



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0134362
(43) 공개일자 2010년12월23일

(51) Int. Cl.

C07D 403/12 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0052958

(22) 출원일자 2009년06월15일

심사청구일자 2009년06월15일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

윤주영

서울특별시 서초구 잠원동 50 롯데캐슬 207동
1703호

조민정

서울특별시 구로구 오류1동 217-1

첸 샤오 창

서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교
나노바이오기술연구소

(74) 대리인

특허법인다나

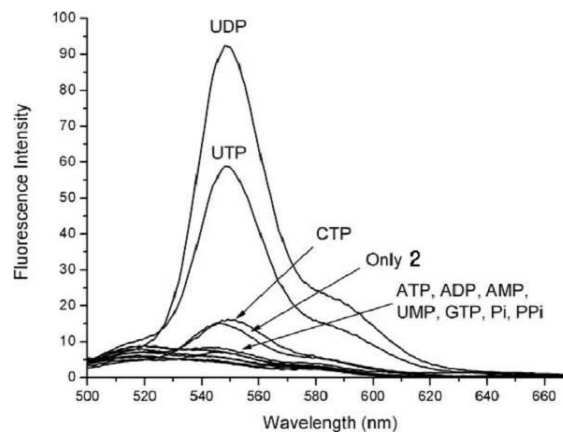
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) UTP 또는 UDP 선택성 형광 프로브, 이의 제조방법 및 이를 이용한 UTP 또는 UDP 검출방법

(57) 요약

본 발명은 UTP 또는 UDP 선택성 형광 프로브, 이의 제조방법 및 이를 이용한 UTP 또는 UDP 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생리적 조건 하에서 페틸렌-dpa-Zn 계 화합물은 UTP 및 UDP와 반응하여 형광 변화를 나타내어 "Off-On" 타입의 형광화학센서로 사용할 수 있으며, 당화 과정에서 UTP 소비 또는 UDP 생성을 선택적이고, 정량적으로 형광 측정하여 당화 과정을 감지함으로써 분석과정이 빠르고 분석비용이 절감되는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10816

부처명 서울특별시

연구관리전문기관

연구사업명 서울시 산학연 협력사업(2006년 기술기반구축사업)

연구과제명 나노 기술을 이용한 바이오 융합산업 혁신 클러스터

기여율

주관기관 연세대학교 산학협력단

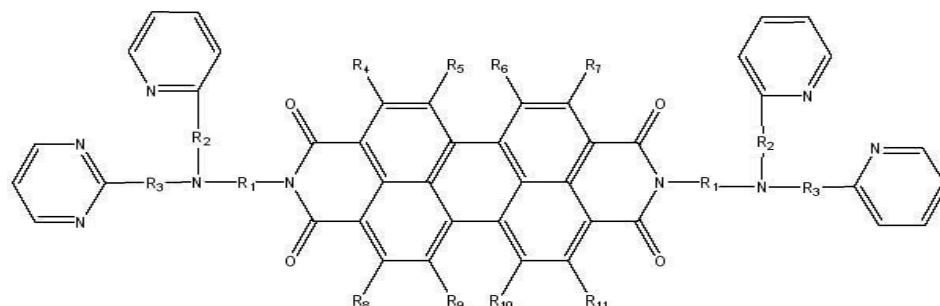
연구기간 2006년 08월 01일 ~ 2011년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 $-N(R_{12})(R_{13})$ 을 나타내고,

여기서 R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

청구항 2

제1항에 있어서,

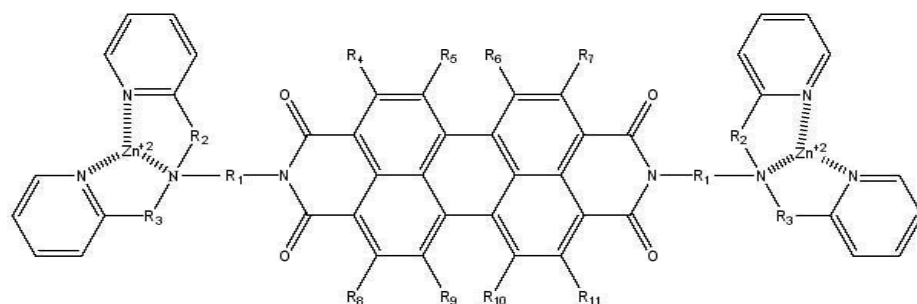
R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-2} 의 알킬렌이고,

R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소인 화합물.

청구항 3

하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

[화학식 2]



상기 식에서,

R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 하이드록시, 할로겐, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 -N(R₁₂)(R₁₃)을 나타내고,

여기서 R₁₂ 및 R₁₃은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

청구항 4

제3항에 있어서,

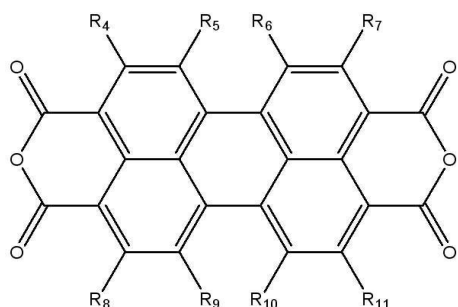
R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 C₁₋₂의 알킬렌이고,

R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소인 화합물.

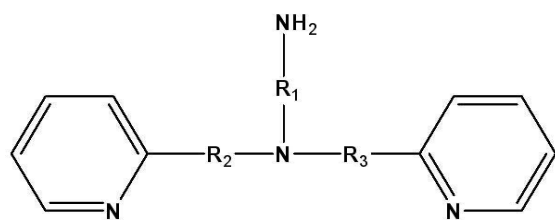
청구항 5

하기 화학식 3의 화합물과 하기 화학식 4의 화합물을 반응시켜 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계; 및 상기 화학식 1의 화합물과 아연 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 2의 화합물의 제조방법:

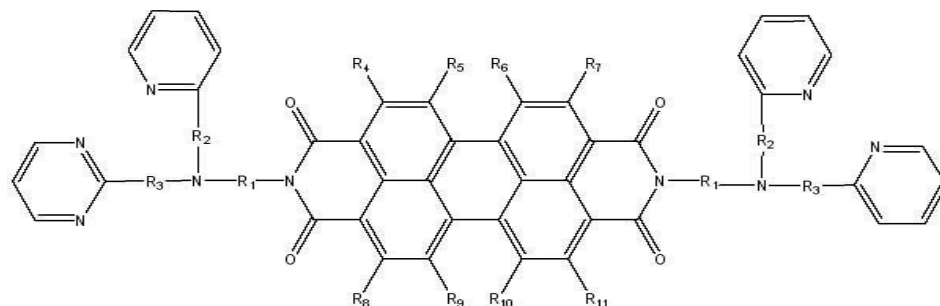
[화학식 3]



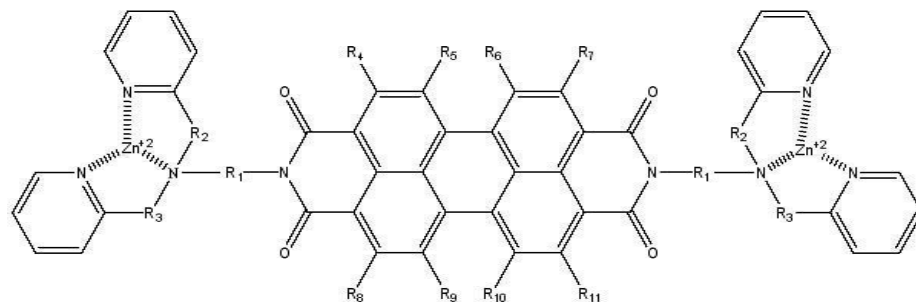
[화학식 4]



[화학식 1]



[화학식 2]



상기 식에서,

R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 $-N(R_{12})(R_{13})$ 을 나타내고,

여기서 R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

청구항 6

제5항에 있어서,

R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-2} 의 알킬렌이고,

R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소인 방법.

청구항 7

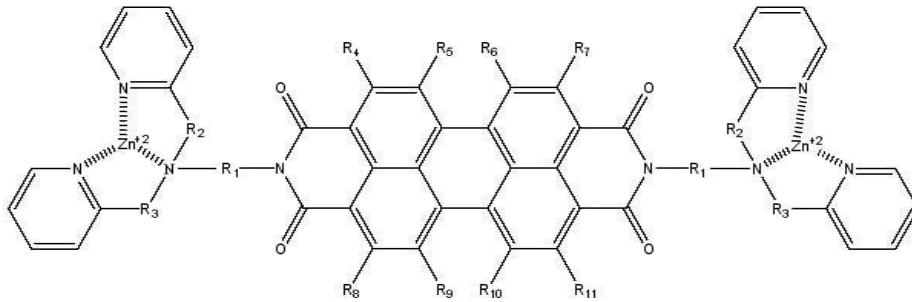
제5항에 있어서,

아연 화합물은 $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 인 방법.

청구항 8

하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 UTP 또는 UDP 검출용 센서:

[화학식 2]



상기 식에서,

R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 -N(R₁₂)(R₁₃)을 나타내고,

여기서 R₁₂ 및 R₁₃는 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아틸을 나타낸다.

청구항 9

제8항에 있어서,

R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 C₁₋₂의 알킬렌이고,

R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소인 센서.

청구항 10

제8항에 따른 센서를 이용하여 UTP 또는 UDP를 검출하는 방법.

청구항 11

제8항에 따른 센서를 이용하여 당화 과정을 측정하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 당화 과정은

UDP-글루코우즈 파이로포스포릴라아제에 의해 UTP를 소비하는 단계; 및

β-1,4-갈락토코실트랜스퍼라아제에 의해 UDP를 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

당화 과정의 측정은 UTP 소비에 의한 센서의 형광 감소를 측정하는 것인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

당화 과정의 측정은 UDP 생성에 의한 센서의 형광 증가를 측정하는 것인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 UTP 또는 UDP 선택성 형광 프로브, 이의 제조방법 및 이를 이용한 UTP 또는 UDP 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생리적 조건 하에서 페틸렌-dpa-Zn 계 화합물은 UTP 및 UDP와 반응하여 형광 변화를 나타내어 "Off-On" 타입의 형광화학센서로 사용할 수 있으며, 당화 과정에서 UTP 소비 또는 UDP 생성을 선택적이고, 정량적으로 형광 측정하여 당화 과정을 감지함으로써 분석과정이 빠르고 분석비용이 절감되는 효과가 있다.

배경 기술

[0002] 최근 음이온계 분석물질의 인지 및 검출은 연구 프로그램의 중요한 목표로 대두되었다. 다양한 음이온, 인산, 피로인산(pyrophosphate), 및 뉴클레오티드는 생물학적 과정을 이해하고 평가하는 열쇠로서 중요한 역할을 담당할 수 있는 인지 및 감지를 위한 중요한 종들이다. 음이온에 의한 형광강도의 변화를 기초로 한 이들 음이온들에 대한 센서는 매우 간단하고 민감하여 이러한 점에서 눈에 띈다.

[0003] 지난 수십 년간, 인산, 피로인산, ATP, GTP, 인산화된 펩티드/단백질, 포스파티딜세린 및 LPA(lysophosphatidic acid)를 위한 빠르고 편리한 검출 시스템의 개발에 상당한 노력을 바쳐왔다. RNA 합성 및 당-전달 경로에서 주요 구성 요소(building block)인 UTP(uridine triphosphate) 및 UDP(uridine diphosphate)는 살아있는 세포에 널리 퍼져있다. 결과적으로, 이들은 다양한 생물학적 사건들에서 중추 역할을 담당하고 있다. 예를 들어, UTP는 생물체에서 에너지 전달 시 도너로서 효소 반응에 참여하여 대사 과정에서 조절 요소로 제공한다. 한편, UTP 및 UDP는 글리코실트랜스퍼라아제에 의해 촉매되는 많은 당화 과정에도 관여한다. 최근 Hamachi 등은 anthracene-Zn 유도체를 이용하여 글리코실트랜스퍼라아제 분석에 관한 선도적인 작업을 보고한 바 있다. 그러나, 이 프로브는 Pi, p-티로신, ATP 및 ADP 에 대한 높은 결합 친화성을 나타냈다.

[0004] 이들의 많은 생물학적 역할에도 불구하고 수용액에서 UTP/UDP에 선택적으로 반응하는 형광화학센서는 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

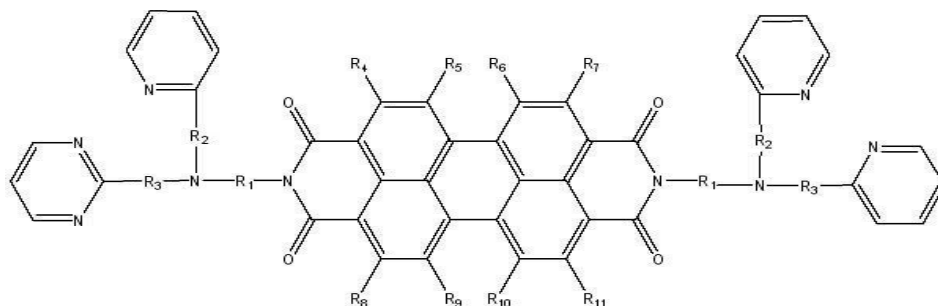
[0005] 본 발명의 목적은 수용액 내에서 UTP 및/또는 UDP를 선택적으로 감지할 수 있는 형광 프로브 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 형광 프로브를 사용하여 당화 과정을 정량적으로 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[0008] [화학식 1]



[0009]

[0010] 상기 식에서,

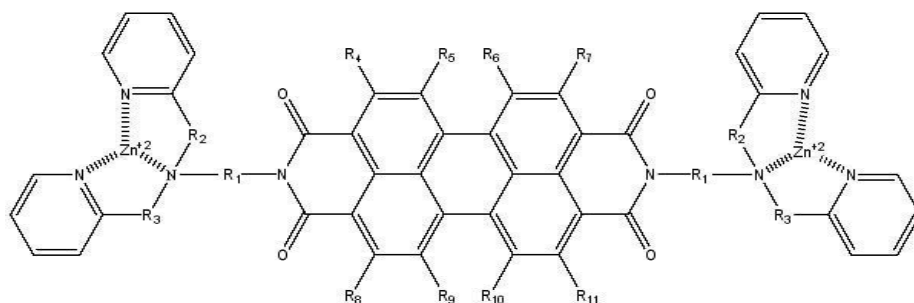
[0011] R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

[0012] R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 $-N(R_{12})(R_{13})$ 을 나타내고,

[0013] 여기서 R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아틸을 나타낸다.

[0014] 본 발명은 또한 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 제공한다:

[0015] [화학식 2]



[0016]

[0017] 상기 식에서,

[0018] R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

[0019] R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 $-N(R_{12})(R_{13})$ 을 나타내고,

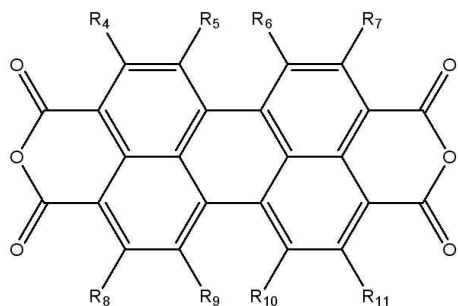
[0020] 여기서 R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아틸을 나타낸다.

[0021] 본 발명은 또한

[0022] 하기 화학식 3의 화합물과 하기 화학식 4의 화합물을 반응시켜 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계; 및

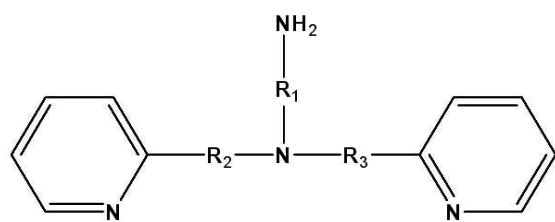
[0023] 상기 화학식 1의 화합물과 아연 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 2의 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0024] [화학식 3]



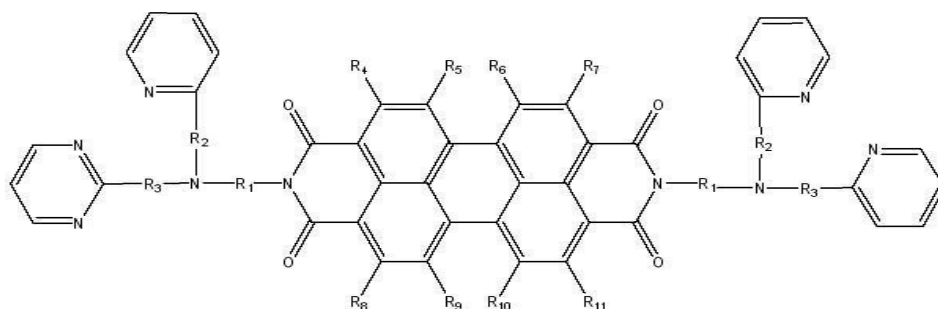
[0025]

[0026] [화학식 4]



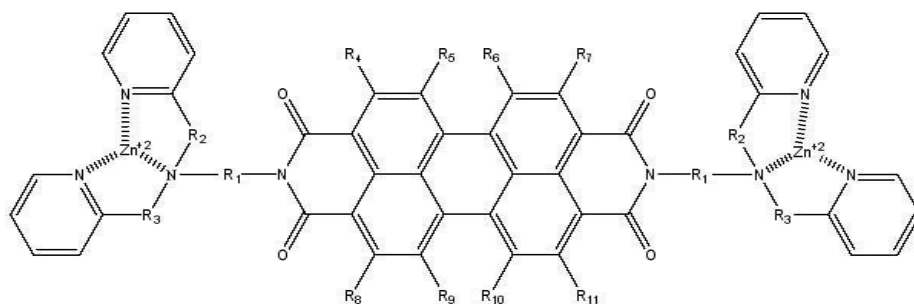
[0027]

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] [화학식 2]



[0031]

[0032] 상기 식에서,

[0033] R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

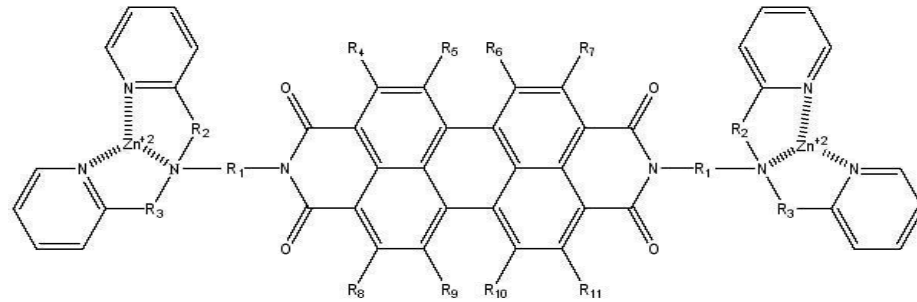
[0034] R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는

$-N(R_{12})(R_{13})$ 을 나타내고,

[0035] 여기서 R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

[0036] 본 발명은 또한 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 UTP 또는 UDP 검출용 센서를 제공한다:

[0037] [화학식 2]



[0038]

[0039] 상기 식에서,

[0040] R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

[0041] R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 $-N(R_{12})(R_{13})$ 을 나타내고,

[0042] 여기서 R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

[0043] 본 발명은 또한 본 발명의 센서를 이용하여 UTP 또는 UDP를 검출하는 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명은 또한 본 발명의 센서를 이용하여 당화 과정을 측정하는 방법을 제공한다.

효 과

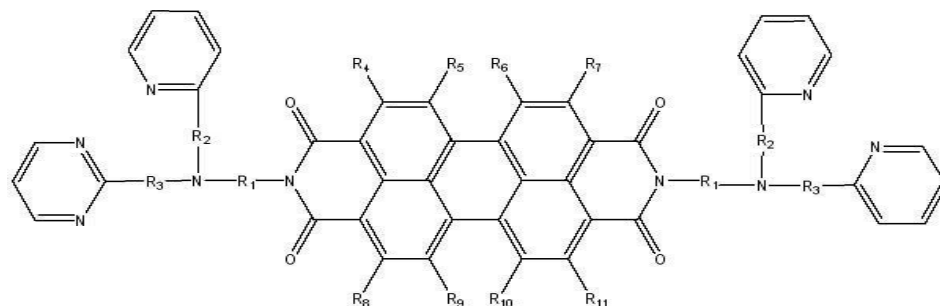
[0045] 본 발명은 UTP 또는 UDP와 반응하여 형광 변화를 나타내는 페틸렌-dpa-Zn 화합물을 형광 프로브로 사용함으로써 UTP 또는 UDP를 선택적으로 감지할 뿐만 아니라, 당화 과정에서 UTP의 소비 및 UDP의 생성을 선택적이고, 정량적으로 형광 측정함으로써 당화 과정을 쉽고 빠르게 감지할 수 있고 분석비용이 절감되는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0047] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

[0048] [화학식 1]



[0049]

[0050] 상기 식에서,

[0051] R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

[0052] R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 $-N(R_{12})(R_{13})$ 을 나타내고,

[0053] 여기서 R_{12} 및 R_{13} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

[0054] 본 발명의 화합물의 치환체 정의에 사용된 용어는 하기와 같다.

[0055] "할로젠"은 $-F$, $-Cl$, $-Br$ 또는 $-I$ 이다.

[0056] "알킬"은 다른 기제가 없는 한, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지쇄 또는 고리형의 포화 탄화수소를 가리킨다. C_{1-6} 알킬기의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸 및 tert-부틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 및 이소헥실이 포함되나, 이들에 제한되지 않는다. 또한 상기 알킬은 "시클로알킬"을 포함한다. 상기 시클로알킬은 다른 기제가 없는 한, 탄소수 3 내지 12의 비방향족, 포화 탄화 수소환으로서 단일환 및 융합환을 포함한다. C_{3-12} 시클로알킬의 대표적 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸 및 시클로옥틸이 포함되나, 이들에 제한되지 않는다.

[0057] "알킬렌"은 상기 알킬로부터 유도된 2가의 유기로서, 바람직한 탄소수의 범위는 1 내지 4이다.

[0058] "알콕시"는 다른 기제가 없는 한, 상기 탄소수 1 내지 6, 예를 들어 탄소수 1 내지 4의 알킬기가 산소원자와 결합한 것을 나타낸다. C_{1-4} 알콕시기의 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 및 부톡시가 포함되나, 이들에 제한되지 않는다.

[0059] "헤테로사이클"은 다른 기제가 없는 한, 질소, 산소, 또는 황 원자를 하나 이상 포함하는 4 내지 6 환원의 비방향족 포화 탄화수소환, 또는 방향족 환으로서 단일환 및 융합환을 포함한다.

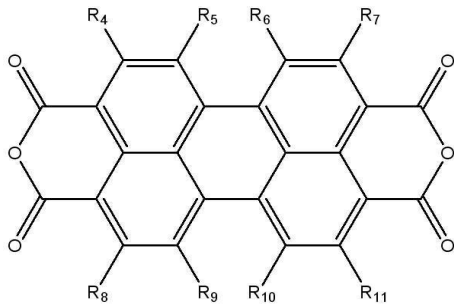
[0060] 아릴은 다른 기제가 없는 한, 6 내지 12-원의 방향족 고리화합물을 가리킨다. 아릴기의 예로는 페닐, 비페닐, 나프틸 및 안트라세닐을 포함하나, 이들에 제한되지 않는다.

[0061] 화학식 1의 화합물은 구체적으로는, 상기 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 2의 알킬렌기를 나타내고,

[0062] R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소를 나타낼 수 있다.

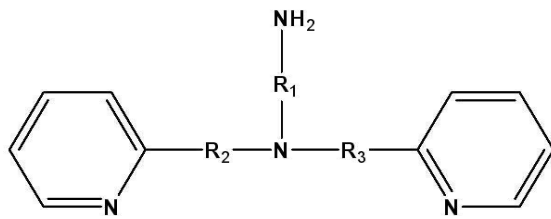
[0063] 상기 화학식 1의 화합물의 제조방법은 특별히 제한하지는 않으나, 하기 화학식 3의 화합물과 하기 화학식 4의 화합물을 반응시켜 제조할 수 있다.

[0064] [화학식 3]



[0065]

[0066] [화학식 4]



[0067]

[0068] 상기 화학식 3 또는 4의 화합물은 구체적으로는, 상기 R₁내지 R₄는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 2의 알킬렌기를 나타내고,

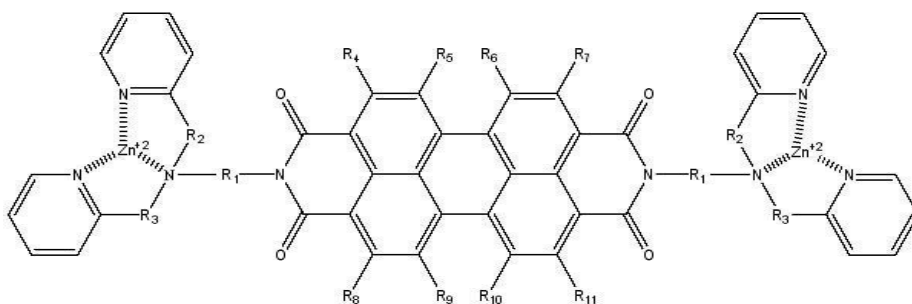
[0069] R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소를 나타낼 수 있다.

[0070] 일 구체예에 따르면, 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic dianhydride 및 (2-aminoethyl)bis(2-pyridylmethyl)amine의 반응에서 시작하며, 상기 반응은 propan-1-ol/H₂O을 환류시키면서 실시한다.

[0071] 상기 반응을 통해 페릴렌 디이미드(perylenediimide)를 합성할 수 있다.

[0072] 본 발명은 또한 하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

[0073] [화학식 2]



[0074]

[0075] 상기 식에서,

[0076] R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

[0077] R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 -N(R₁₂)(R₁₃)을 나타내고,

[0078] 여기서 R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 의 알킬, C_{1-6} 의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

[0079] 화학식 2의 화합물은 구체적으로, 상기 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 2의 알킬렌기를 나타내고,

[0080] R_4 내지 R_{11} 은 각각 독립적으로 수소를 나타낼 수 있다.

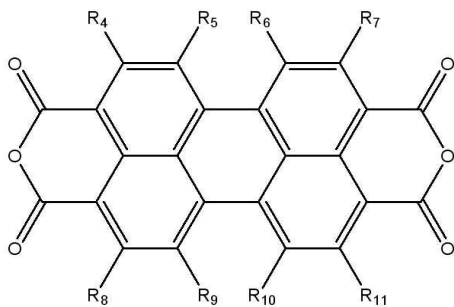
[0081] 화학식 2의 화합물은 페릴렌-dpa-Zn 플랫폼의 구조를 가지고 있으며, 수용액 내에서는 단핵성 Zn^{2+} 복합체로 존재하여 약한 형광을 나타내지만, UTP 또는 UDP와 반응하여 정전기적 및 배위결합을 통해 이차 Zn^{2+} 복합체를 형성할 수 있다. 상기 결합 양식은 3차 아민 도너로부터 페닐렌 단일체 여기상태로의 전자전달을 억제하게 되고, 결과적으로 형광 증가를 유도할 수 있다.

[0082] 본 발명은 또한

[0083] 하기 화학식 3의 화합물과 하기 화학식 4의 화합물을 반응시켜 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계; 및

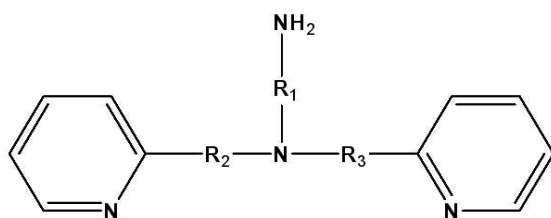
[0084] 상기 화학식 1의 화합물과 아연 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 2의 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0085] [화학식 3]



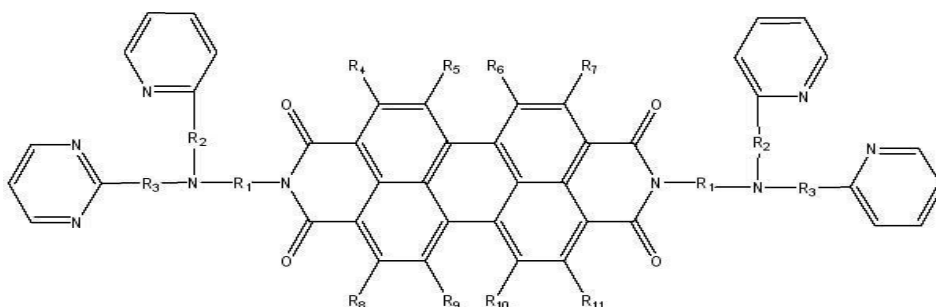
[0086]

[0087] [화학식 4]



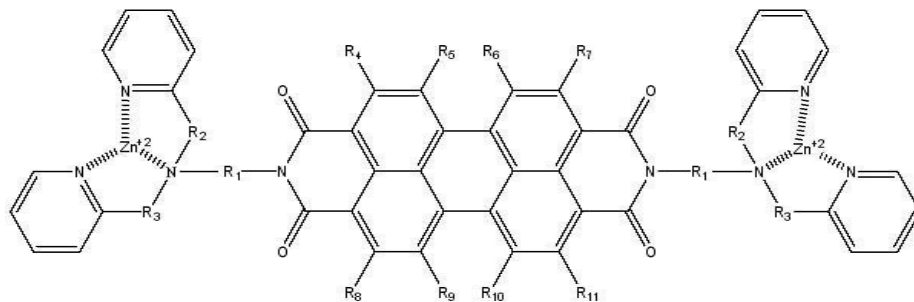
[0088]

[0089] [화학식 1]



[0090]

[0091] [화학식 2]



[0092]

[0093] 상기 식에서,

[0094] R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

[0095] R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 -N(R₁₂)(R₁₃)을 나타내고,

[0096] 여기서 R₁₂ 및 R₁₃은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아릴을 나타낸다.

[0097] 본 발명에 따른 상기 화학식 1 내지 4의 치환체의 보다 바람직한 정의는 하기와 같다.

[0098] 상기 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 2의 알킬렌기를 나타내고,

[0099] R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소를 나타낼 수 있다.

[0100] 본 발명의 화학식 2의 화합물의 제조방법은 상기 화학식 1의 화합물의 제조단계 및 화학식 1의 화합물과 아연 화합물을 반응시켜 화학식 2의 화합물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0101] 상기 화학식 1의 화합물은 하기 반응식 1과 같이 화학식 3의 화합물과 화학식 4의 화합물을 반응시켜 제조할 수 있다.

[0102] 일 구체예에 따르면, 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic dianhydride 및 (2-aminoethyl)bis(2-pyridylmethyl)amine의 반응에서 시작하며, 상기 반응은 propan-1-ol/H₂O를 환류시키면서 실시한다.

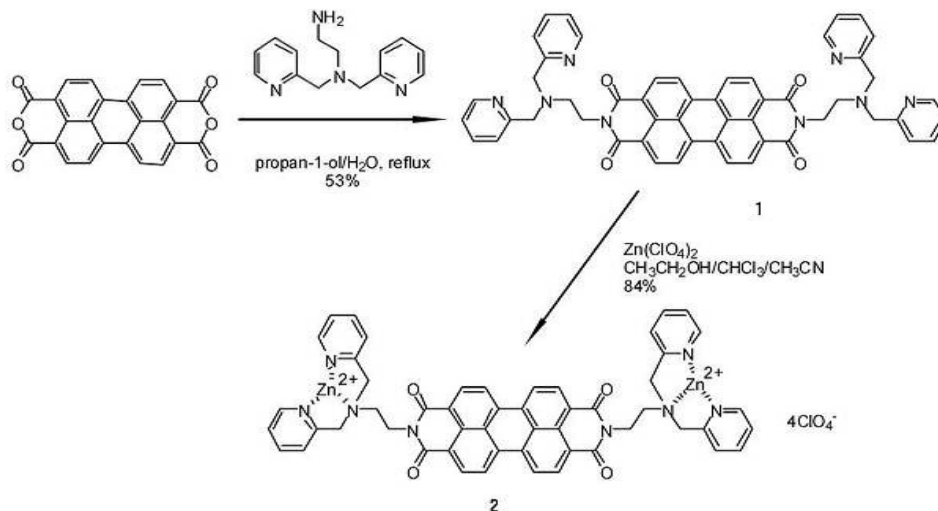
[0103] 상기 반응을 통해 페릴렌 디이미드(perylene diimide)를 합성할 수 있다.

[0104] 상기 단계에서 제조된 화학식 1의 화합물은 아연 화합물과 반응시켜 화학식 2의 화합물을 제조한다.

[0105] 상기 아연 화합물로는 Zn(ClO₄)₂ · 6H₂O 등을 사용할 수 있다.

[0106] 일 구체예에 따르면, CHCl₃-CH₃CH₂OH 혼합물에 Zn(ClO₄)₂ · 6H₂O를 첨가한 용액을 페릴렌 디이미드에 첨가하여 화학식 2의 화합물을 수득할 수 있다.

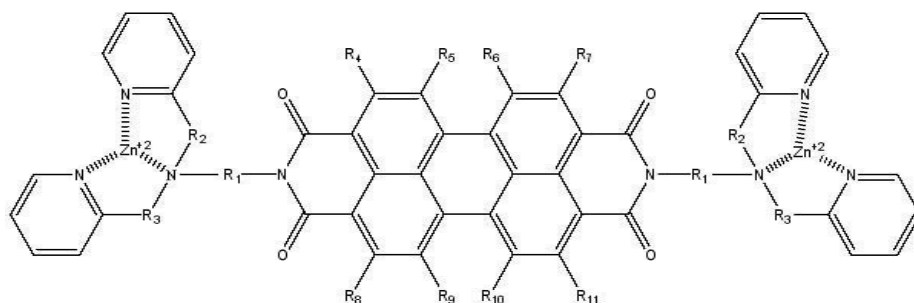
[0107] [반응식 1]



[0108]

[0109] 본 발명은 또한 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 UTP 또는 UDP 검출용 센서에 관한 것이다:

[0110] [화학식 2]



[0111]

[0112] 상기 식에서,

[0113] R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 4의 알킬렌을 나타내고,

[0114] R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 하이드록시, 할로젠, 질소, 산소 및 황 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 가지는 4 내지 6 환원의 헤테로 사이클, 또는 -N(R₁₂)(R₁₃)을 나타내고,

[0115] 여기서 R₁₂ 및 R₁₃는 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆의 알킬, C₁₋₆의 알콕시, 또는 6 내지 12원의 아틸을 나타낸다.

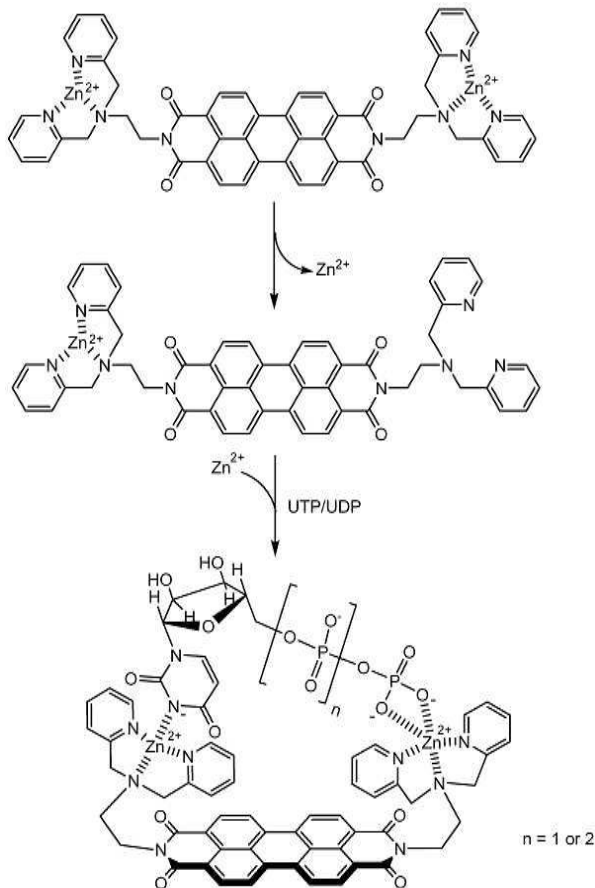
[0116] 본 발명에 따른 상기 화학식 2의 치환체의 보다 바람직한 정의는 하기와 같다.

[0117] 상기 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 2의 알킬렌기를 나타내고,

[0118] R₄ 내지 R₁₁은 각각 독립적으로 수소를 나타낼 수 있다.

[0119] 본 발명의 화학식 2의 화합물의 UTP 및 UDP에 대한 선택성은 반응식 2에 도시된 바와 같이, 상기 화학식 2의 화합물과 UTP/UDP 간에 형성된 복합체에서 화학식 2의 화합물의 Zn²⁺ 모이티 중 하나는 UTP/UDP에서 우리딘 기와 선택적으로 결합하고, 다른 Zn²⁺ 이온은 UTP/UDP에서 인산기와 결합할 수 있다. 이때, Zn²⁺과 우리딘의 특이 결합이 우선권을 갖는다. 따라서, 페릴렌 플랫폼에 의해 제공된 화학식 2의 화합물에서 Zn-중심부의 배위결합은 높은 선택성을 유도할 수 있다.

[0120] [반응식 2]



[0121]

[0122] 또한, 본 발명의 센서는 종래기술과 달리 다른 인산기, 예를 들어, Pi, PPI, ATP, GTP, CTP, ADP, AMP, 또는 UMP 등에는 형광 변화가 거의 없어 UTP 또는 UDP에 대한 검출 민감도가 높은 "Off-On" 타입의 형광센서로 사용할 수 있다.

[0123] 본 발명은 또한 본 발명의 센서를 이용하여 UTP 또는 UDP를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0124] 본 발명의 센서는 수용액의 생리적 pH 하에서 UTP 또는 UDP를 효과적이고 선택적으로 감지하는 수용성 "Off-On" 타입의 형광센서로 사용할 수 있다.

[0125] 이는 본 발명의 센서는 UTP 또는 UDP와 반응하여 복합체를 형성하는데 UTP 및 UDP의 우리딘 및 인산 모이테티와 센서의 Zn²⁺ 이온이 배위결합하면서 형광을 증가시키므로 이를 통해 UTP 또는 UDP를 검출할 수 있다.

[0126] 본 발명은 또한 본 발명의 센서를 이용하여 당화 과정을 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0127] 본 발명의 당화 과정을 측정하는 방법은 상기 화학식 2의 화합물을 이용하여 UDP-글루코우즈 피로포스포릴라아제에 의해 UTP를 소비하는 반응 및 β-1,4-갈락토코실트랜스퍼라아제에 의해 UDP를 생성하는 반응에서 UTP의 소비, 또는 UDP의 생성을 정량적으로 형광 측정할 수 있다.

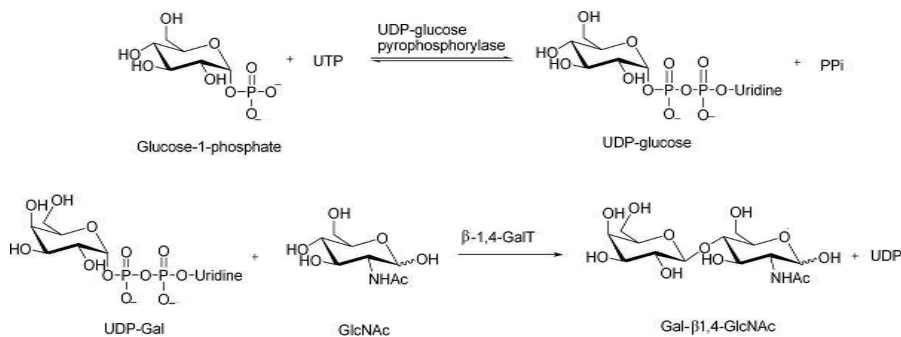
[0128] 구체적으로, 당화 과정은 하기 반응식 3과 같이, uridine 5'-diphosphate (UDP)-글리코시드는 UDP-글루코우즈 피로포스포릴라아제 하에서 UTP 및 글루코우즈-1-포스페이트로부터 생성되는 첫 번째 반응과, 글리코실 도너와 수용체로서 각각 UDP-Gal과 GlcNAc의 존재 하에서 β-1,4-galactosyltransferase (β-1,4-GalT)에 의해 시작되는 두 번째 반응을 말한다.

[0129] 상기 첫 번째 반응에서 본 발명의 센서를 첨가할 경우, UTP 소비에 의한 센서의 형광 감소를 얻을 수 있다.

[0130] 또한, 상기 두 번째 반응에서 본 발명의 센서를 첨가할 경우, UDP 생성에 의한 센서의 형광 증가를 얻을 수 있다.

[0131] 따라서, UTP 또는 UDP 선택성 센서를 통해 당화 과정을 정량적으로 형광 측정할 수 있으므로, 분석과정이 쉽고 빠르며, 분석비용이 절감되는 효과가 있다.

[0132] [반응식 3]



[0133]

[0134] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0135] <실시예 1> 화학식 2의 화합물의 제조

[0136] 본 실시예에서 사용된 시약은 판매되는 것을 구입하여 사용하였고, 별도로 정제과정을 거치지 않는 않았다. 플래쉬 크로마토그래피는 실리카겔(230-400 mesh)에서 실시하였다. ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 250 MHz를 이용하여 기록하였다. 화합물의 쉬프트는 ppm으로 표현하였고, Hz. Mass spectra에서 커플링 상수(J)는 JEOL JMS-700 Mstation spectrometers를 사용하여 얻었다.

[0137] 화학식 1의 화합물을 제조하기 위해, 75 mL의 propan-1-ol/ H_2O (2:1)에 3,4,9,10-Perylenetetracarboxylic dianhydride (518 mg, 1.32 mmol)을 넣은 용액에 *N,N*-Bis(2-pyridylmethyl)ethane-1,2-diamine (800 mg, 3.31 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물은 24시간 동안 환류시켰다. 용매를 증발시킨 후, 잔사는 용출용매로 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1)를 사용하여 Al_2O_3 컬럼에서 정제하였다. $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$ 침전물을 이용한 추가 정제 후, 590 mg의 붉은색 분말로 화학식 1의 화합물을 수득하였다(수율: 53%).

[0138] ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ (ppm): 8.66 (d, 8H, J = 8.5 Hz), 8.42 (d, 4H, J = 5.0 Hz), 7.37 (m, 8H), 7.03 (m, 4H, J = 4.0 Hz), 4.43 (t, 4H, J = 6 Hz), 3.92 (s, 8H), 2.97 (t, 4H, J = 6 Hz).

[0139] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ (ppm): 163.115, 159.583, 148.905, 136.150, 134.500, 131.346, 129.283, 126.344, 123.313, 123.094, 122.807, 121.817, 60.314, 51.533, 38.210.

[0140] FAB MS m/z = 841.3245 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calc. for $\text{C}_{52}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}_4$ = 841.3251.

[0141] 화학식 2의 화합물을 제조하기 위해, CHCl_3 - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (5:1, 60 mL)에 상기 화학식 1의 화합물(100 mg, 0.12 mmol)을 넣은 용액에 CH_3CN (2 mL)에 $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (90 mg, 0.24 mmol)을 넣은 용액을 한 방울씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시킨 후, 잔사는 5 mL CH_3CN 에 다시 녹였다. 생성물은 80 mL CHCl_3 를 첨가하여 침전시켰다. 침전물은 여과하고, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ (10:1)로 세척하여 화학식 2의 화합물을 수득하였다(137 mg, 84%).

- [0142] ^1H NMR (CD_3CN , 250 MHz) δ (ppm): 8.80 (d, 4H, $J = 4.8$ Hz), 8.10 (t, 4H, $J = 8.0$ Hz), 7.99 (m, 8H), 7.63 (d, 8H, $J = 7.3$ Hz), 4.45 (d, 4H, $J = 15.7$ Hz), 4.28 (m, 4H), 4.2 (d, 4H, $J = 15.7$ Hz), 3.06 (m, 4H).
- [0143] ^{13}C NMR (CD_3CN , 62.5 MHz) δ (ppm): 162.718, 154.300, 147.531, 141.532, 133.670, 130.593, 127.812, 125.167, 124.770, 123.369, 121.811, 56.513, 51.214, 34.747.
- [0144] ESI MS $m/z = 1269.0$ [$\text{M} - \text{ClO}_4$] $^+$, calc. for $\text{C}_{52}\text{H}_{40}\text{Cl}_3\text{N}_8\text{O}_{16}\text{Zn}_2 = 1269.0$.
- [0145] 이 센서는 생리적인 조건 하에서 작동하며, 다른 인산 유도체와는 달리 UTP 및 UDP에 높은 선택성을 나타낸다.
- [0146] <실시예 2> 음이온계 분석물질에 대한 선택적 검출
- [0147] 형광측정을 위한 음이온 적정 용액을 제조하기 위해, 물에 PPi , Pi , ATP , GTP , CTP , ADP , AMP , UDP , UMP 및 UTP 의 소듐 염을 녹인 스톡 용액(10 mM)을 제조하였다. 또한, 증류된 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2)에서 호스트의 스톡 용액 (0.667 mM) 을 제조하였다. 실험 용액은 $4.5 \mu\text{l}$ 의 프로브 스톡 용액을 시험관에 첨가하여 제조하였다. 각 음이온 스톡의 적당한 앨리퀀트를 첨가하고, 상기 용액을 20 mM HEPES (pH 7.4) 및 물 3 mL로 희석하였다. 모든 측정 시 여기 파장은 485 nm였고, 여기 및 방출 슬릿 너비는 각각 10 nm 및 5 nm로 하였다.
- [0148] 도 1은 CH_3CN -HEPES 완충용액 (0.01 M, pH 7.4, 0.05:99.95, v/v) 하에서, H_2PO_4^- (Pi), pyrophosphate (PPi), ATP , CTP , GTP , ADP , AMP , UMP , UDP 및 UTP 첨가 시 화학식 2의 화합물($1 \mu\text{M}$)의 형광 변화를 나타낸 것이다.
- [0149] 도 1에 나타난 바와 같이, 형광 스펙트럼은 485 nm에서 페릴렌 형광단의 여기에 의해 얻었다. 화학식 2의 화합물은 100 당량의 UTP 및 UDP 존재 하에서 선택적 형광 증가를 나타내는 반면, UTP 및 UDP 와 비교하여 CTP 에 의해 촉진되는 형광 증가는 미비하였다. 반면, Pi , PPi , ATP , GTP , ADP , AMP 및 UMP 는 형광 강도에 있어서 다소 감소를 나타냈다. 방출 밴드는 550 nm에 집중되어 있으며, 이는 생물학적 적용을 위한 이상적인 파장이라 할 수 있다.
- [0150] 또한, CH_3CN -HEPES 완충용액(0.01M, pH7.4) (0.05:99.95, v/v)에서 화학식 2의 화합물($1 \mu\text{M}$)과 UDP 또는 UTP 의 형광 적정을 실험하였다. 여기 파장은 485nm이고, 슬릿은 10nm/5nm로 하였다.
- [0151] 도 2에 나타난 바와 같이, UTP -1 및 UDP -1의 생성을 위한 결합상수는 각각 $6.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 및 $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (error < 11%)으로 계산되었다.
- [0152] 화학식 2의 화합물의 형광 증가는 dpa의 3차 아민 모이어티에서 질소와 배위결합해 있는 Zn^{2+} 의 세기를 UTP/UDP 가 증가시키는 것과 관련이 있다. 화학식 2의 화합물은 완충용액에서 약한 형광을 나타내기 때문에, 아마도 단핵성 Zn^{2+} 복합체로서 우세하게 존재하는 것으로 추정된다. UDP 또는 UTP 를 첨가하면 이차 Zn^{2+} 복합체 형성을 유도하는데, 이는 UDP -1 또는 UTP -1 복합체를 형성하기 위한 이의 정전기 및 배위결합으로 인한 것 같다. 이 결합 양식은 3차 아민 도너로부터 페릴렌 단일체 여기상태로의 전자전달을 억제할 수 있다. 결과적으로, 형광 증가를 유도할 수 있다.
- [0153] 또한, CH_3CN -HEPES 완충용액(0.01 M, pH 7.4) (0.05:99.95, v/v)에서 다양한 음이온들을 농도별로 550 nm에서 화학식 2의 화합물($1 \mu\text{M}$)의 상대적 형광 강도를 측정한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 디포스페이트 기(ATP , GTP , ADP , PPi)를 갖는 다른 분석물질들은 형광 증감을 유도하지 않았다. 이는 우리딘 기가 주 역할을 담당함을 나타내는 것이다.
- [0154] 상기 결과로부터, 화학식 2의 화합물의 UTP 및 UDP 에 대한 선택성은 두 가지 주요 반응 때문인 것 같다. 즉, 화학식 2의 화합물과 UTP/UDP 간에 형성된 복합체에서 화학식 2의 화합물의 Zn^{2+} 모이어티 중 하나는 UTP/UDP 에서 우리딘기와 선택적으로 결합하고, 다른 Zn^{2+} 이온은 UTP/UDP 에서 인산기와 결합할 수 있다. 이때, Zn^{2+} 과 우리딘

의 결합이 우선권을 갖는다. 따라서, 화학식 2의 화합물에서 Zn-중심부의 배위결합은 높은 선택성을 유도할 수 있다.

[0155] 또한, PPI(1 mM) 및 UMP(1 mM)의 혼합물은 화학식 2의 화합물의 형광 시 효과적인 증가를 나타내지 않기 때문에, 인산기와 우리딘기 간의 배위결합을 위해서는 최적 거리(optimum spacer)가 필요하다(도 4).

[0156] <실시예 3> 당화 과정 측정

[0157] 본 발명의 센서를 생물학에 적용할 수 있는 지를 측정하기 위해, 당화 과정 동안 UTP 소비 및 UDP 생성을 모니터링하였다.

[0158] UDP-글루코우즈 파이로포스포릴라아제에 의해 촉매된 UDP-글루코우즈의 생성을 형광 측정하기 위해, 분석용 완충용액(3 mL, 50 mM HEPES, pH 7.4)에 UTP (1 mM), 글루코우즈-1-포스페이트(1 mM) 및 화학식 2의 화합물(10 μ M)을 넣은 용액을 25°C에서 30분 간 쿼츠 셀에서 전배양하였다. UDP-글루코우즈 파이로포스포릴라아제(2U)를 첨가한 후, 반응 시간대 별(30분 간격)로 방출 스펙트럼(500-700 nm) (λ_{ex} = 485 nm)을 기록하였다. 이때, $[UTP]_0 = [Glucose-1-phosphate]_0 = 1$ mM이고, CH₃CN-HEPES buffer (0.01 M, pH 7.4) (0.5:99.5, v/v)이고, 여기 파장은 485 nm, 슬릿은 5 nm/5 nm로 하였다.

[0159] 또한, β -1,4-GalT에 의해 촉매된 글리코실 전달을 형광 측정하기 위해, 분석용 완충용액(3 mL, 50 mM HEPES, pH 7.4)에 넣은 UDP-Gal (1 mM), GlcNAc (1 mM) 및 화학식 2의 화합물(10 μ M)을 넣은 용액을 25°C에서 30분 간 쿼츠 셀에서 전배양하였다. β -1,4-GalT(50mU)를 첨가한 후, 각 반응 시간대 별(30분 간격)로 방출 스펙트럼(500-700 nm) (λ_{ex} = 485 nm)을 기록하였다. 이때, $[UDP-Gal]_0 = [GlcNAc]_0 = 1$ mM이고, CH₃CN-HEPES buffer (0.01 M, pH 7.4) (0.5:99.5, v/v)이고, 여기 파장은 485 nm, 슬릿은 5 nm/5 nm로 하였다.

[0160] 도 5에 나타난 바와 같이, 첫 번째 반응에서, UTP 및 글루코우즈-1-포스페이트를 포함하는 HEPES 완충용액에 UDP-글루코우즈 파이로포스포릴라아제를 첨가하면 550 nm에서 형광 강도는 점차 감소하였다. 이는 UTP가 점차 소비되었음을 나타내는 것이다.

[0161] 반대로, 파이로포스포릴라아제를 첨가하지 않으면 형광 변화는 관찰되지 않았다(도 6).

[0162] 또한, β -1,4-갈락토코실트랜스퍼라아제에 의해 유발되는 두 번째 반응에서, 550 nm에서의 형광 강도는 점차 증가하였다. 상기 변화는 UDP의 결과와 동일하였다. 이는 이 형광 효과가 글리코실 도너 및 수용체로서 각각 UDP-Gal 및 GlcNAc의 존재 하에서 UDP의 생성으로부터 발생하는 것임을 나타내는 것이다(도 7).

[0163] 결론적으로, 본 발명은 수용액의 생리 pH 하에서 UTP 및 UDP를 효과적이고 선택적으로 감지하는 수용성, "Off-On" 타입의 형광 센서를 제공한다. 형광 증가를 나타내는 페릴렌 센서(화학식 2의 화합물)는 UTP/UDP와의 복합체 형성과 관련되어 있다. 선택적 UTP/UDP 감지는 UTP/UDP의 우리딘 및 인산 모이티와 화학식 2의 화합물의 Zn²⁺ 이온의 배위결합의 결과일 수 있다. 결과적으로, 화학식 2의 화합물의 페릴렌 모이티는 두 가지 중요한 역할, 즉, 주요 형광단과 최적 거리 주형 결합을 담당하는 것으로 사료된다.

[0164] 또한, 본 발명은 화학식 2의 화합물이 효소 촉매로 인한 당화 과정을 형광 측정에 적용할 수 있음을 성공적으로 입증하였다.

도면의 간단한 설명

[0165] 도 1은 수용액 하에서 본 발명의 화학식 2의 화합물의 UTP 및 UDP에 대한 선택적 검출 결과를 나타낸 것이다.

[0166] 도 2는 수용액 하에서 본 발명의 화학식 2의 화합물의 UDP(a) 및 UTP(b)에 대한 형광 적정 실험 결과를 나타낸 것이다.

[0167] 도 3은 본 발명의 화학식 2의 화합물을 이용하여 수용액 하에서 다양한 음이온들을 농도 별로 형광 강도를 측정

한 결과를 나타낸 것이다.

[0168] 도 4는 수용액 하에서 PPi 및 UMP의 첨가 유무에 따른 본 발명의 화학식 2의 화합물의 형광 강도의 변화를 나타낸 것이다.

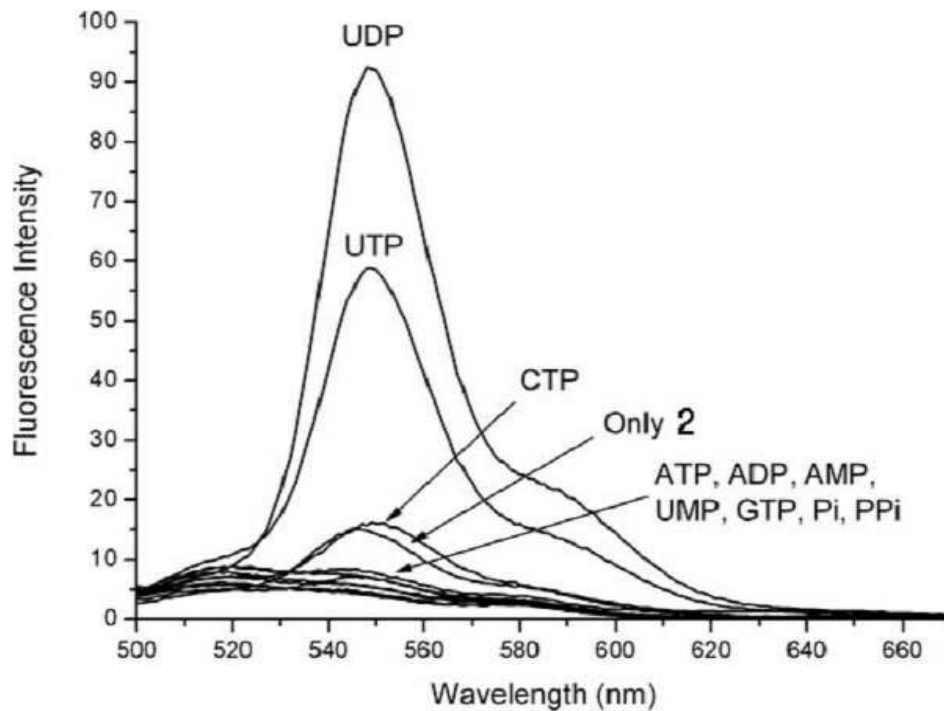
[0169] 도 5는 본 발명의 화학식 2의 화합물을 이용하여 당화 과정에서 UTP의 소비에 따른 형광 소광 결과를 나타낸 것으로, a)는 550 nm에서 방출비율 I/I_0 에 의해 모니터링된 UTP 형광 소광의 시간별 함수이고, b)는 UDP-글루코우즈 파이로포스포일라아제를 이용하여 반응시간 별로 얻은 다른 스펙트럼이다.

[0170] 도 6은 당화 과정에서 촉매 효소를 첨가하지 않은 경우 본 발명의 화학식 2의 화합물의 형광 변화를 나타낸 것으로, a)는 UDP-글루코우즈 파이로포스포일라아제를 첨가하지 않은 경우이고, b)는 β -1,4-갈락토코실트랜스퍼라아제를 첨가하지 않은 경우이다.

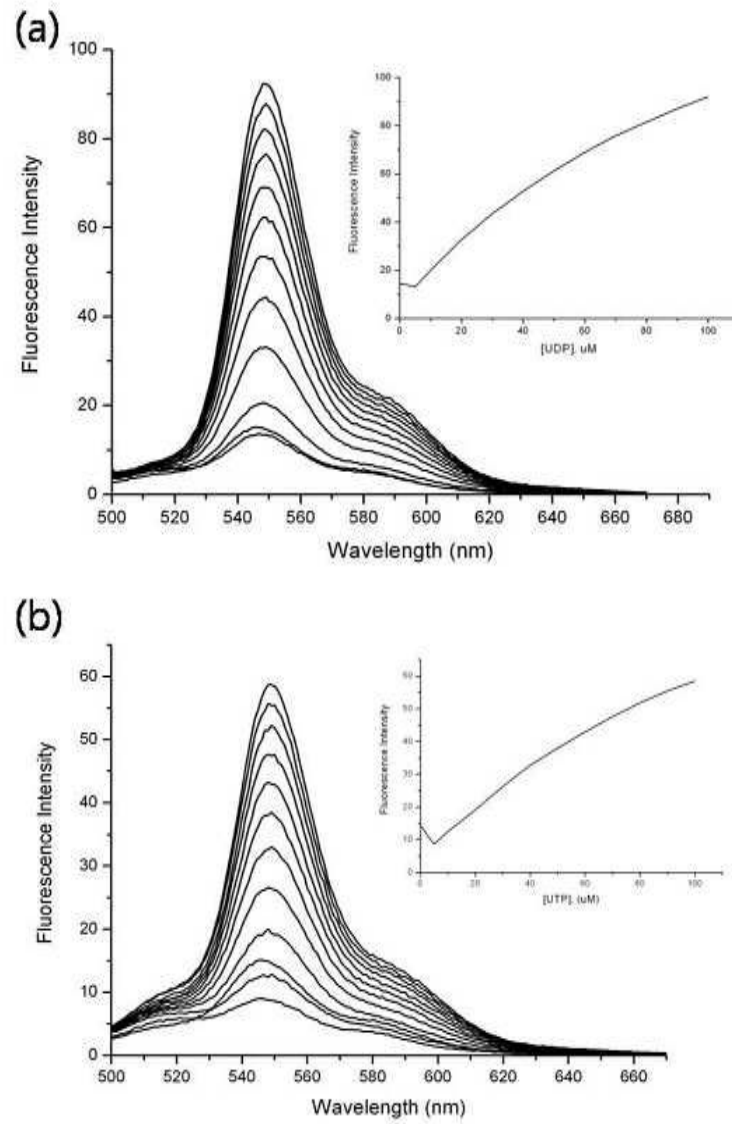
[0171] 도 7은 본 발명의 화학식 2의 화합물을 이용하여 당화 과정에서 UDP의 생성에 따른 실시간 형광 모니터링 결과를 나타낸 것으로, a)는 550nm에서 방출비율 I/I_0 에 의해 모니터링된 UDP의 시간대별 생성 함수이고, b)는 β -1,4-GalT를 이용하여 반응시간 별로 얻은 다른 스펙트럼이다.

도면

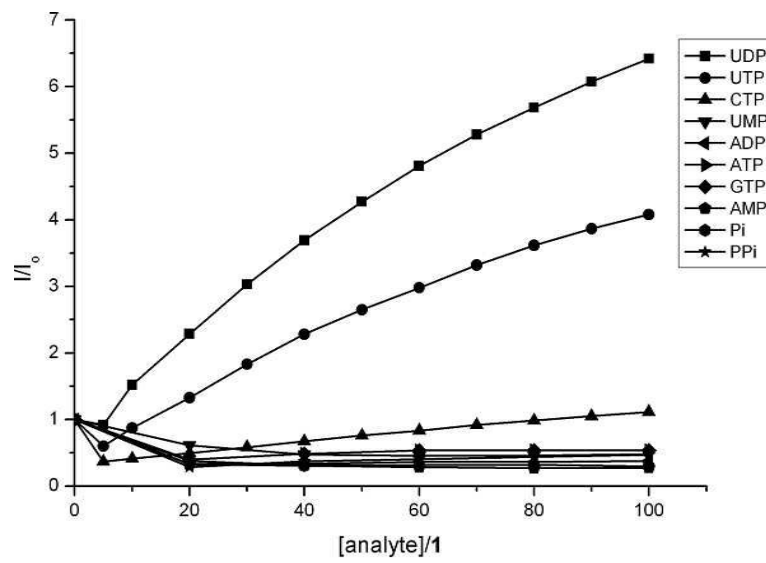
도면1



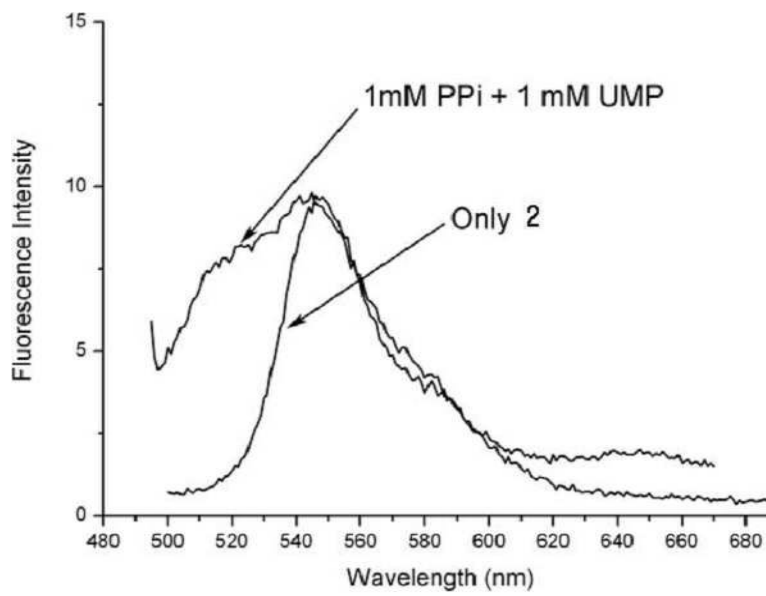
도면2



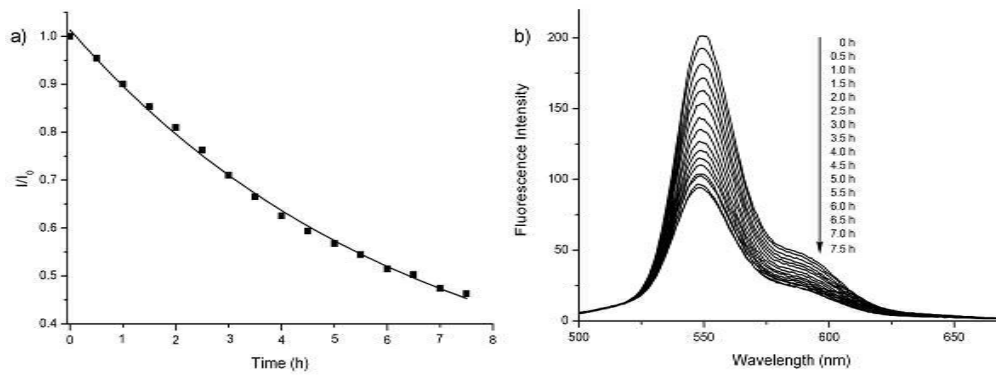
도면3



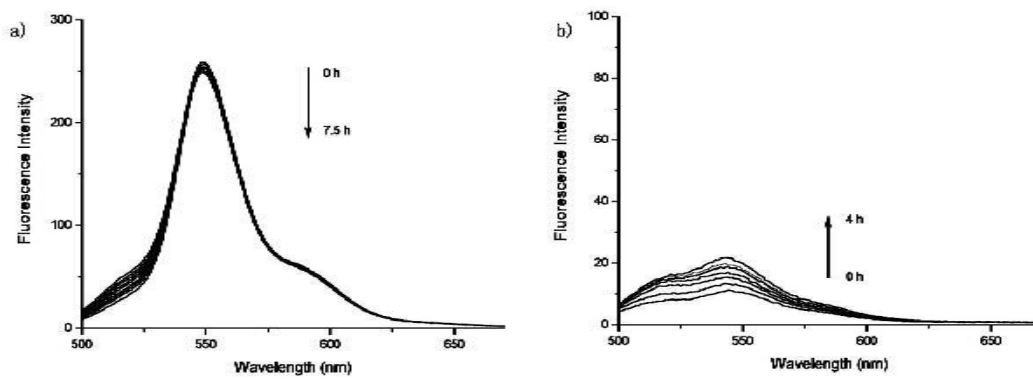
도면4



도면5



도면6



도면7

