



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)
C07D 277/66 (2006.01) G01N 21/77 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011734
- (22) 국제출원일: 2013 년 12 월 17 일 (17.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0093237 2013 년 8 월 6 일 (06.08.2013) KR
- (71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 443-749 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김환명 (KIM, Hwan Myung); 442-754 경기도 수원시 팔달구 우만동 600 월드메르디앙 아파트 104-1005, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 구로동 197-22 에이스테크노타워 5 차 601, Seoul (KR).

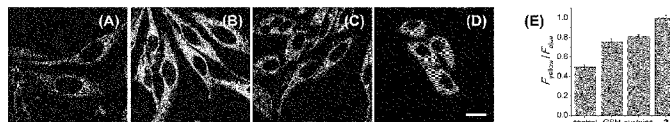
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: VARIABLE COLOR TWO-PHOTON FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING HYDROGEN SULFATE, METHOD FOR MANUFACTURING SAME, AND METHOD FOR QUANTITATIVELY IMAGING IN VIVO HYDROGEN SULFATE USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 황화수소 검출용 가변색 이광자 형광 프로브, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 생체 내 황화수소의 정량적 영상화 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a variable color two-photon fluorescent probe which reacts with in vivo hydrogen sulfate (H_2S) to change a fluorescent color; and to a method for manufacturing the same. Furthermore, the present invention relates to a method for quantitatively imaging hydrogen sulfate present in cells and biopsy tissues through a two-photon microscope by using the variable color two-photon fluorescent probe. The variable color two-photon fluorescent probe according to the present invention is selectively dyed with mitochondria or cytoplasm; reacts with hydrogen sulfate (H_2S) to show a strong fluorescent color change; can easily be loaded on cells due to excellent solubility to water and a small molecular weight; and can selectively detect hydrogen sulfate in cells and 100-200 μm -depth biopsy tissues throughout 60 minutes or longer, thereby quantitatively imaging the distribution and activity of hydrogen sulfate inside the mitochondria or cytoplasm in the cells and biopsy tissues.

(57) 요약서: 본 발명은 생체 내 황화수소(H_2S)와 반응하여 형광 색이 변화하는 가변색 이광자 형광 프로브 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 가변색 이광자 형광 프로브를 이용하여 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 황화수소를 이광자 현미경을 통해 정량적으로 영상화하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 가변색 이광자 형광 프로브는 미토콘드리아 또는 세포질에 선택적으로 염색됨과 동시에 황화수소(H_2S)와 반응하여 강한 형광 색 변화를 나타내며, 물에 대한 우수한 용해도와 작은 분자량으로 인해 세포에 쉽게 로딩될 수 있고, 60 분 이상에 걸쳐 세포 및 100~200 μm 깊이의 생체 조직에서 선택적으로 황화수소를 탐지할 수 있으므로, 세포 및 생체 조직에서 미토콘드리아 또는 세포질 내부의 황화수소의 분포 및 활성을 정량적으로 영상화 할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 황화수소 검출용 가변색 이광자 형광 프로브, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 생체 내 황화수소의 정량적 영상화 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 생체 내 황화수소(H_2S)와 반응하여 형광 색이 변화하는 가변색 이광자 형광 프로브 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 가변색 이광자 형광 프로브를 이용하여 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 황화수소를 이광자 현미경을 통해 정량적으로 영상화하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 황화수소(H_2S)는 생체 내에서 직접 생성되는 기체의 신호전달 물질로서 다양한 생리현상에 참여하고, 세포 면역 시스템에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 K-ATP 채널의 오픈너(opener) 역할을 하여 심혈관 시스템의 항상성에 기여하며 손상된 심혈관 근육의 치유 및 신경계의 산화 스트레스로부터의 보호 역할 등에 직접 관여하는 것으로 알려져 있어, 여러 연구 분야에서 각광을 받고 있다. 또한 인간의 혈액 내 혈장(plasma)의 황화수소 농도는 $50\sim 100\ \mu\text{M}$ 수준으로 알려져 있으므로, 황화수소의 농도 수준을 정량적으로 검출할 수 있다면 다운 증후군(down syndrome) 및 알츠하이머 병(Alzheimer's disease) 등의 진단이 가능하다. 또한 미토콘드리아 내부에는 전체 황화물의 30%가 저장되어 있고 황화수소 역시 미토콘드리아의 기능을 유지하는데 필요한 다양한 역할을 하고 있다. 그러나, 살아있는 세포 및 생체 조직 내에는 글루타티온(glutathione, GSH), 시스테인(cysteine, Cys) 등의 다량의 황화물이 존재하고 있고, 황화수소(H_2S)만을 선택적이고 정량적으로 검출하는 방법은 알려져 있지 않다. 그러므로, 황화수소에 대해 선택적인 가변색 형광 프로브를 개발하면 살아있는 세포 및 조직의 깊은 곳에서 진행되는 생물학적인 현상을 실시간으로 관찰할 수 있게 해주고, 황화수소와 관련된 생명과학 연구와 질병의 조기 진단, 진단 시약 및 치료제의 개발 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.
- [3] 현재 수많은 단일광자 형광 프로브가 개발되어 왔으나, 대부분의 단일광자 프로브의 공통적인 문제점은 그들의 짧은 여기 파장($<500\ \text{nm}$) 사용에 있다. 짧은 여기 파장은 얇은 투과 깊이($<100\ \mu\text{m}$), 광표백(photo-bleaching) 및 세포 자가 형광(auto-fluorescence) 등의 문제를 야기함으로써 조직 영상화(imaging)에 대한 적용을 제한한다. 이러한 문제에 대한 해결책으로 제시된 것이 낮은 에너지의 2개의 근적외선 광자를 이용하는 이광자 현미경(TPM)을 사용하는 방법이다. 이광자 현미경을 사용하면, 손상되지 않은 $100\ \mu\text{m}$ 깊이 이상의 생체 조직 내부를 관찰할 수 있고 장시간의 영상을 실시간으로 만들 수 있다. 그러나 생체 조직 내부에 존재하는 황화수소를 선택적으로 감지할 수 있는 이광자 가변색 형광 프로브는 전무한 상태이다.

- [4] 따라서, 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 황화수소를 선택적으로 탐지할 수 있는 이광자 가변색 형광 프로브의 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명자들은 생체 내 황화수소(H_2S)의 정량적 영상화 방법을 탐색하던 중, 생체 내 미토콘드리아 또는 세포질에 선택적으로 염색되고, 황화수소와 선택적으로 반응하여 강한 형광 변화를 나타내는 가변색 이광자 형광 프로브를 제조하였으며, 제조된 가변색 이광자 형광 프로브가 세포 및 생체 조직에서 미토콘드리아 또는 세포질 내부의 황화수소의 분포 및 활성을 정량적으로 영상화할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [6] 따라서, 본 발명은 생체 내 황화수소(H_2S)와 반응하여 형광 색이 변화하는 가변색 이광자 형광 프로브 및 이의 제조 방법을 제공하고자 한다.
- [7] 또한, 본 발명은 상기 가변색 이광자 형광 프로브를 이용하여 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 황화수소를 이광자 현미경을 통해 정량적으로 영상화하는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명은 생체 내 황화수소(H_2S)와 반응하여 형광 색이 변화하는 가변색 이광자 형광 프로브 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 가변색 이광자 형광 프로브를 이용하여 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 황화수소를 이광자 현미경을 통해 정량적으로 영상화하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명에 따른 가변색 이광자 형광 프로브는 미토콘드리아 또는 세포질에 선택적으로 염색됨과 동시에 황화수소(H_2S)와 반응하여 강한 형광 색 변화를 나타내며, 물에 대한 우수한 용해도와 작은 분자량으로 인해 세포에 쉽게 로딩될 수 있고, 60분 이상에 걸쳐 세포 및 100~200 μm 깊이의 생체 조직에서 선택적으로 황화수소를 탐지할 수 있으므로, 세포 및 생체 조직에서 미토콘드리아 또는 세포질 내부의 황화수소의 분포 및 활성을 정량적으로 영상화 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 이광자 형광 프로브(SHS-M1(a, b) 및 SHS-M2(c, d))에 대한 (a, c) 단일광자 형광 스펙트럼 및 (b, d) HPPES 완충 용액(30 mM, 100 mM KCl, pH 7.4)에서 이광자 형광 프로브 농도에 대한 형광강도를 나타내는 도이다(여기 좌장은 SHS-M1 및 SHS-M2에 대해 각각 340 및 370 nm이다).
- [12] 도 2는 1,4-디옥산(1,4-dioxane), DMF, EtOH, 및 HEPES 완충 용액 (pH 7.4)에서, (a,b) SHS-M1, (c,d) SHS-M1-1, (e,f) SHS-M2 및 (g,h) SHS-M2-2의 정규화된 흡수 (a,c,e,g) 및 방출 (b,d,f,h) 스펙트럼, 및 (d) SHS-M1-1 및 (h) SHS-M2-2로 표지된

- 헬라(HeLa) 세포로부터 얻은 이광자 여기 형광 스펙트럼 (■)을 나타내는 도이다.
- [13] 도 3은 HEPES 완충 용액(30 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.4)에서 1 μ M 의 (a) SHS-M1 및 (b) SHS-M2와 100 μ M의 Na_2S 의 반응에 따른 형광 반응을 시간(0~60분)에 따라 나타낸 그래프이며, (c) SHS-M1의 $k_{\text{obs}} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 및 (d) SHS-M2의 $k_{\text{obs}} = 9.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 는 각각 340 nm 및 373 nm 의 여기 파장을 이용하여 시간 대 $\ln[(F_{\text{max}} - F_t)/F_{\text{max}}]$ 의 플롯으로부터 계산된 기울기이며, (e) SHS-M1 및 (f) SHS-M2는 각각 Na_2S 의 농도 대 k_{obs} 를 나타내는 도이다.
- [14] 도 4는 HEPES 완충 용액 (30 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.4)에서 $[\text{Na}_2\text{S}]$ 의 농도에 따른 (a) SHS-M1 및 (b) SHS-M2의 형광 강도 비(fluorescence intensity ratio)를 나타내는 도이다. 여기서, 각 결과는 실온에서 Na_2S 첨가 후 1시간 후에 얻어졌다.
- [15] 도 5는 HEPES 완충 용액(pH 7.4)에서 1 μ M 의 (a) SHS-M1 및 (b) SHS-M2와 활성 황(RSS), 질소(RNS), 및 산소(ROS) 중, 아미노 산, 금속 이온들 및 100 μ M의 Na_2S 를 첨가한 경우 상대적인 형광 강도를 나타내는 도이다. 막대는 상기 물질을 첨가 후 각각 0, 30, 60 및 90분에서의 λ_{em} 의 방출 강도 비를 나타낸다. 여기서 (a) 340 nm 및 (b) 373 nm의 여기 파장을 이용하였다.
- [16] 도 6은 보편적인 완충 용액(0.1 M 시트로산(citric acid), 0.1 M KH_2PO_4 , 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.1 M Tris, 0.1 M KCl)에서 (a) SHS-M1 (●) 및 SHS-M1-1 (○), (b) SHS-M2 (●) 및 SHS-M2-2 (○)에 대한 pH 변화에 따른 형광 강도 비율을 나타내는 도이다.
- [17] 도 7은 (a) SHS-M2 및 (b) 마이토트랙커 레드 FM(MitoTracker Red FM)으로 표지된 헬라(HeLa) 세포의 영상을 나타내는 도이다. [(a) TPM 및 (b) OPM 영상이고, (c)는 (a) 및 (b)를 합친 영상이다. 이광자 및 단일광자 여기 파장은 각각 750 및 514 nm이었고, 상응하는 방출(emission)은 425-575 nm (SHS-M2) 및 600-700 nm (마이토트랙커 레드 FM)에서 수집되었다. 스케일 바는 30 μ m이다. 보여진 세포는 반복적인 실험(n=5)에 의한 대표 영상이다.]
- [18] 도 8은 SHS-M2의 존재 하에 SHS-M2로 2시간 동안 배양된 HeLa 세포의 생존 능력을 CCK-8 Kit로 측정한 도이다.
- [19] 도 9는 2 μ m 의 (a) SHS-M2 또는 (d) SHS-M2-2로 각각 배양된 HeLa 세포의 슈도 컬러(Pseudocolored) 가변색 이광자 영상을 나타내는 도이다. [(b, c) HeLa 세포는 SHS-M2로 표지하기 전에 30 분 동안 100 μ M의 (b) GSH 또는 (c) Cys로 전처리하였다. (e)는 (a-d)의 평균 형광강도 ($F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)를 나타낸다. 영상은 750 nm 여기를 이용해 얻어졌으며, 방출 윈도우(emission windows)는 파랑(420-470 nm), 노랑(525-575 nm)을 이용하였다. (d)에서의 스케일 바는 20 μ m이다. 보여진 세포는 반복적인 실험(n=5)에 의한 대표 영상이다.]
- [20] 도 10은 (a) 쥐의 해마절편의 CA1-CA3 구역의 밝은-필드(bright-field) 를 나타내고, SHS-M2로 표지하기 전에 1시간 동안 Cys(1 mM)로 전처리되지 않은 (b) 및 전처리된 (c), 20 μ M SHS-M2로 1 시간 동안 염색된 쥐의 해마절편 가변색 이광자 형광 영상을 나타내고, (d)는 20 μ M 화합물 SHS-M2-2로 1시간 동안

염색된 쥐의 해마절편 영상이고, (e)는 (b-d)에서의 평균 형광강도 ($F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)를 나타내는 도이다. 여기서, TPM 영상은 120 μm 깊이에서 40 배 확대하였고, 이광자 형광 방출은 펨토초(fs) 펄스와 함께 750 nm 여기 파장에서 두 개의 채널(파랑 = 425-470 nm, 노랑 = 525-575 nm)을 통해 수집되었다(스케일 바: 300 μm (a) 및 75 μm (d)).

- [21] 도 11은 CBS 발현 수준 및 황화수소(H_2S) 생성량 사이의 상관 관계를 나타내는 도이다. 여기서, (a, b) 신생아 쥐의 뇌로부터 얻은 정상세포를 각각 5일 동안 CBS-특이 siRNA (20 nM) 또는 비표적화된(NT) siRNA로 전처리하였다. (a) CBS mRNA 수준 및 (b) 단백질 수준은 각각 Q-PCR 및 Western blot을 이용하여 분석하고 정량화하였다. (c) CBS-특이 또는 NT siRNA로 처리된 정상세포를 1시간 동안 2 μM SHS-M2로 염색하였고, 영상은 750 nm 여기를 이용해 얻어졌으며, 방출 윈도우(emission windows)는 파랑(425-470 nm) 및 노랑(525-575 nm)을 이용하였다. (d) 평균 강도 비($F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)를 나타낸다. (a-b)의 수치는 3가지 시료의 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(standard error of the mean, SEM)이고, (d)에서의 수치는 3가지 시료의 평균 $\pm$ 표준 편차(standard deviation, SD)이다. 여기서, (c)에서의 스케일 바는 20 μm 이고, 세포는 반복적인 실험(n=3)에 의한 대표 영상이다.

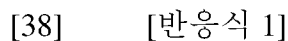
- [22] 도 12는 DJ-1-녹아웃(KO)된 정상세포에서의 약해진 황화수소(H_2S) 생성 및 CBS 발현을 나타내는 도이다. (a, b) 야생형(wild-type, WT) 및 DJ-1-녹아웃(KO)된 쥐 뇌로부터 배양된 정상세포를 1시간 동안 20 μM SHS-M2로 염색하였다. (a) 정상세포의 가변색 이광자 형광 영상은 WT 세포에 비해 KO된 정상세포에서 황화수소(H_2S) 생성이 감소되었음을 보여준다. (b) TPM 영상에서 평균 강도 비($F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)를 나타낸다. WT 및 KO된 정상세포에서의 (c) CBS mRNA 및 (d) 단백질 수준이 각각 Q-PCR 및 Western blot을 이용하여 결정되었다. (b)의 수치는 3가지 시료의 평균 $\pm$ SD이고, (c) 및 (d)에서의 수치는 3가지 시료의 평균 $\pm$ SEM이다. (a)에서의 스케일 바는 20 μm 이다.

- [23] 도 13은 DJ-1-녹아웃(KO)된 뇌에서의 약해진 황화수소(H_2S) 생성 및 CBS 발현을 나타내는 도이다. 뇌 절편은 야생형(wild-type, WT) 및 DJ-1-녹아웃(KO)된 쥐로부터 얻어졌다. (a-c) 해마절편을 준비하여 (a) GFAP 및 CBS 염색을 위해 이용하였다. (b)에서, 오른쪽 패널(panel)은 왼쪽 패널의 박스 영역(boxed area)의 고배율 영상이다. (d, e) 슬라이싱 스트레스(slicing stress)로부터 조직을 안정화시키기 위해 슬라이싱 후 외피 절편을 7일 동안 배양하였고, 그 후 황화수소 생성이 측정되었다. (c) 및 (e)의 수치는 3가지 시료의 평균 $\pm$ SD 이다 (스케일 바: (a) 30 μm , (b) 왼쪽 75 μm , 오른쪽 30 μm , (d) 75 μm).

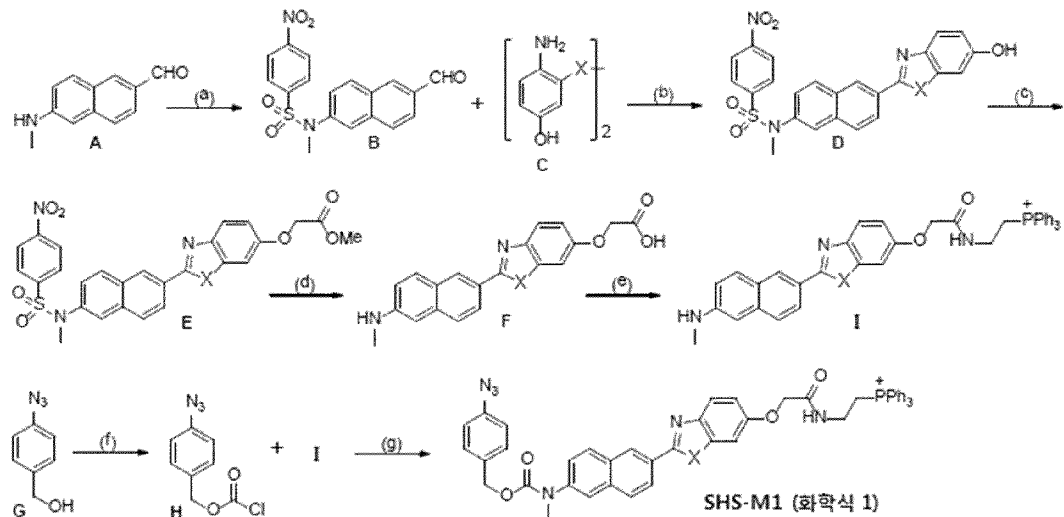
발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 본 발명은 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 생체

[26]



[39]



[40] 상기 반응식 1에서, X는 O, S 또는 Se이며, (a): 4-니트로벤젠설포닐클로라이드 (4-nitrobenzenesulfonylchloride), 피리딘 (pyridine), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 실온, 12 h, (b): *p*-TSA, DMF, 90 °C, 14 h, (c): 메틸브로모아세테이트(methyl bromoacetate), K_2CO_3 , CH_3CN , 90 °C, 18 h, (d): i): 티오펜올(thiophenol), K_2CO_3 , DMF, 실온, 3 h. ii): LiOH, THF, 실온, 6 h, (e): (2-아미노에틸)트리페닐포스포늄브로마이드((2-aminoethyl)triphenylphosphonium bromide), DCC, HOBT, CH_2Cl_2 , N_2 , 실온, 10 h (f): 트리포스젠(triphosgene), Na_2CO_3 , N_2 , 실온, 6 h이다.

[41]

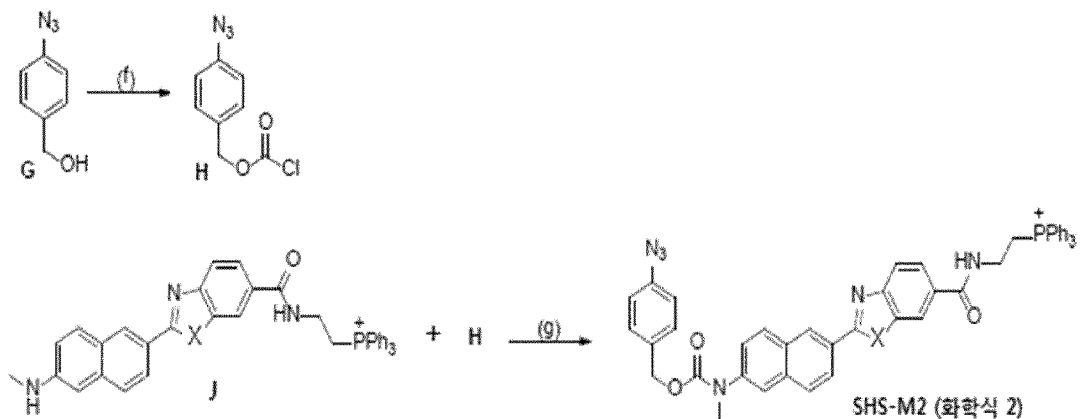
[42] 또한, 본 발명은

[43] (1') 화합물 G를 트리포스젠과 반응시켜 화합물 H를 제조하는 단계; 및

[44] (2') 화합물 H를 화합물 J와 반응시켜 화학식 2의 화합물(SHS-M2)을 제조하는 단계를 포함하며, 하기 반응식 2로 표시되는 화학식 2의 가변색 이광자 형광 프로브의 제조 방법을 제공한다.

[45] [반응식 2]

[46]

[47] 상기 반응식 2에서, X는 O, S 또는 Se이며, (f): 트리포스젠(triphosgene), Na_2CO_3

- , N₂, 실온, 6 h, (g): 피리딘(pyridine), CH₂Cl₂, N₂, 실온, 6 h이다.
- [48] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [49] 본 발명에 따른 황화수소 검출용 가변색 이광자 형광 프로브는, 이광자 형광체로 6-(benzo[d]thiazol-2'-yl)-2-(*N,N*-dimethylamino)naphthalene (BT DAN) 을 포함하고, 황화수소 수용체로 4-아지도벤질(4-azidobenzyl)을 카르바산염(carbamate) 형태로 도입한 것을 특징으로 한다.
- [50] 본 발명에 따른 가변색 이광자 형광 프로브의 제조 방법을 단계별로 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [51] 상기 반응식 1 및 2에서 화합물 A, C, G 및 J는 공지된 방법([1] *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11132., [2] *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4246. 및 [3] *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1532.)에 의해 제조될 수 있다
- [52] 상기 (1)단계는 화합물 B를 제조하는 단계로, 건조된 CH₂Cl₂에 있는 공지된 화합물 A의 현탁액에 4-니트로벤젠술폰닐클로라이드를 가하고 교반하여 생성된 조생성물을, 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색의 고체 화합물로 화합물 B를 제조한다.
- [53] 상기 (2)단계는 화합물 D를 제조하는 단계로, 화합물 B, 3,3'-디설페인디일비스(4-아미노페놀)(화합물 C) 및 *p*-TSA 를 건조된 DMF에 용해한 후, 이를 여과하여 얻은 조생성물을 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색의 고체 화합물로 화합물 D를 제조한다.
- [54] 상기 (3)단계는 화합물 E를 제조하는 단계로, 건조된 CH₃CN에 있는 화합물 D 및 K₂CO₃ 의 현탁액에 메틸브로모아세테이트를 가하고 교반하여 얻은 조생성물을, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색의 고체 화합물로 화합물 E를 제조한다.
- [55] 상기 (4)단계는 화합물 F를 제조하는 단계로, K₂CO₃의 존재 하에 건조된 DMF내 화합물 E용액에 티오페놀을 가하고 교반하여 얻은 조생성물을, 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 회색의 고체인 탈보호된 중간체를 제조한 다음, 상기 중간체를 THF에 용해한 후, LiOH 수용액으로 처리 및 교반하고, 희석된 HCl(aq)로 산성화함으로써, 짙은 갈색의 고체 화합물로 화합물 F를 제조한다.
- [56] 상기 (5)단계는 화합물 I를 제조하는 단계로, 건조된 DCM 내 화합물 F 용액에 1,3-디사이클로헥실카보디이미드 및 1-히드록시벤조트리아졸을 가하고 교반한 후, (2-아미노에틸)트리페닐포스포니움브로마이드를 가하고 교반하여 얻은 조생성물을, 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색의 고체 화합물로 화합물 I를 제조한다.
- [57] 상기 (6)단계는 화합물 H를 제조하는 단계로, Na₂CO₃ 및 트리포스젠을 감압 하에 건조 및 냉각하고, 여기에 THF를 가하고 교반한 후, 화합물 G용액을 가하고 교반하여 화합물 H를 제조한다.
- [58] 상기 (7)단계는 화합물 SHS-M1(화학식 1)를 제조하는 단계로, 화합물 I 및

피리딘의 용액에 화합물 H 용액을 가한 후 용매를 증발시켜 얻은 조생성물을, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 회색의 고체 화합물로 화학식 1의 화합물을 제조한다.

[59]

[60] 상기 (1')단계는 화합물 H를 제조하는 단계로, 상기 (6)단계와 동일한 방법으로 제조된다.

[61] 상기 (2')단계는 화합물 SHS-M2(화학식 2)를 제조하는 단계로, 상기 화합물 H 및 화합물 J의 용액에 피리딘을 가하고 교반하여 얻은 조생성물을, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색의 고체 화합물로 화학식 2의 화합물을 제조한다.

[62] 상기 제조된 가변색 이광자 형광 프로브는 HEPES 완충 용액에서 $3.0 \sim 5.0 \mu\text{M}$ 용해도를 나타내었고, 황화수소(H_2S)와 반응하여 적색 편이 현상 및 $0.2 \sim 0.4 \text{ mM}$ 의 생체 외 검출 한계를 나타내었다.

[63]

[64] 또한, 본 발명은

[65] (a) 화학식 1 내지 화학식 4로 표시되는 화합물 중 어느 하나의 가변색 이광자 형광 프로브를 생체 내에 주입하는 단계;

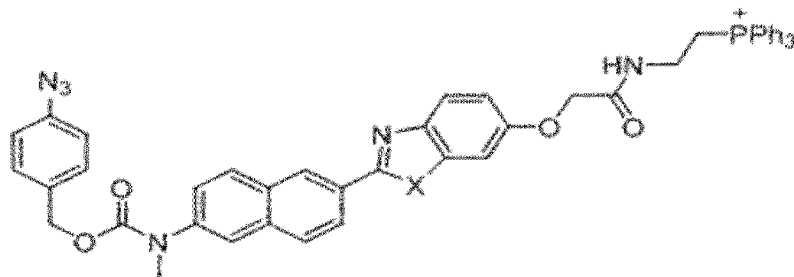
[66] (b) 상기 가변색 이광자 형광 프로브가 생체 내 황화수소와 반응하여 형광을 나타내는 단계; 및

[67] (c) 상기 형광을 가변색 이광자 현미경으로 관측하는 단계

[68] 를 포함하는, 가변색 이광자 형광 프로브를 이용한 황화수소의 영상화(imaging) 방법을 제공한다:

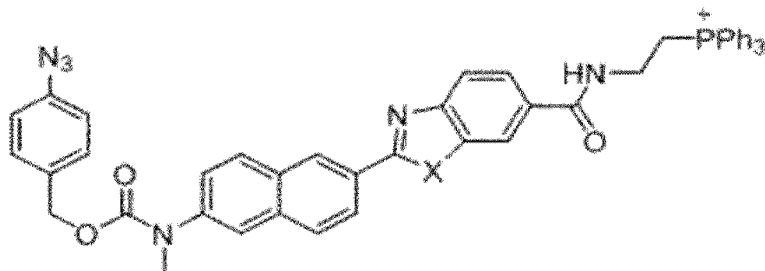
[69] [화학식 1]

[70]

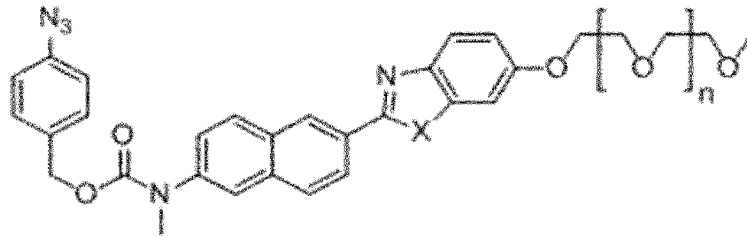


[71] [화학식 2]

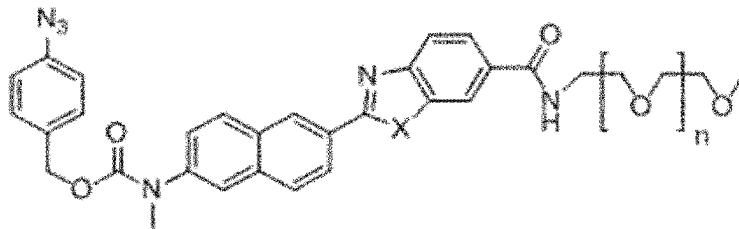
[72]



[75]



[77]



[81] 따라서, 상기 가변색 이광자 형광 프로브 중, 화학식 1 및 2로 표시되는 화합물은 세포 내 소기관 중 미토콘드리아에 선택적으로 염색되고, 화학식 3 및 4로 표시되는 화합물은 세포질에 선택적으로 염색되며, 황화수소(H_2S)와

반응하여 400 ~ 480 nm($F_{\text{파랑}}$) 및 495 ~ 575 nm($F_{\text{노랑}}$)의 파장에서 상대적 형광강도의 비율($F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)을 증가시키므로, 황화수소(H_2S)에 대한 선택성 및 활동성을 영상화시키는 형광 프로브로서 이용될 수 있다.

- [82] 상기 가변색 이광자 형광 프로브는 황화수소(H_2S)에 대하여 강한 선택성을 가지는 것을 특징으로 한다. 일 실시예에 따르면, 글루타티온(GSH), 시스테인(cys) 및 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol, 2-ME)에 비해 5 ~ 8 배 더 큰 형광 강도를 나타내며, 생물학적으로 연관된 RSS (리포 산, SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SCN), RNS (NO_2^- , NO), ROS (H_2O_2 , O_2^- , t-BuOOH, HOCl), 티올기(Ala, Glu)가 없는 아미노, 및 금속 이온들(Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+})에 대해서는 거의 형광 반응을 나타내지 않는다.

- [83] 상기 가변색 이광자 형광 프로브는 생체와 관련된 pH 범위에서 pH-미반응인 것을 특징으로 한다.

- [84] 상기과 같은 영상화 방법을 통해 미토콘드리아 또는 세포질 내에서 황화수소의 분포 및 활동성을 효과적으로 영상화할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [85] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공하는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[86]

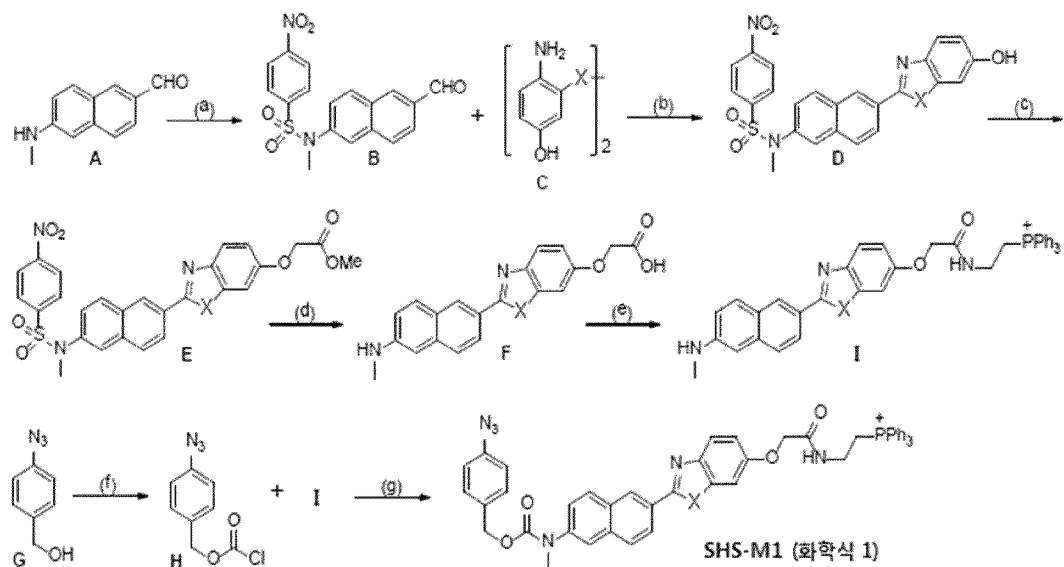
[87] 실시예 1. 가변색 이광자 형광 프로브(SHS-M1 및 SHS-M2)의 제조

- [88] 하기 반응식 1 및 2에서 화합물 A, C, G 및 J는 공지된 방법([1] *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11132., [2] *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4246. 및 [3] *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1532.)에 의해 제조되었다.

[89] 1.1 SHS-M1 (화학식 1)의 제조

[90] [반응식 1]

[91]



- [92] 상기 반응식 1에서, X는 O, S 또는 Se이고, (a): 4-니트로벤젠설포닐클로라이드(4-nitrobenzenesulfonylchloride), 피리딘(pyridine), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 실온, 12 h, (b): *p*-TSA, DMF, 90 °C, 14 h, (c): 메틸브로모아세테이트(methyl bromoacetate), K_2CO_3 , CH_3CN , 90 °C, 18 h, (d): i) 티오펜올(thiophenol), K_2CO_3 , DMF, 실온, 3 h. ii) LiOH, THF, 실온, 6 h, (e): ((2-아미노에틸)트리페닐포스포니움브로마이드((2-aminoethyl)triphenylphosphonium bromide), DCC, HOBT, CH_2Cl_2 , N_2 , 실온, 10 h (f): 트리포스젠(triphosgene), Na_2CO_3 , N_2 , 실온, 6 h이다.
- [93] **(1)화합물 B의 제조**
- [94] 피리딘(1.5 mL, 18.4 mmol) 존재 하에 건조된 CH_2Cl_2 (20 mL)에 있는 6-(메틸아미노)-2-나프탈알데하이드(6-(methylamino)-2-naphthaldehyde)(화합물 A, 1.0 g, 5.4 mmol)의 현탁액에 CH_2Cl_2 내 4-니트로벤젠설포닐클로라이드(1.50 g, 6.8 mmol) 용액을 방울 방울 가한 후, 전체 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 종결한 후, 용매를 증발시키고, NaHCO_3 수용액을 가한 다음, CH_2Cl_2 로 희석하였다. 유기 층을 추출하여 무수 Na_2SO_4 로 건조하였고, 감압 하에 농축하였다. 조생성물(crude product)을 용리제로서 CHCl_3 을 이용한 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색 고체인 화합물 B를 얻었다 (수득량: 1.7 g (85 %); m.p. 178-180°C).
- [95] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.98 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.41 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.35 (s, 3H).
- [96] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) = 191.2, 149.7, 141.5, 140.4, 135.8, 134.2, 133.3, 130.9, 130.3, 128.6, 128.5, 125.1, 124.1, 123.7, 123.5, 38.1.
- [97] **(2)화합물 D의 제조**
- [98] 화합물 B(1.6 g, 4.3 mmol), 3,3'-디설파인디일비스(4-아미노페놀)(3,3'-disulfanediyldis(4-aminophenol)(화합물 C, 1.24 g, 4.3 mmol) 및 *p*-TSA (74 mg, 0.43 mmol)를 10 mL 건조된 DMF에 용해하였다. 반응 혼합물을 90°C, 질소 분위기 하에서 14시간 동안 유지한 후, 50ml 냉각수에 부었다. 여과하여 얻은 고체 침전물을 물로 세척한 후 진공 하에 건조하였다. 조생성물을 EtOAc:헥산(3:2)을 이용한 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색 고체인 화합물 D를 얻었다(수득량: 550 mg (26 %); m.p. 250-252°C).
- [99] ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 9.1 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.21 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.1 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.27 (br s, 1H), 7.21 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.26 (s, 3H).
- [100] ^{13}C NMR NMR (d_6 -DMSO, 100 MHz): δ (ppm) = 163.6, 156.5, 150.6, 147.8, 141.7, 139.8, 136.8, 134.4, 132.3, 131.9, 130.3, 129.7, 129.6, 126.8, 126.3, 125.2, 125.1, 124.2, 117.0, 107.5, 38.9.
- [101] **(3)화합물 E의 제조**

- [102] 건조된 CH_3CN (12 mL)에 있는 화합물 D(500 mg, 1.02 mmol) 및 K_2CO_3 (423.0 mg, 3.0 mmol)의 현탁액에 메틸브로모아세테이트(0.14 mL, 1.3 mmol)를 가한 후, 반응 혼합물을 80°C 에서 18시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고, 물을 가하고, CH_2Cl_2 로 추출하였다. 유기 층을 무수 Na_2SO_4 로 건조하였고, 감압 하에 농축하였다. 조생성물을 용리제로서 EtOAc:헥산(2:3)을 이용한 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색 고체인 화합물 E를 얻었다(수득량: 510 mg (88 %); m.p. $195\text{--}197^\circ\text{C}$).
- [103] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 8.49 (s, 1H), 8.3 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.2 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.39 (bs, 1H), 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.35 (s, 3H).
- [104] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) = 169.2, 165.7, 156.1, 150.3, 149.5, 142.2, 139.4, 136.6, 134.3, 132.2, 132.0, 130.1, 129.1, 128.9, 126.9, 125.6, 125.5, 124.8, 124.3, 124.2, 116.3, 105.9, 66.2, 52.8, 38.7.
- [105] **(4)화합물 F의 제조**
- [106] (i) 화합물 E의 4-니트로벤젠술폰아마이드(4-nitrobenzenesulfonamide) 부분을 탈보호(deprotection)한 다음, 메틸아세테이트(methylacetate) 부분을 염기 촉매 가수 분해하여 화합물 F를 제조하였다. 먼저, K_2CO_3 (276.4 mg, 2.0 mmol)의 존재 하에 건조된 DMF(6 mL) 내 화합물 E(450 mg, 0.80 mmol) 용액에 교반하면서 티오펜올(0.16 mL, 1.6 mmol)을 가하였고, 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하고, 물을 가한 다음, CH_2Cl_2 로 추출하고, 유기 층을 무수 Na_2SO_4 로 건조하였다. 조생성물을 용리제로서 EtOAc:헥산(1:1)을 이용한 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 회색(off-white) 고체인 탈보호된 중간체를 얻었다(수득량: 245 mg (81 %); m.p. $138\text{--}140^\circ\text{C}$).
- [107] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 8.32 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.36 (br s, 1H), 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.9 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.78 (br s, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.1 (br s, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.97 (s, 3H).
- [108] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) = 169.3, 167.3, 155.6, 149.7, 148.4, 136.9, 136.2, 129.9, 127.4, 127.1, 126.9, 126.7, 125.0, 123.6, 118.8, 115.7, 106.0, 103.5, 66.3, 52.7, 30.9.
- [109] (ii) 상기 중간체(250 mg, 0.66 mmol)를 5 mL THF에 용해한 후, 2 mL LiOH (0.1 g, 4.1 mmol) 수용액으로 처리하였다. 반응 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 종결 후, 용매를 제거한 후, 냉각수 5mL 를 가하였고, pH = 4인 희석된 HCl (aq)로 산성화하였다. 여과하여 얻은 갈색의 침전물을 물 및 디에틸에테르로 세척한 후, 진공 하에 건조하여 짙은 갈색 고체인 화합물 F를 얻었다(수득량: 210 mg (87 %); m.p. $210\text{--}212^\circ\text{C}$).
- [110] ^1H NMR ($d_6\text{-DMSO}$, 400 MHz): δ (ppm) = 8.31 (s, 1H), 7.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H),

7.67 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.36 (br s, 1H), 4.73 (s, 2H), 2.81 (s, 3H).

[111] ^{13}C NMR (d_6 -DMSO, 100 MHz): δ (ppm) = 170.7, 166.2, 156.3, 149.7, 149.0, 137.3, 136.0, 130.1, 127.4, 126.8, 126.3, 126.1, 124.6, 123.5, 119.7, 116.4, 106.5, 102.1, 66.1, 30.3.

[112] **(5) 화합물 I의 제조**

[113] 건조된 DCM (10 mL) 내 화합물 F(200 mg, 0.55 mmol) 용액에 교반하면서 1,3-디사이클로헥실카보디이미드(1,3-dicyclohexyl carbodiimide) (284 mg, 1.4 mmol), 및 1-히드록시벤조트리아졸 (1-hydroxybenzotriazole)을 가한 후, 반응 혼합물을 질소 분위기 하에서 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 (2-아미노에틸)트리페닐포스포니움브로마이드((2-aminoethyl)triphenylphosphonium bromide) (220 mg, 0.57 mmol)를 가하고, 10시간 동안 계속해서 교반하였다. 용매를 증발시키고, 조생성물을 CH_3CN 에 용해하였다. 침전물인 디사이클로헥실우레아(dicyclohexylurea)을 여과하여 제거한 후, 여과액을 감압 하에 농축하였다. 조생성물을 용리제로서 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1)을 이용한 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색 고체인 화합물 I을 얻었다(수득량: 280 mg (70 %); m.p. 125-127°C).

[114] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 9.18 (br t, $J = 5.6$ Hz, 1H, amide-NH), 8.31 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.86-7.61 (m, 17 H), 7.49 (br s, 1H), 7.3 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.02-3.97 (m, 2H), 3.94-3.88 (m, 2H), 2.97 (s, 3H).

[115] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) = 168.9, 166.9, 155.3, 149.3, 148.7, 136.8, 135.9, 135.4, 133.3, 133.7, 133.6, 130.7, 130.5, 129.7, 127.2, 126.7, 126.6, 126.5, 124.7, 123.3, 119.1, 118.1, 117.2, 116.1, 106.2, 102.9, 67.4, 36.9, 33.3, 30.7, 23.0.

[116] **(6) 화합물 H의 제조**

[117] Na_2CO_3 (2.5 g, 23 mmol) 및 트리포스젠 (994 mg, 3.4 mmol)을 둥근-바닥 플라스크에서 감압 하에 건조하였다. 플라스크를 얼음 욕조(ice bath)에서 냉각한 후, THF (15 mL)을 가하였다. 암실의 질소 분위기 하에서 0°C, 1시간 동안 교반한 후, 건조된 THF (15 mL)에 있는 화합물 G(1.0 g, 6.7 mmol) 용액을 방울 방울 가하고, 실온에서 6시간 동안 추가적으로 교반하였다. 반응이 종결된 후, 용매를 감압 하에 제거하고, 생성된 화합물 H를 추가적인 정제 없이 다음 단계에 이용하였다.

[118] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.26 (s, 2H)

[119] **(7) 화합물 SHS-M1 (화학식 1)의 제조**

[120] 건조된 CH_2Cl_2 (10 mL) 내 화합물 I(100 mg, 0.14 mmol) 및 피리딘(0.1 mL, 1.2 mmol)의 용액에 CH_2Cl_2 (10 mL) 내 화합물 H(29 mg, 0.14 mmol) 용액을 방울 방울 가하고, 반응 혼합물을 질소 분위기 하에서 실온에서 6시간 동안 유지하였다.

용매를 증발시키고, 조생성물을 용리제로서 CHCl_3 내 CH_3OH (8%)을 이용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 회색 고체인 최종 화합물 SHS-M1을 얻었다(수득량: 80 mg (65 %); m.p. 135-137°C).

[121] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 9.35 (br t, J = 5.8 Hz, 1H, amide-NH), 8.46 (s, 1H), 8.17 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.86-7.76 (m, 11H), 7.71-7.66 (m, 7H), 7.6 (br s, 1H), 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.96-3.90 (m, 2H), 3.43 (s, 3H).

[122] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) = 168.9, 165.8, 155.8, 155.4, 149.3, 142.0, 139.9, 136.3, 135.4, 134.6, 133.8, 133.7, 133.2, 131.3, 131.2, 130.7, 130.6, 129.7, 129.4, 128.6, 126.8, 124.9, 125.0, 123.8, 119.2, 118.2, 117.4, 116.5, 106.2, 67.3, 67.2, 38.1, 33.3, 31.9, 23.0.

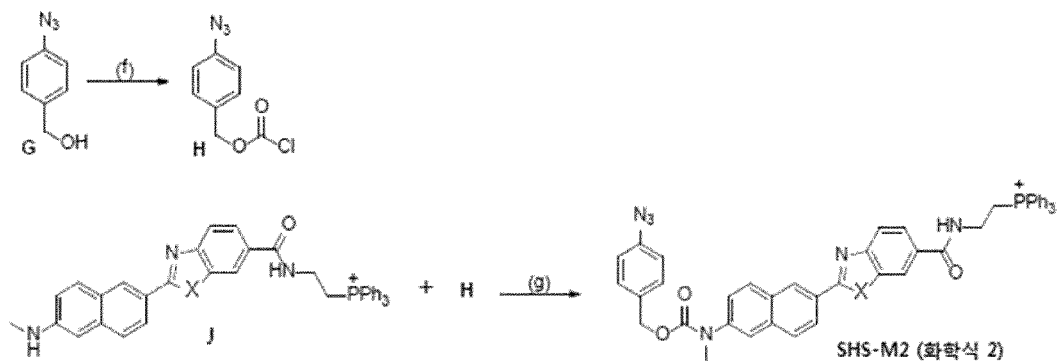
[123] HRMS (FAB⁺): (m/z, %) calculated for $[\text{C}_{48}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_4\text{PS}]^+$ was 827.2569; found 827.2579.

[124]

[125] **1.2 SHS-M2 (화학식 2)의 제조**

[126] [반응식 2]

[127]



[128] 상기 반응식 2에서, X는 O, S 또는 Se이고, (f): 트리포스젠(triphosgene), Na_2CO_3 , N_2 , 실온, 6 h, (g): 피리딘(pyridine), CH_2Cl_2 , N_2 , 실온, 6 h이다.

[129] 15 mL 건조된 CH_2Cl_2 내 화합물 H(30 mg, 0.142 mmol) 및 화합물 J(100 mg, 0.142 mmol)의 용액에 교반하면서 건조된 피리딘 (0.15 mL, 1.86 mmol)을 가하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기 하에서 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후에, 용매를 증발시키고, 조생성물을 용리제로서 디에틸에테르에 있는 CH_3OH (15%)을 이용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제함으로써 노란색 고체인 화합물 SHS-M2을 얻었다(수득량: 93 mg (81 %); m.p. 159-161°C).

[130] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.94 (br t, 1H, amide-NH), 8.71 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.23-8.19 (m, 2H), 8.08 (d, J = 8.4, 1H), 7.94 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.88-7.64 (m, 17H), 7.47 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.05-4.02 (m, 4H), 3.43 (s, 3H).

[131] ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 173.4, 169.9, 159.2, 158.3, 145.3, 138.2, 138.0, 137.9, 136.8, 136.7, 136.2, 134.3, 134.0, 133.6, 133.5, 133.2, 132.7, 132.6, 131.6, 130.5, 129.4, 128.2, 125.8, 125.2, 122.2, 121.5, 120.7, 70.2, 41.1, 37.2, 33.0.

[132] HRMS (FAB+): (m/z, %): calculated for $[\text{C}_{47}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_3\text{PS}]^+$ was 797.2464; found 797.2465.

[133]

[134] **실험예 1. HEPES 완충 용액에서의 용해도 측정**

[135] 본 발명에 따른 실시예 1의 이광자 형광 프로브(SHS-M1 및 SHS-M2)의 소량을 DMSO에 용해하여 저장액 (1.0×10^{-2} M)을 준비하였다. 이후 상기 용액을 1.0×10^{-5} 내지 5.0×10^{-8} M로 희석시키고, 마이크로 주사기를 이용하여, 2.0 mL의 HEPES 완충 용액 (30 mM, 100 mM KCl, pH 7.4)을 함유하는 큐벳(cuvette)에 첨가하였다. 모든 경우, 물에서의 DMSO 농도는 0.2 %를 유지하였다.

[136] 이광자 형광 프로브(SHS-M1(a, b) 및 SHS-M2(c, d))에 대한 (a, c) 단일광자 형광 스펙트럼 및 (b, d) HEPES 완충 용액(30 mM, 100 mM KCl, pH 7.4)에서의 이광자 형광 프로브의 농도에 따른 형광 강도를 도 1에 나타내었다.

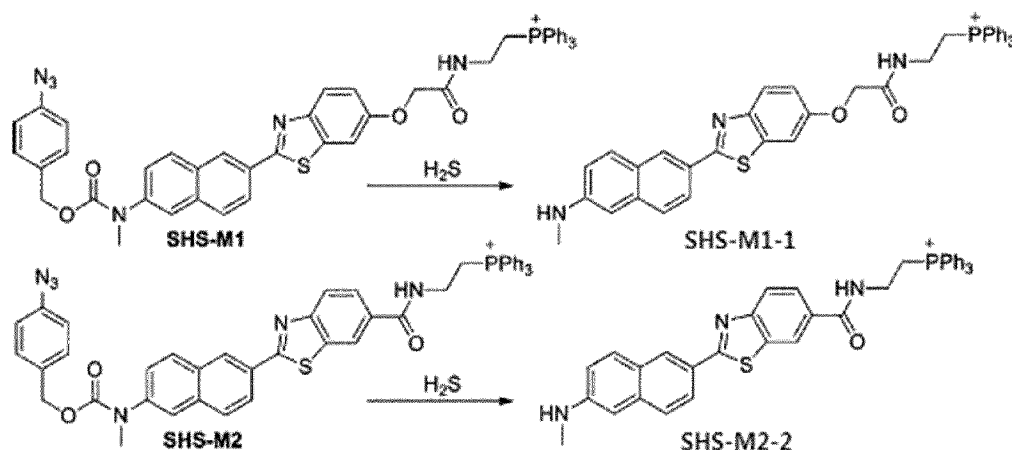
[137] 도 1에 나타난 바와 같이, 이광자 형광 프로브의 농도에 따른 형광 강도는 저농도에서 선형을 나타내지만, 고농도로 갈수록 아래쪽으로 떨어지는 곡선을 나타내었다. 이 경우 이광자 형광 프로브의 용해도는 선형 패턴을 나타내는 최고 농도로 결정된다. HEPES 완충 용액에서 SHS-M1 및 SHS-M2는 ~ 3.0 및 $5.0 \mu\text{M}$ 용해도를 나타내었고 세포 염색에 있어서 매우 효과적임을 보여주었다.

[138]

[139] **실험예 2. 광물리적 특성**

[140] [반응식 3]

[141]



[142] 상기 반응식 3에서, SHS-M1 및 SHS-M2로부터 아지드(azide) 그룹을 가진 티올레이트(thiolate)-동기화된 반응이 카바메이트(carbamate) 결합을 깨고 아미노 그룹을 방출하여 상기 화합물 SHS-M1-1 및 SHS-M2-2가 생성된다. 이광자 형광 프로브(SHS-M1 및 SHS-M2)와 상기 SHS-M1-1 및 SHS-M2-2의

광물리적 특성을 표 1에 나타내었다.

[143] 표 1

[Table 1]

구분 ^a	λ_{abs} ($10^{-4}\epsilon$) ^b	λ_{fl} ^c	Φ ^d	$\lambda_{\text{max}}^{(2)\text{e}}$	$\Phi\delta_{\text{max}}^{\text{f}}$
SHS-M1	340 (1.9)	420	0.23 (0.41)	750	14 (32)
SHS-M1-1	365 (1.8)	500	0.50 (1.00)	750	63 (76)
SHS-M2	343 (1.4)	464	0.24 (1.00)	740	17 (60)
SHS-M2-2	383 (1.5)	545	0.12 (1.00)	750	55 (177)

[144] [a] 모든 측정은 HEPES 완충 용액(30 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.4)에서 실시하였다.

[145] [b] 단일광자 흡수 스펙트럼의 λ_{max} 값으로 단위는 nm이다. 괄호 안의 숫자는 몰 흡광 계수로 $10^4 \times \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 단위이다.

[146] [c] 단일광자 방출 스펙트럼의 λ_{max} 값으로 단위는 nm이다

[147] [d] 형광 양자 수율(fluorescence quantum yield), $\pm 15\%$. 괄호 안의 숫자는 EtOH에서 측정되었다.

[148] [e] 이광자 여기 스펙트럼의 λ_{max} 값으로 단위는 nm이다

[149] [f] 광자당 피크 이광자 동작 단면적(two photon action cross-section))으로 GM의 단위를 가진다($1\text{GM} = 10^{-50} \text{cm}^4 \text{s photon}^{-1}$), $\pm 15\%$. 괄호 안의 숫자는 EtOH에서 측정되었다.

[150] 표 1에 나타난 바와 같이, SHS-M1 및 SHS-M2의 λ_{abs} 값은 거의 같으나, SHS-M2-2는 강한 전자를 끄는 기(electron-withdrawing group)를 가지므로, SHS-M1-1에 비해 약 18nm 적색-편이하였음을 알 수 있다. 또한, SHS-M2 및 SHS-M2-2는 전하-전달 자극 상태(charge-transfer excited state)의 더 큰 안정성으로 인해 SHS-M1 및 SHS-M1-1에 비해 더 큰 스토크스 이동(stokes shift)이 관찰된다.

[151] 1,4-디옥산(1,4-dioxane), DMF, EtOH, 및 HEPES 완충용액 (pH 7.4)에서, (a,b) SHS-M1, (c,d) SHS-M1-1, (e,f) SHS-M2 및 (g,h) SHS-M2-2의 정규화된 흡수 (a,c,e,g) 및 방출 (b,d,f,h) 스펙트럼 및 (d)SHS-M1-1 및 (h)SHS-M2-2로 표시된 HeLa 세포로부터 얻은 이광자 여기 형광 스펙트럼 (■)을 도 2에 나타내었다.

[152] 도 2에 나타난 바와 같이, 용매 극성을 증가시키에 따라, SHS-M1-1 및 SHS-M2-2의 방출 스펙트럼은 SHS-M1 및 SHS-M2의 방출 스펙트럼보다 더 큰 적색-편이를 나타내었다. 또한, 헬라 세포(HeLa cell)에서 측정된 SHS-M1-1 및 SHS-M2-2의 이광자-여기 형광 스펙트럼은 에탄올(EtOH)에서 측정된 것과 유사하였고, 이것은 에탄올이 세포 환경(cellar environment)의 극성을 적절히

대변함을 나타낸다.

[153] HEPES 완충 용액(30 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.4)에서 1 μ M의 (a) SHS-M1 및 (b) SHS-M2와 100 μ M의 Na₂S의 형광 반응을 시간(0~60분)에 따라 도 3에 나타내었다.

[154] 도 3(a)에 나타난 바와 같이, SHS-M1와 Na₂S의 반응은 420 nm의 파장의 강도를 감소시키는 반면, 500 nm의 파장의 강도를 점점 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 유사하게, 도 3(b)에 나타난 바와 같이, SHS-M2와 Na₂S의 반응은 464 nm의 파장의 강도를 감소시키는 반면, 545 nm의 파장의 강도를 점점 증가시키는 것으로 나타났다. 상기 반응은 SHS-M1 및 SHS-M2에 대해 각각 $k_{\text{obs}} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 및 $k_{\text{obs}} = 9.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 를 갖는 유사 1차 반응 속도론(pseudo-first order kinetics)을 따른다. 또한 [Na₂S]의 농도 대 k_{obs} 의 플롯은 선형의 기울기를 나타내었고, 상기 반응이 SHS-M1 및 SHS-M2에 대해 각각 $k_2 = 5.8$ 및 $7.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 갖는 전체 2차(overall second order) 반응임을 나타내었다.

[155] HEPES 완충 용액 (30 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.4)에서 [Na₂S]의 농도에 따른 (a) SHS-M1 및 (b) SHS-M2의 형광 강도 비율을 도 4에 나타내었다.

[156] 도 4에 나타난 바와 같이, (a) SHS-M1 및 (b) SHS-M2의 H₂S에 대한 생체 외(in vitro) 검출 한계는 각각 0.2 및 0.4 μ M인 것으로 나타났다.

[157]

[158] 실험예 3. 이광자 형광 프로브의 황화수소에 대한 선택성

[159] HEPES 완충 용액(pH 7.4)에서 1 μ M의 (a) SHS-M1 및 (b) SHS-M2와 활성 황(RSS), 질소(RNS), 및 산소(ROS) 중, 아미노 산, 금속 이온들 및 100 μ M의 Na₂S를 첨가한 경우의 상대적인 형광 강도를 도 5에 나타내었다. 막대는 상기 물질을 첨가 후 각각 0, 30, 60 및 90분에서의 λ_{fl} 의 방출 강도의 비율을 나타낸다.

[160] 도 5에 나타난 바와 같이, SHS-M1 및 SHS-M2는 생물학적으로 연관된 활성 황(RSS), 질소(RNS), 및 산소(ROS) 중에 비해 H₂S에 대한 높은 선택도를 나타내었다. 또한, 두 이광자 형광 프로브 모두, 10mM 글루타티온(GSH), 1 mM 시스테인(cys) 및 1 mM 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol, 2-ME)에 비해 H₂S에 대해 5 ~ 8 배 더 큰 형광 강도를 나타내었다. 더욱이 두 이광자 형광 프로브 모두, GSH(10 mM) 또는 Cys(1 mM) 존재 하에 100 μ M의 Na₂S를 첨가한 경우도 강한 형광 반응을 나타내었고, GSH 및 Cys에 대한 H₂S의 높은 선택도를 보여주었다. 다른 생물학적으로 연관된 RSS (리포 산, SO₃²⁻, S₂O₃²⁻, SCN⁻), RNS (NO₂⁻, NO), ROS (H₂O₂, O₂⁻, t-BuOOH, HOCl), 티올기(Ala, Glu)가 없는 아미노, 및 금속 이온들(Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Mg²⁺)은 무시할 만한 형광 반응을 나타내었다. 보편적인 완충 용액(0.1 M 시트로산(citric acid), 0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂B₄O₇, 0.1 M Tris, 0.1 M KCl)에서 (a) SHS-M1 (●) 및 SHS-M1-1 (○), 및 (b) SHS-M2 (●) 및 SHS-M2-2 (○)에 대한 pH 변화에 따른 형광 변화를 도 6에 나타내었다.

[161] 도 6에 나타난 바와 같이, 이광자 형광 프로브(SHS-M1 및 SHS-M2)는 생물학적으로 연관된 pH 범위에서 높은 형광 강도를 나타내며, pH 조건에 따라

영향 받지 않음을 나타내었다.

- [162] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 이광자 형광 프로브는 생물학적으로 연관된 다른 종 및 pH 조건에 거의 영향 받지 않고, 생체 내 황화물(sulfide)를 검출하는데 매우 유용하다는 것을 알 수 있다.

[163]

[164] **실험예 4. 이광자 형광 프로브(SHS-M2)의 미토콘드리아 선택성**

- [165] 본 발명의 이광자 형광 프로브가 미토콘드리아에 특이한 선택성을 나타내는지 확인하기 위해, SHS-M2와 마이토틱렉커레드(MTR)를 이용하여 동시국소화(Co-localization) 실험을 실시하였다.

- [166] (a) SHS-M2 및 (b) 마이토틱렉커 레드 FM(MitoTracker Red FM)으로 표지된 HeLa 세포의 영상을 도 7에 나타내었다 [(a) TPM, (b) OPM 영상이고, (c)는 (a)와 (b)의 합친 영상이다].

- [167] 도 7에 나타난 바와 같이, 이광자 형광 프로브(SHS-M2)에 의해 염색된 도 7(a)에 나타난 강한 녹색 형광 영상이 실제 미토콘드리아를 영상화하는지를 확인하기 위하여, 헬라(HeLa) 세포를 종래의 알려진 미토콘드리아용 단일광자 형광 표지자인 마이토틱렉커레드(Mito TrackerRed, Invitrogen 사 제품)로 염색하여 단일광자 적색 형광 영상을 얻은 후(도 7(b)), 얻어진 두 영상을 함께 중첩시켰다(도 7(c)). 도 7(c)에 나타난 바와 같이, 두 염료로 염색한 후 얻어진 영상, 도 7(a)와 (b)는 서로 일치하는 것을 확인할 수 있으며, 또한 Autoquant X2 software에 의한 SHS-M2와 마이토틱렉커의 피어슨의 동시국소화(Pearson's colocalization) 효율은 0.85로 나타나, SHS-M2가 미토콘드리아에 우세하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과를 통해 본 발명에 따른 이광자 형광 프로브(SHS-M2)가 미토콘드리아를 정확하게 영상화하는 것을 확인할 수 있었다.

[168]

[169] **실험예 5. 세포 독성 측정**

- [170] 본 발명의 이광자 형광 프로브가 세포에 독성을 나타내지 않는다는 사실을 확인하기 위하여, HeLa 세포에서 CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, Dojindo, 일본)를 사용하여, 매뉴얼의 프로토콜에 따라 측정하였다. SHS-M2의 존재 하에 SHS-M2로 2시간 동안 배양된 헬라(HeLa) 세포의 생존 능력을 CCK-8 Kit로 측정하여 도 8에 나타내었다.

- [171] 도 8에 나타난 바와 같이, SHS-M2는 낮은 세포 독성(cytotoxicity)을 나타내었고, 살아있는 세포 내의 황화수소를 감지하기 적합하다는 것을 확인할 수 있었다.

[172]

[173] **실험예 6. 이광자 형광 프로브를 이용한 미토콘드리아 내 황화수소의 검출**

- [174] 살아있는 세포 및 조직에서 본 발명의 이광자 형광 프로브가 미토콘드리아 내 황화수소의 변화를 탐지할 수 있는지를 확인하기 위해 시험하였다. 2 μ m 의 (a) SHS-M2 또는 (d) SHS-M2-2로 각각 배양된 HeLa 세포의 슈도

컬러(pseudocolored) 가변색 이광자 영상을 도 9에 나타내었다. 여기서, (b, c) HeLa 세포는 SHS-M2로 표지하기 전에 30 분 동안 100 μ M의 (b) GSH 또는 (c) Cys로 전처리하였고, (e)는 (a-d)의 평균 형광강도 ($F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)를 나타낸다.

[175] 도 9(a), (d) 및 (e)에 나타난 바와 같이, 750 nm 이광자 여기(TP excitation) 상태에서, SHS-M2 및 SHS-M2-2로 표지된 HeLa 세포의 평균 방출비(emission ratio, $F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)는 각각 0.49 및 1.00을 나타내었다.

[176] 또한, 도 9(b), (c) 및 (e)에 나타난 바와 같이, H_2S 의 전구체(precursor)인 GSH 또는 Cys를 첨가한 경우, HeLa 세포의 평균 방출비($F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$)는 0.49로부터 0.76 또는 0.81로 증가하였다.

[177]

[178] 실험예 7. 이광자 형광 프로브 및 이광자 현미경을 통한 쥐의 해마절편 내부영상

[179] 쥐 해마절편에서 이광자 형광 프로브(SHS-M2)의 유용성을 시험하였다. 시스테인(Cys)으로 전처리한 후, SHS-M2로 염색한 쥐의 해마절편의 가변색 이광자 형광 영상을 도 10에 나타내었다.

[180] 도 10(a)에 나타난 바와 같이, 쥐의 해마절편에 대한 밝은-필드(bright-field) 영상을 얻었으며, 이를 CA1 및 CA3 구역에 나타내었다. 뇌 조직의 구조는 모든 깊이에서 불균질하므로, 약 90-180 μ m 깊이의 두께에서 10개의 TPM 영상을 얻었고, 이를 결합하여 전체적인 황화수소 분포를 영상화하였다. 상기 영상을 통해 황화수소는 CA1 및 CA3 영역 모두에서 고르게 분포되어 있지 않음을 확인하였다.

[181] 도 10(b) 및 (c)에 나타난 바와 같이, 고배율 영상은 CA1 구역에 존재하는 각각의 세포에서 120 μ m 깊이에서 0.51의 평균 방출비를 가지는 황화수소의 분포를 명확하게 나타내었다.

[182] 도 10(c) 및 (e)에 나타난 바와 같이, 조직을 1 mM의 Cys으로 50 분간 처리하는 경우, 상기 비율이 0.80까지 증가하였다.

[183] 상기 결과는 본 발명의 이광자 형광 프로브(SHS-M2)가 살아있는 세포 및 100 μ m 깊이 이상의 조직 내에서 황화수소를 탐지할 수 있음을 뒷받침해 준다.

[184]

[185] 실험예 8. 이광자 형광 프로브를 이용한 배양된 성상세포 내 황화수소의 검출

[186] 본 발명에서는 시스타티오닌 β -신타아제(cystathionine β -synthase, CBS)의 서로 다른 수준(level)에서 생성된 성상세포(astrocytes) 내 황화수소(H_2S)의 수준을 이광자 형광 프로브(SHS-M2)로 측정하였다. CBS는 황화수소(H_2S) 생성을 촉진시키는 주요 효소이고, 성상세포는 CBS를 발현하여 뇌에 황화수소(H_2S)를 생성하는 것으로 알려져 있다[J. Neurosci. 1996, 16, 1066., Neurobiol. Aging 2009, 30, 1523., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 293, 1485.].

[187] 본 발명에서는 CBS siRNA (5'-CCC AAA AUU UUA CCA GAU AUU CUU U-3')를 이용하여 성상세포로부터 CBS를 녹아웃(knocked out, KO)시켰다. 5일

동안, CBS siRNA로 전처리된 정상세포는 비표적화된(nontargeted, NT) siRNA (5'-CCU CGU GCC GUU CCA UCA GGU AGU U-3')로 전처리된 세포에 비해 상당히 감소된 CBS mRNA 및 CBS 단백질 수준을 나타내었다. CBS 발현 수준 및 황화수소(H_2S) 생성량 사이의 상관 관계를 도 11에 나타내었다.

- [188] 도 11(c) 및 (d)에 나타난 바와 같이, NT-siRNA 및 CBS siRNA로 각각 전처리한 경우, SHS-M2로 표지된 정상세포의 $F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$ 비는 0.66으로부터 0.56까지 감소하였고, 이것은 황화수소(H_2S) 수준의 평행한 감소를 나타낸다. 상기 결과는 이광자 형광프로브(SHS-M2)를 이용하여, 정상세포 내 CBS 발현 수준 및 황화수소(H_2S) 수준 사이의 관계를 확인할 수 있음을 보여준다.

[189]

[190] 실험예 9. 이광자 형광 프로브를 이용한 DJ-1-부족한 정상세포 및 뇌 절편 내 황화수소의 검출

- [191] 이광자 형광 프로브(SHS-M2)를 이용하여, DJ-1-부족한 정상세포 및 쥐의 뇌 절편에서 내성(endogenous) 황화수소(H_2S)의 수준을 측정하였다. DJ-1은 여러 기능을 가진 PD(parkinson's disease)-관련 유전자로, 정상세포에서 항염증 및 항산화 효과가 있다고 알려져 있다(FASEB J. 2009, 23, 2478., J. Neural Transm. 2010, 117, 599., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005, 102, 9691. 및 J. Biol. Chem. 2011, 286, 35308.). 황화수소 또한, 항염증 및 항산화 효과를 가지고 있기 때문에, DJ-1이 황화수소 생성을 조절할 수 있는지를 확인하는 것은 흥미로운 일이다. DJ-1-녹아웃(KO)된 정상세포에서의 약해진 황화수소(H_2S) 생성 및 CBS 발현을 도 12에 나타내었다.

- [192] 도 12(a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 정상세포의 가변색 이광자 형광 영상은 야생형(wild type, WT) 세포에 비해 녹아웃(KO)된 정상세포에서 황화수소(H_2S) 생성이 감소되었음을 나타내었고, DJ-1-녹아웃(KO)된 정상세포내의 $F_{\text{노랑}}/F_{\text{파랑}}$ 비는 야생형(WT) 정상세포에 비해 0.71로부터 0.46까지 감소하였다. 상기 결과는 내생 황화수소 수준의 평행한 감소를 나타낸다.

- [193] 또한, 도 12(c) 및 (d)에 나타난 바와 같이, CBS mRNA 및 CBS 단백질 수준은 야생형(WT) 정상세포에 비해 DJ-1-녹아웃(KO)된 정상세포에서 상당히 감소하였다. 상기 결과는 CBS 발현 수준 및 내생 황화수소 수준의 평행한 감소를 명확하게 나타낸다.

- [194] 본 발명에서는 또한, 야생형(WT) 및 DJ-1-녹아웃(KO)된 뇌 절편에서의 CBS 발현 및 황화수소 생성 사이의 관계를 조사하였다. 절편은 야생형(WT) 및 DJ-1-녹아웃(KO)된 뇌 해마로부터 준비되었고, 각각 GFAP (정상세포 마커) 및 CBS에 대한 특정 항체를 가지고 두 번 염색하였다. DJ-1-녹아웃(KO)된 뇌에서의 약해진 황화수소(H_2S) 생성 및 CBS 발현을 도 13에 나타내었다.

- [195] 도 13(a)에 나타난 바와 같이, CBS는 GFAP-양성 정상세포에서 검출되었고, CBS의 발현은 DJ-1-녹아웃(KO)된 정상세포에서 상당히 감소하였다.

- [196] 도 13(b) 및 (c)에 나타난 바와 같이, 황화수소는 또한 정상세포

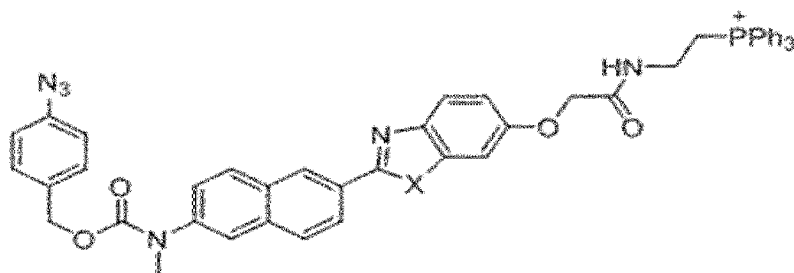
형태(morphology)를 가지는 세포에서 검출되었고, 야생형(WT) 절편에 비해 DJ-1-녹아웃(KO)된 절편에서 상당히 감소하였다. 본 시험에서는 슬라이싱 스트레스(slicing stress)로부터 조직을 안정화시키기 위해 절편(slicing)한지 7일 후의 외피 절편(cortical slices)에서 황화수소 생성을 분석하였다.

- [197] 도 13(d) 및 (e)에 나타난 바와 같이, SHS-M2 표지된 조직의 가변색 형광 영상은 DJ-1-녹아웃(KO)된 외피 절편에서 감소된 황화수소(H_2S) 수준을 나타내었다. 상기 결과는 이광자 형광 프로브(SHS-M2)를 이용한 가변색 영상이 CBS 발현의 다른 수준으로부터 생성된 황화수소(H_2S)의 다른 수준을 측정하는데 있어서 효과적인 도구임을 나타낸다.

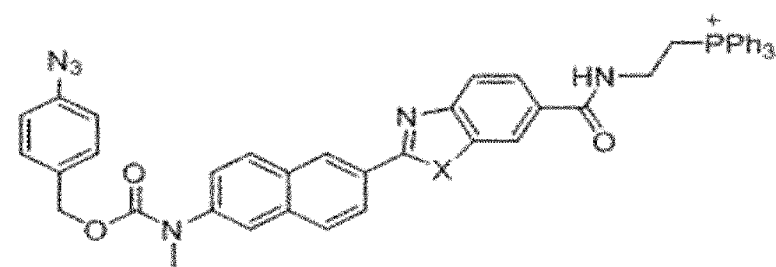
청구범위

[청구항 1]

하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 생체 내의 황화수소(H_2S) 검출을 위한 가변색 이광자 형광 프로브:
[화학식 1]



[화학식 2]

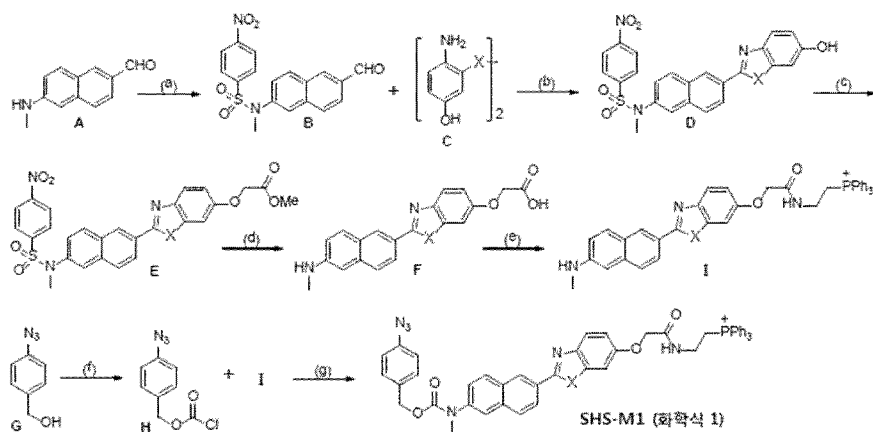


[청구항 2]

상기 화학식 1 및 2에서, X는 O, S 또는 Se이다.

- (1) 6-(메틸아미노)-2-나프탈알데하이드(화합물 A)와 4-니트로벤젠술포닐 클로라이드를 반응시켜 화합물 B를 제조하는 단계;
- (2) 상기 화합물 B와 3,3'-디설펜디일비스(4-아미노페놀)(화합물 C)를 반응시켜 화합물 D를 제조하는 단계;
- (3) 상기 화합물 D와 메틸브로모아세테이트를 반응시켜 화합물 E를 제조하는 단계;
- (4) 상기 화합물 E에 티오펜올을 가하고 반응시킨 후, 수산화리튬(LiOH) 수용액을 가하여 반응시켜 화합물 F를 제조하는 단계;
- (5) 상기 화합물 F를 1,3-디사이클로헥실카보디이미드(DCC)/1-히드록시벤조트리아졸 및 (2-아미노에틸)트리페닐포스포니움브로마이드와 반응시켜 화합물 I를 제조하는 단계;
- (6) 화합물 G를 트리포스젠과 반응시켜 화합물 H를 제조하는 단계; 및
- (7) 상기 화합물 I와 화합물 H를 반응시켜 화학식 1의 화합물(SHS-M1)을 제조하는 단계를 포함하며, 하기 반응식 1로 표시되는 화학식 1의 가변색 이광자 형광 프로브의 제조 방법:

[반응식 1]



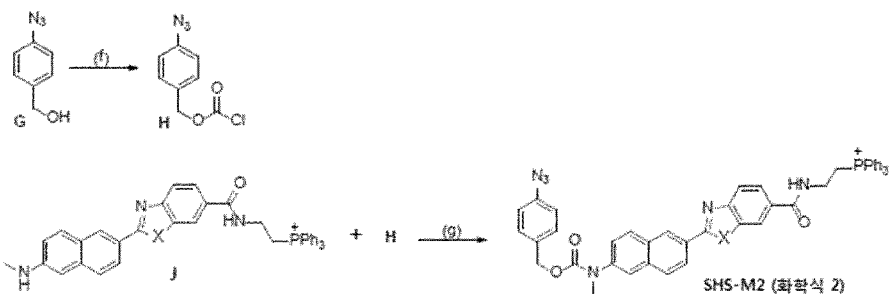
상기 반응식 1에서, X는 O, S 또는 Se이고, (a):

4-니트로벤젠술포닐클로라이드(4-nitrobenzenesulfonylchloride), 피리딘 (pyridine), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 실온, 12 h, (b): *p*-TSA, DMF, 90 °C, 14 h, (c): 메틸브로모아세트레이트(methyl bromoacetate), K_2CO_3 , CH_3CN , 90 °C, 18 h, (d): i): 티오펜올(thiophenol), K_2CO_3 , DMF, 실온, 3 h. ii): LiOH, THF, 실온, 6 h, (e): (2-아미노에틸)트리페닐포스포니움브로마이드 ((2-aminoethyl)triphenylphosphonium bromide), DCC, HOBT, CH_2Cl_2 , N_2 , 실온, 10 h (f): 트리포스젠(triphosgene), Na_2CO_3 , N_2 , 실온, 6 h이다.

[청구항 3]

(1') 화합물 G를 트리포스젠과 반응시켜 화합물 H를 제조하는 단계; 및
(2') 화합물 H를 화합물 J와 반응시켜 화학식 2의 화합물(SHS-M2)을 제조하는 단계를 포함하며, 하기 반응식 2로 표시되는 화학식 2의 가변색 이광자 형광 프로브의 제조 방법:

[반응식 2]



상기 반응식 2에서, X는 O, S 또는 Se이고, (f):

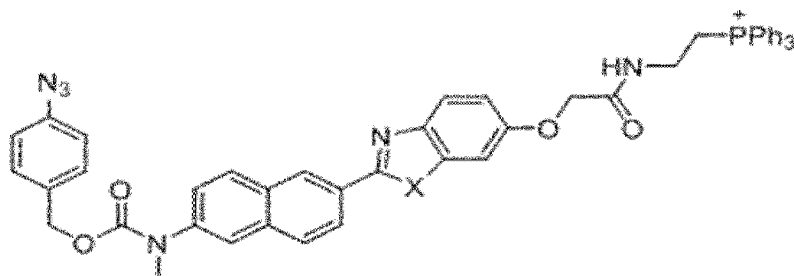
트리포스젠(triphosgene), Na_2CO_3 , N_2 , 실온, 6 h, (g):

피리딘(pyridine), CH_2Cl_2 , N_2 , 실온, 6 h이다.

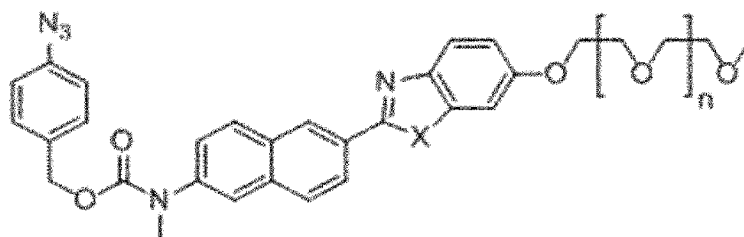
[청구항 4]

(a) 화학식 1 내지 화학식 4로 표시되는 화합물 중 어느 하나의

[화학식 1]

CN(C)C(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(cc2)C3=C(NC(=O)NCC[P+](c4ccccc4)c4ccccc4)c4ccccc34

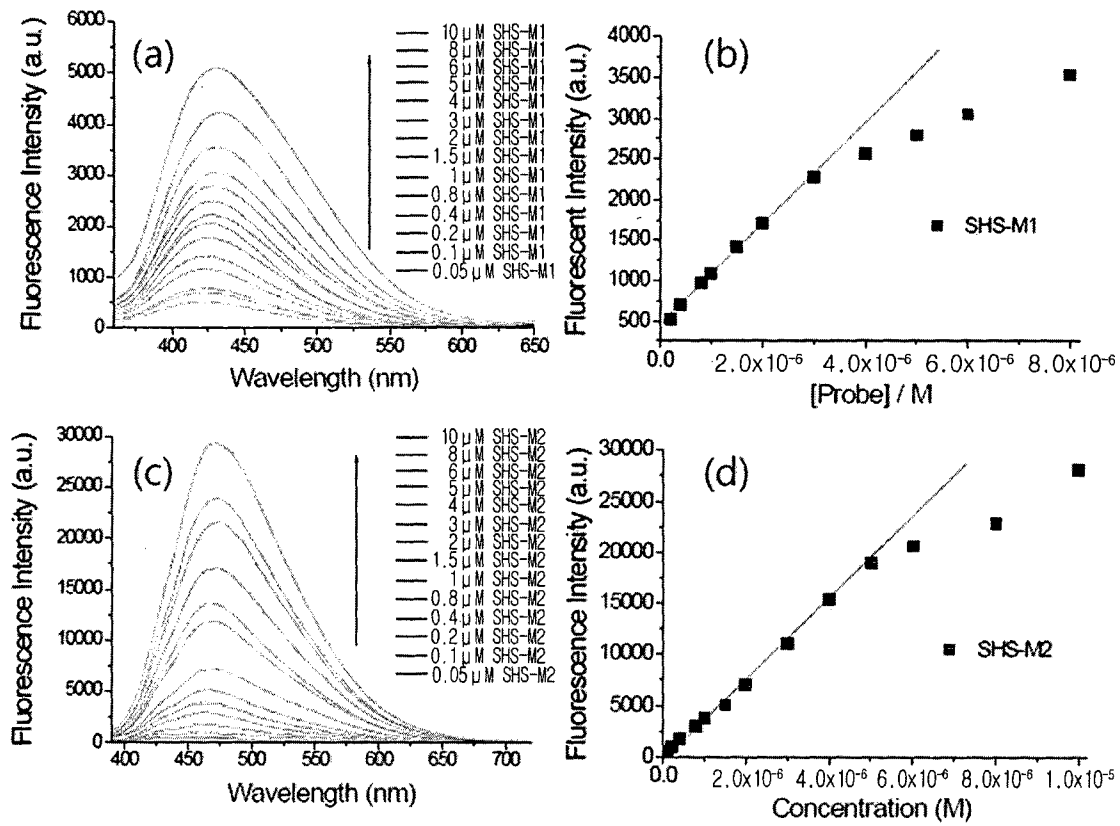
[화학식 3]

*C(=O)Nc1ccc(cc1)C2=CC=CC=C2C3=C(C=C2)C(=Nc4ccc(cc4)C(=O)NCCOCCO)n5ccccc5X

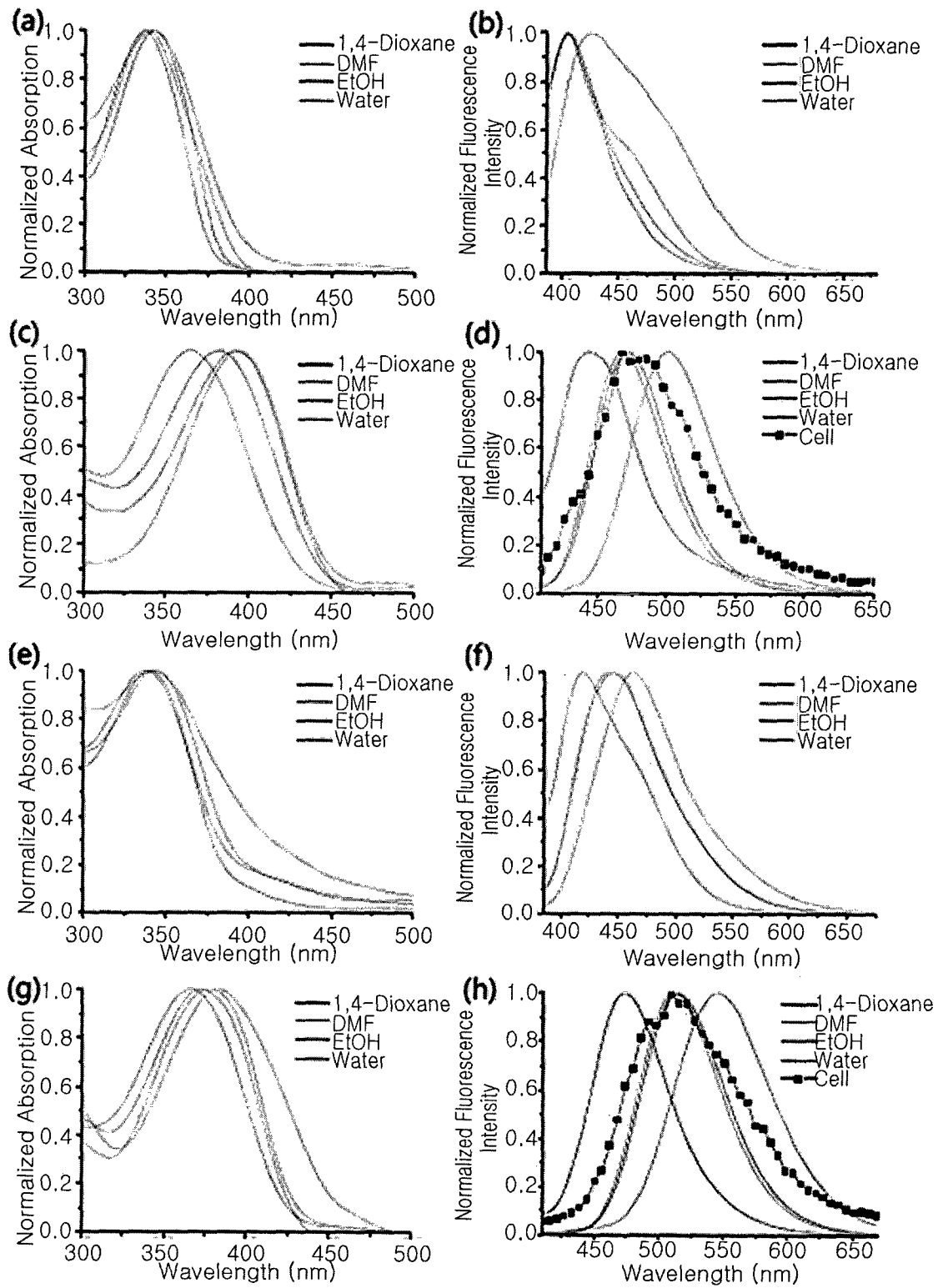
상기 화학식 3 및 4에서, X는 O, S 또는 Se이고, n은 1 내지 50의 정수이다.

- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 화학식 1 및 화학식 2로 표시된 화합물은 생체 내 미토콘드리아에 선택적으로 염색되는 것을 특징으로 하는, 황화수소의 영상화 방법.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서, 상기 화학식 3 및 화학식 4로 표시된 화합물은 생체 내 세포질에 선택적으로 염색되는 것을 특징으로 하는, 황화수소의 영상화 방법.
- [청구항 7] 제 4항에 있어서, 상기 가변색 이광자 형광 프로브는 생체 내의 황화수소와 반응하여, 400 ~ 480 nm 범위로부터 495 ~ 575 nm 범위의 형광으로 가변하는 것을 특징으로 하는, 황화수소의 영상화 방법.
- [청구항 8] 제 4항에 있어서, 상기 황화수소는 생체 세포 또는 100 ~ 200 μm 깊이의 생체 조직에서 탐지되는 것을 특징으로 하는, 황화수소의 영상화 방법.

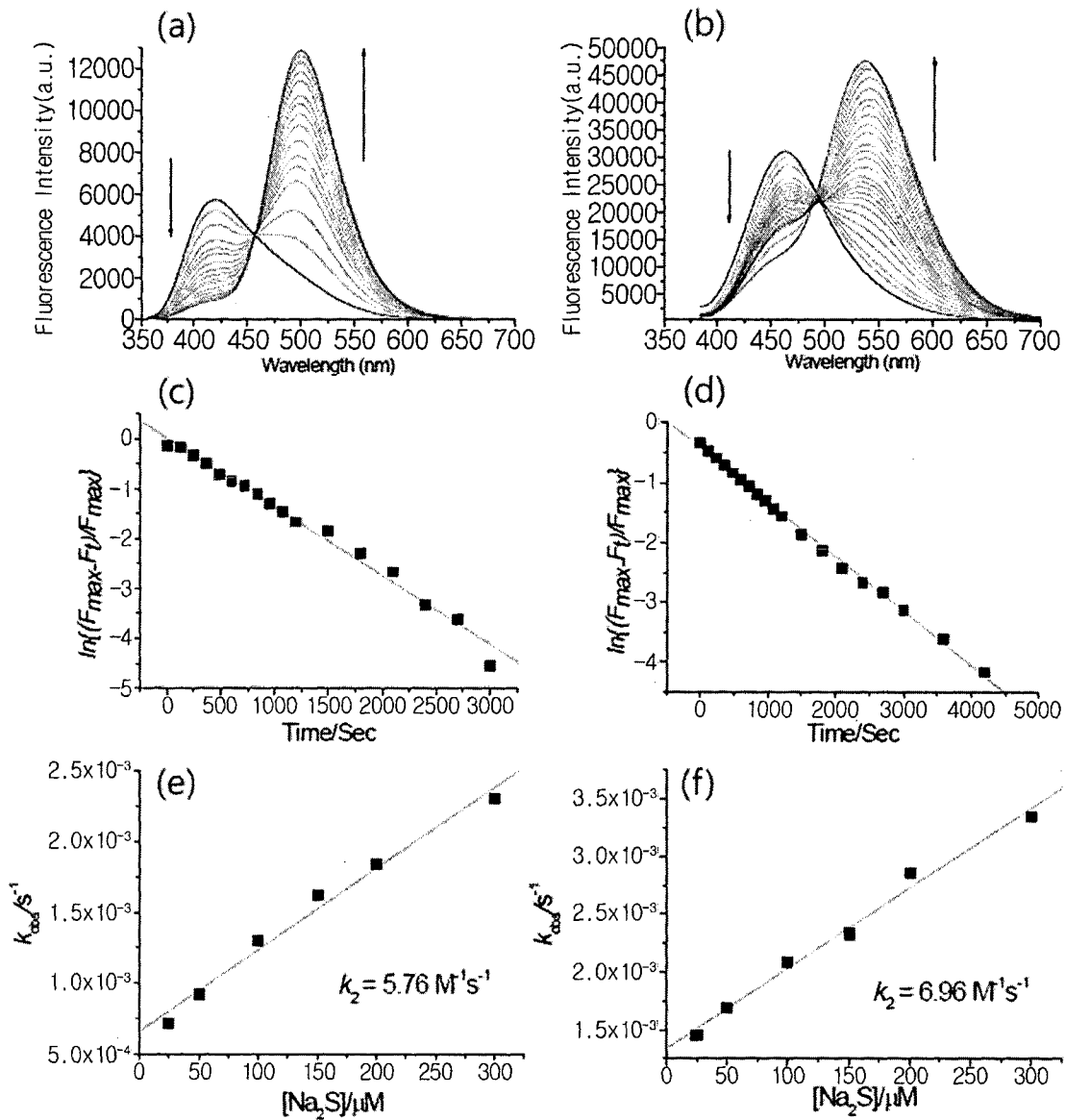
[Fig. 1]



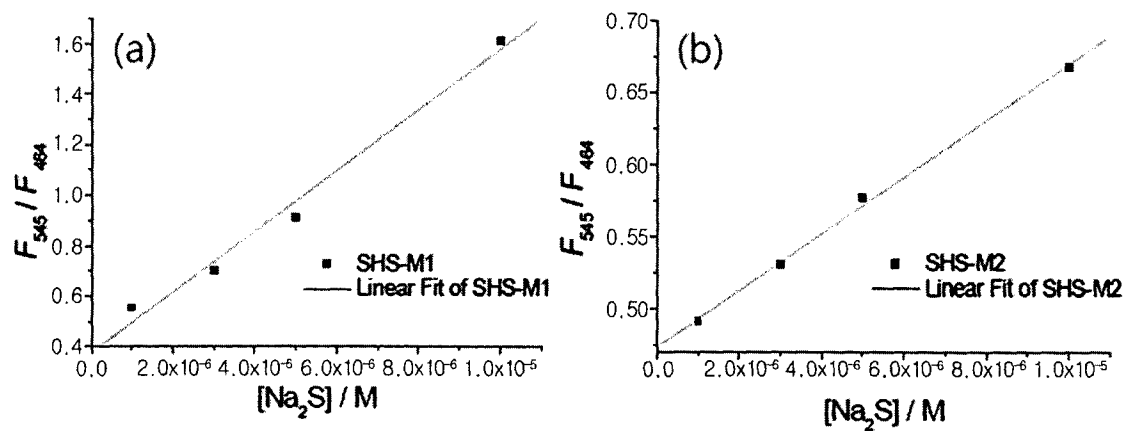
[Fig. 2]



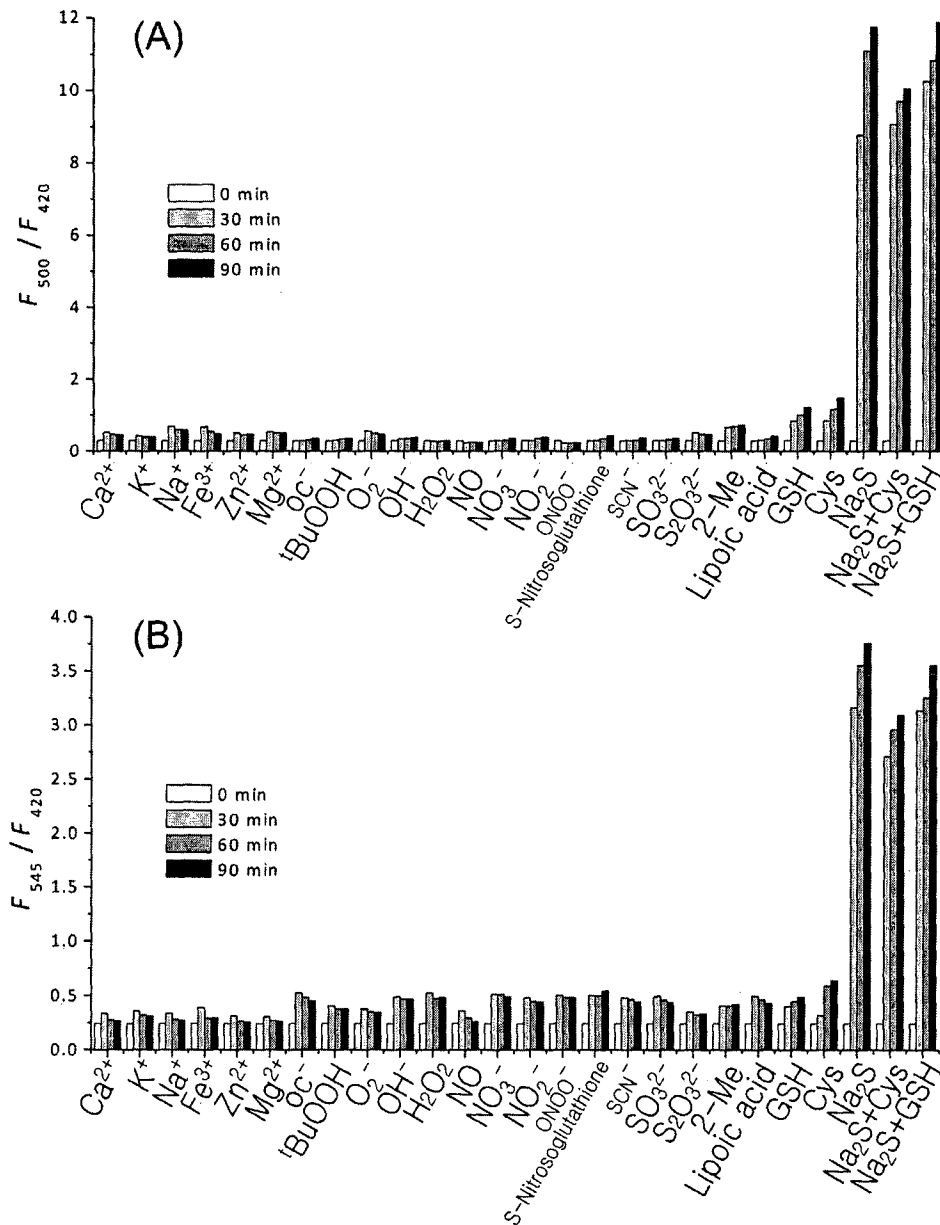
[Fig. 3]



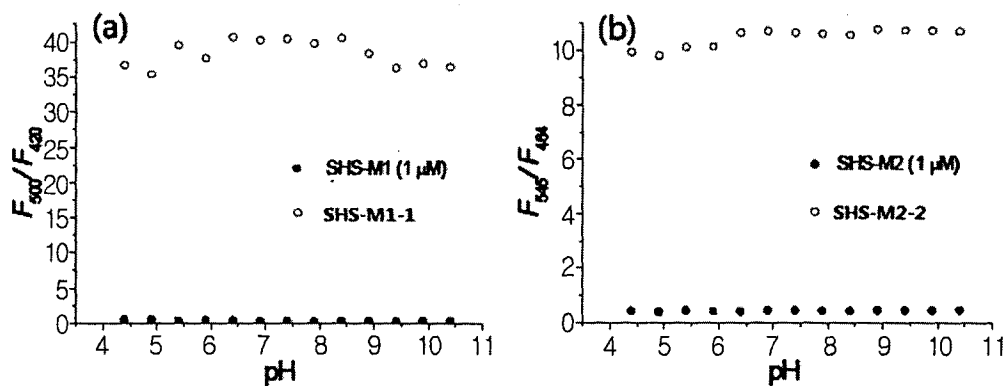
[Fig. 4]



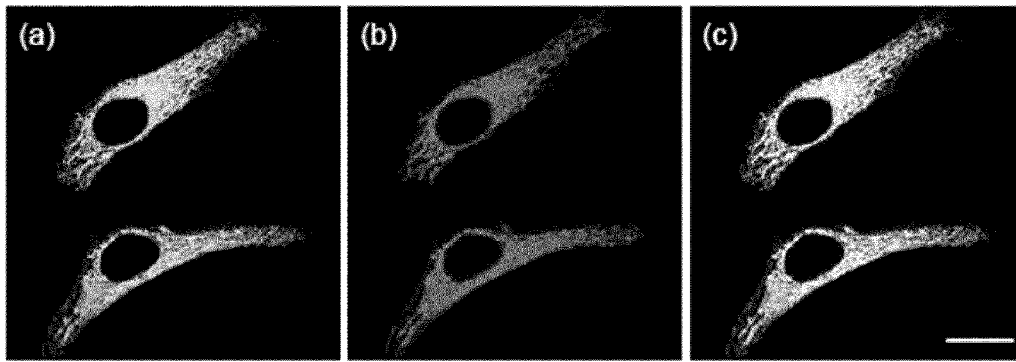
[Fig. 5]



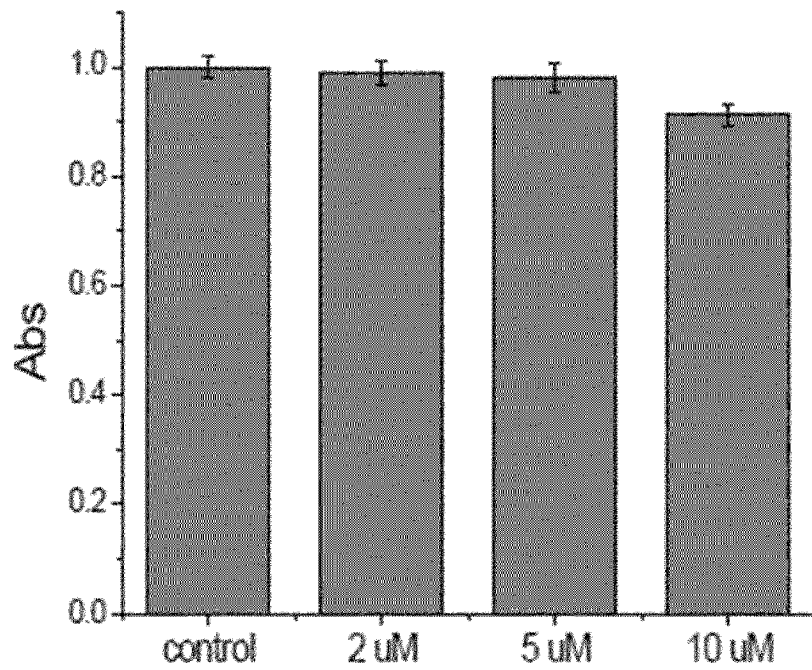
[Fig. 6]



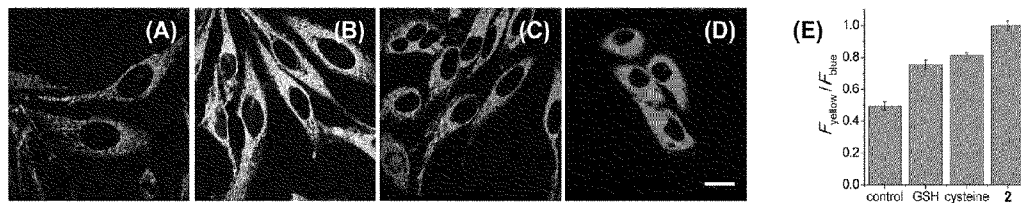
[Fig. 7]



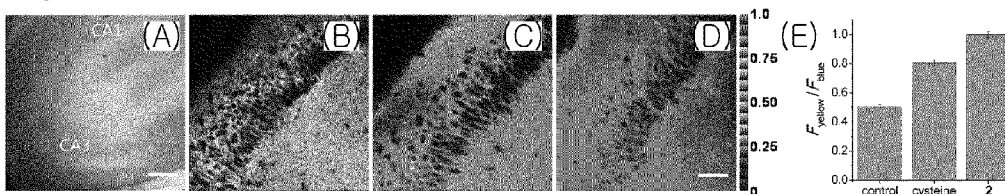
[Fig. 8]



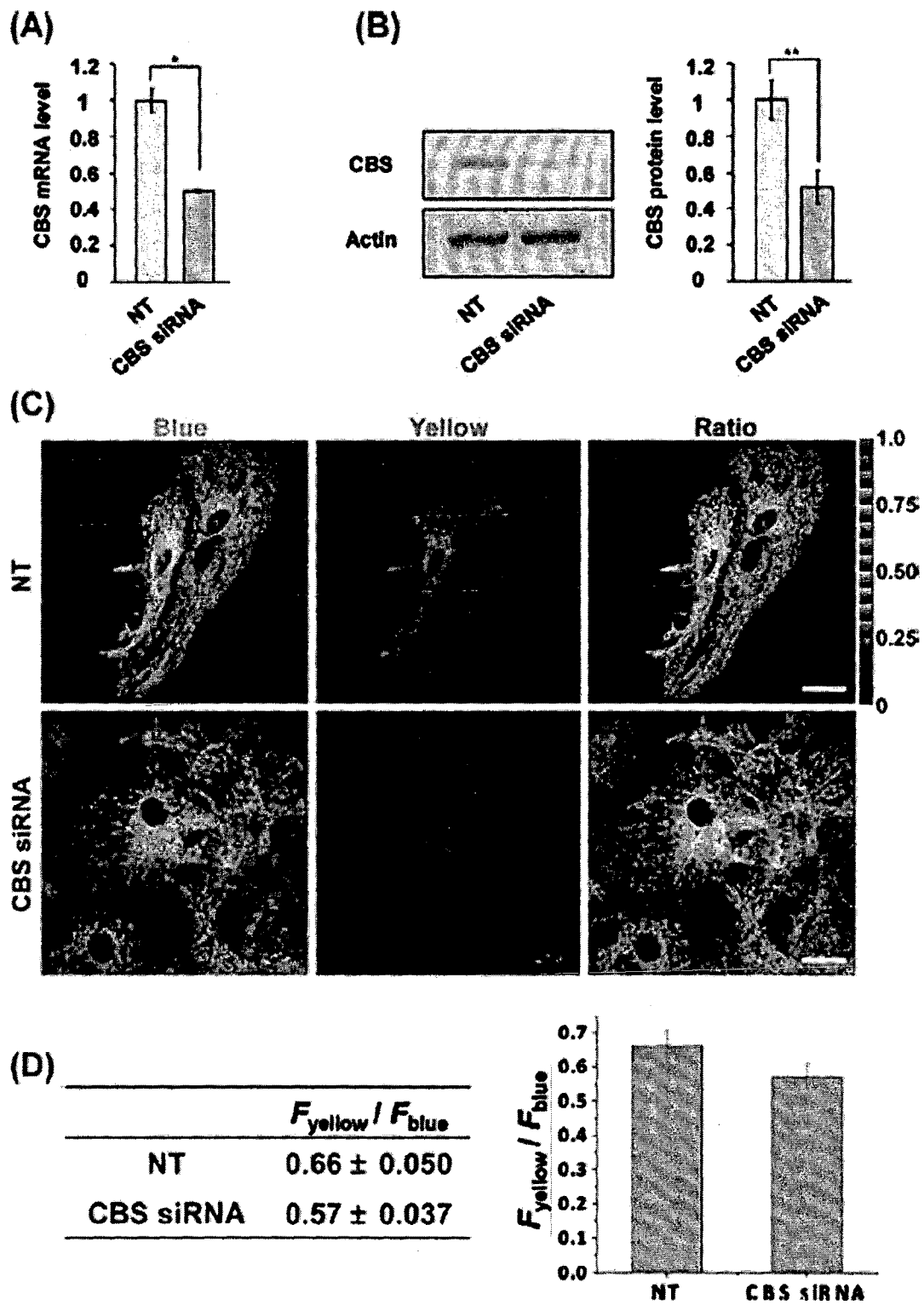
[Fig. 9]



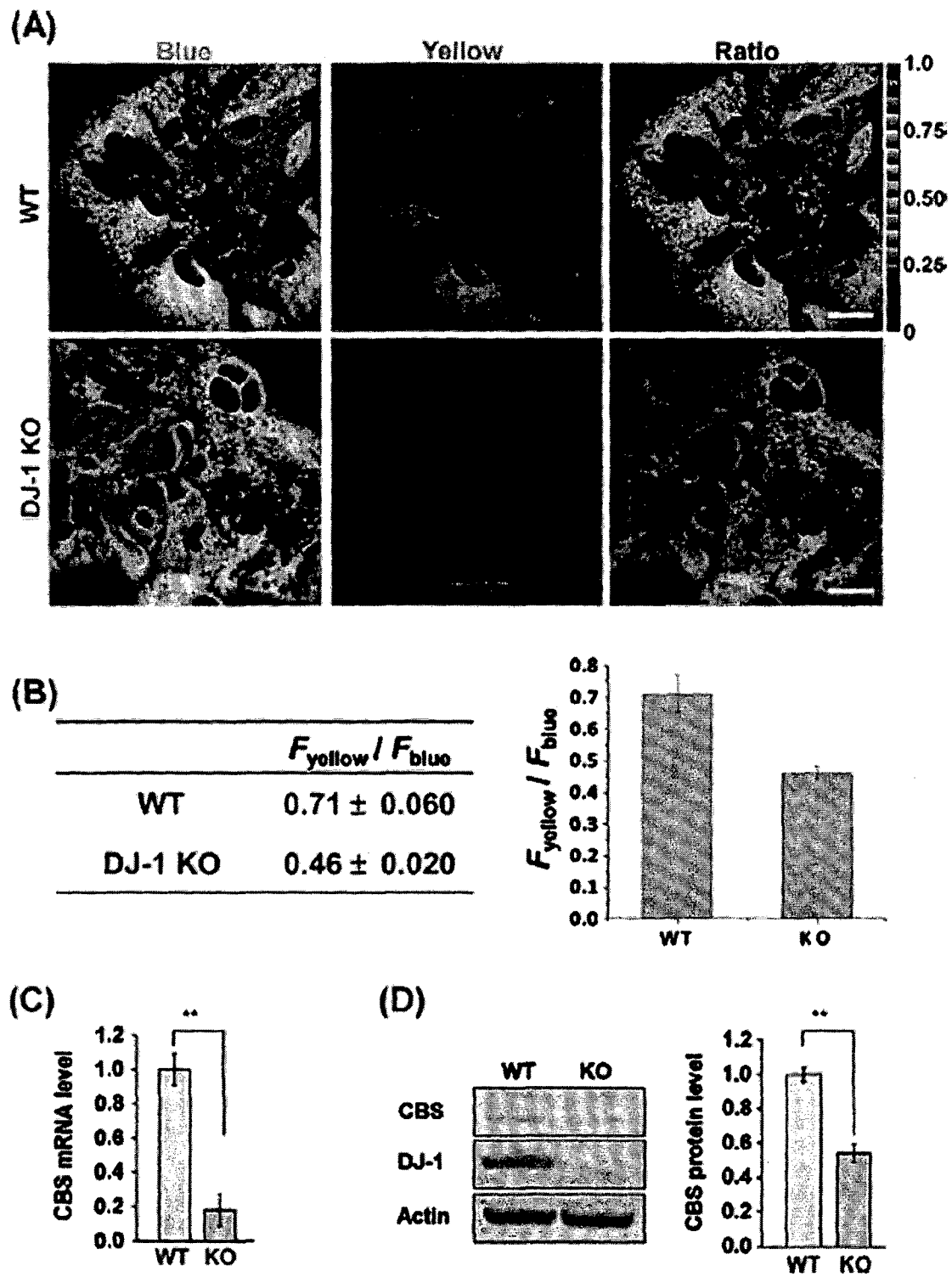
[Fig. 10]



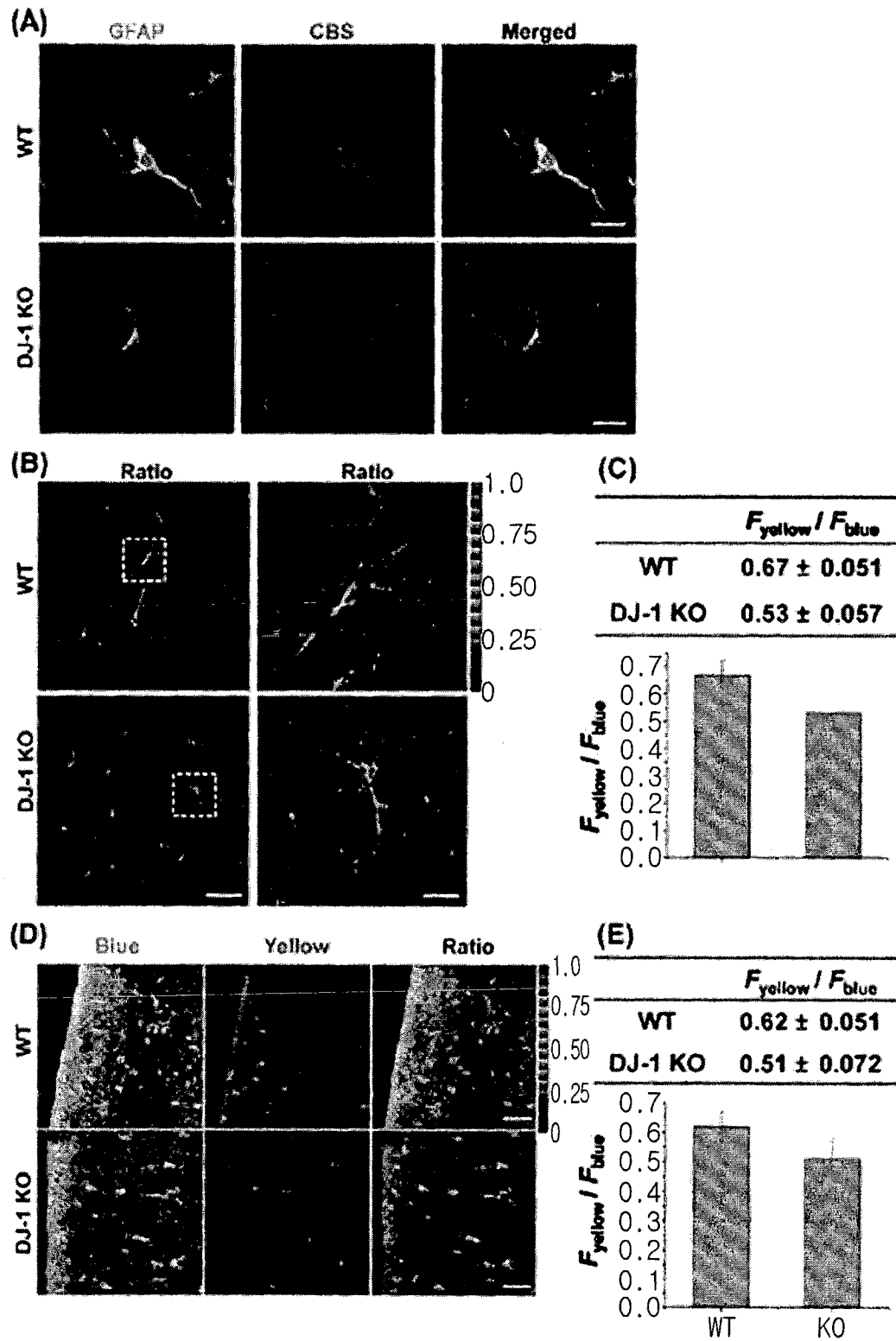
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011734**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/52(2006.01)i, C07D 277/66(2006.01)i, G01N 33/00(2006.01)i, G01N 21/77(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/52; G01N 21/64; G01N 33/58; C07D 235/18; C07D 417/14; C07D 493/10; C07D 277/66; G01N 33/00; G01N 21/77

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: variable color two-photon fluorescent probe, hydrogen sulfide, mitochondria, cytoplasm

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAE, Sung Keun, Two-Photon Fluorescent Probes for Ratiometric Detection of Mitochondrial Hydrogen Sulfide in Living Tissues, February 2013, Graduate School of Ajou University, Master's degree thesis	1-5,7,8
A	See pages 5, 6, 7, 9, 48, 56, 57 and figures 6, 7, 9, 29.	6
X	BAE, SUNG KEUN et al., A ratiometric two-photon fluorescent probe reveals reduction in mitochondrial H ₂ S production in Parkinson's disease gene knockout astrocytes, Journal of The American Chemical Society, 2013, vol. 135, no. 26, pp. 9915-9923 (published on 07 June 2013) See abstract and pages 9915, 9916.	1,4,5,7,8
A	KR 10-2012-0128015 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 26 November 2012 See abstract and claims 1-4.	1-8
A	KR 10-2012-0085100 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 31 July 2012 See abstract and claims 1-4.	1-8
A	US 2012-0329085 A1 (CHANG, Christopher J. et al.) 27 December 2012 See abstract and claims 1, 11, 12.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 MAY 2014 (02.05.2014)

Date of mailing of the international search report

07 MAY 2014 (07.05.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011734

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0128015 A	26/11/2012	KR 10-1270160 B1	31/05/2013
KR 10-2012-0085100 A	31/07/2012	KR 10-1190722 B1 WO 2012-099317 A1	12/10/2012 26/07/2012
US 2012-0329085 A1	27/12/2012	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/52(2006.01)i, C07D 277/66(2006.01)i, G01N 33/00(2006.01)i, G01N 21/77(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/52; G01N 21/64; G01N 33/58; C07D 235/18; C07D 417/14; C07D 493/10; C07D 277/66; G01N 33/00; G01N 21/77

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 가변색 이광자 형광 프로브, 황화수소, 미토콘드리아, 세포질

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	배성근, 미토콘드리아 내 황화수소 검출에 적합한 이광자 가변색 표지자의 합성 및 생체영상, 2013.2., 아주대학교 대학원, 석사학위논문 페이지 5, 6, 7, 9, 48, 56, 57 및 도면 6, 7, 9, 29 참조.	1-5,7,8
A		6
X	BAE, SUNG KEUN 외 6명, A ratiometric two-photon fluorescent probe reveals reduction in mitochondrial H2S production in Parkinson's disease gene knockout astrocytes, Journal of The American Chemical Society, 2013, Vol.135, No.26, pp.9915-9923 (2013.06.07. 공개) 요약 및 페이지 9915, 9916 참조.	1,4,5,7,8
A	KR 10-2012-0128015 A (아주대학교산학협력단) 2012.11.26. 요약 및 청구항 1-4 참조.	1-8
A	KR 10-2012-0085100 A (아주대학교산학협력단) 2012.07.31 요약 및 청구항 1-4 참조.	1-8
A	US 2012-0329085 A1 (CHANG, CHRISTOPHER J. 외 2명) 2012.12.27 요약 및 청구항 1, 11, 12 참조.	1-8



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 05월 02일 (02.05.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 05월 07일 (07.05.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

장봉호

전화번호 +82-42-481-3353



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0128015 A	2012/11/26	KR 10-1270160 B1	2013/05/31
KR 10-2012-0085100 A	2012/07/31	KR 10-1190722 B1	2012/10/12
		WO 2012-099317 A1	2012/07/26
US 2012-0329085 A1	2012/12/27	없음	