



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0122961
C07H 15/04 (2006.01) (43) 공개일자 2006년11월30일

(21) 출원번호	10-2006-7019099	(87) 국제공개번호	WO 2005/077965
(22) 출원일자	2006년09월15일	(43) 공개일자	2006년11월30일
심사청구일자	2006년09월15일		
번역문 제출일자	2006년09월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP2005/003220	(87) 국제공개번호	WO 2005/077965
국제출원일자	2005년02월18일	국제공개일자	2005년08월25일

(30) 우선권주장 JP-P-2004-00041994 2004년02월18일 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 수다, 야수오
일본 890-0005 카고시마 카고시마시 시모이시키 1-13-1-106

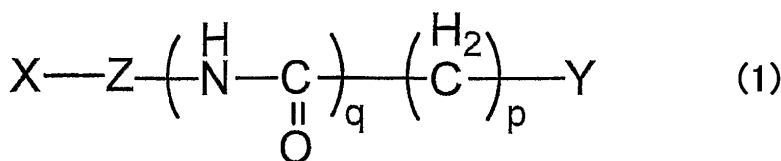
(74) 대리인 이래호

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 당쇄 리간드 복합체, 및 그 리간드 복합체를 이용한단백질의 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 단백질의 기능 해석에 효과적으로 이용할 수 있는 신규 리간드 복합체, 리간드 담지체, 및, 단백질의 분석 방법을 제공한다. 리간드 복합체는 하기 일반식 (1) (식 중, n, p는 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 X로서, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께, 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방한 탄화수소 유도쇄를 1쇄 또는 2쇄 또는 3쇄를 포함하여 이루어지는 구조를 구비하며, 상기 Y로서, 유황 원자를 포함하는 탄화수소 구조를 구비하고, 상기 Z로서, 탄소-탄소 결합 또는 탄소-산소 결합을 가지는 직쇄 구조를 구비하고 있는 링커 화합물과, 환원 말단을 가지는 당이 상기 방향족 아미노기를 통하여 결합되어 있는 구조이다.



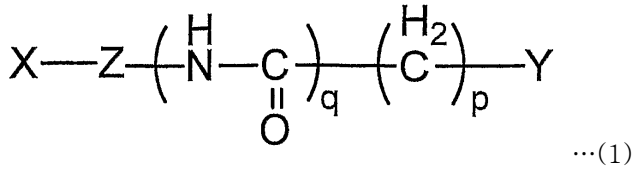
대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

일반식 (1)



(식 중, p, q는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고,

상기 X로서, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께, 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방한 탄화수소 유도쇄를 1 쇠 또는 2 쇠 또는 3 쇠를 포함하여 이루어지는 구조를 구비하며, 상기 Y로서, 유황 원자 또는 유황 원자를 포함하는 탄화수소 구조를 구비하고, 상기 Z로서, 탄소-탄소 결합 또는 탄소-산소 결합을 가지는 직쇄 구조를 구비하고 있는 링커 화합물과, 환원 말단을 가지는 당이 상기 방향족 아미노기를 통하여 결합되어 있는 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 2.

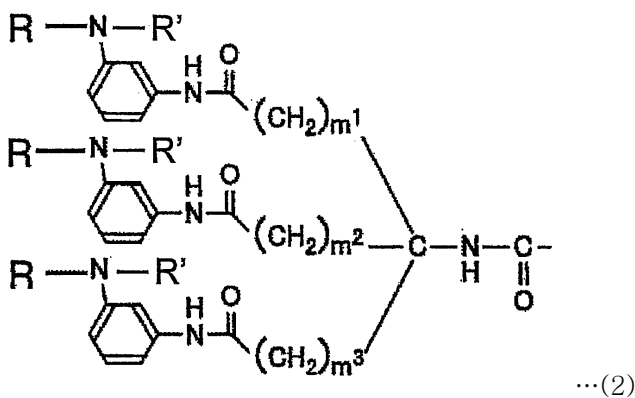
제 1항에 있어서,

상기 Y는, S-S 결합 또는 SH기를 포함하는 탄화수소 구조인 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 X는, 일반식 (2)



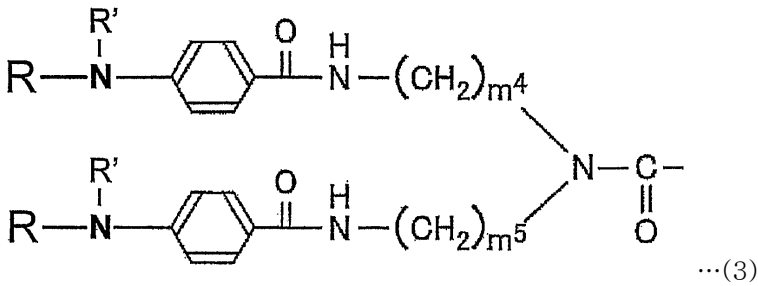
(식 중, m¹, m², m³는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수. R'는 수소(H) 또는 R.)로 나타내어지는 구조를 구비하고,

상기 R은 당쇄 유래 화합물인 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 4.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 X는, 일반식 (3)

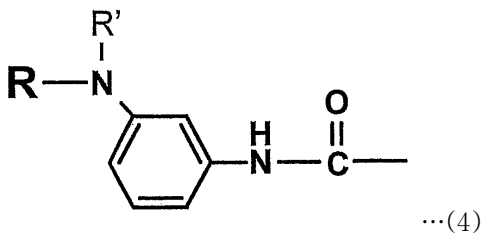


(식 중, m^4, m^5 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수. R'는 수소(H) 또는 R.)으로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 R은 유래 화합물인 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 5.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 X는, 일반식 (4)

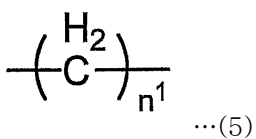


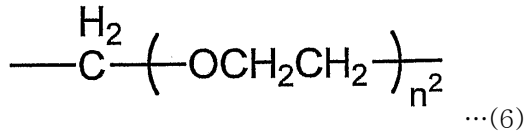
(식 중, R'는 수소(H) 또는 R)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 R은 당쇄 유래 화합물인 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 6.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 Z는, 식 (5) 또는 식 (6)

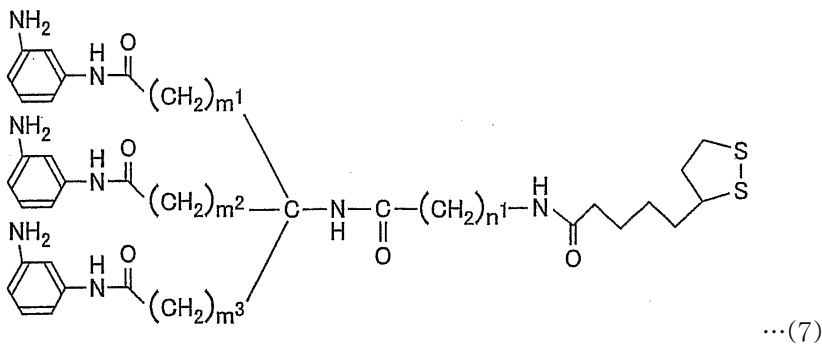




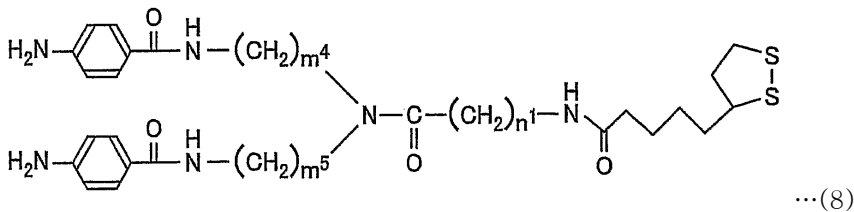
(식 중, n^1, n^2 는 각각 1 이상 6 이하의 정수)으로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것을 특징으로 하는 리간드 복합체.

청구항 7.

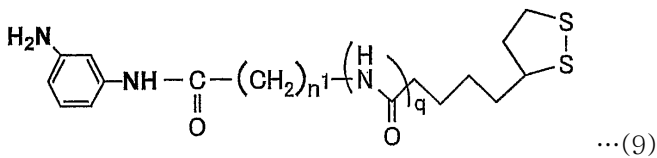
일반식 (7)



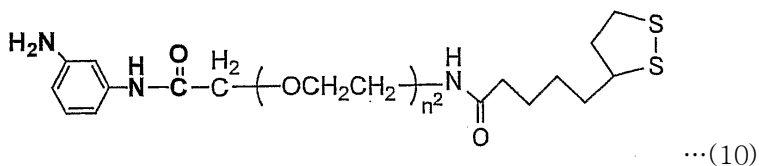
(식 중, m^1, m^2, m^3 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (8)



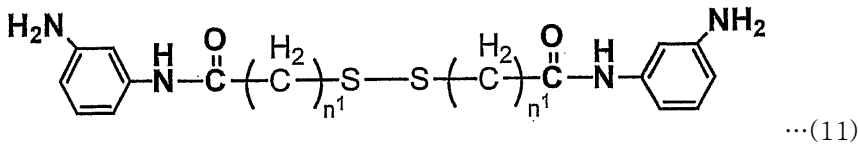
(식 중, m^4, m^5 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (9)



(식 중, n^1, q 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (10)



(식 중, n^2 는 1 이상 6 이하의 정수)으로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (11)



(식 중, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물과,

환원 말단을 가지는 당을 이용하여 환원 아미노화 반응을 행하는 것을 특징으로 하는 리간드 복합체의 제조 방법.

청구항 8.

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 기재된 리간드 복합체를 표면에 금속을 가지는 지지체 상에 고정화시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는 리간드 담지체.

청구항 9.

제 8항에 있어서,

단백질 분석에 사용되는 것을 특징으로 하는 리간드 담지체.

청구항 10.

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 기재된 리간드 복합체를 지지체와 접촉시킴으로써 당해 리간드 복합체를 지지체 상에 고정화시킨 리간드 담지체를 작성하는 공정과,

상기 리간드 담지체를 단백질 용액과 접촉시킨 후, 분자간 상호 작용의 측정을 행하는 공정과,

상기 분자간 상호 작용의 측정 후에 질량 분석을 행하여, 상기 리간드 담지체에 결합되어 있는 단백질을 동정하는 공정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단백질의 분석 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 링커 화합물에 환원 말단을 가지는 당쇄가 도입된 신규 리간드 복합체, 및, 이 리간드 복합체를 금이나 은, 구리 등의 금속으로 표면을 코팅한 칩 상에 집합화시켜 고정화한 리간드 담지체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 리간드 복합체를 이용한 단백질의 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

생체 내에 존재하는 여러 가지 당은 생물의 활동이나 생명을 유지하기 위한 메커니즘 중에서 중요한 역할을 하고 있다. 이와 같은 당의 기능을 정밀하게 해명하기 위해서는 당의 복잡한 구조에 근거하여 그것들의 기능을 해석할 필요가 있다. 당의 기능 해석에는 구조가 해명되어 있는 당쇄를 이용하여 당의 구조를 일부씩 재현하고, 이에 의해 당 전체의 구조와 기능의 관계를 밝히는 기법이 사용된다.

상기 당의 기능 해석 기법으로서, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(이하, SPR이라 기재한다)이 알려져 있다. 즉, 당의 일부를 모의(模擬)한 올리고당을 포함하여 이루어지는 리간드 복합체를 센서 칩 표면에 도입하고, 이 리간드 복합체가 도입되어 이루어지는 센서 칩을 이용하여 올리고당과 특이적으로 상호 작용하는 단백질 등의 물질을 특정한다. 이에 의해, 올리고당 구조에 근거하는 생물 활성의 올바른 평가를 행할 수 있다.

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

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

[특허문헌 1] 일본 특허 공개 제 2003-83969호 공보(2003년 3월 19일 공개)

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

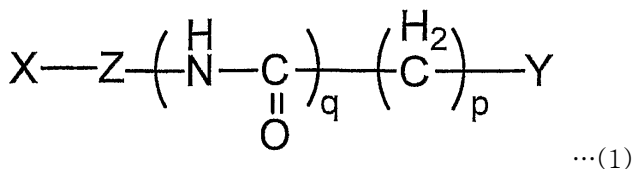
그러나, 상기 각 문헌에 기재된 리간드 복합체에서, 도입되는 당쇄(올리고당쇄)는 발명자들에 의해 합성된 황산화당에 한정되어 있으며, 시판되는 환원 말단을 가지는 말토오스, 락토오스 등의 올리고당을 도입하여 침화할 수 있는지 여부에 대해서는 밝혀져 있지 않다. 또한, 상기의 문헌에 기재된 리간드 복합체를 고정화하여 얻어진 센서 칩을 SPR을 이용한 측정에 사용한 후에, 칩 상의 당쇄와 결합한 단백질의 동정에 사용하는 이용 방법은, 종래부터 제창되고는 있었지만, 데이터적으로 만족할 만한 것은 존재하지 않았다.

본 발명은 상술한 문제점에 착안하여 이루어진 것으로서, 시판되는 환원 말단을 가지는 당을 도입하여 이루어지는 신규 리간드 복합체, 및, 단백질의 동정에 사용할 수 있는 리간드 담지체를 제공하는 것을 목적으로 하는 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명자는 상기 과제를 해결하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 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 18일) 시점에서 미공개)에 기재된 링커 화합물(모두 본 발명자들에 의해 알아낸 것)에 시판되는 말토오스 또는 락토오스를 반응시키고, 각각 말단에 α-글루코피라노오스(glucopyranose) 또는 β-갈락토피라노오스(galactopyranose)를 가지는 리간드 복합체를 합성하였다. 또한, 본 발명자는 이들 리간드 복합체를 금 코팅 칩에 고정화시킨 슈가 칩(리간드 담지체)을 제작하였다. 그리고 이들 슈가 칩을 이용하여 단백질과의 상호 작용을 검토하기 위하여, SPR 측정으로 상호 작용을 확인한 후 당해 슈가 칩을 그대로 MALDI-TOF/MS에 제공한 결과, 각 슈가 칩에 결합되는 단백질을 동정할 수 있음을 알아내고 본 발명을 완성하는데 이르렀다.

즉, 본 발명의 리간드 복합체는, 일반식 (1)



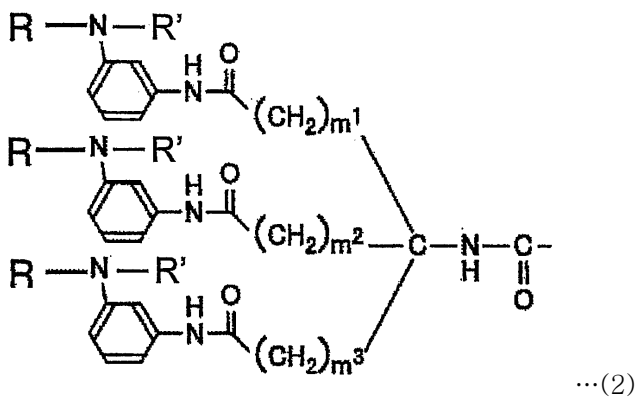
(식 중, p, q는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내지는 구조를 구비하고, 상기 X로서, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께, 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방한 탄화수소 유도쇄를 1 쇠 또는 2 쇠 또는 3 쇠를 포함하여 이루어지는 구조를 구비하며, 상기 Y로서, 유황 원자 또는 유황 원자를 포함한 탄화수소 구조를 구비하고, 상기 Z로서, 탄소-탄소 결합 또는 탄소-산소 결합을 가지는 직쇄 구조를 구비하고 있는 링커 화합물과, 환원 말단을 가지는 당이 상기 방향족 아미노기를 통하여 결합되어 있는 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하고 있다.

상기 탄화수소 유도쇄란, 탄소 및 수소로 이루어지는 탄화수소쇄에서 일부의 탄소나 수소가 다른 원자나 치환기로 치환되어 있어도 무방한 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), 아마이드 결합(CO-NH 결합)으로 치환되어 있어도 무방한 것을 가리킨다.

또한, 상기 유황 원자를 포함하는 탄화수소 구조란, 탄소 및 수소로 이루어지는 탄화수소 구조에서 일부의 탄소가 유황으로 치환되어 있는 것을 의미한다. 또한, 이 유황 원자를 포함하는 탄화수소 구조는 쇠상(직쇄, 분기쇄 양쪽 모두를 포함한다)이거나, 환상이라도 무방하며, 또한, 쇠상 구조 및 환상 구조의 양 구조를 포함하고 있어도 무방한 것으로 한다.

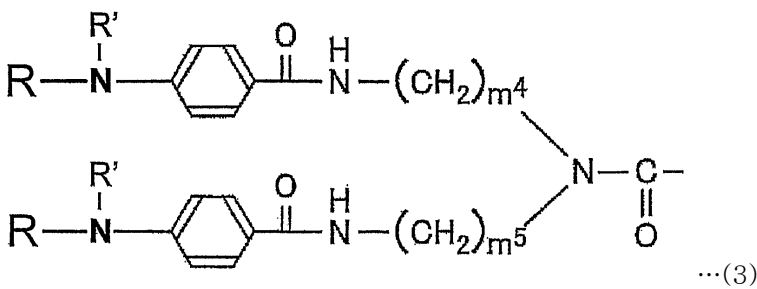
본 발명의 리간드 복합체에 있어서, 상기 링커 화합물은, 상기 Y로서, S-S 결합 또는 SH기를 포함하는 탄화수소 구조를 구비하고 있는 것이라도 무방하다. 즉, 상기 유황 원자를 포함한 탄화수소 구조 중에 디설파이드 결합(S-S 결합) 또는 티올기(SH기)가 포함되어 있어도 무방하다.

본 발명의 리간드 복합체에 있어서, 상기 X는, 일반식 (2)



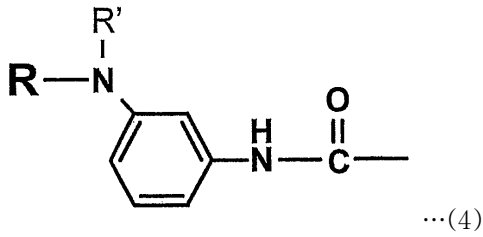
(식 중, m^1, m^2, m^3 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수. R'는 수소(H) 또는 R.)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 R은 당쇄 유래 화합물인 것이라도 된다.

본 발명의 리간드 복합체에 있어서, 상기 X는, 일반식 (3)



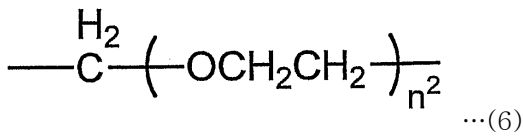
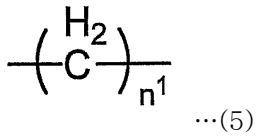
(식 중, m^4, m^5 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수. R'는 수소(H) 또는 R.)으로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 R은 당쇄 유래 화합물인 것이라도 무방하다.

본 발명의 리간드 복합체에 있어서, 상기 X는, 일반식 (4)



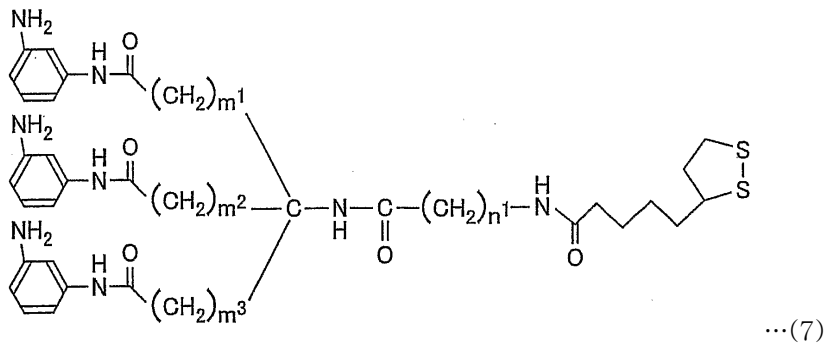
(식 중, R'는 수소(H) 또는 R)로 나타내어지는 구조를 구비하고, 상기 R은 당쇄 유래 화합물인 것이라도 무방하다.

본 발명의 리간드 복합체에 있어서, 상기 Z는, 식 (5) 또는 식 (6)

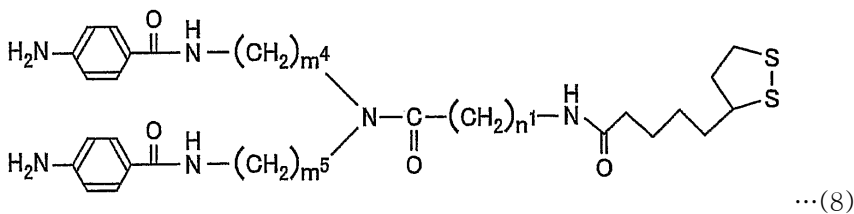


(식 중, n¹, n²는 각각 1 이상 6 이하의 정수)으로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 것이라도 무방하다.

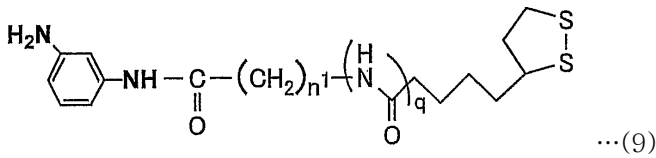
또한, 본 발명에 따른 리간드 복합체의 제조 방법은, 일반식 (7)



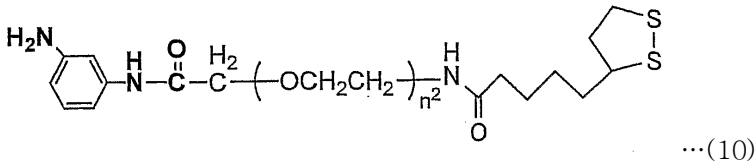
(식 중, m¹, m², m³는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수, n¹은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (8)



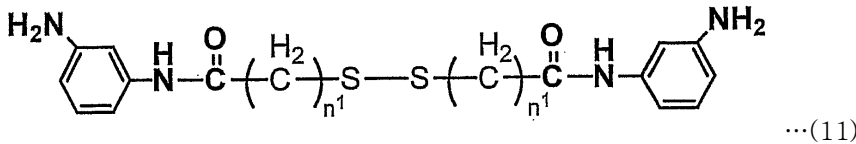
(식 중, m⁴, m⁵는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수, n¹은 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (9)



(식 중, n^1 , q 는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (10)



(식 중, n^2 는 1 이상 6 이하의 정수)으로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물, 또는, 일반식 (11)



(식 중, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물과, 환원 말단을 가지는 당을 이용하여 환원 아미노화 반응을 행하는 것을 특징으로 하고 있다.

또한, 본 발명에 따른 리간드 담지체는, 상기의 어느 하나의 리간드 복합체를 표면에 금속을 가지는 지지체 상에 고정화시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는 것이다. 그리고 상기 리간드 담지체는, 단백질 분석에 사용해도 된다.

또한, 본 발명에 따른 단백질의 분석 방법은, 상기의 어느 하나의 리간드 복합체를 지지체와 접촉시킴으로써 당해 리간드 복합체를 지지체 상에 고정화시킨 리간드 담지체를 작성하는 공정과, 상기 리간드 담지체를 단백질 용액과 접촉시킨 후 분자간 상호 작용의 측정을 행하는 공정과, 상기 분자간 상호 작용의 측정 후에 질량 분석을 행하여 상기 리간드 담지체에 결합되어 있는 단백질을 동정하는 공정으로 이루어지는 것을 특징으로 하고 있다.

실시예

이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

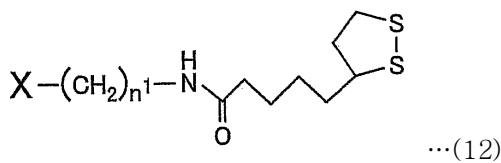
본 발명의 리간드 복합체는, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 센서 칩이나 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)의 담지체 등의 단백질 분석용 지지체에 고정화되어 이용되는 것으로, 지지체 표면과 결합될 수 있는 링커 화합물과, 분석 대상이 되는 단백질 등과 특이적으로 상호 작용할 수 있는 당쇄로 구성되어 있다. 상기 SPR이나 친화성 크로마토그래피에서는, 당분자와 특이적으로 상호 작용하는 단백질 등의 물질을 특정하는 것이나 분리하는 것을 목적으로 하고 있다. 따라서, 상기 리간드 복합체는 단백질 등의 물질과 비특이적으로 상호 작용을 일으키지 않는 것일 필요가 있다.

따라서, 본 발명의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (1)로 나타내어지는 구조를 구비한 링커 부분(링커 화합물)을 가지고 있다. 이 구조 중의 Y로 나타내는 구조 중에는 유황 원자(S)가 포함되어 있으며, 이 유황 원자(S)는, 예를 들어, 단백질 분석용 지지체 표면에 코팅된 금속(예를 들어, Au)과, 금속-유황 결합(예를 들어, Au-S 결합)을 형성하여, 지지체에 견고하게 결합될 수 있다.

또한, 상기 링커 화합물은, 상기 일반식 (1)의 X로서, 말단에 방향족 아미노기를 가짐과 함께 주쇄에 탄소-질소 결합을 가지고 있어도 무방한 탄화수소 유도쇄를 1 쇠 또는 2 쇠 또는 3 쇠를 포함하여 이루어지는 구조를 구비하고 있다. 이에 의해, 상기 링커 화합물은 단백질 분석용 지지체 표면에 당분자를 집합화하여 배열할 수 있음과 함께, 말단에 방향족 아미노기를 가지고 있기 때문에, 당분자를 간편하게 도입할 수 있다.

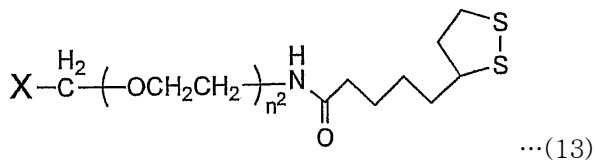
또한, 상기 링커 화합물은, 상기 일반식 (1)의 Z로서, 탄소-탄소 결합 또는 탄소-산소 결합을 가지는 직쇄 구조를 구비하고 있다. 보다 구체적으로, 화합물의 제조의 편의상, Z는 상기 식 (5) 또는 식 (6)으로 나타내어지는 구조를 가지는 것이 바람직하다. 한편, 상기 일반식 (1)에 있어서, p, q는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않는다. 또한, 상기 식 (5)의 n¹ 및 식 (6)의 n²는 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않는다.

또한, 상기 링커 화합물로서, 상기 일반식 (1)에 있어서, p가 4이고, q가 1이며, Y로서, S-S 결합을 가지는 환상 탄화수소 구조를 구비하고 있고, Z가 상기 식 (5)인 구조를 가지고 있는 것을 들 수 있다. 상기 링커 화합물로서는, 예를 들어, 일반식 (12)



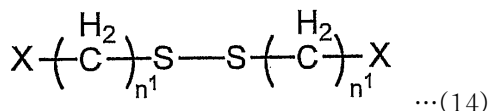
로 나타내어지는 구조를 구비하는 것이라도 무방하다. 이 링커 화합물은, 치옥트산(thioctic acid)을 원료로 하여 합성하는 것이 가능하다.

또한, 상기 링커 화합물로서, 상기 일반식 (1)에 있어서, p가 4이고, q가 1이며, Y로서, S-S 결합을 가지는 환상 탄화수소 구조를 구비하고 있고, Z가 상기 식 (6)인 구조를 가지고 있는 것을 들 수 있다. 상기 링커 화합물로서는, 예를 들어, 일반식 (13)



으로 나타내어지는 구조를 구비하는 것이라도 무방하다. 이 링커 화합물은 치옥트산을 원료로 하여 합성하는 것이 가능하다.

또한, 상기 링커 화합물로서, 상기 일반식 (1)에 있어서, p가 0이고, q가 0이며, Y로서, 유황 원자(S)를 가지고 있고, Z가 상기 식 (5) 또는 상기 식 (6)인 구조가 2량체를 형성하고 있는 것을 들 수 있다. 상기 링커 화합물로서는, 예를 들어, 일반식 (14)



로 나타내어지는 구조를 구비하는 것이라도 무방하다.

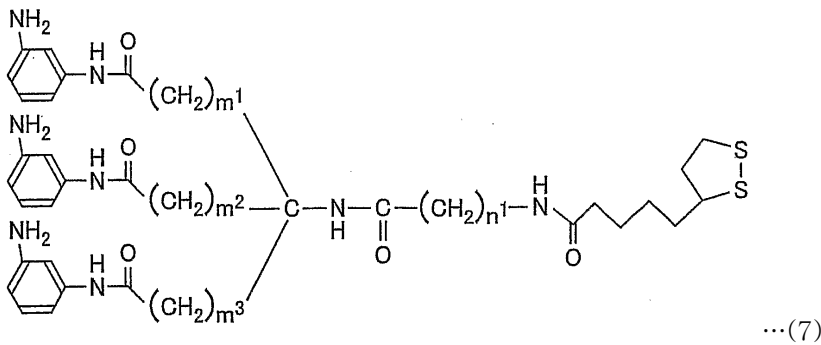
상기 일반식 (12), 일반식 (13) 및 일반식 (14)로 나타내어지는 링커 화합물은 디설파이드 결합(S-S 결합)이 포함되어 있고, 이 S-S 결합 중의 유황(S)은, 예를 들어, 단백질 분석용 지지체 표면에 코팅된 금속(예를 들어, Au)과 금속-유황 결합(예를 들어, Au-S 결합)을 형성하여, 지지체에 견고하게 결합될 수 있다. 한편, 상기 Y로서는, 일반식 (12), 일반식 (13) 또는 일반식 (14)로 나타내어지는 것으로 한정되는 것은 아니지만, 금속-유황 결합(Au-S 결합)을 용이하게 형성할 수 있으므로, S-S 결합 또는 SH기가 포함되어 있는 탄화수소 구조인 것이 바람직하다.

그리고 본 발명의 리간드 복합체는, 상기 링커 화합물의 방향족 아미노기에 환원 말단을 가지는 당쇄가 도입되어 조제된다. 바꾸어 말하면, 본 발명의 리간드 복합체는, 상기 링커 화합물과, 환원 말단을 가지는 당이 방향족 아미노기를 통하여 결합되어 있는 구조를 가지고 있다. 이 당의 도입은, 예를 들어, 상기 링커 화합물의 방향족 아미노기의 아미노기(-NH₂기)와 당의 환원 아미노화 반응에 의해 행할 수 있다. 즉, 당 중의 평형에 의해 생기는 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 환원함으로써 방향족 아미노기에 용이하게 당을 도입할 수 있다.

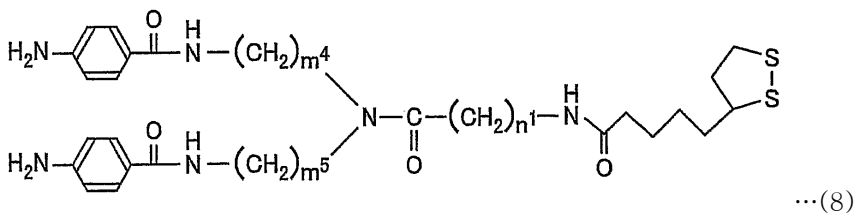
본 발명에서는, 특히 상기 환원 말단을 가지는 당으로서, 상기 선출원에 기재된 발명자들에 의해 합성된 황산화당이 아닌, 시판되는 것, 혹은, 시판되는 다당을 분해하여 조제한 것을 이용한다. 한편, 상기 '환원 말단을 가지는 당'이란, 아노머 탄소(anomeric carbon) 원자가 치환을 받지 않은 단당 또는 올리고당이다. 즉, 상기 환원 말단을 가지는 당이란, 환원당이다.

상기 환원 말단을 가지는 당으로서 보다 구체적으로, 말토오스, 락토오스, 파노오스(panose), 셀로비오스(cellobiose), 멜리비오스(melibiose), 만노올리고당(mannooligosaccharide), 키토올리고당(chitooligosaccharide), 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide) 등을 들 수 있으나, 이것으로 한정되는 것은 아니다. 이와 같이, 말토오스나 락토오스 등의 올리고당을 가지는 리간드 복합체는, 종래의 황산화당을 가지는 리간드 복합체와 비교하여, 단백질 측정에 관하여 응용 범위가 넓다는 이점을 가지고 있다.

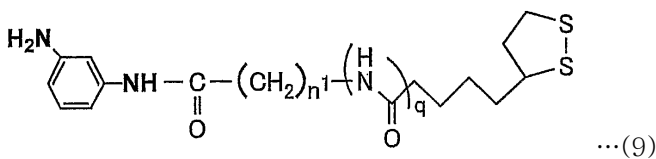
본 발명의 리간드 복합체로서 구체적으로, 일반식 (7)



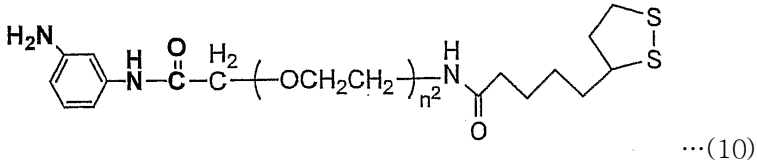
(식 중, m¹, m², m³는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수, n¹은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물, 또는, 일반식 (8)



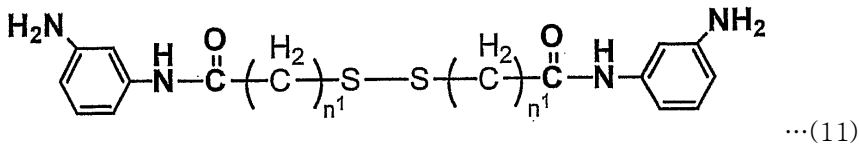
(식 중, m⁴, m⁵는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수, n¹은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물, 또는, 일반식 (9)



(식 중, n¹, q는 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물, 또는, 일반식 (10)



(식 중, n^2 는 1 이상 6 이하의 정수)으로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물, 또는, 일반식 (11)



(식 중, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물의 방향족 아미노기에 환원 말단을 가지는 당이 도입된 구조를 가지는 것을 들 수 있다.

상기의 리간드 복합체는, 예를 들어, 일반식 (7) ~ (11)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물과, 환원 말단을 가지는 당을 이용하여 환원 아미노화 반응을 행함으로써 제조할 수 있다.

상기 일반식 (7)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물이란, 즉, 탄화수소 유도쇄를 3 쇠 가지는 것으로, 말단에 방향족 아미노기를 가지는 3 쇠의 탄화수소 유도쇄가 1 개의 탄소(C)에 결합됨으로써 분기 구조를 형성하고 있다. 한편, 상기 일반식 (7)에 있어서, m^1, m^2, m^3 는, 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않고, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 무방하고, 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 무방하다. 이 중, 상기 $m^1 \sim m^3$ 는 제조시의 편의상 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 2인 것이 바람직하다.

상기 일반식 (8)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물이란, 즉, 탄화수소 유도쇄를 2 쇠 가지는 것이고, 말단에 방향족 아미노기를 가지는 2 쇠의 탄화수소 유도쇄가 1 개의 질소(N)에 결합됨으로써 분기 구조를 형성하고 있다. 한편, 상기 일반식 (8)에 있어서, m^4, m^5 는 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않고, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 무방하고, 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 무방하다. 이 중, 상기 m^4, m^5 는, 제조시의 편의상 서로 같은 정수인 것이 바람직하고, 특히 2인 것이 바람직하다.

상기 일반식 (9)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물은, 탄화수소 유도쇄를 1 쇠 가지는 것이다. 한편, 상기 일반식 (9)에 있어서 n^1, q 는, 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 무방하고, 같은 정수라도 무방하다.

상기 일반식 (10)으로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물은, 탄화수소 유도쇄를 1 쇠 가지는 것이다. 한편, 상기 일반식 (9)에 있어서, n^2 는, 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않는다.

상기 일반식 (11)로 나타내어지는 구조를 가지는 링커 화합물은, 탄화수소 유도쇄를 1 쇠 가지는 것을 2량체를 형성한 것이다. 한편, 상기 일반식 (11)에 있어서, n^1 은, 1 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않는다.

상기 일반식 (7) 또는 일반식 (8)과 같이, 상기 X는, 탄소나 질소 등의 원자에서, 상기 탄화수소 유도쇄를 복수 결합하여 분기 구조를 형성하고 있는 다분기형 부위인 구조를 구비하고 있는 것이라도 무방하다. 한편, 상기 X에 복수의 탄화수소 유도쇄가 포함되는 경우에는, 모두 동일한 것이 바람직하지만, 말단에 방향족 아미노기를 가지고 있으면, 서로 다른 구조라도 무방하다.

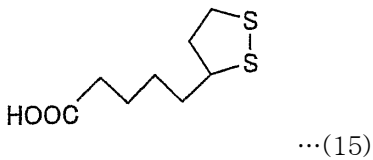
이상과 같이, 본 발명의 리간드 복합체에 포함되는 링커 화합물은, 단백질 분석용 지지체에 결합가능한 유황 원자와, 올리고당쇄 등의 당분자에 결합가능한 아미노기를 가지고 있다. 따라서, 예를 들어, Au-S 결합 등의 금속-유황 결합에 의해 상기 링커 화합물이 단백질 분석용 지지체 상에 고정되므로, 상기 링커 화합물을 통하여 상기 지지체 상에 당분자를 견고하고 또한 간단하게 결합시킬 수 있다.

또한, 상기 링커 화합물은, 다분기형 부위를 가지고 있어도 무방하며, 이 경우 이 다분기형 부위의 각 말단에 방향족 아미노기를 가지고 있다. 따라서, 상기 링커 화합물에 환원 말단을 가지는 당이 도입된 본 발명의 리간드 복합체를 이용함으로써 상기 지지체 표면에 보다 효율적으로 당분자를 집합화시킬 수 있다.

또한, 상기 링커 화합물은, 단백질과의 비특이적인 상호 작용의 영향을 거의 무시할 수 있다. 그러므로, 상기 링커 화합물을 가지는 본 발명의 리간드 복합체를 이용함으로써 상기 당과 단백질의 상호 작용을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능하게 된다.

상기 링커 화합물은, 예를 들어, 이하에 나타내는 제조 방법에 따라 제조된다. 즉, 상기 일반식 (7), (8), (9) 또는 (10)으로 나타내어지는 링커 화합물은, 치옥트산과, 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 아민 화합물의 축합 반응을 행하고, 상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호함으로써 제조된다. 또한, 상기 일반식 (11)로 나타내어지는 링커 화합물은, γ -멜캅토낙산(酪酸)의 2량체와, 2분자의 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 아민 화합물의 축합 반응을 행하고, 상기 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호함으로써 제조된다.

상기 치옥트산은, 하기 일반식 (15)

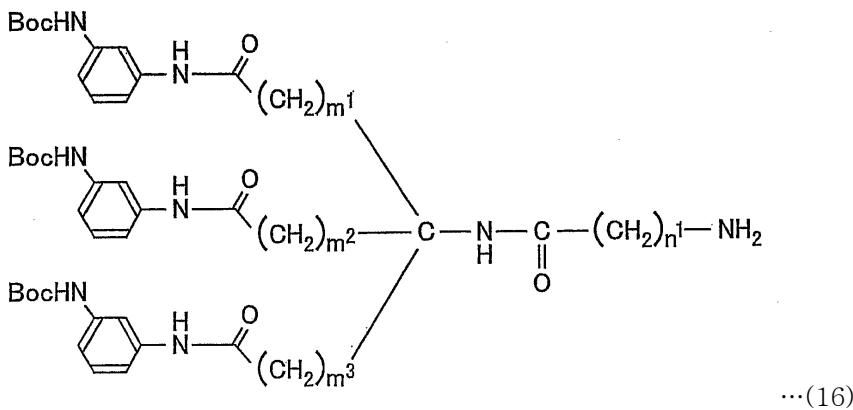


로 나타내어지는 구조를 구비하고 있다.

또한, 상기 아민 화합물은, 보호기에 의해 보호된 방향족 아미노기 말단을 가지는 것이면 특별히 한정되는 것은 아니다.

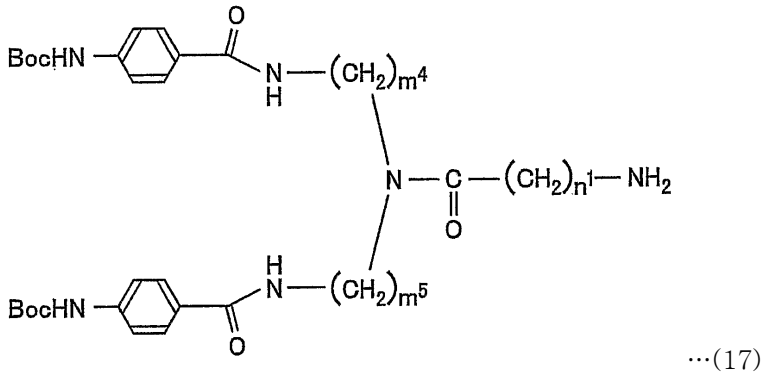
상기 보호기란, 방향족 아미노기의 아미노기가 상기 축합 반응에 의해 반응하지 않도록 도입되는 치환기이다. 이러한 보호기는 특별히 한정되는 것은 아니나, 예를 들어, t-부톡시카르보닐기(-COOC(CH₃)₃기; Boc기라 기재한다), 벤질기, 아릴 카르바메이트(aryl carbamate)기(-COOCH₂CH=CH₂, Alloc기) 등을 들 수 있다.

상기 아민 화합물로서는, 예를 들어, 하기 일반식 (16)



으로 나타내어지는 구조를 구비하는 제 1급 아민 화합물을 들 수 있다. 한편, 상기 일반식 (16) 중의 $m^1 \sim m^3$ 는, 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수이고, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이다. 이 일반식 (16)으로 나타내어지는 아민 화합물과, 치옥트산의 축합 반응, 및 그 후에 행해지는 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호함에 의해 얻어지는 링커 화합물은, 상기 일반식 (7)로 나타내어지는 링커 화합물이다.

또한, 상기 아민 화합물의 다른 예로서는, 예를 들어, 하기 일반식 (17)

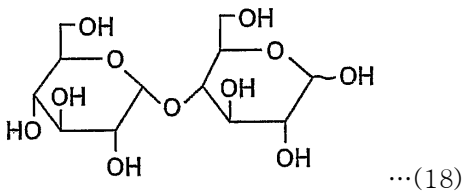


로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 제 2급 아민 화합물을 들 수 있다. 한편, 상기 일반식 (17) 중의 m^4 , m^5 는, 각각 독립적으로, 0 이상 6 이하의 정수이며, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이다. 이 일반식 (17)로 나타내어지는 아민 화합물과, 치옥트산의 축합 반응, 및, 그 후에 행해지는 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호함에 의해 얻어지는 링커 화합물은, 상기 일반식 (8)로 나타내어지는 링커 화합물이다. 이들 아민 화합물의 합성 방법에 대해서는, 이후의 실시예에서 상술한다.

상기 치옥트산 또는 γ -멜캅토 낙산과 아민 화합물의 축합 반응에 의해, 치옥트산 또는 γ -멜캅토 낙산의 카르복실기(-COOH기)와, 아민 화합물의 아미노기(-NH₂기)가 축합하여, 아마이드 결합이 형성된다. 그 후, 방향족 아미노기 말단의 보호기를 탈보호하여 보호기를 떼어내고 방향족 아미노기로 함으로써, 상기한 링커 화합물을 얻을 수 있다.

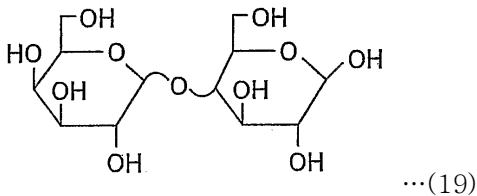
본 발명의 리간드 복합체는, 상술한 바와 같이 하여 제작된 링커 화합물에 환원 말단을 가지는 말토오스나 락토오스 등의 올리고당이 도입된 것이다. 본 발명의 리간드 복합체로서 구체적으로, 이하에 나타내는 것을 들 수 있다.

1 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 하기 식 (18)



로 나타내어지는 구조를 가지는 말토오스를 도입하여 이루어지는 것이다.

2 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 하기 식 (19)



로 나타내어지는 구조를 가지는 락토오스를 도입하여 이루어지는 것이다.

이 1, 2 번째의 리간드 복합체는, 3 개의 탄화수소 유도체를 가지고 있는 링커 화합물에 올리고당이 각각 1 개 도입되어 있으므로, 말단에 3 단위의 올리고당을 가지고 있다. 바꾸어 말하면, 상기 1 번째의 리간드 복합체는 말단에 3 단위의 α -글루코피라노오스를 가지고 있고, 상기 2 번째의 리간드 복합체는 말단에 3 단위의 β -갈락토피라노오스를 가지고 있다. 한편,

상기 일반식 (2)에 있어서, $m^1 \sim m^3$ 는, 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 무방하고, 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 무방하다. 또한, 상기 일반식 (12)에 있어서, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되지 않는다.

또한, 3 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (3)으로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 상기 식 (18)로 나타내어지는 구조를 가지는 말토오스를 도입하여 이루어지는 것이다.

4 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (3)으로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 상기 식 (19)로 나타내어지는 구조를 가지는 락토오스를 도입하여 이루어지는 것이다.

이 3, 4 번째의 리간드 복합체는, 2 개의 탄화수소 유도쇄를 가지고 있는 링커 화합물에 올리고당이 각각 1 개 도입되어 있으므로, 말단에 2 단위의 올리고당을 가지고 있다. 바꾸어 말하면, 상기 3 번째의 리간드 복합체는 말단에 2 단위의 α -글루코피라노오스를 가지고 있고, 상기 4 번째의 리간드 복합체는 말단에 2 단위의 β -갈락토포라노오스를 가지고 있다. 한편, 상기 일반식 (3)에 있어서, m^4, m^5 는, 0 이상 6 이하의 정수이면 한정되지 않으며, 서로 다른 정수라도 무방하고, 일부 혹은 모두가 같은 정수라도 무방하다. 또한, 상기 일반식 (12)에 있어서, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되는 것은 아니다.

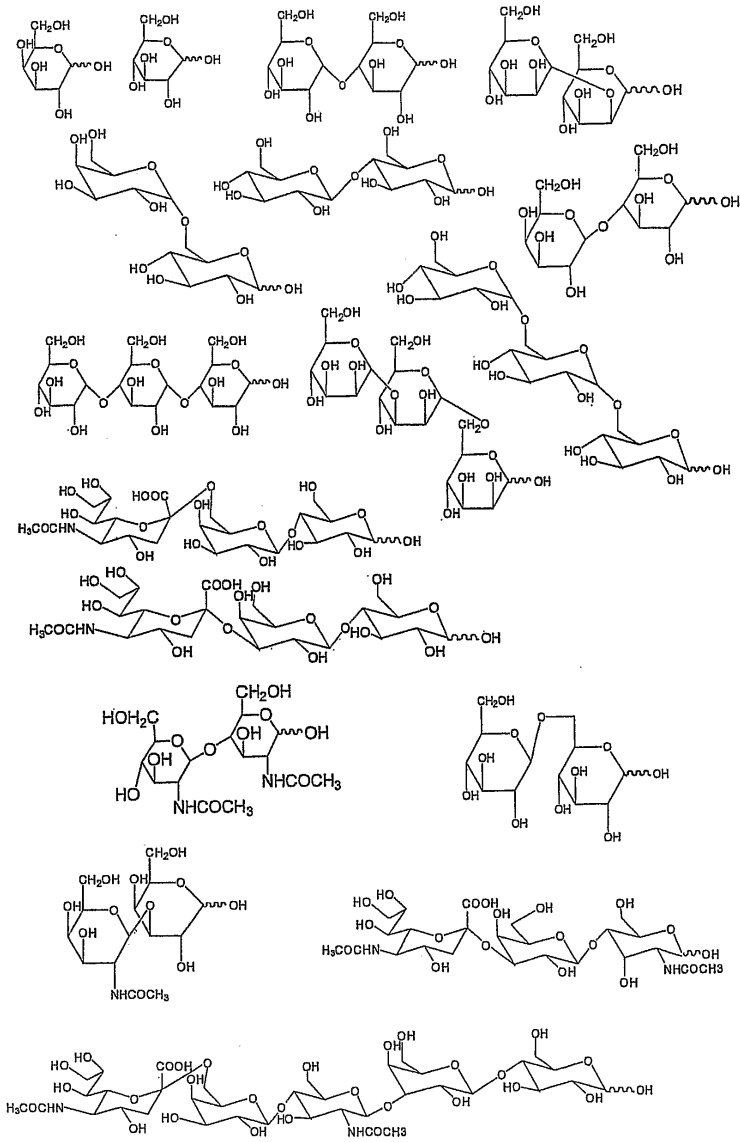
5 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (13)으로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 글루코오스를 도입하여 이루어지는 것이다. 한편, 상기 일반식 (13)에 있어서, n^2 는 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되지 않는다.

6 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (13)으로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 말토오스를 도입하여 이루어지는 것이다. 한편, 상기 일반식 (13)에 있어서, n^2 는 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되지 않는다.

7 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (14)로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 글루코오스를 도입하여 이루어지는 것이다. 한편, 상기 일반식 (14)에 있어서, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되지 않는다.

8 번째의 리간드 복합체는, 상기 일반식 (14)로 나타내어지는 구조에 있어서, 상기 X로서 상기 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하고, R'가 수소(H)이며, R에 말토오스를 도입하여 이루어지는 것이다. 한편, 상기 일반식 (14)에 있어서, n^1 은 1 이상 6 이하의 정수이면 특별히 한정되지 않는다.

또한, 상기 일반식 (9)로 나타내어지는 구조를 구비하고 있는 링커 화합물에, 하기 군 (20)



...(20)

에 나타내는 17 종류의 당쇄를 각각 도입한 17 종류의 리간드 복합체가 본 발명의 리간드 복합체의 구체예로 들 수 있다.

상기의 리간드 복합체는, 모두 링커 화합물과 당분자를 포함하여 이루어져 있기 때문에, 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 당분자를 집합화하여 고정화되어 이루어지는 리간드 담지체를 제공할 수 있다. 상기 지지체 표면의 금속으로서는, 상기 Au 외에, Cu, Ag, Pt 등의 금속을 이용할 수 있으나, 특히 Au를 이용하는 것이 바람직하다.

또한, 상기 각 리간드 복합체는, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 단백질과 다른 상호 작용을 나타내는 것이 확인되었다. 그러므로, 미지의 단백질의 동정에 효과적으로 이용할 수 있다고 생각된다.

한편, 본 발명의 리간드 복합체에 도입되어 있는 상기 올리고당은, 동일한 단당분자로 이루어지는 단일 올리고당이라도 무방하고, 여러 가지의 단당분자나 그 유도체로 이루어지는 복합 당질이라도 무방하다. 또한, 상기 올리고당은, 모두, 자연계로부터 단리·정제하여 얻을 수 있는 여러 가지의 천연 당이라도 무방하고, 인공적으로 합성된 당이라도 무방하다. 또한, 상기 올리고당은 다당을 분해하여 얻어진 것이라도 무방하다.

또한, 상술한 바와 같은 본 발명의 리간드 복합체를, 표면에 금속을 가지는 지지체에 금속-유황 결합을 통하여 고정화시켜 이루어지는 리간드 담지체도 본 발명에 포함된다. 이 리간드 담지체는 단백질 분석 용도로 한정되지 않으며, 당분자와의 상호 작용을 조사하기 위하여 단백질 이외의 물질 분석용으로도 이용할 수 있다.

상기 리간드 담지체는, 이 리간드 복합체를 포함하는 리간드 복합체 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 흘려 넣는다)함으로써, 상기 리간드 복합체(리간드 복합체에 포함되는 링커 화합물)의 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 0.5 시간 ~ 12 시간 정도이면 무방하고, 주입 농도는 1 μ M ~ 1mM 정도이면 무방하다.

이와 같이, 본 발명의 리간드 복합체는, S-S 결합을 가지고 있기 때문에, 단백질 분석용 지지체 표면에 간단하게 고정화할 수 있고, 상기 지지체 상에 당분자를 간단하게 도입할 수 있다.

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

예를 들어, 단백질 분석으로서 SPR 측정을 행하기 위해서는, 이하와 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 있으며, 특히 글래스가 바람직하게 이용된다. 또한, 리간드 담지체와 단백질의 접촉은, 예를 들어, 단백질을 런닝 버퍼에 용해시킨 용액을 이 리간드 담지체의 표면에 유입시킴으로써 행하면 된다. 이 런닝 버퍼로서는, 예를 들어, 인산 완충 용액 등을 들 수 있다.

또한, 본 발명의 리간드 담지체는, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 각각의 단백질과 다른 상호 작용을 나타내는 것이 확인되고 있기 때문에, 단백질의 동정에 이용할 수 있다. 즉, 본 발명의 리간드 담지체를 이용하여 미지의 단백질의 분석을 행함으로써, 그 단백질이 당결합성 단백질인지 여부, 그리고 그 단백질이 어느 종의 단백질인지를 용이하게 판정할 수 있다. 한편, 상기의 리간드 복합체를 각각 고정화한 리간드 담지체 중, 적어도 2 종류를 1 조 세트에 포함하는 칩 세트를 제작하면, 보다 간편하게 단백질(특히, 당쇄 결합성 단백질)의 동정을 행할 수 있기 때문에 유용하다.

여기서, 본 발명의 리간드 담지체의 이용 방법에 대하여 설명한다. 본 발명의 리간드 담지체는, 분자간 상호 작용의 측정(예를 들어, 이하와 같은 SPR 측정)에 센서 칩으로서 사용할 수 있다. 즉, 제 1 리간드 복합체가 지지체 표면에 고정화되어 이루어지는 제 1 센서 칩과, 상기 제 1 리간드 복합체와는 종류가 다른 제 2 리간드 복합체가 지지체 표면에 고정화되어 이루어지는 제 2 센서 칩을 이용하여, 제 1 센서 칩을 이용하여 얻어진 SPR 측정의 검출 결과와 제 2 센서 칩을 이용하여 얻어진 SPR 측정의 검출 결과의 차이를 검출하여, 당분자의 상호 작용을 관측할 수 있다.

이들 센서 칩에는, 고정화되는 당분자가 서로 다른 리간드 복합체, 혹은, 고정화되어 있는 당분자는 동일하나 링커 화합물 부분이 서로 다른 리간드 복합체를 이용하면 된다. 이 종류가 서로 다른 리간드 복합체로서는, 예를 들어, 상술한 각 리간드 복합체를 들 수 있다. 그리고 상기한 리간드 복합체 중에서, 링커 화합물 부분은 같은 구조를 가지고 있으나, 올리고당 부분이 다른 구조를 가지는 것(예를 들어, 상기 1 번째의 리간드 복합체와 2 번째의 리간드 복합체 세트, 혹은, 상기 3 번째의 리간드 복합체와 4 번째의 리간드 복합체 세트)을 선택하는 것이 바람직하다.

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

또한, 당분자와의 상호 작용을 관측하는 물질은 단백질로 한정되지 않는다.

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

상기와 같은 SPR 측정을 행하면, 당분자 이외에는 같은 구조의 리간드 복합체를 가지는 적어도 2 개의 센서 칩을 이용하여 측정할 수 있기 때문에, 적어도 2 개의 센서 칩의 상호 작용의 차이는 당분자에 기인한 것으로 관측된다. 따라서, 상기 측정 방법을 이용하면, 당분자 이외의 부분과 다른 물질의 비특이적인 상호 작용을 저감시켜, 당분자와 다른 물질과의 특이적인 상호 작용을 관측할 수 있다.

또한, 당분자는 동일하고, 링커 화합물 부분의 구조가 다른 리간드 복합체가 고정화된 2 종류의 센서 칩을 이용하여 상기와 같은 SPR 측정을 행하여도 무방하다. 이 경우에는, 센서 칩 상의 당분자의 집합화도의 차이에 따른 단백질의 결합 거동을 측정할 수 있다. 이러한 센서 칩 세트의 예로서는, 상기 1 번째의 리간드 복합체와 3 번째의 리간드 복합체의 세트를 들 수 있다.

또한, 상술한 SPR 측정에 의해 당분자와 다른 물질과의 특이적인 상호 작용을 확인한 후에, SPR 측정에 사용한 단백질이 결합된 리간드 담지체를 그대로 질량 분석하면 센서 칩과 결합된 단백질을 동정할 수 있다. 상기 질량 분석은, 매트릭스 지원형 레이저 이탈/비행 시간형 질량 분석계(MALDI-TOF/MS) 등의 종래 공지된 질량 분석계를 사용하여, 종래 공지된 방법에 따라 행해지면 된다.

상술한 바와 같은 순서를 이용하면, 본 발명의 리간드 복합체를 이용하여 단백질의 분석을 행할 수 있다. 즉, 본 발명의 단백질의 분석 방법은, 상기의 본 발명의 리간드 복합체를 표면에 금속을 가지는 지지체와 접촉시킴으로써, 당해 리간드 복합체를 지지체 상에 고정화시킨 리간드 담지체를 작성하는 공정과, 상기 리간드 담지체를 분석 대상이 되는 단백질을 포함하는 용액과 접촉시켜 상호 작용시킨 후, 예를 들어, SPR과 같은 분자간 상호 작용의 측정을 행하는 공정과, 상기 분자간 상호 작용 측정 후에 질량 분석을 행하여, 상기 리간드 담지체에 결합되어 있는 단백질을 동정하는 공정으로 이루어지는 것이다.

이 단백질의 분석 방법에 있어서는, 상술한 바와 같이, 종류가 서로 다른 리간드 복합체가 고정화된 2 종류 이상의 리간드 담지체를 이용하여 각각 단백질의 분석을 행하여, 각각의 결과를 비교검토하고 각 단백질의 특성을 해석할 수 있다.

<실시예>

이하, 본 발명의 리간드 복합체의 합성에 대하여 보다 상세하게 설명한다. 또한, 본 실시예에서는, 합성한 리간드 복합체를 이용하여 SPR 측정과 질량 분석을 행하여, 단백질의 분석을 행하였다. 이에 대해서도 함께 설명한다.

[실시예 1: 리간드 복합체(화합물 1 ~ 4)의 합성]

본 실시예에서는, 실시형태에서 설명한 1 ~ 4 번째의 리간드 복합체로 각각 분류되는 4 개의 리간드 복합체를 합성하였다.

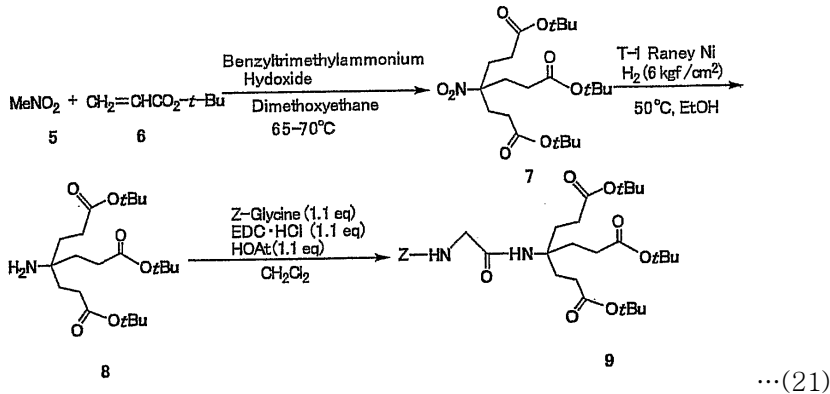
(1) 1 번째의 리간드 복합체(화합물 1)의 합성

상기 1 번째의 리간드 복합체의 하나인, 상기 일반식 (12)로 나타내지어는 구조에 있어서, n^1 이 1이고, X가 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 상기 식 (18)로 나타내어지는 말토오스가 도입되며, m^1 , m^2 , m^3 가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 1)를 하기의 순서로 합성하였다.

상기 리간드 복합체(화합물 1)의 합성의 전(前) 단계로서, 먼저, 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 만큼 분기쇄를 3 개 가지는 링커 화합물 A의 합성을 행하였다.

먼저, 하기 식 (21)에 나타내는 바와 같이, 65°C ~ 70°C의 디메톡시에탄 중, 수산화벤질트리메틸암모늄의 존재하에서, 니트로메탄(화합물 5)에 대하여 3 단위의 t-부틸아크릴레이트(화합물 6)를 마이클 부가시켜, 91%의 수율로 화합물 7을 얻었다. 이어서, 수소 분위기하 (6kg/cm²), 50°C의 에탄올 중에서, 라네이 니켈(Raney Ni)을 이용하여, 상기 화합물 7의 니트로기를 환원하여, 98%의 수율로 화합물 8을 얻었다.

그 후, CH₂Cl₂ 중, 1.1 당량의 1-히드록시-7-아자펜조트리아졸(식 중, HOAt), 1.1 당량의 수용성 카르보디이미드(carbodiimide) 염산염(식 중, EDC·HCl)의 존재하에서, 상기 화합물 8에 1.1 당량의 Z-글리신을 축합시켜, 85%의 수율로 Z-글리신체(화합물 9)를 얻었다.



보다 구체적으로 설명하면, 상기 화합물 8은, 문헌(G. R. Newkome 외, OPPI BRIEFS, 28권, p. 495, 1996)의 방법에 따라, 먼저, 니트로메탄(12.2g, 200mmol)을 1,2-디메톡시에탄 50mL에 용해하여, 65 ~ 70°C로 가열하고, 40% 수산화벤질트리메틸암모늄-메탄올 용액(2mL)을 가하여, 니트로메탄 용액으로 만들었다. 이어서, 이 니트로메탄 용액의 온도를 75°C까지 상승시키고, t-부틸아크릴레이트(90.8mL, 620mmol)를 천천히 적하한 후, 용액 온도를 70 ~ 75°C로 유지하면서, 40% 수산화벤질트리메틸암모늄-메탄올 용액을 1mL씩 4회에 나누어 가하여 2.5시간 교반하고, 니트로메탄/t-부틸아크릴레이트 반응 용액을 얻었다. 이 니트로메탄/t-부틸아크릴레이트 반응 용액 중의 불용물을 디칸테이션(decantation)에 의해 제거하여 농축하고, 얻어진 잔사(殘渣)를 디에틸에테르에 용해시켜, 빙냉한 10% 염산 수용액, 포화탄산수소나트륨 수용액, 및 물로 2 회씩 세정하여 잔사 용액을 얻었다. 그 후, 건조제로서 무수황산나트륨을 이용하여 이 잔사 용액을 건조시키고, 셀라이트를 이용하여 이 건조제를 제거하여 감압농축한 후, 농축 잔사를 에탄올에 용해하여 재결정을 행하여, 화합물 7(81.8g, 91%)을 백색 침상(針狀) 결정으로 얻었다.

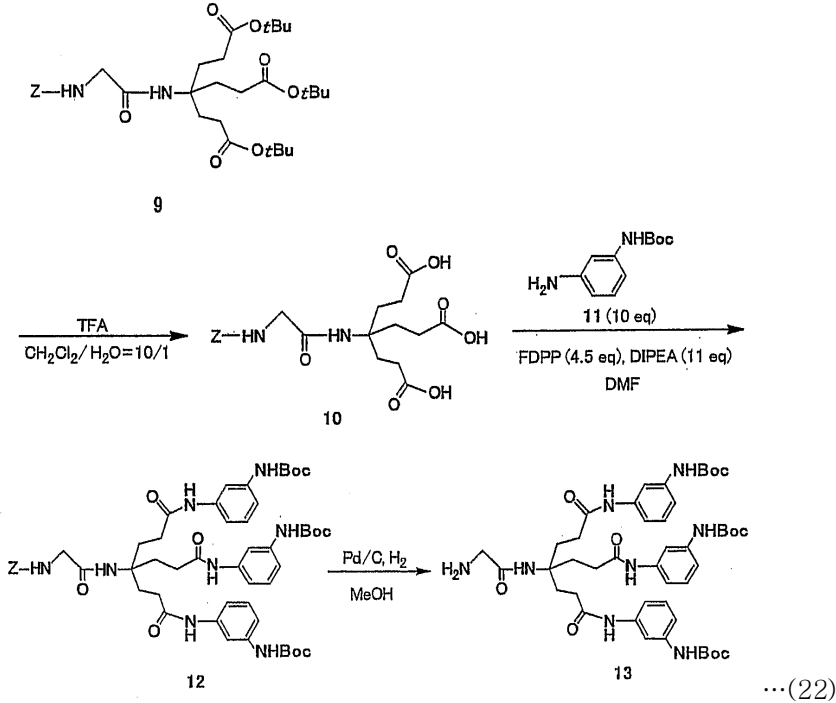
계속해서, 화합물 7의 결정(10g, 22.4mmol)과 T-1 라네이 니켈(6.0g)을 무수에탄올 50mL에 가하고, 6kg/cm²의 수소 분위기하, 50°C에서 23시간 교반한 후, 셀라이트를 이용하여 T-1 라네이 니켈을 여과하여 제거함으로써 얻어진 화합물 7 반응용액을 감압농축하였다. 이 화합물 7 반응 용액의 감압농축에 의해 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(용매: 클로로포름/메탄올=20/1)로 정제하여, 화합물 8(얻은 양 9.2g, 수율 98%)을 백색 고체로 얻었다.

보다 구체적으로, z-글리신(1.26g, 6.62mmol)과, HOAt(0.90g, 6.62mmol)와, EDC·HCl(1.27g, 6.62mmol)을 무수디클로로메탄(28mL)에 녹인 Z-글리신 용액에 0°C의 온도 조건하, 화합물 8(2.50g, 6.02mmol)을 무수디클로로메탄(2mL)에 녹인 화합물 8 용액을 가하여, 아르곤 분위기하, 실온에서 36시간 교반하여, Z-글리신/화합물 8 반응 용액을 얻었다. 이 Z-글리신/화합물 8 반응 용액에 디클로로메탄과 10% 구연산 수용액을 가하여 디클로로메탄으로 추출하고, 유기층을 물, 포화탄산수소나트륨 수용액, 및 물로 1 회씩 세정하고, 건조제로서 무수황산나트륨을 이용하여 건조시킨 후, 이 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 이 감압농축에 의해 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(용매: 클로로포름)로 정제하여, 화합물 9(얻은 양 3.09g, 수율 85%)를 백색 고체로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 9의 ESI-MS(positive) 측정(비행 시간형 질량 분석계 측정)을 행한 결과, m/z(질량/전하비) 629.4 [(M+Na)⁺]였다. 또한, 핵 자기 공명(¹H-NMR, 400MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, 67.37-7.26(5H, m, Ph), 6.43(1H, bs, CONHC), 5.38(1H, bs, Gly-NH), 5.13(2H, s, CH₂Ph), 3.78(2H, d, J=7.7Hz, Gly-CH₂), 2.20(6H, t, J=7.7Hz, CCH₂CH₂), 1.96(6H, t, J=7.7Hz, CCH₂CH₂), 1.44(27H, s, CH₃)였다. 이에 의해, 화합물 9의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 화합물 9의 분자 질량은 606.35이다.

이하에, 하기 식 (22)에 나타내는 바와 같이, CH₂Cl₂/H₂O=10/1의 혼합 용매 중에서, 트리플루오로초산(이하, TFA라 기재한다)을 이용하여, 상기 화합물 9의 t-부톡시카르보닐기(-COOC(CH₃)₃기; 식 (22) 중 tBu)를 탈보호하여, 수율 95%로 화합물 10을 얻었다.

그 후, 4.5 당량의 펜타플루오로페닐디페닐포스페이트(식 중 FDPP), 11 당량의 디소프로필에틸아민(식 중 DIPEA), N,N-디메틸포름아미드(DMF)의 존재하에서, 상기 화합물 10과 Boc기에 의해 아미노기가 보호된 m-페닐렌디아민 유도체(화합물 11, 10 당량)를 축합시켜, 수율 99%로 N-Boc 아민 유도체(화합물 12)를 얻었다. 계속해서, 메탄올(식 중, MeOH) 중, Pd/C(활성탄 담지 팔라듐)의 존재하에서 접촉 수소 환원을 행하고, 화합물 12에 축합된 상기 Z-글리신의 벤질 옥시카르보닐기(식 중 Z기)를 탈보호하여, 수율 79%로 화합물 13을 얻었다.



상기 화합물 10 ~ 13을 얻기 위하여, 구체적으로, 하기의 조작을 행하였다.

즉, 화합물 10을 얻기 위하여, 화합물 9(2.98g, 4.90mmol)를 디클로로메탄 (15mL)에 녹이고, -10℃에서 TFA(15mL)와 물(1.5mL)을 가한 후, 실온에서 1.5시간 교반하여 화합물 9 반응 용액을 얻었다. 이 화합물 9 반응 용액을 감압농축한 후, 빙욕 중에서 농축 잔사에 pH가 5가 될 때까지 10% 수산화나트륨 수용액을 가하고, 다시 pH가 2가 될 때까지 진한 염산을 가하여, 백색 고체를 석출시켰다. 얻어진 백색 고체를 물로 세정하여, 화합물 10(얻은 양 2.04g, 수율 95%)을 백색 고체로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 10의 ESI-MS(negative) 측정을 행한 결과, m/z 437.1 [(M-H)⁻]였다. 또한, 핵 자기 공명 (¹H-NMR, 400MHz, d₆-DMSO) 측정을 행한 결과, δ7.34~7.30(6H, m, Ph, CONHC), 7.15(1H, s, Gly-NH), 5.01(2H, s, CH₂Ph), 3.55(2H, d, J=5.9Hz, Gly-CH₂), 3.33(3H, brs, CO₂H), 2.11(6H, m, CCH₂CH₂), 1.81(6H, m, CCH₂CH₂)이었다. 이것들에 의해, 화합물 10의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 화합물 10의 분자 질량은 438.16이다.

또한, 화합물 11을 얻기 위하여, m-페닐렌디아민(0.50g, 4.62mmol)을 메탄올(35mL)에 녹이고, 0℃에서 (Boc)₂O (1.06mL, 4.62mmol)와 트리에틸아민(0.65mL, 4.65mmol)을 가한 후, 실온에서 24시간 교반하여 감압농축을 행하였다. 이 감압농축에 의해 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(용매: 클로로포름/아세톤=10/1)로 정제하여, 화합물 11(얻은 양 665mg, 수율 68%)을 백색 고체로 얻었다.

상기 화합물 11의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 231.2 [(M+Na)⁺]였다. 또한, ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, δ7.02(1H, t, J=8.0Hz, aromatic), 6.95(1H, bs, aromatic), 6.54(1H, dd, J=2.0Hz, J=8.0Hz, aromatic), 6.41(1H, bs, CONH), 6.35(1H, dd, J=2.2Hz, J=7.9Hz, aromatic), 3.66(2H, bs, NH₂), 1.50(9H, s, t-butyl)이었다. 이것들에 의해, 화합물 11의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 화합물 11의 분자 질량은 208.12이다.

또한, 화합물 12를 얻기 위하여, 상기 화합물 10(100mg, 228 μ mol), 상기 화합물 11(475mg, 2.28mmol), FDPP(394mg, 1.03mmol), 및 디소프로필에틸아민(447 μ L, 2.57mmol)을 무수디메틸포름아미드(2mL)에 녹이고, 아르곤 분위기하, 실온에서 29시간 교반한 후, 초산에틸 및 물을 가하여 초산에틸로 추출하고, 유기층을 0.5N 염산, 물, 포화 탄산수소나트륨 수용액, 및 포화 식염수로 1 회씩 세정하고, 건조제로서 무수황산나트륨을 이용하여 건조시켜, 건조 반응 용액을 얻었다. 얻어진 건조 반응 용액으로부터, 건조제를 여과제거해 감압농축하여, 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(용매: 클로로포름/아세톤=3/1)로 정제하여, 화합물 12(얻은 양 228mg, 수율 99%)를 백색 고체로 얻었다.

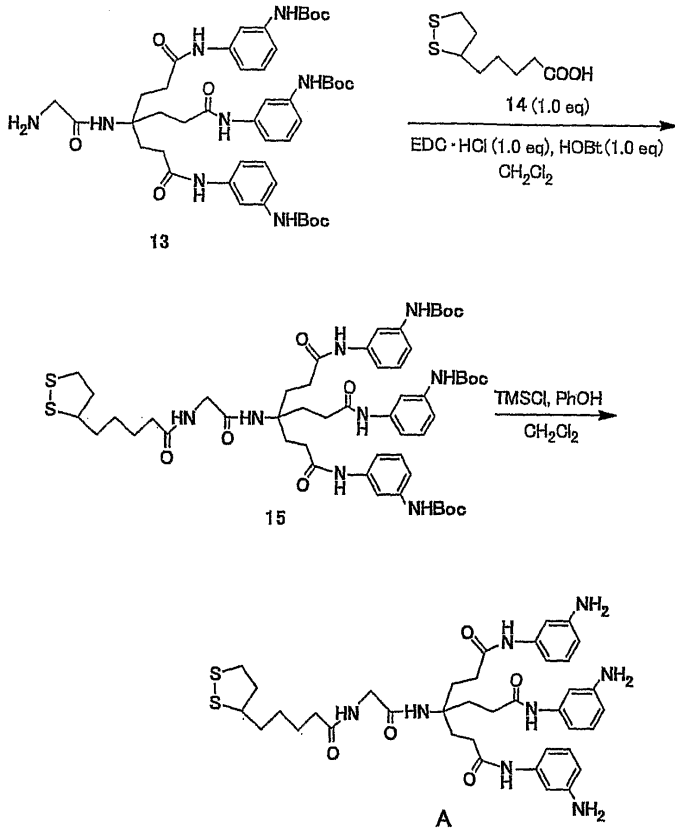
상기 화합물 12의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 1009.5 [(M+ H)⁺]였다. 또한, ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, δ 8.75(3H, s, NHCO₂tBu), 7.67(3H, s, CONHPh), 7.30-6.95(15H, m, aromatic, CH₂CONH), 6.52(1H, bs, Gly-NH), 5.04(2H, s, CH₂Ph), 3.71(2H, d, J=5.0Hz, Gly-CH₂), 2.23(6H, m, CH₂CH₂CO), 1.97(6H, m, CH₂CH₂CO), 1.47(27H, s, t-butyl)이었다. 이것들에 의해, 화합물 12의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 화합물 12의 분자 질량은 1008.50이다.

또한, 화합물 13은, 구체적으로 이하와 같이 하여 얻었다. 즉, 화합물 12(200mg, 198 μ mol)를 메탄올(3mL)에 용해하여, 10% Pd/C(62.3mg)를 가하고, 수소 분위기하, 실온에서 15시간 교반한 후, 상기 Pd/C를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 이 감압농축에 의해 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(용매: 클로로포름/메탄올=8/1)로 정제하여, 화합물 13(얻은 양 136mg, 수율 78%)을 백색 고체로 얻었다.

상기 화합물 13의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 875.5 [(M+ H)⁺]였다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, δ 9.00(3H, s, NHCO₂tBu), 7.57(2H, s, NH₂), 7.35(1H, bs, Gly-NH), 7.14-7.00(15H, m, aromatic, CH₂CONH), 3.21(2H, s, Gly-CH₂), 2.26(6H, m, CH₂CH₂CO), 2.04(6H, m, CH₂CH₂CO), 1.45(27H, s, t-butyl)였다. 이것들에 의해, 화합물 13의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 화합물 13의 분자 질량은 874.46이다.

또한, 하기 식 (23)에 나타내는 바와 같이, 1.0 당량의 EDC·HCl, 1.0 당량의 1-히드록시벤조트리아졸(식 (23) 중 HOBT), CH₂Cl₂ 중, 상기 화합물 13을 1.0 당량의 치옥트산(화합물 14)과 축합시켜, 수율 75%로 치옥트산 유도체(화합물 15)를 얻었다.

상기에서 얻어진 화합물 15를, CH₂Cl₂ 중, 트리메틸시릴클로라이드(식 중 TMSCl), 페놀(PhOH)이 존재하는 산성 조건하에서, 상기 Boc기를 탈보호하고, 방향족 아미노기를 가지는 탄화수소 유도체를 3 개 포함하여 이루어지는 링커 화합물로서, 화합물 A를 얻었다(수율 32%).



...(23)

구체적으로, 화합물 15 및 화합물 A를 얻기 위하여 하기의 조작을 행하였다.

즉, 화합물 15를 얻기 위하여, 화합물 14(23.6mg, 114μmol)와 HOBt(15.4mg, 114μmol)를 무수디클로로메탄(2.3mL)에 용해하고, 0℃의 온도 조건하, 화합물 13(2.50mg, 6.02μmol)을 가하여, 아르곤 분위기하, 차광하 실온에서 36 시간 교반한 후, 10% 구연산 수용액을 가한 후 클로로포름으로 추출하고, 유기층을 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 세정하고, 건조제로서 무수황산나트륨을 이용하여 건조시켰다. 그 후, 이 건조제를 여과제거해 감압농축하여, 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(용매: 클로로포름/메탄올=40/1)로 정제하여, 화합물 15(얻은 양 91.0mg, 수율 75%)를 백색 고체로 얻었다.

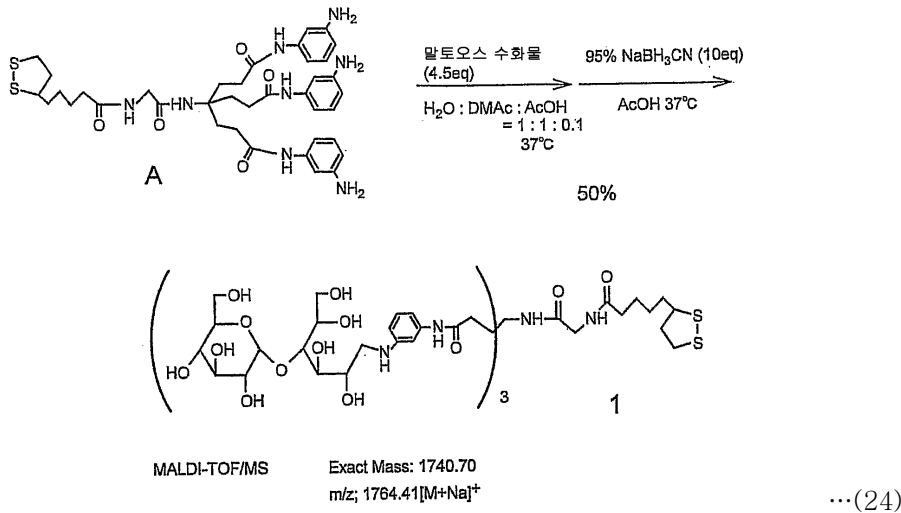
상기 화합물 15의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 1085.5 [(M+H)⁺]였다. 또한, ¹H-NMR (400MHz, CD₃Cl) 측정을 행한 결과, δ9.01(3H, bs, NHCO₂tBu), 7.67(3H, s, CONHPh), 7.31(1H, bs, CONHCH₂), 7.27-7.00(12H, m, aromatic) 3.71(2H, bs, Gly-CH₂), 3.64-3.39(1H, m, SSCH), 3.12-2.99(2H, m, CH₂SS), 2.33(1H, m, CH₂CH₂SS), 2.32(6H, m, CCH₂CH₂CO), 2.20(2H, m, CH₂CONHCH₂), 2.04(6H, m, CCH₂CH₂CO), 1.82-1.73(1H, m, CH₂CH₂SS), 1.62-1.47(4H, m, CH₂(CH₂)₂CONH, (CH₂)₂CH₂CH₂CONH), 1.47(27H, s, t-butyl), 1.39-1.25(2H, m, CH₂CH₂(CH₂)₂CONH)였다. 이것들에 의해, 화합물 15의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 화합물 15의 분자 질량은 1062.49이다.

또한, 화합물 A를 얻기 위하여, 트리메틸시릴클로라이드(0.25mL, 2.64μmol)를 디클로로메탄(0.49mL)에 용해하고, 페놀(549mg, 5.83μmol)을 디클로로메탄(146mL)에 용해시킨 페놀 용액을 가하여 교반한 후, 다시 화합물 15(34.7mg, 32.6μmol)를 가하여 실온에서, 차광하 1.5 시간 교반하여, 화합물 15 반응 용액을 얻었다. 계속해서, 이 화합물 15 반응 용액에 클로로포름을 가하고, 유기층을 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 세정하여, 황색 고체를 석출시켰다. 석출된 황색 고체를 초산에 용해하여 4℃까지 냉각하고, 응집한 고체를 여과분별하여, 화합물 A(얻은 양 79mg, 수율 32%)를 백색 고체로 얻었다.

상기 화합물 A의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 763.6 [(M+H)⁺] 이었다. 또한, ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) 측정을 행한 결과, δ9.57(3H, m, CONHPh), 7.97(1H, m, CONHCH₂), 6.87(6H, m, aromatic), 6.67(3H, d, J= 7.7Hz,

aromatic), 6.21(3H, d, J=7.7Hz, aromatic), 4.98(6H, bs, NH₂), 3.67(2H, d, J=5.1Hz, Gly-CH₂), 3.56(1H, m, SSCH), 3.16-3.04(2H, m, CH₂SS), 2.36(1H, m, CH₂CH₂SS), 2.25(6H, m, CCH₂CH₂CO), 2.19-2.07(2H, m, CH₂CH₂CONHCH₂), 1.93(6H, m, CCH₂CH₂CO), 1.83(1H, m, CH₂CH₂SS), 1.50(4H, m, CH₂(CH₂)₃CONH, (CH₂)₂CH₂CH₂CONH), 1.33(2H, m, CH₂CH₂(CH₂)₂CONH)이었다. 이것들에 의해, 화합물 A의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 화합물 A의 분자 질량은 762.33이다.

계속해서, 이와 같이 얻어진 링커 화합물 A를 이용하여, 상기 일반식 (1 2)로 나타내어지는 구조에 있어서, n¹이 1이고, X가 일반식 (2)로 나타내어지며, m¹, m², m³가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 1)를 하기 식 (24)의 순서로 합성하였다.



식 (24)에 나타내는 바와 같이, 얻어진 링커 화합물 A와, 상기 식 (18)로 나타내어지는 올리고당인 시판되는 말토오스 수화물(4.5당량)을 H₂O/디메틸아세트아미드(식 중 DMAc)/초산(AcOH)=1/1/0.1의 혼합 용매에 용해하고, pH 4 ~ 4.5, 37°C에서 시프 염기를 형성시킨 후, 용매에 AcOH를 가하고, 10 당량의 95% NaBH₃CN을 가하여, pH 3 ~ 4.5, 37°C에서 환원 아미노화 반응을 행하였다. 그 후, 얻어진 화합물을 Sephadex G-50(아마삼 바이오 시스템즈社 제품)을 이용하여 겔 여과 크로마토그래피로 정제하고, 다시 탈염처리를 행하여 말단에 α-글루코피라노오스를 3 단위 포함하여 이루어지는 리간드 복합체로서 화합물 1을 얻었다. 상기 화합물 1의 동정은 MALDI-TOF/MS 및 NMR에 의해 행하였다.

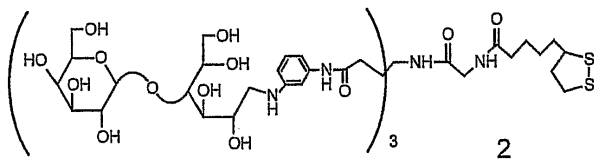
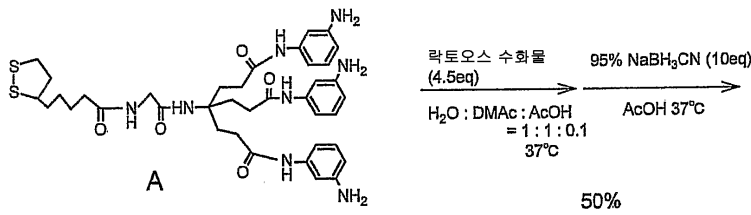
MALDI-TOF/MS의 결과는 m/z; 1764.41 [(M+ Na)⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, 87.01(3H, dd, J=8.2, 8.2Hz, aromatic), 6.70(3H, s, aromatic), 6.58(3H, d, J=8.2Hz, aromatic), 6.44(3H, d, J=8.2Hz, aromatic), 4.90(3H, d, J=3.4Hz, H-1'×3), 3.79-3.73(6H, m, H-2×3, H-5×3), 3.71-3.66(6H, m, H-3×3, H-5'×3), 3.64(3H, dd, J=2.1, 12.4Hz, H-6a'×3), 3.59(3H, dd, J=4.8, 12.4Hz, H-6b'×3), 3.59-3.52(3H, m, H-6a×3), 3.54-3.51(6H, m, H-4×3, H-3'×3), 3.43(3H, dd, J=6.9, 12.4Hz, H-6b×3), 3.39-3.34(1H, m, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.37(3H, dd, J=3.4, 9.6Hz, H-2'×3), 3.25(3H, dd, J=9.6, 9.6Hz, H-4'×3), 3.11(3H, dd, J=4.8, 13.7Hz, H-1a×3), 3.01(3H, dd, J=7.7, 13.7Hz, H-1b×3), 2.98-2.86(2H, m, -SCH₂-), 2.27-2.23(6H, m, -CH₂CH₂CO-×3), 2.19-2.14(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 2.10(2H, t, J=7.6Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.98-1.94(6H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂-×3), 1.72-1.65(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.43-1.36(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.39-1.29(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.19-1.13(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)이었다. 이러한 결과로부터 화합물 1의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 1의 분자 질량은 1740.70이다.

(2) 2 번째의 리간드 복합체(화합물 2)의 합성

상기 2 번째의 리간드 복합체의 하나인 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, n^1 이 1이고, X가 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 상기 식 (19)로 나타내어지는 락토오스가 도입되며, m^1, m^2, m^3 가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 2)를 하기 순서로 합성하였다.

상기 리간드 복합체(화합물 2)의 합성에 있어서는, 우선, 링커 화합물 A를 상술한 1 번째 리간드 복합체의 합성에서의 순서와 같은 순서로 합성하였다.

계속해서, 얻어진 링커 화합물 A를 이용하여, 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, n^1 이 1이고, X가 일반식 (2)로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 상기 식 (19)로 나타내어지는 락토오스가 도입되며, m^1, m^2, m^3 가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 2)를 하기 식 (25)의 순서로 합성하였다.



MALDI-TOF/MS Exact Mass: 1740.70
m/z; 1766.92[M+Na]⁺

...(25)

식 (25)에 나타내는 바와 같이, 상기 방법으로 얻어진 링커 화합물 A와, 상기 식 (19)로 나타내어지는 올리고당인 시판되는 락토오스 수화물(4.5 당량)을 H₂O/디메틸아세트아미드(식 중 DMAc)/초산(AcOH)=1/1/0.1의 혼합 용매에 용해하고, pH 4 ~ 4.5, 37°C에서 시프 염기를 형성시킨 후, 용매에 AcOH를 가하고, 10 당량의 95% NaBH₃CN를 가하여, pH 3 ~ 4.5, 37°C에서 환원 아미노화 반응을 행하였다. 그 후, 얻어진 화합물을 Sephadex G-50(아마삼 바이오 시스템즈 社 제품)을 이용하여 겔 여과 크로마토그래피로 정제하고, 다시 탈염 처리를 행하여 말단에 β-갈락토피라노오스를 3 단위 포함하여 이루어지는 리간드 복합체로서 화합물 2를 얻었다. 상기 화합물 2의 동정은, MALDI-TOF/MS 및 NMR에 의해 행하였다.

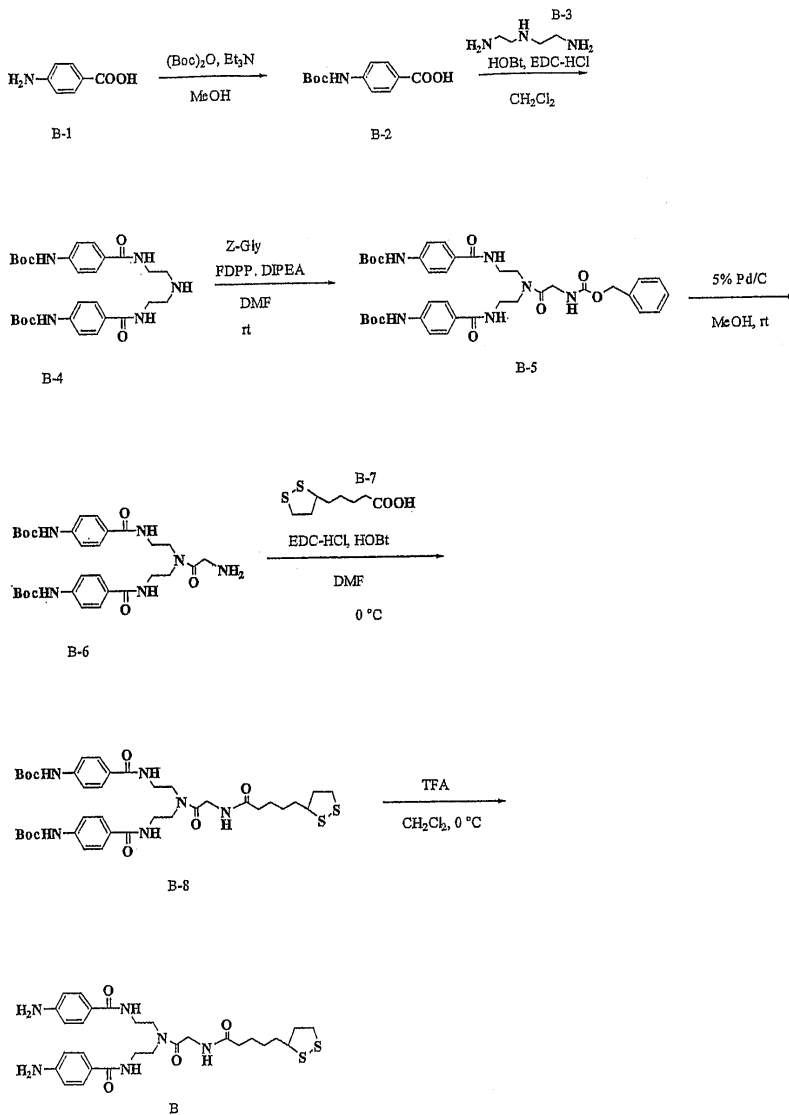
MALDI-TOF/MS의 결과는, m/z 1766.92 [(M+Na)⁺]였다. 또한, ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, 86.99(3H, dd, J=7.9, 8.2Hz, aromatic), 6.70(s, 3H, aromatic), 6.61(3H, dd, J=7.9, aromatic), 6.43(3H, d, J=8.2Hz, aromatic), 4.27(3H, d, J=7.6Hz, H-1'×3), 3.90-3.85(3H, m, H-2×3), 3.74-3.70(3H, m, H-5'×3), 3.69-3.66(3H, m, H-4×3), 3.68-3.62(3H, m, H-6a'×3), 3.65-3.62(3H, m, H-3×3), 3.57(3H, br, H-4'×3), 3.53(3H, dd, J=5.8, 11.7Hz, H-6b'×3), 3.47-3.43(6H, m, H-6×3), 3.41(3H, m, J=3.1, 10.0Hz, H-3'×3), 3.38(3H, brt, J=5.8Hz, H-5×3), 3.35(3H, dd, J=7.6, 10.0Hz, H-2'×3), 3.36-3.29(1H, m, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.12(3H, brd, J=10.7Hz, H-1a×3), 2.91(3H, dd, J=7.6, 12.0Hz, H-1b×3), 2.90-2.83(2H, m, -SCH₂-), 2.23-2.16(6H, m, -CH₂CH₂CO-×3), 2.18-2.10(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 2.06(2H, t, J=5.8Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.95-1.89(6H, m, -CH₂CH₂CO-×3), 1.68-1.59(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.41-1.30(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.32-1.22(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.15-1.08(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)였다. 이러한 결과로부터 화합물 2의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 2의 분자 질량은 1740.70이다.

(3) 3 번째의 리간드 복합체(화합물 3)의 합성

상기 3 번째의 리간드 복합체의 하나인 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, n^1 이 1이고, X가 일반식 (3)으로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 상기 식 (18)로 나타내어지는 말토오스가 도입되며, m^4 , m^5 가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 3)를 하기의 순서로 합성하였다.

상기 리간드 복합체(화합물 3)의 합성의 전 단계로서, 먼저, 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 2 개 가지는 링커 화합물 B의 합성을 행하였다.

하기 식 (26)에 나타내는 바와 같이, 아미노 안식향산(B-1)의 아미노기를 Boc기로 보호한 아미노 안식향산 유도체(B-2)와 디에틸렌트리아민(B-3)을 HOBt와 EDC-HCl을 이용해 축합하여, 디아미드체(B-4)를 79%의 수율로 얻었다. DMF 중, 축합제로서 FDPP를 이용하여 디아미드체(B-4)와 아미노기를 Z기로 보호한 글리신(Z-Gly)을 반응시켜, (B-5)를 75%의 수율로 얻었다. Z기를 집속 수소 환원에 의해 제거하여 (B-6)으로 만든 후, 치옥트산(B-7)과 축합시켜 (B-8)을 97%의 수율로 얻었다. 마지막으로, TFA에 의해 Boc기를 제거하고, 방향족 아미노기를 2 단위 가지는 링커 화합물 B를 95%의 수율로 얻었다.



...(26)

보다 구체적으로 설명하면, 상기 화합물 B-2는, 4-아미노 안식향산(B-1)(2.00g, 14.6mmol)을 메탄올 140mL에 용해시키고, $(\text{Boc})_2\text{O}$ (6.7mL, 29.1mmol)와 트리에틸아민(3.06mL, 21.9mmol)을 가하여 실온에서 16 시간 교반하였다. 반응 용액을 감압농축하고, 잔사에 헥산과 포화 탄산수소나트륨 수용액 (50mL)을 가하여 수층을 추출하였다. 이 수층에 10% 구

연산 나트륨 수용액을 pH=4가 될 때까지 가하여 백색의 고체를 석출시켰다. 얻어진 고체를 초산에틸에 용해시켜, 물로 세정한 후, 감압농축하였다. 잔사를 초산에틸-헥산으로 재결정하여 화합물 B-2(3.25g, 수율: 91.3%)를 무색 결정으로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 B-2의 $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CD_3OD) 측정을 행한 결과, δ 9.24(1H, s, NH), 7.96(2H, d, J=8.9Hz, aromatic), 7.55(2H, d, J=8.6Hz, aromatic), 1.56(9H, s, t-butyl)이었다. 또한, 상기 화합물 B-2의 ESI-MS(negative) 측정을 행한 결과, m/z 236.20 [(M-H) $^-$]이었다. 이에 의해 화합물 B-2의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 B-2의 분자 질량은 237.25이다.

계속해서, 상기 화합물 B-2(1.30g, 5.46mmol), HOBt(0.738g, 5.46mmol) 및 EDC·HCl(1.05g, 5.46mmol)을 무수디클로로메탄(30mL)에 용해시켜, 아르곤 분위기하 0°C에서 50분간 교반하였다. 이 용액에 디에틸렌트리아민(B-3)(0.283mL, 2.60mmol)을 가하고, 차광하 실온에서 철야 교반하여 백색 결정을 얻었다. 이 백색 결정을 여과하여 취한 후, 메탄올로부터 재결정하여, 화합물 B-4(1.23g, 수율: 87.4%)를 백색 결정으로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 B-4의 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) 측정을 행한 결과, δ 7.77-7.74(4H, d, J=8.67Hz, aromatic), 7.50-7.48(4H, d, J=8.57Hz, aromatic), 3.70-3.66(4H, m, J=5.19Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.34-3.28(4H, m, J=5.61Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 1.53(18H, s, t-butyl)이었다. 또한, 상기 화합물 B-4의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 542.64[(M+H) $^+$]였다. 이에 의해 화합물 B-4의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 B-4의 분자 질량은 541.60이다.

계속해서, 상기 화합물 B-4(1.03g, 1.85mmol), Z-글리신(0.430g, 2.04mmol) 및 FDPP(1.07mg, 2.78mmol)를 무수디메틸포름아미드(8mL)에 용해시킨 후, 디이소프로필에틸아민(0.36mL, 2.78mmol)을 가하고, 아르곤 분위기하 실온에서 20시간 교반하였다. 이 반응 용액을 감압농축하여 얻어진 잔사를 클로로포름에 용해하고, 유기층을 10% 구연산, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 순차 세정한 후, 무수황산나트륨을 이용하여 건조시키고, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(50g, 클로로포름:아세톤=1:2)로 정제하여 화합물 B-5(1.02 g, 수율: 75.0%)를 백색 고체로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 B-5의 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 7.88(1H, bs, NHCOPh), 7.73-7.66(10H, m, NHCOPh , aromatic), 7.56(1H, bs, NHCOPh), 7.38(4H, d, J=8.4Hz, COPhNH), 7.34-7.29(8H, m, aromatic), 5.37(1H, bs, Gly-NH), 5.00(2H, s, PhCH_2), 3.64(4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.49, 3.47(4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.43, 3.27, 3.17(6H, bt, bt, bt, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.50, 1.49(36H, s, s, t-butyl)였다. 또한, 상기 화합물 B-5의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 755.36 [(M+Na) $^+$]이었다. 이에 의해 화합물 B-5의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 B-5의 분자 질량은 732.32이다.

계속해서, 상기 화합물 B-5(0.193g, 0.264mmol)를 메탄올(3mL)에 용해하고, 10% Pd/C(120mg)를 가하여, 수소 분위기하, 실온에서 3 시간 교반한 후, Pd/C를 여과제거해 감압농축하여, 화합물 B-6(0.230g, 수율: 94.4%)을 백색 고체로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 B-6의 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, d_6 -DMSO) 측정을 행한 결과, δ 9.54(4H, d, J=9.5Hz, COPhNH), 8.58, 8.53, 8.46(4H, bs, bs, bs, NHCOPh), 8.10(2H, bs, NH_2), 7.56(1H, bs, NHCOPh), 7.76-7.73(8H, m, aromatic), 7.53-7.48(8H, m, aromatic), 4.39, 4.24(4H, bs, bs, CONCH_2), 3.80(2H, bs, CH_2NH_2), 3.42-3.33(16H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.46, 1.45(36H, s, s, t-butyl)였다. 또한, 상기 화합물 B-6의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 599.33 [(M+H) $^+$] 이었다. 이에 의해 화합물 B-6의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 B-6의 분자 질량은 598.39이다.

계속해서, 치옥트산(B-7)(41.0mg, 0.200mmol), HOBt(35.0mg, 0.200mmol) 및 EDC·HCl(42.1g, 0.200mmol)을 디메틸포름아미드(3mL)에 용해하고, 질소 분위기하에서 차광하고 0°C에서 1.5 시간 교반하였다. 이어서, 상기 화합물 B-6(0.1g, 0.167mmol)을 디메틸포름아미드(2mL)에 용해하여, 상기의 디메틸포름아미드 용액에 적하한 후, 실온에서 19 시

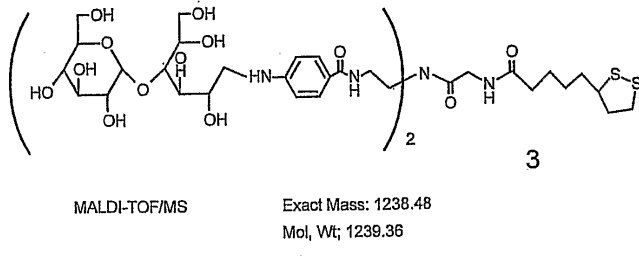
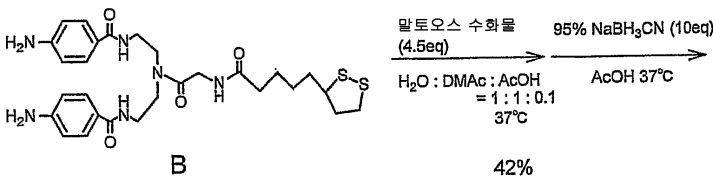
간 교반하였다. 반응 용액에 클로로포름을 가하고, 유기층을 추출하여, 이 유기층을 10% 구연산 수용액과 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 세정하고, 무수황산나트륨으로 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(50g, 클로로포름:메탄올=7:1)로 정제하여, 화합물 B-8(0.128g, 수율: 97.0%)을 백색 고체로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 B-8의 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 7.76-7.69(1H, m, NHCOPh , aromatic), 7.55(1H, bs, NHCOPh), 7.45-7.35(9H, m, aromatic, COPhNH), 7.13, 7.00, 6.97(3H, bs, bs, bs, COPhNH), 5.83(1H, bs, Gly-NH), 4.04(2H, bs, Gly- CH_2), 3.73-3.66(4H, m, CONCH_2), 3.54-3.46(1H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, SSCH_2), 3.41, 3.29, 3.22(6H, bs, bs, bs, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.16-3.03(2H, m, CH_2SSCH), 2.39(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 2.02(2H, t, $J=6.9\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.84(1H, m, CHCH_2SS), 1.58-1.52(4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.51, 1.49(18H, s, s, t-butyl), 1.35(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)였다. 또한, 상기 화합물 B-8의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 809.33 [$(\text{M} + \text{Na})^+$]였다. 이에 의해 화합물 B-8의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 B-8의 분자 질량은 787.30이다.

상기 화합물 B-8(0.128g, 0.16mmol)을 디클로로메탄(1mL)에 용해하고, TFA(2mL)를 가하여, 차광하 0°C에서 1.5 시간 교반한 후, 감압농축을 행하고, 얻어진 잔사를 메탄올에 용해하여, Dowex Marathon A(OH^- form)의 컬럼에 통과시켜 중화하고, 감압농축하여, 화합물 B(89.3mg, 수율: 95.2%)를 황색 고체로 얻었다.

얻어진 상기 화합물 B의 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, d_6 -DMSO) 측정을 행한 결과, δ 8.20, 8.07(2H, m, NHCOPh), 7.83(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$, Gly-NH), 6.51-6.48(8H, m, aromatic), 5.57(8H, d, $J=14.3\text{Hz}$, PhNH_2), 4.34, 4.12(4H, bs, bs, CONCH_2), 3.82(2H, bs, Gly- CH_2), 3.64-3.55(1H, m, SSCH_2), 3.50-3.32(16H, band, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.18-3.04(2H, m, CH_2SSCH), 2.38(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 2.02(2H, t, $J=7.1\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.85(1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 1.57-1.47(4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.35(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)였다. 또한, 상기 화합물 B의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 587.24 [$(\text{M} + \text{H})^+$]였다. 이에 의해 화합물 B의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 B의 분자 질량은 586.24이다.

계속해서, 얻어진 링커 화합물 B를 이용하여, 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, n^1 이 1이고, X가 일반식 (3)으로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 상기 식 (18)로 나타내어지는 말토오스가 도입되며, m^4 , m^5 가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 3)를 하기 식 (27)의 순서로 합성하였다.



식 (27)에 나타내는 바와 같이, 상기 방법으로 얻어진 링커 화합물 B와, 상기 식 (18)로 나타내어지는 올리고당인 시판되는 말토오스 수화물(4.5 당량)을 H_2O /디메틸아세트아미드(식 중 DMAc)/초산(AcOH)=1/1/0.1의 혼합 용매에 용해하고, pH 4 ~ 4.5, 37°C에서, 시프 염기를 형성시킨 후, 용매에 AcOH를 가하여 10 당량의 95% NaBH_3CN 을 가하여, pH 3 ~ 4.5,

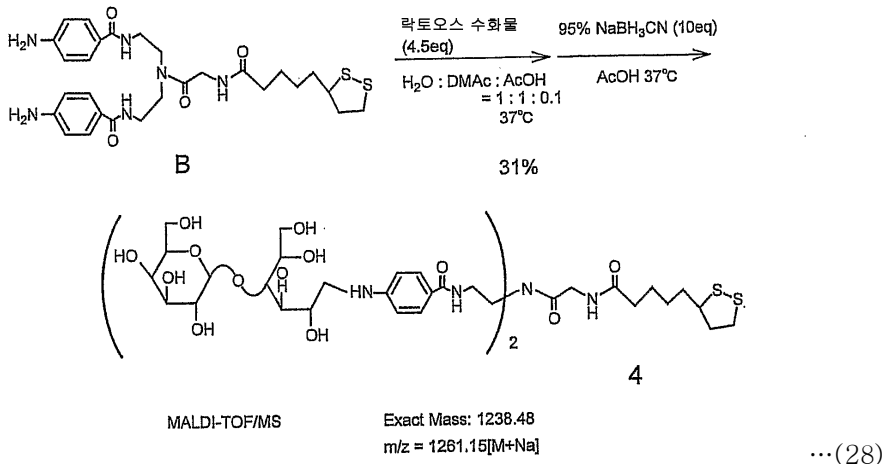
37°C에서, 환원 아미노화 반응을 행하였다. 그 후, 얻어진 화합물을 Sephadex G-50(아마삼 바이오 시스템즈社 제품)을 이용하여, 겔 여과 크로마토그래피로 정제하고, 다시 탈염처리를 행하여, 말단에 α-글루코피라노오스를 2 단위 포함하여 이루어지는 리간드 복합체로서 화합물 3을 얻었다. 상기 화합물 3의 동정은, MALDI-TOF/MS 및 NMR에 의해 행해졌다.

MALDI-TOF/MS의 결과는, m/z 1239.36 [(M+H)⁺]이었다. 또한, ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, δ7.39(2H, d, J=8.2, aromatic), 7.38(2H, d, J=8.2, aromatic), 6.56(2H, d, J=8.2, aromatic), 6.55(2H, d, J=8.2, aromatic), 4.91(2H, d, J=3.4Hz, H-1'×2), 3.84(2H, s, -NHCOCH₂NH-), 3.83-3.78(2H, m, H-2×2), 3.75(2H, dd, J=4.1, 6.9Hz, H-5×2), 3.72(2H, dd, J=2.7, 4.8Hz, H-3×2), 3.69(2H, dd, J=4.1, 4.8Hz, H-4×2), 3.69-3.66(2H, m, H-5×2), 3.64(2H, dd, J=2.1, 12.4Hz, H-6a'×2), 3.58(2H, dd, J=4.8, 12.4Hz, H-6b'×2), 3.55-3.51(2H, m, H-6a×2), 3.53(2H, dd, J=8.9, 9.6Hz, H-3'×2), 3.47-3.40(8H, m, -CONHCH₂CH₂N-×2), 3.44-3.41(2H, m, H-6b×2), 3.37(2H, dd, J=3.4, 9.6Hz, H-2'×2), 3.37-3.30(1H, m, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.23(2H, dd, J=8.9, 10.3Hz, H-4'×2), 3.20(3H, dd, J=4.8, 13.7Hz, H-1a×2), 3.12(2H, dd, J=8.2, 13.7Hz, H-1b×2), 3.00-2.89(2H, m, -SCH₂-), 2.22-2.15(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.98(2H, t, J=6.9Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.72-1.64(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.45-1.37(1H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂(1H)-), 1.35-1.23(3H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), -COCH₂CH₂CH₂CH₂(1H)-), 1.09-1.02(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)였다. 이들 결과로부터 화합물 3의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 3의 분자 질량은 1238.48이다.

(4) 4 번째의 리간드 복합체(화합물 4)의 합성

상기 4 번째의 리간드 복합체의 하나인 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, n¹이 1이고, X가 일반식 (3)으로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 상기 식 (19)로 나타내어지는 락토오스가 도입되며, m⁴, m⁵가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 4)를 하기의 순서로 합성하였다.

상기 리간드 복합체(화합물 4)의 합성의 전 단계로서, 먼저, 방향족 아미노기 말단이 보호기에 의해 보호된 분기쇄를 2 쇠가지는 링커 화합물 B의 합성을 상기와 같이 행하였다. 계속해서, 얻어진 링커 화합물 B를 이용하여, 상기 일반식 (12)로 나타내어지는 구조에 있어서, n¹이 1이고, X가 일반식 (3)으로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 상기 식 (19)로 나타내어지는 락토오스가 도입되며, m⁴, m⁵가 2인 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 4)를 하기 식 (28)의 순서로 합성하였다.



식 (28)에 나타내는 바와 같이, 상기 방법으로 얻어진 링커 화합물 B와, 상기 식 (19)로 나타내어지는 올리고당인 시판되는 락토오스 수화물(4.5 당량)을 H₂O/디메틸아세트아미드(식 중 DMAc)/초산(AcOH)=1/1/0.1의 혼합 용매에 용해하고, pH 4 ~ 4.5, 37°C에서, 시프 염기를 형성시킨 후, 용매에 AcOH를 가하여, 10 당량의 95% NaBH₃CN을 가하여, pH 3 ~ 4.5, 37°C에서, 환원 아미노화 반응을 행하였다. 그 후, 얻어진 화합물을 Sephadex G-50(아마삼 바이오 시스템즈社 제품)을 이용하여, 겔 여과 크로마토그래피로 정제하고, 다시 탈염 처리를 행하여, 말단에 β-갈락토피라노오스를 2 단위 포함하여 이루어지는 리간드 복합체로서 화합물 4를 얻었다. 상기 화합물 4의 동정은, MALDI-TOF/MS 및 NMR에 의해 행해졌다.

MALDI-TOF/MS의 결과는, m/z 1261.15 [(M+ Na)+]였다. 또한, ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, 8.74(2H, d, J=8.9Hz, aromatic), 7.39(2H, d, J=8.9Hz, aromatic), 6.59(2H, d, J=8.9Hz, aromatic), 6.58(2H, d, J=8.9Hz, aromatic), 4.30(d, 1H, J=7.6Hz, H-1'), 4.29(1H, d, J=7.6Hz, H-1'), 3.93-3.89(2H, m, H-2×2), 3.84(2H, s, -CONHCH₂NH-), 3.74-3.71(2H, m, H-5'×2), 3.71-3.69(4H, m, H-4×2, H-4'×2), 3.69-3.66(2H, m, H-3×2), 3.65(2H, dd, J=3.0, 11.7Hz, H-6a'×2), 3.53(2H, dd, J=5.5, 11.7Hz, H-6b'×2), 3.48-3.42(12H, m, H-5×2, H-3'×2, -CONHCH₂CH₂N-×2), 3.41-3.39(4H, m, H-6×2), 3.37-3.32(1H, m, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.35(2H, dd, J=7.6, 8.9Hz, H-2'×2), 3.23(2H, dd, J=4.1, 13.7Hz, H-1a×2), 3.04(2H, dd, J=7.6, 13.7Hz, H-1b×2), 3.01-2.90(2H, m, -SCH₂-), 2.23-2.16(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.99(2H, t, J=6.9Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.73-1.66(1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.46-1.39(1H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂(1H)-), 1.35-1.30(1H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂(1H)-), 1.32-1.26(2H, m, -COCCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.11-1.04(2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)였다. 이러한 결과로부터 화합물 4의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 4의 분자 질량은 1238.48이다.

[실시예 2: SPR 측정과 질량 분석에 의한 단백질의 분석]

실시예 2에서는, 실시예 1에서 제작한 각 리간드 복합체(화합물 1 ~ 4)를 이용하여, 단백질의 당쇄와의 결합 특성에 대하여, SPR 측정 및 질량 분석에 의해 해석하였다. 그 순서에 대하여 이하에 설명한다.

도 1에는, 본 실시예에서의 단백질의 분석 순서를 공정 1 ~ 공정 12로 나타낸다. 도 1에 있어서, 공정 1 ~ 공정 7은, 각 리간드 복합체(화합물 1 ~ 4)를 금(Au)으로 코팅된 지지체 표면에 고정화시켜 리간드 담지체(센서 칩)를 제작하는 공정이다. 그리고 상기 리간드 담지체를 분석 대상이 되는 단백질을 포함하는 용액과 접촉시키는 공정 8의 이후에 실시되는 공정이 SPR 측정을 행하는 공정이다. 또한, 지지체 표면을 물로 세정하는 공정 10의 이후에 실시되는 공정이 질량 분석(MS)에 의해 단백질을 동정하는 공정이다.

본 실시예에 있어서, SPR 측정은 일본 레이저 전자사 제품인 SPR-8B를 이용하여 행하였다. 또한, 질량 분석은 어플라이드 바이오사 제품인 매트릭스 지원형 레이저 이탈/비행 시간형 질량 분석계(MALDI-TOF/MS)인 Voyager RP-DE를 이용하여 행하였다.

분석에 이용한 단백질은, 글루코피라노오스 결합성의 렉틴 단백질로서 Concanavalin A(Con A라 약기한다), PSA, LCA, 및, 갈락토피라노오스 결합성의 렉틴 단백질로서 RCA, PNA의 5 종류였다. 그리고 네가티브 컨트롤로서 소 혈청 알부민(BSA)을 이용하였다.

먼저, 도 1에 나타내는 공정 1 ~ 공정 7에 근거하여, 상기 화합물 1 ~ 4를 각각 고정화한 4 종류의 리간드 담지체를 제작하였다. 계속해서, 상기 5종의 렉틴 단백질 및 BSA를 각각 PBS 버퍼에 용해하여 단백질 용액을 조제하였다. 그 후, 도 1에 나타내는 공정 8을 행하여, 각 리간드 담지체와 각 단백질 용액을 각각 접촉시켜 상호작용시켰다. 계속해서, SPR 측정을 행하여, 리간드 담지체와 단백질의 결합측정을 행하였다.

α-글루코피라노오스를 고정화한 리간드 담지체(센서 칩)를 이용한 렉틴 단백질의 결합 거동의 결과를 도 2, 도 3 및 표 1에 나타내었다. 도 2에는 화합물 3(Di-valent type)의 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩의 결과를 나타내고, 도 3에는 화합물 1(Tri-valent type)의 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩의 결과를 나타내었다. 도 2 및 도 3 모두 (a)는 Con A의 결합 거동 결과, (b)는 PSA의 결합 거동 결과, (c)는 LCA의 결합 거동 결과를 나타내고 있다.

	Di-valent형			Tri-valent형		
	K _D	k _a	k _d	K _D	k _a	k _d
Con A	11.33	0.45	0.51	4.34	1.95	0.85
PSA	8.58	0.87	0.75	9.86	2.34	1.01
LCA	결합되지 않음			6.04	2.40	1.45
RCA	결합되지 않음			결합되지 않음		
PNA	결합되지 않음			결합되지 않음		

K_D: 해리 상수(μM)

k_a : 결합 속도 상수($M^{-1}s^{-1} \times 10^4$)

k_d : 해리 속도 상수($s^{-1} \times 10^1$)

도 2 및 도 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, Con A 및 PSA에 대해서는, 리간드 복합체의 링커 부분 구조의 차이에 상관없이 마찬가지로 결합 거동을 나타내었다. 그러나, LCA에 대해서는, 3 단위의 당분자를 가지는 리간드 복합체인 화합물 1과는 결합하는 것이 나타났지만, 2 단위의 당분자를 가지는 리간드 복합체 화합물 3과는 결합하지 않는 것이 나타났다. 도면에는 도시하지 않았으나, 네가티브 컨트롤인 BSA는 화합물 1 또는 3을 고정화한 칩에는 결합하지 않는 것을 알 수 있었다.

또한, 표 1에는, 각각의 단백질의 결합 거동을 정리하였다. α -글루코오스 결합성의 렉틴 단백질에 특이적 결합이 관측되고 결합 상수의 산출도 가능하였다. Di-valent 리간드 결합체를 이용한 경우보다 Tri-valent 리간드 결합체를 이용한 경우가 해리 상수(K_D)가 동등 또는 작게 산출되고 있으며, 1 개의 리간드 복합체 당 당쇄 수가 증가함에 따라, 결합 활성이 상승하고 있는 것이 밝혀졌다.

β -갈락토포라노오스를 고정화한 리간드 담지체(센서 칩)를 이용한 렉틴 단백질의 결합 거동의 결과를 도 4, 도 5 및 표 2에 나타내었다. 도 4에는 화합물 4(Di-valent type)의 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩의 결과를 나타내고, 도 5에는 화합물 2(Tri-valent type)의 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩의 결과를 나타내었다. 도 4 및 도 5 모두 (a)는 RCA의 결합 거동 결과, (b)는 PNA의 결합 거동 결과를 나타내고 있다.

	Di-valent형			Tri-valent형		
	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d
Con A	결합되지 않음			*1		
PSA	결합되지 않음			결합되지 않음		
LCA	결합되지 않음			결합되지 않음		
RCA	12.23	0.74	0.61	7.79	0.52	0.41
PNA	4.95	1.71	0.85	5.83	1.98	1.15

K_D : 해리 상수(μM)

k_a : 결합 속도 상수($M^{-1}s^{-1} \times 10^4$)

k_d : 해리 속도 상수($s^{-1} \times 10^1$)

*1: 단백질 농도에 의존하지 않는 비특이적 흡착이 관찰되었다.

도 4 및 도 5로부터 알 수 있는 바와 같이, RCA 및 PNA는 리간드 복합체의 링커 부분 구조의 차이에 상관없이 마찬가지로 결합 거동을 나타내었다. 도면에는 도시하지 않았으나, 네가티브 컨트롤인 BSA는 화합물 2 또는 4를 고정화한 칩에는 결합되지 않는 것을 알 수 있었다.

또한, 표 2에는, 각각의 단백질의 결합 거동을 정리했다. β -갈락토스 결합성의 렉틴 단백질에 특이적 결합이 관측되고 결합 상수의 산출도 가능하였다. 한편, Con A에 대해서는 화합물 3을 이용하여 작성한 칩에서, 단백질 농도에 의존하지 않는 비특이적인 결합 거동이 관측되었다. Di-valent 리간드 결합체를 이용한 경우보다 Tri-valent 리간드 결합체를 이용한 경우가 해리 상수 (K_D)가 동등 또는 작게 산출되고 있어 1 개의 리간드 복합체 당 당쇄 수가 증가함으로써, 결합 활성이 상승하고 있는 것이 밝혀졌다.

이상의 결과로부터, 당쇄의 집합화도에 따라 단백질의 당쇄에 대한 결합 활성이 다른 경우가 있는 것이 밝혀지고, 렉틴 단백질의 당쇄 결합 특성도 이 시스템에 의해 측정할 수 있음을 알 수 있었다.

또한, 이 SPR 측정에 제공한 리간드 담지체 중, 단백질과의 결합이 확인된 것에 대해서는, 공정 9 및 공정 10을 행한 후, 질량 분석계에 제공함으로써 리간드 담지체에 결합되어 있는 단백질의 동정을 행하였다. 한편, 질량 분석을 행할 때에는, 결합 측정을 행한 부분에 매트릭스 용액(포화 α CHCA 또는 시나핀산)을 인가하여 건조시킨 후 질량 분석계에 제공하여 분자 질량의 측정을 행하였다.

상기의 일련의 공정으로 리간드 담지체와 단백질의 결합 거동을 확인한 후, 공정 11에서 리간드 담지체와 단백질의 결합을 해리시킨 후, 공정 12에서 PBS 버퍼로 세정을 행하였다. 그 후, 다른 단백질 용액을 이용하여 재차 공정 8 ~ 공정 10까지를 반복하여 SPR 측정 및 질량 분석을 행하였다. 이 작업을 각 리간드 담지체 및 각 단백질에 대하여 반복해서 행하였다.

질량 분석의 결과를 도 6 및 표 3에 나타내었다. 도 6의 (a)에는 Con A의 분석 결과를 나타내고, 도 6의 (b)에는 PNA의 분석 결과를 나타내었다.

렉틴 단백질	분자량	Found (m/z)
Con A	104000 (α_4) 25572 (α)	25523 (α chain)
PSA	50000 ($\alpha_2\beta_2$) 6000 (α) 18000 (β)	5801 (α chain) 19210 (β chain)
LCA	46000 ($\alpha_2\beta_2$) 5710 (α) 17572 (β)	5742 (α chain) 8594 (β chain, 2+)
PNA	98000 (α_4) 24500 (α)	24736 (α chain)
RCA	120000 ($\alpha_2\beta_2$) 31000 (α) 32000 (β)	미검출

도 6의 (a) 및 도 6의 (b)로부터 알 수 있는 바와 같이, 각각의 단백질을 구성하는 서브 유닛의 분자 질량에 상당하는 1가와 2가의 이온 피크가 관측되었다.

또한, 표 3에는 다른 렉틴 단백질의 결과도 함께 정리했다. 각각의 렉틴 단백질의 서브 유닛의 1가 또는 2가의 분자 질량에 가까운 이온 피크가 관측되었다. 단, RCA에 대해서는 서브 유닛의 분자 질량이 3만 달톤 이상으로 크기 때문에, 사용한 질량 분석계로는 그 이온 피크를 검출할 수 없었다. 보다 고성능인 MALDI-TOF/MS 기기를 이용하면 검출가능할 것이다.

이 질량 분석의 결과, RCA를 제외하고, 결합된 각각의 렉틴 단백질에 상당하는 분자량이 관측되어 렉틴 단백질의 동정에 성공하였다.

이상과 같이, 본 실시예의 결과로부터, 본 발명에 따른 리간드 복합체를 이용하여 SPR 측정 및 질량 분석을 행하여 단백질의 분석을 행하면, 단백질을 정확하게 동정할 수 있음이 확인되었다. 또한, 본 실시예의 결과로부터, 말단에 같은 당쇄를 가지고 있는 리간드 담지체라도 당쇄의 집합화도의 차이에 따라 단백질과의 결합 활성이 다른 것이 확인되었다. 즉, 본 발명의 단백질의 분석 방법은, 당쇄의 집합화도와 단백질의 결합 활성의 관계의 해석에도 이용할 수 있다고 생각된다. 이러한 당쇄의 집합화도와 단백질의 결합 활성의 관계 해석은, 기존의 방법에서는 판별이 불가능하기 때문에, 본 발명의 유용성을 보다 높여주는 것이라 말할 수 있다.

[실시예 3: 리간드 복합체(화합물 21, 22)의 합성]

본 실시예에서는, 실시형태에서 설명한 5 번째 및 6 번째의 리간드 복합체로 분류되는 리간드 복합체를 합성하였다. 즉, 5 번째의 리간드 복합체인 상기 일반식 (13)으로 나타내어지는 구조에 있어서 n^2 가 4이고, 상기 X가 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 글루코오스가 도입된 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 21), 및, 6 번째

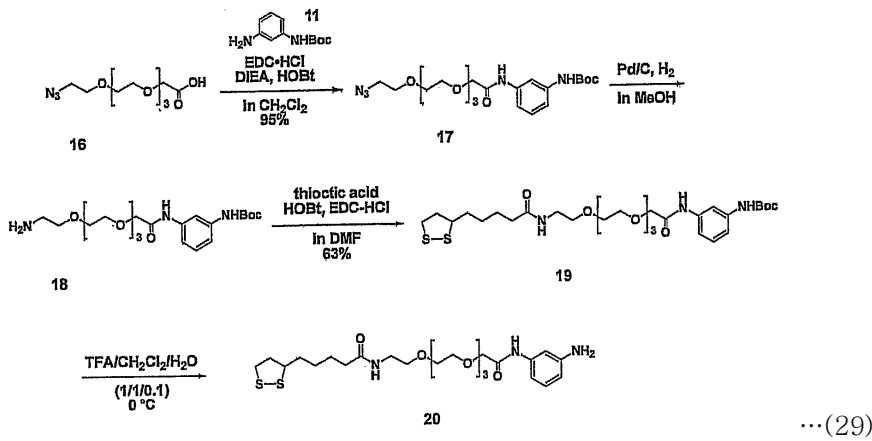
의 리간드 복합체인 상기 일반식 (13)으로 나타내어지는 구조에 있어서 n^2 가 4이고, 상기 X가 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 말토오스가 도입된 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 22)를 하기의 순서로 합성하였다.

[측정 방법, 시약 등]

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 측정에는, JEOL-Delta600 Spectrometer를 이용하였다. 화학 쉬프트는, CDCl_3 의 경우에는 테트라메틸실란(0.00ppm)을 기준 물질로 하여 δ 값으로 나타내었다. D_2O 의 경우에는 DHO(4.65ppm)를 기준 물질로 하여 δ 값으로 나타내었다. 질량 분석은 PerSeptive Biosystem MarinerTM Biospectrometry Workstation 을 이용하여 측정하였다. 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 주식회사의 제품을 구입하여 사용하였다.

(1) 화합물 16의 합성

이하, 식 (29)에 따라 설명한다.



먼저, 식 (29)의 화합물 16을 하기의 순서로 합성하였다.

비스[2-(2-히드록시에톡시)에틸]에테르(14.57ml, 80mmol)와 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (252ml, 2mmol)를 무수디클로로메탄 50ml에 용해하고, 0°C에서 디아조초산에틸(1.8ml, 17.35mmol)을 적하한 후, 실온에서 70분간 교반하였다. 반응 용액에 포화 염화암모늄 수용액 20ml를 가하여, 디클로로메탄으로 추출하고, 무수황산마그네슘으로 건조하였다.

건조제를 여과제거해 감압농축하고, 농축 잔사를 크로마토그래피(600g, 헥산:초산에틸=1:3)로 정제하여 에틸화체 화합물(2.26g, 수율: 47%)을 무색 액체로 얻었다.

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

상기의 토실체 화합물(1.01g, 2.31mmol)과 아지화 나트륨(1.53g, 2.31mmol)을 무수디메틸포름아미드 50ml에 용해하고, 차광하 120°C에서 질소 분위기하 10시간 교반하였다. 반응 용액을 클로로포름으로 추출하고, 물, 포화 식염수로 유기층을 1회씩 세정하고, 무수황산마그네슘으로 건조하였다. 건조제를 여과제거해 감압농축하고, 농축 잔사를 크로마토그래피(10g, 클로로포름:아세톤=2:1)로 정제하여 아지드체 화합물(638mg, 수율: 90%)을 황색 액체로 얻었다.

상기의 아지드체 화합물(614mg, 2.01mmol)을 메탄올 24ml에 용해하고, 차광하 0℃에서 1N NaOH 4.3ml를 가한 후, 실온에서 21시간 교반하였다. 반응 용액을 감압농축하고, 농축 잔사에 클로로포름을 가한 후, 1N HCl을 pH=2가 될 때까지 가하여 클로로포름으로 추출하였다. 유기층을 포화 식염수로 1회 세정하고, 무수황산마그네슘으로 건조하였다. 건조제를 여과제거해 감압농축하여, 화합물 16(549mg, 수율: 90%)을 무색 액체로 얻었다.

이 화합물 16에 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 [$(\text{M}+\text{Na})^+$]였다. 이에 의해 화합물 6의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 16의 분자 질량은 277.13이다.

(2) 화합물 17의 합성

화합물 16(228mg, 0.823mmol)을 무수디클로로메탄(4ml)에 용해하고, 실온, HOBt(135mg, 0.987mmol), EDC·HCl(192mg, 0.987mmol), 화합물 11(205mg, 0.987mmol)을 0℃에서 순서대로 가하고, 차광하 20시간 교반하였다. 이 반응 용액을 감압농축하여 얻어진 농축 잔사를 클로로포름으로 추출하고, 유기층을 10% 구연산, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 1회씩 세정하고, 건조제로서 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 감압농축에 의해 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(80g, 클로로포름:메탄올=10:1)로 정제하여, 화합물 17(367mg, 수율: 95%)을 황색 오일상 물질로 얻었다. 이 화합물 17의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 490.24 [$(\text{M}+\text{Na})^+$]였다. 이에 의해 화합물 3의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 17의 분자 질량은 467.24이다.

(3) 화합물 18의 합성

화합물 17(29mg, 0.062mmol)을 메탄올(3ml)에 용해하고, 10% Pd/C(5.0mg)를 가하여 수소 분위기하, 실온에서 9시간 교반하였다. 상기 Pd/C를 여과제거하여 여과액을 감압농축하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(1.5g, 클로로포름:메탄올=7:1)로 정제하여, 화합물 18(22mg, 수율: 82%)을 황색 오일상 물질로 얻었다. 이 화합물 18의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 442.27 [$(\text{M}+\text{H})^+$]이었다. 이에 의해 화합물 18의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 18의 분자 질량은 $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$: 441.25이다.

(4) 화합물 19의 합성

치옥트산(12.6mg, 0.061mmol)을 무수디메틸포름아미드(2ml)에 용해하고, 아르곤 분위기하, HOBt(8.3mg, 0.061mmol), EDC·HCl(11.8mg, 0.061mmol)을 순서대로 가하고, 차광하 실온으로 되돌려 2시간 교반하였다. 화합물 18(22.4mg, 0.051mmol)을 무수디메틸포름아미드(2ml)에 용해하여 가하고, 실온에서 차광하 1일간 교반하였다. 반응액에 톨루엔을 가하여 농축하고, 유기층을 10% 구연산, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 순차 세정하고, 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(3g, 클로로포름:메탄올=10:1)로 정제하여, 화합물 19를 황색의 유상물(油狀物)로 얻었다. 얻은 양은 27mg(84%)이었다. 이 화합물 19의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 652.28 [$(\text{M}+\text{Na})^+$]이었다. 이에 의해 화합물 19의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 19의 분자 질량은 629.28이다.

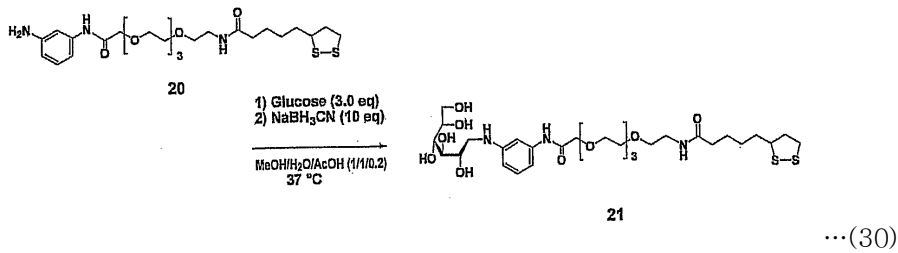
(5) 화합물 20의 합성

화합물 19(31mg, 0.050mmol)를 디클로로메탄(2ml)에 용해하고, 0℃에서 TFA(147 μ l)를 가하여 동 온도에서 3시간 교반하였다. 반응 용액을 농축한 후, 톨루엔으로 공비(共沸)하였다. 얻어진 농축 잔사를 디클로로메탄에 용해하고, 트리에틸아민 수용액을 가하여, 수상(水相)의 pH를 8로 한 후, 유기상을 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(10g, 클로로포름:메탄올=5:1)로 정제하여, 화합물 20을 황색의 유상물로 얻었다. 얻은 양은 26.1mg(59%)이었다. 이 화합물 20에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(600MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 7.17(s, 1H, aromatic), 7.1(dd, 1H, $J=8.6, 8.3\text{Hz}$ aromatic), 6.91(d, 1H, $J=8.2\text{Hz}$ aromatic) 6.45(d, 1H, $J=8.2\text{Hz}$ aromatic) 4.1 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CONH}-$), 3.78-3.49(m, 15H, ethylene glycol chain, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2-)(\text{S}-)$), 3.41(q, 2H, $J=5.5\text{Hz}$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.16(m, 1H, $-\text{SCH}_2(1\text{H})-$), 3.08(m, 1H, -

SCH₂(1H-), 2.46-2.44(m, 1H, -SCH₂CH₂(1H-), 2.13-2.10(t, 2H, J=7.6Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.92-1.88(m, 1H, -SCH₂CH₂(1H-), 1.43-1.40(m, 4H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.26-1.24(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)였다. 또한, 화합물 20의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 552.31 [(M+Na)⁺]이었다. 이상으로부터 화합물 20의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 20의 분자 질량은 529.23이다.

(6) 리간드 복합체(화합물 21)의 합성

이하, 식 (30)에 따라 설명한다.

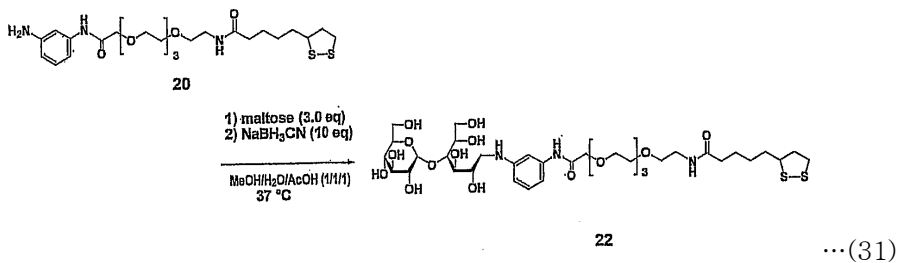


화합물 20(15.5mg, 29.3μmol)과 글루코오스(5.8mg, 32.2μmol)를 DMAc/물 (1:1, 1ml)에 용해하고, 초산(200μl)을 가하여 37°C에서 2일간 방치하였다. 반응액에 시아노수소화 붕소나트륨(5.5mg, 87.9μmol)을 가하고, 37°C에서 6일간 더 방치하였다. 반응액을 농축하였다. 얻어진 잔사는, ODS 컬럼 크로마토그래피(Chromatorex ODS, 30g, 메탄올/물=50/50)로 정제하였다. 화합물 21은 백색의 고체로 얻어졌다. 얻은 양은 4.54mg(22%)이었다.

이 화합물 21에 대하여 ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, δ7.17(s, 1H, aromatic), 7.1 (dd, 1H, J=8.6, 8.3Hz aromatic), 6.91(d, 1H, J=8.2Hz aromatic) 6.45(d, 1H, J=8.2Hz aromatic) 4.1(s, 2H, -OCH₂CONH-), 3.80-3.76(m, 1H, H-2), 3.68-3.35(m, 19H, ethylene glycol chain, H-3, H-6a, H-5, H-4, H-6b), 3.20-3.10(m, 2H, H-1-a, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.05-2.94(m, 1H, H-1b, -SCH₂), 2.28-2.23(m, 1H, -SCH₂CH₂(1H-), 2.13-2.10 (t, 2H, J=7.6, 6.9Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.78-1.69(m, 1H, -SCH₂CH₂(1H-), 1.53-1.36(m 4H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.20-1.10(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)이었다. MALDI-TOF-MS 측정을 행한 결과, m/z 694.66 [(M+H)⁺]이었다. 이에 의해 화합물 21의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 21의 분자 질량은 693.30이다.

(7) 리간드 복합체(화합물 22)의 합성

이하, 식 (31)에 따라 설명한다.



화합물 20(9.0mg, 17.0μmol)과 말토오스(5.8mg, 17.0μmol)를 메탄올/물(1:1, 1ml)에 용해하고, 초산(50μl)을 가하여, 37°C에서 24시간 방치하였다. 반응액에 초산(450μl)과 시아노수소화붕소나트륨(3.2mg, 51.0μmol)을 가하고, 37°C에서 120시간 더 방치하였다. 반응액을 농축하였다. 얻어진 잔사는, ODS 컬럼 크로마토그래피(Chromatorex ODS, 30g, 메탄올/물=50/50)로 정제하였다. 화합물 22는 백색의 고체로 얻어졌다. 얻은 양은 2.36mg(16%)이었다.

이 화합물 22에 대하여 ¹H-NMR 스펙트럼(600MHz, D₂O) 측정을 행한 결과, δ7.07-7.04(t, 1H, J=8.2Hz, aromatic), 6.76(s, 1H, J=8.2Hz, aromatic), 6.63(d, 1H, J=8.2Hz, aromatic), 6.48(dd, 1H, J=2.1, 6.2Hz, aromatic), 4.91(d, 1H, J=4.1Hz, H-1), 4.1(s, 2H, -OCH₂CONH-), 3.82-3.78(m, 1H, H-2), 3.75-3.34(m, 24H, ethylene glycol chain H-2', H-5', H-5, H-6'a, H-6'b, H-6a, H-6b, H-3, H-3', H-4') 3.25(m, 1H, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.18-3.11(m, 3H, H1'b, -CONHCH₂CH₂O-), 3.07-2.93(m, 3H, H1'a, -SCH₂), 2.29-2.20(m, 1H, -SCH₂CH₂(1H)-), 2.05-1.96(t, 2H, J=7.6, 6.9Hz, -NHCOCH₂CH₂-), 1.76-1.69(m, 1H, -SCH₂CH₂(1 H)-), 1.52-1.31(m 4H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.18-1.10(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)이었다. MALDI-TOF-MS 측정을 행한 결과, m/z 878.39 [(M+ Na)⁺]였다. 이것들에 의해 화합물 22의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 22의 분자 질량은 855.35이다.

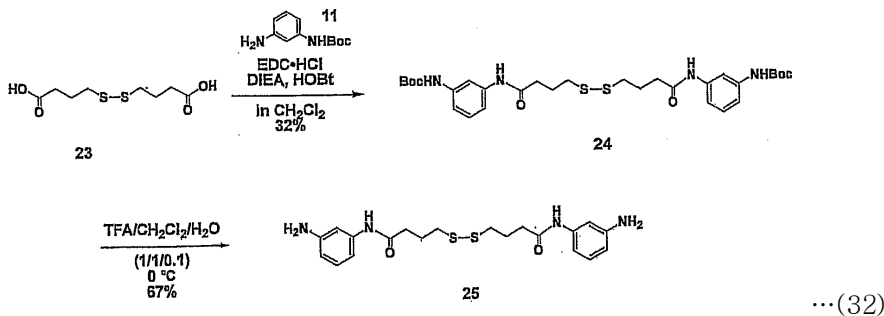
[실시예 4: 리간드 복합체(화합물 26, 27)의 합성]

본 실시예에서는, 실시형태에서 설명한 7 번째 및 8 번째의 리간드 복합체로 분류되는 리간드 복합체를 합성하였다. 즉, 7 번째 리간드 복합체의 하나인 5 번째의 리간드 복합체의 하나인 상기 일반식 (14)로 나타내어지는 구조에 있어서 n¹이 3이고, 상기 X가 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 글루코오스가 도입된 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 26), 및, 8 번째 리간드 복합체의 하나인 상기 일반식 (14)로 나타내어지는 구조에 있어서 n¹이 3이고, 상기 X가 일반식 (4)로 나타내어지는 구조를 구비하며, R'가 수소(H)이고, R에 말토오스가 도입된 구조를 가지는 리간드 복합체(화합물 26)를 하기의 순서로 합성하였다.

한편, 측정 방법, 시약 등에 대해서는, 상기 실시예 3에 기재한 것과 마찬가지로이다.

(1) 화합물 24의 합성

이하, 식 (32)에 따라 설명한다.



γ-멜캅토 낙산의 2량체(화합물 23)(344mg, 1.44mmol)를 무수디클로로메탄(25ml)에 용해하고, 실온, 아르곤 분위기하에서 HOBT(359mg, 2.64mmol), EDC·HCl(508mg, 2.64mmol), n-Boc-페닐렌디아민(화합물 11)(502mg, 2.4mmol)을 0°C에서 순서대로 가하고, 차광하 17 시간 교반하였다. 이 반응 용액을 감압농축하여 얻어진 농축 잔사를 클로로포름으로 추출하고, 유기층을 10% 구연산, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 1회씩 세정하고, 건조제로서 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 감압농축에 의해 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 크로마토그래피(50g, 톨루엔:초산 에틸=5:1)로 정제하여, 화합물 24(220mg, 수율: 30%)를 황색의 유상물로 얻었다. 이 화합물 24의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 641.25 [(M+ Na)⁺]였다. 이에 의해 화합물 24의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 24의 분자 질량은 618.25이다.

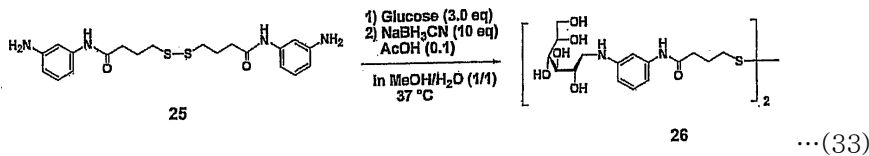
(2) 화합물 25의 합성

화합물 24(103mg, 11.67mmol)를 디클로로메탄(2ml)에 용해하고, 0°C에서 TFA(247μl)를 가하고, 동 온도에서 1시간 교반하였다. 반응 용액을 농축 후, 톨루엔으로 공비하였다. 얻어진 농축 잔사를 초산 에틸에 용해하고, 트리에틸아민 수용액을 가하여, 수상의 pH를 8로 한 후, 유기상을 무수황산마그네슘을 이용하여 건조시킨 후, 건조제를 여과제거하여 감압농축을 행하였다. 얻어진 농축 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(5mg, 클로로포름:아세톤=5:1)로 정제하여, 화합물 25

를 황색의 유상물로 얻었다. 얻은 양은 46.8mg(67%)이었다. 이 화합물 25에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(600 MHz, CDCl_3) 측정을 행한 결과, δ 6.93-6.89(m, 2H, aromatic), 6.71-6.68(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, aromatic), 6.37-6.35(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, aromatic), 2.66(t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$, O=C-CH_2), 2.36(t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-S}$), 1.98-1.94(m, 2H, $J=6.6\text{Hz}$, 14.4Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)였다. 또한, 화합물 25의 ESI-MS(positive) 측정을 행한 결과, m/z 419.06 $[(\text{M}+\text{H})^+]$ 이었다. 이 상으로부터 화합물 25의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 25의 분자 질량은 418.15이다.

(3) 리간드 복합체(화합물 26)의 합성

이하, 식 (33)에 따라 설명한다.

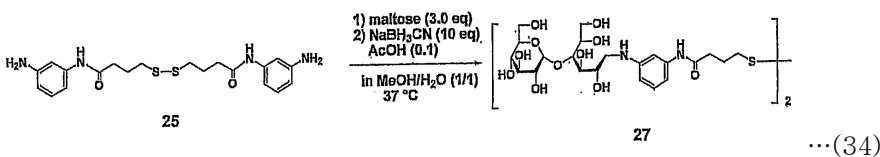


화합물 25(5.04mg, 12 μmol)와 글루코오스(4.79mg, 26 μmol)를 메탄올/물(1:1, 1ml)에 용해하고, 초산(50 μl)을 가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 방치하였다. 반응액에 초산(950 μl), 메탄올/물(1:1, 1ml), 시아노수소화붕소나트륨(5.14mg, 72 μmol)을 더하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간 더 방치하였다. 반응액을 농축하였다. 얻어진 잔사는, LH-20을 이용한 컬럼 크로마토그래피(50g, 메탄올/물=50/50)로 정제하였다. 화합물 26은 백색의 고체로 얻어졌다. 얻은 양은 2.58mg(29%)이었다.

이 화합물 26에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(600 MHz, D_2O) 측정을 행한 결과, δ 6.94(t, 1H, $J=7.8\text{Hz}$, aromatic), 6.66(s, 1H, aromatic), 6.55(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, aromatic), 6.37(d, 1H, $J=9.6\text{Hz}$, aromatic), 3.714-3.707(m, 1H, $J=4.2\text{Hz}$), 3.58-3.51(m, 3H), 3.44-3.37(m, 2H), 3.10-3.07(m, 2H, 8.4Hz, 13.8Hz), 2.56-2.50(m, 2H, O=C-CH_2), 2.24(t, 2H, $J=3.6\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-S}$), 1.83-1.81(m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)이었다. MALDI-TOF-MS 측정을 행한 결과, m/z 747. 21 $[(\text{M}+\text{H})^+]$ 이었다. 이에 의해 화합물 26의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 26의 분자 질량은 746.29이다.

(4) 리간드 복합체(화합물 27)의 합성

이하, 식 (34)에 따라 설명한다.



화합물 25(5.1mg, 12 μmol)와 말토오스(9.2mg, 26 μmol)를 메탄올/물(1:1, 1ml)에 용해하고, 초산(50 μl)을 가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 방치하였다. 반응액에 초산(950 μl), 메탄올/물(1:1, 1ml), 시아노수소화 붕소나트륨(5.22mg, 72 μmol)을 가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 120시간 더 방치하였다. 반응액을 농축하였다. 얻어진 잔사는, LH-20을 이용한 컬럼 크로마토그래피(50g, 메탄올/물=50/50)로 정제하였다. 화합물 27은 백색의 고체로 얻어졌다. 얻은 양은 2.74mg(21%)이었다.

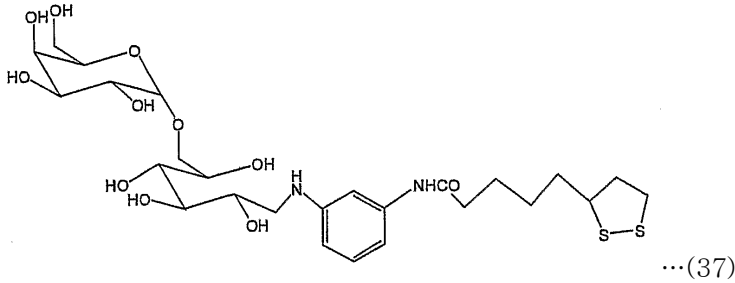
이 화합물 27에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(600MHz, D_2O) 측정을 행한 결과, δ 7.04(t, 1H, $J=4.2\text{Hz}$, aromatic), 6.77(s, 1H, aromatic), 6.64(d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$, aromatic), 6.54(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, aromatic), 4.93(d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 3.82-3.78 (m, 2H), 3.75-3.70(m, 3H), 3.63-3.56(m, 3H), 3.48(dd, 1H, $J=6.6\text{Hz}$, 11.4Hz), 3.41-3.39(m, 1H) 3.27(t, 1H, $J=9.0\text{Hz}$), 3.18(s, 3H), 3.08-3.06(m, 1H), 2.65(t, 2H, 4.8Hz, O=C-CH_2), 2.34(t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-S}$), 1.91(t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)이었다. MALDI-TOF-MS 측정을 행한 결과, m/z 1093.27 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$ 이었다. 이에 의해 화합물 27의 구조를 확인할 수 있었다. 한편, 이 화합물 27의 분자 질량은 1070.39이다.

[실시예 5]

이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 8에 나타내었다. 이에 의해, 식 (36)으로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(3) 리간드 복합체(식 (37))의 합성

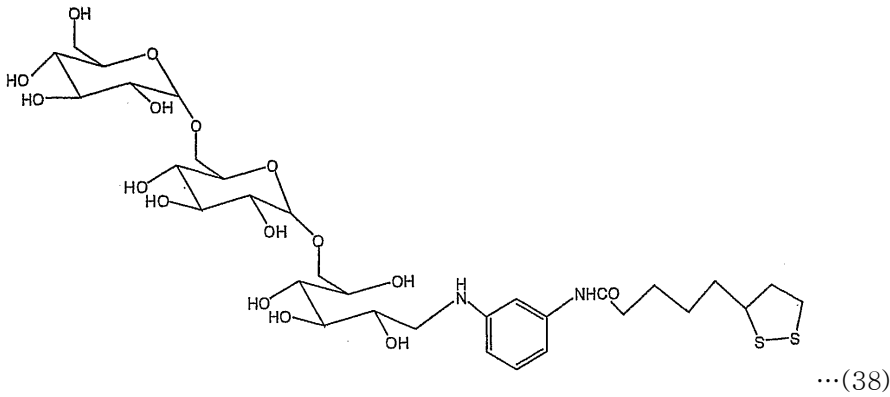
식 (37)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 9에 나타내었다. 이에 의해, 식 (37)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(4) 리간드 복합체(식 (38))의 합성

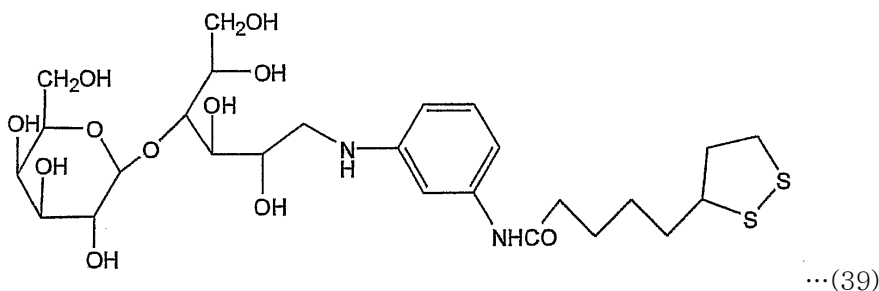
식 (38)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 10에 나타내었다. 이에 의해, 식 (38)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(5) 리간드 복합체(식 (39))의 합성

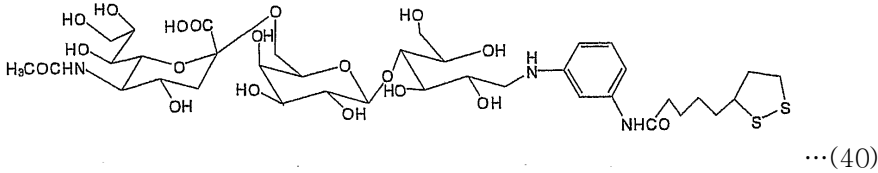
식 (39)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 11에 나타내었다. 이에 의해, 식 (39)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(6) 리간드 복합체(식 (40))의 합성

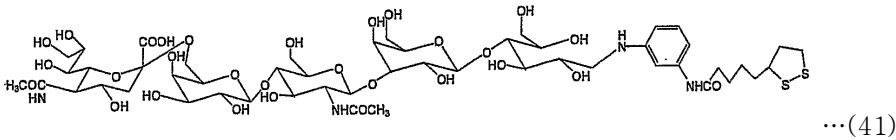
식 (40)으로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 12에 나타내었다. 이에 의해, 식 (40)으로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(7) 리간드 복합체(식 (41))의 합성

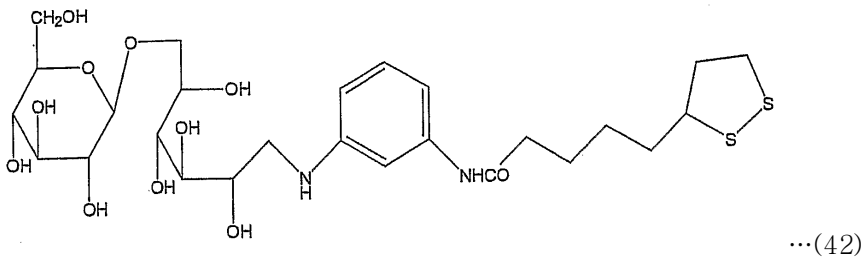
식 (41)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 13에 나타내었다. 이에 의해, 식 (41)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(8) 리간드 복합체(식 (42))의 합성

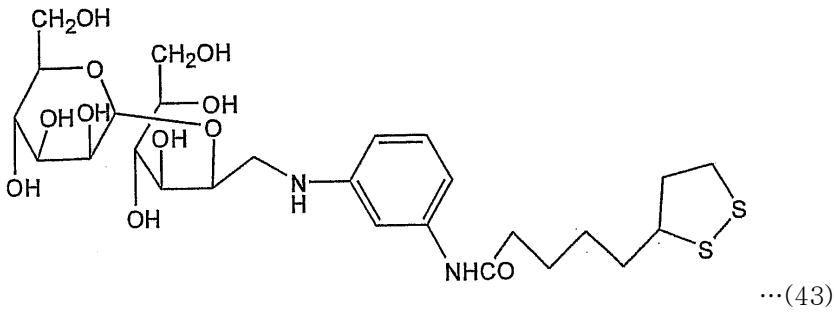
식 (42)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 14에 나타내었다. 이에 의해, 식 (42)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(9) 리간드 복합체(식 (43))의 합성

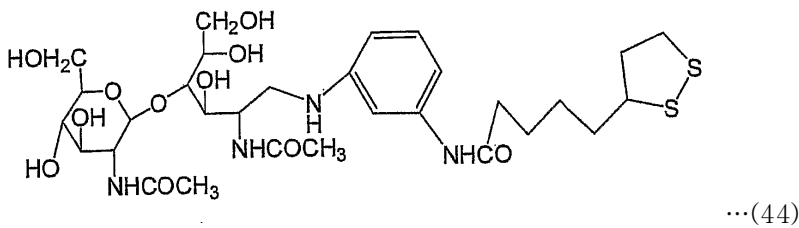
식 (43)으로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 15에 나타내었다. 이에 의해, 식 (43)으로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(10) 리간드 복합체(식 (44))의 합성

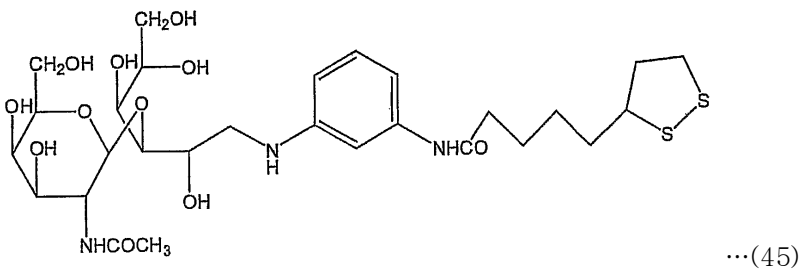
식 (44)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 16에 나타내었다. 이에 의해, 식 (44)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(11) 리간드 복합체(식 (45))의 합성

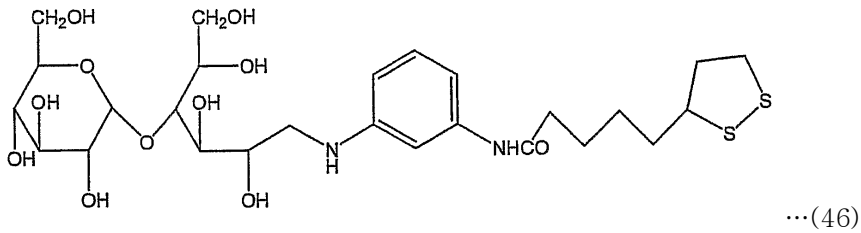
식 (45)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 17에 나타내었다. 이에 의해, 식 (45)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(12) 리간드 복합체(식 (46))의 합성

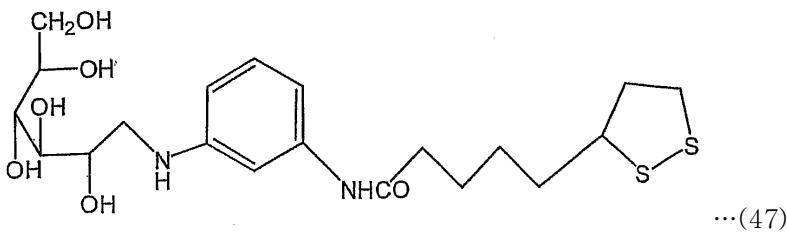
식 (46)으로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 18에 나타내었다. 이에 의해, 식 (46)으로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(13) 리간드 복합체(식 (47))의 합성

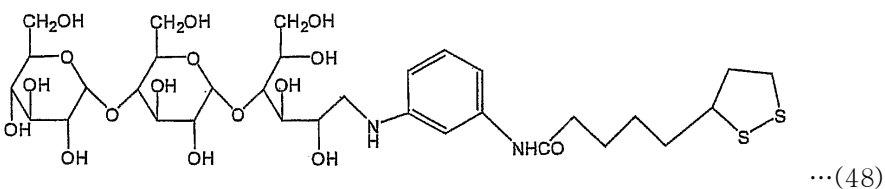
식 (47)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 19에 나타내었다. 이에 의해, 식 (47)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(14) 리간드 복합체(식 (48))의 합성

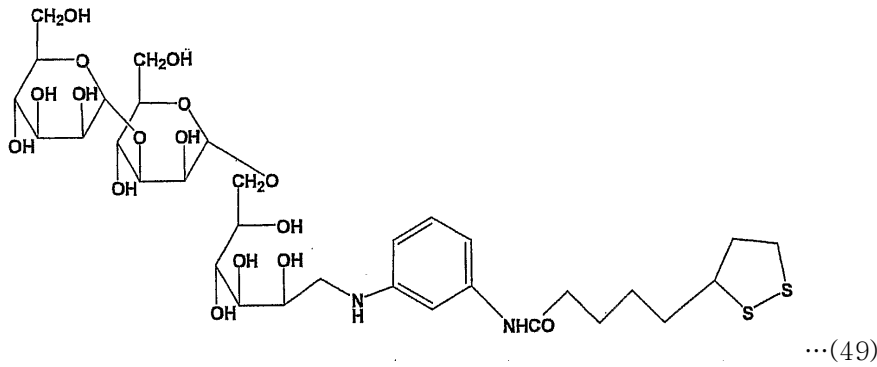
식 (48)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 20에 나타내었다. 이에 의해, 식 (48)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(15) 리간드 복합체(식 (49))의 합성

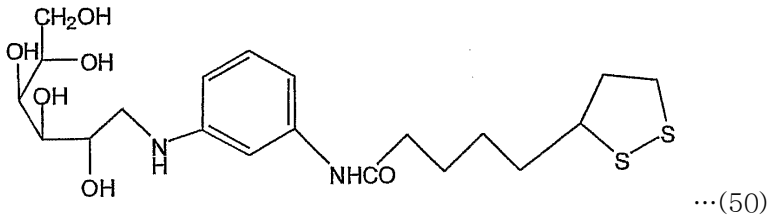
식 (49)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 ¹H-NMR 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 21에 나타내었다. 이에 의해, 식 (49)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(16) 리간드 복합체 (식 (50))의 합성

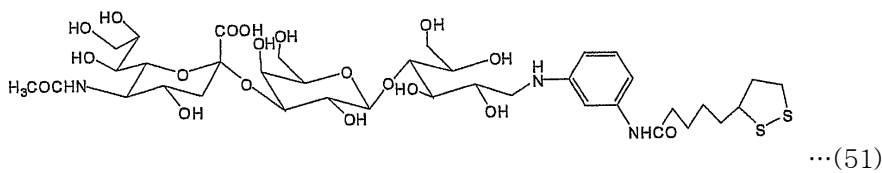
식 (50)으로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 ¹H-NMR 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 22에 나타내었다. 이에 의해, 식 (50)으로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

(17) 리간드 복합체(식 (51))의 합성

식 (51)로 나타내어지는 리간드 복합체를 상기 (1)과 마찬가지로의 순서로 합성하였다.



이 리간드 복합체의 ¹H-NMR 스펙트럼을 측정하여, 얻어진 차트를 도 23에 나타내었다. 이에 의해, 식 (51)로 나타내어지는 리간드 복합체의 구조를 확인할 수 있었다.

한편, 발명을 실시하기 위한 최선의 형태의 항에서 이루어진 구체적인 실시형태 또는 실시예는, 어디까지나 본 발명의 기술 내용을 명확히 하는 것으로서, 이와 같은 구체적인 예로만 한정되어 협의로 해석되어서는 안 되며, 본 발명의 정신과 이하에 기재하는 청구의 범위 내에서 다양하게 변경하여 실시할 수 있는 것이다.

산업상 이용 가능성

상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 리간드 복합체는, 하나의 리간드 복합체 내에 복수의 당분자를 도입할 수 있기 때문에, 상기 리간드 복합체들이 지지체 표면에 집합화하는 것을 피하면서 당분자에 대해서는 집합화시킬 수 있다. 본 발명의 링커 화합물을 이용함으로써, 상기 당분자와 단백질의 상호 작용을 높은 재현성으로 평가하는 것이 가능해진다.

또한, 본 발명에 따른 리간드 담지체는, 미지의 단백질의 동정에 이용할 수 있는 효과를 발휘한다. 또한, 본 발명에 따른 단백질 분석 방법에 따르면, 미지의 단백질의 동정을 행할 수 있다

본 발명은, 단백질의 기능 해석에 효과적으로 이용할 수 있는 신규 리간드 복합체나 리간드 담지체 등을 제공하는 것이다. 올리고당쇄를 고정화한 리간드 담지체(칩)가 당쇄나 단백질의 기능 해석의 툴로 발전하면, 올리고당쇄가 관여하는 생명 현상의 해명에 공헌할 뿐만 아니라, 의약품 개발에 있어서의 중요한 기술이 될 것으로 기대된다. 그러므로, 본 발명의 유용성은 높은 것으로 생각된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 리간드 복합체를 이용한 단백질 분석 방법의 순서를 나타내는 모식도이다.

도 2의 (a)는 α -글루코피라노오스를 2 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 Con A의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2의 (b)는 α -글루코피라노오스를 2 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 PSA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2의 (c)는 α -글루코피라노오스를 2 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 LCA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3의 (a)는 α -글루코피라노오스를 3 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 Con A의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3의 (b)는 α -글루코피라노오스를 3 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 PSA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3의 (c)는 α -글루코피라노오스를 3 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 LCA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4의 (a)는 β -갈락토피라노오스를 2 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 RCA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4의 (b)는 β -갈락토피라노오스를 2 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 PNA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5의 (a)는 β -갈락토피라노오스를 3 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 RCA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5의 (b)는 β -갈락토피라노오스를 3 분자 가지는 리간드 복합체를 고정화한 센서 칩을 이용하여 PNA의 결합 거동을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6의 (a)는 센서 칩에 결합된 Con A를 질량 분석한 결과를 나타내는 차트이다.

도 6의 (b)는 센서 칩에 결합된 PNA를 질량 분석한 결과를 나타내는 차트이다.

도 7은 리간드 복합체(화합물 30)의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 8은 리간드 복합체(식 (36))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 9는 리간드 복합체(식 (37))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 10은 리간드 복합체(식 (38))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 11은 리간드 복합체(식 (39))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 12는 리간드 복합체(식 (40))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 13은 리간드 복합체(식 (41))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 14는 리간드 복합체(식 (42))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 15는 리간드 복합체(식 (43))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 16은 리간드 복합체(식 (44))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 17은 리간드 복합체(식 (45))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 18은 리간드 복합체(식 (46))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 19는 리간드 복합체(식 (47))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 20은 리간드 복합체(식 (48))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

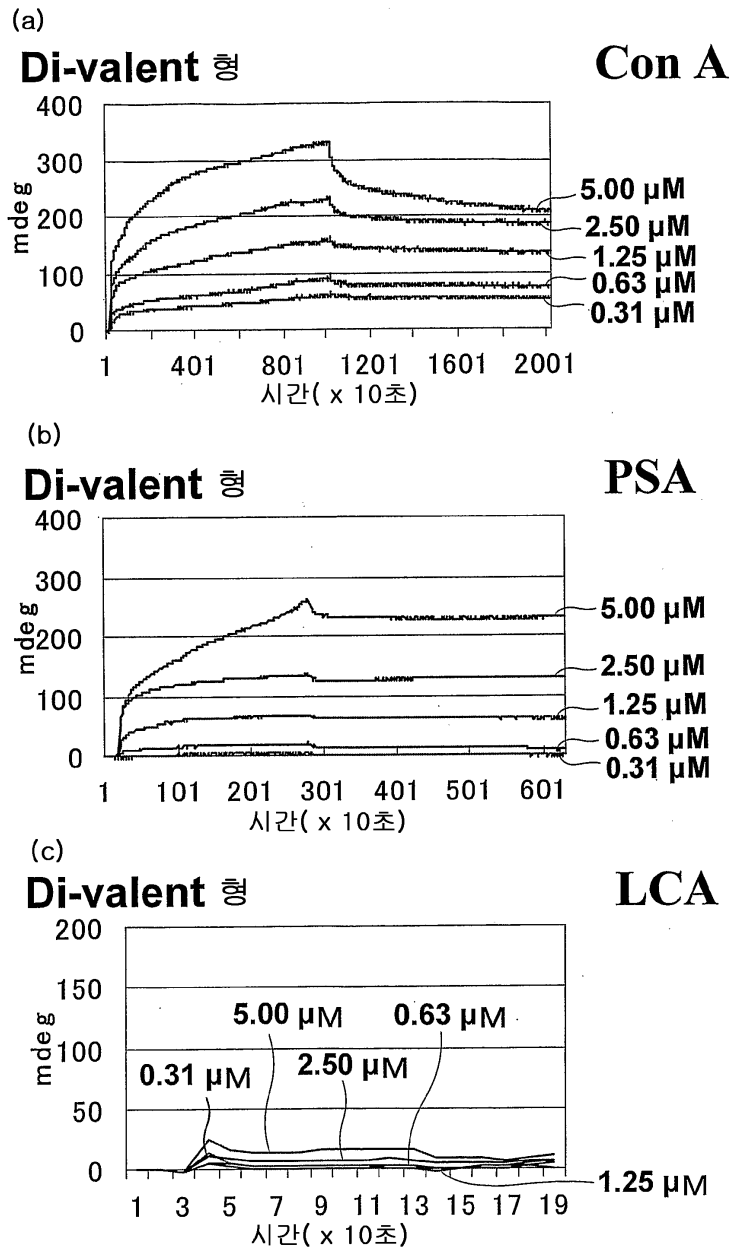
도 21은 리간드 복합체(식 (49))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도 22는 리간드 복합체(식 (50))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

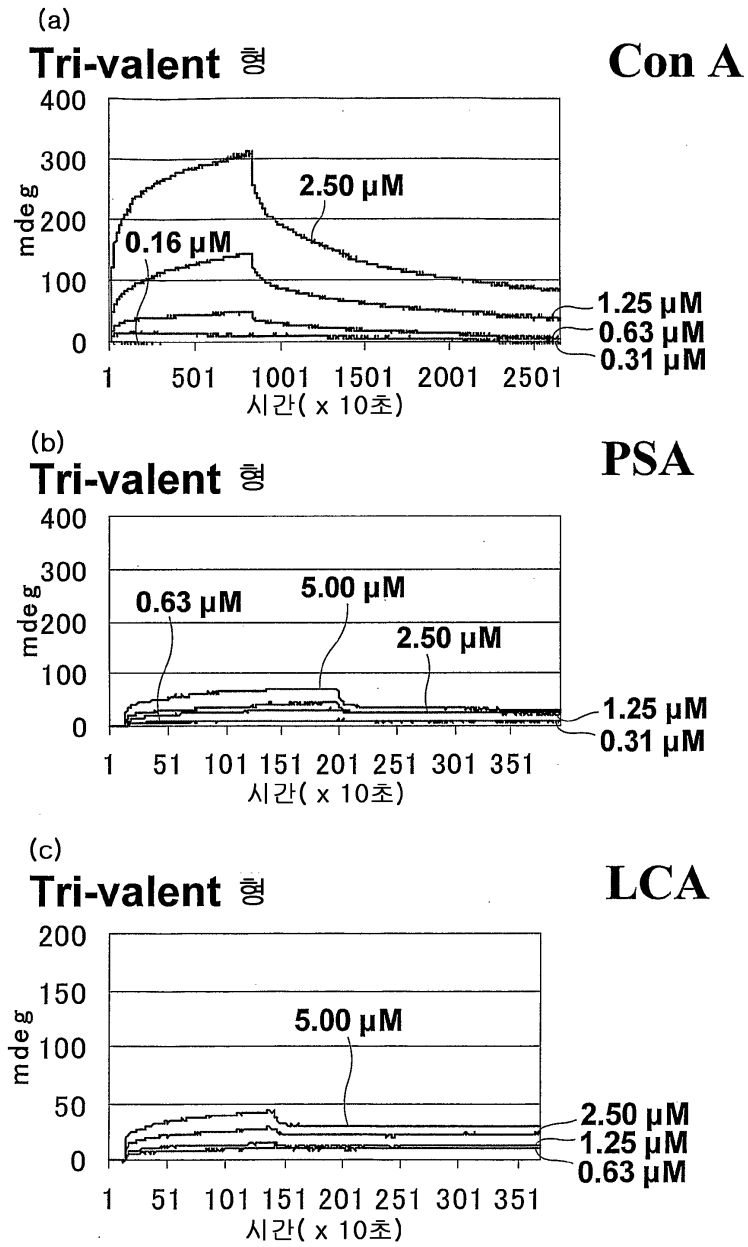
도 23은 리간드 복합체(식 (51))의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 측정 차트이다.

도면

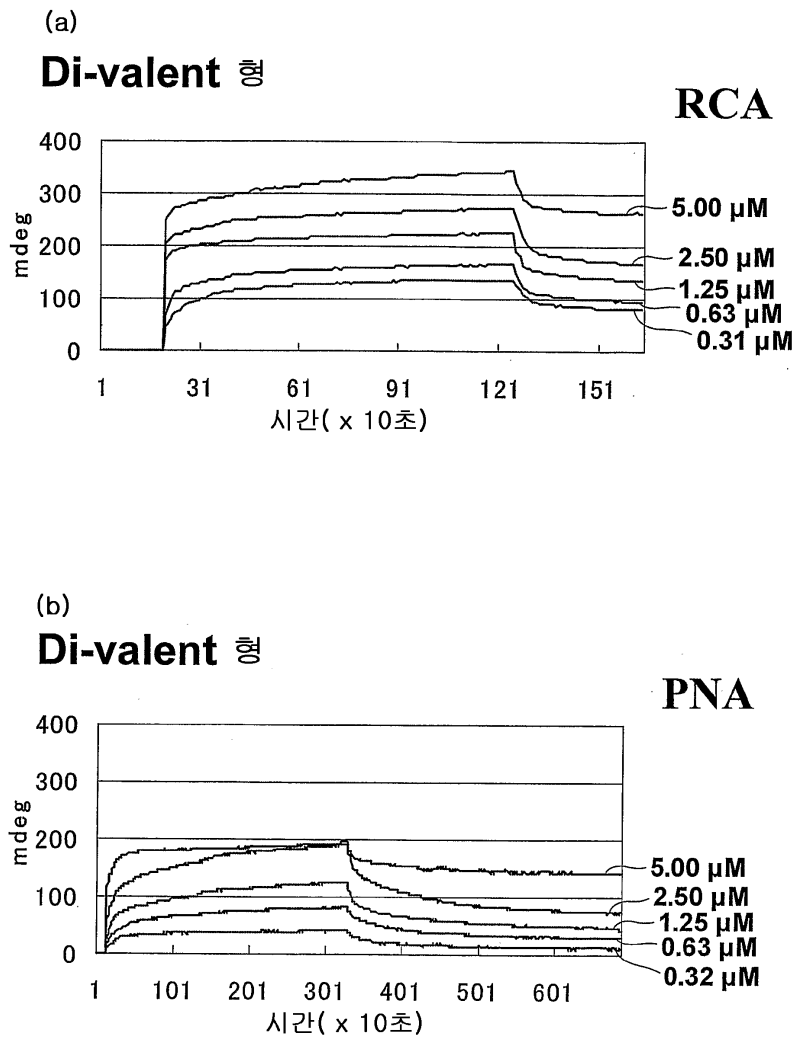
도면2



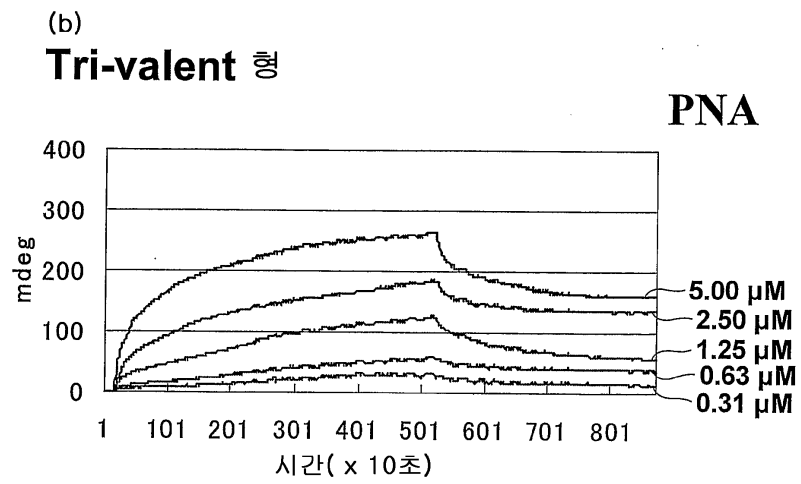
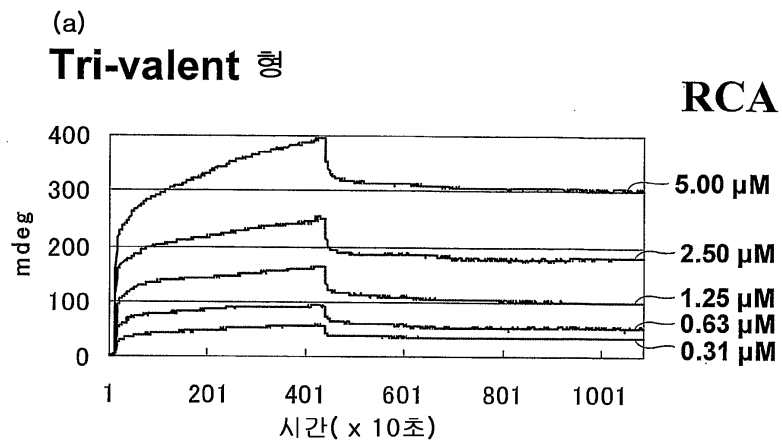
도면3



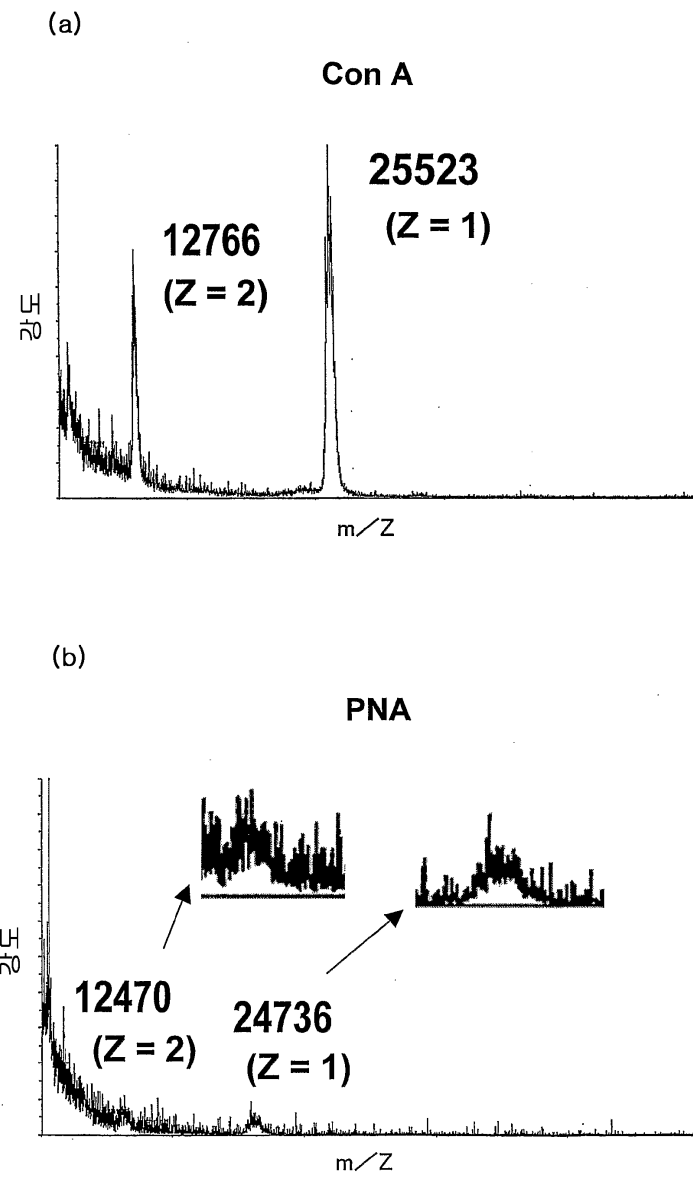
도면4



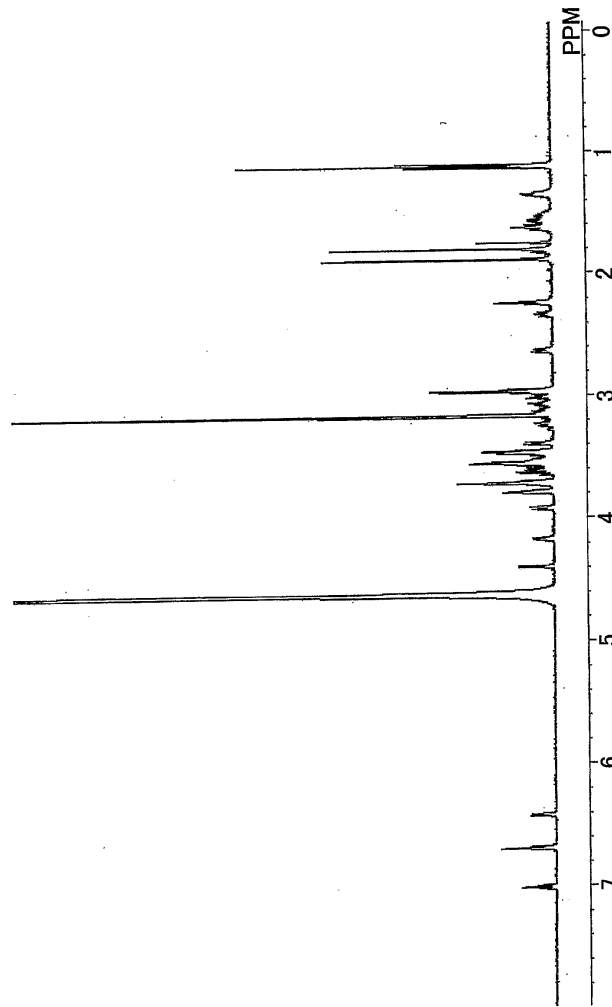
도면5



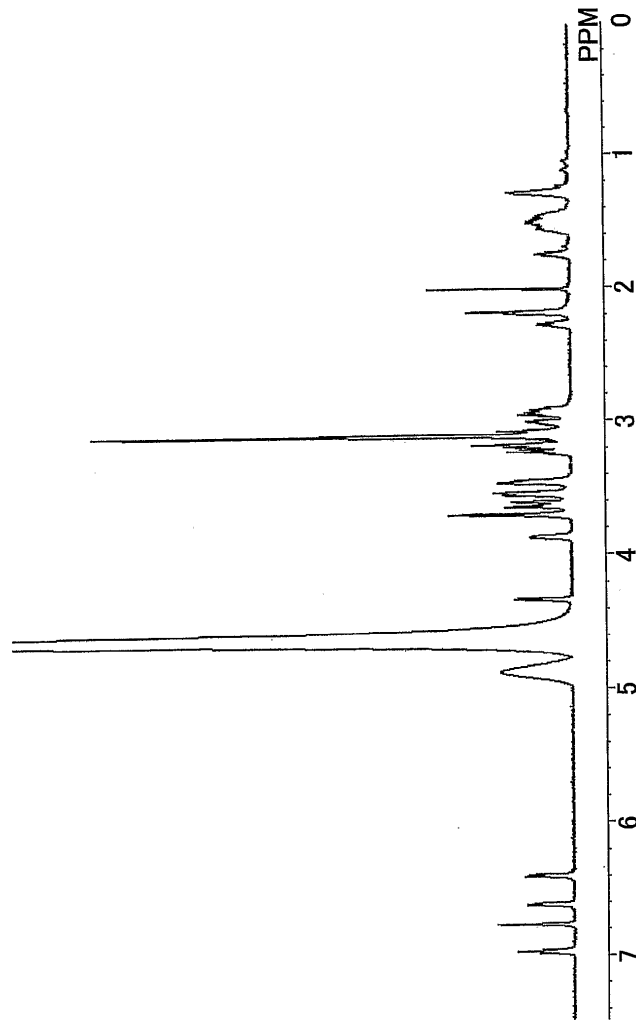
도면6



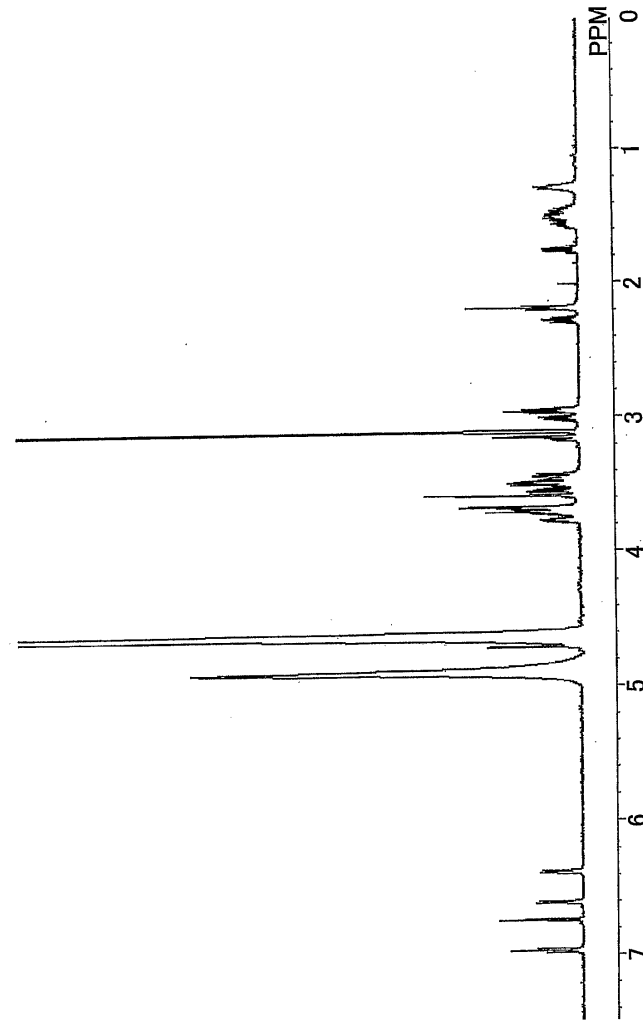
도면7



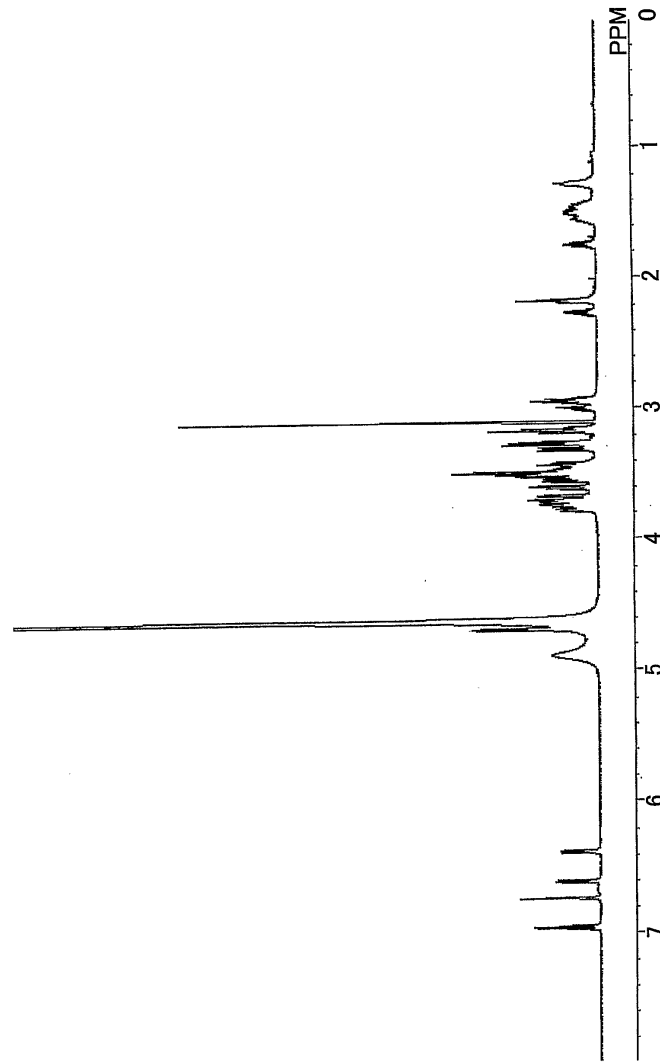
도면8



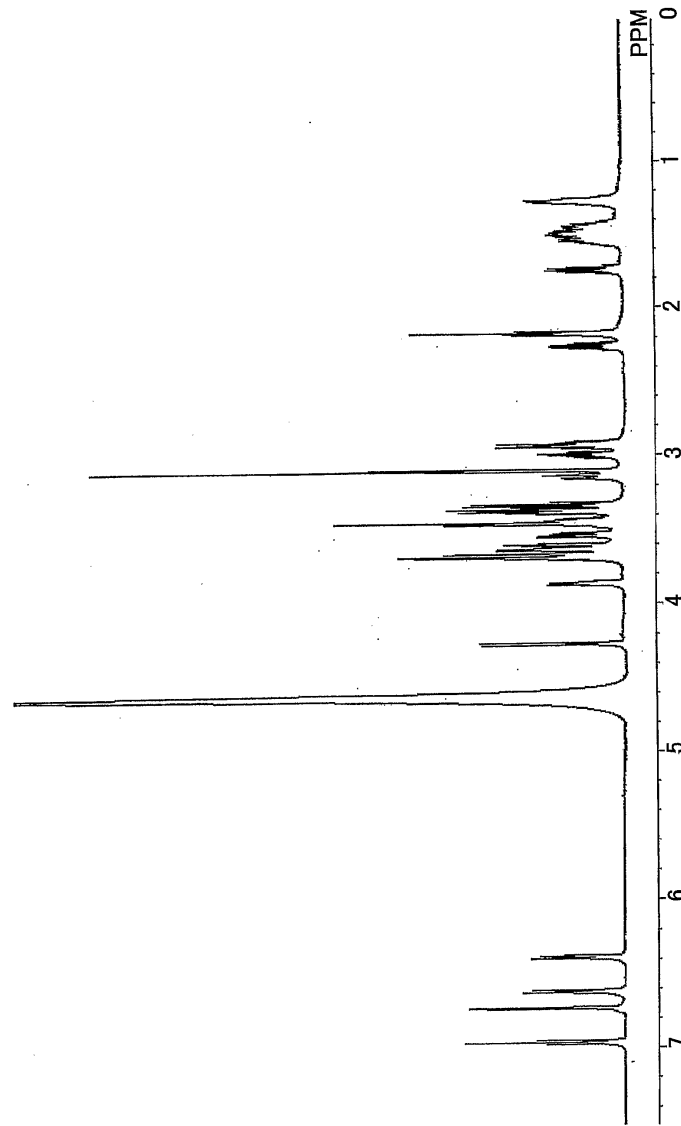
도면9



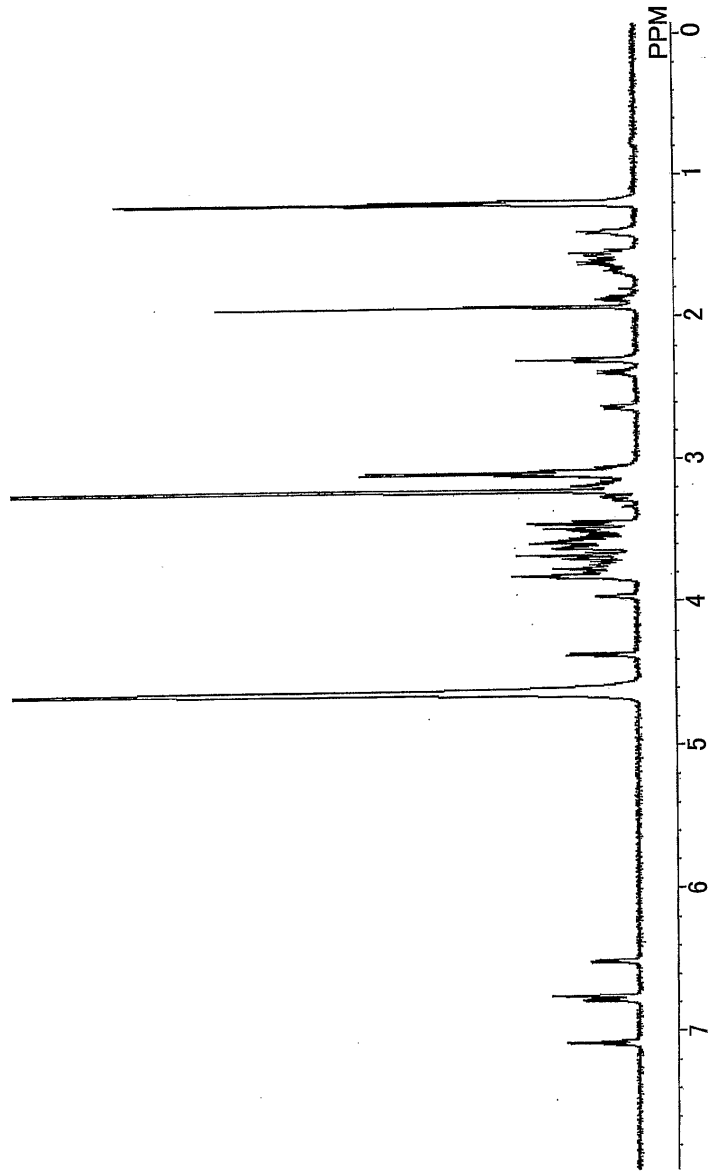
도면10



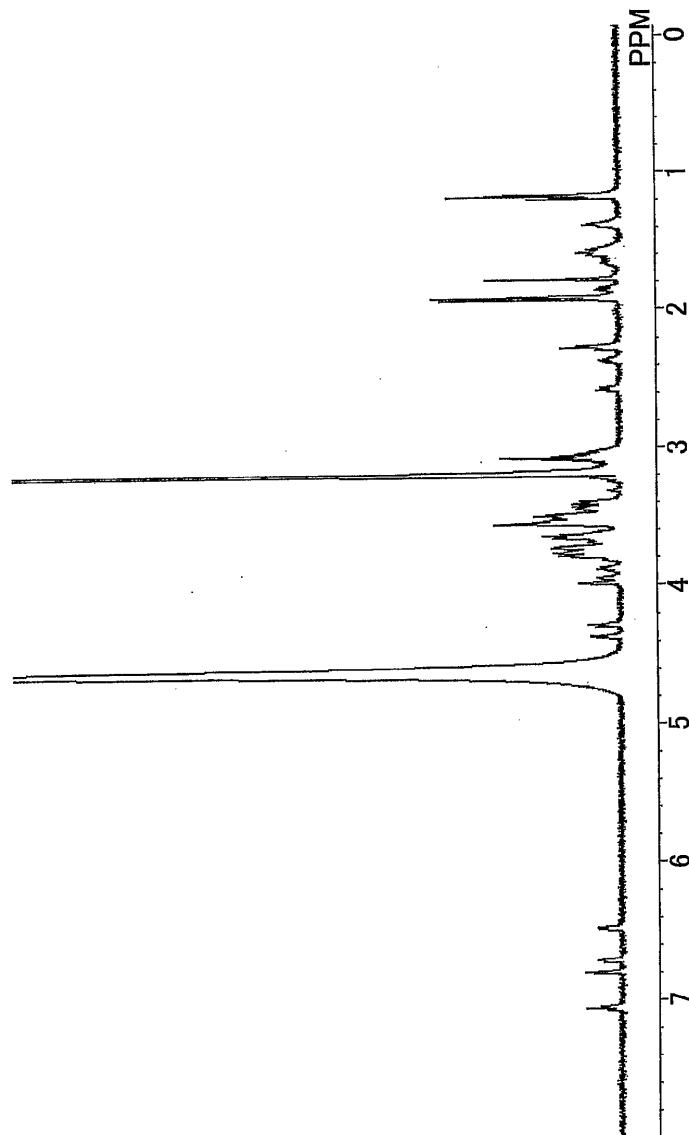
도면11



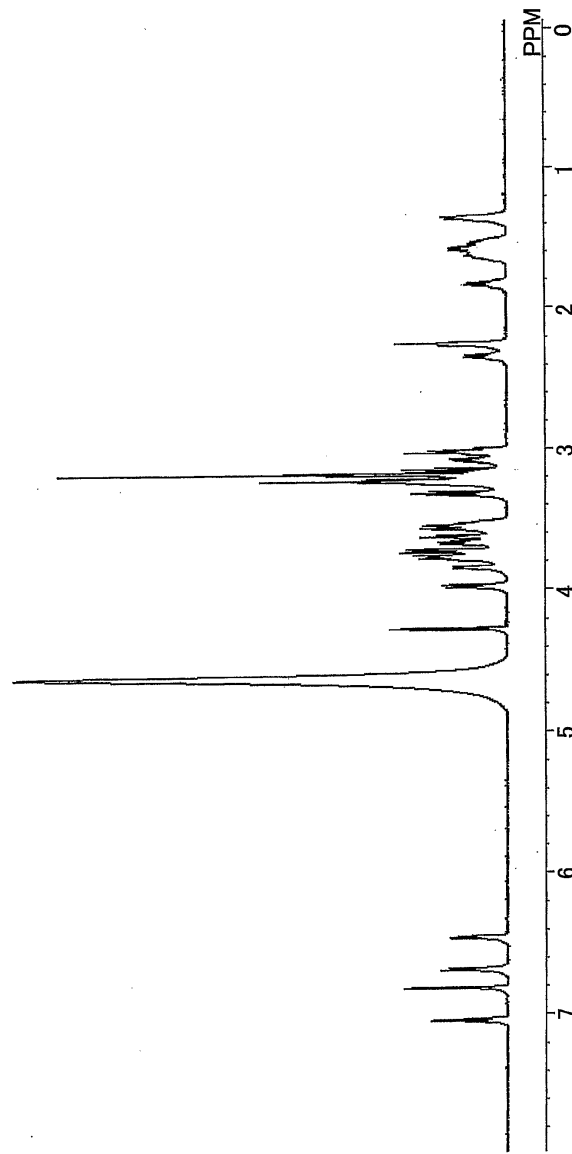
도면12



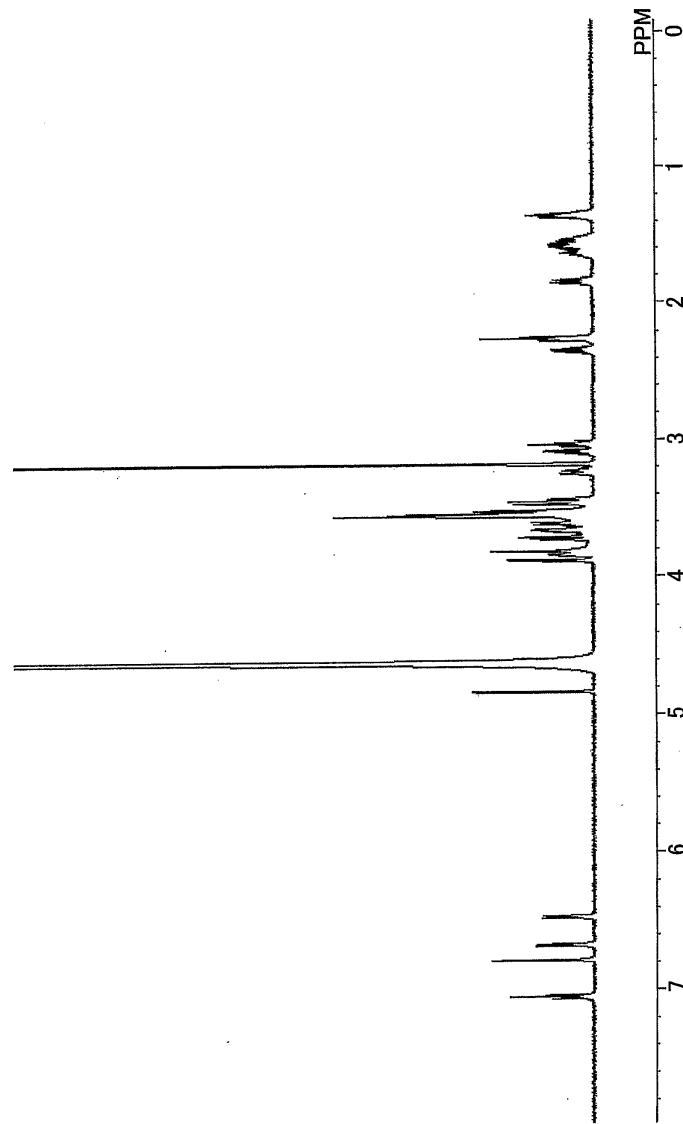
도면13



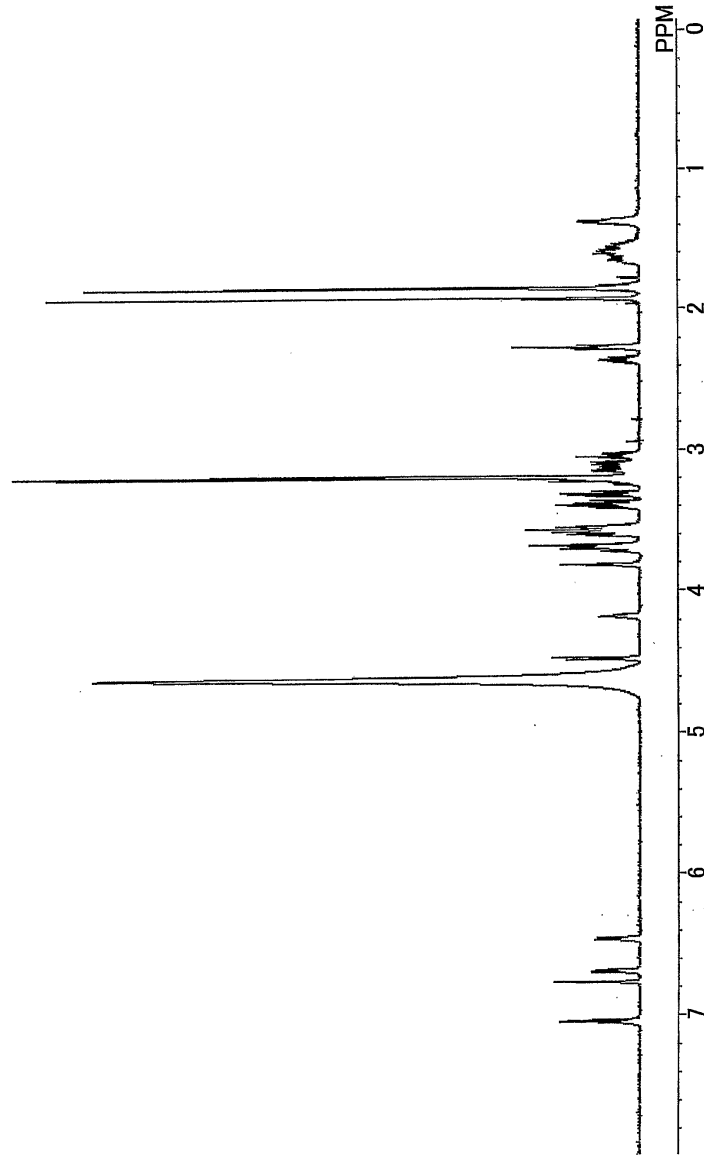
도면14



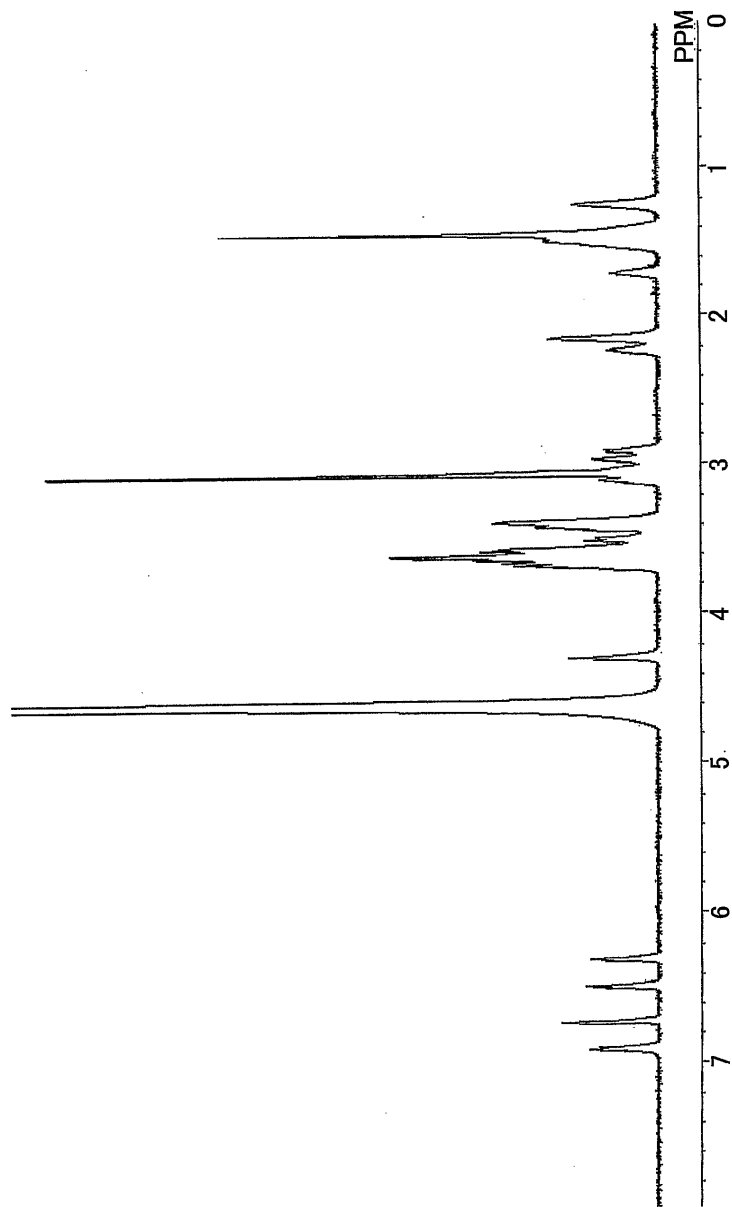
도면15



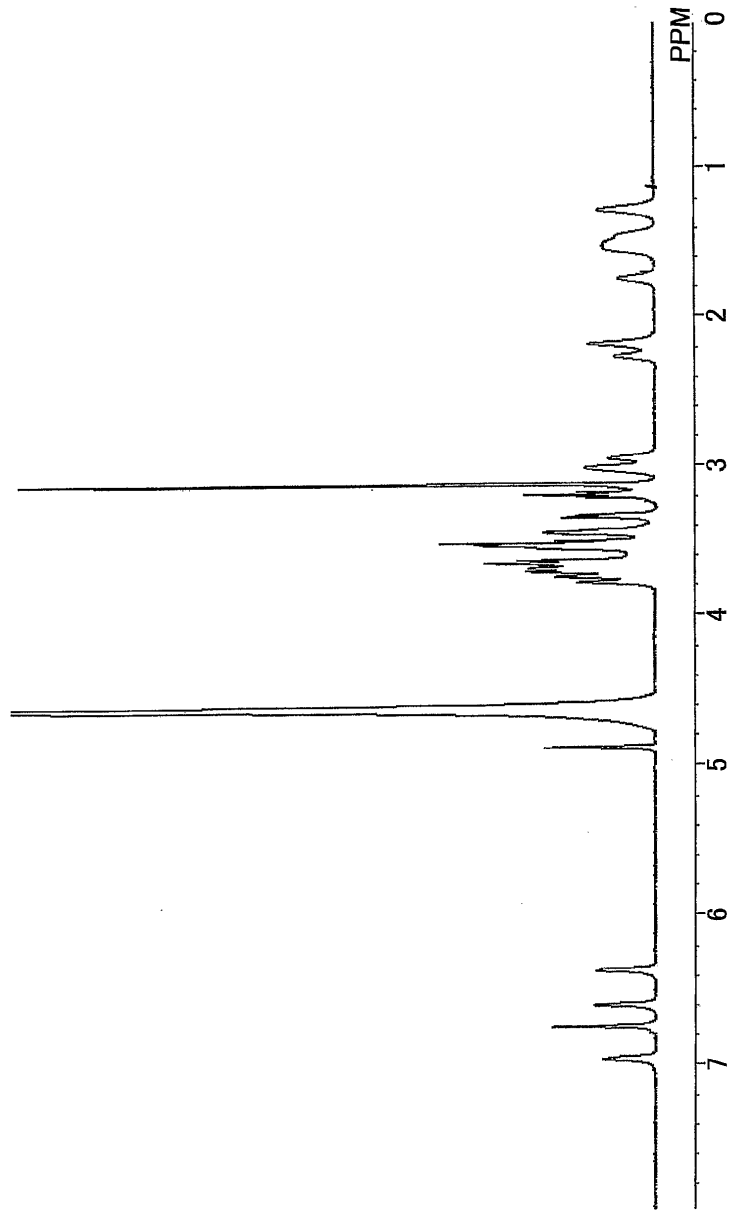
도면16



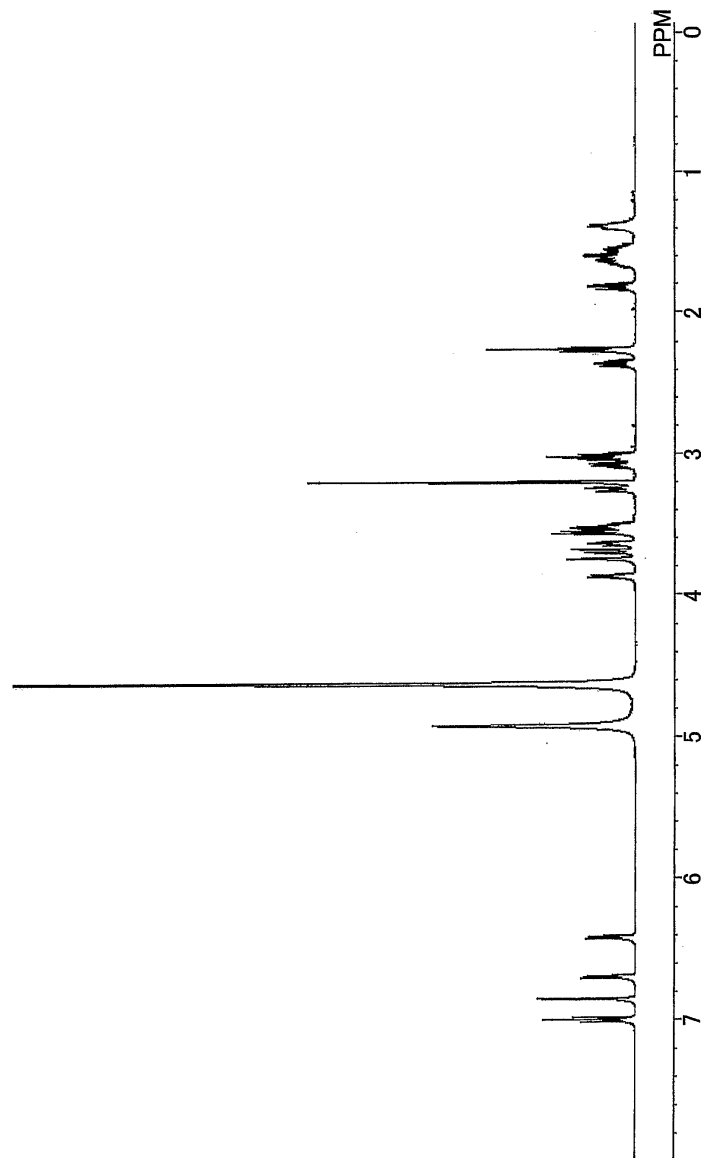
도면17



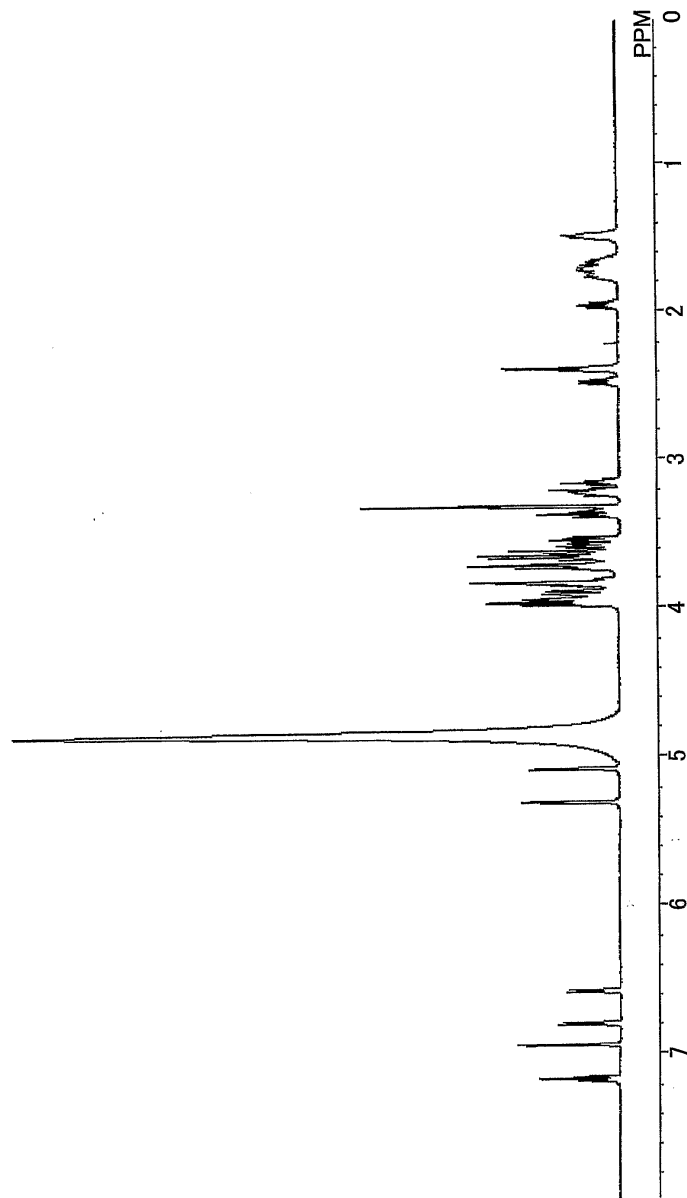
도면18



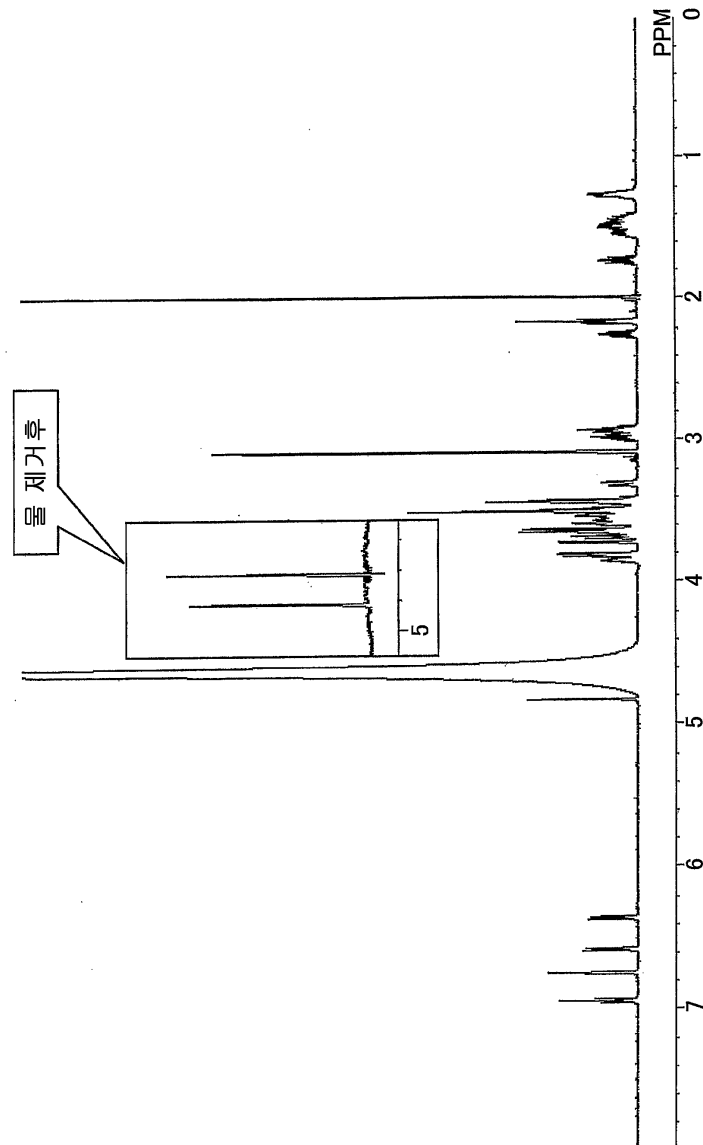
도면19



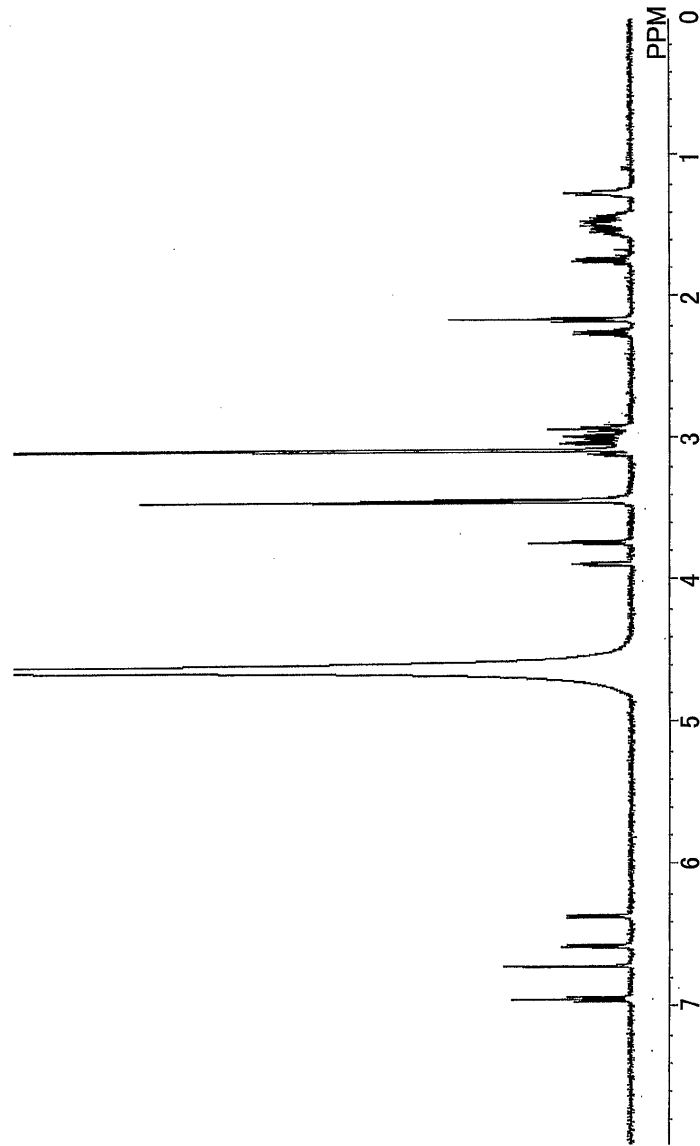
도면20



도면21



도면22



도면23

