



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월17일

(11) 등록번호 10-1990245

(24) 등록일자 2019년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 21/6428 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0045654

(22) 출원일자 2018년04월19일

심사청구일자 2018년04월19일

(56) 선행기술조사문헌

Chemical Communication, 2017, Vol. 53, pp 1607-1610.

ACS Chem. Neurosci., 2012, Vol. 3, pp 319-324.

Sensors and Actuators B:Chemical, 2017, Vol. 244, pp 673-683.

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김종승

경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호

피터 베르비스트

서울특별시 성북구 안암로 87, 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 4 항

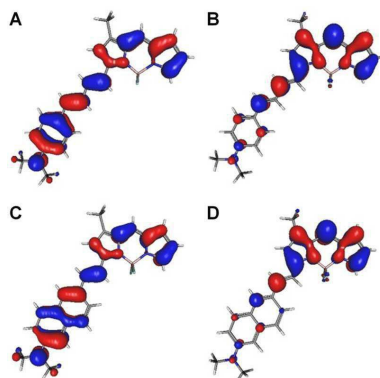
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 타우 단백질 검출용 형광 센서

(57) 요약

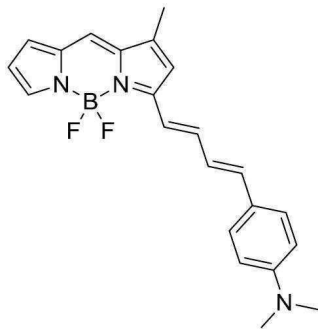
본 발명은 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1

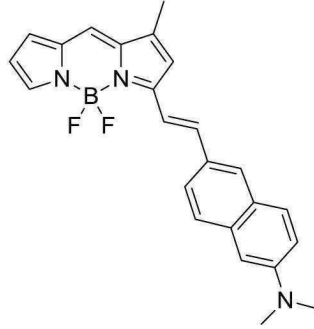


는 타우 단백질 검출용 형광 센서에 관한 것이다:

[화학식 1]



[화학식 2]



(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 2021/6439 (2013.01)

(72) 발명자

강철훈

경기도 수원시 장안구 하물로30번길 22, 105동 70
4호

서진호

경기도 용인시 기흥구 연원로42번길 2, 104동 303
호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081566

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016H1D3A1938052

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (교육인력)해외우수신진연구자유치사업

연구과제명 암과 알츠하이머 약물전달시스템의 난제 해결을 위한 단분자 진단치료제 개발

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.10.15 ~ 2017.04.30

공지예외적용 : 있음

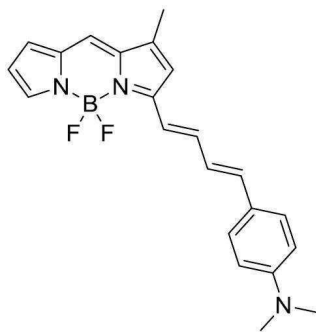
명세서

청구범위

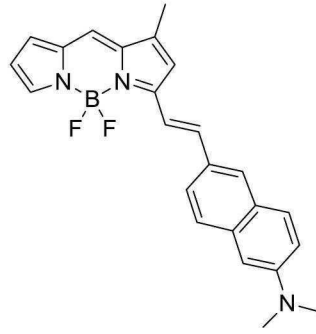
청구항 1

하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 타우 단백질과 선택적으로 상호작용하는 것을 특징으로 하는 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물은 세포 내에서 오키다산(Okadaic acid)에 의해 유발된 과인산화된 타우 단백질을 선택적으로 시각화하는 것을 특징으로 하는 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물.

청구항 4

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 타우 단백질 검출용 형광 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 타우 단백질 검출용 형광 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경 세포 내 신경섬유 매듭 (Intraneuronal neurofibrillary tangles, NFTs)은 쌍나선필라멘트로 이루어져 있으며 과인산화된 미세소관 관련 단백질 tau (MAPT, tau 단백질)(비특허문헌 1)을 포함하며, 과인산화된 타우 단백질은 세포외 β amyloid ($A\beta$) 단백질 침전물과 함께 알츠하이머 환자들의 뇌에서 발견되는 전형적인 특징에 해당한다(비특허문헌 2). 뿐만 아니라 NFT들은 다운 증후군, 근위축성측삭경화증, 피크병, 파킨슨병, 일부 형태의 가족성 치매와 같이 tauopathy라 일컫는 여러 신경퇴행 질병들에서 나타나는 일반적인 특징이기도 하다(비특허문헌 3). 한가지 중요한 점은, NFT 부하(burden)이 알츠하이머병에서의 $A\beta$ 와 달리 질병 진척도와 강한 상관관계를 나타낸다는 것이다(비특허문헌 4). 따라서 다른 tauopathy로의 잠재적 적용성을 고려할 때, tau 기반 이미징 프로브의 개발은 매우 중요한 상황이다.

- [0003] 인간의 경우, tau 단백질은 352개에서 441개 아미노산 길이 범위에서 6가지 이형(isoform)이 존재하고, 이들의 2차 구조는 명확하게 정의되어 있지 않다(비특허문헌 5). 이러한 단백질과 뉴런의 축삭 부분에 있는 미세 소관과의 결합은 주로 정전기적인 상호 작용을 통해 미세 소관의 성장과 안정성을 촉진시킨다(비특허문헌 5-7). 세린 및 트레오닌 잔기의 인산화, 메틸화, 아 실화, 당화 및 절단 (truncation)과 같은 광범위한 번역 후 변형이 관찰되었다(비특허문헌 8-10). Tau 단백질의 역동적인 인산화와 탈인산화는 건강한 개체의 중요한 특징이지만 tau의 과인산화가 선호되는 균형 파괴 현상은 병리학적 반응을 촉발한다. 감소된 정전기적 상호작용의 결과로 tau 단백질들이 미세소관에서 분리되어 세포체 수상돌기 구획 (somatodendritic compartment)으로 잘못 분포하게 되면 자가 집적 (self-aggregate)되고 NFT의 세포 내 축적이 이루어진다(비특허문헌 11-12).
- [0004] 자가집적된 tau 단백질의 구조는 중심에 평행 β 병풍구조가 덜 구조적인 고분자 전해질 가지로 둘러싸여 있을 것으로 예상되었다(비특허문헌 13). 하지만 NMR이나 X-선 결정학에 기반한 확실한 구조가 없으므로 tau 특이적 β 병풍 결합체의 발견은 아주 어려운 실정이다.
- [0005] 결국, 현재까지 분명한 약물 분자 구조 모델이 밝혀진 바 없으며, 최근에는 최근 NFT 결합체의 디자인을 이끄는 두 가설이 제시되었다. 첫째로, benzothiazole를 함유한 도너-수용체 색소들을 통해 도너와 수용체 부분 간의 짧은 거리가 $A\beta$ plaque을 선호하게 하는 반면 도너와 수용체 부분 간의 13 에서 19 ÅA 되는 거리는 NFT 선택도에 도움을 준다는 것이 발견되었다(비특허문헌 15). 두번째로, 유사한 화합물들 중 축합 고리 시스템을 가진 것들이 흔히 $A\beta$ 섬유보다 tau 매듭에 대한 더 높은 선택도를 지닌다는 것이다(비특허문헌 14).
- [0006] 지금까지 NFT용 근적외선 방출 형광 탐침은 거의 발견되지 않았지만, 특정 인산화 패턴을 인식하거나(비특허문헌 16), β 병풍 결합체를 어느 정도의 선택도로 인식하는 방식이 존재한다(비특허문헌 17).
- [0007] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 타우 단백질에 대해 고선택성을 갖는 프로브 화합물에 대해 연구하던 중에, $A\beta$ 플라크 결합 염료로 알려진 BAP-1(비특허문헌 18)의 접합부와 고리형성부를 연장하여 합성된 화합물이 타우 단백질에 대해 고선택성을 가짐을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Crowther, R. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991, 88, 2288-2292.
- (비특허문헌 0002) Ittner, L. M.; Gotz, J. Nat. Rev. Neurosci. 2011, 12, 67-72.
- (비특허문헌 0003) Spillantini, M. G.; Goedert, M. Lancet Neurol. 2013, 12, 609-622.
- (비특허문헌 0004) Arriagada, P. V.; Growdon, J. H.; Hedley-whyte, E. T.; Hyman, B. T. Neurology 1992, 42, 631-639.
- (비특허문헌 0005) Buee, L.; Bussiere, T.; Buee-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R. Brain Res. Rev. 2000, 33, 95-130.
- (비특허문헌 0006) Morris, M.; Maeda, S.; Vossel, K.; Mucke, L. Neuron 2011, 70, 410-426.
- (비특허문헌 0007) del Carmen Cardenas-Aguayo, M.; Gomez-Virgilio, L.; DeRosa, S.; Meraz-Rs, M. A. ACS Chem. Neurosci. 2014, 5, 1178-1191.
- (비특허문헌 0008) Martin, L.; Latypova, X.; Terro, F. Neurochem. Int. 2011, 58, 458-471.
- (비특허문헌 0009) Cohen, T. J.; Guo, J. L.; Hurtado, D. E.; Kwong, L. K.; Mills, I. P.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y. Nat. Commun. 2011, 2, 252.
- (비특허문헌 0010) Funk, K. E.; Thomas, S. N.; Schafer, K. N.; Cooper, G. L.; Liao, Z.; Clark, D. J.; Yang, A. J.; Kuret, J. Biochem. J. 2014, 462, 77-88.
- (비특허문헌 0011) Khan, S. S.; Bloom, G. S. Front. Neurosci. 2016, 10, 31.
- (비특허문헌 0012) Zempel, H.; Mandelkow, E. Trends Neurosci. 2014, 37, 721-732.
- (비특허문헌 0013) Wegmann, S.; Medalsy, I. D.; Mandelkow, E.; Muller, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013, 110, E313-E321.

(비특허문헌 0014) Ariza, M.; Kolb, H. C.; Moechars, D.; Rombouts, F.; Andres, J. I. J. Med. Chem. 2015, 58, 4365-4382.

(비특허문헌 0015) Maruyama, M.; Shimada, H.; Suhara, T.; Shinotoh, H.; Ji, B.; Maeda, J.; Zhang, M.-R.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y.; Ono, M.; Masamoto, K.; Takano, H.; Sahara, N.; Iwata, N.; Okamura, N.; Furumoto, S.; Kudo, Y.; Chang, Q.; Saido, T. C.; Takashima, A.; Lewis, J.; Jang, M.-K.; Aoki, I.; Ito, H.; Higuchi, M. Neuron 2013, 79, 1094-1108.

(비특허문헌 0016) Ojida, A.; Sakamoto, T.; Inoue, M.-a.; Fujishima, S.-h.; Lippens, G.; Hamachi, I. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 6543-6548.

(비특허문헌 0017) Seo, Y.; Park, K.-s.; Ha, T.; Kim, M. K.; Hwang, Y. J.; Lee, J.; Ryu, H.; Choo, H.; Chong, Y. ACS Chem. Neurosci. 2016, 7, 1474- 1481.

(비특허문헌 0018) Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. ACS Chem. Neurosci. 2012, 3, 319-324.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명에서는 타우 단백질에 고선택성을 갖는 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 타우 단백질 검출용 형광 센서를 제공하고자 한다.

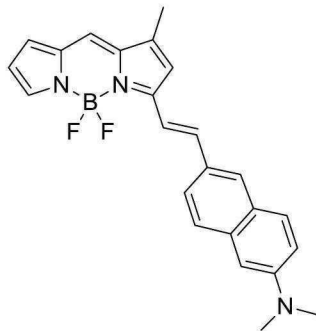
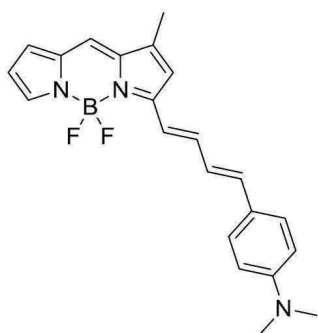
과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0011] 하기 [화합식 1] 또는 [화합식 2]로 표시되는 타우 단백질 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0012] [화합식 1]

[화합식 2]



[0013]

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 타우 단백질과 선택적으로 상호작용하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 세포 내에서 오키다산(Okadaic acid)에 의해 유발된 과인산화된 타우 단백질을 선택적으로 시각화하는 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 타우 단백질 검출용 형광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물은 타우 단백질에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 우수한 광물리적 특성과 낮은 세포독성을 가지고 있어 타우 단백질을 효과적으로 이미징할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 6-311 ++ G ** 수준의 이론에서 B3LYP를 사용하여 밀도 함수 이론에 의해 계산된 Tau 1([화합식 1]로 표시되는 화합물)과 Tau 2([화합식 2]로 표시되는 화합물)의 프런티어 궤도(frontier orbitals)를 나타낸 것으로,

(a), (b)는 Tau 1의 HOMO와 LUMO 궤도를 (c), (d)는 Tau 2의 HOMO와 LUMO 궤도를 나타낸다. 전자 밀도는 $0.03 \text{ e} \cdot \text{bohr}^{-3}$ isodensity 표면에 표시된다.

도 2는 Tau 1 (a-c)와 Tau 2 (d-f)의 분자 도킹 결과를 나타낸 것으로, (a), (d)는 인접한 4 개의 베타 시트가 쌓인 터널에 도킹 된 분자의 상면도(top view)로 단백질 분자 표면을 묘사하는 것이고, (b), (e)는 터널의 상단을 확대한 것으로, 터널을 구성하는 측쇄는 막대기로, 다른 하나는 선으로 표시되었다. (c), (f)는 단백질 터널에서 분자의 측면을 나타낸 것으로(side view), 터널을 구성하는 측쇄는 막대기로, 다른 하나는 선으로 표시되었다. 노란색 화살표는 패널 c 및 f에 대한 보기 방향을 나타낸다.

도 3은 단백질 집적체 존재하 Tau 1,2 (10 μM)의 시간 의존적인 형광 증강(fluorescence enhancement)을 나타낸 것으로, (a)는 타우 단백질 (10 μM)과 헤파린 (2.5 μM)의 존재하에서 Tau 1의 방출 스펙트럼을 나타내고(excited at 590 nm), (b)는 타우 단백질 (10 μM)과 헤파린 (2.5 μM)의 존재하에서 Tau 2의 방출 스펙트럼을 나타내며(excited at 580 nm), (c), (d)는 A β 섬유(fibrils)(50 μM)의 존재 하에서 Tau 1,2의 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4의 (a)는 Tau 1, Tau 2, BAP-1 및 ThT (500 nM)로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 분 동안 배양 한 SH-SY5Y 세포의 형광 이미지를 나타낸다. Top : 미처리 세포, Bottom : 6 시간 동안 오카다산(Okadaic acid, OA) (100 nM)으로 예비 배양. ThT는 458 nm에서 여기되었고, 방출은 475-525 nm 밴드패스 필터를 사용하여 기록되었다. Tau 1, Tau 2 및 BAP-1은 633 nm에서 여기되었고, 형광은 650 nm보다 높은 파장에서 수집되었다. (b)는 Image J를 사용하여 결정된 비 처리 세포 ($n = 5$)에 대한 세포 당 형광 강도를 나타내며, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. (c)는 Tau 1, Tau 2, BAP-1 및 ThT를 갖는 아밀로이드 베타 펩타이드를 사용한 SH-SY5Y 세포의 형광 이미지를 나타낸다. 48 시간 동안 아밀로이드 베타 펩타이드 (50 $\mu\text{g/mL}$)를 처리한 후, 프로브 (1 μM)를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 배양하였다. 미처리 세포를 펩타이드 없이 15분 동안 프로브와 함께 배양하였다(상단). ThT는 458 nm에서 여기되었고, 방출은 475-525 nm 밴드패스 필터를 사용하여 기록되었다. Tau 1, Tau 2 및 BAP-1은 633 nm에서 여기되었고, 형광은 650 nm보다 높은 파장에서 수집되었다. (d)는 Image J를 사용하여 결정된 미처리 세포 ($n = 5$)에 대한 세포 당 형광 강도를 나타내며, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 5는 OA 처리 마우스의 CA1 (상단) 및 CA3 (하단) 해마(hippocampal) 영역의 공초점 이미징 결과를 나타낸 것으로, 과인산화된(hyperphosphorylated) 타우 단백질 항체 (AT-180)와 Tau 1을 사용한 이중 염색은 매우 높은 중첩 정도를 나타내었다. Tau1의 형광 이미지는 505-550 nm 밴드 패스 필터로 488 nm에서 여기시켜 얻은 633 nm에서 여기시켜 수득하였다.

도 6은 OA 처리 마우스의 단일 해마 뉴런(neuron)의 공초점 이미징 결과를 나타낸 것으로, 과인산화된 타우 단백질 항체 AT-180과 Tau 1을 사용한 이중 염색은 뉴런의 세포체가지돌기 격실(somatodendritic compartment) (*)에 상당한 양의 tau missorting을 보여주고 축삭 돌기 (화살표)를 따라 산발적으로 과인산화된 타우 침착물을 생성하였다. Tau 1의 형광 이미지는 650 nm 롱 패스 필터로 633 nm에 여기시켜 수득하였고, AT180은 505-550 nm 밴드 패스 필터로 488 nm에서 여기시켜 수득하였다.

도 7은 3xTg 마우스의 해마 영역의 공초점 이미징 결과 병합 결과를 나타낸 것으로, 왼쪽은 과인산화된 타우단백질 항체 AT180 및 Tau1을 사용한 이중 염색 결과, 오른쪽은 아밀로이드 베타 항체 6e10과 Tau 1을 이용한 이중 염색 결과를 나타낸 것이다. Tau 1의 형광 이미지는 650 nm 롱 패스 필터로 633 nm에서 여기시켜 수득하였고, AT180 및 6e10은 505-550 nm 밴드 패스 필터로 488 nm에서 여기시켜 수득하였다. 세포핵을 DAPI로 염색하였으며, 개별 채널의 이미지는 도 51, 52에 나타내었다.

도 8은 두개 내로(intracranially) Tau 1이 주사된 3xTg 마우스의 해마 영역의 공초점 이미징 결과를 나타낸 것으로, 첫 번째 줄은 control을, 두 번째 줄은 과인산화된 타우 단백질 항체 (AT180)와 Tau 1을 사용한 이중 염색은 매우 높은 중첩 정도를 나타냄을 보여주며, 세 번째 줄은 A β 항체 (sig 39200)와 Tau 1을 이용한 이중 염색은 사실상 중첩이 없음을 보여주며, 마지막 줄은 APP 항체 (mab348)와 Tau 1을 사용한 이중 염색은 사실상 중첩이 없음을 보여준다. Tau1의 형광 이미지는 650 nm 롱 패스 필터로 633 nm에서 여기시켜 수득하였고, 항체는 505-550 nm 밴드 패스 필터로 488 nm에서 여기시켜 수득하였다.

도 9는 Tau 1 또는 비히클(vehicle)의 꼬리 정맥 주사 후 30 분 동안 Tau P301L 마우스 또는 야생형 마우스의 뇌 생체 내 이미징 결과를 나타낸다. 형광 이미지는 670 nm에서 여기시켜 수득하였고, 방출은 699 nm에서 모니터링 하였다.

도 10은 Tau 1의 ^1H NMR 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 11은 Tau 1의 ^{13}C NMR 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 12는 Tau 1의 ESI-MS 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 13은 Tau 2의 ^1H NMR 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 14는 Tau 2의 ^{13}C NMR 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 15는 Tau 2의 ESI-MS 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 16은 BAP-1 : (A), (B)는 용매 유전 상수의 자연 대수 (natural logarithm)를 갖는 용매 Stokes shift (A)와 형광 양자 수율 (B) 사이의 관계를 나타내고, (C), (D)는 용매의 점도와 용매 Stokes 'shift (C)와 형광 양자 수율 (D) 사이의 관계를 나타낸다(용매 : 2-메톡시 에탄올, 아세톤, 아세토니트릴, n-부탄올, 1,2-디클로로벤젠, N, N-디메틸포름아미드, 에틸아세테이트, 에틸렌 글리콜 디메틸 에테르, 디 에틸 에테르, 에틸렌 글리콜, 에탄올, 메탄올, 테트라 하이드로 푸란, 톨루엔 및 클로로포름). 에틸렌 글리콜 (비 방출 성)의 데이터 포인트는 명료성을 위해 (C 및 D)에서 생략되었다. $\lambda_{\text{ex}} = 570\text{nm}$. 슬릿 너비 3/3. 형광 양자 수율은 95 % EtOH 중의 로다민 B에 대해 측정하였다.

도 17은 Tau 1: (A), (B)는 용매 유전 상수의 자연 대수 (natural logarithm)를 갖는 용매 Stokes shift (A)와 형광 양자 수율 (B) 사이의 관계를 나타내고, (C), (D)는 용매의 점도와 용매 Stokes 'shift (C)와 형광 양자 수율 (D) 사이의 관계를 나타낸다(용매 : 2-메톡시 에탄올, 아세톤, 아세토니트릴, n-부탄올, 1,2-디클로로벤젠, N, N-디메틸포름아미드, 에틸아세테이트, 에틸렌 글리콜 디메틸 에테르, 디 에틸 에테르, 에틸렌 글리콜, 에탄올, 메탄올, 테트라 하이드로 푸란, 톨루엔 및 클로로포름). 에틸렌 글리콜 (비 방출 성)의 데이터 포인트는 명료성을 위해 (C 및 D)에서 생략되었다. $\lambda_{\text{ex}} = 570\text{nm}$. 슬릿 너비 3/3. 형광 양자 수율은 95 % EtOH 중의 로다민 B에 대해 측정하였다.

도 18은 Tau 2: (A), (B)는 용매 유전 상수의 자연 대수 (natural logarithm)를 갖는 용매 Stokes shift (A)와 형광 양자 수율 (B) 사이의 관계를 나타내고, (C), (D)는 용매의 점도와 용매 Stokes 'shift (C)와 형광 양자 수율 (D) 사이의 관계를 나타낸다(용매 : 2-메톡시 에탄올, 아세톤, 아세토니트릴, n-부탄올, 1,2-디클로로벤젠, N, N-디메틸포름아미드, 에틸아세테이트, 에틸렌 글리콜 디메틸 에테르, 디 에틸 에테르, 에틸렌 글리콜, 에탄올, 메탄올, 테트라 하이드로 푸란, 톨루엔 및 클로로포름). 에틸렌 글리콜 (비 방출 성)의 데이터 포인트는 명료성을 위해 (C 및 D)에서 생략되었다. $\lambda_{\text{ex}} = 570\text{nm}$. 슬릿 너비 3/3. 형광 양자 수율은 95 % EtOH 중의 로다민 B에 대해 측정하였다.

도 19는 Catalan 데이터 세트의 용매 분극 매개 변수와 비교된 BAP1과 Tau1-2의 최대 흡광도 사이의 관계를 나타낸 것이다.

도 20은 Tau1-2 방출의 최대 방출과 Catalan 데이터 세트의 용매 양극성 파라미터 사이의 관계를 나타낸 것이다.

도 21은 산성화된 CHCl₃에서의 BAP-1 및 Tau 1-2의 정규화된 흡수 및 방출을 나타낸다($\lambda = 540\text{nm}$, 슬릿 폭 1.5/3).

도 22는 CHCl₃에서 BAP-1 및 Tau 1-2의 정규화된 흡수 및 방출을 나타낸다 ($\lambda = 570\text{nm}$, 슬릿 폭 3/3).

도 23은 DMF에서 Rose Bengal과 비교하여 BAP-1과 Tau 1-2의 광 안정성을 나타낸 결과이다.

도 24는 인접한 4 개의 베타 시트가 쌓인 터널의 구조를 나타낸 것으로, 분자 표면은 와이어 메쉬로 표시된다. 톱 뷰 (섬유 축 아래), 6/5 레이어가 표시된다. 노란색 화살표는 도킹 결과 그림에 표시된 것처럼 측면 뷰의 보기 방향 (피브릴 축에 수직)을 나타낸다.

도 25 내지 도 40은 각각 3h(도 25), PBB5(도 26), BAP-1(도 27), F-ATPZ-38(도 28), Astemizole(도 29), I-PDB3(도 30), FDDNP(도 31), BF-188(도 32), S-F-THK-5117(도 33), F-T808(도 34), F-T807(도 35), L-Methyl-Lansoprazole(도 36), D-Methyl-Lansoprazole(도 37), I-TH2(도 38), N-(2-methoxyphenyl)-N'-[4-(1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)phenyl]urea(도 39), F-SKT04-137(도 40)의 분자 도킹 결과이다. A)는 인접한 4 개의 적층된 베타 시트에 의해 형성된 터널 내에 도킹된분자의 평면도로서 단백질 분자의 표면을 묘사한다.

B)는 터널의 상면을 확대한 것으로, 터널을 구성하는 측쇄는 스틱, 다른 것은 선으로 표시된다. C) 단백질 터널에서 분자의 측면도를 나타낸 것으로, 터널을 구성하는 측쇄는 스틱으로, 다른 것은 선으로 표시되며, 시각 방향 (노란색 화살표)에 대해서는 도 24를 참조한다.

도 41은 단백질 집적체 존재하에서 ThT 및 BAP-1 (10 μ M)의 시간 의존적인 형광 증강을 나타낸 것으로 (A)는 타우 단백질 (10 μ M)과 헤파린 (2.5 μ M)의 존재 하에서 ThT의 방출 스펙트럼, 450 nm에서 여기, (B) 타우 단백질 (10 μ M) 및 헤파린의 존재 하에서 BAP-1의 방출 스펙트럼 (2.5 μ M), 590 nm에서 여기, (C), (D)는 A β 섬유 (50 μ M)의 존재 하에서 ThT와 BAP-1의 방출 스펙트럼을 나타낸다.

도 42는 ThT의 형광을 모니터링하는 AcPHF6 집적 억제 분석 결과를 나타낸다. (여기 440 nm, 방출 480 nm, 슬릿 폭 3/3). 데이터는 세 가지 측정의 평균을 나타내며, 형광 강도의 초기 상승 후 모노 지수 감쇠 보정을 사용하여 용액으로부터 침전된 펩티드에 대한 데이터를 보정하였다.

도 43은 BAP-1 and Tau 1의 형광을 모니터링하는 AcPHF6 집적 억제 분석 결과를 나타낸다. (여기 600 nm, 방출 660 nm, 슬릿 폭 3/3). 데이터는 세 가지 측정의 평균을 나타내며, 형광 강도의 초기 상승 후 모노 지수 감쇠 보정을 사용하여 용액으로부터 침전된 펩티드에 대한 데이터를 보정하였다.

도 44는 48 시간 배양 후 MTT 분석을 사용하여 도출한 Tau 1 및 Tau 2 세포 생존율 데이터로, (A) SKNMC (인간 신경 모세포종), (B) U87 (인간 아교 모세포종), (C) SH-SY5Y (인간 신경 모세포종), (D) C6 (랫트 뇌 신경 교종), (E) N2A (마우스 뇌 신경 모세포종), (F) 일차 인간 뇌 신경 세포 배양 결과를 나타내며, 오차 막대는 표준 편차 (n = 3)를 나타낸다.

도 45는 SH-SY5Y 세포의 Western Blot 이미지로서, 오카다산 (50 nM)으로 처리한 후, 단백질을 타우, p- 타우 및 액틴 특이적 항체로 시각화하였다. 빨간색 화살표는 타우 단백질과 과인산화된 타우 단백질을 나타낸다.

도 46은 48 시간 동안 아밀로이드 베타 펩티드 (50 μ g / mL)를 처리한 후 SHSY-5Y에서 A β 집적체의 웨스턴 블롯 이미지를 A β 특이적 항체를 사용하여 시각화한 결과를 나타낸다.

도 47은 오카다산 처리 23 개월 된 마우스의 해마 영역 염색 패턴 비교결과이다. Tau1을 633 nm에서 여기시키고 형광을 650 nm 롱 패스 필터로 수득하였다. 첫 번째 패널 : DMSO로 처리한 대조군 그룹의 밝은 영역 이미지.

도 48은 오카다산 처리 23 개월 된 마우스의 CA3 해마 영역의 공초점 이미징 결과를 나타낸다. 아밀로이드 베타 항체 (ab10148, abcam) 및 타우 1로 이중 염색하였으며, Tau 1의 형광 이미지는 650 nm 장파장 필터를 사용하여 633 nm에서 여기시켜 수득하였고, 아밀로이드 베타는 505-550 nm 밴드 패스 필터를 사용하여 488 nm에서 여기시켜 수득하였다.

도 49는 OA 처리 된 10 주된 마우스의 CA1 해마 영역의 공초점 이미징 결과를 나타낸다. Tau1의 형광 이미지는 650 nm의 롱 패스 필터로 633 nm에서 여기시켜 수득하였다.

도 50은 Tau 1의 BBB 침투를 나타낸 것으로, ICR 마우스의 꼬리 정맥을 통해 Tau 1 또는 비히클을 주사 후 마우스의 해마 영역의 공초점 이미징 결과를 나타낸다. Tau 1의 형광 이미지는 650 nm의 롱 패스 필터로 633 nm에서 여기시켜 수득하였다.

도 51은 3xTg 마우스의 해마 영역 공초점 이미징 결과를 나타낸 것이다. 과인산화된 타우 단백질 항체 (AT180)와 Tau 1으로 이중 염색하였고, Tau 1의 형광 이미지는 650 nm의 롱 패스 필터로 633 nm에서 여기시켜 수득하였고, AT180의 이미지는 505-550 nm의 밴드 패스 필터로 488 nm에서 여기시켜 수득하였다. 세포핵은 DAPI로 염색하였다.

도 52는 3xTg 마우스의 해마 영역 공초점 이미징 결과를 나타낸 것이다. 베타 아밀로이드 항체 (6e10)와 Tau 1으로 이중 염색하였고, Tau1의 형광 이미지는 650nm 롱 패스 필터로 633nm에서 여기시켜 수득하였고, 6e10의 이미지는 505-550nm 밴드 패스 필터로 488nm에서 여기시켜 수득하였다. 세포핵은 DAPI로 염색하였다.

도 53은 두개 내로(intracranially) Tau 1이 주사된 3xTg 마우스의 해마 영역의 공초점 이미징 결과를 나타낸 것이다. 과인산화된 타우 단백질 (AT180) 또는 베타 아밀로이드 항체 (sig 39200) 및 Tau 1로 이중 염색하였고, Tau1의 형광 이미지는 650 nm 롱 패스 필터로 633 nm에서 여기시켜 수득하였고, 항체의 이미지는 505-550 nm 밴드 패스 필터로 488 nm에서 여기시켜 수득하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0021] **실험방법**
- [0022] **재료, 방법 및 기기장치**
- [0023] 모든 반응물 및 용매는 Sigma-Aldrich, Alfa, Samchun에서 구매하였으며 추가적인 정제없이 사용하였다. THF를 Na/benzophenone 상에서 증류시켰다. Aβ1-42 및 AcPHF6 peptide는 GenicBio Limited (Shanghai, China)에서 구입하였고, 비 태그 4R2N Tau441은 MRC PPU 시약 및 서비스 시설 (MRC PPU, College of Life Sciences, University of Dundee, Scotland, mrcppureagents. dundee.ac.uk)을 통해 입수했다. NMR 스펙트럼은 300 또는 400 MHz Varian NMR 분광기에서 얻었다. UV /vis 스펙트럼을 Scinco S-3100 분광기에 기록하였고 Shimadzu RF-5301PC 분광 형광 광도계를 사용하여 형광 스펙트럼을 얻었다. ESI-MS는 Shimadzu LCMS-2020 질량 분석기 시스템 상에서 수행하였다.
- [0025] **단백질 존재하에서 분광법**
- [0026] 단백질 존재하에 분광적 측정을 위해 ThT, Tau 1, Tau 2, BAP-1의 stock 용액을 DMSO로 제조하였다. 다르게 언급되지 않은 한, 여기 및 방출 슬릿 폭은 모두 10 nm이었다.
- [0028] **양자 수율과 광방출 및 형광 파장 최대 값 결정**
- [0029] 데이터는 HPLC 등급 용매에서 기록되었으며 내부 필터 효과를 방지하기 위해 여기 파장보다 길거나 같은 파장에서 측정했을 때, 흡광도가 0.1보다 낮았다. slit 설정은 여기 및 방출 슬릿 모두 3 nm이었다. BAP-1과 Tau 1,2의 양자 수율은 종래 문헌에 개시된 보정 계수를 사용하여(Brouwer, A. M. Pure Appl. Chem. 2011, 83, 2213-2228), 95% EtOH (ΦF1 =0.70)에서 rhodamine B와 비교하여 기록하였다(Arbeloa, F. L.; Ojeda, P. R.; Arbeloa, I. L. J. Lumin. 1989, 44, 105-112).
- [0031] **광 안정성**
- [0032] 최대 흡광도 파장에서 흡광도가 1.0인 Rose Bengal, BAP-1 및 Tau 1,2의 용액을 DMF에서 제조하였다. Zeiss KL1500 LCD 장치를 사용하여 3300K 할로겐 램프로 초점을 맞추어 용액에 빛을 조사하고 40분 동안 5분 간격으로 흡광도를 측정했다. Rose Bengal의 피크 흡광 파장에서 램프 분광 복사에 비교하여 BODIPY 색소의 광퇴색 slope은 피크 흡광 파장에서 램프 분광 복사에 대해 보정되었다.
- [0034] **DFT 계산**
- [0035] 밀도 함수 이론을 이용한 이론적 계산은 6-311++G** level of theory에서 기능하는 B3LYP4750를 이용해 수행하였다(Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. J. Chem. Phys. 1980, 72, 650-654). 계산은 Gaussian G09W 소프트웨어 패키지를 이용하여 수행하였다. 분자 오비탈은 Gabedit 2.4.8 software package을 이용해 시각화하였으며, 결과들은 하기 표 1에 나타내었다.
- [0037] **도킹 연구**
- [0038] 다른 BODIPY 기반 탐침들에 대해 종래 문헌에 개시된대로, 하기 표 3에 나타난 납화합물들 뿐만 아니라 최적화된 구조의 Tau 1, Tau 2, BAP-1, 3h, PBB5가 이론의 6-31G* 레벨을 사용해 (재)계산되었으며, 중심의 붕소 원자가 탄소로 치환되어 (도킹 소프트웨어 한도에 붕소가 포함되어있지 않아) 리간드에 대한 입력정보로 설정되었다(Teoh, C. L.; Su, D.; Sahu, S.; Yun, S.-W.; Drummond, E.; Prelli, F.; Lim, S.; Cho, S.; Ham, S.; Wisniewski, T.; Chang, Y.-T. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 13503-13509). 분리된 6-mer PHF6에 대한 도킹 연구를 위해 분자 구조가 X-ray 결정구조(PDB ID: 5K7N)에 기반한 Avogadro 1.2.0 software package⁵⁷를 이용해 구성되었고(de la Cruz, M. J.; Hattne, J.; Shi, D.; Seidler, P.; Rodriguez, J.; Reyes, F. E.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Weiss, S. C.; Kim, S. K.; Hinck, C. S.; Hinck, A. P.; Calero, G.; Eisenberg, D.; Gonen, T. Nat. Methods 2017, 14, 399-402), 섬유 축을 따라 steric zipper를 형성하는 4개의 인접한 병풍에 의해 형성된 터널은 같은 결정 구조에서 5/6-mer로 유사하게 구성되었다. 계산값에 대한 입력과 일은 AutoDockTools 1.5.6 software package,⁵⁸을 이용해 생성되었고 도킹 계산은 AutoDock Vina⁵⁹을 이용해 수행하였다. 계산 결과의 시각화는 Python Molecule Viewer 1.5.6 software package을 이용해 수행하였다(Sanner, M. F. J. Mol. Graphics Modell. 1999, 17, 57-61).

- [0040] 세포 배양과 형광 이미징
- [0041] SH-SY5Y 세포들은 10% FBS (Gipco), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 이미징 하루 전에 세포들은 glass-bottomed dishes (SPL)에 올려진 후 5% (v/v) CO₂를 포함한 37 °C의 습한 공기에 배양되었다. 세포 이미지는 공초점 현미경 (Zeiss model LSM 510)을 이용해 획득하였다. 모든 형광 이미지는 광흥분 파장 458nm (ThT), 633 nm (Tau 1, Tau 2, and BAP-1)과 band pass 광방출 필터 475-525 nm (ThT), long pass 광방출 필터 (>650 nm)를 통해 획득하였다.
- [0043] In Vitro에서 Tau 집적(agggregation)
- [0044] 단백질 집적은 공유결합된 tau 이합체나 단량체들을 감소시키기 위하여 50 mM NaCl, 1mM DTT 완충액이 첨가된 25mM Tris 완충액 (pH7)에서 2시간동안 이루어졌다(37 °C). 집적 반응은 heparin (2.5 μ M)에 의해 유도되었다.
- [0046] Beta Amyloid 집적
- [0047] 동결 건조된 beta amyloid peptide (1-42)가 100% HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol)에 녹여진 후 상온에 1시간 동안 배양하였다. 용액을 10분 동안 음과처리하고, 용매는 speed vac을 통해 제거하였다. Peptide는 DMSO 저장 용액에 다시 녹이고, 각 실험 전에 이 저장 용액의 0.5 mM aliquot은 50 mM NaCl, 1.6 mM KCl, 2 mM MgCl₂, and 3.5 mM CaCl₂ 이 포함된 10 mM 인산 완충액 (pH 7.4)을 이용해 50 μ M로 희석하였다.
- [0049] AcPHF6 집적 억제 분석
- [0050] 분석은 종래 문헌에 개시된 과정과 비슷하게 96-well 플레이트, 10mm fluorescent cuvette에서 수행하였다 (Zheng, J.; Liu, C.; Sawaya, M. R.; Vadla, B.; Khan, S.; Woods, R. J.; Eisenberg, D.; Goux, W. J.; Nowick, J. S. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 3144-3157). 데이터는 3회 실험 후의 평균값이다. 사용된 저장 용액은 다음과 같다: (A) PBS (50mM, pH 7.4), (B) 0.5% DMSO와 물에 녹인 100 μ M BAP-1 또는 Tau 1, (C) 50 mM PBS (50 mM, pH 7.4)에 녹인 100 μ M ThT, (D) 순수한 H₂O 에 녹인 1 mM AcPHF6. 각 샘플은 1400 μ L의 용액 A, 200 μ L의 용액 B, 200 μ L의 용액 C, and 200 μ L의 용액 D가 들어 있었으며 총 용액은 2000 μ L이었다. 용액 D는 실험 시작 바로 전에 첨가하였다. 형광은 30분 동안 매 0.16초 마다 한번씩 최대로 섞어주며 측정하였다. ThT 또는 NIR 색소의 형광을 관찰하기 위해 여기 및 방출 설정은 각각 440/480, 600/660이었고 slit 폭은 3/3, 10/10 이었다. 데이터는 형광 강도의 초기 상승 후에 지수 부식 보정 (exponential decay correction)을 이용해 용액 내 peptide 침전에 대한 보정이 이루어졌다.
- [0052] MTT 분석
- [0053] 세포 생존량을 정량 분석하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 수행하였다. SHSY5Y, SKNMC, U87, C6, N2A 세포들 (2×10^5 /mL) 및 인간 1차 뇌 뉴런(cat. 8800-10f, Cell Applications, San Diego, CA, USA)을 여러 농도의 Tau 1과 Tau 2로 48시간 동안 96-well plate 에서(37 °C) 처리하였다. 무혈청배지에 녹인 MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가한 후 1시간 동안 배양하였다. 그 결과 생성된 formazan 결정은 DMSO 첨가로 가용화되었고 formazan의 상대적 농도는 흡광도 분광법을 통해 결정하였다 (multiwell plate reader at 570 nm (n = 3)).
- [0055] 급성(acute) 동물 모델
- [0056] 23개월 또는 10주된 암컷 야생형 C57BL/6 마우스를 산소에 증기화된 isoflurane으로 마취하고, DMSO에 녹인 100 μ M OA (Sigma-Aldrich) 또는 순수 DMSO를 측면 편도 한쪽에 주사하였다(n = 3). 주사 24시간 후, 주사 부위에 130nL의 100 μ M 탐침을 적용하였다. 해마의 CA1과 CA3 영역을 포함하는 종단 절편에는 tau 인산화원결정인자 AT180 (pTh231: Thermo Fisher)에 대한 면역-조직 화학적 표지가 이루어졌다. paraffin embedding에 의해 처리되기 전에 뇌는 종래 문헌에 개시된바와 같이 전두, 후두, 소뇌로 절개하였다(Baker, S.; Gotz, J. Acta Neuropathol. Commun. 2016, 4, 32.).
- [0058] BBB 침투
- [0059] ICR 마우스 (수컷, 12주)를 in vivo 마우스 뇌 관류 기법의 변형을 이용해 BBB 투과성 판정에 사용하였다. 20% DMSO에 녹인 Tau 1 (500 μ M) 과 80% propylene glycol (100 μ L)을 섞은 용액을 꼬리 정맥을 통해 정맥주사하

였다. 1시간 후 마우스를 죽인 뒤 두개골에서 뇌를 꺼내 얼음 위에서 절개하였다. 냉동된 뇌는 20 μ m 두께의 절편들로 절단하였다. Tau 1의 형광 이미지는 650nm long-pass 필터를 사용한 633nm의 광홍분과 공초점 현미경 장치 (LSM700, Carl Zeiss)를 이용해 획득하였다.

[0061] **Tau 1의 tau 매듭 선택도 결정**

[0062] 조직 염색: 15개월된 암컷 3xTg 마우스를 죽인 후 즉시 뇌를 분리하여 24시간 동안 4% formaldehyde에 고정하였다. 뇌는 paraffin embedding을 위해 처리되었고 5 μ m의 두께로 절단하였다. 절편들은 각각 과인산화 tau 단백질 항체 (AT180, Thermo Fisher)와 Tau 1, amyloid beta 항체 (6e10, Biolegend)와 Tau 1으로 이중 염색하였다. Tau 1의 형광 이미지는, 650nm long-pass 필터를 사용한 633nm의 광홍분과 공초점 현미경 장치 (LSM700, Carl Zeiss)를 이용해 획득하였다. AT-180과 6e10의 이미지는, 505-550nm bandpass 필터를 사용한 488nm의 광홍분을 통해 획득하였다. Tau 1의 두개 내 주사는 17개월된 암컷 3xTg 마우스를 사용한 acute 마우스 모델의 것과 같았다(Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J. D.; Murphy, M. P.; Golde, T. E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M. P.; Akbari, Y.; LaFerla, F. M. Neuron 2003, 39, 409-421). 종단 절편들은 AT180 (Thermo Fisher), sig 39200 (BioLegend), mab348 (EMD Millipore)으로 염색하였다. Tau 1의 형광 이미지는 650nm longpass 필터를 이용하여 633nm에서 여기시켜 획득하였고, AT180의 형광 이미지는 505-550 nm bandpass 필터를 이용한 488nm에서 여기시켜 획득하였다.

[0064] **In Vivo 이미징**

[0065] Tau P301L 마우스 (암컷, 12개월) 또는 ICR 마우스 (암컷, 12주)에 30% DMSO/30% EtOH (50 μ L) 또는 30% DMSO/30% EtOH (50 μ L)에 Tau 1(1mM)를 녹인 용액을 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 마우스들은 Zoletil 50 (Virbac, New Zealand)을 이용해 마취하였다. Tau 1와 음성 대조군의 형광 이미지는 Optix MX3 광학 분자 이미징 시스템 (ART Advanced Research Technologies Inc., Canada)에서 여기 파장 670nm, 방출 파장 699nm를 사용하여 획득하였다.

[0066] **입체 정위 수술(Stereotaxic Surgery)**

[0068] 조직학적 샘플링을 위해 마우스에게 치사량의 펜토르 비톤을 마취 한 다음 PBS 30 mL와 4 % 파라 포르말데히드 30 mL를 사용하여 심근 관류를 시행하여 마취시켰다. 두개골에서 분리된 뇌의 후고정 (postfixing)은 4 °C에서 하룻밤 동안 진행하였다.

[0070] **면역 세포 화학**

[0071] 연속 절편을 젤라틴 코팅 유리 슬라이드 상에 수집하고 어두운 곳에서 공기 건조시켰다. 염색 없이 퇴색 지연제 용액 처리된 유리 커버슬립이 공초점 관찰을 위해 올려졌다. 뇌 절편들은 Carl Zeiss LSM 510 META 레이저 주사 현미경을 사용해 관찰하였다. 뇌 절편들은 20분간 100% ethanol로 고정하였고, 인산-tau 선택적 마커 AT180 또는 A β 142 선택적 마커 ab10148 (Abcam)에 대하여 면역 염색하였다.

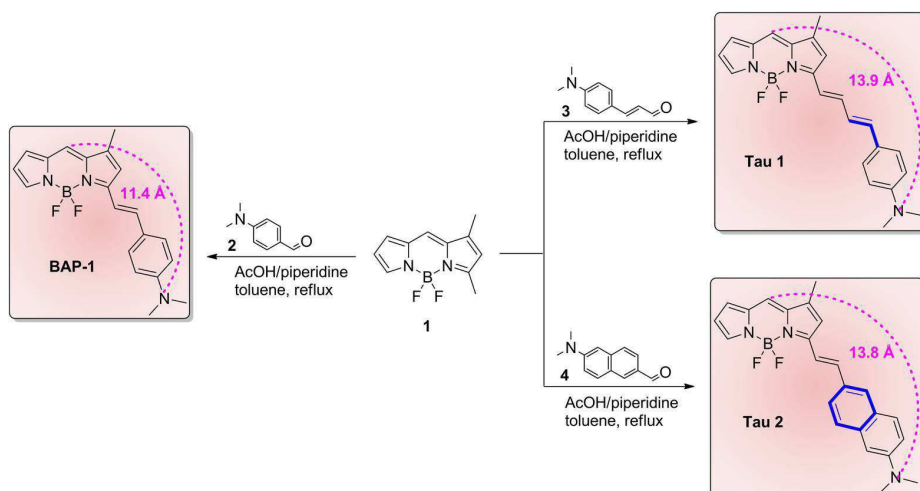
[0073] **Western Blot**

[0074] 오카다산(Okadaic acid, OA) 처리 후 tau 단백질 인산화: SH-SY5Y 세포들은 PBS로 세척된 후 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 단백질분해효소 억제자 혼합물, 인산분해효소 억제자 혼합물 (Sigma-Aldrich)을 포함한 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)에 30분간 0 °C에서 음과 처리를 통해 균질화하였다. 그 후 균질액을 10,000rpm에서 15분간 원심분리되어 맑은 상층액이 새로운 튜브에 옮겼다. SDS PAGE 후, 단백질들은 polyvinylidene difluoride 막 (Bio-Rad) 위로 옮겼고, 막은 3% BSA로 처리한 후 항tau (sc390476), 항-p-tau (sc101815), 또는 항actin 항체와 4 °C에서 하룻밤 배양하였다. 밴드들은 Super Signal West Femto (Thermo Fisher)를 이용해 시각화하였다. 세포 내 A β 142 집적 : 50 μ g/mL A β 1-42와 함께 48 시간동안 배양한 세포의 세포 추출물, 대조군을 함께 종래 문헌에 기술된 대로(Hu, X.; Crick, S. L.; Bu, G.; Frieden, C.; Pappu, R. V.; Lee, J.-M. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009, 106, 20324-20329.), Tris- 클리신 겔 (4 내지 20 %)상에서 수행하였다.

[0076] **화합물 합성**

[0077] 하기 합성경로에 따라 본 발명에 따른 [화합식 1](Tau 1), [화합식 2](Tau 2)로 표시되는 화합물을 합성하였다.

[0078] [합성 경로]



[0079]

[0080] BAP-1에 관련된 구조적 변형은 청색으로 표시하였다. DFT에 의해 최적화된 구조에서 결정된 N-BODIPY C8 (meso) 거리는 마젠타 색으로 표시하였다.

[0082] 화합물 1의 합성

[0083] 종래 문헌(Lee, J.-S.; Kang, N.-y.; Kim, Y. K.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H. K.; Vendrell, M.; Park, J. H.; Chang, Y.-T. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 10077-10082.)에 보고된 절차에 따라 화합물 1(4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)을 85% 수율로 합성하였다.

[0085] 화합물 4의 합성

[0086] 종래 문헌(Petric, A.; Johnson, S. A.; Pham, H. V.; Li, Y.; Ceh, S.; Golobic, A.; Agdeppa, E. D.; Timbol, G.; Liu, J.; Keum, G.; Satyamurthy, N.; Kepe, V.; Houk, K. N.; Barrio, J. R. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, 109, 16492-16497.)에 보고된 절차를 기반으로 화합물 4(6-(Dimethylamino)-2-naphthaldehyde)를 합성하였다. 구체적으로, 두꺼운 벽을 가진 48mL 유리 압력 용기 (주의 : 폭발 위험, 안전 장비 착용 필수) 안에서 1.4 g (7.36mmol)의 sodium metabisulfite와 800 mg (3.58 mmol)의 6-bromo-2-naphthol을 8mL 물에 풀었다. 이 교반된 현탁액에 2 mL의 40 wt % aqueous dimethylamine (39mmol)을 첨가하였고, 용기는 밀봉하여 60시간 동안 120 °C에서 가열하였다. 압력 용기를 상온에서 냉각한 후 반응 혼합물을 여과하였다. 고체들을 물로 세척(3 × 20 mL)한 후 DCM에 용해시켰다. 유기층을 물로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. Column chromatography (silica, EtOAc/hexane, 8:1)로 하얀 고체 상태의 505 mg (2.02 mmol, 56%) of (6-bromo-2-naphthyl)-dimethylamine을 얻었다. 78 °C의 불활성 대기 조건에서 900 mg (3.60mmol) of (6-bromo-2-naphthyl)amine이 9mL의 무수성 THF에 녹아있는 용액에 2.7 mL (a 1.6 M solution)의 n-BuLi in hexanes (4.32 mmol)을 첨가하였다. 용액을 30분간 교반 후 2.7 mL의 무수성 DMF를 한방울씩 첨가하였다. 용액을 0 °C에서 2시간 동안 교반한 후 포화된 NH₄Cl 수용액을 첨가하였다. 만들어진 혼합물을 Et₂O (3 × 50 mL)로 추출하고, 유기층을 Na₂SO₄로 건조시켰다. Column chromatography (silica, EtOAc/hexane, 1:6)로 511 mg (2.56 mmol, 71%)의 화합물 4(6-(dimethylamino)-2-naphthaldehyde)를 수득하였다.

[0088] BAP-1의 합성

[0089] BAP-1을 종래 문헌(Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. ACS Chem. Neurosci. 2012, 3, 319-324.)에 보고된 절차에 따라 Knoevenagel 응축을 통해 50% 수율로 합성하였다.

[0091] Tau 1의 합성

[0092] 100 mg (0.45 mmol)의 화합물 1, 84mg (0.45 mmol)의 4-(dimethylamino)cinamaldehyde (화합물 3), 0.35 mL의 acetic acid, 및 0.35 mL의 piperidine을 10 mL의 toluene에 섞은 용액을 Dean-Stark 조건하에서 2시간 동안 가열하였다. 반응을 실온으로 냉각시켰고, 50 mL의 포화된 NH₄Cl 수용액을 첨가하였다. 혼합물을 EtOAc (3 × 50 mL)로 추출하였고, 유기층과 합쳐진 뒤 Na₂SO₄로 건조시켰다. Column chromatography (silica, EtOAc/hexane, 1:15 → 1:10)로 다음과 같은 결과값을 얻었다. 22 mg (0.06 mmol, 13%)의 Tau 1. ¹H NMR

(300MHz, CDC13): δ 7.61 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.297.16 (m, 1H), 7.136.99 (m, 2H), 6.996.78 (m, 3H), 6.756.62 (m, 3H), 6.456.36 (m, 1H), 3.03 (s, 6H), 2.28 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100MHz, CDC13): δ 159.82, 151.22, 144.43, 142.92, 140.62, 138.75, 137.34, 133.12, 129.17, 124.74, 124.69, 124.41, 121.17, 119.73, 117.87, 115.85, 112.33, 40.44, 11.68 ppm. MS(ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{BF}_2\text{N}_3$ [M]⁺, m/z calcd 377.19, found 377.35.

[0094] Tau 2의 합성

[0095] 120 mg (0.55 mmol)의 화합물 1, 164mg (0.83 mmol) 의 화합물 4, 0.35 mL의 acetic acid, 및 0.35 mL의 piperidine을 10 mL의 toluene에 섞은 용액을 Dean-Stark 조건 하에서 2시간 동안 가열하였다. 반응을 실온으로 냉각시켰고, 50 mL의 포화된 NH_4Cl 수용액을 첨가하였다. 혼합물을 EtOAc (3 × 50 mL)로 추출하였고, 유기층과 합쳐진 뒤 Na_2SO_4 로 건조시켰다. Column chromatography (silica, EtOAc/hexane, 1:15 → 1:10) 로 다음과 같은 결과값을 얻었다. 70mg (0.17 mmol, 32%)의 Tau 2. ^1H NMR (300 MHz, CDC13): δ 7.81 (s, 1H), 7.747.59 (m, 5H), 7.547.45 (m, 1H), 7.13 (dd, J = 9.2 Hz, J = 2.4 Hz, 1H) 7.10 (s, 1H), 6.906.84 (m, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.47 6.41 (m, 1H), 3.10 (s, 6H), 2.31 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDC13): δ 159.98, 149.73, 144.71, 141.76, 138.46, 137.78, 136.37, 133.12, 130.01, 130.00, 129.70, 127.05, 126.38, 124.93, 124.66, 121.97, 117.65, 116.47, 116.45, 116.07, 106.17, 40.76, 11.72 ppm. MS(ESI): $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{BF}_2\text{N}_3$ [M + H]⁺, m/z calcd 402.19, found 402.35; [2M + H]⁺m/z calcd 803.38, found 803.50.

[0097] 결과 및 고찰

[0098] 합성

[0099] BAP-1과 Tau 1-2는 상응하는 알데히드 (화합물 2-4)와 함께 Knoevenagel 축합을 통해 공통 전구체 BODIPY(화합물 1)로부터 합성하였다(합성경로 참고). 합성된 화합물의 특성을 ^1H 과 ^{13}C NMR 및 ESI-MS로 분석한 결과는 하기도 10-15에 나타내었다.

[0101] 형광과 이론적 계산

[0102] 염료의 광물리적 특성들은 여러 용매의 환경적 특성과의 관계 내에서 확인되었다 (표 1).

표 1

	BAP-1				Tau 1				Tau 2				Solvent viscosity (cP)	Solvent dielectric constant	Solvent Polarizability ^b	Solvent Dipolarity ^b
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_{F}^a (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_{F}^a (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_{F}^a (%)				
Acetone	593	687	94	2.9	606	778	172	0.5	593	-	-	-	0.32	20.7	0.651	0.907
Acetonitrile	593	-	-	-	603	787	184	0.2	583	-	-	-	0.37	37.5	0.645	0.974
1-Butanol	596	671	75	10.3	610	740	130	1.6	590	-	-	-	2.95	17.8	0.783	0.655
Chloroform	604	658	54	76.1	621	705	84	23.6	597	687	90	28.0	0.58	4.81	0.674	0.614
1,2-Dichlorobenzene	614	675	61	55.6	633	742	109	9.2	607	723	116	8.4	1.32	9.93	0.869	0.676
Diethyl ether	590	645	55	67.8	604	678	74	29.4	586	660	74	47.0	0.24	4.34	0.617	0.385
N,N-Dimethylformamide	599	-	-	-	614	-	-	-	591	-	-	-	0.92	36.70	0.759	0.977
Ethanol	593	676	83	2.2	606	754	148	0.7	583	-	-	-	1.10	24.6	0.633	0.783
Ethyl acetate	591	664	73	29.1	604	719	115	8.0	585	708	123	3.7	0.46	6.02	0.656	0.603
Ethylene glycol	608	-	-	-	621	-	-	-	593	-	-	-	16.1	37.70	0.777	0.910
Ethylene glycol dimethyl ether	592	672	80	16.0	607	746	139	3.2	588	731	143	1.3	0.46	7.20	0.680	0.625
Methanol	592	674	82	1.2	604	-	-	-	582	-	-	-	0.55	32.60	0.608	0.904
2-Methoxy ethanol	596	690	94	2.5	611	765	154	0.4	590	-	-	-	1.72	16.90	n.d.	n.d.
1-Propanol	595	675	80	7.0	609	746	137	3.3	585	-	-	-	2.26	20.1	0.658	0.748
Tetrahydrofuran	595	666	71	28.8	607	733	126	5.9	590	712	122	3.1	0.55	7.60	0.714	0.634
Toluene	603	644	41	77.6	620	667	47	39.6	600	652	52	67.6	0.59	2.40	0.782	0.284

^a Determined vs. Rhodamine B in 95% EtOH.

^b From Catalán (Reference 21 in the main text)

n.d.: not defined

[0103]

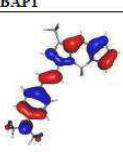
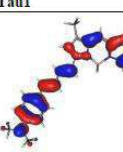
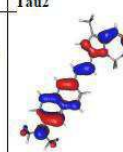
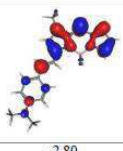
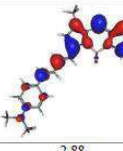
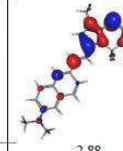
[0104] 도 16-18에 나타난 바와 같이 BAP-1, Tau 1, Tau 2은 아주 유사한 행태를 보이는데, 용매 극성과 관련되어 증가된 스토크스 이동(Stokes shifts)과 감소된 형광 양자 수율을 나타낸다 (용매 유전 상수(dielectric constant)에 의해 정량된 대로). 염료 중 그 어떤 것도 용매 점성에 의존적이지 않았다. 특히 BODIPY 타입의 염료 (10nm 범위 내)에서 흔히 볼 수 있는 유전 상수 (dielectric constant)에 대한 스토크스 이동의 의존성과 그 상대적으로 큰 값 (아주 작은 스토크스 이동에 비해)은 광여기시 분자내 전하 전송 (intramolecular charge

transfer, ICT)의 존재를 나타낸다.

[0105] 형광단의 흡광 및 광방출의 피크 파장의 의존성은 용매 극성과의 연관 내에서 분극률 (유도 쌍극자)와 쌍극성 (영구 쌍극자)를 각각 다르게 취급하는 극성에 대한 척도를 사용하여 Catalan에 의해 기술된 대로 연구되었다 (Catalan, J. J. Phys. Chem. B 2009, 113, 5951-5960.). FranckCodon 상태의 용매 전자 안정화의 결과로 최대 흡광 파장은 모든 형광단에서 용매 분극률과 상호연관성을 보인 반면 최대 광방출 파장은 Tau 1, 2 내 흥분 상태 분자의 기하학적 완화 후 용매 cage rearrangement를 통해 용매 쌍극성과 일치하였다 (도 20). 이 용매 발색 효과들을 종합하면 기저 상태보다 아주 높은 쌍극자 모멘트를 가지는 여기 상태라는 결론이 나오며, 이는 여기 된 상태에서 ICT를 나타내는 형광단의 핵심 특성이다.

[0106] 진공에서 색소 분자 오비탈의 에너지 수준은 6-311++G** level of theory 에서 B3LYP DFT 계산에 의해 계산되었다.(도 1 및 표 2). 하기 표 2는 BAP1과 Tau1-2.a의 계산된 분자 프론티어 궤도를 나타낸다.

표 2

	BAP1	Tau1	Tau2
HOMO ^a			
HOMO energy ^c	-5.13	-5.06	-5.15
LUMO ^a			
LUMO energy ^c	-2.80	-2.88	-2.88
Minimized energy ^d	-1163.4467402	-1240.874166	-1317.0891753

^a Density functional theory using B3LYP at the 6-311++G** level of theory, using Gaussian G09W, molecular orbital visualization using Gabedit 2.4.8.
^b at 0.03 e/bohr² isodensity surface
^c in electronvolts (eV)
^d Energy of the system after geometry optimization in Hartrees (Ha)

[0107]

[0108] 경계 오비탈 내 전자 분포는 가장 낮은 비점유 오비탈(LUMO)을 가진 BODIPY 핵에서부터 가장 높은 점유 오비탈 (HOMO)을 가진 aniline 또는 aminonaphthalene pendants까지의 전자 재분포를 보여주었으며 (표 2), 따라서 관찰된 큰 스토크스 이동의 근거로서 ICT 과정의 관여를 증명한다.

[0109] 액화되지 않은 chloroform에 비해 (도 22), 액화된 chloroform에 넣은 BAP-1과 Tau 1, 2의 스펙트럼은 흡광 및 광방출 스펙트럼 모두 큰 청색 이동되었으며(도 21), 고전적인 BODIPY 색소의 연관된 스토크스 이동을 보였다 (around 6nm). 이 결과들은 pedant aniline 부분의 양성자 첨가가 전하 이동 과정을 방해함에 따른 ICT의 관여를 더욱 증명한다.

[0110] 교차 β 시트 단백질 형태를 탐지하는 다른 많은 탐침들과 달리 BAP-1, Tau 1, 2는 용매 점성에 의존적으로 형광 양자 수율을 보이지 않았고 따라서 그 구조적 유사성에도 불구하고 분자 로터로서 기능하지 않았다. 자가 조립된 tau 단백질의 β 시트 구조의 상대적으로 무극성인 특성과 결합된 Tau 단백질 교차 β 시트의 선택적 인식은 결합시 형광 증가를 보장하는 반면, ICT 기반의 큰 스토크스 이동은 작은 스토크스 이동을 가진 염료들이 흔히 겪는 방출된 빛의 재흡수를 막음으로써 이미징 응용에 아주 유익하며 잡음 대비 더 좋은 신호를 보인다.

[0111] 마지막으로 염료의 광안정성은 dimethylformamide (DMF) 내 Rose Bengal과 비교하여 판단하였다. 도 23에서 볼 수 있듯이 모든 염료들은 제공된 조건하에서 유사한 광퇴색 저항성을 보였다. (Rose Bengal에 비해 BAP-1: 43±0.04배, Tau 1: 2.42 ± 0.07배, Tau 2: 2.59 ± 0.06배)

[0113] 분자 도킹 연구

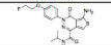
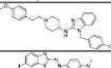
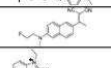
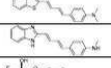
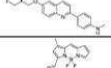
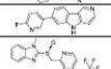
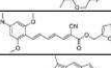
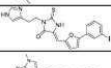
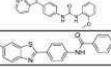
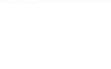
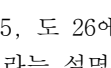
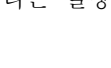
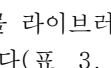
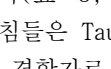
[0114] 타우 단백질의 R3 미세 소관 결합 영역의 PHF6 단편 (306VQIVYK311)의 결정 구조와 BAP-1 및 Tau1.2의 상호 작용을 분자 도킹 연구를 사용하여 평가하였다. PH36 서열은 tau 단백질이 자가 조립 구조를 형성하는 경향성에 중요한 역할을 하는 것으로 입증되었으며(von Bergen, M.; Friedhoff, P.; Biernat, J.; Heberle, J.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000, 97, 5129-5134.), tau 단백질의 핵 형성에 관여하고 있는 것으로 확인되었다. 따라서 tauopathy의 잠재적 치료로서 핵 형성을 막을 수 있는 리간드

탐색을 위해 많이 연구되고 있다. 특히 인접한 306V 와 308I 평행 층들 간의 상호 작용은 단백질 핵 형성의 시작을 막기 위한 타겟으로 확인되었다(Zheng, J.; Liu, C.; Sawaya, M. R.; Vadla, B.; Khan, S.; Woods, R. J.; Eisenberg, D.; Goux, W. J.; Nowick, J. S. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 3144-3157.). 이 6 peptide의 결정 구조체는 steric zipper 구조로 이루어져 있으며, 다른 화합물들과의 공동 결정화를 통해 섬유 축을 따라 터널을 형성하는 경향성이 있다 (자연적으로 또는 작은 유기 리간드와의 공동 결정화를 통해 유발)(Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J.; McFarlane, H. T.; Madsen, A.; Riek, C.; Eisenberg, D. Nature 2007, 447, 453-457.). 섬유 축을 따라 0 (PDB: 2ON9)(Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J.; McFarlane, H. T.; Madsen, A.; Riek, C.; Eisenberg, D. Nature 2007, 447, 453-457.), 1 (PDB: 3OVL)(Landau, M.; Sawaya, M. R.; Faull, K. F.; Laganowsky, A.; Jiang, L.; Sievers, S. A.; Liu, J.; Barrio, J. R.; Eisenberg, D. PLoS Biol. 2011, 9, e1001080.), 2 (4NP8 and 5K7N)(Wiltzius, J. J.; Landau, M.; Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Apostol, M. I.; Goldschmidt, L.; Soriaga, A. B.; Cascio, D.; Rajashankar, K.; Eisenberg, D. Nat. Struct. Mol. Biol. 2009, 16, 973-978.) 터널들을 보이는 결정 구조체와 같이 아주 다양한 형태들이 존재한다. β 시트 결합자 DDNP와 curcumin (1 tunnel)과 같은 공동 결정화에 의해 유발된 터널의 구조는 2개의 터널을 보이는 구조들에서 높은 비율로 보존되어 있다.

[0115] 먼저, 최근의 1.1 Å 해상도의 결정 구조 (PDB: 5K7N)에서 추출된 단일 VQIVYK peptide의 축 신장으로 만들어진 6-mer 섬유 상에서의 BAP-1과 Tau 1, 2 상호작용이 연구되었다(de la Cruz, M. J.; Hattne, J.; Shi, D.; Seidler, P.; Rodriguez, J.; Reyes, F. E.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Weiss, S. C.; Kim, S. K.; Hinck, C. S.; Hinck, A. P.; Calero, G.; Eisenberg, D.; Gonen, T. Nat. Methods 2017, 14, 399-402.). 도킹 연구는 섬유 축을 따라 QVK에 의해 형성된 표면과 BAP-1, Tau 1, 2와의 뚜렷한 상호작용을 드러냈다. (BAP-1 < Tau 1 < Tau 2의 친화력 순위) 탐침은 Tau 집적 억제에 중요할 것이라 여겨졌던 306V와 308I를 포함한 단백질의 반대쪽 표면에 대해 강한 친화력을 보이지 않았다.

[0116] 그 후에 가장 잘 보존된 채널의 6-mer 모델 (인접한 β 시트 구조에 의해 형성된)이 만들어졌다 (도 24). 이 터널은 평면 내 쌓여 있는 수소결합에 의한 소수성 표면과 일부의 친수성 표면의 조합을 가지고 있다. 이전에 기술된 NIR 방사성 교차 β 시트 결합 tau 탐침 3h(Seo, Y.; Park, K.-s.; Ha, T.; Kim, M. K.; Hwang, Y. J.; Lee, J.; Ryu, H.; Choo, H.; Chong, Y. ACS Chem. Neurosci. 2016, 7, 1474-1481.), PBB5(Maruyama, M.; Shimada, H.; Suhara, T.; Shinotoh, H.; Ji, B.; Maeda, J.; Zhang, M.-R.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y.; Ono, M.; Masamoto, K.; Takano, H.; Sahara, N.; Iwata, N.; Okamura, N.; Furumoto, S.; Kudo, Y.; Chang, Q.; Saido, T. C.; Takashima, A.; Lewis, J.; Jang, M.-K.; Aoki, I.; Ito, H.; Higuchi, M. Neuron 2013, 79, 1094-1108.)와 함께 터널 구멍 내에서 BAP-1과 Tau1, 2의 상호작용을 분석하였다(표 3).

표 3

Name	Structure	Docking affinity (kCal/mol)
F-ATPZ-38		-5.0
BAP-1		-7.1
Astemizole		-7.4
I-PDB3		-7.6
FDDNP		-7.7
PBB5		-7.7
BF-188		-7.8
S-F-THK-5117		-7.8
Tau 1		-7.8
F-T808		-7.9
F-T807		-8.5
Methyl-Lansoprazole		L: -8.5 D: -8.7
3h		-8.6
Tau 2		-8.6
I-TH2		-8.9
N-(2-methoxyphenyl)-N'-[4-(1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)phenyl]urea		-9.3
F-SKT04-137		-9.3

[0117]

[0118]

흥미롭게도 3h와 PBB5 처럼 Tau 1, 2는 도 2, 도 25, 도 26에 나타난 것처럼 터널 안에 딱 들어맞았으며, BAP-1은 작은 표면적에 따른 적은 양의 표면 상호작용이라는 설명이 가능한 아주 낮은 결합 친화도를 보였다 (표 3, 도 27).

[0119]

도킹 연구의 보편성을 시험하기 위하여 넓은 화합물 라이브러리에서 선별된 tau 선택적 PET 탐침의 디자인을 가진 12가지 납 화합물을 통해 계산을 반복하였다(표 3, 도 28-40). 두 화합물을 제외 (F-ATPZ-38 과 astemizole; 표 3, 각각 entry1과 3)하고 모든 탐침들은 Tau 1, 2, 3h, PBB5와 같거나 더 높은 범위의 친화력을 보였다. 구조들로 판단할 때 모두 교차 β 시트 결합자로 작용할 것으로 보이지 않으나 과인산화된 tau 단백질 집적체와 다른 위상 (topology)을 통해 상호작용할 것으로 생각된다.

[0120]

이 결과들로 볼 때 우리는 섬유축을 따라 형성된 이 터널 구조체가 과인산화된 tau 단백질과 결합하는 교차 β 시트 결합 탐침의 주요 부위일 수 있다고 상정하였다.

[0121]

하지만 자가 조립된 tau 단백질의 복잡한 구조 때문에 자가 조립하는 PHF6에 의해 형성된 구멍을 잠재적 또는 우세한 결합 위치로서 정확히 짚어 내는 것이 불가능하기 때문에 이 이론적 연구의 결과들은 어느 정도 주의하여 해석되어야 할 것이다.

[0122]

그럼에도 불구하고 단백질 구멍에 대한 이 결과들은 긴 탐침들에서 나타나는 tau 매듭과의 향상된 결합 친화도에 대한 분자적 통찰과 근거를 잠재적으로 제공할 수 있으며, tau 집적체에 대한 새로운 (형광) 탐침을 디자인하는데 있어 유용할 수 있다.

[0124]

용액 내에서 tau 단백질 집적체와 Tau1, Tau2가 선택적으로 상호작용

[0125]

BAP-1과 일반적인 β 병풍 형광단 thioflavin T (ThT)(Groenning, M.; Olsen, L.; van de Weert, M.; Flink, J. M.; Frokjaer, S.; Jgensen, F. S. J. Struct. Biol. 2007, 158, 358-369.)를 대조군으로, Tau 1, 2 샘플의 광방출 스펙트럼은 beta amyloid 집적체들에 대한 선택도에 대비되는 tau 단백질 집적체들에 대한 탐침들의 선택도를 분석하기 위해 시간을 따라 관찰하였다 (도 3 및 도 41). 도 3 A, B에 명백히 나타나듯이 tau 단백질 집적체는 다중 음이온성 heparin(Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Hasegawa, M.; Smith, M. J.;

Crowther, R. A. Nature 1996, 383, 550-553.)과의 배양에 의해 유도되었으며 Tau 1과 Tau 2 모두의 존재하에 분명한 시간 의존적 형광 향상이 관찰되었다. 최대 형광 증가 (Tau 1 은 6.4배, Tau 2는 9.3배)에는 heparin 배양 48시간 후에 도달하였다. 하지만 heparin만 존재했을 때는 유의미한 형광이 관찰되지 않았다 (도 3A, B). 대조적으로 Tau 1과 Tau 2 모두 beta amyloid 용액이 존재할 때 약한 반응만을 보였다 (도 3C, D). 이 데이터는 Tau 1과 Tau 2가 A β 집적체보다 Tau 단백질에 대해 훨씬 더 높은 선택도를 보인다는 것을 시사한다. ThT와 BAP-1은 tau와 A β amyloid 집적체 분석에서 모두 강한 형광 반응을 보였다 (도 41).

[0126] Tau 파생 peptide의 집적 행태에 미치는 염료들의 영향을 확인하기 위해 AcPHF6 peptide에 대한 집적 억제 분석을 수행하였다. ThT의 시간 의존적 형광을 이용해 기록한 분석 결과, peptide의 집적은 현 연구에 사용된 농도의 BAP-1이나 Tau 1의 존재에 영향을 받지 않았으며(도 42), 최대 형광에 도달하는 시간 또한 크게 다르지 않았다. 색소 첨가 후 ThT의 최대 형광강도는 감소하였는데, 이는 peptide 집적체들과 BAP-1, Tau 1과의 결합 부위에 대한 경쟁을 제시하는 결과이다. 높은 완충력을 가진 배지에 대한 Tau 2의 용해도가 부적절하여 Tau 2의 영향은 확인되지 않았다.

[0127] 이 환경하에 비슷한 형광 상승 시간과 함께 NIR 영역에서의 BAP-1과 Tau 1의 형광 또한 증가하였는데, 이 결과는 AcPHF6 peptide와의 결합 상호작용에 대한 추가적인 증거를 제공하며(도 43), 따라서 도킹 연구의 결과를 입증한다.

[0129] Tau 1과 Tau 2의 세포 독성

[0130] 세포 환경에서 탐침들의 특이성을 분석하기 전에 여러 뇌 유래 세포주들에서 MTT 분석을 이용한 탐침의 세포독성 분석을 수행하였다. SKNMC (인간 신경아세포종), U87 (인간 교모세포종), SH-SY5Y (인간 신경아세포종), C6 (쥐 뇌 신경교종), N2A (쥐 뇌 신경아세포종) 뿐만 아니라 여러 인간 1차 뇌 신경 배양체를 이용하였다. 최대 10 μ M 농도에서 48시간 배양 후에도 유의미한 독성은 관찰되지 않았다. (도 44).

[0132] Tau 1과 Tau 2는 세포 내에서 Okadaic acid에 의해 유발된 Tau 과인산화를 선택적으로 시각화

[0133] 인간 신경아세포종 SH-SY5 세포는 넓은 범위의 serine/threonine 인산가수분해효소에 대한 강력한 억제자인 okadaic acid (OA)로 처리되었다. 이것은 in vitro tau 과인산화의 잘 알려진 세포 배양 모델이며 tau 인산화 패턴은 인간 알츠하이머병 뇌 조직에서 얻어진 패턴과 유사하다(Baker, S.; Gotz, J. Acta Neuropathol. Commun. 2016, 4, 32.). 도 45에 나타난 것처럼 50nM의 OA를 SH-SY5에 첨가하자 tau 단백질 발현과 그 과인산화의 시간 의존적인 증가가 일어났다.

[0134] 세포 모델에서 과인산화를 확인했기 때문에 Tau 1, 2, BAP-1 또는 ThT (각 500nM)를 100nM OA와 6시간 동안 배양된 SH-SY5 세포들에 첨가하였으며 형광 이미지를 정량적으로 분석하였다. 도 4A, B에서 볼 수 있듯이 모든 탐침들은 OA와 사전 배양되지 않은 세포들에 비해 형광 강도의 증가를 보였다. Tau 1과 2에서 형광 증가가 각각 4.41 ± 1.53 배, 2.92 ± 1.10 배로 관측된 것에 반해 BAP-1, ThT는 덜 뚜렷한 형광 증가 효과를 보였다 (각각 1.71 ± 0.35 배, 2.17 ± 0.45 배). 이러한 결과들은 Tau 1과 Tau 2의 tau 단백질 집적체에 대한 선호를 확실히 나타내는 것이다.

[0135] 뇌 조직 내 tau 집적체의 선택적 시각화에서의 가능한 간섭 원인인 A β 에 대한 형광단들의 반응을 특징짓기 위해 그들의 형광 반응들을 갖 녹인 A β ₁₋₄₂ peptide (50 μ g/mL)로 48시간 전처리된 SH-SY5Y 세포에서 조사하였으며(Hu, X.; Crick, S. L.; Bu, G.; Frieden, C.; Pappu, R. V.; Lee, J.-M. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009, 106, 20324-20329.), 세포 내 amyloid 섬유 형성은 세포 용해물의 Western blot 분석을 통해 확인하였다 (도 46).

[0136] 도 4C, D에서 볼 수 있듯이 Tau 1과 Tau 2는 A β 처리 세포에서 미처리 세포에 비해 약한 형광 향상을 보인 반면 BAP-1과 ThT는 작지만 유의미한 형광 증가를 보였다 (각각 1.57 ± 0.42 배와 2.35 ± 0.61 배). 이 결과들은 Tau 1과 Tau 2가 A β 집적체에 의한 간섭없이 세포 내에서 과인산화된 tau 단백질 집적체를 탐지할 수 있다는 것을 분명히 보여주는 것이다.

[0138] 나이 든 마우스의 tauopathy에 대한 acute 쥐과 모델에서 Tau 1이 tau 과인산화를 시각화

[0139] 세포 내 과인산화된 tau 집적체에 대한 Tau 1의 선택성 결과에 힘입어 Tau 1의 in vivo 동물 tauopathy 모델에서의 적용을 시험하였다. 관련된 동물 모델로서 23개월된 마우스들에게 해마 영역에서의 tau 과인산화와 집적을 유도하기 위해 편도체 측면에 10ng의 OA가 1회 주사하였다. CA1과 CA3 영역은 연구 모델들과(de Calignon, A.; Polydoro, M.; Suares*rez-Calvet, M.; William, C.; Adamowicz, D. H.; Kopeikina, K. J.; Pitstick, R.;

Sahara, N.; Ashe, K. H.; Carlson, G. A.; Spires-Jones, T. L.; Hyman, B. T. *Neuron* 2012, 73, 685-697.) 인간 환자들의 질병 진행 중 tau 단백질 과인산화와 신경세포 내 신경섬유매듭 축적에 일찍 영향을 받는 곳 중 하나라는 점에서 특히 흥미롭다(Braak, H.; Braak, E. *Acta Neuropathol.* 1991, 82, 239-259.). 쥐 뇌의 해마 영역에 대한 Ex vivo 분석 결과, OA가 없는 마우스 뇌 조각에서 Tau 1이 사실상 형광을 보이지 않았던(같은 이미징 설정 하에) 피라미드형 뉴런 세포체 수상돌기 구획에 상응하는 뇌의 CA1과 CA3 영역에서 대조적인 밴드 염색 결과를 보였다 (도 47).

[0140] 뇌 조각 내 tau 양성 지역이 과인산화된 tau 집적체 위치인지 확인하기 위해 Tau 1과 과인산화된 tau 단백질에 대한 항체의 광방출 공초점 현미경 연구를 진행하였다. 도 5에 나타난 바와 같이 OA 처리된 마우스의 CA1, CA3 해마 지역 내에서 Tau 1이 강렬한 형광점을 나타냈으며 예상된대로 이 지역의 세포체들은 확실히 항체 형광 지역과 겹쳤다. 도 6에 나타난 것처럼 개별 뉴런의 수준에서 일부는 불꽃 같은 특징을 보였다. 이 특징은 tau 단백질 집적체가 뉴런의 세포체 수상돌기 구획으로 모이는 것(일부는 axon을 따라서)으로 해석할 수 있다. 인간 환자에서 과인산화된 tau 집적체는 주로 뉴런의 axonal stem에서 발견되지만 tau 과인산화의 동물 모델에서는 체세포 국부화가 자주 관찰되었다 (도 6). 그럼에도 불구하고 도 5, 6의 결과들은 뇌 조직에서 과인산화된 tau 집적체에 대한 선택적 형광 센서로서 Tau 1의 능력을 보여주는 것이다. A β ₁₋₄₂의 형광 항체를 이용한 공동 국부화 실험은 흥미하고 비특이적인 형광을 보였으며 따라서 OA 처리 마우스에서 Tau 1 유래 형광은 A β 142 염색의 결과가 아니라는 것을 증명해주었다(도 48).

[0141] tau 단백질을 인산화되지 않은 상태로 유지하며(Qian, W.; Shi, J.; Yin, X.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C.-X.; Liu, F. J. *Alzheimer's Dis.* 2010, 19, 1221-1229.), OA 억제 tau의 1차 타겟이기도 한 가장 중요한 인산분해효소인 단백질 인산분해효소 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 발현 수준의 보고된 연령 의존적 감소에 부합하게(Veeranna; Yang, D.-S.; Lee, J.-H.; Vinod, K. Y.; Stavrides, P.; Amin, N. D.; Pant, H. C.; Nixon, R. A. *Neurobiol. Aging* 2011, 32, 2016-2029.), 10주된 OA 처리 마우스가 아주 희미한 Tau 1 형광만을 나타내어 (도 49), OA 처리 마우스에서 Tau 1 형광의 tau 단백질 burden에 대한 의존성은 더욱 입증되었다(Haystead, T. A. J.; Sim, A. T. R.; Carling, D.; Honnor, R. C.; Tsukitani, Y.; Cohen, P.; Hardie, D. G. *Nature* 1989, 337, 78-81.). 따라서 OA 처리의 tau 과인산화에 대한 효과는 늙은 쥐에게서 더 심각할 것으로 예상된다.

[0143] Tau-1의 혈액-뇌 장벽 침투성

[0144] 마우스에서 Tau 1의 BBB 침투성을 분석하기 위해 꼬리 정맥을 통해 색소를 주사한 뒤 한시간 후에 죽였다. 뇌는 저온 절단되었고 Tau 1의 이미징은 해마 내 추체 뉴런에서 발생하는 형광을 보여주었으나 (도 50), 운반체만을 주사한 마우스에서는 아무런 형광이 나타나지 않았다. 이 결과들은 Tau 1의 BBB 투과 잠재성을 확실히 증명하는 것이다.

[0146] 알츠하이머병 형질전환 마우스 모델에서 Tau 1의 tau 집적체에 대한 선택성

[0147] Tau 매듭 선택성은 알츠하이머 병을 가진 3xTg 마우스 모델을 이용해 분석하였다(Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J. D.; Murphy, M. P.; Golde, T. E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M. P.; Akbari, Y.; LaFerla, F. M. *Neuron* 2003, 39, 409-421.). 이 삼중 형질전환된 모델은 amyloid 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)의 A β ₁₋₄₂ peptide로의 가공에 관여되어 있는 M146V 돌연변이된 버전의 PSEN1뿐만 아니라 APP의 Swedish (KM670/671NL) 돌연변이와 인간 tau 단백질 4R2N (Tau441) 유형의 P301L 돌연변이를 모두 발현한다. 세 돌연변이의 결합된 효과는 tau 매듭과 beta amyloid plaque가 각각 생후 12개월과 6개월 쯤에 확실히 존재할 것을 보장해준다.

[0148] Tau 1의 병리학적 선택성을 알아내기 위하여 서로 다른 두가지 방법을 사용하였다. 먼저, 15개월된 마우스의 해마 뇌 조각에서 과인산화 tau 단백질 특이적 항체 AT180과 조직 염색을 통해 Tau 1의 명백한 공동 국부화를 확인하였다 (도 51). 해마의 피라미드형 뉴런은 AT180과 Tau 1의 형광 창 (fluorescent window) 모두에서 세포체 수상돌기 구획 유래 형광을 보였으며 이는 3xTg 모델에 대한 1차 문헌의 발견을 그대로 반영하는 결과이다(Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J. D.; Murphy, M. P.; Golde, T. E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M. P.; Akbari, Y.; LaFerla, F. M. *Neuron* 2003, 39, 409-421.).

[0149] 이 뇌 조각들 내 beta amyloid plaque는 pan-A β 형광 항체 6e10를 이용해 확인하였으며 Tau 1과의 공동 염색은 plaque의 중심부에서만 아주 약한 신호를 보였다 (도 52). Tau 매듭이 많은 조각 내 공동 국부화와 A β plaque 내 공동 국부화를 비교하는 것은 Tau 1이 A β 집적체보다는 tau 병리에 대해 높은 선택도를 가진다는 것

을 보여주며 (도 7), 용액 및 세포 기반 분석에서 얻어진 결과를 입증해준다 (도 3-4).

[0150] 두번째, 염료의 *in vivo* 분포를 분석하기 위해 3xTg 마우스의 두개 내로 Tau 1을 주입하였다. 마우스를 죽인 뒤 뇌의 해마 영역이 과인산화된 tau 단백질, A β plaques, APP에 대한 항체들로 공동 염색하였다. (각각 AT180, sig 39200, mab348). 도 8 및 도 53에서 볼 수 있듯이 이 조건들에서 Tau 1은 A β 병리가 아니라 tau 병리와 분명하게 공동 국부화되었다.

[0152] **Tauopathy 형질전환 마우스 모델 내 Tau 1의 *in vivo* 이미징**

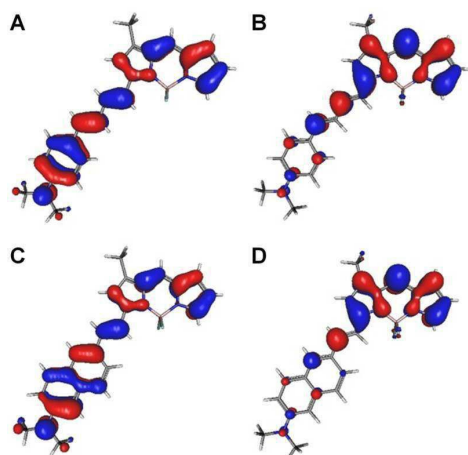
[0153] NIR 방출 염료가 조직 깊이 침투할 수 있기에 마지막으로 Tau P301L 마우스 모델과 야생형 마우스 모델 내 Tau 1 형광 이미징을 실시하였다. Tau P301L 마우스 모델은 특히 인간 tau 단백질의 4R2N (Tau441) 이형을 과발현하며 집적이 잘 발생하게 하는 P301L 돌연변이가 존재한다(Terwel, D.; Lasrado, R.; Snauwaert, J.; Vandeweert, E.; Van Haesendonck, C.; Borghgraef, P.; Van Leuven, F. J. Biol. Chem. 2005, 280, 3963-3973). 도 9에서 볼 수 있듯이 꼬리 정맥 주사 30분 후, 야생형이나 음성 대조군 샘플들에 비해 형질 전환 마우스 모델에서는 크게 증가된 형광 강도가 관찰되었다. 이는 살아있는 마우스에서 tau 매듭의 존재를 보고할 수 있는 Tau 1의 능력을 명백히 보여주는 것이다.

[0155] **결론**

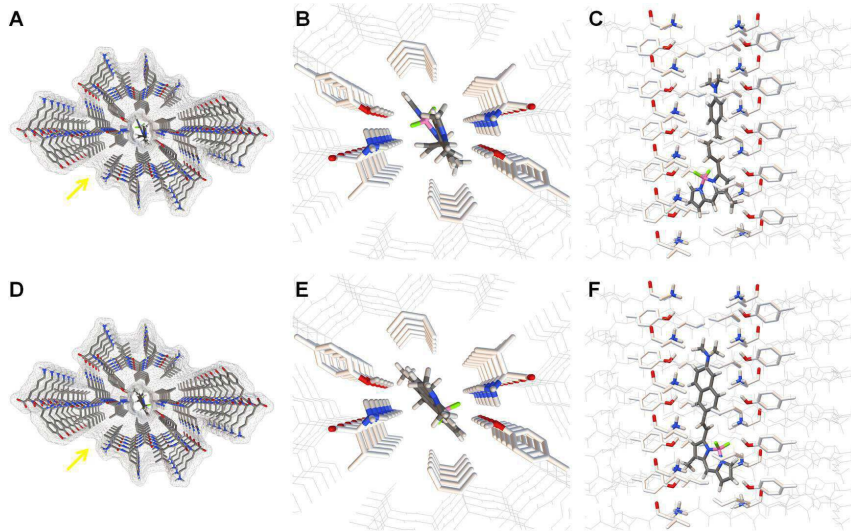
[0156] 본 발명에서는 자가 조립 미세소관 관련 tau 단백질에 의해 형성된 분자 표면에 대한 민감하고 선택적인 탐침을 만들기 위한 쉬운 구조 변형의 실현 가능성을 보여주었다. 이와 같이 Tau 1과 Tau 2는 단백질 집적체 특이성에 대한 push-pull 발색단 결합 거리 관련 가설 (전혀 다른 종류의 형광단에 대해 만들어진대로)에 분명히 부합한다. Ring fusion을 통한 추가 친유성 표면의 결합은 중요한 역할을 하지 않는 것으로 밝혀졌다. Tau 단백질 R3 반복부의 PHF6 조각에 대한 도킹 연구는 자가 조립된 tau 단백질에 대한 색소들의 잠재적 결합 방식들을 제공하며 이미징을 위한 새로운 tau 결합 분자 디자인에 대한 추가적인 지침 또한 제공해줄 수 있다. 이 탐침은 짧은 합성 경로를 통해 얻을 수 있으며 큰 스토크스 이동과 같은 훌륭한 광물리적 특성들과 낮은 세포독성을 가지고 있어 최소한의 잡음으로 과인산화된 tau 단백질 필라멘트의 *in vitro/ex vivo* 이미징을 가능케 한다. 탐침은 분명히 살아있는 세포 내에 효과적으로 침투하여 세포 내 tau 단백질 침전물을 시각화할 수 있었다. 또한 두 단백질 집적체를 모두 가지는 형질 전환 마우스 모델에서 Tau 1은 효과적인 BBB 침투를 보였고 A β 침전물보다 tau 매듭에 대한 높은 선택도를 보였다. 마지막으로, Tau 1은 *in vivo* 형질 전환 마우스 모델에서 tau 매듭을 인식했고 따라서 살아있는 생물에서 tau 식별을 위한 훌륭한 잠재적 염료라는 점을 확인하였다. 판매되는 인산화된 tau 항체에 비하여 본 발명에 따른 Tau 1, Tau 2는 아주 훌륭히 기능하였으며 완벽에 가까운 spatial overlap을 보여주었다. 형광 표지된 항체를 합성하는 것의 금전적인 비용과 시간적 비용을 고려할 때, 본 발명에 따른 형광단은 조직학적 실험에 항체들보다 훨씬 유리할 수 있다. 더 나아가 BODIPY 색소의 붕소 중앙부에서의 효과적인 18F/19F 교환 때문에 본 발명에 따른 염료는 dual NIR 형광과 양전자 방출 단층 촬영 이미징 작용제로도 효과적으로 사용될 수 있다.

도면

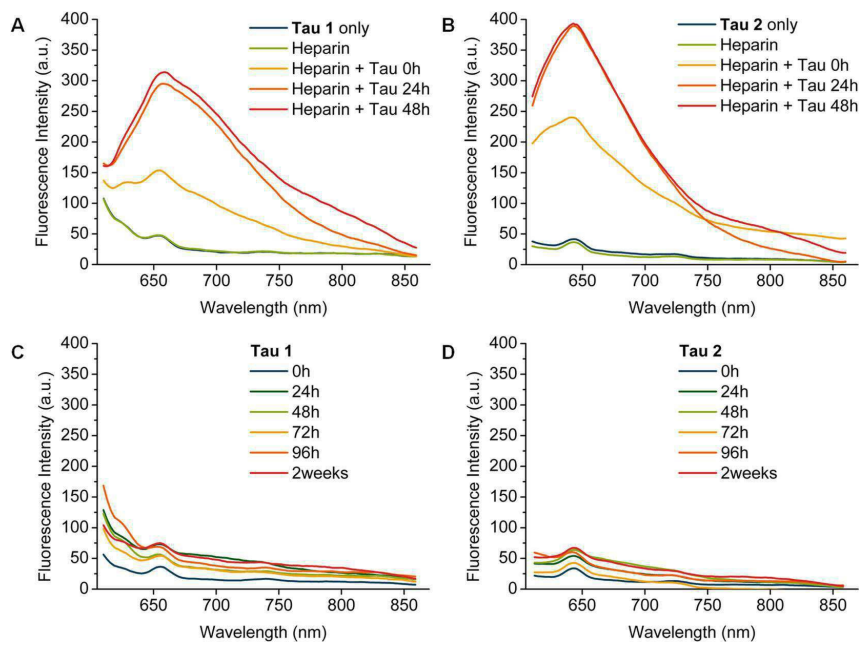
도면1



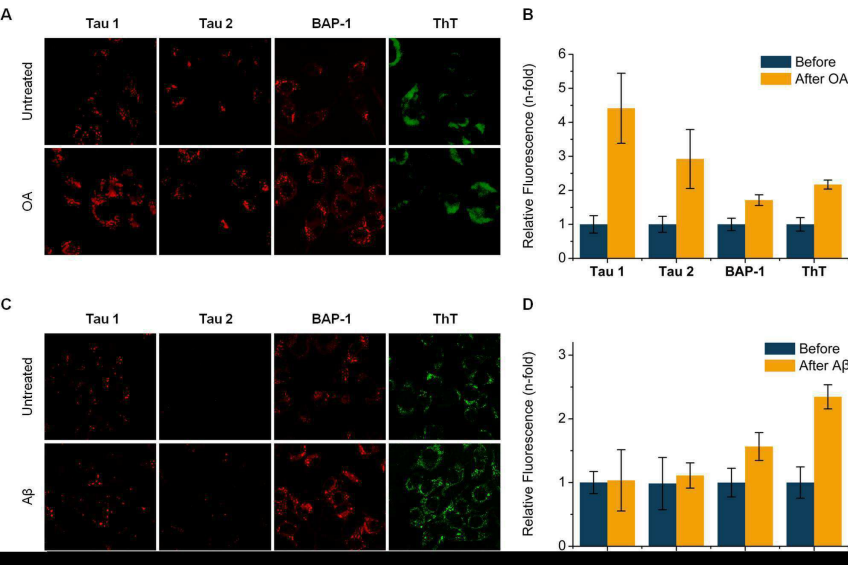
도면2



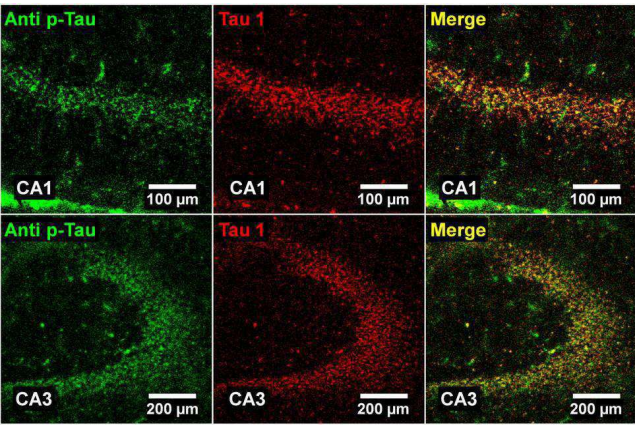
도면3



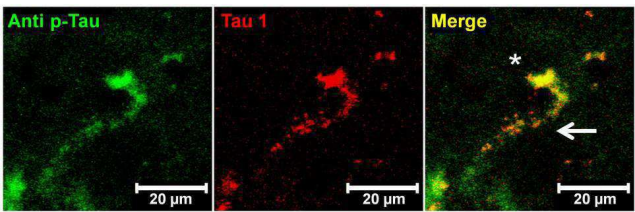
도면4



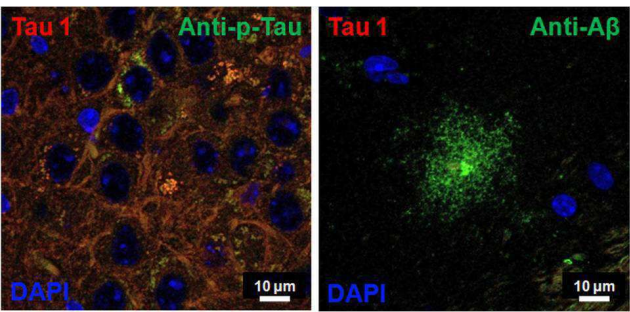
도면5



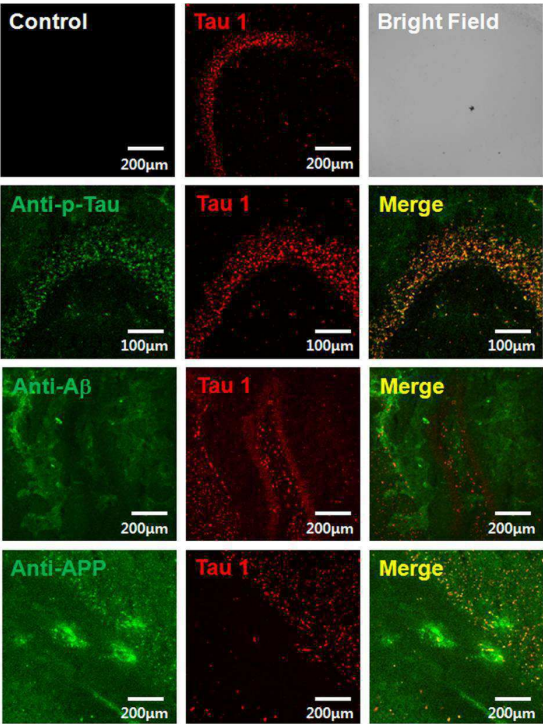
도면6



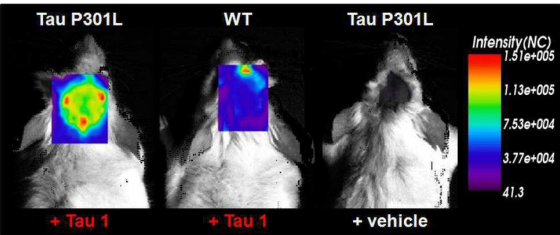
도면7



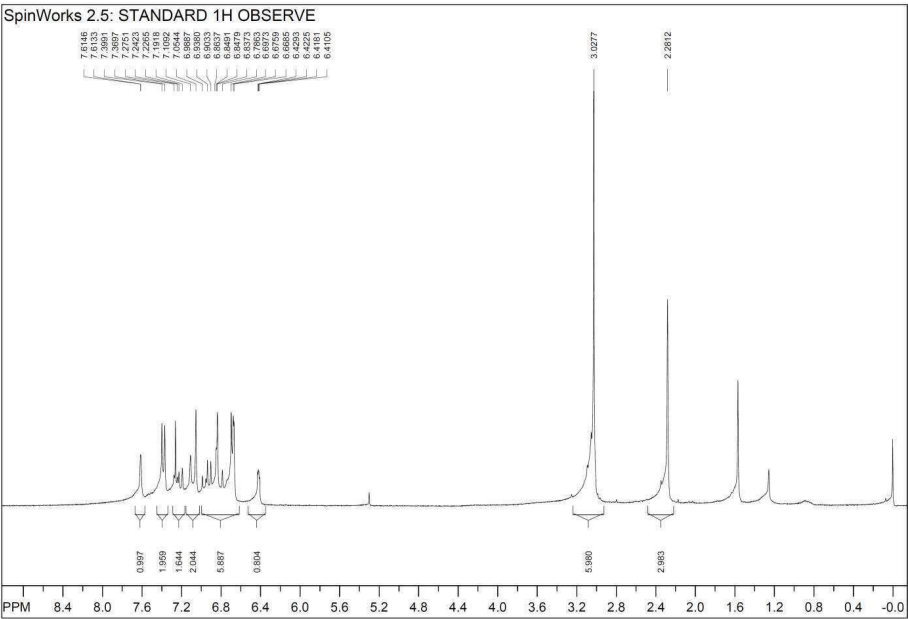
도면8



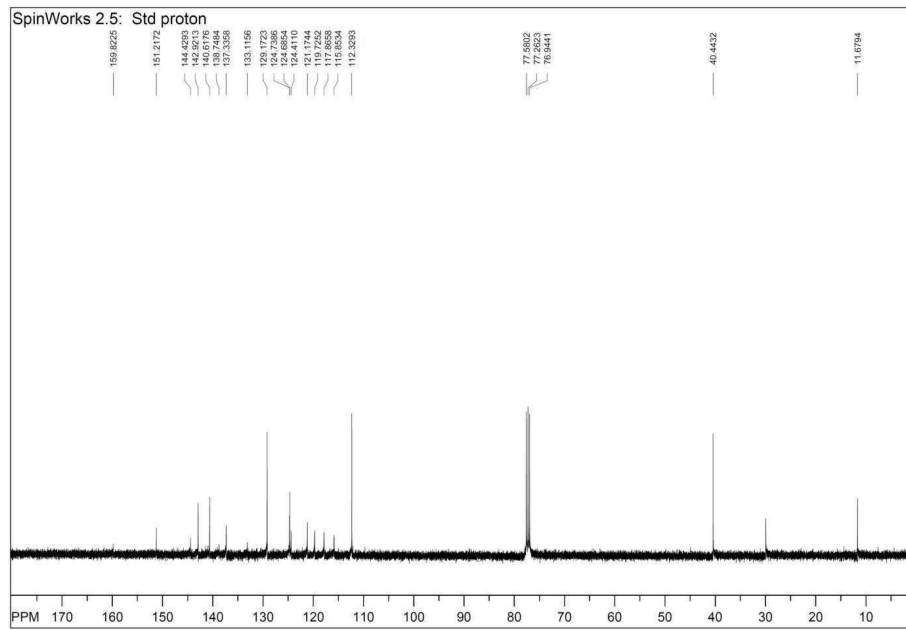
도면9



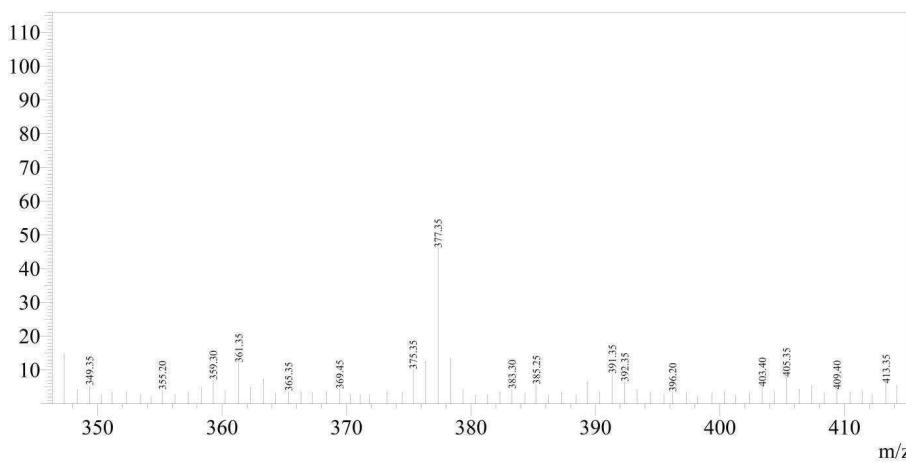
도면10



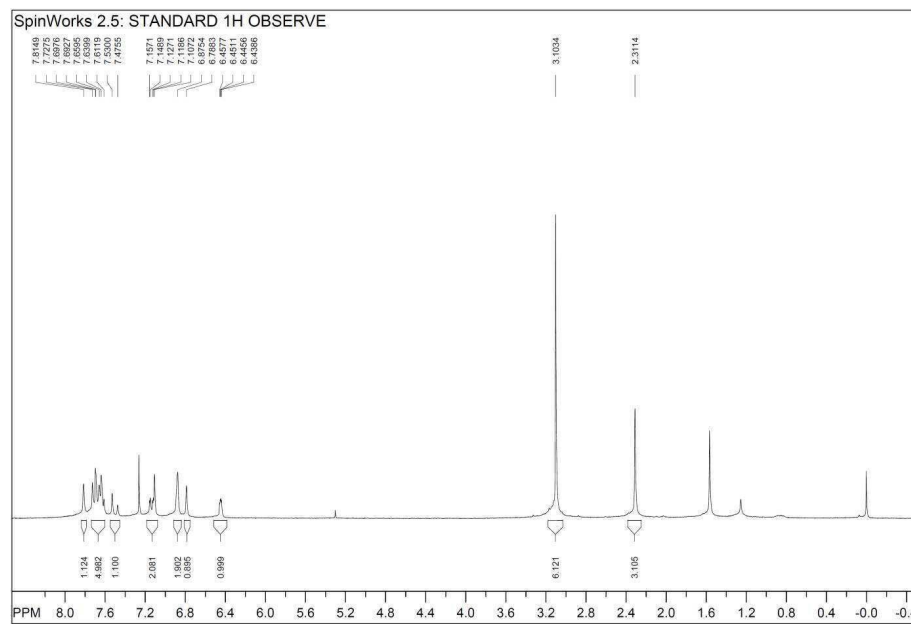
도면11



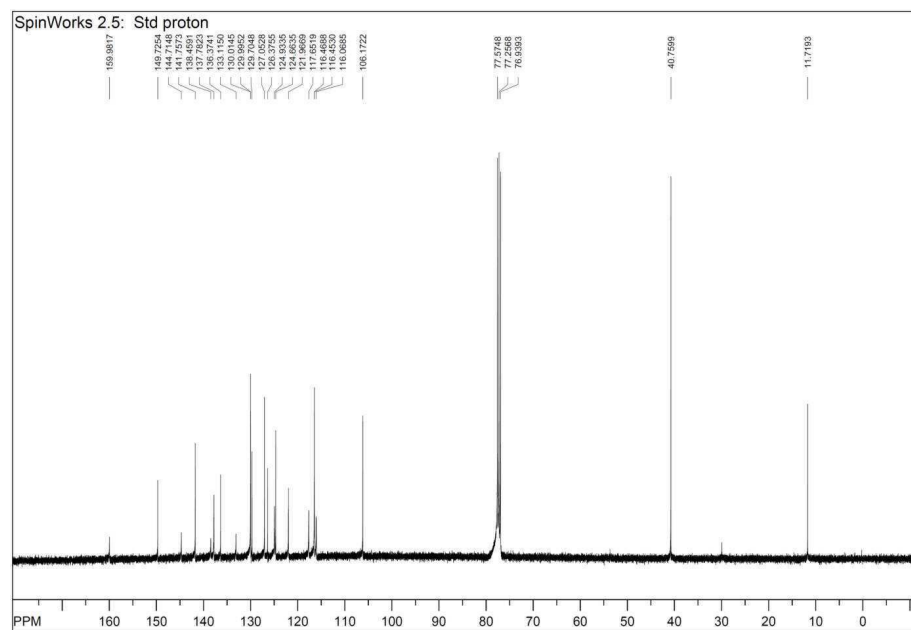
도면12



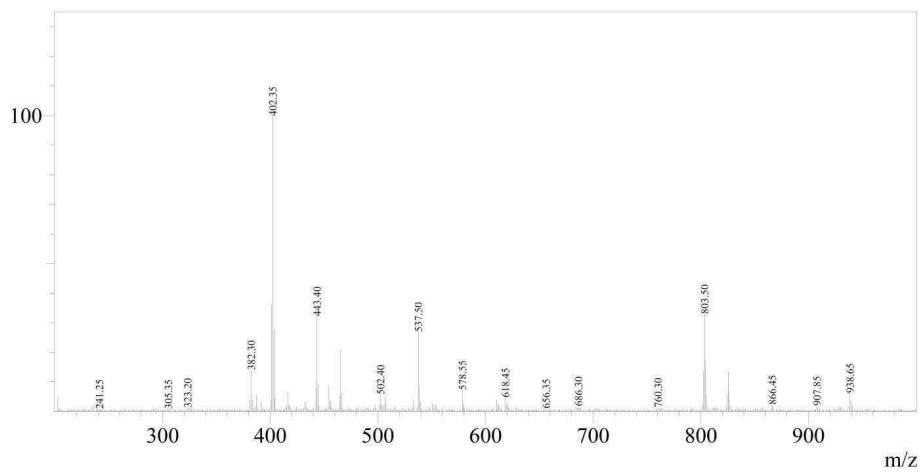
도면13



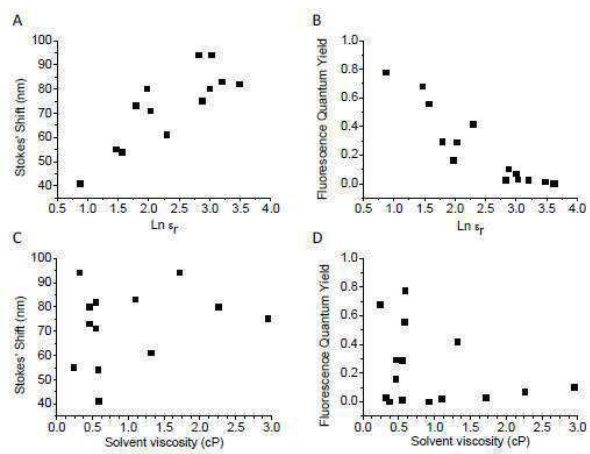
도면14



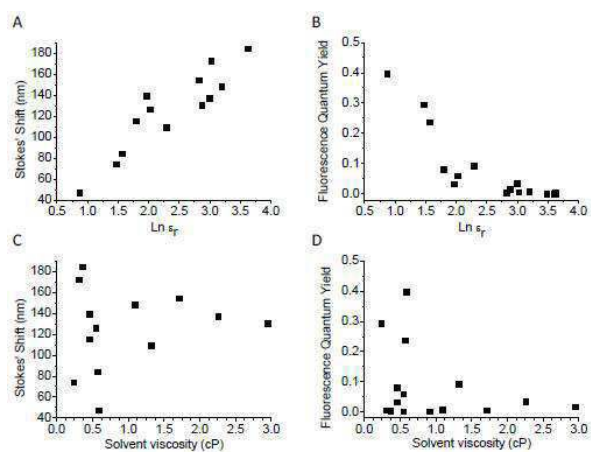
도면15



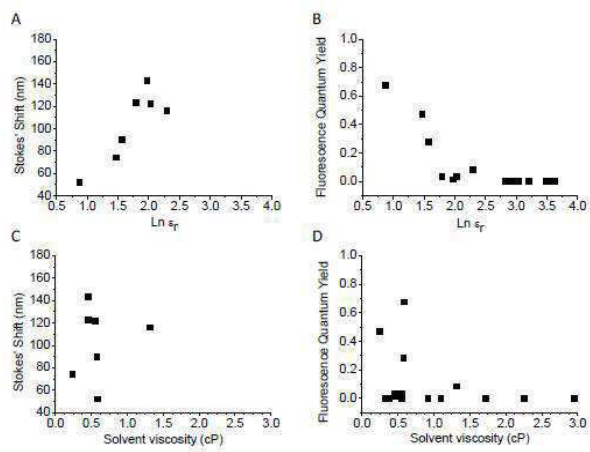
도면16



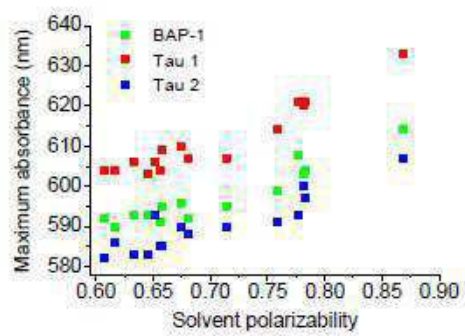
도면17



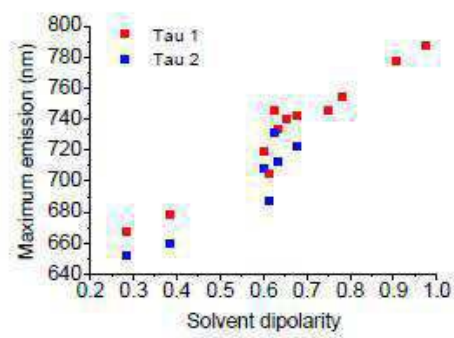
도면18



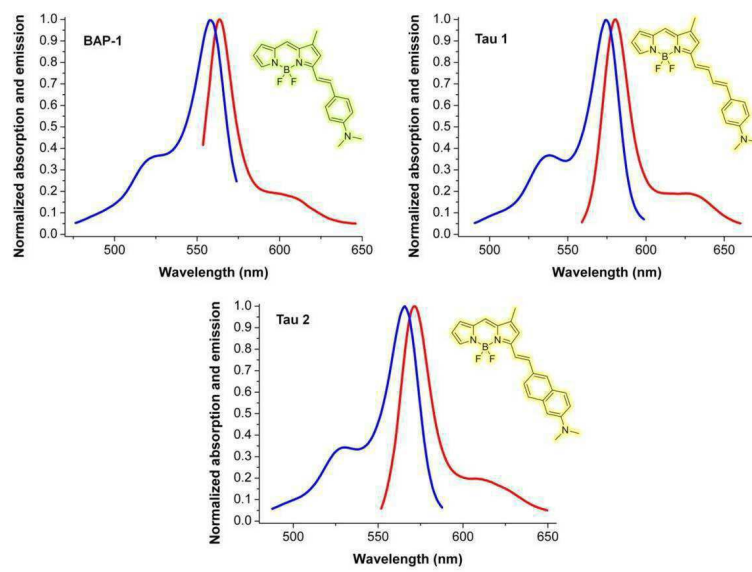
도면19



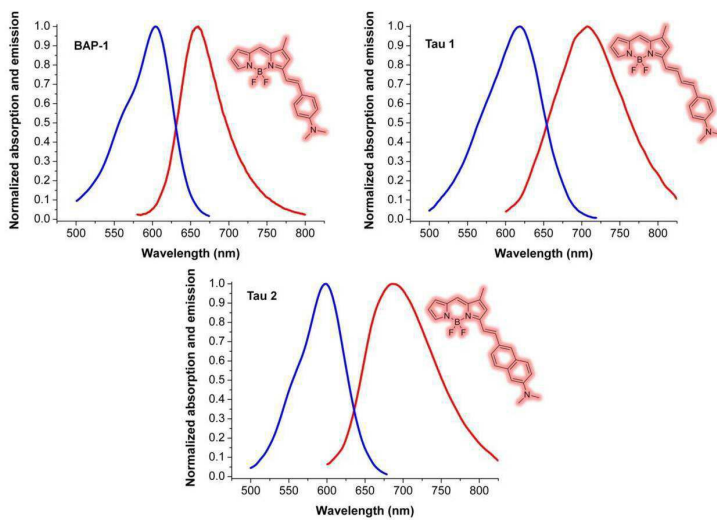
도면20



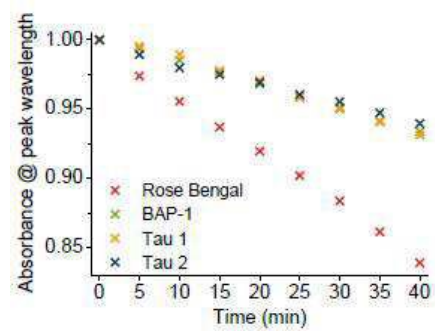
도면21



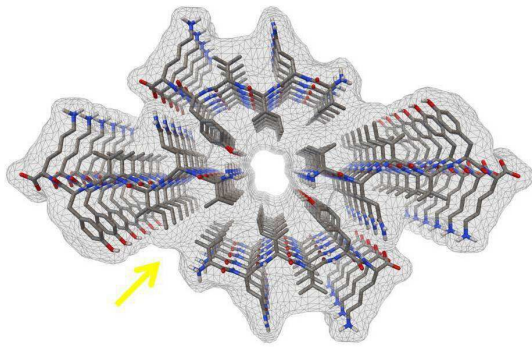
도면22



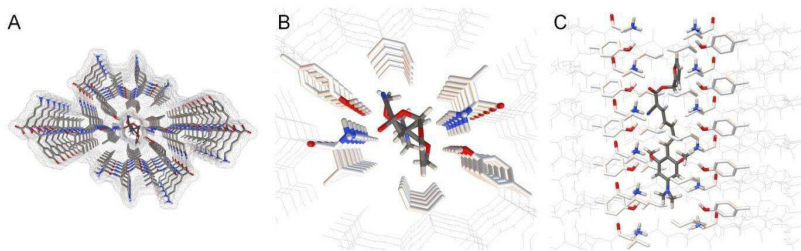
도면23



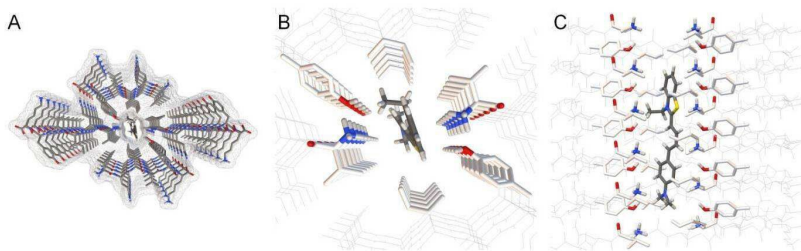
도면24



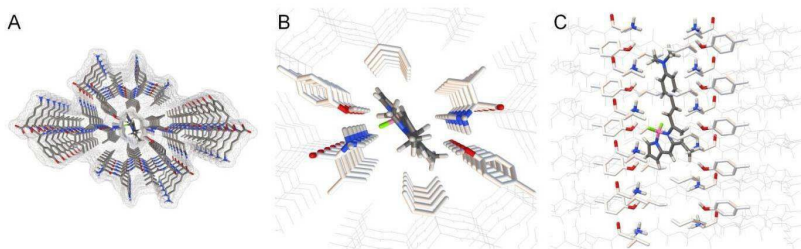
도면25



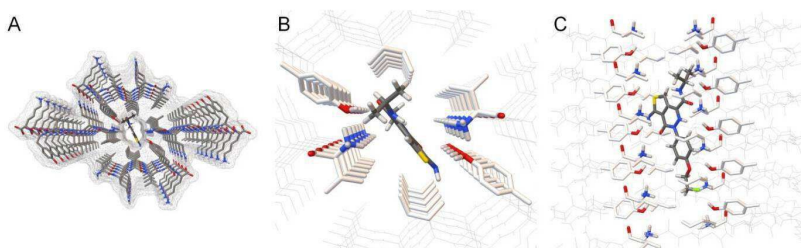
도면26



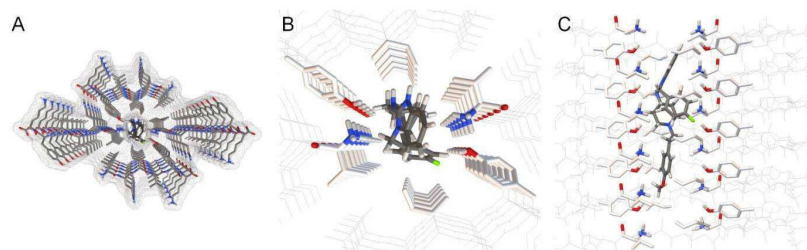
도면27



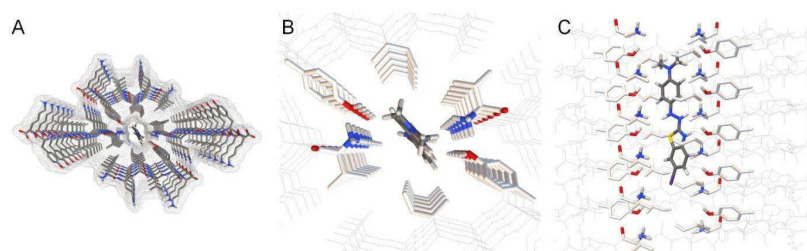
도면28



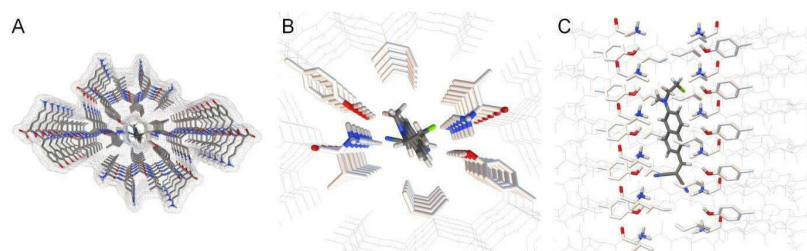
도면29



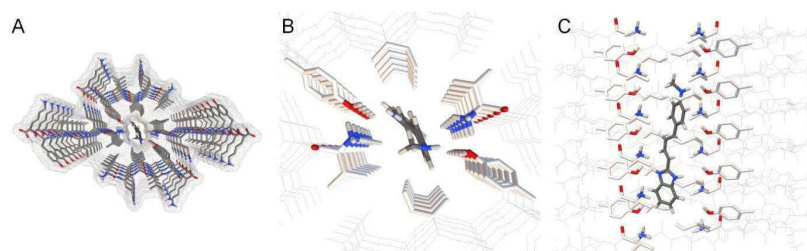
도면30



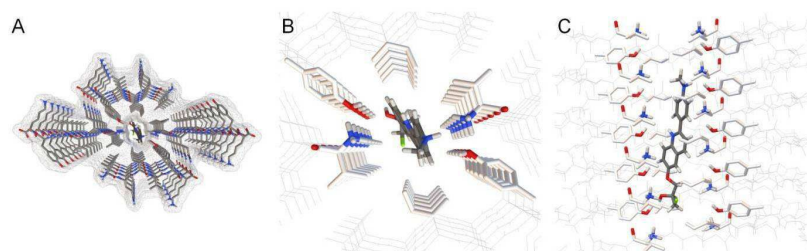
도면31



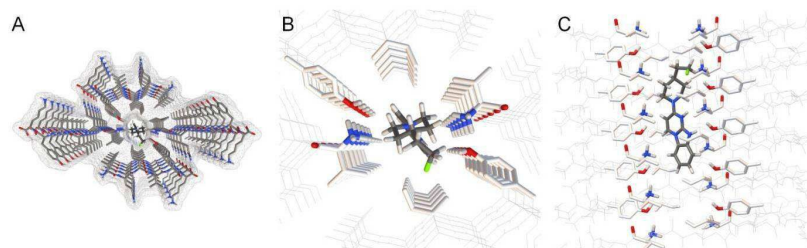
도면32



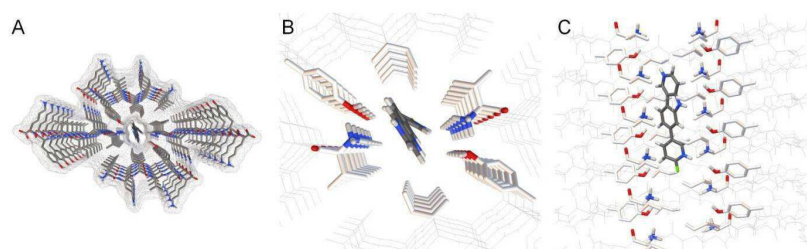
도면33



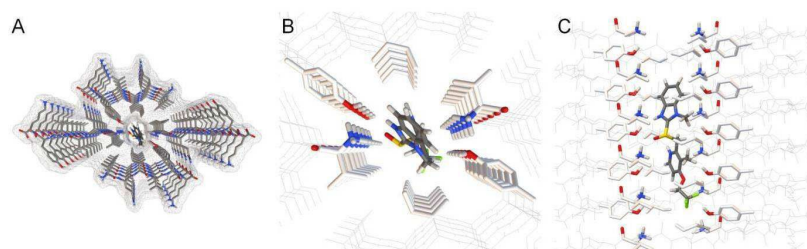
도면34



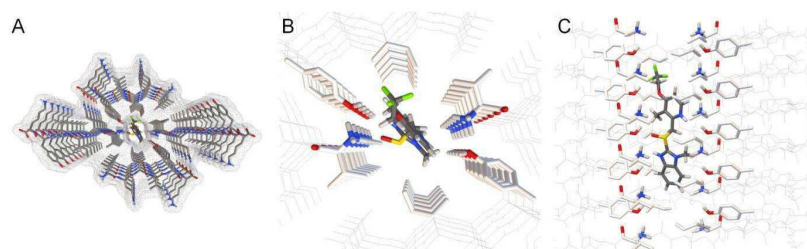
도면35



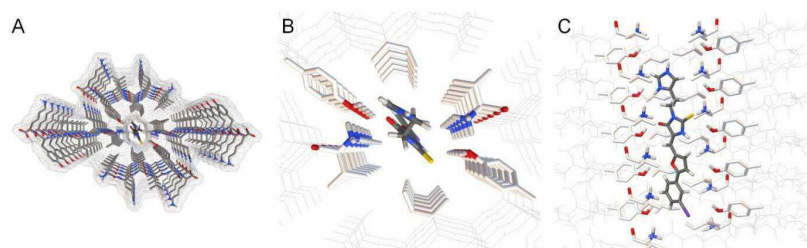
도면36



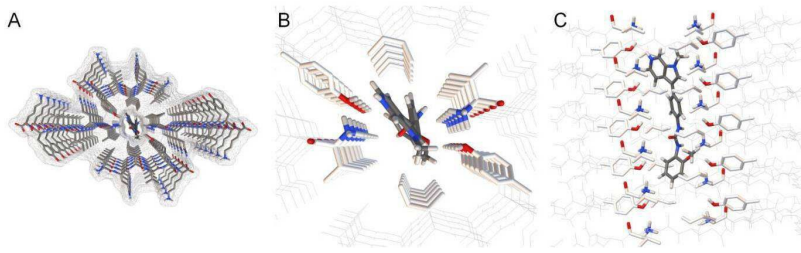
도면37



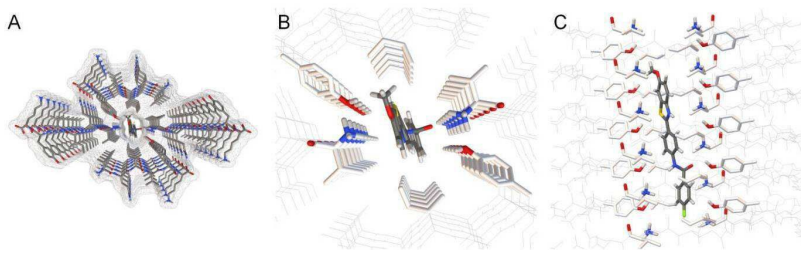
도면38



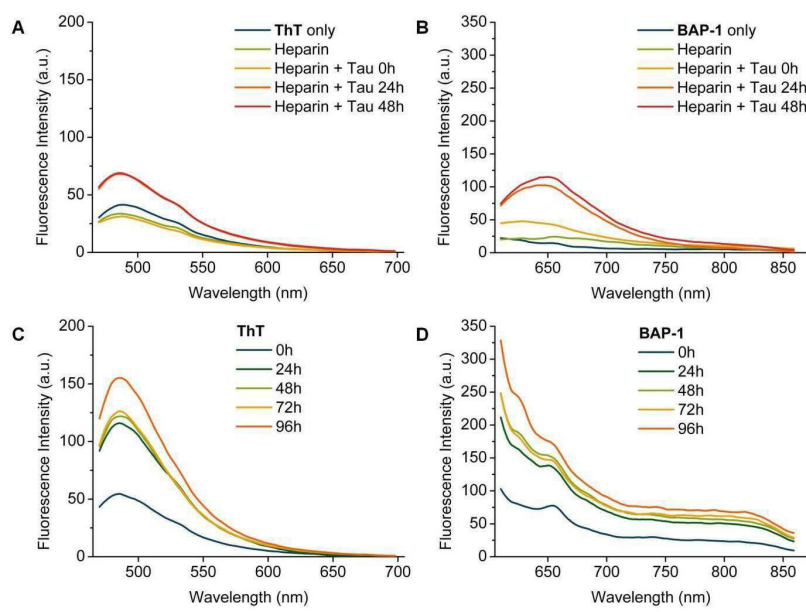
도면39



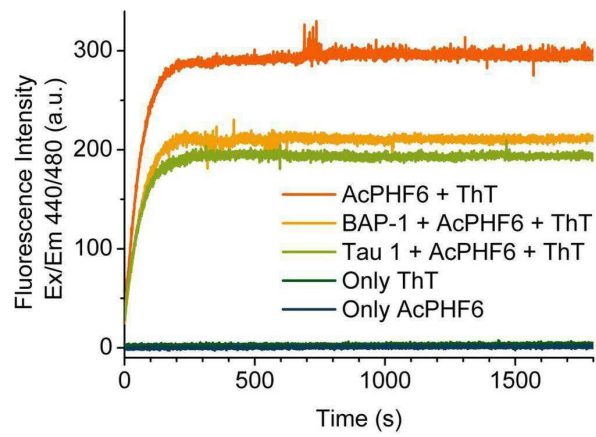
도면40



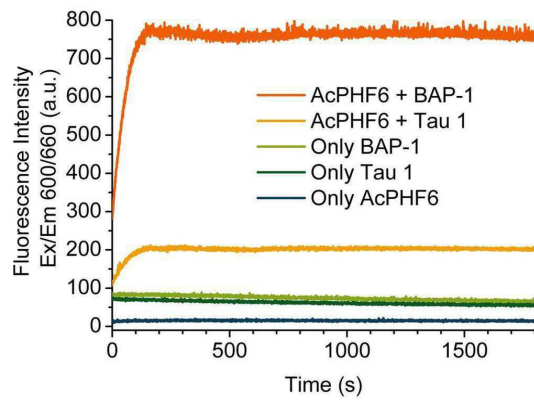
도면41



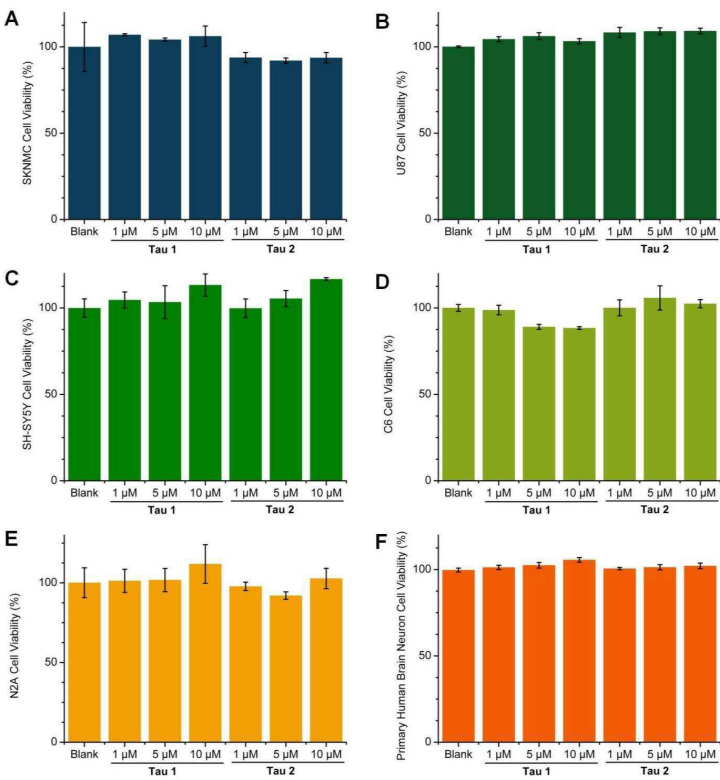
도면42



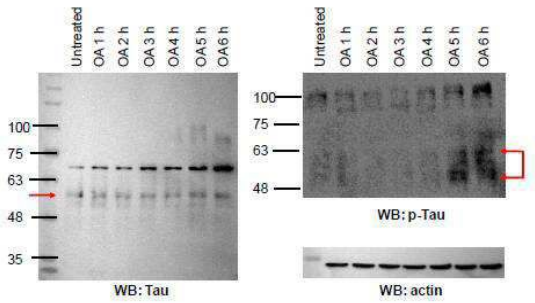
도면43



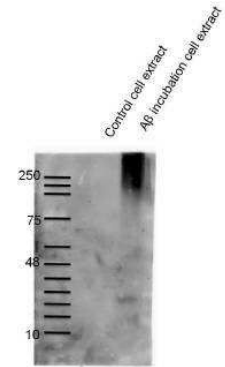
도면44



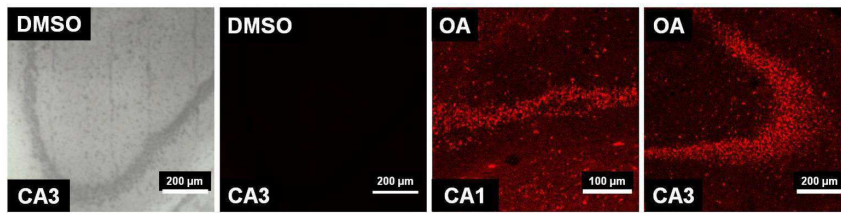
도면45



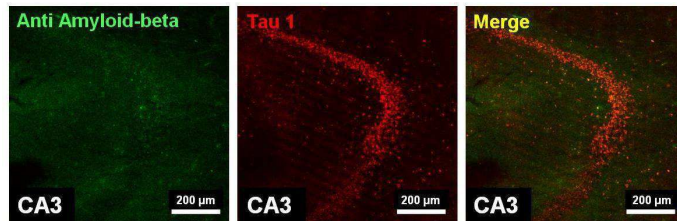
도면46



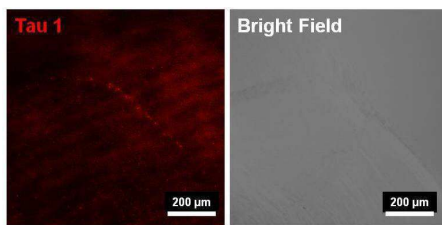
도면47



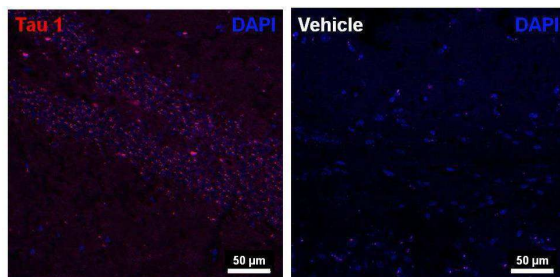
도면48



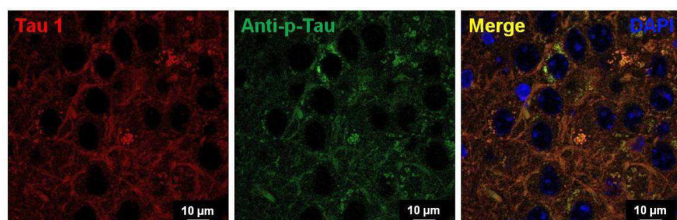
도면49



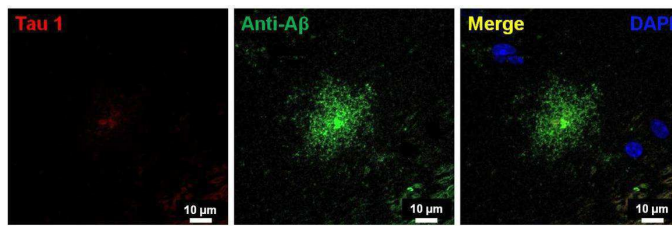
도면50



도면51



도면52



도면53

