

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0039680 (43) 공개일자 2013년04월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C09B 57/00 (2006.01) A61K 49/04 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2012-0111515		(72) 발명자 조봉래 서울특별시 성동구 성수동2가 843 서울숲 힐스테이트 103동 504호
(22) 출원일자 2012년10월08일 심사청구일자 2012년10월08일		(74) 대리인 특허법인충현
(30) 우선권주장 1020110104150 2011년10월12일 대한민국(KR)		

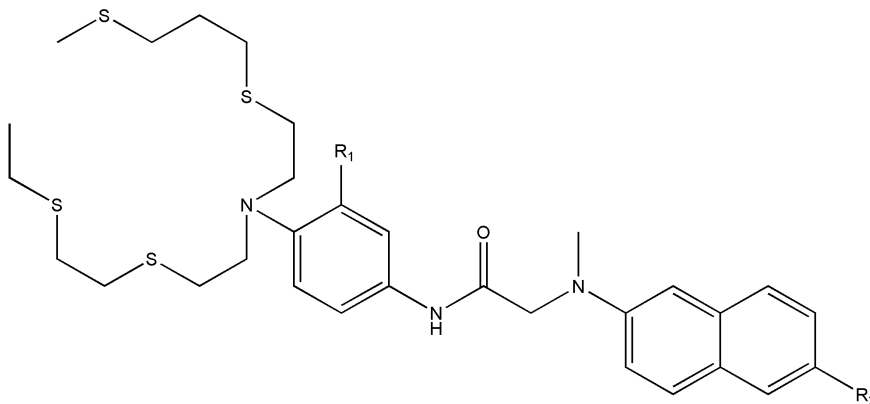
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료 및 그 제조방법

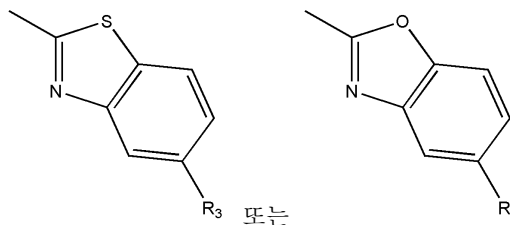
(57) 요약

본 발명은 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 화학식 1의 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료 및 그 제조방법에 관한 것이다:

<화학식 1>



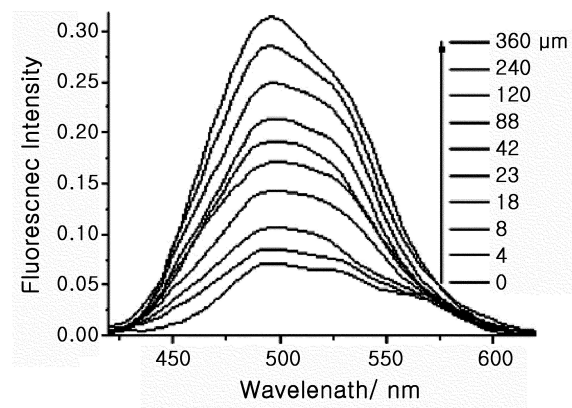
상기 식에서 R1은 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기 또는 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이고, R2는 -COCH3,



또는 R3이며, R3는 수소, 또는 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이다.

본 발명에 따른 이광자 형광 염료는 구리 1가 이온에 대해서 높은 선택성 및 감도를 가지며, 생체 세포 및 조직 내에서 90 μ m보다 높은 투과 깊이를 가지고 오폭적화 및 광탈색의 문제점 없이 장시간 동안 세포 내 유리 구리 1가 이온을 검출할 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110020477

부처명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원_도약연구

연구과제명 이광자 표지자의 합성과 생체 영상

주관기관 고려대학교 산학협력단

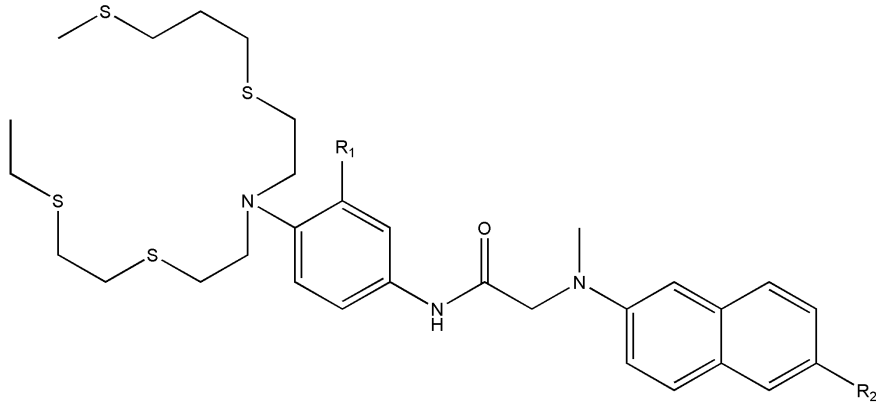
연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

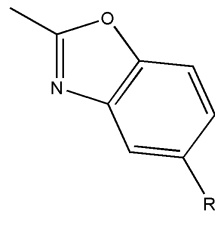
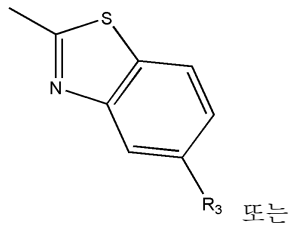
청구항 1

하기 화학식 1의 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료:

<화학식 1>



상기 식에서 R1은 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기 또는 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이고, R2는 -COCH3,



또는

R3

이며, R3는 수소, 또는 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R1은 수소, 메틸기 또는 메톡시기인 것을 특징으로 하는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료.

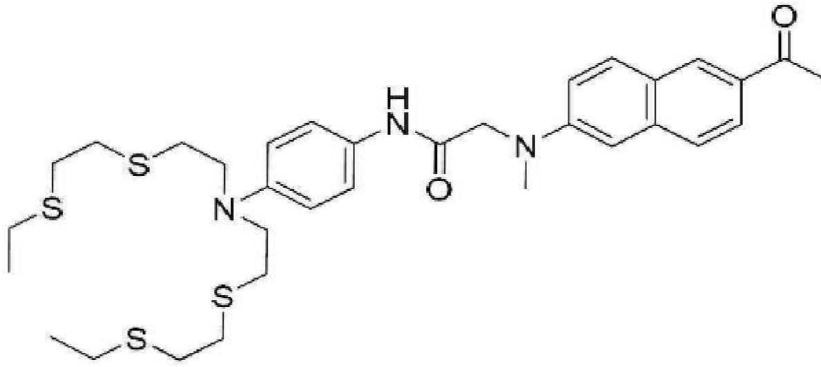
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 R3는 수소 또는 메톡시기인 것을 특징으로 하는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물인 것을 특징으로 하는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료:

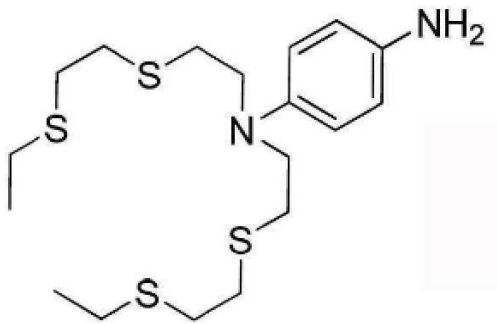
<화학식 2>



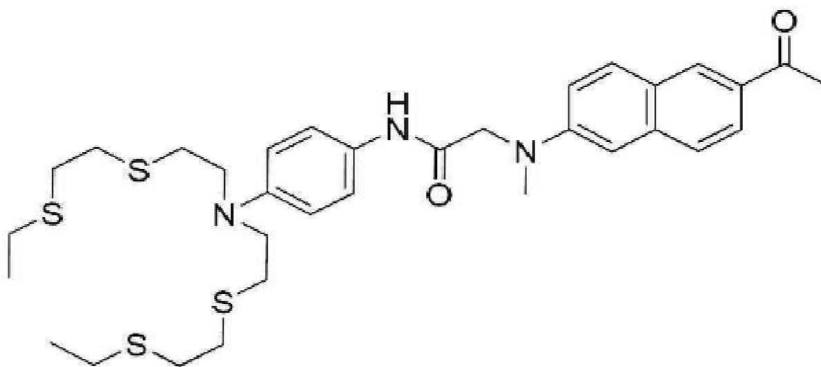
청구항 5

하기 화학식 3의 화합물과 6-아세틸-2-[*N*-메틸-*N*-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌, 1-히드록시벤조트리아졸 및 *N,N'*-디시클로헥실카르보디이미드의 혼합물을 반응시킴으로써 하기 화학식 2의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료의 제조방법:

<화학식 3>



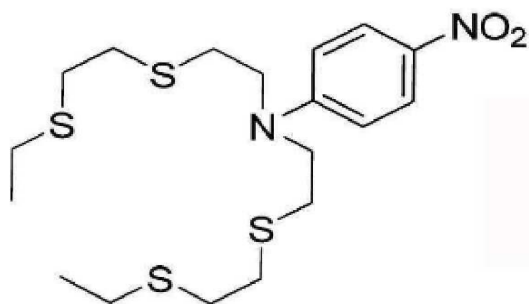
<화학식 2>



청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물과 SnCl₂의 혼합물을 유기 용매 중에서 환류시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료의 제조방법:

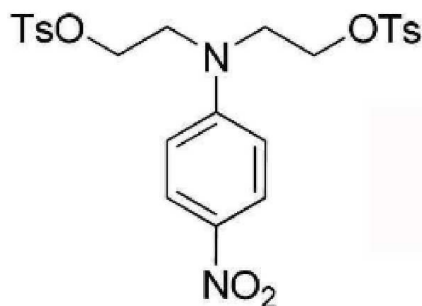
<화학식 4>



청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화학식 4의 화합물은 하기 화학식 5의 화합물과 2-(에틸티오)에탄티올 및 Cs₂CO₃의 혼합물을 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료의 제조방법:

<화학식 5>



상기 화학식에서 Ts는 토실기이다.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 구리 이온은 산화된 상태의 구리 2가 이온 (Cu²⁺) 및 환원된 상태의 구리 1가 이온 (Cu¹⁺)으로서 생체 내의 모든 기관에서 발견되는 필수 표지 금속으로서, 많은 세포질내 효소, 미토콘드리아 효소, 및 막산화 효소들의 반응에 보조 인자로서 작용한다. 특히, 유리 구리 이온 수준은 세포 내에서 정교하게 조절되는데, 이는 구리 이온 농도의 조절에 이상이 생길 경우 멘케스병 (Menkes disease) 및 윌슨병 (Wilson's disease)과 같은 심각한 질병들을 야기할 수 있기 때문이다.

[0003] 세포내 구리 이온의 역할을 이해하기 위해서 종래에 수 많은 일광자 (one-photon, OP) 형광 염료 (fluorescent probe)가 개발된 바 있다 (M. Royzen, Z. Dai 및 J. W. Canary, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1612; G. K. Li, Z. Xu, X. C. F. Chen 및 Z. T. Huang, *Chem. Commun.*, 2008, 1774; H. S. Jung, P. S. Kwon, J. W. Lee, J. I. Kim, C. S. Hong, J. W. Kim, S. Yan, J. Y. Lee, J. H. Lee, T. Joo 및 J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 2008). 그러나, 대부분의 일광자 형광 염료들은 구리 2가 이온에만 선택성을 가지며, 피라졸린 또는 BODIPY계 염료 및 (1,4,7,10-테트라티아-13-아자)-15-크라운-5 또는 비스{2-[2-(2-에틸티오)에틸티오]에틸}아민 (BETA)과 같은 소수의 일광자 형광 염료만이 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 것으로서 개발되었다 (L. Yang, R. McRae, M. M. Henary, R. Patel, B. Lai, S. Vogt 및 C. J. Fahrni, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 11179; L. Zeng, E. W. Miller, A. Pralle, E. Y. Isacoff 및 C. J. Chang, *J. Am. Chem.*

Soc., 2006, **128**, 10; A. F. Chaudhry, V. M. T. Morgan, M. M. Henary, N. Siegel, J. M. Hales, J. W. Perry 및 C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 737; D. W. Domaille, L. Zeng 및 C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1194). 더욱이, 이러한 일광자 형광 염료들을 일광자 현미경법 (one-photon microscopy, OPM)에 사용하기 위해서는 단파장광 (350 - 500 μm)에 의한 여기가 요구되는데, 이러한 요구사항은 투과 깊이를 제한시키고, 광탈색 (photobleaching), 광손상 (photodamage) 및 세포의 자가 형광 (autofluorescence) 현상 등을 일으켜서 조직 영상화에 있어서의 응용 범위를 제한하는 문제점을 갖는다.

[0004] 따라서, 생체 조직 내 깊은 곳에서 구리 이온을 탐지하기 위해서는 이광자 현미경법 (two-photon microscopy, TPM)의 사용이 필수적이다. TPM은 여기원으로서 2개의 근적외선 광자들을 사용하며, OPM에 비해서 다양한 장점들을 갖는데, 특히 투과 깊이가 증가하며 (>500 μm), 국부적 여기가 가능하고, 광손상 및 광탈색 현상을 감소시켜서 장시간 동안 조직 영상화를 가능하게 한다 (W. R. Zipfel, R. M. Williams 및 W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1369; F. Helmchen 및 W. Denk, *Nat. Methods*, 2005, **2**, 932). 그러나, 종래에는 구리 1가 이온에 대한 이광자 현미경법 염료의 개발이 보고된 바 없었으므로, 이에 대한 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0005] 종래기술로서, 대한민국 공개특허공보 제2009-0118412호는 세포질내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질내 자유아연이온의 실시간 모니터링 방법을 개시하고 있으며, 이는 세포질내 자유 아연 이온에 대해서 특이적으로 반응 및 발광하는 이광자 염료에 관한 것이다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제2009-0026048호는 세포내 칼슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포내 칼슘의 실시간 모니터링 방법을 개시하고 있으며, 이는 세포내 칼슘 이온만을 선택적으로 감지하는 이광자 염료에 관한 것이다. 따라서, 구리 1가 이온이 생체 내에서 갖는 중요성을 감안할 때, 이를 선택적으로 검출할 수 있는 이광자 형광 염료에 대한 기술개발이 필요한 실정이었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

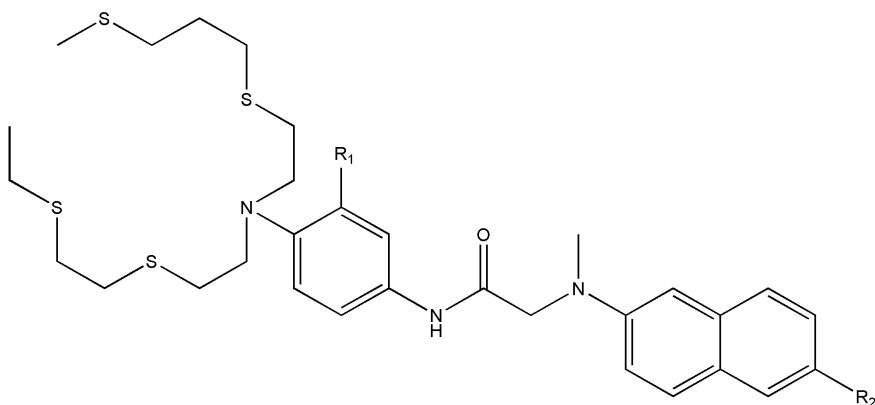
[0006] 본 발명이 이루고자 하는 첫 번째 기술적 과제는, 구리 1가 이온에 대해서 높은 선택성 및 감도를 가지며, 생체 세포 및 조직 내에서 90 μm 보다 높은 투과 깊이를 가지고 오폭적화 및 광탈색의 문제점 없이 장시간 동안 세포 내 유리 구리 1가 이온을 검출할 수 있는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 이광자 형광 염료의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

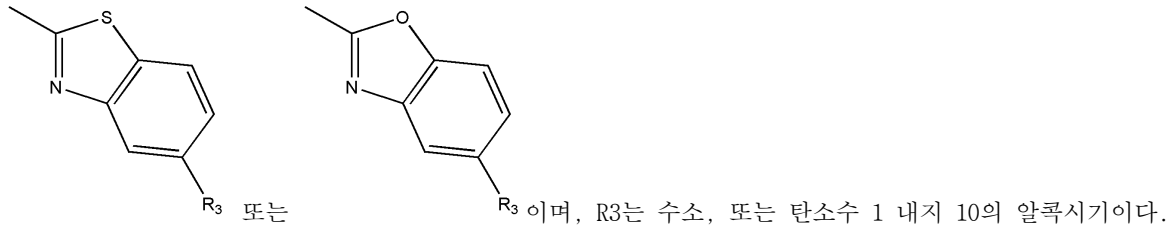
[0008] 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여, 화학식 1의 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료를 제공한다:

화학식 1



[0009]

[0010] 상기 식에서 R1은 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기 또는 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이고, R2는 -COCH3,

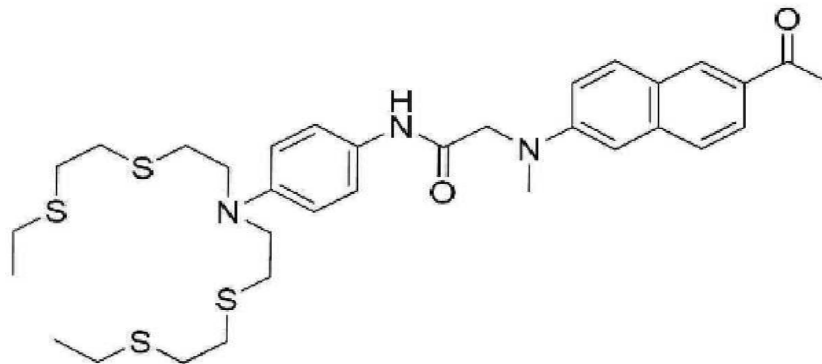


[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 R1은 수소, 메틸기 또는 메톡시기이다.

[0012] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 R3는 수소 또는 메톡시기이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물이다:

화학식 2

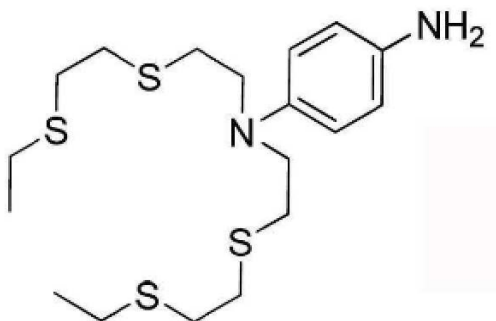


[0014]

[0015] 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

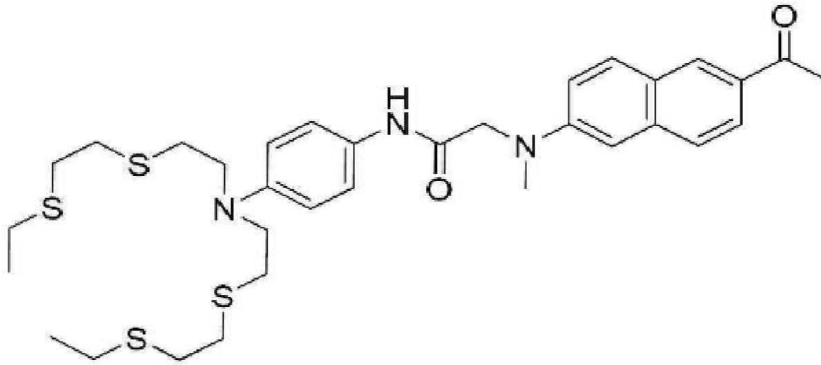
[0016] 화학식 3의 화합물과 6-아세틸-2-[N-메틸-N-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌, 1-히드록시벤조트리아졸 및 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드의 혼합물을 반응시킴으로써 화학식 2의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료의 제조방법을 제공한다:

화학식 3



[0017]

[0018] <화학식 2>

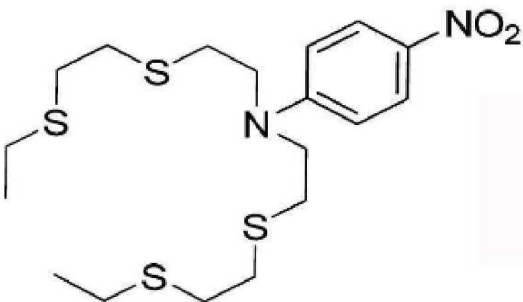


[0019]

[0020]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 3의 화합물은 화학식 4의 화합물과 SnCl_2 의 혼합물을 유기 용매 중에서 환류시킴으로써 제조될 수 있다:

화학식 4

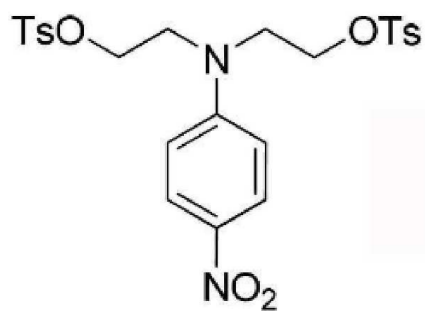


[0021]

[0022]

본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 4의 화합물은 화학식 5의 화합물과 2-(에틸티오)에탄티올 및 Cs_2CO_3 의 혼합물을 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

화학식 5



[0023]

[0024]

상기 화학식에서 Ts는 토실기이다.

발명의 효과

[0025]

본 발명에 따른 이광자 형광 염료는 구리 1가 이온에 대해서 높은 선택성 및 감도를 가지며, 생체 세포 및 조직 내에서 $90\mu\text{m}$ 보다 높은 투과 깊이를 가지고 오폭적화 및 광탈색의 문제점 없이 장시간 동안 세포 내 유리 구리 1가 이온을 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026]

도 1a 및 1b는 1,4-디옥산, DMF, 에탄올, 및 HEPES 완충용액 ([HEPES] = 20mM, pH 7.0) 중에서 화학식 2의 화합물에 대한 정규화된 흡수 (도 1a) 및 형광 (도 1b) 스펙트럼이다.

도 2a 및 2b는 구리 1가 이온을 HEPES 완충용액 중의 화합물 2에 첨가해 준 경우에 관찰된 일광자 흡수 (도 2a) 및 형광 (도 2b) 스펙트럼이다.

도 3은 구리 1가 이온을 HEPES 완충용액 중의 화합물 2에 첨가해 준 경우에 관찰된 이광자 형광 스펙트럼이다.

도 4는 화합물 2와 유리 구리 1가 이온 (0-360pM)의 복합체 형성 반응에 대한 일광자 형광 적정 곡선 (빈 구) 및 이광자 형광 적정 곡선이다.

도 5는 경쟁 금속 이온들과 대비한 구리 1가 이온의 화합물 2에 대한 반응성을 상대 형광 강도로서 표시한 그래프이다.

도 6은 HEPES 완충 용액 중의 0 (빈 구) 및 2 μ M (채워진 구) 농도의 구리 1가 이온 존재하에서, 2 μ M 농도의 화합물 2에 대한 일광자 형광 강도를 각각 다른 pH에서 측정한 결과를 도시한 그래프이다.

도 7은 구리 1가 이온 존재 하에서, 화합물 2 및 참조 화합물로서 Bodipy의 이광자 형광 스펙트럼을 도시한 그래프이다.

도 8은 2 μ M 농도의 화합물 2로 37°C에서 20분 동안 배양된 HeLa 세포의 이광자 현미경 영상을 도시한 사진이다.

도 9는 화합물 2로 배양된 생후 2일된 쥐의 해마 박편에 대한 명시야 영상 (bright field image) 사진이다.

도 10은 화합물 2로 배양된 생후 2일된 쥐의 해마 박편에 대해서, 다양한 깊이에서 얻어진 15개의 이광자 현미경 영상들을 합한 사진이다.

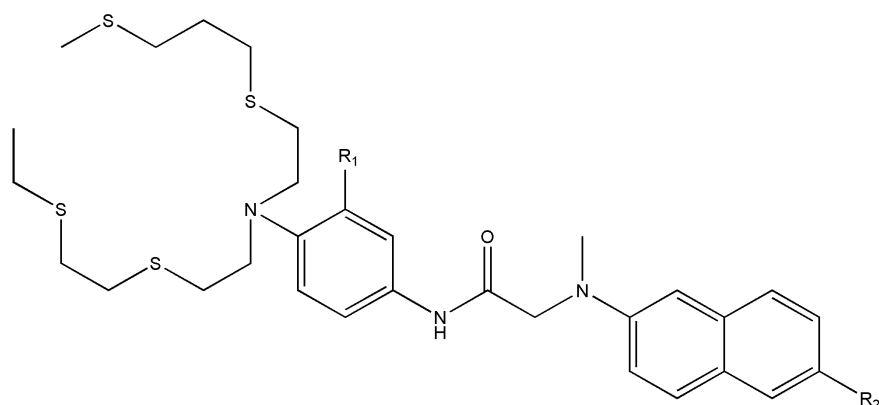
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

본 발명은 하기 화학식 1의 구리 1가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료를 제공한다:

[0028]

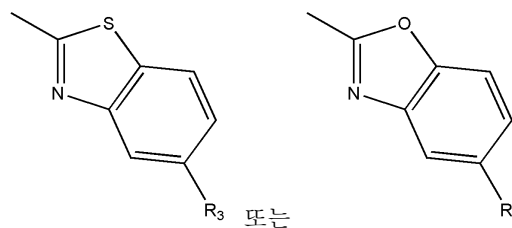
<화학식 1>



[0029]

[0030]

상기 식에서 R1은 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기 또는 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이고, R2는 -COCH3,



또는

R3

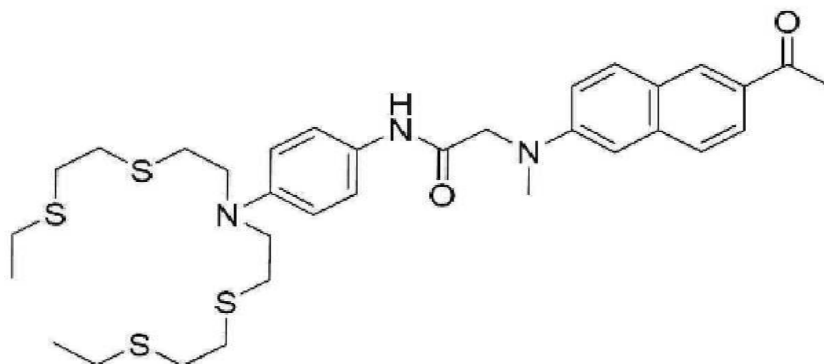
이며, R3는 수소, 또는 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이다.

[0031]

상기 R1은 수소, 메틸기 또는 메톡시기일 수 있으며, 또한 상기 R3는 수소 또는 메톡시기일 수 있고, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물일 수 있다:

[0032]

<화학식 2>



[0033]

[0034]

본 발명에 따른 이광자 형광 염료는 세포 내 구리 1가 이온에 대해서 매우 높은 선택성을 갖는다. 본 발명에 따른 이광자 형광 염료의 생체 내 다양한 경쟁반응 금속들에 대한 반응성을, 후술하는 바와 같이 다양한 실험을 통하여 검증해 본 결과, 본 발명의 염료가 생체 내의 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 와 같은 다른 경쟁 반응 금속들에 비해서 구리 1가 이온과 매우 높은 반응성을 가지고 선택적으로 반응함을 알 수 있었다. 더욱이, 본 발명에 따른 이광자 형광 염료의 반응 신호는 생물학적으로 유의성 있는 pH 범위 내에서 반응 용액의 pH와 무관함을 알 수 있었는데, 이로부터 본 발명에 따른 염료가 pH에 의한 간섭 현상 없이 구리 1가 이온을 검출할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0035]

또한, 본 발명에 따른 염료와 BODIPY 같은 종래의 염료에 대한 $\phi\delta$ 값을 비교해 보면, 본 발명에 따른 염료가 월등하게 높은 값을 나타내는데, 이는 본 발명에 따른 염료로 염색된 시료에 대한 TPM 영상이 종래의 염료로 염색된 시료에 대한 TPM 영상에 비해서 훨씬 더 밝게 나타난다는 사실을 의미한다.

[0036]

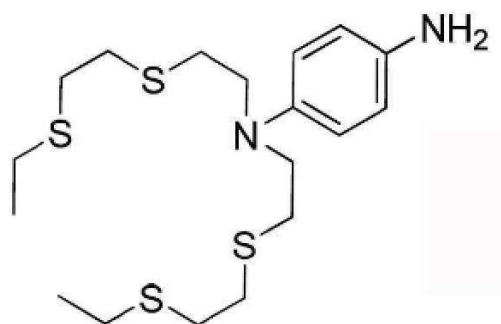
더 나아가, 본 발명에 따른 염료의 생체 내 영상화제로서의 적합성을 검증해 보기 위해서 배양 HeLa 세포 내에서의 구리 1가 이온 검출 실험을 수행하였으며, 생체 조직 내 깊은 곳에 존재하는 구리 1가 이온을 검출할 수 있는지 여부를 검증해 보기 위해서 쥐 해마 조직 박편에 대한 TPM 영상을 촬영한 결과, 본 발명에 따른 염료가 생체 내 구리 1가 이온의 검출에 유용하게 사용될 수 있으며, 다양한 깊이의 조직에서도 훌륭한 검출 강도를 나타냄을 알 수 있었다.

[0037]

본 발명은 또한 하기 화학식 3의 화합물과 6-아세틸-2-[*N*-메틸-*N*-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌, 1-히드록시벤조트리아졸 및 *N,N'*-디시클로헥실카르보디이미드의 혼합물을 반응시킴으로써 상기 화학식 2의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 생체 내 영상화용 이광자 형광 염료의 제조방법을 제공한다:

[0038]

<화학식 3>



[0039]

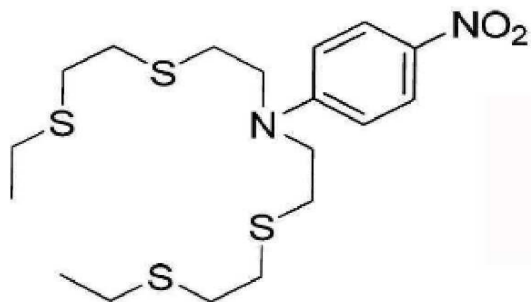
[0040]

상기 반응은 6-아세틸-2-[*N*-메틸-*N*-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌, 1-히드록시벤조트리아졸 및 *N,N'*-디시클로헥실카르보디이미드의 혼합물을 CH_2Cl_2 와 같은 유기 용매 중에서 교반시킨 다음, 상기 혼합물 용액에 상기 화학식 3의 화합물을 첨가하고 더욱 교반시켜 줌으로써 수행될 수 있다. 상기 6-아세틸-2-[*N*-메틸-*N*-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌은 공지된 방법에 의해서 합성될 수 있다 (H. M. Kim, C. Jung, B. R. Kim, S.-Y. Jung, J. H. Hong, Y.-G. Ko, K. J. Lee, B. R. Cho, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3460).

[0041]

바람직하게는, 상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물과 SnCl_2 의 혼합물을 유기 용매 중에서 환류시킴으로써 제조될 수 있다:

[0042] <화학식 4>

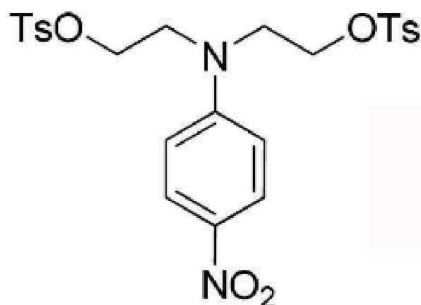


[0043]

[0044] 예를 들어, 상기 유기 용매로는 THF 및 에탄올의 혼합물을 사용할 수 있으며, 상기 화학식 3의 화합물은 용매를 진공 처리하여 제거하고, NaOH와 같은 염기성 용액으로 처리한 다음, 추출 및 건조 과정을 거쳐서 제조할 수 있다.

[0045] 바람직하게는, 상기 화학식 4의 화합물은 하기 화학식 5의 화합물과 2-(에틸티오)에탄티올 및 Cs₂CO₃의 혼합물을 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

[0046] <화학식 5>



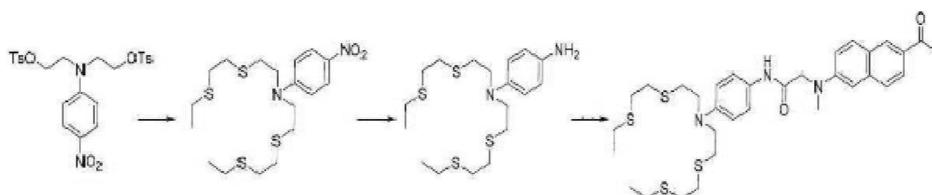
[0047]

[0048] 상기 화학식에서 Ts는 토실기이다.

[0049] 예를 들어, 상기 화학식 4의 화합물은 2-(에틸티오)에탄티올 및 Cs₂CO₃의 혼합물을 DMF 용매 중에 용해시킨 다음, 이를 다시 DMF 용매 중의 상기 화학식 5의 화합물 용액에 서서히 가하고 교반시켜 주고, 용매 증발, 추출, 건조 등의 과정을 거쳐서 제조할 수 있다. 상기 화학식 5의 화합물은 공지의 방법에 의해서 합성될 수 있다 (M. W. Glenn, L. G. A. van de Water, J. M. Vere, A. J. Blake, C. Wilson, W. L. Driessen, J. Reedijk, M. Schroder, *Polyhedron*. **2006**, *25*, 599).

[0050] 참고로, 하기 반응식 1에는 화학식 5의 화합물로부터, 화학식 2의 화합물을 제조하는 예시적인 개략 반응도를 나타내었다.

[0051] <반응식 1>



[0052]

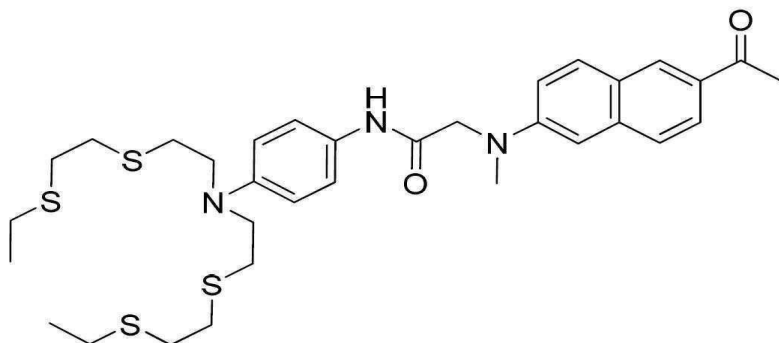
[0053] 상기 반응식에서 Ts는 토실기이다.

[0054] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니며, 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 서술된 것이다.

[0055] 제조예. 본 발명에 따른 이광자 형광 염료의 제조

[0056] 하기 제조예에 따라서 본 발명에 따른 이광자 형광 염료인 하기 화학식 2의 화합물을 제조하였다.

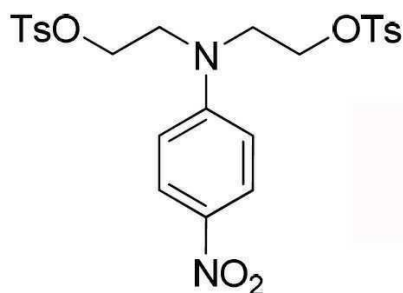
[0057] <화학식 2>



[0058]

[0059] 제조예 1.1. *N,N*-비스(토실에틸)-4-니트로아닐린 (화학식 5)의 제조

[0060] <화학식 5>



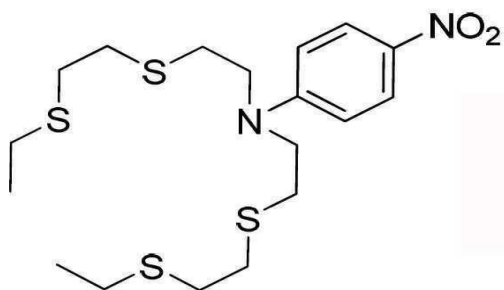
[0061]

[0062] 상기 화학식에서 Ts는 토실기이다.

[0063] 상기 화학식 5의 화합물은 참고 문헌 (M. W. Glenny, L. G. A. van de Water, J. M. Vere, A. J. Blake, C. Wilson, W. L. Driessen, J. Reedijk, M. Schroder, *Polyhedron*. **2006**, 25, 599)에 기재된 바에 따라서 제조하였다.

[0064] 제조예 1.2. *N,N*-비스{2-[2-(에틸티오)에틸티오]에틸}-4-니트로아닐린 (화학식 4)의 제조

[0065] <화학식 4>



[0066]

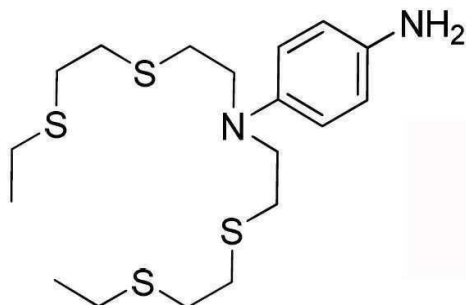
[0067] DMF 중의 2-(에틸티오)에탄티올 (0.60g, 4.9mmol) 및 Cs_2CO_3 (1.9g, 5.8mmol)의 혼합물 용액 (50mL)을 DMF 중의 상기 화학식 4의 화합물 (1.2g, 2.3mmol) 용액 (50mL)에 160℃에서 서서히 가하고 24시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시킨 다음, 잔류물을 물 (100mL)에 붓고 1시간 동안 교반하였다. 생성물을 CH_2Cl_2 로 추출하고, MgSO_4 상에서 건조, 여과 및 증발시켰다. *n*-헥산/에틸 아세테이트 (3:1 내지 1:1)를 용출액으로 사용하는 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해서 산물을 정제하였으며, 감압하에서 농축하여 담황색 오일을 수득하였다.

[0068] 수율: 0.77 g (63 %); IR (KBr): 1594 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.14 (2H, d, $J = 7.1$ Hz), 6.63 (2H, d, $J = 7.1$ Hz), 3.67 (4H, t, $J = 5.4$ Hz), 2.85 (4H, q, $J = 5.6$ Hz), 2.82-2.73 (12H, m), 1.27 (6H,

t, $J = 5.6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 151.7, 137.9, 126.7, 110.6, 51.8, 32.9, 32.1, 29.6, 26.4, 15.0$ ppm; HRMS (FAB $^+$): $[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_4+\text{H}^+]$ 에 대해서 계산된 m/z: 435.1267, 실제값 : 435.1269

[0069] 제조예 1.3. *N,N'*-비스{2-[2-(에틸티오)에틸티오]에틸}벤젠-1,4-디아민 (화학식 3)의 제조

[0070] <화학식 3>



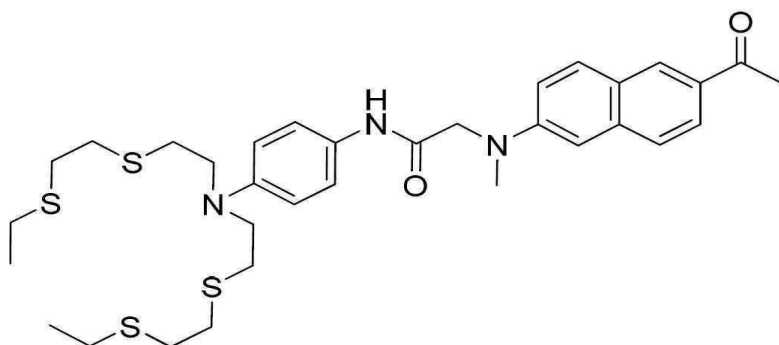
[0071]

[0072] 제조예 1.2로부터 제조된 화학식 4의 화합물 (0.30g, 0.69mmol)과 SnCl_2 (1.5g, 6.9mmol)의 혼합물을 THF/에탄올 용매 (1/1, 80mL) 중에서 12시간 동안 환류시켰다. 용매를 진공에서 제거하고 조생성물을 NaOH 수용액으로 처리하였다. 용액이 염기성을 띄게 되면, 생성물을 CH_2Cl_2 로 추출하고, MgSO_4 상에서 건조한 다음, 용매를 진공에서 제거함으로써 암갈색 오일을 수득하였다.

[0073] 수율: 0.16g (56 %); (56 %); IR (KBr): 3480, 3340 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.67 (4H, m), 3.41 (4H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.73 (12H, m), 2.56 (4H, q, $J = 7.4$ Hz), 1.26 (6H, t, $J = 7.4$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 135.9, 133.6, 115.1, 112.6, 51.9, 32.7, 32.0, 29.6, 26.3, 15.0$ ppm; HRMS (FAB $^+$): $[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{S}_4+\text{H}^+]$ 에 대해서 계산된 m/z: 404.1448, 실제값 : 404.1451

[0074] 제조예 1.4. 본 발명에 따른 이광자 형광 염료 (화학식 2)의 제조

[0075] <화학식 2>



[0076]

[0077] CH_2Cl_2 (30mL) 중의 6-아세틸-2-[*N*-메틸-*N'*-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌 (0.13g, 0.50mmol), 1-히드록시벤조트리아졸 (0.07g, 0.50mmol), 및 *N,N'*-디시클로헥실카르보다이미드 (0.10g, 0.50mmol)의 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 이 혼합물에 CH_2Cl_2 (15mL) 중의 화학식 3의 화합물 (0.16g, 0.42mmol)을 가하고 N_2 하에서 4시간 동안 교반하였다. 결과 혼합물을 여과한 다음, 여과물을 CH_2Cl_2 로 추출하고, 포화 NaHCO_3 (aq)로 세척, Na_2SO_4 상에서 건조, 여과 및 증발 과정을 수행하였다. 조생성물을 헥산/에틸 아세테이트/ CHCl_3 (1:1:1)를 용출액으로 사용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다.

[0078] 수율 0.14g (50%); 융점 150.3°C; IR (KBr): 3450, 1650, 1616 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 8.37 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 8.05 (1H, br s), 7.99 (1H, dd, $J = 1.2, 6.9$ Hz), 7.89 (1H, d, $J = 6.9$ Hz), 7.72 (1H, d, J

= 6.9 Hz), 7.34 (2H, d, $J = 6.8$ Hz), 7.19 (1H, dd, $J = 1.8, 6.9$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.61 (2H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.12 (2H, s), 3.52 (4H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.25 (3H, s), 2.77-2.71 (12H, m), 2.69 (3H, s), 2.56 (4H, q, $J = 5.6$ Hz), 1.25 (6H, t, 5.6 Hz); ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 198.0, 167.9, 149.2, 137.3, 132.3, 131.6, 130.4, 127.0, 126.6, 125.2, 122.6, 116.6, 112.5, 107.6, 59.4, 51.9, 40.4, 32.7, 32.6, 31.9, 31.8, 29.6, 26.8, 26.3, 15.0$ ppm; HRMS (FAB): $[\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_4\text{H}^+]$ 에 대해서 계산된 m/z : 644.2473, 실제값 : 644.2474.

[0079] 실시예 1. 흡수 및 형광 스펙트럼 측정

[0080] 흡수 스펙트럼은 Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer를 사용하여, 형광 스펙트럼은 1cm 표준 퀴즈 셀을 구비한 Amico-Bowman series 2 luminescence spectrometer를 사용하여 측정하였으며, 형광 양자 수율은 Coumarin 307을 참조 화합물로 사용하는 참고 문헌의 방법에 따라서 측정하였다 (J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991).

[0081] 도 1a 및 1b에는 1,4-디옥산, DMF, 에탄올, 및 HEPES 완충용액 ([HEPES] = 20mM, pH 7.0) 중에서 화학식 2의 화합물에 대한 정규화된 흡수 (도 1a) 및 형광 (도 1b) 스펙트럼을 도시하였으며, 이때 여기 파장으로는 365nm의 빛을 사용하였다. 화합물 2의 HEPES 완충용액 ([HEPES] = 20mM, pH 7.0)에 대한 용해도는 참고문헌의 형광 방법을 사용하여 측정하였으며 (H. M. Kim 및 B. R. Cho, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 863; M. K. Kim, C. S. Lim, J. T. Hong, J. H. Han, H. Y. Jang, H. M. Kim 및 B. R. Cho, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 364; J. H. Lee, C. S. Lim, Y. S. Tian, J. H. Han 및 B. R. Cho, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1216; H. M. Kim 및 B. R. Cho, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 58), 측정치는 $4.0 \mu\text{M}$ 로서, 세포들을 염색하기에 충분한 수준이었다.

[0082] 도 1a 및 1b를 참조하면, 화합물 2의 흡수 및 형광 스펙트럼 최대값은 용매 극성에 따라서 높은 수준의 적색 이동을 나타내었는데 (1,4-디옥산 < 에탄올 < HEPES 완충용액), 단파장광에 대한 스펙트럼 최대값의 이동은 흡수 스펙트럼 (17nm) 보다는 형광 스펙트럼 (65nm)에서 더 컸으며, 이는 화합물 2가 극성 염료로서 유용하다는 사실을 반증한다.

[0083] 한편, 도 2a 및 2b에는 유리 구리 1가 이온 (0-360pM) 존재 하에서 $2 \mu\text{M}$ 농도의 화합물 2에 대한 일광자 흡수 및 형광 스펙트럼을 도시하였다. 도 2a 및 2b를 참조하면, 구리 1가 이온을 HEPES 완충용액 중의 화합물 2에 첨가해준 경우에, 형광 강도는, 흡수 스펙트럼에 영향을 끼치지 않고, 구리 1가 이온의 농도에 대한 함수로서 점진적으로 증가하였는데, 이는 금속 이온과 화합물 2가 복합체를 형성함으로써 광유도 전자수송 (photo induced electron transfer, PeT)을 차단하기 때문으로 판단된다. 360pM 농도의 유리 구리 1가 이온이 존재하는 경우에는 4배의 형광강도 증가가 관찰되었으며, 이러한 결과는 일광자 형광 스펙트럼에서도 유사하게 관찰되었다 (도 3 참조).

[0084] 일광자 및 이광자 과정에 대한 화합물 2의 해리상수 (K_d)는 형광 적정곡선 (도 4 참조)으로부터 계산하였다 (HEPES 완충용액을 사용하였으며, HEPES의 농도는 20mM, 티오우레아의 농도는 $100 \mu\text{M}$, pH는 7.0). 형광 적정곡선은 1:1 결합 모델과 부합하는데, 이로부터 화합물 2와 구리 1가 이온이 1:1 복합체를 형성한다는 사실을 알 수 있다. 구리 1가 이온에 대한 해리상수 값은 일광자 및 이광자 과정에 대해서 각각 16 ± 2 pM 및 20 ± 3 pM이었으며, 이러한 값으로부터 화합물 2가 구리 1가 이온을 pM 범위로 검출하는데에 유용하게 사용될 수 있다는 사실을 알 수 있다.

[0085] 실시예 2. 경쟁 이온 반응

[0086] 도 5에는 경쟁 금속 이온들과 대비한 구리 1가 이온의 화합물 2에 대한 반응성을 상대 형광 강도로서 표시하였다. 도 5에서, 빈 막대 그래프는 구리 1가 이온을 첨가하기 전에 2mM 농도의 화합물 2가, 20mM의 HEPES 완충용액 (pH 7.0) 중의 1mM 농도의 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 와 반응하는 경우, 2mM 농도의 Hg^{2+} 와 반응하는 경우, 및 50mM 농도의 다른 양이온들과 반응하는 경우에 측정된 상대 형광 강도를 측정한 그래프이며, 채워진 막대 그래프는 여기에 2mM 농도의 구리 1가 이온을 첨가한 후에 측정된 상대 형광 강도이다 (그래프에서 가로축 각각의 숫자가 표시하는 양이온들은 다음과 같다: (1) Cu^+ ; (2) Na^+ ; (3) K^+ ; (4) Mg^{2+} ; (5) Ca^{2+} ; (6) Mn^{2+} ; (7) Fe^{2+} ; (8) Co^{2+} ; (9) Ni^{2+} ; (10) Cu^{2+} ; (11) Zn^{2+} ; (12) Hg^{2+}). 도 5를 참조하면, 화합물 2는 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 와 같은

알칼리 금속 또는 알칼리 토금속, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 와 같은 전이금속들의 존재 하에서도 형광 반응의 방해받지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과에 대한 유일한 예외는 Hg^{2+} 이온이지만, 생체 내의 Hg^{2+} 이온의 농도가 무시할 만한 수준이라는 점을 감안하면, 화합물 2가 세포 내 구리 1가 이온을 선택적으로 검출할 수 있다고 할 수 있다.

[0087] 도 6에는 HEPES 완충 용액 중의 0 (빈 구) 및 2 μM (채워진 구) 농도의 구리 1가 이온 존재하에서, 2 μM 농도의 화합물 2에 대한 일광자 형광 강도를 각각 다른 pH에서 측정한 결과를 도시하였으며, 이때 여기 파장으로는 365nm의 광을 사용하였다. 도 6을 참조하면, 화합물 2의 반응성은 생물학적으로 관련성 있는 pH 범위 내에서 용액의 pH와 무관한 특성을 갖는데, 이러한 도 5 및 도 6의 결과로부터 본 발명에 따른 화합물 2가 pH 및 다른 금속 이온들로부터 거의 방해받지 않으면서 구리 1가 이온을 검출할 수 있다는 사실을 알 수 있다.

[0088] 도 7에는 2 μM 농도의 구리 1가 이온 존재 하에서, 화합물 2 (도면에서 ACu1으로 도시) 및 참조 화합물로서 Bodipy의 이광자 형광 스펙트럼을 도시하였다 (Bodipy의 수치는 C. Xu and W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B*, 1996, **13**, 481로부터 인용). 도 7을 참조하면, HEPES 완충용액 중에서 화합물 2-Cu⁺ 복합체의 이광자 스펙트럼은 67GM의 $\phi \delta$ 값을 나타내었는데 (750nm), 이는 BODIPY의 수치 (750nm에서 <5GM)보다 13배 이상 더 큰 것이다. 따라서, 화합물 2로 염색된 시료들에 대한 이광자 영상이 BODIPY계 염료로 염색된 시료들보다 훨씬 밝다는 사실을 알 수 있다.

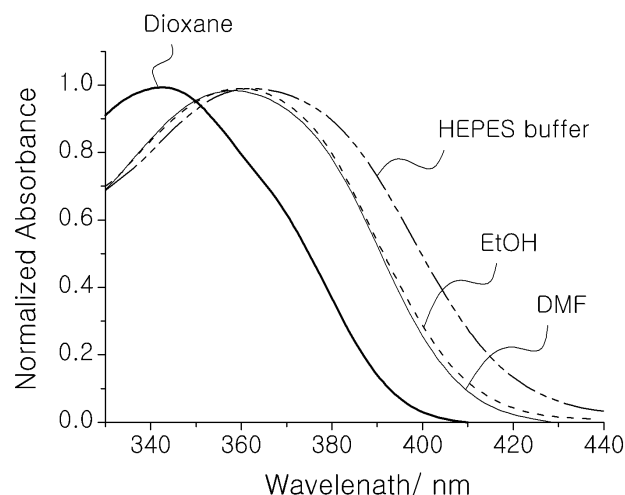
[0089] 실시예 3. 배양 세포 내 구리 이온의 검출

[0090] 생체 세포 내에서 화합물 2의 유용성을 알아보기 위해서, 배양된 HeLa 세포 내의 구리 1가 이온을 이광자 현미경법에 의해서 탐지하였다. 도 8에는 2 μM 농도의 화합물 2로 37°C에서 20분 동안 배양된 HeLa 세포의 이광자 현미경 영상을 도시하였다. 도 8을 참조하면, 화합물 2로 표지된 HeLa 세포에 대한 TPM 영상은 매우 밝았는데, 이는 로딩이 쉽고, 반응산물의 $\phi \delta$ 값이 매우 크기 때문으로 판단된다.

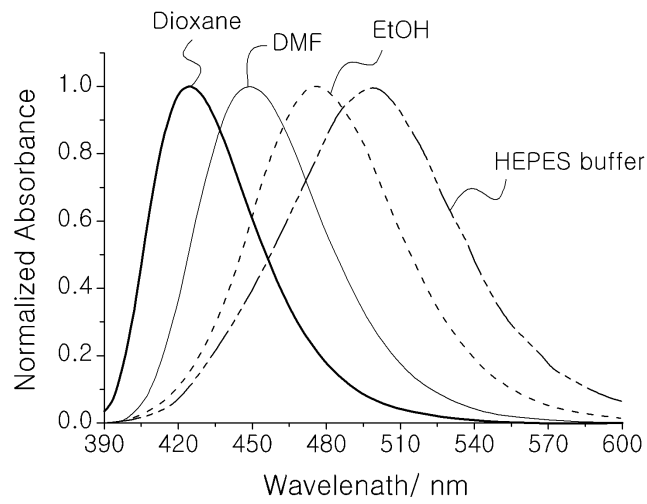
[0091] 한편, 화합물 2의 생체 조직 내 깊은 곳에서의 검출 가능 여부를 알아보기 위해서, 37°C에서 1시간 동안 20 μM 농도의 화합물 2로 배양된 생후 2일된 쥐의 해마 박편에 대한 명시야 영상 (bright field image)을 얻었으며, 이를 도 9에 도시하였다. 도 9를 참조하면, 구리 1가 이온은 CA1 및 CA3 영역에서 뿐만 아니라, 치상회 (dentate gyrus)에서도 관찰되었다. 뇌 조직은 비균질한 구조를 갖기 때문에, 전체적인 구리 1가 이온의 분포를 가시화하기 위해서 90-220 μm 범위의 다양한 깊이에서 얻어진 15개의 TPM 영상들을 합하였으며, 이를 도 10에 도시하였다. 도 10을 참조하면, 구리 1가 이온이 치상회보다는 CA1 및 CA3 영역에서 더욱 풍부하게 관찰된다는 사실을 알 수 있다.

도면

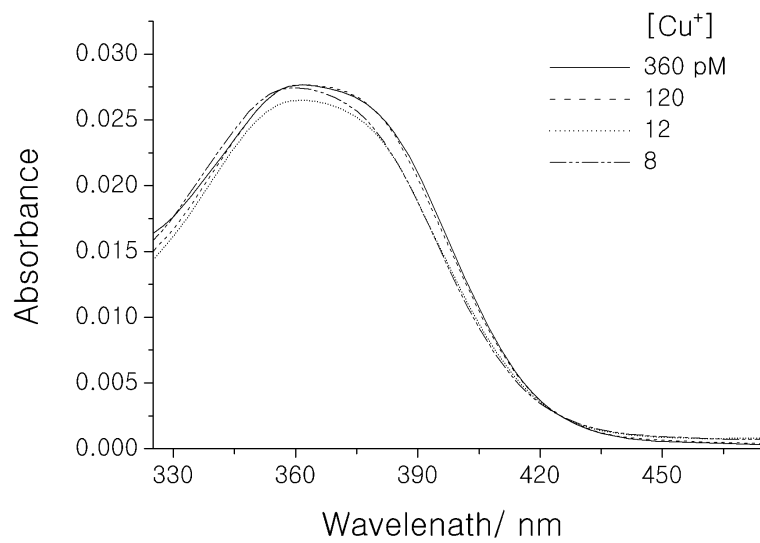
도면1a



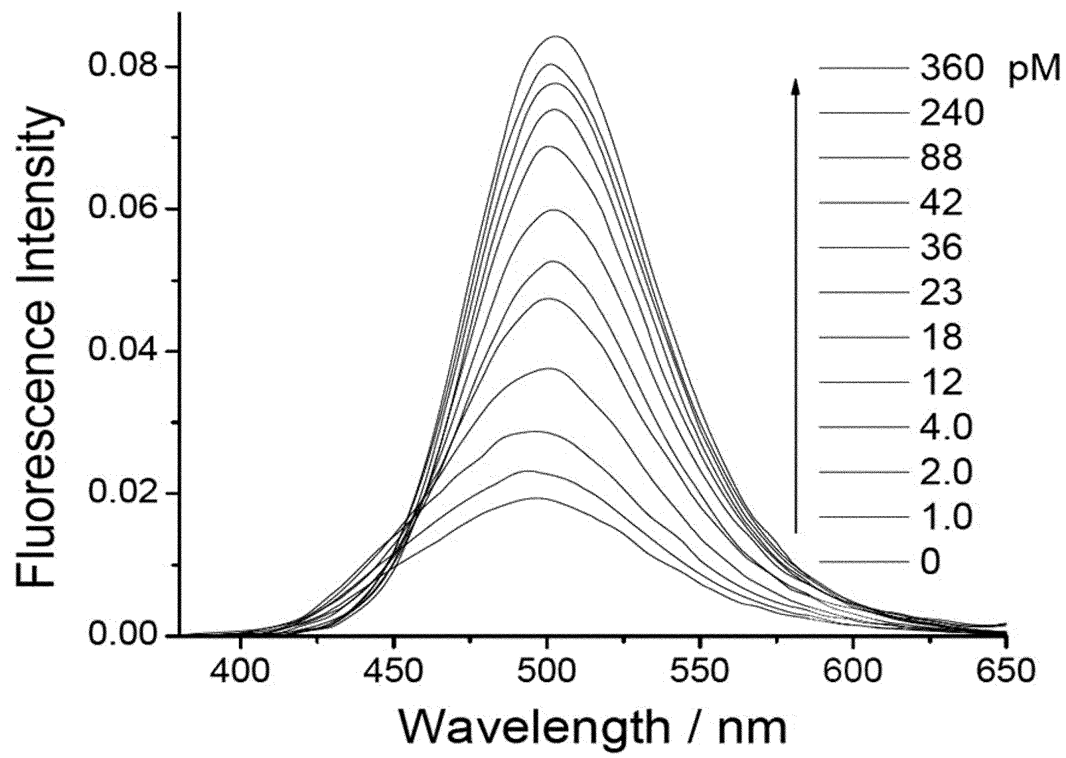
도면1b



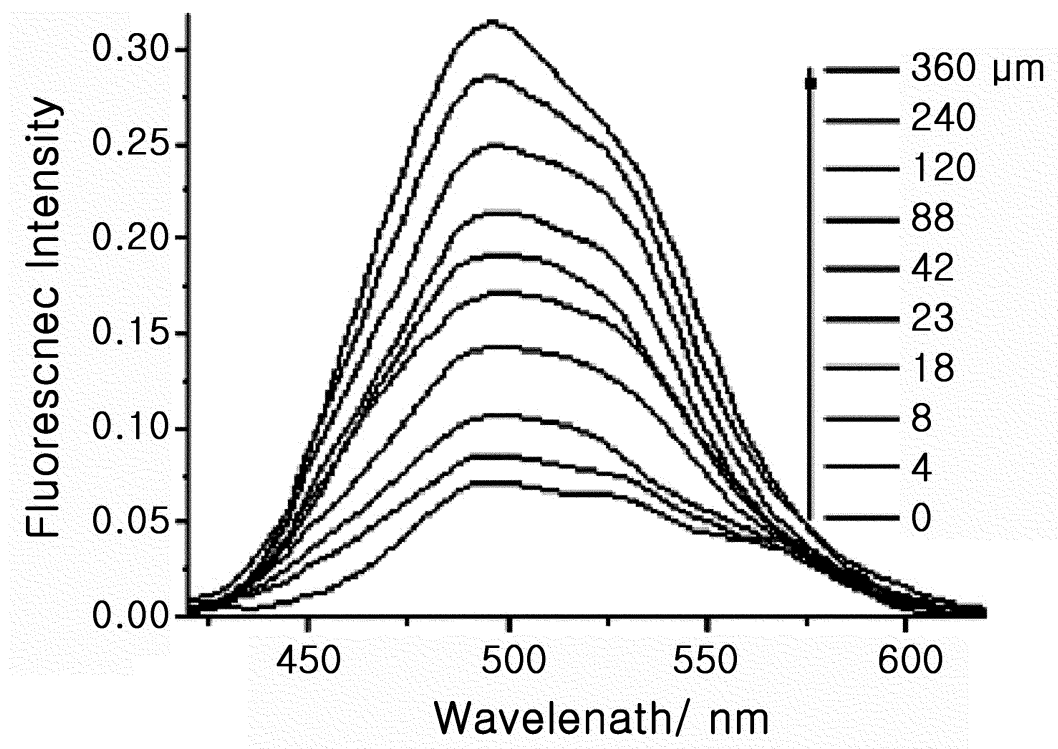
도면2a



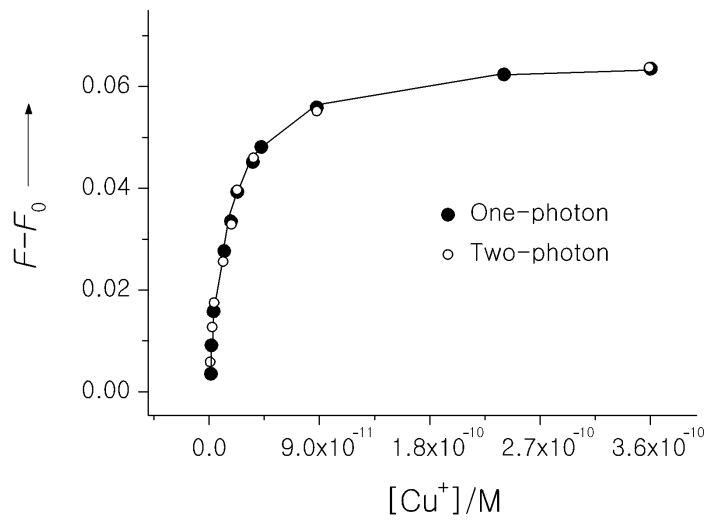
도면2b



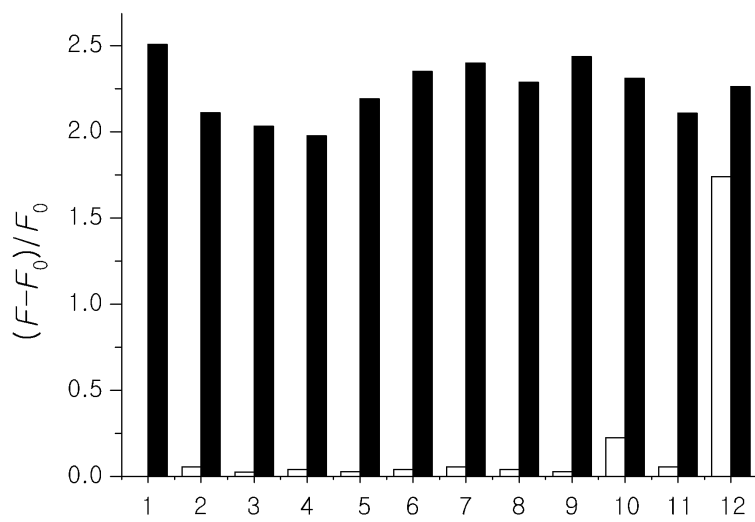
도면3



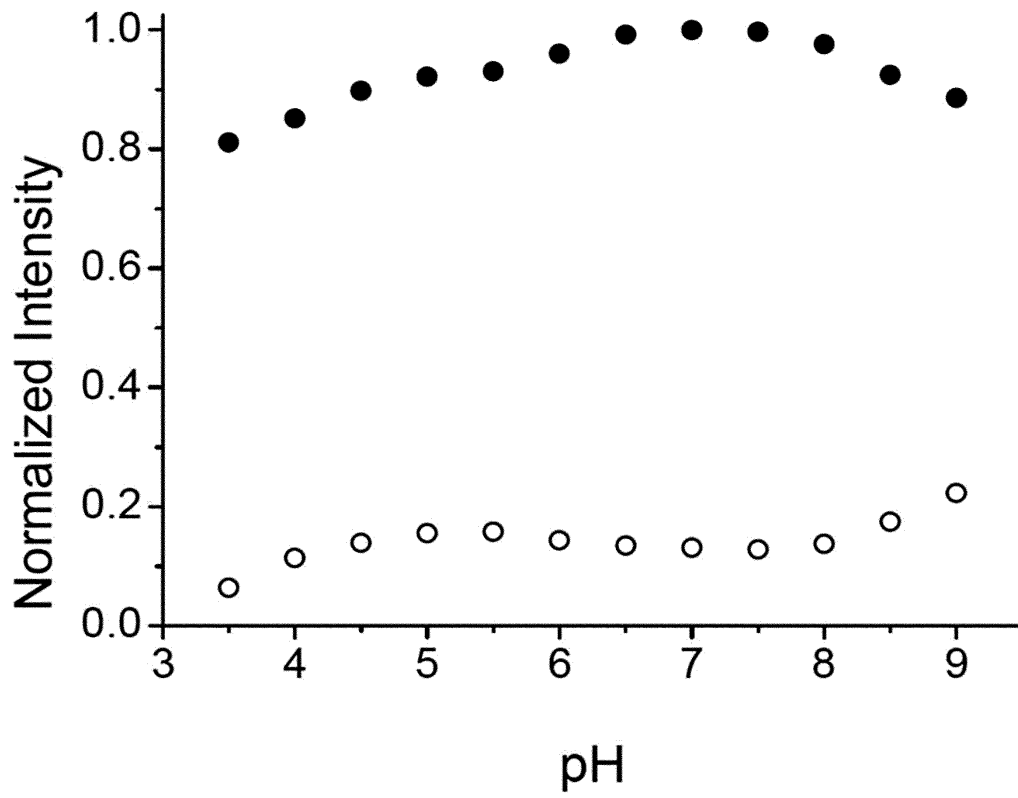
도면4



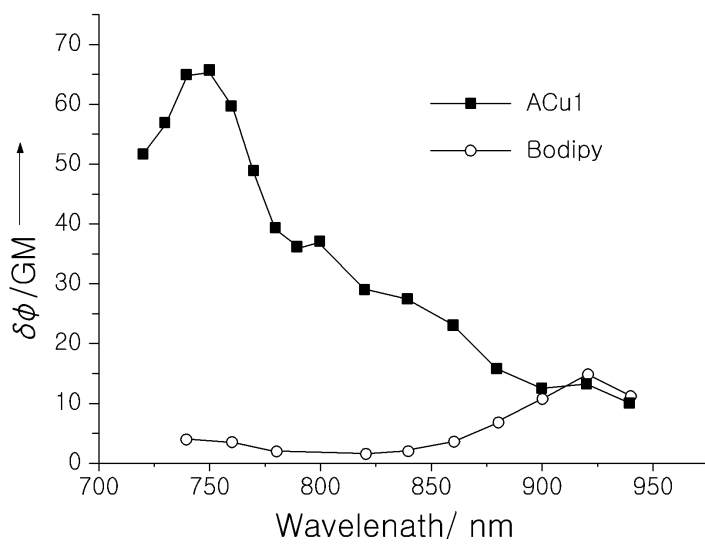
도면5



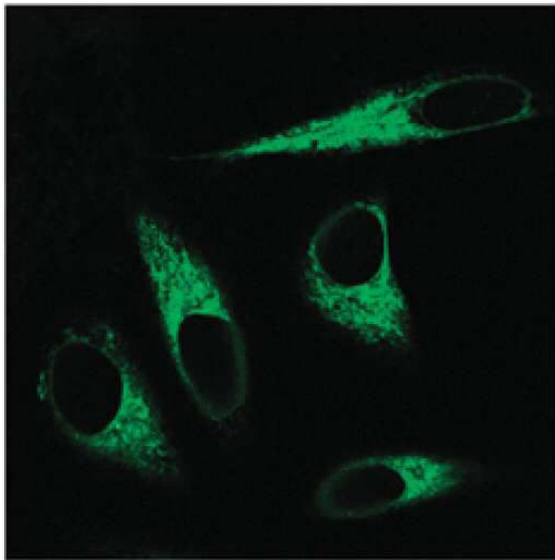
도면6



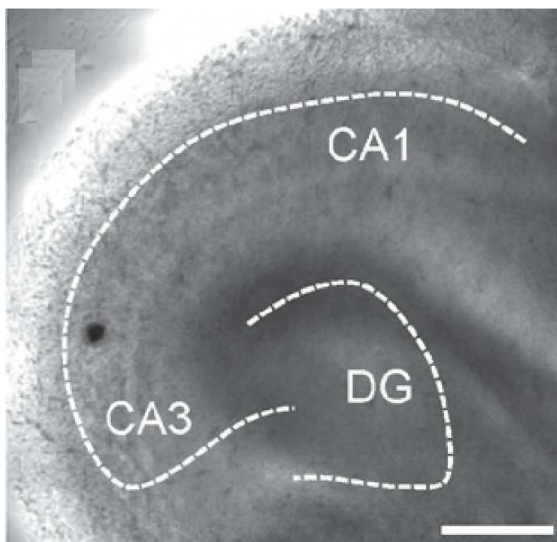
도면7



도면8



도면9



도면10

