(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0029802
(43) 공개일자 2020년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 11/06 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09K 11/06 (2013.01)
G01N 21/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0108288
(22) 출원일자 2018년09월11일
심사청구일자 2018년09월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호
원미애
서울특별시 성북구 한천로78길 15
심인섭
서울특별시 도봉구 방학로 193, 12동 403호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 2 항

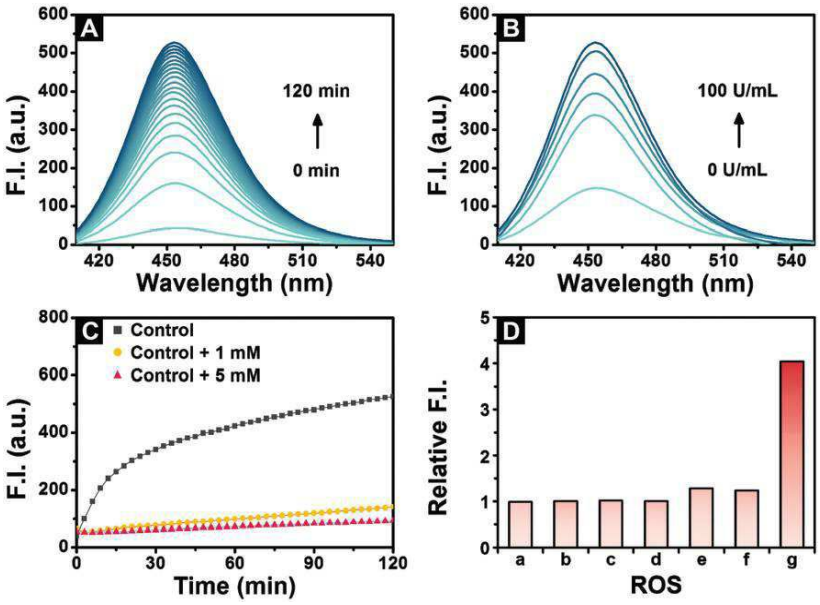
(54) 발명의 명칭 **티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 티로신 산화효소 검출용 형광 센서**

(57) 요 약

본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 티로신 산

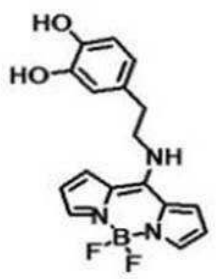
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



화효소 검출용 형광 센서에 관한 것이다:

[화학식 1]



.

(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
C09K 2211/1096 (2013.01)
G01N 2333/90245 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0081566
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명 발광센서 재료 연구단
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1D1A1B03030062
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원-기본연구
연구과제명 화학센서 기반의 신규 암 줄기세포 표적 저분자 치료제 개발 및 치료 기전 규명
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28

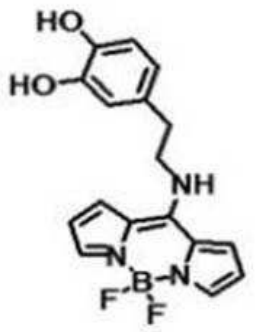
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 티로신 산화효소 검출용 형광 센서.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 내 티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 티로신 산화효소 검출용 형광 센서에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 여러 생명시스템 (living system)의 병원성 이상증세에 대한 초기 지식을 얻는 것이 급하다는 것은 우리에게 진단 도구 개발의 동기를 부여한다. 비침습성 (non-invasiveness), 선택도 (selectivity), 민감도 (sensitivity)는 살아있는 표본의 질병을 진단하는 도구에서의 아주 바람직한 핵심적 특징들이다(비특허문헌 1). 질병을 진단하기 위한 여러가지 이미징 방식들 중, 형광 프로브는 분자 반응성 차이에 기반하여 원하는 화학물질들을 분류하고 파악할 수 있는 능력과 최소한의 교란으로 공간 이미지를 얻을 수 있다는 능력 때문에 아주 매력적인 전략이 되고 있다(비특허문헌 2).

[0003] 티로신 산화효소(Tyrosinase)는 산소 분자 존재하에서 페놀 유도체가 퀴논으로 히드록실화되고 산화되는 것을 촉매하는 구리 함유 효소이다(비특허문헌 3). Melanin이 흑색종 (melanoma) 진행의 필수적인 구성성분이기 때문에 생물체 내 phenol에서 melanin으로의 산화적 화학 변화는 흑색종 (melanoma) 상피성 암종 (carcinoma)을 유발한다. 흑색종은 좋지 않은 예후와 높은 전이 (metastasis) 특성을 보이는 가장 치명적인 피부암종이다(비특허문헌 4). 추가적으로 tyrosinase는 파킨슨병과 연관되어 있는 dopamine 신경독성과 신경퇴행을 유발한다. 따라서 이러한 생화학적 존재에 적합한 표지자 (marker)를 찾는 것은 다양한 생화학적, 병리학적 과정 내 tyrosinase의 활성을 이해하는데 있어 바람직하며 궁극적으로 tyrosinase 관련 질병을 진단할 수 있게 해준다. Tyrosinase의 과발현 정도에 따라 흑색종을 시각화하려는 많은 노력이 있었지만 살아있는 시스템에서 tyronase를 감시할 수 있는 빠르고 선별적인 형광 탐침을 개발하는 것은 아직도 어려운 일이다(비특허문헌 5). 종래 형광 프로브들은 tyrosinase 뿐만아니라 HOCl, H_2O_2, NO_3와 같은 활성산소족 (reactive oxygen species, ROS)이 존재할 때에도 형광 반응을 나타내기 때문에(비특허문헌 6), ROS의 원치 않는 간섭으로 인하여 티로신 산화효소를 선택적으로 검출할 수 없다는 문제가 있다.

[0004] 이처럼, 세포에서 Tyrosinase를 감지하는 여러 프로브들이 보고되고 있으나, 여전히 세포 및 조직에서 만족할만

한 수준으로 Tyrosinase 특이적이면서 효과적으로 Tyrosinase를 검출하는 프로브 및 센서의 개발에 대해서는 거의 보고된바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) S. K. Arya and S. Bhansali, Chem. Rev., 2011, 111, 6783.

(비특허문헌 0002) K. Fujimoto, S. Yamada and M. Inouye, Chem. Commun., 2009, 7164.

(비특허문헌 0003) C. M. Kumar, U. V. Sathisha, S. Dharmesh, A. G. Rao and S. A. Singh, Biochimie, 2011, 93, 562.

(비특허문헌 0004) I. J. Fiddler, Cancer Control, 1995, 2, 398.

(비특허문헌 0005) T. I. Kim, J. Park, S. Park, Y. Choi and Y. Kim, Chem. Commun., 2011, 47, 12640.

(비특허문헌 0006) J. Kim and Y. Kim, Analyst, 2014, 139, 2986.

발명의 내용

해결하려는 과제

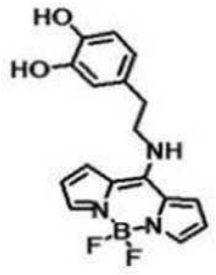
[0006] 본 발명에서는 티로신 산화효소에 고선택성을 갖는 티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 티로신 산화효소 검출용 형광 센서를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0008] 하기 [화학식 1]로 표시되는 티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0009] [화학식 1]

[0010] 

.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 티로신 산화효소 검출용 형광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물은 티로신 산화효소에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 우수한 광물리적 특성과 낮은 세포독성을 가지고 있어 티로신 산화효소를 효과적으로 이미징할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1의 (A)는 티로시나제(100 U mL^{-1})와 배양시 Tyro-1([화학식 1]로 표시되는 화합물)(5 μM)의 시간 의존적 형광 변화를 관찰한 결과이고, (B)는 다양한 티로시나제 농도(0-100 U mL^{-1})하에서 Tyro-1 (5 μM)의 농도 의존적 형광 변화를 관찰한 결과이다. 배양은 PBS 완충액 (pH = 7.4, 1 % DMSO)에서 37 ℃, 1 시간 동안 진행하였다. (C)는 PBS 완충액 (pH = 7.4, 1 % DMSO) 및 37 ℃에서 다양한 농도의 코직산(kojic acid)의 존재하 Tyro-1 (5 μM)을 이용한 티로시나제 활성 억제 분석(inhibition assay) 결과를 나타낸다. Tyrosinase (100

U mL^{-1})를 억제제와 함께 37 ℃에서 20 분 동안 배양하였다. (D)는 다양한 ROS하에서 Tyro-1 (5 μM)의 형광 반응 결과를 나타낸다 : 37 ℃에서 PBS 완충액 (pH 7.4, 1 % DMSO) 중 (a) NO^{2-} 500 μM; (b) ClO^{-} 500 μM; (c) H_2O_2 500 μM; (d) TBHP 500 μM; (e) $^{\cdot}OH$ 100 μM; (f) $TBO^{\cdot}$ 100 μM; 및 (g) 티로시나제 (100 U mL^{-1}). 모든 형광 반응은 452 nm에서 얻어졌다; 여기 파장은 400nm, 슬릿셋(slit set)은 3/5nm.

도 2는 B16F10 세포 (배율, x40)에서 시간의 함수로서 Tyro-1 (10 μM)의 일광자(one-photon) 레이저 현미경 이미지이다. λ_{ex} = 405 nm; λ_{em} = 420-500 nm. 스케일 바 = 50 μM.

도 3은 B16F10 세포 (배율, x100)에서 시간의 경과에 따른 Tyro-1 (10 μM)의 이광자(two-photon) 레이저 현미경 이미지이다. 37 ℃에서 세포를 Tyro-1 (10 μM)과 함께 다양한 시간 (0, 2, 3 시간) 동안 배양하였다. λ_{ex} = 740 nm; λ_{em} = 420-520 nm. 스케일 바 = 20 μM.

도 4는 B16F10 세포 (배율, x100)에서 프로브 Tyro-1 (10 μM)의 2광자 레이저 스캐닝 현미경 이미지이다. (A)는 세포만 (대조군); (B)는 Tyro-1 (10 μM)과 2 시간 동안 배양한 세포; (C) 코직산 (100 μM)으로 2 시간 동안 전처리한 후 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포; (D)는 2 시간 동안 α-MSH (200nM)로 전처리한 후 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포; (E) α-MSH 및 코직산으로 2 시간 동안 전처리한 후 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포. λ_{ex} = 740 nm; λ_{em} = 420-520 nm. 스케일 바 = 20 μM.

도 5는 B16F10 세포 (배율, x100)에서 프로브 Tyro-1 (10 μM)과 tyrosinase의 형광 이미지를 나타낸다. (A)는 프로브가 처리되지 않은 세포의 2광자 레이저 스캐닝 현미경 이미지; (B)는 Tyro-1 (10 μM), tyrosinase (100 U mL^{-1})와 함께 2 시간 동안 배양된 세포; (C)는 2 시간 동안 H_2O_2 (50 μM)로 전처리 한 다음, 프로브 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포; (D-F)는 H_2O_2 및 코직산(10, 50 및 100 μM)으로 2 시간 동안 전처리한 후, Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포. λ_{ex} = 740 nm; λ_{em} = 420-520 nm. 스케일 바 = 20 μM. 이광자 레이저 스캐닝 현미경 이미지의 상대적 형광 강도는 각 처리 그룹의 평균값을 ImageJ (* $p < 0.05$)를 사용하여 모든 이미지에 대한 공통 임계 값을 설정한 후 각 처리 조건 (A - F) 당 총 9 개의 셀에서 정량화하였다.

도 6은 PBS 완충액 (pH 7.4, 1 % DMSO) 중 tyrosinase (200 U/mL)의 부재 (블랙 라인) 및 존재 (레드 라인)하에서 Tyro-1 (5μM)의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸다. 데이터는 25 ℃에서 30 분 동안 인큐베이션 한 후에 기록되었다.

도 7은 ΔF와 tyrosinase 농도 (20-80 U/mL) 사이의 선형 상관 관계를 나타낸다. ΔF는 티로시나제 (tyrosinase) 배양 전후의 Tyro-1 (5μM)의 형광 강도 차이를 의미한다.

도 8은 회귀 방정식을 적용하여 Tyro-1 (5 μM)과 tyrosinase (100 U / mL) 사이의 반응 속도 상수 추정값을 나타낸다 ; $K = 0.004S^{-1}$

도 9는 슬릿 너비 3/5 nm의 PBS 완충액 (pH 7.4, 1 % DMSO)에서 Tyrosinase (0-0.1 U/mL)의 다양한 농도에 대해 452 nm에서 Tyro-1 (5 μM)의 형광 강도 변화를 나타낸다.

도 10은 37 ℃에서 다른 pH 완충액 (1 % DMSO가 함유 된 PBS)에서 tyrosinase (100 U/mL)로 배양시 Tyro-1 (5 μM)의 형광 반응 결과를 나타낸다. 각 포인트의 형광 강도는 3/5 nm로 설정된 슬릿으로 400 nm에서 여기시켜, 452 nm에서 기록하였다.

도 11은 다양한 아미노산 (500 μM)에 대한 Tyro-1 (5 μM)의 형광 반응을 나타낸다: 37 ℃에서 PBS 완충액 (pH 7.4, 1 % DMSO) 중 a) 알라닌; b) 아르기닌; c) 아스파라긴; d) 아스파라긴산; e) 시스테인; f) 글루타민; g) 글루탐산; h) 글리신; i) 히스티딘; j) 호모 시스테인; k) 이소 루이 신; l) 류신; m) 리신; n) 메티오닌; o) 페닐알라닌; p) 프롤린; q) 세린; r) 트레오닌; s) 트립토판; t) 티로신; u) 발린 및 v) tyrosinase (100 U/mL). 모든 형광 반응은 3/5 nm에서 세팅된 슬릿으로 400 nm에서 여기시켜 452 nm에서 기록하였다.

도 12는 다양한 금속 이온 (500 μM)에 대한 Tyro-1 (5 μM)의 형광 반응을 나타낸다: 37 ℃에서 PBS 완충액 (pH 7.4, 1 % DMSO)에 용해된, a) Ag^{+}; b) Al^{3+}; c) Ba^{2+}; d) Ca^{2+}; e) Cd^{2+}; f) Co^{2+}; g) Cu^{2+}; h) Fe^{2+}; i) Fe^{3+}; j) K^{+}; k) Mg^{2+}; l) Mn^{2+}; m) Ni^{2+}; n) Pb^{2+}; o) Zn^{2+}; p) 아스코르브 산; q) GSH 및 r) tyrosinase (100 U/mL).

모든 형광 반응은 3/5 nm에서 세팅된 슬릿으로 400 nm에서 여기시켜 452 nm에서 기록하였다.

도 13은 tyrosinase 처리된 Tyro-1의 LC-MS 데이터이다.

도 14는 Tyro-1의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 결과이다.

도 15는 Tyro-1의 ^{13}C-NMR 스펙트럼 결과이다.

도 16은 Tyro-1의 HRMS 결과이다.

도 17은 프로브 Tyro-1의 세포 생존률을 나타낸다. 세포는 B16F10 (A) 및 HeLa (B) 세포에서 12 시간 동안 0, 1,5,10 및 50 μM의 프로브 Tyro-1으로 배양 하였다. 결과값은 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SE를 나타낸다. * p <0.05.

도 18은 HeLa 세포에서 Tyro-1 (10 μM)의 일광자 이미지를 나타낸다. (A)는 세포만 (대조군); Tyro-1 (10 μM)과 2 시간 동안 배양한 세포; (C) 코직산 (100 μM)으로 2 시간 동안 전처리한 후 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포. λ_{ex} = 405 nm, λ_{em} = 420-500 nm. 스케일 바 = 20 μM.

도 19는 B16F10 세포 (배율, ×40)에서 Tyro-1 (10 μM)의 일광자 레이저 스캐닝 현미경 이미지를 나타낸다. (A)는 세포만 (대조군); (B)는 Tyro-1 (10 μM)과 2 시간 동안 배양한 세포; (C) 코직산 (100 μM)으로 2 시간 동안 전처리한 후 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포; (D)는 2 시간 동안 α-MSH (200nM)로 전처리한 후 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포; (E) α-MSH 및 코직산으로 2 시간 동안 전처리한 후 Tyro-1과 2 시간 동안 배양한 세포. λ_{ex} = 405 nm, λ_{em} = 420-500 nm. 스케일 바 = 20 μM.

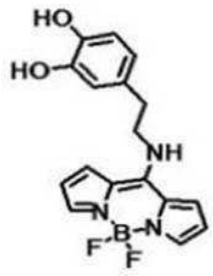
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 한다.

[0015] 본 발명에서는 세포 내 티로신 산화효소를 선택적으로 검출할 수 있는 프로브 화합물 및 이를 포함하는 센서를 제공하고자 한다.

[0016] 따라서, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다:

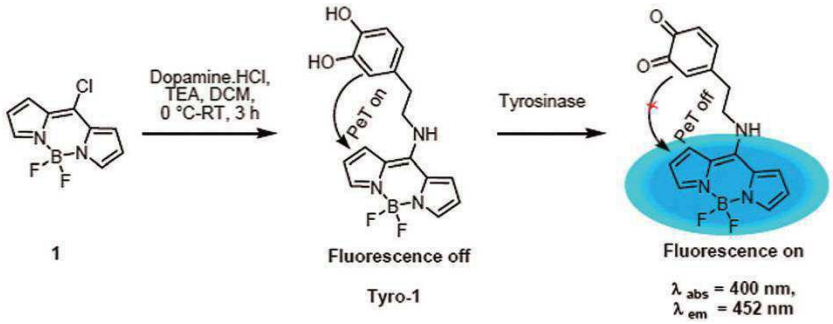
[0017] [화학식 1]

[0018] 

.

[0019] 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 하기 [Tyrosinase 검출 메커니즘]에 도시된 바와 같이, Tyrosinase 존재하에서 페놀 구조가 퀴논 구조로 변하면서 광유발 전자 전달 효과(Photoinduced Electron Transfer, PET)를 억제함으로써 강한 형광을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0020] [Tyrosinase 검출 메커니즘]



[0021]

[0022] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 티로신 산화효소 검출용 형광 센서를 제공한다.

[0024] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0026] **실험 방법**

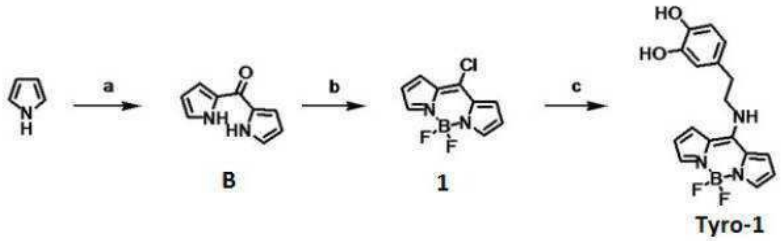
[0027] **재료, 방법 및 기기장치**

[0028] 모든 반응물 및 용매는 Sigma-Aldrich, Avra, Loba chem에서 구매하였으며 추가적인 정제없이 사용하였다. 플래쉬 칼럼 크로마토그래피는 실리카 겔 (100-200 메쉬)을 사용하여 수행하고 분석용 박층 크로마토 그래피는 실리카 겔 60 (0.25 mm 두께를 갖는 미리 코팅된 시트)을 사용하여 수행하였다. 질량 스펙트럼은 음이온 SpecHiResESI 질량 분석기에 기록되었다. NMR 스펙트럼은 400MHz 분광계 (Bruker, Germany)에서 수집되었다.

[0030] **화합물 합성**

[0031] 하기 합성 경로에 따라 본 발명에 따른 [화학식 1](Tyro-1)로 표시되는 화합물을 합성하였다.

[0032] [합성 경로]



[0033]

[0034] a) (i) Pyrrole, triphosgene, 1,2-dichloroethane, 0 ℃, 2 h; (ii) Pyrrole, 80 ℃, 30 min; b) (i) $POCl_3$, 1,2-dichloroethane, 80 ℃, 2 h. (ii) Et_3N, $BF_3E_{t2}O$; c) Dopamine. HCl, Et_3N, Dichloromethane, 25 ℃, 6 h.

[0036] 화합물 B 및 1의 합성

[0037] 화합물 B 및 화합물 1은 종래 문헌(Y. Zhang, X. Shao, Y. Wang, F. Pan, R. Kang, F. Peng, Z. Huang, W. Zhang and W. Zhao *Chem. Commun.*, 2015, 51, 4245-4548.)에 보고된 절차에 따라 합성하였다.

[0039] Tyro-1의 합성

[0040] 화합물 1 (150 mg, 0.664 mmol)을 도파민이 교반된 용액에 첨가 하였다. 0 ℃에서 DCM (20 mL) 중 HCl (377 mg, 1.99 mmol) 및 트리에틸아민 (0.28 mL, 1.99 mmol)을 첨가하고, 실온에서 6 시간 동안 교반하였다. 반응은 TLC로 모니터링 하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 물 (50 mL)에 붓고 에틸 아세테이트 (3 x 25 mL)로 추출하였다. 유기층을 물 (2 x 50 mL), 염수 (1 x 50 mL)로 세척하고, 무수 황산나트륨상에서 건조시키고 감압하에 농축시켰다. 조 생성물을 용리액으로서 pet 에테르 DCM (5 : 5) 중 에틸 아세테이트를 사용하여 실리카 겔 (100-200 메쉬)상에서 컬럼 크로마토 그래피로 정제하여 옅은 갈색 고형물의 Tyro-1(90mg; 64.47 %)을 수득하였다.

[0041] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.70 (s, 1H); 8.89 (s, 1H); 8.76 (s, 1H); 7.58 (s, 1H); 7.45 (d, *J* = 3.60 Hz, 1H);7.35 (s, 1H); 7.32 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H); 6.69 (q, 2H); 6.57 (q, 2H); 6.38 (q, 1H); 3.92 (t, *J* = 7.20 Hz, 2H); 2.95 (q, 2H); ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): 149.41, 145.99, 144.01, 134.21, 131.82, 130.21, 124.41, 122.45, 120.01, 117.65, 114.75, 112.89, 47.12, 32.75; ESI- HRMS *m/z* (M+H): calcd. 344.13, found 344.1375.

[0043] **UV-Vis 및 Fluorescence Spectroscopy**

[0044] 흡수 스펙트럼은 UV-1800 분광 광도계 (Shimadzu)에서 기록하였고, 형광 스펙트럼은 1cm 표준 석영셀(quartz cell) 300μL 부피의 RF-5301 형광 분광 형광 측정기 (Shimadzu)를 사용하여 기록하였다. DMSO에 프로브를 용해시켜 500 μM 프로브 스톡 용액을 제조하였다. 100 U/mL tyrosinase의 스톡 용액을 PBS 완충액 (pH = 7.4)에 용해시켜 제조하였다. 에펜도르프 튜브에서 500 μM Tyro-1 3 μL와 적절한 부피의 tyrosinase 또는 다른 시약과 PBS 완충액을 섞었다. 최종 300 μL 부피의 반응 용액을 37 ℃에서 배양했다. 그 후, 형광 측정을 위해 석영셀로 옮겼다. 형광 방출 스펙트럼을 400 nm의 여기 파장에서 기록하고 방출을 3/5 nm로 설정된 슬릿 폭을 갖는 400-600 nm (λem = 452 nm)의 범위에서 모니터링 하였다.

[0046] **세포 배양**

[0047] 마우스 멜라노마(B16F10) 및 인간 자궁 경부암 (HeLa) 세포주는 한국 세포주 은행 (서울, 대한민국)에서 구입하였다. B16F10과 HeLa 세포는 10% FBS(VWR International, Radnor, PA, USA) 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신 (Welgene)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)((Welgene, Gyeongsangbuk- do, 대한민국)에서 배양하였다. 배양된 모든 세포는 5 % CO_2가 포함된 가습 분위기에서 37 ℃로 유지되었다.

[0049] **이광자 형광 현미경(Two-photon fluorescence microscopy)**

[0050] 1×10^{5}개의 세포를 35 mm 유리 바닥 공촛점 접시 (SPL Life Science, 경기도, 대한민국)에 분주하고, 1 일 동안 안정화시켰다. 세포가 80 %의 confluency에 도달하면, 37 ℃, 5 % CO_2 에서 프로브 Tyro - 1 (DMSO에서 10μM)로 0-3 시간 동안 처리하였다. Tyrosinase 자극 효과를 평가하기 위해, 세포를 2 시간 동안 α-MSH (200nM) 및 H_2O_2 (50μM)의 부재 또는 존재하에 전처리 한 다음, 37 ℃, 5% CO_2하에서 프로브 Tyro-1 (10μM)과 함께 2 시간 동안 배양하였다. Tyrosinase 저해 효과를 평가하기 위해, 코직산(100 μM)의 존재 또는 부재하에 2 시간 동안 세포를 전처리 한 다음 37 ℃, 5% CO_2하에서 프로브 Tyro-1 (10μM)과 함께 2 시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 PBS로 세척하였다. B16F10 세포 표지된 프로브의 이광자 형광 현미경 이미지는 ×100 (NA = 1.30 OIL)의 대물 렌즈가 있는 스펙트럼 공촛점 및 2 광자 현미경 (Leica TCS SP2)으로 수득하였다. 이광자 형광 현미경 이미지는 DM IRE2 현미경 (Leica)를 이용하여 파장 740nm로 설정된 모드 고정 티타늄 사파이어 레이저 소스 (코히어런트 카멜레온, 90MHz, 200fs)로 프로브를 여기함으로써 수득하였다. 420-520 nm 범위의 이미지를 얻기위해 내부 PMT를 사용하여 400 Hz 스캔 속도에서 8 비트 부호없는 512 X 512 픽셀로 신호를 수집하였다.

[0052] **일광자 형광 현미경(One-photon fluorescence microscopy)**

[0053] 형광 이미지는 동일한 조건의 공촛점 레이저 스캐닝 현미경 (Carl-Zeiss LSM 700 Exciter, Oberko chen,

Germany)을 사용하여 촬영하였다. 형광 채널을 Si 레이저로 405 nm에서 여기시키고 420-500 nm 밴드 패스 필터로 방출을 수집하였다.

[0055] **세포 생존률**

[0056] 대략 2×10^4 세포를 96 웰 마이크로 플레이트 (SPL Life Science)에 접종하고 하루 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 DMSO로 처리하고 Tyro-1을 12 시간 동안 처리하였다. 세포에서 프로브의 세포 생존력을 분석하기 위해 CytoTox96® 비 방사성 세포 독성 분석 키트 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 세포 생존능 분석을 수행하였다. SPECTRA MAX GEMINI EM 마이크로 플레이트 리더 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 형광 레벨을 분석 하였다. 파장은 490nm로 설정되었다. 세포 생존력은 대조군 웰에 비해 처리된 웰에서 측정된 흡광도의 백분율로 표시하였다.

[0058] **통계 분석**

[0059] 통계적 유의성은 Student 's t-test를 사용하여 대조값과 비교하여 분석하였다. 데이터는 데이터는 평균 ± SE를 나타내며, P-values가 0.05 미만인 경우에 유의미한 것으로 간주하였다.

[0061] **선형 범위 및 검출 한계**

[0062] 형광 적정을 사용하여 검출 한계를 계산하였다. 프로브 Tyro-1 (2.0 × 10-6 M)의 형광 방출 스펙트럼을 10 회 측정하여 공시료의 표준 편차를 얻었다. 452 nm에서의 형광 강도를 tyrosinase 농도로 나타내었다. 검출 한계는 방정식(3σ/k: 여기서, σ는 블랭크 측정의 표준 편차, k는 형광 강도 대 tyrosinase 농도 사이의 기울기이다)을 사용하여 계산하였다.

[0064] **결과 및 고찰**

[0065] BODIPY는 큰 스토크스 이동 (Stokes shift), 상대적으로 높은 양자 수율 (quantum yield), 용도에 맞는 유도체 합성이 용이한 다용도의 형광단 (fluorophore)이다(Y. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi, H. Kojima and T. Nagano, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 3357.). 게다가 분자 내 광유도 전자 전달 (PeT) 과정을 통한 상대적 깁스 자유 에너지 (열역학적 포텐셜) 조절에 의한 체계적인 형광 변화를 나타낸다는 장점이 있다.

[0066] 본 발명에 따른 티로신 산화효소 검출용 형광 프로브 화합물(Tyro-1)은 Tyrosinase에 반응하는 페놀 구조와 452 nm의 형광을 방출하는 보디피 형광체로 구성되어 있으며, Tyrosinase 존재하에서 페놀 구조가 퀴논 구조로 변하면서 광유발 전자 전달 효과(Photoinduced Electron Transfer, PET)를 억제함으로써 강한 형광을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0067] Tyro-1의 잠재성은 인공적인 생리학적 환경인 37 ℃의 인산염 완충액에서 광물리적 특성들을 관찰함으로써 추정하였다. 도 6에 나타난 바와 같이 400nm 파장에서 Tyro-1의 자외선 흡광도는 100 U/mL의 tyrosinase가 존재할 때 증가하였다. 반면 배양 시간과 tyrosinase 농도에 대한 함수로서 Tyro-1의 형광 강도의 변화를 나타낸 도 1의 결과와 같이 Tyrosinase 첨가 이후에 형광 강도는 시간이 지남에 따라 점차 증가하였으며 결국 452nm에서 최대 12.5배로 광방출량이 증가된 안정기에 도달하는 것으로 나타났다(도 1A). 인공적인 생리학적 환경하의 Tyro-1의 형광 변화는 20-80U/mL의 농도 범위에서 tyrosinase 의 가변 농도와 훌륭한 선형적 상관관계를 보여준다(도 1B, 도 7). Tyro-1은 tyrosinase와 4 $\times10^{-3}$ s^{-1}의 속도로 반응했으며 이는 유사 단분자 반응 (pseudo-unimolecular reation)을 의미한다(도 8). 뿐만 아니라 회귀 방정식을 적용하여 tyrosinase의 검출 한계를 계산한 결과 검출 한계 값은 2.5 $\times10^{-2}$ U/mL로(도 9) 나타났는바, Tyro-1은 tyrosinase에 대해 높은 민감도를 가진다는 것을 확인하였다.

[0068] 다음으로, Tyro-1이 바이오이미징에 적합한지 확인하기 위하여 37 ℃, 생리학적 pH 범위 (pH 6.0-8.0) 내에서 tyrosinase와 함께 또는 없이 배양했을 때 Tyro-1의 형광 반응을 확인하였다. 광전자전달 (photoelectron transfer, PeT)을 고려할 때, Tyrosinase가 없을 때 Tyro-1은 거의 형광을 띄지 않을 것이며 Tyro-1의 형광 강

도가 2시간 동안 거의 변화하지 않았다는 것은 Tyro-1의 뛰어난 안정성을 나타낸다. Tyrosinase와의 배양 이후에, Tyro-1은 생리학적 환경과 같은 6.0-8.0 범위의 pH에서 높은 형광 반응을 보였다 (도 10). 이러한 결과는 Tyro-1이 생리학적 조건하에서 tyrosinase에 노출되었을 때 강하고 안정적인 형광 신호를 만든다는 것을 나타내는 것이다. 왜냐하면 광전자전달은 dopamine 부분의 산화에 의해 상당히 차단되기 때문이다.

[0069] 뿐만 아니라 pH 7.4 PBS, 37 ℃의 생리학적 조건에서 tyrosinase 억제자인 kojic acid가 존재할 때 Tyro-1의 형광 약화 정도를 측정함으로서 tyrosinase 활성억제를 평가하였다. 도 1C에서 나타난바와 같이 대조군에 비하여 kojic acid와 배양된 Tyro-1과 tyrosinase를 포함하는 용액에서 상당한 형광 강도 감소가 나타났다. 또한, Kojic acid의 농도가 증가함에 따라 Tyro-1의 형광 반응은 점차 감소하였다. 이를 통해 tyrosinase가 Tyro-1을 산화시켜 광전자전달에 의해 억제된 형광을 되찾는다는 것을 확인하였다.

[0070] 다음으로, 다른 관련 ROS인 아미노산, 금속 이온등을 이용하여 tyrosinase에 대한 Tyro-1의 화학선택도를 평가하였다. 도 1D 와 도 11-12에 나타난 바와 같이, Tyro-1은 tyrosinase가 존재할 때만 형광 향상을 보이며 다른 분석물이 존재할 때는 형광 향상이 나타나지 않는 것으로 확인되었다. HOCl을 포함한 다양한 산화제들에 대한 Tyro-1의 안정성은 명백히 Tyro-1과 산화제들 간의 산화 환원 포텐셜 불일치에 의한 것이다. 이 사실은 FerriBRIGHT(D. P. Kennedy, C. M. Kormos and S. C. Burdette, J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 8578.)의 catechol 부분이 Fe^{3+}에 의해 산화되는데 반해 그 유사체가 tyrosinase에 의해 산화되었다는 이전의 보고에 의해 뒷받침된다(T. I. Kim, J. Park, S. Park, Y. Choi and Y. Kim, Chem. Commun., 2011, 47, 12640.). 뿐만 아니라 Tyro-1은 500 μM의 H_2O_2에 노출되었을 때 소량의 형광 반응을 나타낼 뿐인데 이 농도는 흑색종 내의 H_2O_2 농도보다 150배 높은 농도이다(J. Bustamante, L. Guerra, L. Bredeston, J. Mordoh and A. Boveris, Exp. Cell Res., 1991, 196, 172.). 이러한 결과는 Tyro-1이 산화제들을 포함한 다른 생물학적 분석물 등의 방해를 받지 않고 살아있는 시스템에서 tyrosinase를 탐지할 수 있다는 것을 강하게 암시하는 것이다.

[0071] Tyro-1 형광 향상의 메커니즘을 이해하기 위하여 tyrosinase로 전처리된 Tyro-1을 LC-MS 분석을 이용해 분석하였다. 도 13에 나타난 바와 같이 MS값이 342.2(M+1)에서 93.12% abundance로 나타났으며, 이는 Tyro-1의 catechol 부분이 o-quinone로 산화되었다는 것을 의미한다. 이 결과는 tyrosinase가 Tyro-1의 catechol 부분을 o-quinone으로 산화시키는데 결정적 역할을 하여 광전자전달 효과를 무효화했고, 따라서 산화된 형태의 Tyro-1이 형광을 띄게 된다는 것을 뒷받침한다.

[0072] 세포 내에서 tyrosinase의 활성을 입증하기 위해 Tyro-1을 첨가하기 전에 CytoTox96® nonradioactive cytotoxicity assay kit을 이용해 B16F10과 HeLa 세포주에 대한 세포 생존력을 분석하여 Tyro-1의 세포독성을 평가하였다. 10 μM(도 17)까지 Tyro-1은 유의미한 세포독성을 보이지 않았으며 이는 Tyro-1이 tyrosinase 발현에 기반한 in vitro 이미징에 적합하다는 것을 의미한다.

[0073] 다음으로 in vitro 세포 이미징을 통해 Tyro-1을 이용하여 살아있는 세포 내 tyrosinase 활성을 조사하였다. 잘 알진 바와 같이, tyrosinase는 B16F10 쥐 흑생종 세포주에서는 과발현되며(R. White and F. Hu, J. Invest. Dermatol., 1977, 68, 272.), HeLa 세포주에서는 미미하게 발현된다. 따라서 B16F10과 HeLa 가 각각 양성 대조군과 음성 대조군으로 선택하였다. 다음으로, Tyro-1 (10 μM)과 배양된 B16F10의 공초점 현미경 형광이 시간에 대한 함수로 상당히 증가한 것을 관찰하였다(도 2). 이것은 Tyro-1이 살아있는 시스템에서 tyrosinase의 활성을 감지할 수 있다는 것을 확실하게 보여주는 결과이다. tyrosinase 음성의 HeLa 에서는 같은 실험 조건에서도 형광 향상이 거의 나타나지 않았다(도 18).

[0074] 다음으로 Tyro-1의 tyrosinase 활성을 추적하기 위한 이광자 신호 능력 (two-photon signaling ability)을 이광자 레이저 주사 현미경 (two photon laser scanning microscopy)을 이용하여 조사하였다. 측정 결과, 일광자 공초점 현미경 실험의 결과와 유사하게(도 2), Tyro-1과 배양된 B6F10 세포들은 시간에 따라 향상된 형광을 나타내었다(도 3). 또한, Tyro-1을 살아있는 세포에 처리한 후 최소 3시간 동안 안정적인 것을 확인하였는바, Tyro-1이 내생 tyrosinase 활성을 평가하기 위한 이광자 프로브로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0075] 다음으로, 이광자 레이저 주사 현미경을 이용해 B16F10 세포 내 tyrosinase 발현에 따른 세포 표지의 정도를 관찰하였다(도 4). Tyro-1의 형광 활성에 tyrosinase 억제가 미치는 영향을 평가하기 위하여 B16F10 세포들을 tyrosinase 억제자인 kojic acid로 전처리하였다. 측정 결과, kojic acid 전처리된 B16F10 세포들은 대조군인 Tyro-1 처리된 B16F10(도 4B)에 비하여 형광 강도가 현저하게 감소하였다(도 4C). 반면에 내생 tyrosinase 활성을 상향조절하는 자극 호르몬인 α-melanocyte(α-MSH)와 배양된 Tyro-1 처리 B16F10 세포들은 대조군에 비해 더 높은 형광 강도를 보이는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 일광자 현미경 이미징 결과에서도 이광자 형광 이미

징에서 관찰된 것과 유사한 패턴이 확인되었도(도 19). 이러한 결과들은 모두 Tyro-1이 살아있는 세포의 형광 표지 정도에 기반하여 tyrosinase 조절을 세포 환경에서 탐지할 수 있다는 것을 뒷받침한다.

[0076] 마지막으로 Tyro-1이 세포 내 H2O2 에 의해 유발된 tyrosinase 활성 상향 조절을 세포 내에서 추적할 수 있는지 조사하였다. 이를 위해 B16F10 세포들을 H_2O_2 (50 μM)로 전처리한 후 kojic acid와 함께, 또는 없이 배양하였다. 그리고 Tyro-1을 처리한 후 형광 강도의 변화를 관찰하기 위해 2시간 동안 배양하였다. 세포들의 형광 강도는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 도 5C에 나타난 바와 같이 H_2O_2(50 μM)와 배양된 B16F10 세포에서 나온 형광 강도는 H_2O_2 없이 배양된 B16F10 세포에서 나온 형광 강도보다 3배 더 높았다(도 5B). 반면에 B16F10 세포들의 형광 강도는 kojic acid 농도에 의존적으로 크게 떨어졌다(도 5D-F). 이러한 결과를 통해 Tyro-1은 일반적인 생리학적 환경뿐만 아니라 암 진행중에도 내생 H_2O_2 매개 tyrosinase 활성을 탐지하기 위한 비침습적 이광자 형광 프로브로 이용될 수 있음을 확인하였다.

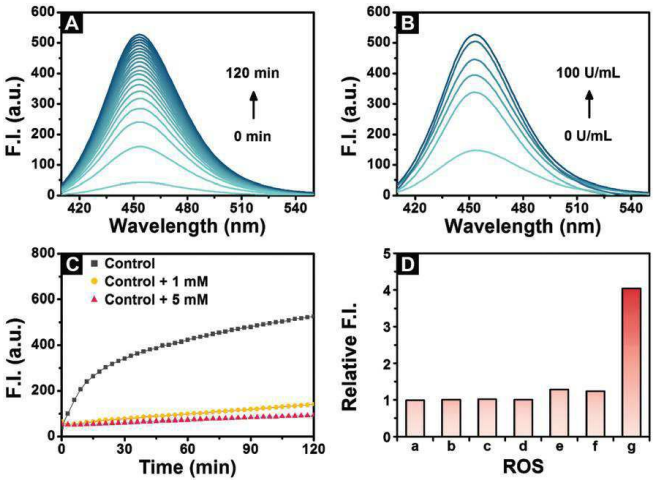
[0078] **결론**

[0079] 전술한 실시예를 통해 측정된 광물리적 특성에 기초하여, 본 발명에 따른 화합물(Tyro-1)은 낮은 검출 한계 및 높은 선택성으로 인해 세포내에서 티로신 산화효소를 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 인공 생리학적 조건하에서 200 U/mL의 tyrosinase가 존재할 때, Tyro-1의 자외선 흡광도는 400nm 파장에서 최대 8배까지 향상되었다. 더욱이 같은 조건에서 Tyro-1의 400nm 파장에서의 형광 강도는 최대 12.5배 향상되었다. 또한, Tyro-1은 tyrosinase에 대한 낮은 검출 한계를 보여주었으며 그 한계는 2.5×10^{-2} U/mL로 나타났다. 또한, Tyro-1은 생리학적 pH 범위 내에서 아주 안정하며 생물학적 시스템 내에 흔히 존재하는 물질들의 방해를 받지 않고 tyrosinase를 탐지할 수 있었다. 또한, Tyro-1은 높은 세포 생존률을 보였는바, 이를 통해 Tyro-1이 tyrosinase 발현의 in vitro 지도화에 적합한 후보라는 것을 확인하였다.

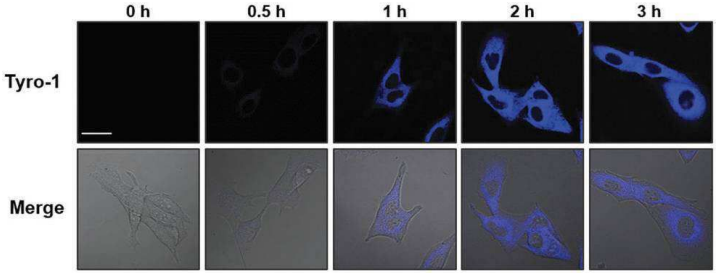
[0080] 결과적으로, 본 발명에 따른 화합물(Tyro-1)은 생리적 조건에서 매우 안정적으로 형광을 방출하고 높은 농도의 활성산소종들 하에서도 티로신 산화효소에 높은 선택성을 보일 뿐만 아니라, 과산화수소와는 거의 반응하지 않으면서도 일광자, 이광자에서 모두 성공적으로 tyrosinase를 모니터링할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 티로신 산화효소 검출을 위한 효율적인 도구로 활용될 수 있으며, 세포내에서 티로신 산화효소의 생리학적 및 병리학적 역할에 대한 연구 등 다양한 생물학적 및 임상학적 응용 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

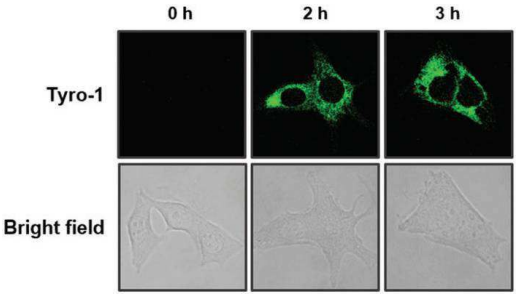
도면1



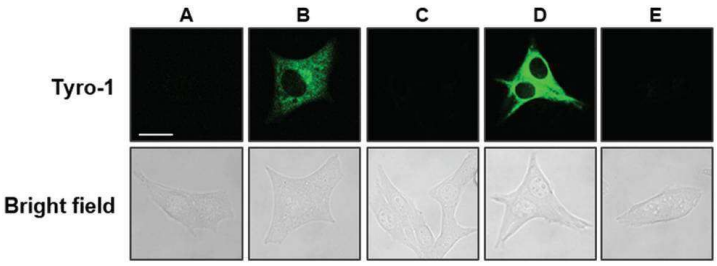
도면2



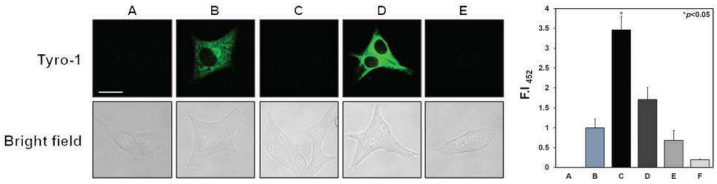
도면3



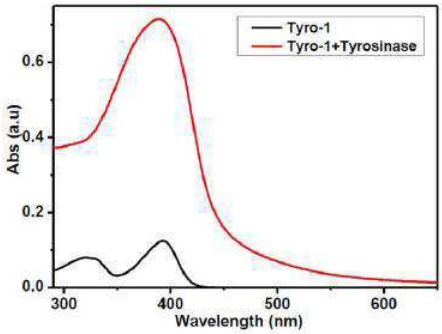
도면4



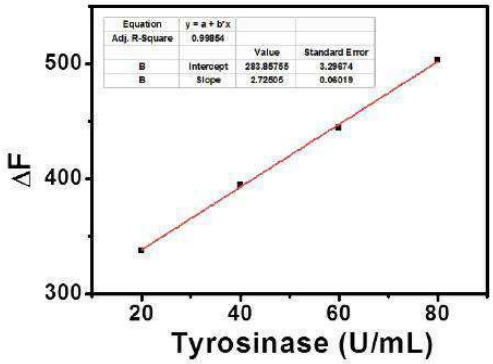
도면5



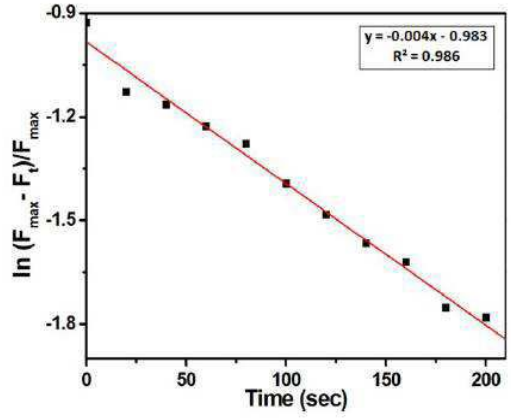
도면6



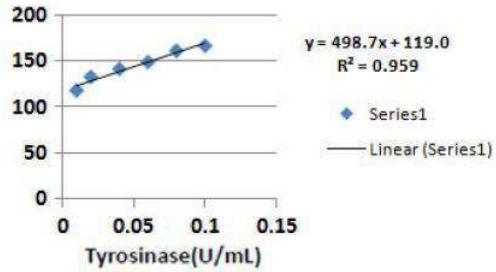
도면7



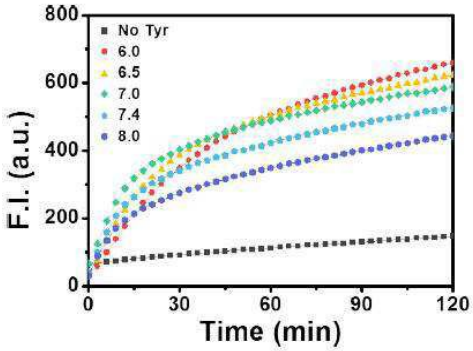
도면8



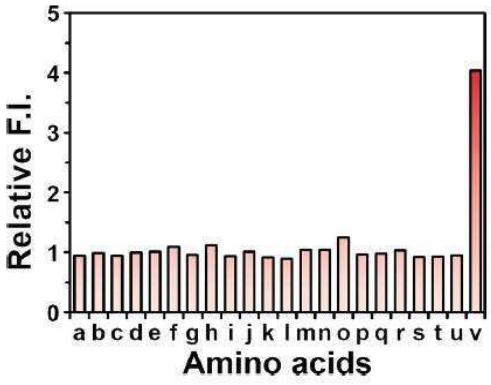
도면9



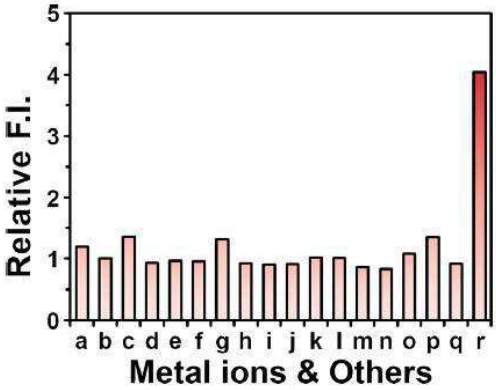
도면10



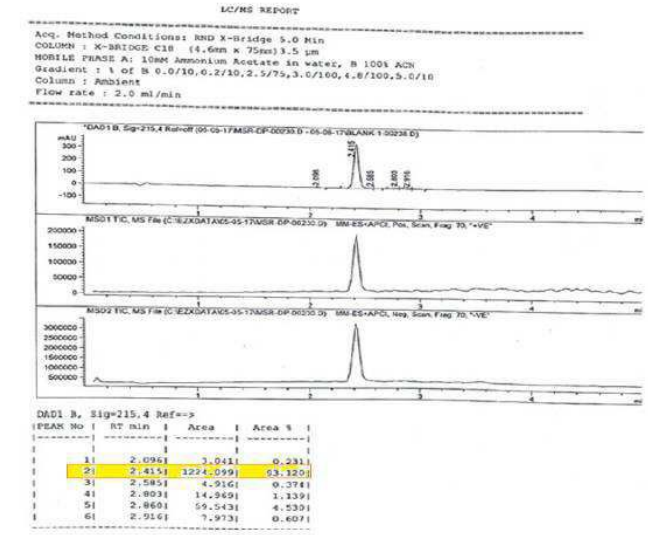
도면11

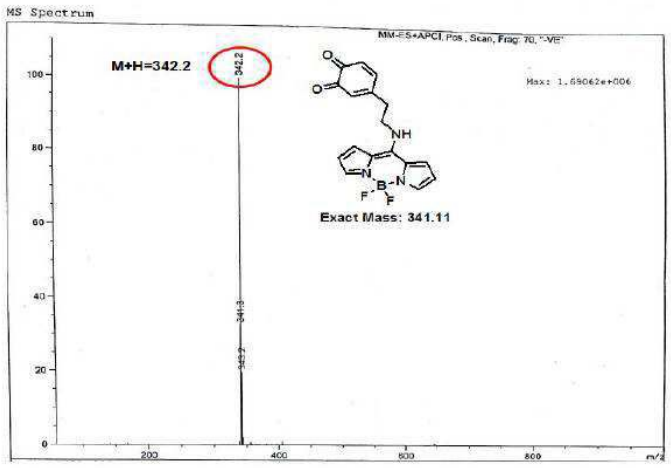

Relative F.I.
0
1
2
3
4
5
a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v
Amino acids

도면12

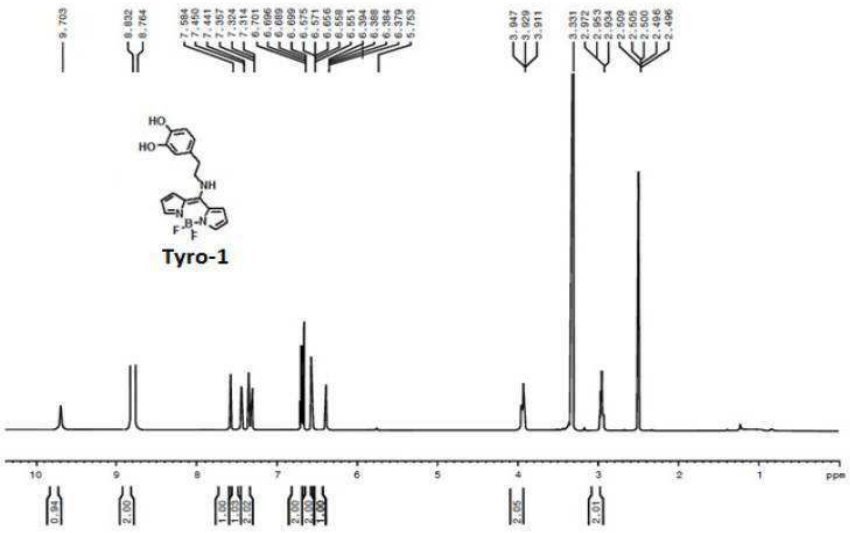

Relative F.I.
0
1
2
3
4
5
a b c d e f g h i j k l m n o p q r
Metal ions & Others

도면13

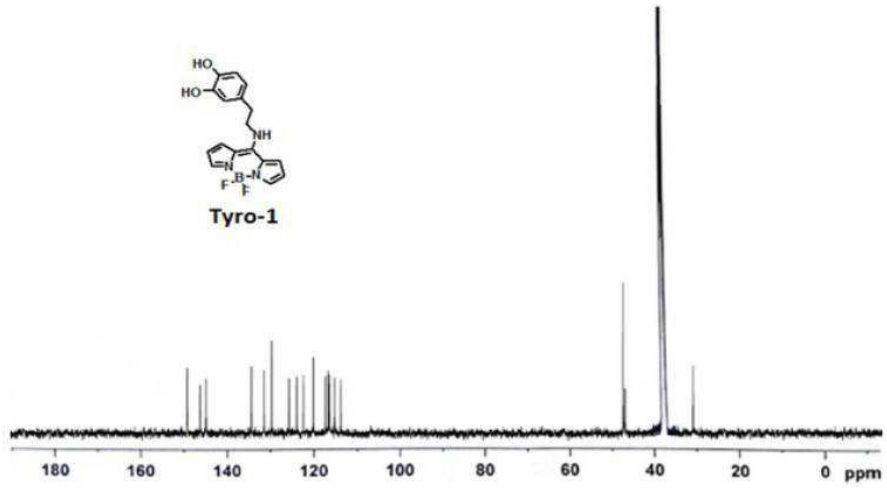

LC/MS REPORT
Acq. Method Conditions: RND X-Bridge 5.0 Min
COLUMN : X-BRIDGE C18 (4.6mm x 75mm)3.5 µm
MOBILE PHASE A: 10MM Ammonium Acetate in water, B 100% ACN
Gradient : % of B 0.0/10,0.2/10,2.5/75,3.0/100,4.8/100,5.0/10
Column : Ambient
Flow rate : 2.0 ml/min
DAD1 B, Sig=215,4 Ref=->
PEAK No | RT min | Area | Area %
1 | 2.096 | 3.041 | 0.231
2 | 2.415 | 1224.099 | 93.120
3 | 2.585 | 4.916 | 0.374
4 | 2.803 | 14.969 | 1.139
5 | 2.860 | 59.543 | 4.530
6 | 2.916 | 7.973 | 0.607


MS Spectrum
M+H=342.2
342.2
Exact Mass: 341.11

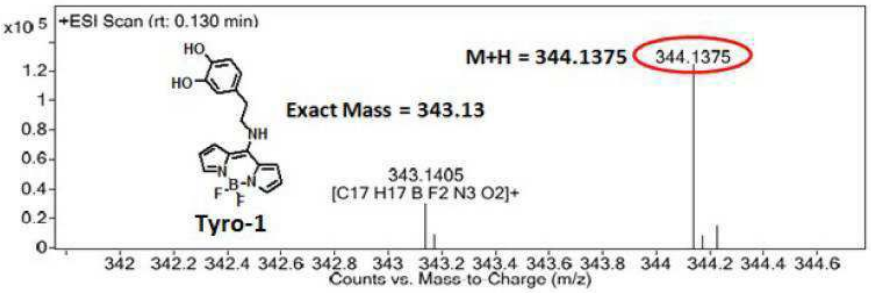
도면14


Tyro-1

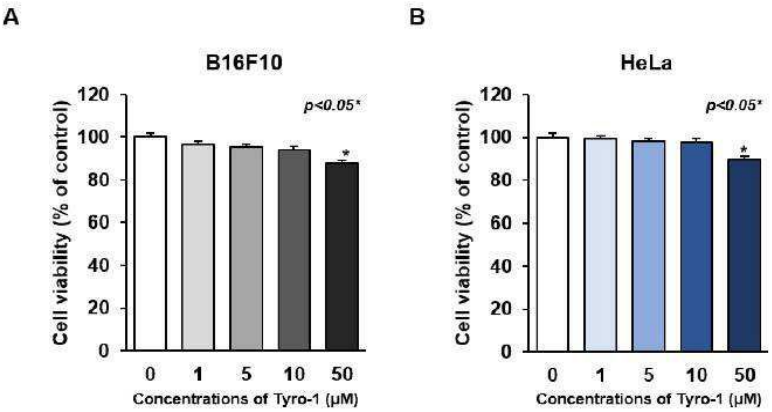
도면15



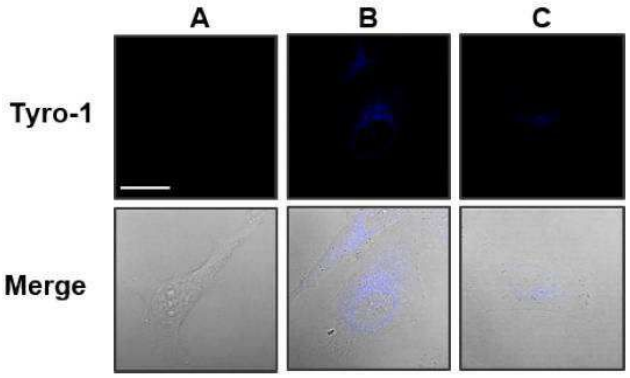
도면16



도면17



도면18



도면19

