



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월06일
(11) 등록번호 10-1915744
(24) 등록일자 2018년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 209/04 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
C09B 57/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 209/04 (2013.01)
A61K 49/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0040711
(22) 출원일자 2017년03월30일
심사청구일자 2017년03월30일
(65) 공개번호 10-2018-0110858
(43) 공개일자 2018년10월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150049824 A*
WO2011123742 A1*
KR1020160140556 A
KR1020100115301 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)바이오엑츠
인천광역시 남동구 호구포로74번길 53 (고잔동)
(72) 발명자
박진우
인천광역시 연수구 원인제로 180, 205동 1601호(연수동, 연수우성2차아파트)
장수정
경기도 시흥시 은행로 232, 104동 1202호 (대야동, 서강아파트)
신경립
인천광역시 남동구 논현로 106, 609동 1301호(논현동, 어진마을한화꿈에그린6단지아파트)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김은희

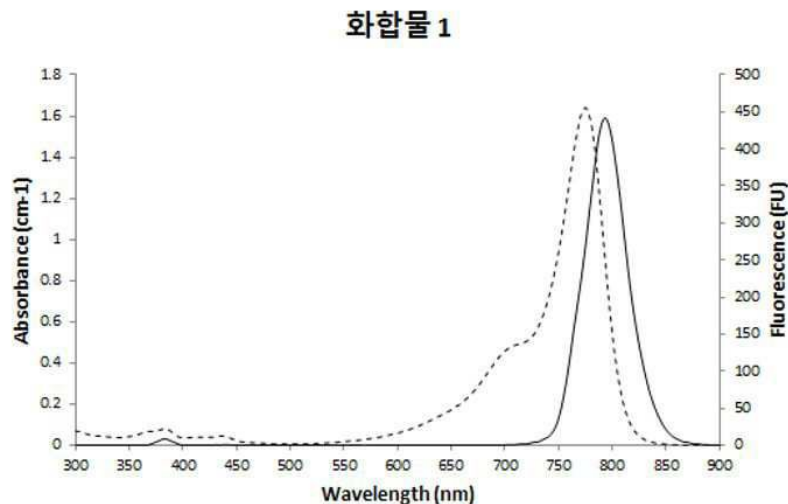
(54) 발명의 명칭 염료 화합물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 생체 분자에 표지가 된 이후에 장시간 보관하더라도 초기의 형광 특성을 그대로 유지하여 보관 안정성이 뛰어난 염료 화합물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 염료 화합물은 단백질 또는 항체 등과 같은 생체분자에 표지된 후 장시간 보관하더라도 초기의 형광 특성을 그대로 유지할 뿐만 아니라, 온도 및 수분 등의 보관 안정성 측면에서도 뛰어난 효과를 나타낸다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C09B 57/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2273552

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 중소기업융복합기술개발사업

연구과제명 고감도 근적외선 형광소재 및 고해상도 광학모니터링 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)바이오엑츠

연구기간 2015.06.16 ~ 2017.06.15

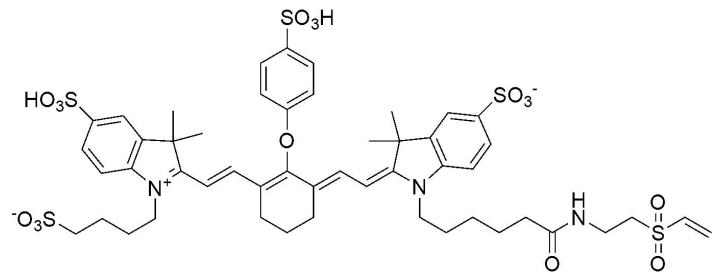
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1a로 표시되는 것을 특징으로 하는 화합물:

[화학식 1a]



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 따른 화합물을 포함하는 염료.

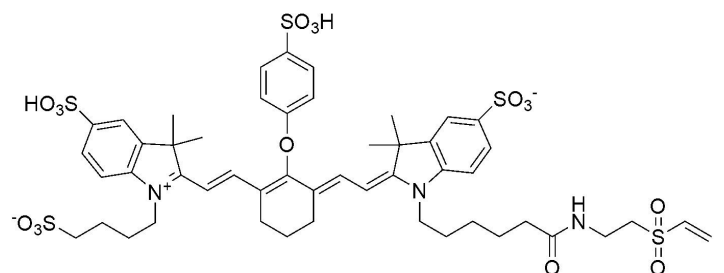
청구항 5

제4항에 따른 염료를 포함하는 생체분자 염색용 조성물.

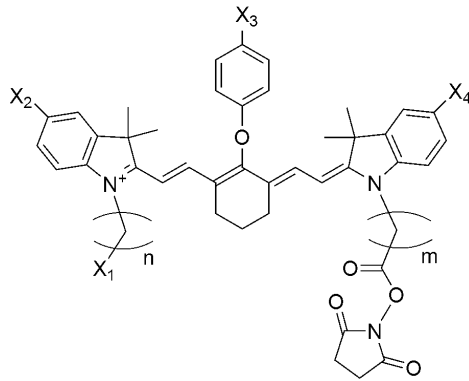
청구항 6

하기 화학식 2의 화합물을 4-aminobutane-1-sulfonyl chloride와 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 하기 화학식 1a로 표시되는 화합물의 제조방법:

[화학식 1a]



[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 서로 동일하거나 상이하며 각각 독립적으로 SO_3H 또는 SO_3^- 이고,

상기 n 은 1 내지 5, m 은 1 내지 6, l 은 1 내지 5의 정수이다.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 반응은 N,N-다이소프로필에틸아민을 추가로 투입하고, 1 내지 20 시간 동안 20 내지 30 °C의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 화합물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 분자에 표지가 된 이후에 장시간 보관하더라도 초기의 형광 특성을 그대로 유지하여 보관 안정성이 뛰어난 염료 화합물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체물질 자체는 가시광 및 근적외 영역의 형광이 미약하거나 없으므로 바이오 분야에서는 생체 내/외에서 세포 및 세포 이하 단계에서의 생물학적인 현상을 관찰하거나 생체 내로 투여되어 조영 및 질환 부위의 광학 영상을 얻기 위해서 생체물질에 형광 염료 또는 형광 염료가 미리 표지된 생체적합성 물질을 광학장치와 함께 활용하는 다양한 방법을 통해 영상화한 자료를 얻고 있다.

[0003] 바이오 분야에서 사용되는 다양한 광학 분석(optical analysis) 장비들은 내장된 광원 및 필터에 따라 형광을 관찰하기에 적합한 여기 파장(excitation wavelength) 및 형광 파장(emission wavelength)를 가진 형광 염료를 기본 소재나 시약으로 선택하게 된다.

[0004] 주로 사용되는 광학 분석 장비로는 세포 관찰을 위한 형광 현미경(fluorescence microscope), 공초점 현미경(confocal microscope), 유세포분석기(flow cytometer), 마이크로 어레이(micro array), 정량 중합효소 연쇄반응 장치(qualitative PCR system), 핵산 및 단백질 분리, 분석을 위한 전기영동(electrophoresis) 장치, 실시간 생체 내 영상 장비(in vivo imaging system) 등 연구 목적의 장비 외에도, 면역 분석 기법(immuno assay)이나 PCR 분석 및 통계 기술이 접목된 핵산 및 단백질 진단 키트(또는 바이오칩) 기반 체외 진단(in vitro diagnosis) 장비와 의료 영상 수술(image-guided surgery)을 위한 수술대 및 내시경 장비 등의 진단 및 치료를 위한 것들이 알려져 있으며, 지속적으로 새로운 응용 분야 및 더 높은 수준의 해상도 및 데이터 처리 능력을 가진 장비가 개발되고 있다.

[0005] 바이오 분야에 이용 가능한 형광 염료 선별에는 생체 분자들이 존재하는 매질, 즉, 수용액 및 수용성 버퍼 내에 존재할 때 강한 형광을 내는 것과 형광 장비에 맞는 여기 및 형광 파장을 갖는 것이 중요하다.

[0006] 종래의 염료 화합물은 보관 안정성 측면에서 불안정할 뿐만 아니라 생체 분자에 표지된 후에는 시간이 경과함에 따라 보관 안정성과 함께 형광 특성이 급격히 저하되는 문제점을 나타낸다. 따라서, 이를 극복하기 위한 연구가 절실한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1023217호

발명의 내용

해결하려는 과제

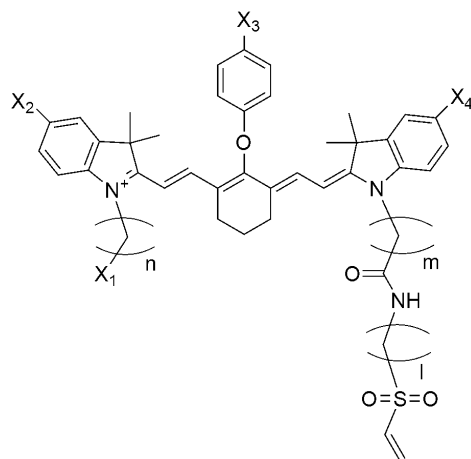
[0008] 종래의 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 목적은 생체 분자에 표지된 이후에 장시간 보관하더라도 초기의 형광 특성을 그대로 유지할 수 있는 염료 화합물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 상술한 생체 분자에 표지된 염료는 초기 형광 특성을 그대로 유지함과 동시에 온도 및 수분 등에 대한 보관 안정성 측면에서도 현저한 효과를 나타내는 염료 화합물 및 이의 제조방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 대표적인 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 관한 것이다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

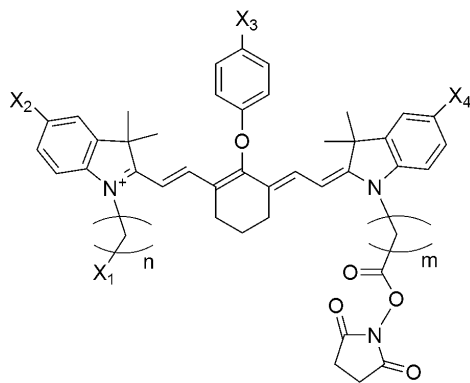
[0013] (단, 상기 화학식 1에서,

[0014] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 서로 동일하거나 상이하며 각각 독립적으로 SO_3H 또는 SO_3^- 이고,

[0015] 상기 n 은 1 내지 5, m 은 1 내지 6, l 은 1 내지 5의 정수이다.)

[0016] 본 발명의 다른 대표적인 일 측면에 따르면, 하기 화학식 2의 화합물을 비닐 술폰과 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

[0017] [화학식 2]



[0018]

[0019] (단, 상기 화학식 2에서,

[0020] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 서로 동일하거나 상이하며 각각 독립적으로 SO_3H 또는 SO_3^- 이고,

[0021] 상기 n 은 1 내지 5, m 은 1 내지 6, l 은 1 내지 5의 정수이다.)

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 염료 화합물은 단백질 또는 항체 등과 같은 생체분자에 표지된 이후에 장시간 보관하더라도 초기의 형광 특성을 그대로 유지할 뿐만 아니라, 온도 및 수분 등의 보관 안정성 측면에서도 뛰어난 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 제조예(화합물 a, b)에 대한 흡수 및 형광 스펙트럼을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

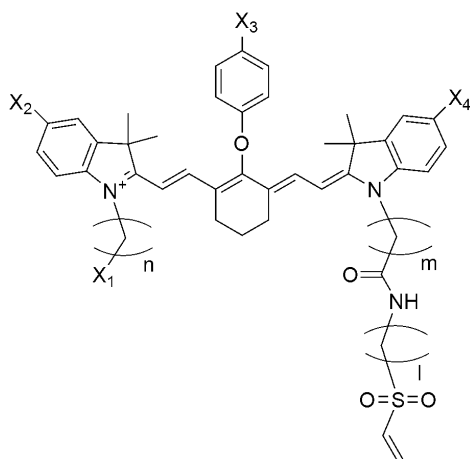
도 2는 실시예(화합물 1)에 대한 흡수 및 형광 스펙트럼을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.

[0025] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 개시된다.

[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 상기 화학식 1에서,

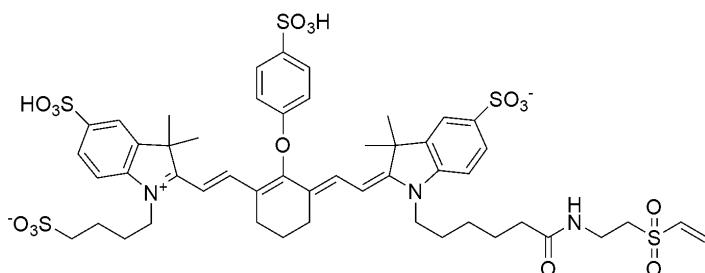
[0029] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 서로 동일하거나 상이하며 각각 독립적으로 SO_3H 또는 SO_3^- 이고, 상기 n 은 1 내지 5, m 은 1 내지 6, l 은 1 내지 5의 정수이다.

[0030] 종래의 단백질 또는 항체 등과 결합된 염료는 단백질에 표지한 후에 장시간 보관하게 되면 광학 특성(형광 특성)이 떨어지는 현상을 나타낼 뿐만 아니라, 보관 안정성이 시간이 지날수록 급격히 저하되는 문제점을 나타내었다.

[0031] 이에, 본 발명에서는 단백질 또는 항체에 표지된 염료를 장시간 보관하더라도 초기의 형광 특성을 그대로 유지할 뿐만 아니라, 보관 안정성 측면에서도 효과적인 염료를 제공하고자 한다.

[0032] 본 발명에 의하면, 상기 화학식 1로 표시되는 다른 화합물과는 달리 하기 화학식 1a로 표시되는 화합물은 인체에 무해한 용매인 증류수에 용해가 가능하고, 특정 분석에 국한되지 않고 넓은 범위의 분석에 응용시킬 수 있다는 점을 확인하였다.

[0033] [화학식 1a]



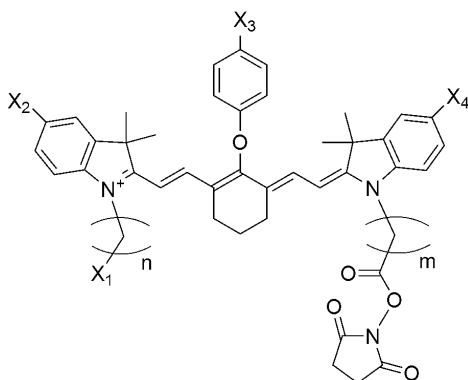
[0034]

[0035] 특히, 화학식 1a로 표시되는 화합물은 다른 화학식 1의 화합물과는 달리 pH=5에서는 낮은 흡수과장과 낮은 형광과장 세기를 나타내었으며, pH=7에서 높은 흡수과장 세기 및 높은 형광과장 세기를 나타내었고 흡수과장 위치도 차이를 나타내는 등, pH에 따라 광학 특성이 다르기 때문에 체내 pH의 변화를 관측할 목적으로 사용할 경우 우수한 성능을 보일 수 있음을 확인하였다. 체내의 pH 변화는 세포의 증식, 세포사멸, 근육 수축 등의 현상과 관계가 깊으므로, pH 변화를 측정함으로써 세포 내 인터널리제이션 경로(cellular internalization pathways)에 관한 연구를 진행할 수 있을 뿐 아니라, 암세포 및 알츠하이머와 같은 질병에서도 비정상적인 pH 변화의 관측을 할 수 있다는 점에서 상기 화학식 1a의 화합물은 큰 장점을 지닌다고 할 수 있다.

[0036] 또한, 다른 화학식 1의 화합물이 생체 분자에 표지된 이후 시간이 경과 할수록 D/P(Dye/Protein) ratio 값이 감소 되는 것과는 달리, 상기 화학식 1a의 화합물은 생체분자에 표지된 후 6시간이 경과 한 후에도 상기 D/P 값이 전혀 감소 되지 않음을 확인하였다.

[0037] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하기 화학식 2의 화합물을 비닐 술폰과 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법이 개시된다.

[0038] [화학식 2]



[0039]

[0040] 상기 화학식 2에서 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 서로 동일하거나 상이하며 각각 독립적으로 SO_3H 또는 SO_3^- 이고, 상

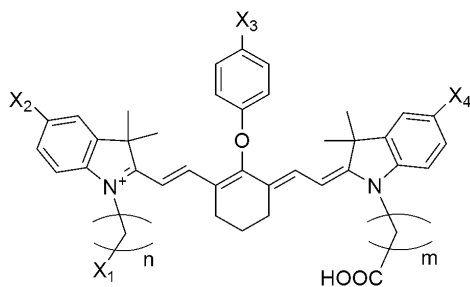
기 n은 1 내지 5, m은 1 내지 6, l은 1 내지 5의 정수이다.

[0041] 본 발명에 의하면, 상기 화학식 1의 화합물은 상기 화학식 2의 화합물과 비닐 술폰과 반응시켜 제조될 수 있으며, 추가로 N,N-다이소프로필에틸아민을 투입하여 반응시킬 수도 있다.

[0042] 상기 화학식 1의 화합물을 제조하기 위한 반응은 1 내지 20 시간 동안 20 내지 30 °C의 온도에서 수행될 수 있으며, 상기 반응 종료 후 반응물은 추출 용매를 이용하여 석출시키고, 상기 석출된 입자를 정제하여 목적하는 화합물을 얻을 수 있다.

[0043] 한편, 상기 화학식 2의 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물과 N,N-디숙시니미딜 카보네이트와 반응시켜 제조될 수 있으며, 추가로 N,N-다이소프로필에틸아민을 투입하여 반응시킬 수도 있다.

[0044] [화학식 3]

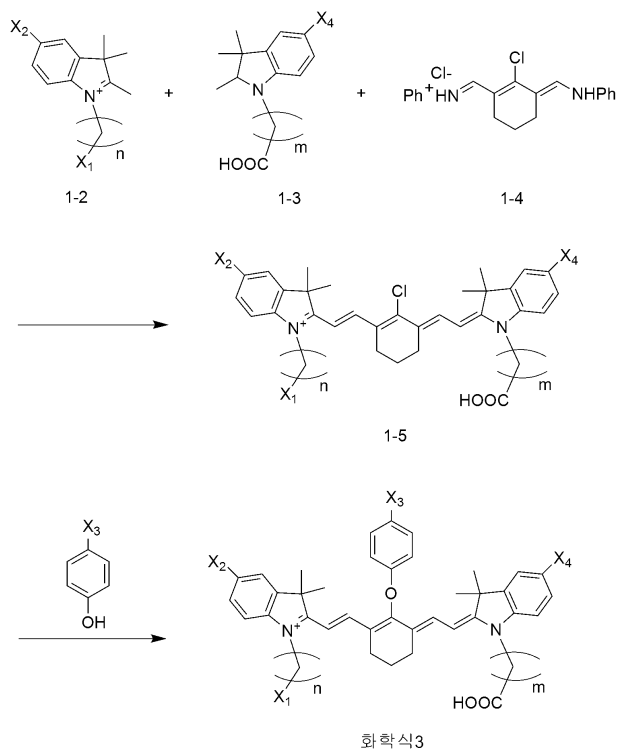


[0045] 보다 상세하게는, 상기 화학식 2의 화합물을 제조하기 위한 반응은 10 내지 100 분 동안 30 내지 50 °C의 온도에서 수행될 수 있으며, 반응 종료 후 반응물의 온도를 상온으로 냉각시킨 다음 추출 용매를 이용하여 석출시키고, 상기 석출된 입자를 건조시켜 제조될 수 있다.

[0047] 또한, 상기 화학식 3의 화합물의 제조방법을 간략하게 표현하면 하기 반응식 1로 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 보다 상세하게는, 하기 반응식 1에서 보는 바와 같이, 먼저 화합물 1-2, 1-3 및 1-4를 반응시켜 화합물 1-5를 제조한다. 그리고, 상기 화합물 1-5에 X3가 치환된 페놀기를 투입하여 반응시키고, 상기 반응이 종료된 후에 반응물의 온도를 상온으로 냉각시킨 다음 추출 용매를 이용하여 석출시키고, 석출된 입자를 정제하여 화학식 3의 화합물을 제조할 수 있다.

[0049] [반응식 1]



[0050]

[0051] 앞서 상술한 상기 추출 용매는 통상의 추출용매와 방법을 이용하여 수행될 수 있는데, 상기 추출 용매로는 에틸 아세테이트 또는 디에틸 이서 등을 이용할 수 있다.

[0052] 또한, 앞서 상술한 상기 정제는 통상의 정제 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 실리카겔 컬럼크로마토그래피법 또는 재결정법을 이용할 수 있다.

[0053] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0054] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

[0055] (제조예 1: 화합물 a의 제조)

[0056] 1. 화합물 1-1의 합성

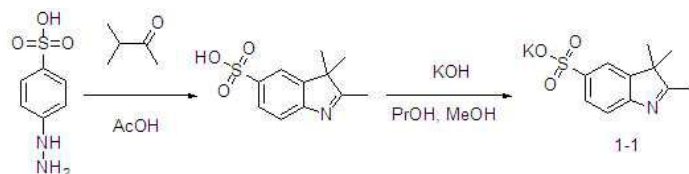
[0057] p-히드라지노벤젠설폰산(p-Hydrazinobenzenesulfonic acid, 10 g, 53 mmol, 1 eq, Aldrich)과 3-메틸-2-부탄온 (3-Methyl-2-butanone, 17.18 mL, 160 mmol, 3.02 eq, TCI)을 아세트산 30 mL에 가한 후, 4 시간 동안 가열 환류하며 반응시켰다. 반응이 완료된 후 상온으로 냉각시키고, 생성된 고체 입자를 여과하였다. 그리고 에틸아세테이트(Ethyl acetate)로 2, 3회 세정한 후 감압 건조시켜 고체물질 11.34 g(89%)을 합성하였다.

[0058] R_f = 0.68 (역상, C18, 아세토니트릴/물 1:4 v/v)

[0059] 수산화칼륨(1.427 g, 25.4 mmol, 1.2 eq)을 프로판올(n-Propanol) 35 mL에 용해시키고, 여기에 앞에서 얻은 상기 고체 물질(5.073 g, 21.2 mmol, 1 eq)을 메탄올(Methanol) 35 mL에 용해시켜 적가한 후, 상온에서 24 시간 교반하고 여과함으로써 노란색의 고체 입자 5.35 g(90%)를 얻었다.(5.35 g, 90%)

[0060] R_f = 0.68 (역상, C18, 아세토니트릴/물 1:4 v/v)

[0061] [반응식 2]



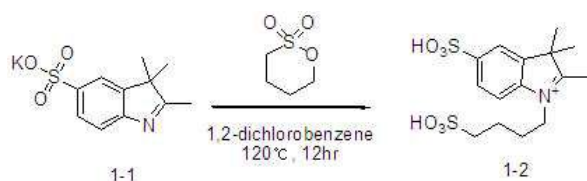
[0062]

[0063] 2. 화합물 1-2의 합성

[0064] 상기 화합물 1-1(6 g, 21.6 mmol, 1 eq)과 1,4-부탄설통(1,4-Butanesultone, 6.4 mL, 68.9 mmol, 3.01 eq, TCI), 아세트산 나트륨(Sodium acetate, 2.1 g, 25.9 mmol, 1.2 eq)을 아세토나이트릴(Acetonitrile) 10 ml에 가한 후, 12 시간 동안 100 °C에서 가열 환류하며 반응시켰다. 반응이 완료된 후 상온으로 냉각시키고, 용매를 제거한 후 생성된 고체 입자를 여과하여 에틸아세테이트로 2, 3회 세정한 후 감압 건조함으로써 화합물 1-2(5 g, 61.6 %)를 얻었다.

[0065] $R_f = 0.31$ (정상, 실리카겔, 이소부탄올:프로판올:에틸아세테이트:증류수=2:4:1:3 v/v)

[0066] [반응식 3]



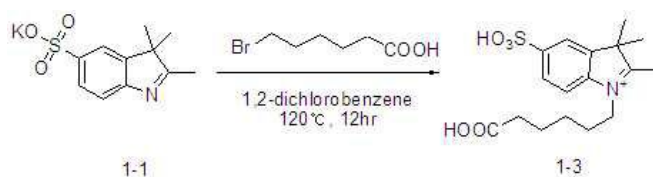
[0067]

[0068] 3. 화합물 1-3의 합성

[0069] 상기 화합물 1-1 (5 g, 20.9 mmol, 1 eq)과 6-브로모헥사노익 산(6-Bromohexanoic acid, 8.1 g, 41.8 mmol, 2 eq, TCI)을 1,2-다이클로로벤젠(1,2-Dichlorobenzene) 20 ml에 가한 후, 12 시간 동안 120 °C의 온도에서 가열 환류하며 반응시켰다. 반응이 완료된 후 상온으로 냉각시키고, 용매를 제거한 후 생성된 고체 입자를 여과하여 에틸아세테이트로 2, 3회 세정한 후 감압 건조함으로써 화합물 1-3(5.2 g, 70.3 %)을 얻었다.

[0070] $R_f = 0.23$ (정상, 실리카겔, 이소부탄올:프로판올:에틸아세테이트:증류수=2:4:1:3 v/v)

[0071] [반응식 4]



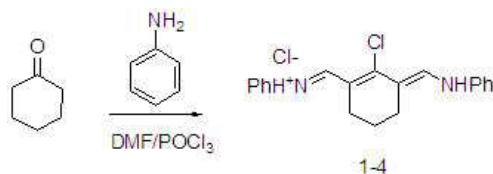
[0072]

[0073] 4. 화합물 1-4의 합성

[0074] N,N-다이메틸포름아마이드(DMF, N,N-Dimethylformamide, 60.8 ml, 2 mol, 5 eq, 덕산)와 디클로로메탄(Dichloromethane) 40 ml을 혼합하고 온도를 0 °C로 냉각시켰다. 디클로로메탄 40 ml에 포스포러스 옥시클로라이드(Phosphorus oxychloride, 45.2 ml, 1.5 mol, 3.7 eq, Aldrich)를 용해시킨 후 상기 냉각시킨 용액에 10분 동안 적가한 후, 여기에 디클로로메탄 60 ml에 싸이클로헥사논(Cyclohexanone, 11.7 ml, 0.4 mol, 1 eq, Aldrich)을 용해시킨 용액을 10분 동안 적가하였다. 그리고 3시간 동안 가열 환류시킨 뒤 상온으로 냉각시키고, 아닐린(Aniline, 31.0 ml, 1.0 mol, 2.7 eq, Aldrich)을 넣고 추가로 1시간 동안 상온에서 교반한다. 반응이 완료된 후, 50 ml의 증류수를 혼합 용액에 넣고 냉장 보관 한 후 생성된 어두운 보라색 침전을 여과하여 감압 건조함으로써 화합물 1-4(38 g, 26 %)를 얻었다.

[0075] $R_f = 0.99$ (정상, 실리카겔, 이소부탄올:프로판올:에틸아세테이트:증류수=2:4:1:3 v/v)

[0076] [반응식 5]



[0077]

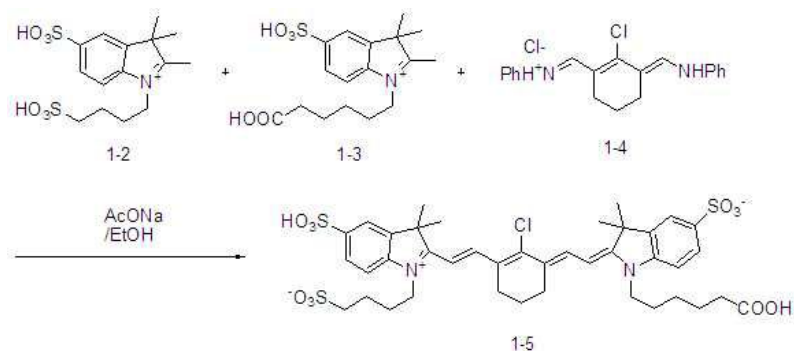
[0078] 5. 화합물 1-5의 합성

[0079] 상기 화합물 1-2(941 mg, 2.67 mmol, 1 eq)과 상기 화합물 1-3(1 g, 2.67 mmol, 1 eq), 상기 화합물 1-4(862 mg, 2.67 mmol, 1 eq), 및 아세트산 나트륨(Sodium Acetate, 438 mg, 5.34 mmol, 2 eq, 덕산)을 에탄올(Ethanol) 20 ml에 가한 후, 2 시간 동안 50 °C의 온도에서 가열하며 반응시켰다. 반응이 완료된 후 상온으로 냉각시키고, 용매를 제거한 후 생성된 고체 입자를 여과하고, 에틸아세테이트로 2, 3회 세정한 후 감압 건조시켜 화합물 1-5(180 mg, 7.8 %)를 얻었다.

[0080] $R_f = 0.45$ (정상, 실리카겔, 이소부탄올:프로판올:에틸아세테이트:중류수=2:4:1:3 v/v)

[0081] LC/MS, 계산치 $C_{40}H_{48}ClN_2O_{11}S_3^-$ 863.21, 측정치 863.0

[0082] [반응식 6]



[0083]

[0084] 6. 화합물 a의 합성

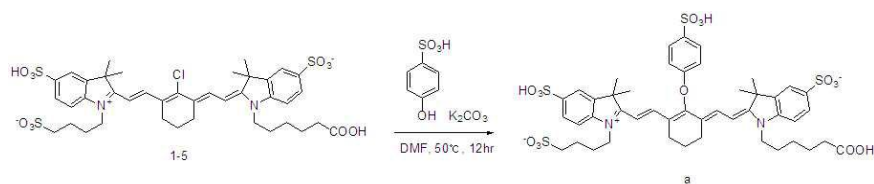
[0085] 상기 화합물 1-5(160 mg, 0.186 mmol, 1 eq)와 소듐 4-하이드로시벤젠-설포네이트(Sodium 4-Hydroxybenzene-sulfonate dihydrate, TCI, 146 mg, 0.74 mmol, 4 eq), 및 포타슘 카보네이트(Potassium carbonate, 51 mg, 0.372 mmol, 2 eq, 덕산)를 다이메틸포름아마이드 5 ml에 가한 후 12 시간 동안 50 °C의 온도에서 가열하며 반응시켰다. 반응이 완료된 후 상온으로 냉각시키고, 다이에틸 이서로 입자를 잡은 뒤 2, 3회 세정한 후 감압 건조시켰다.(5 g, %) 그리고 아세토니트릴 수용액을 전개액으로 RP-C18 역상 크로마토그래피로 정제하여 순수한 화합물 a(83 mg, 44.6 %)를 얻었다.

[0086] $R_f = 0.26$ (정상, 실리카겔, 이소부탄올:프로판올:에틸아세테이트:중류수=2:4:1:3 v/v)

[0087] LC/MS, 계산치 $C_{46}H_{53}N_2O_{15}S_4^-$ 1001.23, 측정치 1001.0

[0088] 1H NMR (500 MHz, D₂O) : δ 8.110-8.079(t, 4H, J = 8Hz), δ 7.969-7.918(t, 1H), δ 7.890-7.859(t, 1H), δ 7.833-7.734(m, 3H), δ 7.656-7.629(t, 1H), δ 7.610-7.578(t, 1H, J = 8Hz), δ 7.377-7.318(m, 2H), δ 6.292-6.204(q, 1H, J = 14Hz), δ 4.144(s, 3H), δ 3.790-3.765(t, 4H), δ 3.376(s, 2H), δ 3.002-2.971(t, 1H), δ 2.940(s, 1H), δ 2.884(s, 1H), δ 2.753(s, 3H), δ 2.090(s, 1H), δ 1.965-1.832(m, 8H), δ 1.656-1.626(t, 2H, J = 7Hz), δ 1.382-1.271(m, 8H), δ 1.182(s, 1H), δ 1.144-1.119(t, 1H, J = 6.5Hz)

[0089] [반응식 7]



[0090]

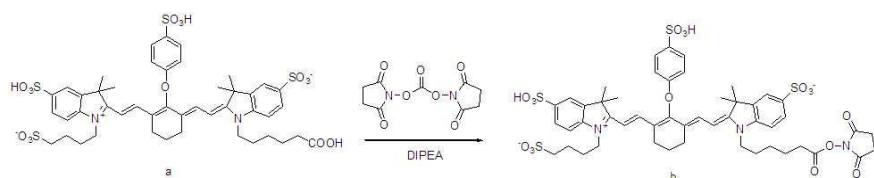
[0091] (제조예 2: 화합물 b의 제조)

[0092] 상기 제조예 1의 화합물 a(50 mg, 0.05 mmol, 1 eq)와 N,N-다이석시니미딜 카보네이트(DSC, N,N-Disuccinimidyl carbonate, 38.4 mg, 0.15 mmol, 3 eq, TCI), 및 N,N-다이아이소프로필에틸아민(DIPEA, N,N-Diisopropylethylamine, 87 μ l, 0.5 mmol, 10 eq, TCI)을 다이메틸포름아마이드 6 ml에 가한 후, 1 시간 동안 40 $^{\circ}$ C의 온도에서 가열하며 반응시켰다. 반응이 완료된 후 상온으로 냉각시키고, 다이에틸 이서를 이용하여 입자를 잡은 뒤 생성된 고체 입자를 감압 건조시켜 화합물 b(38.4 mg, 70%)를 얻었다.

[0093] Rf = 0.67 (정상, 실리카겔, 이소부탄올:프로판올:에틸아세테이트:중류수=2:4:1:3 v/v)

[0094] LC/MS, 계산치 $C_{50}H_{56}N_3O_{17}S_4^-$ 1098.25, 측정치 1098.3

[0095] [반응식 8]



[0096]

[0097] (실시예: 화합물 1의 제조)

[0098] 상기 제조예 2의 화합물 b(38.4 mg, 0.035 mmol, 1 eq)에 4-aminobutane-1-sulfonyl chloride(28 mg, 0.11 mmol, 3 eq, BioActs), 및 N,N-다이아이소프로필에틸아민(DIPEA, N,N-Diisopropylethylamine, 61 μ l, 0.35 mmol, 10 eq, TCI)을 다이메틸포름아마이드 6 ml에 가한 후, 12 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 완료된 후 다이에틸 이서를 이용하여 입자를 잡은 뒤 생성된 고체 입자를 감압 건조하였다. 그리고 아세토니트릴 수용액을 전개액으로 RP-C18 역상 크로마토그래피로 정제하여 순수한 화합물 1(10 mg, 25.6%)을 얻었다.

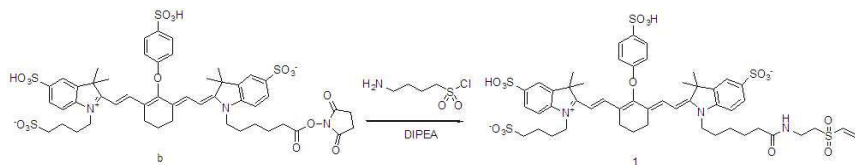
[0099] Rf = 0.28 (정상, 실리카겔, 이소부탄올:프로판올:에틸아세테이트:중류수=2:4:1:3 v/v)

[0100] LC/MS, 계산치 $C_{50}H_{60}N_3O_{16}S_5^-$ 1118.26, 측정치 1118.0

[0101] 1H NMR (500 MHz, D_2O) : δ 8.020-7.998(s, 1H), δ 7.833-7.752(q, 2H, J = 14Hz), δ 7.641-7.590(q, 6H), δ 7.366-7.350(d, 1H J = 8Hz), δ 7.272-7.255(d, 1H, J = 8.5Hz), δ 7.105-7.090(d, 2H, J = 7.5Hz), δ 7.016-6.963(m, 1H), δ 6.275-6.237(q, 3H), δ 6.145-6.117(d, 1H, J = 14Hz), δ 4.139-4.069(m, 7H), δ 3.371-3.333(q, 2H), δ 3.247-3.168(q, 2H), δ 2.734-2.700(m, 4H), δ 2.544(s, 2H), δ 2.043-2.014(t, 2H, J = 7Hz), δ 1.944(s, 2H), 1.748(s, 4H), δ 1.665-1.637(t, 2H, J = 7Hz), δ 1.546-1.487(m, 2H), 1.313-1.235(m, 15H)

[0102] [반응식 9]

[0103]



[0104] (시험예 1: 화합물 a, b 및 1의 광학 특성 평가)

[0105] 제조예의 화합물 a, b 및 1(실시예)에 대한 광학 특성을 분석하였으며, 그 결과를 도 1, 2에 나타내었다.

[0106] 단, 분석 방법은 먼저, 상기 화합물 각각에 적합한 용매를 넣어 저장 용액(Stock solution)을 제조하였는데, 화합물 b는 디메틸포름아마이드(dimethylformamide, DMF), 화합물 a와 화합물 1은 증류수(DI water)를 용매로 사용하였고, 농도는 10 mg/mL로 동일하게 만들었다. 그리고, pH 7.4 10 mM Phosphate buffered saline(이하 1X PBS)을 이용하여 스펙트럼이 왜곡되지 않을 정도의 농도로 각 저장 용액을 희석하고(화합물 a : 6.7, 화합물 b : 9.1, 화합물 1 : 8.9 uM) 해당 샘플들로부터 1/2로 희석(dilution)여 1/8x 농도 샘플까지 총 네 번씩 흡광도 측정을 진행하였다. 그리고, 1/8x 희석 농도 샘플로부터 화합물 a : 0.42, 화합물 b : 0.57, 화합물 1 : 0.22 uM 샘플을 제조하여 여기(Excitation) 774 nm 설정 하에 형광을 측정하였다. 비교예로 사용된 IRDye[®] 800CW NHS ester(LICOR) 제품도 같은 방식으로 흡광 및 형광 분석을 진행하였다.(단, 상기 NHS ester는 DMF로 저장 용액을 제조하고, PBS로 희석하여 5.7 uM 농도로 흡광을 측정하고, 0.24 uM 농도로 형광을 측정하였다.)

[0107] 도 1, 2는 각 화합물들의 흡수 및 형광 스펙트럼을 나타낸 것이며, 본 분석으로부터 하기 표 1과 같이 화합물 별 최대 흡수 및 형광 파장을 확인하고 몰흡광계수를 산출할 수 있었다. (단, 상기 실험에서 흡광도 측정은 Agilent의 Cary 8454 UV-Vis spectrophotometer를, 형광 측정은 PerkinElmer의 LS 55 Fluorescence spectrometer 기기를 사용하였다.)

표 1

[0108]

구분	기준	화합물a	화합물b	화합물1	IR800CW NHS
$\lambda_{Ex}(nm)$	774	774	775	775	775
$\lambda_{Em}(nm)$	789	794	795	794	792
$\epsilon (cm^{-1}M^{-1})$	240,000	205,000	219,000	183,000	224,000

[0109] (시험예 2: 화합물 1의 보관/유통 시 온도 안정성 확인)

[0110] 분말(Powder) 형태(저장 용액이 아닌)의 화합물 b와 화합물 1을 각 1 mg 이상 정량하여 상온, 암실 조건에서 24 시간 방치한 후, 24 시간이 경과 되면 화합물 b는 DMF 용해시키고, 화합물 1은 증류수에 용해시켜 저장 용액으로 제조하고, 단백질(Protein, BSA 0.5 mg scale), 염료 반응 비 20 molar로 표지를 진행하였다. 단, 단백질은 10 mg/mL의 농도로 사용하였고, 반응에 적절한 pH 환경(약 8.3)을 조성하기 위해, pH 7.4 1X PBS 및 pH 9.4 1M Sodium carbonate-Bicarbonate buffer(이하 1 M CBC)를 활용하였다.

[0111] 그리고, 화합물 b와 1의 각 반응을 위한 혼합물의 제조는 EP-Tube 안에 1X PBS 176 uL, 10 mg/mL BSA 44 uL를 넣고 섞어준(vortexing)후, 해당 용액에 1M CBC buffer를 22 uL 첨가한 후 섞어준다(vortexing). 제조한 각 혼합물에서 210 uL씩을 마그네틱 바(Magnetic bar)가 든 반응기(Reacti-vial, Thermo)에 넣고 자석 교반기로 교반한다. 화합물 2종에 대해 염료 반응 비 20 molar를 적용하여 계산한 실험양 만큼 교반하고 있는 각 반응기에 주입한다. 염료 반응량은 각각 화합물 b : 13.30 uL, 화합물 1 : 13.54 uL이다. 염료(화합물 b, 화합물 1)는 상기 저장 용액 10 mg/mL를 사용하였으며, 바이알(Vial) 뚜껑을 닫고 상온(25 ℃ 항온기)에서 22 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 1X PBS로 레진(Resin)을 완충 평형(Buffer equilibrium) 시킨 PD-10 Column(GE Healthcare)에 각 반응물을 200 uL 씩 로딩하고 정제한 후, 추출 용매에 대해 흡광 스펙트럼 분석을 진행하였다. 280, 774 nm의 흡광도로부터 각 D/P(Dye/Protein) ratio를 산출해 냈다. 실험은 결과 신뢰도를 위하여 n=3으로 시행하였고, 하기 표 2와 같은 결과를 얻었다.

표 2

[0112]

구분	화합물 b	화합물 1
1회	0.15	1.25
2회	0.15	1.28
3회	0.15	1.30

[0113]

상기 표 2를 참조하면, 실시예의 화합물 1은 상온 보관 조건에서 화합물 b에 비해 안정적인 것을 확인할 수 있다. 반면에, 화합물 b는 온도에 따라 변화하여 온도에 영향을 많이 받는다는 것을 알 수 있다.

[0114]

즉, 화합물 b와 같은 NHS ester 화합물은 생체 분자에 표지되었을 때 온도 변화에 민감하여 보관 안정성이 현저히 저하되므로 빛을 차단하여 냉동 포장 상태로 보관할 수 밖에 없으나, 본 발명에 따른 화합물 1은 비닐 술폰(Vinylsulfone) 화합물로 높은 온도 안정성을 나타내어 상온에서도 장시간 보관할 수 있음을 보여준다.

[0115]

(시험예 3: 수분 안정성 평가)

[0116]

정량한 화합물 b 및 화합물 1을 각각 증류수에 용해시켜 10 mg/mL 저장 용액을 제조하고 상온에 보관한다. 보관 시간이 경과함에 따라, 1 시간, 1 일, 3일 경과의 저장 용액에 대해 상기 시험예 2에서와 같이 단백질 BSA 0.5 mg scale(최종 농도 2 mg/mL), 염료 반응 비 20 molar로 반응을 진행하되, 두 화합물 모두에 대해 25 °C와 37 °C 온도 조건에서 24 시간 반응하였다. 온도별 반응을 진행한 것은 NHS ester 및 비닐 술폰(Vinylsulfone) 타입 염료의 반응시 온도 영향을 확인하고, 나아가 체내 반응 시 비닐 술폰 타입이 더욱 안정하다는 것을 증명하기 위함이다. 반응물은 PD-10 Column으로 정제한 후 추출 용매의 흡광 분석을 진행하였으며, 산출한 D/P ratio는 하기 표 3과 같다.

[0117]

하기 표 3을 참조하면, 비닐 술폰기를 갖는 화합물 1의 경우 인체에 무해한 용매인 증류수를 활용한 사용이 가능하며, NHS ester 타입에 비해 수분 안정성이 월등함을 확인할 수 있다.

표 3

[0118]

반응시간	보관시간	화합물 b	화합물 1
25 °C	1시간	1.27	1.32
	1일	0.46	1.32
	3일	0.08	1.21
37 °C	1시간	0.93	1.30
	1일	0.39	1.31
	3일	0.06	1.23

[0119]

(시험예 4: 화합물 1의 반응시간 경과에 따른 표지율(D/P ratio) 분석)

[0120]

시험예 1에서 제조한 화합물 b 및 화합물 1의 저장 용액을 이용해 25 °C 및 37 °C 조건에서 각각 1 시간, 3 시간, 6 시간 동안 반응하며 반응시간 경과에 따른 표지율 경향을 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0121]

반응시간	37 °C		25 °C	
	화합물 b	화합물 1	화합물 b	화합물 1
1시간	0.725	1.44	0.84	1.14
3시간	0.675	1.76	0.77	1.37
6시간	0.565	1.74	0.75	1.485

[0122]

표 4를 참조하면, 실시예의 화합물 1은 37 °C 반응 조건에서 3 시간 반응까지 표지율이 증가하며, 25 °C 반응 조건에서는 24 시간에 이르기까지 반응시간 경과에 따라 표지율이 점차적으로 지속 증가함을 확인할 수 있었다.(단, 실시한 실험 스케일은 모두 단백질 BSA 0.2 mg(최종 농도 2 mg/mL), 염료 반응 비 10 molar로 진행하였

다.)

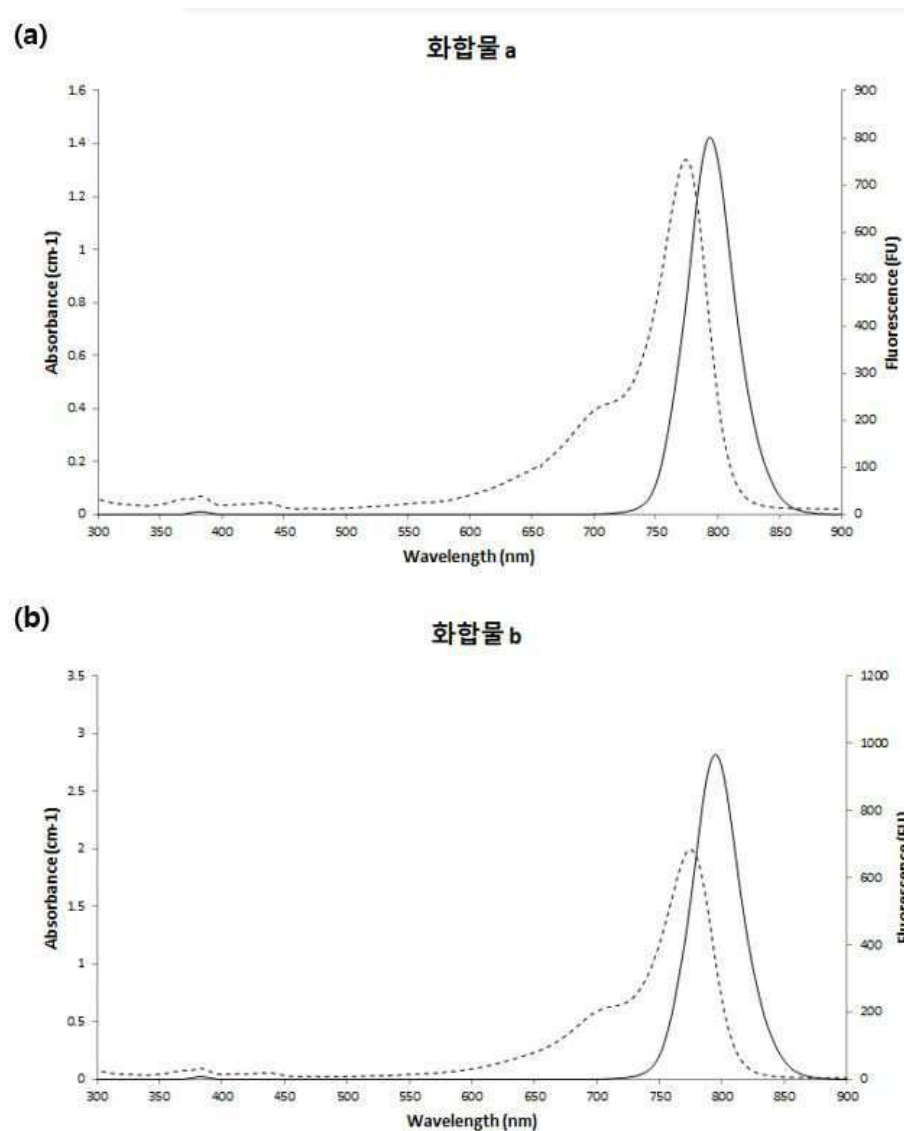
[0123] 그리고, 저장 용액의 제조 용매와 단백질과의 반응시간을 제외하면, 모든 실험 조건은 시험예 3과 동일하게 실시한 후, 경향성 확인을 위하여 NHS ester(LICOR사 IRDye 800CW)와 함께 추가 분석을 시행하였다.

[0124] 그 결과, NHS ester 화합물은 최소 유지되어야 할 D/P ratio가 오히려 감소하는 경향을 나타내었으며, 반면에 화합물 1의 경우에는 25 및 37 ℃의 온도에서도 D/P ratio가 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 in vivo, in vitro 및 ex vivo 환경에서 비닐 술폰기 타입(화합물 1)이 NHS ester 타입에 비해 머무른 시간(Retention time)에 있어 비교 우위를 점할 수 있음을 나타낸다.

[0125] 따라서, 본 발명에 따른 비닐 술폰기 타입의 화합물은 생체 분자에 표지된 후 장시간이 경과하여도 D/P ratio를 유지할 수 있으며, 이는 화합물의 초기 형광 특성을 그래도 유지할 수 있음을 보여주는 결과이다.

도면

도면1



도면2

