

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07D 339/02
C07D 339/04

(11) 공개번호 10-2005-0057270
(43) 공개일자 2005년06월16일

(21) 출원번호 10-2005-7003969
(22) 출원일자 2005년03월08일
 번역문 제출일자 2005년03월08일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2003/011417
 국제출원일자 2003년09월08일

(87) 국제공개번호 WO 2004/022583
 국제공개일자 2004년03월18일

(30) 우선권주장 JP-P-2002-00263412 2002년09월09일 일본(JP)
 JP-P-2003-00190568 2003년07월02일 일본(JP)

(71) 출원인 도꾸리쓰교세이호징 가가꾸 기쥬쓰 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 슈다, 야수오
 일본, 890-0005, 카고시마, 카고시마시 시모이시킴, 1-13-1-106
 아라노, 아키오
 일본, 457-0817, 아이치, 나고야시, 미나미쿠 모토시바타니시마치, 3-
 1-3-612
 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) 링커 화합물, 리간드 및 이들의 제조방법

명세서

기술분야

본 발명은 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)에 이용되는 센서 칩 또는 이와 같은 단백질 분석용 지지체에 올리고당과 같은 당(sugar)을 고정화할 수 있는 링커 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 링커 화합물과 이에 도입된 당을 포함한 리간드, 리간드 담체 및 이러한 링커 화합물, 리간드 및 리간드 담체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

생명체 내에 존재하는 다양한 당은 살아있는 유기체의 활동과 생명을 유지하는 메커니즘에서 중요한 역할을 수행하고 있다. 당의 그러한 기능을 명확하게 규명하기 위해서 당의 기능이 당의 복잡한 구조를 기반으로 하여 분석되어야 한다. 당의 기능은 전체 당의 구조와 기능간의 관계를 명확히 하기 위하여 구조가 밝혀진 올리고당을 당의 구조를 일부분씩 재현하는데 사용하는 방법을 통하여 분석된다.

표면 플라즈몬 공명(SPR) 방법이 예를 들면 당의 기능을 분석하는 방법으로서 알려져 있다. 즉, 당 부위(moiety)를 모방한 올리고당을 포함하는 리간드를 센서 칩의 표면에 도입하는 것이다. 이와 같이 도입된 리간드를 포함하는 센서 칩은 올리고당과 특이적으로 상호작용하는 단백질과 같은 물질을 동정하는데 이용된다. 이는 올리고당의 구조를 기반으로 한 생물학적 활성의 정확한 평가를 가능하게 한다.

그러나 올리고당 단일 분자가 활성을 나타내는 것이 아니므로 올리고당의 생물학적 활성을 평가하는 경우에 올리고당은 센서 칩 상에 집합되어야 한다. 즉, 집합된 올리고당이 단백질과 같은 물질과의 상호작용을 분석하는데 이용될 수 있고 이에 의하여 상기 올리고당의 생물학적 활성을 정확하게 평가할 수 있다.

일본특허공개 836969/2003(Tokukai 2003-836969; 2003년 3월 19일에 공개됨)(문헌 1) 및 "Tentative Lecture Proceedings II in the 79th Spring Meeting, Chemical Society of Japan, March 15, 2001, p.1042"(문헌 2)에서 발명자들은 센서 칩 상에 고정화될 수 있는 부위와 올리고당을 수용할 수 있는 부위를 갖는 링커 화합물을 수득하였다. 상기 발명자들은 또한 링커 화합물과 링커 화합물에 도입된 한 개 단위(분자) 또는 두 개 단위의 올리고당을 포함하는 리간드를 수득하였다. 따라서 상기 발명자들은 상기 리간드가 센서 칩 상에 올리고당을 집합할 수 있고 이에 의하여 센서 칩 상에 올리고당을 도입할 수 있다는 것을 확인하였다.

그러나 종래의 리간드는 센서 칩의 표면에 이차원적으로 올리고당의 당쇄(chain)를 배열할 수 있음에도 불구하고 높은 재현성을 갖는 배열을 달성하는데 어려움이 있다는 기술적인 문제가 여전히 남아있다.

즉, 올리고당의 생물학적 활성을 분석하기 위하여 센서 칩의 표면에 다수의 올리고당 분자를 집합하는 경우에 올리고당의 당쇄는 올리고당과 단백질간의 상호작용을 높은 재현성으로 측정하기 위해서 균일하게 집합되어야 한다. 특히 올리고당의 생물학적 활성을 측정하기 위하여 3 단위 또는 4 단위의 올리고당이 센서 칩 상에 집합되어야 하고 그 센서 칩 상에서 높은 재현성을 갖도록 이차원적으로 배열되어야 한다. 이러한 배열은 올리고당의 생물학적 활성을 높은 재현성으로 평가할 수 있도록 한다.

그러나 종래의 리간드는 한 개 단위(분자) 당 한 개 또는 두 개 단위의 올리고당을 포함한다. 즉, 종래의 리간드의 경우 한 개의 링커 화합물은 한 개 또는 두 개의 올리고당과 결합한다. 따라서 올리고당의 생물학적 활성을 측정하기 위해서는 3 단위 이상의 올리고당이 리간드의 농도를 증가시키는 방식으로 센서 칩 표면에 리간드를 집합하고 배열함으로써 집합되어야 한다.

그러한 방법에 따라 올리고당을 집합하는 경우에 예정된 간격으로 올리고당의 당쇄의 간격을 조정하여 높은 재현성을 갖도록 올리고당의 배열을 달성하는데 어려움이 있다. 따라서 종래의 리간드를 이용하여 높은 재현성으로 올리고당의 생물학적 활성을 측정하는 것은 불가능하다. 이는 당의 구조를 규명하거나 올리고당의 생물학적 활성을 평가하는데 어려움을 유발할 수 있다.

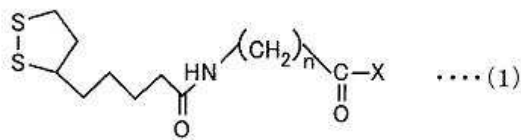
본 발명은 상기 문제를 해결하기 위한 것이다. 본 발명의 목적은 단백질 분석용 지지체 또는 그와 같은 것 상에 이차원적으로 높은 재현성을 갖도록 당을 배열할 수 있는 신규한 링커 화합물, 링커 화합물과 이에 도입된 당 분자를 포함한 신규한 리간드, 리간드 담체 및 이들의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명자들은 상기 문제를 해결하기 위하여 부단히 연구하였다. 그 결과 본 발명자들은 3 단위 또는 4 단위의 당 분자를 수용할 수 있는 부위와 상기 당 분자와 특이적으로 상호작용하는 단백질을 검출하고 분리하는데 사용되는 지지체에 고정화할 수 있는 부위를 포함하는 신규한 링커 화합물을 사용함으로써 높은 재현성을 갖도록 단백질 분석용 지지체상에 3 단위 또는 4 단위의 당 분자를 배열할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

상술한 문제를 해결하기 위한 링커 화합물은 하기 일반식(1)에 나타난 구조를 갖는데 상기 식에서 n은 1 내지 6의 정수이고 X는 3쇄 또는 4쇄의 탄화수소 유도체쇄를 포함하는 다분지(multi-branched) 구조 부위로서 작용하는 구조를 갖되, 상기 탄화수소 유도체쇄 각각은 말단에 방향족 아미노기를 포함하고 주쇄(backbone)에 탄소-질소 결합을 포함하거나 그렇지 않을 수도 있다.

[일반식 1]



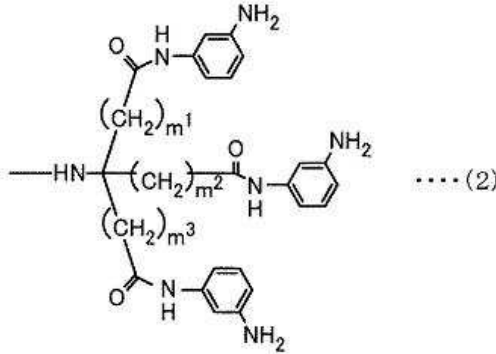
본 발명에서 "탄화수소 유도체쇄"는 탄소와 수소의 탄화수소쇄를 의미하는 것으로 탄소 원자들 및 수소 원자들의 일부는 다른 원자 또는 치환기로 치환될 수 있다. 즉, 탄화수소 유도체쇄는 말단에 방향족 아미노기를 포함하고 탄화수소쇄의 주쇄 구조를 이루는 탄소-탄소 결합(C-C 결합)의 일부는 탄소-질소 결합(C-N 결합), 탄소-산소 결합(C-O 결합) 또는 아미드 결합(CO-NH 결합)으로 치환될 수 있다.

상기 배열에 의하여 링커 화합물은 당 분자를 용이하게 수용할 수 있는 일부로서 작용하는 방향족 아미노기를 갖는다. 방향족 아미노기는 각 탄화수소 유도체쇄 내에 포함되기 때문에 3 단위 또는 4 단위의 당 분자가 링커 화합물에 도입될 수 있다. 또한, 링커 화합물은 단백질 분석용 지지체 상에 고정화될 수 있는 부위로서 작용하는 S-S 결합을 갖는다.

따라서 상기 링커 화합물에 의해 3 단위 또는 4 단위의 당 분자가 지지체 상에 집합될 수 있고 링커 화합물로 도입될 수 있다. 또한, 3 단위 또는 4 단위의 당 분자가 한 개의 링커 화합물에 도입될 수 있기 때문에 3 단위 또는 4 단위의 당 분자가 높은 재현성을 갖도록 지지체의 표면에 배열될 수 있다. 이는 지지체 상에서 당 분자와 단백질 간의 상호작용을 측정 가능하게 한다. 또한, 당 분자의 생물학적 활성을 높은 재현성으로 평가할 수 있다.

일반식(1)에 나타낸 구조를 갖는 링커 화합물에서, X는 하기 일반식(2)에 나타낸 구조를 갖되, 상기 식에서 m^1 , m^2 및 m^3 는 독립적으로 1 내지 6의 정수인 것이 바람직하다.

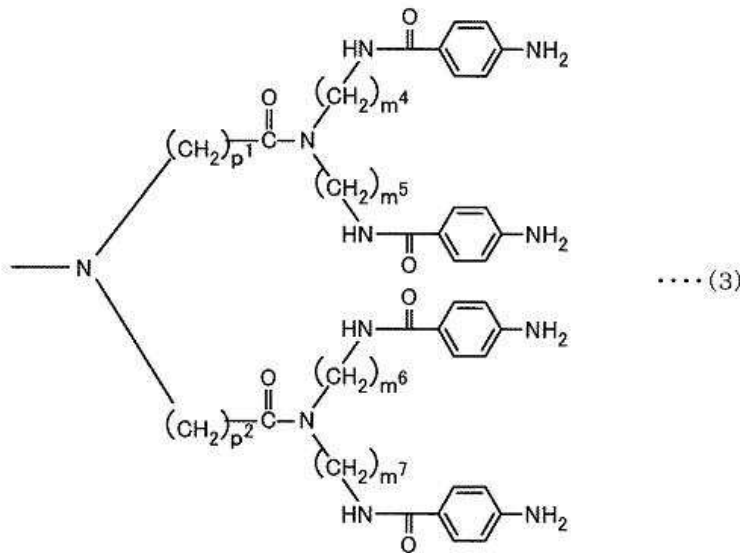
[일반식 2]



상기 링커 화합물에서 X는 3개의 탄화수소 유도체쇄를 갖기 때문에 상기 링커 화합물은 3 단위의 당 분자를 지지체 상에 도입할 수 있다. 이는 지지체의 표면에 높은 재현성을 갖도록 당 분자를 배열하도록 3 단위의 당 분자간의 간격을 조정하는 것을 가능하게 하고 이에 의하여 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 평가할 수 있다.

또한, 일반식(1)에 나타낸 구조를 갖는 링커 화합물에서 X는 하기 일반식(3)에 나타낸 구조를 갖되, 상기 식에서 m^4 , m^5 , m^6 , m^7 , p^1 및 p^2 는 독립적으로 1 내지 6의 정수인 것이 바람직하다.

[일반식 3]

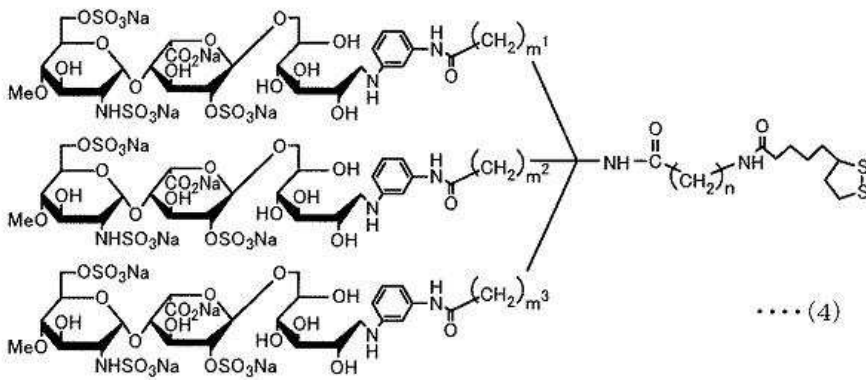


상기 링커 화합물에서 X는 4개의 탄화수소 유도체쇄를 갖기 때문에 상기 링커 화합물은 4 단위의 당 분자를 지지체 상에 도입할 수 있다. 이는 높은 재현성을 갖도록 당 분자를 배열하도록 4 단위의 당 분자간의 간격을 조정하는 것을 가능하게 하고 이에 의하여 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 평가할 수 있다.

또한, 상술한 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 리간드는 링커 화합물의 방향족 아미노기와 상기 링커 화합물의 방향족 아미노기들 중 어느 하나에 도입된 당 분자를 포함한다.

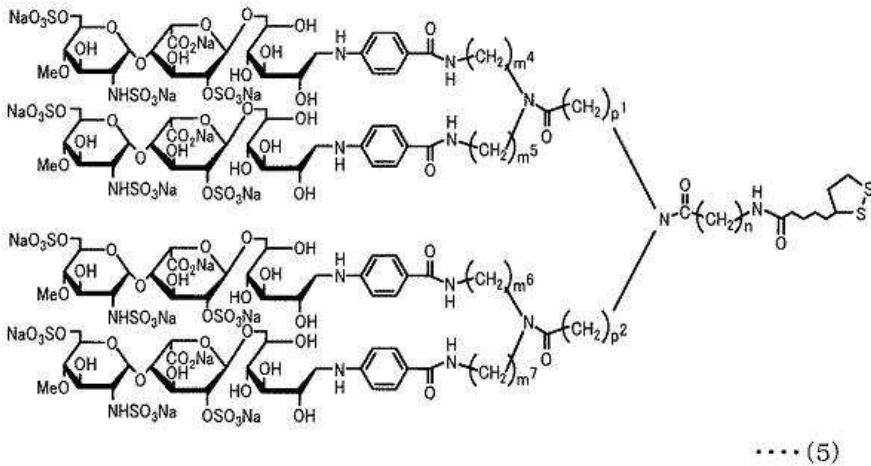
특히 리간드는 하기 일반식(4)에 나타낸 구조를 갖되, 상기 식에서 m^1 , m^2 , m^3 및 n 은 독립적으로 1 내지 6의 정수인 것이 바람직하다.

[일반식 4]



한편, 리간드는 하기 일반식(5)에 나타낸 구조를 갖되, 상기 식에서 m^4 , m^5 , m^6 , m^7 , n , p^1 및 p^2 는 독립적으로 1 내지 6의 정수인 것이 바람직하다.

[일반식 5]



상기 리간드 중 어느 하나를 이용하여 3 단위의 당 분자 (일반식(4)에 나타낸 구조를 갖는 리간드의 경우) 또는 4 단위의 당 분자 (일반식(5)에 나타낸 구조를 갖는 리간드의 경우)를 단백질 분석용 지지체의 표면에 집합하고 고정화시킬 수 있다. 이러한 방식으로 한 개의 리간드가 3개 또는 4개의 당 분자를 갖게 되므로 단일 리간드의 이용은 지지체의 표면에 다수의 리간드를 집합하지 않고도 3 단위 또는 4 단위의 당 분자를 집합할 수 있다. 이는 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 측정 가능하게 한다. 또한, 다수의 당 분자가 높은 재현성을 갖도록 지지체의 표면에 이차원적으로 배열될 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 리간드가 고정화된 단백질 분석용 지지체를 이용하여 당 분자의 생물학적 활성이 높은 재현성으로 평가될 수 있다.

또한, 상술한 문제점을 해결하기 위한 본 발명에 따른 링커 화합물의 제조방법은 티옥트산과 각각 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 갖는 3쇄 또는 4쇄로 분지된 쇠를 포함하는 아민 화합물간의 축합 반응을 수행하는 단계 및 방향족 아미노기 말단에서 보호기를 제거하는 단계를 포함한다.

상기 방법을 이용하여 단백질 분석용 지지체 상에 고정화할 수 있는 부위로서 작용하는 S-S 결합과 당 분자를 용이하게 수용될 수 있는 부위로서 작용하는 방향족 아미노기를 갖는 본 발명에 따른 링커 화합물을 수득할 수 있다.

또한, 상술한 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 리간드를 제조하는 방법은 링커 화합물과 당 분자를 사용하여 환원 아미노화 반응을 수행하는 단계를 포함한다.

상기 방법을 이용하여 본 발명에 따른 리간드는 당 분자가 링커 화합물에 용이하게 도입될 수 있는 환원 아미노화 반응에 의해 수득할 수 있다.

또한, 상술한 문제점을 해결하기 위한 본 발명에 따른 당 분자의 도입 방법은 리간드를 포함하는 용액을 금속 표면을 갖는 지지체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

상기 방법을 이용해서 리간드(리간드에 포함된 링커 화합물)의 S-S 결합을 지지체의 표면을 코팅하는 금속과의 결합으로 전환하여 지지체의 표면에 리간드를 고정화할 수 있다. 따라서 링커 화합물에 결합된 당 분자는 리간드를 포함하는 용액을 지지체와 접촉시키는 간단한 방법에 의해 지지체의 표면에 배열시킬 수 있다.

또한, 상술한 문제점을 해결하기 위한 본 발명에 따른 리간드 담체는 금속 표면을 갖는 지지체상에 고정화된 리간드를 포함한다.

상기 배열에 의해 리간드는 황-금속 결합에 의해서 지지체의 표면에 견고하게 고정화될 수 있고 이에 의하여 높은 재현성으로 지지체의 표면에 배열된 다수의 당 분자를 포함하는 리간드 담체를 제공한다. 따라서 이러한 리간드 담체를 이용하여 리간드에 포함된 당 분자와 상기 당 분자와 상호작용하는 단백질과 같은 물질간의 상호작용을 높은 재현성으로 측정할 수 있으며, 이에 의하여 당 분자의 생물학적 활성을 정량적으로 평가하는 것이 가능하다.

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

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 리간드가 고정화된 리간드 도입 칩과 rvWF간의 결합을 측정한 SPR 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 종래의 리간드가 고정화된 리간드 도입 칩과 rvWF간의 결합을 측정한 SPR 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

실시예

이하에서 본 발명은 자세히 설명될 것이다. 그러나 본 발명은 하기 실시예에 의해 제한되지 않는다.

단백질 분석용 지지체 (예, SPR 센서 칩 또는 친화 크로마토그래피 담체)와 당 (예를 들면 올리고당; 이하에서는 당 분자로 명명한다) 사이에 위치하는 본 발명의 링커 화합물은 지지체의 표면에 당 분자를 고정화시키는데 이용된다. 따라서 링커 화합물은 분자 내에 지지체상에 고정화할 수 있는 부위와 당 분자를 용이하게 수용할 수 있는 부위를 포함하여야 한다.

또한, SPR 및 친화 크로마토그래피의 목적은 당 분자와 특이적으로 상호작용하는 단백질과 같은 물질을 동정하고 분리하는 것이다. 따라서 링커 화합물은 단백질과 같은 물질과 비특이적인 상호작용을 제공해서는 안된다.

일반식(1)에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 링커 화합물은 지지체상에 고정화시킬 수 있는 부위로서 작용하는 디설파이드 결합(S-S 결합)을 갖는다. 예를 들어 디설파이드 결합의 황(S)은 단백질 분석용 지지체의 표면에 코팅된 금과 황-금 결합(S-Au 결합)을 형성하고, 이에 의하여 지지체와 견고하게 결합한다.

또한, 링커 화합물은 다수의 아미노기를 포함하는 다분지 부위를 갖는다. 상기 다분지 부위는 당 분자를 용이하게 수용할 수 있는 부위로서 작용하여 다수의 당 분자가 단백질 분석용 지지체의 표면에 이차원적으로 배열될 수 있고 각 당 분자의 당쇄간의 간격이 조정될 수 있게 한다. 즉, 본 발명에 따른 링커 화합물의 다분지 부위는 일반식(1)의 X에 나타난 구조를 갖되, 상기 식에서 X는 전술한 바와 같이 말단에 방향족 아미노기를 포함하는 3쇄 또는 4쇄의 탄화수소 유도체쇄를 갖는 구조이고 주쇄에 탄소-질소 결합 또는 아마이드 결합을 포함할 수 있다. 일반식(1)에서 n은 제한적이지 않지만 1 내지 6의 정수이다.

방향족 아미노기의 아미노기(-NH₂기)는 당 분자를 수용할 수 있는 기질을 제공하기 위하여 올리고당과 같은 당 분자와 환원 아미노화 반응을 수행한다. 즉, 링커 화합물 내에 포함된 아미노기는 당 분자내에서 평형(equilibration)에 의해 형성되는 알데히드기(-CHO기) 또는 케톤기(-CRO기, 여기서 R은 탄화수소기이다)와 반응한다. 이러한 반응에 의해 형성된 쉬프 염기(Schiff base)를 연속적으로 환원함으로써 당 분자는 방향족 아미노기에 용이하게 도입될 수 있다.

따라서 3쇄 또는 4쇄의 탄화수소 유도체쇄를 갖는 일반식(1)에서 X는 당 분자를 수용할 수 있는 방향족 아미노기를 포함하는 다분지 부위로서 작용하는 구조를 제공한다. 올리고당과 같은 당 분자가 다분지 부위에 포함된 각 방향족 아미노기에 도입될 수 있기 때문에 일반식(1)에 나타난 구조를 갖는 링커 화합물을 통하여 높은 재현성을 갖도록 단백질 분석용 지지체의 표면에 다수의 당 분자를 이차원적으로 배열하는 것이 가능해진다.

일반식(2)에 나타난 바와 같이 X는 방향족 아미노기의 반대편 말단에 위치한 탄소 원자에 결합한 3쇄의 탄화수소 유도체쇄에 의해 형성된 분지된 구조를 제공한다. -NH-가 상기 탄소 원자와 결합한다. X는 탄소 원자와 -NH-기간의 결합으로 인하여 3쇄의 탄화수소 유도체쇄를 포함하는 다분지 부위를 갖는다. 일반식(2)에서 m¹, m² 및 m³는 제한적이지 않지만, 1 내지 6의 정수이다. m¹, m² 및 m³로 나타낸 정수는 서로 상이하거나 부분적으로 또는 완전히 동일할 수 있다. 다분지 부위를 갖는 화합물을 용이하게 생산하기 위한 측면에서 m¹ 내지 m³은 서로 동일하게 특히 정수 2인 것이 바람직하다.

일반식(3)에 나타난 바와 같이 X는 방향족 아미노기의 반대편 말단에 위치한 한 개의 질소 원자(N)에 결합한 각각 2쇄의 탄화수소 유도체쇄에 의해 형성된 두 개의 이분지(double branched) 구조를 가질 수 있다. 이러한 경우에 두 개의 이분지 구조의 질소 원자는 -CO-CH₂-기를 통하여 단일 질소 원자에 결합하여 분지 구조를 형성한다. 이러한 경우에 X는 4쇄의 탄화수소 유도체쇄를 포함하는 다분지 부위로서 작용하는 구조를 제공한다. 일반식(3)에서 m⁴, m⁵, m⁶ 및 m⁷는 제한적이

지 않으나 1 내지 6의 정수이다. m^4 , m^5 , m^6 및 m^7 로 나타낸 정수는 서로 상이하거나 부분적으로 또는 완전히 동일할 수 있다. 다분지 부위를 갖는 화합물을 용이하게 생산하기 위한 측면에서 m^4 내지 m^7 은 서로 동일하게 특히 정수 2인 것이 바람직하다. 또한, p^1 및 p^2 는 제한적이지 않으나 1 내지 6의 정수이다. p^1 및 p^2 로 나타낸 정수는 서로 상이하거나 동일할 수 있다. 용이하게 생산하기 위한 측면에서 p^1 및 p^2 는 서로 동일하게 특히 정수 1인 것이 바람직하다.

따라서 X는 탄소 원자 또는 질소 원자와 같은 원자와 다수의 탄화수소 유도체쇄의 결합에 의해 형성된 분지된 구조를 갖는 다분지 부위로서 작용하는 구조를 제공한다. X에 포함된 다수의 탄화수소 유도체쇄는 동일한 구조인 것이 바람직하지만 이들은 말단에 방향족 아미노기를 포함하는 한 상이한 구조를 가질 수도 있다.

전술한 바와 같이 일반식(1)에 나타낸 구조를 갖는 링커 화합물은 단백질 분석용 지지체와 결합을 형성할 수 있는 S-S 결합과 올리고당쇄와 같은 당 분자와 결합을 형성할 수 있는 아미노기를 갖는다. 따라서 링커 화합물은 예를 들면 S-Au 결합에 의해 단백질 분석용 지지체에 고정화될 수 있기 때문에 링커 화합물은 당 분자가 견고하고 용이하게 지지체의 표면에 결합될 수 있도록 한다.

또한, 링커 화합물은 다분지 부위의 각각의 말단에 고정화된 방향족 아미노기를 갖는 다분지 부위를 갖고 있기 때문에 링커 화합물에 당 분자를 도입함으로써 수득한 (이하에서 기술될) 리간드는 지지체의 표면에 당 분자를 효율적으로 집합하는데 이용될 수 있다. 또한, 링커 화합물을 포함하는 리간드는 다분지 부위를 포함하기 때문에 링커 화합물을 포함하는 리간드는 지지체의 표면에 결합되었을 때 다수의 당 분자가 이차원적으로 높은 재현성을 갖도록 배열하는 것이 가능하

다. 추가로 상기 링커 화합물을 이용하여 단백질과 임의의 비특이적인 상호작용의 영향은 거의 완전히 배제할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 링커 화합물의 이용은 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 평가하도록 할 것이다.

링커 화합물은 하기 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 즉, 링커 화합물은 티옥트산과 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기를 갖는 3쇄 또는 4쇄의 분지쇄를 포함하는 아민 화합물과 축합 반응하여 제조한다. 반응은 방향족 아미노기 말단에서 보호기를 제거하고 링커 화합물을 수득하는 것이다.

티옥트산은 하기 일반식(6)에 나타낸 구조를 갖는다.

[일반식 6]



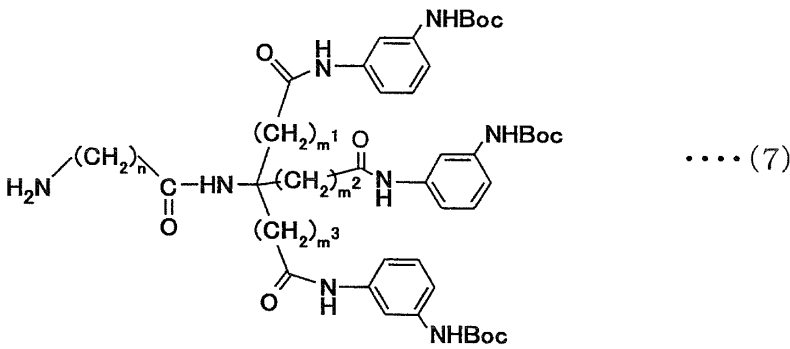
아민 화합물은 특별히 제한적이지 않으며 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기를 갖는 분지쇄를 포함하는 것이다. 아민 화합물은 링커 화합물의 다분지 부위와 동등한 구조를 가져야 한다.

따라서 상기 분지쇄는 탄화수소 유도체쇄가 방향족 아미노기 대신에 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 갖는다는 점을 제외하고는 탄화수소 유도체쇄에 포함된 구조를 가져야 한다. 즉, 분지쇄 내에서 탄소와 질소로 이루어진 탄화수소쇄의 탄소 및 수소 원자들의 일부는 다른 원자들 또는 치환기에 의해 치환될 수 있다. 특히, 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 갖는 분지쇄는 변형되어져 탄화수소쇄의 주쇄 구조에서 탄소-탄소 결합(C-C 결합)의 일부는 탄소-질소 결합(C-N 결합) 또는 탄소-산소 결합(C-O 결합)에 의해 치환될 수 있다.

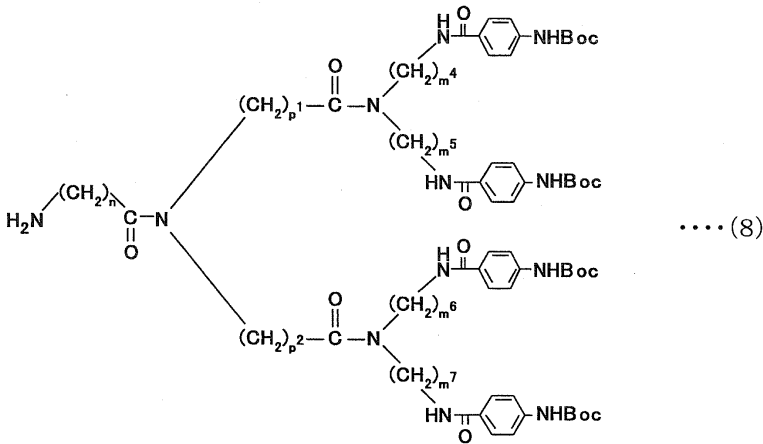
보호기는 방향족 아미노기의 아미노기가 축합반응을 수행하지 못하도록 하기 위하여 도입된 치환기이다. 보호기는 특별히 제한적이지 않지만 제 2의 방향족 아미노기에 대한 보호기를 제거해야 할 때 영향을 미치지 않는 것이어야 한다. 그러한 보호기의 예에는 t-부톡시카르보닐기(-COOH (CH₃)₃); Boc 기로 명명됨), 벤질기 및 아릴카바메이트기(-COOCH₂CH=CH₂, Alloc기)를 포함한다.

아민 화합물의 예는 하기 일반식(7) 및 (8)에 나타낸 구조를 갖는 화합물들이다.

[일반식 7]



[일반식 8]



일반식(7) 또는 (8)에서 n, m¹ 내지 m⁷, p¹ 및 p²은 독립적으로 1 내지 6의 정수이다. 아민 화합물을 합성하는 방법은 이하 실시예에서 상세하게 설명될 것이다.

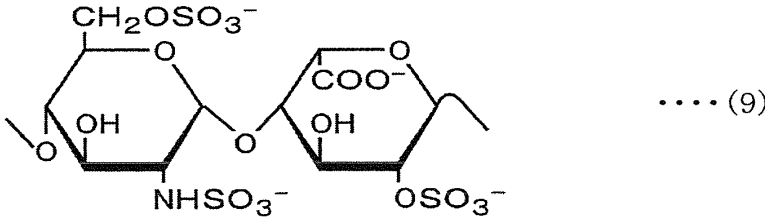
티옥트산과 아민 화합물의 축합 반응에서 티옥트산의 카르복실기는 아민 화합물의 아미노기와 축합하여 아마이드 결합을 형성한다. 그 다음 방향족 아미노기 말단에 있는 보호기를 제거하여 방향족 아미노기를 유리화시키고 이에 의하여 링커 화합물을 수득한다.

링커 화합물의 방향족 아미노기에 당 분자를 도입함으로써 수득한 리간드는 이하에서 설명된다. 본 발명에 따른 리간드에서 당 분자를 방향족 아미노기에 도입한다. 이는 링커 화합물의 아미노기와 당 분자내에서 평형에 의해 형성된 알데히드기 또는 케톤기의 반응에 의해 형성된 슈프 염기(Schiff base)의 연속적인 환원에 의해 수행된다. 즉, 환원 아미노화 반응이 링커 화합물과 당 분자를 결합시킨다.

본 발명에 따른 리간드에 포함된 당 분자는 특별히 제한적이지 않지만 환원 말단을 갖는 환원당이어야 한다. 그러한 당 분자의 예에는 단당류, 올리고당 및 다당류가 포함된다. 단당류는 예를 들면 글루코오스, 갈락토오스 및 만노오스이다. 올리고당은 두 개 내지 열 개의 당 분자가 서로 결합된 예를 들면 말토오스 또는 락토오스 및 이하에서 언급될 황산화된 올리고당이다. 다당류는 단당류 및 올리고당을 포함한 11개 이상의 당 분자를 갖는 예를 들면 헤파린, 콘드로이친 설페이트 또는 헤파란 설페이트이다.

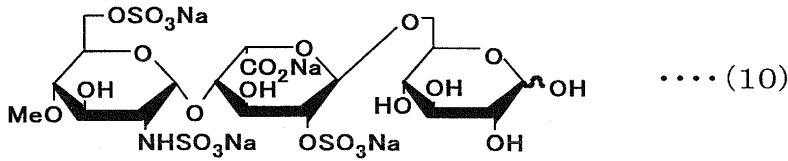
올리고당의 한 예는 하기 일반식(9)에 나타낸 부분적으로 특이한 이당류 구조(G1cNS6S-IdoA2S)를 갖는 황산화된 올리고당으로서, 항응고 활성을 갖고 있는 것으로 알려진 황산화된 다당류인 헤파린에 포함되어 있다.

[일반식 9]



다른 예는 일반식(10)에 나타난 구조를 갖는 올리고당으로서, 환원 말단으로 작용하는 하이드록시기에 글루코오스를 도입시킨 황산화된 올리고당이다.

[일반식 10]



올리고당류와 다당류는 단일 단당류로 이루어진 호모올리고당 또는 호모다당류이드 또는 상이한 단당류 또는 이들의 유도체로 이루어진 복합 탄수화물 또는 상이한 모노사라이드 또는 이들의 유도체와 올리고당으로 이루어진 복합 다당류일 수 있다. 또한, 당 분자는 자연으로부터 분리 및 정제를 통하여 수득한 천연 당이거나 인공적으로 합성한 당일 수 있다.

본 발명에 따른 리간드는 일반식(4)에 나타난 구조를 갖는다. 일반식(4)에 나타난 구조를 갖는 리간드는 일반식(1)에 나타난 구조를 갖되 상기 식에서 X는 일반식(2)에 나타난 구조를 갖는 링커 화합물에 일반식(10)에 나타난 당 분자를 첨가함으로써 수득한다. 일반식(2)에 나타난 X는 3개의 탄화수소 유도체쇄를 포함하는 구조를 갖고 있으므로 일반식(4)에 나타난 구조를 갖는 리간드는 3 단위의 당 분자에 결합된 링커 화합물을 포함한다. 일반식(4)에서 m^1 내지 m^3 은 일반식(2)의 m^1 내지 m^3 과 같이 제한적이지 않으며 1 내지 6의 정수이다. m^1 내지 m^3 에 나타난 정수는 서로 상이하거나 부분적으로 또는 완전히 동일할 수 있다. 또한, n은 특별히 제한적이지 않으며 1 내지 6의 정수이다.

본 발명의 또 다른 리간드는 일반식(5)에 나타난 구조를 갖는다. 일반식(5)에 나타난 구조를 갖는 리간드는 일반식(1)에 나타난 구조를 갖되, 상기 식에서 X는 일반식(3)에 나타난 구조를 갖는 링커 화합물에 일반식(10)에 나타난 당 분자를 첨가함으로써 수득한다. 일반식(3)에 나타난 X는 4개의 탄화수소 유도체쇄를 포함하는 구조를 갖고 있기 때문에 일반식(5)에 나타난 구조를 갖는 리간드는 4 단위의 당 분자에 결합된 링커 화합물을 포함한다. 일반식(5)에서 m^4 내지 m^7 은 일반식(3)의 m^4 내지 m^7 과 같이 제한적이지 않으며 1 내지 6의 정수이다. m^4 내지 m^7 로 나타난 정수는 서로 상이하거나 부분적으로 또는 완전히 동일할 수 있다. 또한, 일반식(3)의 p^1 및 p^2 와 같이 p^1 및 p^2 도 특별히 제한적이지 않으며 1 내지 6의 정수이다. p^1 내지 p^2 로 나타난 정수는 서로 상이하거나 부분적으로 또는 완전히 동일할 수 있다. 또한, n은 특별히 제한적이지 않으며 1 내지 6의 정수이다.

리간드는 링커 화합물과 당 분자를 포함하고 있기 때문에 리간드는 링커 화합물에 포함된 S-S 결합을 이용하여 황-금(S-Au) 결합과 같은 황(S)-금속 결합을 형성함으로써 단백질 분석용 지지체의 표면 금속에 결합할 수 있다. 이는 S-Au 결합을 통하여 지지체 표면에 집합되고 고정화된 3 단위 또는 4 단위의 당 분자를 포함하는 리간드 담체를 제공하게 할 수 있다. 따라서 리간드는 예를 들어 높은 재현성을 갖도록 단백질 분석용 지지체의 표면에 다수의 당 분자를 이차원적으로 배열하는데 이용될 수 있고 이에 의하여 리간드 담체를 수득할 수 있다. 리간드 담체의 이용은 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 평가할 수 있게 한다. Au 뿐만 아니라 Cu, Ag, Pt 및 이와 같은 금속들이 지지체의 표면 금속으로 이용될 수 있지만 Au가 특히 바람직하다.

따라서 본 발명은 S-금속 결합을 통하여 지지체의 표면에 고정화된 본 발명의 리간드를 갖는 리간드 담체를 또한 포함한다. 리간드 담체의 적용 분야는 단백질 분석에 제한되지 않는다. 예를 들어 리간드 담체는 당 분자와 상호작용을 확인하기 위하여 단백질 이외의 물질을 분석하는데 이용될 수 있다.

리간드 담체는 리간드를 지지체의 표면에 도입함으로써 형성된다. 이는 리간드를 포함하는 리간드 용액을 금속 필름 코팅을 구비한 지지체와 접촉한 결과, 리간드의 S-S 결합에 있는 각 황 원자가 S-금속 결합의 형성에 의해 지지체의 표면 금속에 결합함으로써 일어난다. 특히 리간드 용액에 단백질 분석용 지지체를 예정된 시간 동안 침지시킴으로써 또는 리간드 용액을 지지체에 주입함으로써(리간드 용액을 지지체의 표면에 부어줌으로써) 리간드(리간드에 포함된 링커 화합물)의 S-S 결합은 지지체의 표면을 코팅한 금 또는 그와 같은 것들과 S-Au 결합으로 전환되고 이러한 결과로 리간드가 지지체의 표면에 고정화된다.

리간드 용액으로 이용될 수 있는 용매는 특별히 제한적이지 않다. 예를 들어 메탄올, 물, 디메틸아세트아미드(DMAc) 또는 이러한 용매의 혼합물이 이용될 수 있다. 침지 시간은 약 0.5 내지 12시간이며 주입 양은 0.01 내지 1mM이다.

본 발명의 리간드는 S-S 결합을 갖고 있기 때문에 단백질-분석용 지지체의 표면에 용이하게 고정화될 수 있어서 용이하게 당 분자를 지지체 상에 도입할 수 있다.

상기된 바와 같이 본 발명은 당 분자를 지지체 상에 도입하는 방법을 또한 포함한다.

본 발명의 리간드-담체는 당 분자와 단백질과 같은 다른 물질간의 상호작용을 분석하는데 이용될 수 있다. 특히, 리간드-담체는 SPR 측정, 친화 크로마토그래피 및 이와 같은 것들에 적용할 수 있다.

예를 들어 단백질을 분석할 목적으로 SPR 측정은 다음과 같이 수행될 수 있다. 즉, 표면에 적층된 금의 박막과 같은 금속 박막을 갖는 지지체상에 본 발명의 리간드를 고정화시킴으로써 수득한 리간드-담체를 이용하여 상기 담체를 단백질과 접촉시키고 표면 플라즈몬 공명 장치를 이용하여 통상적인 방법으로 공명 각도를 측정한다. 이러한 방식으로 리간드-담체와 단백질의 결합 특성을 측정할 수 있다. 유리, 플라스틱 또는 이와 같은 것들이 SPR 측정에 이용될 수 있는 지지체(센서 칩)를 형성하는데 이용될 수 있다. 우리가 특히 적합하다. 또한, 리간드-담체는 런닝 버퍼에 용해된 단백질을 포함하는 용액을 리간드-담체의 표면에 흘려줌으로써 단백질과 접촉시킬 수 있다. 런닝 버퍼로는 예를 들면 인산완충용액이 이용될 수 있다.

리간드를 갖는 본 발명에 따른 리간드-담체를 이용하여 다수의 당 분자를 높은 재현성을 갖도록 지지체의 표면에 이차원적으로 배열할 수 있다. 따라서 리간드-담체는 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 측정하는 것을 가능하게 하고 이에 의하여 당 분자의 구조가 규명될 수 있고 상기 당 분자의 생물학적 활성이 정량적으로 평가될 수 있다.

또한, 본 발명의 리간드-담체로서 작용하는 리간드를 갖는 센서 칩은 하기에 기술되는 방식으로 SPR 측정에 이용될 수 있다. 즉, 당 분자의 상호작용은 지지체 표면에 제 1 당 분자를 고정화시킴으로써 수득한 제 1 센서 칩을 사용한 SPR 측정에 따른 검출 결과와 지지체 상에 상기 제 1 당 분자와는 상이한 말단 구조를 갖는 제 2 당 분자를 고정화시킴으로써 수득한 제 2 센서 칩을 사용한 SPR 측정에 따른 검출 결과의 차이를 검출함으로써 측정될 수 있다. 이들 센서 칩 간에는 상이한 당 분자를 구비한 리간드가 고정화된다. 서로 비교될 수 있는 당 분자의 예에는 락토오스와 글루코오스, 말토오스와 글루코오스 및 코지비오스와 글루코오스이다. 상기 예에서는 두 개의 센서 칩이 이용되었지만, 상이한 당 분자를 도입한 두 개 이상의 센서 칩이 이용될 수도 있다. 본 발명에서 당 분자의 "말단"은 센서 칩에 고정화되지 않는 쪽(side)을 의미한다.

SPR 측정은 일정한 측정 조건 하에서 제 1 당 분자에 특이적으로 작용하는 단백질 또는 다른 분자에 의해 작용되는 두 센서 칩의 공명 각도를 측정한다. 상기 두 센서 칩 간의 공명에서의 차이를 검출함으로써 당 분자와 단백질 간의 특이적 상호작용을 측정할 수 있다.

또한, 당 분자와의 상호작용을 측정하는데 사용되는 물질은 단백질에만 제한되지 않는다.

상기 예에 따르면 두 종류의 센서 칩이 동시에 측정될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 두 종류 이상의 센서 칩이 측정될 수 있고 상기 센서 칩은 동시에 측정되지 않을 수 있다. 또한, 적어도 하나 이상의 센서 칩이 당 분자가 도입되지 않은 채로 이용될 수 있다. 예를 들어 링커 화합물만이 고정화된 센서 칩이 이용될 수 있다.

SPR 측정은 당 분자의 구조를 제외하고 동일한 구조를 갖는 리간드를 포함하는 적어도 둘 이상의 센서 칩을 이용하여 진행할 수 있기 때문에 당분자로 인하여 기인된 적어도 둘 이상의 센서 칩 간의 상호작용의 차이가 측정될 수 있다. 따라서 상술한 측정 방법을 사용하여 당 분자 이외의 부위와 다른 물질간의 비특이적인 상호작용을 배제함으로써 당 분자와 다른 물질간의 특이적 상호작용을 측정할 수 있다.

이하에서 본 발명은 실시예와 비교 실시예에 의하여 보다 상세하게 설명된다. 그러나 본 발명은 이에 의하여 제한되지 않는다.

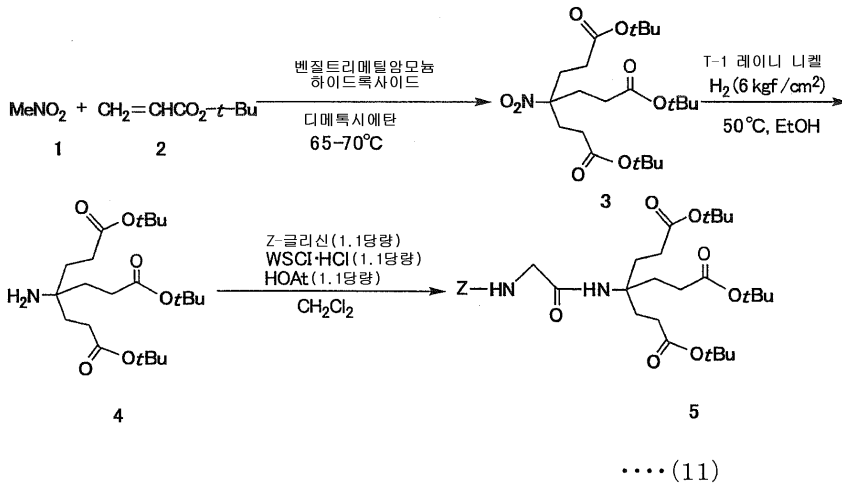
[실시예 1: 링커 화합물의 합성]

일반식(1)에 나타낸 구조를 갖되, 상기 식에서 n은 1이고 X는 일반식(2)에 나타낸 구조를 갖되, 상기 식에서 m¹, m² 및 m³는 2인 본 발명에 따른 링커 화합물은 다음 단계를 거쳐 합성하였다.

하기 일반식 (11)에 나타낸 바와 같이 3 단위의 t-부틸아크릴레이트(화합물 2)를 65 내지 70°C에서 디메톡시에탄 중 벤질트리메틸암모늄 하이드록사이드의 존재 하에서 니트로메탄(화합물 1)에 미카엘 첨가반응(Michael addition)을 통하여 첨가하였다. 결과적으로 화합물 3을 91%의 수율로 수득하였다. 이어서, 화합물 3의 니트로기를 50°C에서 에탄올 중 수소 분위기(6kg/cm²) 하에서 레이니 니켈(Raney Ni)을 사용하여 환원시켰다. 결과적으로 화합물 4를 98%의 수율로 수득하였다.

그 다음 화합물 4를 CH₂Cl₂ 중 1-하이드록시-1-아자벤조트리아졸(일반식에서 HOAt; 1.1 당량)과 수용성 카르보디이미드 하이드로클로라이드(일반식에서 WSCI·HCl; 1.1당량)의 존재 하에서 Z-글리신(1.1 당량)과 축합하였다. 결과적으로 Z-글리신 유도체(화합물 5)를 85%의 수율로 수득하였다.

[일반식 11]



보다 자세하게는 화합물 4는 G.R. Newkome et al, OPPI BRIEFS, vol.28, p.495, 1996에 기술된 방법에 따라 수득할 수 있다. 먼저, 니트로메탄(12.2g, 200mmol)을 50ml의 1,2-디메톡시에탄에 용해하였다. 이 혼합물을 65°C 내지 70°C까지 가열하고 여기에 2ml의 40% 벤질트리메틸암모늄 하이드록시-메탄올 용액을 첨가하여 니트로메탄 용액을 수득하였다. 그 다음 상기 니트로메탄 용액을 75°C까지 가열하고 t-부틸아크릴레이트(90.8ml, 620mmol)를 니트로메탄 용액에 천천히 한 방울씩 첨가하였다. 이어서, 용액의 온도를 70°C 내지 75°C로 유지하면서 1ml의 40% 벤질트리메틸암모늄 하이드록시-메탄올 용액을 니트로메탄 용액에 4차례 첨가하였다. 이렇게 형성된 용액을 2.5시간 동안 교반하여 반응 산물로서 니트로메탄 및 t-부틸아크릴레이트의 용액을 수득하였다. 니트로메탄/t-부틸아크릴레이트 반응 용액 중 불용성 물질은 농축되도록 경사 분리를 통하여 제거하였다. 이렇게 수득한 잔류물은 디에틸 에테르에 용해시키고 얼음 냉각시킨 10% 염산 용액, 소듐 하이드로젠 카보네이트의 포화된 수용액 및 물에 각각 두 차례 세정하여 잔류물 용액을 수득하였다. 그 다음 상기 잔류물 용액을 건조제로서 무수 소듐 설페이트를 이용하여 건조하였다. 건조제는 세라이트(cerite)를 이용하여 제거하였다. 이렇게 형성된 잔류물 용액은 감압 농축하여 농축된 잔류물을 수득하였다. 그 다음 상기 농축된 잔류물은 재결정화를 위하여 에탄올에 용해시켜 백색의 바늘 결정 형태로 화합물 3(81.8g, 91%)을 수득하였다.

이어서 화합물 3(10g, 22.4mmol)의 결정과 T-1 레이니 니켈(6.0g)을 무수 에탄올(50ml)에 첨가하고 수소 분위기(6kg/cm²)하 50°C에서 24시간동안 교반하였다. 그 후에 T-1 레이니 니켈을 세라이트를 사용하여 여과시켰고 반응 산물로서 화합물 3의 용액을 수득하였다. 화합물 3의 반응 용액은 감압 농축하여 농축된 잔류물을 수득하였다. 이렇게 수득한 농축된 잔류물은 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매: 클로로포름/메탄올 = 20/1)를 이용하여 정제해서 백색 고체 형태로 화합물 4(9.2g, 98% 수율)를 수득하였다.

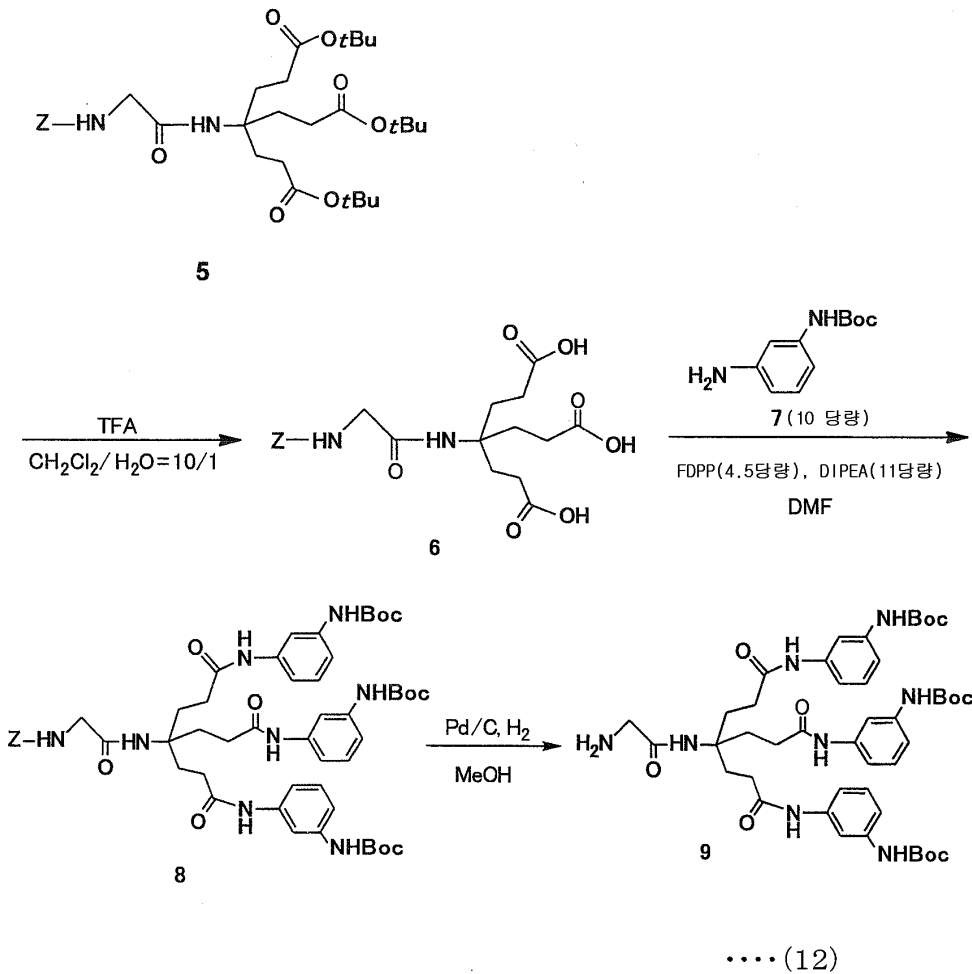
보다 자세하게는 2ml의 무수 디클로로메탄에 용해시킨 화합물 4(2.50g, 6.02mmol)의 용액을 0°C에서 28ml의 무수 디클로로메탄에 Z-글리신(1.26g, 6.62mmol), HOAt(0.90g, 6.62mmol) 및 WSCI·HCl(1.27g, 6.62mmol)을 용해하여 수득한 Z-글리신 용액에 첨가하였다. 이렇게 형성된 용액을 아르곤 분위기하 실온에서 36시간 동안 교반하여 Z-글리신 및 화합물 4의 반응 용액을 수득하였다. Z-글리신/화합물 4 반응 용액을 디클로로메탄과 10% 시트르산 수용액과 혼합한 후 디클로로메탄으로 추출하였다. 추출물에서 유기층은 물, 소듐 하이드로젠 카보네이트의 포화된 수용액 및 물로 각각 한차례 세정하였다. 이어서 유기층은 건조제로서 무수 소듐 설페이트를 이용하여 건조시켰다. 상기 유기층으로부터 건조제를 여과하여 제거시키고 감압 농축하여 농축된 잔류물을 수득하였다. 이렇게 수득한 농축된 잔류물을 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매:클로로포름)로 정제하여 백색 고체의 형태로 화합물 5(3.09g, 85% 수율)를 수득하였다.

ESI-MS(positive) 측정(비행시간형 질량 분석계)을 상기와 같이 수득한 화합물 5에 대하여 수행하였다. 측정 결과 m/z(질량/전하비)가 629.4[(M+Na)⁺]이었다. 이로부터 화합물 5의 구조가 확인되었다.

그 다음 하기 일반식(12)에 나타난 바와 같이 화합물 5의 t-부톡시카르보닐기(-COOC(CH₃)₃기; 일반식(12)에서 tBu)를 CH₂Cl₂/H₂O=10/1로 혼합된 용매 중 트리플루오로아세트산(이하에서 TFA로 표기한다)을 사용하여 제거하였다. 결과적으로 화합물 6을 95%의 수율로 수득하였다.

그 다음 펜타플루오로페닐디페닐 포스페이트(일반식에서 FDPP, 4.5당량), 디이소프로필 에틸아민(일반식에서 DIPEA, 11당량) 및 N,N-디메틸 포름아미드(DMF)의 존재 하에서 화합물 6을 아미노기가 Boc 기에 의해 보호된 m-페닐엔디아민 유도체(화합물 7, 10 당량)와 축합시켰다. 결과적으로 N-Boc 아민 유도체를 99%의 수율로 수득하였다. 그 다음 축매에 의한 수소 환원 반응을 Pd/C(활성-카본 담체 팔라듐)의 존재 하에서 메탄올(일반식에서 MeOH)에서 수행하여 화합물 8과 축합 반응을 일으킬 수 있는 Z-글리신의 벤질옥시카르보닐기(일반식에서 Z)를 제거하였다. 결과적으로 화합물 9를 79%의 수율로 수득하였다.

[일반식 12]



특히 화합물 6 내지 9는 하기 단계를 거쳐 수득하였다.

화합물 6은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저, 화합물 5(2.98g, 4

90mmol)을 15ml의 디클로로메탄에 용해시키고 15ml의 TFA와 1.5ml의 물을 -10°C 에서 첨가하였다. 이어서, 이 혼합물을 상온에서 1.5시간 동안 교반시키고 반응 산물로서 화합물 5의 용액을 수득하였다. 화합물 5의 반응 용액을 감압 농축하여 농축된 잔류물을 수득하였다. 그 후 10%의 수산화나트륨 수용액을 pH가 5에 도달할 때까지 얼음 냉각조 내에서 농축된 잔류물에 첨가하였고 진한 염산을 pH가 2에 도달할 때까지 첨가하였다. 결과적으로 백색의 고형 침전물을 수득하였다. 이렇게 수득한 백색의 고체를 물로 세정하여 백색 고체의 형태로 화합물 6(2.04g, 95% 수율)을 수득하였다.

ESI-MS(negative) 측정이 상기와 같이 수득한 화합물 6에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z 는 437.1 $[(M-H)^{-}]$ 이었다. 또한, 핵자기공명($^1\text{H-NMR}$, 400MHz, d_6 -DMSO) 측정 결과는 $\delta=7.34-7.14(6\text{H}, m)$, 5.00(1H, s), 3.55(2h, d, $J=5.9\text{Hz}$), 3.33(3H, bs), 2.11(6H, m), 1.81(6H, m)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 6의 구조가 확인되었다.

화합물 7은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저 *m*-페닐렌디아민(0.50g, 4.62mmol)을 35ml의 메탄올에 용해시키고 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.06ml, 4.62mmol) 및 트리에틸아민(0.65ml, 4.65mmol)을 0°C 에서 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였고 감압 농축하여 농축된 잔류물을 수득하였다. 농축된 잔류물을 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매: 클로로포름/아세톤 = 10/1)로 정제하여 백색 고체의 형태로 화합물 7(665mg, 68% 수율)을 수득하였다.

ESI-MS(positive) 측정이 상기와 같이 수득한 화합물 7에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z 는 231.2 $[(M+Na)^{+}]$ 이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3Cl) 측정 결과는 $\delta=7.02(1\text{H}, t, J=8.0\text{Hz})$, 6.95(1H, bs), 6.54(1H, dd, $J=2.0\text{Hz}$, $J=8.0\text{Hz}$), 6.41(1H, bs), 6.35(1H, dd, $J=2.2\text{Hz}$, $J=7.9\text{Hz}$), 3.66(2H, bs), 1.53, 1.50(9H, s, s)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 7의 구조가 확인되었다.

화합물 8은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저, 화합물 7(475mg, 2.28mmol), FDPP(394mg, 1.03mmol) 및 디이소프로필 에틸아민(447 μl , 2.57mmol)을 2ml의 무수 디메틸 포름아미드에 용해시켰다. 이 혼합물을 아르곤 분위기 하 실온에서 29시간 동안 교반시키고 에틸 아세테이트 및 물과 혼합하였고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 0.5N 염산, 물, 소듐 하이드로젠 카르보네이트의 포화된 수용액 및 포화된 염수로 각각 한 차례 세정하였다. 그 다음 유기층을 건조제로서

무수 소듐 설페이트를 사용하여 건조하였다. 이렇게 형성된 용액은 건조제를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 농축된 잔류물은 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매:클로로포름/아세톤=3/1)로 정제하여 백색 고체의 형태로 화합물 8(228mg, 99% 수율)을 수득하였다.

ESI-MS(positive) 측정이 화합물 8에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 1009.5[(M+H)⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR(400MHz, CD₃Cl)의 측정 결과는 δ=8.75(3H, s), 7.67(3H, s), 7.30-6.95(18H, m), 6.52(1H, bs), 5.04(2H, s), 3.71(2H, d, J=5.0Hz), 2.23(6H, m), 1.97(6H, m), 1.47(27H, s)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 8의 구조가 확인되었다.

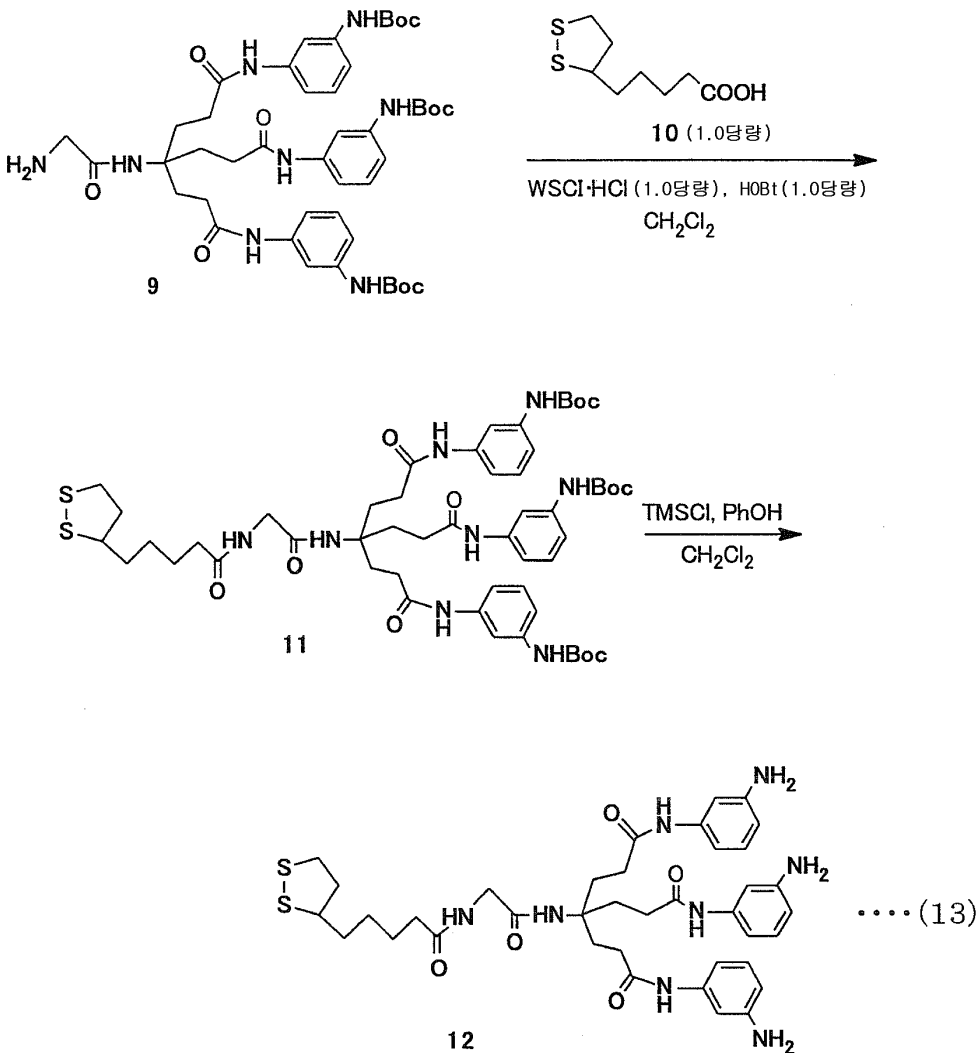
화합물 9는 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저, 화합물 8(200mg, 198μmol)을 3ml의 메탄올에 용해시키고 10% Pd/C(62.3mg)를 첨가하였다. 이 혼합물을 수소 분위기 하 실온에서 15시간 동안 교반시키고 Pd/C를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축하였다. 이렇게 농축된 잔류물을 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매: 클로로포름/메탄올=8/1)에 의해 정제하여 화합물 9(136mg, 78% 수율)를 백색 고체의 형태로 수득하였다.

ESI-MS(positive) 측정을 화합물 9에 대하여 수행하였다. 측정 결과 m/z는 875.5[(M+H)⁺]이었다. 이로부터 화합물 9의 구조가 확인되었다.

또한, 일반식(13)에 나타낸 바와 같이 화합물 9를 CH₂Cl₂ 중에 WSCI·HCl(1.0 당량) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(일반식(13)에서 HOBT: 1.0 당량)의 존재 하에서 티옥트산(화합물 10)과 축합시켰다. 결과적으로 티옥트산 유도체(화합물 11)를 75%의 수율로 수득하였다.

그 다음 화합물 11의 Boc 기를 CH₂Cl₂ 중에 트리메틸실릴 클로라이드(일반식 TMSCI)와 페놀(PhOH)의 존재 하 산성 조건에서 제거하였다. 결과적으로 화합물 12가 각각 방향족 아미노기를 갖는 3개의 탄화수소 유도체체를 포함하는 링커 화합물로서 수득되었다(32% 이상의 수율).

[일반식 13]



특히 화합물 11 및 12는 하기 단계를 거쳐 수득하였다.

화합물 11은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 화합물 10(23.6mg, 114mmol)과 HOBt(15.4mg, 114mmol)을 2.3ml의 무수 디클로로메탄에 용해시키고 화합물 9(2.50mg, 6.02mmol)를 0℃에서 첨가하였다. 상기 혼합물을 아르곤 분위기 하 차광된 곳의 실온에서 36시간 동안 교반하였다. 이렇게 형성된 용액을 10% 시트르산 수용액과 혼합하고 클로로포름으로 추출하였다. 유기층은 소듐 하이드로젠 카보네이트의 포화된 수용액으로 세정하고 건조제로서 무수 소듐 설페이트를 사용하여 건조시켰다. 그 다음 유기층은 건조제를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 이렇게 농축된 잔류물은 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매: 클로로포름/메탄올=40/1)로 정제하였다. 결과적으로 화합물 11(91.0mg, 75% 수율)이 백색의 고체 형태로 수득되었다.

ESI-MS(positive) 측정이 화합물 11에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 1085.5[(M+H)⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, CD₃Cl) 측정 결과는 δ=9.01(3H, bs), 7.67(3H, s), 7.31(1H, bs), 7.27-7.00(12H, m), 3.71(2H, bs), 3.64-3.39(1H, m), 3.12-2.99(2H, m), 2.33(1H, m), 2.32(6H, m), 2.20(2H, m), 2.04(6H, m), 1.82-1.73(1H, m), 1.62-1.47(4H, m), 1.47(27H, s), 1.39-1.25(27H, m)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 11의 구조가 확인되었다.

화합물 12는 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저, 트리메틸시릴 클로라이드(0.25ml, 2.64mmol)를 0.49ml의 디클로로메탄에 용해시키고, 1.46ml의 디클로로메탄에 페놀(549mg, 5.83mmol)을 용해시켜 수득한 페놀 용액을 첨가하였다. 교반 후에 화합물 11(34.7mg, 32.6μmol)을 첨가하고 혼합물을 차광된 곳의 실온에서 1.5시간 동안 교반시켜서 반응 산물로서 화합물 11의 용액을 수득하였다. 그 다음 화합물 11의 반응 용액에 클로로포름을 첨가하였고 유기층은 소듐 하이드로젠 카보네이트의 포화된 수용액으로 세정하고 황색의 고체 침전물을 형성시켰다. 상기 황색의 고체는 아세트산에 용해시키고 4℃까지 냉각시켰다. 이렇게 형성된 응고된 고체를 여과하여 화합물 12(7.9mg, 32% 수율)를 백색 고체로 수득하였다.

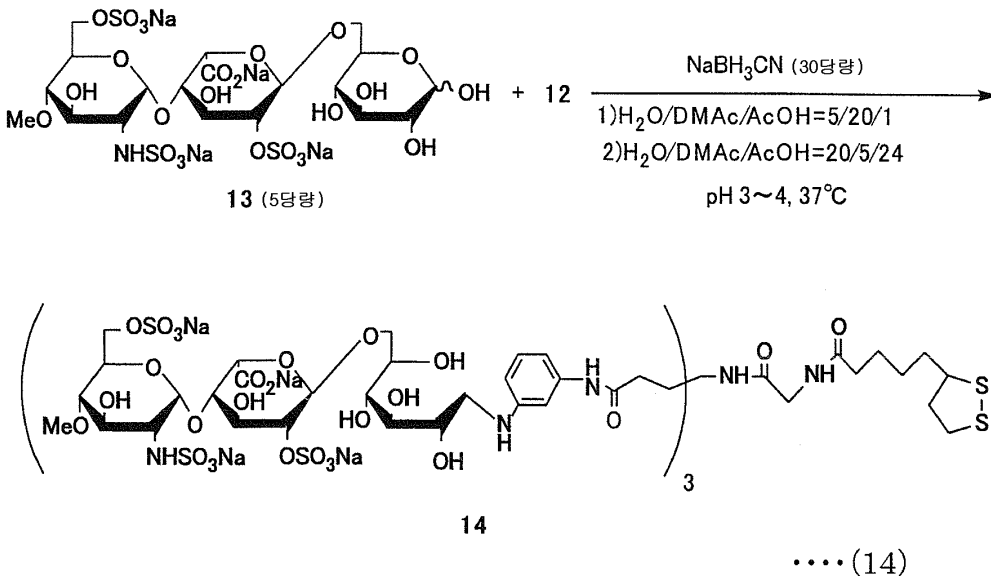
ESI-MS(positive) 측정이 화합물 12에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 763.6[(M+H)⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, d₆DMSO) 측정 결과는 δ=9.57(3H, s), 7.97(1H, m), 6.87(6H, m), 6.67(3H, d, J=7.7Hz), 6.21(3H, d, J=7.7Hz), 4.98(6H, bs), 3.67(2H, d, J=5.1Hz), 3.56(1H, m), 3.16-3.04(2H, m), 2.36(1H, m), 2.25(6H, m), 2.19-2.07(2H, m), 1.93(6H, m), 1.83(1H, m), 1.50(4H, m), 1.33(2H, m)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 12의 구조가 확인되었다.

[실시예 2; 리간드의 합성]

실시예 1에서 수득한 링커 화합물 12를 이용하여 일반식(4)에 나타낸 구조를 갖되, 상기 일반식(4)에서 m¹, m² 및 m³은 2이고 n은 1인 리간드를 하기 단계를 거쳐 수득하였다.

하기 일반식(14)에 나타낸 바와 같이 실시예 1에서 수득한 링커 화합물 12와 일반식(10)에 나타낸 당 분자로서 작용하는 화합물 13(5 당량)을 H₂O/디메틸아세트아미드(일반식에서 DMAc)/아세트산(AcOH)=5/20/1로 혼합된 용매에 용해시키고 37℃, pH 3 내지 4에서 슈프 염기가 형성되도록 하였다. 이어서, 용매의 함량을 H₂O/DMAc/AcOH=20/5/24로 변화시키고 37℃, pH 3 내지 4에서 NaBH₃CN(30 당량)을 첨가하여 환원 아미노화 반응을 일으켰다. 그 다음 이렇게 형성된 화합물을 세파텍스 G-50(Amersham Biosystems Co., Ltd.에서 제조됨)을 구비한 겔 여과 크로마토그래피로 정제하고 탈염시켰다. 결과적으로 화합물 14가 3 단위의 당 분자를 포함하는 리간드로서 수득되었다.

[일반식 14]



특히 화합물 14는 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 실시예 1에서 수득한 링커 화합물 12(0.5mg, 655nmol)와 화합물 13(2.8mg, 3 μ mol)을 물(25 μ l), 디메틸아세트아미드(100 μ l) 및 아세트산 (5 μ l)을 함유하는 혼합된 용매에 용해시켰다. 이렇게 형성된 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 밀봉된 튜브에 하룻밤 동안 가열하여 반응 산물로서 링커 화합물 12와 화합물 13의 용액을 수득하였다. 링커 화합물 12와 화합물 13의 반응 용액을 20 μ l의 아세트산에 NaBH₃CN(2.7mg, 39.2 μ mol)을 용해시킴으로써 수득한 NaBH₃CN 용액과 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 가열하고, 감압 농축시키고, 세파덱스 G-50을 구비한 겔 여과 크로마토그래피(용매 : 0.3M NaCl을 포함하는 PBS)를 수행하였다. 그 결과 얻은 목적 분획물은 감압 농축시키고, 그 결과 얻은 농축된 잔류물은 Sephadex G-25(용매 : 물)에 의해 탈염시켰다. 탈염된 목적 분획물은 감압 농축시키고, 물에 용해하고 냉동시켰다. 결과적으로 화합물 14(1.5mg, 66%수율)가 백색 분말의 형태로 수득되었다.

수득된 화합물 14의 질량은 3291.28Da(달톤)이다. 일반식(14)에 나타난 화합물 14는 비행시간형 질량 분석계 측정에 의해 수득한 m/z 1008.19의 피크에서 삼가 이온[M-12Na+ 9H]³⁻으로서 측정되었다. 또한, ¹H-NMR (500MHz, D₂O)의 측정 결과는 δ = 7.20(3H, m), 6.82(6H, m), 6.64(3H, m), 5.35(3H, d, J=3.5Hz), 5.13(3H, J=2.5Hz), 4.51(3H, d, J=2.4Hz), 4.29(6H, m), 4.18(6H, m), 4.06(6H, m), 3.97(9H, m), 3.87(3H, m), 3.82(3H, m), 3.78(6H, m), 3.68(9H, m), 3.56(9H, s), 3.34(6H, m), 3.24(3H, dd, J=3.4, 10.5Hz), 3.08(4H, m), 2.44(6H, m), 2.33(1H, m), 2.27(2H, t), 1.86(1H, m), 1.56-1.46(2H, m), 1.35-1.14(4H, m)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 14의 구조는 확인되었다.

[실시예 3: 링커 화합물의 합성]

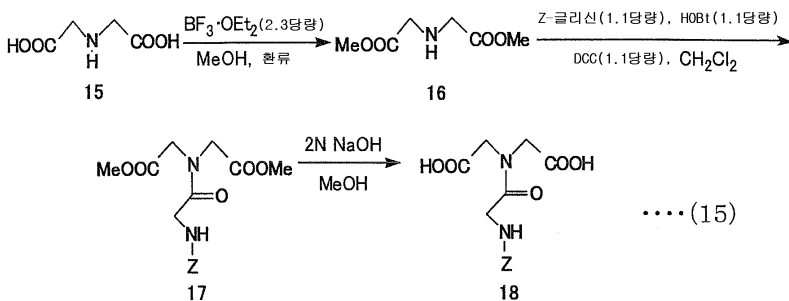
일반식(1)의 구조를 갖되 상기 식에서 n은 1이고 X는 일반식(3)에 나타난 구조를 갖되, m⁴, m⁵, m⁶ 및 m⁷은 모두 2이고 p¹ 및 p²는 1인 본 발명에 따른 링커 화합물은 하기 단계를 거쳐 합성하였다.

하기 일반식 (15)에 나타난 바와 같이 트리플루오로보론·에테르 첨가생성물(일반식에서 BF₃·OEt₂)을 MeOH에 첨가하고 산성의 조건 하에서 환류시켰다. 이어서, 디카르복실산(화합물 15)을 에스테르화하여 79%의 수율로 에스테르 유도체(화합물 16)을 수득하였다.

그 다음 Z-글리신(1.1 당량)을 CH₂Cl₂에 용해된 HOBt(1.1 당량)과 디사이클로헥실 카보다이미드(일반식에서 DCC)의 존재 하에서 화합물 16과 축합하였다. 결과적으로 글리신 유도체(화합물 17)를 94%의 수율로 수득하였다.

이어서, 2N NaOH를 MeOH에 첨가하였고 화합물 17의 에스테르기를 알칼리성 조건 하에서 가수분해시켰다. 결과적으로 디카르복실산 유도체(화합물 18)를 98%의 수율로 수득하였다.

[일반식 15]



특히, 화합물 16 내지 19는 하기 단계를 거쳐서 수득하였다.

즉, 화합물 16은 하기 단계를 거쳐서 수득하였다. 먼저, 화합물 15(이미노디아세트산; 10.0g, 75.1mmol) 및 BF₃·OEt₂ (보론 트리플루오라이드-디에틸 에테르 복합체; 22ml, 173mmol)를 50ml의 무수 메탄올에서 용해시켰다. 이 혼합물을 아르곤 분위기 하에서 5시간 동안 환류시키고 소듐 하이드로젠 카보네이트의 포화된 수용액을 첨가하여 중화시키고 클로로포름으로 추출하였다. 물 층에 트리에틸아민을 pH가 9가 될 때까지 첨가하였다. 이어서, 상기 층을 클로로포름으로 추출하고 건조제로서 무수 소듐 설페이트를 이용하여 건조시키고 건조제를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 결과적으로 화합물 16(9.61g, 79% 수율)이 황색의 유상물(oily matter) 형태로 수득된다.

ESI-MS(positive) 측정이 화합물 16에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 162.1[(M+H)⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, CD₃Cl)의 측정 결과는 δ = 3.74(6H, s), 3.48(4H, s), 2.00(1H, s)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 16의 구조가 확인되었다.

화합물 17은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저 화합물 16(1.00g, 6.21mmol), 디사이클로헥실 카보다이미드(1.41g, 6.83mmol) 및 HOBt(0.92g, 6.83mmol)을 25ml의 무수 디클로로메탄에 용해시켰다. 이렇게 형성된 혼합물을 아르곤 분위기 하 0 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 교반하고, Z-글리신 (1.42g, 6.83mmol)과 함께 실온에서 5일 동안 교반하였다. 교반에 의해 형성된 침전물은 여과하여 제거하고 여과액은 클로로포름으로 추출하였다. 유기층은 1N HCl과 소듐 하이드로젠 카보네이트의 포화된 수용액으로 각각 두 차례 세정하고 추가로 물로 한 차례 더 세정하였다. 유기층은 건조제로서 무수 소듐 설페이트를 이용하여 건조시키고 감압 농축시켰다. 결과적으로 화합물 17(1.00g, 94% 수율)을 수득하였다.

페이트를 사용하여 건조시키고 건조제를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 이렇게 농축된 잔류물을 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매: 클로로포름/아세톤=2/1)로 정제하였다. 결과적으로, 화합물 17(2.05g, 94% 수율)이 백색 고체의 형태로 수득되었다.

ESI-MS(positive) 측정이 화합물 17에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 375.1[(M+Na)⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, CD₃Cl)의 측정 결과는 δ= 7.36(5H, m), 5.69(1H, bst), 5.12(2H, s), 4.22, 4.12(4H, s, s), 4.06(2H, d), 3.78, 3.73(4H, s, s)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 17의 구조가 확인되었다.

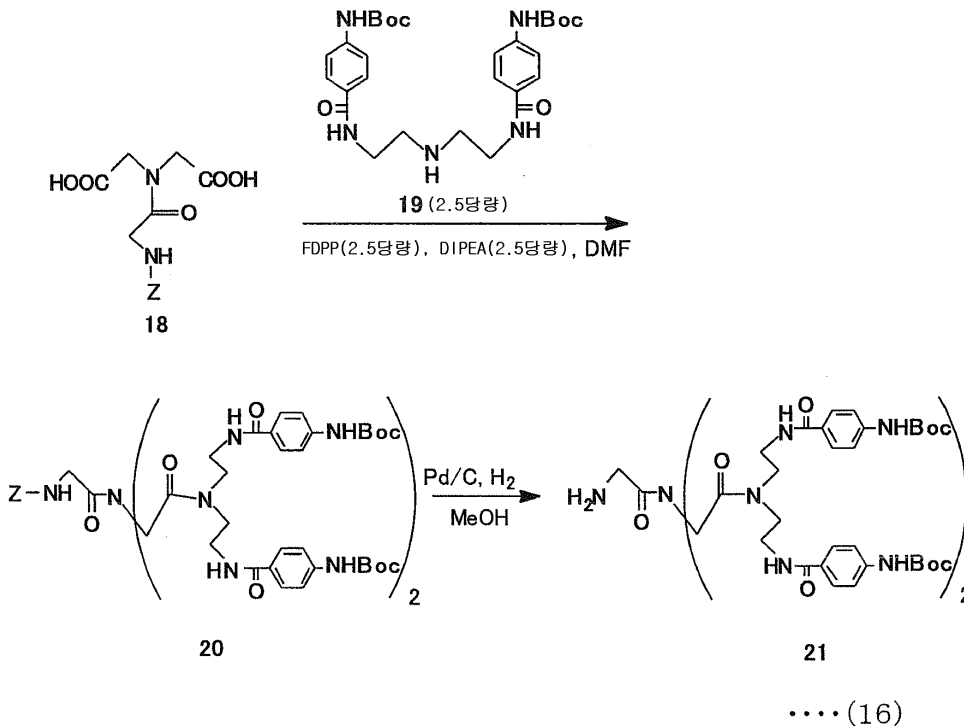
화합물 18은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저, 화합물 17(1.50g, 4.26mmol)을 20ml의 메탄올에 용해시키고 2N NaOH(9ml)을 첨가하였다. 이 혼합물을 0℃에서 2.5시간 동안 교반시키고 pH가 6이 될 때까지 Dowex 50WX-8(H⁺ 형태)을 첨가하여 중화시키고 Dowex 50WX-8을 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 이렇게 농축된 잔류물에 물을 첨가하고 불용성 물질을 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시키고 냉동 건조시켰다. 결과적으로 화합물 18(1.30g, 98% 수율)이 백색 고체의 형태로 수득되었다.

ESI-MS(negative) 측정이 화합물 18에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 321.1[(M-2H+Na)⁻]이었다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, d₆-DMSO)의 측정 결과는 δ= 7.32(5H, m), 7.21(1H, m), 5.01(2H, s), 3.93, 3.84(4H, s, s), 3.72(2H, d, J=5.4Hz)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 18의 구조가 확인되었다.

그 다음, 하기 일반식(16)에 나타낸 바와 같이 방향족 아미노기 말단이 Boc 기에 의해 보호된 화합물 19(2.5 당량)를 DMF 중 FDPP(2.5 당량) 및 DIPEA(2.5 당량)의 존재 하에서 화합물 18과 반응시켰다. 결과적으로, N-Boc 아민 유도체(화합물 20)가 60%의 수율로 수득되었다.

이어서, 촉매에 의한 수소 환원 반응을 Pd/C의 존재 하 MeOH에서 수행하여 화합물 20과 축합 반응을 수행하는 Z-글리신의 Z기를 제거하였다. 결과적으로 아민 유도체(화합물 21)를 92%의 수율로 수득하였다.

[일반식 16]



화합물 19 내지 21은 하기 단계를 거쳐 수득하였다.

화합물 19는 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저, 4-아미노벤조산(3.33g, 14.0mmol)과 HOBt(1.93g, 14.3mmol)을 무수 디클로로메탄에 현탁시키고 이 혼합물을 아르곤 분위기 하 0℃에서 15분 동안 교반시켰다. 이어서, 30ml의 무수 디클로로메탄에 WSCI·HCl(2.87g, 15.0mmol)을 용해시켜서 수득한 WSCI·HCl 용액을 첨가하고, 상기 혼합물을 50분 동안 교반하고 반응 산물로서 4-아미노벤조산 및 HOBt 용액을 수득하였다. 4-아미노벤조산 및 HOBt 반응 용액의 용액에 디에틸엔트리아민(0.79ml, 7.00mmol)을 첨가하고 상기 혼합물을 차광된 곳의 실온에서 하룻밤 동안 교반한 후 백색의 결정을 수득하였다. 백색의 결정을 여과하고 메탄올로부터 재결정화하였다. 결과적으로, 화합물 19(3.53g, 92.9% 수율)가 백색 결정의 형태로 수득되었다.

ESI-MS(positive) 측정이 화합물 19에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z 는 $542.4[(M+H)^+]$ 이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3Cl)의 측정 결과는 $\delta=7.77-7.74(4\text{H}, \text{d}, J=8.7\text{ Hz}), 7.50-7.48(4\text{H}, \text{d}, J=8.6\text{Hz}), 3.70-3.66(4\text{H}, \text{m}, J=5.2\text{Hz}), 3.34-3.28(4\text{H}, \text{m}, J=5.6\text{ Hz}), 1.53(18\text{H}, \text{s})$ 임을 확인하였다. 이로부터 화합물 19의 구조가 확인되었다.

화합물 20은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저 화합물 18(50.0g, 154 μmol), 화합물 19(209mg, 386 μmol) 및 FDPP(148mg, 386 μmol)을 30ml의 무수 디메틸포름아미드에 용해시켰다. 이렇게 형성된 혼합물에 디소프로필 에틸아민(67.2 μl , 386 μmol)을 첨가하였고 이 혼합물을 아르곤 분위기 하 실온에서 20시간 동안 교반하여 반응 산물로서 화합물 18과 화합물 19의 용액을 수득하였다. 화합물 18과 화합물 19의 반응 용액을 감압 농축시켰고 이렇게 농축된 잔류물을 클로로포름으로 추출하였다. 유기층을 10% 시트르산 및 소듐 하이드로젠 카르보네이트의 포화된 수용액으로 세정하고 건조제로서 무수 소듐 설페이트를 사용하여 건조시키고 건조제를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 농축된 잔류물을 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매:클로로포름/메탄올=10/1)로 정제하였다. 결과적으로 화합물 20(125mg, 59% 수율)이 백색 고체의 형태로 수득되었다.

ESI-MS (positive) 측정이 화합물 20에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z 는 $1393.7[(M+Na)^+]$ 이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3)의 측정 결과는 $\delta=7.88(1\text{H}, \text{bs}), 7.73-7.66(10\text{H}, \text{m}), 7.56(1\text{H}, \text{bs}), 7.38(4\text{H}, \text{d}, J=8.4\text{Hz}), 7.34-7.29(6\text{H}, \text{m}), 7.17, 7.05(2\text{H}, \text{bs}, \text{bs}), 5.35(1\text{H}, \text{bs}), 5.00(2\text{H}, \text{s}), 3.96(2\text{H}, \text{bs}), 3.64(4\text{H}, \text{band}), 3.55(4\text{H}, \text{band}), 3.51(6\text{H}, \text{band}), 3.43, 3.27, 3.17(6\text{H}, \text{bs}, \text{bs}, \text{bs}), 1.50, 1.49(36\text{H}, \text{s}, \text{s})$ 임을 확인하였다. 이로부터 화합물 20의 구조가 확인되었다.

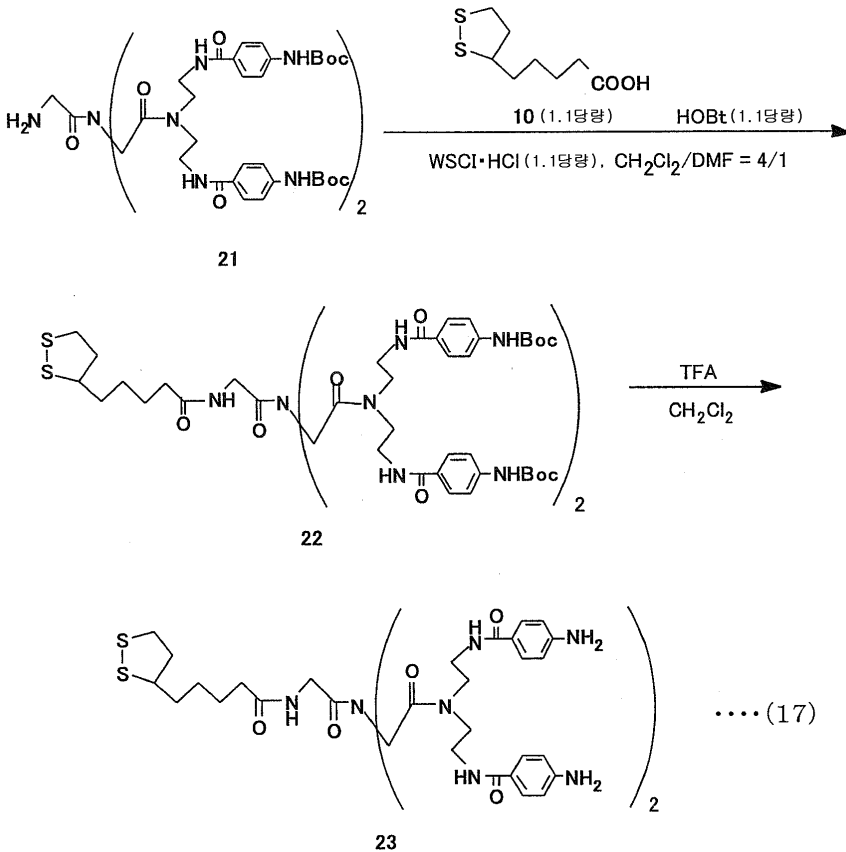
화합물 21은 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 먼저, 화합물 20(103mg, 74.4 μmol)을 3ml의 메탄올에 용해하고 10% Pd/C(84mg)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 수소 분위기 하 실온에서 47시간 동안 교반하고 Pd/C를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 결과적으로 화합물 21(84.9mg, 92% 수율)이 백색 고체의 형태로 수득되었다.

ESI-MS(positive) 측정이 화합물 21에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z 는 $630.3[(M+H+Na)^{2+}]$ 이었다. 이로부터 화합물 21의 구조가 확인되었다.

또한, 일반식 (17)에 나타낸 바와 같이 화합물 21을 HOBt(1.1 당량) 및 WSCI·HCl(1.0 당량)의 존재 하에서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}=4/1$ 로 혼합된 용매에서 티옥트산(화합물 10; 1.1당량)과 축합하였다. 결과적으로, 아마이드 화합물(화합물 22)이 75%의 수율로 수득되었다.

추가로 이렇게 수득한 화합물 22의 Boc 기는 TFA를 포함하는 산성의 조건 하 CH_2Cl_2 에서 제거하였다. 결과적으로 화합물 23(91% 수율)이 각각 방향족 아미노기를 갖는 4개의 탄화수소 유도체쇄를 포함하는 링커 화합물로서 수득되었다(수율 91%).

[일반식 17]



특히, 화합물 22 및 23은 하기 단계를 거쳐 수득되었다.

화합물 22는 하기 단계를 거쳐 수득되었다. 먼저, 화합물 10(12.8g, 62.2 μ mol)과 HOBt(8.4mg, 62.2 μ mol)를 10ml의 무수 디클로로메탄에 용해시켰다. 이렇게 형성된 혼합물은 아르곤 분위기하 차광된 곳의 0 $^{\circ}$ C에서 교반하여 반응 산물로서 화합물 10과 HOBt의 용액을 수득하였다. 그 다음 화합물 21(70.0mg, 56.6 μ mol)을 0.5ml의 디메틸포름아미드에 용해시키고 이 혼합물을 화합물 10 및 HOBt의 반응 용액에 한 방울씩 첨가하였다. 이렇게 형성된 혼합물을 실온에서 19시간 동안 교반하였고 에틸 아세테이트로 추출하여 추출물을 수득하였다. 추출물의 유기층을 10% 시트르산 수용액 및 소듐 하이드로젠 카르보네이트의 포화된 수용액으로 각각 한 차례 세정하였다. 유기층은 건조제로서 무수 소듐 설페이트를 사용하여 건조하였고 건조제를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 이렇게 농축된 잔류물은 실리카겔 분류 크로마토그래피(용매: 클로로포름/메탄올=15/1)로 정제하였다. 결과적으로 화합물 22(60.8mg, 75% 수율)가 백색 고체의 형태로 수득되었다.

ESI-MS (positive) 측정이 화합물 22에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 735.3[(M+ 2Na)²⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃)의 측정 결과는 δ = 7.76-7.79(1H, m), 7.55(1H, bs), 7.42(4H, d, J=8.6Hz), 7.35(5H, m), 7.13, 7.00, 6.97(3H, bs, bs, bs), 5.84(1H, bs), 4.04(2H, bs), 3.67(4H, band), 3.55(4H, band), 3.48(8H, band), 3.41, 3.29, 3.22(6H, bs, bs, bs), 3.16-3.03(2H, m), 2.39(1H, m), 2.02(1H, m), 1.84(1H, m), 1.58-1.52(4H, m), 1.51, 1.49(36H, s, s), 1.35(2H, m)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 22의 구조가 확인되었다.

화합물 23은 하기 단계를 거쳐 수득되었다. 먼저, 화합물 22(48.2mg, 33.8 μ mol)를 1ml의 디클로로메탄에 용해시키고 2ml의 트리플루오로아세트산을 첨가하였다. 상기 혼합물을 차광된 곳의 0 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 교반하였고 감압 농축시켰다. 이렇게 형성된 잔류물을 메탄올에 용해시키고 Dowex Marathon A(OH⁻ 형태)를 첨가하여 중화시키고 Dowex Marathon A를 여과하여 제거시킨 후 감압 농축시켰다. 결과적으로 화합물 23(31.6mg, 91% 수율)이 백색 고체의 형태로 수득되었다.

ESI-MS(positive) 측정이 화합물 23에 대하여 수행되었다. 측정 결과 m/z는 534.2[(M+ 2Na)²⁺]이었다. 이로부터 화합물 23의 구조가 확인되었다.

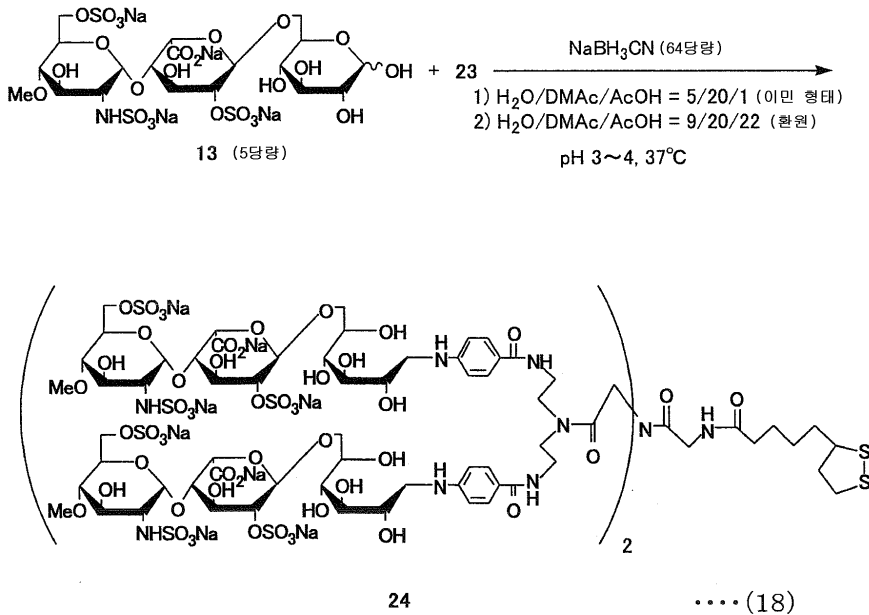
[실시예 4: 리간드의 합성]

실시예 3에서 수득한 링커 화합물 23을 사용하여 일반식(5)에 나타낸 구조를 갖는 리간드를 하기 단계를 거쳐 수득하였다. 상기 일반식(5)에서 m⁴, m⁵, m⁶ 및 m⁷은 모두 2이고, n은 1이며, p¹ 및 p²는 1이다.

하기 일반식 (18)에 나타낸 바와 같이 실시예 3에서 수득한 링커 화합물 23과 하기 일반식 (18)에 나타낸 당 분자로서 작용하는 화합물 13(5당량)을 H₂O/DMAc/AcOH=5/20/1로 혼합된 용매에 용해시키고 pH 3 내지 4의 37 $^{\circ}$ C에서 쉬프 염기

(일반식에서 이민 형태)를 형성시켰다. 그 다음 용매의 함량을 H₂O/DMAc/AcOH=9/20/22로 변화시키고 NaBH₃CN(64당량)을 첨가하여 pH 3 내지 4의 37°C에서 환원 반응(일반식에서 환원)을 진행시켰다. 그 다음 세파텍스 G-50을 구비한 겔 여과 크로마토그래피로 정제하고 탈염시켰다. 결과적으로 화합물 24가 4 단위의 당 분자를 포함하는 리간드로서 수득되었다.

[일반식 18]



특히, 화합물 24는 하기 단계를 거쳐 수득되었다. 링커 화합물 23(0.5mg, 488nmol)과 화합물 13(2.1mg, 2.4 μ mol)을 물 (25 μ l), 디메틸아세트아미드(100 μ l) 및 아세트산 (5 μ l)을 포함하는 혼합된 용매에 용해시켰다. 상기 혼합물을 밀봉된 튜브에 37°C에서 3시간 동안 가열하여 반응 산물로서 링커 화합물 23과 화합물 13의 용액을 수득하였다. 링커 화합물 23 및 화합물 13의 반응 용액에 NaH₃CN(2.18mg, 31.2 μ mol)에 아세트산(45 μ l)을 용해시켜 수득한 용액을 첨가하고, 상기 혼합물을 37°C에서 3일 동안 가열하였다. 이렇게 형성된 혼합물은 감압 농축시키고 세파텍스 G-50(1.6 x 80cm, PBS-0.3 NaCl)으로 정제하였다. 이렇게 형성된 목적 분획물은 감압 농축시키고 이렇게 농축된 잔류물은 세파텍스 G-25(1.6 x 40cm, 물)로 탈염시켰다. 이렇게 형성된 목적 분획물을 감압 농축시키고 물에 용해시킨 후 냉각 건조하였다. 결과적으로 화합물 24(1.0mg, 47% 수율)가 백색 고체의 형태로 수득되었다.

수득될 수 있는 화합물 24의 질량은 4369.37 Da(달톤)이다. 일반식 (18)에 나타난 화합물 24는 비행시간형 질량 분석계 측정의 의해 수득된 m/z 1368.93의 피크에서 삼가 이온[M-13Na+ 10H]³⁺으로서 측정되었다. 또한, NMR 스펙트럼 측정 결과는 δ = 7.70-7.55(8H, m), 6.78-6.64(8H, m), 5.34(4H, s), 5.20(8H, d, J=3.3Hz), 5.15(4H, bs), 4.52(4H, bs), 4.29(8H, m), 4.19(8H, m), 4.05(4H, m), 3.99(4H, band), 3.87-3.80(16H, band), 3.73-3.66(24H, m), 3.87(3H, m), 3.57(12H, s), 3.49(4H, dd, J=3.8, 9.7), 3.39-3.34(14H, m), 3.26-3.19(12H, m), 2.60(1H, m), 2.21-2.13(2H, m), 1.77(1H, m), 1.50-1.13(4H, m)임을 확인하였다. 이로부터 화합물 24의 구조가 확인되었다.

[실시예 5: 리간드 화합물을 사용한 SPR 측정]

SPR 측정은 일반식(4)에 나타난 구조를 갖되, 상기 식에서 m¹, m² 및 m³은 모두 2이고 n은 2인 리간드인, 실시예 2에서 수득한 화합물 14를 이용하여 수행되었다.

즉, 하기 단계를 거쳐 리간드(화합물 14)는 표면에 적층된 금박을 구비한 유리 기판의 표면에 고정화되어 헤파린 결합 단백질인 재조합 von Willebrand's Factor(이하에서 rvWF로 약칭된다)와 화합물 14의 결합 특성을 측정하였다.

(5-1 리간드 도입 칩의 제조)

먼저, 13mm x 20mm x 0.7mm의 유리 기판에 50nm의 금박을 적층함으로써 수득한 센서 칩(Japan Laser Electronics Co. Ltd.에 의해 제조됨)을 UV 오존 세정기(제품명: NL-UV253, Japan Laser Electronics Co. Ltd.) 내에 위치시키고 자외선에 20분 동안 노출시켜서 센서 칩의 금 표면을 오존으로 세정하였다. 이어서, 센서 칩은 셀 내에 있는 TeflonTM 셀 홀더 상에 올려놓았다. 0.1mM의 화합물 14를 포함하는 50 μ l의 메탄올 용액을 셀에 첨가하여 밀봉한 후 Bio Dancer(제품명, New Brunswick Scientific Co., Ltd.)를 이용하여 실온에서 하룻밤 동안 가볍게 셰이킹(shaking)하였다. 그 다음 셀을 100 μ l의 메탄올로 여섯 차례 세정하고 센서 칩을 TeflonTM 셀 홀더로부터 제거하였다. 제거된 센서 칩을 메탄올로 채워진 페트리 디쉬에 침지시키고 페트리 디쉬를 가볍게 셰이킹하여 두 차례 세정하였다. 그 다음 센서 칩을 상기된 바와 같은 방식과 같은 순서로 물과 메탄올로 세정하여 리간드 도입 칩(리간드 담체)을 수득하였다. 리간드 담체를 공기 중에 건조시키고 표면 플라즈몬 공명 장치 SPR670(제품명, Japan Laser Electronics Co., Ltd.)의 센서 칩 카트리지(유리 프리즘) 상에 위치시켰다.

(5-2 리간드 도입 칩과 단백질 간의 소수성 상호작용으로 인한 비특이적인 상호작용의 시험)

런닝 버퍼로서 작용하는 인산완충용액(PBS; pH 7.4)을 표면 플라즈몬 공명 장치에 의해 측정된 공명 각도 변화가 일정하여질 때까지 25°C에서 리간드 도입 칩 상에 15 μ l/분의 유속으로 흘려주었다. 그 다음 SPR 측정을 위하여 단백질로서 작용하는 소혈청 알부민(BSA)을 런닝 버퍼에 용해시켜 1mg/ml BSA 농도로 BSA 용액을 제조하였다. 이어서, 60 μ l의 BSA 용액을 리간드 도입 칩의 표면에 15 μ l/분의 유속으로 주입하였다.

BSA 용액이 흐르는 리간드 도입 칩의 표면에 형성된 금과 단백질로서 작용하는 BSA간의 소수성 상호작용을 기반으로 하는 비특이적 상호작용을 시험하기 위하여 표면 플라즈몬 공명 장치를 사용하는 측정이 수행되었다. 측정 결과 거의 어떠한 공명 각도의 변화도 발견되지 않았다. 이로부터 칩 상에 도입된 화합물 14를 포함하는 리간드 도입 칩이 단백질과 리간드 도입 칩 간의 비특이적인 상호작용의 영향을 감소시키기 때문에 단백질과 당간의 결합 상호작용은 정량적으로 평가될 수 있는 것으로 해석된다.

(5-3 rvWF의 해리 상수의 분석)

(5-1에서 수득된) 리간드 도입 칩 상에 주입된 BSA 용액(5-2) 대신에 rvWF 용액을 사용한 점을 제외하고는 상기 (5-2)와 동일한 단계를 거쳐 rvWF 용액을 리간드 도입 칩의 표면에 주입하였다. rvWF를 런닝 버퍼에 용해시켜서 125nM 내지 1600nM 농도의 rvWF 용액을 제조하였다.

rvWF 용액을 다양한 농도로 리간드 도입 칩의 표면에 주입하였고 표면 플라즈몬 공명 장치를 사용하여 화합물 14와 rvWF간의 결합을 기반으로 하는 공명(RU; 공명 단위)을 rvWF 용액의 주입 시간(초)의 함수로서 측정하였다. 상기 결과를 도 1에 나타내었다.

rvWF와 리간드 도입 칩을 재사용하기 위하여 상기 리간드 도입 칩의 표면에 10mM의 NaOH를 1분 또는 그 이상 동안 60 μ l/분의 유속으로 흘려주었다.

또한, 해리 상수(K_D), 결합 속도 상수 (k_a) 및 해리 속도 상수 (k_d)는 화합물 14(리간드)와 rvWF의 결합 특성을 측정하여 수득한 결과(도 1)를 기반으로 해서 표면 플라즈몬 공명 장치(SPR670)에 부착된 소프트웨어를 사용하여 계산되었다. 상기 결과를 표 1에 나타내었다.

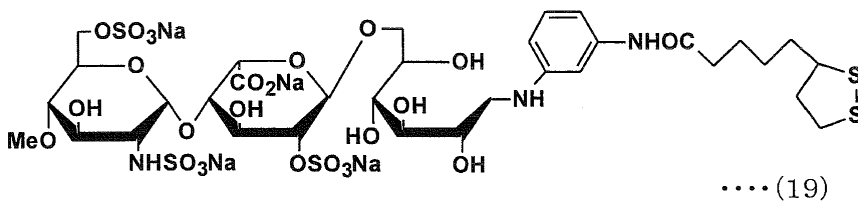
표 1.

| 리간드 | 화합물 14 | 화합물 25 |
|---|-----------------------|-----------------------|
| 해리 상수 K_D (M) | 1.2×10^{-6} | 2.6×10^{-6} |
| 결합 속도 상수 k_a ($M^{-1} \text{ sec}$) | 6.60×10^3 | 8.38×10^3 |
| 해리 속도 상수 k_d (sec^{-1}) | 8.05×10^{-3} | 2.19×10^{-2} |

[비교 실시예]

문헌 1에 기술된 공정에 따라 화합물 25 즉, 하기 일반식(10)에 나타낸 구조를 갖는 한 개 단위의 올리고당을 포함하는 하기 일반식(19)에 나타낸 구조를 갖는 리간드를 제조하였다.

[일반식 19]



이어서, 화합물 14 대신에 화합물 25를 사용한다는 점을 제외하고 상기 실시예 5의 (5-1)의 단계를 거쳐 리간드 도입 칩을 수득하였다. 실시예 5의 (5-2)의 단계를 거쳐 리간드 도입 칩과 단백질 간의 소수성 상호작용을 기반으로 하는 비특이적 상호작용이 없다는 것을 확인하였다. 그 다음 실시예 5의 (5-3)의 단계를 거쳐 rvWF 용액을 리간드 도입 칩의 표면에 주입하고 표면 플라즈몬 공명 장치를 사용하여 rvWF 용액의 주입 시간의 함수로 공명 각도에서의 변화를 측정해서 화합물 25와 rvWF의 결합 특성을 시험하였다. 상기 결과는 도 2에 나타내었다.

또한, 해리 상수(K_D), 결합 속도 상수 (k_a) 및 해리 속도 상수 (k_d)는 도 2를 기반으로 해서 실시예 5의 (5-3) 단계를 거쳐 계산되었다. 상기 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1로부터 본 발명의 실시예에 따른 리간드인 화합물 14를 사용한 리간드 도입 칩은 화합물 25를 사용한 리간드 도입 칩보다 rvWF에 대하여 더 높은 친화력을 나타내는 것을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 실시예에 따른 리간드 도입 칩을 이용하여 더 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 측정할 수 있다. 리간드 도입 칩은 당 분자의 구조를 규명 및/또는 당 분자의 생물학적 활성을 평가하는데 매우 적합하다.

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

산업상 이용 가능성

상술한 바와 같이 본 발명은 단백질 분석용 지지체 또는 그와 같은 것들에 높은 재현성을 갖도록 3 단위 또는 4 단위의 당 분자를 이차원적으로 배열할 수 있는 링커 화합물을 제공한다. 이러한 링커 화합물을 이용하여 단백질의 비특이적인 상호작용은 거의 완전히 무시할 수 있다.

또한, 본 발명의 리간드는 링커 화합물과 이에 도입된 당 분자를 포함한다. 리간드를 이용하여 3 단위 또는 4 단위의 당 분자를 집합할 수 있고, 이에 의하여 높은 재현성으로 당 분자의 생물학적 활성을 측정하는 것이 가능하다.

따라서 본 발명은 링커 화합물과 리간드를 이용하여 생물분자의 상호작용을 검출하는 생명공학 산업에 적용할 수 있다. 본 발명은 특히 칩 기술 및 친화 컬럼이 이용되는 분야에서 유용하다. 본 발명은 또한 바이오프로브 및 바이오센서가 이용되는 분야에서 유용하다. 본 발명의 다른 적용할 수 있는 분야는 의약 산업 및 진단과 검사를 위한 의료 기술 분야를 포함한다.

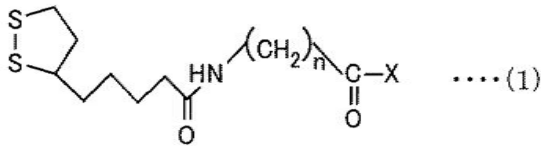
(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 일반식 1로 표시되는 구조를 가지며,

X가 말단에 방향족 아미노기를 가지며 주쇄에 탄소-질소 결합을 갖을 수 있는 탄화수소 유도체쇄를 3쇄 또는 4쇄 포함하여 된 다분자 구조부위인 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

[일반식 1]



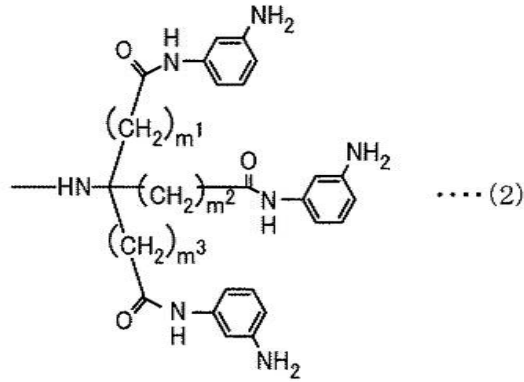
상기 식에서 n은 1 내지 6의 정수이다.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 X는 하기 일반식 2로 표시되는 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

[일반식 2]



상기 식에서 m^1, m^2, m^3 은 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이다.

청구항 3.

제 2 항에 있어서,

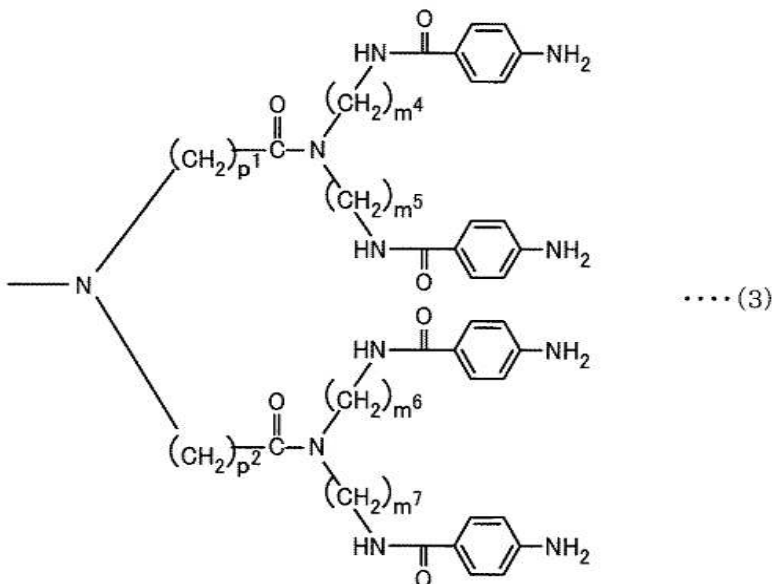
상기 일반식 2에서 m^1, m^2, m^3 은 모두 2인 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

청구항 4.

제 1 항에 있어서,

상기 X는 하기 일반식 3으로 표시되는 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

[일반식 3]



상기 식에서 m^4, m^5, m^6, m^7, p^1 및 p^2 는 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이다.

청구항 5.

제 2 항에 있어서,

상기 일반식 3에서 m^4, m^5, m^6, m^7 은 모두 2이며, p^1, p^2 는 모두 1인 것을 특징으로 하는 링커 화합물.

청구항 6.

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 링커 화합물의 방향족 아미노기에 당 분자를 도입하여 된 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 7.

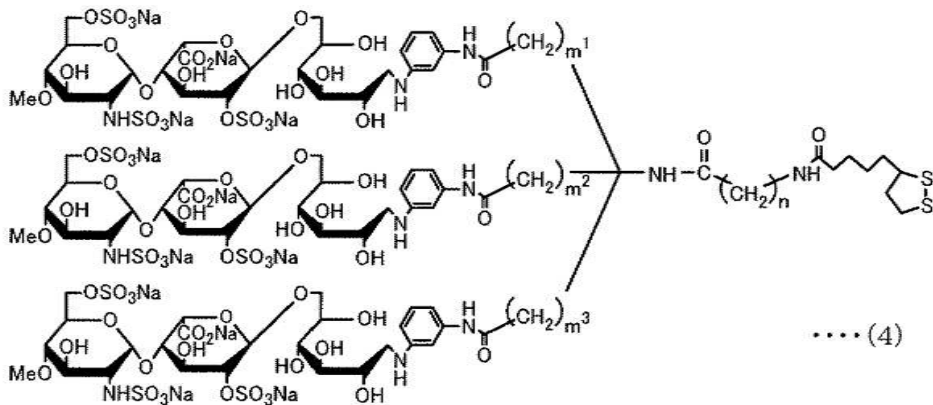
제 6 항에 있어서,

상기 당 분자는 단당류, 올리고당류, 다당류 중 적어도 하나에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 8.

하기 일반식 4로 표시되는 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 리간드.

[일반식 4]



상기 식에서 m^1, m^2, m^3 및 n 은 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이다.

청구항 9.

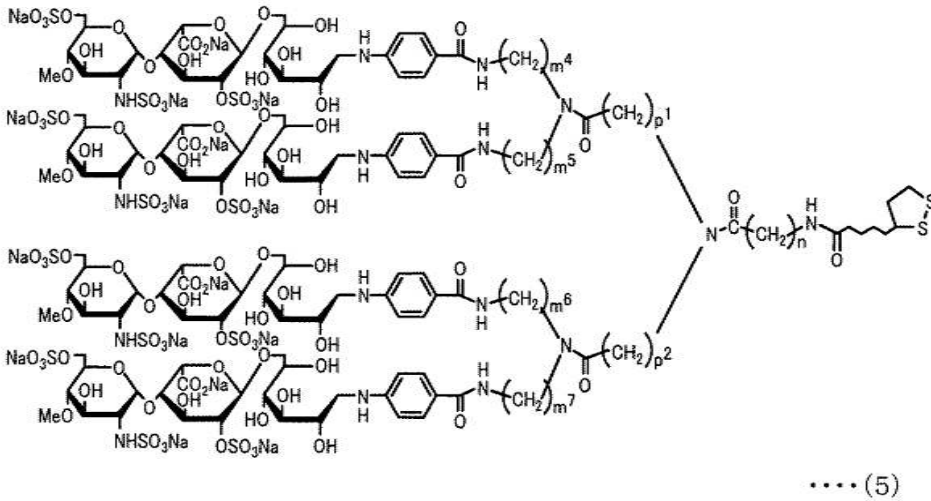
제 8 항에 있어서,

상기 일반식 4에서 m^1, m^2 및 m^3 은 모두 2이며, n 은 1인 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 10.

하기 일반식 5로 표시되는 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 리간드.

[일반식 5]



상기 식에서, m^4 , m^5 , m^6 , m^7 , n , p^1 및 p^2 는 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이다.

청구항 11.

제 10 항에 있어서,

상기 일반식 5에서, m^4 , m^5 , m^6 , m^7 은 모두 2이고, n 은 1이며, p^1 및 p^2 는 모두 1인 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 12.

티옥트산(thioctic acid)과 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분지쇄를 3쇄 또는 4쇄 갖는 아미노 화합물과의 축합 반응을 실시하는 단계와,

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

청구항 13.

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 링커 화합물과 당 분자를 이용하여 환원 아미노화 반응을 실시하는 것을 특징으로 하는 리간드의 제조방법.

청구항 14.

당분자를 지지체의 표면에 배열시키는 당분자의 도입방법으로서,

제 6 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 리간드를 포함하는 용액과 표면에 금속을 갖는 지지체를 접촉시키는 것을 특징으로 하는 당분자의 도입방법.

청구항 15.

제 6 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 리간드를 표면에 금속을 갖는 지지체상에 고정화시켜 된 것을 특징으로 하는 리간드 담체.

청구항 16.

제 15 항에 있어서,

표면 플라즈몬 공명측정용의 센서 칩으로서 사용되는 리간드 담체.

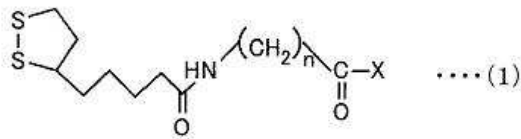
청구항 17.

제 15 항에 있어서,

친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)용의 컬럼에 사용되는 리간드 담체.

요약

링커 화합물은 하기 일반식(1)의 구조를 갖되, 상기 식에서 n은 1 내지 6의 정수이고 X는 각각 말단에 아미노기를 갖는 3쇄 또는 4쇄의 탄화수소 유도체쇄를 포함하는 다분지 구조 부위로서 작용하는 구조와 주쇄에는 탄소-질소 결합을 갖는다. 리간드는 상기 링커 화합물과 링커 화합물에 도입되는 당 분자를 포함한다.



대표도

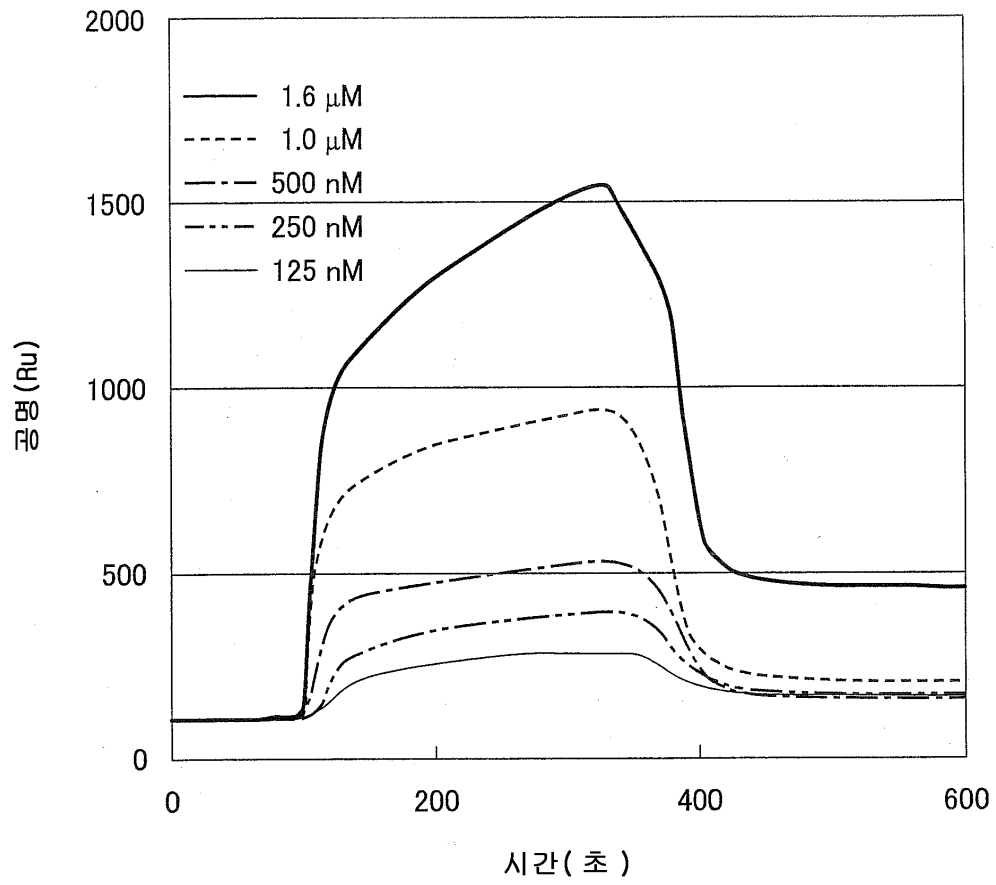
도 1

색인어

링커 화합물, 리간드, 리간드 담체, 당 분자, 표면 플라즈몬 공명

도면

도면1



도면2

