(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0036532
(43) 공개일자 2017년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 31/22 (2006.01) *C07D 221/12* (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01) *G01N 21/77* (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 31/22 (2013.01)
C07D 221/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0135830
(22) 출원일자 2015년09월24일
심사청구일자 2015년09월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
경기도 성남시 분당구 내정로 152 130-2402(수내동, 파크타운롯데아파트)
이윤학
서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 1 항

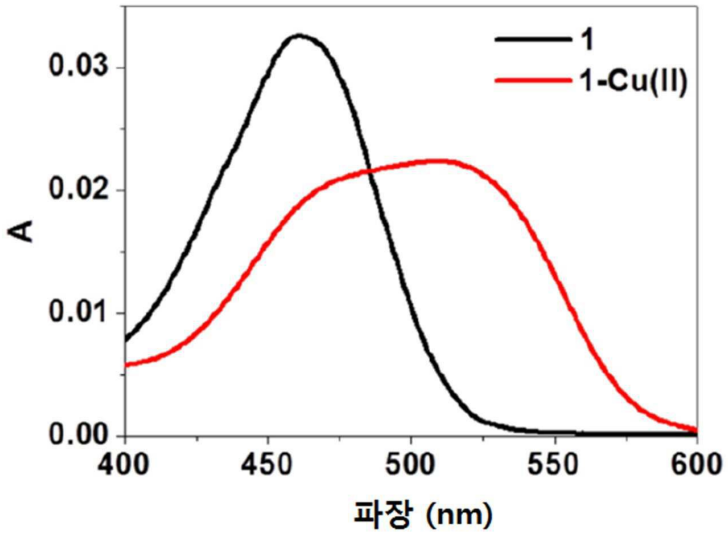
(54) 발명의 명칭 **구리 2가 이온 검출용 프로브 화합물**

(57) 요 약

본 발명은 구리 2가 이온 검출용 프로브 화합물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 하기 화학식 1로 표시되는

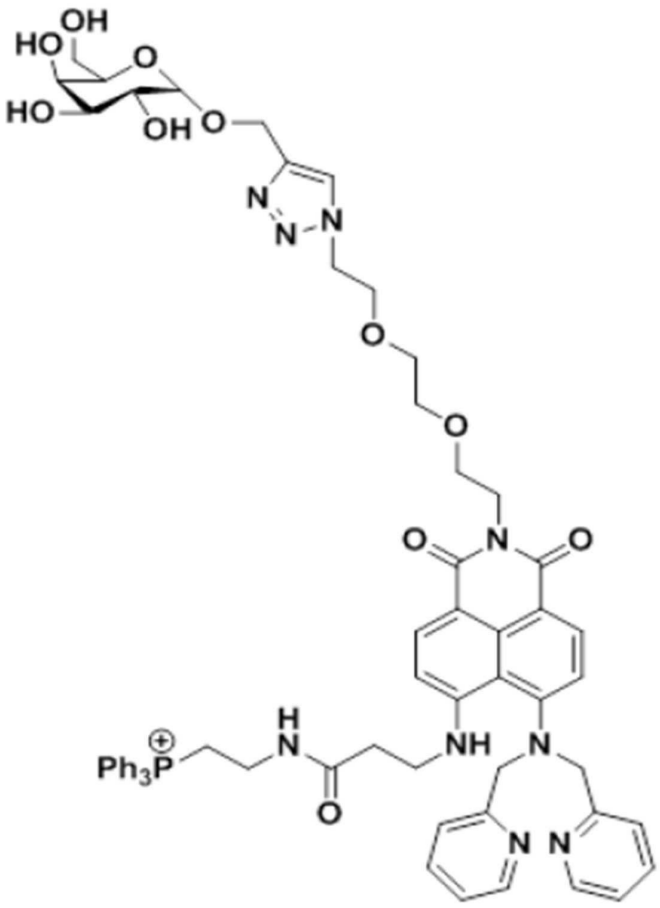
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a



구리 2가 이온 (Cu(II)) 검출용 화합물에 관한 것이다:

[화학식 1]



.

본 발명에 따른 구리 2가 이온 검출용 화합물은 효과적으로 미토콘드리아를 타겟팅하며, 다양한 다른 금속들에 비해서 구리 2가 이온만에 대해서 높은 선택성으로 형광 반응을 나타내는 바, 임상 및 약제학적 분석에 있어서 매우 높은 효용성을 나타낸다.

(52) CPC특허분류
C07D 401/14 (2013.01)
G01N 21/77 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015001883
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명 발광센서 재료 연구단
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.28

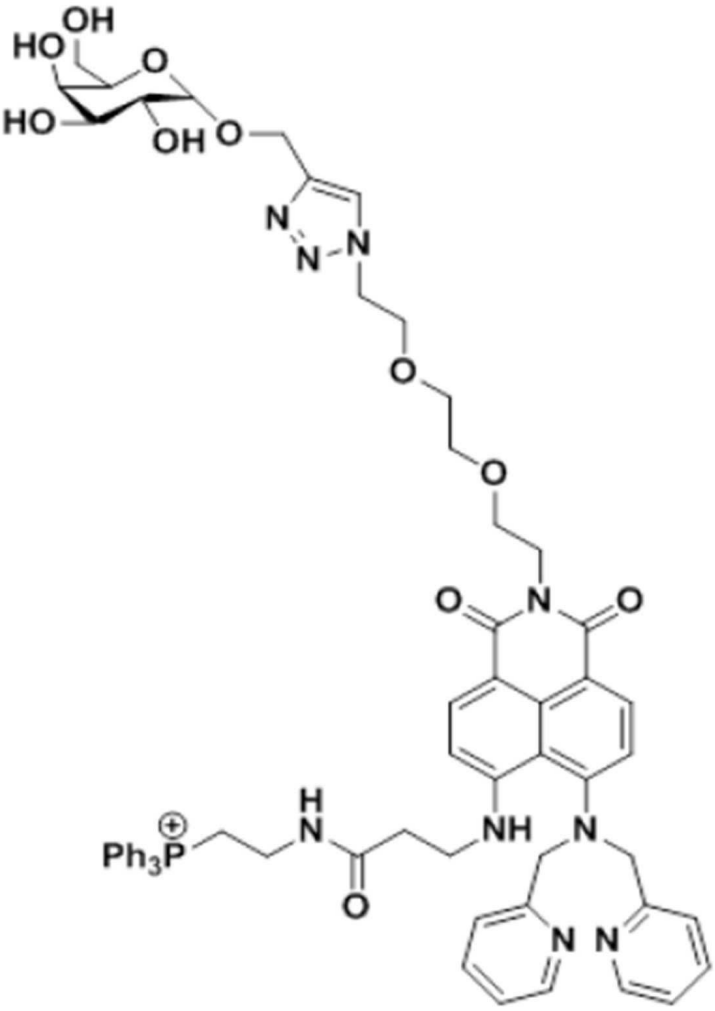
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 구리 2가 이온 (Cu(II)) 검출용 화합물:

[화학식 1]



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 구리 2가 이온 검출용 프로브 화합물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포소기관 표적 형광 프로브에 대한 다양한 전략 개발은 생물학적 환경에서 이들의 광범위한 용도로 인해 큰 관심을 끌고 있다. 세포내 소기관 (예를 들면, 미토콘드리아, 리소좀 등)은 산화적 인산화, 세포 대사 조절, 단백질 변형과 접힘, 거대분자 분해, 유전자 발현 조절을 포함한 필수 기능을 담당하기 때문에 중요한 역할을 유지한다. 그러나, 세포내 소기관 수준에서 기능부전은 심한 대사 불균형을 일으켜 세포사가 나타날 수 있다. 따라서, 세포소기관을 표적으로 하는 다수의 효율적인 감지 방법이 많은 관심을 받고 있다.

[0003] 세포 내 소기관을 영상화하기 위한 각종 기기 기술이 개발되었지만, 형광 프로브가 여전히 이들을 인식하기 위한 주요 수단이다. 이는 이러한 형광 프로브가 상대적으로 낮은 비용과 간단히 적용할 수 있다는 장점을 갖는 바, 다른 방법들에 비해 더 단순하고 효율적이기 때문이다. 세포소기관 특이적 프로브의 가장 중요한 용도 중 하나는 세포내 소기관에서 생리학적 특성을 실시간으로 분석하여 이들 세포소기관 내에서 외인성 화학 물질의 흡수를 확인하는 중요한 물리화학적 특징을 밝히는 것이다.

[0004] 예를 들어, 세포내 소기관에서 구리 2가 이온 (Cu(II))을 선택적으로 검출하기 위한 프로브에 관한 연구들이 보고된 바 있으며 (비특허문헌 1 내지 3), 특히, 미토콘드리아는 필수 금속과 그 외 다른 보조 인자의 세포 항상성 유지, 대사 조절 뿐 아니라 다른 기능들에 관여하는 가장 중요한 세포내 구획이기 때문에, 미토콘드리아 내 Cu(II) 농도를 분석하는 것은 매우 중요하다. 미토콘드리아와 Cu 과축적 간의 상관관계는 아직 완전하게 알려진 바가 없으며, Cu(I)에 대한 형광 센서는 미토콘드리아 구리 농도 증가를 보였지만 (비특허문헌 4), Cu(II)가 Cu 과축적에 기인한 스트레스에 대한 미토콘드리아 반응에 있어서 중요한 역할을 하는지는 여전히 중요한 의문이다.

[0005] 관련해서, 대한민국 공개특허공보 제2010-0049994호에서는 백금 필름 상에 고정시킨 로다민 유도체와 상기 로다민 유도체를 이용한 구리 이온 검출 방법 및 화학 센서를 개시하고 있으며, 또한 대한민국 공개특허공보 제2009-0129105호에서는 구리 이온 검출용 로다민 유도체 및 플루오레세인 유도체, 및 이를 이용한 프로브를 개시하고 있다.

[0006] 따라서, 미토콘드리아 내 Cu(II) 이온의 영상화를 제공할 새로운 방법을 개발하는 것이 구리 세포독성을 더 잘 이해하기 위해서 매우 중요한 문제이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 공개특허공보 제2010-0049994호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 대한민국 공개특허공보 제2009-0129105호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Kim, H.J., Lee, S.J., Park, S.Y., Jung, J.H., Kim, J.S.: Detection of Cu(II) by a chemodosimeter-functionalized monolayer on mesoporous silica. Adv. Mat. 20, 3229.3234 (2008)

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Kim, H.J., Hong, J., Hong, A., Ham, S., Lee, J.H., Kim, J.S.: Cu2+ -induced intermolecular static excimer formation of pyrenealkylamine. Org. Lett. 10, 1963.1966 (2008)

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Kim, Y.-R., Kim, H.J., Kim, J.S., Kim, H.: Rhodamine-based "turn-on" fluorescent chemodosimeter for Cu(II) on ultrathin platinum films as molecular switches. Adv. Mat. 20, 4428.4432 (2008)

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Dodani, S.C., Leary, S.C., Cobine, P.A., Winge, D.R., Chang, C.J.: A targetable fluorescent sensor reveals that copper-deficient SCO1 and SCO2 patient cells prioritize mitochondrial copper homeostasis. J. Am. Chem. Soc. 133, 8606.8616 (2011)

발명의 내용

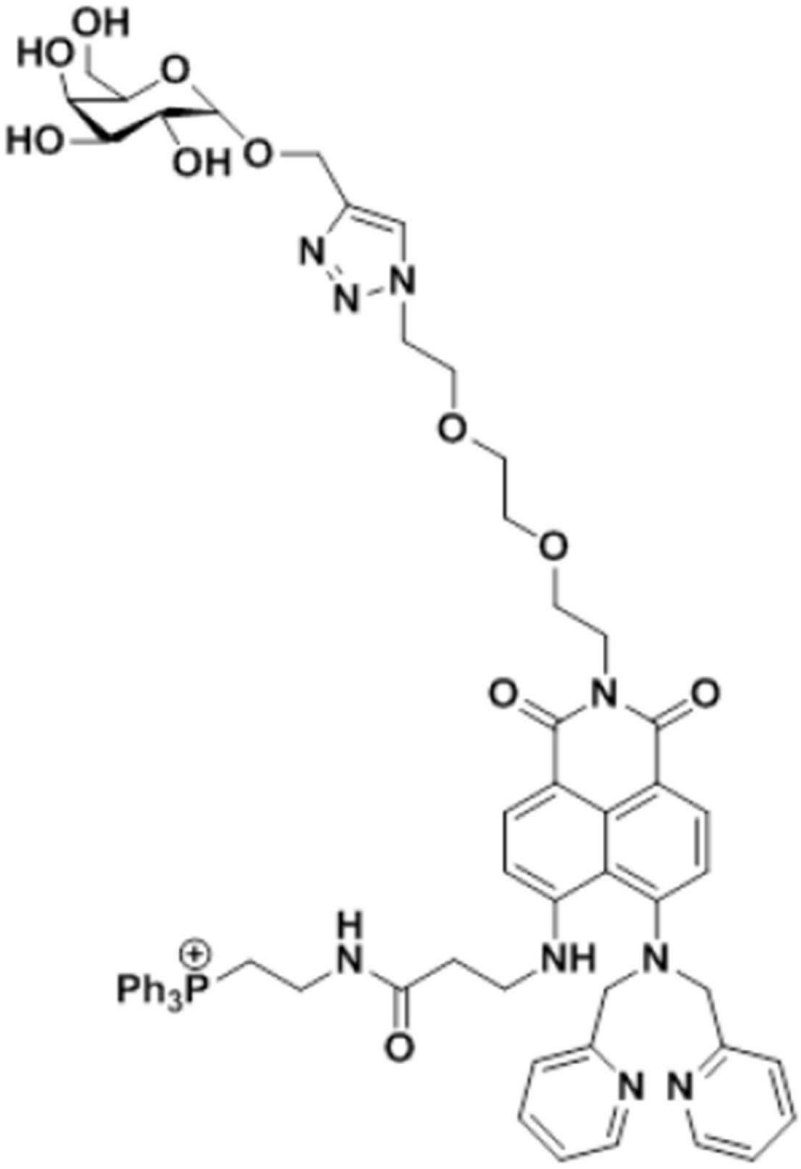
해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명에서는 다양한 세포 소기관 중 미토콘드리아를 표적으로 하며, 미토콘드리아 내 Cu(II) 이온에 대해서 높은 선택성 및 민감도를 나타내는 구리 2가 이온 검출용 프로브를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, 하기 화학식 1로 표시되는 구리 2가 이온 검출용 화합물을 제공한다:

[0011] [화학식 1]



[0012] .

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 구리 2가 이온 검출용 화합물은 효과적으로 미토콘드리아를 타겟팅하며, 다양한 다른 금속들에 비해서 구리 2가 이온만에 대해서 높은 선택성으로 형광 반응을 나타내는 바, 임상 및 약제학적 분석에 있어서 매우 높은 효용성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a 및 1b는 각각 본 발명에 따른 화합물 1의 흡수 및 형광 스펙트럼을 도시한 것이다.

도 2a 및 2b는 Cu(II)의 농도 변화에 따른 화합물 1의 형광 적정 스펙트럼을 도시한 것이다.

도 3a 및 3b는 Cu(II)와 그 외 생체 관련 금속이온에 대한 화합물 1의 형광 반응을 생리적 조건에서 평가한 그래프이다.

도 4a 및 4b는 화합물 1과 다른 생체 분석물 사이의 경쟁 실험 결과를 도시한 그래프이다.

도 5는 공초점 현미경 검사에 의해서 HepG2 세포 내 화합물 1의 세포내 국재화를 관찰한 도면이다.

도 6은 HepG2 세포 내 화합물 **1** (1 μM)의 공초점 현미경 사진을 도시한 것이다.

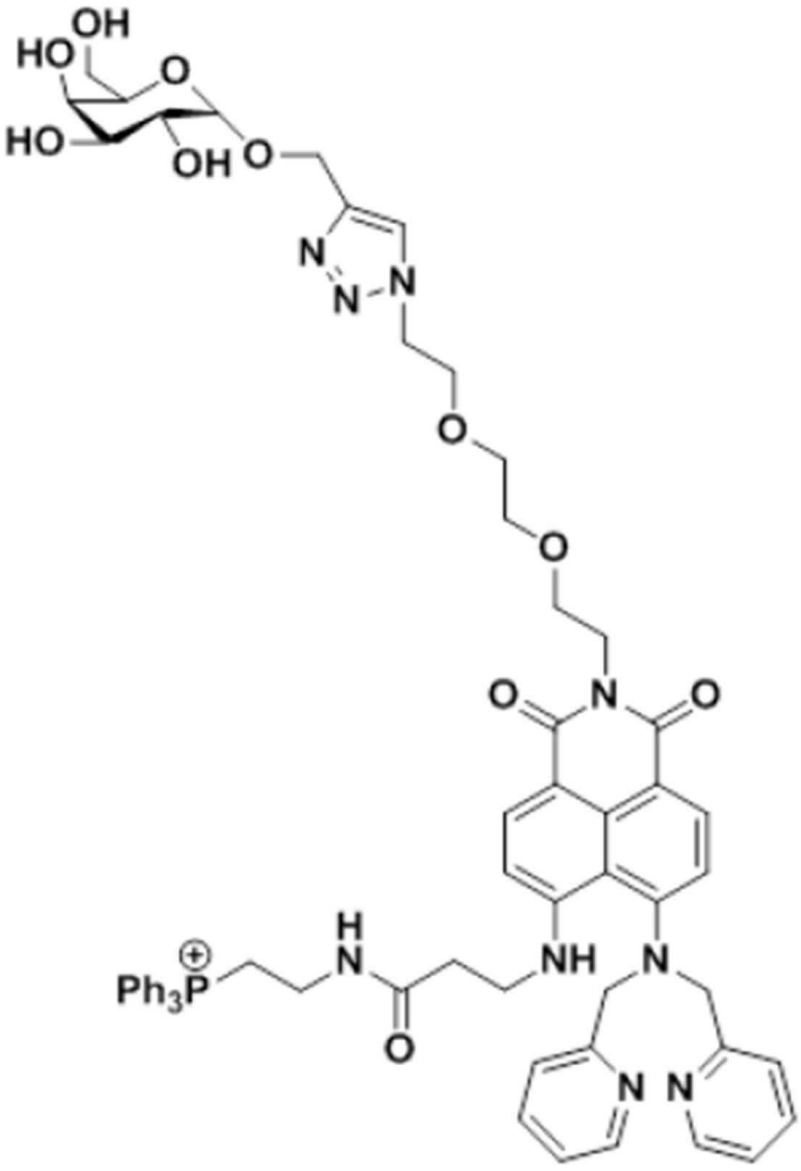
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

[0016] 본 발명에서는 Cu(II)에 대한 센서로서 신규한 수용성 형광 나프탈이미드 유도체를 제공한다. 본 발명에 따른 화합물은, Cu(II)에 대한 결합 부위로서 디-(2-피콜릴)아민기 (DPA)를 포함하며, 미토콘드리아를 표적화하기 위한 부위로서 트리페닐포스포늄기 (TPP)를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 화합물의 용해도와 세포 투과도를 향상시키기 위해서, 상기 DPA와 TPP 복합체의 말단에 갈락토오스 잔기를 부착하였다.

[0017] 이를 위해서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구리 2가 이온 검출용 화합물을 제공하며,

[0018] [화학식 1]



[0019] .

[0020] 상기 화학식 1의 화합물은 HEPES 완충용액 내 다양한 금속 이온들에 비해서, 구리 2가 이온에 대해서 높은 선택성을 나타내고, 더 나아가, 1 당량의 구리 2가 이온 첨가시에 형광이 급격히 소광되었고, pH 6-10의 범위 내에서 안정적 반응을 일으켰다. 즉, 상기 화학식 1의 화합물은 미토콘드리아로 타겟팅된 후, 구리 2가 이온 존재시 상기 구리 2가 이온과 결합함으로써 급격한 형광 소광 현상을 나타내게 된다.

[0021] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한

것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

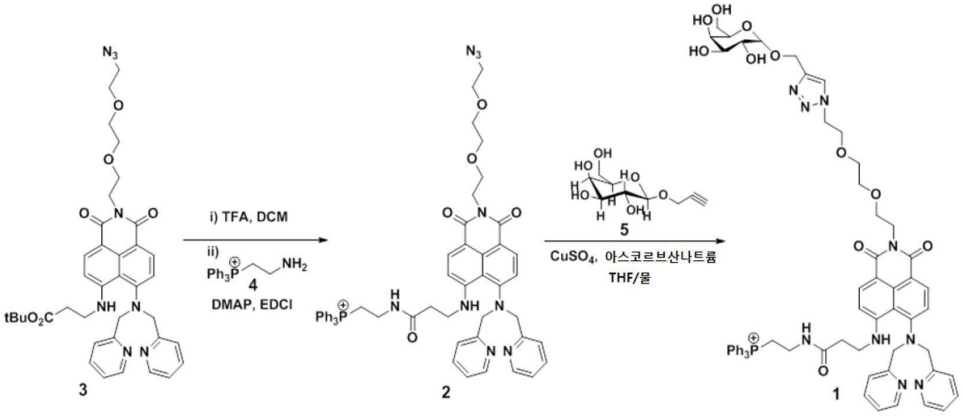
[0022] **합성 재료와 시료 준비**

[0023] 모든 반응은 화염 건조시킨 유리용기를 이용하여 질소 분위기에서 수행하였다. 칼럼 크로마토그래피 분석을 위해 실리카 겔 60 (Merck, 0.063-0.2 mm)을 이용하였다. 분석용 박층 크로마토그래피는 Merck 60 F254 실리카 겔 (코팅 전처리한 시트, 두께 0.25 mm)을 이용하여 수행하였다. 다른 모든 시약들은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였고 입수한 그대로 이용하였다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 300 및 400 MHz 분광계에서 $CDCl_3$와 CD_3OD (Cambridge Isotope Laboratories, 캠브리지, MA)를 이용하여 측정하였다. 모든 화학이동은 내부 표준물질로서 TMS의 피크를 이용하여 ppm 값으로 기록하였다. 역상 HPLC 실험은 분석용 Zorbax C18 (3.5 μm, 4.6 × 150 mm)과 Shim-pack VP-ODS (4.6 × 150 mm) 칼럼을 구비한 Agilent HPLC(Agilent 1100 시리즈), 예비분리용 XBridge C18 (5 μm, 19 × 150 mm) 칼럼을 구비한 Waters HPLC(Waters 600)를 이용하여 수행하였다. 분석 및 분취용 HPLC를 위한 유속은 4.5 mL/분이었다. 이동상을 위해 완충용액 A (0.1% v/v TFA가 포함된 물) 및 완충용액 B (0.1% v/v TFA가 포함된 아세토니트릴)를 이용하여 용매 구배를 제공하였다. ESI 질량 분광분석은 LC/MS-2020 Series(Shimadzu) 기기를 이용하여 실시하였다.

[0024] **합성예**

[0025] 하기 반응식 1에 개략적으로 나타낸 바와 같이 화합물 **1**을 합성하였다. 종전에 보고된 방법에 따라 화합물 **3-5**를 제조하였다 (Lee, Y.H., Park, N., Park, Y.B., Hwang, Y.1 J., Kang, C., Kim, J.S.: Organelle-selective fluorescent Cu2+ ion probes: revealing endoplasmic reticulum as reservoir for Cu-overloading. Chem. Commun. **50**, 3197.3200 (2014); Maryanoff, B.E., Reitz, A.B., Duhl-Emswiler, B.A.: Stereochemistry of the Wittig reaction. Effect of nucleophilic groups in the phosphoniumylide. J. Am. Chem. Soc. **107**, 217.226 (1985)). 화합물 **2**의 합성을 위해서, 트리플루오로아세트산을 매개로 화합물 **3**의 삼차부틸기를 제거한 후 DMF 중에 1-에틸-3-(3-(디메틸아미노)프로필)카르보디이미드와 4-(*N*,*N*-디메틸아미노)피리딘이 존재하는 상태에서 화합물 **4**와 아미드 결합을 형성하였다. 이어서, 아스코르브산나트륨과 황산구리(II)가 존재하는 상태에서 화합물 **2**와 프로파르길 β-D-갈락토피라노시드 (화합물 **5**)의 클릭 반응에 의해 화합물 **1**을 제조하였다. 합성된 화합물 **1**과 **2**의 특성을 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR과 ESI-MS에 의해 분석하였다.

[0026] [반응식 1]



[0027]

[0028] *(a) 화합물 2의 합성*

[0029] 화합물 **3** (100.0 mg, 0.15 mmol)의 CH_2Cl_2(0.5 mL) 용액을 상온에서 4 시간 동안 TFA (1 mL)로 처리하고 반응 용매를 완전히 증발시켰다. 잔류물을 디옥산 중 4N HCl로 처리한 다음, 농축하고, 조생성물을 다음 단계에서 직접 사용하였다. 이 반응 혼합물 (80.0 mg, 0.13 mmol)을 DMF (1 mL)에 용해시키고 EDCI (72.0 mg, 0.38 mmol)와 DMAP (45.9 mg, 0.38 mmol)로 처리하였다. 얻어진 용액을 상온에서 10분 동안 질소 분위기에서 교반하였다. 이어서, 상기 혼합물에 화합물 **4** (191.0 mg, 0.62 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 용액을 진공에서 제거하고 얻어진 혼합물을 물 (50 mL)과 디클로로메탄 (3 × 50 mL)으로 분배하였다. 용매들을 제거한 후, 조생성물을 용리액으로서 디클로로메탄/메탄올 (v/v, 95:5)을 이용하여 실리카겔로 정제하여 황

색 오일로서 화합물 **2**를 수득하였다 (51.0 mg, 44%). ^{1}H NMR($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.58(d, 2H, J=4.1 Hz), 8.37(d, 1H, J=8.5 Hz), 8.30(d, 1H, J=8.0 Hz), 7.81-7.54(m, 15H), 7.56(t, 2H, J=7.4 Hz), 7.16(t, 2H, J=6.0 Hz), 7.01(t, 3H, J=6.6 Hz), 6.76(d, 1H, J=8.9 Hz), 4.40(s, 4H), 4.37(t, 2H, J=6.1 Hz), 3.80-3.61(m, 14H), 3.29(t, 2H, J=4.6 Hz), 2.72(t, 2H, J=6.7 Hz) ppm. ^{13}C NMR($CDCl_3$, 100 MHz): δ 172.5, 171.3, 164.7, 164.3, 156.0, 154.6, 152.8, 149.4, 136.9, 135.4, 134.9, 133.6, 133.5, 133.0, 131.5, 130.7, 130.6, 123.9, 122.8, 118.3, 117.5, 115.2, 108.1, 104.5, 70.7, 70.3, 70.0, 68.3, 60.5, 59.2, 53.6, 50.8, 39.9, 38.7, 35.3 ppm. ESI-MS: m/z(M+) 계산치 926.4, 실측치 926.7.(M+).

[0030] *(b) 화합물 1의 합성*

[0031] 프로파르길 β-D-갈락토피라노시드 (화합물 **5**) (8.2 mg, 0.38 mmol)와 화합물 **2** (35.0 mg, 0.38 mmol)를 무수 THF (1 mL)에 용해시켰다. 다음, 아스코르브산나트륨 (1.8 mg, 0.04 mmol)과 황산구리(II) (2.3 mg, 0.04 mmol)의 수용액을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였다. HPLC 정제 후 화합물 **1** (22.0 mg, 51%)을 수득하였다. ^{1}H NMR(CD_3OD, 400 MHz): δ 8.52(d, 2H, J=4.4 Hz), 8.30(m, 2H), 7.88-7.69(m, 15H), 7.67(t, 2H, J=7.4 Hz), 7.26-7.20(m, 4H), 7.14(d, 2H, J=7.8 Hz), 6.81(d, 1H, J=8.6 Hz), 4.81(d, 2H, J=12.5 Hz), 4.60(d, 2H, J=12.3 Hz), 4.43(br, 2H), 4.32-4.27(m, 3H), 4.24(t, 2H, J=4.9 Hz), 3.88(t, 2H, J=6.2 Hz), 3.81(d, 2H, J=3.2 Hz), 3.77-3.68(m, 6H), 3.62-3.40(m, 10H), 2.67(t, 2H, J=6.3 Hz) ppm. ^{13}C NMR(CD_3OD, 100 MHz): δ 174.5, 165.9, 165.8, 157.1, 156.4, 154.2, 150.2, 138.7, 136.5, 136.5, 135.9, 134.8, 134.7, 134.0, 132.8, 131.7, 131.5, 125.5, 124.3, 120.9, 119.7, 119.5, 118.8, 116.4, 108.5, 105.7, 104.2, 76.8, 74.9, 72.4, 71.4, 71.4, 70.3, 70.3, 69.1, 62.9, 62.6, 60.0, 51.3, 40.5, 40.0, 35.9, 34.7, 30.8 ppm. ESI-MS: m/z(M+) 계산치 1144.5, 실측치 1144.6.(M+).

[0032] **실험예**

[0033] *화합물 1의 광 물리적 특성*

[0034] Cu(II)에 대한 프로브 **1**의 분광학적 특성을 평가하기 위해서 Cu(II)가 부재 및 존재하는 상태에서 프로브 **1**의 UV/vis 및 형광 변화를 조사하였다. 모든 광 물리 실험은 HEPES 완충용액 (20 mM, pH 7.4)에서 실시하였고, DMSO와 같은 용해제는 필요하지 않았다. 구체적으로, 3차 증류수 중에 화합물 **1** 및 GSH, ATP, Val, Tyr, Thr, Tau, Ser, Pro, Phe, Met, Lys, Leu, Ile, His, Gly, Gluc, Glu, Gln, Asp, Asn, Arg, Ala, Li(I), Na(I), K(I), Ca(II), Sr(II), Ba(II), Co(II), Mg(II), Hg(II), Cd(II), Fe(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II), Mn(II)과 Ni(II)을 포함한 생체 관련 분석물의 모액을 준비하였다. S-3100(Scinco) 분광광도계로 흡수 스펙트럼을 측정하고 크세논램프를 구비한 RF-5301 PC 분광형광계(Shimadzu)를 이용하여 형광 스펙트럼을 측정하였다. 흡수와 방출 측정용 시료를 석영 큐벳 (부피 4 mL)에 넣었다. 여기 및 방출 슬릿폭 3 nm로 486 nm에서 여기시켰다. 모든 분광 측정은 생리적 조건 (각각 pH 7.4의 HEPES 완충용액)에서 수행하였다.

[0035] 도 1a 및 1b는 각각 461 nm (옅은 황색, ε=6.5 × 103 M^{-1} cm^{-1})과 543 nm에서 최대 세기를 나타내는 화합물 **1**의 흡수 및 형광 스펙트럼을 도시한 것이다. 구체적으로, 486 nm에서 여기한 후 HEPES 완충용액 (20 mM, pH 7.4) 중 Cu(II) (5 μM)의 부재 (검정색) 및 존재 (적색) 상태에서 화합물 **1** (5 μM)의 UV-Vis 스펙트럼 (1a)과 형광 스펙트럼 (1b)을 도시한 것으로서, 도 1a 및 1b를 참조하면, 5 μM의 Cu(II)가 있는 상태에서 509 nm (분홍색, ε=4.5 × 10^3 M^{-1} cm^{-1})를 중심으로 새로운 흡수 밴드가 나타났고, 이에 수반하여 543 nm의 형광 밴드는 Cu(II)의 상자기성에 의해 소광되었다.

[0036] 또한, Cu(II)의 농도 변화에 따른 화합물 **1**의 형광 적정 스펙트럼을 도 2a 및 2b에 도시하였다. 구체적으로, 다양한 농도의 Cu(II) (0-7.5 μM)가 존재하는 상태에서 화합물 **1** (5 μM)의 형광 방출 스펙트럼 (2a) (삽입 그래프는 Cu(II) 농도 함수로서 543 nm에서 화합물 **3**의 형광 세기를 나타낸다)과, HEPES 완충용액 (20 mM, pH 7.4) 중 화합물 **1**과 Cu(II)의 정규화 Job's 플롯을 도시한 것으로서, 모든 스펙트럼은 486 nm에서 여기한 후 HEPES 완충용액 (20 mM, pH 7.4)에서 얻었고, 방출 세기는 543 nm에서 측정하였다. 도 2a 및 2b를 참조하면, Cu(II) 양을 증가시키면서 첨가할 때 543 nm에서 화합물 **1**의 형광 세기는 등흡광점에 해당하는 486 nm에서 여기시 5 μM의 Cu(II)가 존재하는 상태에서 10배까지 점차 감소하였다. 또한, 543 nm에서 화합물 **1**의 형광 세기가 Cu(II)의 농도에 따라 1 당량까지 선형으로 감소한다는 것을 관찰하였으며, Job's 플롯은 화합물 **1**과 Cu(II)가

1:1로 착화되었음을 나타내었다.

[0037] 한편, Cu(II)와 그 외 생체 관련 금속이온에 대한 화합물 **1**의 형광 반응을 확인하기 위해서 생리적 조건에서 형광을 평가하였다 (도 3a 및 3b). 구체적으로, 50 μM의 각종 염화물 염 (1, 프로브 단독; 2, Li(I); 3, Na(I); 4, K(I); 5, Ca(II); 6, Sr(II); 7, Ba(II); 8, Co(II); 9, Mg(II); 10, Hg(II); 11, Cd(II); 12, Fe(II); 13, Fe(III); 14, Zn(II); 15, Mn(II); 16, Ni(II); 17, Cu(II) (5 μM); 18, Cu(II) (5 μM) + 기타 금속)에 대한 화합물 **1** (5 μM)의 금속이온 선택성 (3a)을 도시하였으며, Cu(II) (5 μM)의 부재 (검정색) 또는 존재 (적색)하 다양한 pH (4-10)에서 화합물 **1** (5 μM)의 형광 반응을 나타내었다. 모든 스펙트럼은 486 nm에서 여기한 후 HEPES 완충용액 (20 mM, pH 7.4) 중에서 얻었고, 방출 세기는 543 nm에서 측정하였다. 경쟁 실험을 통해 화합물 **1**의 형광 세기는 다른 금속이온이 존재하는 상태에서도 Cu(II)에 의해 선택적으로 소광된다는 것을 알 수 있는바, 이로부터 화합물 **1**이 Cu(II)에 대해 높은 선택성을 보인다는 것을 유추할 수 있다. 더 나아가, 화합물 **1**은 생리적 pH (4-10)에서 안정하였고 6 내지 10의 pH 범위에서 Cu(II)에 의해서 주로 소광되었다. 이에 비해, 산성 환경에서 **1**의 형광 세기의 제한적 감소가 Cu(II)와의 결합능 약화로 이어지는 **1**의 DPA기의 양성자 첨가반응에 의해 검출되었다. 그럼에도 불구하고, 화합물 **1**은 가장 생물학적으로 관련이 있는 pH 수준에서 Cu(II)를 선택적으로 검출할 수 있다.

[0038] 한편, 세포 환경으로부터 방해가 어느 정도 있을 수 있다는 것을 감안하여 Cu(II)와 그 외 GSH, ATP 등의 아미노산과 같은 다른 생체 관련 분석물 간의 경쟁 실험을 통해서 화합물 **1**을 조사하였다 (도 4a 및 4b). 구체적으로, Cu(II) (5 μM)이 존재하는 상태에서 GSH, ATP, 히스티딘 및 그 외 아미노산 (각각 (5 μM)이 첨가된 화합물 **1** (각각 5 μM)의 형광 방출 스펙트럼 (4a) 및 GSH (1 mM)이 존재하는 상태에서 다양한 농도의 Cu(II)(0-1 mM)의 첨가에 따른 화합물 **1** (1 μM)의 형광 방출 스펙트럼 (4b)을 도시하였다. 모든 스펙트럼은 486 nm에서 여기한 후 HEPES 완충용액(20 mM, pH 7.4) 중에서 얻었고 방출 세기는 543 nm에서 측정하였다. 도 4a 및 4b를 참조하면, GSH, ATP와 히스티딘이 생리적 조건에서 화합물 **1**의 구리 결합능에 방해를 일으킨다는 것을 시사하고 있다. 그러나, 생물계에서 히스티딘의 양은 상당량의 소광을 나타내기에는 충분하지 않고, ATP의 구리 결합능은 Mg(II) 금속 이온에 대한 화합물 **1**의 우선 결합에 의해 Mg(II)의 세포내 농도에 의해 억제된다. 주목할 점은, GSH가 존재하는 상태에서 Cu(II)의 첨가시 화합물 **1**이 부분적인 형광 변화를 나타낼 수 있다는 점이다. 따라서, 화합물 **1**이 세포 내 Cu 과축적 조건에 적절하게 반응할 것으로 예상된다.

[0039] *화합물 1의 시험관내 연구*

[0040] 본 발명자들은 간 내 구리와 아시알로당단백질 (ASGP) 수용체의 축적 사이의 상관관계를 통해서 모델 세포주로서 HepG2를 이용하여 Cu 과축적 조건에서 구리 이온의 세포내 국재를 보고한 바 있다 (Mersch-Sundermann, V., Knasmuller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F.: Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. Toxicology **198**, 329-340 (2004); Spiess, M.: The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. Biochemistry **29**, 10009-10018 (1990)). 화합물 **1**을 미토콘드리아로 안내하는 TPP 기의 역할을 증명하기 위해서 화합물 **1**과 3개의 서로 다른 세포소기관 표지자인 LysoTracker Red DND-99, ER-Tracker Red와 MitoTracker를 공국재하였다. 구체적으로, HepG2 세포를 10분 동안 화합물 **1** (1 μM)과 함께 배양하고, 세포소기관 표지자 (각각 0.5 μM LysoTracker Red, 0.1 μM ER Red 및 0.1 μM MitoTracker Deep Red)에 대해 염색하였다.

[0041] 도 5에 도시된 바와 같이, HepG2 세포의 공초점 형광 사진은 화합물 **1**이 주로 리소좀과 소포체 (ER)에 국재하였음을 증명하고 있다. 이들 결과는 화합물 **1**과 MitoTracker 간에 겹침이 크지 않다는 것을 보여주는 것으로서, 화합물 **1**이 이들 세포에서 비특이적인 분포를 갖는다는 것을 의미한다. 놀라운 점은, TPP가 부가된 화합물 **1**은 유의미한 미토콘드리아 흡수로 나타나지 않았다는 것이다. 미토콘드리아 막 전위는 친유성 양이온을 미토콘드리아 막을 통과시키는데 있어 중요하고 이러한 유형의 분자들은 에너지 생성 미토콘드리아 내에 축적된다는 것이 알려져 있어 미토콘드리아 생물학을 연구하기 위해 TPP 부분을 도입하게 되었다. 상기 원리에 따라, 본 발명에서는 화합물 **1**이 갈락토오스 단위에 의해 친유성이 부족할 수 있다고 추정하였다. 보통 ASGP 수용체는 수용체 매개 엔도시토시스에 의해 말단 갈락토오스 잔기와 선택적으로 내재화되는데, 이는 이후에 엔도시토시스 소포가 엔도솜과 융합되고 상기 엔도솜으로부터 수용체가 리소좀으로 더 이동될 수 있음을 의미한다. 이에 따라, 상기 분자는 친유성이 크지 않기 때문에 엔도솜 탈출이 제한되어 화합물 **1**의 관찰된 리소좀 분포가 나타난다.

[0042] 한편, Cu 과축적 조건에서 화합물 **1**의 형광 변화를 추가로 평가하기 위해서 HepG2 세포를 문헌에 이미 보고되어 있는 3종의 Cu 과축적 방법에 의해 배양하였다: 15분간 200 μM $CuCl_2$ (Chen, Y., Zhu, C., Cen, J., Li, J.,

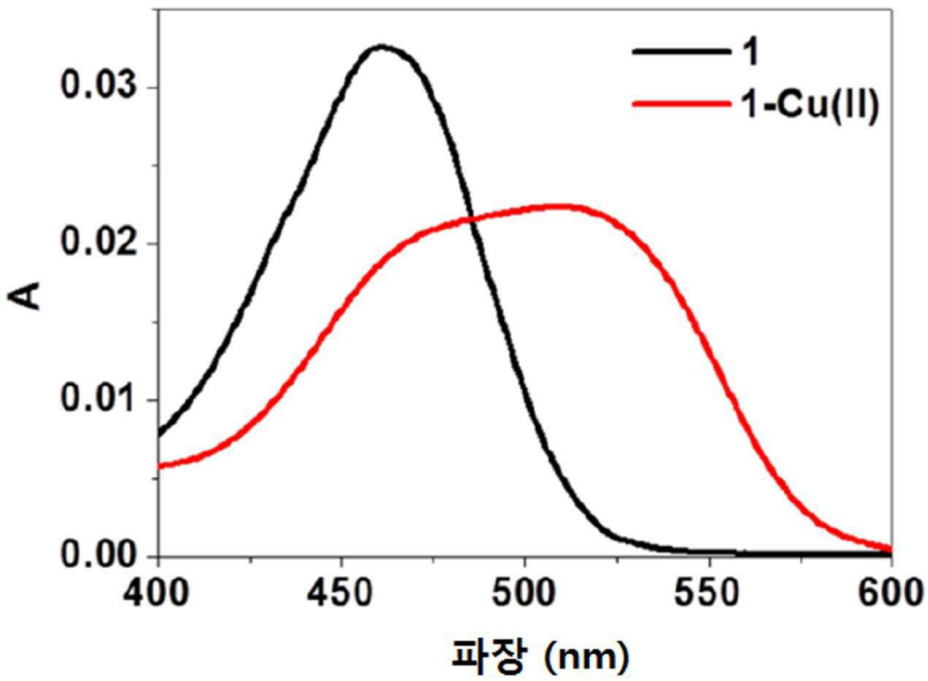
He, 1 W., Jiao, Y., Guo, Z.: A reversible ratiometric sensor for intracellular Cu2+ imaging: metal coordination-altered FRET in a dual fluorophore hybrid. Chem. Commun. **49**, 7632-7634 (2013)), 7시간 1.0 mM $CuCl_2$ (Lim, C.S., Han, J.H., Kim, C.W., Kang, M.Y., Kang, D.W., Cho, B.R.: A copper(I)-ion selective two-photon fluorescent probe for in vivo imaging. Chem. Commun. **47**, 7146-7148 (2011)) 및 7시간 100 μM $CuCl_2$, 24시간 100 μM $NaVO_3$ 전처리 (Moriya, M., Ho, Y.H., Grana, A., Nguyen, L., Alvarez, A., Jamil, R., Ackland, M.L., Michalczyk, A., Hamer, P., Ramos, D., Kim, S., Mercer, J.F., Linder, M.C.: Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **295**, C708-C721 (2008)), 세포 내 구리의 배출계의 저해제 (Cui, C.T., Uriu-Adams, J.Y., Tchaparian, E.H., Keen, C.L., Rucker, R.B.: Metavanadate causes cellular accumulation of copper and decreased lysyl oxidase activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. **199**, 35-43 (2004)).

[0043] 상기 연구로부터 얻은 결과를 도 6에 도시하였다. 도 6을 참조하면, 이들 3개의 조건에서 유의미한 형광 변화가 없다는 것을 알 수 있다. 본 발명에서는, 화합물 1이 위에서 언급한 바와 같이 세포내 방해 또는 산성 환경을 극복할 수 없었다고 가정하였다. 이전의 보고에 따르면, 이들 조건에서 리소좀 표적 프로브는 소광되지 않았다. 리소좀 내 화합물 1의 우선적인 국재에 의해 Cu 과축적시 미토콘드리아 내 불안정한 Cu(II) 전체를 모니터링할 수 없었다.

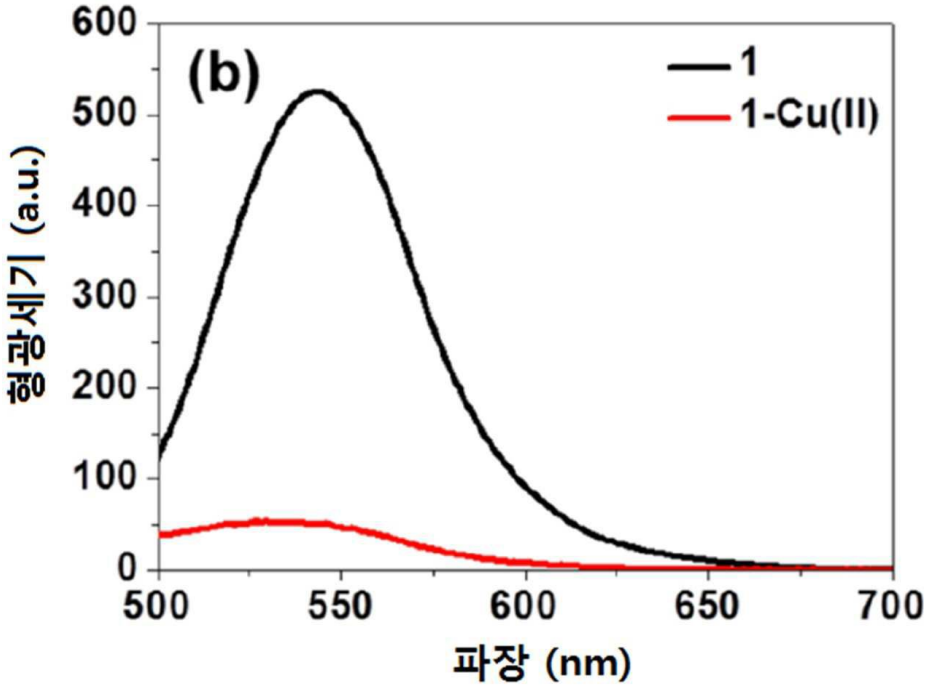
[0044] 종합하면, 본 발명에서는 수성 매질에서 Cu(II)에 대해 세포소기관 선택적인 형광 프로브를 제공한다. 본 발명에 따른 프로브의 DPA, TPP와 갈락토오스 단위의 합리적인 설계에 의해 미토콘드리아에서 Cu(II)를 선택적으로 모니터링할 수 있었으며, 이러한 결과는 구리에 선택적인 차세대 미토콘드리아 표적 프로브를 개발함에 있어서 매우 중요한 시발점이 될 수 있다.

도면

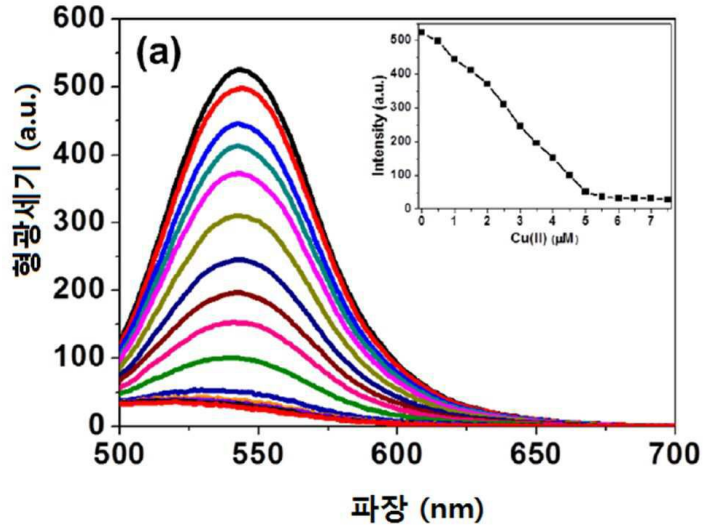
도면1a



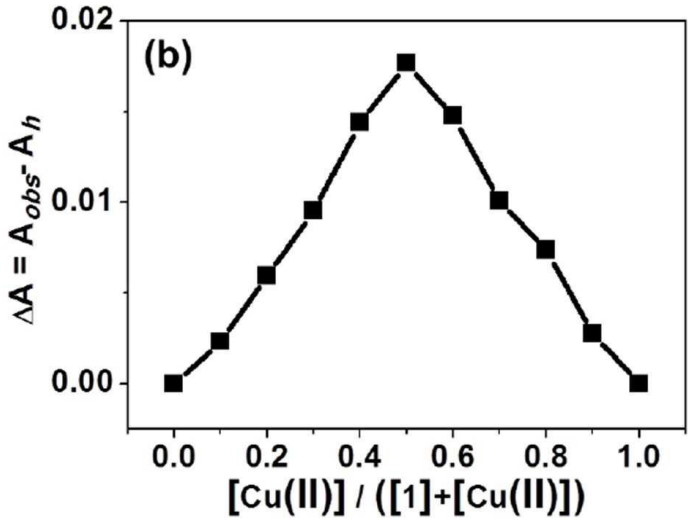
도면1b


(b)
1
1-Cu(II)
형광세기 (a.u.)
파장 (nm)
0
100
200
300
400
500
600
500
550
600
650
700

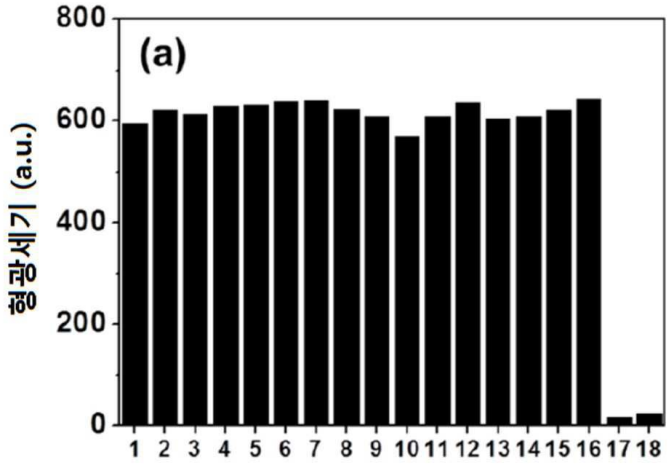
도면2a


(a)
형광세기 (a.u.)
파장 (nm)
Intensity (a.u.)
Cu(II) (μM)

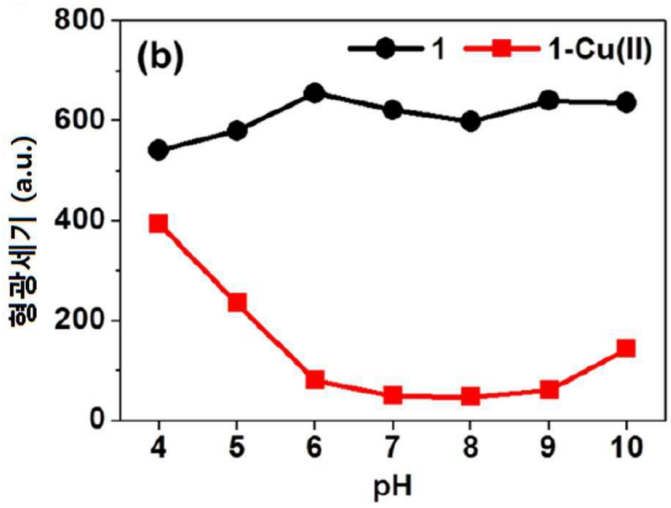
도면2b



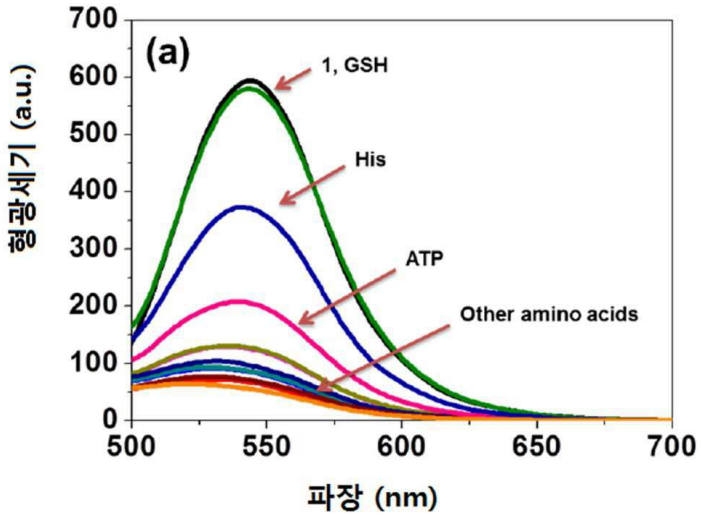
도면3a



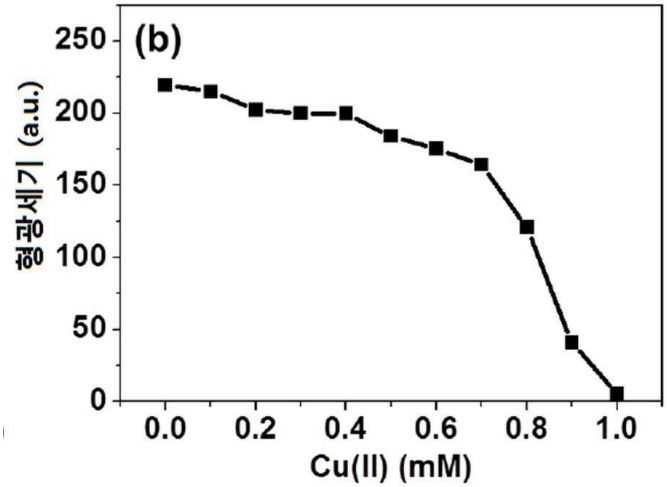
도면3b



도면4a


(a)
1, GSH
His
ATP
Other amino acids
형광세기 (a.u.)
파장 (nm)
0
100
200
300
400
500
600
700
500
550
600
650
700

도면4b


(b)
형광세기 (a.u.)
Cu(II) (mM)
0
50
100
150
200
250
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

도면5

