기와 같은 SPR 측정에 사용할 수 있다. 즉, 제 1 당분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어지는 제 1 센서 칩과, 상기 제 1 당분자와는 말단 구조가 서로 다른 제 2 당분자가 지지체 표면에 고정화되어 이루어지는 제 2 센서 칩을 이용하여, 제 1 센서 칩을 이용해 얻어진 SPR 측정의 검출 결과와, 제 2 센서 칩을 이용하여 얻어진 SPR 측정의 검출 결과의 차이를 검출하여, 당분자의 상호작용을 관측할 수 있다. 이들 센서 칩은, 고정화되는 당분자가 서로 다른 리간드 복합체를 이용하면 된다. 비교하는 당분자에는, 예를 들어, 락토오스와 글루코오스, 말토오스와 글루코오스, 코지비오스와 글루코오스 등을 들 수 있다. 여기에서는, 2개의 센서 칩을 이용하였으나, 이 이상의 수의, 도입되는 당분자의 종류가 다른 센서 칩을 이용해도 무방하다. 한편, 당분자의 말단이란, 센서 칩에 고정되어 있지 않은 쪽을 말한다.

상기 SPR 측정에서는, 제 1 당분자에 특이적으로 작용하는 단백질 등을 이용하여, 측정 조건을 일정하게 하여 상기 2개의 센서 칩에 작용시켜, 양자의 공명 각도를 관측한다. 이 양자의 공명 각도의 차이를 검출함으로써 당분자와 단백질 등의 특이적인 상호작용으로서 측정할 수 있다.

또한, 당분자와의 상호작용을 관측하는 물질은 단백질에 한정되지 않는다.

상기에서는 2 종류의 센서 칩을 동시에 측정하였으나, 이것으로 한정되는 것은 아니며, 2 종류 이상의 센서 칩을 측정해도 되고, 동시에 측정하지 않아도 된다. 또한, 적어도 1개의 센서 칩에 당분자를 도입하지 않은 것을 이용해도 된다. 예를 들어, 링커 화합물만을 고정화한 것을 이용해도 무방하다.

상기와 같은 SPR 측정을 행하면, 당분자 이외는 동일한 구조의 리간드 복합체를 고정화한 적어도 2개의 센서 칩을 이용하여 측정을 할 수 있기 때문에, 적어도 2개의 센서 칩으로 측정된 상호작용의 크기의 차이는 당분자에 기인한 것으로서 관측된다. 따라서, 상기 측정 방법을 이용하면, 당분자 이외의 부분과 다른 물질과의 비특이적인 상호작용을 저감시켜 당분자와 다른 물질의 특이적인 상호작용을 관측할 수 있다.

<실시예>

이하, 본 발명의 링커 화합물 및 리간드 복합체의 합성에 대하여, 보다 상세하게 설명한다. 또한, 본 실시예에서는, 합성한 당해 리간드 복합체와 다른 리간드 복합체를 이용하여 그 특성을 비교검토하는 실험도 행하였다. 이에 대해서도 아울러 설명한다.

[실시예 1: 링커 화합물(화합물 15)의 합성]

본 발명에 따른 링커 화합물 중 하나, 즉, 상기 일반식 (2)에서, n 이 4이고, X 가 상기 일반식 (3)으로 나타내어지며, p^1 , p^2 가 1이고, m^1 , m^2 , m^3 , m^4 가 2인 구조를 가지는 링커 화합물(화합물 15)은 하기의 순서로 합성하였다. 도 1에는, 이 링커 화합물(화합물 15)을 합성하는 과정을 나타낸다. 한편, 본 실시예 1의 설명에 있어서, 각 화합물에 부기하고 있는 번호는 도 1에 기재된 번호에 해당한다.

도 1에 나타내는 바와 같이, 먼저, 원료로서 비스[2-(2-히드록시에톡시)에틸]에테르(화합물 1)를 이용하여 디클로로메탄 중에서 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 존재하에 디아조초산에틸(화합물 2)을 반응시켜 에스테르체(화합물 3)를 수율 40%로 합성하였다. 이어, 화합물 3을 디클로로메탄 중에서 DMAP, 피리딘 존재하에서 *p*-톨루엔술폰닐클로라이드와 반응시키고, 토실(tosyl)체(화합물 4)를 78%의 수율로 얻었다. 화합물 4에 *N,N*-디메틸포름아미드 중 아지화나트륨을 작용시켜 수율 90%로 아지드체(화합물 5)를 얻었다.

이것을 메탄올 중 1N NaOH으로 가수분해하여 카르본산유도체(화합물 6)를 수율 98%로 얻었다. 디클로로메탄 중에서 상기 화합물 6과 화합물 7을 HOBt와 EDC·HCl을 이용해 축합하여 디에스테르 유도체(화합물 8)를 80%의 수율로 얻었다. 이 화합물 8을 메탄올 중 0.6N NaOH으로 가수분해함으로써 디카르본산유도체(화합물 9)를 수율 93%로 얻었다. 상기 화합물 9와 디아민유도체(화합물 10)를 FDPP와 DIPEA를 이용해 축합하여 화합물 11을 수율 40%로 얻었다. 이 화합물 11의 아지드기를 접촉수소환하여 수율 80%로 아민체(화합물 12)로 유도하였다.

그 후, 치옥트산(화합물 13)과 축합시켜 화합물 14를 수율 59%로 얻었다. 마지막으로, 이 화합물 14에 TFA를 작용시킴으로써 Boc기를 탈보호하고, 목적하는 방향족 아미노기를 4단위 가지는 링커 화합물(화합물 15)을 수율 91%로 얻었다.

이하, 상술한 합성 과정에서 얻어지는 각 화합물의 합성 방법에 대하여 보다 구체적으로 나타내며 함께, 합성된 각 화합물에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 측정과 질량 분석의 측정을 행한 결과를 나타낸다. 또한, 리간드인 당쇄의 칩 상에서의 상대 농도는 전반사 FT-IR(ATR-FT-IR)을 측정하여 구하였다. 각각, 하기와 같은 순서로 행하였다.

[$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼, 질량 분석, ATR-FT-IR의 측정, 및 시약 등]

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 측정에는, JEOL-JNM-Lambda-500 NMR spectrometer와 JEOL JNM-GSX400 NMR spectrometer와 JEOL EX-270 NMR spectrometer를 이용하였다. 화학 쉬프트는, CDCl_3 의 경우 테트라메틸실란을 기준 물질로 하여 δ 값으로 나타내었다. CD_3OD 및 DMSO-d_6 는 잔존하는 용매의 프로톤의 화학 쉬프트를 기준으로 δ 값으로 나타내었다. 질량 분석은 AppliedBiosystems, MarinerTM을 이용하여 측정하였다. ATR-FT-IR 측정에는, Shimadzu, IRPrestige-21에 1회 반사 ATR 부착 장치(MIRacle Ge 프리즘)를 탑재한 것을 이용하였다. ATR-FT-IR 측정을 위한 센서 칩은 SPR 측정기와 동일한 것을 사용하였다. 중압 컬럼 실리카겔 크로마토그래피는 Silica gel 60 No. 9385(Merck)를 사용하고, 박층 실리카겔 크로마토그래피는 Silica gel 60 F254(Merck)를 사용하였다. 무수디클로로메탄은 수소화 칼슘을 건조제로 사용하여 질소 기류하에서 증류한 것을 사용하였다. 그 밖의 탈수 용매는, 칸토 화학 주식회사의 제품을 구입하여 사용하였다. 그 이외의 시약 및 용매는, 기본적으로 특급을 사용하였다.

(1) 화합물 3의 합성

비스[2-(2-히드록시에톡시)에틸]에테르(화합물 1)(14.57ml, 80mmol)와 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (252ml, 2mmol)을 무수디클로로메탄 50ml에 용해하고, 0°C에서 디아조초산에틸(화합물 2)(1.8ml, 17.35mmol)을 적하한 후, 실온에서 70분간 교반하였다. 반응 용액에 포화 염화암모늄 수용액 20ml를 가해 디클로로메탄으로 추출하여 무수황산마그네슘으로 건조하였다. 건조제를 여과제거하여 감압농축하고, 농축 잔사(殘渣)를 중압 분취 크로마토그래피(600g, 헥산:초산에틸=1:3)로 정제하여 화합물 3(2.26g, 수율:47%)을 무색 액체로 얻었다.

이 화합물 3에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 4.22(2H, q, $J=7.0, 14.2\text{Hz}$, CO_2CH_2), 4.14(2H, s, OCH_2CO), 3.75-3.62(14H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \times 3$, HOCH_2CH_2), 3.61(2H, t, $J=4.4\text{Hz}$, HOCH_2), 1.84(1H, bs, OH), 1.28(3H, t, $J=7.3\text{Hz}$, CH_2CH_3)이었다. 또한, 상기 화합물 3의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 303.27 [(M + Na)⁺]이었다. 이에 의해 화합물 3의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 3의 분자 질량은 $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_7$:280.15이다.

(2) 화합물 4의 합성

상기의 에틸체 화합물 3(2.15g, 7.66mmol)과 DMAP(41.7mg, 337mmol)를 무수피리딘 8ml에 용해하였다. 이 용액에 0°C에서 p-톨루엔설폰산클로라이드(1.75g, 9.19mmol)를 무수디클로로메탄 8ml에 용해한 용액을 적하하고, 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 용액에 디클로로메탄과 빙수를 더하여 디클로로메탄으로 추출하였다. 유기층을 포화탄산수소나트륨수용액, 물, 포화 식염수로 1회씩 세정하고, 무수황산마그네슘으로 건조하였다. 건조제를 여과제거하여 감압농축하고, 농축 잔사를 중압 분취 크로마토그래피(100g, 클로로포름:아세톤=4:1)로 정제하여 화합물 4(2.59g, 수율:78%)를 황색 액체로 얻었다.

이 화합물 4에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 7.80(2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, aromatic), 7.35(2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, aromatic), 4.21(2H, q, CO_2CH_2), 4.16(2H, t, $J=4.8\text{Hz}$, TsOCH_2), 4.14(2H, s, OCH_2CO), 3.76-3.59(14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\times 3$, $\text{TsOCH}_2\text{CH}_2$), 2.45(3H, s, CH_3Ar), 1.28(3H, t, $J=7.0\text{Hz}$, CH_2CH_3)이었다. 또한, 상기 화합물 4의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 457.16 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$ 이었다. 이에 의해 화합물 4의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 4의 분자 질량은 $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{S}$:434.16이다.

(3) 화합물 5의 합성

상기의 토실체 화합물 4(1.01g, 2.31mmol)와 아지화나트륨(1.53g, 2.31mmol)을 무수디메틸포름아미드 50ml에 용해하고, 차광하여 120°C 질소 분위기하에서 10시간 교반하였다. 반응 용액을 클로로포름으로 추출하고, 물, 포화 식염수로 유기층을 1회씩 세정하고, 무수황산마그네슘으로 건조하였다. 건조제를 여과제거하여 감압농축하고, 농축 잔사를 중압 분취 크로마토그래피(10g, 클로로포름:아세톤=2:1)로 정제하여 화합물 5(638mg, 수율:90%)를 황색 액체로 얻었다.

이 화합물 5에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 4.22(2H, q, $J=7.3\text{Hz}$, CO_2CH_2), 4.15(2H, s, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Et}$), 3.75-3.63(12H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.69(2H, m, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.39(2H, t, $J=5.1\text{Hz}$, N_3CH_2), 1.29(3H, t, $J=7.3\text{Hz}$, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)였다. 또한, 상기 화합물 5의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 328.14 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$ 이었다. 이에 의해 화합물 5의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 5의 분자 질량은 $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$:305.16이다.

(4) 화합물 6의 합성

상기의 아지드체 화합물 5(614mg, 2.01mmol)를 메탄올 24ml에 용해하고, 차광하 0°C에서 1N NaOH 4.3ml를 가한 후, 실온에서 21시간 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축하고, 농축 잔사에 클로로포름을 가한 후, 1N HCl을 pH=2가 될 때까지 가하여 클로로포름으로 추출하였다. 유기층을 포화 식염수로 1회 세정하고, 무수황산마그네슘으로 건조하였다. 건조제를 여과제거하여 감압농축하고, 화합물 6(549mg, 수율:90%)을 무색 액체로 얻었다.

이 화합물 6에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 6.19(1H, bs, CO_2H), 4.16(2H, s, $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.75-3.64(12H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.68(2H, m, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.41(2H, t, $J=5.1\text{Hz}$, N_3CH_2)이었다. 또한, 상기 화합물 6의 ESI-MS(negative) 측정을 행한 결과, m/z 328.14 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$ 이었다. 이에 의해 화합물 6의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 6의 분자 질량은 $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6$:277.13이다.

(5) 화합물 7의 합성

이미노 2초산(10.0g, 75.1mmol)과 $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (22ml, 173mmol)를 무수메탄올(50ml)에 용해하고, 아르곤 분위기하에서 5시간 환류한 후, 포화탄산수소나트륨 수용액을 가하여 중화하고, 클로로포름으로 추출하였다. pH가 9가 될 때까지 수층에 트리에틸아민을 가하여, 다시 클로로포름으로 추출하고, 건조제로서 무수황산나트륨을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압 농축하고, 화합물 7(9.61g, 수율:79%)을 황색 유상물(油狀物)로 얻었다.

이 화합물 7에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 3.74(6H, s, OMe), 3.48(4H, s, CH_2N), 2.00(1H, s, NH)이었다. 또한, 상기 화합물 7의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 162.1[(M+H) $^+$]이었다. 이에 의해, 화합물 7의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 7의 분자 질량은 $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$:161.07이다.

(6) 화합물 8의 합성

상기 화합물 6(0.35g, 1.26mmol)과 EDC·HCl(0.27g, 1.39mmol)과 HOBt(0.19g, 1.39mmol)를 무수디클로로메탄 2ml에 용해하고, 아르곤 분위기하에서 차광하여 0°C에서 80분간 교반한 후, 상기 화합물 7(1.42g, 6.83mmol)을 무수디클로로메탄 1ml에 용해한 용액을 더하여, 실온에서 17시간 교반하였다. 반응 용액을 클로로포름으로 추출하고, 유기층을 10% 구연산과 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 1회씩 세정하였다. 건조제로서 무수황산나트륨을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압 농축을 행하였다. 농축 잔사를 분취 실리카겔 크로마토그래피(50g, 클로로포름:아세톤=10:1)로 정제하여, 화합물 8(0.42g, 수율:80%)을 백색 고체로 얻었다.

이 화합물 8에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 4.23, 4.11(4H, s, s, CONCH_2), 4.18(2H, s, OCH_2CON), 3.69, 3.66(4H, s, s, CO_2CH_3), 3.69-3.56(12H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.61(2H, t, $J=5.1\text{Hz}$, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.32(3H, t, $J=5.0\text{Hz}$, N_3CH_2)이었다. 또한, 상기 화합물 8의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 443.17 [(M+Na) $^+$]이었다. 이에 의해 화합물 8의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 8의 분자 질량은 $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_9$:420.19이다.

(7) 화합물 9의 합성

상기 화합물 8(398mg, 947 μmol)을 메탄올(5ml)에 용해하고, 2N의 NaOH(2.1ml)를 가하여, 0°C에서 2.5시간 교반한 후, Dowex 50WX-8(H^+ form)을 pH=2가 될 때까지 가하여 중화하고, Dowex 50WX-8을 여과분별한 후, 감압 농축을 행하였다. 감압 농축에 의해 얻어진 농축 잔사에 물을 가하여 불용물을 여과분별한 후, 감압 농축 및 동결 건조를 행하여, 화합물 9(346mg, 수율:93%)를 백색 고체로 얻었다.

이 화합물 9에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 5.66(2H, bs, $\text{CO}_2\text{H} \times 2$), 4.26(2H, s, OCH_2CON), 4.24, 4.18(4H, s, s, CONCH_2), 3.71-3.63(12H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.67(2H, m, $J=5.1\text{Hz}$, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.40(3H, t, $J=4.9\text{Hz}$, N_3CH_2)이었다. 또한, 상기 화합물 9의 ESI-MS(negative) 측정을 행한 결과, m/z 391.15[(M-H)]이었다. 이에 의해 화합물 9의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 9의 분자 질량은 $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_9$:392.15이다.

(8) 화합물 10의 합성

N-Boc 아미노 안식향산 유도체(3.33g, 14.0mmol)와 HOBt(1.93g, 14.3mmol)를 무수디클로로메탄(60ml)에 현탁시켜, 아르곤 분위기하, 0°C에서 15분 교반하고, EDC·HCl(2.87g, 15.0mmol)을 무수디클로로메탄(30ml)에 용해시킨 용액을 가하여, 50분 교반하였다. 이 용액에 디에틸렌트리아민(0.79ml, 7.00mmol)을 가하고, 차광하, 실온에서 철야 교반하여 백색 결정을 얻었다. 이 백색결정을 여과하여 취한 후, 메탄올로부터 재결정하여, 화합물 10(3.53g, 수율:92.9%)을 백색 결정으로 얻었다.

이 화합물 10에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 7.77-7.74(4H, d, $J=8.67\text{Hz}$, aromatic), 7.50-7.48(4H, d, $J=8.57\text{Hz}$, aromatic), 3.70-3.66(4H, m, $J=5.19\text{Hz}$ CONHCH_2), 3.34-3.28(4H, m, $J=5.61\text{Hz}$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ONH}$), 1.53(18H, s, CH_3)이었다. 또한, 상기 화합물 10의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 542.4 [(M+H) $^+$]이었다. 이에 의해 화합물 10의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 10의 분자 질량은 $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_6$:541.29이다.

(9) 화합물 11의 합성

상기 화합물 9(333mg, 847 μ mol)와 디이소프로필에틸아민(435ml, 2.54mmol)과, FDPP(1.00g, 2.60mmol)를 무수디메틸포름아미드(5ml)에 용해하고 차광하여 아르곤 분위기하 0 $^{\circ}$ C에서 30분 교반한 후, 상기 화합물 10(1.15g, 2.11mmol)을 무수디메틸포름아미드(11ml)에 용해하여 가하고, 실온에서 20시간 교반하였다. 이 반응 용액을 감압 농축하여 얻어진 농축 잔사를 클로로포름으로 추출하고, 물, 유기층을 10% 구연산, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 1회씩 세정하여, 건조제로서 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압 농축을 행하였다. 감압 농축에 의해 얻어진 농축 잔사를 분취 실리카겔 크로마토그래피(80g, 클로로포름:메탄올=10:1)로 정제하여, 화합물 11(125mg, 수율:59%)을 백색 고체로 얻었다.

이 화합물 11에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, 8.18(1H, bs, NHCOPh), 7.86(2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, aromatic), 7.80(1H, bs, PhNHCO), 7.75-7.68(8H, m, NHCOPh , aromatic, PhNHCO), 7.54(1H, bs, PhNHCO), 7.48(2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, NHCOPh , aromatic), 7.42(5H, m, aromatic, NHCOPh), 7.34(2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, aromatic), 7.28(1H, bs, PhNHCO), 3.84(4H, bs, CONCH_2), 3.62-3.48(20H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.56(2H, t, $J=5.1\text{Hz}$, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.43(2H, bs, OCH_2CON), 3.35-3.30(4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.26(2H, t, $J=5.1\text{Hz}$, N_3CH_2), 3.13, 2.98(4H, bs, bs, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.52, 1.50, 1.49(36H, s, s, s, t-butyl)이었다. 또한, 상기 화합물 11의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 1461.72[($\text{M}+\text{Na}$) $^+$]이었다. 이에 의해 화합물 11의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 11의 분자 질량은 $\text{C}_{70}\text{H}_{98}\text{N}_{14}\text{O}_{19}$:1438.71이다.

(10) 화합물 12의 합성

상기 화합물 11(165mg, 114 μ mol)을 메탄올(12ml)에 용해하고, 5% Pd/C (55mg)를 가하고, 수소 분위기하, 실온에서 5시간 교반한 후, 상기 Pd/C를 여과제거하여 감압 농축하고, 얻어진 농축 잔사를 분취, 실리카겔 크로마토그래피(10g, 클로로포름:메탄올=7:1)로 정제하여, 화합물 12(128mg, 수율:79%)를 백색 고체로 얻었다.

이 화합물 12에 대하여, $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, 8.78-7.68(8H, m, aromatic), 7.48(8H, m, aromatic), 4.21, 4.10(4H, bs, bs, CONCH_2), 3.85(2H, bs, OCH_2CON), 3.62-3.44(26H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.50(2H, t, $J=5.1\text{Hz}$, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 2.76(2H, t, $J=5.1\text{Hz}$, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 1.50(36H, s, t-butyl)이었다. 또한, 상기 화합물 12의 ESI-MS(positive)측정을 행한 결과, m/z 1413.74[($\text{M}+\text{H}$) $^+$]이었다. 한편, 이 화합물 12의 분자 질량은 $\text{C}_{70}\text{H}_{100}\text{N}_{12}\text{O}_{19}$:1412.72이다.

이 화합물 12는, 상기 일반식(11)에서 n이 4이고, p^1 , p^2 가 1이며, m^1 , m^2 , m^3 , m^4 가 2인 구조를 가지는 아민 화합물이다.

(11) 화합물 14의 합성

상기 화합물 13(치옥트산)(3.4mg, 16.6 imol)과 HOBt(1.6mg, 16.6 μ mol)EDC·HCl(3.2mg, 1.66 μ mol)를 무수디메틸포름아미드(2ml)에 용해하고, 아르곤 분위기하 0 $^{\circ}$ C에서 차광하여 교반하였다. 이어서, 상기 화합물 12(23.5mg, 16.6 μ mol)를 무수디메틸포름아미드(2ml)에 용해하여 가하고, 실온에서 22시간 교반하였다. 이 반응 용액을 감압농축하여 얻어진 농축 잔사를 디클로로메탄으로 추출하고, 유기층 10% 구연산, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 1회씩 세정하였다. 건조제로서 무수황산나트륨을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압 농축을 행하였다. 농축 잔사를 분취 실리카겔 크로마토그래피(7g, 클로로포름:메탄올=10:1)로 정제하여, 화합물 14(15.7mg, 수율:59%)를 백색 고체로 얻었다.

이 화합물 14에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, 8.20, 8.00(4H, bs, bs, NHCOPh), 7.86(2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, aromatic), 7.77-7.72(7H, m, COPhNH , aromatic), 7.53(1H, bs, NHCOPh), 7.50-7.36(10H, m, aromatic, $J=8.8\text{Hz}$, COPhNH), 7.27(2H, bs, COPhNH , CONHCH_2), 3.89(4H, bs, CONCH_2CO), 3.64-3.37(26H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CONHCH_2 , $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), 3.53(1H, m, SSCH), 3.48(2H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.32(4H, m, OCH_2CON , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.18, 2.85(4H, bs, bs, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.17-3.04(2H, m, CH_2SSCH), 2.44-2.36(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 2.16(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.89-1.81(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 1.69-

1.56(4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.51, 1.50(36H, s, s, t-butyl), 1.42-1.34(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)이었다. 또한, 상기 화합물 14의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 1601.81 $[(M+H)^+]$ 이었다. 이에 의해 화합물 14의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 14의 분자 질량은 $\text{C}_{78}\text{H}_{112}\text{N}_{12}\text{O}_{20}\text{S}_2$:1600.76이다.

(12) 링커 화합물(화합물 15)의 합성

상기 화합물 14(60.3mg, 31.2 μmol)를 디클로로메탄(1ml)에 용해하고, TFA(3ml)를 가하여 차광하 0°C에서 1시간 교반한 후, 감압 농축을 행하여, 얻어진 잔사를 메탄올에 용해하여 Dowex Marathon A(OH⁻form)를 충전한 컬럼(1.0cm ϕ ×3.0cm)에 주입하여 이온 교환을 행하였다. 용출액을 감압농축하여, 화합물 15(41.2mg, 수율:91%)를 백색 고체로 얻었다.

이 화합물 15에 대하여, ¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₃) 측정을 행한 결과, 8.19, 8.05(4H, m, m, NHCOPh), 7.82(1H, bt, CONHCH_2), 7.53(8H, m, aromatic), 6.51(8H, dd, J=8.4, 1.5Hz, aromatic), 5.61-5.55(8H, m, NH_2), 4.24, 4.11(4H, s, s, CONCH_2CO), 3.93(2H, bs, OCH_2CON), 3.60-3.37(31H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CONHCH_2 , $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$, SSCH), 3.19-3.06(4H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$, CH_2SSCH), 2.42-2.32(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 2.04(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.87-1.78(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 1.64-1.45(4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.34-1.28(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)였다. 또한, 상기 화합물 15의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 623.27 $[(M+2\text{Na})^{2+}]$ 이었다. 한편, 이 화합물 15의 분자 질량은 $\text{C}_{58}\text{H}_{80}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{S}_2$:1200.55이다.

이 화합물 15는, 상기 일반식 (2)에서 n이 4이고, X가 상기 일반식 (3)로 나타내지며, p¹, p²가 1이고, m¹, m², m³, m⁴가 2인 구조를 가지는 링커 화합물이다.

[실시예 2: 리간드 복합체(화합물 17)의 합성]

실시예 1에서 얻어진 링커 화합물 15를 이용하여, 상기 일반식 (5)에서, n이 4이고, p¹, p²가 1이며, m¹, m², m³, m⁴가 2이고, R'가 수소(H)이며, R가 상기 일반식(12)로 나타내어지는 올리고당 유래의 구조를 가지는 리간드 복합체를 하기의 순서로 합성하였다. 도 2에는, 이 합성의 화학반응식을 나타낸다.

도 2에 나타내는 바와 같이, 실시예 1에서 얻어진 링커 화합물 15와, 상기 일반식(12)로 나타내어지는 당분자인 화합물 16(7 당량)을 이용하여 환원 아미노화 반응을 행하였다. 이에 의해, 본 발명의 리간드 복합체의 일예인 화합물 17을 수율 22%로 얻었다.

구체적으로, 상기 링커 화합물 15(2.0mg, 1.67 μmol)와 화합물 16(10mg, 11.7mmol)을 물 100ml와 디메틸아세트아미드 400ml와 초산 10ml의 혼합 용매에 용해하고, 차광하, 밀봉관 중 37°C에서 25시간 가열하였다. NaBH_3CN (3.51mg, 50.2mmol)을 초산 15ml에 용해하여 반응 용액에 가하고 37°C에서 6일간 가열한 후, 감압농축하여 Sephadex G-50(1.6cm ϕ × 80cm, PBS에 0.3M의 NaCl을 더한 용액)을 이용하여 정제하였다. 정제에 의해 얻어진 목적 분획을 감압농축하고, 농축 잔사를 Sephadex G-25(1.6cm ϕ × 40cm, 물)를 이용하여 탈염하였다. 탈염에 의해 얻어진 목적 분획을 감압농축하고, 물에 녹여 동결건조를 행하여 화합물 17(1.7mg, 수율:22%)을 백색 분체(粉體)로 얻었다.

이 화합물 17에 대하여, 실시예 1에 기재된 방법으로 ¹H-NMR(400MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, 8.7.65-7.58(8H, m, aromatic), 6.78-6.67(8H, m, aromatic), 5.37(4H, bs, H-1"), 5.13(4H, bs, J=2.5Hz), 4.52(4H, bs, H-5'), 4.29(10H, m, H-6a", H-3', CONCH_2CO), 4.19(10H, m, H-6b", H-2', CONCH_2CO), 4.05(3H, m, H-4'), 3.99-3.92(14H, m, H-2, H-6a, H-5", OCH_2CON), 3.87(8H, m, H-5, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.83(8H, m, H-3, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.77-3.70(8H, m, H-4, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.71(4H, t, J=9.9Hz, H-3"), 3.64-3.50(25H, m, H-6b, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CONHCH_2 , $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$, SSCH), 3.54(3H, s, OCH_3), 3.45-3.19(14H, m, H-1a, H-1b, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, CH_2SS), 3.34(4H, t, J=9.6Hz, H-4"), 3.24(4H, dd, J=3.4, 10.5Hz, H-2"), 2.35-2.28(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 2.27(2H, bt, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 1.89-1.84(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 1.56-1.46(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.35-1.14(2H, m, CH_2CH_2

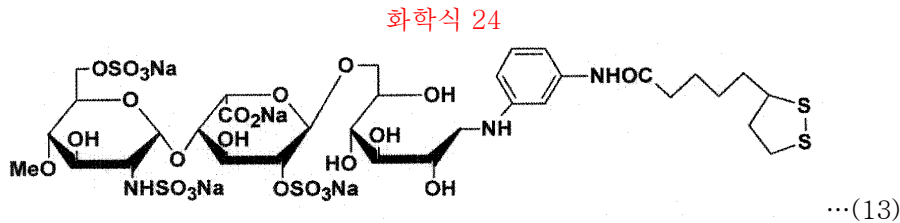
(CH₂)₂CONH)였다. 또한, 상기 화합물 17의 ESI-MS(negative) 측정을 행한 결과, m/z 1449.93[(M-10Na+ 7H)³]이었다. 이에 의해 화합물 17의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 17의 분자 질량은 C₁₃₄H₁₉₆N₁₆Na₁₆O₁₀₈S₁₄:4572.48이다.

이 화합물 17이, 상기 일반식 (5)에서, n이 4이고, p¹, p²가 1이며, m¹, m², m³, m⁴가 2이며, R'가 수소(H)이고, R이 일반식 (6-3)으로 나타내어지는 올리고당 유래 화합물인 구조를 가지는 리간드 복합체이다.

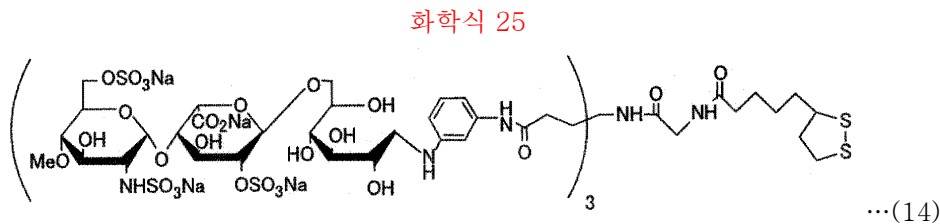
[실시예 3: 리간드인 당쇄와 단백질의 상호작용의 검증]

본 실시예에서는, 실시예 2에서 얻어진 상기 일반식 (5)에서, n이 4이고, p¹, p²가 1이며, m¹, m², m³, m⁴가 2이고, R'가 수소(H)이며, R가 일반식 (6-3)으로 나타내어지는 올리고당 유래 화합물인 구조를 가지는 리간드 복합체(이하, 이 리간드 복합체에 대해서는, 'Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc'라 기재한다)를 이용하여, 단백질과의 분자간 상호작용에 대해 검증했다.

본 실시예에 있어서는, 비교를 위하여 본 발명자들이 이전에 발견한 다른 2종류의 리간드 복합체에 대해서도 동일한 실험을 행하고, 그 상호작용에 대해 비교검토하였다. 상기 다른 2 종류의 리간드 복합체란, 구체적으로, 상기 특허문헌 1에 기재된 리간드 복합체로서, 이하의 일반식(13)으로 나타내어지는 리간드 복합체다. 이하, 이 리간드 복합체에 대해서는, 'Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc'기재한다.



또한, 다른 리간드 복합체의 다른 하나는, 일본 특허 공개 제 2004-157108호 공보에 기재된 리간드 복합체로서, 하기의 일반식(14)로 나타내어지는 리간드 복합체이다. 이하, 이 리간드 복합체에 대해서는, 'Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc'라 기재한다. 한편, 상기 일본 특허 공개 제 2004-157108호 공보는, 본 우선일의 시점에서 미공개이다.

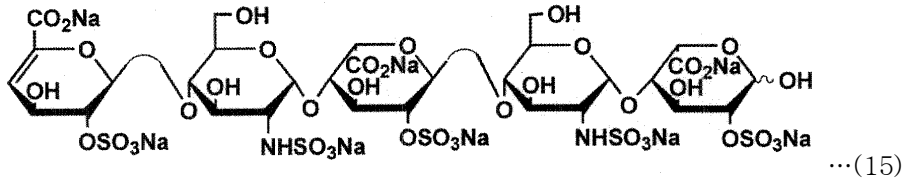


[실시예 3-1: 특이적 상호작용의 확인]

먼저, 실시예 3-1로서 상기 일반식 (8)로 나타내어지는 2당 구조(GlcNS6S-IdoA2S)를 고정화한 칩과, 헤파린 결합성 단백질의 특이적 상호작용을 확인하기 위하여 저해 실험을 행하였다. 즉, 헤파린 결합성 단백질과 GlcNS6S-IdoA2S 구조의 결합을 저해하는 인히비터를 공존시켜, 헤파린 결합성 단백질의 칩에 대한 결합이 저해되는지 여부에 대하여 검토하였다.

본 실험에서는, 인히비터로서 헤파린(돼지 소장 유래, Mw=17600)을, 헤파린 결합성 단백질로서 bFGF를 이용하였다. bFGF는 FGF-2라고도 불리고, 혈관 내피 세포나 선유아 세포에 작용하여, 혈관 신생 작용, 육아 형성 촉진 작용을 발휘함으로써 창상 치유를 촉진하는 것이 알려져 있다. 생체 내에서는, 세포 표면에 있는 헤파린 유사 물질인 헤파란 황산과 상호작용하고, 생물 활성을 발현시키고 있다. bFGF와의 결합에 필요한 최소 결합 단위는, 하기의 일반식(15)로 나타내어지는 5당이라는 사실이 보고되어 있다(참고 문헌:M. Maearana, B. Casu & U. Lindahl, J. Biol. Chem. 268권, 8857페이지, 1993년).

화학식 26



상기의 구조에는, 글루코사민의 6위(位)가 황산화되어 있는 구조가 포함되지 않았다. 그러나, 헤파린 황산 중의 IdoA2S-GlcNS 구조와 bFGF의 회합에 있어서 불특정 다수의 6위 황산화는 필요 없지만, 활성 부위의 형성에는 필요하다는 것이 확인되고 있다. 따라서, bFGF를, GlcNS6S-IdoA2S 구조와의 상호작용을 관측하기 위한 단백질로 선택하였다.

이어서, 상술한 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 각각 고정화한 칩을 이용하여, 헤파린 공존하 bFGF와의 결합 저해 실험을 행하였다. 즉, 200nM의 bFGF 용액에 헤파린을 3, 10, 100, 300, 1000nM로 농도를 바꾸어 혼합하고, 칩에 주입하였다.

도 3에는, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에 대한 bFGF의 결합 거동을 나타낸다. 이 도면으로부터, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에 대한 bFGF의 결합은, 헤파린 농도 의존적으로 저해됨이 확인되었다. 즉, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에 대한 bFGF의 결합은, 헤파린에 의해 저해됨이 확인되었다.

상기 실험에 의해 얻어진 3종류의 칩 각각의 데이터로부터, 각 칩에 있어서의 bFGF의 결합의 저해율을 산출하였다. 그 결과를 도 4에 나타낸다. 한편, 상기 저해율은, 서로 다른 농도의 헤파린 공존하에서의 최대 각도 변화량을, 헤파린을 공존시키지 않는 경우의 최대 각도 변화량으로 나눈 값의 백분율로 나타낸 것이다.

도 4에 나타내는 그래프로부터, bFGF의 칩에 대한 결합 저해율이 50%인 곳을 IC₅₀으로 정의하였다. 그 결과, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에서는 IC₅₀=2.5nM, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에서는 IC₅₀=94nM, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에서는 IC₅₀=71nM이 되고, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩의 IC₅₀값은, 다른 2종류의 칩의 값과 비교하여, 1 오더 낮아, 헤파린에 의한 저해 효과를 강하게 받고 있음이 확인되었다. 어느 칩에서도 저해율이 헤파린의 농도 의존적으로 변화하고 있음으로부터, 이들 칩은 헤파린 결합성 단백질인 bFGF를 특이적으로 인식하고 있다고 결론지을 수 있다.

[실시예 3-2: 칩 표면의 당쇄의 상대 밀도의 검토]

먼저, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc 혹은 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와, 당쇄를 가지지 않은 분자가 결합한 링커 화합물(비당쇄-링커 결합 화합물, 이하, Mono-Glc라 부른다)를 용액 중에서 혼합하여 칩에 대한 고정화를 행하고, 그 혼합비(사입비)에 의한 칩 상의 리간드인 황산화이당의 밀도 변화에 대하여, ATR-FT-IR법을 이용하여 검토하였다. 용액 중의 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc 혹은 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 비율은, 0, 25, 50, 75, 100%로 변화시켰다. 그 결과를 도 5의 (a), (b)에 나타낸다. 도 5의 (a)가 용액 중의 혼합비를 바꾼 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 전반사 스펙트럼이고, 도 5의 (b)가 용액 중의 혼합비를 바꾼 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 전반사 스펙트럼이다.

파수(wavenumber) 1200-1303cm⁻¹의 범위에 황산기 유래의 S=O 신축 진동이 관측되었기 때문에, 이 영역의 흡광도 곡선을 이용하여 다변량 해석법에 의해 황산기의 정량을 행하고, 용액 중 리간드 복합체의 혼합비에 대한 칩 상의 황산기의 상대 강도를 플로팅하였다. 그 결과를 도 6의 (a), (b)에 나타낸다. 도 6의 (a)가 용액 중의 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 혼합비에 대한 칩 상의 황산기의 상대 강도를 나타내는 그래프이고, 6(b)가 용액 중의 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 혼합비에 대한 칩 상의 황산기의 상대 강도를 나타내는 그래프이다. 도 6의 (a), (b)에 나타내는 일차 곡선의 상관계수는, 각각 0.9993, 0.9610이므로, 리간드인 황산화이당의 칩에 대한 고정화율(칩 표면의 당쇄의 밀도)은 어느 쪽도 용액 중의 리간드 복합체의 존재비에 비례하는 것이 나타났다.

[실시예 3-3: 당쇄의 상대 밀도가, h-vWF와의 상호작용에 미치는 영향의 검토]

계속해서, 칩 표면의 리간드인 황산화이당의 상대 밀도가 단백질과의 상호작용에 미치는 영향에 대해 검토하였다. 여기에서는, 인간 혈장 유래 vWF(이하, h-vWF라 부른다)와의 상호작용에 대하여 해석을 행하였다.

상기 3종의 각 리간드 복합체(Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc)와 Mono-Glc의 혼합비를, 각각 100/0, 및, 20/80으로 바꾸어, 6종의 칩을 작성하고, h-vWF와의 상호작용을 SPR법으로 관측했다. 여기서, SPR법에 따른 측정 순서에 대하여 설명한다.

측정에는, SPR670(일본 레이저 전자 주식회사 제품)을 이용하였다. 또한, 센서 칩에는, 13×20×0.7mm의 클래스 기판에 접착층으로서 2nm의 크롬을 증착하고, 다시 그 위에 50nm의 금 박막을 증착한 것(일본 레이저 전자 주식회사제)을 이용하고, UV 오존 클리너(일본 레이저 전자 주식회사 제품 NL-UV253)에 넣어 자외선을 30분간 조사하고, 오존으로 칩 표면을 세정하였다.

이어서, 센서 칩을 전용 PTFE 셀(일본 레이저 전자 주식회사 제품)에 장착한 후, 상기 6종의 각 칩을 메탄올/물=1/1의 혼합 용액(단, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc 혼합의 경우에는 메탄올 용액)에 용해하고(0.1mM), 이 용액을 50 μl 취하여 PTFE 셀에 넣고, 파라필름으로 밀봉하였다. 이 칩을 장착한 PTFE 셀을 실온에서 Bio Dancer(New Brunswick Scientific社 제품)상에서 철야 완만하게 진탕하였다.

이 칩을 메탄올로, 6회 세정하고, 물로 1회 세정한 후, 다시 한번 메탄올, 물의 순서로 1회씩 세정하였다. 풍건 후, SPR670의 센서 칩 카트리지에 부착하였다. 런닝 버퍼로 칩 표면을 충분히 평형화한 후, 레이저광을 금막에 조사하고, 이 때 관측되는 표면 플라즈몬 공명 각도 변화를 관찰하였다. 런닝 버퍼는 pH7.4인 등장 인산 완충 용액(PBS)을 이용하였다. 또한, SPR 측정은 모두 25℃의 온도에서 행하였다. bFGF는, STRATHMANN BIOTEC AG社 제품(Recombian Human FGF-basic, MW; 17000, Lot No.;471120)을 이용하고, h-vWF는, CALBIOCHEM社 제품(von Willebrand Factor, Human Plasma, MW; 270000(Monomer Unit 환산), Lot No.;B41632)을 사용하였다.

이 SPR 측정을 행할 때에, h-vWF의 농도를 10, 20, 40, 80, 160nM로 바꾸면서 각 칩 상에 주입하자, 결합 상호작용이 관측되고, h-vWF가 칩 상에 고정화되어 있는 모습이 관찰되었다. 이때, 리간드인 황산화이당을 변성시키지 않고 h-vWF를 칩으로부터 완전히 해리시키는 해리제가 발견되지 않았기 때문에, 해리 상수(K_D)의 산출은 칩 상의 h-vWF의 결합량으로부터 구하였다. h-vWF의 결합량은, 리간드 복합체가 고정화된 상태를 베이스로 하고, 농도를 바꾸어 주입한 h-vWF의 센서그램의 커브가 거의 일정해진 곳의 차이를 이용하였다.

도 7의 (a) ~ (c)에는, 상기 3종의 각 리간드 복합체(Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc)와 Mono-Glc의 혼합비가 100/0인 경우의 결합 상호작용을 나타낸다. (a)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우, (b)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우, (c)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우이다. 또한, 도 8의 (a) ~ (c)에는, 상기 3종의 각 리간드 복합체(Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc)와 Mono-Glc의 혼합비가 20/80인 경우의 결합 상호작용을 나타낸다. (a)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우, (b)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우, (c)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우이다.

이 결과로부터 얻어진 결합량을 h-vWF의 농도별로 플로팅한 것을 도 9의 (a) ~ (c)에 나타낸다. (a)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우, (b)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우, (c)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 경우이다. 이 도 9에는, 각 그래프의 커브로부터 해리 상수(K_D)를 산출한 결과도 나타내고 있다.

도 9의 (a)에 나타내는 바와 같이, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc= 100/0, 및, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=20/80으로 하여 리간드인 황산화이당을 고정화한 칩을 이용한 경우에는, 해리 상수가 각각 $K_D=35nM$ 및 $41nM$ 이 되었다. 도 9의 (b)에 나타내는 바와 같이, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc= 100/0, 및, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=20/80으로 하여 리간드인 황산화이당을 고정화한 칩을 이용한 경우에는, 해리 상수가 각각 $K_D=27nM$ 및 $24nM$ 이 되었다. 또한, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=100/0, 및, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=20/80으로 하여 리간드인 황산화이당을 고정화한 칩을 이용한 경우에는, 해리 상수가 각각 $K_D=32nM$ 및 $35nM$ 이 되었다.

이러한 결과로부터, 아날라이트로서 h-vWF를 이용한 경우, 리간드인 당쇄의 칩 상의 존재비를 변화시키더라도 친화성에 미치는 영향은 거의 없음을 알았다. 또한, 당쇄간 거리가 서로 다른 리간드 복합체를 고정화한 칩을 이용하더라도, h-vWF와의 상호작용에 있어서 당쇄간 거리의 차이가 해리 상수의 값에 영향을 미치지 않았다. 이는 h-vWF가 다량체 구조를 취하고 있기 때문에 복수의 헤파린 결합성 도메인이 존재하고, 그 영향에 의해 해리 속도가 현저하게 늦어져, 당쇄간 거리의 차이가 해리 상수에 반영되지 않았던 것이라 생각된다.

[실시예 3-4: 당쇄의 상대 밀도가 단백질과의 상호작용에 미치는 영향의 검토]

여기서, 1개의 헤파린 결합성 도메인을 가지는 A1 루프 부분만을 가지는 대장균 유래의 재조합 인간 vWF 부분 단백질(이하, rhvWF-A1라 부른다)을 이용하면, 칩 상에 클러스터화한 당쇄와 단백질간의 상호작용에 있어서, 당쇄간 거리의 차이가 당쇄-당쇄 결합성 단백질간의 상호작용에 미치는 영향을 검토할 수 있을 것이라 생각하고, 하기와 같은 실험을 행하였다. rhvWF-A1은 문헌(M. A. Cruz, R. I. Handin & R. J. Wise, J.Biol. Chem. 268권, 21238페이지, 1993년)에 따라 조제하였다.

여기에서는, 리간드 복합체로서 상술한 상기 3종의 각 리간드 복합체(Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc), 및, Mono-Glc를 이용해, 상기 3종의 각 리간드 복합체/Mono-Glc의 존재비를 각각 100/0, 50/50으로 바꾸어 작성한 칩을 이용하였다. rhvWF-A1 농도를 변화시켜 칩과의 결합 상호작용을 측정할 결과를 도 10 ~ 도 12에 나타낸다. 한편, 도 10의 (a)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=100/0으로 칩을 작성했을 경우이며, 도 10의 (b)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=50/50인 경우이다. 또한, 도 11의 (a)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=100/0으로 칩을 작성했을 경우이고, 도 11의 (b)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=50/50인 경우이다. 또한, 도 12의 (a)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=100/0으로 칩을 작성했을 경우이고, 도 12의 (b)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=50/50인 경우이다.

이들 결과로부터 산출한 해리 상수, 결합 상수, 결합 속도 상수, 해리 속도 상수를 표 1에 정리해 나타낸다. 한편, 표 1에 있어서, 해리 상수:KD(k_d/k_a), 결합 상수:KA(k_a/k_d), 결합 속도 상수: k_a , 해리 속도 상수: k_d 이다.

[표 1]

No.	리간드의 종류	칩 상의 조성비	K_D (μM)	K_A ($\text{M}^{-1} \times 10^{-5}$)	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^3$)	k_d ($\text{s}^{-1} \times 10^{-3}$)
1	Mono-GlcNS6S-IdoA2A-Glc/Mono-Glc	100/0	2.60	3.86	8.38	21.9
2		50/50	3.79	2.64	14.6	55.2
3	Tri-GlcNS6S-IdoA2A-Glc/Mono-Glc	100/0	1.20	8.33	6.60	8.05
4		50/50	1.50	6.65	4.52	6.83
5	Tetra-GlcNS6S-IdoA2A-Glc/Mono-Glc	100/0	0.99	10.1	6.50	6.44
6		50/50	1.00	9.96	5.24	5.26

표 1에 나타내는 바와 같이, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩의 경우에는, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc나 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 비교하여 해리 상수의 값은 커졌다($K_D=2.60\mu\text{M}$). 또한, 칩 상의 당쇄의 고정화 밀도를 상대적으로 작게 하면 해리 상수의 값은 더 커졌다($K_D=3.79\mu\text{M}$). 한편, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에서는, 칩 상의 고정화 밀도를 상대적으로 작게 했을 경우, 약간의 해리 상수의 값의 증가를 볼 수 있었다($K_D=1.20\mu\text{M} \rightarrow 1.50\mu\text{M}$). 또한, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에서는, 칩 상의 고정화 밀도를 변화시키더라도, 해리 상수는 거의 변함없었다($K_D=0.99\mu\text{M} \rightarrow 1.00\mu\text{M}$).

또한, 표 1에 나타내는 바와 같이, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩의 경우에는, 다른 2개의 리간드 복합체와 고정화 칩과 비교하여, 1 오더 높은 해리 속도 상수(k_d)를 가지는 것이 확인되었다. 이로부터, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc 및 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc는 분자 내에서 황산화 올리고당쇄간 거리가 제어된 당쇄 클러스터 구조를 가지고 있기 때문에, 칩 상의 당쇄의 고정화 밀도를 상대적으로 저하시키더라도 그 영향을 받기 어려운 것이라 생각된다.

즉, rhvWF-A1과의 상호작용에 있어서는, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에서는, 칩 상의 상대적인 당쇄 고정화 밀도를 저하시키면, 결합력이 저하되는 것이 확인되었다. 이에 대해, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc나 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에서는, 칩 상의 상대적인 당쇄 고정화 밀도를 저하시키더라도 그 결합력은 그다지 변화하지 않음을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터, 황산화 올리고당쇄-당쇄 결합 단백질간의 상호작용에 있어서, 결합력을 증대시키려면, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 같이, 동일한 리간드 복합체 구조를 가지는 황산화 올리고당쇄를 칩 상에 2차원적으로 클러스터화시키는 것 만으로는 불충분하고, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc나 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와 같이, 분자 레벨에서 당쇄간 거리가 제어된 클러스터 구조가 필요하다는 것이 뒷받침된다.

[실시예 4: 링커 화합물(화합물 26) 및 리간드 복합체(화합물 27)의 합성]

본 발명에 따른 링커 화합물의 하나, 즉, 상기 일반식(1)에서, a가 1, b가 4, d가 1, e가 4이고, X가 상기 일반식 (4)로 나타내어지고, q^1, q^2, q^3 가 2이고, $r^1, r^2, r^3, t^1, t^2, t^3, u^1, u^2, u^3$ 가 0인 구조를 가지는 링커 화합물(화합물 26), 및 상기 일반식 (7)로 나타내어지고, a가 1, b가 4, d가 1, e가 4이고, q^1, q^2, q^3 가 2이고, $r^1, r^2, r^3, t^1, t^2, t^3, u^1, u^2, u^3$ 이 0이며, R'가 수소(H)이고, R이 일반식 (6-2)의 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 27)는 하기의 순서로 합성하였다. 도 13 에는, 이 링커 화합물(화합물 26)을 합성하는 과정을 나타낸다. 또한, 도 14에는 이 링커 화합물(화합물 26)로부터 리간드 복합체(화합물 27)를 합성하는 과정을 나타낸다. 한편, 본 실시예 4의 설명에 있어서, 각 화합물에 부기하고 있는 번호는 도 13 및 도 14에 기재된 번호에 해당한다.

[측정 방법, 시약 등]

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 측정에는, JOEL-Delta 600 Spectrometer를 이용하였다. 화학 시프트는, CDCl_3 의 경우에는 테트라메틸실란(0.00ppm)을 기준 물질로 하여 δ 값으로 나타내었다. D_2O 의 경우에는 D_2O (4.65ppm)를 기준 물질로 하여 δ 값으로 나타내었다. 질량 분석은 PerSeptive Biosystem MarinerTM Biospectrometry Workstation을 이용하여 측정하였다. 중압 실리카겔 크로마토그래피는 Silicagel 60(Merck, 0.040 ~ 0.063mm)을 이용하여 행하였다. 박층 크로마토그래피는 Precoated Silicagel 60 F254(Merck, 0.5mm)를 사용하였다. 모든 시약, 탈수 용매는 칸토 화학 주식회사 제품을 구입하여 사용하였다.

(1) $\text{N}_3\text{-TEG-Trivalent-(O}^t\text{Bu)}_3$ (화합물 20)의 합성(도 13 참조)

$\text{O}_2\text{N-Trivalent-(O}^t\text{(Bu)}_3$ (화합물 18)(757mg, 1.70mmol)와 염화니켈 6수물($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)(80.8mg, 0.340mmol)을 메탄올(20ml)에 용해하고, 수소화붕소나트륨(322mg, 8.50mmol)을 5회로 나누어 당량분씩 가하고 실온에서 30분간 교반하였다. 메탄올을 농축제거한 후, 물과 클로로포름을 가하였다. 셀라이트 여과 후, 여과액을 클로로포름으로 3회 추출하였다. 유기상(有機相)을 무수 황산 나트륨을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축하였다. 얻어진 농축 잔사(화합물 19)와 $\text{N}_3\text{-TEG-COOH}$ (화합물 6)(441mg, 1.70mmol)를 무수디메틸포름아미드(10ml)에 용해하고, 실온, 아르곤 분위기하에서 DIEA(592 μl , 3.40mmol), HOAt(463mg, 3.40mmol), EDC·HCl(652mg, 3.40mmol)을 순서대로 가하여 16시간 교반하였다. 반응액에 물을 가한 후, 수상(水相)을 초산에틸로 3회 추출하였다. 유기상을 포화 식염수로 세정하고, 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압 농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(50g, 클로로포름:아세톤=50:1)로 정제하여, $\text{N}_3\text{-TEG-Trivalent-(O}^t\text{Bu)}_3$ (화합물 20)를 무색의 유상물(油狀物)로 얻었다. 얻은 양은 839mg(73%)이었다.

이 화합물 20에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(600mHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 3.90(s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CONH-}$), 3.70-3.67(m, 14H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O-} \times 3, \text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$), 3.39(t, 2H, $J=4.8\text{Hz}, \text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$), 2.21-2.18(m, 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-} \times 3$), 2.00-1.96(m, 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-} \times 3$), 1.43(s, 27H, $-\text{CH}_3 \times 9$)였다. ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 697.45[(M+Na)⁺]이었다. 이에 의해 화합물 20의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 20의 분자 질량은 $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{11}$:676.41이다.

(2) $\text{TEG-Trivalent-(O}^t\text{BUu)}_3$ (화합물 22)의 합성(도 13 참조)

상기 화합물 20(N_3 -TEG-Trivalent-(O^t Bu) $_3$)(837mg, 1.24mmol)을 메탄올(10ml)에 용해하고, 10% Pd/C(200mg)를 가하여 수소 분위기하, 실온에서 1.5시간 교반하였다. 상기 Pd/C를 여과제거하여 여과액을 감압농축하였다. 얻어진 농축 잔사(화합물 21)과 치옥트산(385mg, 1.87mmol)을 무수디메틸포름아미드(10ml)에 용해하고, 아르곤 분위기하, 실온에서 DIEA (325 μ l, 1.87mmol), HOAt(254mg, 1.87mmol), EDC·HCl(358mg, 1.87mmol)을 순서대로 가하여 13시간 교반하였다. 반응액에 포화 탄산수소나트륨 수용액을 가한 후, 수상을 초산에틸로, 3회 추출하였다. 유기상을 포화 식염수로 세정하고, 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(50g, 클로로포름:메탄올=30:1)로 정제하여, TEG-Trivalent-(O^t Bu) $_3$ (화합물 22)를 무색의 유상물로 얻었다. 얻은 양은 1.05g (99%)이었다.

이 화합물 22에 대하여 1 H-NMR 스펙트럼(600MHz, $CDCl_3$) 측정을 행한 결과, δ 3.91(s, 2H, $-OCH_2CONH-$), 3.70-3.54(m, 13H, $-OCH_2CH_2O-\times 3$, $CH_2CH(CH_2-)(S-)$), 3.55(t, 2H, $J=5.5$ Hz, $-CONHCH_2CH_2O-$), 3.45(q, 2H, $J=5.5$ Hz, $CONHCH_2CH_2O-$), 3.20-3.16(m, 1H, $-SCH_2(1H)-$), 3.14-3.09(m, 1H, $-SCH_2(1H)-$), 2.49-2.43(m, 1H, $-SCH_2CH_2(1H)-$), 2.22-2.17(m, 8H, $-CH_2CH_2CO-\times 3$, $NHCOCH_2CH_2-$), 2.00-1.96(m, 6H, $-CH_2CH_2CO-\times 3$), 1.94-1.88(m, 1H, $-SCH_2CH_2(1H)-$), 1.74-1.62(m 4H, $-COCH_2CH_2CH_2-$), 1.52-1.41(m, 2H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2-$), 1.44(s, 27H, $-CH_3\times 9$)였다. 이에 의해 화합물 22의 구조를 확인할 수 있었다.

(3) TEG-Trivalent-(NHBoc) $_3$ (화합물 25)의 합성(도 13 참조)

상기 화합물 22(TEG-Trivalent-(O^t Bu) $_3$)(500mg, 0.587mmol)를 디클로로메탄/물(2.2ml, 10/1)로 용해하고, 0 $^\circ$ C에서 TFA(2ml)를 가하고, 동 온도에서 1시간 교반하였다. 반응 용액을 농축 후, 톨루엔으로 공비(共沸)하였다. 얻어진 농축 잔사(화합물 23)와 N-Boc-페닐렌디아민(화합물 24)(612mg, 2.94mmol)을 무수디메틸포름아미드(10ml)에 용해하고, 아르곤 분위기하, 실온에서 DIEA(380 μ l, 2.94mmol), HOAt(400mg, 2.94mmol), EDC·HCl(563mg, 2.94mmol)을 순서대로 가하여 19시간 교반하였다. 반응 용액에 포화 탄산수소나트륨 수용액을 가한 후, 수상을 AcOEt로 3회 추출하였다. 유기상을 포화 식염수로 세정하고, 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(50g, 클로로포름:아세톤=3:1)로 정제하고, TEG-Trivalent-(NHBoc) $_3$ (화합물 25)를 담황색의 유상물로 얻었다. 얻은 양은 230mg(31%)이었다.

이 화합물 25에 대하여 1 H-NMR 스펙트럼(600MHz, $CDCl_3$) 측정을 행한 결과, δ 8.72(bs, 3H, $-NHCO-$), 7.56(bs, 3H, aromatic), 7.22-7.10(m, 6H, aromatic), 6.91(bs, 3H, $-NHCO-$), 3.85(s, 2H, $-OCH_2CONH-$), 3.67-3.57(m, 9H, ethylene glycol chain, $CH_2CH(CH_2-)(S-)$), 3.55-3.47(m, 6H, ethylene glycol chain, $CONHCH_2CH_2O-$), 3.38(q, 2H, $J=5.2$ Hz, $-CONHCH_2CH_2O-$), 3.14(ddd, 1H, $J=6.9, 6.9, 12.4$ Hz, $-SCH_2(1H)-$), 3.08(ddd, 1H, $J=6.9, 6.9, 12.4$ Hz, $-SCH_2(1H)-$), 2.43-2.35(m, 7H, $-CH_2CH_2CO-\times 3$, $-SCH_2CH_2(1H)-$), 2.08(t, 2H, $J=6.9$ Hz, $-NHCOCH_2CH_2-$), 2.17-2.12(m, 6H, $-CH_2CH_2CO-\times 3$), 1.88-1.83(m, 1H, $-SCH_2CH_2(1H)-$), 1.65-1.50(m 4H, $-COCH_2CH_2CH_2CH_2-$), 1.50(s, 27H, $-CH_3\times 9$), 1.46-1.29(m, 2H, $-COCH_2CH_2CH_2CH_2-$)였다. 이에 의해 화합물 25의 구조를 확인할 수 있었다.

(4) 리간드 복합체 TEG-Trivalent-(Mal) $_3$ (화합물 27)의 합성(도 13 및 도 14참조)

상기 화합물 25(TEG-Trivalent-(O^t Bu) $_3$)(500mg, 0.587mmol)을 디클로로메탄/물(4.4ml, 10/1)에 용해하고, 0 $^\circ$ C에서 TFA(2ml)를 가하여 동 온도에서 1.5시간 교반하였다. 반응 용액을 농축 후, 톨루엔으로 공비하였다. 얻어진 잔사(화합물 26)은 정제하지 않고, 다음의 환원 아미노화 반응에 이용하였다. 얻은 양은 252mg이었다.

이하, 도 14에 따라 설명한다. 얻어진 잔사(화합물 26)(12.1mg, 8.88 μ mol)과 말토오스(9.60mg, 26.7 μ mol)를 디메틸아세트아미드/물(1:1, 600 μ l)에 용해하고, 37 $^\circ$ C에서 7시간 방치하였다. 반응액에 초산(30 μ l)과 시아노수소화 붕소나트륨

(5.58mg, 88.8 μ mol)을 가하고 37°C에서 70시간 더 방치하였다. 반응액을 동결건조한 후, 얻어진 잔사는 분취 고속 액체 크로마토그래피(ODS 컬럼, 메탄올/물=50/50)에 의해 정제하였다. 리간드 복합체 TEG-Trivalent-(Mal)₃(화합물 27)는 백색 고체로 얻어졌다.

이 화합물 27에 대하여 ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, δ 7.02(dd, 3H, J=7.6, 8.2Hz, aromatic), 6.72(s, 3H, aromatic), 6.60(dd, 3H, J=1.4, 7.6Hz, aromatic), 6.44(dd, 3H, J=1.4, 8.2Hz, aromatic), 4.91(d, 3H, J=3.4 Hz, H-1'×3), 3.82-3.73(m, 8H, H-2×3, H-5×3, -OCH₂CONH-), 3.73-3.67(m, 9H, H-3×3, H-5'×3, H-6a'×3), 3.65(dd, 3H, J=2.1, 12.4Hz, H-6b'×3), 3.59(dd, 3H, J=4.8, 12.4Hz, H-6a×3), 3.55(dd, 3H, J=5.5, 6.2Hz, H-4×3) 3.55(dd, 3H, J=9.6, 9.6Hz, H-3'×3), 3.50-3.36(m, 12H, -OCH₂CH₂O-×3), 3.45-3.40(m, 3H, H-6b×3), 3.42-3.38(m, 1H, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.38(dd, 3H, J=3.4, 10.3Hz, H-2'×3), 3.40(t, 2H, J=5.5Hz, -CONHCH₂CH₂O-), 3.25(dd, 3H, J=9.6, 9.6Hz, H-4'×3), 3.15-3.10(m, 5H, -CONHCH₂CH₂O-, H-1a×3), 3.02(dd, J=8.2, 13.7Hz, H-1b×3), 3.01-2.97(m, 1H, -SCH₂(1H)-), 2.96-2.91(m, 1H, -SCH₂(1H)-), 2.29-2.25(m, 6H, CH₂CH₂CO-×3), 2.26-2.19(m, 1H, -SCH₂CH₂(1H)-), 2.05-1.98(m, 6H, -CH₂CH₂CO-×3), 1.99(t, 2H, J=6.9Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.74-1.69(m, 1H, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.50-1.30(m 4H, COCH₂CH₂CH₂CH₂), 1.16-1.10(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)이었다. ESI-MS 측정을 행한 결과, m/z 981.41 [(M+ 2Na)²⁺]이었다. 이것들에 의해 화합물 27의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 27의 분자 질량은 C₈₂H₁₃₂N₈O₃₉S₂:1916.80이다.

[실시예 5: 링커 화합물(화합물 32) 및 리간드 복합체(화합물 34)의 합성]

본 발명에 따른 링커 화합물의 하나, 즉, 상기 일반식(1)에서, a가 4, b가 0, d가 0, e가 0이고, X가 상기 일반식 (4)로 나타내어지고, q¹, q², q³가 2이며, r¹, r², r³가 1이고, t¹, t², t³가 4이며, u¹, u², u³가 1인 구조를 가지는 링커 화합물(화합물 32), 및 상기 일반식 (7)로 나타내어지고, a가 4, b가 0, d가 0, e가 0이며, q¹, q², q³가 2이고, r¹, r², r³가 1이며, t¹, t², t³가 4이고, u¹, u², u³가 1이며, R'가 수소(H)이고, R이 일반식 (6-2)의 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 34)는 하기의 순서로 합성하였다. 도 15에는, 이 링커 화합물(화합물 32)을 합성하는 과정을 나타낸다. 도 16에는 상기 링커 화합물(화합물 32)을 합성하는 과정에서 이용되는 화합물 30의 합성 과정을 나타낸다. 또한, 도 17에는 이 링커 화합물(화합물 32)로부터 리간드 복합체(화합물 34)를 합성하는 과정을 나타낸다. 한편, 본 실시예 5의 설명에 있어서, 각 화합물에 부기하고 있는 번호는 도 15, 도 16 및 도 17에 기재된 번호에 해당한다.

[측정 방법, 시약 등]

¹H-NMR 스펙트럼의 측정에는, JOEL-Delta600 Spectrometer를 이용하였다. 화학 시프트는, CDCl₃의 경우에는 테트라메틸실란(0.00ppm)을 기준 물질로 하여 δ 값으로 나타내었다. D₂O의 경우에는 DHO(4.65ppm)를 기준 물질로 하여 δ 값으로 나타내었다. 질량 분석은 PerSeptive Biosystem MarinerTM Biospectrometry Workstation을 이용하여 측정하였다. 중압 실리카겔 컬럼 크로마토그래피는, Silicagel 60(Merck, 0.040 ~ 0.063mm)을 이용하여 행하였다. 박층 크로마토그래피는 Precoated Silicagel 60 F254(Merck, 0.5mm)를 사용하였다. 모든 시약, 탈수 용매는 칸토 화학 주식회사 제품을 구입하여 사용하였다.

(1) Trivalent 1(O^tBu)₃(화합물 28)의 합성(도 15 참조)

O₂N-Trivalent-(O^tBu)₃(화합물 18)(757mg, 1.70mmol)과 NiCl₂·6H₂O(80.8mg, 0.340mmol)을 메탄올(20ml)에 용해하고, 0°C에서 수소화붕소나트륨(322mg, 8.50mmol)을 5회로 나누어 당량분씩 가하고, 그 후 반응액을 실온에서 30분간 교반하였다. 메탄올을 농축하여 제거하고, 반응 용액에 물과 클로로포름을 가하였다. 셀라이트 여과 후, 수상을 클로로포름으로 3회 추출하였다. 유기상을 무수황산나트륨을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축하였다. 얻어진 농축 잔사(화합물 19)와 치옥트산(351mg, 1.70mmol)을 무수디메틸포름아미드(10ml)에 용해하고, 아르곤 분위기하, 실온에서 DIEA(592 μ l, 3.40mmol), HOAt(463mg, 3.40mmol), EDC·HCl(652mg, 3.40mmol)을 순서대로 가하여 16시간 교반하였다. 반응 용액에 물을 가한 후, 수상을 초산에틸로 3회 추출하였다. 유기상을 포화 식염수 및 포화 탄산수소나트

를 수용액으로 세정하고, 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압 농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(50g, 헥산:초산에틸=3:1)로 정제하여, Trivalent-(O^tBu)₃(화합물 28)를 담황색의 유상물로 얻었다. 얻은 양은 750mg(73%)이었다.

이 화합물 28에 대하여 ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, 65.91(s, 1H, -CONH-), 3.57(ddd, 1H, J=6.2, 6.2, 12.4Hz, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.18(ddd, 1H, J=5.5, 5.5, 12.4Hz, -SCH₂(IH)-), 3.11(ddd, 1H, J=6.9, 7.6, 12.4Hz, -SCH₂(IH)-), 2.46(ddd, 1H, J=6.2, 6.2, 12.4Hz, -SCH₂CH₂(IH)-), 2.22(t, 8H, J=7.6Hz, -CH₂CH₂CO-×3), 2.11(dd, 2H, J=6.9, 7.6Hz, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.97(t, 6H, J=7.6Hz, -CH₂CH₂CO-×3), 1.91(ddd, 1H, J=6.9, 6.9, 12.4Hz -SCH₂CH₂(IH)-), 1.74-1.57(m 4H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.51-1.38(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.43(s, 27H, -CH₃×9)이었다. 또한, ¹³C-NMR(150MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, δ172.9, 172.1, 80.7, 57.3, 56.3, 40.2, 38.5, 37.2, 34.6, 30.0, 29.8, 28.9, 28.1, 25.3이었다. 이것들에 의해 화합물 28의 구조를 확인할 수 있었다.

(2) N₃-TEG-NHBoc(화합물 33)의 합성(도 16 참조)

N₃-TEG-CO₂Et(화합물 5)(500mg, 1.64mmol)를 1,4-디옥산(6ml)에 용해하고, 0℃에서 수산화나트륨 수용액(1ml, 150mg/ml)을 반응액에 가하고, 동 온도에서 3시간 교반하였다. 1,4-디옥산을 농축제거한 후, 5% 황산수소칼륨 수용액과 클로로포름을 가하였다. 수상을 클로로포름으로 3회 추출하고, 유기상을 무수황산나트륨을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 얻어진 잔사(화합물 6)는 정제하지 않고 이후의 커플링 반응에 이용되었다. 얻은 양은 435mg(96%)이었다. 얻어진 농축잔사와 N-Boc-페닐렌디아민(화합물 24)(327mg, 1.57mmol)을 무수디메틸포름아미드에 용해하고, 아르곤 분위기하, 실온에서 DIEA(410μl, 2.35mmol), HOAt(320mg, 2.35mmol), EDC·HCl(451mg, 2.35mmol)을 순서대로 가하고, 14시간 교반하였다. 반응 용액에 물을 가한 후, 수상을 초산에틸로 3회 추출하였다. 유기상을 포화 식염수 및 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 세정하고, 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압 농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(50g, 톨루엔:초산에틸=1:1)로 정제하고, N₃-TEG-NHBoc(화합물 33)를 담황색의 유상물로 얻었다. 얻은 양은 597mg(81%)였다.

이 화합물 33에 대하여 ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, 68.81(bs, 1H, -NHCO-), 7.61(s, 1H, aromatic), 7.35(d, 1H, J=6.9Hz, aromatic), 7.26-7.20(m, 2H, aromatic), 6.71(bs, 1H, -NHCO-), 4.10(s, 2H, -OCH₂CONH-), 3.78-3.70(m, 8H, ethyleneglycol chain), 3.67-3.62(m, 6H, ethylene glycol chain, -CONHCH₂CH₂O-), 3.35(t, 2H, J=5.5Hz, -CONHCH₂CH₂O-)였다. 또한, ¹³C-NMR(150MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, 668.3, 152.6, 139.0, 138.0, 129.5, 114.5, 114.3, 109.8, 80.5, 71.2, 70.6, 70.6, 70.6, 70.5, 70.4, 70.2, 70.0, 50.6, 28.3였다. 이것들에 의해 화합물 33의 구조를 확인할 수 있었다.

(3) H₂N-TEG-NHBoc(화합물 30)의 합성(도 16 참조)

상기 화합물 33(N₃-TEG-NHBoc)(200mg, 0.425mmol)를 메탄올(4ml)에 용해하고, 10% Pd/C (200mg)를 가하고, 수소 분위기하, 실온에서 1.5시간 교반하였다. 상기 Pd/C를 여거한 후, 감압농축하였다. 얻어진 잔사(화합물 30)는 정제하지 않고 이후의 반응에 이용하였다. 얻은 양은 174mg(93%)이었다.

(4) Trivalent-(TEG-NHBoc)₃(화합물 31)의 합성(도 15 참조)

상기 화합물 28(Trivalent-(O^tBu)₃)(64.2mg, 0.106mmol)을 디클로로메탄/물(2.2ml, 10/1)에 용해하고, 0℃에서 TFA(2ml)를 가하고, 동 온도에서 1시간 교반하였다. 반응액을 농축 후, 톨루엔으로 공비하였다. 얻어진 농축 잔사(화합물 29)와 H₂N-TEG-NHBoc(화합물 30)(174mg, 0.425mmol)를 무수디메틸포름아미드(3ml)에 용해하고, 아르곤 분위기하, 실온에서 DIEA(92.6μl, 0.532mmol), HOAt(72.3mg, 0.532mmol), EDC·HCl(102mg, 0.532mmol)을 순서대로 가하여 14시간 교반하였다. 반응 용액에 물을 가한 후, 수상을 초산에틸로 3회 추출했다. 유기상을 포화 식염수로 세정하고, 무수황산

마그네슘을 이용해 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(50g, 클로로포름:메탄올=30:1)로 정제하고, Trivalent-(TEG-NHBoc)₃(화합물 31)을 담황색의 유상물로 얻었다. 얻은 양은 64.7mg(36%)이었다.

이 화합물 31에 대하여 ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, δ8.88(bs, 3H, -NHCO-×3), 7.67(bs, 3H, aromatic), 7.42(bs, 3H, -NHCO-×3), 7.31(d, 3H, J=7.7Hz, aromatic), 7.27(d, 3H, J=8.2Hz, aromatic), 7.22(dd, 3H, J=7.7, 8.2Hz, aromatic), 6.63(bt, 3H, J=4.8Hz, -NHCO-×3), 4.11(s, 6H, -OCH₂CONH-×3), 3.78-3.58(m, 36H, ethylene glycol chain), 3.57-3.49(m, 1H, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.50(t, 6H, J=5.5Hz, -CONHCH₂CH₂O-×3), 3.36(q, 6H, J=5.2Hz, -CONHCH₂CH₂O-×3), 3.15(ddd, ¹H, J=5.5, 6.9, 11.0Hz, -SCH₂(1H)-), 3.09(ddd, 1H, J=6.9, 6.9, 11.0Hz, -SCH₂(1H)-), 2.42(ddd, 1H, J=6.9, 6.9, 12.4Hz, -SCH₂CH₂(1H)-), 2.12-2.06(m, 8H, -CH₂CH₂CO-×3, -NHCOCH₂CH₂CH₂-), 1.95-1.88(m, 6H, -CH₂CH₂CO-×3), 1.87(ddd, 1H, J=6.9, 6.9, 12.4Hz, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.70-1.50(m 4H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.50(s, 27H, CH₃×9), 1.48-1.33(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)이었다. 또한, ¹³C-NMR(150MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, δ173.3, 172.8, 168.4, 152.8, 139.3, 137.8, 129.3, 114.5, 114.4, 110.1, 80.2, 71.1, 70.5, 70.4, 70.4, 70.3, 70.1, 70.1, 69.7, 57.3, 56.4, 40.1, 39.2, 38.3, 37.0, 34.5, 31.1, 30.5, 28.8, 28.3, 25.4였다. 또한, ESI-MS 측정을 행한 결과, m/z 875.41 [(M+2Na)²⁺]이었다. 이것들에 의해 화합물 31을 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 31의 분자 질량은 C₈₁H₁₂₈N₁₀O₂₈S₂:1704.85이다.

(5) 리간드 복합체 Trivalent-(TEG-Mal)₃(화합물 34)의 합성(도 16 및 도 17 참조)

상기 화합물 31(Trivalent-(TEG-NHBoc)₃)(64.7mg, 37.9μmol)을 디클로로메탄/물(2.2ml, 10/l)로 용해하고, 0℃에서 TFA(2ml를 가하고 동 온도에서 2.5시간 교반하였다. 반응액을 농축 후, 톨루엔으로 공비하였다. 얻어진 잔사(화합물 32)는 정제하지 않고 이후의 환원 아미노화 반응에 이용하였다. 얻은 양은 70mg이었다.

이하, 도 17에 따라 설명한다. 얻어진 농축 잔사(화합물 32)(6.95mg, 3.77μmol 함유)와 말토오스(4.07mg, 11.3μmol)를 디메틸아세트아미드/물(1:1, 400μl)에 용해하고, 37℃에서 13시간 방치하였다. 그 후, 초산(20μl)과 시아노수소화붕소나트륨(2.24 mg, 35.6μmol)을 반응액에 가하고, 37℃에서 59시간 방치하였다. 반응액을 동결건조한 후, 얻어진 잔사를 분취 고속 액체 크로마토그래피(ODS컬럼, 메탄올/물=50/50)에 의해 정제하고, Trivalent-(TEG-Mal)₃(화합물 34)를 백색 고체로 얻었다. 얻은 양은 4.46mg(50%)이었다.

화합물 34에 대하여 ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, δ7.05(dd, 3H, J=7.6, 8.2Hz, aromatic), 6.77(s, 3H, aromatic), 6.63(dd, 3H, J=1.4, 7.6Hz, aromatic), 6.47(dd, 3H, J=1.4, 8.2Hz, aromatic), 4.92(d, 3H, J=3.4Hz, H-1'×3), 4.01(s, 6H, -OCH₂CONH-×3), 3.81(ddd, 3H, J=2.1, 4.8, 7.6Hz, H-2×3), 3.71(ddd, 3H, J=4.1, 7.6Hz, H-5×3), 3.74-3.68(m, 9H, H-3×3, H-5'×3, H-6a'×3), 3.65(dd, 3H, J=2.1, 12.4Hz, H-6b'×3), 3.64-3.60(m, 3H, H-6a×3), 3.64-3.42(m, 36H, -OCH₂CH₂O-×9), 3.56-3.52(m, 6H, H-4×3, H-3'×3), 3.47-3.43(m, 3H, H-6b×3), 3.42-3.39(m, 1H, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.38(dd, 3H, J=3.4, 9.6Hz, H-2'×3), 3.37(t, 6H, J=4.8Hz, CONHCH₂CH₂O-×3), 3.26(dd, 3H, J=9.6, 9.6Hz, H-4'×3), 3.15(dd, 3H, J=4.8, 13.7Hz, H-1a×3), 3.14(t, 6H, -CONHCH₂CH₂O-×3), 3.06(dd, J=7.6, 13.7Hz, H-1b×3), 3.01(ddd, 1H, J=6.2, 6.2, 11.0Hz, -SCH₂(1H)-), 2.95(ddd, 1H, J=6.9, 6.9, 11.0Hz, -SCH₂(1H)-), 2.24(ddd, 1H, J=6.2, 6.2, 12.4Hz, SCH₂CH₂(1H)-), 2.00(t, 2H, J=6.9Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.96-1.92(m, 6H, CH₂CH₂CO-×3), 1.77-1.69(m, 7H, -CH₂CH₂CO-×3, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.52-1.32(m 4H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.20-1.14(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)였다. 또한, ESI-MS 측정을 행한 결과, m/z 1214.57 [(M+2Na)²⁺]이었다. 이것들에 의해 화합물 34의 구조를 확인할 수 있다. 한편, 이 화합물 34의 분자 질량은 C₁₀₂H₁₇₀N₁₀O₄₉S₂:2283.06이다.

한편, 발명을 실시하기 위한 최선의 형태의 항에서 이룬 구체적인 실시형태 또는 실시예는 어디까지나 본 발명의 기술 내용을 명확하게 하는 것으로서, 그러한 구체적인 예에만 한정하여 협의로 해석되어야 하는 것은 아니며, 본 발명의 정신과 하기에 기재하는 청구 범위 내에서 다양하게 변경하여 실시할 수 있는 것이다.

산업상 이용 가능성

본 발명의 링커 화합물은, 상술한 바와 같이, 3단위 이상의 당분자를 도입가능한 부위로서 방향족 아미노기 말단을 가지고 있다. 또한, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 센서 칩이나 친화성 크로마토그래피의 담체 등의 단백질 분석용 지지체에 결합가능한 부위로서 S-S 결합을 가지고 있다. 또한, 비특이적인 소수성 상호작용을 극력 억제할 수가 있고, 또한 금속 결합에 제공되는 디설파이드기까지의 길이를 용이하게 조정할 수 있도록 디설파이드기와 방향족 아미노기 사이에 올리고에틸렌옥사이드를 가지고 있다.

그러므로, 상기 링커 화합물을 이용함으로써 상기 지지체 표면에 3단위 이상의 당분자를 높은 재현성으로 2차원적으로 배열시킬 수 있는 효과를 발휘한다. 또한, 상기 링커 화합물은 단백질과의 비특이적인 상호작용의 영향은 거의 무시할 수 있기 때문에 당분자와 단백질의 상호작용을 관측할 때에 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해진다. 또한, 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있다.

또한, 본 발명의 리간드 복합체는, 상기 링커 화합물에 당분자를 도입하여 이루어지는 것이다.

그러므로, 상기 리간드 복합체를 단백질 분석용 지지체 표면에 도입함으로써 2차원적으로 복수의 당분자를 높은 재현성으로 배열할 수 있으므로 당분자의 생물 활성을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해지는 효과를 발휘한다. 또한, 효율적으로 금속-유황 결합을 형성할 수 있는 효과를 발휘한다.

본 발명에 따르면, 센서 칩 표면상의 당쇄간 거리를 제어하고 올리고당을 높은 재현성으로 2차원적으로 배열할 수 있는 링커 화합물, 및, 이 링커 화합물에 당분자가 도입되어 이루어지는 리간드 복합체를 얻을 수 있다. 이 링커 화합물 및 리간드 복합체는 올리고당쇄 칩의 실용화와 일반화에 매우 유용하다.

올리고당쇄를 고정화한 칩이 당쇄나 단백질의 기능 해석 도구로 발전하면, 올리고당쇄가 관여하는 생명 현상의 해명에 공헌할 뿐만 아니라, 의약품 개발에 있어서의 중요한 기술이 될 것으로 기대된다. 그러므로, 본 발명의 유용성은 높다고 생각된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 링커 화합물(화합물 15)의 합성 경로의 일예를 나타내는 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 리간드 복합체(화합물 17)의 합성 경로의 일예를 나타내는 모식도이다.

도 3은 헤파린 공존하에서 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩에 대한 bFGF의 결합 거동을 나타내는 그래프이다.

도 4는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 각각 고정화한 칩에 대한 bFGF의 결합상호작용에 대한 헤파린의 저해율을 나타내는 그래프이다.

도 5의 (a)는 용액 중의 혼합비를 바꾼 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 전반사 적외 흡수 스펙트럼을 나타내는 그래프이다.

도 5의 (b)는 용액 중의 혼합비를 바꾼 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 전반사 적외 흡수 스펙트럼을 나타내는 그래프이다.

도 6의 (a)는 용액 중의 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 혼합비에 대한 칩 상의 황산기의 상대 강도를 나타내는 그래프이다.

도 6의 (b)는 용액 중의 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc의 혼합비에 대한 칩 상의 황산기의 상대 강도를 나타내는 그래프이다.

도 7의 (a)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와 Mono-Glc의 혼합비가 100/0인 경우의 h-vWF의 결합상호작용을 SPR법에 따라 관측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7의 (b)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와 Mono-Glc의 혼합비가 100/0인 경우의 h-vWF의 결합상호작용을 SPR법에 따라 관측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7의 (c)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와 Mono-Glc의 혼합비가 100/0인 경우의 h-vWF의 결합상호작용을 SPR법에 따라 관측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8의 (a)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와 Mono-Glc의 혼합비가 20/80인 경우의 h-vWF의 결합상호작용을 SPR법에 따라 관측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8의 (b)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와 Mono-Glc의 혼합비가 20/80인 경우의 h-vWF의 결합상호작용을 SPR법에 따라 관측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8의 (c)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc와 Mono-Glc의 혼합비가 20/80인 경우의 h-vWF의 결합상호작용을 SPR법에 따라 관측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9의 (a)는 도 7의 (a) 및 도 8의 (a)에 나타내는 결과로부터 얻어진 결합량을 h-vWF의 농도별로 플로팅한 그래프이다.

도 9의 (b)는 도 7의 (b) 및 도 8의 (b)에 나타내는 결과로부터 얻어진 결합량을 h-vWF의 농도별로 플로팅한 그래프이다.

도 9의 (c)는 도 7의 (c) 및 도 8의 (c)에 나타내는 결과로부터 얻어진 결합량을 h-vWF의 농도별로 플로팅한 그래프이다.

도 10의 (a)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=100/0인 경우에, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 rhvWF-A1의 상호작용을 측정하여 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10의 (b)는 Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=50/50인 경우에, Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 rhvWF-A1의 상호작용을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11의 (a)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=100/0인 경우에, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 rhvWF-A1의 상호작용을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11의 (b)는 Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=50/50인 경우에, Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 rhvWF-A1의 상호작용을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12의 (a)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=100/0인 경우에, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 rhvWF-A1의 상호작용을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12의 (b)는 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc/Mono-Glc=50/50인 경우에, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc를 고정화한 칩과 rhvWF-A1의 상호작용을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 본 발명에 따른 링커 화합물(화합물 26)의 합성 경로의 일예를 나타내는 모식도이다.

도 14는 본 발명에 따른 리간드 복합체(화합물 27)의 합성 경로의 일예를 나타내는 모식도이다.

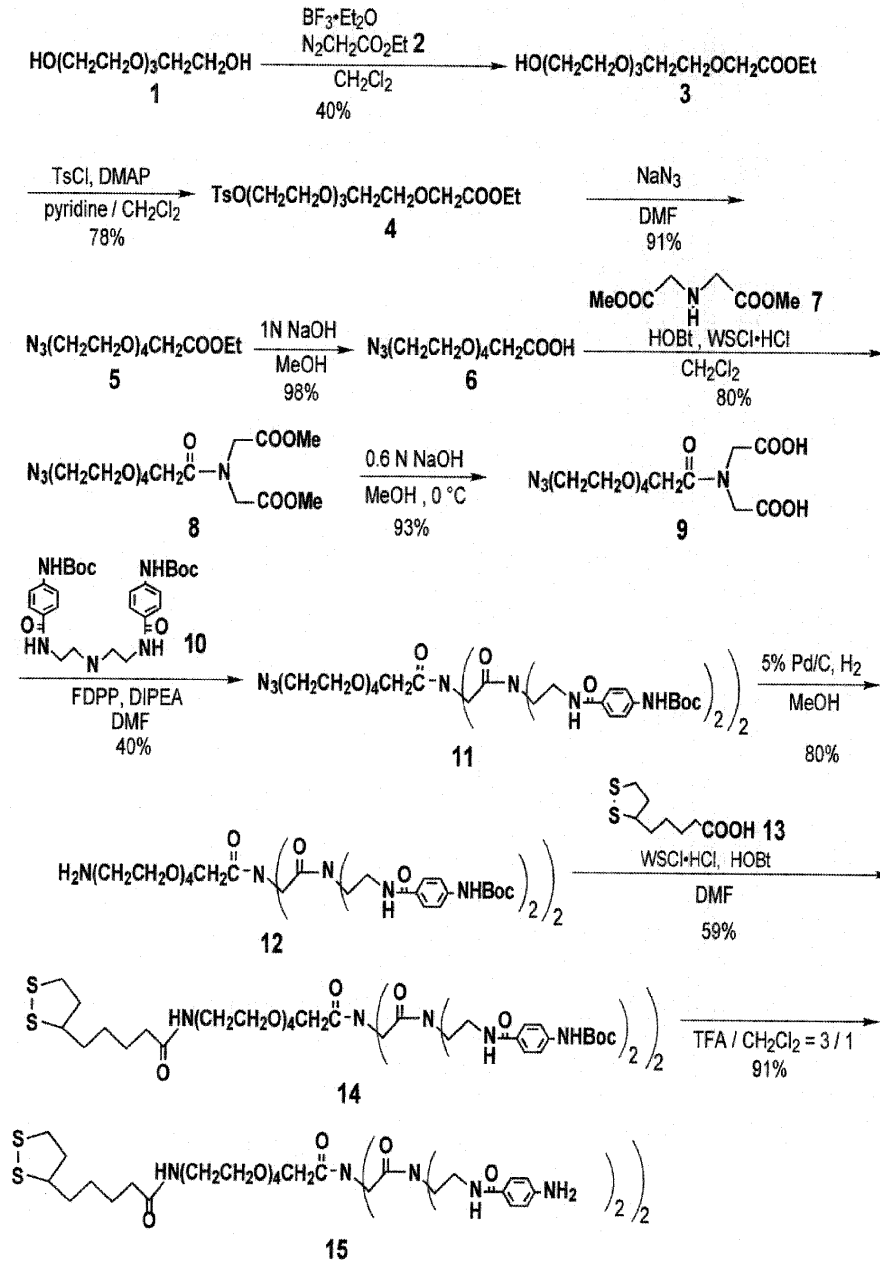
도 15는 본 발명에 따른 링커 화합물(화합물 32)의 합성 경로의 일예를 나타내는 모식도이다.

도 16은 H₂N-TEG-NHBoc(화합물 30)의 합성 경로의 일예를 나타내는 모식도이다.

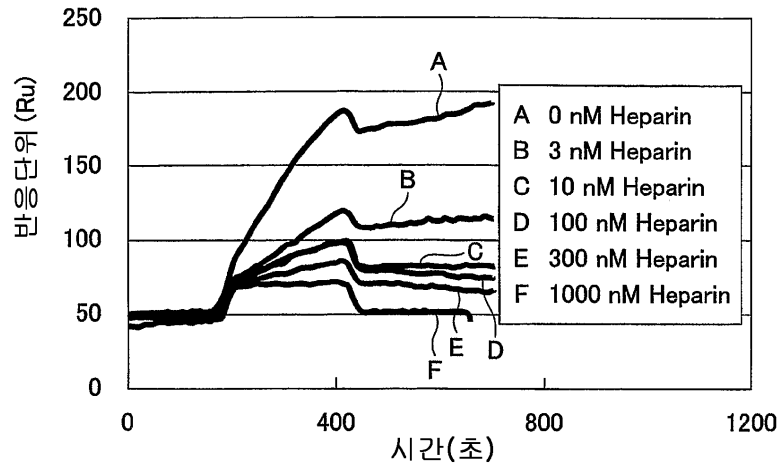
도 17은 본 발명에 따른 리간드 복합체(화합물 34)의 합성 경로의 일예를 나타내는 모식도이다.

도면

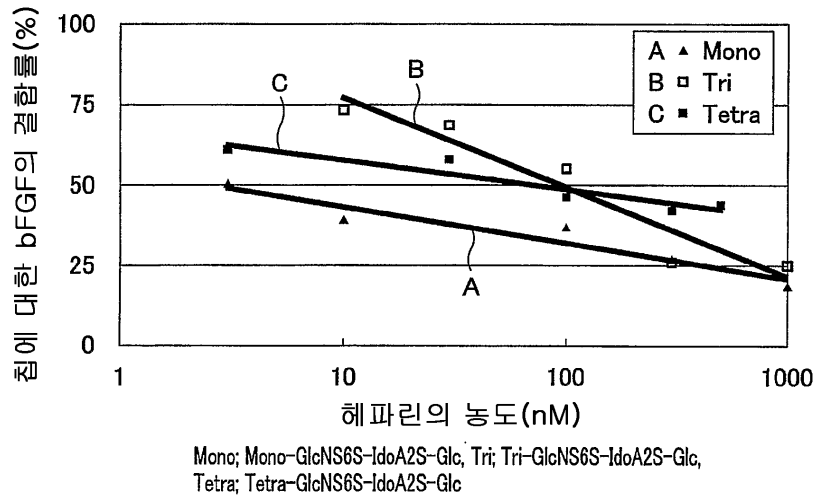
도면1



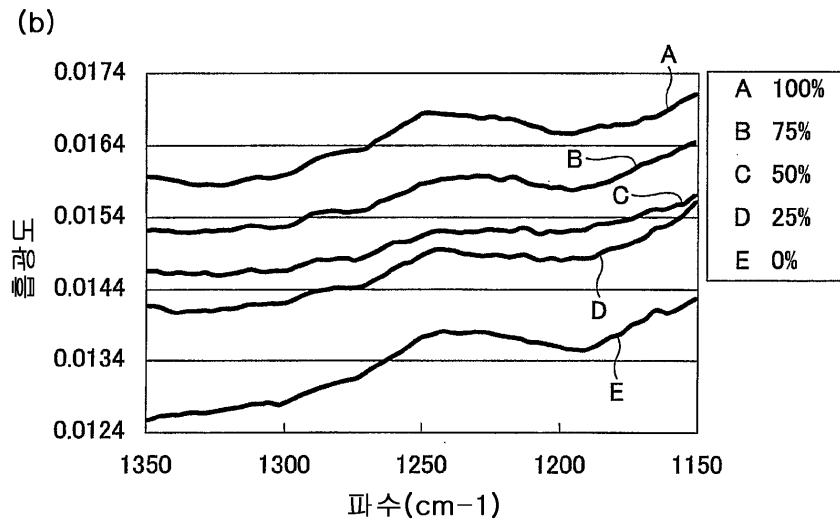
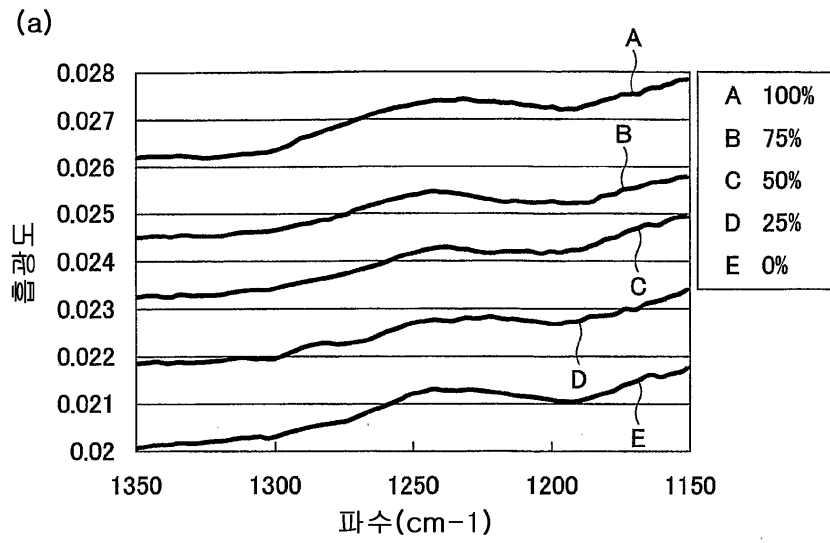
도면3



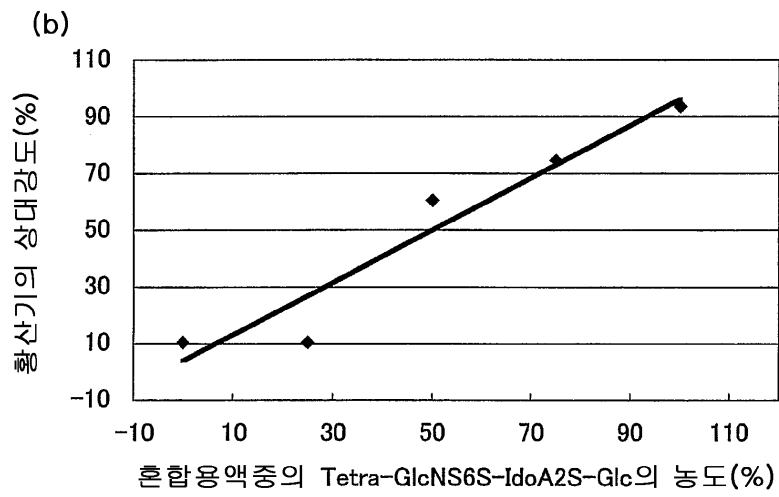
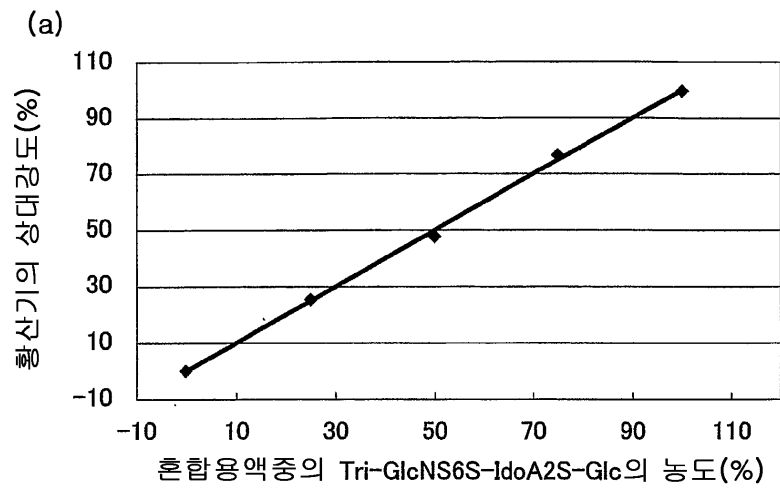
도면4



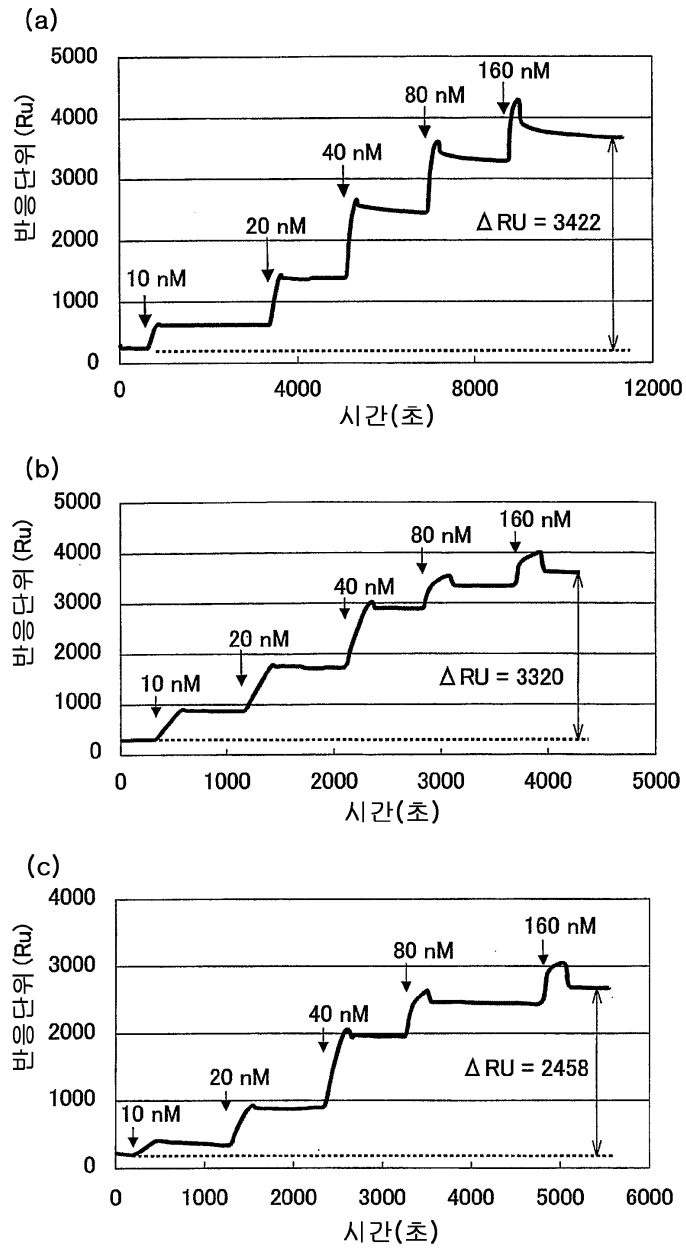
도면5



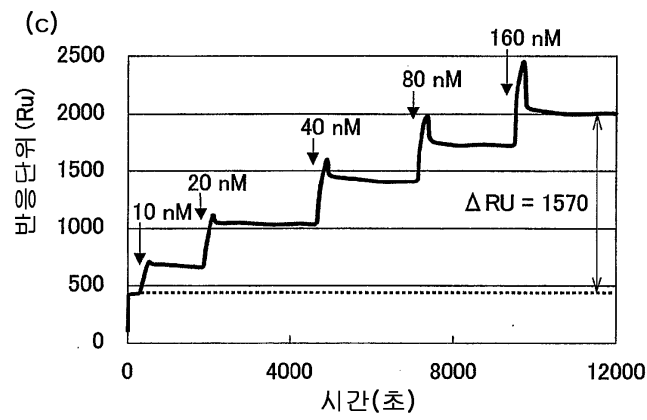
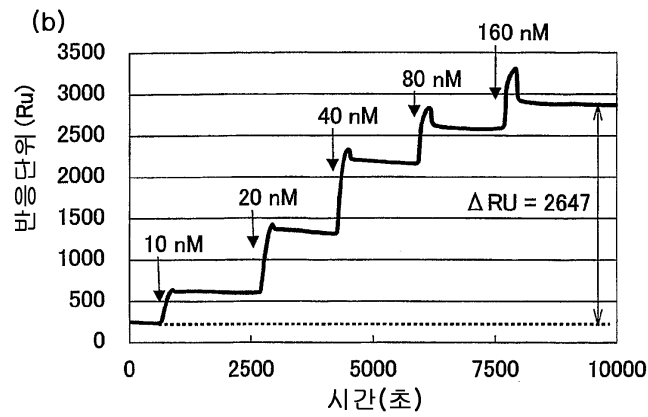
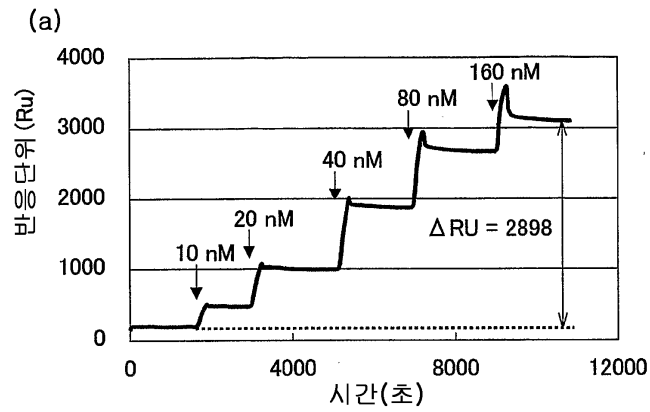
도면6



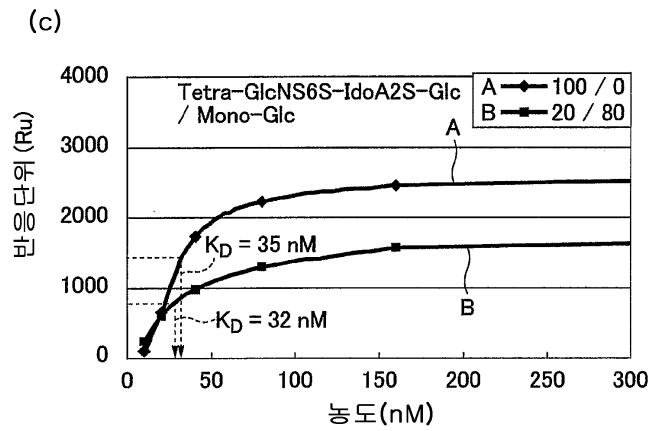
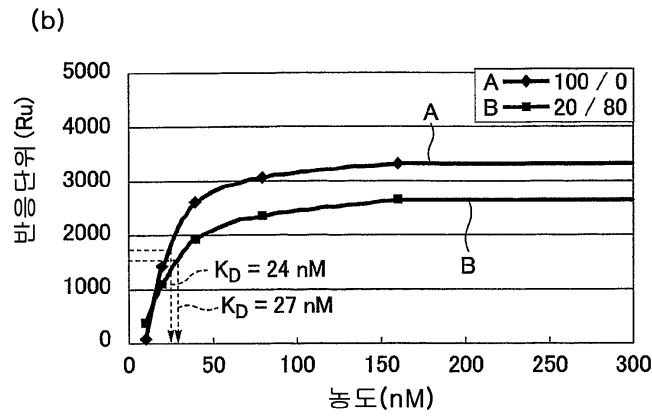
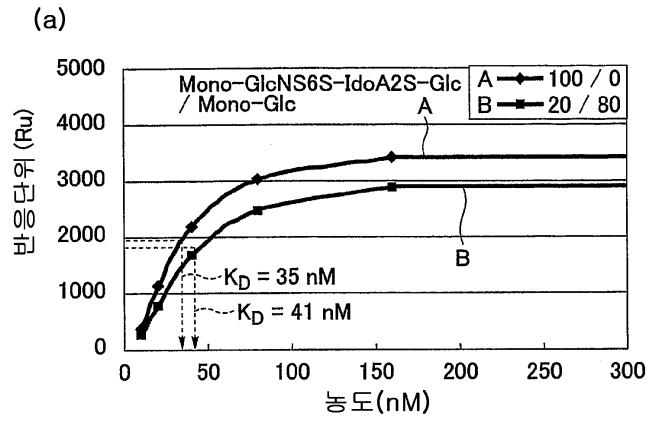
도면7



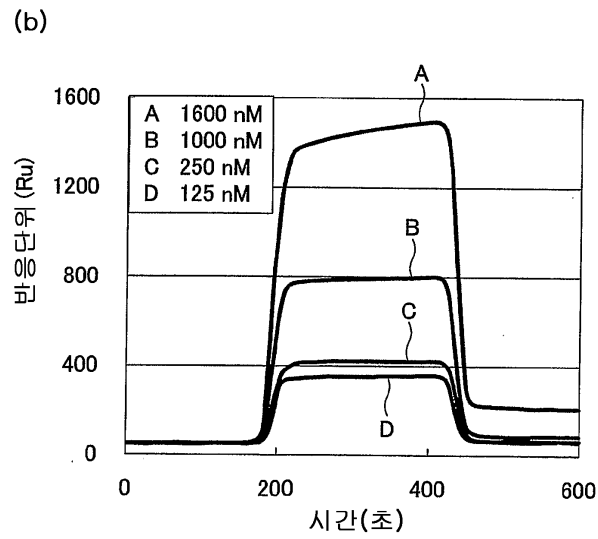
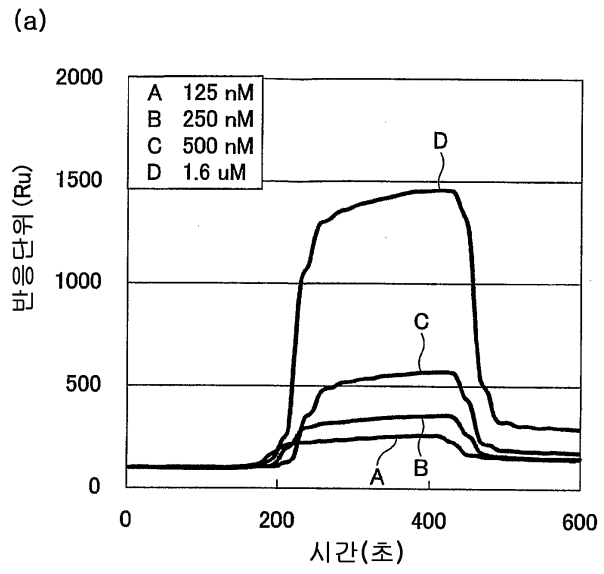
도면8



도면9

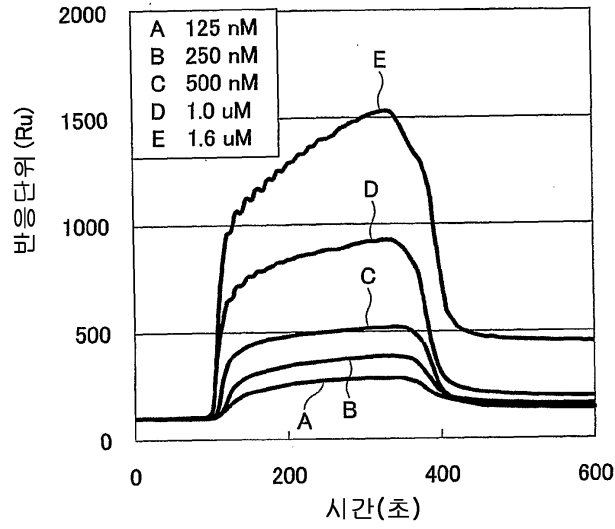


도면10

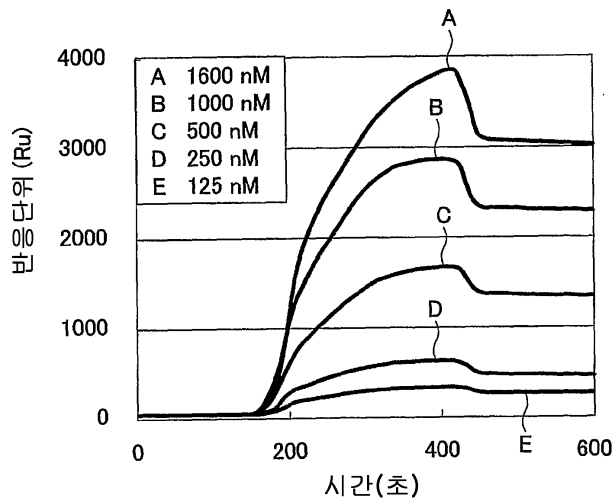


도면11

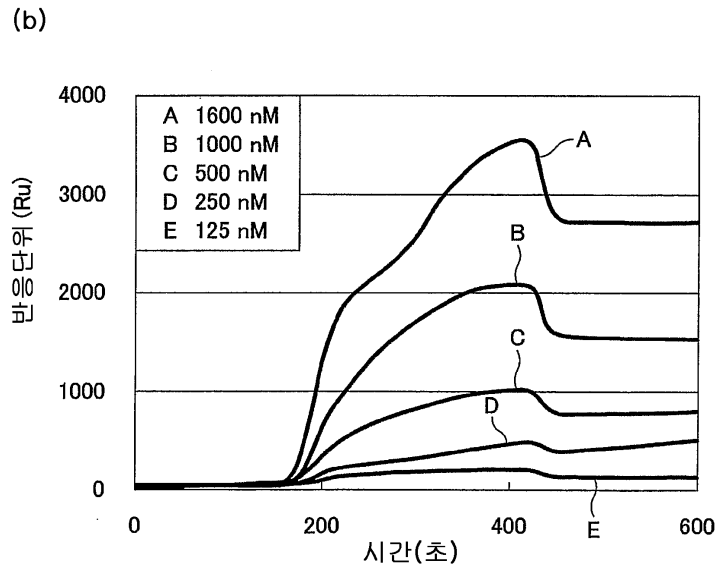
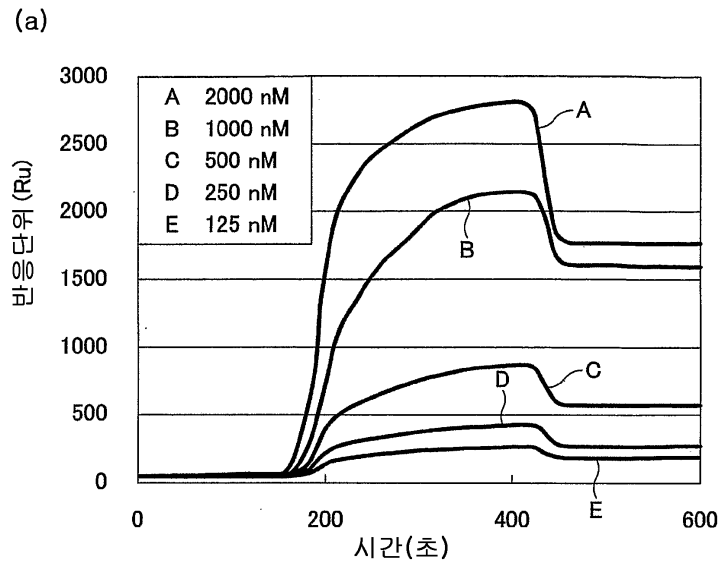
(a)



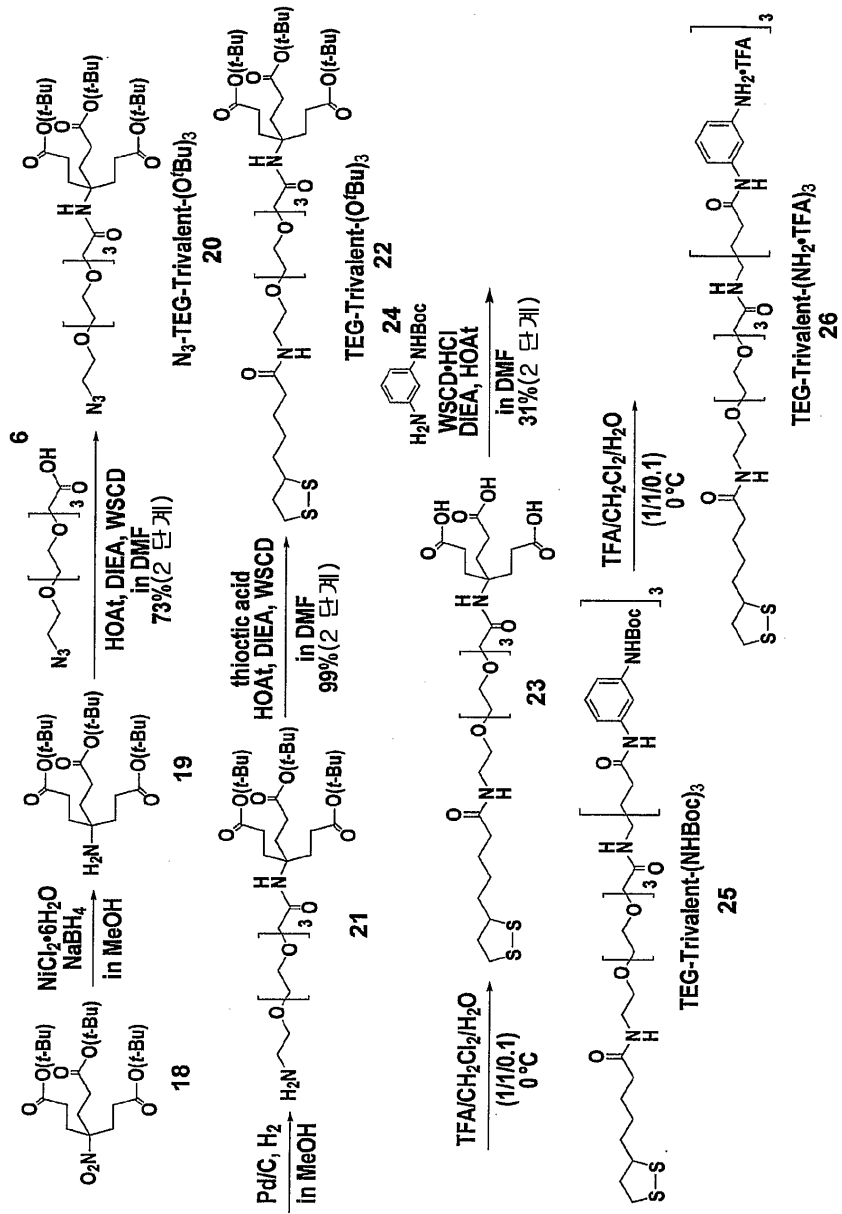
(b)



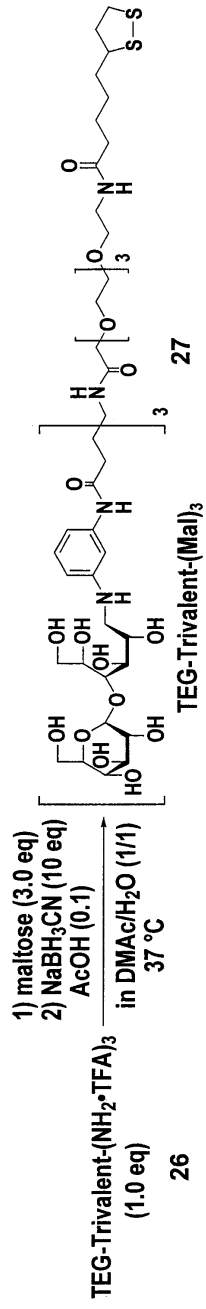
도면12



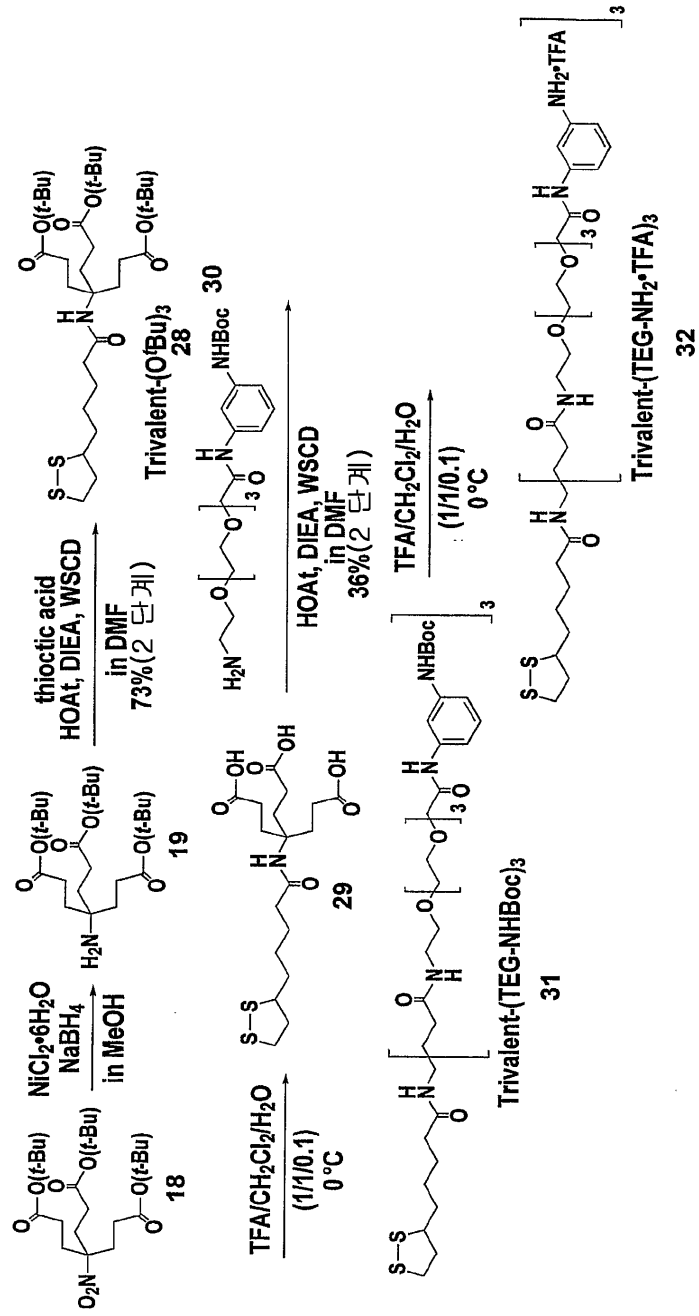
도면13



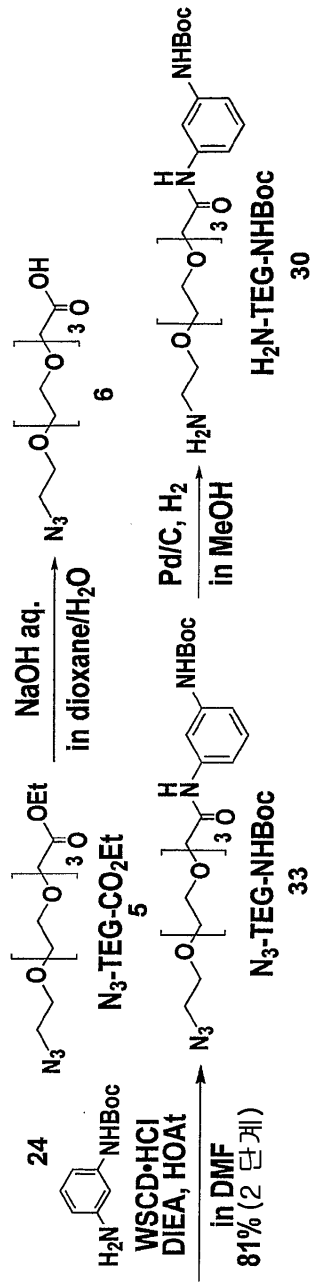
도면14



도면15



도면16



도면17

