

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07H 15/04 (2006.01)

C07D 339/04 (2006.01)

G01N 27/62 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580005186.9

[43] 公开日 2007年3月14日

[11] 公开号 CN 1930179A

[22] 申请日 2005.2.18

[21] 申请号 200580005186.9

[30] 优先权

[32] 2004.2.18 [33] JP [31] 041994/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/003220 2005.2.18

[87] 国际公布 WO2005/077965 日 2005.8.25

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.17

[71] 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本国埼玉县川口市

共同申请人 国立大学法人鹿儿岛大学

[72] 发明人 隅田泰生

[74] 专利代理机构 北京申翔知识产权代理有限公司
代理人 周春发

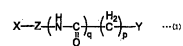
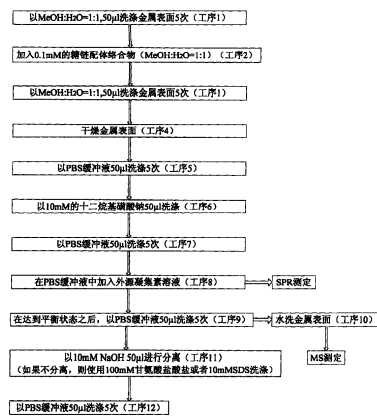
权利要求书 3 页 说明书 62 页 附图 24 页

[54] 发明名称

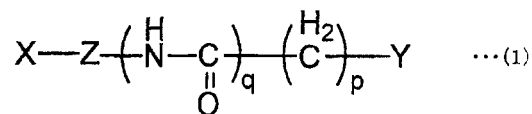
糖链配体络合物和利用该配体络合物的蛋白质的分析方法

[57] 摘要

本发明提供能够有效应用于蛋白质的功能分析的新型配体络合物、配体载体以及蛋白质的分析方法。一种配体络合物，其特征在于：具备以通式(1)，(式中，n，q各自分别为0~6的整数)表示的结构，作为上述X，具备末端存在芳香族氨基，同时含1条或2条或3条主链还可以具有碳—氮键的烃衍生链而形成的结构，作为上述Y，具备硫原子或含硫原子的烃结构，作为上述Z，具有连接子化合物与具有还原末端的糖通过上述芳香族氨基连接的结构，其中，所述连接子化合物具备含碳—碳键或碳—氧键的直链结构。



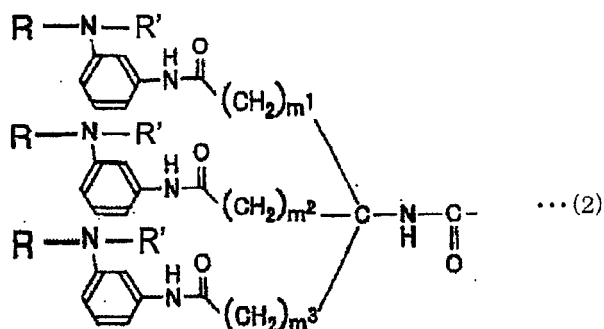
1、一种配体络合物，其特征在于：具备以通式 (1)



(式中，p, q各自分别为0~6的整数)表示的结构，作为上述X，具备末端存在芳香族氨基，同时含1条或2条或3条主链还可以具有碳—氮键的烃衍生链而形成的结构，作为上述Y，具备硫原子或含硫原子的烃结构，作为上述Z，具有通过上述芳基结合具有具备含碳—碳键或碳—氧键的直链结构的化合物、与具有还原末端的糖的结构。

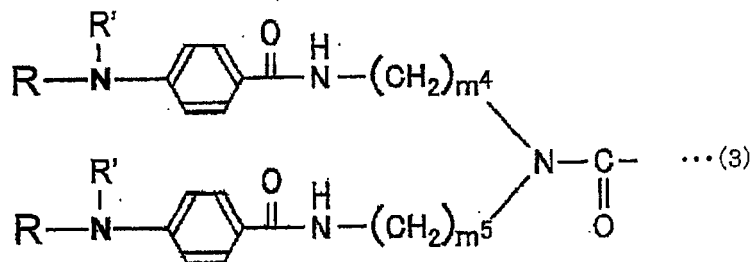
2、权利要求 1 所述的配体络合物，其特征在于：上述 Y 是含 S—S 键或 SH 基的烃结构。

3、权利要求 1 或 2 所述的配体络合物，其特征在于：上述 X 具备以通式 (2)



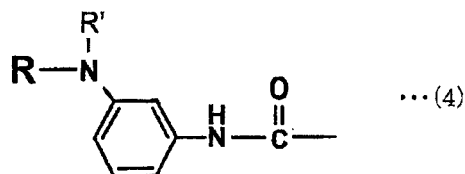
(式中， m^1 、 m^2 、 m^3 各自分别是 0~6 的整数， R' 是氢 (H) 或 R) 表示的结构，上述 R 是源自糖链的化合物。

4、权利要求 1 或 2 所述的配体络合物，其特征在于：上述 X 具备以通式 (3)



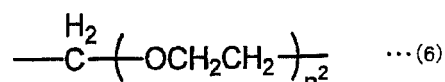
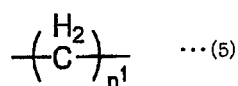
(式中, m^4 、 m^5 各自分别是 0~6 的整数, R' 是氢 (H) 或 R 表示的结构, 上述 R 是衍生化合物。

5、权利要求 1 或 2 所述的配体络合物, 其特征在于: 上述 X 具备以通式 (4)



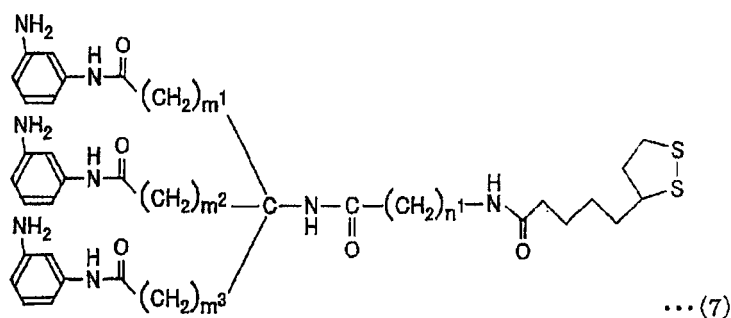
(式中, R' 是氢 (H) 或 R 表示的结构, 上述 R 是源自糖链的化合物。

6、权利要求 1 或 2 所述的配体络合物, 其特征在于: 上述 Z 具备以通式 (5) 或通式 (6)



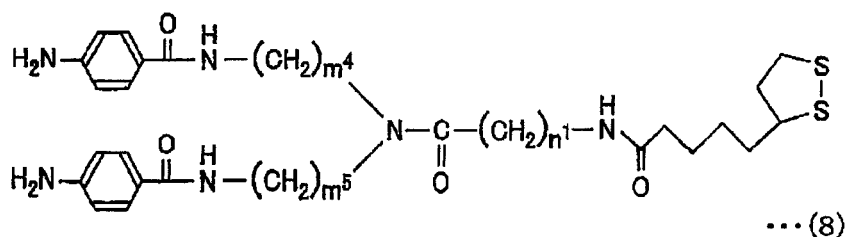
(式中, n^1 、 n^2 分别是 1 以上、6 以下的整数) 表示的结构。

7、一种配体络合物的制备方法, 其特征在于: 利用具备以通式 (7)



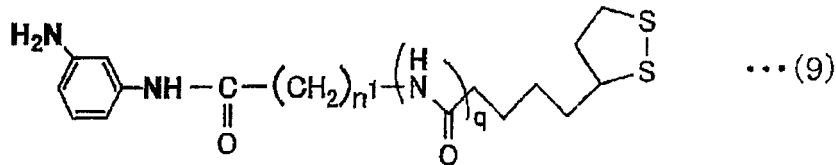
(式中, m^1 、 m^2 、 m^3 分别各自是 0~6 的整数, n^1 是 1 以上, 6 以下的整数) 表示的结构连接子化合物、

或者具备以通式 (8)

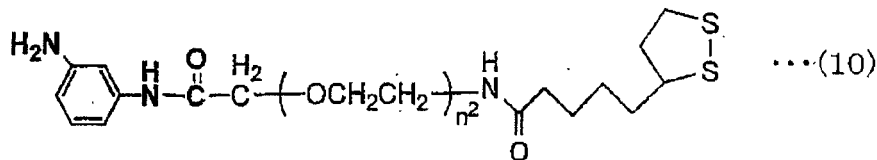


(式中, m^4, m^5 分别各自是 0~6 的整数, n^1 是 0~6 的整数) 表示的结构连接子化合物、

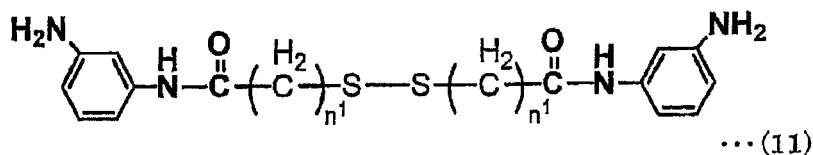
或者具备以通式 (9)



(式中, n^1, q 分别各自是 0~6 的整数) 表示的结构连接子化合物、
或者具备以通式 (10)



(式中, n^2 是 1~6 的整数) 表示的结构连接子化合物、
或者具备以通式 (11)



(式中, n^1 是 1~6 的整数) 表示的结构连接子化合物与具有还原末端的糖, 进行还原氨基化反应。

8、一种配体载体, 其特征在于: 其通过在表面具有金属的支撑体上固定权利要求 1~6 任一项所述的配体络合物而构成。

9、权利要求 8 所述的配体载体, 其特征在于用于蛋白质分析。

10、一种蛋白质的分析方法, 其特征在于由下列工序构成: 通过使权利要求 1~6 任一项所述的配体络合物与支撑体接触, 制造使该配体络合物固定在载体上的配体载体的工序; 和使上述配体载体与蛋白质溶液接触后, 进行分子间相互作用的测定的工序; 在上述分子间相互作用的测定后, 进行质量分析, 鉴定与上述配体载体结合的蛋白质的工序。

糖链配体络合物和利用该配体络合物的蛋白质的分析方法

技术领域

本发明涉及向连接子化合物导入具有还原末端的糖链的新型配体络合物和将该配体络合物聚集固定在利用金或银、铜等金属涂布表面的芯片上而得到的配体载体。此外，本发明还涉及利用上述配体络合物的蛋白质的分析方法。

背景技术

存在于体内的各种糖在维持生物的活动或生命的机制中起着重要的作用。为了精确地阐明这种糖的功能，必须基于糖的复杂结构分析那些构能。对于糖的功能分析，使用以下技术：利用阐明结构的糖链，重现糖结构的每个部分，从而清楚糖的整体结构与功能的关系。

作为上述糖的功能分析的技术，例如，公开了表面等离子体激元共振（以下记作 SPR）。即，在传感芯片的表面上导入含模拟糖的一部分的寡聚糖而构成的配体络合物，利用导入该配体络合物而构成的传感芯片，指定与糖发生特别的相互作用的蛋白质等物质。通过这样能够进行基于寡聚糖的结构生物活性的正确评价。

但是，仅仅 1 分子的寡聚糖的活性没那么高，因此，当评价寡聚糖的生物活性时，需要使寡聚糖聚集在传感芯片上。即，使用聚集的寡聚糖，通过分析与蛋白质的相互作用，可以进行寡聚糖的生物活性的评价。

因此，到目前为止，本发明者得到了分子内具有可以固定于传感芯片表面的部位和可以导入寡聚糖的部位的连接子化合物，得到了向该连接子化合物导入 1 个单元或 2 个单元的寡聚糖而形成的配体络合物。并且发现：通过利用该配体络合物，能够在传感芯片上聚集，并导入寡聚糖（例如，参照专利文献 1、非专利文献 1 等）。

[专利文献 1] 特开 2003-83969 号公报（2003 年 3 月 19 日公开）

[非专利文献 1] 《日本化学会第 79 次春季年会—演讲初稿Ⅱ》，社团法人日本化学会，2001 年 3 月 15 日，第 1042 页

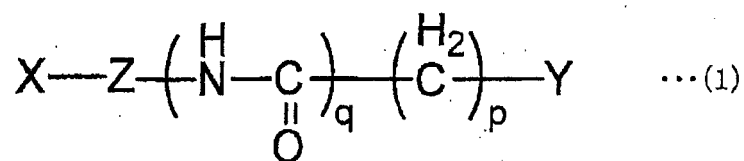
然而，在记载于上述各文献的配体络合物中，导入的糖链（寡聚糖）仅限于本发明者合成的硫酸化糖，并不清楚是否能够导入市售的具有还原末端的麦芽糖、乳糖等寡聚糖而芯片化。另外，迄今为止，虽然提到过将固定上述文献记载的配体络合物固定而得到的传感芯片用于使用 SRP 的测定之后，用于与芯片上的糖链结合的蛋白质的鉴定的方法，但是尚不存在数据上令人满意的方法。

本发明是鉴于上述问题而作出的，其目的在于提供导入市售的具有还原末端的糖而形成的新型配体络合物和能够用于鉴定蛋白质的配体载体。

发明内容

本申请发明者为了解决上述课题进行精心的研究，结果使在先申请（申请号：2003—190568，公开号：特开 2004—157108（公开日：2004 年 6 月 3 日）、在本申请优先权日（2004 年 2 月 18 日）当日未公开）记载的连接子化合物（都是本申请发明者发现的）与市售的麦芽糖或乳糖反应，分别合成末端具有 α 吡喃葡萄糖、 β 吡喃半乳糖的配体络合物。此外，本申请发明者制造使这些配体络合物固定在涂金的芯片上的糖芯片（配体载体）。而且，还发现：为了利用这些糖芯片研究与蛋白质的相互作用，在通过 SRP 测定确认相互作用后，将该糖芯片直接用于 MALDI—TOF/MS，能够鉴定与各糖芯片结合的蛋白质，从而完成了本发明。

即，本发明的配体络合物，其特征在于：具备以通式（1）



（式中，p，q 各自分别为 0~6 的整数）表示的结构，作为上述 X，具备末端存在芳香族氨基，同时含 1 条或 2 条或 3 条主链还可以具有碳—氮键的烃衍生链而形成的结构，作为上述 Y，具备硫原子或含硫原子的烃结构，作为上述 Z，具有连接子化合物与具有还原末端的糖通过上述芳香族氨基连接的结构，其中，所述连接子化合物具备含碳—碳键或碳—氧键的直链结构。

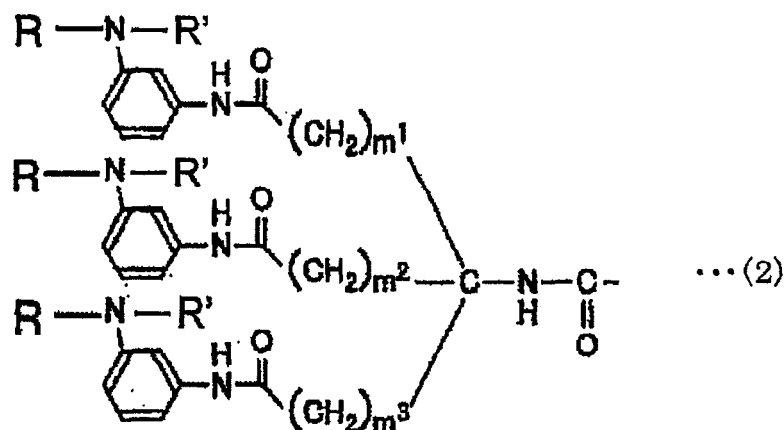
上述烃衍生链是指在由碳和氢构成的烃链中，部分碳或氢还可以被取代成其

他原子或取代基的链。即，上述烃衍生链是指末端具有芳香族氨基，作为烃链主链结构的部分碳—碳键（C—C 键）还可以被取代成碳—氮键（C—N 键）、碳—氧键（C—O 键）、酰胺键（CO—NH 键）的链。

另外，所谓上述含硫原子的烃结构是指在碳和氢构成的烃结构中，部分碳被取代成硫的结构。另外，该含硫原子的烃结构可以是链状（包括直链、支链），也可以是环状，另外，还可以同时包含链状结构和环状结构。

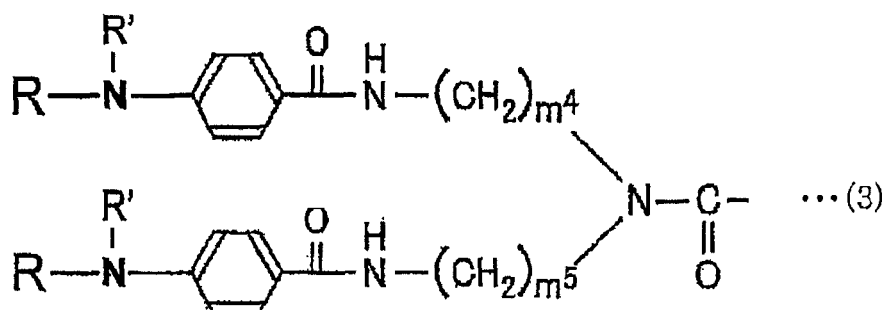
在本发明的配体络合物中，对于上述连接子化合物，作为上述 Y，还可以是具备含 S—S 键或 SH 基的烃结构。即，在上述含硫原子的烃结构中，还可以含有二硫键（S—S 键）或者巯基（SH 基）。

在本发明的配体络合物中，上述 X 具备以通式（2）



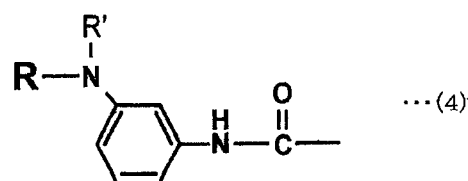
（式中， m^1 、 m^2 、 m^3 各自分别是0~6的整数。 R' 是氢（H）或R表示的结构，上述R还可以是源自糖链的化合物。

在本发明的配体络合物中，上述 X 具备以通式（3）

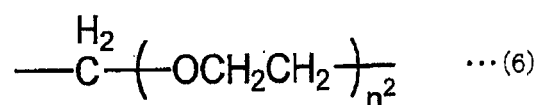
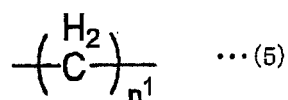


（式中， m^4 、 m^5 各自分别是0~6的整数。 R' 是氢（H）或者R表示的结构，上述R还可以是源自糖链的化合物。

在本发明的配体络合物中，上述 X 具备以通式（1）

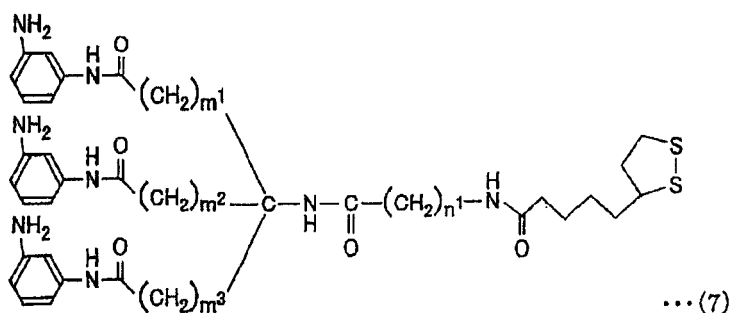


(式中, R'是氢(H)或R)表示的结构, 上述R还可以是源自糖链的化合物。
在本发明的配体络合物中, 上述Z还可以具备以式(5)或式(6)

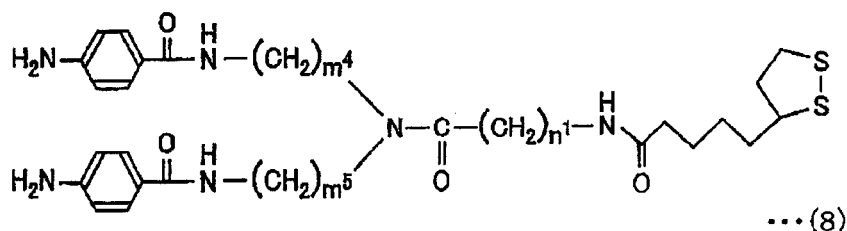


(式中, n^1, n^2 各自是1~6的整数)表示的结构。

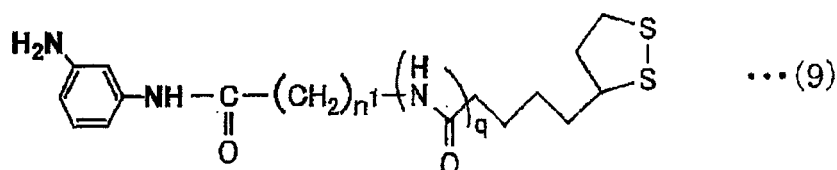
另外, 本发明涉及的配体络合物的制备方法, 其特征在于: 利用具备以通式(7)



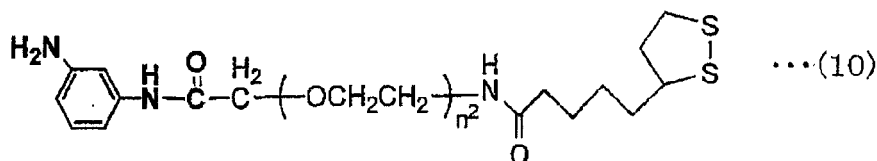
(式中, m^1, m^2, m^3 分别各自是0~6的整数, n^1 是1以上, 6以下的整数)表示的结构的连接子化合物、或者具备以通式(8)



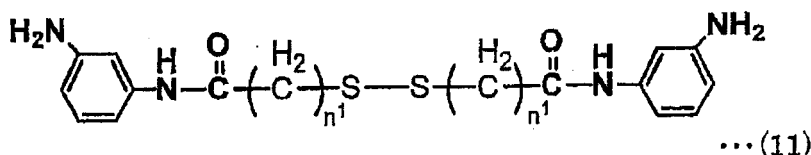
(式中, m^4, m^5 分别各自是0~6的整数, n^1 是0~6的整数)表示的结构的连接子化合物、或者具备以通式(9)



(式中, n^1, q 分别各自是 0~6 的整数) 表示的结构的连接子化合物、或者具备以通式 (10)



(式中, n^2 是 1~6 的整数) 表示的结构的连接子化合物、或者具备以通式 (11)



(式中, n^1 是 1~6 的整数) 表示的结构的连接子化合物与具有还原末端的糖, 进行还原氨基化反应。

另外, 本发明涉及的蛋白质载体的特征在于: 使上述任何配体络合物固定在表面具有金属的载体上而形成。而且, 上述配体络合物还可以用于分析蛋白质。

另外, 本发明涉及的蛋白质的分析方法, 其特征在于由下列工序构成: 通过使上述任何配体络合物与支撑体接触, 制造使该配体络合物固定在载体上的配体载体的工序、和使上述配体载体与蛋白质溶液接触后, 进行分子间相互作用的测定的工序、在上述分子间相互作用的测定后, 进行质量分析, 鉴定与上述配体载体结合的蛋白质的工序。

附图的简要说明

图 1 是表示利用本发明的配体络合物的蛋白质分析方法的步骤的示意图。

图 2 (a) 是表示利用固定具有 2 分子 α -吡喃葡萄糖的配体络合物的传感芯片测定 ConA 的结合行为的结果的图表。

图 2 (b) 是表示利用固定具有 2 分子 α -吡喃葡萄糖的配体络合物的传感芯片测定 PSA 的结合行为的结果的图表。

图 2 (c) 是表示利用固定具有 2 分子 α -吡喃葡萄糖的配体络合物的传感芯片测定 LCA 的结合行为的结果的图表。

图 3 (a) 是表示利用固定具有 3 分子 α -吡喃葡萄糖的配体络合物的传感芯片测定 ConA 的结合行为的结果的图表。

图 3 (b) 是表示利用固定具有 3 分子 α -吡喃葡萄糖的配体络合物的传感芯片测定 PCA 的结合行为的结果的图表。

图 3 (c) 是表示利用固定具有 3 分子 α -吡喃葡萄糖的配体络合物的传感芯片测定 LCA 的结合行为的结果的图表。

图 4 (a) 是表示利用固定具有 2 分子 β -吡喃半乳糖的配体络合物的传感芯片测定 RCA 的结合行为的结果的图表。

图 4 (b) 是表示利用固定具有 2 分子 β -吡喃半乳糖的配体络合物的传感芯片测定 PNA 的结合行为的结果的图表。

图 5 (a) 是表示利用固定具有 3 分子 β -吡喃半乳糖的配体络合物的传感芯片测定 RCA 的结合行为的结果的图表。

图 5 (b) 是表示利用固定具有 3 分子 β -吡喃半乳糖的配体络合物的传感芯片测定 PNA 的结合行为的结果的图表。

图 6 (a) 是表示对与传感芯片结合的 ConA 进行质量分析的结果的图表。

图 6 (b) 是表示对与传感芯片结合的 PNA 进行质量分析的结果的图表。

图 7 是配体络合物 (化合物 30) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 8 是配体络合物 (式 (36)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 9 是配体络合物 (式 (37)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 10 是配体络合物 (式 (38)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 11 是配体络合物 (式 (39)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 12 是配体络合物 (式 (40)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 13 是配体络合物 (式 (41)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 14 是配体络合物 (式 (42)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 15 是配体络合物 (式 (43)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 16 是配体络合物 (式 (44)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 17 是配体络合物 (式 (45)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 18 是配体络合物 (式 (46)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 19 是配体络合物 (式 (47)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 20 是配体络合物 (式 (48)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 21 是配体络合物 (式 (49)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 22 是配体络合物 (式 (50)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

图 23 是配体络合物 (式 (51)) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱测定图谱。

实施方式

下面详对本发明进行详细的说明。

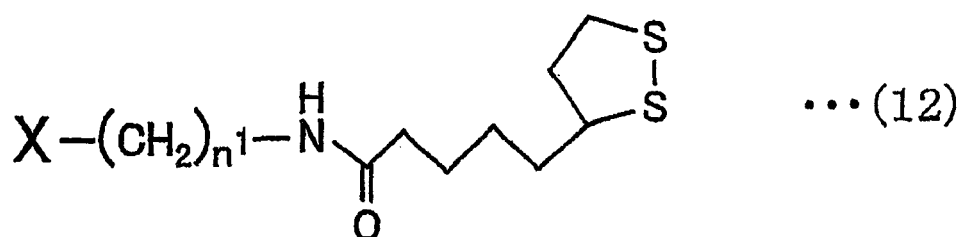
本发明的配体络合物是固定于表面等离子体激元共振 (SPR) 的传感芯片或亲和色谱法的载体等蛋白质分析用支撑体而使用, 由能够与支撑体表面结合的连接子化合物和能够与作为分析对象的蛋白质等发生特别的相互作用的糖链构成。上述 SPR 或亲和色谱法的目的在于指定或分离与糖分子发生特别的相互作用的蛋白质等物质。因此, 上述配体络合物必需是不引起与蛋白质等物质引起未特别相互作用的物质。

因此, 本发明的配体络合物含有具备以上述通式 (1) 表示的结构的连接部分 (连接子化合物)。在该结构中以 Y 表示的结构中, 含有硫原子 (S), 该硫原子 (S) 例如与涂布于蛋白质分析用的支撑体表面的金属 (例如 Au) 形成金属—硫键 (例如, Au—S 键), 从而能够牢固地与支撑体结合。

另外, 对于上述连接子化合物, 作为上述 X, 具备末端存在芳香族氨基, 同时含 1 条或 2 条或 3 条主链还可以具有碳—氮键的烃衍生链而形成的结构。通过这样, 对于上述连接子化合物, 能够在蛋白质分析用的支撑体表面聚集排列糖分子, 而且, 通过末端具有芳香族氨基, 能够容易地导入糖分子。

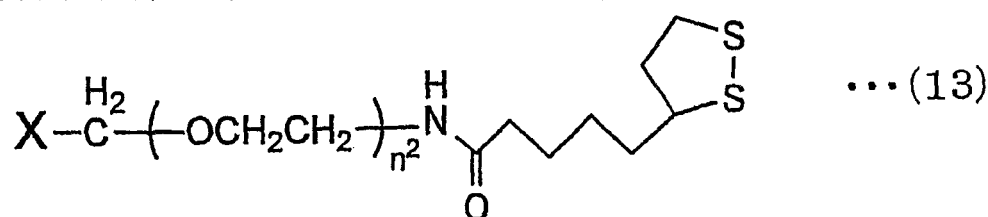
另外, 对于上述连接子化合物, 作为上述通式 (1) 的 Z, 具备含碳—碳键或碳—氧键的直链结构。更具体地讲, 为了便于制备化合物, Z 优选具有以上式 (5) 或式 (6) 表示的结构。另外, 在上述通式 (1) 中, p, q 分别各自为 0 以上、且 6 以下的整数, 而没有特殊限制。另外, 上式 (5) 的 n_1 和式 (6) 的 n_2 分别各自为 1 以上、且 6 以下的整数, 而没有特殊限制。

此外, 作为上述连接子化合物, 在上述通式 (1) 中, 可以列举 p 为 4, q 为 1, Y 具备含 S—S 键的环烃结构, Z 具有上式 (5) 的结构的化合物。作为上述连接子化合物, 例如, 还可以是具备以通式 (1)



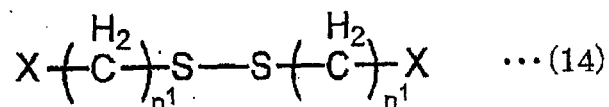
表示的结构的化合物。该连接子化合物可以把硫辛酸作为原料进行合成。

另外，作为上述连接子化合物，在上述通式(1)中，可以列举 p 为 4, q 为 1, Y 具备含 S-S 键的环烃结构, Z 具有上式(6)的结构的化合物。作为上述连接子化合物，例如，还可以是具有以通式(13)



表示的结构的化合物。该连接子化合物可以把硫辛酸作为原料进行合成。

另外，作为上述连接子化合物，在上述通式(1)中，可以列举 p 为 0, q 为 0, Y 具有硫原子(S), Z 是上式(5)或上式(6)的结构形成二聚体的化合物。作为上述连接子化合物，例如，还可以是具有以通式(14)



表示的结构的化合物。

以上述通式(12)、通式(13)以及通式(14)表示的连接子化合物含有二硫键(S-S)键，该 S-S 键中的硫(S)例如能够与涂布于蛋白质分析用的支撑体表面的金属(例如 Au)形成金属-硫键(例如 Au-S 键)而牢固地与支撑体结合。另外，作为上述 Y，并不限于以通式(12)、通式(13)或通式(14)表示的化合物，根据能够容易地形成金属-硫键(Au-S 键)的观点，优选含 S-S 键或 SH 基的烃结构。

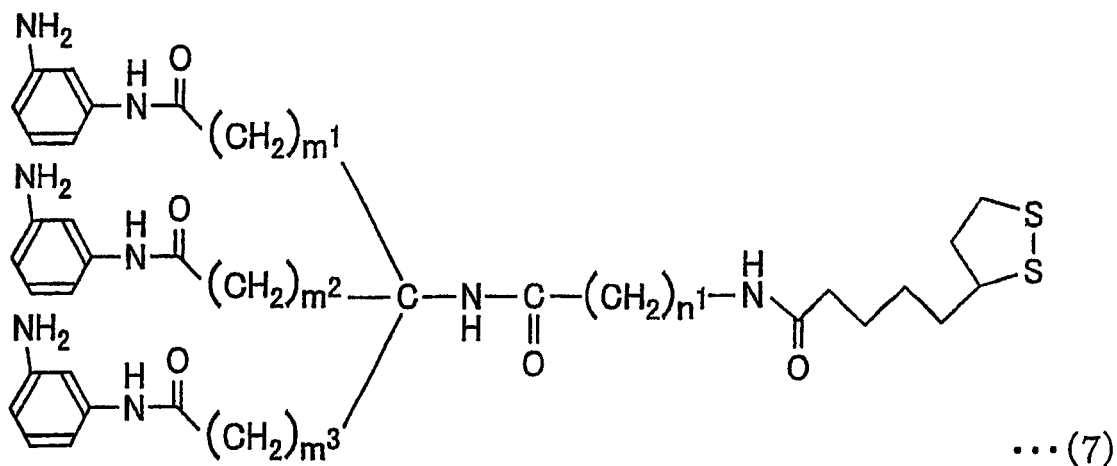
而且，本发明的配体络合物可以向上述连接子化合物的芳香类氨基导入具有还原末端的糖链而制备。换言之，本发明的配体络合物具有上述连接子化合物与具有还原末端的糖通过芳香族氨基结合的结构。该糖的导入例如能够通过上述连接子化合物的芳香族氨基的氨基(-NH₂)与糖的还原氨基化反应而进行。

即，通过糖中的平衡产生的醛基（—CHO 基）或酮基（—CRO 基，R 是烃基）与上述连接子化合物具有的氨基发生反应。而且，通过继续还原该反应形成的席夫碱，能够容易地向芳香氨基导入糖。

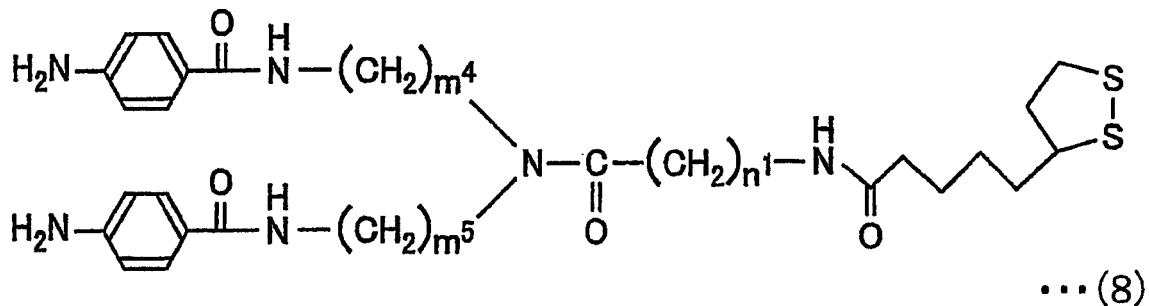
在本发明中，尤其作为具有上述还原末端的糖，并不是上述在先申请记载的由本发明者合成的硫酸化糖，而是使用市售的糖或通过分解市售的多糖而制备的糖。另外，上述“具有还原末端的糖”是指端基异构碳原子不被取代的单糖或寡聚糖。即，上述具有还原末端的糖是指还原糖。

作为上述具有还原末端的糖，具体地列举麦芽糖、乳糖、潘糖、纤维二糖、蜜二糖、甘露糖、壳木糖、昆布寡糖等，但并不限于这些糖。像这样，具有麦芽糖或乳糖等寡聚糖的配体络合物与具有以前的硫酸化糖的配体络合物相比，具有对于蛋白质测定应用范围广的优点。

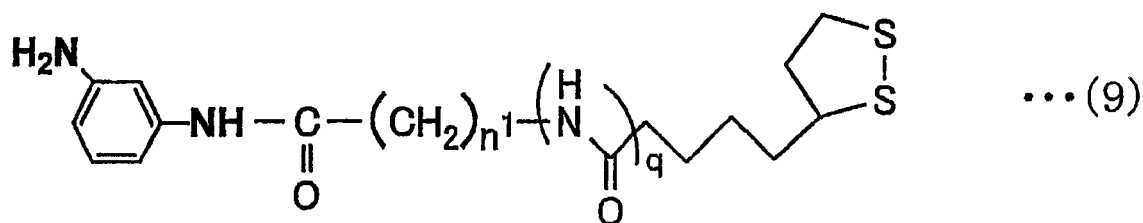
作为本发明的配体络合物，具体地可以列举具有以下所述结构的络合物：向具有以通式（7）



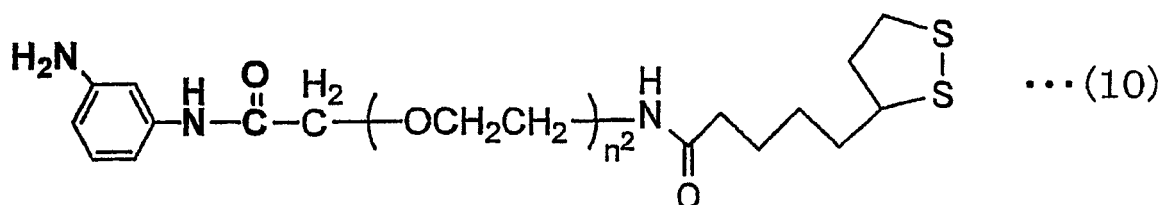
（式中， m^1 ， m^2 ， m^3 分别各自是 0~6 的整数， n^1 是 1~6 的整数）表示的结构的连接子化合物、或具有以通式（8）



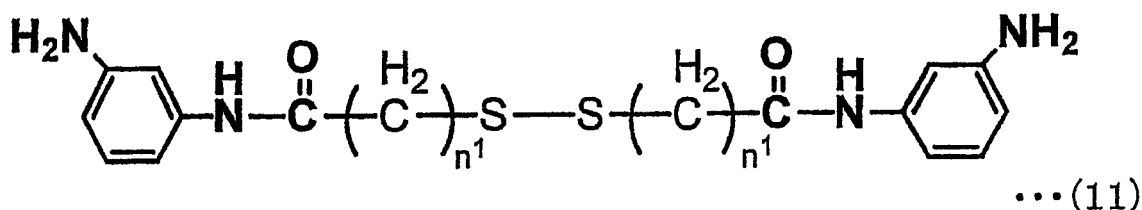
（式中， m^4 ， m^5 各自分别是 0~6 的整数， n^1 是 1~6 的整数）表示的结构的连接子化合物、或具有以通式（9）



(式中, n^1, q 各自分别是 0~6 的整数) 表示的结构的连接子化合物、或者具有以通式 (10)



(式中, n^2 是 1~6 的整数) 表示的结构的连接子化合物、或者具有以通式 (11)



(式中, n^1 是 1~6 的整数) 表示的结构的连接子化合物的芳香氨基导入具有还原末端的糖而得到的结构。

上述配体络合物, 例如, 可以通过利用具有以通式 (7) ~ (11) 表示的结构的连接子化合物与具有还原末端的糖, 进行还原氨基化反应而进行制备。

具有以上述通式 (7) 表示的结构的连接子化合物即为具有 3 条烃衍生链的化合物, 末端具有芳香族氨基的 3 条烃衍生链通过与 1 个碳 (C) 结合而形成分支结构。另外, 在上述通式 (7) 中, m^1, m^2, m^3 是 0~6 的整数而没有特殊限制, n^1 是 1~6 的整数而没有特殊限制, 还可以是相互不同的整数, 也可以是部分或全部相同的整数。根据制造时的简易程度, 上述 $m^1 \sim m^3$ 优选为相同的整数, 特别优选为 2。

具有以上述通式(8)表示的结构连接子化合物即为具有2条烃衍生链的化合物,末端具有芳香族氨基的2条烃衍生链通过与1个氮(N)结合而形成分支结构。在上述通式(8)中, m_4, m_5 是0~6的整数而没有特殊限制, n_1 是1~6的整数而没有特殊限制,还可以是相互不同的整数,也可以是部分或全部相同的整数。其中,根据制造时的简易程度,上述 m^4, m^5 优选为相同的整数,特别优选为2。

上述具有以通式(9)表示的结构连接子化合物是具有1条烃链的化合物。而且,在上述通式(9)中, n_1, q 是0~6的整数而没有特殊限制,可以是相互不同的整数,也可以是相同的整数。

上述具有以通式(10)表示的结构连接子化合物是具有1条烃链的化合物。另外,在上述通式(9)中, n_2 是1~6的整数而没有限制。

上述具有以通式(11)表示的结构连接子化合物是具有1条烃链的化合物形成二聚体的物质。另外,在上述通式(11)中, n_1 是1以上,6以下的整数,而没有特殊限制。

如上述通式(7)或通式(8)那样,上述X是具备如下所述结构的基团:通过碳或氮等原子,结合多个上述烃衍生链形成支链结构的多支链部位的结构。另外,当上述X含有多个烃衍生链时,优选全部相同,但是,如果末端具有芳香族氨基,还可以是相互不同的结构。

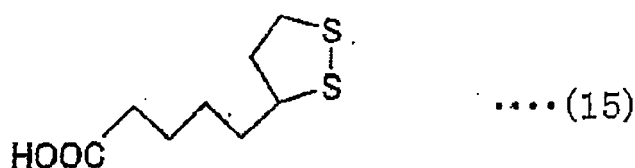
上述那样，本发明的配体络合物所含的连接子化合物具有能够与蛋白质分析用的支撑体结合的硫原子和能够与寡聚糖链等糖分子结合的氨基。因此，例如，通过 Au—S 键等金属—硫键，上述连接子化合物被固定在蛋白质分析用支撑体上，因而，通过上述连接子化合物，能够使糖分子牢固、且简单地结合在上述支撑体上。

另外，上述连接子化合物还可以具有多分支部位，此时，在该多分支部位各末端具有芳香族氨基。因此，通过使用在上述连接子化合物中导入具有还原末端的糖的本发明的配体络合物，能够更有效地使糖分子聚集在上述支撑体表明上。

此外，上述连接子化合物几乎能够忽略与蛋白质的非特别的相互作用的影响。因此，通过使用具有上述连接子化合物的本发明的配体络合物，可以重现性良好地评价上述糖与蛋白质的相互作用。

上述连接子化合物例如通过以下所示的制造方法制造。即，以上述通式(7)、(8)(9)或(10)表示的连接子化合物通过以下步骤制造：进行硫辛酸与芳香族氨基末端受保护基保护的胺化合物的缩合反应，并且对上述芳香族氨基末端的保护基进行脱保护。另外，以上述通式(11)表示的连接子化合物通过以下步骤制备：进行 γ -巯基丁酸的二聚体与 2 分子的芳香族氨基末端受保护基保护的胺化合物的缩合反应，并且对上述芳香族氨基某端的保护基进行脱保护。

上述硫辛酸具备以下述通式(15)

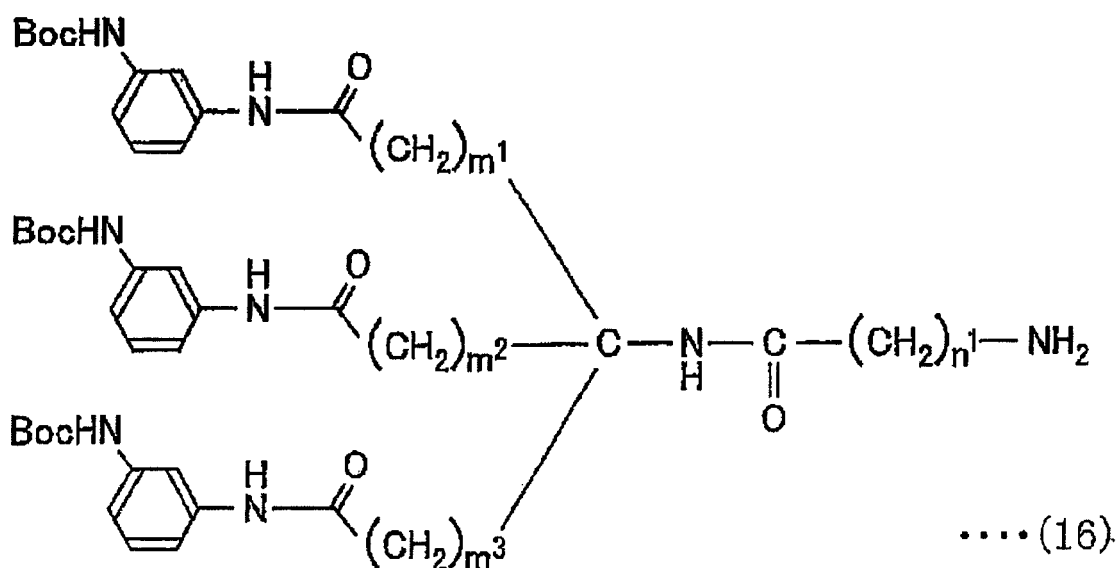


表示的结构。

另外，上述胺化合物只要是具有被保护基保护的芳香族氨基末端的化合物，就没有特别限制。

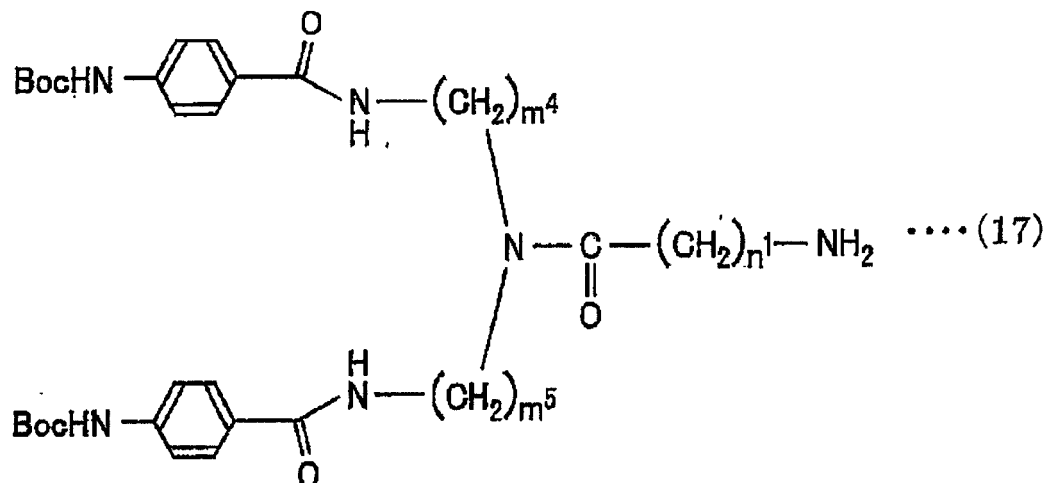
上述保护基是芳香族氨基的氨基通过上述缩合反应不反应而导入的取代基。这样的保护基没有特别地限制，例如，可以列举叔丁氧基羰基(—COOC(CH₃)₃)基；记作 Boc 基)、苄基、氨基甲酸烯丙酯(—COOCH₂CH=CH₂，Alloc 基)等。

作为上述胺化合物，例如，可以列举具有以下述通式(16)



表示的结构的伯胺化合物。另外，在上述通式 (16) 中的 $m^1 \sim m^3$ 分别各自为 0~6 的整数， n^1 为 1~6 的整数。通过通式 (16) 表示的胺化合物与硫辛酸的缩合反应、以及之后进行的芳香族氨基末端的保护基的脱保护而得到的连接子化合物是以上述通式 (7) 表示的连接子化合物。

另外，作为上述胺化合物的其他例子，例如，可以列举具有下述通式 (17)



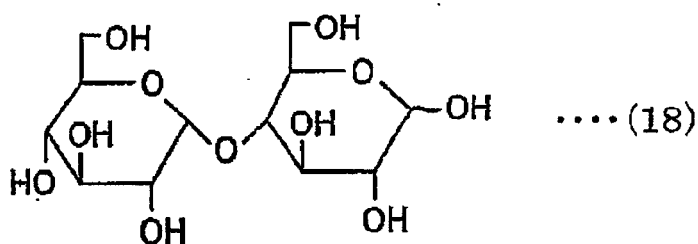
表示的结构的仲胺化合物。另外，在上述通式 (17) 中的 m^4 、 m^5 各自分别是 0~6 的整数， n^1 是 1~6 的整数。通过通式 (17) 表示的胺化合物与硫辛酸的缩合反应、以及之后进行的芳香族氨基末端的保护基的脱保护而得到的连接子化合物是以上述通式 (8) 表示的连接子化合物。通过下列实施例，详细描述这些胺化合物的合成方法。

通过上述硫辛酸或者 γ -巯基丁酸与胺化合物的缩合反应，缩合硫辛酸或

γ -巯基丁酸的羧基（—COOH基）与胺化合物的氨基（—NH₂基），形成酰胺键。然后，对芳香族氨基末端的保护基进行脱保护，除去保护基，形成芳香族氨基，从而能够制得上述连接子化合物。

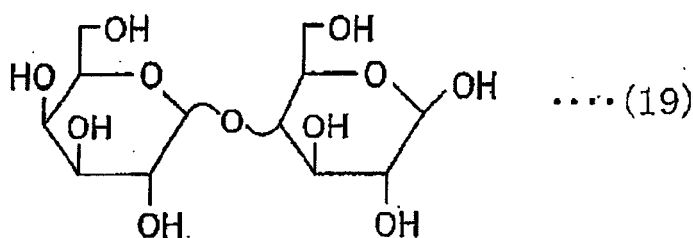
本发明的配体络合物是向上述制造的连接子化合物导入具有还原末端的麦芽糖或乳糖等寡聚糖而得到的化合物。作为本发明的配体络合物，具体地可以列举以下所示的化合物。

对于第1号配体络合物，在以上述通式（12）表示的结构中，作为上述X，是具备以上述通式（2）表示的结构，R'是氢（H），并向R导入具备以下式（18）



表示的结构的麦芽糖而形成的基团。

对于第2号配体络合物，在以上述通式（12）表示的结构中，作为上述X，是具备以上述通式（2）表示的结构，R'是氢（H），并向R导入具备以下式（19）



表示的结构的麦芽糖而形成的基团。

对于该第1, 2号配体络合物，各自向具有3条烃衍生链的连接子化合物导入1个寡聚糖，从而在末端具有3个单元的寡聚糖。换言之，上述第1号配体络合物在末端具有3个单元的 α -吡喃葡萄糖，上述第2号配体络合物在末端具有3个单元的 β -吡喃半乳糖。另外，在上述通式（2）中， $m^1 \sim m^3$ 为0~6的整数而没有特殊限制，可以是不同的整数，也可以是部分或完全相同的整数。另外，在上述通式（12）中， n_1 是1~6的整数而没有特殊限制。

另外，对于第3号配体络合物，在以上述通式（12）表示的结构中，作为上述X，是具备以上述通式（3）表示的结构，R'是氢（H），并向R导入具备以上式（18）表示的结构的麦芽糖而形成的基团。

对于第4号配体络合物,在以上述通式(12)表示的结构中,作为上述X,是具备以上述通式(3)表示的结构,R'是氢(H),并向R导入具备以上式(19)表示的结构的麦芽糖而形成的基团。

该第3、4号配体络合物是各自向具有2条烃衍生链的连接子化合物导入1个寡聚糖,从而在末端具有2个单元的寡聚糖。换言之,上述第3号配体络合物在末端具有2单元的 α -吡喃葡萄糖,上述第4号配体络合物在末端具有2个单元的 β -吡喃半乳糖。另外,在上述通式(3)中, m_4 、 m_5 是0~6的整数而没有限制,还可以是不同的整数,也可以是部分或全部相同的整数。另外,在上述通式(12)中, n_1 是1~6的整数而没有特殊限制。

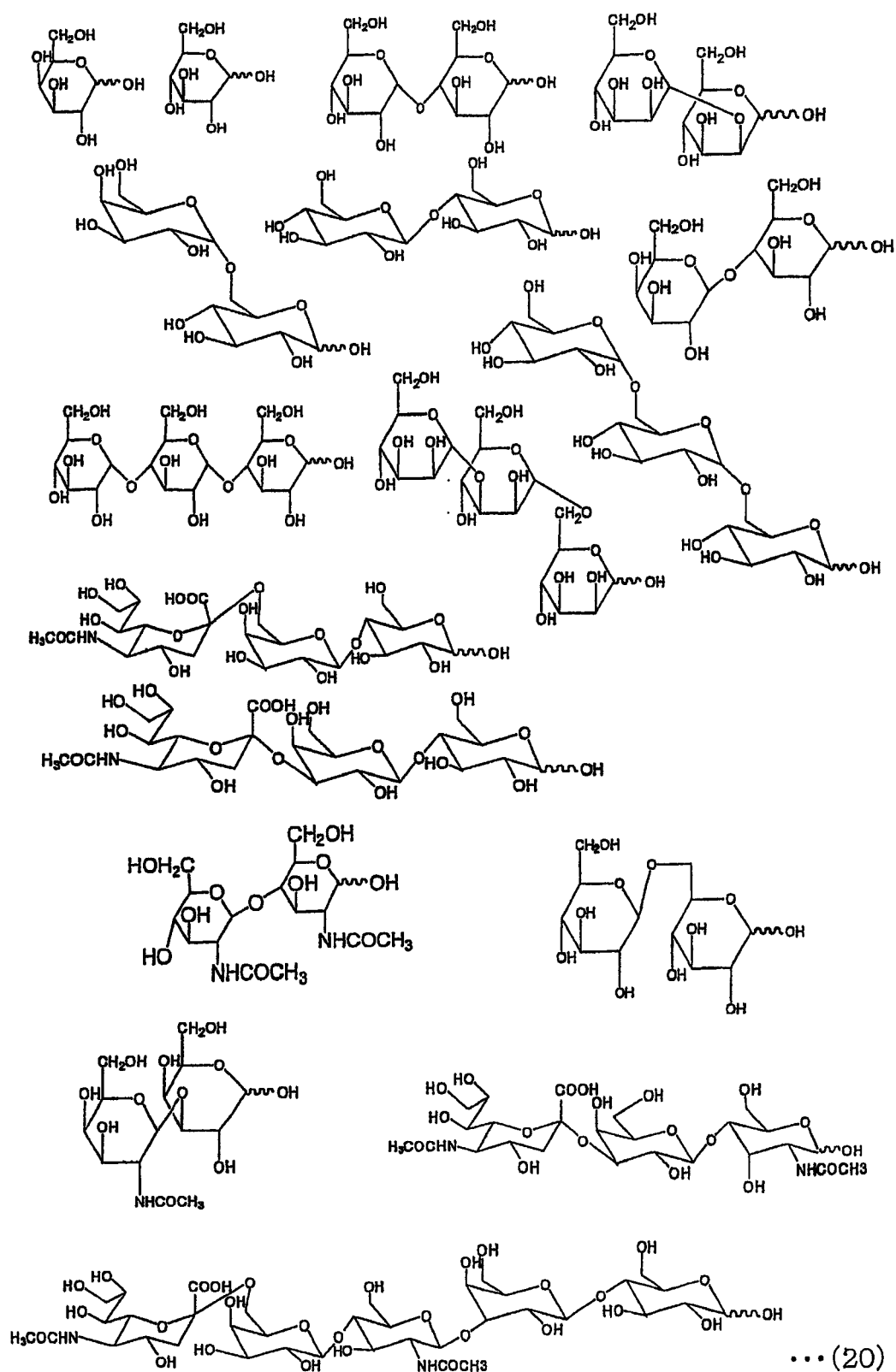
对于第5号配体络合物,在以上述通式(13)表示的结构中,作为上述X,是具备以上述通式(4)表示的结构,R'是氢(H),并向R导入麦芽糖而形成的基团。另外,在上述通式(13)中, n^2 是1~6的整数而没有特殊限制。

对于第6号配体络合物,在以上述通式(13)表示的结构中,作为上述X,是具备以上述通式(4)表示的结构,R'是氢(H),并向R导入麦芽糖而形成的基团。另外,在上述通式(13)中, n_2 是1~6的整数而没有特殊限制。

对于第7号配体络合物,在以上述通式(14)表示的结构中,作为上述X,是具备以上述通式(4)表示的结构,R'是氢(H),并向R导入麦芽糖而形成的基团。另外,在上述通式(14)中, n^1 是1~6的整数而没有特殊限制。

对于第8号配体络合物,在以上述通式(14)表示的结构中,作为上述X,是具备以上述通式(4)表示的结构,R'是氢(H),并向R导入麦芽糖而形成的基团。另外,在上述通式(14)中, n_1 是1~6的整数而没有特殊限制。

此外,作为本发明的配体络合物的具体例子,可以列举向具有以上述通式(9)表示的结构的连接子化合物分别导入下述组(20)



表示的 17 种糖链而得到的 17 种配体络合物。

上述配体络合物都是含有连接子化合物与糖分子而形成，通过连接子化合物内的 S—S 键，利用金属—硫 (S) 键，例如金—硫 (Au—S) 键能够与蛋白质

分析用的支撑体表面的金属结合。通过这样，能够提供通过该 Au—S 键，使糖分子聚集、固定在上述支撑体表面而形成的配体载体。作为上述支撑体表面的金属，除了上述 Au 之外，还可以使用 Cu、Ag、Pt 等金属，特别优选使用 Au。

另外，如下面实施例 1 所示，证实了上述各配体络合物表现出与蛋白质的不同的相互作用。因此，可以认为能够有效地用于鉴定未知的蛋白质。

另外，导入本发明的配体络合物的上述寡聚糖可以是由相同的单糖分子构成的单一寡聚糖，也可以是由各种单糖分子或其衍生物构成的复合糖。另外，上述寡聚糖都是从自然界分离、精制而得到的各种天然糖，还可以是人工合成的糖。另外，上述寡聚糖也可以是分解多糖而制得的。

另外，通过金属—硫键使上述那样的本发明配体络合物固定在表面具有金属的支撑体上而构成的配体载体也包括在本发明范围内。该配体载体并不限于蛋白质分析的用途，为了研究与糖分子的相互作用，还可以用于分析蛋白质以外的物质。

对于上述配体载体，通过使含该配体络合物的配体络合物溶液与表面具有金属膜的支撑体接触，配体络合物的 S—S 键的各 S 原子通过金属—硫键与支撑体表面的金属结合，在支撑体表面导入上述配体络合物。具体地讲，通过在规定时间内将蛋白质分析用支撑体浸渍在上述配体络合物液体中或者向上述支撑体注入配体络合物溶液（使配体络合物溶液流淌在支撑体表面），将上述配体络合物（配体络合物所含的连接子化合物）的 S—S 键转换成与上述支撑体表面的金等的 Au—S 键，从而能够将上述配体络合物固定在支撑体表面上。

作为用于配体络合物溶液的溶剂，没有特别限制，例如，可以列举甲醇、水、二甲基乙酰胺（DMAc）或它们的混合溶剂等。另外，浸渍时间可以是 0.2 小时~12 小时，注入浓度可以是 $1\ \mu\text{M}$ ~ 1mM 。

像这样，本发明的配体络合物具有 S—S 键，因而能够简单地固定于蛋白质分析用的支撑体表面，能够简单地在上述支撑体上导入糖分子。

本发明的配体载体可以用于分析糖分子与例如蛋白质等其他物质的相互作用。具体地讲，上述配体载体能够应用于 SRP 测定、亲和色谱法等。

例如，作为蛋白质分析，可以按照如下步骤进行 SRP 测定。即，如果使用在蒸镀金属膜等金属薄膜的支撑体上固定本发明的配体络合物而形成的配体载体，使该配体载体与蛋白质接触，并通过常规方法利用表面等离子体激元共振

装置测定共振角度，就能够观测该配体载体与蛋白质的结合行为。另外，作用于 SPR 测定的支撑体（传感芯片），例如，能够使用玻璃、塑料等，特别合适地使用玻璃。另外，配体载体和蛋白质的接触，例如可以通过如下步骤进行：将蛋白质溶解在运行缓冲剂中得到溶液，并将所得溶液流淌在该配体载体的表面。作为该运行缓冲剂，例如，可以列举磷酸缓冲溶液等。

另外，如后面的实施例所示，证实了本发明的配体载体表现出与各种蛋白质不同的相互作用，因而能够用于蛋白质的鉴定。即，通过利用本发明的配体载体分析未知的蛋白质，能够容易地判断该蛋白质是否是糖结合性蛋白质，或者该蛋白质是哪种蛋白质。另外，如果制造含有在分别固定上述配体络合物的配体载体中的至少 2 种作为 1 个组合的芯片组合，能够更简便地鉴定蛋白质（特别是糖链结合性的蛋白质），因而是有用的。

下面描述本发明的配体载体的利用方法。本发明的配体载体能够作为传感芯片用于测定分子间相互作用的测定（例如，如下的 SPR 测定）。即，利用第 1 配体络合物固定在支撑体表面而形成的第 1 的传感芯片和与上述第 1 的配体络合物种类不同的第 2 的配体络合物固定在支撑体表面而形成的第 2 传感芯片，检测出利用第 1 传感芯片得到的 SPR 测定的检测结果与利用第 2 传感芯片得到的 SPR 测定的检测结果之差，能够观测糖分子的相互作用。对于这些传感芯片，可以使用固定的糖分子不同的配体络合物或者固定的糖分子不同，但连接子化合物部分不同的配体络合物。作为该种类不同的配体络合物，例如，可以列举上述各种配体络合物。而且，在上述配体络合物中，优选选择连接子化合物部分具有相同结构，但寡聚糖部分具有不同结构的化合物（例如，上述第 1 号配体络合物与第 2 号配体络合物的组合、或者上述第 3 号配体络合物与第 4 号配体络合物的组合）。

对于上述 SPR 测定，利用特异地作用于第 1 传感芯片的糖分子的蛋白质等，测定条件保持恒定，使上述 2 个传感芯片起作用，观测两者的共振角度。通过检测该两者的共振角度之差，能够作为糖分子于蛋白质等特异的相互作用进行测定。

另外，观测与糖分子的相互作用的物质并不限于蛋白质。

如上所述，同时测定 2 个种类的传感芯片，并不限于这些，可以测定 2 种以上的传感芯片，也可以同时测定。另外，还可以使用不向至少 1 个传感芯片

导入糖分子的芯片。例如，还可以使用只固定连接子化合物的芯片。

如果进行上述那样的 SPR 测定，能够利用糖分子以外具有相同结构的配体络合物的至少 2 个传感芯片进行测定，因而能够观测到由糖分子引起的至少 2 个传感芯片相互作用之差。因此，如果利用上述测定方法，能够降低糖分子以外的部分与其他物质的非特异的相互作用，能够观测糖分子与其他物质的特异的相互作用。

另外，还可以利用使糖分子相同、连接子化合物部分结构不同的配体络合物固定的 2 种传感芯片进行上述 SPR 测定。此时，能够测定由传感芯片上的糖分子的聚集度不同而引起的蛋白质的结合行为。作为这样的传感芯片的组合，能够列举上述第 1 号配体络合物与第 3 号配体络合物的组合。

此外，通过上述的 SPR 测定证实糖分子与其他物质的特异的相互作用后，如果直接将用于 SPR 测定的蛋白质结合的配体载体供质量分析使用，能够鉴定与传感芯片结合的蛋白质。可以使用母体支持型激光脱离/飞行时间型质量分析仪 (MALDI-TOF/MS) 等以前公知的质量分析仪，并根据以前公知的方法进行上述质量分析。

如果利用上述步骤，能够使用本发明的配体络合物进行蛋白质的分析。即，本发明的蛋白质的分析方法由以下工序构成：通过使上述本发明的配体络合物与表面具有金属的支撑体接触，制造支撑体上固定该配体络合物的配体载体的工序、使上述配体载体与含作为分析对象的蛋白质接触，并相互作用后，进行例如 SPR 那样的分子间相互作用的测定工序、在上述分子间相互作用测定后进行质量分析，鉴定与上述配体载体结合的蛋白质的工序。

该蛋白质的分析方法如上所述利用固定多种不同的配体络合物的 2 种以上的配体载体，分别进行蛋白质的分析，比较研究各自的结构，能够分析各个蛋白质的特性。

<实施例>

下面更详细地描述本发明的配体络合物的合成。另外，本实施例利用合成的配体络合物进行 SPR 测定与质量分析，进行蛋白质的分析。并同时描述这些内容。

[实施例 1：配体络合物（化合物 1~4）的合成]

本实施例合成实施方式描述的各自分为第1~4号配体络合物的4个配体络合物。

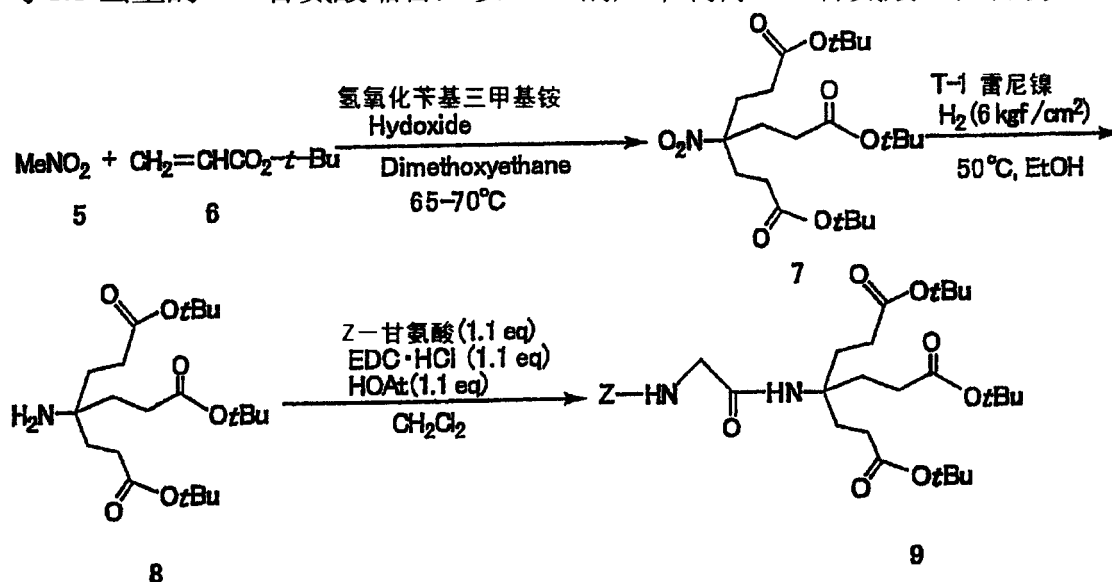
(1) 第1号配体络合物(化合物1)的合成

按照以下步骤合成具有如下所述结构的配体络合物(化合物1): 作为上述第1号配体络合物之一的、在上述通式(12)表示的结构中, n^1 是1, X具备以通式(2)表示的结构, R是氢(H), 向R导入以上式(18)表示的麦芽糖, m^1 , m^2 , m^3 是2。

作为上述配体络合物(化合物1)的合成前阶段, 首先, 合成具有3条芳香族氨基末端受保护基保护的支链的连接子化合物A。

首先, 如下式(21)所示, 在60°C-70°C的二甲氧基乙烷中, 在氢氧化苄基三甲基铵的存在下, 相对硝基甲烷(化合物5)迈克尔加成3个单元的丙烯酸叔丁酯(化合物6), 以91%的产率制得化合物7。接着, 在氢气气氛下(6kg/cm²)、50°C的乙醇中, 利用雷尼镍(Raney Ni), 还原上述化合物7的硝基, 以98%的产率制得化合物8。

然后, 在CH₂Cl₂中, 在1.1当量的1-羟基-7-氮杂苯并三唑(式中, HOAt)、1.1当量的水溶性碳二亚胺盐酸盐(式中, EDC·HCl)的存在下, 使上述化合物8与1.1当量的Z-甘氨酸缩合, 以85%的产率制得Z-甘氨酸(化合物9)。



更详细地讲, 上述化合物8根据文献(G. R. Newkome等, OPPI BRIEFS, 28卷, p. 495, 1996)的进行制备, 首先, 在50mL1, 2-二甲氧基乙烷溶解硝基甲

烷 (12.2g, 200mmol), 加热至 65—70℃, 添加 40% 的氢氧化苄基三甲基铵—甲醇溶液 (2ml), 制成硝基甲烷溶液。接着, 使该硝基甲烷溶液的温度上升至 75℃, 缓慢滴加丙烯酸叔丁酯 (90.8mL, 620mmol) 后, 一边将溶液温度保持在 70—75℃, 一边分 4 次每次添加 1mL40% 的氢氧化苄基三甲基铵—甲醇溶液, 搅拌 2.5 小时, 制得硝基甲烷/丙烯酸叔丁酯反应溶液。通过倾析除去该硝基甲烷/丙烯酸叔丁酯反应溶液中的不溶物, 进行浓缩, 将所得残渣溶于二乙醚, 利用水冷的 10% 的盐酸水溶液、饱和碳酸氢钠溶解和水, 分 2 次进行洗涤, 制得残渣溶液。之后, 利用无水硫酸钠作为干燥剂, 干燥该残渣溶液, 利用 C 矿除去该干燥剂, 进行减压浓缩后, 将浓缩残渣溶解于乙醇, 进行重结晶, 制得白色针状晶体化合物 7 (81.8g, 91%)。

接着, 在 50ml 无水乙醇中, 添加化合物 7 的晶体 (10g, 22.4mmol) 和 T-1 雷尼镍 (6.0g), 在 6kg/cm² 的氢气气氛下, 在 50℃ 下进行 23 小时的搅拌后, 利用 C 矿过滤 T-1 雷尼镍, 减压浓缩所得化合物 7 反应溶液。通过硅胶色谱 (溶剂: 氯仿/甲醇=20/1) 精制通过该化合物反应的减压浓缩得到的浓缩残渣, 制得白色固体化合物 8 (产量 9.2g, 收率 98%)。

更具体地讲, 将 Z-甘氨酸 (1.26g, 6.62mmol) 和 HOAt (0.90g, 6.62mmol)、EDC·HCl (1.27g, 6.62mmol) 溶解在无水二氯甲烷 (28mL), 得到 Z-甘氨酸溶液, 将化合物 8 (2.50g, 6.02mmol) 溶于无水二氯乙烷 (2mL) 得到化合物 8 溶液, 在 0℃ 的温度条件下, 在上述 Z-甘氨酸溶液中添加上述化合物 8 溶液, 在氩气气氛下, 在室温下搅拌 36 小时, 制得 Z-甘氨酸/化合物 8 反应溶液。在该 Z-甘氨酸/化合物 8 反应溶液中添加二氯甲烷和 10% 柠檬酸水溶液, 利用二氯甲烷进行提取, 依次利用水、饱和碳酸氢钠水溶液和水洗涤有机层 1 次, 使用无水硫酸钠作为干燥剂进行干燥后, 过滤该干燥剂进行减压浓缩。利用硅胶色谱法 (溶剂: 氯仿) 精制通过该减压浓缩得到的浓缩残渣, 制得白色固体化合物 9 (产量 3.09g, 收率 85%)。

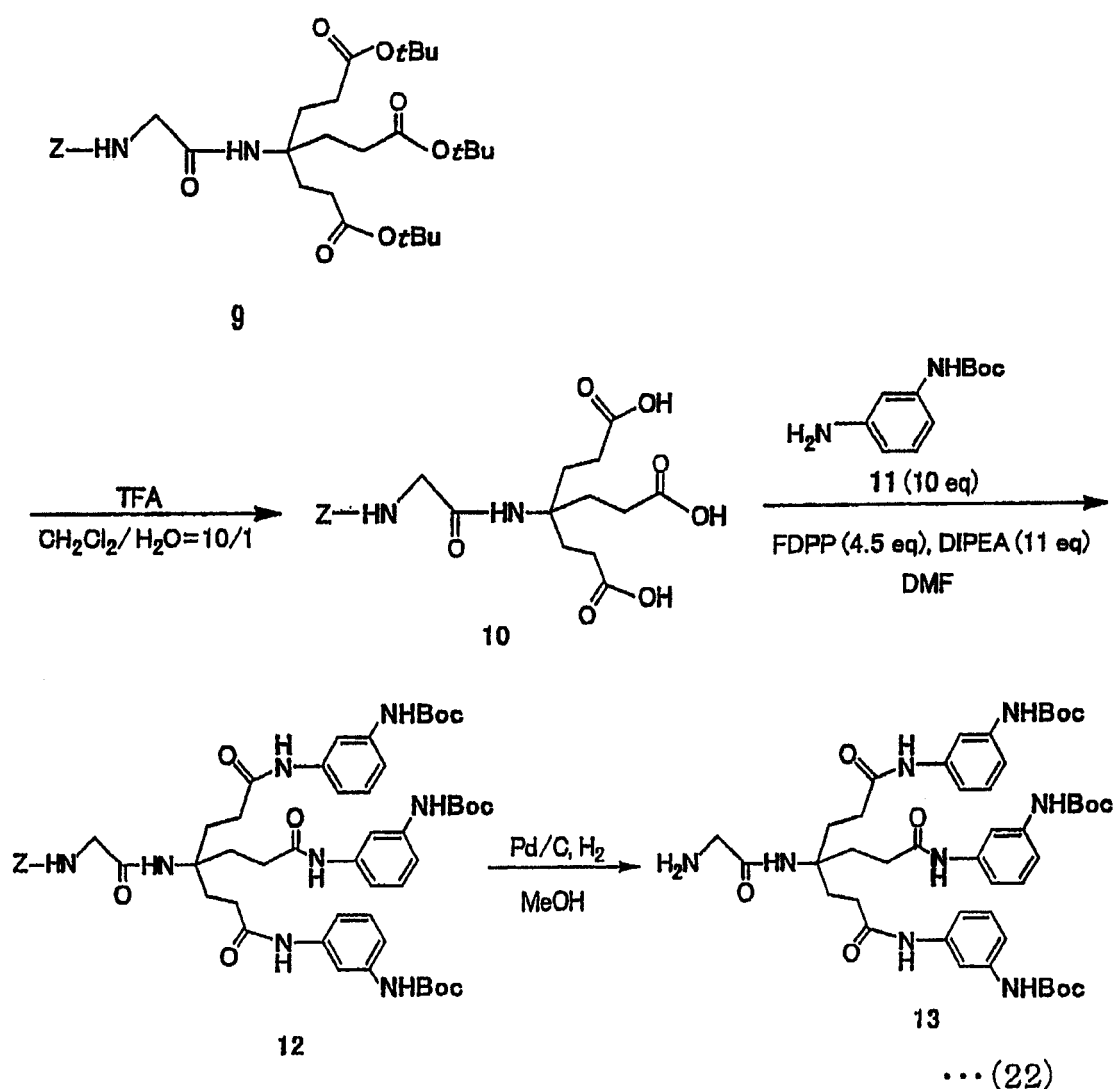
进行所得上述化合物 9 的 ESI-MS (positive) 测定 (飞行时间型质量分析仪测定), 结果 m/z (质量/电荷比) 629.4 [(M+Na) +]。另外, 进行核磁共振 (1H-NMR, 400MHz, CDCl₃) 测定, 结果为:

δ 7.37-7.26 (5H, m, Ph), 6.43 (1H, bs, CONHC),
5.38 (1H, bs, Gly-NH), 5.13 (2H, s, CH₂Ph), 3.78
(2H, d, J = 7.7 Hz, Gly-CH₂), 2.20 (6H, t, J = 7.7 Hz, CCH₂CH₂),
1.96 (6H, t, J = 7.7 Hz, CCH₂CH₂), 1.44 (27H, s, CH₃)。

通过这样能够证实化合物 9 的结构。另外, 化合物 9 的分子质量为 606.35。

接着, 如下式 (22) 所示, 在 CH₂Cl₂/H₂O=10/1 的混合溶剂中, 利用三氟乙酸 (以下称为 TFA), 对上述化合物 9 的叔丁氧基羰基 (-COOC(CH₃)₃基; 式 (22) 中, tBu), 以收率 95% 制得化合物 10。

然后, 在 4.5 当量的五氟苯基磷酸二苯酯 (式中, FDPP)、11 当量的二异丙基异胺 (式中, DIPEA)、N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的存在下, 使上述化合物 10 与通过 Boc 基保护氨基的间苯二胺衍生物 (化合物 11、10 当量) 缩合, 以收率 99% 制得 N-Boc 胺衍生物 (化合物 12)。接着, 在甲醇 (式中, MeOH) 中, 在 Pd/C (活性炭负载钯) 存在下, 进行接触氢还原, 对缩合成化合物 12 的 Z-甘氨酸的苄氧羰基 (式中, Z 基) 进行脱保护, 以收率 79% 制得化合物 13。



为了制得上述化合物 10~13，具体地进行以下操作。

即，为了制得化合物 10，将化合物 9 (2.98g, 4.90mmol) 溶解于二氯甲烷 (15mL)，在 -10°C 下添加 TFA (15mL) 和水 (1.5mL) 后，在室温下搅拌 1.5 小时，制得化合物 9 反应溶液。在减压浓缩该化合物 9 反应溶液后，在水浴中向浓缩残渣添加 10% 氢氧化钠水溶液，使得 pH 为 5，此外，添加浓盐酸，使 pH 为 2，使白色固体析出。利用水洗涤所得白色固体，制得白色固体化合物 10 (产量 2.04g, 收率 95%)。

进行所得上述化合物 10 的 ESI-MS (negative) 测定，结果为： m/z 437.1 [(M-H)]。另外，进行核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$, 400MHz, d_6 -DMSO) 测定，结果为：

δ 7.34-7.30 (6H, m, Ph, CONH), 7.15 (1H, s, Gly-NH),
5.01 (2H, s, CH₂Ph), 3.55 (2H, d, J = 5.9 Hz, Gly-CH₂),
3.33 (3H, brs, CO₂H), 2.11 (6H, m, CCH₂CH₂), 1.81 (6H, m, CCH₂CH₂)。
通过这样,能够证实化合物 10 的结构。另外,化合物 10 的分子质量是 438.16。

另外,为了制得化合物 11,将间苯二胺(0.50g, 4.62mmol)溶于甲醇(35mL),在 0°C 下添加 (Boc)₂O (1.06mL, 4.62mmol) 和三乙胺 (0.65mL, 4.65mmol) 之后,在室温下搅拌 24 小时,进行减压浓缩。通过硅胶色谱(溶剂:氯仿/丙酮=10/1)精制通过该减压浓缩得到的浓缩残渣,制得白色固体化合物 11 (产量 665mg, 收率 68%)。

进行上述化合物 11 的 ESI-MS (positive) 测定,结果为: m/z231.2 [(M+Na)⁺]。另外,进行 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) 测定,结果为:

δ 7.02 (1H, t, J = 8.0 Hz, aromatic), 6.95 (1H, bs, aromatic), 6.54 (1H, dd, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz, aromatic), 6.41 (1H, bs, CONH), 6.35 (1H, dd, J = 2.2 Hz, J = 7.9 Hz, aromatic), 3.66 (2H, bs, NH₂), 1.50 (9H, s, t-butyl)
通过这些能够证实化合物 11 的结构。另外,化合物 11 的分子质量是 208.12。

另外,为了制得化合物 12,将上述化合物 10 (100mg, 228 μ mol)、上述化合物 11 (475mg, 2.28mmol)、FDPP (394mg, 1.03mmol) 和二异丙基乙胺 (447 μ L, 2.57mmol) 溶于无水二甲基甲酰胺 (2mL),在氩气气氛下,在室温下搅拌 29 小时后,添加乙酸乙酯和水,利用乙酸乙酯进行提取,分别利用 0.5N 盐酸、水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水洗涤一次有机层,使用无水硫酸钠作为干燥剂,进行干燥,制得干燥反应溶液。从制得的干燥反应溶液过滤干燥剂,进行减压浓缩,利用硅胶色谱(溶剂:氯仿/丙酮=3/1)精制浓缩残渣,制得白色固体化合物 12 (产量 228mg, 收率 99%)。

进行上述化合物 12 的 ESI-MS (positive) 测定,结果为: m/z1009.5 [(M+H)⁺]。另外,进行 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) 测定,结果为:

δ 8.75 (3H, s, NHCO_2tBu), 7.67 (3H, s, CONHPh),
7.30–6.95 (15H, m, aromatic, CH_2CONH), 6.52 (1H, bs, Gly-NH),
(2H, s, CH_2Ph), 3.71 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, Gly-CH_2),
2.23 (6H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.97 (6H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.47 (27H
, s, t-butyl)。

通过这些, 能够证实化合物 12 的结构。另外, 化合物 12 的分子质量是 1008.50。

另外, 化合物 13 具体地按照以下步骤制得。即, 将化合物 12 (200mg, 198 μ mol) 溶解于甲醇 (3mL), 添加 10%Pd/C (62.3mg), 在氢气气氛下, 在室温下搅拌 15 小时后, 过滤上述 Pd/C, 进行减压浓缩。利用硅胶色谱 (溶剂: 氯仿/甲醇=8/1) 精制通过该减压浓缩制得的浓缩残渣, 制得白色固体化合物 13 (产量 136mg, 收率 78%)。

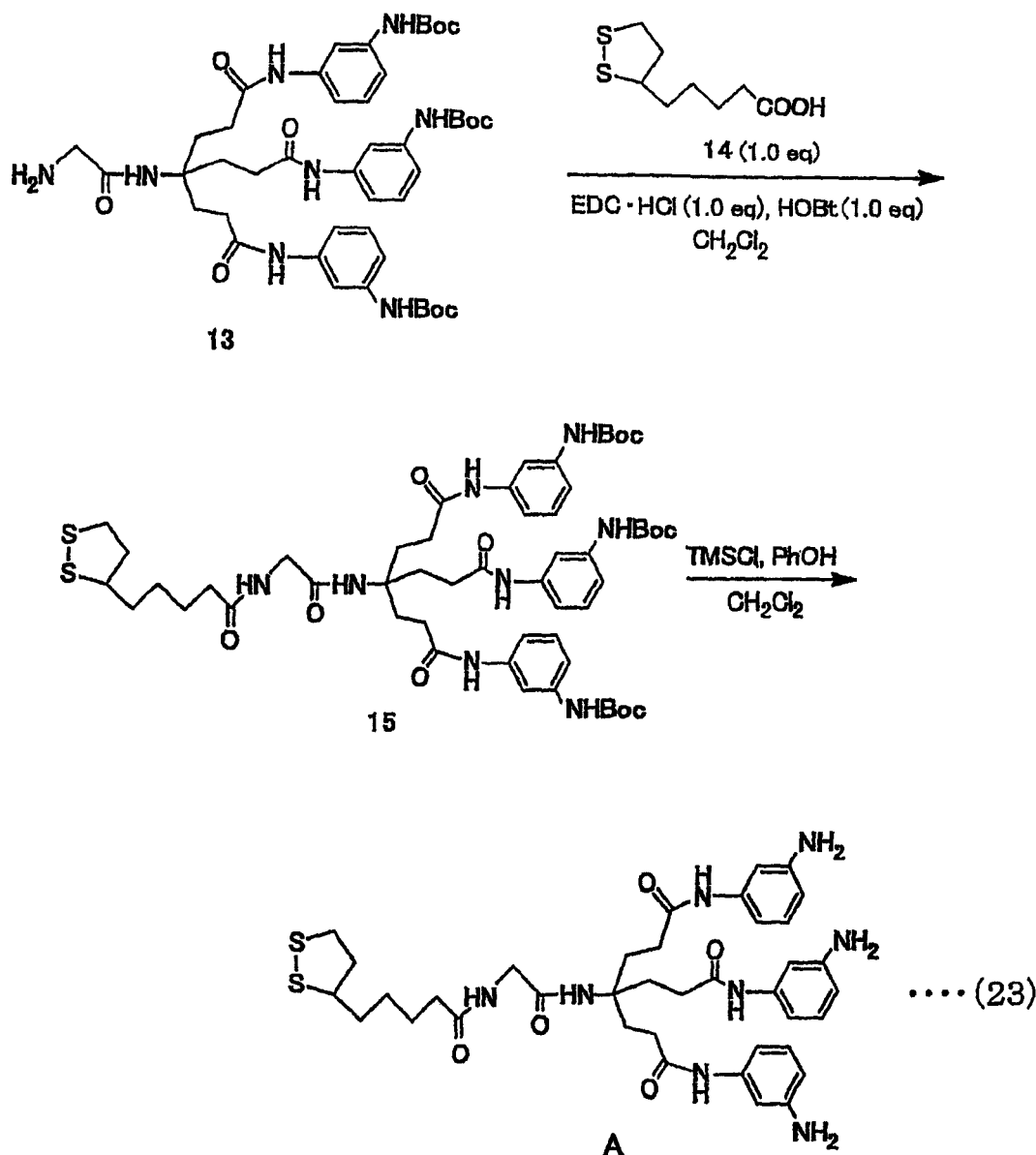
进行上述化合物 13 的 ESI-MS (positive) 测定, m/z 875.5 [(M+H)⁺]。另外, 进行 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 测定, 结果为:

δ 9.00 (3H, s, NHCO_2tBu), 7.57 (2H, s, NH_2),
7.35 (1H, bs, Gly-NH), 7.14–7.00 (15H, m, aromatic, CH_2CONH),
3.21 (2H, s, Gly-CH_2), 2.26 (6H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.04 (
6H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.45 (27H, s, t-butyl)。

通过这些, 能够证实化合物 13 的结构。另外, 化合物 13 的分子质量为 874.46。

此外, 如下式 (23) 所示, 在 CH_2Cl_2 中, 使 1.0 当量的 EDC·HCl、1.0 当量的 1-羟基苯并三唑 (式 (23) 中, HOBT)、上述化合物 13 与 1.0 当量的硫辛酸 (化合物 14), 以收率 75% 制得硫辛酸衍生物 (化合物 15)。

在 CH_2Cl_2 中, 在三甲基氯化癸烷 (式中, TMSCl)、苯酚 (PhOH) 的存在的酸性条件下, 对上述得到的化合物 15 脱保护上述 Boc 基, 形成含 3 条具有芳香族氨基衍生链而形成的连接子化合物, 制得化合物 A (收率 32%)。



具体地讲，为了制得化合物 15 和化合物 A，进行以下操作。

即，为了制得化合物 15，将化合物 14 (23.6mg, 114μmol) 和 HOBT (15.4mg, 114μmol) 溶于无水二氯甲烷 (2.3mL)，在 0℃ 的温度条件下，添加化合物 13 (2.50mg, 6.02μmol)，在氩气气氛下进行遮光，在室温下，搅拌 36 小时后，添加 10% 的柠檬酸水溶液，然后利用氯仿进行提取，利用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机层，使用无水硫酸钠作为干燥剂进行干燥。之后，过滤该干燥剂，进行减压浓缩，利用硅胶色谱 (溶剂：氯仿/甲醇=40/1) 进行浓缩残渣，制得白色固体化合物 15 (产量 91.0mg, 产率 75%)。

进行上述化合物 15 的 ESI-MS (positive) 测定， m/z 1085.5 [(M+H)⁺]。另外，进行 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) 测定，结果为：

δ 9.01 (3H, bs, NHCO_2tBu), 7.67 (3H, s, CONHPh),
 7.31 (1H, bs, CONHCH_2), 7.27-7.00 (12H, m, aromatic),
 3.71 (2H, bs, Gly-CH_2), 3.64-3.39 (1H, m, SSCH), 3.12-
 2.99 (2H, m, CH_2SS), 2.33 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 2.32 (6H, m, CCH_2CH_2
 CO), 2.20 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 2.04 (6H, m, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.82-1.73
 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 1.62-1.47 (4H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH}$, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$
 NH), 1.47 (27H, s, t-butyl), 1.39-1.25 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH}$)

通过这些, 能够证实化合物 15 的结构。另外, 化合物 15 的分子质量为 1062.49。

另外, 为了制得化合物 A, 将三甲基氯化硅烷 (0.25mL, 2.64mmol) 溶解于二氯甲烷 (0.49mL), 添加把苯酚 (549mg, 5.83mmol) 溶解于二氯甲烷 (1.46mL) 的苯酚溶液, 进行搅拌后, 进而添加化合物 15 (34.7mg, 32.6 μmol), 在室温下, 进行遮光, 搅拌 1.5 小时, 制得化合物 15 反应溶液。接着, 向该化合物 15 反应溶液添加氯仿, 利用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机层, 析出黄色固体。将析出的黄色固体溶于乙酸, 冷却至 4°C, 过滤凝聚的固体, 制得白色固体化合物 A (产量 7.9mg, 收率 32%)。

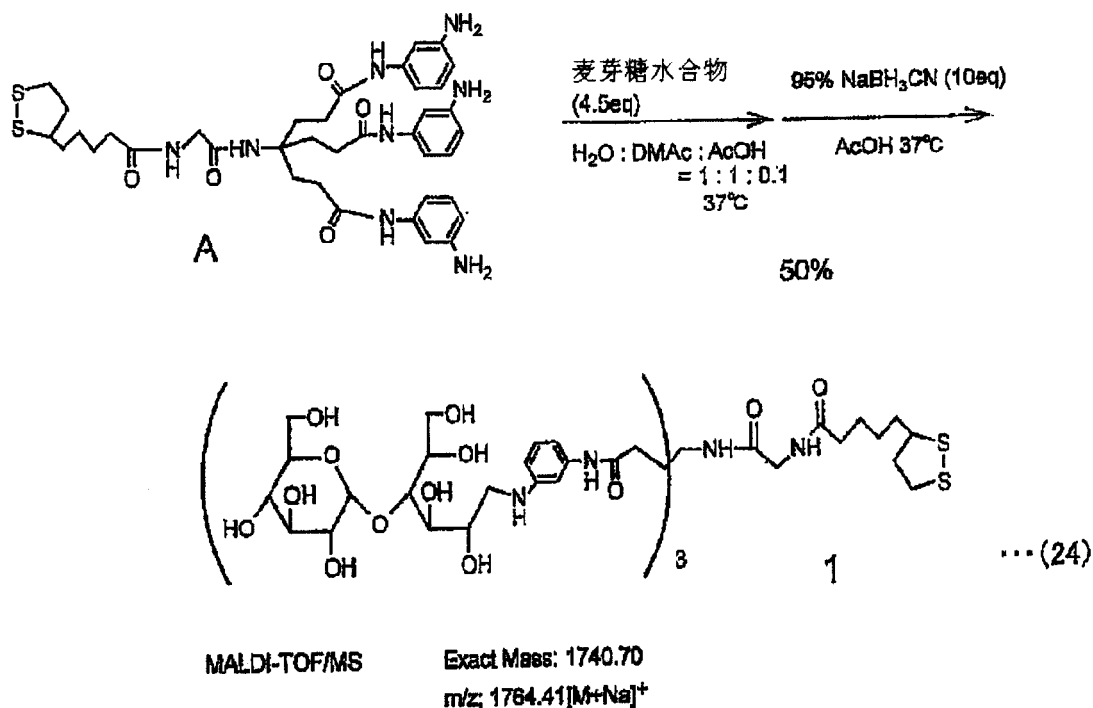
进行上述化合物 A 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 763.6 [$(M+H)^+$]。另外, 进行 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 测定, 结果为:

δ 9.57 (3H, m, CONHPh), 7.97 (1H, m, CONHCH_2),
 6.87 (6H, m, aromatic), 6.67 (3H, d, $J = 7.7$ Hz, aromatic),
 6.21 (3H, d, $J = 7.7$ Hz, aromatic), 4.98 (6H, bs, NH_2)
 , 3.67 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, Gly-CH_2), 3.56 (1H, m, SSCH), 3.16-3.
 04 (2H, m, CH_2SS), 2.36 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 2.25 (6H, m, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$
), 2.19-2.07 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 1.93 (6H, m, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.8
 3 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SS}$), 1.50 (4H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CONH}$, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$),
 1.33 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH}$)。

通过这些, 能够证实化合物 A 的结构。另外, 化合物 A 的分子质量为 762.33。

接着, 利用这样制得的连接子化合物 A, 按照下式 (24) 的步骤, 合成在上述以通式 (12) 表示的结构中, 具有 n^1 为 1, X 是以通式 (2) 表示, m^1 , m^2 , m^3 是

2 的结构配体络合物 (化合物 1)。



如式 (24) 所示, 在 H_2O /二甲基乙酰胺 (式中, DMAc)/乙酸 (AcOH) = 1/1/0.1 的混合溶剂中溶解所得连接子化合物 A 和以上式 (18) 表示的作为寡聚糖的市售麦芽糖水合物 (4.5 当量), 在 $\text{pH} 4 \sim 4.5$, 37°C 下, 形成席夫碱之后, 向溶剂添加 AcOH, 添加 10 当量的 95% 的 NaBH_3CN , 在 $\text{pH} 3 \sim 4.5$, 37°C 下, 进行还原氨基化反应。然后, 利用 Sephadex G-50 (Pharmacia Biosystem 公司制造), 通过凝胶过滤色谱精制所得化合物, 进一步进行除盐处理, 作为末端含 3 个单元的 α -吡喃葡萄糖而构成的配体络合物制得化合物 1。通过 MALDI-TOF/MS 和 NMR 鉴定上述化合物 1。

MALDI-TOF/MS 的结果是 $m/z 1764.4[(M+Na)^+]$ 。另外, 进行 $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, D_2O) 测定, 结果为:

δ 7.01 (3H, dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz, aromatic), 6.70 (3H, s, aromatic), 6.58 (3H, d, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 6.44 (3H, d, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 4.90 (3H, d, $J = 3.4$ Hz, H-1' $\times 3$), 3.79–3.73 (6H, m, H-2 $\times 3$, H-5 $\times 3$), 3.71–3.66 (6H, m, H-3 $\times 3$, H-5' $\times 3$), 3.64 (3H, dd, $J = 2.1, 12.4$ Hz, H-6a' $\times 3$), 3.59 (3H, dd, $J = 4.8, 12.4$ Hz, H-6b' $\times 3$), 3.59–3.52 (3H, m, H-6a $\times 3$), 3.54–3.51 (6H, m, H-4 $\times 3$, H-3' $\times 3$), 3.43 (3H, dd, $J = 6.9, 12.4$ Hz, H-6b $\times 3$), 3.39–3.34 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2-)(\text{S}-)$), 3.37 (3H, dd, $J = 3.4, 9.6$ Hz, H-2' $\times 3$), 3.25 (3H, dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, H-4' $\times 3$), 3.11 (3H, dd, $J = 4.8, 13.7$ Hz, H-1a $\times 3$), 3.01 (3H, dd, $J = 7.7, 13.7$ Hz, H-1b $\times 3$), 2.98–2.86 (2H, m, $-\text{SCH}_2-$), 2.27–2.23 (6H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\times 3$), 2.19–2.14 (1H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 2.10 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, $-\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$), 1.98–1.94 (6H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\times 3$), 1.72–1.65 (1H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.43–1.36 (2H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{H}_2-$), 1.39–1.29 (2H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.19–1.13 (2H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)。

根据这些结果能够证实化合物 1 的结构。另外, 该化合物 1 的分子质量为 1740.70。

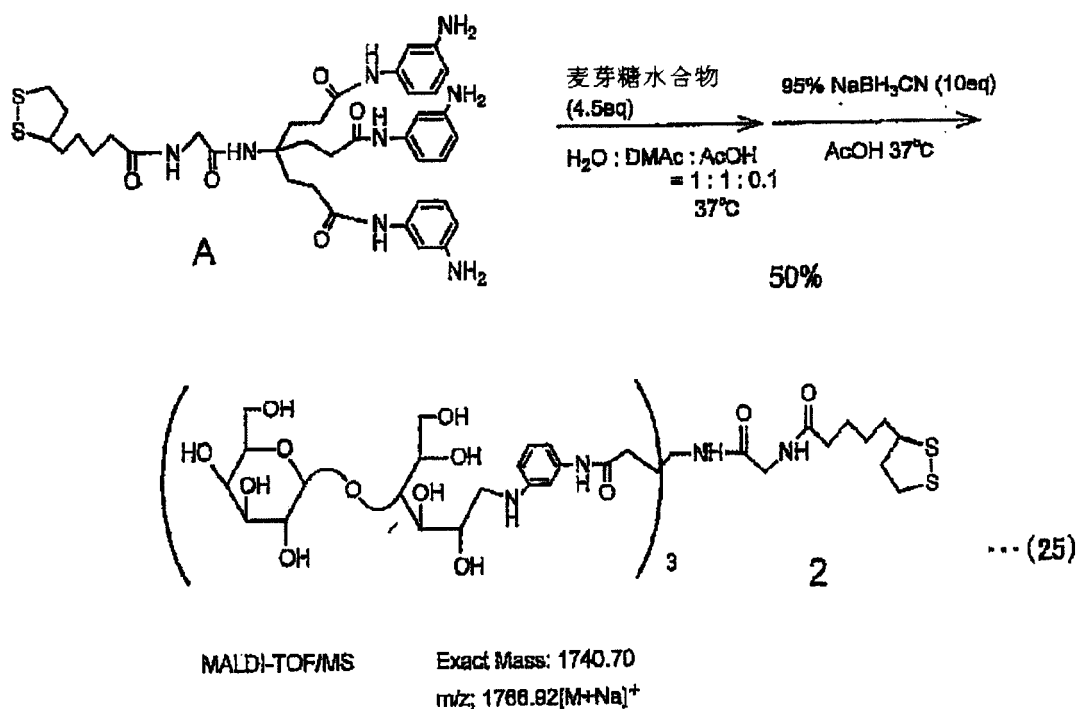
(2) 第 2 号配体络合物 (化合物 2) 的合成

按照以下步骤合成具有如下所述结构的配体络合物 (化合物 2): 作为上述第 2 号配体络合物之一的、在上述通式 (12) 表示的结构中, n^1 是 1, X 具备以通式 (2) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入以上式 (18) 表示的麦芽糖, m^1, m^2, m^3 是 2。

在上述配体络合物 (化合物 2) 的合成中, 首先, 按照与上述第 1 号配体络合物的合成的步骤相同的步骤合成连接子化合物 A。

接着, 利用所得的连接子化合物 A, 并按照下式 (25) 的步骤, 合成具有如下结构的配体络合物 (化合物 2): 在上述通式 (12) 表示的结构中, n^1 是 1, X

具备以通式 (2) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入以上式 (18) 表示的麦芽糖, m^1, m^2, m^3 是 2。



如式 (25) 所示, 在 H_2O /二甲基乙酰胺 (式中, DMAC)/乙酸 (AcOH) = 1/1/0.1 的混合溶剂中溶解上述方法得到的连接子化合物 A 和以上式 (19) 表示的作为寡聚糖的市售麦芽糖水合物 (4.5 当量), 在 $pH 4 \sim 4.5, 37^\circ C$ 下, 形成席夫碱之后, 向溶剂添加 AcOH, 添加 10 当量的 95% 的 $NaBH_3CN$, 在 $pH 3 \sim 4.5, 37^\circ C$ 下, 进行还原氨基化反应。然后, 利用 Sephadex G-50 (Pharmacia Biosystem 公司制造), 通过凝胶过滤色谱精制所得化合物, 进一步进行除盐处理, 作为末端含 3 个单元的 β -吡喃半乳糖而构成的配体络合物制得化合物 2。通过 MALDI-TOF/MS 和 NMR 鉴定上述化合物 2。

MALDI-TOF/MS 的结果是 $m/z 1766.92 [(M+Na)^+]$ 。另外, 进行 ^1H-NMR (600MHz, D_2O) 测定, 结果为:

δ 6.99 (3H, dd, $J = 7.9, 8.2$ Hz, aromatic), 6.70 (s, 3H, aromatic), 6.61 (3H, d, $J = 7.9$ Hz, aromatic), 6.43 (3H, d, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 4.27 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1' $\times 3$), 3.90–3.85 (3H, m, H-2 $\times 3$), 3.74–3.70 (3H, m, H-5' $\times 3$), 3.69–3.66 (3H, m, H-4 $\times 3$), 3.68–3.62 (3H, m, H-6a' $\times 3$), 3.65–3.62 (3H, m, H-3 $\times 3$), 3.57 (3H, br, H-4' $\times 3$), 3.53 (3H, dd, $J = 5.8, 11.7$ Hz, H-6b' $\times 3$), 3.47–3.43 (6H, m, H-6 $\times 3$), 3.41 (3H, m, $J = 3.1, 10.0$ Hz, H-3' $\times 3$), 3.38 (3H, brt, $J = 5.8$ Hz, H-5 $\times 3$), 3.35 (3H, dd, $J = 7.6, 10.0$ Hz, H-2' $\times 3$), 3.36–3.29 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2-)$ (S-)), 3.12 (3H, brd, $J = 10.7$ Hz, H-1a $\times 3$), 2.91 (3H, dd, $J = 7.6, 12.0$ Hz, H-1b $\times 3$), 2.90–2.83 (2H, m, $-\text{SCH}_2-$), 2.23–2.16 (6H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\times 3$), 2.18–2.10 (1H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 2.06 (2H, t, $J = 5.8$ Hz, $-\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$), 1.95–1.89 (6H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\times 3$), 1.68–1.59 (1H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.41–1.30 (2H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{C}$ H_2CH_2-), 1.32–1.22 (2H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.15–1.08 (2H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)。

根据这些结果能够证实化合物 2 的结构。另外, 该化合物 2 的分子质量为 1740.70。

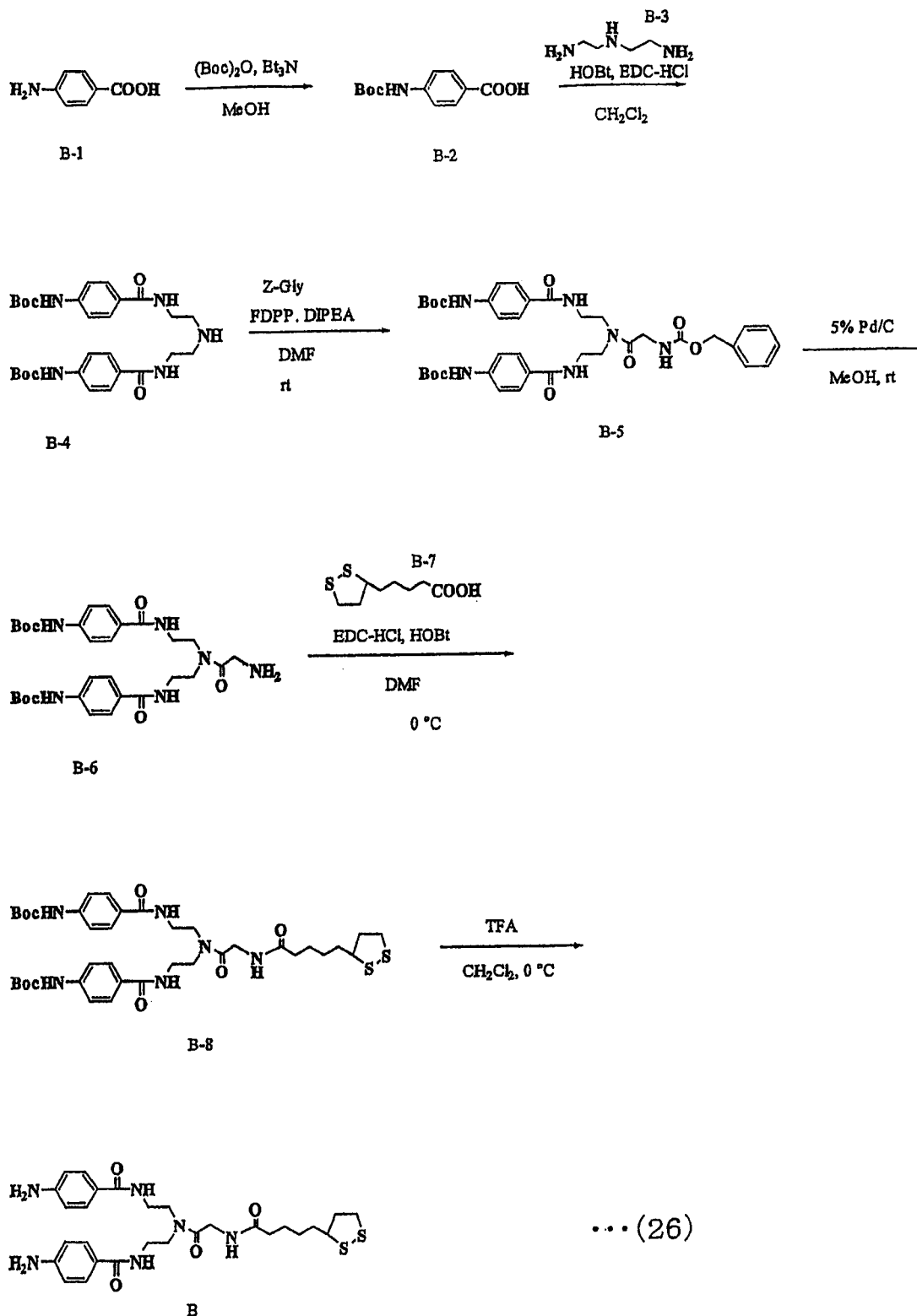
(3) 第 3 号配体络合物 (化合物 3) 的合成

按照以下步骤合成具有如下所述结构的配体络合物 (化合物 3): 作为上述第 3 号配体络合物之一的、在上述通式 (12) 表示的结构中, n^1 是 1, X 具备以通式 (3) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入以上式 (18) 表示的麦芽糖, m^4 , m^5 是 2。

作为上述配体络合物 (化合物 3) 的合成的前阶段, 首先, 合成芳香族氨基末端受保护基保护的具有 2 条支链的连接子化合物 B。

如下式 (26) 所示, 利用 HOBt 和 EDC-HCl, 缩合以 Boc 基保护氨基安息香酸 (B-1) 的氨基的氨基安息香酸衍生物 (B-2) 和二亚乙基三胺 (B-3), 以 79% 的收率制得二酰胺 (B-4)。在 DMF 中, 利用 FDPP 作为缩合剂, 使二

酰胺 (B-4) 与 Z 基保护氨基的甘氨酸 (Z-Gly) 反应, 以 75% 的收率制得 (B-5)。通过接触氢还原除去 Z 基, 形成 (B-6) 后, 与硫辛酸 (B-7) 缩合, 以 97% 的收率制得 (B-8)。最后通过 TFA 除去 Boc 基, 以 95% 的收率制得具有 2 个单元芳香族氨基的连接子化合物 B。



更具体地讲,对于上述化合物 B-2,使 4-氨基安息香酸(B-1)(2.00g, 14.6)溶解于 140mL 甲醇中,添加(Boc)₂O(6.7mL, 29.1mmol)和三乙胺(3.06mL, 21.9mmol),在室温下搅拌 16 小时。减压浓缩反应溶液,向残渣添加己烷和饱和碳酸氢钠水溶液(50mL),提取水层。向该水层添加 10%柠檬酸钠水溶液,使得 pH=4,析出白色固体。使所得固体溶解于乙酸乙酯,利用水进行洗涤后,进行减压浓缩。利用乙酸乙酯-己烷对残渣进行重解决,制得无色晶体化合物 B-2(3.25g, 收率 91.3%)。

进行所得上述化合物 B-2 的 ¹H-NMR (270MHz, CD₃OD) 测定,结果为:
δ 9.24 (1H, s, NH), 7.96 (2H, d, J = 8.9 Hz, aromatic),
7.55 (2H, d, J = 8.6 Hz, aromatic), 1.56 (9H, s, t-butyl)。

另外,进行上述化合物 B-2 的 ESI-MS (negative) 测定, m/z236.20 [(M-H)⁻]。通过这样能够证实化合物 B-2 的结构。另外,该化合物 B-2 的分子质量为 237.25。

接着,使上述化合物 B-2 (1.30g、5.46mmol)、HOBt (0.738g、5.46mmol) 和 EDC·HCl (1.05g, 5.46mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (30mL),在氩气气氛下,在 0°C 下搅拌 50 分钟。向该溶液添加二亚乙基三胺(B-3) (0.283mL, 2.60mmol),在遮光下,在室温下进行整夜搅拌,制得白色晶体。过滤该白色晶体,通过甲醇进行重结晶,制得白色晶体化合物 B-4 (1.23g, 收率: 87.4%)。

进行所得上述化合物 B-4 的 ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD) 测定,结果为:
δ 7.77-7.74 (4H, d, J = 8.67 Hz, aromatic), 7.50-7.48
(4H, d, J = 8.57 Hz, aromatic), 3.70-3.66 (4H, m, J
= 5.19 Hz, NCH₂CH₂NHCO), 3.34-3.28 (4H, m, J = 5.61 Hz, NCH₂CH₂NH
CO), 1.53 (18H, s, t-butyl)

另外,进行上述化合物 B-4 的 ESI-MS (positive) 测定, m/z542.64 [(M+H)⁺]。通过这样能够证实化合物 B-4 的结构。另外,该化合物 B-4 的分子质量为 541.60。

接着,将上述化合物 B-4 (1.03g, 1.85mmol)、Z-甘氨酸 (0.430g, 2.04mmol) 和 FDPP (1.07mg, 2.78mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (8mL) 后,添加二异丙基异胺 (0.36mL, 2.78mmol),在氩气气氛下,在室温下搅拌 20 小时。将减压

浓缩该反应溶液的残渣溶解于氯仿，依次利用 10%柠檬酸、饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机层后，利用无水硫酸钠进行干燥，过滤干燥剂，进行减压浓缩。利用硅胶色谱（50g，氯仿：丙酮=1：2）精制浓缩残渣，制得白色固体化合物 B-5（1.02g，收率：75.0%）。

进行所得上述化合物 B-5 的 $^1\text{H-NMR}$ （400MHz， CDCl_3 ）测定，结果为：
 δ 7.88（1H，bs， NHCOPh ），7.73-7.66（10H，m， NHCOPh ，aromatic），
7.56（1H，bs， NHCOPh ），7.38（4H，d， $J = 8.4$
Hz， 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， NCH_2
 CH_2NH ），1.50，1.49（36H，s，s，t-butyl）。

另外，进行上述化合物 B-5 的 ESI-MS(positive)测定，结果为： m/z 755.36[(M+Na) $^+$]。通过这样能够证实化合物 B-5 的结构。另外，该化合物 B-5 的分子质量是 732.32。

接着，将上述化合物 B-5（0.193g，0.264mmol）溶解于甲醇（3mL），添加 10%Pd/C(120mg)，在氢气气氛下，在室温下搅拌 3 小时后，过滤 Pd/C，进行减压浓缩，制得白色固体化合物 B-6（0.230g，收率：94.4%）。

进行所得上述化合物 B-6 的 $^1\text{H-NMR}$ （400MHz， d_6 -DMSO）测定，结果为：

δ 9.54（4H，d， $J = 9.5$ Hz， 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， C
 H_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）。

另外，进行上述化合物 B-6 的 ESI-MS(positive)测定，结果为： m/z 599.33[(M+H) $^+$]。通过这样能够证实化合物 B-6 的结构。另外，该化合物 B-6 的分子质量为 598.39。

接着, 将硫辛酸 (B-7) (41.0mg, 0.200mmol)、HOBt (35.0mg, 0.200mmol) 和 EDC·HCl (42.1g, 0.200mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (3mL), 在氮气气氛下, 进行遮光, 在 0°C 下搅拌 1.5 小时。接着, 将上述化合物 B-6 (0.1g, 0.167mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (2mL), 滴入上述二甲基甲酰胺溶液后, 在室温下搅拌 19 小时。向反应溶液添加氯仿, 提取有机层, 利用 10% 柠檬酸水溶液和饱和碳酸氢钠溶液洗涤该有机层, 利用无水硫酸钠进行干燥后, 过滤干燥剂, 进行减压浓缩。利用硅胶色谱 (50g, 氯仿: 甲醇=7: 1) 精制浓缩残渣, 制得白色固体化合物 B-8 (0.128g, 收率: 97.0%)。

进行所得上述化合物 B-8 的 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3), 结果是 δ 7.76-7.69 (11H, 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 (11H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, SSCHCH_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, $J = 6.9$ 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 (18 H, s, s, t-butyl), 1.35 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)。

另外, 进行上述化合物 B-8 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 809.33 [$(\text{M} + \text{Na})^+$]。通过这样能够证实化合物 B-8 的结构。另外, 该化合物 B-8 的分子质量为 787.30。

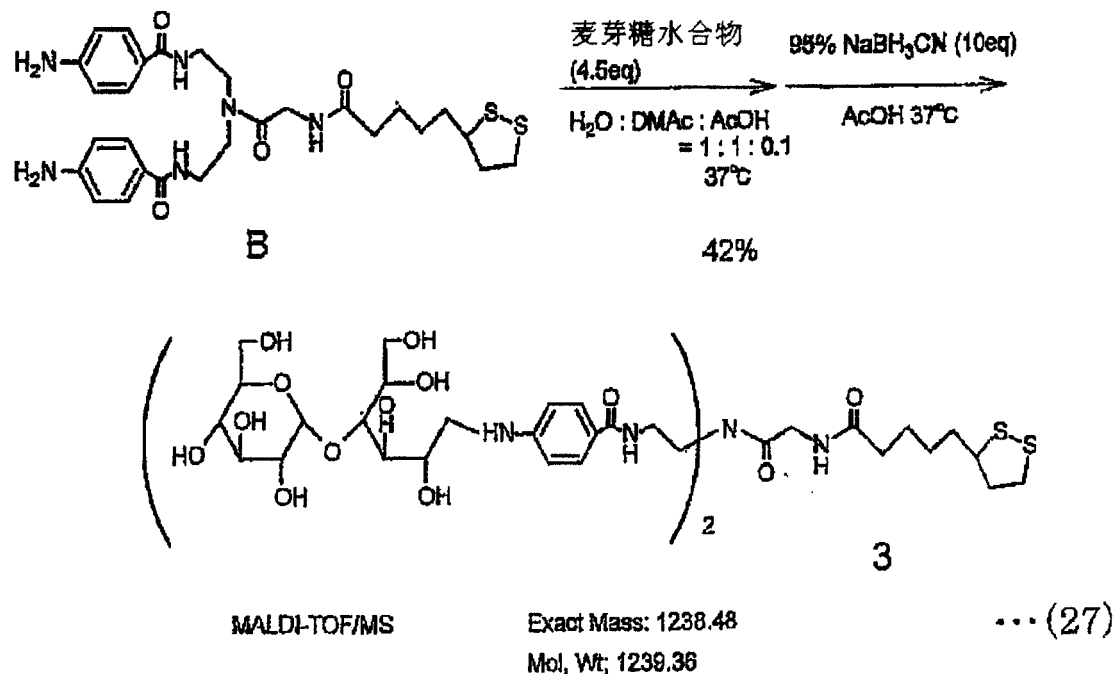
将上述化合物 B-8 (0.128g, 0.16mol) 溶解于二氯甲烷 (1mL), 添加 TFA (2mL), 在遮光下, 在 0°C 下搅拌 1.5 小时后, 进行减压浓缩, 将所得残渣溶解于甲醇, 通入 Dowex Marathon (OH^- form) 的柱, 进行中和, 进行减压浓缩, 制得黄色固体化合物 B (89.3mg, 收率: 95.2%)

进行所得上述化合物 B 的 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, d_6 -DMSO) 测定, 结果为:

δ 8.20, 8.07 (2H, m, NHCOPh), 7.83 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, Gly-NH), 6.51-6.48 (8H, m, aromatic), 5.57 (8H, d, $J = 14.3$ 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, $J = 7.1$ 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, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)。

另外, 进行上述化合物 B 的 ESI-MS (positive) 测定, m/z 587.24 [$(M+H)^+$]。通过这样能够证实化合物 B 的结构。另外, 该化合物 B 的分子质量为 586.24。

接着, 利用所得连接子化合物 B, 按照下式 (27) 的步骤合成具有如下所述结构的配体络合物 (化合物 3): 在上述通式 (12) 表示的结构中, n^1 是 1, X 具备以通式 (3) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入以上式 (18) 表示的麦芽糖, m^4 , m^5 是 2。



如式 (27) 所示, 在 H_2O /二甲基乙酰胺 (式中, DMAc)/乙酸 (AcOH) = 1/1/0.1 的混合溶剂中溶解上述方法得到的连接子化合物 B 和以上式 (18) 表示的作为

寡聚糖的市售麦芽糖水合物 (4.5 当量), 在 $\text{pH}4 \sim 4.5$, 37°C 下, 形成席夫碱之后, 向溶剂添加 AcOH , 添加 10 当量的 95% 的 NaBH_3CN , 在 $\text{pH}3 \sim 4.5$, 37°C 下, 进行还原氨基化反应。然后, 利用 Sephadex G-50 (Pharmacia Biosystem 公司制造), 通过凝胶过滤色谱精制所得化合物, 进一步进行除盐处理, 作为末端含 2 个单元的 α -吡喃葡萄糖而构成的配体络合物制得化合物 3。通过 MALDI-TOF/MS 和 NMR 鉴定上述化合物 3。

MALDI-TOF/MS 的结果是 $m/z1239.36[(M+H)^+]$ 。另外, 进行 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (600MHz, D_2O), 结果是

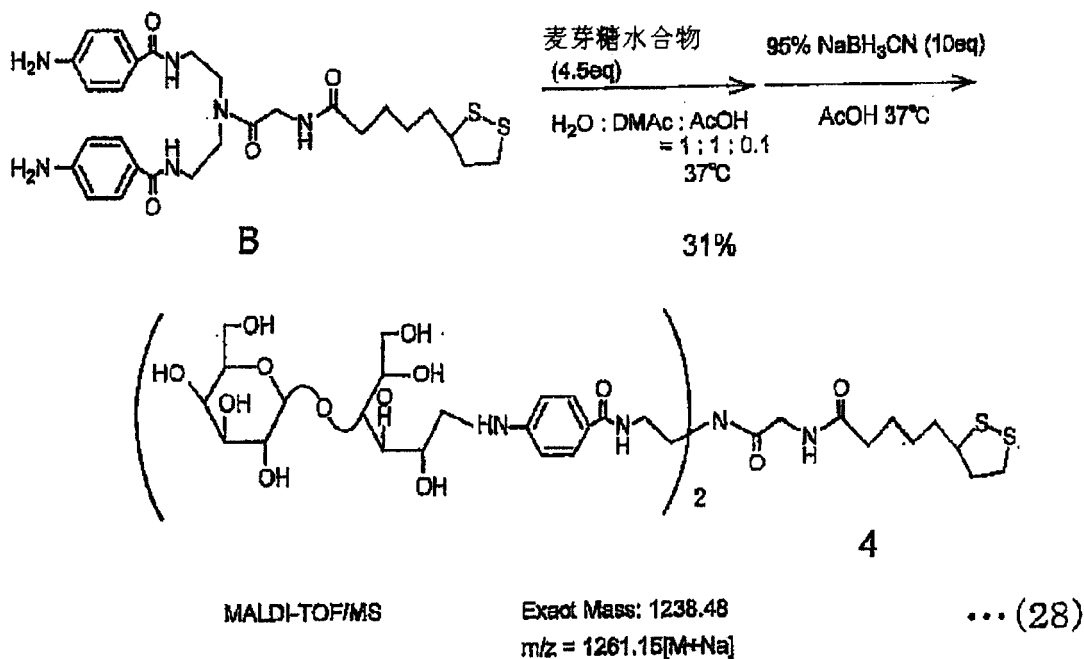
δ 7.39 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 7.38 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 6.56 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 6.55 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 4.91 (2H, d, $J = 3.4$ Hz, $\text{H-1}' \times 2$), 3.84 (2H, s, $-\text{NHCOCH}_2\text{NH}-$), 3.83-3.78 (2H, m, $\text{H-2} \times 2$), 3.75 (2H, dd, $J = 4.1, 6.9$ Hz, $\text{H-5} \times 2$), 3.72 (2H, dd, $J = 2.7, 4.8$ Hz, $\text{H-3} \times 2$), 3.69 (2H, dd, $J = 4.1, 4.8$ Hz, $\text{H-4} \times 2$), 3.69-3.66 (2H, m, $\text{H-5} \times 2$), 3.64 (2H, dd, $J = 2.1, 12.4$ Hz, $\text{H-6a}' \times 2$), 3.58 (2H, dd, $J = 4.8, 12.4$ Hz, $\text{H-6b}' \times 2$), 3.55-3.51 (2H, m, $\text{H-6a} \times 2$), 3.53 (2H, dd, $J = 8.9, 9.6$ Hz, $\text{H-3}' \times 2$), 3.47-3.40 (8H, m, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}- \times 2$), 3.44-3.41 (2H, m, $\text{H-6b} \times 2$), 3.37 (2H, dd, $J = 3.4, 9.6$ Hz, $\text{H-2}' \times 2$), 3.37-3.30 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2-)$ (S-)), 3.23 (2H, dd, $J = 8.9, 10.3$ Hz, $\text{H-4}' \times 2$), 3.20 (3H, dd, $J = 4.8, 13.7$ Hz, $\text{H-1a} \times 2$), 3.12 (2H, dd, $J = 8.2, 13.7$ Hz, $\text{H-1b} \times 2$), 3.00-2.89 (2H, m, $-\text{SCH}_2-$), 2.22-2.15 (1H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.98 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, $-\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$), 1.72-1.64 (1H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.45-1.37 (1H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.35-1.23 (3H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.09-1.02 (2H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{H}_2-$)。

通过这些结果能够证实化合物 3 的结构。另外, 该化合物 3 的分子质量是 1238.48。

(4) 第4号配体络合物(化合物4)的合成

按照以下步骤合成具有如下所述结构的配体络合物(化合物4): 作为上述第4号配体络合物之一的、在上述通式(12)表示的结构中, n^1 是1, X具备以通式(3)表示的结构, R'是氢(H), 向R导入以上式(19)表示的麦芽糖, m^4 , m^5 是2。

作为上述配体络合物(化合物4)的合成的前阶段, 首先, 按照上述步骤合成芳香族氨基末端受保护基保护的具有2条支链的连接子化合物B。接着, 利用所得连接子化合物B, 按照下式(28)的步骤合成具有如下所述结构的配体络合物(化合物4): 在上述通式(12)表示的结构中, n^1 是1, X具备以通式(3)表示的结构, R'是氢(H), 向R导入以上式(19)表示的麦芽糖, m^4 , m^5 是2。



如式(28)所示, 在 H_2O /二甲基乙酰胺(式中, DMAc)/乙酸(AcOH) = 1/1/0.1的混合溶剂中溶解上述方法得到的连接子化合物B和以上式(19)表示的作为寡聚糖的市售麦芽糖水合物(4.5当量), 在 $\text{pH}4 \sim 4.5$, 37°C 下, 形成席夫碱之后, 向溶剂添加AcOH, 添加10当量的95%的 NaBH_3CN , 在 $\text{pH}3 \sim 4.5$, 37°C 下, 进行还原氨基化反应。然后, 利用Sephadex G-50(Pharmacia Biosystem公司制造), 通过凝胶过滤色谱精制所得化合物, 进一步进行除盐处理, 作为末端含2个单元的 β -吡喃半乳糖而构成的配体络合物制得化合物4。通过MALDI-TOF/MS和

NMR 鉴定上述化合物 4。

MALDI-TOF/MS 的结果是 m/z 1261.15 [(M+Na)⁺]。另外, 进行 ¹H-NMR 图谱 (600MHz, D₂O), 结果是

δ 7.40 (2H, d, J = 8.9 Hz, aromatic), 7.39 (2H, d, J = 8.9 Hz, aromatic), 6.59 (2H, d, J = 8.9 Hz, aromatic), 6.58 (2H, d, J = 8.9 Hz, aromatic), 4.30 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-1'), 4.29 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1'), 3.93-3.89 (2H, m, H-2 \times 2), 3.84 (2H, s, -CONHCH₂NH-), 3.74-3.71 (2H, m, H-5' \times 2), 3.71-3.69 (4H, m, H-4 \times 2, H-4' \times 2), 3.69-3.66 (2H, m, H-3 \times 2), 3.65 (2H, dd, J = 3.0, 11.7 Hz, H-6a' \times 2), 3.53 (2H, dd, J = 5.5, 11.7 Hz, H-6b' \times 2), 3.48-3.42 (12H, m, H-5 \times 2, H-3' \times 2, -CONHCH₂CH₂N- \times 2), 3.41-3.39 (4H, m, H-6 \times 2), 3.37-3.32 (1H, m, CH₂CH(CH₂-)(S-)), 3.35 (2H, dd, J = 7.6, 8.9 Hz, H-2' \times 2), 3.23 (2H, dd, J = 4.1, 13.7 Hz, H-1a \times 2), 3.04 (2H, dd, J = 7.6, 13.7 Hz, H-1b \times 2), 3.01-2.90 (2H, m, -SCH₂-), 2.23-2.16 (1H, m, -SCH₂CH₂(1H)-), 1.99 (2H, t, J = 6.9 Hz, -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, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-), 1.11-1.04 (2H, m, -COCH₂CH₂CH₂CH₂-)。

通过这些结果能够证实化合物 4 的结构。另外, 该化合物 4 的分子质量是 1238.48。

[实施例 2: 利用 SPR 测定和质量分析的蛋白质分析]

实施例 2 利用实施例 1 制造的各种配体络合物 (化合物 1~4), 通过 SPR 测定和质量分析与蛋白质的糖链的结合特性。下面描述其步骤。

图 1 按照工序 1~工序 12 表示本实施例的蛋白质的分析步骤。在图 1 中, 工序 1~工序 7 是使各配体络合物 (化合物 1~4) 固定在用金 (Au) 包覆的支撑

体表面，制造配体载体（传感芯片）的工序。而且，在使上述配体载体与含作为分析对象的蛋白质的溶液接触的工序8之后实施的工序是进行SRP测定的工序。此外，在利用水洗涤支撑体表面的工序10之后实施的工序是通过质量分析（MS）鉴定蛋白质的工序。

在本实施例中，SPR测定是利用日本激光电子公司制造的SPR-8B进行的。另外，质量分析是利用作为アプライドバイオ公司制造的母体支持型激光脱离/飞行时间型质量分析仪（MALDI-TOF/MS）的Voyager RP-DE进行的。

对于用于分析的蛋白质，作为吡喃葡萄糖结合性的乳糖蛋白质是ConcanavalinA（简称ConA）、PSA、LCA，以及作为吡喃半乳糖结合性的乳糖蛋白质是RCA、PNA5种。而且，利用牛血清白蛋白（BSA）作为负对照组。

首先，基于图1所示的工序1~工序7，制造分别固定上述化合物1~4的4种配体载体。接着，分别将上述5种乳糖蛋白质和BSA溶解于PBS缓冲液中，制造蛋白质溶液。然后，进行图1所示的工序8，分别使各配体络合物与各蛋白质溶液接触，使它们进行相互作用。接着，进行SPR测定，进行配体载体与蛋白质的结合测定。

利用固定 α -吡喃葡萄糖的配体载体（传感芯片）的乳糖蛋白质的结合行为的结果示于图2、图3以及表1。图2表示固定化合物（双键型）的配体络合物的传感芯片的结果，图3表示固定化合物1（三键型）的配体络合物的传感芯片的结果。在图2和图3中，(a)表示ConA的结合行为结果，(b)表示PSA的结合行为结果，(c)表示LCA的结合行为结果。

	双键型			三键型		
	K_D	K_a	K_d	K_D	K_a	K_d
ConA	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	未结合			6.04	2.40	1.45
RCA	未结合			未结合		
PNA	未结合			未结合		

K_D : 解离常数 (μM)

K_a : 结合速度常数 ($M^{-1}s^{-1} \times 10^4$)

K_d : 解离速度常数 ($s^{-1} \times 10^1$)

由图 2 和图 3 可知：对于 ConA 和 PSA，表现出不随配体络合物的连接部分的结构不同而变化的同样的结合行为。但是，对于 LCA，表现出与作为具有 3 个单元的糖分子的配体络合物的化合物 1 结合，但是表现出没有与具有 2 个单元的糖分子的配体络合化合物 3 结合。虽然图中未示出，但表明作为负面控制的 BSA 没有与固定化合物 1 或 3 的芯片结合。

另外，表 1 汇集了各种蛋白质的结合行为。对于 α 葡萄糖结合性的乳糖蛋白质，观测到特异的结合，耦合常数也可以计算。可知：利用三键配体络合物的情况计算得到的理解常数 (K_p) 与使用双键配体络合物的情况相等或更小，通过增加每个配体络合物的糖链数，能够提高结合活性。

利用固定 β -吡喃半乳糖的配体络合物（传感芯片）的乳糖蛋白质的结合行为的结果示于图 4、图 5 和表 2。图 4 表示固定化合物 4（双键型）的配体络合物的传感芯片的结果，图 5 表示固定化合物 2（三键型）的配体络合物的传感芯片的结果。在图 4 和图 5 中，(a) 表示 RCA 的结合行为结果，(b) 表示 PNA 的结合行为结果。

	双键型			三键型		
	K_D	K_a	K_d	K_D	K_a	K_d
ConA	未结合			*1		
PSA	未结合			未结合		
LCA	未结合			未结合		
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 : 解离常数 (μM)

K_a : 结合速度常数 ($M^{-1}s^{-1} \times 10^4$)

K_d : 解离速度常数 ($s^{-1} \times 10^1$)

*1: 不取决于蛋白质浓度，观测到非特异性

如图 4 和图 5 可知：RCA 和 PNA 表现出不随配体络合物的连接部分的结构不同而变化的同样的结合行为。虽然图中未示出，但表明作为负面控制的 BSA 没有与固定化合物 2 或 4 的芯片结合。

另外，表 2 汇总了各种蛋白质的结合行为。对于 β 半乳糖结合性的乳糖蛋白质，观测到特异的结合，还可以计算耦合常数。另外，对于 ConA，在利用化合物 2 制造的芯片中，观测到不依赖于蛋白质浓度的非特异的结合行为。可知：利用三键配体络合物的情况计算得到的理解常数 (K_p) 与使用双键配体络合物的情况相等或更小，通过增加每个配体络合物的糖链数，能够提高结合活性。

以上结果表明：随着糖链的聚集度不同，对于蛋白质的糖链的结合活性也不同，乳糖蛋白质的糖链结合特性也嫩构通过该体系进行测定。

此外，在进行工序 9 和工序 10 之后，将供该 SPR 测定的配体载体中的已经证实与蛋白质结合的物质提供至质量分析仪，鉴定与配体载体结合的蛋白质。另外，在进行质量分析时，在进行结合测定的部分放置母液（饱和 α CHCA 或芥子酸），干燥之后提供至质量分析仪，进行分子质量的测定。

在上述一系列的工序中，在证实配体载体和蛋白质的结合行为之后，在工序 11 中分离配体载体与蛋白质的结合，然后，在工序 12 中利用 PBS 缓冲液进行洗涤。然后，利用其他蛋白质溶液，再次反复进行工序 8~工序 10，进行 SPR 测定和质量分析。针对各种配体载体和各种蛋白质，重复进行该操作。

质量分析的结果示于图 6 和表 3。图 6 (a) 表示 ConA 的分析结果，图 6 (b) 表示 PNA 的分析结果。

外源凝集素吸附蛋白质	分子量	观测值 (m/z)
ConA	104000 ($\alpha 4$) 25572 (α)	25523 (α 链)
PSA	50000 ($\alpha 2 \beta 2$) 6000 (α) 18000 (β)	5801 (α 链) 19210 (β 链)
LCA	46000 ($\alpha 2 \beta 2$) 5710 (α) 17572 (β)	5472 (α 链) 8594 (β 链, 2+)
PNA	98000 ($\alpha 4$) 24500 (α)	24736 (α 链)
RCA	12000 ($\alpha 2 \beta 2$) 31000 (α)	未检出

	32000 (β)	
--	-------------------	--

根据图 6 (a) 和图 6 (b), 可以明显观测到相当于构成每个蛋白质的子单元的分子质量的 1 价和 2 价的离子峰。

另外, 在表 3 中还汇总了其他乳糖蛋白质的结果。与各种乳糖蛋白质的子单元的 1 价或 2 价的分子质量接近的离子峰。但是, 对于 RCA, 由于子单元的分子质量为 3 万道尔顿以上, 因此不能利用所用的质量分析仪检测其离子峰。如果利用性能更高的 MALDI-TOF/MS 仪器, 就可以检测。

根据该质量分析的结果, 除了 RCA 以外, 观测到相当于结合的各种乳糖蛋白质的分子量, 能够鉴定乳糖蛋白质。

如上所述, 本实施例的结果证实: 如果利用本发明涉及的配体络合物进行 SPR 测定和质量分析, 从而进行蛋白质的分析, 能够精确地鉴定蛋白质。另外, 本实施例的结果证实: 即使是末端具有相同糖链的配体载体, 随着糖链的聚集度的差异, 与蛋白质的结合活性也不同。即, 可以认为本发明的蛋白质的分析方法还能够应用于分析糖链的聚集度和蛋白质的结合活性之间的关系。对于这种糖链的聚集度于蛋白质的结合活性之间的关系的分析来说, 现有的方法是不能进行判断的, 因此可以认为进一步提高了本发明的实用性。

[实施例 3: 配体络合物 (化合物 21、22) 的合成]

在本实施例中, 合成分为实施方式描述的第 5 号和第 6 号配体络合物的配体络合物。即, 按照以下步骤合成具有如下所述结构的配体络合物 (化合物 21): 作为上述第 5 个配体络合物的、在上述通式 (13) 表示的结构中, n^2 是 4, X 具备以通式 (4) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入麦芽糖; 以及具有如下所述结构的配体络合物 (化合物 22): 作为上述第 6 个配体络合物的、在上述通式 (14) 表示的结构中, n^2 是 4, X 具备以通式 (4) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入麦芽糖。

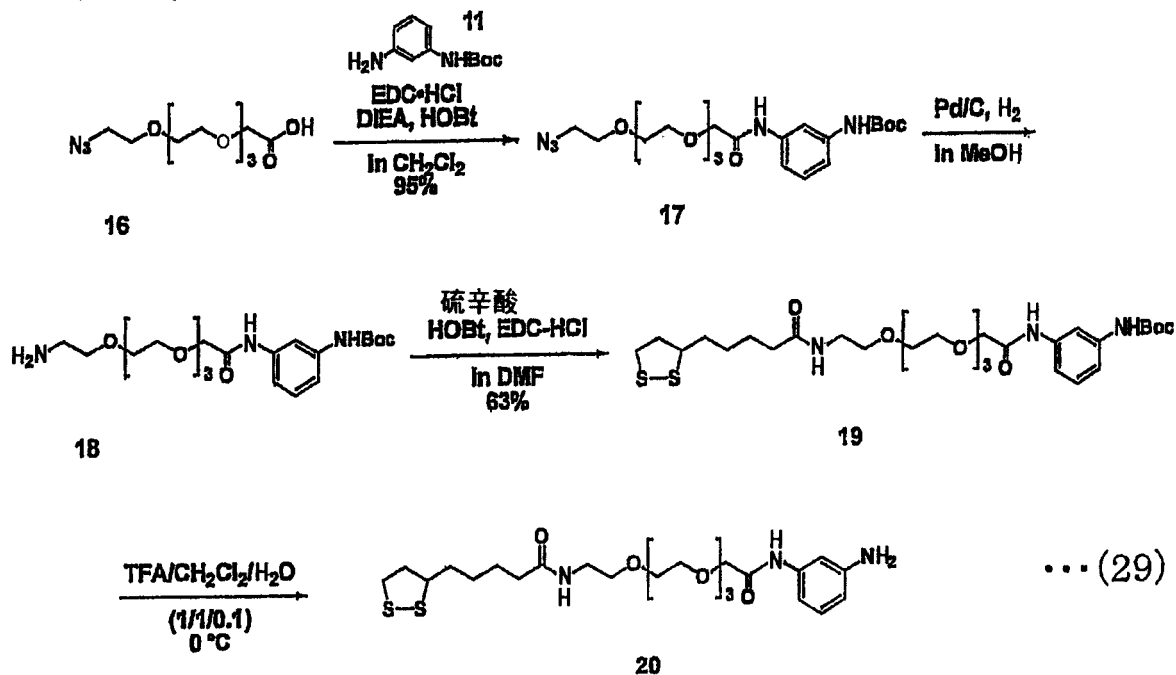
[测定方法、试剂等]

对于 $^1\text{H-NMR}$ 图谱的测定, 利用 JEOL-Delta600 分光计。对于化学位移, 在 CDCl_3 的情况下, 以四甲基硅烷 (0.00ppm) 为标准物质, 利用 δ 值进行表示。在 D_2O 的情况下, 以 DHO (4.65ppm) 为标准物质, 以 δ 值进行表示。质量分

析利用 PerSeptive Biosystem Mariner™ Biospectrometry Workstation 进行测定。硅胶色谱法利用 Silicagel 60 (Merck, 0.040—0.063mm) 进行测定。薄层色谱法利用 Precoated Silicagel 60 F254 (Merck, 0.5mm)。所有试剂、脱水试剂都购买关东化学株式会社生产的试剂而使用。

(1) 化合物 16 的合成

下面描述式 (29)。



首先, 按照以下步骤合成式 (29) 的化合物 16

将双[2-(2-羟基乙氧基)乙基]醚 (14.57ml, 80mmol) 和 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (252ml, 2mmol) 溶解于 50ml 无水二氯甲烷, 在 0°C 下滴加重氮乙酸乙酯 (1.8ml, 17.35mmol) 后, 在室温下搅拌 70 分钟。向反应溶液添加 20ml 饱和氯化铵水溶液, 利用二氯甲烷进行提取, 利用无水硫酸镁进行干燥。过滤干燥剂, 进行减压浓缩, 利用色谱 (600g, 己烷: 乙酸乙酯=1: 3) 精制浓缩残渣, 制得无色液体乙基化物 (2.26g, 产率: 47%)。

将上述乙基化物 (2.15g, 7.66mmol) 和 DMAP (41.7mg, 337mmol) 溶解于 8ml 无水吡啶。在 0°C 下, 向该溶液滴入对甲苯磺酸氯 (1.75g, 9.19mmol) 溶解于 8ml 无水二氯甲烷制得的溶液, 在室温下搅拌 3 小时。在反应溶液添加二氯甲烷和冰水, 利用二氯甲烷进行提取。分别利用饱和碳酸氢钠水溶液、水、饱和食盐水洗涤有机层 1 次, 利用无水硫酸镁进行干燥。过滤干燥剂, 进行减压浓缩, 利用色谱 (100g, 氯仿: 丙酮=4: 1) 精制浓缩残渣, 制得

黄色液体甲苯磺酰化合物 (2.59g, 产率: 78%)。

将上述甲苯磺酰化合物 (1.01g, 2.31mmol) 和叠氮化钠 (1.53g, 2.31mmol) 溶解于 50ml 无水二甲基甲酰胺, 进行遮光, 在 120°C 下, 在氮气气氛下, 搅拌 10 小时。利用氯仿提取反应溶液, 分别利用水、饱和食盐水洗涤有机层 1 次, 利用无水硫酸镁进行干燥。过滤干燥剂, 进行减压浓缩, 利用色谱法 (10g, 氯仿: 丙酮=2: 1) 精制浓缩残渣, 制得黄色液体叠氮化合物 (638mg, 产率: 90%)。

将 24ml 甲醇溶于上述叠氮化合物 (614mg, 2.01mmol), 在遮光下, 添加 1N NaOH 4.3ml 后, 在室温下搅拌 21 小时。对反应溶液进行减压浓缩, 向浓缩残渣添加氯仿后, 添加 1N HCl, 直到 pH=2, 利用氯仿进行提取。利用饱和食盐水洗涤有机层 1 次, 利用无水硫酸镁进行干燥。过滤除去干燥剂, 进行减压浓缩, 制得无色液体化合物 (549mg, 收率: 90%)。

针对该化合物 16 进行 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 测定, 结果为:

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)。

另外, 进行上述化合物 6 的 ESI-MS (negative) 测定, 结果为: m/z 328.14 [$(\text{M} + \text{Na})^+$]。通过这些能够证实化合物 6 的结构。另外, 该化合物 16 的分子质量是 277.13。

(2) 化合物 17 的合成

将化合物 16 (228mg, 0.823mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (4ml), 在室温下, 在 0°C 下依次添加 HOBt (135mg, 0.987mmol)、EDC \cdot HCl (192mg, 0.987mmol)、化合物 11 (205mg, 0.987mmol), 在遮光下搅拌 20 小时。对该反应溶液进行减压浓缩, 利用氯仿提取浓缩残渣, 分别利用 10% 柠檬酸、饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机层 1 次, 利用无水硫酸镁作为干燥剂进行干燥后, 过滤除去干燥剂, 进行减压浓缩。利用硅胶色谱 (80g, 氯仿: 甲醇=10: 1) 精制通过减压浓缩得到的浓缩残渣, 制得黄色油状物质化合物 17 (367mg, 收率: 95%)。进行该化合物 17 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 490.24 [$(\text{M} + \text{Na})^+$]。通过这样能够证实化合物 3 的结构。另外, 该化合物 17 的分子质量是 467.24。

(3) 化合物 18 的合成

将化合物 17 (29mg, 0.062mmol) 溶解于甲醇 (3ml), 添加 10% Pd/C (5.0mg), 在氢气气氛下, 在室温下搅拌 9 小时。过滤上述 Pd/C, 减压浓缩滤液。利用硅胶色谱 (1.5g, 氯仿: 甲醇=7: 1) 精制所得浓缩残渣, 制得黄色油状物质化合物 18 (22mg, 收率: 82%)。进行该化合物 18 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 442.27 [$(\text{M} + \text{H})^+$]。通过这些能够证实化合物 18 的结构。另外, 该化合物 18 的分子质量是 $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$: 441.25。

(4) 化合物 19 的合成。

将硫辛酸 (12.6mg, 0.061mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (2ml), 在氩气氛下, 依次添加 HOBt (8.3mg, 0.061mmol)、EDC·HCl (11.8mg, 0.061mmol), 在遮光下, 返回至室温下, 搅拌 2 小时。将化合物 18 (22.4mg, 0.051mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (2ml), 在室温下, 在遮光下搅拌 1 天。向反应液添加甲苯, 进行浓缩, 依次利用 10% 柠檬酸、饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机层, 利用无水硫酸镁进行干燥后, 过滤除去干燥剂, 进行减压浓缩。利用硅胶柱色谱 (3g, 氯仿: 甲醇=10: 1) 精制所得的浓缩残渣, 制得黄色油状物的化合物 19。产量是 27mg (84%)。进行该化合物 19 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 652.28 [$(M+Na)^+$]。通过这样能够证实化合物 19 的结构。另外, 该化合物 19 的分子质量是 629.28。

(5) 化合物 20 的合成。

将化合物 19 (31mg, 0.050mmol) 溶解于二氯甲烷 (2ml), 在 0°C 下添加 TFA (147 μ l), 在相同温度下搅拌 3 小时。浓缩反应溶液后, 利用甲苯进行共沸。将所得的浓缩残渣溶解于二氯甲烷, 添加三乙胺水溶液, 使水相的 pH 为 8 之后, 利用无水硫酸镁干燥有机相后, 过滤除去干燥剂, 进行减压浓缩。利用硅胶柱色谱 (10mg, 氯仿: 甲醇=5: 1) 精制所得的浓缩残渣, 制得黄色油状物化合物 20。产量是 26.1mg (59%)。针对该化合物 20 进行 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (600MHz, CDCl_3) 测定, 结果为:

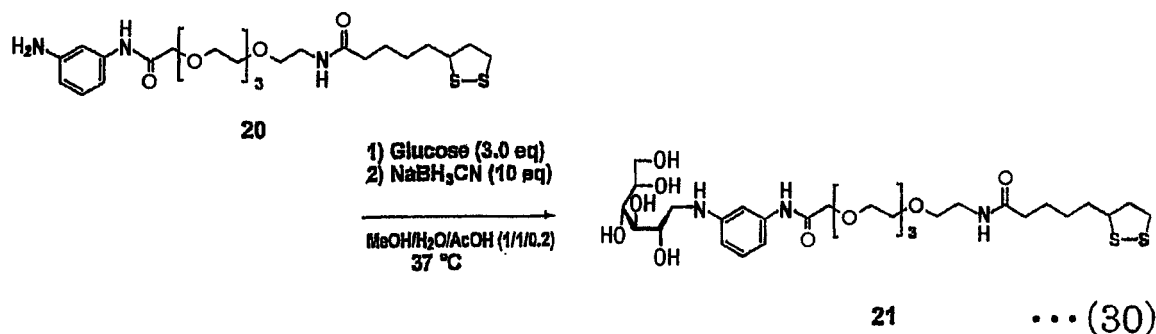
δ 7.17 (s, 1H, aromatic), 7.1 (dd, 1H, $J = 8.6, 8.3$ Hz aromatic), 6.91 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz aromatic) 6.45 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz aromatic) 4.1 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CONH}-$), 3.78-3.49 (m, 15H, ethylene glycol chain, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2-)(\text{S}-)$), 3.41 (q, 2H, $J = 5.5$ Hz, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.16 (m, 1H, $-\text{SCH}_2(1\text{H})-$), 3.08 (m, 1H, $-\text{SCH}_2(1\text{H})-$), 2.46-2.44 (m, 1H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 2.13-2.10 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $-\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$), 1.92-1.88 (m, 1H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.43-1.40 (m 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.26-1.24 (m, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)。

另外, 进行化合物 20 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 552.31 [$(M+Na)^+$]。根据以上结构能够证实化合物 20 的结构。另外, 该化合物 20 的分

子质量为 529.23。

(6) 配体络合物 (化合物 21) 的合成

下面描述式 (30)。



将化合物 20 (15.5mg, 29.3 μ mol) 和葡萄糖 (5.8mg, 32.2 μ mol) 溶解于 DMAc/水 (1: 1, 1ml), 添加乙酸 (200 μ l), 在 37°C 下放置 2 天。向反应液添加氰氢化硼钠 (5.5mg, 87.9 μ mol), 在 37°C 下进一步放置 6 天。浓缩反应液。通过 ODS 柱色谱 (Chromatorex ODS, 30g, 甲醇/水=50/50) 精制所得残渣。制得白色固体化合物 21。产量是 4.54mg (22%)。

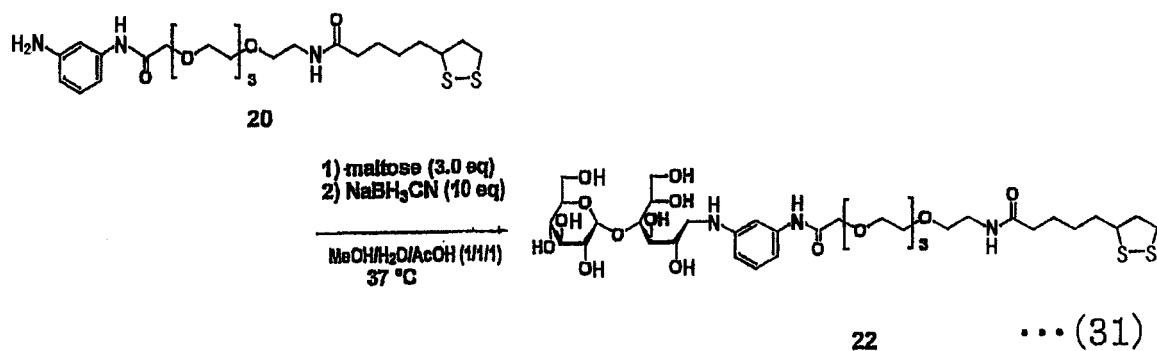
针对该化合物 21 进行 ¹H-NMR 图谱 (600MHz, D₂O) 测定, 结果为:

δ 7.17 (s, 1H, aromatic), 7.1 (dd, 1H, J = 8.6, 8.3 Hz aromatic); 6.91 (d, 1H, J = 8.2 Hz aromatic) 6.45 (d, 1H, J = 8.2 Hz 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, -COCH₂CH₂CH₂-)。

进行 MALDI-TOF-MS 测定, 结果是 m/z694.66 [(M+H)⁺]。通过这些能够证实化合物 21 的结构。另外, 该化合物 21 的分子质量是 693.30。

(7) 配体络合物 (化合物 22) 的合成

下面描述式 (31)



将化合物 20 (9.0mg, 17 μmol) 和麦芽糖 (5.8mg, 17.0 μmol) 溶解于甲醇/水 (1: 1, 1ml), 添加乙酸 (50 μl), 在 37 $^\circ\text{C}$ 下放置 24 小时。向反应液添加乙酸 (450 μl) 和氰氢化硼钠 (3.2mg, 51 μmol), 在 37 $^\circ\text{C}$ 下进一步放置 120 小时。浓缩反应液。通过 ODS 柱色谱 (Chromatorex ODS, 30g, 甲醇/水=50/50) 精制所得残渣。制得白色固体化合物 22。产量是 2.36mg (16%)。

针对该化合物 22 进行 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (600MHz, D_2O) 测定, 结果为:

δ 7.07-7.04 (t, 1H, $J = 8.2$, Hz, aromatic), 6.76 (s, 1H, aromatic), 6.63 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, aromatic), 6.48 (dd, 1H, $J = 2.1, 6.2$ Hz, aromatic), 4.91 (d, 1H, $J = 4.1$ Hz, H-1), 4.1 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CONH}-$), 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, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2-)$ (S-)), 3.18-3.11 (m, 3H, H1' b, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.07-2.93 (m, 3H, H1' a, $-\text{SCH}_2$), 2.29-2.20 (m, 1H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 2.05-1.96 (t, 2H, $J = 7.6, 6.9$ Hz, $-\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$), 1.76-1.69 (m, 1H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2(1\text{H})-$), 1.52-1.31 (m 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.18-1.10 (m, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)

进行 MALDI-TOF-MS 测定, 结果是 $m/z 878.39 [(M+Na)^+]$ 。通过这些能够证实化合物 22 的结构。另外, 该化合物 22 的分子质量是 855.35。

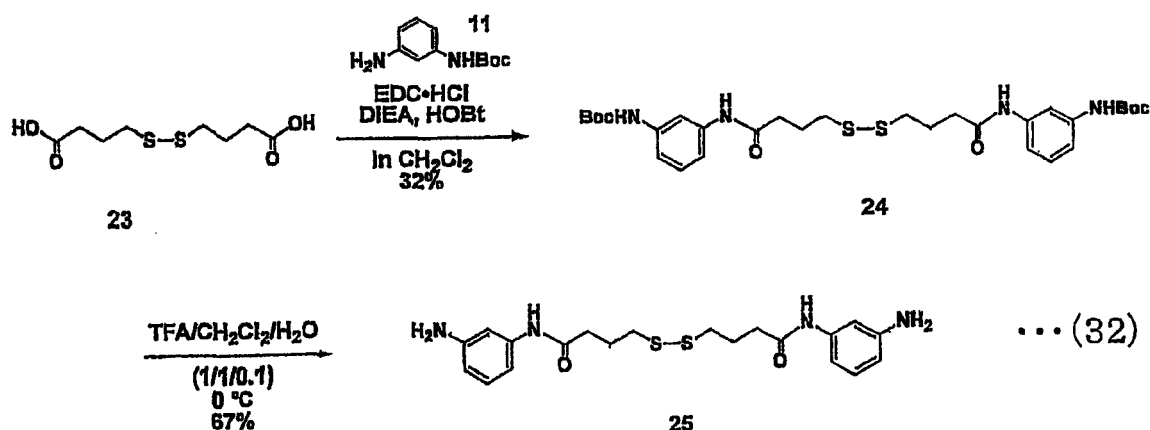
[实施例 4: 配体络合物 (化合物 26、27) 的合成]

在本实施例中, 合成分为实施方式描述的第 7 号和第 8 号配体络合物的配体络合物。即, 按照以下步骤合成作为上述第 7 个配体络合物的作为上述第 5 个配体络合物的具有如下所述结构的配体络合物 (化合物 26): 在上述通式 (14) 表示的结构中, n^1 是 3, 上述 X 具备以通式 (4) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入葡萄糖; 以及作为上述第 8 个配体络合物的具有如下所述结构的配体络合物 (化合物 27): 在上述通式 (14) 表示的结构中, n^1 是 3, 上述 X 具备以通式 (4) 表示的结构, R' 是氢 (H), 向 R 导入麦芽糖。

另外, 测定方法、试剂等与上述实施例 3 记载的内容相同。

(1) 化合物 24 的合成

下面描述式 (32)。



将 γ -巯基丁酸二聚体 (化合物 23) (344mg, 1.44mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (25ml), 在室温下, 在氩气气氛下, 在 0°C 下, 依次添加 HOBT (359mg, 2.64mmol)、EDC·HCl (508mg, 2.64mmol)、N-Boc-3-氨基苯胺 (化合物 11) (502mg, 2.4mmol), 在遮光下, 搅拌 17 小时。减压浓缩该反应溶液, 利用氯仿提取所得的浓缩残渣, 分别利用 10% 柠檬酸、饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机层 1 次, 使用无水硫酸镁作为干燥剂进行干燥后, 过滤除去干燥剂, 进行减压蒸馏。利用硅胶色谱 (50g, 甲苯: 乙酸乙酯=5: 1) 精制通过减压浓缩得到的浓缩残渣, 制得黄色油状物的化合物 27 (220mg, 产率: 30%)。进行该化合物 24 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 641.25 [(M+Na)⁺]。通过这些能够证实化合物 24 的结构。另外, 该化合物 24 的分子质量是 618.25。

(2) 化合物 25 的合成

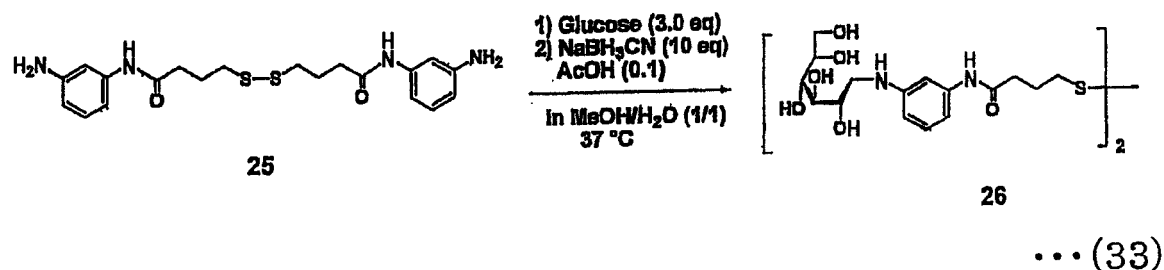
将化合物 24 (103mg, 11.67mmol) 溶解于二氯甲烷 (2ml), 在 0°C 下添加 TFA (247 μl), 在相同温度下搅拌 1 小时。浓缩反应溶液后, 利用甲苯进行共沸。将所得浓缩残渣溶解于乙酸乙酯, 添加三乙胺水溶液, 使水相的 pH 为 8 之后, 利用无水硫酸镁干燥有机相后, 过滤除去干燥剂, 进行减压浓缩。利用硅胶柱色谱 (5mg, 氯仿: 甲醇=5: 1) 精制所得的浓缩残渣, 制得黄色油状物化合物 25。产量是 46.8mg (67%)。针对该化合物 25 进行 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (600MHz, CDCl_3) 测定, 结果为:

δ 6.93-6.89 (m, 2H, aromatic), 6.71-6.68 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aromatic), 6.37-6.35 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aromatic), 2.66 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$), 2.36 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2-S), 1.98-1.94 (m, 2H, $J = 6.6$ Hz, 14.4 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)。

另外, 进行化合物 25 的 ESI-MS (positive) 测定, 结果为: m/z 419.06 [(M+H)⁺]。根据以上结构能够证实化合物 25 的结构。另外, 该化合物 25 的分子质量为 418.15。

(3) 配体络合物 (化合物 26) 的合成

下面描述式 (33)



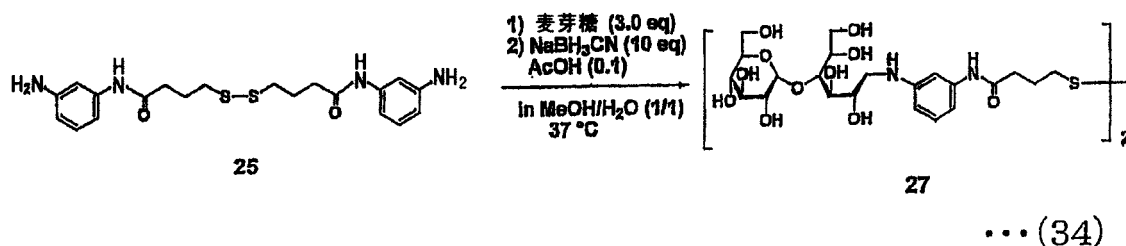
将化合物 25 (5.04mg, 12 μmol) 和葡萄糖 (4.79mg, 26.0 μmol) 溶解于甲醇/水 (1: 1, 1ml), 添加乙酸 (50 μl), 在 37°C 下放置 4 小时。向反应液添加乙酸 (950 μl)、甲醇/水 (1: 1, 1ml) 和氰氢化硼钠 (5.14mg, 72 μmol), 在 37°C 下进一步放置 72 小时。浓缩反应液。通过利用 LLH-20 的柱色谱 (50g, 甲醇/水=50/50) 精制所得残渣。制得白色固体化合物 26。产量是 2.58mg (29%)。

针对该化合物 26 进行 ¹H-NMR 图谱 (600MHz, D₂O) 测定, 结果为: δ 6.94 (t, 1H, J = 7.8 Hz, aromatic), 6.66 (s, 1H, aromatic), 6.55 (d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic), 6.37 (d, 1H, J = 9.6 Hz, aromatic), 3.714-3.707 (m, 1H, J = 4.2 Hz), 3.58-3.51 (m, 3H), 3.44-3.37 (m, 2H,), 3.10-3.07 (m, 2H, J = 8.4 Hz, 13.8 Hz), 2.56-2.50 (m, 2H, O=C-CH₂), 2.24 (t, 2H, J = 3.6 Hz, CH₂-S), 1.83-1.81 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)。

进行 MALDI-TOF-MS 测定, 结果是 m/z 747.21 [(M+H)⁺]。通过这些能够证实化合物 26 的结构。另外, 该化合物 26 的分子质量是 746.29。

(4) 配体络合物 (化合物 27) 的合成

下面详细描述式 (34)。



将化合物 25 (5.1mg, 12 μ mol) 和麦芽糖 (9.2mg, 26.0 μ mol) 溶解于甲醇/水 (1: 1, 1ml), 添加乙酸 (50 μ l), 在 37°C 下放置 4 小时。向反应液添加乙酸 (950 μ l)、甲醇/水 (1: 1, 1ml) 和氰氢化硼钠 (5.22mg, 72 μ mol), 在 37°C 下进一步放置 120 小时。浓缩反应液。通过利用 LLH=20 的柱色谱 (50g, 甲醇/水=50/50) 精制所得残渣。制得白色固体化合物 27。产量是 2.74mg (21%)。

针对该化合物 27 进行 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (600MHz, D_2O) 测定, 结果为:

δ 7.04 (t, 1H, $J = 4.2$ Hz, aromatic), 6.77 (s, 1H, aromatic), 6.64 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, aromatic), 6.54 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aromatic), 4.93 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 3.82-3.78 (m, 2H), 3.75-3.70 (m, 3H), 3.63-3.56 (m, 3H), 3.48 (dd, 1H, $J = 6.6$ Hz, 11.4 Hz), 3.41-3.39 (m, 1H) 3.27 (t, 1H, $J = 9.0$ Hz), 3.18 (s, 3H), 3.08-3.06 (m, 1H), 2.65 (t, 2H, 4.8 Hz, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$), 2.34 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2-S), 1.91 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)

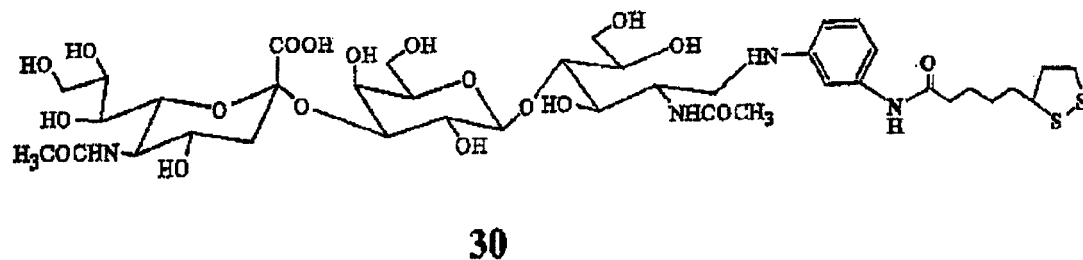
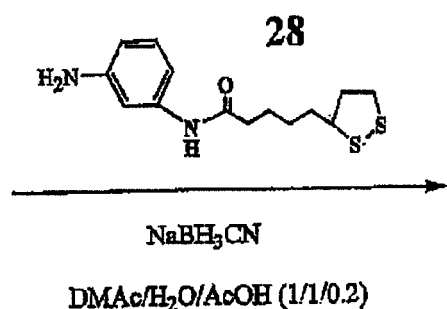
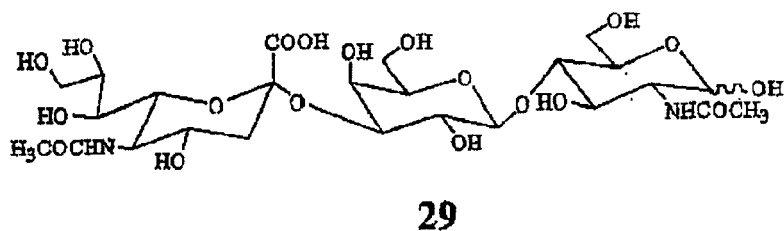
进行 MALDI-TOF-MS 测定, 结果是 m/z 1093.27 [$(\text{M}+\text{Na})^+$]。通过这些能够证实化合物 27 的结构。另外, 该化合物 22 的分子质量是 1070.39。

[实施例 5]

合成在上述以通式 (19) 表示的结构中, n^1 和 q 是 0, 导入以上述组 (20) 表示的糖链的配体络合物。另外, 测定方法、试剂等与上述实施例 4 相同。

(1) 配体络合物 (化合物 30) 的合成

按照式 (35) 描述配体络合物 (化合物 30) 的合成步骤。



... (35)

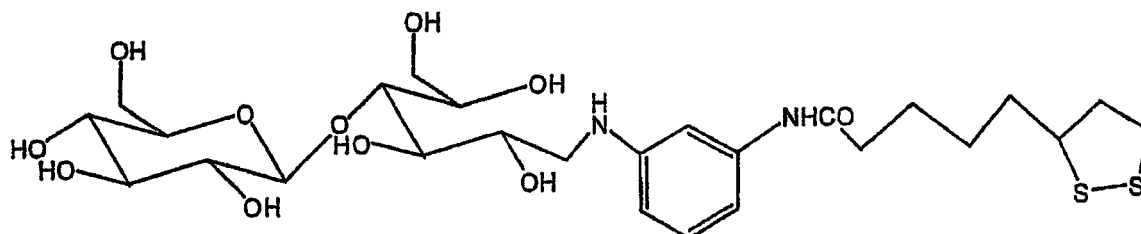
将化合物 28 (2.47mg, 8.24 μmol) 和含氰酸的三糖 (化合物 29, 5.11mg, 7.57 μmol) 溶解于二甲基乙酰胺/水 (1: 1, 1.0ml), 添加乙酸 (100 μl), 在 37°C 下放置 10 小时。向反应液添加氰氢化硼钠 (1.55mg, 24.7 μmol), 进一步在 37°C 下放置 72 小时。向反应液添加 3ml 丙酮, 使未反应的氰氢化硼钠淬灭后, 进行浓缩。依次利用使用 Chromatorex ODSde 柱色谱、HPLC (柱: DAISO SP-120-5-ODS-BP)、使用 Sephadex G-25 的色谱精制所得的残渣。制得白色固体化合物 30。产量是 2.31mg (32%)。

进行该化合物 30 的 ¹H-NMR 图谱 (600MHz, D₂O) 测定。得到图 7 所示

的图表。另外,进行MALD-TOF-MS测定,结果是 $m/z977.5[(M+Na)^+]$ 。通过这些能够证实化合物30的结构。另外,该化合物30的分子质量是954.34。

(2) 配体络合物(式(36))的合成

按照与上述(1)同样的步骤合成以式(36)表示的配体络合物。

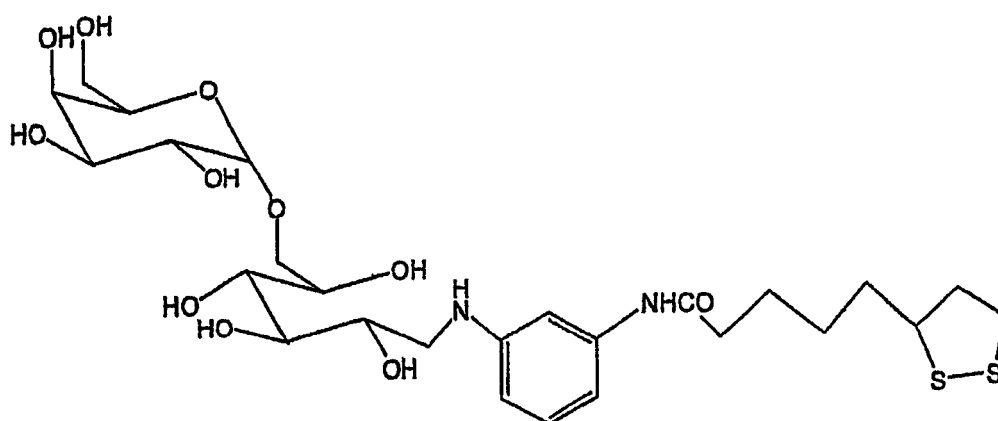


... (36)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱,所得图表示于图8。通过这些能够证实以式(36)表示的配体络合物的结构。

(3) 配体络合物(式(37))的合成

按照与上述(1)同样的步骤合成以式(37)表示的配体络合物。

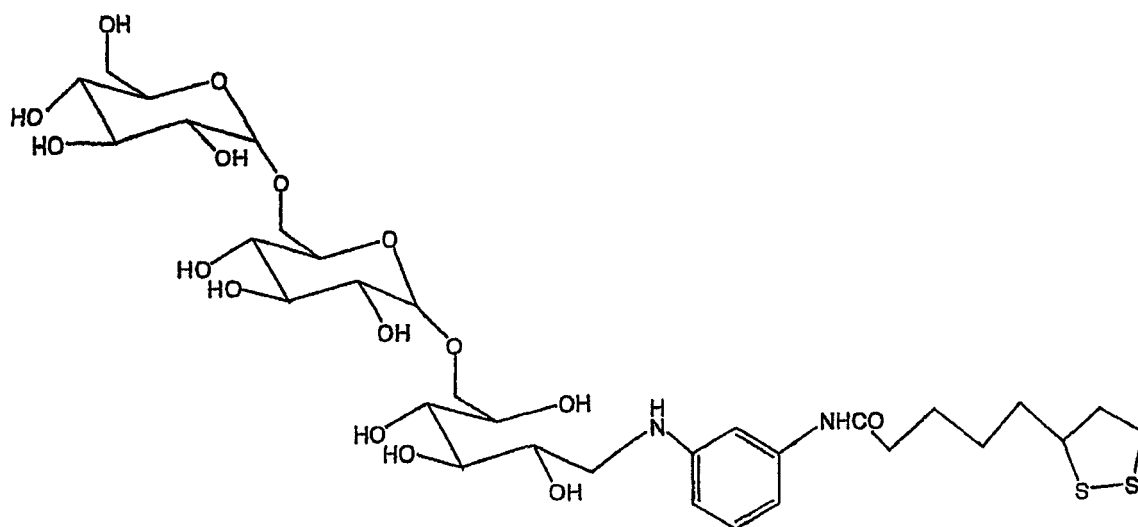


... (37)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱,所得图表示于图9。通过这些能够证实以式(37)表示的配体络合物的结构。

(4) 配体络合物(式(38))的合成

按照与上述(1)同样的步骤合成以式(38)表示的配体络合物。

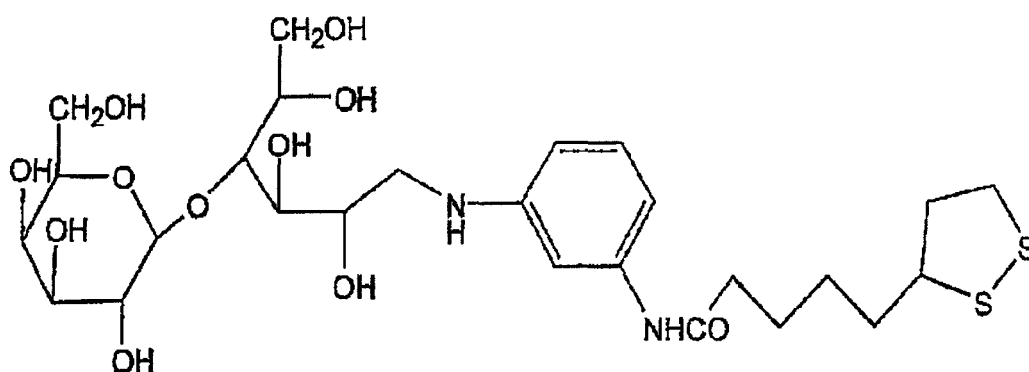


... (38)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 10。通过这些能够证实以式 (38) 表示的配体络合物的结构。

(5) 配体络合物 (式 (39)) 的合成

按照与上述 (1) 同样的步骤合成以式 (39) 表示的配体络合物。

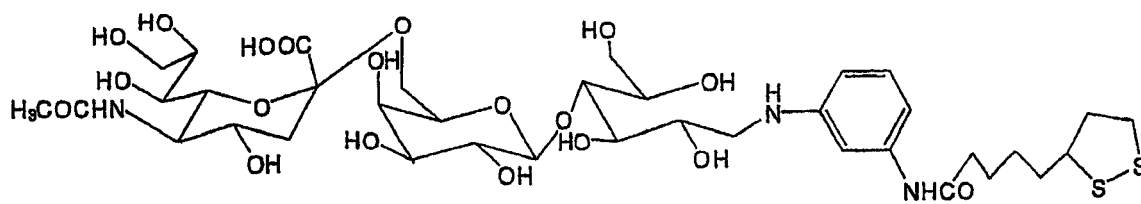


... (39)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 11。通过这些能够证实以式 (39) 表示的配体络合物的结构。

(6) 配体络合物 (式 (40)) 的合成

按照与上述 (1) 同样的步骤合成以式 (40) 表示的配体络合物。

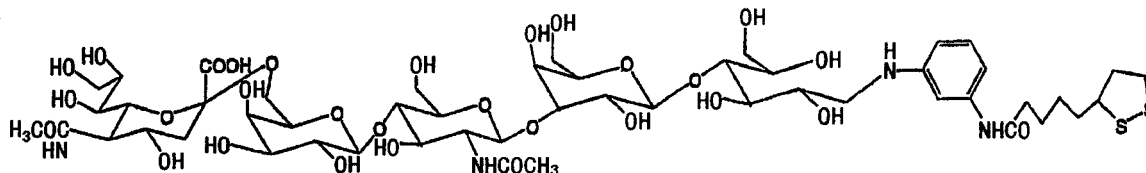


... (40)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 12。通过这些能够证实以式 (40) 表示的配体络合物的结构。

(7) 配体络合物 (式 (41)) 的合成

按照与上述 (1) 同样的步骤合成以式 (41) 表示的配体络合物。

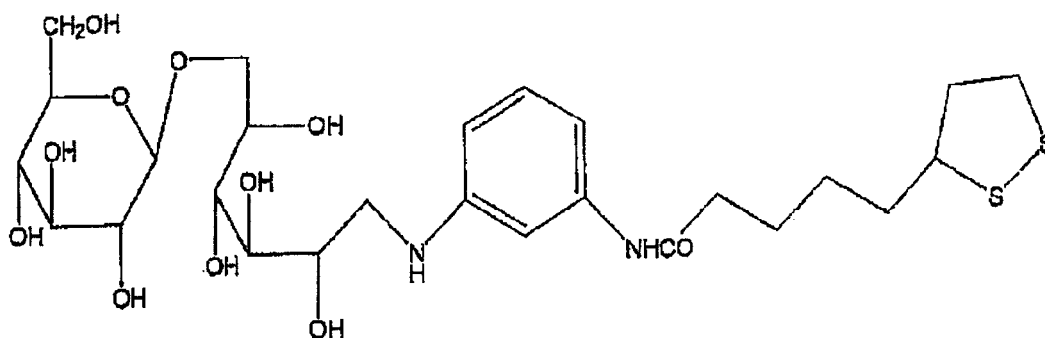


... (41)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 13。通过这些能够证实以式 (41) 表示的配体络合物的结构。

(8) 配体络合物 (式 (42)) 的合成

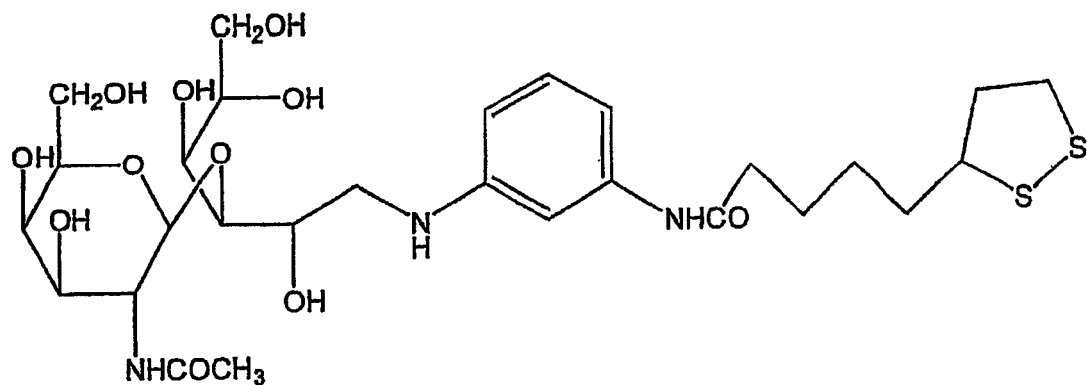
按照与上述 (1) 同样的步骤合成以式 (42) 表示的配体络合物。



... (42)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 14。通过这些能够证实以式 (42) 表示的配体络合物的结构。

(9) 配体络合物 (式 (43)) 的合成

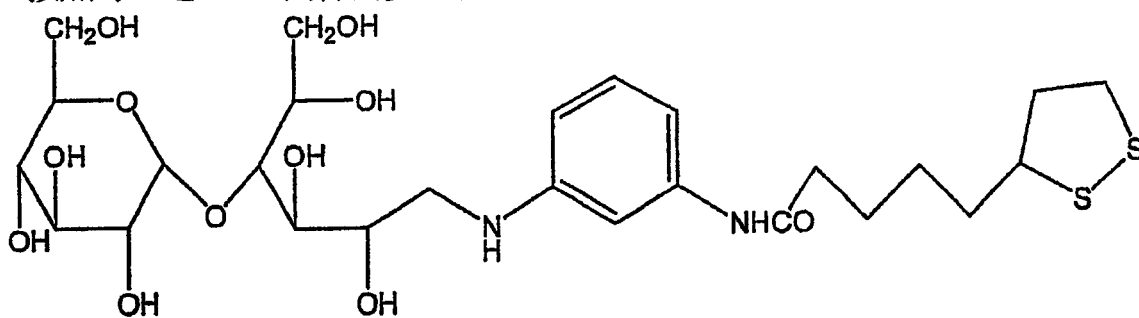


... (45)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 17。通过这些能够证实以式 (45) 表示的配体络合物的结构。

(12) 配体络合物 (式 (46)) 的合成

按照与上述 (1) 同样的步骤合成以式 (46) 表示的配体络合物。

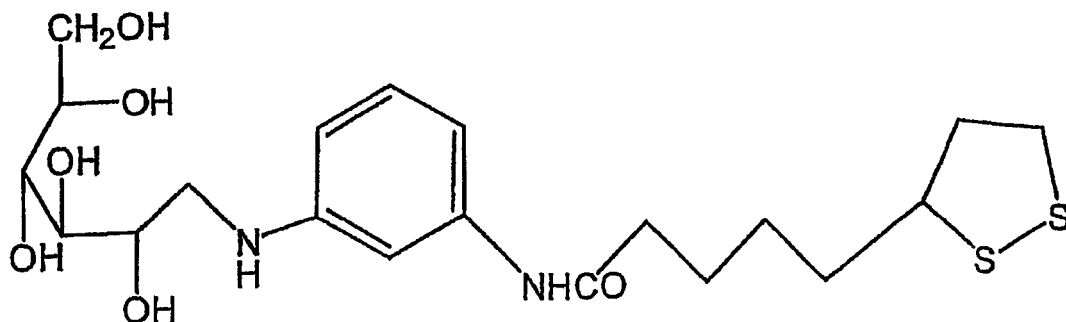


... (46)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 18。通过这些能够证实以式 (46) 表示的配体络合物的结构。

(13) 配体络合物 (式 (47)) 的合成

按照与上述 (1) 同样的步骤合成以式 (47) 表示的配体络合物。



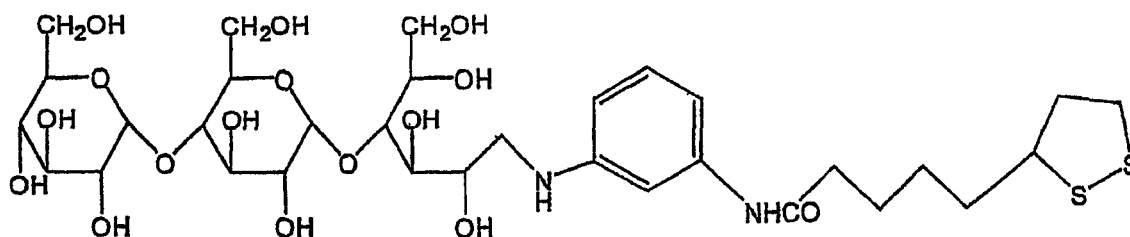
... (47)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 19。通过这些能够

证实以式(47)表示的配体络合物的结构。

(14) 配体络合物(式(48))的合成

按照与上述(1)同样的步骤合成以式(48)表示的配体络合物。

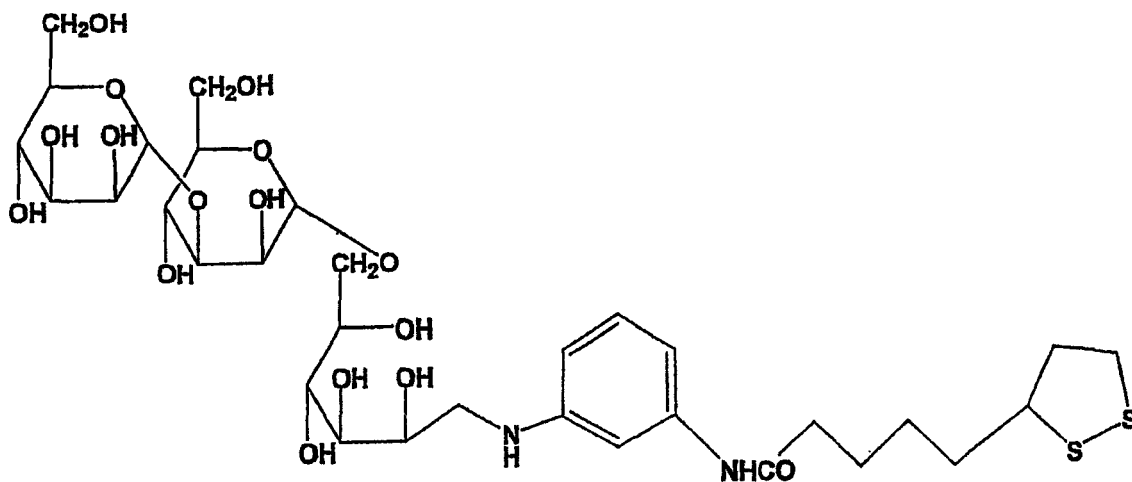


... (48)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 20。通过这些能够证实以式(48)表示的配体络合物的结构。

(15) 配体络合物(式(49))的合成

按照与上述(1)同样的步骤合成以式(49)表示的配体络合物。

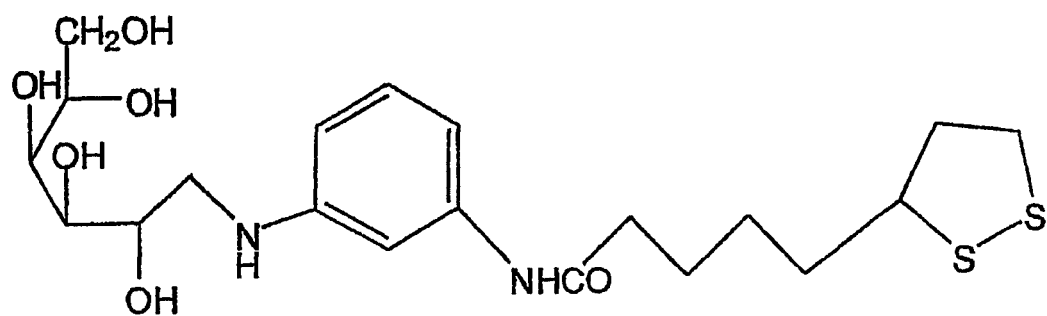


... (49)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 21。通过这些能够证实以式(49)表示的配体络合物的结构。

(16) 配体络合物(式(50))的合成

按照与上述(1)同样的步骤合成以式(50)表示的配体络合物。

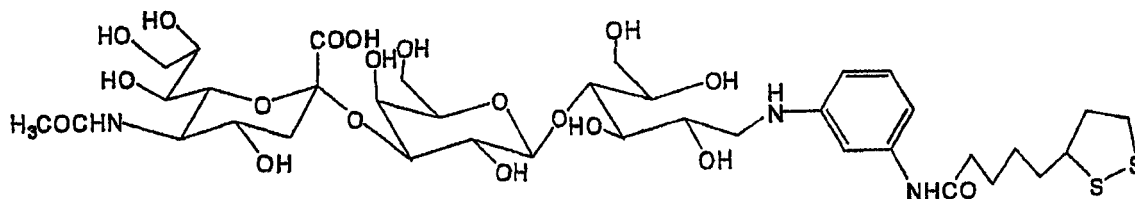


... (50)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 22。通过这些能够证实以式 (50) 表示的配体络合物的结构。

(17) 配体络合物 (式 (51)) 的合成

按照与上述 (1) 同样的步骤合成以式 (51) 表示的配体络合物。



... (51)

测定该配体络合物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 所得图表示于图 23。通过这些能够证实以式 (51) 表示的配体络合物的结构。

另外, 实施发明的最佳方式完成的具体实施方式只不过是使本发明的技术内容清楚明了而列举的例子, 而并不应该狭义地理解为局限于那样的具体例子, 在本发明的宗旨和下面记载的权利要求的范围内, 能够进行各种变换而实施。

工业实用性

如上所述, 本发明涉及的配体络合物能够在—个配体络合物内导入多个糖分子, 因而能够避免上述配体络合物聚集在支撑体表面, 而且能够使糖分子聚集。通过利用本发明的连接子化合物, 可以重现性良好地评价上述糖分子与蛋白质之间的相互作用。

另外，本发明涉及的配体载体起到能够用于鉴定未知蛋白质的效果。此外，通过利用本发明涉及的蛋白质的分析方法，能够进行未知蛋白质的鉴定。

本发明提供能够有效地用于蛋白质的功能分析的新型的配体络合物或配体载体等。如果作为糖链或蛋白质的功能分析的工具而开发固定寡聚糖的配体载体（芯片），不仅有助于分析与寡聚糖链相关的生命现象，而且还期待成为药物开发的重要技术。因而可以认为本发明的实用性很高。

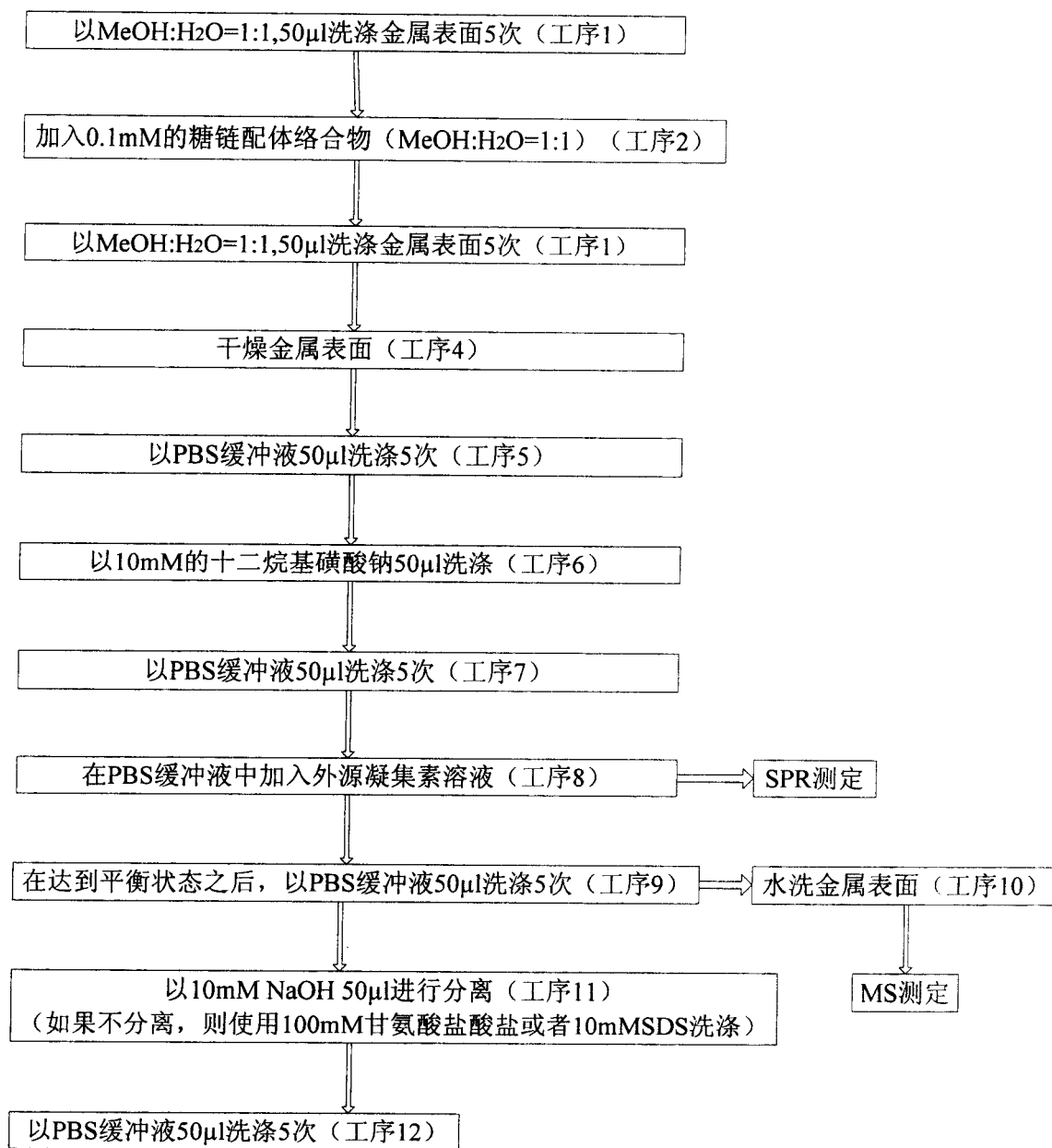


图 1

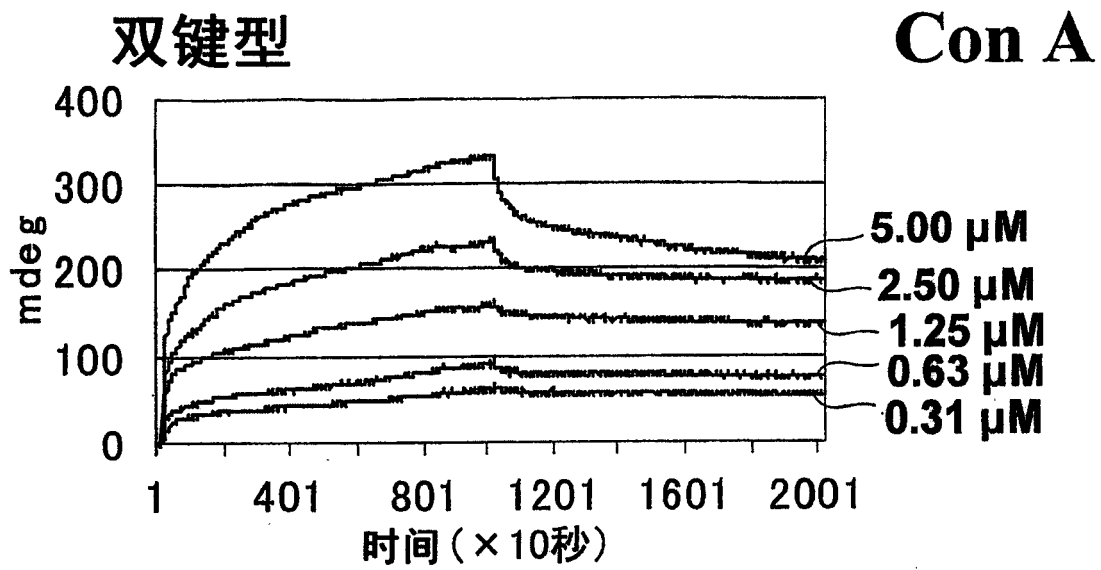


图 2a

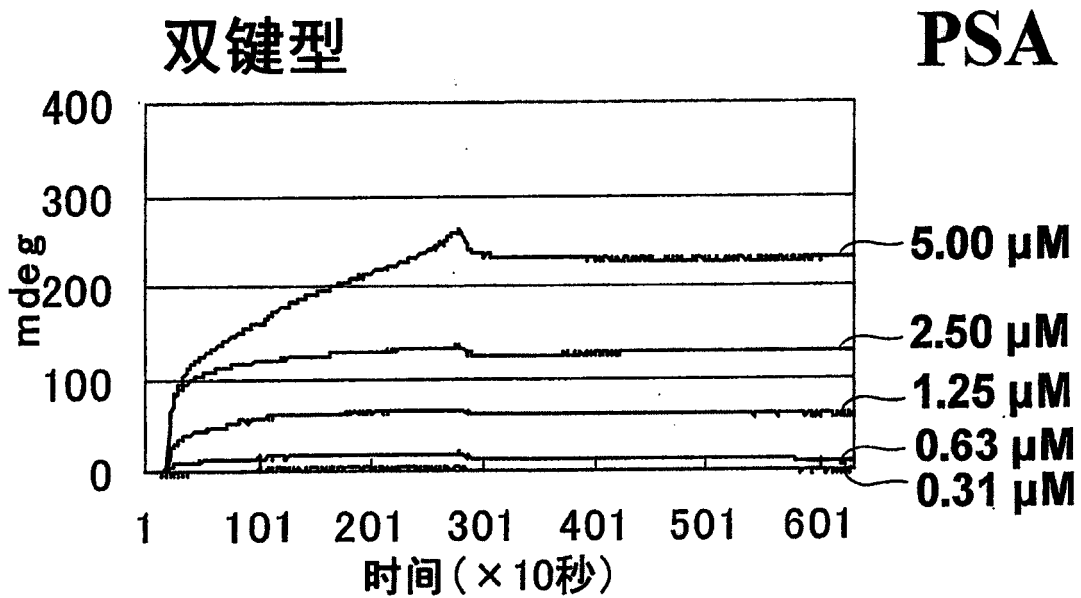


图 2b

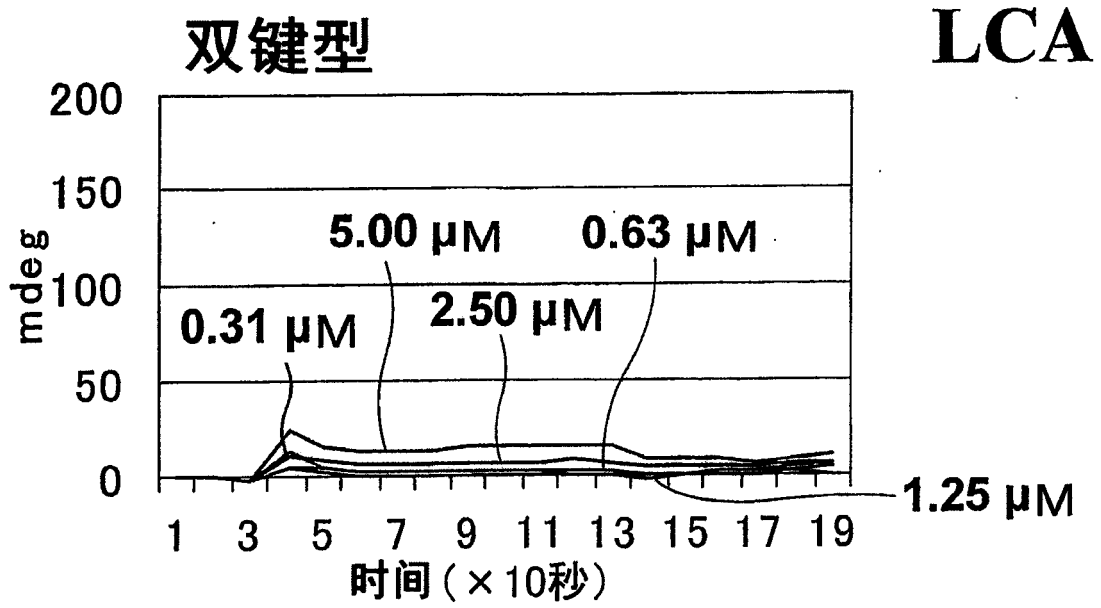


图 2c

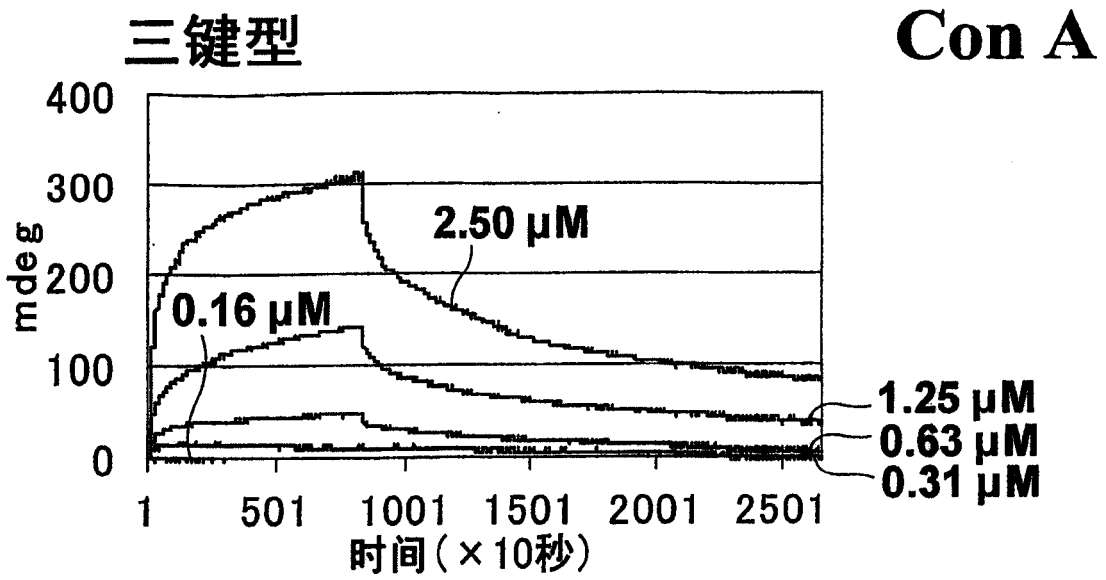


图 3a

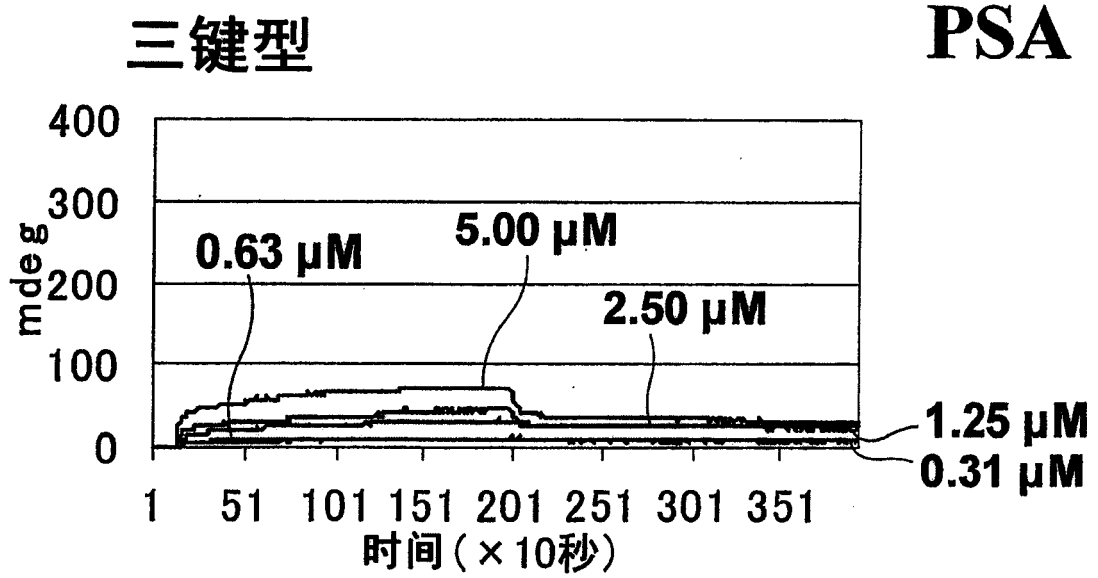


图 3b

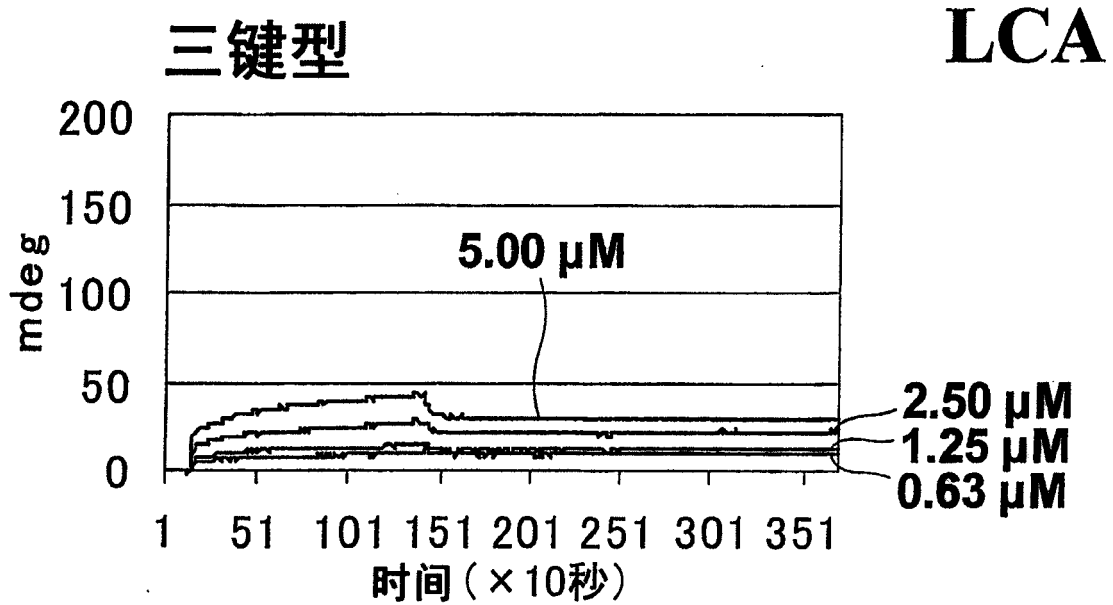


图 3c

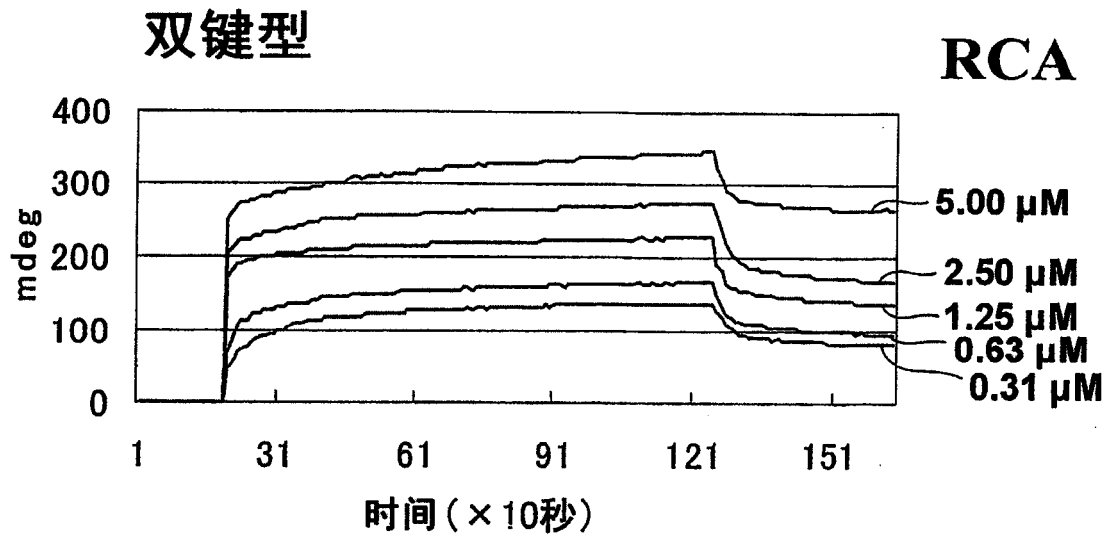


图 4a

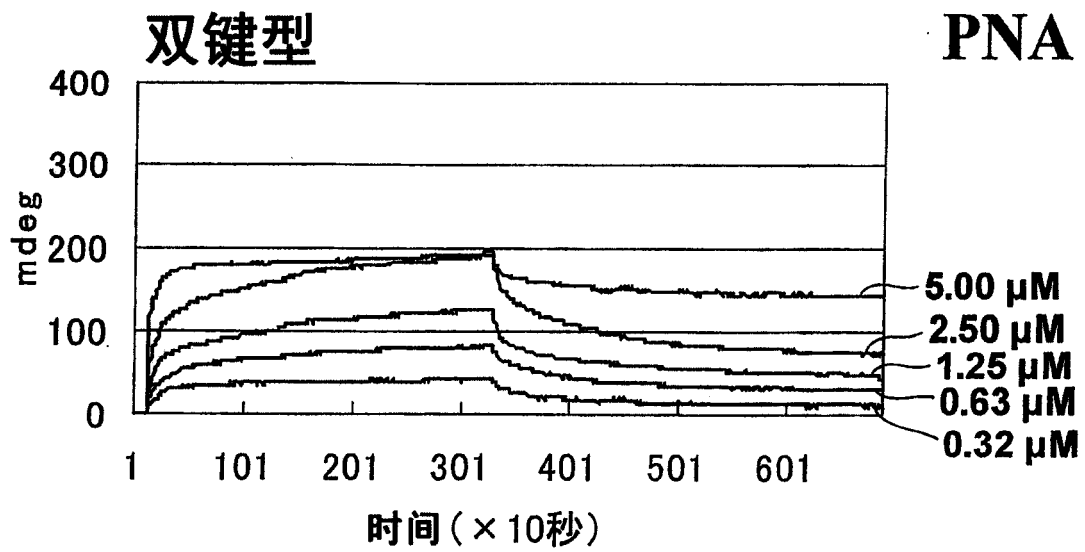


图 4b

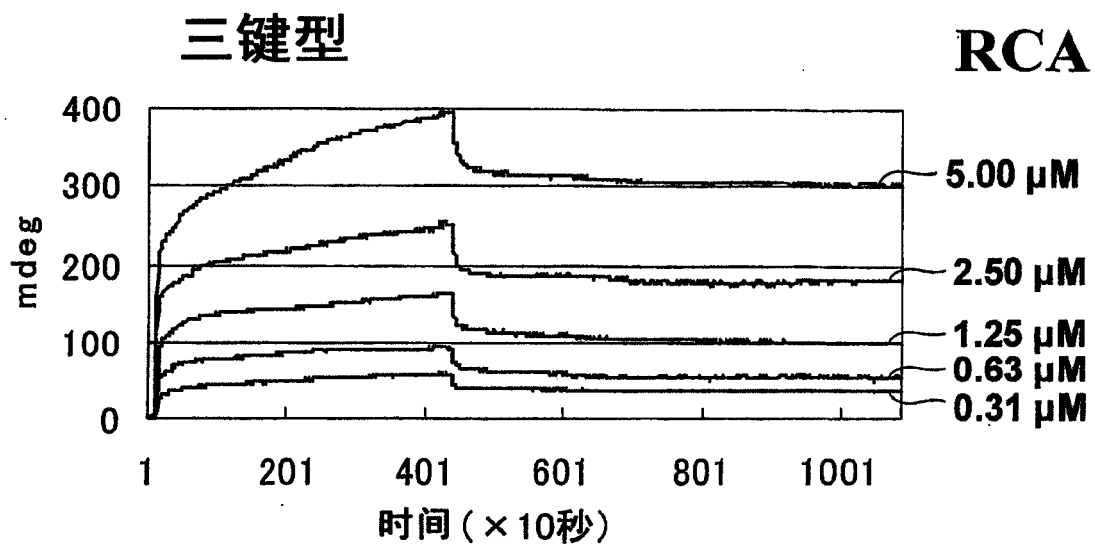


图 5a

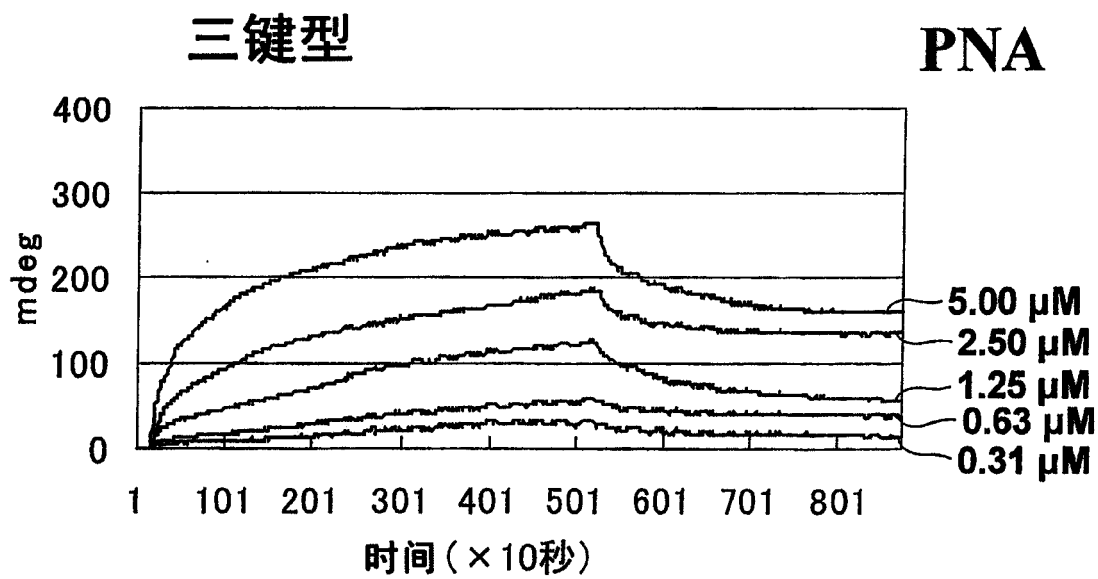


图 5b

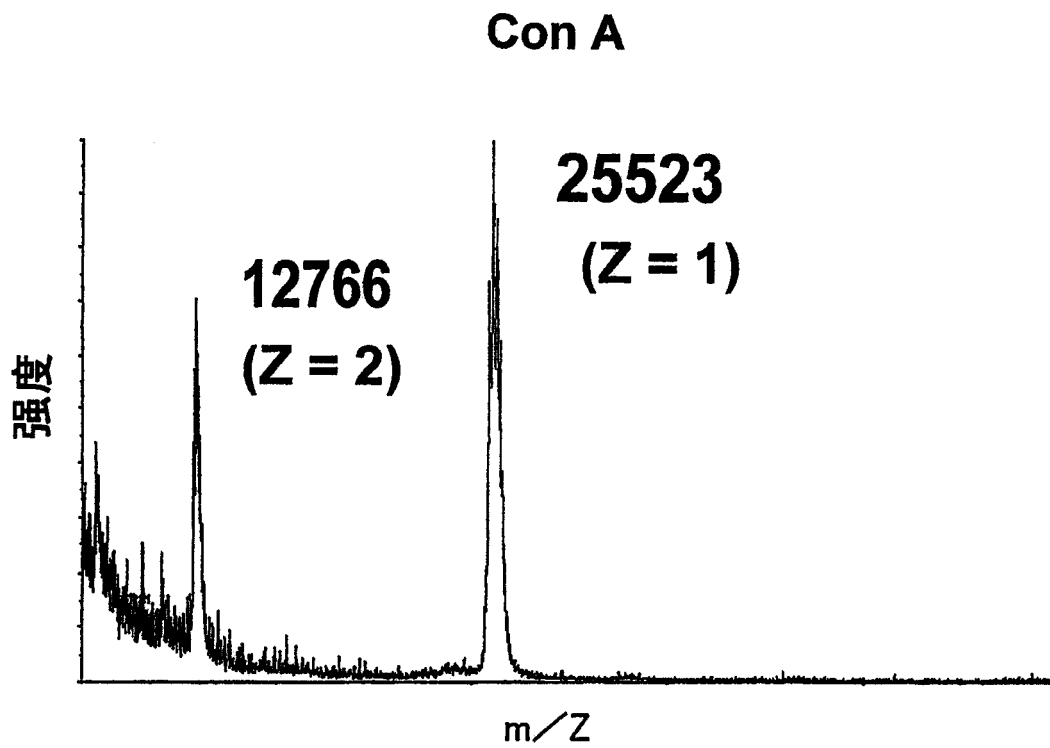


图 6a

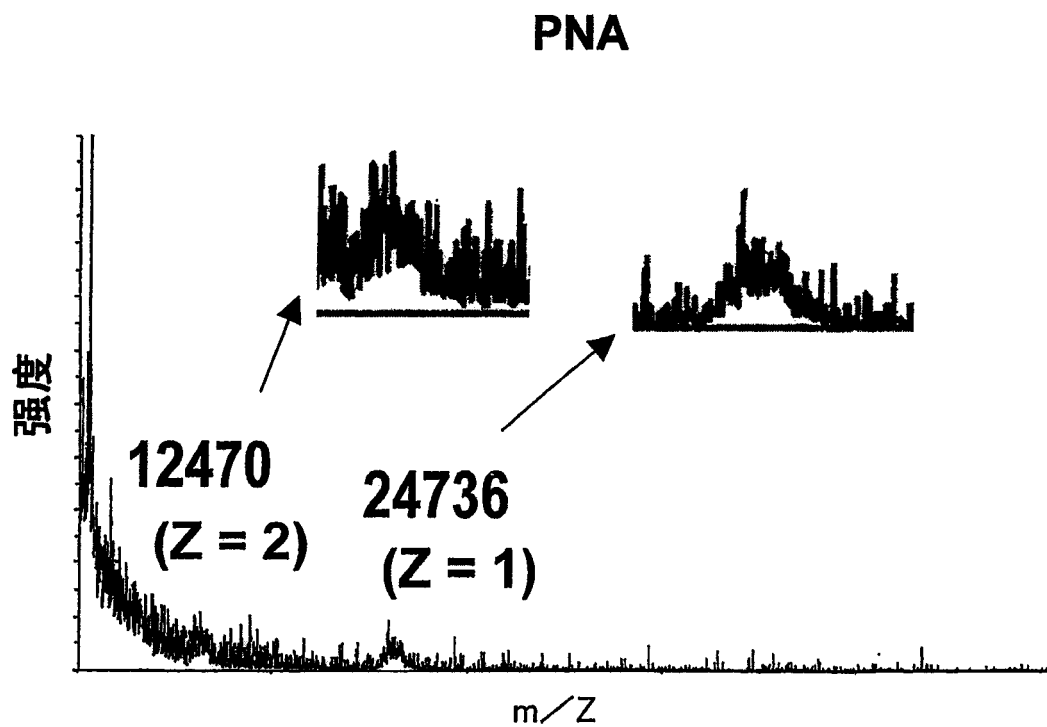


图 6b

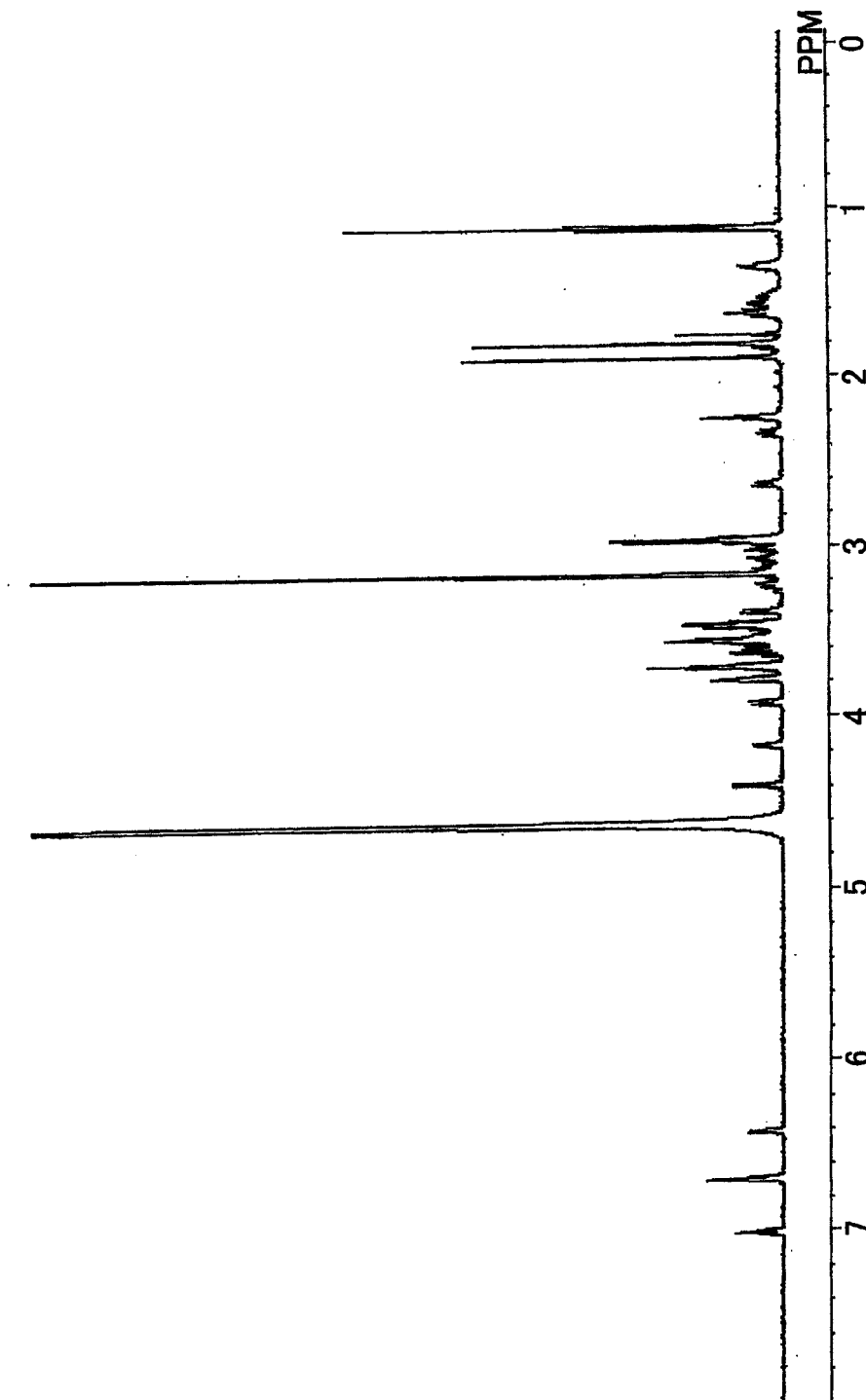


图7

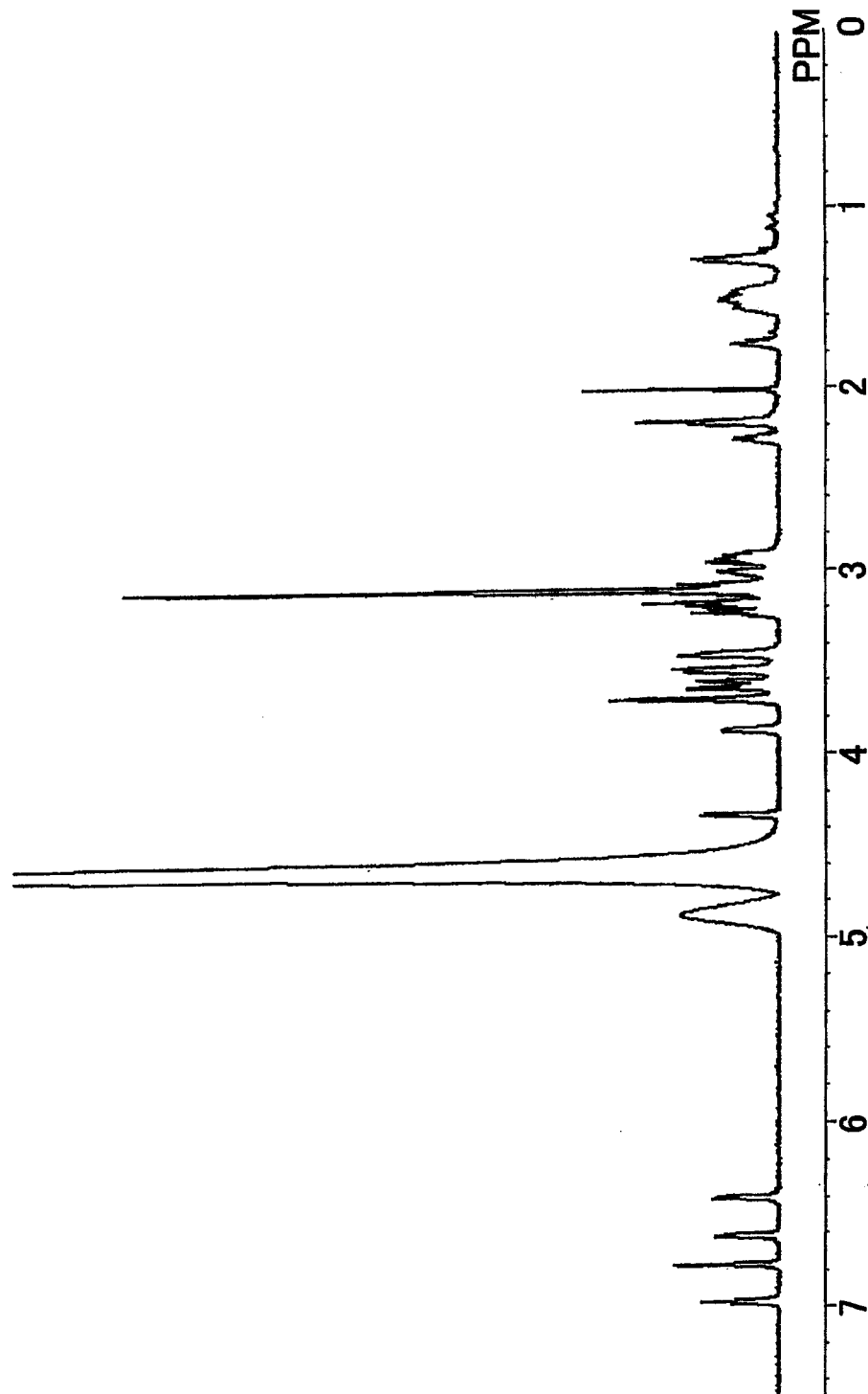


图 8

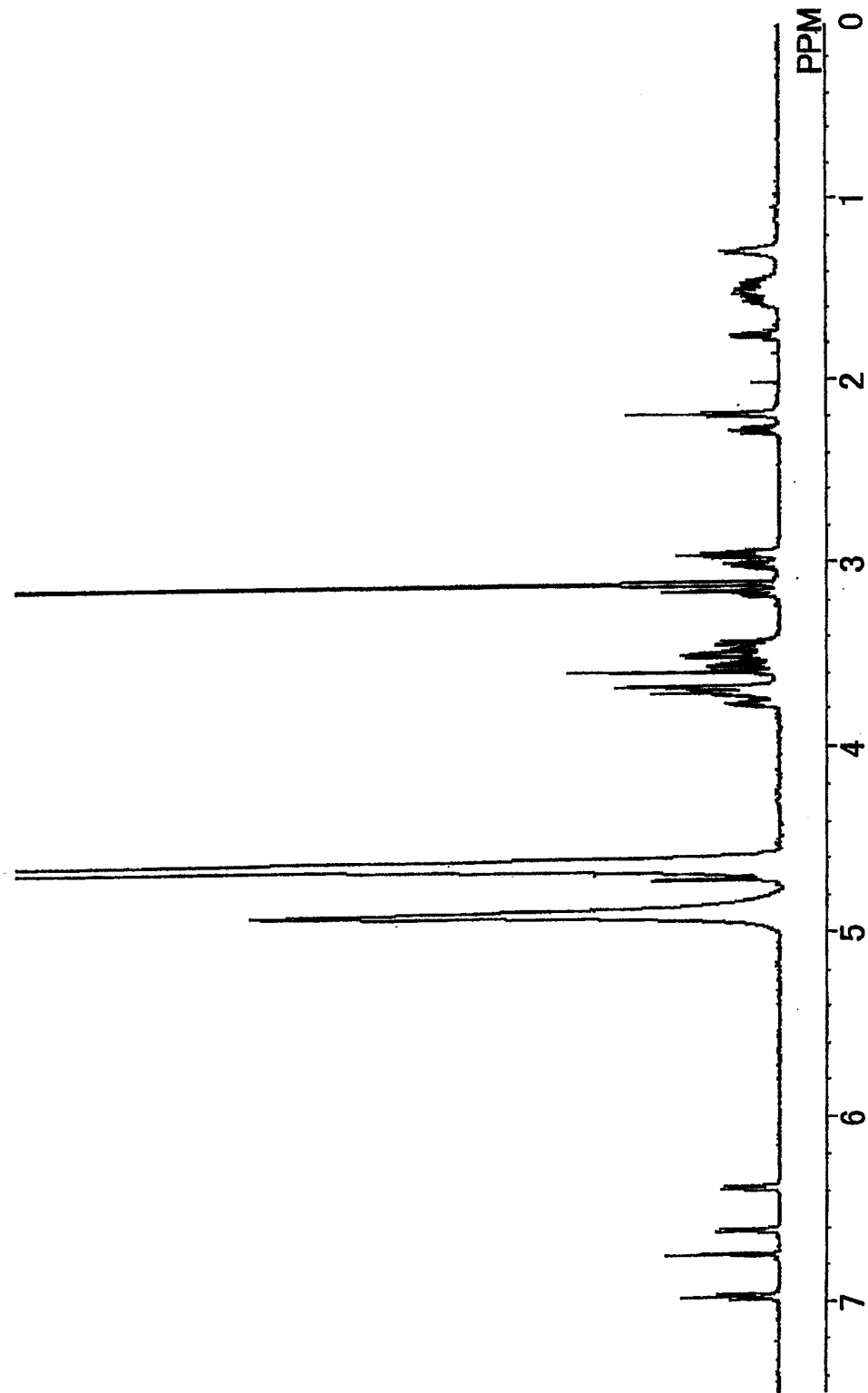


图9

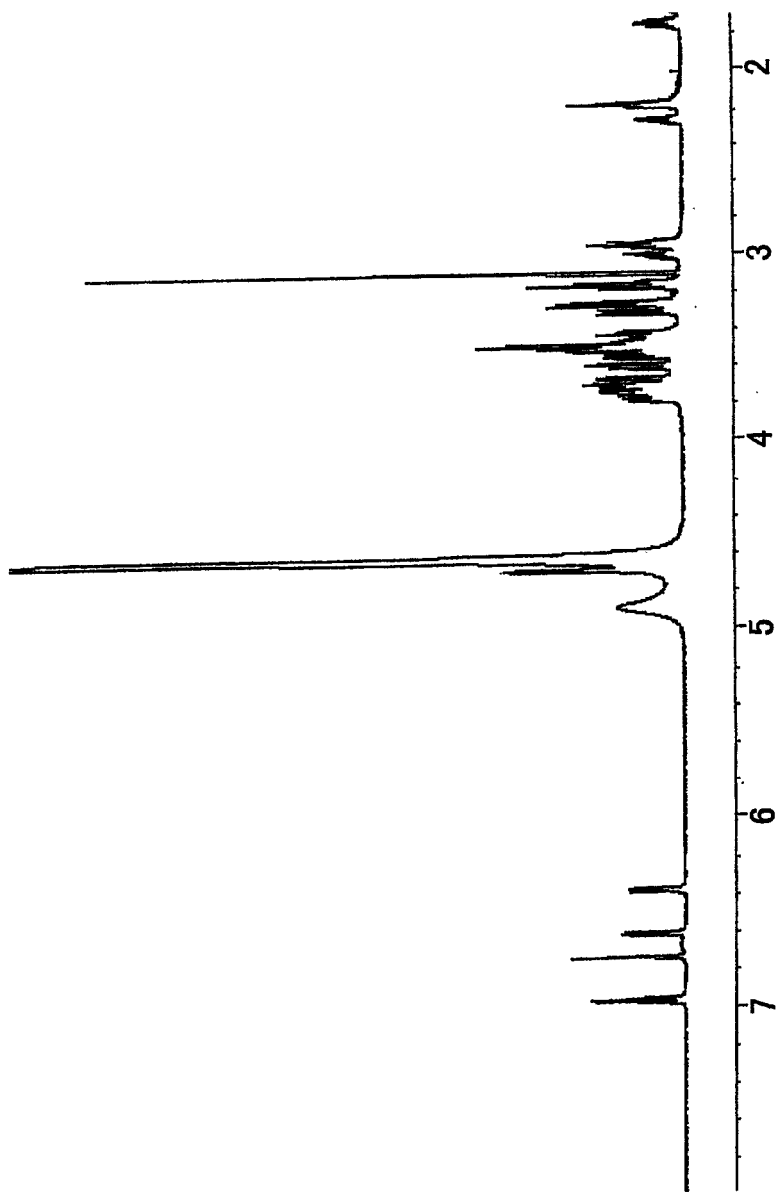


图 10

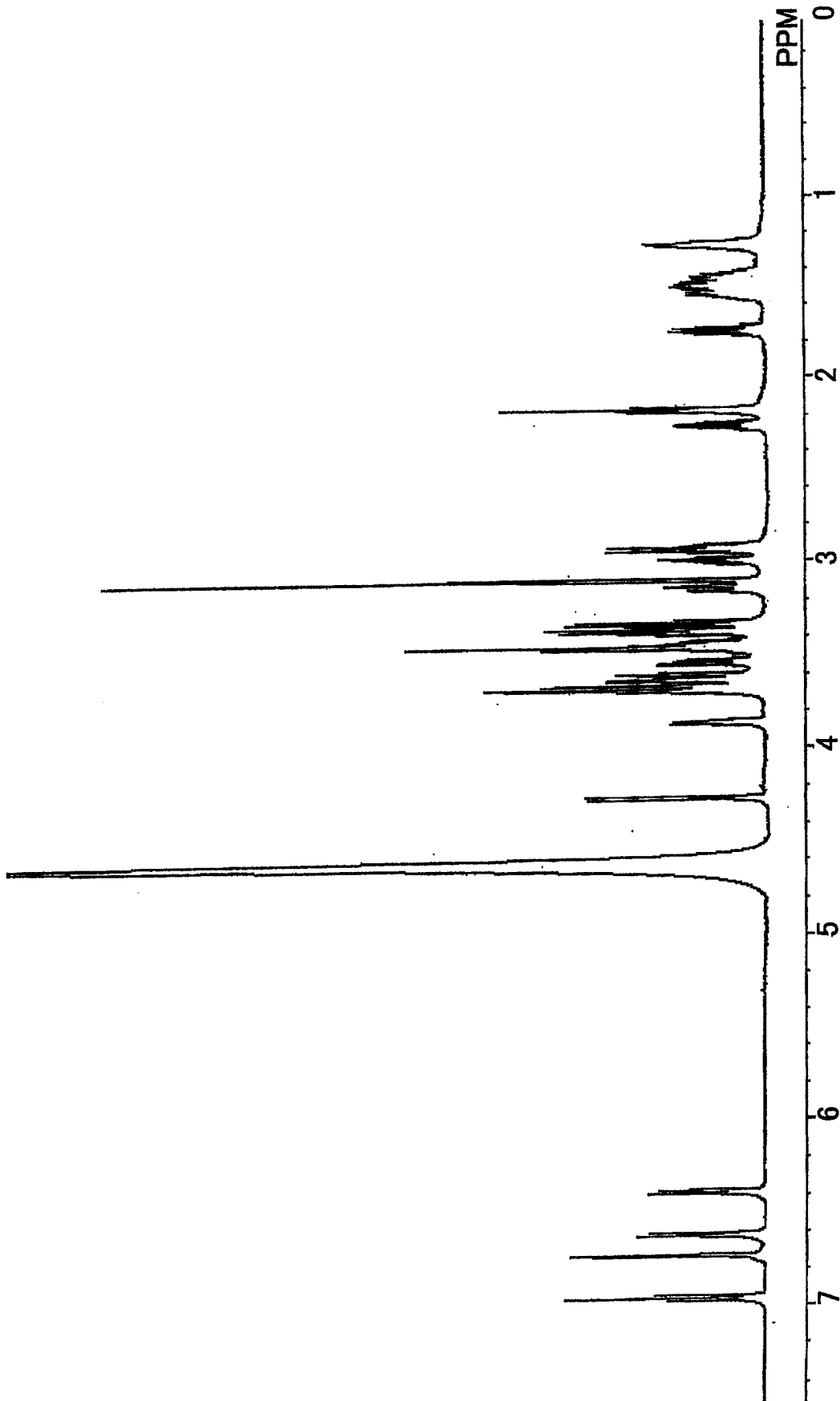


图 11

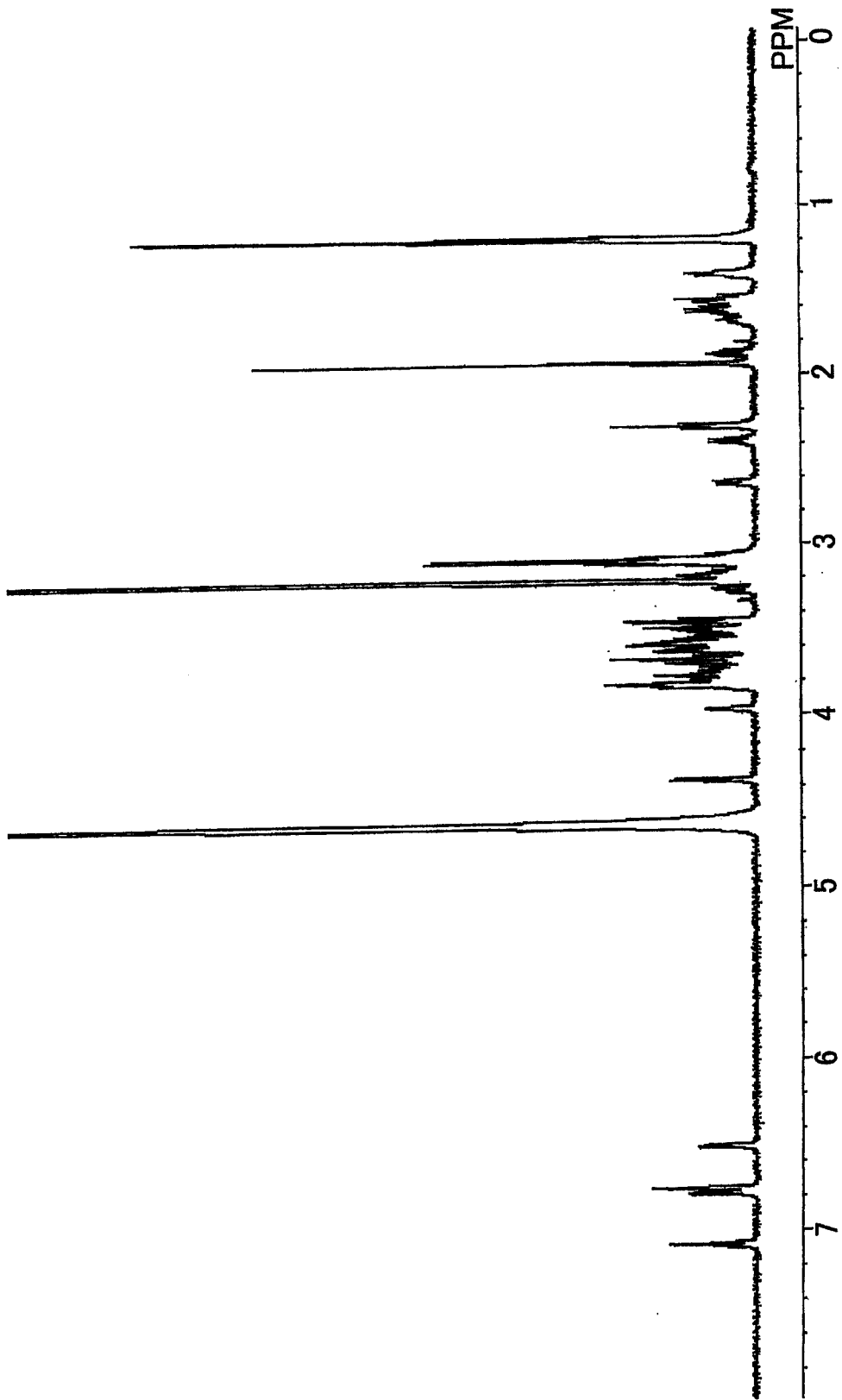


图 12

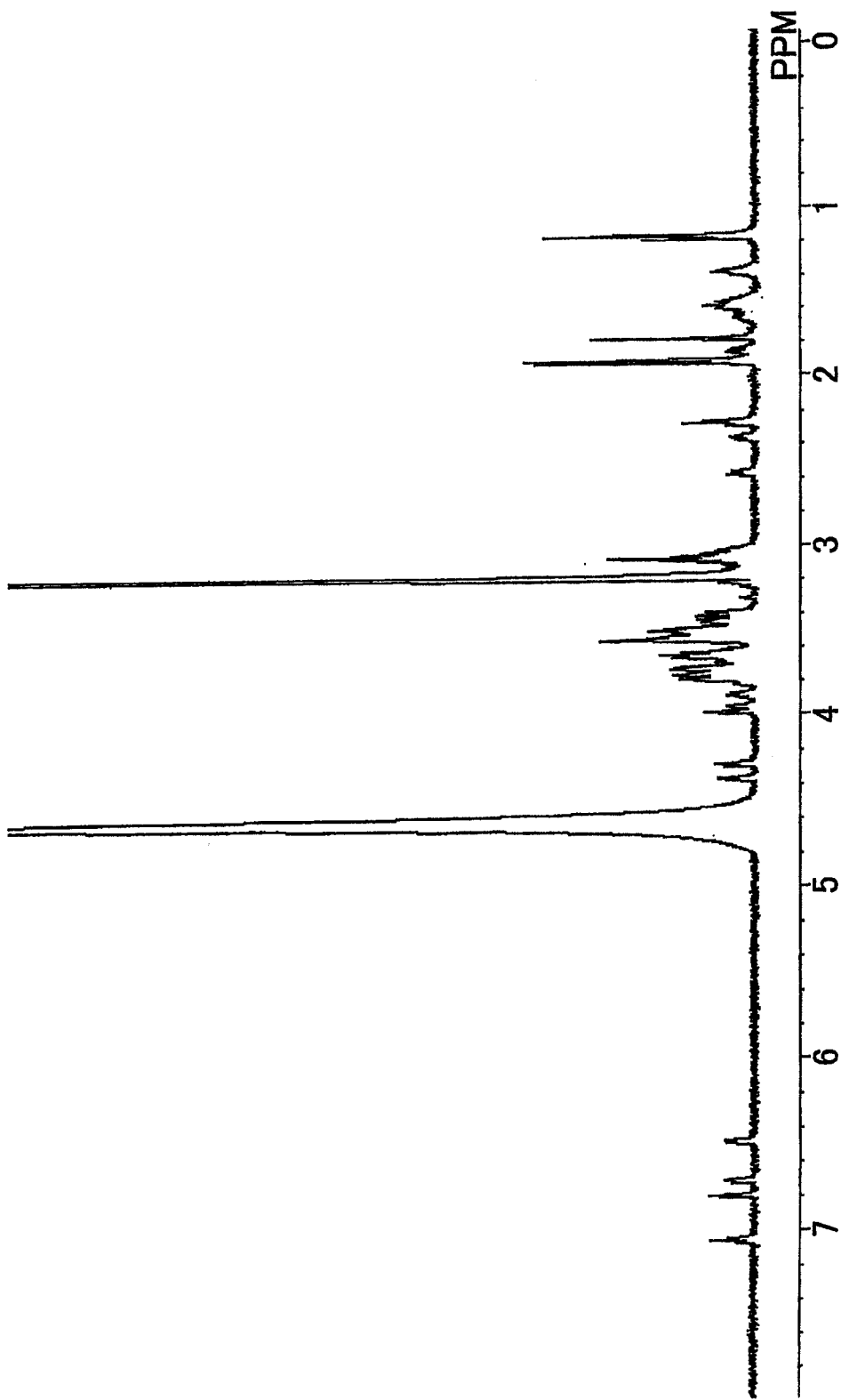


图 13

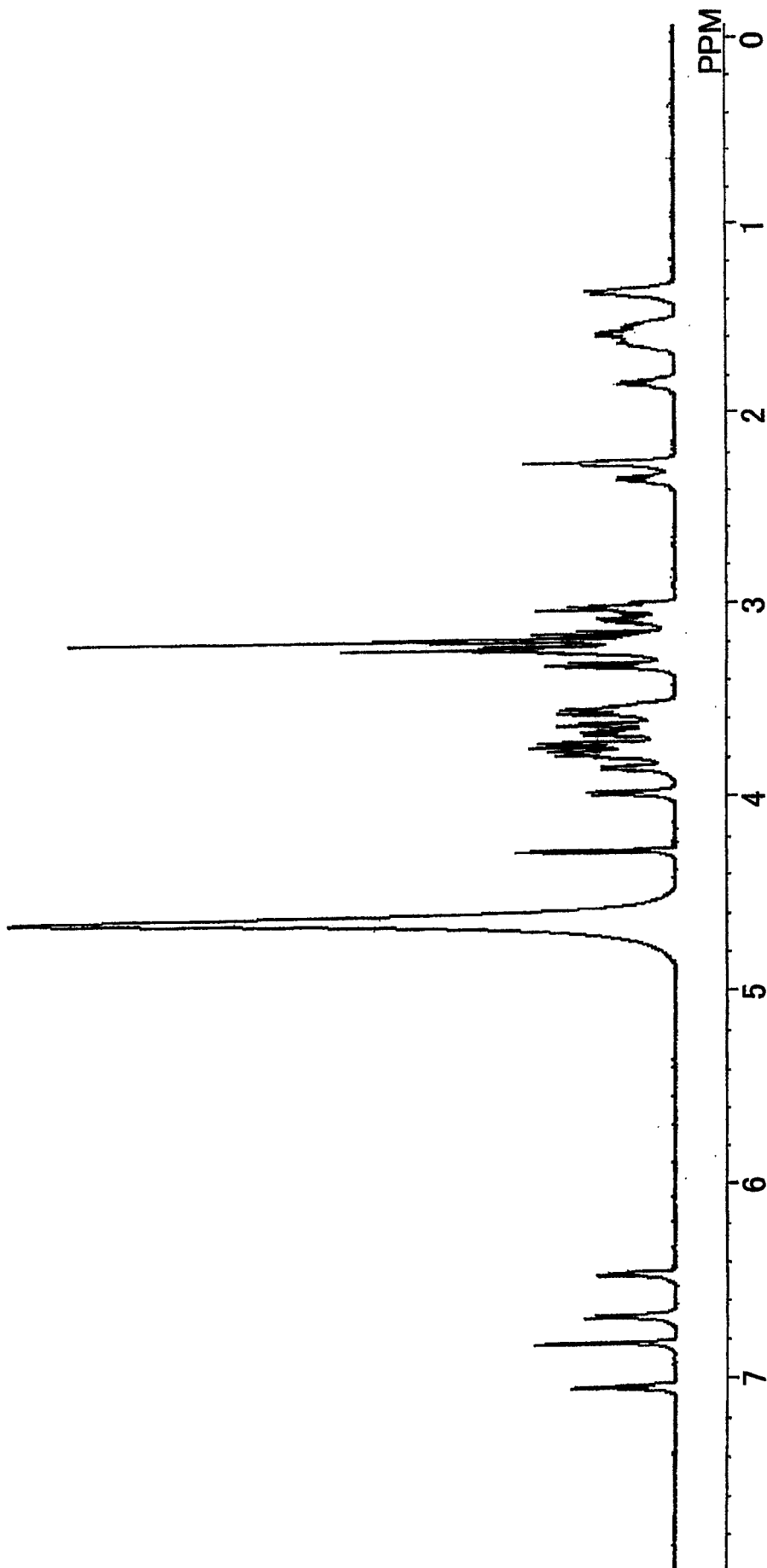


图 14

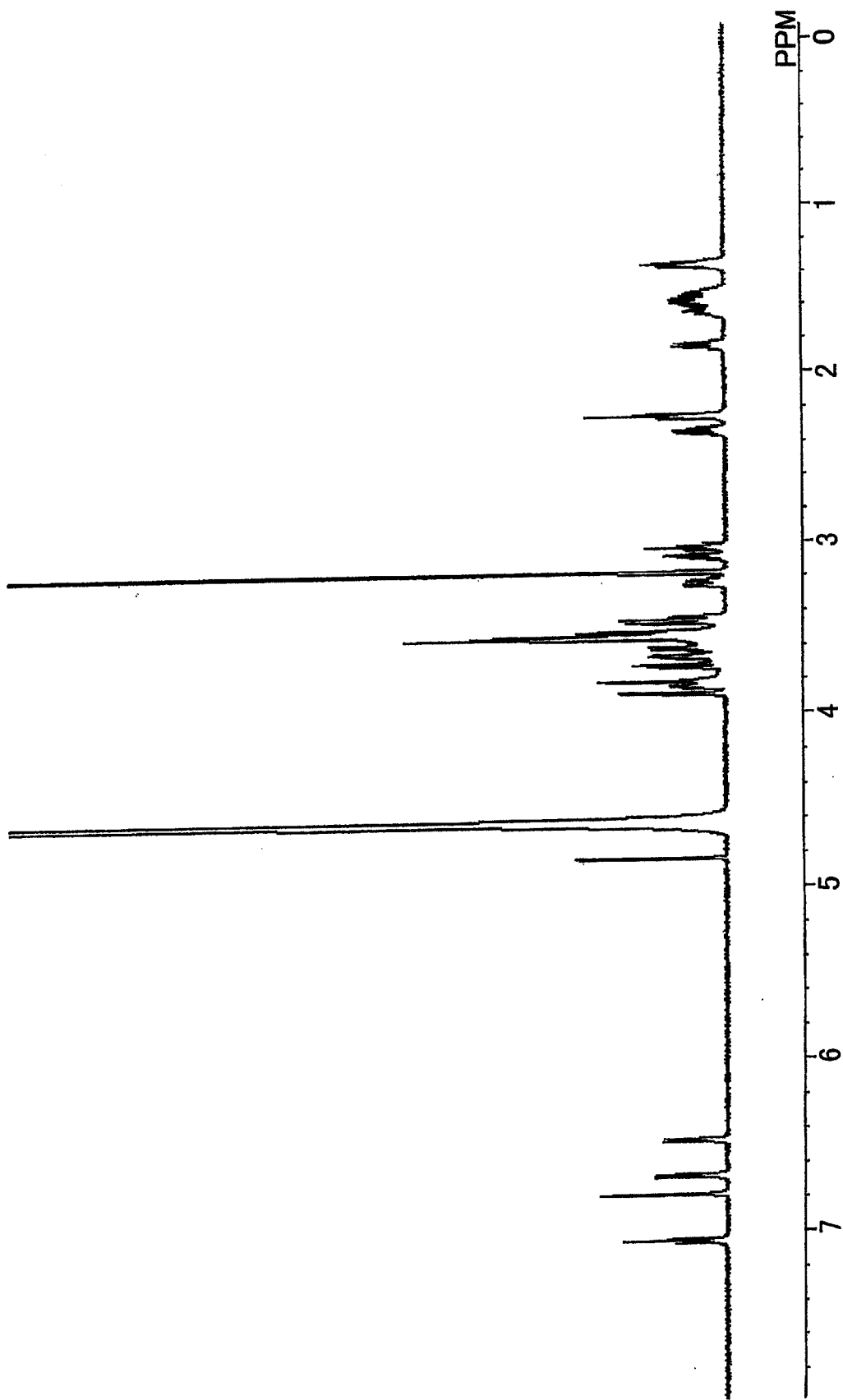


图 15

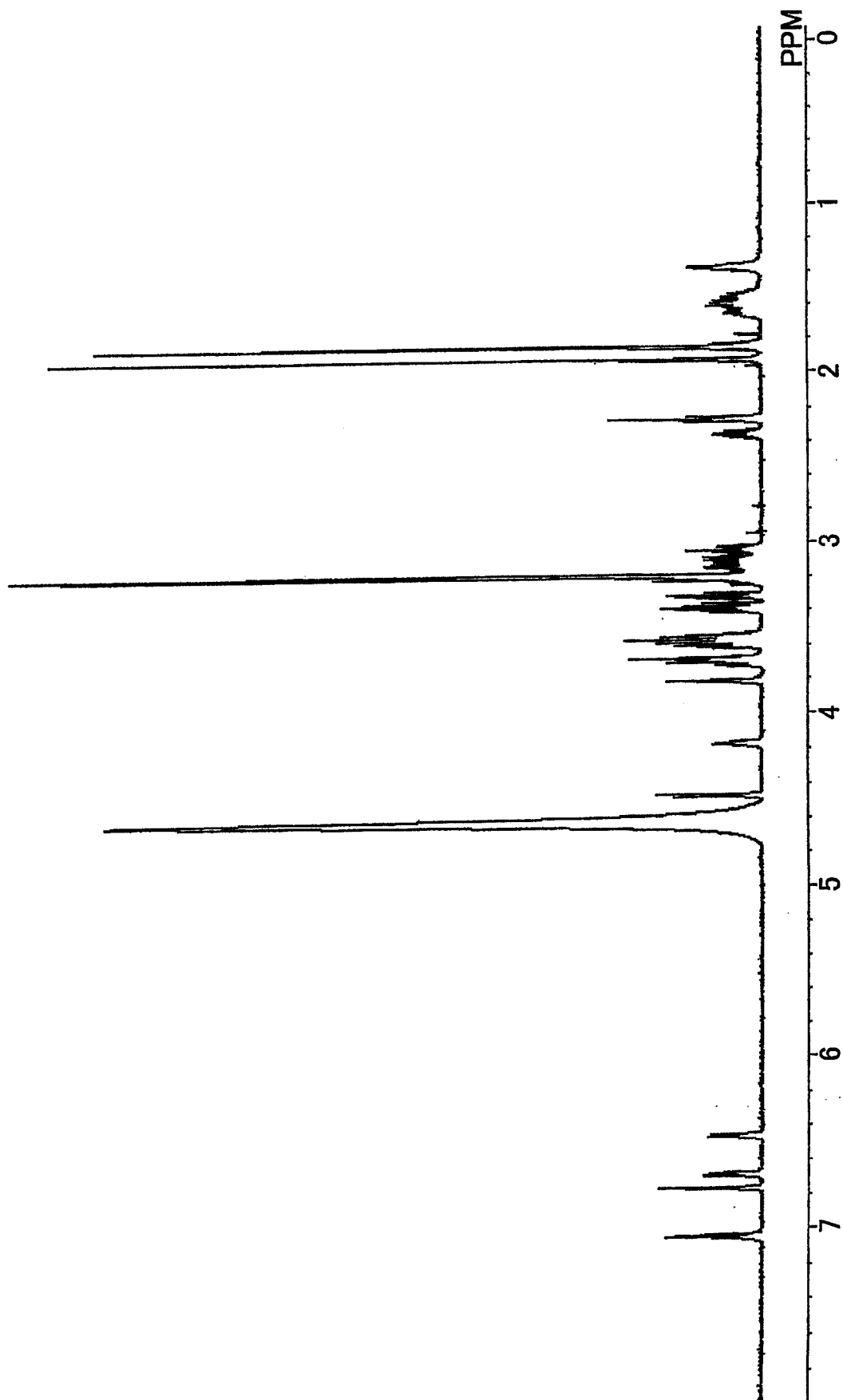


图 16

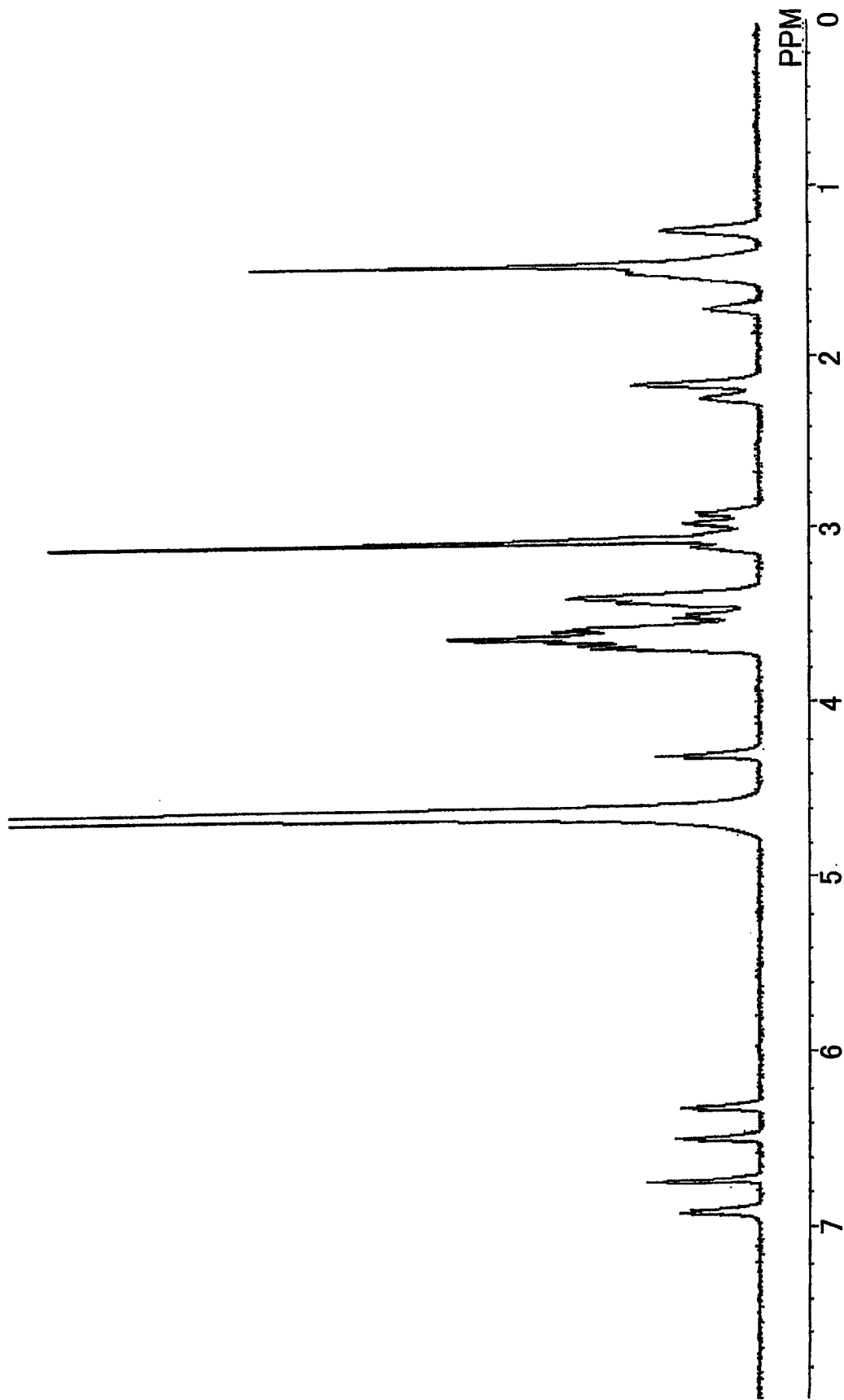


图 17

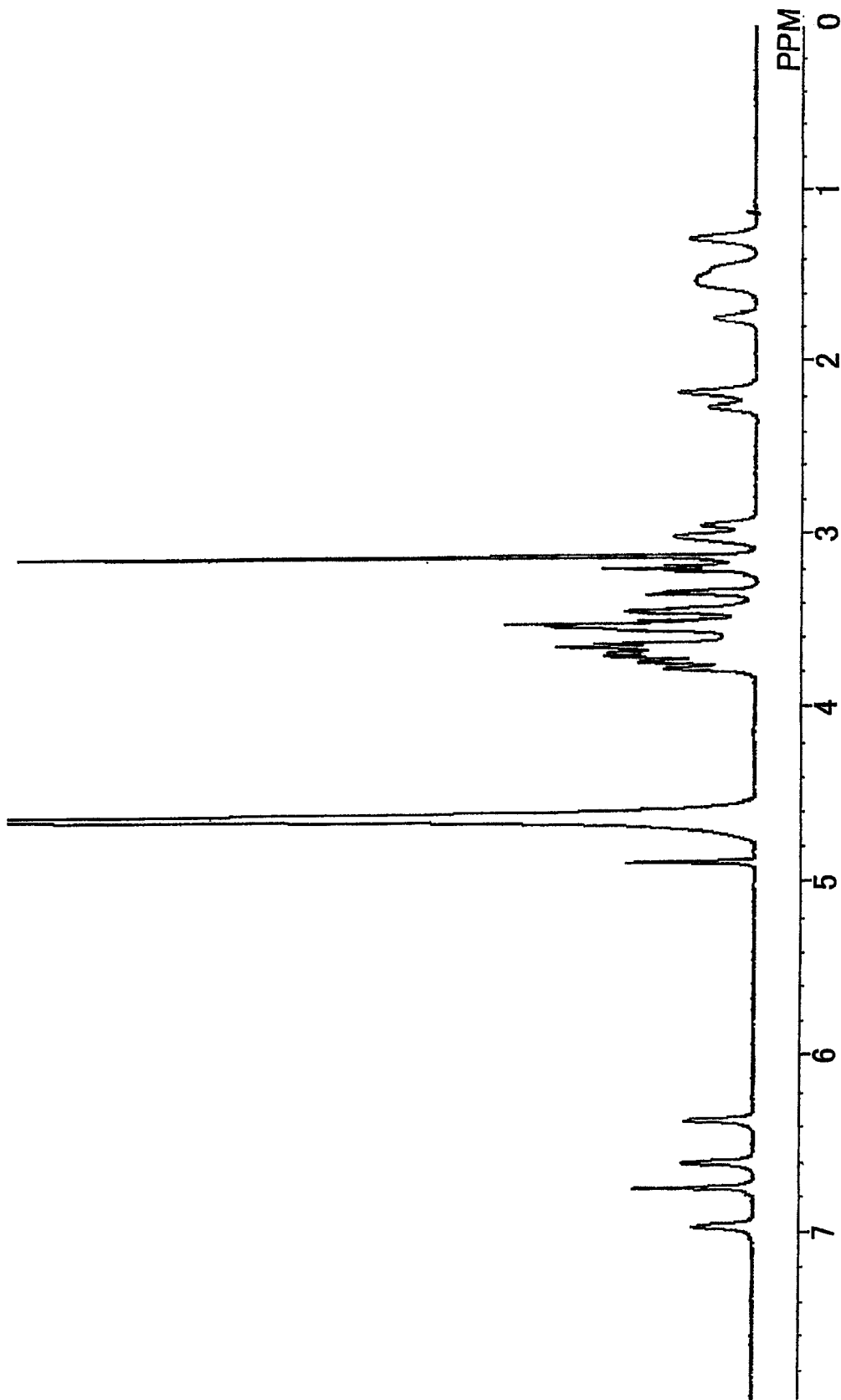


图 18

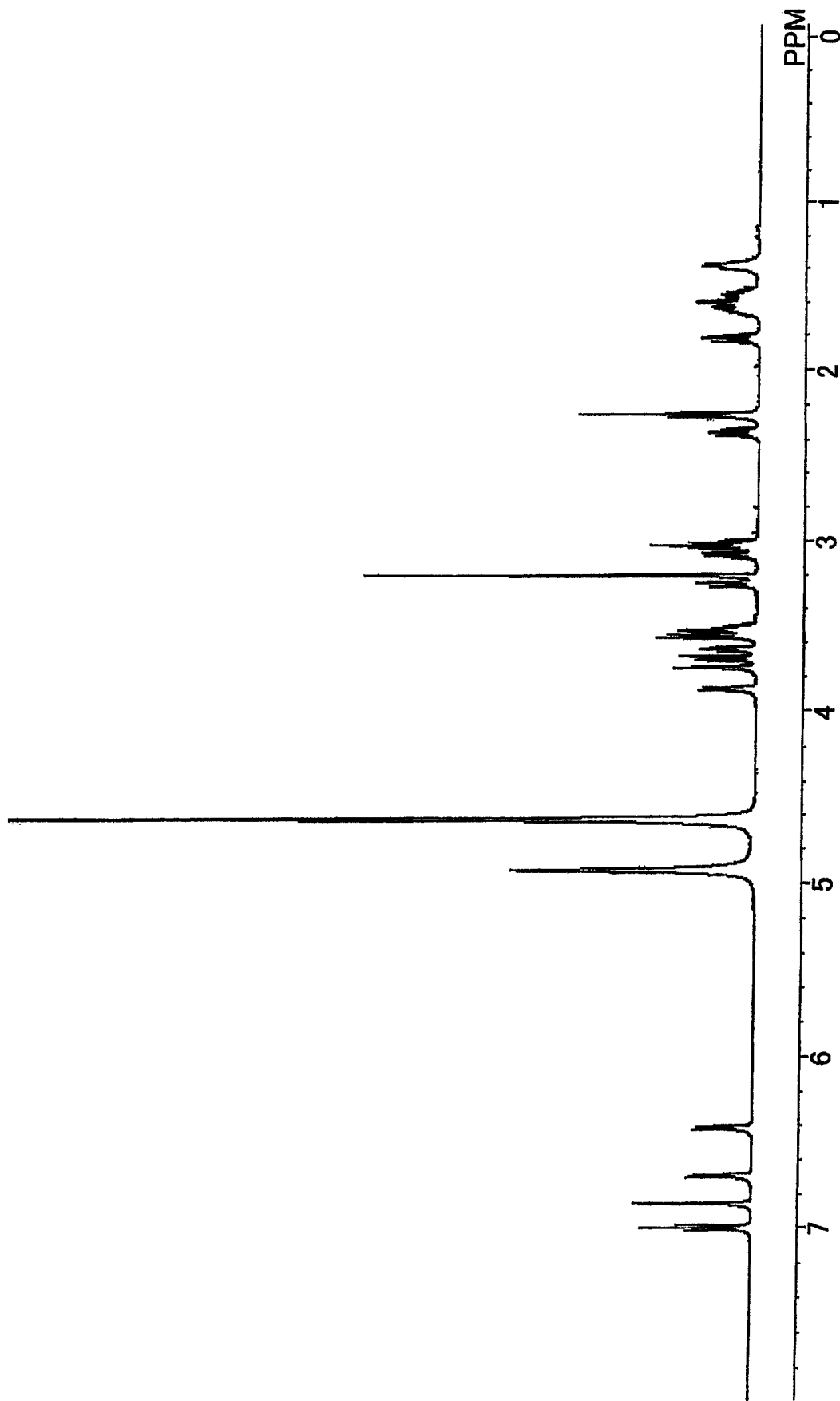


图 19

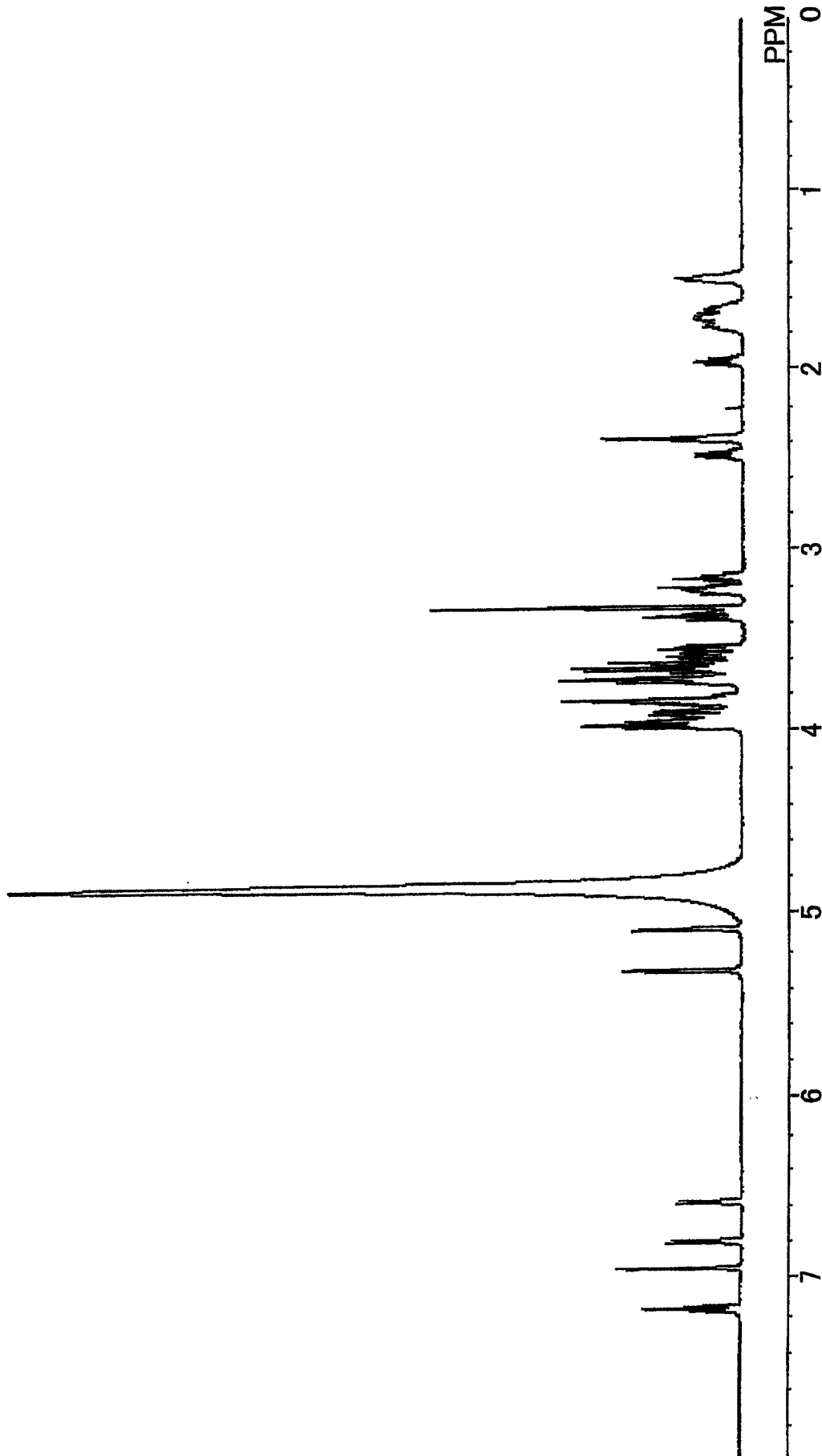


图 20

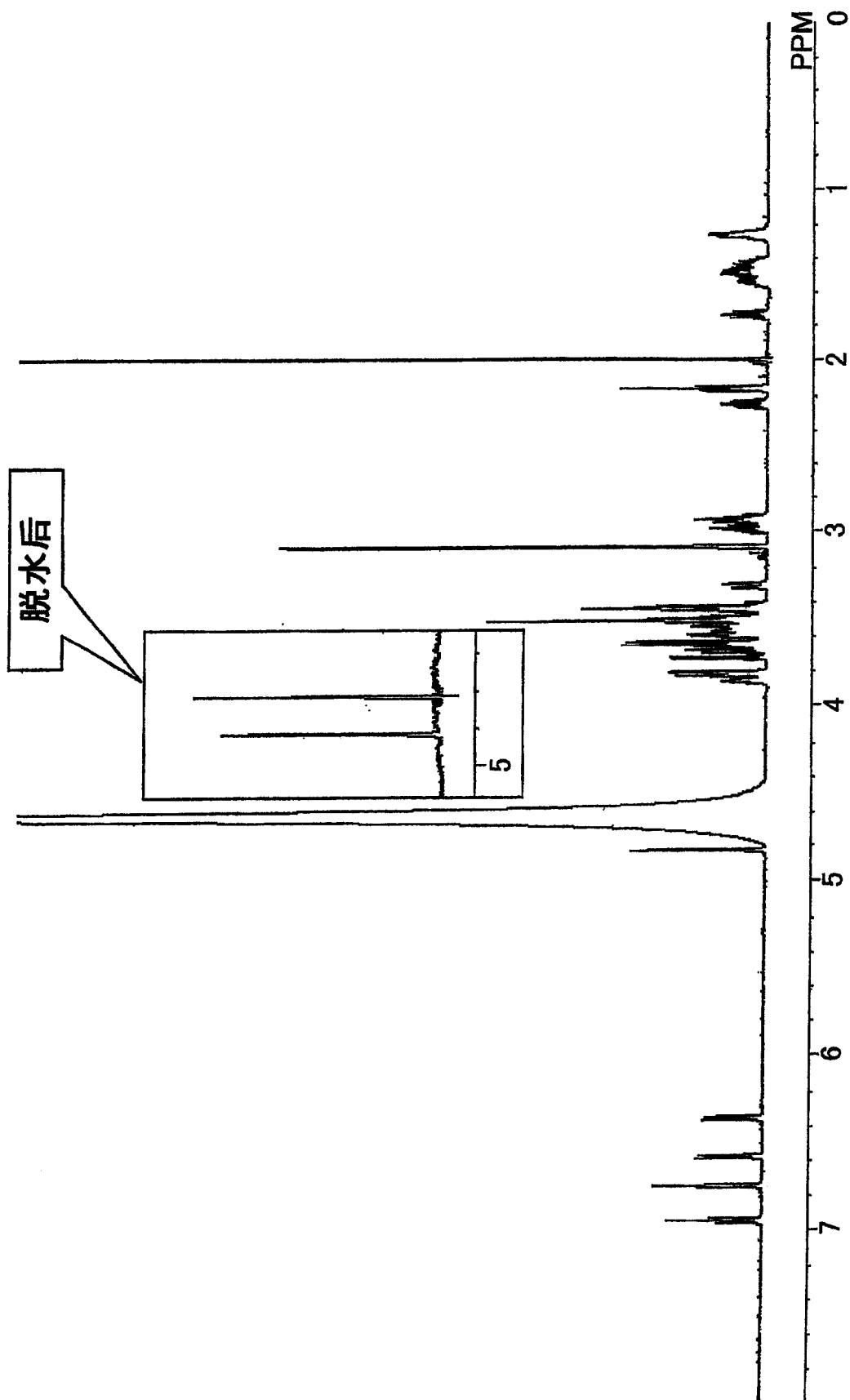


图 21

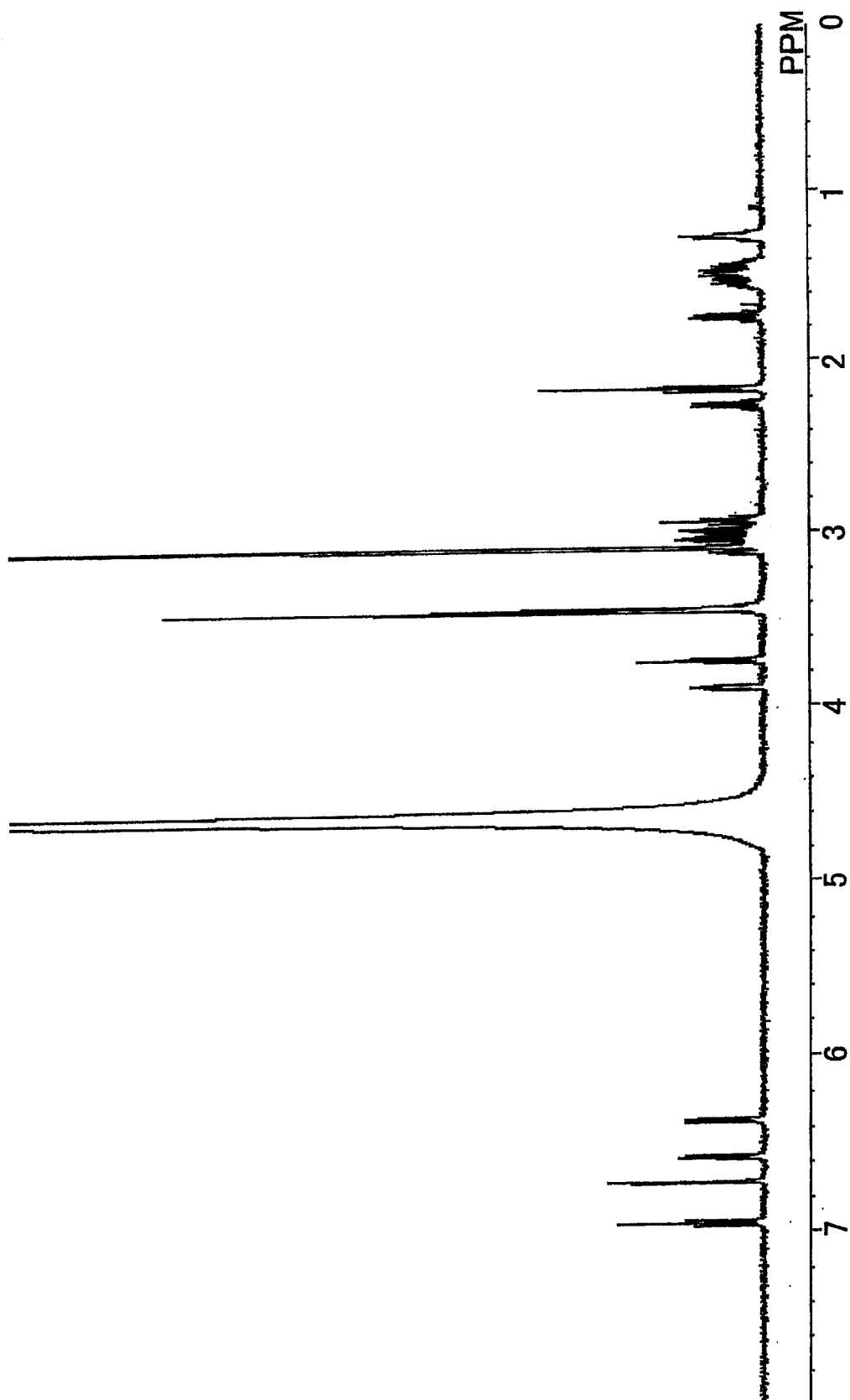


图 22

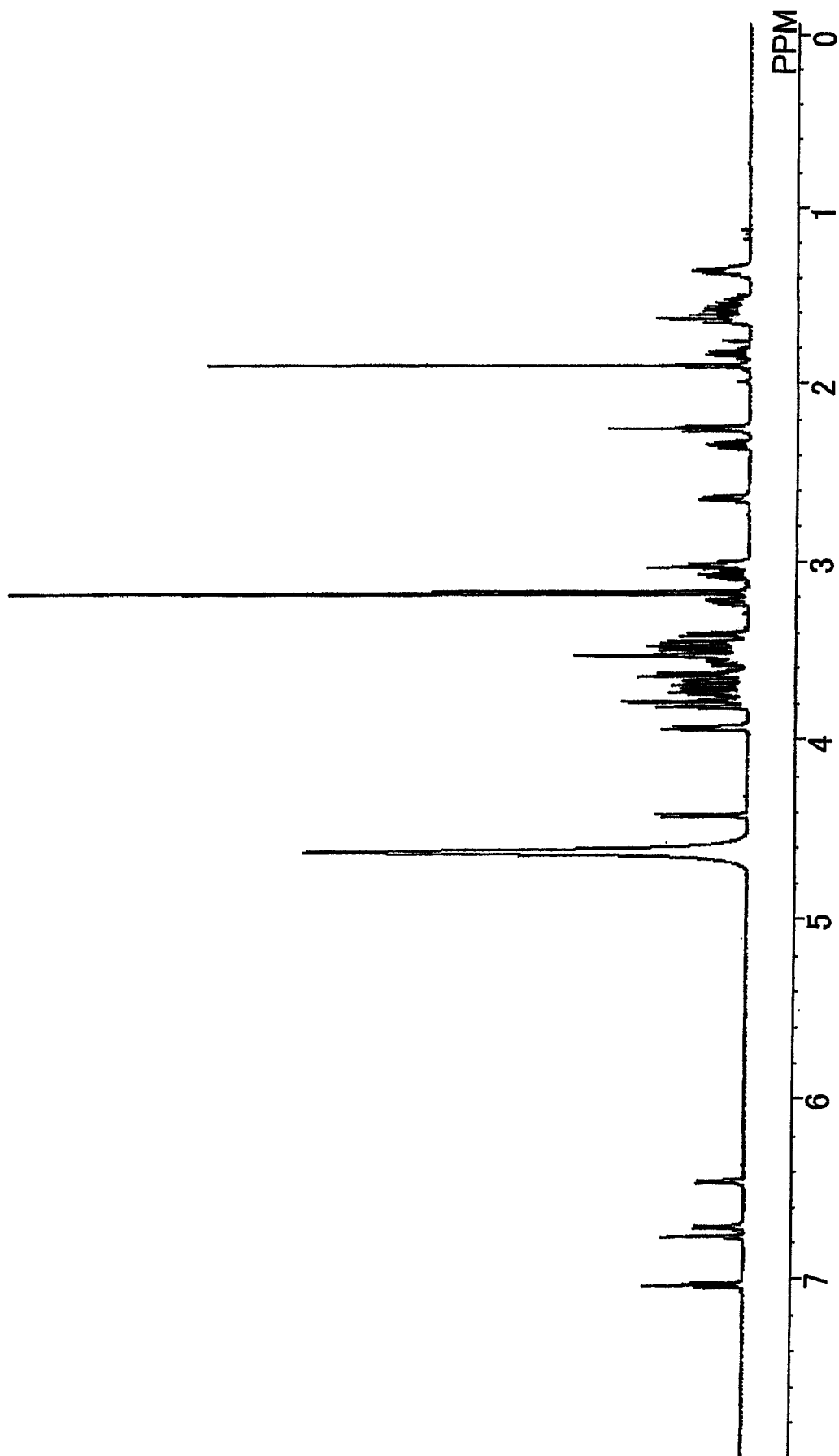


图 23

专利名称(译)	糖链配体络合物和利用该配体络合物的蛋白质的分析方法		
公开(公告)号	CN1930179A	公开(公告)日	2007-03-14
申请号	CN200580005186.9	申请日	2005-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 国立大学法人鹿儿岛大学		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 国立大学法人鹿儿岛大学		
[标]发明人	隅田泰生		
发明人	隅田泰生		
IPC分类号	C07H15/04 C07D339/04 G01N27/62 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 C07H15/04 G01N33/52 G01N2400/00		
代理人(译)	周春发		
优先权	2004041994 2004-02-18 JP		
其他公开文献	CN1930179B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供能够有效应用于蛋白质的功能分析的新型配体络合物、配体载体以及蛋白质的分析方法。一种配体络合物，其特征在于：具备以通式(1)，(式中，n，q各自分别为0~6的整数)表示的结构，作为上述X，具备末端存在芳香族氨基，同时含1条或2条或3条主链还可以具有碳—氮键的烃衍生链而形成的结构，作为上述Y，具备硫原子或含硫原子的烃结构，作为上述Z，具有连接子化合物与具有还原末端的糖通过上述芳香族氨基连接的结构，其中，所述连接子化合物具备含碳—碳键或碳—氧键的直链结构。

