



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0108074
(43) 공개일자 2023년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 245/04 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 245/04 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0003430
(22) 출원일자 2022년01월10일
심사청구일자 2022년01월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
이준석
서울특별시 성북구 월곡로 14길 25, 109-1601
박승빈
서울특별시 강남구 언주로146길 18 (논현동 동현
아파트) 6동 508호
코조리즈 코스탄틴
서울특별시 성북구 화랑로 94-12, 403호 (하월곡
동)
(74) 대리인
위병갑

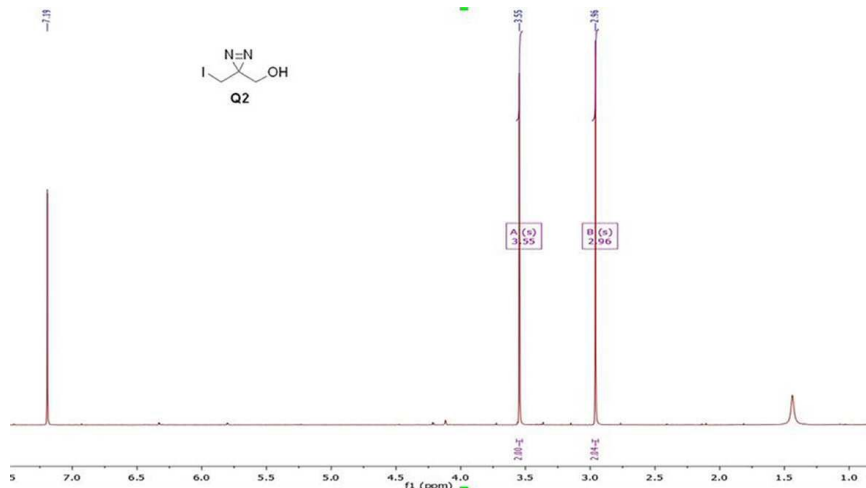
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 다이아지린 분자를 이용한 광친화성 표지 복합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 다이아지린계 화합물, 이의 제조방법, 이를 이용한 광친화성 표지용 조성물 및 단백질을 광표지하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에서 새롭게 합성된 다이아지린계 화합물은 분자구조가 짧고 간단하여, 효율적인 구조적 변화 유도가 가능하며, 특정 분자 또는 단백질과 결합시 용이성 및 안정성을 가지므로, 광친화성 표지로서 유용한 효과가 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	711129351
과제번호	2018M3A9H4079286
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(원천)바이오의료기술개발사업
연구과제명	화학프로브 기반 숙주세포 단백질 프로파일링 기술개발 및 이를 활용한 AI 감염기전

연구

기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106414
과제번호	2020R1A2C200442212
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)(유형1-2)중견연구
연구과제명	저분자 프로브를 이용한 RNA epigenetics profiling 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

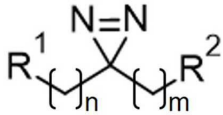
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 다이아지린(Diazirine)계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에 있어서,

상기 R¹은 할로젠, 아지도 또는 C₁-C₅의 알킬옥시카보닐이고;

상기 R²는 C₁-C₅의 하이드록시알킬, 카복실, C₁-C₅의 알킬옥시카보닐, 또는 C₂-C₅의 알카이닐이고;

상기 n은 1 내지 10의 정수이고;

상기 m은 0 내지 9의 정수이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R¹은 아이오도, 아지도 또는 -C(=O)-OCH₂CH₃이고;

상기 R²는 -CH₂OH, 카복실, -C(=O)-OCH₂CH₃, 또는 프로파길이고;

상기 n은 1 또는 2이고;

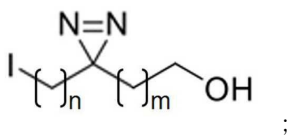
상기 m은 0 또는 1인 것인, 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

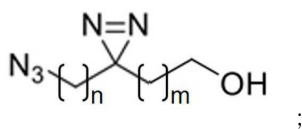
제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 6으로 표시되는 화합물 군으로부터 선택되는 1종인 것인, 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

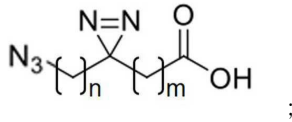
[화학식 2]



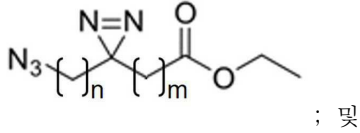
[화학식 3]



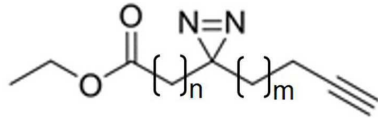
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



(상기 화학식 2 내지 6에 있어서,

상기 n 및 m은 각각 제1항에서 정의한 바와 같다).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화학식 2 내지 3으로 표시되는 화합물은 화학식 4로 표시되는 화합물을 합성하기 위한 중간체 화합물인 것을 특징으로 하는, 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 화학식 2 내지 4로 표시되는 화합물은 화학식 5로 표시되는 화합물을 합성하기 위한 중간체 화합물인 것을 특징으로 하는, 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는, 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

- 1) (3-(아이오도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올;
- 2) (3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올;
- 3) 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실산;
- 4) 에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트;
- 5) 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올; 및
- 6) 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트.

청구항 7

제1항의 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법으로서,

하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

화학식 7로 표시되는 화합물을 암모니아(ammonia) 용액을 혼합하여 반응시키고, 하이드록시아민-O-설페이트산(hydroxylamine-O-sulfonicacid) 및 유기용매를 첨가하여 반응시킨 뒤, 트리에틸아민(TEA) 및 아이오딘(I₂)을

첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 8로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1);

화학식 8로 표시되는 화합물에 이미다졸(imidazole), 트리페닐포스핀(triphenylphosphine) 및 유기용매를 혼합하고, 아이오딘(I_2)을 첨가하여 반응시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 2);

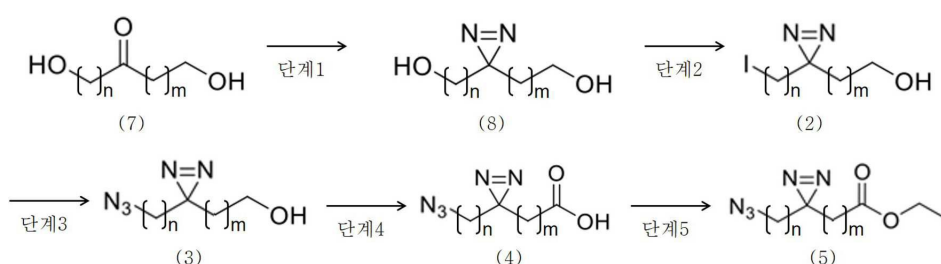
화학식 2로 표시되는 화합물에 아지드화 나트륨(sodium azide) 및 유기용매를 혼합하여 반응시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 3);

화학식 3으로 표시되는 화합물에 유기용매 및 존스 시약(Jones reagent)을 혼합하여 반응시켜 화학식 4로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 4); 및

화학식 4로 표시되는 화합물에 염화마그네슘($MgCl_2$), 디에틸피로카보네트(Diethylpyrocarbonate)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 5);를 포함하고,

상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은, 단계 2 내지 단계 4에서 각각 얻어진 중간체 화합물 또는 단계 5에서 얻어진 최종 화합물인 것인, 제1항의 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에 있어서,

상기 n 및 m은 각각 제1항에서 정의한 바와 같다).

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 단계 1 내지 단계 5의 유기용매는 독립적으로 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 디클로로메탄(DCM), 디메틸포름아미드(DMF), 아세톤, 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, 헥산, 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO) 및 클로로벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 제조방법.

청구항 9

제1항의 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법으로서,

하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

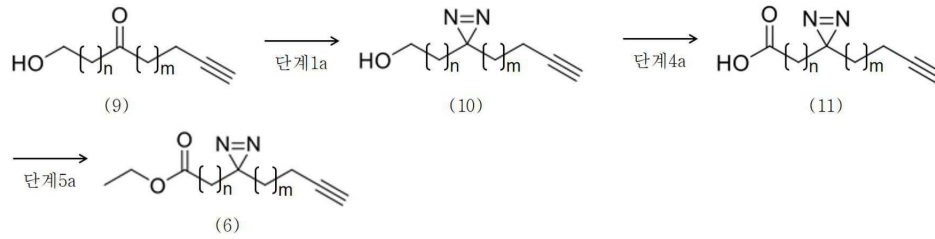
화학식 9로 표시되는 화합물을 암모니아(ammonia) 용액을 혼합하여 반응시키고, 하이드록시아민-O-설페이트산(hydroxylamine-O-sulfonic acid) 및 유기용매를 첨가하여 반응시킨 뒤, 트리에틸아민(TEA) 및 아이오딘(I_2)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 10으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1a);

화학식 10으로 표시되는 화합물에 유기용매 및 존스 시약(Jones reagent)을 혼합하여 반응시켜 화학식 11로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 4a); 및

화학식 11로 표시되는 화합물에 염화마그네슘($MgCl_2$), 디에틸피로카보네트(Diethylpyrocarbonate)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 5a);를 포함하고,

상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은, 단계 5a에서 얻어진 최종 화합물인 것인, 제1항의 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법:

[반응식 2]



(상기 반응식 2에 있어서,

상기 n 및 m은 각각 제1항에서 정의한 바와 같다).

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단계 1a, 단계 4a 및 단계 5a의 유기용매는 독립적으로 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 디클로로메탄(DCM), 디메틸포름아미드(DMF), 아세톤, 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, 헥산, 디이소프로필 에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO) 및 클로로벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 제조방법.

청구항 11

제1항의 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 광친화성 표지(Photo-affinity tag)용 조성물.

청구항 12

제1항의 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 단백질을 포함하는 시료에 처리하는 단계; 및

300 내지 380nm 파장의 자외선(UV)을 포함하는 광을 조사하는 단계;를 포함하는, 단백질을 광표지하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광친화성 표지(Photo-affinity tag)를 위한 다이아지린(Diazirine)계 화합물, 이의 제조방법, 이를 이용한 광친화성 표지용 조성물 및 단백질을 광표지하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광친화성 표지(Photo-affinity tag)는 복합체 중 광 노출로 특정 광반응 부분의 분리, 이 후 공유결합으로 단백질과의 결합을 유도하는 기술이다. Photo-affinity tag가 가능한 복합체는 생체외 타겟 물질을 시각화할 수 있으며, 광 노출로 인한 복합체의 특정 부위의 분리 후 단백질과의 결합 시에는 공유결합을 통해 다른 결합 기술에 비해 견고한 결합을 하게되고, 이러한 기술을 이용하여 단백질-단백질간의 상호작용 또는 다른 복합체간의 권유제이션의 확인에도 용이하게 사용되어지고 있다.

[0003] 광가교결합(photo-crosslinking)을 통하여 형광 프로브로 합성되는 화합물들은 모두 광반응 그룹을 가져 광친화성 라벨링(photo-affinity labeling)에 관여할 수 있다. 광가교결합의 광 반응그룹을 종류별로 분류하면, 벤조페논(benzophenone), 아릴 아지드(aryl azide), 다이아지린(diazirine)이 주로 사용되고 있다.

[0004] 종래의 기술은 대부분 azide 또는 Benzophenone을 Photo-affinity tag로 이용하고 있으나, 이들은 세포에 대한 위해성이 크며, 상기 Photo-affinity tag 이외의 단백질 간의 상호 작용을 확인하기 위해서는 많은 실험 과정을 거쳐야 하는 문제점이 존재하였다. 한편, 광친화성 표지 기술에 사용되는 Azide, Benzophenone, Diazirine 분자들 중 Diazirine 분자는 사용시 독성이 낮으며, 상대적으로 짧은 구조의 복합체로 합성이 가능하다는 이점이 있

다. 그러나, 기존에 사용된 Diazirine 이용 Photo-affinity tag 복합체의 경우 비교적 분자의 크기가 크다는 문제가 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제를 해결하고자 보다 작은 크기의 복합체를 합성하기 위하여 연구한 결과, 다이아지린(diazirine) 분자를 이용한 신규한 광친화성 표지 복합체를 제조하였으며, 합성된 복합체가 기존 Photo-affinity tag에 사용되는 Azide, Benzophenone에 비하여 작은 분자 구조를 가지고 있으며, 355nm의 광원에 반응하므로 세포에 대한 위해도가 낮고, 구조적 안정성 및 작용 효율성과 구조적 변화의 효율성이 용이한 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2017-0058377호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 광친화성 표지로서 유용성을 갖는 신규한 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

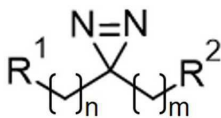
[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 이용한 광친화성 표지(Photo-affinity tag)용 조성물 및 단백질을 광표지하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0012] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 다이아지린(Diazirine)계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0013] [화학식 1]



[0014]

(상기 화학식 1에 있어서,

[0016] 상기 R¹은 할로젠, 아지도 또는 C₁-C₅의 알킬옥시카보닐이고;

[0017] 상기 R²는 C₁-C₅의 하이드록시알킬, 카복실, C₁-C₅의 알킬옥시카보닐, 또는 C₂-C₅의 알카이닐이고;

[0018] 상기 n은 1 내지 10의 정수이고;

[0019] 상기 m은 0 내지 9의 정수이다).

[0021] 또한, 본 발명은 상기 다이아지린계 화합물의 제조방법으로서, 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0022] 화학식 7로 표시되는 화합물을 암모니아(ammonia) 용액을 혼합하여 반응시키고, 하이드록시아민-0-설페이트산(hydroxylamine-0-sulfonicacid) 및 유기용매를 첨가하여 반응시킨 뒤, 트리에틸아민(TEA) 및 아이오딘(I₂)을

첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 8로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1);

[0023] 화학식 8로 표시되는 화합물에 이미다졸(imidazole), 트리페닐포스핀(triphenylphosphine) 및 유기용매를 혼합하고, 아이오딘(I_2)을 첨가하여 반응시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 2);

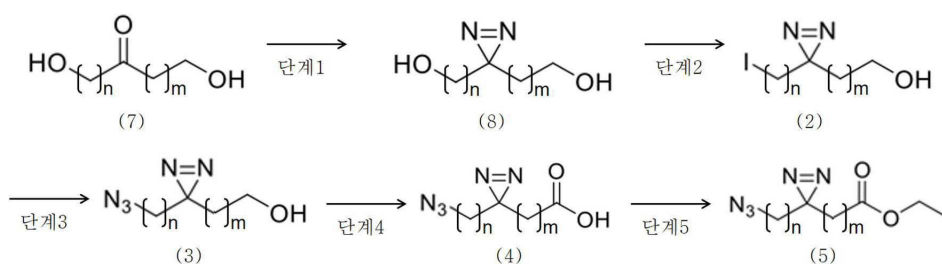
[0024] 화학식 2로 표시되는 화합물에 아지드화 나트륨(sodium azide) 및 유기용매를 혼합하여 반응시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 3);

[0025] 화학식 3으로 표시되는 화합물에 유기용매 및 존스 시약(Jones reagent)을 혼합하여 반응시켜 화학식 4로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 4); 및

[0026] 화학식 4로 표시되는 화합물에 염화마그네슘($MgCl_2$), 디에틸피로카보네트(Diethylpyrocarbonate)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 5);를 포함하고,

[0027] 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은, 단계 2 내지 단계 4에서 각각 얻어진 중간체 화합물 또는 단계 5에서 얻어진 최종 화합물인 것인, 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0028] [반응식 1]



[0029]

[0030] (상기 반응식 1에 있어서,

[0031] 상기 n은 1 내지 10의 정수이고;

[0032] 상기 m은 0 내지 9의 정수이다).

[0034] 나아가, 본 발명은 상기 다이아지린계 화합물의 제조방법으로서, 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

[0035] 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

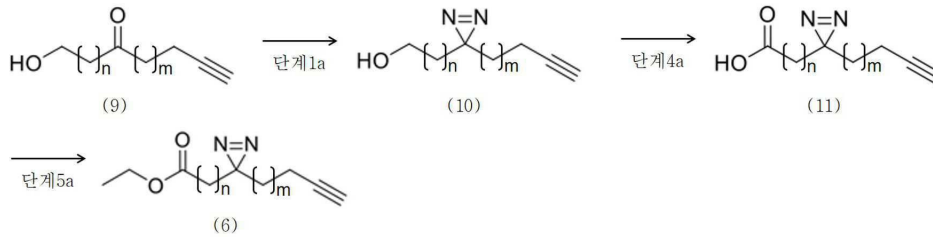
[0036] 화학식 9로 표시되는 화합물을 암모니아(ammonia) 용액을 혼합하여 반응시키고, 하이드록시아민-O-설페이트산(hydroxylamine-O-sulfonicacid) 및 유기용매를 첨가하여 반응시킨 뒤, 트리에틸아민(TEA) 및 아이오딘(I_2)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 10으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1a);

[0037] 화학식 10으로 표시되는 화합물에 유기용매 및 존스 시약(Jones reagent)을 혼합하여 반응시켜 화학식 11로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 4a); 및

[0038] 화학식 11로 표시되는 화합물에 염화마그네슘($MgCl_2$), 디에틸피로카보네트(Diethylpyrocarbonate)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 5a);를 포함하고,

[0039] 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은, 단계 5a에서 얻어진 최종 화합물인 것인, 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0040] [반응식 2]



[0041]

[0042] (상기 반응식 2에 있어서,

[0043] 상기 n은 1 내지 10의 정수이고;

[0044] 상기 m은 0 내지 9의 정수이다).

[0046] 더 나아가, 본 발명은 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 광친화성 표지(Photo-affinity tag)용 조성물을 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 단백질을 포함하는 시료에 처리하는 단계; 및 300 내지 380nm 파장의 자외선(UV)을 포함하는 광을 조사하는 단계;를 포함하는, 단백질을 광표지하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에서 새롭게 합성된 복합체는 단백질과 결합하여 특정 단백질과의 특이적 결합이 가능하며, 특정 단백질과 리간드 간의 결합이 가능하다. 본 발명의 복합체는 기존의 복합체에 비하여 상대적으로 간단한 구조를 가지고 있으며, 짧은 분자구조를 가지고 있으므로, 작용의 효율성 또한 더 높고, 특정 분자와의 결합 시 유리함과 더불어 구조적 안정성을 갖는 효과가 있을 뿐만 아니라, 더 나아가 효율적인 구조적 변화를 유도할 수 있으며, 새로운 구조의 합성에 이용하기에도 용이한 효과가 있다. 또한, 본 발명에서 사용되는 복합체의 광 노출 파장은 355nm 이므로, 단백질 구조에 있어서 상대적으로 위해성이 낮으며, 세포에 대한 위해도가 낮다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 화합물 Q1의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 화합물 Q2의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 화합물 Q3의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 화합물 Q4의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 화합물 Q5의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 화합물 A1의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 화합물 A2의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 화합물 A3의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 화합물 A4의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 화합물 Z1의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 화합물 Z2의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 화합물 Z3의 ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d)분광분석을 이용한 프로톤 분석 결과를 나타낸 스펙트럼 및 이를 통해 확인된 화학구조를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 화합물 Z3의 처리에 따른 단백질 표지 가능 여부를 확인한 결과를 나타낸 PAGE 이미지이다 (lane 1: control, lane 2: Z3 (200 μM) without UV, lane 3: Z3 (200 μM) with 365nm UV).

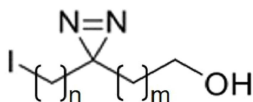
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0053] 본 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0054] 본 명세서의 구조식에서, 원자 및/또는 치환기(group)를 결합하는 기호 "-"는 단일 결합, 기호 "="는 이중 결합, 기호 " $\equiv$ "는 삼중 결합을 의미할 수 있다. 상기 기호는 생략될 수 있으며, 결합 원자 또는 결합 위치를 특정하는 경우 등 필요한 경우 표시될 수도 있다.
- [0055] 본 명세서에서 "치환되거나 비치환된"은 다른 기재가 없는 한 하나 또는 복수의 수소 원자가 다른 원자 또는 치환기로 치환되거나 치환되지 않은 것을 의미할 수 있다. 치환기는 예를 들어 할로젠, 하이드록시, 치환된 하이드록시, 아실옥시, 아미노, 치환된 아미노, 아미도, 시아노, 니트로, 구아니디노, 아미디노, 머캅토, 치환된 머캅토, 카복실, 설폰일옥시, 카보닐, 벤질옥시, 아릴, 헤테로아릴, 카보사이클릴, 헤테로사이클릴, 또는 보호기로 적절하게 보호될 수 있는 다른 작용기를 포함 할 수 있다.
- [0056] 본 명세서에서, "알킬"은, 다른 기재가 없는 한, 치환되거나 비치환된 직쇄 또는 분지쇄의 비고리형; 고리형; 또는 이들이 결합된 포화 탄화수소를 의미할 수 있다. 또한, " $\text{C}_x\text{-C}_y$ 알킬"은 탄소 원자를 x 내지 y개 포함하는 알킬을 의미할 수 있다. 비고리형 알킬은, 일 예로서, 메틸, 에틸, N-프로필, N-부틸, N-펜틸, N-헥실, N-헵틸, N-옥틸, 아이소프로필, 2급(sec)-부틸, 아이소부틸, 3급(tert)-부틸, 아이소펜틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸, 2,3-다이메틸부틸 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 고리형 알킬은, 일 예로서, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 또는 사이클로옥틸 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 비고리형과 고리형 알킬이 결합된 알킬은, 예를 들어, 메틸사이클로프로필, 사이클로프로필메틸, 에틸사이클로프로필, 사이클로프로필에틸, 메틸사이클로부틸, 사이클로부틸메틸, 에틸사이클로펜틸, 또는 사이클로펜틸메틸 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 명세서에서, "할로젠"은, 플루오로(F), 클로로(Cl), 브로모(Br) 또는 아이오도(I)를 의미할 수 있다.
- [0058] 본 명세서에서, "카복실"은 $-(\text{C}(=\text{O})-\text{OH})$ 를 의미한다.
- [0059] 본 명세서에서, "아지도"는, 세 개의 질소 원자가 직선적으로 같은 간격으로 늘어선 아자이드(azide) 치환기, $-\text{N}_3$ ($-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$, 또는 $-\text{N}^--\text{N}^+=\text{N}^-$ 으로도 표기됨)를 의미한다.
- [0060] 본 명세서에서, "알킬옥시카보닐"은 $-(\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{알킬})$ 을 의미할 수 있으며, 여기서 알킬은 상기에서 정의된 바와 같다. 또한, " $\text{C}_1\text{-C}_5$ 의 알킬옥시카보닐"은 $\text{C}_1\text{-C}_5$ 의 알킬을 함유하는 카보닐옥시, 즉, $-(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_1\text{-C}_5\text{알킬}))$ 을 의미할 수 있으며, 일 예로서, 메틸카보닐옥시(아세트옥시, $-(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3)$), 에틸카보닐옥시, n-프로필카보닐옥시, 아이소-프로필카보닐옥시, n-부틸카보닐옥시, sec-부틸카보닐옥시, 아이소부틸카보닐옥시, tert-부틸카보닐옥시, 사이클로프로필카보닐옥시, 사이클로부틸카보닐옥시, 사이클로펜틸카보닐옥시 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

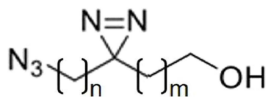
- [0061] 본 명세서에서, "하이드록시알킬"은 알킬알코올 치환기, 즉, -(알킬-OH)을 의미할 수 있으며, 여기서 알킬은 상기에서 정의된 바와 같다. 또한, "C₁-C₅의 하이드록시알킬"은 하이드록시기가 결합된 C₁-C₅의 알킬, 즉, -((C₁-C₅알킬)-OH)을 의미할 수 있으며, 일 예로서, -CH₂-OH, -(CH₂)₂-OH, -(CH₂)₃-OH, -(CH₂)₄-OH, 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 명세서에서, "아민"은 암모니아의 유도체로서, 특별한 기재가 없는 한 수소 원자가 들어갈 자리에 알킬 등과 같은 치환기로 대체된 형태를 의미할 수 있고, 상기 암모니아에서 하나의 수소가 치환기로 대체된 경우를 1차 아민, 두 개의 수소가 치환기로 대체된 경우를 2차 아민, 세 개의 수소가 치환기로 대체된 경우를 3차 아민이라고 한다. 일 예로서, 메틸아민, 디메틸아민, 아닐린(aniline), 3-나이트로아닐린 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명에서 사용되는, 용어 "알카이닐"은 한 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합(C≡C)을 갖는 치환되거나 비치환된 직쇄, 분지쇄의 비고리형 또는 고리형의 탄화수소를 의미할 수 있다. 또한, "C₂-C₅ 알카이닐"은 탄소 원자를 2 내지 5개 포함하는 알카이닐을 의미할 수 있으며, 일 예로서, 1-프로파이닐, 2-프로파이닐(또는 프로파길이라고도 함), 1-부타이닐, 2-부타이닐 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0066] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0068] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 다이아지린(Diazirine)계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다:
- [0069] [화학식 1]
-
- [0070]
- [0071] (상기 화학식 1에 있어서,
- [0072] 상기 R¹은 할로젠, 아지도 또는 C₁-C₅의 알킬옥시카보닐이고;
- [0073] 상기 R²는 C₁-C₅의 하이드록시알킬, 카복실, C₁-C₅의 알킬옥시카보닐, 또는 C₂-C₅의 알카이닐이고;
- [0074] 상기 n은 1 내지 10의 정수이고;
- [0075] 상기 m은 0 내지 9의 정수이다).
- [0077] 바람직하게는, 상기 R¹은 할로젠, 아지도 또는 C₁-C₄의 알킬옥시카보닐이고; 상기 R²는 C₁-C₃의 하이드록시알킬, 카복실, C₁-C₄의 알킬옥시카보닐, 또는 C₂-C₄의 알카이닐이고; 상기 n은 1 내지 5의 정수이고; 상기 m은 0 내지 4의 정수인 것일 수 있다.
- [0078] 더욱 바람직하게는, 상기 R¹은 아이오도, 아지도 또는 -C(=O)-OCH₂CH₃이고; 상기 R²는 -CH₂OH, 카복실, -C(=O)-OCH₂CH₃, 또는 프로파길이고; 상기 n은 1 또는 2이고; 상기 m은 0 또는 1인 것일 수 있다.
- [0079] 보다 더 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 6으로 표시되는 화합물 군으로

부터 선택되는 1종인 것일 수 있다:

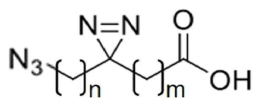
[화학식 2]



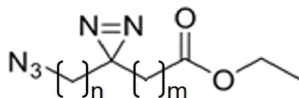
[화학식 3]



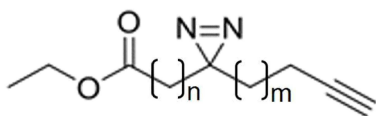
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



(상기 화학식 2 내지 6에 있어서,

상기 n은 1 내지 10의 정수이고; 상기 m은 0 내지 9의 정수인 것일 수 있다).

상기 화학식 2 내지 5에 있어서, 바람직하게는, 상기 n은 1 내지 5의 정수이고; 상기 m은 0 내지 4의 정수인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 상기 n은 1 또는 2이고; 상기 m은 0 또는 1인 것일 수 있다. 이때, 상기 m은 n-1의 정수인 것일 수 있다.

상기 화학식 6에 있어서, 바람직하게는, 상기 n은 1 내지 4의 정수이고; 상기 m은 0 내지 4의 정수인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 상기 n은 1 또는 2이고; 상기 m은 0 또는 1인 것일 수 있고, 보다 더 바람직하게는, 상기 n 및 m은 각각 1인 것일 수 있다.

상기 화학식 2 내지 3으로 표시되는 화합물은 화학식 4로 표시되는 화합물을 합성하기 위한 중간체 화합물인 것일 수 있다.

상기 화학식 2 내지 4로 표시되는 화합물은 화학식 5로 표시되는 화합물을 합성하기 위한 중간체 화합물인 것일 수 있다.

특히 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 1종인 것일 수 있다:

1) (3-(아이오도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올;

2) (3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올;

3) 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실산;

4) 에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트;

- [0101] 5) 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올; 및
- [0102] 6) 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트.

[0104] 본 발명의 일실시예에서는, 광친화성 표지 복합체로서 유용할 수 있는 다이아지린계 화합물을 개발하기 위해 연구한 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물로서, 신규한 화합물 1 내지 6(화합물 Q2, Q3, Q4, Q5, A4 및 Z3, 하기 표 1 참조)을 합성하였다.

표 1

[0105]

화합물	화학구조	화합물명	화합물	화학구조	화합물명
화합물 1 (실시예 1의 Q2)		(3-(아이오도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올 [(3-(iodomethyl)-3H-diazirin-3-yl)methanol]	화합물 4 (실시예 4의 Q5)		에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트 [ethyl 3-(azidomethyl)-3H-diazirin-3-carboxylate]
화합물 2 (실시예 2의 Q3)		(3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올 [(3-(azidomethyl)-3H-diazirin-3-yl)methanol]	화합물 5 (실시예 5의 A4)		2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)아세트산 [2-(3-(2-azidoethyl)-3H-diazirin-3-yl)acetic acid]
화합물 3 (실시예 3의 Q4)		3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실산 [3-(azidomethyl)-3H-diazirin-3-carboxylic acid]	화합물 6 (실시예 6의 Z3)		에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트 [ethyl 2-(3-(but-3-yn-1-yl)-3H-diazirin-3-yl)acetate]

[0107] 본 발명에서 새롭게 합성된 상기 다이아지린계 화합물은 단백질과 결합하여 특정 단백질과의 특이적 결합이 가능하며, 특정 단백질과 리간드 간의 결합이 가능하다. 본 발명의 상기 화합물은 기존의 복합체에 비하여 상대적으로 간단한 구조를 가지고 있으며, 짧은 분자구조를 가지고 있으므로, 작용의 효율성 또한 더 높고, 특정 분자와의 결합 시 유리함과 더불어 구조적 안정성을 갖는 효과가 있을 뿐만 아니라, 더 나아가 효율적인 구조적 변화를 유도할 수 있으며, 새로운 구조의 합성에 이용하기에도 용이한 효과가 있다. 또한, 본 발명에서 사용되는 상기 화합물을 이용한 광친화성 표지 복합체의 광 노출 파장은 355nm 이므로, 단백질 구조에 있어서 상대적으로 위해성이 낮으며, 세포에 대한 위해도가 낮다.

[0109] 본 발명의 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 유효물질의 염기 화합물의 이론적인 효능을 떨어뜨리지 않는 유효물질의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레인산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레인산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이셀

페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

[0110] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0111] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0112] 나아가, 본 발명의 화합물은 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 이성질체, 광학 이성질체 등을 모두 포함한다.

[0114] 일 측면에서, 본 발명은 상기 다이아지린계 화합물의 제조방법으로서, 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0115] 화학식 7로 표시되는 화합물을 암모니아(ammonia) 용액을 혼합하여 반응시키고, 하이드록시아민-O-설페이트산(hydroxylamine-O-sulfonic acid) 및 유기용매를 첨가하여 반응시킨 뒤, 트리에틸아민(TEA) 및 아이오딘(I₂)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 8로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1);

[0116] 화학식 8로 표시되는 화합물에 이미다졸(imidazole), 트리페닐포스핀(triphenylphosphine) 및 유기용매를 혼합하고, 아이오딘(I₂)을 첨가하여 반응시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 2);

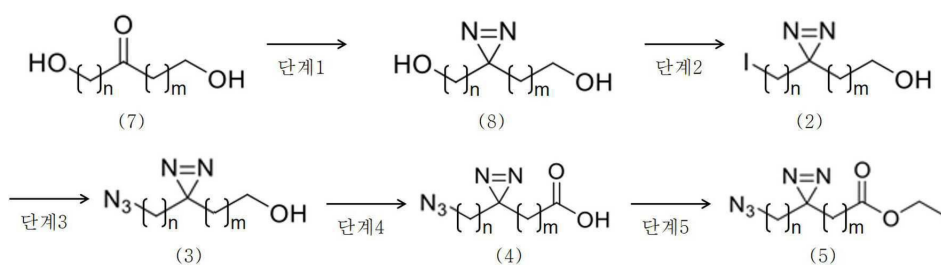
[0117] 화학식 2로 표시되는 화합물에 아지드화 나트륨(sodium azide) 및 유기용매를 혼합하여 반응시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 3);

[0118] 화학식 3으로 표시되는 화합물에 유기용매 및 존스 시약(Jones reagent)을 혼합하여 반응시켜 화학식 4로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 4); 및

[0119] 화학식 4로 표시되는 화합물에 염화마그네슘(MgCl₂), 디에틸피로카보네이트(Diethylpyrocarbonate)를 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 5);를 포함하고,

[0120] 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은, 단계 2 내지 단계 4에서 각각 얻어진 중간체 화합물 또는 단계 5에서 얻어진 최종 화합물인 것인, 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

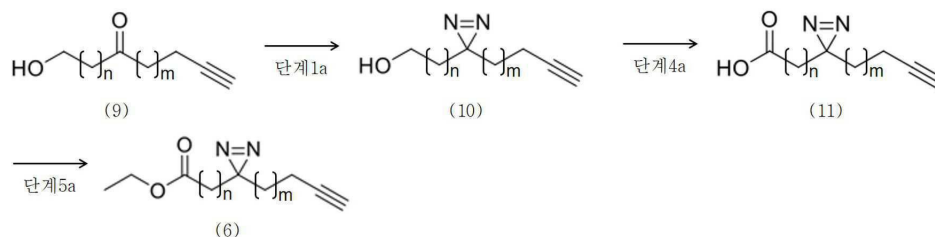
[0121] [반응식 1]



[0122]

- [0123] (상기 반응식 1에 있어서,
- [0124] 상기 n은 1 내지 10의 정수이고;
- [0125] 상기 m은 0 내지 9의 정수이다).
- [0127] 상기 반응식 1에 있어서, 바람직하게는, 상기 n은 1 내지 5의 정수이고; 상기 m은 0 내지 4의 정수인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 상기 n은 1 또는 2이고; 상기 m은 0 또는 1인 것일 수 있다. 이때, 상기 m은 n-1의 정수인 것일 수 있다.
- [0128] 특히 바람직하게는, 상기 반응식 1에 나타난 바와 같은 제조방법에 의해 얻을 수 있는 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물인 것일 수 있다:
- [0129] 1) (3-(아이오도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올;
- [0130] 2) (3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올;
- [0131] 3) 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실산;
- [0132] 4) 에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트; 및
- [0133] 5) 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올.
- [0135] 상기 반응식 1에 있어서, 상기 단계 1 내지 단계 5의 유기용매는 독립적으로 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 디클로로메탄(DCM), 디메틸포름아미드(DMF), 아세톤, 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, 헥산, 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO) 및 클로로벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0136] 바람직하게는, 상기 단계 1 내지 단계 5의 유기용매는 독립적으로 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 디클로로메탄(DCM), 디메틸포름아미드(DMF) 및 아세톤으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 디클로로메탄(DCM), 디메틸포름아미드(DMF) 및 아세톤으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있다.
- [0137] 특히 바람직하게는, 단계 1의 유기용매는 메탄올(MeOH), 단계 2의 유기용매는 디클로로메탄(DCM), 단계 3의 유기용매는 디메틸포름아미드(DMF), 단계 4의 유기용매는 아세톤, 단계 5의 유기용매는 에탄올(EtOH)일 수 있다.
- [0138] 상기 반응식 1에 있어서, 상기 단계 1 내지 단계 5는 독립적으로 반응 이후 용매/용액을 건조, 증발 또는 제거하는 단계; 필터링하는 단계; 세척하는 단계; 물, 에틸아세테이트(EtOAc) 또는 디클로로메탄(DCM)으로 희석하는 단계; 에틸아세테이트로 추출하는 단계; 유기층(organic layer)을 건조 및 증발시키는 단계; 및 컬럼 크로마토그래피 등을 이용하여 반응물을 정제하는 단계; 등의 공정을 일부 또는 전부를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0140] 일 측면에서, 본 발명은 상기 다이아지린계 화합물의 제조방법으로서, 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,
- [0141] 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,
- [0142] 화학식 9로 표시되는 화합물을 암모니아(ammonia) 용액을 혼합하여 반응시키고, 하이드록시아민-O-설페이트산(hydroxylamine-O-sulfonicacid) 및 유기용매를 첨가하여 반응시킨 뒤, 트리에틸아민(TEA) 및 아이오딘(I₂)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 10으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1a);
- [0143] 화학식 10으로 표시되는 화합물에 유기용매 및 존스 시약(Jones reagent)을 혼합하여 반응시켜 화학식 11로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 4a); 및
- [0144] 화학식 11로 표시되는 화합물에 염화마그네슘(MgCl₂), 디에틸피로카보네트(Diethylpyrocarbonate)을 첨가하여 유기용매에서 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 5a);를 포함하고,
- [0145] 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은, 단계 5a에서 얻어진 최종 화합물인 것인, 상기 화학식 1로 표시되는 다이아지린계 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0146] [반응식 2]



[0147]

[0148] (상기 반응식 2에 있어서,

[0149] 상기 n은 1 내지 10의 정수이고;

[0150] 상기 m은 0 내지 9의 정수이다).

[0152] 상기 반응식 2에 있어서, 바람직하게는, 상기 n은 1 내지 4의 정수이고; 상기 m은 0 내지 4의 정수인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 상기 n은 1 또는 2이고; 상기 m은 0 또는 1인 것일 수 있고, 보다 더 바람직하게는, 상기 n 및 m은 각각 1인 것일 수 있다.

[0153] 특히 바람직하게는, 상기 반응식 2에 나타난 바와 같은 제조방법에 의해 얻을 수 있는 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물인 것일 수 있다:

[0154] 6) 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트.

[0156] 상기 반응식 2에 있어서, 상기 단계 1a, 단계 4a 및 단계 5a의 유기용매는 독립적으로 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 디클로로메탄(DCM), 디메틸포름아미드(DMF), 아세톤, 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, 헥산, 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO) 및 클로로벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0157] 바람직하게는, 상기 단계 1a, 단계 4a 및 단계 5a의 유기용매는 독립적으로 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH) 및 아세톤으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH) 및 아세톤으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있다.

[0158] 특히 바람직하게는, 단계 1a의 유기용매는 메탄올(MeOH), 단계 4a의 유기용매는 아세톤, 단계 5a의 유기용매는 에탄올(EtOH)일 수 있다.

[0159] 상기 반응식 2에 있어서, 상기 단계 1a, 단계 4a 및 단계 5a는 독립적으로 반응 이후 용매/용액을 건조, 증발 또는 제거하는 단계; 필터링하는 단계; 세척하는 단계; 물, 에틸아세테이트(EtOAc) 또는 디클로로메탄(DCM)으로 희석하는 단계; 에틸아세테이트로 추출하는 단계; 유기층(organic layer)을 건조 및 증발시키는 단계; 및 컬럼 크로마토그래피 등을 이용하여 반응물을 정제하는 단계; 등의 공정을 일부 또는 전부를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0161] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 광친화성 표지(Photo-affinity tag)용 조성물에 관한 것이다.

[0162] 상기 광친화성 표지용 조성물은 단백질을 표지하는 것일 수 있다.

[0163] 상기 단백질은 폴리펩티드 또는 아미노산; 또는 아미노산의 유도체 (예, 5-히드록시트립토판 (5-HTP), 또는 L-디히드록시페닐알라닌 (L-DOPA) 등)을 포함하는 것일 수 있다. 상기 아미노산은 천연 아미노산 또는 인공 아미노산일 수 있다. 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 셀레노시스테인, 아스파라진, 글루타민, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 오르니틴 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 또한, 상기 단백질은 세포 중 단백질일 수 있다. 상기 세포는 박테리아, 식물, 또는 동물 세포일 수 있다. 상기 동물 세포는 예를 들면, HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) 세포, HeLa, Huh7, Huh7.5, 또는 MDCK 세포일 수 있

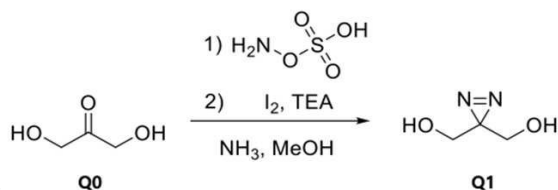
다.

- [0164] 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 단백질과 리간드간의 반응, 바람직하게는 공유결합을 통해 단백질과 결합되어 단백질을 표지(광표지)하는 것일 수 있다.
- [0165] 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 200 내지 400nm 파장의 자외선(UV)을 포함하는 광원에 반응하여 단백질을 표지하는 것일 수 있고, 상기 광의 파장은 바람직하게는 300 내지 380nm, 더욱 바람직하게는 330 내지 370nm일 수 있다. 상기 광은 형광 여기를 위한 광원에서 방출되는 것이면, 어떠한 것이든 이용할 수 있다. 상기 광원은 레이저 광원일 수 있다. 상기 광은 자외선일 수 있다.
- [0166] 상기 광친화성 표지용 조성물에 포함될 수 있는 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 1종인 것이 특히 바람직하다:
- [0167] 4) 에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트;
- [0168] 5) 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올; 및
- [0169] 6) 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트.
- [0171] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 단백질을 포함하는 시료에 처리하는 단계; 및 300 내지 380nm 파장의 자외선(UV)을 포함하는 광을 조사하는 단계;를 포함하는, 단백질을 광표지하는 방법에 관한 것이다.
- [0172] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 단백질을 포함하는 시료에 처리하는 단계; 및 300 내지 380nm 파장의 자외선(UV)을 포함하는 광을 조사하는 단계;를 포함하는, 단백질을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0173] 상기 단백질은 폴리펩티드 또는 아미노산; 또는 아미노산의 유도체 (예, 5-히드록시트리프토판 (5-HTP), 또는 L-디히드록시페닐알라닌 (L-DOPA) 등)을 포함하는 것일 수 있다. 상기 아미노산은 천연 아미노산 또는 인공 아미노산일 수 있다. 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 셀레노시스테인, 아스파라진, 글루타민, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 오르니틴 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 또한, 상기 단백질은 세포 중 단백질일 수 있다. 상기 세포는 박테리아, 식물, 또는 동물 세포일 수 있다. 상기 동물 세포는 예를 들면, HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) 세포, HeLa, Huh7, Huh7.5, 또는 MDCK 세포일 수 있다.
- [0174] 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 단백질과 리간드간의 반응, 바람직하게는 공유결합을 통해 단백질과 결합되어 단백질을 광표지하는 것일 수 있다.
- [0175] 상기 광을 조사하는 단계는 표지자(상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염)와 단백질을 결합시켜 표지자와 단백질의 복합체를 형성시킬 수 있다.
- [0176] 상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 상기 조사된 광에 반응하여 단백질을 표지하는 것일 수 있고, 상기 광의 파장은 바람직하게는 300 내지 380nm, 더욱 바람직하게는 330 내지 370nm일 수 있다. 상기 광은 형광 여기를 위한 광원에서 방출되는 것이면, 어떠한 것이든 이용할 수 있다. 상기 광원은 레이저 광원일 수 있다. 상기 광은 자외선일 수 있다.
- [0177] 상기 단백질을 광표지하는 방법 또는 단백질을 검출하는 방법에 이용될 수 있는 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 1종인 것이 특히 바람직하다:
- [0178] 4) 에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트;
- [0179] 5) 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올; 및
- [0180] 6) 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트.
- [0181] 상기 검출은 광 조사후, 표지자(상기 화합물 1로 표시되는 다이아지린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염)와 단백질의 복합체로부터 방출되는 형광 또는 흡광을 측정하는 것을 통해 수행될 수 있다.

[0183] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0185] <실시예 1> (3-(아이오도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올 (Q2)의 제조

[0186] <1-1> (3H-다이아지린-3,3-다이일)다이메탄올 (Q1)의 제조

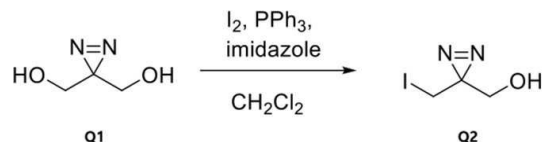


[0187]

[0188] (3H-다이아지린-3,3-다이일)다이메탄올 [(3H-diazirine-3,3-diyl)dimethanol; 화합물 Q1]을 합성하기 위하여, 디하이드록시아세톤(dihydroxyacetone; 화합물 Q0)이 담긴 플라스크에 암모니아 용액(Ammonia solution)을 첨가하여 -10℃의 온도에서 봉입하여 3시간 동안 반응시킨 뒤 하이드록시아민-오-설페이트산(hydroxylamine-O-sulfonic acid, 2.888g, 1.15 eq)이 용해되어있는 15ml 메탄올(MeOH, 15 ml)을 첨가하여 재봉입한 뒤 -10℃에서 1시간 동안 혼합, 반응시켰다. 이 후 상온에서 하루 밤 동안(Overnight) 혼합, 반응시킨 후, 필터링을 하여 다이아지린을 수득하였다. 수득한 침전물은 여과시킨 뒤, 여과물을 다시 압력으로 농축하였다. 건조 후 침전물을 MeOH(40ml)에 다시 용해시키며, 트리에틸아민(Et3N; 4.394g, 2eq)을 0℃에서 첨가하였다. 10분 반응 후, 용액에 산화를 나타내는 탈색화(색변화)가 일어나지 않을 때까지 I₂(6.2 g, 1.1 eq)을 첨가하였다. 혼합물은 1시간 동안 진공상태에서 에어 보르보테이팅을 통해 농축하였다. 농축물을 EtOAc(40 mL)로 희석하고 포화상태의 Na₂S₂O₃로 세척한 후 Organic layer를 Na₂SO₄로 건조시키고 증발시켰다. 이 후 잔류물은 실리카 겔 크로마토그래피(EtOAc: Hexane = 3:7, UV)를 통해 노란색 오일 상태의 화합물 Q1(650mg, 47.4%)를 수득하였다.

[0189] ¹H NMR(400MHz, Chlorform-d) → 3.55(s, 2H), 2.96(s, 2H).

[0191] <1-2> (3-(아이오도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올 (Q2)의 제조

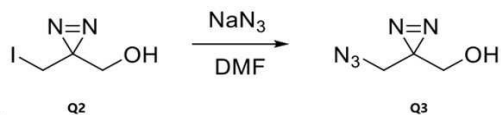


[0192]

[0193] (3-(아이오도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올 [(3-(iodomethyl)-3H-diazirine-3-yl)methanol; 화합물 Q2]의 제조를 위하여, 상기 실시예 1-1에서 수득된 화합물 Q1(660mg, 1eq)에 이미다졸(Imidazole, 511mg, 1.16eq)과 트리페닐포스핀(Triphenylphosphine, 1.696g, 1eq)이 첨가된 DCM(60mL)을 암실 안의 아이스베스에서 혼합하였다. 이 후 아이오딘(Iodine powder, 1.805g, 1.1eq)을 천천히 첨가해준 다음, 하루 밤 동안 실온에서 반응을 시켜 용액을 상온이 되게 만들어주었다. 다시 DCM으로 희석하고 포화상태의 Na₂S₂O₃로 세척하였다. 유기층(Organic layer)은 Na₂SO₄로 건조하고 증발시켰다. 잔류물은 실리카 겔 크로마토그래피(EtOAc: Hexane = 3:7, UV)를 통해 노란색 오일 상태의 화합물 Q2(650mg, 47.4%)를 수득하였다.

[0194] ¹H NMR(400MHz, Chlorform-d) → 3.55(s, 2H), 2.96(s, 2H).

[0196] <실시예 2> (3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올 (Q3)의 제조



[0197]

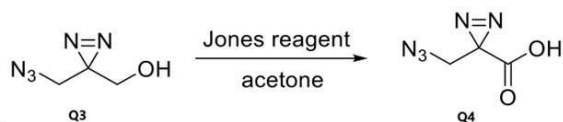
[0198] (3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-일)메탄올 [(3-(azidomethyl)-3H-diazirine-3-yl)methanol; 화합물 Q3]의 합

성을 위하여, 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 제조된 Q2(340mg, 1eq)에 아지드화 나트륨(sodium azide, 520mg, 5eq)가 첨가되어있는 DMF(8mL)을 암실에서 첨가하였다. 상온에서 12시간 동안 교반한 다음, EtOAc(25 mL)로 희석한 뒤 브라인으로 5회 세척하였다. 유기층(Organiclayer)은 Na₂SO₄로 건조, 증발시켰다. 잔류물은 실리카겔 크로마토그래피(EtOAc: Hexane = 3:7, PotassiumPermanganate solution as a stain)를 통해 노란색 오일 상태의 화합물 Q3(160mg, 78.5%)를 얻었다.

[0199] ¹H NMR(400MHz, Chlorform-d) → 3.48(s, 2H), 3.24(s, 2H).

[0201] <실시예 3> 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실산 (Q4)의 제조

[0202]



[0203] 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실산 [3-(azidomethyl)-3H-diazirine-3-carboxylic acid; 화합물 Q4]은 상기 실시예 2의 방법으로 제조된 Q3과 존슨 시약을 이용하여 합성하였다.

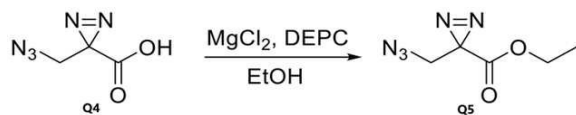
[0204] 먼저, 2.5M 존슨 시약을 준비하였다. 구체적으로, 크로뮴 트리옥사이드(Chromium trioxide, 2.5 g, 0.025 mol)를 50 mL 비커에 넣고 물(7.5 mL)에 녹인 뒤 농축된 황산(Sulfonic acid, 2.5 mL)을 천천히 더하였다. 아이스 워터 베스에서 교반시키며 식혔다. 용액의 온도는 0~5℃로 유지하였다. 이 단계의 용액 농도는 2.5M이다.

[0205] 그 다음, 1mL의 2.5M 존슨 시약(Chromium trioxide - 3eq)를 0℃의 아세톤(Acetone, 5ml, 1eq)에 용해되어있는 Q3(100mg, 1eq)을 첨가하여 15분간 교반시켰다. 반응 혼합물은 상온에서 2시간 동안 교반시킨 후 이소프로판올(Isopropyl alcohol, 5 mL)을 첨가 후 Over Celite 방식으로 필터링하였다. 필터 케이크는 아세톤(Acetone, 5 mL)으로 3회 세척하였고, 이 후 Na₂SO₄으로 건조시켰다. 실리카겔 크로마토그래피(Hexane:EtOAc = 7:3, PotassiumPermanganate solution as a stain)를 통하여 여과, 농축, 정제하여 무색 오일의 화합물 Q4(50mg, 45%)를 얻었다.

[0206] ¹H NMR(400MHz, Chlorform-d) → 1094).

[0208] <실시예 4> 에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트 (Q5)의 제조

[0209]

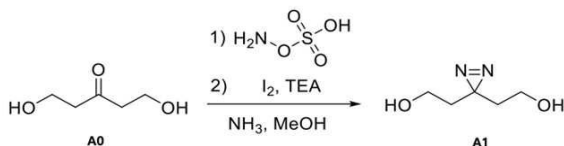


[0210] 에틸 3-(아지도메틸)-3H-다이아지린-3-카복실레이트 [ethyl 3-(azidomethyl)-3H-diazirine-3-carboxylate; 화합물 Q5]는 상기 실시예 4의 방법으로 제조된 Q4를 이용하여 합성하였다. 마그네틱 교반 바가 장착된 바이알에 MgCl₂(3mg, 0.10eq), 디에틸피로카보네이트(Diethylpyrocarbonate, 57mg, 1eq) 및 Q4(50mg, 1eq)를 넣고 에틸알코올(Ethylalcohol, 33mg, 2eq)로 용해하였다. 이 혼합물은 실온에서 24시간 동안 교반시켰다. 반응혼합물은 H₂O(5 mL)로 희석하고 EtOAc(5 mL)로 3회 추출하였다. 유기층을 분리하여, Na₂SO₄로 분리, 건조하여 여과한 후 회전증발로 용제를 제거하였다. 잔류물은 실리카 겔 크로마토그래피(EtOAc: Hexane = 1:10, PotassiumPermanganate solution as a stain)을 통해 무색 오일의 Q5(13mg, 21.7%)를 수득하였다.

[0211] ¹H NMR (400MHz, Cloroform-d) → 4.26 (q, J = 7.1Hz, 2H), 3.61 (s, 2H), 1.32 (s, 1.32).

[0213] <실시예 5> 2-(3-(2-아지도메틸)-3H-다이아지린-3-일)아세트산 (A4)의 제조

[0214] <5-1> 2,2'-(3H-다이아지린-3,3-다이일)비스(에탄-1-올) (A1)의 제조

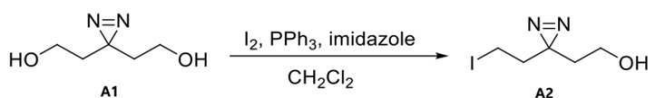


[0215]

[0216] 2,2'-(3H-다이아지린-3,3-다이일)비스(에탄-1-올) [2,2'-(3H-diazirine-3,3-diyl)bis(ethan-1-ol); 화합물 A 1]을 제조하기 위하여, 디하이드록시펜탄(1,5-dihydroxypentan-3-ol, 350mg, 1eq)이 들어 있는 플라스크에 -10℃에서 암모니아 용액(Ammonia solution, 7M in MeOH) 10ml를 첨가하였다. 플라스크를 밀봉하고 혼합물을 -10℃에서 3시간 동안 혼합하였다. 그 다음 하이드록실아민-O-설포닉 산(hydroxylamine-O-sulfonic acid, 385mg, 1.15eq)이 함유된 메탄올(Methanol, 2mL) 용액을 -10℃에서 첨가하였다. 플라스크를 밀봉하여 1시간 동안 혼합물을 교반한 후 혼합물을 상온에서 하룻밤 동안 섞어주어 반응시켰다. 필터링을 거쳐 여과물을 얻어내며, 여과물은 압력으로 농축시켰다. 여기서 수득한 다이아지린(Diazirine) 화합물은 메탄올(Methanol, 10ml)에 다시 용해시켜, 0℃에서 Et3N(600mg, 2eq)을 첨가하였다. 10분 후, 다이아지리딘 중간체가 완전한 산화를 나타내는 탈색화(색변화)가 일어나지 않을 때까지 I2(827mg, 1.1eq)를 첨가하였다. 혼합물은 에어 보르보테이팅을 통해 1시간 동안 교반한 후 진공상태에서 농축하였다. 이 후 EtOAc(20 mL)로 희석한 뒤 포화상태의 Na2S2O3로 세척하였다. 유기층(Organic layer)을 Na2SO4로 건조시키고 증발시켰다. 이 후 잔류물은 실리카겔 크로마토그래피(EtOAc, Potassium Permanganate solution as a stain)를 통해 노란색 오일 상태의 화합물 A1(237mg, 62%)을 수득하였다.

[0217] ¹H NMR(400MHz, Chlorform-d) → 3.58(t, J=5.7Hz, 4H), 2.62(s, 2H), 1.69(t, J=5.7Hz, 4H).

[0219] <5-2> 2-(3-(2-이오도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올 (A2)의 제조

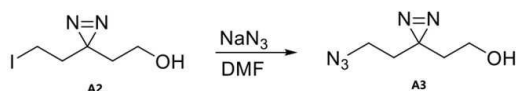


[0220]

[0221] 2-(3-(2-이오도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올 [2-(3-(2-iodoethyl)-3H-diazirine-3-yl)ethan-1-ol; 화합물 A2]을 합성하기 위하여, 상기 실시예 5-1의 방법으로 수득된 A1(237mg, 1eq) 화합물에 이미다졸(Imidazole, 144mg, 1.16eq)과 트리페닐포스핀(Triphenylphosphine, 478mg, 1eq)이 첨가된 DCM(20mL)을 암실 안의 아이스베스에서 혼합하였다. 이 후 아이오딘(Iodine powder, 508mg, 1.1eq)을 천천히 첨가하였다. 하루 밤 동안 실온에서 반응을 시켜 용액을 상온이 되게 만들어준 다음, 다시 DCM으로 희석하고 포화상태의 Na2S2O3로 세척하였다. 유기층(Organic layer)은 Na2SO4로 건조하고 증발시켰다. 잔류물은 실리카겔 크로마토그래피(EtOAc: Hexane = 3:7, UV)를 통해 노란색 오일 상태의 화합물 A2(200mg, 46%)를 수득하였다.

[0222] ¹H NMR(400MHz, Chlorform-d) → 3.53(t, J = 6.1Hz, 2H), 2.94(t = 7.6Hz, 2H), 2.16 (t).

[0224] <5-3> 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올 (A3)의 제조

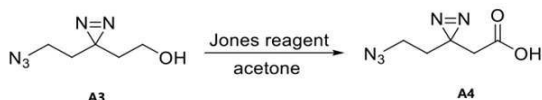


[0225]

[0226] 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올 [2-(3-(2-azidoethyl)-3H-diazirine-3-yl)ethan-1-ol; 화합물 A3]을 합성하기 위하여, 상기 실시예 5-2의 방법으로 수득된 A2(100mg, 1eq)에 아지드화나트륨(Sodium azide, 135mg, 5eq)이 첨가되어있는 DMF(2mL)을 암실에서 첨가하였다. 상온에서 12시간동안 교반한 다음, EtOAc(15 mL)로 희석한 뒤 브라인으로 5회 세척하였다. 유기층(Organic layer)은 Na2SO4로 건조하고 증발시켰다. 잔류물은 실리카겔 크로마토그래피(EtOAc: Hexane = 1:6, Potassium Permanganate solution as a stain)를 통해 무색 오일 상태의 화합물 A3(55mg, 85%)를 수득하였다.

[0227] ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d) $\rightarrow$ 3.55(t =6.0Hz, 2H), 3.22(t, J = 6.7Hz).

[0229] <5-4> 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)아세트산 (A4)의 제조



[0230]

[0231] 2-(3-(2-아지도에틸)-3H-다이아지린-3-일)아세트산 [2-(3-(2-azidoethyl)-3H-diazirin-3-yl)acetic acid; 화합물 A4]는 상기 실시예 5-3의 방법으로 수득된 A3 및 존스 시약을 이용하여 합성하였다.

[0232] 먼저, 2.5M 존스 시약 준비를 위해, 크로뮴 트리옥사이드(Chromiumtrioxide, 2.5g, 0.025 mol)을 50 mL 비커에 넣고 물(7.5 mL)에 녹인 뒤 농축된 황산(Sulfonic acid, 2.5mL)을 천천히 첨가하였다. 아이스워터 베스에서 교반시키며 식혔고, 용액의 온도는 0~5℃로 유지하였다. 이 단계의 용액 농도는 2.5M이다.

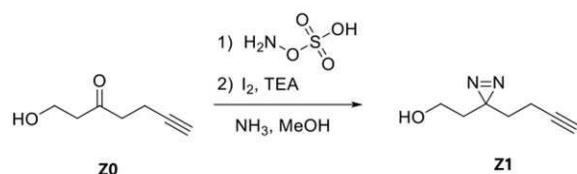
[0233] 그 다음, 존스 시약 산화를 위하여, 0.5mL의 2.5M 존스 시약(Chromium trioxide - 3eq)을 0℃의 아세톤(Acetone, 5ml, 1eq)에 용해되어있는 A3(55mg, 1eq)를 첨가하여 15분동안 교반시켰다. 반응 혼합물은 상온에서 2시간 동안 교반시킨 후 이소프로판올(Isopropyl alcohol, 5 mL)을 첨가한 후 Over Celite 방식으로 필터링하였다. 필터 케이크는 아세톤(Acetone, 5 mL)으로 3회 세척한 후 Na_2SO_4 으로 건조시켰다. 실리카겔 크로마토그래피(Hex/EA=7/3 + 2% Acetic acid, PotassiumPermanganatesolution as a stain)를 통하여 여과, 농축, 정제하여 무색 오일 상태의 화합물 A4(25mg, 42%)를 얻었다.

[0234] ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d) $\rightarrow$ 1094).

[0235] [M-H]에 대해 계산된 MS(ESI)값 168.06, 측정 값 168.05.

[0237] <실시예 6> 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트 (Z3)의 제조

[0238] <6-1> 2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올 (Z1)의 제조

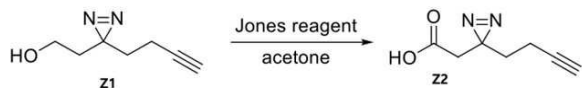


[0239]

[0240] 2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)에탄-1-올 [2-(3-(but-3-yn-1-yl)-3H-diazirin-3-yl)ethanol; 화합물 Z1]을 합성하기 위하여, 1-하이드록시헵트-6-인-3-1 (1-hydroxyhept-6-yn-3-1, 2g, 1eq)이 포함된 플라스크에 암모니아 용액(Ammonia solution)을 첨가하여 -10℃의 온도에서 봉입하여 3시간 동안 반응 시킨 다음, 하이드록시 아민-오-설페이트산(hydroxylamine-O-sulfonic acid, 2.06g, 1.15eq)이 용해되어있는 15ml 메탄올(Methanol, 10ml)을 첨가하여 재봉입한 뒤 -10℃에서 1시간 동안 혼합, 반응 시켰다. 이 후 상온에서 Overnight으로 혼합시킨 뒤 필터링을 하여 다이아지린을 수득하였고, 수득한 침전물은 여과시킨 뒤, 여과물을 다시 압력으로 농축하였다. 건조 후 메탄올(Methanol, 60ml)에 다시 용해시켜, Et3N(3.2g, 2eq)을 0℃에서 첨가하였다. 10분 반응 후, 용액에 산화를 나타내는 탈색화(색변화)가 일어나지 않을 때까지 I_2 (4.43g, 1.1 eq)을 첨가하였다. 혼합물은 1시간 동안 진공상태에서 에어 보르보테이팅을통해 농축시켰다. EtOAc(70 mL)로 희석하고 포화상태의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 로 세척하였다. 세척 후 유기층(Organic layer)을 Na_2SO_4 로 건조시키고 증발시켰다. 이 후 잔류물은 실리카겔 크로마토그래피(Hex/EA =3/2, Potassium Permanganate solution as a stain)를 통해 노란색 오일 상태의 화합물 Z1(900mg, 41%)을 수득하였다.

[0241] ^1H NMR(400MHz, Chlorform-d) $\rightarrow$ 3.53(q, J = 6.0Hz, 2H 2) $\rightarrow$ 2H, 2H).

[0243] <6-2> 2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세트산 (Z2)의 제조



[0244]

[0245] 2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세트산 [2-(3-(but-3-yn-1-yl)-3H-diazirin-3-yl)acetic acid; 화합물 Z2]은 상기 실시예 6-1의 방법으로 제조된 Z1 및 존스 시약을 이용하여 합성하였다.

[0246] 먼저, 2.5M 존스 시약의 준비를 위하여, 크로뮴 트리옥사이드(Chromiumtrioxide, 2.5g, 0.025 mol)를 50 mL 비커에 넣고 물(7.5 mL)에 녹인 뒤 농축된 황산(Sulfonic acid, 2.5mL)을 천천히 첨가하였다. 아이스워터배스에서 교반시키며 식혔으며, 용액의 온도는 0~5° C로 유지하였다. 이 단계의 용액농도는 2.5M이다.

[0247] 그 다음, 존스 시약의 산화를 위하여, 4mL의 2.5M 존스시약(Chromium trioxide - 3eq)을 0°C의 아세톤(Acetone, 25ml, 1eq)에 용해되어있는 Z1(470mg, 1eq)에 첨가하여 15분 동안 교반시켰다. 반응 혼합물은 상온에서 2시간 동안 교반시킨 후 이소프로판올(Isopropyl alcohol, 25 mL)을 첨가 후 Over Celite방식으로 필터링하였다. 필터 케이크는 아세톤(Acetone, 10mL)으로 3회 세척한 후 Na₂SO₄으로 건조시켰다. 실리카겔 크로마토그래피(Hex/EA= 7/3, PotassiumPermanganatesolutionas a stain)를 통하여 여과, 농축, 정제하여 무색 오일 상태의 화합물 Z2(276mg, 53%)를 얻었다.

[0248] ¹H NMR(400MHz, Chlorform-d) →2.44 (s, 2H), 2.10(td, J = 7.4, 2.6 Hz, 2H), 2.04 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 1.83 (t, J = 7.3 Hz, 2H).

[0250] <6-3> 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트 (Z3)의 제조

[0251] 에틸2-(3-(부트-3-인-1-일)-3H-다이아지린-3-일)아세테이트 [ethyl2-(3-(but-3-yn-1-yl)-3H-diazirin-3-yl)acetate; 화합물 Z3]를 합성하기 위하여, 마그네슘교반 바가 장착된 바이알에 MgCl₂(6mg, 0.10eq), Diethylpyrocarbonate (107mg, 1eq) 및 상기 실시예 6-2의 방법으로 제조된 Z2(100mg, 1eq)를 넣고 에틸알코올(Ethylalcohol, 61mg, 2eq)로 용해하였다. 이 혼합물은 실온에서 24시간동안 교반시킨 다음, 반응혼합물을 H₂O(2 mL)로 희석하고 EtOAc(3 mL)로 3회 추출하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 분리, 건조하여 여과한 후 회전증발로 용제를 제거하였다. 잔류물은 실리카겔 크로마토그래피(EtOAc: Hexane = 1:10, PotassiumPermanganate solution as a stain)를 통해 황색 오일의 화합물 Z3(67mg, 56.7%)를 수득하였다.

[0252] ¹H NMR (400MHz, Cloroform-d) →4.22 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.36 (s, 2H), 2.09 (td, J = 7.4, 2.6 Hz, 2H), 2.02 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 1.81 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

[0254] <실시예 7> 실시예의 화합물을 이용한 단백질의 표지

[0255] 본 발명의 실시예의 방법으로 수득된 화합물의 광친화성 표지(Photo-affinity tag)로의 유용성을 확인하기 위하여, Huh7.5 세포(Huh7.5 cell)를 lysis시켜 얻은 세포 용해물(lysate) 샘플에 실시예 6의 화합물 Z3을 200 μM 농도로 처리 및/또는 365 nm 파장의 자외선(UV)을 조사한 뒤, SDS-PAGE 전개하였고, 단백질 표지 여부를 분석하였다. 이때, 레인(lane) 1은, Z3을 비치리 및 UV를 조사한 대조군(control)이고, lane 2는 Z3을 처리하되 UV를 조사하지 않은 군이며, lane 3은 Z3을 처리하고 UV를 조사한 군이다.

[0256] 분석 결과, Huh7.5 cell lysate 에 Z3(200 μM)을 처리한 후 365 nm 파장의 빛을 처리해 준 경우(lane 3)에만, 단백질과 광가교를 통해 효율적으로 표지됨을 확인할 수 있었다(도 13).

[0257] 또한, 실시예 4의 화합물 Q5 및 실시예 5의 화합물 A4의 경우에도, 365 nm 파장의 광을 조사시 단백질을 효율적으로 표지가 가능함을 확인하였다.

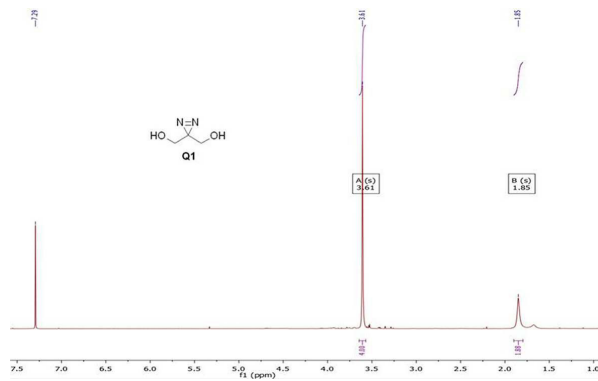
[0258] 따라서, 이러한 결과로부터, 본 발명의 실시예 1 내지 6의 방법으로 제조된 화합물은 각각 광범위한 다양한 단백질들을 표지가 가능한 광친화성 표지용 화합물로 유용하게 이용할 수 있음을 확인하였다.

[0260]

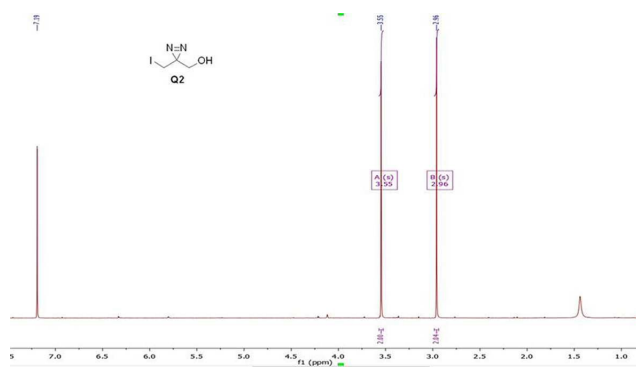
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

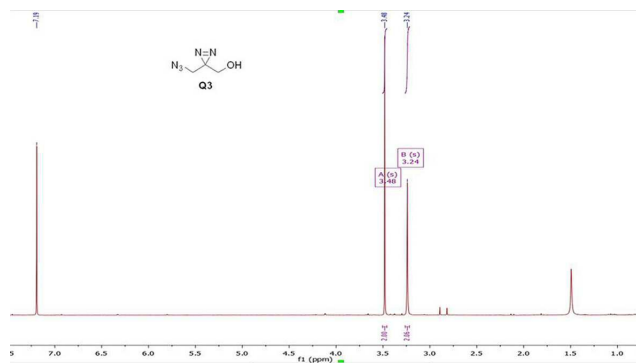
도면1



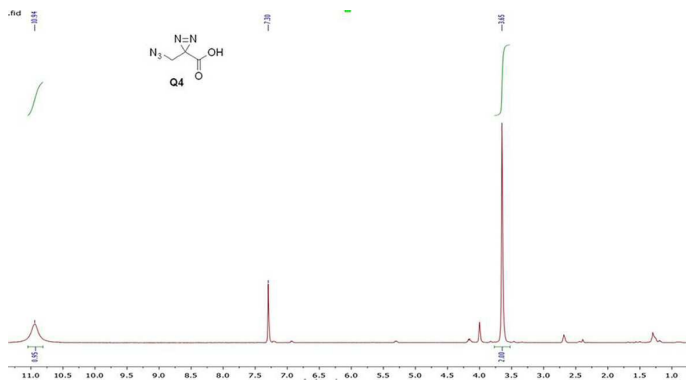
도면2



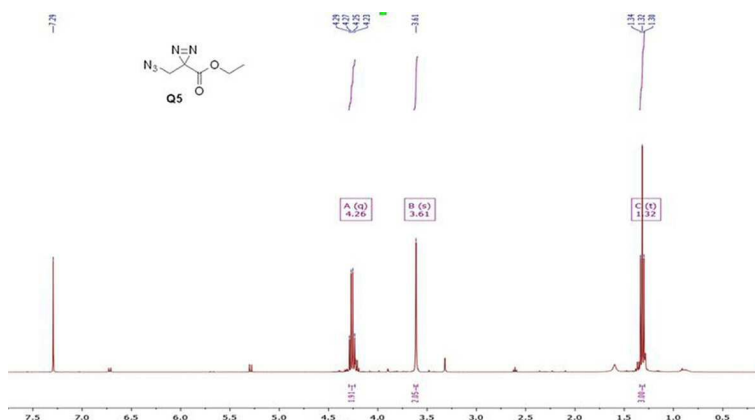
도면3



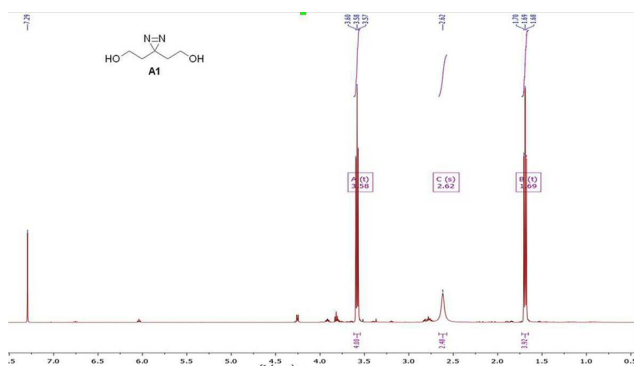
도면4



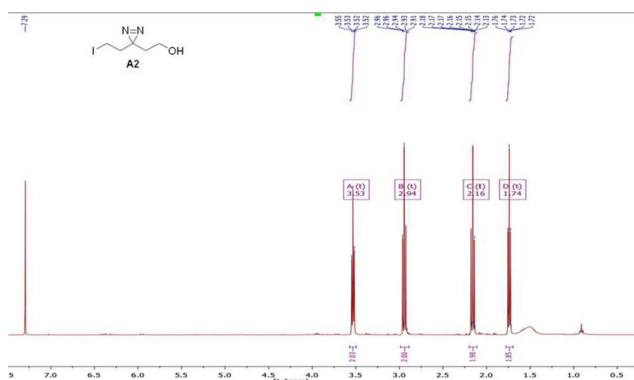
도면5



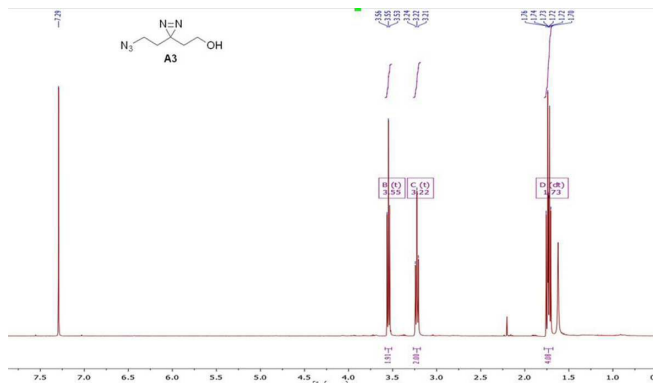
도면6



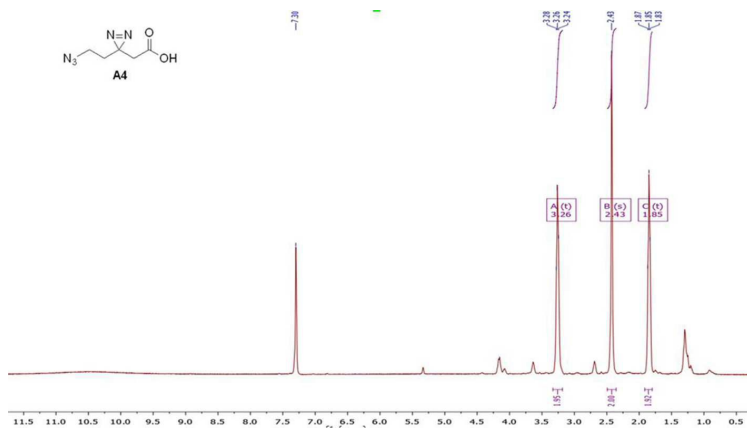
도면7



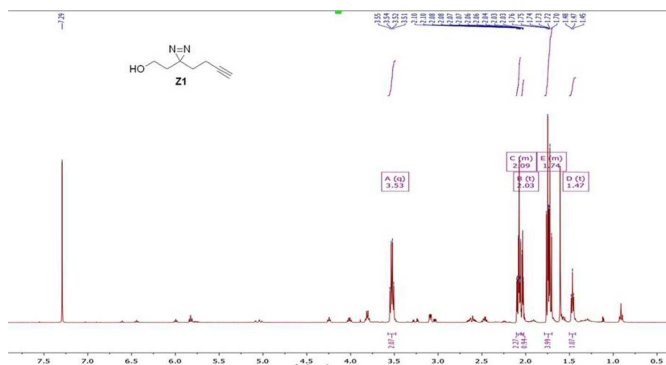
도면8



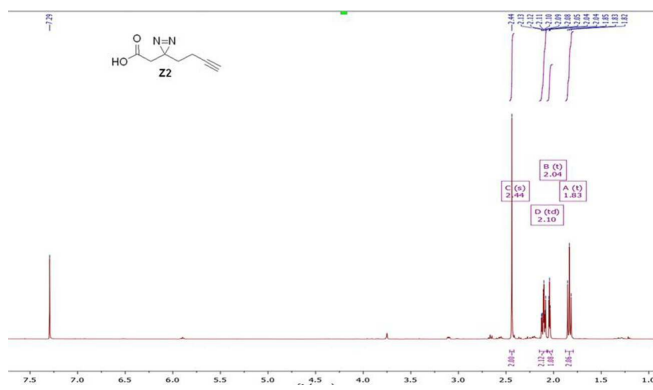
도면9



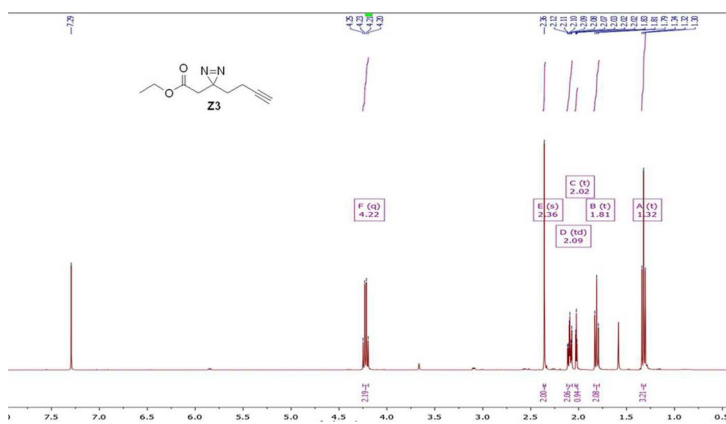
도면10



도면11



도면12



도면13

