



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0118597
(43) 공개일자 2017년10월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/52 (2006.01) C07D 311/80 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/52 (2013.01)
C07D 311/80 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0036764
(22) 출원일자 2017년03월23일
심사청구일자 2017년03월23일
(30) 우선권주장
1020160046066 2016년04월15일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김중승
경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호
이윤학
서울특별시 노원구 노원로 569, 1동 605호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

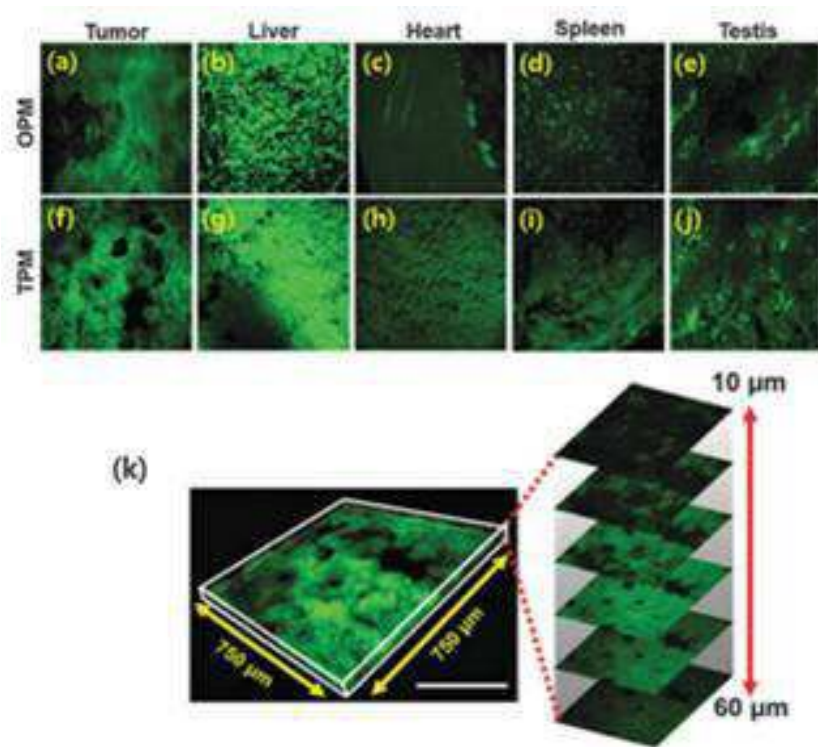
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 시스테인 검출용 이광자 형광 프로브 화합물

(57) 요약

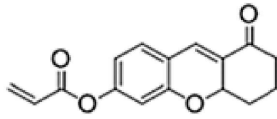
본 발명은 생체 세포 및 조직에서 호모시스테인 및 글루타티온과 구별하여 시스테인을 선택적으로 인식하는 하기 [화학식 1]로 표시되는 이광자 형광 프로브 화합물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 시스테인 검출용 이광자 형광 프로브 화합물은 깊은 조직 침투성과 낮은 광-세포독성을 가지며, TPM을 통해 생물학적으로 관련된 다른 물질 (뒷면에 계속)

대표도 - 도5a



의 간섭 없이 살아 있는 조직 내에서 시스테인 분포를 선택적으로 확인할 수 있어, 세포내 시스테인 인식을 위한 효율적인 도구로 활용할 수 있으며, 암 진단과 같은 다양한 생물학적 및 임상학적 응용 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

[화학식 1]



(52) CPC특허분류

G01N 33/58 (2013.01)

G01N 33/6815 (2013.01)

(72) 발명자

임문수

서울특별시 성동구 돌레9나길 26-7, 102호

한지유

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연대
캠퍼스 생명과학대학 서관 305호

선우경

서울특별시 서초구 신반포로 32, 68동 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015001883

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의적연구지원사업

연구과제명 발광센서재료연구단

기 여 율 90/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2062997

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 고려대학교 산학협력단

연구사업명 이공분야기초연구사업-(이공)일반연구자-기본(리서치펠로우)

연구과제명 새로운 암치료 작용물질 : 과산화수소 인식 고선택성 약물 전달 시스템

기 여 율 10/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

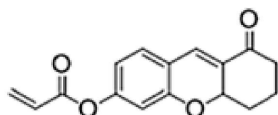
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 시스테인 검출용 이광자 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 따른 이광자 프로브 화합물을 이용하여 생체 세포 또는 생체 조직에서 시스테인을 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 생체 세포 및 조직에서 호모시스테인 및 글루타티온과 구별하여 시스테인을 선택적으로 인식하는 이광자 형광 프로브 화합물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy) 및 글루타티온(GSH)은 구조는 유사하지만 생리학적으로 다른 기능을 가지고 있는데, 생물 시스템을 유지하는 데 결정적인 역할을 수행하는 가장 중요한 저분자량 아미노티올이다. 특히, 이들 중에서 시스테인은 세포의 핵심 성분으로서 단백질 합성, 세포 해독작용 및 번역 후 조절(posttranslational control)에 있어서 중추적인 역할을 담당한다.

[0003]

혈장 내 시스테인의 농도의 범위는 80 - 200 μM 이고 평균은 쥐에서 약 100 μM , 인간에서 약 200 μM 인 것으로 알려져 있다. 시스테인의 부족은 모발 탈색, 간 손상, 성장 지체, 무기력, 근육과 지방의 손실, 피부 병변 및 알츠하이머병과 같이 다양한 의학적 문제들의 원인이다. 또한, 반면에 시스테인 농도가 너무 높으면 신경독성과 심혈관계 질환이 초래될 수 있다. 따라서, 살아 있는 세포에서 세포내 시스테인을 탐지하는 것은 발생 가능한 병리학적 상관관계를 밝히는 데 있어서 앞으로 기초적이고 중요한 접근을 하는 것이라고 할 수 있다. 그러므로 지난 몇 년 동안 다양한 시스테인 형광 프로브들이 다양한 전략을 기초로 하여 개발되어 왔는데, 이러한 전략 가운데에는 마이클 첨가 반응, 아미노티올과 알데하이드 사이의 고리화 반응, 티올 유도성 절단 반응 및 리간드 교환 등이 있다.

[0004]

형광에 기반한 방법은 높은 선택도와 민감도, 낮은 기기 비용 및 간단한 작업 공정과 같은 장점을 가지고 있다. 하지만, 시스테인과 호모시스테인과 글루타티온은 서로 구조가 비슷하고 빠르게 글루타티온, 단백질 혹은 코엔자임 A에 포함되는 경향이 있기 때문에, 이들을 분별해 낼 수 있는 프로브는 몇 가지밖에 없다. 따라서, 생리학적 조건하에서 시스테인을 식별하기 위한 간단하고 효과적인 형광 프로브를 만든다는 것은 여전히 도전적인 과제에 남아 있으며, Cys만을 식별할 수 있는 효과적인 형광 프로브들을 개발하는 것이 절실히 필요한 실정이다. 2010년에 Strongin 등은 선구자적인 접근법을 보고했는데, 이들은 한 아크릴레이트 성분을 인식 단위로서 형광소에 불임으로써 시스테인과 호모시스테인을 높은 선택도로 탐지하는 일을 이루어냈다(X. F. Yang, Y. X. Guo and R. M. Strongin, Angew. Chem., Int. Ed., 2011, 50, 10690; Y. X. Guo, X. F. Yang, L. Hakuna, A. Barve, J. O. Escobedo, M. Lowry and R. M. Strongin, Sensors (Basel), 2012, 12, 5940.). 또한, 더 최근에는 다른 몇몇 연구 집단에서 이 전략을 적용하여 여러 물성을 가지는 시스테인 센서들을 개발하였다(H. L. Wang, G. D. Zhou, H. W. Gai and X. Q. Chen, Chem. Commun., 2012, 48, 8341; Z. Q. Guo, S. Nam, S. Park and J. Yoon, Chem. Sci., 2012, 3, 2760.).

[0005] 한편, 일광자 현미경(one-photon microscopy, OPM)을 사용하여 조직을 라벨링하는 방식에는 제한점이 하나 더 있는데, 프로브를 생물학적 시편에 집어넣는 깊이가 제한되어 있다는 것이다. 이광자 여기 형광(two-photon excitation fluorescence, TPEF)을 사용하여 생조직 이미징을 하면 OPM에 비해 굉장한 장점들이 있는데, 삽입 깊이가 깊어지고, 자기형광 수준이 낮고, 광독성이 감소하며, 생조직을 3차원으로 이미징할 수도 있으며, 관찰 시간이 길어진다. TPEF 이미징은 깊은 조직 내 시스테인의 분포를 분석하는 데에도 적용할 수 있다.

[0006] 하지만, 현재까지 시스테인에 특이적인 이광자 프로브를 개발했다는 보고는 제한적이며, 효과적인 시스테인 특이적 이광자 프로브의 개발에 대해서는 거의 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

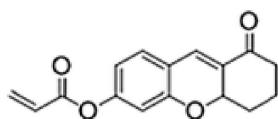
[0007] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결할 수 있도록, 호모시스테인(Hcy) 및 글루타티온(GSH) 등과 구별하여 시스테인에 대해서 매우 높은 선택적 특이성을 갖는 이광자 형광 프로브 화합물 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 이광자 형광 프로브 화합물을 이용하여 생체 세포 및 조직에서 시스테인을 검출하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, 하기 [화학식 1]로 표시되는 시스테인 검출용 이광자 형광 프로브 화합물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 시스테인 검출용 이광자 형광 프로브 화합물은 깊은 조직 침투성과 낮은 광-세포독성을 가지며, TPM을 통해 생물학적으로 관련된 다른 물질의 간섭 없이 살아 있는 조직 내에서 시스테인 분포를 선택적으로 확인할 수 있어, 세포내 시스테인 인식을 위한 효율적인 도구로 활용할 수 있으며, 암 진단과 같은 다양한 생물학적 및 임상학적 응용 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a 및 1b는 각각 시스테인(100 μ M)이 존재할 때와 존재하지 않을 때 본 발명에 따른 프로브 1과 프로브 2(10 μ M)의 UV/가시광선(도 1a) 및 형광 스펙트럼(도 1b)이고, 이러한 스펙트럼은 분석물을 에탄올-인산 완충액(10 mM, pH 7.4, 2 : 8 v/v)에 첨가한 후에 15분 후 37 $^{\circ}$ C에서 444 nm에서 여기 후에 획득한 것이다.

도 1c는 본 발명에 따른 프로브 1(10 μ M)의 형광 여기 및 방출 스펙트럼이고, 시스테인(100 μ M)이 존재하여 분석물을 에탄올-인산 완충액(10 mM, pH 7.4, 2 : 8 v/v)에 첨가한 후에 15분 후 37 $^{\circ}$ C에서 509 nm에서 여기 후에 획득한 것이다.

도 1d는 프로브 1이 시스테인 존재하에서 나타내는 형광 강도를 다양한 pH에서 확인한 결과이고, 에탄올-인산 완충액 중의 Cys(100 μ M)의 존재(적색) 및 부존재(흑색)에서의 509 nm에서 측정하였다(λ_{ex} = 444 nm, 슬릿 : 1.5 nm / 1.5 nm).

도 2a는 444 nm에서의 여기 조건하에서 시스테인 농도가 증가할 때 프로브 1(10 μ M)의 일광자 형광 스펙트럼이고, 삽입된 도면은 509 nm에서의 형광 강도의 변화를 시스테인 농도의 함수로 나타낸 것이다.

도 2b는 프로브 1(10 μ M)이 시스테인(20 μ M), 호모시스테인(20 μ M) 및 글루타티온(100 μ M)에 대해 나타내는 형광 응답의 시간에 따른 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2a 및 도 2b의 스펙트럼은 분석물을 에탄올-인산 완충액(10 mM, pH 7.4, 2 : 8 v/v)에 첨가하고, 15분 후에 37 °C에서 획득한 것이다.

도 2c는 형광 강도(I_{509})와 시스테인 농도 간에 계산된 검출 한계를 보여주는 그래프로써, 시스테인에 대한 프로브 1의 검출 한계는 방정식 ($\text{Log} [\text{Cys}] = - \text{intercept} / \text{slop}$)을 사용하여 정규화된 형광 변화 (509 nm)의 플롯으로부터 추정하였다.

도 2d는 각각의 생물학적 분석시료 (1 mM)에 프로브 1 (10 μM)을 노출시켰을 때의 형광 강도 (509 nm) 히스토그램으로서, 분석시료 1은 프로브 1만; 2는 Val; 3은 Tyr; 4는 Thr; 5는 Tau; 6은 Ser; 7은 Pro; 8은 Phe; 9는 Met; 10은 Lys; 11은 Leu; 12는 Ile; 13은 His; 14는 Gly; 15는 Gluc; 16은 Glu; 17은 Gln; 18은 Asp; 19는 Asn; 20은 Arg; 21은 Ala; 22는 Trp; 23은 K(I); 24는 Na(I); 25는 Ca(II); 26은 Cu (II); 27은 Fe (II); 28은 Fe (III); 29는 Mg (II); 30은 Zn (II); 31은 Cys를 포함한다.

도 3a는 본 발명에 따른 프로브 1을 사용하여 얻은 HepG2 세포의 OPM 이미지이고, (a)는 프로브 1 (10 μM)을 사용하여 세포를 1시간 동안 인큐베이션하였으며, (b)는 500 μM NEM을 사용하여 세포를 30분 동안 인큐베이션한 후, 세척하고 나서, 프로브 1 (10 μM)으로 1시간 동안 처리하였으며, (c)는 포도당이 없는 배지에서 세포를 2시간 동안 인큐베이션한 후 프로브 1 (10 μM)로 1시간 동안 처리하였다 (배율 400 $\times$).

도 3b는 이광자 현미경을 사용하여 740 nm 여기를 통해 획득한 이광자 형광 스펙트럼으로서, Cys (100 μM)의 존재 (적색) 및 부존재 (흑색)에서 프로브 1 (10 μM)의 이광자 형광 스펙트럼이고, 스펙트럼은 에탄올-인산 완충액 (10 mM, pH 7.4, 2 : 8 v / v)에 37 °C에서 분석물을 첨가한 후 15 분 동안 측정하였다.

도 3c는 HeLa, HepG2, Hep3B, Huh7, MDA-MB-231 및 BJ에서 본 발명에 따른 프로브 1의 세포 독성 효과를 보여주는 그래프로써, MTT의 세포 독성 효과는 제조사의 지시에 따라 수행되었으며, 본 발명에 따른 프로브 1의 상이한 농도 (0, 1, 5, 10 및 50 μM)를 24 시간 배양에 대해서 확인하였다. (a) 6 개의 다른 세포주의 흡수는 농도에 관계없이 크게 다르지 않았음을 보여주며, (b) 대조군 세포는 100 % 살아있으며, 본 발명에 따른 프로브 1 처리된 세포의 75 % 이상이 50 μM 농도의 24 시간 배양 후 살아있음을 보여준다. 이는 프로브 1이 다양한 세포주에 독성이 없음을 보여주는 것이다.

도 3d는 HepG2 세포에서 본 발명에 따른 프로브 1의 OPM 이미지로서(배율 400 $\times$), (a) 세포를 프로브 1 (10 μM)과 함께 1 시간 동안 배양하였으며, (b) 세포를 500 μM NEM으로 30 분간 사전 배양하고 세척한 후에, 세포를 프로브 1 (10 μM)로 1 시간 처리하였고, (c) 세포를 글루코스가 없는 DMEM에서 2 시간 동안 배양 한 다음, 1 시간 동안 1 (10 μM)로 처리하였으며, (d) 상기 (a), (b) 및 (c)의 상대적인 형광 강도이며, 형광 강도는 NEM의 존재하에서 현저히 감소하였다. (** $p < 0.005$).

도 3e는 HepG2 세포에서 본 발명에 따른 프로브 1의 TPM 형광 이미지로서(배율 400 $\times$), (a) 세포를 프로브 1 (10 μM)과 함께 1 시간 동안 배양하였으며, (b) 세포를 30 분 동안 500 μM NEM과 사전 배양하고 세척한 후에 프로브 1 (10 μM)로 1 시간 동안 처리하였다.

도 4a는 4가지의 암종 세포주 (HeLa, Hep3B, Huh7, MDA-MB-231)에서 얻은 프로브 1의 OPM 이미지로서, 프로브 1 (10 μM)로 1 시간 동안 세포를 배양하였다 (배율 400 $\times$).

도 4b의 (a) 내지 (d)는 4 개의 살아있는 암종 세포주 (HeLa, Hep3B, Huh7 및 MDA-MB-231)에서 프로브 1의 OPM 이미지이고, 도 4b의 (e)는 상이한 암종 세포주에서의 평균 형광 강도를 나타낸 것이다. HeLa의 평균 형광 강도는 나머지 시험된 세포주 (* $p < 0.05$)와 비교하여 유의하게 높았다.

도 5a는 프로브 1 (10 μM)을 사용하여 2시간 동안 염색한, 냉동 절개된 이중 이식 생쥐 종양과 기관의 OPM (a ~ e) 및 TPM (f ~ j) 이미지 (배율 100 $\times$)이고, (k)는 (왼쪽) 10-60 μm 깊이에서 프로브 1 (10 μM)을 사용하여 표지한 종양의 3차원 TPM 이미지이며, (오른쪽) 여러 다른 깊이에서 촬영한 일련의 Z형 단면 종양 조직 TPM 이미지이며, 이미지들은 10 - 60 μm 깊이에서 얻은 30개의 단면 이미지 중에 대표적인 이미지이다. TPEF 이미지는 740 nm에서 여기 후에 기록한 것으로, 해당 방출은 450 - 600 nm에서 수집되었으며, 스케일 바는 300 μm 이다.

도 5b의 (a) 내지 (d)는 본 발명에 따른 프로브 1 (10 μM)로 2 시간 동안 염색된 장기 (간, 심장, 비장 및 고환)의 조직에 대한 TPM 이미지이고(배율 400 $\times$), 간은 다른 주요 기관들 중에서 가장 높은 형광 강도를 갖는다.

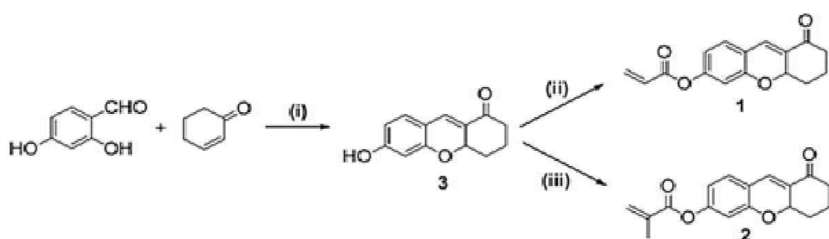
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하에서는 본 발명에 따른 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다.

[0016] 실시예

[0017] 형광 및 UV/Vis 흡수 스펙트럼은 Shimadzu RF-5301PC 및 Agilent 8453 분광 광도계를 이용하여 측정하였으며, ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 300 및 400 MHz 분광기에서 CDCl_3 로 측정하였다. 또한, 화학적 이동은 TMS의 잔류 양성자 신호 피크를 내부 기준으로 사용하여 ppm 값으로 측정하였고, HRMS 데이터는 한국 기초 과학 연구소를 통하여 확인하였다. 또한, 세포와 조직의 형광 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Carl-Zeiss LSM 5 Exciter, Oberko, Germany)으로 획득하였으며, 모든 분석 물질은 Aldrich에서 구입하여 사용했으며, 모든 용제는 덕산화학(주)의 분석용 시약을 사용하였으며, 스펙트럼 검출을 위한 모든 DMSO는 형광성 불순물이 없는 HPLC 시약 등급이었으며, H_2O 를 탈이온화시켜 사용하였다.

[0019] 합성예 1



[0020]

[0021] 화합물 1과 화합물의 2의 반응식으로서, 반응식 (i)의 반응물 및 조건은 이미다졸, 물, THF 및 RT이며, 반응식 (ii)의 반응물 및 조건은 트리에틸아민, 아크릴로일클로라이드, THF, 0 °C 및 2시간이고, 반응식 (iii)의 반응물 및 조건은 트리에틸아민, 메타아크릴로일클로라이드, THF, 0 °C 및 2시간이다.

[0023] (1) 6-hydroxy-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-one [3] 화합물의 합성

[0024] 상기 반응식 (i)에 따라 살리실알데히드 (553 mg, 4 mmol) 용액 (THF, 3 mL)에 1.5 당량의 2-cyclohexen-1-one (576 mg, 6 mmol)과 1.5 당량의 이미다졸 (408 mg, 6 mmol)을 첨가하고, 탈이온수 (3 mL)와 혼합한 후에 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 완료 후에 최종 혼합물에 1 M HCl (20 mL)을 처리한 후에 에틸아세테이트로 추출하고, 유기층을 Na_2SO_4 로 건조시키고 진공 농축하였다. 실리카겔상에서 크로마토그래피 정제(헥산 / EtOAc = 100 % 내지 30 %)에 의해 순수한 생성물 432 mg (50 % 수율)을 밝은 황색 고체로 수득하였다.

[0026] (2) 1-oxo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-6-yl acrylate [1] 화합물의 합성

[0027] 0 °C에서 상기 합성예 1-(1)에서 수득한 [3] 화합물 (200 mg, 0.93 mmol) 및 트리에틸아민 (151 mg, 1.5 mmol) 용액 (THF, 20 mL)에 아크릴로일클로라이드 (84 mg, 0.93 mmol)를 첨가한 후에, 혼합물을 2 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후에 반응 혼합물을 진공 농축시키고, 잔여물을 에틸아세테이트에 용해시킨 다음 물과 염수로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 농축 잔류물을 칼럼크로마토그래피 (10 % 에틸 아세테이트 / 메틸렌 클로라이드)로 정제하여 담황색 고체 (236 mg, 95 %)를 수득하였다.

[0028] ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): δ 1.65-1.75 (m, 1H), 1.95-2.11 (m, 2H), 2.34-2.61 (m, 3H), 5.00-5.04 (m, 1H), 6.03 (d, $J=10.4$ Hz, 1H), 6.26-6.33 (m, 1H), 6.58-6.75 (m, 2H), 7.22 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.41 (s, 1H);

[0029] ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18.16, 29.82, 39.01, 75.06, 110.05, 115.71, 120.24, 127.84, 130.14, 130.65, 131.01, 133.37, 149.64, 153.35, 164.25, 197.62;

[0030] HRMS: m/z = 270.0892 [M].

[0032] (3) 1-oxo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-6-yl methacrylate [2] 화합물의 합성

[0033] 0 °C에서 상기 합성에 1-(1)에서 수득한 [3] 화합물 (200 mg, 0.93 mmol) 및 트리에틸아민 (151 mg, 1.5 mmol) 용액 (THF, 20 mL)에 메타크릴로일클로라이드 (97 mg, 0.93 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 2 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후에 반응 혼합물을 진공 농축시키고 잔여물을 에틸아세테이트에 용해시킨 다음 물과 염수로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 농축 잔류물을 칼럼크로마토그래피 (10 % 에틸 아세테이트 / 메틸렌 클로라이드)로 정제하여 담황색 고체 (243 mg, 92 %)를 수득하였다.

[0034] ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): δ 1.65-1.74 (m, 1H), 1.94-2.09 (m, 5H), 2.33-2.60 (m, 3H), 4.99-5.03 (m, 1H), 5.76 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.68-6.74 (m, 2H), 7.22 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.40 (s, 1H);

[0035] ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18.16, 18.58, 29.80, 39.00, 75.03, 110.12, 115.80, 120.11, 127.96, 130.06, 130.62, 131.05, 131.46, 135.80, 153.75, 156.94, 165.55, 197.59;

[0036] HRMS: m/z = 284.1049 [M].

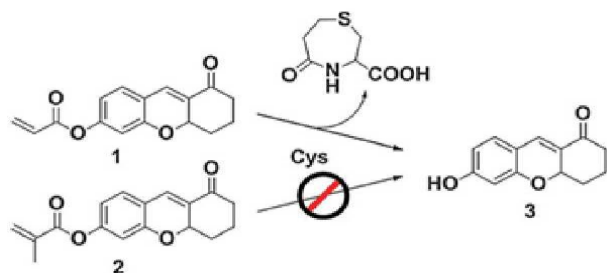
[0038] 실험예 1

[0039] 본 발명에 따른 프로브 1과 프로브 2의 분광학적 특징들을 생리학적 조건 하에서 확인한 결과, 하기 도 1a에서 확인할 수 있는 바와 같이 시스테인이 없는 환경에서 프로브 1과 프로브 2 용액은 각각 302 nm와 358 nm에서 두 개의 흡수 피크를 보이는 유사한 UV/가시광선 스펙트럼을 보였다.

[0040] 시스테인 (100 μM)을 프로브 1의 용액에 첨가하였을 때에는 302 nm와 358 nm에서 나타나는 흡수 피크들은 빠르게 (15분) 감소하였으며, 적색편이 되는 넓은 부수적 흡수 피크가 398 nm에서 관찰되었고 444 nm에서는 숄더 피크 (shoulder peak)가 관찰되었다. 또한, 하기 도 1c는 본 발명에 따른 프로브 1 (10 μM)의 형광 여기 및 방출 스펙트럼으로서, 이러한 여기 및 방출 스펙트럼을 통해서 444 nm에서 프로브 1이 여기될 때 시스테인에 대한 가장 좋은 형광 응답이 509 nm에서 나타남을 알 수 있다 (약 22배).

[0041] 하지만, 프로브 2는 시스테인을 첨가하여도 형광 및 흡수 스펙트럼에서 별다른 변화를 보이지 않았다.

[0043] 상기와 같은 현상은 하기의 메커니즘을 통해 설명할 수 있다.



[0044]

[0045] 시스테인이 존재하는 상태에서 프로브 1이 나타내는 형광 응답은 시스테인이 아크릴레이트에 추가되는 친핵성 첨가 반응을 포함하며, 이어서 발생하는 빠른 분자 내 고리화 반응은 크로멘 형광소 (chromene fluorophore)의 방출을 유도하며, 결국 형광을 증가시키게 된다. 프로브 2의 경우에는 시스테인이 아크릴레이트에 추가되는 친핵성 첨가 반응 이후, 추가되는 메틸기가 훨씬 강한 입체 장애를 유도하여 분자 내 고리화 반응이 일어나지 않도록 한다.

[0047] 또한, 509 nm에서의 프로브 1이 시스테인 존재 하에서 나타내는 형광 강도를 다양한 pH에서 확인하였으며, 그 결과를 하기 도 1d에 나타내었다.

- [0048] 하기 도 1d에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시스테인이 없는 상태에서 프로브 1의 형광 스펙트럼은 넓은 pH 범위 (pH 6.9)에서 유의한 변화를 보여주지 않았다. 그러나, 시스테인이 있는 경우에는 pH 6.5와 9 사이에서 형광 변화를 탐지할 수 있으며, 가장 좋은 응답은 pH 7.4와 9 사이에서 얻을 수 있음을 알 수 있다. 이러한 결과를 통해서 프로브 1은 생리학적 pH에서 시스테인을 탐지하는 데 응용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0050] 실험예 2
- [0051] 형광적정검사법을 사용하여 프로브 1 (10 μ M)을 농도를 다르게 한 시스테인으로 처리하였다 (하기 도 2a). 15 분간의 인큐베이션 이후 시스테인의 양이 증가함에 따라 509 nm에서의 형광 강도가 점점 증가하였다. 형광(I_{509})의 변화를 시스테인 농도의 함수로 그래프로 나타내었다.
- [0052] 형광 강도(I_{509})와 시스테인 농도 사이에는 0에서 20 μ M 사이 농도 범위에서 선형성이 좋았으며, 계산된 측정 한계는 53.1 nM (하기 도 2c)였는데, 이는 세포와 인간 혈액 내에서 시스테인을 측정하기에 충분하다 할 것이다.
- [0054] 실험예 3
- [0055] 프로브 1(10 μ M)이 시스테인 (20 μ M), 호모시스테인 (20 μ M) 및 글루타티온 (100 μ M)과 반응하는 반응 속도를 비교함으로써, 기타 티올 함유 아미노산에 대해 가지는 시스테인 선택성을 검사하였으며, 그 결과를 하기 도 2b에 나타내었다.
- [0056] 하기 도 2b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 프로브와 시스테인의 반응은 호모시스테인이나 글루타티온과의 반응보다 빨랐으며, 그 결과 15분 후에 형광이 크게 증가하였으나, 호모시스테인과 글루타티온의 경우에는 형광이 단지 약간만 증가하였다. 이러한 결과를 통해 프로브 1을 사용하여 호모시스테인이나 글루타티온과 구분하여 선택적으로, 그리고 빠르게 시스테인을 측정할 수 있음을 알 수 있다.
- [0057] 또한, 프로브 1이 시스테인에 대해 가지는 선택성을 평가하기 위해, 수성 매질 내에서 다양한 생물 관련 용질에 프로브 1을 노출시켜 형광 강도(I_{509})를 모니터링하였다. 시스테인을 제외하고 시험에 사용한 다른 어떤 아미노산(Val, Tyr, Thr, Tau, Ser, Pro, Phe, Met, Lys, Leu, Ile, His, Gly, Gluc, Glu, Gln, Asp, Asn, Arg, Ala, Trp)이나 생물학적 금속 이온들(K(I), Na(I), Ca(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Mg(II), Zn(II))들도, 심지어 매우 높은 농도(1 mM)에서도, 유의할 만한 형광의 변화를 보이지 않았다 (하기 도 2d).
- [0058] 이는 본 발명에 따른 프로브 1이 생물학적 활용 분야에서 시스테인을 매우 높은 선택도로 측정하는 데 유용하다는 것을 보여준다.
- [0060] 실험예 4
- [0061] TPEF(이광자 여기 형광, two-photon excitation fluorescence) 이미징에 본 발명에 따른 프로브 1을 사용할 수 있는 잠재적 가능성을 확인하기 위해서, 본 발명의 발명자들은 이광자 현미경을 사용하여 740 nm 여기를 통해 형광 응답을 시험하였다 (하기 도 3b).
- [0062] 시스테인(100 μ M)을 프로브 1의 용액에 첨가하자 형광이 유의하게 증가하였으며(약 13배), 이는 OPM을 사용하여 얻은 결과와 일치하였다. 따라서, 프로브 1은 OPM과 TPM 모두를 통하여 살아 있는 개체에서 시스테인을 형광 이미징하는 데 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [0064] 실험예 5
- [0065] 이러한 특성을 고려하여, 프로브 1이 살아 있는 세포 내에서 시스테인을 선택적으로 이미징할 수 있는 능력을 조사하기 위해 일련의 세포 기반 실험들을 수행하였다.
- [0066] 하기 도 3a에서 보는 바와 같이, 살아 있는 HepG2 세포로 인큐베이션하였을 때 (1 시간), 프로브 1 (10 μ M)의 세포 투과성은 좋았으며 세포독성은 최대 50 μ M (하기 도 3c)로 낮았다. 더 나아가, 밝은 초록색 형광이 살아

있는 HepG2 세포 속에서의 세포내 시스테인 분포를 보여주었다. 이 초록색 형광은 세포내 시스테인 농도가 *N*-ethylmaleimide(NEM, 티올 특이적 저해제)에 의해 감소하였을 때 유의미하게 감소하였으며 포도당이 없는 배지에서 세포를 인큐베이션하여 세포 내 시스테인이 축적되도록 하였을 때 증가하였다(하기 도 3a의 (b) 및 (c), 도 3d).

[0067] 이러한 결과들은 세포 내에서 측정된 형광의 변화가 프로브 1과 세포내 시스테인의 반응에 의한 것임을 입증하여 주는 것이다.

[0068] 본 발명의 발명자들은 또한 TPM을 사용하여 살아 있는 HepG2에 대한 이미징 연구를 실시하였다 (하기 도 3e). TPEF 이미지는 740 nm에서의 여기 조건하에서 기록하였다. 이러한 결과들은 프로브 1을 사용하여 OPM과 TPM 둘 모두를 사용하여 높은 민감도와 선택도로 내생적 시스테인 농도를 추적할 수 있음을 보여주는 것이다.

[0070] 실험예 6

[0071] 프로브 1을 세포내 시스테인 측정에 실용적으로 사용할 수 있는지를 여러 암 세포주를 사용하여 조사하였다. 프로브를 사용하여 모든 시험된 세포들에서 시스테인을 측정할 수 있었으며, 공초점 이미지들을 하기 도 4a와 하기 도 4b에 나타내었다. 평균 형광 강도를 측정하여 각 세포주에 대해 이전에 보고된 자료들과 비교하였다 (하기 도 4b).

[0072] 이들 중에서 HeLa 세포가 가장 높은 형광 응답을 보였다. 관찰된 형광의 차이는 이전 문헌에 보고된 시스테인 농도의 차이와 일치하였다. 따라서, 프로브 1은 여러 암 세포주에서 시스테인의 변화를 정확하게 탐지할 수 있다.

[0074] 실험예 7

[0075] 이러한 특징을 확인한 이후에, 본 발명의 발명자들은 다양한 냉동 보관 쥐 조직들에서 내생적 시스테인을 시각화하는 데 프로브 1을 적용하였다. 하기 도 5a에서 확인할 수 있는 바와 같이, 여러 기관 (간, 이자, 신장, 심장, 고환) 및 야생형 암 조직들과 이중 이식 생쥐에서 온 순간 냉동된 조직들을 10 μ M 농도의 프로브 1로 2시간 동안 염색하였다.

[0076] OPM과 TPM을 사용하였을 때, 암 조직들 (도 5a의 (a))과 간 조직들 (도 5a 및 도 5b의 (a))에서 강한 형광이 관찰되었는데, 이들은 상당한 양의 시스테인을 발현하는 것으로 알려져 있다. 또한, 본 발명의 결과 데이터(도 5a 및 도 5b)는 시스테인의 농도 범위가 다양한 쥐 조직에서 10 ~ 100 mM 정도이며 간에서의 농도가 가장 높다는 기존의 연구 결과와 일치한다. 더 나아가, OPM과 TPM으로 탐지한, 암 조직과 여러 종류의 기관 (간, 심장, 이자, 고환)의 조직에서의 형광 강도는 세포내 시스테인에 대해 탐지한 형광 강도와 비슷했는데, 하지만 일반적으로 TPM은 분리 해상도가 떨어진다. 따라서, 본 발명의 발명자들은 조직 침투 깊이가 더 깊지만 광독성은 더 낮은 3차원 TPM을 사용하여 생물학적 조건하에서 암 조직 내 자연적 시스테인 분포를 밝히는 데 프로브 1을 적용하였다. 프로브 1을 사용하여 암 조직을 염색한 후, Z형 단면을 가진 일련의 이광자 이미지들 (30개 단면)을 얻었다. 3차원 TPM 이미지들은 깊이 범위 10에서 60 μ m에서 밝은 부분과 어두운 부분 사이의 차이를 잘 보여주었다 (도 5a의 (k)).

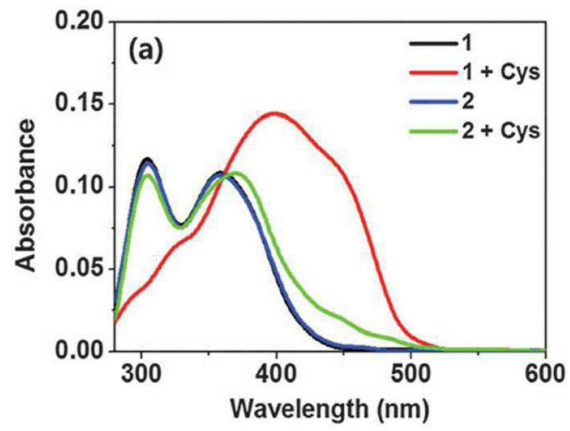
[0078] 이전에 암 세포에서 티올이 발현된다는 보고가 있었지만 살아 있는 암 세포의 내부 혹은 건강한 기관의 심부에서는 잘 발견되지 않았다.

[0079] 본 발명의 발명자들은 생물 시편에서 시스테인을 고선택성, 고민감성, 저독성으로 측정하기 위한 새로운 이광자 형광 프로브를 개발하였으며, 본 발명에 따른 프로브 1은 여러가지 살아 있는 암 세포 내에서, 그리고 냉동절개된 암 조직 내 60 μ m의 심부에서, 세포 내 시스테인 변화를 모니터링할 수 있다.

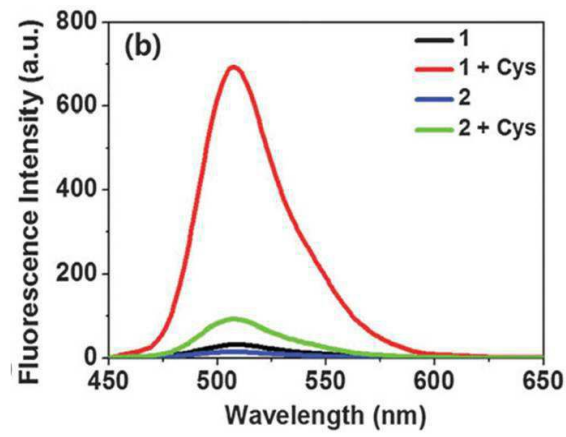
[0080] 이와 같이 깊은 조직 침투성과 낮은 광-세포독성 때문에, 프로브 1을 사용하는 TPM을 통해 다른 생물학적으로 관련된 물질의 간섭 없이 살아 있는 조직 내 시스테인 분포를 선택적으로 확인할 수 있다. 결론적으로, 본 발명에 따른 형광 프로브는 세포내 시스테인 인식을 위한 효율적인 도구로 활용할 수 있으며, 암 진단과 같은 다양한 생물학적 및 임상학적 응용 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

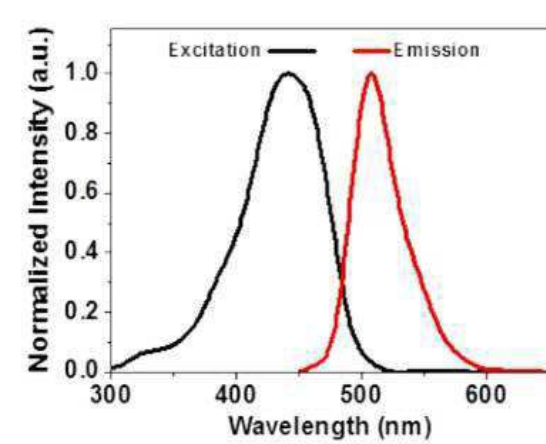
도면1a



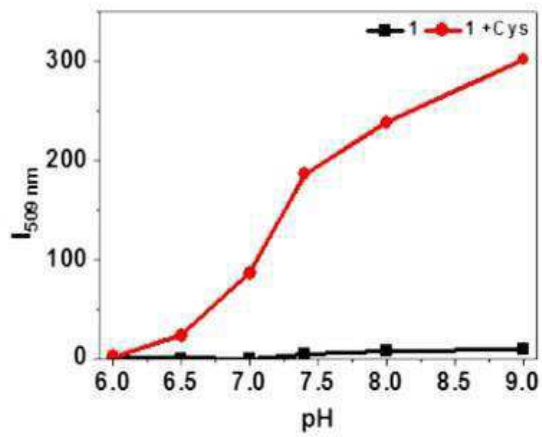
도면1b



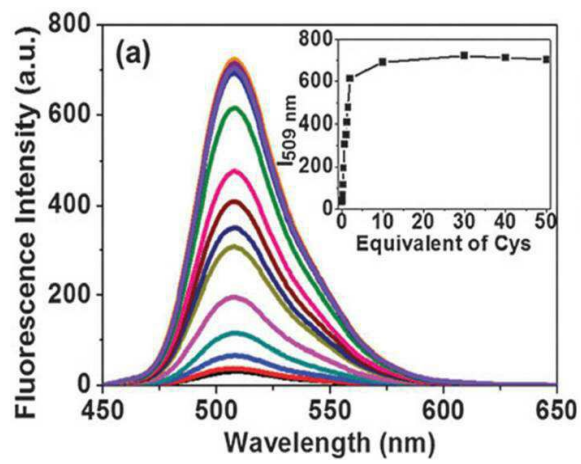
도면1c



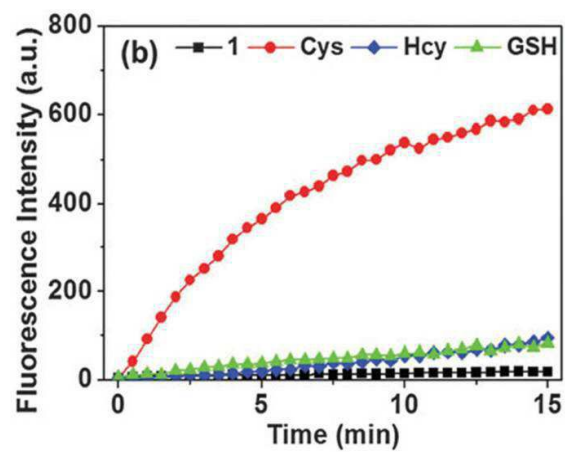
도면1d



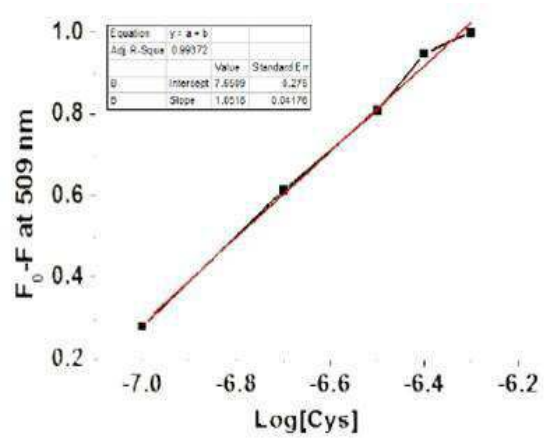
도면2a



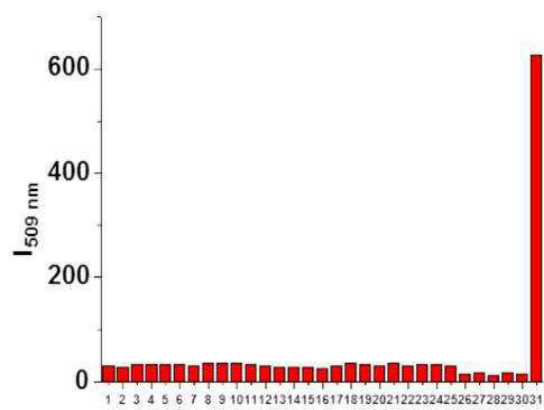
도면2b



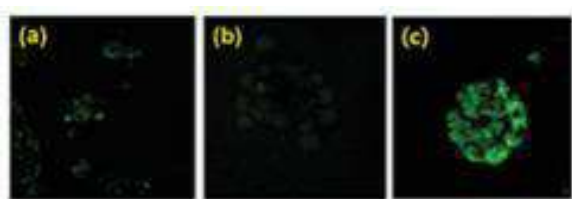
도면2c



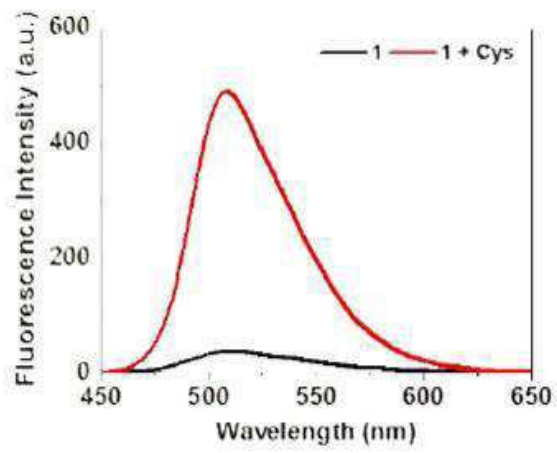
도면2d



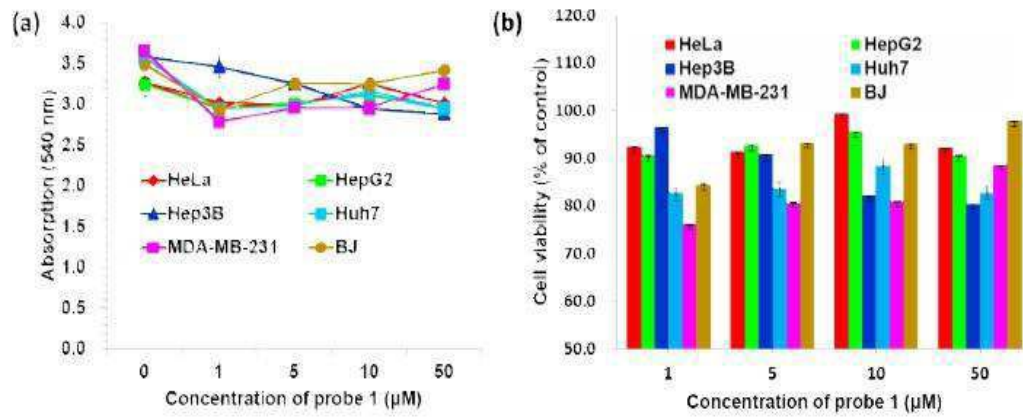
도면3a



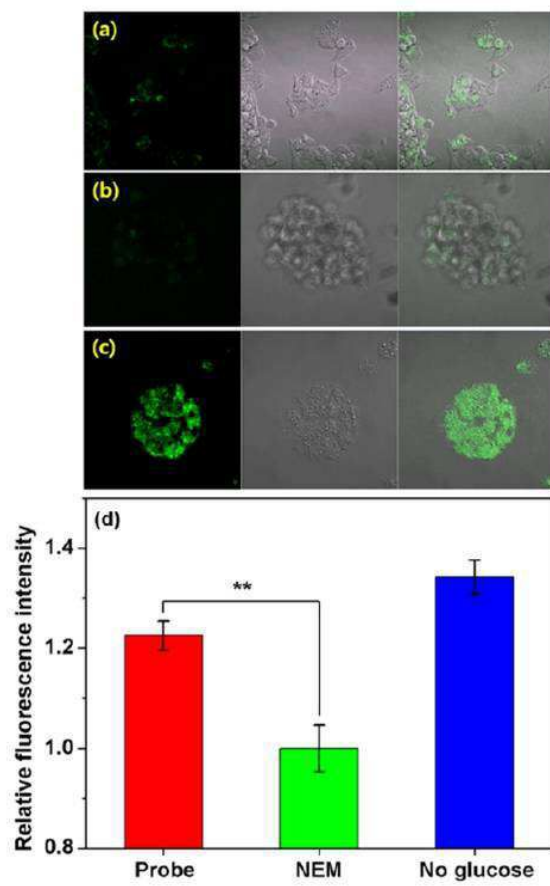
도면3b



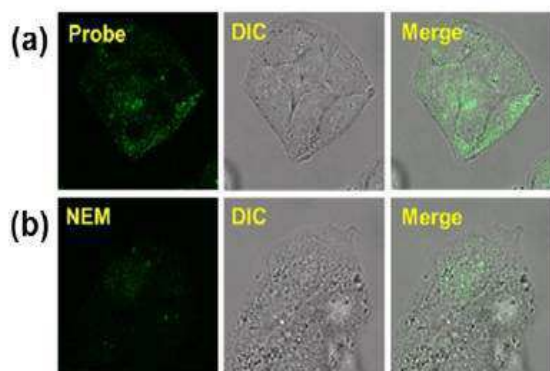
도면3c



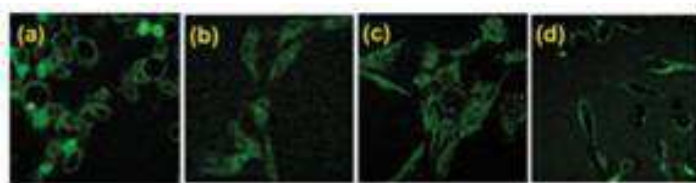
도면3d



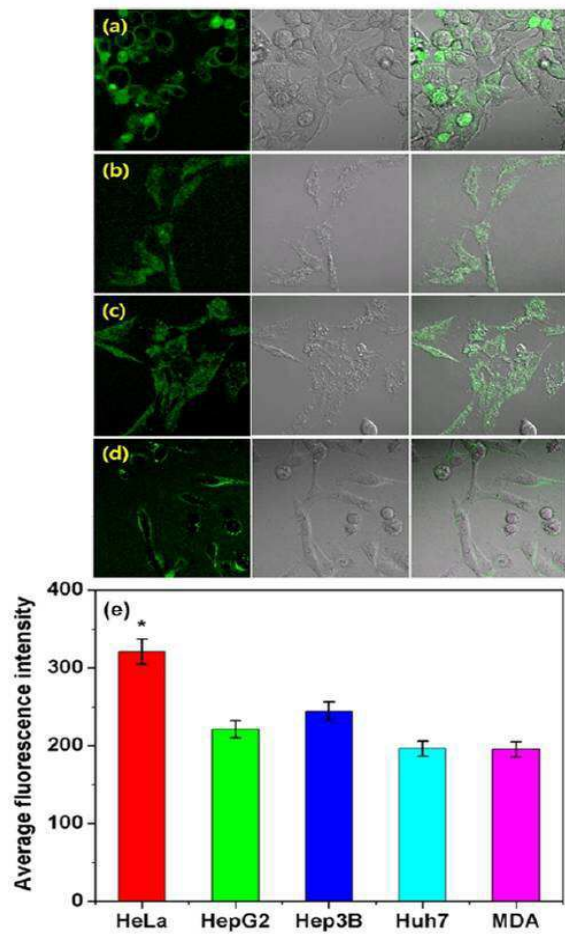
도면3e



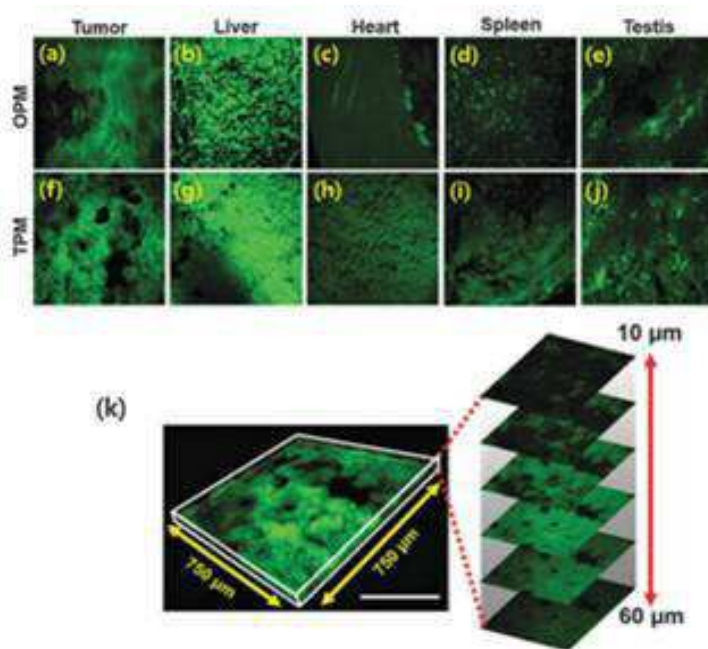
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

