



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0116179  
(43) 공개일자 2016년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/68 (2006.01) C07D 285/14 (2006.01)  
G01N 21/17 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)  
G01N 31/22 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
G01N 33/6815 (2013.01)  
C07D 285/14 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-0042512  
(22) 출원일자 2015년03월26일  
심사청구일자 2015년03월26일

(71) 출원인  
이화여자대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)  
(72) 발명자  
윤주영  
서울특별시 서초구 잠원로14길 23 207동 1703호 (잠원동, 롯데캐슬아파트)  
윤준  
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이대 종합과학관 D동 501호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이원희

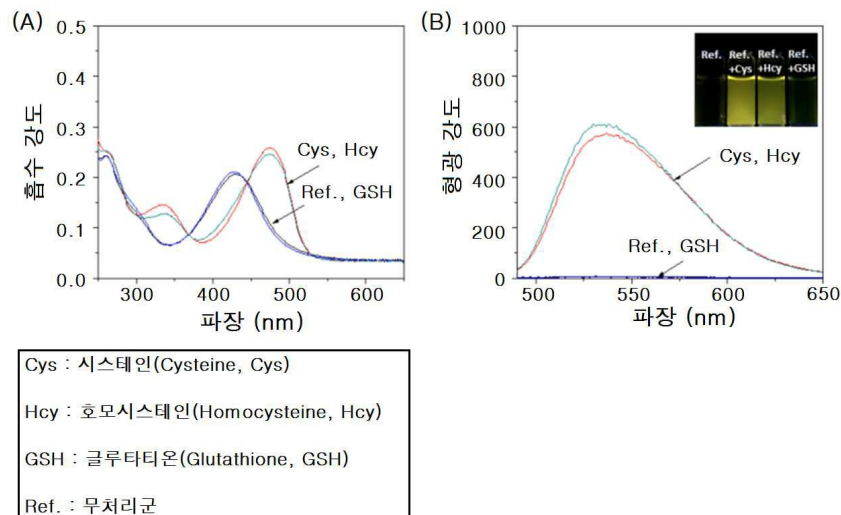
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **시스테인 또는 호모시스테인을 선택적으로 감지하기 위한 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 프로브**

(57) 요약

본 발명은 시스테인 및 호모시스테인을 선택적으로 감지하기 위한 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 프로브에 관한 것으로, 본 발명에 따른 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 프로브는 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며; 중성 조건(pH 7.4)에서 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)과 선택적으로 반응하여 흡수 또는 형광 스펙트럼이 변화하고; 약산성 조건(pH 6.0)에서 오직 시스테인(Cys, Cysteine)과 선택적으로 반응하여 흡수 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 내에서 하나의 프로브로 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 동시에 검출하거나 선택적으로 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**G01N 21/17** (2013.01)

**G01N 21/64** (2013.01)

**G01N 31/22** (2013.01)

**G01N 33/52** (2013.01)

(72) 발명자

**이다영**

부산광역시 사상구 주례로 93 104동 405호 (주례  
동, 현대무지개타운아파트)

**김경미**

서울특별시 강서구 강서로18마길 9 (화곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711020628

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원 유기소재 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2021.08.31

---

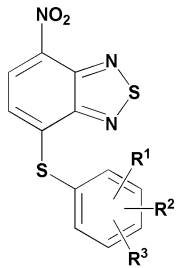
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO<sub>2</sub>, 할로젠, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>이고,

상기  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 -H, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이다).

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 -H, 할로젠, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>이고,

상기  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 -H 또는 C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 -H 또는 -NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>이고,

상기  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 -H인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물:

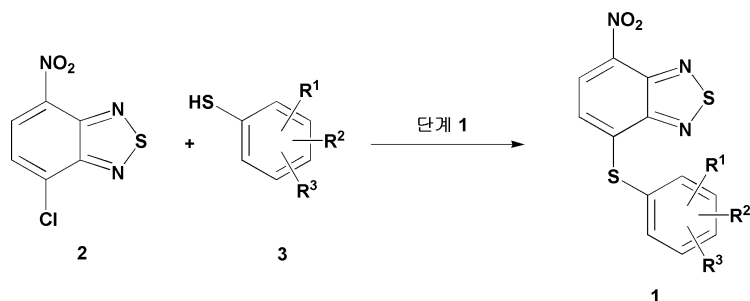
(1) 4-(7-니트로벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일티오)벤젠아민.

## 청구항 5

하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>는 독립적으로 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

## 청구항 6

제1항의 화합물을 포함하는 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine) 검출용 화학센서.

## 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 화학센서는 생체시료 중에서 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)을 검출하는 것을 특징으로 하는 화학센서.

## 청구항 8

시료에 제6항의 화학센서를 첨가하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 준비한 시료에 광원을 조사하는 단계(단계 2); 및

흡수 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)의 검출방법.

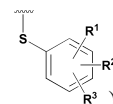
## 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 검출방법은 생체시료 중에서 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)을 검출하는 것을 특징으로 하는 화학센서.

## 청구항 10

제8항에 있어서,



상기 검출방법은 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 황(sulfur) 원자를 포함하는 페닐 유도체(시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)과 반응함으로써 떨어져 나가, 이에 발생하는  $\pi$ -공액계( $\pi$ -conjugation system) 변화에 기인하는 흡수 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 것을 특징으로 하는 검출방법.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 시스테인 또는 호모시스테인을 선택적으로 감지하기 위한 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 프로브에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0003] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들은 환원된 자유 싸이올(free thiol) 형태와, 산화된 디설파이드(disulfide) 형태 사이에서 평형을 유지하며 생체 내에서 산화-환원 항상성을 유지하는 중요한 역할을 수행하는 수많은 펩타이드들의 구성요소이다(비특허문헌 1).

[0005] 비특허문헌 2에서는, 생체 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들의 비정상적인 수준(levels)은 간 손상, 암, 에이즈, 골다공증, 알츠하이머 병, 염증성 장질환, 심장혈관계 질병 등 특정 질병의 발생과 밀접하게 관련이 있음을 개시하고 있다. 즉, 생체 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올(Biothiol)의 수준을 평가한다면, 이와 관련된 몇몇 질병들에 대하여 조기 진단이 가능하게 될 것이다.

[0007] 이에, 생체 내에서 다양한 아미노산들 중 선택적으로 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산을 검출하기 위한 다양한 형광 프로브(Fluorescent probes)가 개발되었다. 구체적으로, 비특허문헌 3에서는, 싸이올기가 독특한 친핵성 첨가 및 치환반응을 한다는 점을 사용한 프로브에 대하여 개시하고 있다. 하지만, 상기 프로브의 경우, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine), 글루타티온(GSH, Glutathione) 등 싸이올기를 포함하는 아미노산을 모두 검출하며 각각의 아미노산을 선택적으로 검출하지 못하는 문제가 있다.

[0009] 상기 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)은 세포 내 산화환원 활성도(intracellular redox activity), 이물질 대사(xenobiotic metabolism), 세포 내 신호전달, 유전자 조절 등의 세포 기능과 관련이 있어 특히 중요하다.

[0011] 상기 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 선택적으로 검출하기 위하여 유기 염료를 기반으로 한 몇몇 형광 프로브가 개발되었다. 예를 들면, 비특허문헌 4에서는 상기 바이오싸이올 중에서 오직 시스테인(Cys, Cysteine)을 선택적으로 검출하기 위한 용도로 사용할 수 있는 프로브에 관하여 개시하고 있다. 또한, 비특허문헌 5에서는 상기 바이오싸이올 중에서 오직 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 선택적으로 검출하기 위한 용도로 사용할 수 있는 보디피(BODIPY) 구조 기반의 프로브에 관하여 개시하고 있다.

[0013] 하지만, 상기 프로브들은 독립적으로 오직 시스테인(Cys, Cysteine)을 검출하거나(비특허문헌 4), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 검출(비특허문헌 5)하는 용도로 사용할 수 있으며, 하나의 프로브로 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 동시에 검출하거나 선택적으로 검출할 수 없는 한계가 있다.

[0015] 이에, 본 발명자들은 하나의 프로브로 생체시료 내에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 동시에 검출하거나 선택적으로 검출하기 위한 프로브를 개발하기 위하여 연구하던 중, 본 발명에 따른 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 프로브는 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며; 중성 조건(pH 7.4)에서 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)과 선택적으로 반응하여 흡수 또는 형광 스펙트럼이 변화하고; 약산성 조건(pH 6.0)에서 오직 시스테인(Cys, Cysteine)과 선택적으로 반응하여 흡수 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 내에서 하나의 프로브로 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 동시에 검출하거나 선택적으로 검출하는 용도로 유용함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0017] (비특허문헌 0001) Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L. B. Trends Biochem. Sci. 2003, 28, 32.
- (비특허문헌 0002) Herzenberg, L. A.; De Rosa, S. C.; Dubs, J. G.; Roederer, M.; Anderson, M. T.; Ela, S. W.; Deresinski S. C.; Herzenberg, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997, 94, 1967.
- (비특허문헌 0003) Yin, L.-L.; Chen, Z.-Z.; Tong, L.-L.; Xu, K.-H.; Tang, B. Chin. J. Analy. Chem. 2009, 37, 1073.
- (비특허문헌 0004) RSC Adv., 2014, 4, 29340-29343.
- (비특허문헌 0005) Chem. Commun., 2014, 50, 13668-13671.

## 발명의 내용

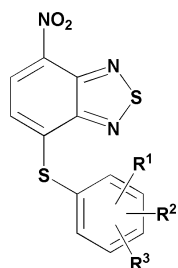
### 해결하려는 과제

- [0018] 본 발명의 목적은 시스테인 또는 호모시스테인을 선택적으로 감지하기 위한 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 화합물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 화학센서를 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학센서를 이용한 시스테인 또는 호모시스테인의 검출방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0026] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0027] [화학식 1]



[0028]

[0029] 상기 화학식 1에서,

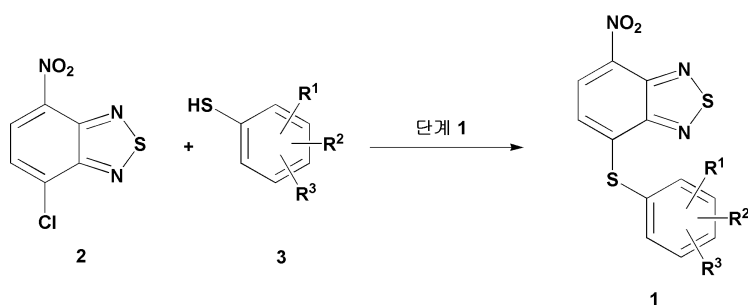
[0030]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO<sub>2</sub>, 할로젠, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>이고,

[0031] 상기 R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 -H, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이다.

[0033] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0034] 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0035] [반응식 1]



[0036]

[0037] 상기 반응식 1에서,

[0038]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0040] 나아가, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine) 검출용 화학 센서를 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 시료에 상기 화학센서를 첨가하는 단계(단계 1);

[0043] 상기 단계 1에서 준비한 시료에 광원을 조사하는 단계(단계 2); 및

[0044] 흡수 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)의 검출방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0046] 본 발명에 따른 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 프로브는 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며; 중성 조건(pH 7.4)에서 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 시스테인

인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)과 선택적으로 반응하여 흡수 또는 형광 스펙트럼이 변화하고; 약산성 조건(pH 6.0)에서 오직 시스테인(Cys, Cysteine)과 선택적으로 반응하여 흡수 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 내에서 하나의 프로브로 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 동시에 검출하거나 선택적으로 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0048]

도 1(A)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 중성(pH 7.4) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 흡수 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이다.

도 1(B)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 중성(pH 7.4) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 형광 발광 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이고, 삽도는 각 샘플의 형광 발광을 관찰한 샘플을 나타내는 이미지이다.

도 2는 중성(pH 7.4) 조건에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine), 글루타티온(GSH, Glutathione), 알라닌(Alanine, Ala), 아르지닌(Arginine, Arg), 아스파라진(Asparagine, Asn), 아스파르트산(Aspartic acid, Asp), 디티오프레이톨(Dithiothreitol, Dtt), 글루타민(Glutamine, Gln), 글루탐산(Glutamic acid, Glu), 글라이신(Glycine, Gly), 히스티딘(Histidine, His), 이소로이신(Isoleucine, Ile), 라이신(Lysine, Lys), 메티오닌(Methionine, Met), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 프롤린(Proline, Pro), 세린(Serine, Ser), 트립토판(Tryptophan, Trp), 타이로신(Tyrosine, Tyr) 및 발린(Valine, Val)을 각각 반응시켜 533nm 파장 대의 상대적인 형광 발광 강도를 관찰한 이미지이다.

도 3은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 다양한 농도의 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시켜 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)변화를 관찰한 이미지이다.

도 4는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 다양한 농도의 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시켜 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)변화를 관찰한 이미지이다.

도 5는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.

도 6은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.

도 7(A)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 약산성(pH 6.0) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 흡수 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이다.

도 7(B)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 약산성(pH 6.0) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 형광 발광 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이고, 삽도는 각 샘플의 형광 발광을 관찰한 샘플을 나타내는 이미지이다.

도 8은 약산성(pH 6.0) 조건에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine), 글루타티온(GSH, Glutathione), 알라닌(Alanine, Ala), 아르지닌(Arginine, Arg), 아스파라진(Asparagine, Asn), 아스파르트산(Aspartic acid, Asp), 디티오프레이톨(Dithiothreitol, Dtt), 글루타민(Glutamine, Gln), 글루탐산(Glutamic acid, Glu), 글라이신(Glycine, Gly), 히스티딘(Histidine, His), 이소로이신(Isoleucine, Ile), 라이신(Lysine, Lys), 메티오닌(Methionine, Met), 오르니틴(Ornithine, Orn), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 세린(Serine, Ser), 트레오닌(Threonine, Thr), 트립토판(Tryptophan, Trp) 및 발린(Valine, Val)을 각각 반응시켜 533nm 파장 대의 상대적인 형광 발광 강도를 관찰한 이미지이다.

도 9는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.

도 10은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.

도 11은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 0-500  $\mu$ M 농도의 시스테인(Cys, Cysteine)을 적정하며 반응시켜 관찰되는 변화를 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 관찰한 이미지이다.

도 12는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 0-500  $\mu$ M 농도의 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 적정하며 반응시켜 관찰되는 변화를 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 관찰한 이미지이다.

도 13(a)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 13(b)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 13(c)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 13(d)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 호모시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 13(e)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 글루타티온을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 14(a)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 14(b)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 14(c)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 14(d)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 호모시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

도 15는 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가한 이미지이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049]

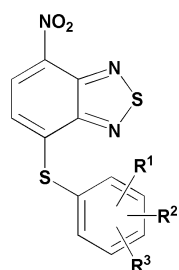
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0050]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0051]

[화학식 1]



[0052]

상기 화학식 1에서,

[0053]

[0054]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO<sub>2</sub>, 할로젠, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>이고,

[0055] 상기  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 -H, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이다.

[0057] 바람직하게,

[0058]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 -H, 할로젠, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>이고,

[0059] 상기  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 -H 또는 C<sub>1-10</sub>의 직쇄 또는 측쇄 알킬이다.

[0061] 더욱 바람직하게,

[0062]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 -H 또는 -NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>이고,

[0063] 상기  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 -H이다.

[0065] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 예로는 하기의 화합물을 들 수 있다.

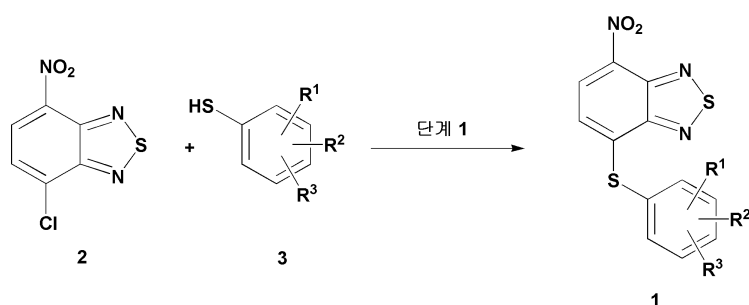
[0066] (1) 4-(7-니트로벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일티오)벤젠아민.

[0068] 상기 화합물은 세포 내 존재하는 다양한 아미노산 중, 시스테인 또는 호모시스테인을 선택적으로 검출하기 위한 용도로 사용할 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0071] 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0072] [반응식 1]

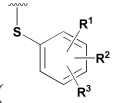


[0073]

[0074] 상기 반응식 1에서,

[0075]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 는 독립적으로 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0077] 이하, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

- [0079] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이며, 보다 구체적으로는 용매에 용해된 화학식 3으로 표시되는 화합물 및 트리에틸아민 혼합물에 화학식 1로 표시되는 화합물을 첨가하고 교반하여 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0080] 이때, 상기 반응 용매로는 테트라하이드로퓨란; 다이옥산; 에틸에테르, 1,2-다이메톡시에탄 등을 포함하는 에테르용매; 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 포함하는 저급 알코올; 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄, 물, 아세트나이트릴, 아세트나셀설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시크레이트, 락테이트,  $\beta$ -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 사용할 수 있으며, 테트라하이드로퓨란을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0081] 또한, 상기 반응온도는 0℃에서 용매의 비등점 사이에서 수행하는 것이 바람직하고, 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.
- [0083] 나아가, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine) 검출용 화학센서를 제공한다. 여기서, 상기 화학센서는 생체시료 중에서 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)을 검출하는 것을 특징으로 한다.
- [0085] 또한, 본 발명은 시료에 상기 화학센서를 첨가하는 단계(단계 1);
- [0086] 상기 단계 1에서 준비한 시료에 광원을 조사하는 단계(단계 2); 및
- [0087] 흡수 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)의 검출방법을 제공한다.
- [0089] 이하, 본 발명에 따른 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)의 검출방법을 단계별로 상세히 설명한다.
- [0091] 본 발명에 따른 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)의 검출방법에 있어서, 상기 단계 1은 시료에 상기 화학센서를 첨가하는 단계이다. 여기서, 상기 시료는 생체시료인 것이 바람직하고, 헬라 세포(HeLa cell)인 것이 가장 바람직하다.
- [0093] 본 발명에 따른 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)의 검출방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 준비한 시료에 광원을 조사하는 단계이다. 여기서, 상기 광원은 형광 분광광도계 또는 UV 흡수 분광법을 사용하여 조사하는 것이 바람직하다.
- [0095] 본 발명에 따른 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)의 검출방법에 있어서, 상기 단계 3은 흡수 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 단계이다. 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 황(sulfur) 원자를 포함하는 페닐 유도체()가 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)과 반응함으로써 떨어져 나가, 이에 발생하는  $\pi$ -공액계( $\pi$ -conjugation system) 변화에 기인하는 흡수 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합함으로써 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)을 검출할 수 있다.

- [0097] 본 발명에 따른 니트로벤조티아디아졸 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성의 시스테인(Cysteine) 또는 호모시스테인(Homocysteine)과 선택적으로 반응하여 흡수 또는 형광 스펙트럼이 변화할 것이라 예상되었으며, 이를 증명하기 위하여 하기 일련의 실험을 수행하였다.
- [0099] 먼저, 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 대한 선택성 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중 시스테인(Cys, Cysteine)과 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)과 반응하여 흡수 또는 형광 발광 스펙트럼의 변화가 나타남을 확인하였다(실험예 1의 도 1, 실험예 2의 도 2 참조).
- [0101] 또한, 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 농도에 따른 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)변화를 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 농도를 증가시킬수록 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)의 발광 정도가 증가하는 것을 확인하였다(실험예 3의 도 3 및 도 4 참조).
- [0103] 나아가, 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 의한 형광 발광의 시간 경과에 따른 유지 안정성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)이 반응하여 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)은 시간 경과에 따라 특정 형광 세기에 대해 수렴하며 증가하는 것으로 나타나 형광 발광 유지 안정성이 높은 것을 확인하였다(실험예 4의 도 5 및 도 6 참조).
- [0105] 또한, 약산성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine)에 대한 선택성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 6.0) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중 오직 시스테인(Cys, Cysteine)과 반응하여 흡수 또는 형광 발광 스펙트럼의 변화가 나타남을 확인하였다(실험예 5의 도 7, 실험예 6의 도 8).
- [0107] 나아가, 약산성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 의한 형광 발광의 시간 경과에 따른 유지 안정성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)이 반응하여 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)은 시간 경과에 따라 특정 형광 세기에 대해 수렴하며 증가하는 것으로 나타나 형광 발광 유지 안정성이 높은 것을 확인하였다(실험예 7의 도 9 및 도 10 참조).
- [0109] 또한, 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 농도에 따른 흡수 또는 형광 스펙트럼 변화를 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 적정 농도를 증가시킬수록 535nm 파장 영역 대의 형광 발광 정도가 증가하는 것으로 나타났다(실험예 8의 도 11 및 도 12 참조).
- [0111] 나아가, 중성 조건에서 세포 내 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 검출능력을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 시스테인 및 호모시스테인과 선택적으로 반응하여 그린 형광이 발생하므로, 시스테인 및 호모시스테인을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다(실험예 9의 도 13 참조).
- [0113] 또한, 약산성 조건에서 세포 내 시스테인(Cys, Cysteine) 검출능력을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실

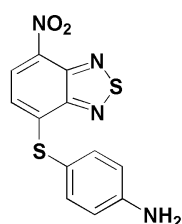
시에 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 7.4) 조건에서 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 시스테인과 선택적으로 반응하여 그런 형광이 발생하므로, 시스테인을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다(실험예 10의 도 14 참조).

[0115] 나아가, 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물을 0 내지 3  $\mu$ M로 HeLa 세포와 함께 배양한 경우, 상기 세포의 생존율이 모두 약 85% 이상인 것으로 나타났다(실험예 11의 도 15 참조).

[0117] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0118] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0120] <실시예 1> 4-(7-니트로벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일티오)벤젠아민의 제조



[0121]

[0122] 건조 THF (20 mL)에 용해된 4-아미노티오펜올 (125 mg, 1.0 mm) 및 트리에틸아민 (303 mg, 3.0 mm) 용액에 4-클로로-7-니트로벤조[c][1,2,5]티아디아졸 (215 mg, 1.0 mm)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 질소환경 하 4시간 동안 환류하였다. 상온으로 냉각한 후, 상기 용매를 제거하고, 물로 세척한 후, 디클로로메탄으로 추출하였다. 조 생성물이 생성되면, 이를 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산/디클로로메탄 1 : 1)를 통해 정제하여 표제 화합물을 제조하였다(수율 : 93%).

[0123]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.66 (d, 1H), 6.83 (d, 2H), 7.22 (d, 2H), 8.24 (d, 1H), 4.10 ( $\text{NH}_2$ );

[0124]  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149.36, 148.34, 145.12, 142.55, 137.22, 130.83, 120.82, 116.43, 112.31; 및

[0125] FAB-MS  $m/z$  =XXXX [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$  =304.35.

[0127] <실험예 1> 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 대한 선택성 평가 1

[0128] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중에서, 실시예 1에서 제조한 화합물의 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 대한 중성(pH 7.4) 조건에서의 선택성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0130] 실시예 1에서 제조한 화합물 10  $\mu$ M과, 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 각각 100  $\mu$ M씩 1% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(0.01M, pH=7.4)에 첨가하여 25 $^\circ\text{C}$ 에서, UV 흡수 스펙트럼(UVIKON 933 Double Beam UV/VIS Spectrometer)을 통해 나타나는 변화와 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 나타나는 변화를 관찰하였다. 그 결과를 각각 도 1(A) 및 도 1(B)에 나타내었다.

[0132] 도 1(A)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루

타티온(GSH, Glutathione)을 중성(pH 7.4) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 흡수 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이다.

[0133] 도 1(B)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 중성(pH 7.4) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 형광 발광 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이고, 삽도는 각 샘플의 형광 발광을 관찰한 샘플을 나타내는 이미지이다.

[0135] 도 1(A)에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)과 반응하여 475nm 파장대에서 강한 흡수를 나타내는 것으로 확인되는 반면, 글루타티온(GSH, Glutathione)은 무처리군과 유사한 흡수를 보이는 것으로 나타났다.

[0137] 또한, 도 1(B)에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)과 반응하여 535nm 파장대에서 강한 형광 발광을 나타내는 것으로 확인되는 반면, 글루타티온(GSH, Glutathione)은 무처리군과 유사한 형광 발광을 보이는 것으로 나타났다.

[0139] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중 시스테인(Cys, Cysteine)과 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0141] <실험예 2> 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 대한 선택성 평가

[0142] 상기 실험예 1에서 사용한 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 뿐만 아니라, 보다 다양한 종류의 아미노산에 대하여 실시예 1에서 제조한 화합물이 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 대하여 선택성을 갖는 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0144] 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 이외에, 알라닌(Alanine, Ala), 아르지닌(Arginine, Arg), 아스파라진(Asparagine, Asn), 아스파르트산(Aspartic acid, Asp), 디티오프레이톨(Dithiothreitol, Dtt), 글루타민(Glutamine, Gln), 글루탐산(Glutamic acid, Glu), 글라이신(Glycine, Gly), 히스티딘(Histidine, His), 이소로이신(Isoleucine, Ile), 라이신(Lysine, Lys), 메티오닌(Methionine, Met), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 프롤린(Proline, Pro), 세린(Serine, Ser), 트립토판(Tryptophan, Trp), 타이로신(Tyrosine, Tyr) 및 발린(Valine, Val)을 추가로 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 수행하여 533nm 파장대의 상대적인 형광 발광 강도를 평가하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0146] 도 2는 중성(pH 7.4) 조건에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine), 글루타티온(GSH, Glutathione), 알라닌(Alanine, Ala), 아르지닌(Arginine, Arg), 아스파라진(Asparagine, Asn), 아스파르트산(Aspartic acid, Asp), 디티오프레이톨(Dithiothreitol, Dtt), 글루타민(Glutamine, Gln), 글루탐산(Glutamic acid, Glu), 글라이신(Glycine, Gly), 히스티딘(Histidine, His), 이소로이신(Isoleucine, Ile), 라이신(Lysine, Lys), 메티오닌(Methionine, Met), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 프롤린(Proline, Pro), 세린(Serine, Ser), 트립토판(Tryptophan, Trp), 타이로신(Tyrosine, Tyr) 및 발린(Valine, Val)을 각각 반응시켜 533nm 파장대의 상대적인 형광 발광 강도를 관찰한 이미지이다.

[0148] 도 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)과 반응하여 533nm 파장대에서 강한 형광 발광을 나타내는 것으로 확인되는

반면, 이를 제외한 나머지 아미노산에 대하여는 형광 발광을 보이지 않는 것으로 나타났다.

- [0150] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 다양한 아미노산 중, 오직 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0152] <실험예 3> 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 농도에 따른 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)변화 평가
- [0153] 중성 조건에서 일정한 농도(1  $\mu$ M)의 실시예 1에서 제조한 화합물과, DMSO-HEPES (0.01M, pH 7.4) (1:99, v/v)에 농축된 다양한 농도의 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시켜 관찰되는 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)변화를 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 평가하였으며, 그 결과를 도 3 및 도 4에 각각 나타내었다.
- [0155] 도 3은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 다양한 농도의 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시켜 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)변화를 관찰한 이미지이다.
- [0156] 도 4는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 다양한 농도의 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시켜 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)변화를 관찰한 이미지이다.
- [0158] 도 3에 나타난 바와 같이, 시스테인(Cys, Cysteine)의 농도를 증가시킬수록 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)의 발광 정도가 증가하는 것으로 나타났다. 여기서, 상기 시스테인(Cys, Cysteine)의 검출 하한값은  $9.93056 \times 10^{-7}$  M인 것을 확인하였다.
- [0160] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 농도를 증가시킬수록 표준 형광 반응(Normalized fluorescence responses)의 발광 정도가 증가하는 것으로 나타났다. 여기서, 상기 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 검출 하한값은  $5.91741 \times 10^{-7}$  M인 것을 확인하였다.
- [0162] <실험예 4> 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 의한 형광 발광의 시간 경과에 따른 유지 안정성 평가
- [0163] 중성 조건에서 일정한 농도(10  $\mu$ M)의 실시예 1에서 제조한 화합물과, DMSO-HEPES (0.01M, pH 7.4) (1:99, v/v)에 농축된 100  $\mu$ M의 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 각각 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광이 시간 경과에 따라 안정하게 유지되는지 평가하기 위하여, 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 5 및 도 6에 각각 나타내었다.
- [0165] 도 5는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.
- [0166] 도 6은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.
- [0168] 도 5에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)은 시간 경과에 따라 특정 형광 세기에 대해 수렴하며 증가하는 것으로 나타나 형광 발광 유지 안정성이 높은 것으로 나타났다.

- [0170] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물과 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)은 시간 경과에 따라 특정 형광 세기에 대해 수렴하며 증가하는 것으로 나타나 형광 발광 유지 안정성이 높은 것으로 나타났다.
- [0172] <실험예 5> 약산성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine)에 대한 선택성 평가 1
- [0173] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중에서, 실시예 1에서 제조한 화합물의 시스테인(Cys, Cysteine)에 대한 약산성(pH 6.0) 조건에서의 선택성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0175] 실시예 1에서 제조한 화합물 10  $\mu$ M과, 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 각각 100  $\mu$ M씩 1% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 구연산(citric acid)-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.01M, pH=6.0)에 첨가하여 25℃에서, UV 흡수 스펙트럼(UVIKON 933 Double Beam UV/VIS Spectrometer)을 통해 나타나는 변화와 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 나타나는 변화를 관찰하였다. 그 결과를 각각 도 7(A) 및 도 7(B)에 나타내었다.
- [0177] 도 7(A)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 약산성(pH 6.0) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 흡수 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0178] 도 7(B)는 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)을 약산성(pH 6.0) 조건에서 각각 반응시켜 나타나는 형광 발광 스펙트럼 변화를 관찰한 이미지이고, 삽도는 각 샘플의 형광 발광을 관찰한 샘플을 나타내는 이미지이다.
- [0180] 도 7(A)에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 6.0) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine)과 반응하여 475nm 파장 대에서 강한 흡수를 나타내는 것으로 확인되는 반면, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)은 무처리군과 유사한 흡수를 보이는 것으로 나타났다.
- [0182] 또한, 도 7(B)에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 6.0) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine)과 반응하여 535nm 파장 대에서 강한 형광 발광을 나타내는 것으로 확인되는 반면, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione)은 무처리군과 유사한 형광 발광을 보이는 것으로 나타났다.
- [0184] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 6.0) 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중 오직 시스테인(Cys, Cysteine)을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0186] <실험예 6> 약산성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine)에 대한 선택성 평가 2
- [0187] 상기 실험예 5에서 사용한 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 뿐만 아니라, 보다 다양한 종류의 아미노산에 대하여 실시예 1에서 제조한 화합물이 시스테인(Cys, Cysteine)에 대하여 선택성을 갖는 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0189] 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 이외에, 알라닌(Alanine, Ala), 아르지닌(Arginine, Arg), 아스파라긴(Asparagine, Asn), 아스파르트산(Aspartic acid, Asp), 디티오프레이톨(Dithiothreitol, Dtt), 글루타민(Glutamine, Gln), 글루탐산(Glutamic acid, Glu), 글라이신

(Glycine, Gly), 히스티딘(Histidine, His), 이소로이신(Isoleucine, Ile), 라이신(Lysine, Lys), 메티오닌(Methionine, Met), 오르니틴(Ornithine, Orn), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 세린(Serine, Ser), 트레오닌(Threonine, Thr), 트립토판(Tryptophan, Trp) 및 발린(Valine, Val)을 추가로 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험에 1과 동일한 방법으로 수행하여 533nm 파장대의 상대적인 형광 발광 강도를 평가하였으며 그 결과 도 8에 나타내었다.

[0191] 도 8은 약산성(pH 6.0) 조건에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine), 글루타티온(GSH, Glutathione), 알라닌(Alanine, Ala), 아르지닌(Arginine, Arg), 아스파라진(Asparagine, Asn), 아스파르트산(Aspartic acid, Asp), 디티오프레이톨(Dithiothreitol, Dtt), 글루타민(Glutamine, Gln), 글루탐산(Glutamic acid, Glu), 글라이신(Glycine, Gly), 히스티딘(Histidine, His), 이소로이신(Isoleucine, Ile), 라이신(Lysine, Lys), 메티오닌(Methionine, Met), 오르니틴(Ornithine, Orn), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 세린(Serine, Ser), 트레오닌(Threonine, Thr), 트립토판(Tryptophan, Trp) 및 발린(Valine, Val)을 각각 반응시켜 533nm 파장 대의 상대적인 형광 발광 강도를 관찰한 이미지이다.

[0193] 도 8에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 6.0) 조건에서 오직 시스테인(Cys, Cysteine)과 반응하여 533nm 파장 대에서 강한 형광 발광을 나타내는 것으로 확인되는 반면, 이를 제외한 나머지 아미노산에 대하여는 형광 발광을 보이지 않는 것으로 나타났다.

[0195] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 6.0) 조건에서 다양한 아미노산 중, 오직 시스테인(Cys, Cysteine)을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0197] <실험예 7> 약산성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 의한 형광 발광의 시간 경과에 따른 유지 안정성 평가

[0198] 약산성 조건에서 일정한 농도(10  $\mu$ M)의 실시예 1에서 제조한 화합물과, 1% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 구연산(citric acid)- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.01M, pH=6.0)에 농축된 100  $\mu$ M의 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 각각 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광이 시간 경과에 따라 안정하게 유지되는지 평가하기 위하여, 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 9 및 도 10에 각각 나타내었다.

[0200] 도 9는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.

[0201] 도 10은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)의 시간 경과에 따른 변화 정도를 관찰한 이미지이다.

[0203] 도 9에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물과 시스테인(Cys, Cysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)은 시간 경과에 따라 특정 형광 세기에 대해 수렴하며 증가하는 것으로 나타나 형광 발광 유지 안정성이 높은 것으로 나타났다.

[0205] 또한, 도 10에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물과 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 반응시킴으로써 발생하는 형광 발광(533nm 파장 영역)은 시간 경과에 따라 상기 시스테인(Cys, Cysteine)을 사용한 경우와 비교하여 현저히 낮은 특정 형광 세기에 대해 수렴하며 증가하는 것으로 나타나 형광 발광 유지 안정성이 높은 것으로 나타났다.

- [0207] <실험예 8> 중성 조건에서 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 농도에 따른 흡수 또는 형광 스펙트럼 변화 평가
- [0208] 중성 조건에서 일정한 농도(10  $\mu$ M)의 실시예 1에서 제조한 화합물과, DMSO-HEPES (0.01M, pH 7.4) (1:99, v/v)에 농축된 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 농도를 0-500  $\mu$ M로 적정하며 반응시켜 관찰되는 변화를 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 평가하였으며, 그 결과를 도 11 및 도 12에 각각 나타내었다.
- [0210] 도 11은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 0-500  $\mu$ M 농도의 시스테인(Cys, Cysteine)을 적정하며 반응시켜 관찰되는 변화를 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 관찰한 이미지이다.
- [0211] 도 12는 실시예 1에서 제조한 화합물과, 0-500  $\mu$ M 농도의 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)을 적정하며 반응시켜 관찰되는 변화를 형광 발광 스펙트럼(RF-5301/PC 형광 분광광도계, Shimadzu)을 통해 관찰한 이미지이다.
- [0213] 도 11에 나타난 바와 같이, 시스테인(Cys, Cysteine)의 적정 농도를 증가시킬수록 535nm 파장 영역 대의 형광 발광 정도가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0215] 또한, 도 12에 나타난 바와 같이, 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)의 적정 농도를 증가시킬수록 535nm 파장 영역 대의 형광 발광 정도가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0217] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물과, 시스테인(Cys, Cysteine) 또는 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)이 반응하여 유도되는 형광 강도는 농도 의존적임을 확인하였다.
- [0219] <실험예 9> 중성 조건에서 세포 내 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 검출능력 평가
- [0220] 중성 조건에서, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중에서, 실시예 1에서 제조한 화합물의 시스테인(Cys, Cysteine) 및 호모시스테인(Hcy, Homocysteine)에 대한 선택성을 세포에서 평가하기 위하여 하기과 같은 실험을 수행하였다.
- [0222] 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium, pH 7.4) 내 37°C 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 배양하여 준비하였다. 싸이올 차단제로 알려져 있는 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM) 1mM을 30분 동안 전처리하거나 처리하지 않고, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온을 각각 300  $\mu$ M 첨가한 후, DMEM 배지 내 디쉬 당(per dish)  $3 \times 10^5$  세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed) 하였다. 24시간 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 3  $\mu$ M을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 함께 배양하였다. 이후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [0224] 도 13(a)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.
- [0225] 도 13(b)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

- [0226] 도 13(c)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.
- [0227] 도 13(d)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 호모시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.
- [0228] 도 13(e)는 중성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 글루타티온을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.
- [0230] 도 13(a)에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나는 것을 확인하였으며, 이로부터 실시예 1에서 제조한 화합물은 HeLa 세포의 세포질 내 구조가 안정하게 유지되며 내인성 시스테인 및 호모시스테인과 반응하여 형광 발광을 보인다는 사실을 알 수 있다.
- [0232] 반면, 도 13(b)에 나타난 바와 같이, *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나지 않는 것을 확인하였으며, 이로부터 NEM이 싸이올 차단제로써 내인성 시스테인 및 호모시스테인을 차단하여 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 수 있는 아미노산이 없으므로 형광 발광이 나타나지 않는 사실을 알 수 있다.
- [0234] 또한, 도 13(c)에 나타난 바와 같이, *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나는 것을 확인하였으며, 이로부터 실시예 1에서 제조한 화합물은 HeLa 세포의 세포질 내 구조가 안정하게 유지되며 외인성 시스테인과 반응하여 형광 발광을 보인다는 사실을 알 수 있다.
- [0236] 나아가, 도 13(d)에 나타난 바와 같이, *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 호모시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나는 것을 확인하였으며, 이로부터 실시예 1에서 제조한 화합물은 HeLa 세포의 세포질 내 구조가 안정하게 유지되며 외인성 호모시스테인과 반응하여 형광 발광을 보인다는 사실을 알 수 있다.
- [0238] 또한, 도 13(e)에 나타난 바와 같이, *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 글루타티온을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나지 않는 것을 확인하였으며, 이로부터 실시예 1에서 제조한 화합물은 글루타티온에 대하여 활성이 없는 것을 알 수 있다.
- [0240] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 중성(pH 7.4) 조건에서 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 시스테인 및 호모시스테인과 선택적으로 반응하여 그린 형광이 발생하므로, 시스테인 및 호모시스테인을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0242] <실험예 10> 약산성 조건에서 세포 내 시스테인(Cys, Cysteine) 검출능력 평가
- [0243] 약산성 조건에서, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중 시스테인(Cys, Cysteine), 호모시스테인(Hcy, Homocysteine) 및 글루타티온(GSH, Glutathione) 중에서, 실시예 1에서 제조한 화합물의 시스테인(Cys, Cysteine)에 대한 선택성을 세포에서 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0245] HBSS(Hanks' balanced salt solution) 배지 내에서, 상기 실험예 9에서 준비한 HeLa 세포(인간 상피선암 세포,

Korea Cell Line Bank)에 싸이올 차단제로 알려져 있는 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM) 1mM을 30분 동안 전처리하거나 처리하지 않고, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 시스테인 또는 호모시스테인을 각각 300  $\mu$ M 첨가한 후, 구연산(citric acid)- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  완충액(pH 6.0)에 용해된 실시예 1에서 제조한 화합물 3  $\mu$ M을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 함께 배양하였다. 이후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0247] 도 14(a)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

[0248] 도 14(b)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

[0249] 도 14(c)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

[0250] 도 14(d)는 약산성 조건에서 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 호모시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포를 관찰한 형광 이미지 및 미분간섭 채널이다.

[0252] 도 14(a)에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나는 것을 확인하였으며, 이로부터 실시예 1에서 제조한 화합물은 HeLa 세포의 세포질 내 구조가 안정하게 유지되며 내인성 시스테인과 반응하여 형광 발광을 보인다는 사실을 알 수 있다.

[0254] 반면, 도 14(b)에 나타난 바와 같이, *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나지 않는 것을 확인하였으며, 이로부터 NEM이 싸이올 차단제로써 내인성 시스테인을 차단하여 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 수 있는 아미노산이 없으므로 형광 발광이 나타나지 않는 사실을 알 수 있다.

[0256] 또한, 도 14(c)에 나타난 바와 같이, *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나는 것을 확인하였으며, 이로부터 실시예 1에서 제조한 화합물은 HeLa 세포의 세포질 내 구조가 안정하게 유지되며 외인성 시스테인과 반응하여 형광 발광을 보인다는 사실을 알 수 있다.

[0258] 나아가, 도 14(d)에 나타난 바와 같이, *N*-에틸말레이미드 (*N*-ethylmaleimide, NEM)를 전처리한 후, 호모시스테인을 첨가하고, 실시예 1에서 제조한 화합물을 함께 배양한 HeLa 세포에서 그린 형광이 나타나지 않는 것을 확인하였으며, 이로부터 약산성(pH 6.0) 조건에서는 실시예 1에서 제조한 화합물이 호모시스테인에 대하여 활성이 없는 것을 알 수 있다.

[0260] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약산성(pH 7.4) 조건에서 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 시스테인과 선택적으로 반응하여 그린 형광이 발생하므로, 시스테인을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0262] <실험예 11> 세포독성 평가

[0263] 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

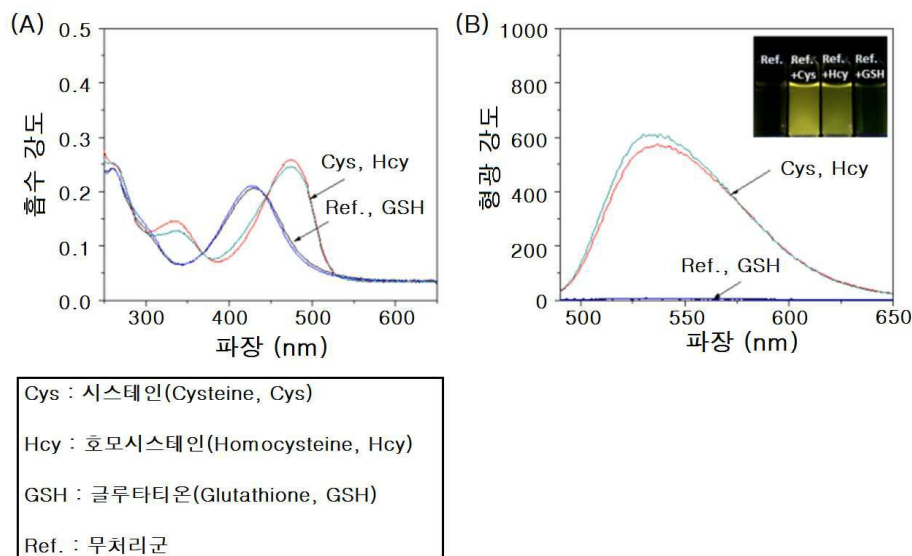
[0265] 상기 실험예 9에서 준비한 HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 96-웰 플레이트에 시딩(seed) 하였다. 하루 동안 배양한 후, 상기 세포를 실시예 1에서 제조한 화합물( $0-3\mu\text{M}$ )과 함께  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 함께 배양하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)로 세척한 후, MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma)  $0.5\text{ mg/mL}$ 를  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 첨가하고, 생성되는 포르마잔(formazan)을  $0.1\text{ mL}$  DMSO에 용해시킨 후, Spectramax Microwell plate reader를 사용하여 OD  $650\text{nm}$  부근을 읽었다. 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0267] 도 15는 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가한 이미지이다.

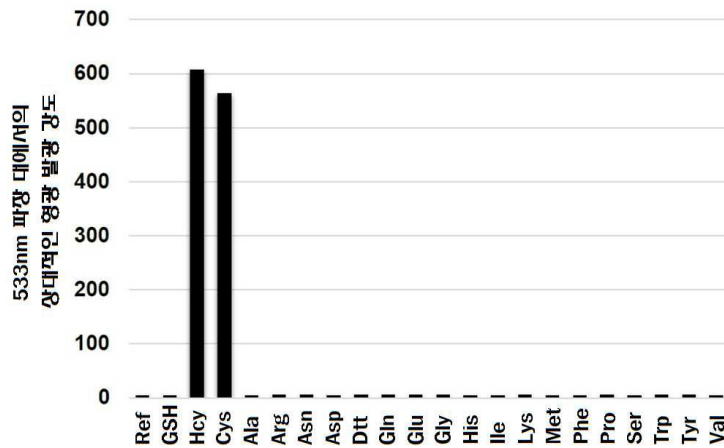
[0269] 도 15에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물을  $0$  내지  $3\mu\text{M}$ 로 HeLa 세포와 함께 배양한 경우, 상기 세포의 생존율이 모두 약  $85\%$  이상인 것으로 나타났다.

## 도면

### 도면1

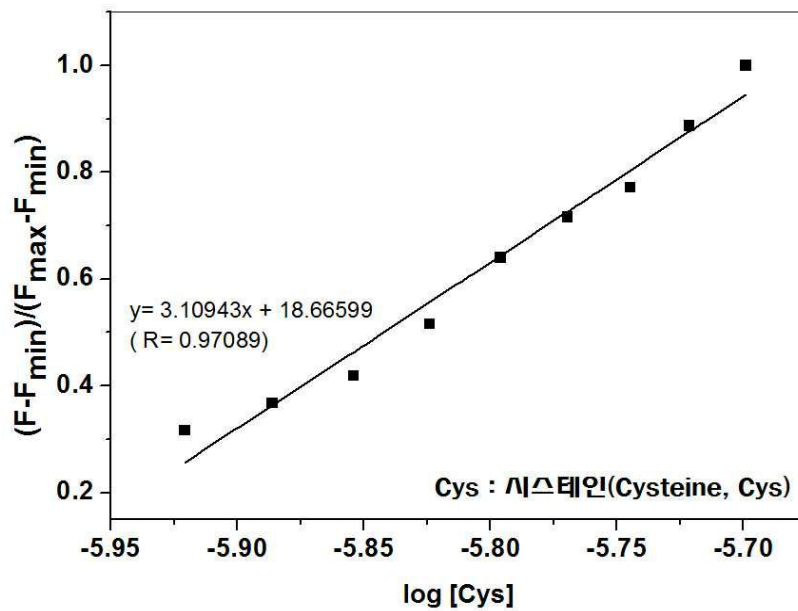


도면2

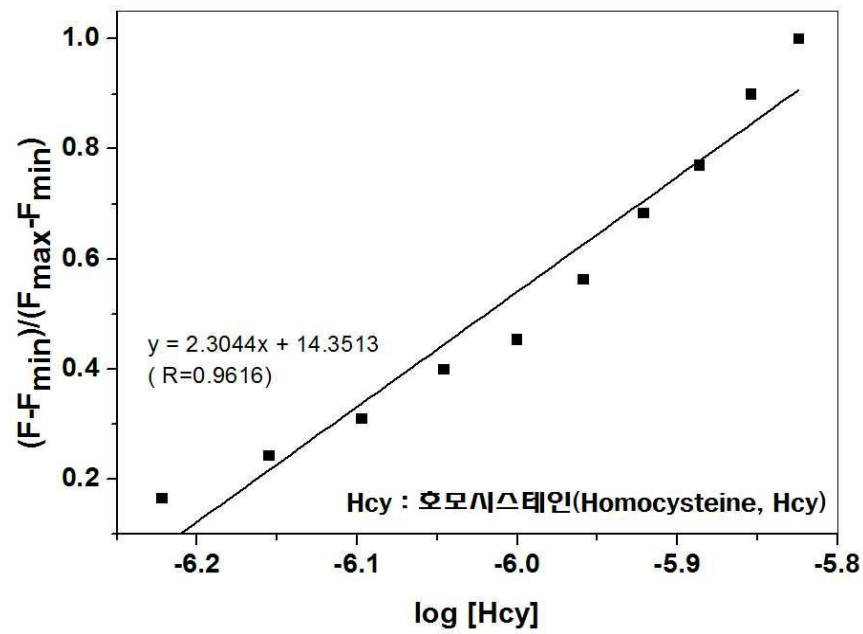


|               |             |
|---------------|-------------|
| Ref : 무처리군    | Gly : 글라이신  |
| GSH : 글루타티온   | His : 히스티딘  |
| Hcy : 호모시스테인  | Ile : 이소로이신 |
| Cys : 시스테인    | Lys : 라이신   |
| Ala : 알라닌     | Met : 메티오닌  |
| Arg : 아르기닌    | Phe : 페닐알라닌 |
| Asn : 아스파라진   | Pro : 프롤린   |
| Asp : 아스파르트산  | Ser : 세린    |
| Dtt : 디티오프레이롤 | Trp : 트립토판  |
| Gln : 글루타민    | Tyr : 타이로신  |
| Glu : 글루탐산    | Val : 발린    |

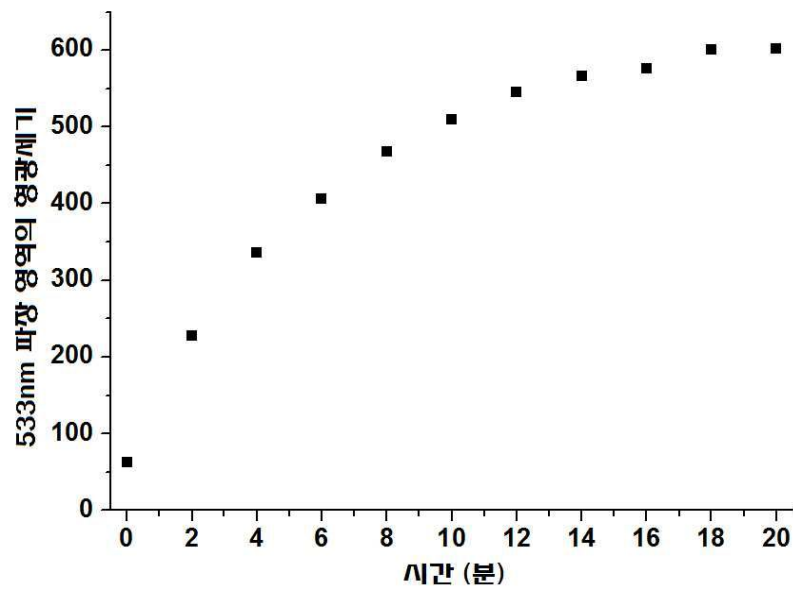
도면3



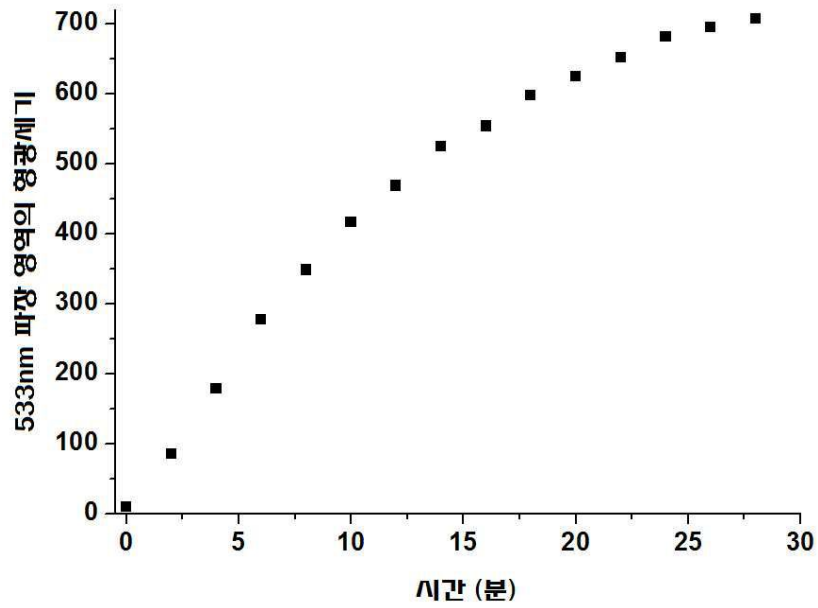
도면4



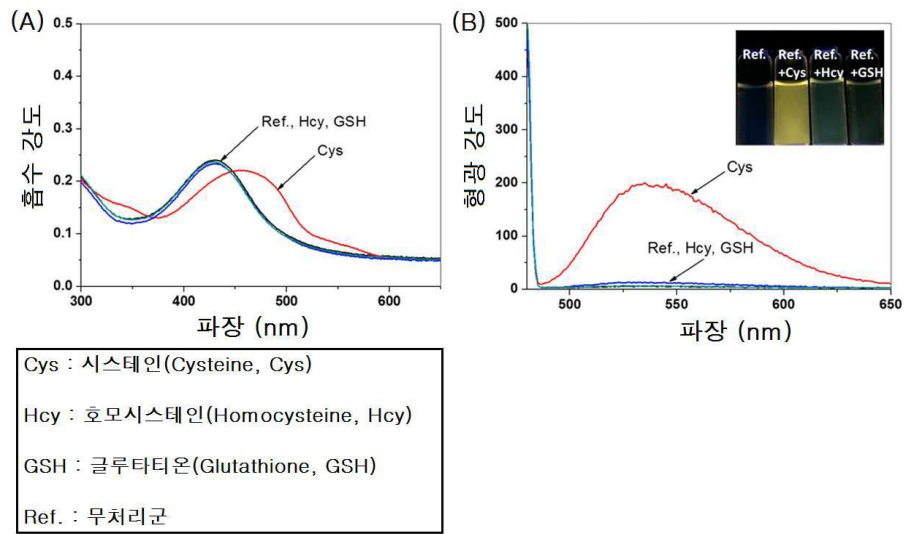
도면5



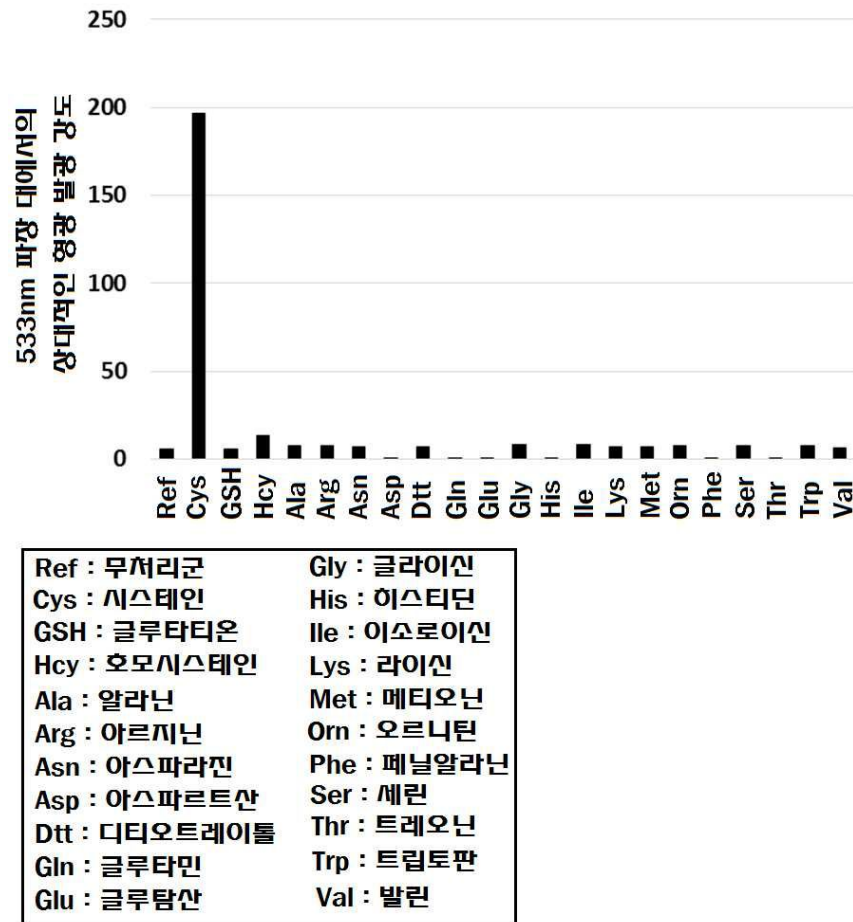
도면6



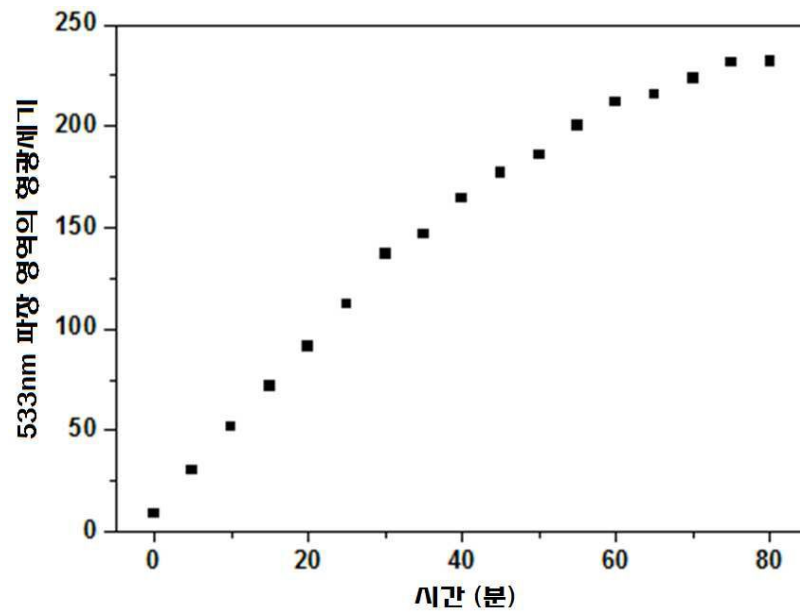
도면7



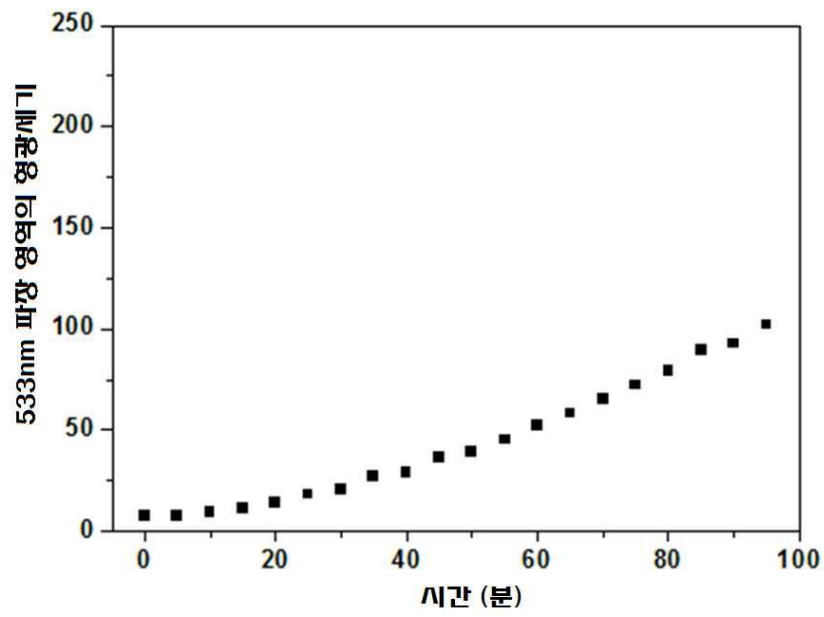
도면8



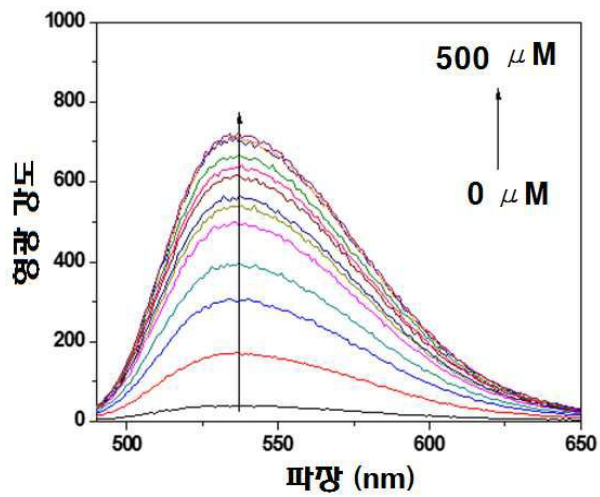
도면9



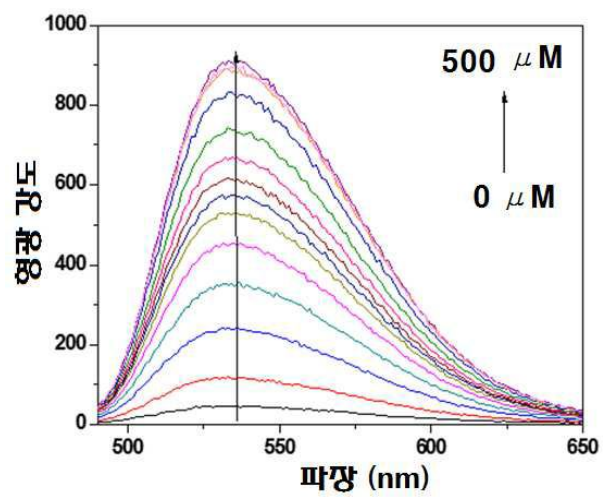
도면10



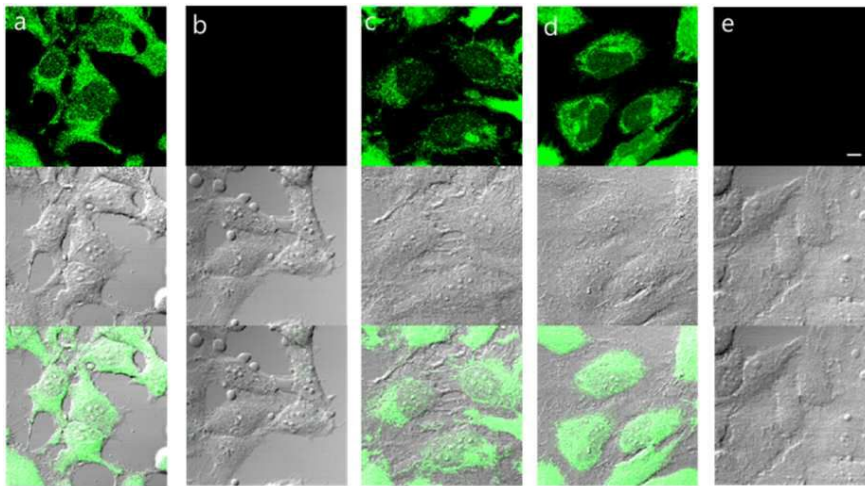
도면11



도면12

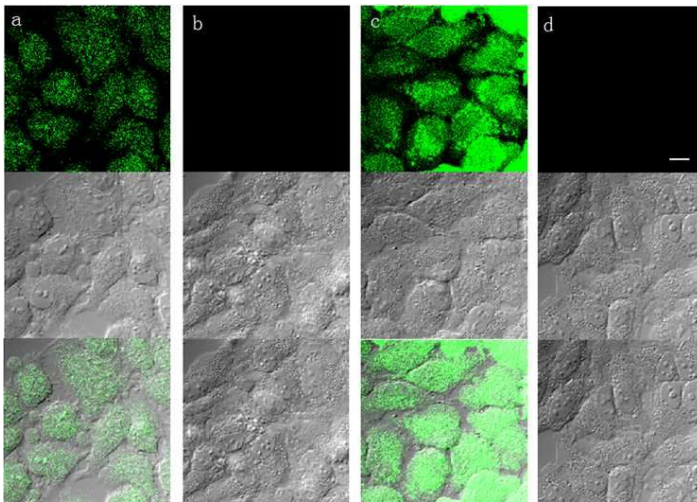


도면13



스케일 바(Scale bar) : 10  $\mu$ M

도면14



스케일 바(Scale bar) : 10  $\mu$ M

도면15

