

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0112200

(43) 공개일자 2020년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 9/80 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07F 9/80 (2018.08)

G01N 21/64 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0032286

(22) 출원일자 2019년03월21일

심사청구일자 2019년03월21일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호

강철훈

경기도 수원시 장안구 하물로30번길 22, 105동 704호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열

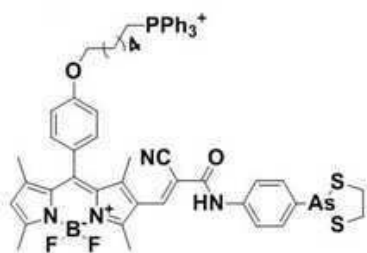
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 센서

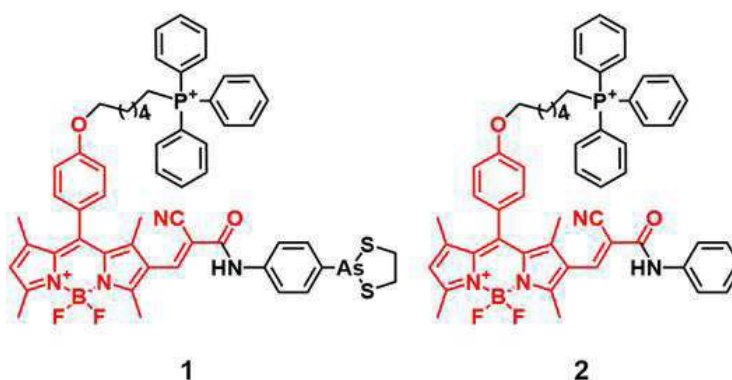
## (57) 요약

본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 센서에 관한 것이다:

[화학식 1]



## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**G01N 33/68** (2013.01)

(72) 발명자

**구세영**

서울특별시 양천구 목동동로 130, 1401동 1103호

**버디 하디브싱**

서울특별시 성북구 안암로9가길 50, 103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 2009-0081566            |
| 부처명         | 미래창조과학부                 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                  |
| 연구사업명       | (이공)리더연구자지원_창의연구        |
| 연구과제명       | 발광센서 재료 연구단             |
| 기 여 율       | 1/1                     |
| 과제수행기관명     | 고려대학교 산학협력단             |
| 연구기간        | 2017.03.01 ~ 2018.02.28 |

---

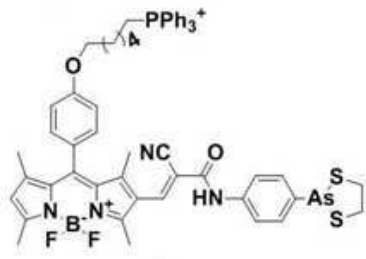
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 [화합식 1]로 표시되는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 프로브 화합물:

[화합식 1]



#### 청구항 2

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 센서.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 내 비시날 디티올 단백질(Vicinal dithiol protein, VDP) 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 센서에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 다수의 천연 단백질 구조들 중 cysteine (Cys)-sulfhydryls 그룹들은 중심부에 가까이 위치해 있으며 산화적 환경하에서 단백질 내 또는 단백질 간 이황화 결합 형성에 매우 민감하다. 이런 단백질들은 흔히 비시날 디티올 단백질(Vicinal dithiol protein, VDP)이라고 불리는데 대체로 동일하거나 다른 폴리펩타이드 사슬 위에 존재하는 cysteine 부분들의 병렬 배치(juxtaposition)에서 유래한다. 최근 몇 년간 VDP는 엄청난 관심을 받고 있으며, 그 이유는 VDP는 세포의 산화 환원 항상성 유지, 단백질 원형 구조의 접힘과 안정화, 산화적 손상에 대한 방어 기작과 같은 다양한 생물학적 기전에 핵심적인 역할을 한다는 점 때문이다. 마찬가지로, VDP는 국지적인 산화 환원 환경에 따라 산화 환원 스위치로서 작용할 수 있다. 게다가 VDP는 단백질 합성과 기능에도 관여하는 것으로 알려진바, 암, 당뇨, 혈소판 기능, 인간 면역 결핍 바이러스 1형 (HIV-1), 신경 퇴행 등과 같은 여러 인간 질병들과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, 문헌 조사에 따르면, VDP는 미토콘드리아에 풍부하게 분포하며 미토콘드리아 단백질 thiol의 5-20%를 차지하는 것으로 추정된다(비특허문헌 1). 세포소기관은 ROS 생성의 주된 원인이기 때문에(비특허문헌 2), 미토콘드리아 VDP는 미토콘드리아의 산화 방어 기작과 산화 환원 균형을 잡는데 있어 주목할만한 기여를 한다. 따라서 생물학적 시스템 내에서 VDP의 단백질군을 밝혀내기 위한 VDP 표지 형광 프로브의 개발은 큰 가치를 지닌다.

### 선행기술문헌

#### 비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Requejo, R.; Chouchani, E. T.; James, A. M.; Prime, T. A.; Lilley, K. S.; Fearnley, I. M. ; Murphy, M. P. Quantification and identification of mitochondrial proteins containing vicinal dithiols. Arch. Biochem. Biophys. 2010, 504, 228-235.

(비특허문헌 0002) Jones, D. P.; Go, Y. M. Redox compartmentalization and cellular stress. Diabetes

Obes. Metab. 2010, 2, 116-125.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

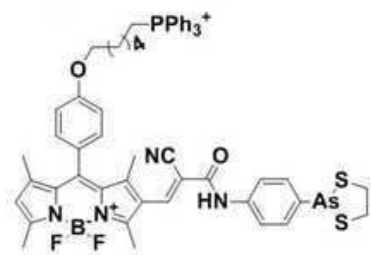
[0005] 본 발명에서는 비시날 디티올 단백질에 고선택성을 갖는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 센서를 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0007] 하기 [화합식 1]로 표시되는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0008] [화합식 1]



[0009]

[0010] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 비시날 디티올 단백질 검출용 형광 센서를 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물은 세포 내 미토콘드리아에 존재하는 비시날 디티올 단백질에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 우수한 광물리적 특성을 가지고 있어 비시날 디티올 단백질을 효과적으로 이미징할 수 있도록 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따라 [화합식 1]로 표시되는 미토콘드리아 비시탈 디티올(mitochondrial vicinal dithiol) 선택적 형광 프로브 화합물 1과, 비티올(non-thiol) 유사체 화합물 2의 화학적 구조를 나타낸 것이다.

도 2의 (a)는 메탄올 중 화합물 1(1.0  $\mu\text{M}$ )의 흡광 스펙트럼, (b)는 형광 스펙트럼(붉은색)과 여기 스펙트럼(파란색)을 나타낸 것이다. 방출 스펙트럼은 534nm에서의 여기를 통해 획득하였고, 여기 스펙트럼은 514nm에서의 방출을 통해 획득하였다.

도 3은 프로브 화합물 1과 반응한 후 rBSA와 oBSA의 겔 전기영동 결과를 나타낸다. 형광 및 CBB G250염색 이미지는 SDS-PAGE 겔에서 획득하였다; (a) 다양한 양의 rBSA의 형광 이미지를 겔 상에서 획득; (b) 단백질 크기 마커는 M 라인에 표시. (a)에 나타난 rBSA의 양은 레인 당 10  $\mu\text{g}$ 이었고, 형광 이미지는 형광 스캐너(Typhoon FLA 9400, GE)를 이용하여, 488nm에서 여기 및 500~540nm의 band pass 필터를 이용하여 획득하였다.

도 4는 화합물 1의 영구적 표지(permanent labeling) 결과를 나타낸 것이다. (a) HeLa 세포주는 화합물 1과 2로 각각 처리하여(각각 1.0 mM) 1시간 동안 배양하였다(37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). HeLa 세포주의 공초점 현미경 이미지는 ethanol 중 1XPBS (1:1 v/v)로 세척되기 전과 후에 얻었다. 모든 이미지는 488nm의 여기 및 505nm long pass 방출 필터를 이용하여 기록하였다. (b) image J 프로그램을 이용하여 각 세포 당 상대적 형광 강도 (relative fluorescence intensity, R. F. I)를 막대그래프로 나타내었다. 결과는 3번의 독립적 실험들의 평균 ( $\pm$  SEM)을 나타낸다. 통계적 유의성은 세척 전 각 형광 강도를 비교하여  $p < 0.001$ 에 대해 \*\*\* 로 표시하였다.

도 5는 HeLa 세포주에서 프로브 화합물 1의 세포 내 공동 국부화를 나타낸다. 세포들은 화합물 1(1.0  $\mu\text{M}$ )과 배양한 후 Mito-Tracker Red(0.1  $\mu\text{M}$ ), Lyso-Tracker Red(0.1  $\mu\text{M}$ ), ER-Tracker Red(0.2  $\mu\text{M}$ )와 같은 다른 세포

소기관 마커들과 배양하였다. 화합물 1 처리 세포들의 이미지는 458nm의 여기 및 505-530 nm band 패스 방출 필터를 이용하여 취득하였고, 세포소기관 처리된 세포들의 이미지는 633 nm(Mito-), 543nm(Lyso-, ER-tracker)의 여기 파장에서 650nm 롱패스 필터로 기록하였다. Scale bar=50  $\mu$ m. Rr = Pearson 상관계수

도 6 oligomeric A $\beta_{1-42}$ 의 프로브 화합물 1로 처리된 세포에 대한 형광 표지 효과를 나타낸 것이다; 세포들은 oligomeric A $\beta_{1-42}$ 와(10.0  $\mu$ M) 또는 없이 12시간 동안 배양하였다(37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>). 배양 후 각 샘플들을 Mito-Tracker (0.1  $\mu$ M)로 20분간 처리한 후 DMEM 중 프로브 화합물 1로 60분간 처리하였다(37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>). 프로브 화합물 1의 공초점 형광 이미지는 488nm의 여기 파장 및 505-560nm 방출 필터를 이용하여 취득하였고, Mito Tracker의 공초점 형광 이미지는 633nm 여기 파장 및 650nm 방출 필터를 이용하여 취득하였다. 모든 이미지는 1 XPBS 세척 후에 기록하였다. Scale bar =50  $\mu$ m. 각 세포의 상대적 형광 강도의 히스토그램은 image J를 이용하여 취득하였다. 결과는 10번의 독립적 실험의 평균( $\pm$  SEM)을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군(A $\beta$  없이)과 비교하여 p < 0.001일 때 \*\*\*로 표시하였다.

도 7은 프로브 화합물 1-변형 단백질(probe 1-modified proteins)의 동정 결과를 나타낸 것이다; (a) HeLa 세포주를 2  $\mu$ M의 As-TP와 1시간 동안 37  $^{\circ}$ C에서 배양한 후 차가운 PBS로 행구었다. HeLa 세포주의 3개의 세포 분획물을 10% SDS-PAGE 겔에서 분리하고 겔의 형광 이미지를 100  $\mu$ M 해상도로 Typhoon 9400 variable mode imager (Amersham Bioscience/GE Healthcare)를 이용하여 취득하였다. 형광 이미징 후에 겔을 CBB 염색하고, 상응하는 형광 이미지와 합쳐 SDS-PAGE 겔 상의 같은 위치에 있는 단백질 밴드를 잘라내었다; Cyto, 세포질; Mito, 미토콘드리아; Nuc, 핵 (b)는 VDAC2에 상응하는 단백질 밴드에서 얻어진 [M+2H]<sup>2+</sup> peptide의 MS/MS 스펙트럼이다. CBB 염색된 SDS-PAGE의 밴드는 trypsin으로 처리한 후 나노 LC-ESI-MS/MS를 통한 질량 분광법으로 분석하였다. 분석 정보는 다음을 포함한다: Uniprot 데이터베이스의 등록번호, 분자량, 서열 기반 식별에서 서열 분석된 tryptic 조각과 일치하는 단백질 서열 비율과 Mascot 스코어. (c)는 HeLa 세포주의 미토콘드리아 분획물을 항 VDAC2 항체를 이용해 면역 블로팅한 결과이다. 결과는 3 번의 독립적인 실험의 대표값이다.

도 8은 메탄올 중 화합물 2(1  $\mu$ M)의 흡광 (a), 형광 (red in b) 및 여기 (blue in b) 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 9는 ACN, dioxane 및 DW와 같은 서로 다른 용매에서 화합물 1 (1  $\mu$ M)의 방출 스펙트럼을 나타낸다(여기 파장은 514nm).

도 10은 PBS 및 4% 포름알데히드로 세척하기 전후의 화합물 1 처리된 HeLa 세포의 공초점 현미경 이미지이다. 세포는 프로브 화합물 1(1  $\mu$ M)로 37  $^{\circ}$ C에서 1 시간 처리하였다. 1X PBS 세척 후, -20%에서 30 분 동안 4% 포름알데히드로 세포를 처리하였다. 이미지는 488nm의 여기 파장, 505nm의 롱패스 방출 필터 조건에서 취득하였다.

도 11은 PAO 처리 48시간 후 화합물 1(1  $\mu$ M)로 처리한 HeLa 세포의 형광 이미지이다. 이미지는 488nm의 여기 파장, 505nm의 롱 패스 방출 필터 조건에서 취득하였다.

도 12는 올리고머 A $\beta_{1-42}$ 와 (미토콘드리아 손상 물질) MitoSOX (적색 방사성 미토콘드리아 ROS 지시약)를 배양 시간의 함수로 함께 표지한 HeLa 세포의 공초점 현미경 이미지이다. 세포를 35  $\pi$  공초점 접시에 분주하였다. 세포는 인큐베이터 (37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 2, 4, 6, 8, 10 및 12 시간 동안 올리고머 A $\beta_{1-42}$  (10.0  $\mu$ M)로 전처리하였다. 각 배양 시간 후, 세포를 37  $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 1 x PBS 중 MitoSOX (2.0  $\mu$ M)와 함께 공동 표지하였다. 형광 공초점 이미지는 488nm의 여기 파장 및 530nm 롱패스 방출 필터를 사용하여 수집하였고, 올리고머 A $\beta_{1-42}$  미처리 대조군 세포와 비교하였다. 스케일 바는 50  $\mu$ m를 나타낸다. 세포 당 상대 형광 강도 (R.F.I.)의 히스토그램은 이미지 J 프로그램을 사용하여 나타내었다. 결과는 5개의 독립적인 실험 (n = 5)의 평균 ( $\pm$  SEM)을 나타낸다. 통계적 유의성은 p < 0.001에 대해 \*\*\*로 표시하였다.

도 13은 Organelle-selective 마커를 사용하여 organelle fraction의 순도를 확인하기 위한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 세포질, 미토콘드리아 및 핵에 대한 마커는 각각  $\beta$ -액틴, VDAC-1 및 라민 B이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명의 이해를 위하여 구체적인 실시예를 통하여 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기의 실시예에 의해서 본 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니다.

### [0014] 실험 방법

- [0015] **재료, 방법 및 기기장치**
- [0016] HeLa 세포는 American Type Culture Collection (ATCC) (VA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양을 위한 모든 시약, ER-Tracker Red (BODIPY TR Glibenclamide), MitoTracker Deep Red FM 및 LysoTracker Red DND-99는 Invitrogen (Oregon, USA)에서 구입하였다. 메탄올, DTT (Dithiothreitol), HFIP(1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol) 및 TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)를 Sigma-Aldrich로부터 구입하여 추가 정제없이 사용하였다. 아밀로이드  $\beta$ -단백질(1-42)은 바켄 (Bachem)에서, Lamin B (H-90)와  $\beta$ -Actin (C4)은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, 미국)에서, Anti-VDAC 1 및 VDAC 2는 Abcam (Cambridge, UK)에서, Sequencing-grade trypsin은 Promega (Wisconsin, US)에서 구입하였다.
- [0018] **UV-Vis 및 Fluorescence Spectroscopy**
- [0019] 화합물 1(1 mM)의 스톡 용액을 DMSO에서 제조하였다. V-560 UV/VIS 분광 광도계 (JASCO, Japan)를 사용하여 흡수 스펙트럼을 기록하고, 형광 스펙트럼은 RF-5301 형광 분광 형광 측정기 (Shimadzu)를 사용하여 기록하였다.
- [0021] **환원된 BSA(rBSA) 및 산화된 BSA (oBSA)의 형성**
- [0022] BSA 용액을 4 °C에서 밤새 1 mM DTT로 처리하여 rBSA를 얻었고 BSA를 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 25 °C에서 10분간 처리하여 oBSA를 얻었다. 이 샘플을 증류수로 50 배 희석한 다음 단백질을 50% 아세톤에서 -20 °C, 2시간 동안 침전시켜 회수하였다.
- [0024] **올리고머 A $\beta$ <sub>1-42</sub>의 형성**
- [0025] 펩타이드(Beckham)를 100% HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol)에 1mg/mL의 농도로 용해시키고, 3일 동안 실온에서 볼 텍싱하면서 배양하였으며, 튜브를 똑바로 세운 상태에서 10 분 동안 초음파 처리했다. 다음으로, 샘플을 질소 가스를 이용하여 건조시킨 즉시 바이알에 캡핑하였다. A $\beta$  펩타이드 스톡 용액(50  $\mu$ g)을 13  $\mu$ l DMSO에 재현탁시키고 50  $\mu$ l의 DMEM을 첨가 및 혼합한 후 2시간 동안 배양하였다 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). 이 샘플은 전체 부피가 63  $\mu$ L이고 올리고머 형태의  $\beta$ -아밀로이드의 농도는 100  $\mu$ M이다.
- [0027] **세포 배양**
- [0028] HeLa 세포를 DMEM 배지에서 배양하였다. 모든 배지에는 10% (v/v) FBS (WelGene), penicillin (100 units/mL), 및 스트렙토마이신 (100 mg/mL)을 첨가하여 사용하였다. 배양된 모든 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 가습 분위기에서 37 °C로 유지되었다.
- [0030] **공초점 현미경**
- [0031] 영상화 하루 전 37 °C에서 5% (v/v) CO<sub>2</sub>를 함유 한 가습 대기에서 배양 한 세포를 Cover glass Bottom Dish (SPL Lifesciences Co., Ltd.)에 분주하였다. 세포 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Zeiss LSM 510, Zeiss, Oberko, Germany)을 사용하여 획득하였다.
- [0033] **SDS-PAGE 및 겔의 형광 이미지**
- [0034] 단백질 또는 세포에 대한 화합물 1의 선택성을 10% SDS-PAGE로 확인하였다. 샘플을 37 °C에서 1시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 습도 조건하 탈 이온수 (DW) 또는 DMEM에서 화합물 1로 처리하였다. 라벨링 후, 샘플을 -20 °C에서 2시간 동안 50% (v/v) 아세톤으로 침전시킨 후, tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)을 갖는 SDS PAGE 로딩 완충액과 혼합하고, 전기영동을 즉시 개시하였다. 겔을 형광 스캐너 (Typhoon FLA 9400, GE)로 이미지화 하였다 (488nm에서 여기, 500nm 내지 540nm 범위의 밴드 패스 필터). 형광 이미지 획득 후 동일한 겔을 Coomassie

brilliant blue (CBB) G250로 염색하였다.

## [0036] 2 차원 (2D) 전기 영동

[0037] HeLa 세포를 100pai 접시에 분주하고, 10  $\mu$ M 올리고머 A $\beta$ <sub>1-42</sub>를 함유한 배양 배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C에서 12시간 동안 처리한 다음 같은 조건에서 화합물 1을 1시간 동안 처리하였다. 상기 HeLa 세포를 PBS로 2회 세척한 후 수득하고, 균질화하기 전에 용해 완충액에서 용해시켰다. 단백질 함량은 Bradford's method에 따라 결정하였다. 동일한 부피의 100% 아세톤을 용균된 샘플에 첨가하였다. vortexing 후, 시료를 최소 2시간 동안 -20 °C에서 배양하였다. 샘플을 12000 rpm으로 10분간 원심 분리하고 상등액을 따라 내었다. 이러한 방식으로 수득된 펠렛을 잠시 건조시키고 재수화 완충액(8M urea, 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 0.5% (w/v) TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride), 1% (v/v) ampholyte (pH 3-10) and 1  $\mu$ l/mL protease inhibitor cocktail)에 재현탁시켰다. 생성된 용액을 isoelectric focusing strip(pH 3-10 NL 구매, 7cm, GE Healthcare Life Sciences)에 적용하였다. 스트립을 13시간 동안 50V에서 재수화시키고 15,000 Vh까지 포커싱 하한 후 평형 용액(50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate), 0.5% (w/v) TCEP, and 0.001% (w/v) bromophenol blue)으로 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 DTT가 부족하고, 2.5%(w/v) iodoacetamide가 포함된 동일 버퍼로 15분 동안 처리하였다. 샘플을 Laemmli 방법에 따라 10% 겔을 사용하여 2차원 (2D) 전기영동 하였다. 형광겔 이미징은 Typhoon 9400 스캐너를 사용하여 수행하였다. 겔 염색은 변형된 콜로이드 성 CBB (쿠마시 브릴리언트 블루) G250 염색법을 사용하여 수행하였다. 염색겔의 염색을 24 시간 동안 두 배 증류수를 이용하여 제거하였다. 이미지는 UMAX PowerLook 2100XL 스캐너 (Willich, Germany)로 수득하였다.

## [0039] 질량 분석

[0040] 펩티드 시퀀싱에 대한 탠덤 질량 스펙트럼 (MS/MS) 분석은 질량 분광계 (Q-TOF Ultima<sup>TM</sup> global, Waters Co. UK)를 사용하여 나노 유동 역상 HPLC/ESI/MS에서 수행되었다. 트립신 소화액 5  $\mu$ l를 버퍼 A (물/ACN/포름산 95:5:0.2, v/v)에 용해시키고, electrospray ionization SilicaTip<sup>TM</sup> ( $\pm$ 10  $\mu$ m, New Objective, USA)를 이용하여 C18 역상 75  $\mu$ m i.d. x 150 mm 분석 컬럼(3  $\mu$ m particle size, Atlantis<sup>TM</sup> dC18, Waters)에 주입하였다. 펩티드는 트랩 컬럼(i.d. 0.35 x 50 mm, OPTI-PAK<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>, Waters) 카트리지를 사용하여 분리하기 전에 라인에서 탈염시키고, 5 내지 80% 버퍼 B (물/ACN/포름산; 5:95:0.2, v/v)를 120분 동안 처리하였다. 유속은 200 nl/min으로 설정하고 스프레이하기 전에 capillary voltage (3.0 kV)를 HPLC 이동상에 가하였다. 크로마토 그래피는 Q-TOF Ultima<sup>TM</sup> global (Version 4.0, Waters Co., UK)의 기기 제어 소프트웨어 MassLinx를 사용하여 수행하였다.

## [0042] 웨스턴 블랏팅

[0043] 같은 부피의 세포질 분획을 5x Laemmli 샘플 버퍼와 혼합하고 5분간 끓였다. 끓인 샘플을 10% SDS 폴리아크릴아미드 겔에서 분리한 다음 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 멤브레인을 블로킹 버퍼 (5% 탈지유 또는 0.5% 트윈-20을 함유하는 트리스 완충 식염수 중 1% BSA)와 함께 실온에서 흔들어 주면서 1시간 동안 배양하였다. 블로킹 버퍼 내에서, 블롯을 지시된 1차 항체와 함께 4 °C에서 밤새 배양하였다. TBST로 3회 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse immunoglobulin G (IgG; 1:5000) 또는 goat anti-rabbit IgG (1:3000)와 함께 블롯을 인큐베이션 하였다. Bio-Rad ChemiDoc<sup>TM</sup> Touch Imaging System (Bio-Rad, Richmond, CA, US)을 사용하여 특정 면역 반응 단백질 밴드를 시각화하였다.

## [0045] 화합물 합성

[0046] 하기 합성경로에 따라 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물(화합물 1)을 합성하였다.



[0050] 화합물 10(4-Aminophenylarsenoxide)의 합성

[0051] *p*-Arsanilic acid (화합물 11) (22 g, 100 mmol)을 메탄올 (100 mL)에 용해시키고 환류하에 가열하였고, 30분 내에 Phenylhydrazine (23 mL, 220 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 80 °C에서 농축하여 용매를 제거한 다음, 물 (100 mL), NaOH 수용액 (0.2 M, 60 mL) 및 에테르 (2 x 150 mL)로 세척 하였고, 0 °C에서 밤새 현탁시킨 수성 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (5M, 80mL)으로 처리하였다. 침전물을 Buechner-funnel 여과를 통해 수집하고, 얼음물 (25 mL×2)로 세척하고 KOH로 건조시켜 백색 분말의 화합물 10을 수득하였다(6.5 g, 26% 수율).

[0053] 화합물 9(2-*p*-Aminophenyl-1, 3, 2-Dithiarsenolane)의 합성

[0054] 무수 에탄올 (25 mL) 중 화합물 10 (2.6 g, 13 mmol)의 용액에 ethanedithiol(1.5 mL, 20 mmol)을 적가하고 일 정하게 교반하면서 20분 동안 가열 환류하였다. 용액을 드라이 아이스/아세톤에서 냉각시키고, 톨루엔 (106 mL)과 함께 증류 및 농축시켰다. 백색 결정을 에탄올로부터 재결정 화하여 1.8g (34% 수율)의 화합물 9를 수득하 였다.

[0055] <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*6, 400 MHz) δ 3.13-3.36 (m, 4H), 5.40 (s, N-H, 2H), 6.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H).

[0057] 화합물 8의 합성

[0058] 50 ml 둥근 바닥 플라스크에서 DMF (20 ml) 중 2-cyanoacetic acid (0.86 g, 10 mmol), EDCI (1 g, 7 mmol), DMAP (0.12 g, 1 mmol) 및 DIPEA의 반응 혼합물을 실온에서 수분 동안 교반하였다. 이어서, DMF에 용해된 화합물 9 (1.3 g, 5 mmol)를 상기 용액에 적가하고, 밤새 실온에서 교반한 후 식염수 (70 mL)에 붓고 DCM (100 mL)으로 추출한 후 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시켰다. DCM을 증발시킨 후 생성물을 칼럼 크로마토 그래피로 정제하여 화합물 8(1.3g, 수율 80%)을 수득하였다.

[0059]  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  3.11 (t,  $\text{CH}_2$ , 2H,  $J = 6$  Hz), 3.28 (t,  $\text{CH}_2$ , 2H,  $J = 6$  Hz), 3.84 (s,  $\text{CH}_2$ ,

2H), 7.50-7.60 (dd, ArH, 4H,  $J = 8\text{Hz}$ ), 7.89 (s, NH, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  31.40, 36.49, 42.09, 49.41, 116.38, 119.63, 132.15, 138.85, 161.81

[0061] 화합물 6의 합성

[0062] 4-hydroxyphenyl aldehyde (3 g, 24 mmol) 및 2,4-dimethylpyrrole (5 mL)을 10 mL의 DCM에서 혼합한 후, Ar 대기하, 0 °C에서 0.1 mL TFA를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 밤새 교반시킨 후, DDQ (2.8g)를 첨가하고, 1시간 더 연속적으로 교반하였다. 최종적으로,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (3 mL) 및 TEA (6 mL)를 첨가한 후 5 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 생성물을 실리카겔 크로마토 그래피 (hexane-DCM as eluent phase)로 정제하여 화합물 6(1.8g, 21%)을 수득하였다.

[0064] 화합물 5의 합성

[0065] 화합물 6 (1.4 g, 4 mmol), 1,6-dibromobexane (2 g, 8 mmol) 및  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.6 g, 4 mmol)을 15 mL의 무수 DMF에서 50 °C 조건하 밤새 교반 하였다. 생성물을 실리카겔 크로마토 그래피(DCM-메탄올)로 분리하여 화합물 5(1.6g, 80%)를 수득하였다.

[0066]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.38 (s,  $\text{CH}_3$ , 6H), 1.48 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.78 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.82 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.49(s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 3.38 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 4\text{ Hz}$ ), 3.95 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 4\text{ Hz}$ ), 5.92 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 6.93 (d, 2H, ArH,  $J = 8\text{ Hz}$ ), 7.05 (d, 2H, ArH,  $J = 8\text{Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  14.76, 14.81, 25.52, 28.17, 29.29, 32.87, 34.09, 68.02, 115.26, 121.33, 126.89, 129.30, 132.02, 142.22, 143.38, 155.28, 159.83

[0068] 화합물 4의 합성

[0069]  $\text{POCl}_3$  (1.54 g, 10 mmol)를 건조 DMF (6 mL)에 0 °C 조건하에 30분 동안 적가한 후, 3 mL의 무수 DMF에 용해 된 화합물 5 (1.6 g, 3 mmol)를 첨가하여 얻어진 혼합물을 5시간 동안 60 °C에서 가열하였다. 상기 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후, 얼음물 (100 mL)에 붓고, 이어서  $\text{NaHCO}_3$ 로 중화시켰다. 조 생성물을 DCM으로 추출하고 실리카겔 크로마토 그래피 (DCM- 메탄올)로 정제하여 화합물 4(1.2g, 75.5%)를 수득하였다.

[0070]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.49 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 1.55 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.72 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.92 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.61(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.82(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.45 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 4\text{ Hz}$ ), 4.03 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 4\text{ Hz}$ ), 6.15 (s, 1H,  $\text{CH}_3$ ), 7.03 (d, 2H, ArH,  $J = 8\text{ Hz}$ ), 7.16 (d, 2H, ArH,  $J = 8\text{Hz}$ ); 10.01 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  12.00, 15.34, 25.57, 26.88, 28.10, 29.25, 32.68, 33.99, 45.23, 68.14, 115.39, 124.07, 126.13, 129.39, 134.72, 143.06, 144.05, 147.54, 148.23, 156.56, 160.22, 161.61, 186.17

[0072] 화합물 3의 합성

[0073] 화합물 4(1.1 g, 2 mmol)를 triphenylphosphine(1 g, 3.8 mmol)과 함께 20 mL 톨루엔에 넣고 80 °C에서 8시간 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 디에틸에테르(150 mL)로 희석하여 생성물을 침전 및 여과하고, 과량의 디에틸에테르로 세척하여 화합물 3 (1 g, 70%)을 수득하였다.

[0074]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.21 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 1.26 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.80 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.80 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 6\text{ Hz}$ ), 4.01 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 6\text{ Hz}$ ), 6.16 (s, 1H, ArH), 7.02 (d, 2H, ArH,  $J = 8\text{ Hz}$ ), 7.13 (d, 2H, ArH,  $J = 8\text{ Hz}$ ), 7.72-7.88 (m, 15 H, ArH,  $J = 8\text{ Hz}$ ), 9.98 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  11.94, 13.27,

15.36, 22.84, 25.95, 27.73, 29.03, 29.84, 30.24, 68.13, 84.97, 115.60, 118.01, 118.86, 124.14, 126.27, 130.41, 130.65, 133.76, 142.94, 147.78, 156.09, 160.23, 161.65, 186.14.

[0076] 화합물 2의 합성

[0077] DMF/메탄올 용매 (1/1 v/v) 20 mL 중 화합물 3(0.72 g, 1 mmol), 2-cyanoactylalanine (0.32 g, 2 mmol) 및 피페라진 (0.17 g, 2 mmol)을 혼합하였다. 수득된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 반응 혼합물을 건조 디에틸 에테르 (200 mL)에 부어서 침전물을 형성시키고, 이를 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피 (DCM-메탄올)상에서 추가로 정제하여 화합물 2를 수득하였다.

[0078]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta$  9.98 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.84 - 7.76 (m, 15H), 7.70 - 7.66 (m, 10H), 7.12 (d,  $J$  = 8.43 Hz, 2H), 7.00 (d,  $J$  = 8.55 Hz, 2H), 6.13 (s, 1H), 4.09 (t,  $J$  = 6.59 Hz, 2H), 3.97 (t,  $J$  = 6.26 Hz, 2H), 2.79 (s, 2H), 2.59 (s, 2H), 2.25 - 2.21 (m, 2H), 2.02 - 1.96 (m, 2H), 1.79 - 1.46 (m, 20H).

[0080] 화합물 1의 합성

[0081] 화합물 3 (0.72 g, 1 mmol), 화합물 8 (0.48, 1.5 mmol) 및 피페라진 (0.17 g, 2 mmol)을 20 mL의 DMF/메탄올 용매 (1/1, v/v)에서 혼합하였다. 수득된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 건조 디에틸에테르 (200 mL)에 부어서 침전물을 형성시키고, 이를 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피 (DCM-메탄올)상에서 추가로 정제하여 화합물 1(0.5 g, 50%)을 수득하였다.

[0082]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.44 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 1.47 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.50 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J$  = 4 Hz), 1.73 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ,  $J$  = 4 Hz), 2.56 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.63 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.12 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.31 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.73 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.09 (s, 1H, ArH), 6.96 (d, 2H, ArH,  $J$  = 8 Hz), 7.10 (d, 2H, ArH,  $J$  = 8 Hz), 7.55 (d, 2H, ArH,  $J$  = 8 Hz), 7.67 (m, 8H, ArH), 7.73 (m, 9H, ArH), 7.80 (s, 1H, CH), 7.83 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  14.87, 15.40, 22.50, 22.88, 25.89, 29.07, 36.71, 42.02, 53.42, 68.12, 115.67, 118.00, 118.92, 120.49, 123.98, 129.21, 130.77, 135.90, 138.57, 140.53, 147.51, 153.43, 160.18, 162.76; Calculated  $[\text{M}]^+$ ,  $\text{C}_{55}\text{H}_{54}\text{AsBF}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{PS}_2^+$ , molecular weight: Fw = 1021.27; Mass spectra ESI $^+$ , found peak, 1021.50

[0084] 결과 및 고찰

[0085] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 화합물(화합물 1)은 BODIPY(형광단)가 구조적으로 triphenylphosphonium 그룹 (미토콘드리아 유도 단위), phenylarsenate 그룹 (VDP 인식 부위)과 각각 적합한 연결부를 이용하여 결합된 구조를 가지고 있다. 하기 실시예에서 설명하는 바와 같이, 본 발명에 따른 프로브 화합물 1은 미토콘드리아 막결합 VDP를 효율적으로 탐지하여 미토콘드리아의 막에 국부화되었으며 특히 전위의 존성음이온 채널2 (VDAC2)를 효율적으로 탐지할 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 프로브 화합물 1은 상기 [합성 경로]에 따른 절차를 통해 합성하였다. 구체적으로, 4-hydroxybenzaldehyde (화합물 7)로부터 4-hydroxyphenyl-tetramethyl BODIPY (화합물 6)을 20% 수율로 수득하였다. 이어서, 1,6-dibromohexane으로 화합물 6을 알킬화하여 화합물 5를 생성시킨 다음, Vilsmeier-Hack 반응 등을 통해 aldehyde 유도체로서 화합물 4를 합성하였다. 화합물 4를 toluene 중 triphenylphosphine과 함께 12 시간 동안 환류시켜 화합물 3을 수득하고, 최종적으로 비소화합물 8과 비소가 없는 유도체와 각각 염기 촉매 반응시켜 본 발명에 따른 화합물 1과, 기준(대조군) 화합물 2를 합성하였다.

[0087] 화합물 1의 분광특성은 도 2에 나타나 있으며, 여기서 메탄올 중 화합물 1은 514와 534nm에서 각각 최대 흡광도와 최대 방출값을 나타내었다. 기준 화합물 2의 스펙트럼은 화합물 1의 스펙트럼과 거의 동일하며 이는 benzamide 그룹의 유기 비소 부분의 가수분해가 BODIPY의 분광 속성에 거의 영향을 끼치지 않는다는 것을 보여

준다(도 8). 뿐만 아니라 화합물 1은 다른 용매들에서 최대 광방출량 변화가 거의 없었다는 점에서 용매 극성에 민감하지 않다는 것을 확인하였다(도 9). 마찬가지로 화합물 1은 유기 비소 부분을 통해 생체 분자를 변형시켰을 때에도 작은 분광 변화가 예상되었다.

[0088] 수성 환경에서 화합물 1과 단백질의 vicinal dithiol motif와의 반응 여부는, 부분적으로 환원된 bovine serum albumin (rBSA)을 화합물 1과 반응시키고 그 생산물을 산화된 BSA (oBSA)에서의 생산물과 dodecyl sulfate-polyacrylamide 젤 전기영동 (SDS-PAGE)을 통해 비교하여 확인하였다. rBSA와 oBSA는 BSA를 각각 1,4-dithiothreitol (DTT)과 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )로 처리하여 제조하였다. BSA와 프로브 화합물 1의 반응 혼합물의 겔 전기영동 프로파일은 도 3에 나타내었고 CBB G250 염색 또는 프로브 화합물 1의 광방출을 이용하여 단백질 밴드를 시각화하였다. 도 3a에 나타난 바와 같이 CBB 염색 이미지상에서 거의 동일한 양의 BSA가 관찰되었지만, 단일 형광 밴드는 rBSA를 넣은 레인에서만 발견되었다. 또한 rBSA의 형광 밴드 강도는 농도에 따라 증가하였다(도 3b). 겔 전기영동을 위한 실험 조건에 강한 세정제(SDS)가 사용된 것을 고려할 때, 겔에서의 방출은 프로브 화합물 1과 단백질 사이의 비공유 결합으로 인한 것이 아니라 rBSA와의 공유 결합으로 인한 것이며, rBSA의 vicinal dithiol 그룹과의 반응에 의한 것으로 추측된다.

[0089] 프로브 화합물 1이 살아있는 세포 내에서 공유결합으로 세포 단백질을 변형할 수 있는지 확인하기 위하여 HeLa 세포를 프로브 화합물 1, 기준 화합물 2와 함께 1시간 동안 별도 배양하고, 해당 이미지를 도 4, 도 10-11에 나타난 바와 같이 공초점 형광 현미경을 이용해 기록하였다. 도 4의 왼쪽에 나타난 바와 같이 화합물 1과 2로 처리된 HeLa 세포의 공초점 이미지는 1시간 배양 후 강한 녹색 신호를 보였다. 하지만 50% 알코올성 PBS 용액 (1:1 v/v)으로 연속적으로 세척하였을 때, 화합물 1로 처리된 세포들은 지속적으로 형광 강도를 유지한데 반해 화합물 2로 처리된 세포들에서 나온 신호는 크게 감소하였다. 화합물 1로 처리된 세포들의 형광 강도는 4% formaldehyde와 PBS로 연속 3회 행군 후에도 일정하게 유지되었다(도 10). 이러한 결과는 화합물 1로 처리된 세포들의 형광 신호가 대부분 세포 거대분자의 공유결합 표지에 도움을 받는다는 것을 시사하며, 이는 프로브 화합물 1에 의한 vicinal thiol 단백질 표지로 추측된다. 도 4b에 나타난 형광 강도의 정량화는 이 결론에 더욱 확신을 준다. 뿐만 아니라 본 발명에서는 VDP의 잘 알려진 변형인자인 phenylarsine oxide (PAO)의 영향에 대해서도 조사하였다(Hoye, A. T.; Davoren, J. E.; Wipf, P.; Fink, M. P.; Kagan, V. E. Targeting mitochondria. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 87-97.). 서로 다른 농도의 PAO 존재하에서 화합물 1이 처리된 세포들의 공초점 이미지는 용량 의존적으로 형광 강도의 점진적 감소를 나타내었으며(도 11), 이는 화합물 1에 의한 변형이 VDP에 대한 것임을 의미한다.

[0090] 살아있는 세포 내에서 프로브 화합물 1의 반응을 조사하기에 앞서 세포소기관 마커(*i.e.*, Mito-, Lyso- and ER-trackers)를 이용한 형광 공동국부화 (co-localization) 실험을 통해 프로브 화합물 1의 세포 내 국부화를 확인하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 화합물 1이 처리된 세포의 공초점 이미지는 Pearson의 상관계수가 Mito-는 0.89, Lyso-는 0.41, ER-tracker는 0.51라는 점에서 Lyso-와 ER-trackers의 공초점 이미지에 비해 Mito-tracker의 공초점 이미지와 더 잘 겹친다. 이러한 특이적인 미토콘드리아 국부화는 전기적으로 양성을 띤 큰 부피의 소수성 부분에 의해 미토콘드리아 유도 단위로서 잘 알려진 triphenylphosphonium 그룹 때문이다. 종합하면 이러한 결과는 프로브 화합물 1의 주요 국부화 위치가 프로브 화합물 1이 거대분자들(대체로 환원된 형태의 vicinal 단백질)을 공유결합으로 변형할 수 있는 곳인 미토콘드리아 라는 것을 암시한다.

[0091] 더 나아가 본 발명에서는 미토콘드리아에 국부화된 VDP에 대한 프로브 화합물 1의 특이성 (specificity)을 평가하기 위해 잘 알려진 미토콘드리아 손상 물질인 oligomeric  $A\beta_{1-42}$  존재하에 공초점 형광 이미지를 기록하였다.  $A\beta_{1-42}$  처리는 ROS의 급격한 생산 증가를 유발하였으며 이는 미토콘드리아 과산화물 지표(indicator)인 MitoSOX의 증가된 적색 신호에 의해 시각화되었다(도 12). 이러한 결과는  $A\beta_{1-42}$  처리가 실제로 미토콘드리아에서 세포로의 ROS 생성을 유발한다는 것을 나타낸다. oligomeric  $A\beta_{1-42}$  처리 세포에 이어진 화합물 1의 첨가는  $A\beta_{1-42}$  처리를 하지 않은 세포들에 비해 프로브 화합물 1에 해당하는 형광 강도가 유의하게 감소하였다(도 6). 하지만 비슷한 조건에서 MitoSOX의 형광 강도 변화는 무시할 만한 수준이었다. 프로브 화합물 1의 극적인 형광 감소는 프로브 화합물 1의 낮은 효율의 세포 로딩에 기인한 것이 아니라,  $A\beta_{1-42}$  처리 시 미토콘드리아 VDP와 화합물 1의 비효율적인 결합 때문이며, 이는 프로브 화합물 1이 미토콘드리아 VDP에 매우 민감하다는 것을 의미한다.

[0092] 세포 내 화합물 1-변형된 단백질을 확인하기 위해 미토콘드리아 분할법 (fractionation)에 기반한 단백질체학적 접근법인 SDS-PAGE 상의 단백질 분리와 질량 분광계 (mass spectrometric, MS)분석을 수행하였다. 화합물 1과 함께 배양한 후 HeLa 세포를 3개의 세포 내 구획(세포질, 미토콘드리아, 핵)으로 분획하였다. 수득한 분획된 단

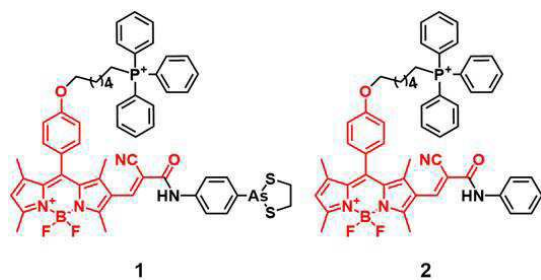
백질들은 SDS-PAGE에 적용하여 분획의 순도(purity)를 세포소기관 선택적 단백질 마커(marker)를 이용해 Western blot 분석으로 확인하였다(도 13). 그런 다음 분리된 단백질을 프로브 화합물 1로 처리하고 형광 이미지를 기록하기 전에 겔 전기영동에 적용하였다. 도 7A에 나타난 바와 같이, 동일한 겔을 다른 단백질 발현을 확인하기 위해 CBB 염색하였다. 놀랍게도 형광 이미지는 우세하게 표지된 미토콘드리아 분획물에서 단일 밴드를 나타내었고, 그 강도는 oligomeric A $\beta$ <sub>1-42</sub> 처리시 감소하였다. 마찬가지로 이 단백질 분획물의 vicinal dithiol 부분의 산화 환원은 A $\beta$ <sub>1-42</sub>에 의한 미토콘드리아 독성에 관련되어있는 것으로 보인다. MS/MS 분석에서 이 밴드는 전체 발현 수준에서 큰 변화 없이 전압 의존성 음이온 채널(Voltage-dependent anion channel 2, VDAC2)로 할당되었다(도 7C). 대조적으로 세포질과 핵 분획물에서는 강한 형광 밴드가 검출되지 않았다. VDAC2 단백질은 척추동물에서 미토콘드리아 외막을 통해 대사산물과 이온 유동의 1차적인 경로를 조절하는 3가지 VDAC 중 하나이다. VDAC2는 미토콘드리아 막간 공간 내에서 ROS에 대한 보호작용을 하고, 통로 (pore) 형성과 관련이 있을 것이라 예상되는 9개의 cysteine 부분을 가지고 있다(Colombini, M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 256, 107-115.). 게다가 VDAC2가 분리된 미토콘드리아는 아포토시스 경로의 활성화를 촉진시켰다. 이러한 VDAC2의 중요한 생물학적 기능들과 미토콘드리아 ROS에 대한 민감성을 고려할 때, 본 발명에 따른 결과는 VDAC2가 vicinal dithiol 그룹을 환원시킨다 것을 보여주었으며, 이는 VDAC2가 산화 스트레스 조건하에 이황화물 형태로 산화되어 미토콘드리아를 산화적 손상으로부터 보호할 수 있는 비시날 디티올 그룹을 갖는다는 것을 의미한다.

## [0094] 결론

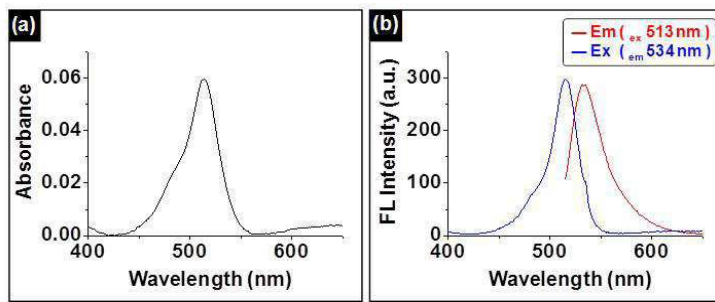
[0095] 본 발명에서는 미토콘드리아 막에서 VDP에 대한 고선택성 및 강력한 염색을 위한 BODIPY 기반 형광 프로브 화합물 1을 제공한다. BODIPY (형광단), triphenylphosphonium (미토콘드리아 타겟팅 unit), phenylarsenicate (vicinal dithiol 인식부위)로 이루어진 본 발명에 따른 프로브 화합물 1은 자신의 arsenicate moiety를 vicinal dithiol과 공유 결합시킴으로써 미토콘드리아 막 위 VDP를 표지할 수 있다. 더 나아가 본 발명에 따른 프로브 화합물 1은 미토콘드리아 분획 후 단백질체학적 MS/MS 분석을 통해 미토콘드리아 막 위 VDAC2를 주로 타겟팅하는 것으로 증명되었다. 전술한 미토콘드리아 VDP의 중요한 역할들을 고려했을 때, 본 발명에 따른 프로브 화합물 1은 VDAC2의 오작동에 의한 다양한 질병들을 이해하는데 상당한 기여를 할 것으로 기대된다.

## 도면

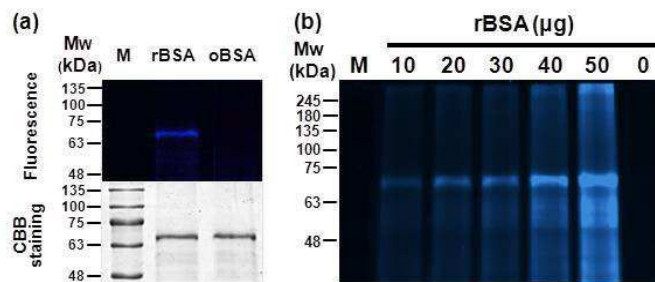
### 도면1



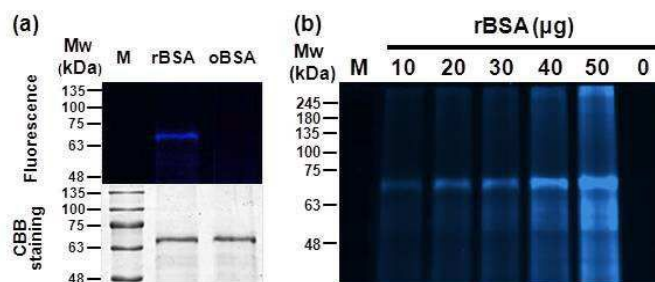
도면2



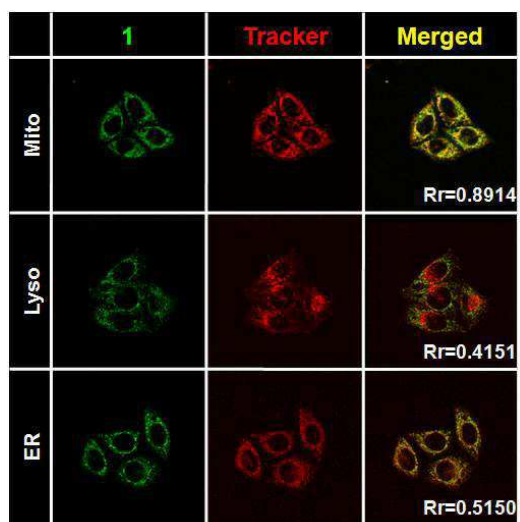
도면3



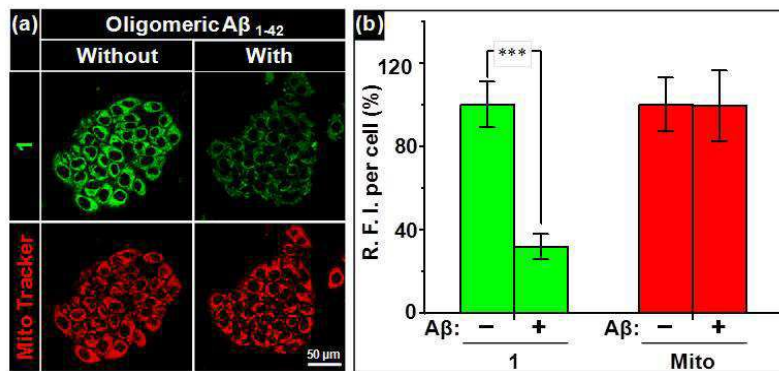
도면4



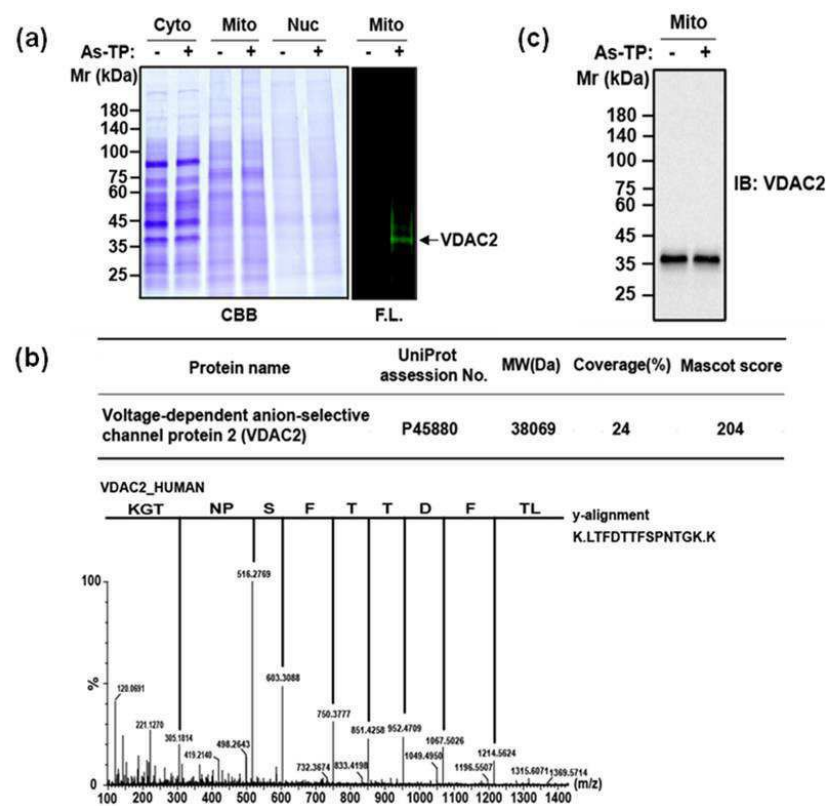
도면5



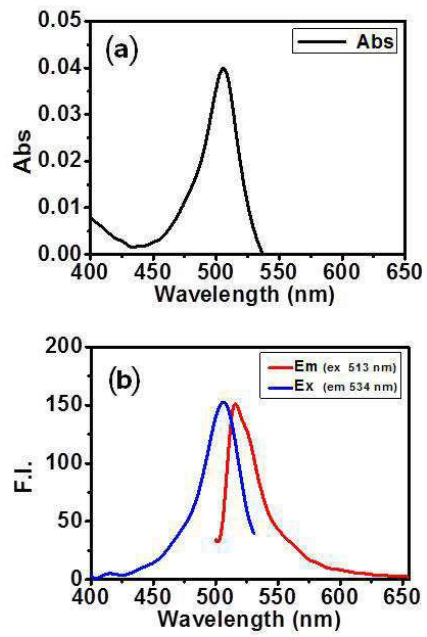
도면6



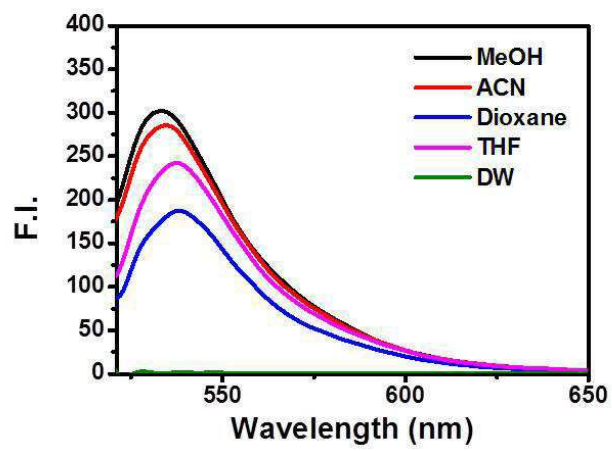
도면7



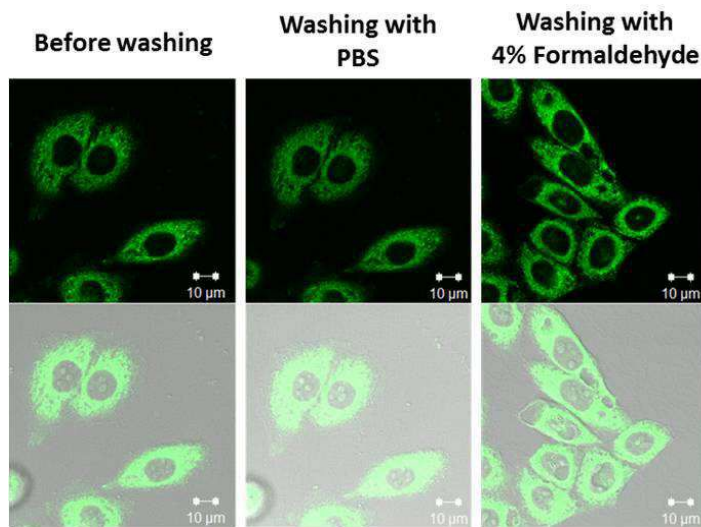
도면8



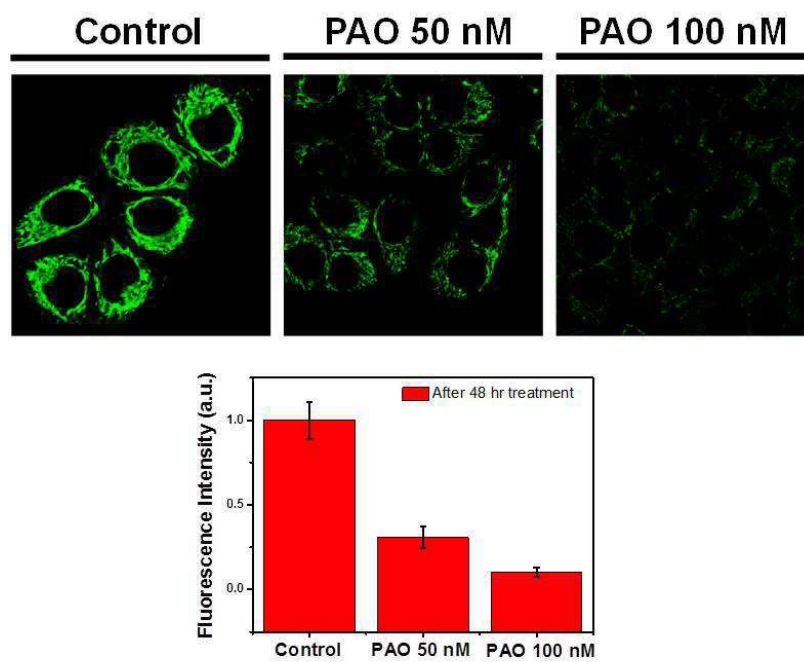
도면9



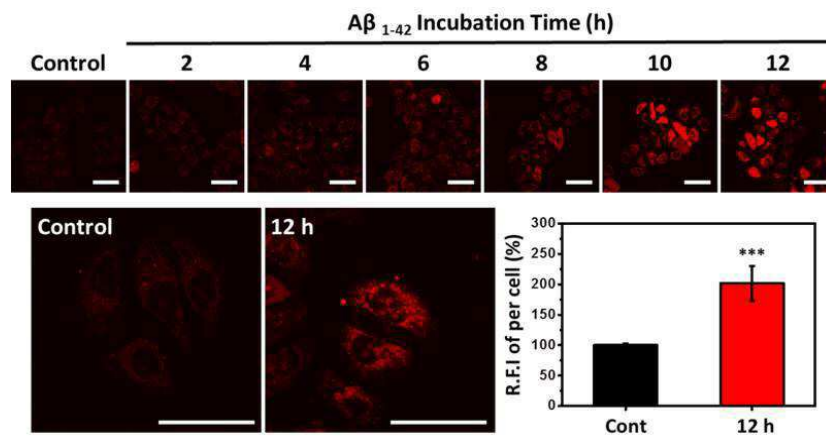
도면10



도면11



도면12



도면13

