

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0174846

(43) 공개일자 2023년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09K 11/06 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C09K 11/06 (2022.01)

A61K 49/0021 (2023.08)

(21) 출원번호 10-2022-0075971

(22) 출원일자 2022년06월22일

심사청구일자 2022년06월22일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

서울특별시 성북구 안암로 145

구세영

서울특별시 성북구 안암로 145

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

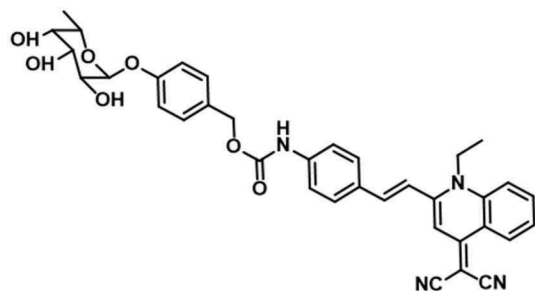
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 푸코시다제 반응성 형광 프로브 화합물 및 이를 이용한 시네신스 검출 방법

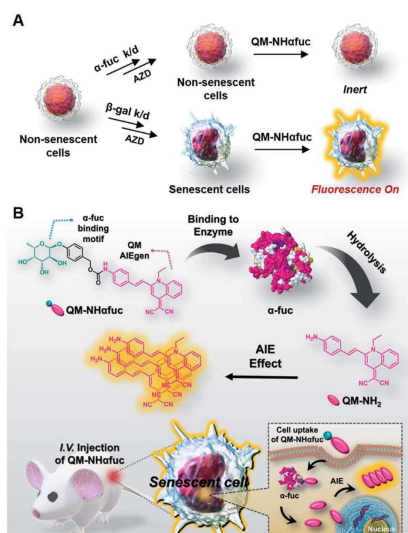
(57) 요약

본 발명은 하기 [화학적 1]로 표시되는 형광 프로브 화합물에 관한 것이다:

[화학적 1]



대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/52 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 2800/7042 (2013.01)

(72) 발명자

원미애

서울특별시 성북구 안암로 145

김원영

경기도 수원시 영통구 신원로294번길 40-21

조나단 엘세슬러

더 유니버시티 오브 텍사스 앳 오스틴 디파트먼트 오브 케미스트리, 컬리지 오브 내츄럴 사이언서즈 105 이스트 24 스트리트 스톱 A5300 오스틴, 텍사스 78712, 미국

리 밍리

서울특별시 성북구 안암로 145

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132422
과제번호	2018R1A3B1052702
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스
기 여 율	90/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345323765
과제번호	2020R1A6A3A01100558
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	노화세포 표적사멸 항노화 약물전구체 개발
기 여 율	5/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345323788
과제번호	2020R1A6A3A01100551
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	세포 카니발리즘 매개의 신규 암전이 극복 표적치료제 개발
기 여 율	5/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.08.31

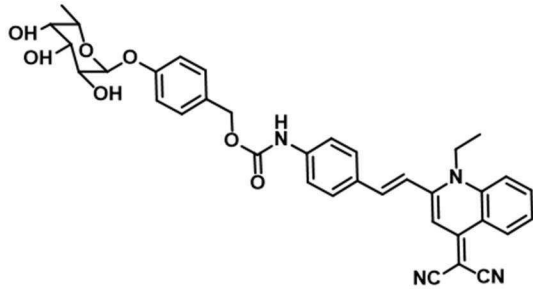
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 α -L-fucosidase(α -fuc)와 선택적으로 상호작용 하는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화합물은 α -fuc에 의해 형광 활성이 증가하는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 4

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 α -fuc 검출용 형광 센서.

청구항 5

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 시네신스 (Senescence) 검출용 조성물.

청구항 6

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 생체로부터 분리된 시료에 주입하는 단계; 및

상기 시료에서, 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 관측하는 단계;를 포함하는 시네신스의 검출 및 영상화 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 생체로부터 분리된 시료는 세포 또는 조직인 것을 특징으로 하는 시네신스의 검출 및 영상화 방법.

청구항 8

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 생물(organism)에 주입하는 단계; 및

상기 생물의 생체 내에서, 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 관측하는 단계;를 포함하는 시네신스의 검출 및 영상화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 푸코시다제 반응성 형광 프로브 화합물 및 이를 이용한 시네신스 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 시네신스 (Senescence, 노화)는 정상세포가 헤이 플릭 한계 (Hayflick limit)에 도달하거나 스트레스에 노출되었을 때 영구적으로 세포증식을 중단하는 현상으로 개체수준의 노화와 퇴행성 질환 발병의 주요 원인으로 추정되고 있다. 최근 20년간 시네신스 세포가 갖는 다양한 특징들을 찾기 위한 연구가 활발하게 진행되어 왔으며 그 결과 세포주기조절단백질 (p56, p21, p16), 항사멸단백질 (BCL-2, BCL-XL), 라이소좀 가수분해 효소 (β -galactosidase)와 같은 단백질들이 시네신스 세포 내에 다량 축적 되어있는 상태로 존재한다는 것이 밝혀졌다. 하지만 세포주기조절단백질, 항사멸단백질과 같은 지표는 살아있는 개체내에서 실시간 검출이 어렵기 때문에, 현재 개체수준에서 시네신스 세포의 검출은 β -galactosidase (β -gal)에 의해 형광 활성이 증가하는 형광전구체시스템에 의존하고 있다. 단일 바이오마커를 기반으로 한 검출시스템은 허위 양성(false-positive) 혹은 허위 음성(false-negative)결과를 보이는 한계가 있기 때문에 시네신스의 새로운 바이오마커를 발굴하여 β -gal 기반 형광 검출 시스템을 보완할 수 있는 새로운 시네신스 검출용 프로브의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

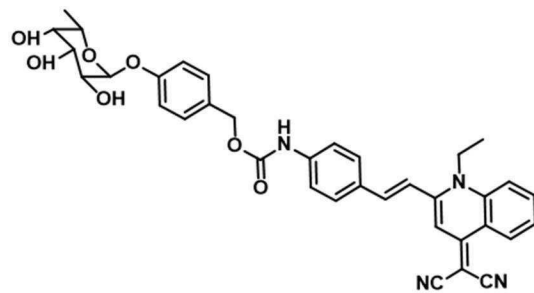
[0003] 본 발명에서는 시네신스의 새로운 바이오마커로서 알파-L-푸코시다제 (α -L-fucosidase, α -fuc)의 가능성을 확인하고, 상기 α -fuc에 고선택성을 갖는 α -fuc 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 이용한 시네신스 검출 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0005] 하기 [화합식 1]로 표시되는 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0006] [화합식 1]



[0007]

[0008] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 α -L-fucosidase (α -fuc)와 선택적으로 상호작용 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0009] 이때, 상기 화합물은 α -fuc에 의해 형광 활성이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0010] 본 발명은 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 α -fuc 검출용 형광 센서를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 시네신스 (Senescence) 검출용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 생체로부터 분리된 시료에 주입하는 단계; 및 상기 시료에서, 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 관측하는 단계;를 포함하는 시네신스의 검출 및 영상화 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 생체로부터 분리된 시료는 세포 또는 조직인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 생물(organism)에 주입하는 단계; 및 상기 생물의 생체 내에서, 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 관측하는 단계;를 포함하는 시네신스의 검출 및 영상화 방법을

제공한다.

발명의 효과

[0015]

본 발명에 따른 형광 프로브 화합물은 시네신스의 바이오마커인 α -fuc에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 우수한 광물리적 특성과 낮은 세포독성을 가지고 있어 α -fuc를 검출능이 우수하고, 결과적으로 시네신스 세포를 효과적으로 검출 및 이미징할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1의 (A), (B)는 α -fuc-반응성 AIEgen(aggregation induced emission luminogen)으로서 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물(QM-NH α fuc)의 화학 구조 및 생체 내 노화 세포(senescent cells)의 실시간 이미징 및 노화 세포 검출 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 2는 표준 세포 노화 모델에서 α -fuc 발현 조사 결과를 나타낸 것으로서, (A)는 복제 노화 섬유아세포(replicative senescent fibroblast cells) 및 스트레스 유도 조기 노화(stress-induced premature senescent) HCT116 세포를 생성하기 위한 개략도를 나타낸 것이고, (B)는 초기 및 후기(early and late) 섬유아세포 또는 대조군 및 노화 HCT 116 세포에서 p53, p21 및 p16의 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 것이며, (C)는 초기 및 후기 섬유아세포 또는 대조군 및 노화 HCT116 세포의 발색 X-fuc 분석 결과를 나타낸 것이고, (D)는 초기 및 후기 섬유아세포 또는 대조군 및 노화 HCT116 세포에서 FUCA1, GLB1 및 GUSB mRNA의 실시간 PCR 분석 결과를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였다. 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-d는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 3은 새로운 노화 바이오마커로서의 α -fuc의 충실도(fidelity) 평가 결과를 나타낸 것으로서, (A)는 GLB1/FUCA1 녹다운 세포에서 노화 유도(senescence induction) 평가를 위한 실험 설계를 나타내고, (B)는 GLB1-녹다운 세포에서 GLB1, FUCA1, p53, p21 및 p16의 mRNA 발현을 나타내며, (C)는 FUCA1-녹다운 세포에서 GLB1, FUCA1, p53, p21 및 p16의 mRNA 발현을 나타내고, (D)는 GLB1 녹다운 세포에서 발색 X-gal 및 X-fuc 분석 결과를 나타내며, (E)는 FUCA1 녹다운 세포에서 발색 X-gal 및 X-fuc 분석 결과를 나타내고, (F)는 α -fuc 및 β -gal 발현과 노화 시작의 상관관계를 보여주는 개략도를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였다($n = 3$ in B and C). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-c는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 4는 α -fuc-반응성 AIE 형광 프로브로서의 QM-NH α fuc의 평가 결과로서, (A), (B)는 각각 다른 수성 분획(f_w)과 THF의 혼합물에서, (A) QM-NH $_2$ (10 μ M) 및 (B) QM-NH α fuc(10 μ M)의 방출 스펙트럼(λ_{ex} : 543 nm)을 나타낸 것이다(Inset: f_w 에 대한 586 nm에서의 상대 형광 강도의 플롯). (C) 및 (D)는 순수한 물에서 (C) QM-NH $_2$ (5 μ M) 및 (D) QM-NH α fuc(5 μ M)에 대한 DLS 데이터를 나타낸다. (E)는 α -fuc(2 U mL^{-1})의 존재 하에 기록된 QM-NH α fuc(20 μ M)의 시간 의존적 방출 스펙트럼(λ_{ex} : 543 nm)을 나타낸 것이다(Inset: 시간의 함수로 586 nm에서 상대 강도의 플롯). (F)는 다양한 농도의 α -fuc 존재하에서, 시간에 따른 QM-NH α fuc의 형광 강도를 나타낸 것이다. (G)는 α -fuc 또는 기타 분석 물질과 6시간 인큐베이션 후, QM-NH α fuc(20 μ M)의 형광 반응을 나타낸 것이다. (H)는 α -fuc의 존재 하에 보이는 QM-NH α fuc의 가수분해의 HPLC 모니터링 결과를 나타낸 것이다. (I)는 α -fuc의 활성 부위 내에서 QM-NH α fuc에 대해 제안된 결합 모드를 나타낸 것이다.

도 5는 QM-NH α fuc를 사용한 노화 세포의 시험관내 실시간 이미징 결과를 나타낸 것이다. (A)는 복제 노화 세포에서 4-MU-fuc(30 μ M) 및 QM-NH α fuc(30 μ M)의 형광(senescent vs. control) 변화를 나타낸 것이다. (B)는 ROS-, UVA-, 약물 유도 노화 세포(ROS-, UVA-, drug-induced senescent cells)에서 4-MU-fuc(30 μ M) 및 QM-NH α fuc(30 μ M)의 형광(senescent vs. control) 변화를 나타낸 것이다. (C)는 DFJ(100 μ M)의 전처리 유무에 따른 QM-NH α fuc(30 μ M)를 사용한 복제 노화 세포의 CLSM 이미지를 나타낸 것이다. Scale bar = 50 μ m. (D)는 DFJ(100 μ M)의 전처리 유무에 따른 QM-NH α fuc(30 μ M)를 사용한 ROS-, UVA-, 약물 유도 노화 세포의 CLSM 이미지를 나타낸 것이다. Scale bar = 50 μ m. (E)는 QM-NH α fuc(30 μ M)를 사용하여 AZD 처리된 GLB1-녹다운 및 FUCA1-녹다운 세포의 CLSM 연구를 위한 실험 설계를 나타낸 것이다. (F)는 QM-NH α fuc(30 μ M)를 사용하여 AZD 처리된 GLB1-녹다운 및 FUCA1-녹다운 세포의 CLSM 이미지를 나타낸 것이다. Scale bar = 50 μ m. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였다($n = 3$ in A and B). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-c는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 6은 QM-NH α fuc를 사용한 노화 세포의 생체 내 실시간 이미징 결과를 나타낸 것이다. (A)는 대조군 및 노화 종양에서 Ki-67, p53 및 p21에 대한 면역형광 염색 결과를 나타낸 것이다. Scale bar = 100 μ m. (B)는 QM-NH α fuc 투여 후 다양한 시점에서 기록된 노화 종양을 지닌 마우스의 생체내 형광 이미지를 나타낸 것이고, (C)는 QM-NH α fuc 투여 유무에 따른 대조군 또는 노화 종양이 있는 마우스의 생체내 형광 이미지를 나타낸 것이며, (D)는 대조군 또는 노화 종양이 있는 마우스에서 해부된 장기의 생체외 이미지를 나타낸 것이다(Li = 간, Ki = 신장, Sp = 비장, Lu = 폐, Te = 고환, He = 심장, Tu = 종양).

도 7은 대조군 및 다양한 노화 유도 세포에서 p53, p21 및 p16 mRNA의 실시간 PCR 분석 결과를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였다(n = 3). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 oneway/two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-d는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다(p < 0.05).

도 8은 대조군 및 다양한 노화 유도 세포의 발색 X-gal 분석(Chromogenic X-gal assay) 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 대조군 및 약물 유도 노화 HCT116 세포에서 인간 FUCA2의 실시간 PCR 분석 결과를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였다(n = 3). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 oneway/two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. 동일한 문자(예: a)의 사용은 p < 0.05 컷오프에 대해 통계적 차이가 없는 데이터 세트를 나타낸다.

도 10은 노화 세포에서 β -gal, α -fuc siRNA 형질감염(transfection) 결과를 나타낸 것으로, (A)는 노화 세포에서 GLB1/FUCA1 녹다운 효율을 조사하기 위한 실험 설계를 나타내고, (B)는 스크램블 siRNA 또는 β -gal siRNA로 형질감염시킨 후 ROS-, UVA- 및 약물 유도 노화 세포에서 상대적인 GLB1 mRNA 발현 수준을 나타내며, (C) 스크램블된 siRNA 또는 α -fuc siRNA로 형질감염시킨 후 ROS-, UVA- 및 약물 유도 노화 세포에서 상대적 FUCA1 mRNA 발현 수준을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였다(n = 3). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 oneway/two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-d는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다(p < 0.05).

도 11은 QM-NH₂ 및 QM-NH α fuc의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것으로, (A)는 수성 매질(pH 7.4, 1% BSA가 포함된 10 mM PBS)의 다른 분획(f_n)과 THF의 혼합물에서 QM-NH₂(10 μ M)의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이고, (B)는 수성 매질(pH 7.4, 1% BSA가 포함된 10 mM PBS)의 다른 분획(f_w)과 THF의 혼합물에서 QM-NH α fuc(10 μ M)의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 12의 (A)는 순수 물에서 QM-NH₂ (5 μ M)의 SEM 이미지이고, (B)는 순수 물에서 QM-NH α fuc (5 μ M)의 SEM 이미지이다.

도 13은 QM-NH₂의 단결정 X선 회절 분석 결과로서, (A)는 단결정 X선 회절 분석에서 추론된 고체 상태에서 보이는 QM-NH₂의 꼬인 구조를 설명하기 위한 주요 2면각 값(dihedral angle value)을 나타낸 것이고, (B)는 QM-NH₂의 결정 구조를 나타낸 것이며, (C-D)는 QM-NH₂의 분자 적층 배열(molecular stacking arrangement)을 나타낸 것이다.

도 14는 수성 매질(pH 6.0, 1% BSA, 5% THF 포함 10 mM PBS)에서 α -fuc가 없는 QM-NH α fuc(20 μ M)의 시간 의존적 방출 스펙트럼(6시간 동안 기록됨)을 나타낸 것이다.

도 15는 QM-NH α fuc(20 μ M)의 형광 강도와 α -fuc 레벨 사이의 선형 관계를 나타낸 것이다(검출 한계는 1.0×10^{-2} U/mL(3σ /slope)로 계산되었음).

도 16은 선택성 분석 결과(Selectivity assay)로서 (A)는 다양한 농도의 수성 NaCl이 존재할 때 QM-NH α fuc(20 μ M)의 형광 반응을 나타낸 것이고(1: Blank, 2: α -fuc (2 U/mL), 3: 0 mM NaCl, 4: 200 mM NaCl, 5: 400 mM NaCl, 6: 600 mM NaCl, 7: 800 mM NaCl, 8: 1000 mM), (B)는 세포 배양 배지에서 QM-NH α fuc(20 μ M)의 형광 반응을 나타낸 것이다(1: Blank, 2: α -fuc (2 U/mL), 3: Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (with 10% FBS), 4: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (with 10% FBS), 5: Dulbecco's Modified Eagle's Medium /F-12 Nutrient Mixture Ham's (DMEM/F12) (with 10% FBS), 6: RPMI 1640 (with 10% FBS), 7: McCoy's 5A (with 10% FBS). α -fuc를 포함하는 샘플의 경우, 용액을 수성 매질(pH 6.0, 1% BSA, 5% THF가 포함된 10 mM PBS)에서 제조하였다. I/I₀: 586 nm에서 각 샘플의 형광 강도 비율, I₀: 블랭크 샘플의 형광 강도. 모든 형광 스펙트럼은 37°C에서 6시간 인큐베이션 후 기록되었다.

도 17은 세포 생존력 분석 결과로서, (A)는 QM-NH a fuc로 처리된 대조군 및 노화(AZD1152-HQPA 처리) HCT116 세포의 세포 생존력을 나타내고, (B)는 QM-NH a fuc로 처리된 early passage (p10) 및 late passage (p25) HDF 세포의 세포 생존력을 나타낸 것이다. 대조군 및 노화 세포를 24시간 동안 상이한 농도의 QMNH a fuc 또는 1% DMSO(대조군)로 처리하였다. CytoTox96®비방사성 세포독성 분석을 사용하여 세포 생존력을 측정하였다.

도 18은 ImageJ를 사용하여 CLSM 이미지의 정량화된 형광 강도를 나타낸 것이다. (A)는 early passage (대조군) 및 late passage (복제) 세포에서 DFJ 처리 유무에 따른 QM-NH a fuc의 형광 강도를 나타낸 것이고, (B)는 대조군 및 노화(ROS-, UVA- 및 약물 유도) 세포에서 DFJ 처리 유무에 따른 QM-NH a fuc의 형광 강도를 나타낸 것이다. 데이터는 평균±SEM으로 표시하였다. 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-c는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 19는 세포내 공동 국소화(co-localization assay) 분석 결과를 나타낸 것으로, (A)는 QM-NH a fuc(30 μ M) 및 LysoTracker®Red DND-99(500 nM)의 형광 신호의 세포내 공동 국소화 결과를 나타낸다. Scale bar=50 μ m. (B)는 산점도(Scatter plot)를 나타내고, (C)는 QM-NH a fuc 및 LysoTracker®Red DND-99의 형광 신호의 공동 국소화 히스토그램을 나타낸 것이다.

도 20은 대조군 및 노화 유도 종양(AZD1152-HQPA 처리)을 보유한 마우스의 생체 내(In vivo) 형광 이미지를 나타낸 것이다. QM-NH a fuc($n = 3/\text{group}$)을 투여하거나 투여하지 않고 이미지를 촬영하였다.

도 21은 대조군 종양 및 노화 유도 종양을 보유하고 있는 마우스에서 절개된 장기의 생체외(Ex vivo) 이미지를 나타낸 것이다(Li = 간, Ki = 신장, Sp = 비장, Lu = 폐, Te = 고환, He = 심장, Tu = 종양).

도 22는 10% DMSO(대조군) 및 QM-NH a fuc로 처리한 마우스의 간 및 신장 독성 분석 결과를 나타낸 것이다. 데이터는 평균±SEM으로 표시하였다($n = 3$). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 one-way ANOVA test에 의해 결정하였다. 동일한 문자(예: a)의 사용은 통계적 차이가 없는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] [실시예]

[0018] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0020] 실험 방법

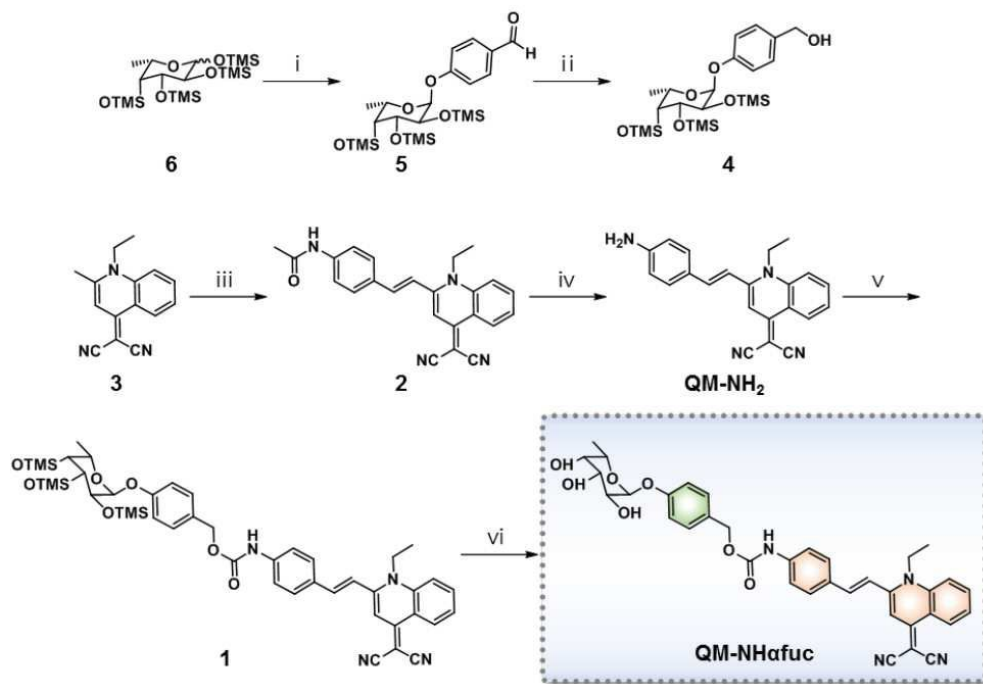
[0021] 재료 및 방법

[0022] UV-Vis 및 형광 스펙트럼은 각각 Jasco V-750 분광 광도계 및 Jasco FP-8500 분광 형광계를 사용하여 각각 기록하였다. ESI-MS는 Shimadzu LC/MS-2020 질량 분석기 시스템 상에서 수행하였고, ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker 500MHz NMR 분광계를 이용하여 취득하였다. 역상 HPLC 분석은 Young Lin HPLC 시스템(YL9100)이 있는 Dr. Maish GmbH ReproSil 100 C 18, 5 μ m(250 $\times$ 4.6 mm) 컬럼에서 수행하였다. 모든 시약 및 용매는 Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Tokyo Chemical Industry에서 구입하여 추가적인 정제 없이 사용하였다. 실리카겔 60(70-230 mesh)을 고정상으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 60 실리카겔(0.25 mm 두께의 사전 코팅된 시트)을 사용하여 분석 박막 크로마토그래피를 수행하였다.

[0024] QM-NH₂ 및 QM-NH a fuc의 합성

[0025] 하기 합성 경로(Scheme 1)에 따라 QM-NH₂ 및 QM-NH a fuc를 합성하였다.

[Scheme 1]



(시약 및 조건: (i) TMSCl, dichloromethane (DCM), 0°C, 0.5h; 4-hydroxybenzaldehyde, TBAI, DIPEA, room temperature (rt), 12h, 25%; (ii) NaBH₄, DCM/MeOH, rt, 2h, 73%; (iii) 4-actamidobenzaldehyde, piperidine, ACN, reflux, 12h, 79%; (iv) HCl/dioxane, reflux, 2h, 32%; (v) phosgene, DIPEA, DCM, 0°C, 0.5h; 4, DIPEA, DCM, rt, 6h, 42%; (vi) Amberlite IR120, DCM/MeOH, rt, 4h, 81%)

화합물 3, 6의 합성

종래 문헌에 기재된 절차에 따라 화합물 3(C. X. Shi, Z. Q. Guo, Y. L. Yan, S. Q. Zhu, Y. S. Xie, Y. S. Zhao, W. H. Zhu and H. Tian, *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2013, 5, 192-198) 및 화합물 6(T. Uchiyama and O. Hindsgaul, *Synlett*, 1996, 6, 499-501)을 합성하였다.

화합물 5의 합성

0°C에서 무수 디클로로메탄(dichloromethane, DCM, 5 mL) 중 화합물 6(1.0 g, 2.2 mmol)의 용액에 TMSI(0.32 mL, 2.2 mmol)를 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 아르곤 하에 30분 동안 교반하였다(용액 A). DIPEA(1.93 mL, 22 mmol)를 첨가하기 전에, 별도의 둥근 바닥 플라스크에서 4-hydroxybenzaldehyde(0.14 g, 1.1 mmol), TBAI(0.82g, 2.2 mmol) 및 molecular sieves(4Å, 0.2 g)를 무수 DCM(8 mL)에서 혼합하였다(용액 B). 용액 B를 실온에서 10분 동안 교반하였다. 그 다음, 용액 A를 아르곤 하에서 용액 B에 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반한 후, 휘발성 물질을 감압하에 제거하였다. 용리제로 hexanes/EtOAc (v/v, 95:5)을 사용하여 조 생성물(crude product)을 실리카겔 상에서 정제하여 화합물 5(0.27 g, 25%)를 수득하였다.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 9.90 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.69 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.69 Hz, 2H), 5.48 (d, *J* = 3.50 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 9.62, 3.50 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 9.62, 2.63 Hz, 1H), 3.92 (q, *J* = 5.43 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 2.63 Hz, 1H), 1.12 (d, *J* = 5.43 Hz, 3H), 0.19 (s, 9H), 0.17 (s, 9H), 0.07 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 190.8, 162.6, 131.7, 130.7, 116.8, 98.3, 75.4, 70.9, 68.6, 68.2, 16.6, 0.61, 0.47, 0.19. ESI-MS calc. for C₂₂H₄₀O₆Si₃Na⁺ [M + Na]⁺ 507.20; found 507.20.

[0037] 화합물 4의 합성

[0038] 실온에서 DCM/MeOH(v/v, 5:2 mL) 중 화합물 5(0.27 g, 0.56 mmol)의 용액에 NaBH₄(0.42 mg, 1.1 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후, 용매를 감압하에 제거하였다. 용리제로 hexanes/EtOAc (v/v, 3:1)를 사용하여 조 생성물을 실리카겔 상에서 정제하여 화합물 4(0.20 g, 73%)를 수득하였다.

[0039] ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.34 (d, *J* = 8.74 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.54 Hz, 2H), 5.48 (d, *J* = 2.51 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 4.12 Hz, 2H), 4.15-4.10 (m, 3H), 3.79 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 1.22 (d, *J* = 5.43 Hz, 3H), 0.30 (s, 9H), 0.27 (s, 9H), 0.19 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 157.1, 134.4, 128.2, 116.9, 98.6, 75.5, 70.9, 68.7, 67.5, 64.5, 16.5, 0.55, 0.43, 0.14. ESI-MS calc. for C₂₂H₄₂O₆Si₃Na⁺ [M + Na]⁺ 509.22, found 509.20.

[0041] 화합물 2의 합성

[0042] 화합물 3(1.0 g, 4.0 mmol) 및 ACN(15 mL) 중 4-acetamidobenzaldehyde(1.4 g, 8.6 mmol)의 용액에 피페리딘(0.84 mL, 8.5 mmol)을 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 환류 하에 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후, 침전물을 여과하고 ACN으로 세척하였다. 수득한 조 생성물을 재결정화를 통해 정제하여 화합물 2(1.2 g, 79%)를 수득하였다.

[0043] ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.1 (s, 1H), 8.93 (d, *J* = 8.51 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.89 Hz, 1H), 7.93 (m, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.65 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.65 Hz, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.43 (d, *J* = 15.49 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 15.49 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.57 (q, *J* = 7.15 Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.41 (t, *J* = 7.15 Hz, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 169.1, 152.7, 149.8, 141.3, 139.8, 138.3, 134.2, 130.3, 129.3, 125.6, 125.4, 121.1, 121.0, 119.8, 119.3, 119.2, 118.6, 107.2, 55.3, 47.1, 44.3, 24.5, 14.1. ESI-MS calc. for C₂₄H₁₉N₄O⁻ [M - H]⁻ 379.16, found 379.05.

[0045] QM-NH₂의 합성

[0046] dioxane/conc. HCl (v/v, 30:24 mL) 중 화합물 2(0.3 g, 0.79 mmol)의 용액을 환류 하에 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 포화 수성 Na₂CO₃를 사용하여 중화시켰다. 용액 pH가 7에 도달하면, 수득된 침전물을 여과에 의해 수집하고 물 및 DCM/MeOH로 여러 번 세척하였다. 수득한 조 생성물을 재결정화를 통해 정제하여 화합물 QM-NH₂(0.085 g, 32%)를 수득하였다.

[0047] ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.91 (d, *J* = 8.47 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.87 Hz, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.50 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 15.49 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 15.49 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.51 (d, *J* = 8.50 Hz, 2H), 5.81 (s, 2H), 4.55 (q, *J* = 7.11 Hz, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.11 Hz, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 152.1, 151.7, 150.4, 141.5, 138.3, 133.8, 130.5, 125.5, 125.1, 123.0, 121.0, 118.4, 114.0, 113.7, 106.3, 45.9, 44.0, 31.1, 14.1 ESI-MS calc. for C₂₂H₁₇N₄⁻ [M - H]⁻ 337.15, found 337.05.

[0049] 화합물 1의 합성

[0050] QM-NH₂(0.085 g, 0.25 mmol), DCM(10 mL) 중 DIPEA(1.0 mL, 23 mmol)의 용액에 포스젠(phosgene) 용액(15 wt.% in toluene, 2.30 mL)을 첨가하고 0°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 과량의 포스젠을 아르곤으로 2시간 동안 퍼징하여 제거하고 감압하에 완전히 제거하였다. 이어서, 반응 혼합물을 DCM(5 mL)에 용해시키고, 여기에 DCM(2

mL) 중 화합물 4(0.093 g, 0.19 mmol) 및 DIPEA(0.066 mL, 0.38 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 후, 휘발성 물질을 감압 하에 제거하였다. 용리제로 DCM/MeOH(v/v, 96:4)를 사용하여 조 생성물을 실리카겔 상에서 정제하여 화합물 1(0.089 g, 42%)을 수득하였다.

[0051] ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 9.08 (d, J = 8.45 Hz, 1H), 7.75 (m, 1H), 7.52 (d, J = 8.66 Hz, 1H), 7.52-7.40 (m, 5H), 7.34 (d, J = 8.63 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 15.70 Hz, 1H), 7.12-7.08 (m, 3H), 6.97 (d, J = 15.70 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 5.39 (d, J = 3.05 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.39 (q, J = 7.01 Hz, 2H), 4.07-3.97 (m, 3H), 3.68 (d, J = 1.40 Hz, 1H), 1.56 (t, J = 7.23 Hz, 3H), 1.12 (d, J = 6.50 Hz, 3H), 0.19 (s, 9H), 0.17 (s, 9H), 0.08 (s, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 157.9, 153.3, 153.0, 147.9, 139.6, 138.0, 133.2, 130.0, 129.8, 128.9, 128.6, 128.5, 126.8, 124.5, 121.4, 120.2, 119.2, 118.5, 117.7, 117.0, 116.0, 107.5, 98.5, 75.5, 70.9, 68.7, 67.7, 67.0, 50.9, 43.9, 16.6, 13.9, 0.64, 0.51, 0.24. ESI-MS calc. for $\text{C}_{45}\text{H}_{57}\text{N}_4\text{O}_7\text{Si}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 849.35, found 849.25.

[0053] QM-NH α fuc의 합성

[0054] 화합물 1(0.089 g, 0.10 mmol), DCM/MeOH(v/v, 5:1 mL) 중 Amberlite IR 120(0.1 g)의 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 침전물을 여과하고 DCM으로 여러 번 세척하여 QM-NH α fuc(0.051 g, 81%)를 수득하였다.

[0055] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ 10.01 (brs, 1H), 8.93 (d, J = 8.42 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.86 Hz, 1H), 7.93 (m, 1H), 7.77 (d, J = 8.71 Hz, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.56 (d, J = 8.42 Hz, 2H), 7.44-7.36 (m, 4H), 7.07 (d, J = 8.57 Hz, 2H), 7.02 (s, 1H), 5.41 (d, J = 3.10 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.91 (d, J = 5.32 Hz, 1H), 4.77 (brs, 1H), 4.62 (d, J = 3.99 Hz, 1H), 4.57 (q, J = 7.02 Hz, 2H), 3.87 (q, J = 6.51 Hz, 1H), 3.76 (m, 2H), 3.56 (brs, 1H), 1.40 (t, J = 7.02 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.51 Hz, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ 157.6, 153.7, 152.7, 149.9, 141.2, 139.9, 138.3, 134.1, 130.4, 129.8, 129.7, 129.5, 125.6, 125.4, 121.1, 119.7, 119.0, 118.6, 118.4, 117.0, 107.1, 98.4, 71.8, 70.2, 69.9, 68.0, 67.6, 66.2, 47.1, 44.3, 16.9, 14.1. ESI-MS calc. for $\text{C}_{36}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 633.23, found 633.10.

[0057] THF/물 혼합 용매 시스템에서 QM-NH α fuc 및 QM-NH $_2$ 의 흡광도 및 방출 스펙트럼 변화

[0058] QM-NH α fuc(10 μM) 또는 QM-NH $_2$ (10 μM)의 10mM DMSO 스톱을 테트라히드로푸란(THF)과 다른 수성 분획(f_w)의 혼합물에 용해시켜 각 샘플을 준비하였다. 수성 매질로 pH 7.4 10 mM PBS(phosphate buffered saline)와 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다(각 샘플의 BSA 농도는 1%로 동일하게 조정). Jasco V-750 분광 광도계 및 Jasco FP-8500 분광 형광계를 사용하여 각 샘플의 흡광도 및 방출 스펙트럼을 기록하였다.

[0060] QM-NH α fuc의 형광 변화

[0061] 각 샘플은 1% BSA, 5% THF가 포함된 100 μL 의 수성 배지(pH 6.0, 10 mM PBS)에 QM-NH α fuc(20 μM) 및 α -L-fucosidase (α -fuc; F884; Sigma Aldrich)(0.05, 0.1, 0.15 및 0.175 U)를 혼합하여 준비하였다; 각 샘플에서 BSA 및 THF의 농도를 동일하게 조정하고 96웰 플레이트에 로딩하였다. 37°C에서 지정된 시간(0, 1, 2, 3 및 4시간) 동안 샘플을 인큐베이션한 후, Multi-Detection Microplate Reader system (HIDEX) 및 575 nm 밴드패스 필터(ex: 535)를 사용하여 형광 강도를 기록하였다.

[0063] 선택성 분석((Selectivity assay)

[0064] 6시간 동안 37°C에서 각 샘플을 인큐베이션한 후 α -fuc 또는 다른 분석물의 존재 하에 QM-NH α fuc(20 μM)의 형광 스펙트럼을 수집하였다(ex: 543 nm). 각 샘플의 586 nm에서의 상대 형광 강도는 각 값을 대조군 샘플(20 μM QM-NH α fuc without any analyte)의 값으로 나누어 계산하였다. 사용된 분석 물질의 특성과 농도는 다음과

같다: α -fuc (2 U/mL), β -galactosidase (β -gal; 10 U/mL), esterase (10 U/mL), nitroreductase (NTR; 10 U/mL), cysteine (Cys; 2 mM), homocysteine (Hcy; 2 mM), glutathione (GSH; 2 mM), dithiothreitol (DTT; 2 mM), H₂S (2 mM), glucose (2 mM).

[0066] **DLS 및 SEM 측정**

[0067] 샘플은 탈이온수에 QM-NH α fuc(5 μ M)를 용해하여 준비하였다. 입자 크기는 Malvern Zetasizer Nano S90을 사용하여 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS)에 의해 결정하였다. 주사 전자 현미경(Scanning electron microscope, SEM) 이미지는 JEOL JSM-6360 주사 전자 현미경을 사용하여 기록하였다.

[0069] **QM-NH₂의 단결정 분석**

[0070] DCM/MeOH (v/v = 1:1) 용액의 느린 증발을 통해 QM-NH₂의 회절 등급(diffraction grade) 단결정을 얻었다. Bruker D8 Venture X-Ray Diffractometer로 회절 데이터를 수집하였다. QM-NH₂에 대한 X-ray 결정학적 좌표(X-ray crystallographic coordinates)는 기탁 번호 1996923으로 Cambridge Crystallographic Data Center(CCD C)에 기탁되었다.

[0072] **QM-NH α fuc와 α -fuc의 반응에 대한 역상 HPLC 분석**

[0073] QM-NH α fuc 및 QM-NH₂의 수용액은 5% THF를 포함하는 10 mM PBS(pH 6.0, 1% BSA 포함)에서 각 화합물(20 μ M)을 혼합하여 제조하였다. QM-NH α fuc 및 α -fuc로 구성된 반응 혼합물은 5% THF를 포함하는 10 mM PBS(pH 6.0, 1% BSA 포함)에서 QM-NH α fuc(20 μ M) 및 α -fuc(2 U/mL)를 혼합하여 제조하였다. 분석 전에 QM-NH α fuc 및 α -fuc로 구성된 반응 혼합물을 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 각 시료는 Binary gradient (60% of Solvent A for 10 min, then 60%-45% of Solvent A for 3 min, then 45% of Solvent A for 5 min, then 45%-0% of Solvent A for 2 min, then 0% of Solvent A for 5 min, then 0%-60% of Solvent A for 3 min)로 구성된 이동상 (Solvent A: Deionized water containing 0.1% TFA, Solvent B: Acetonitrile)을 이용하여 1mL/min의 유속으로 용출시켰다.

[0075] **도킹 및 분자 역학(molecular dynamic, MD) 시뮬레이션**

[0076] α -fuc에 대한 구조적 데이터는 Protein Data Bank(PDB ID: 2ZXD)에서 얻었다. Grid box는 0.6 Å 간격으로 약물작용발생단(pharmacophores)을 덮도록 구성되었다. Autodock 4.2 및 AutodockTools 1.5.6 프로그램과 Lamarckian 유전 알고리즘을 사용하여, 도킹 매개변수를 각 주기에 대해 2,500,000 에너지 평가(energy evaluations)와 함께 100회 실행으로 설정하였다. 이러한 방식으로 얻은 가장 낮은 결합 에너지를 갖는 5개의 구조를 추가 분자 역학 시뮬레이션에 사용하였다.

[0077] QM-NH α fuc(리간드)에 대한 Gaff force field는 Gaussian 09.2에 의해 설정된 6-31G** basis set으로 M06 교환 함수를 사용하여 수행된 밀도 함수 이론(density functional theory, DFT) 계산을 사용하여 생성되었다. ff14SB force field 및 Tip3p water 모델은 Amber14 패키지를 사용하여 수행되는 5개의 독립적인 MD 시뮬레이션과 함께 사용되었다. SHAKE 알고리즘은 수소 원자를 포함하는 특정 결합을 제한하기 위해 적용되었다. 비결합 컷오프 값은 12 Å로 설정되었다. 시스템과 box edge 사이의 거리는 10 Å 이상이었다. 전체 시스템은 가장 빠른 적절한 최소화 방법(steepest decent minimization method)을 통해 5,000 스텝(step)을 사용하여 최소화한 다음, 켈레 기울기 방법(conjugate gradient method)을 사용하여 5,000 스텝을 사용하여 최소화하였다. 그런 다음 시스템을 200 ps 이내에 0K에서 298.15K로 가열했으며 표준 앙상블(canonical ensemble)(NVT)에 대한 커플링 상수는 2.0fs였다. 일정한 압력 시뮬레이션을 위해 Berendsenbarostat를 사용하는 등온-등압 앙상블(isothermal-isobaric ensemble)(NPT)을 200ps 동안 사용하였다. 마지막으로 2.0fs 타임 스텝을 사용하여 각 MD 시뮬레이션에 대해 2500ps 이상의 생산 실행(production run)을 수행하였다. 평형 과정(equilibration process)을 평가한 후, 최종 2000ps만 결합 자유 에너지를 계산하는 데 사용되었다. 결합 에너지는 분자 역학 일반화-본 표면적(molecular mechanics generalized-Born surface area) (MM/GBSA) 방법을 사용하여 획득하였

다.

[0079] 세포 배양 연구

[0080] 인간 대장암 HCT116 세포주는 한국 세포주 은행(Seoul, Republic of Korea)에서 구입하였다. 세포를 10% 소태아혈청(FBS)(GIBCO, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Hyclone)이 보충된 Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI1640) 배지(Hyclone, USA)에서 배양하였다. 정상 인간 진피 섬유아세포(Normal human dermal fibroblasts)(HDFs)(Korea University Guro Hospital)를 15% FBS 및 1% 페니실린스트렙토마이신이 첨가된 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 배양된 세포는 5% CO₂를 포함하는 가습 분위기에서 37℃로 유지시켰다.

[0082] 세포 노화(cellular senescence) 유도

[0083] Early passage (p10-11)와 late passage (p20-25)의 인간 진피 섬유아세포(HDF)를 각각 대조군 및 복제 노화 세포로 제조하였다. HCT116 세포는 약물 유도 노화 모델(drug-induced senescence model)로서, Aurora kinase B inhibitor(3일 동안 500ng/mL AZD1152-HQPA)로 처리하였다. ROS-, UVA-유도 노화 모델 생성에 사용된 세포는 각각 *tert*-butyl hydroperoxide(30 μ M for 24h), UV-A(250 mJ/cm²; after 30 min exposure for 24h)로 처리하여 준비하였다.

[0085] Small interfering RNA

[0086] β -gal 및 α -fuc에 특이적인 Small interfering RNA(siRNA) 표적 서열은 각각 5'-CUACACAAUACAGCGAUUU-3' 및 5'-GCAGAGGCGGACA-3'이었다. 사용된 대조군 siRNA 서열은 5'-CCUACGCCACCCAAUUUCGU-3'이었다. 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 Bioneer(Daejeon, South Korea)에서 구입하고 어닐링 버퍼의 존재하에 어닐링하였다.

[0088] 가수분해효소 활성의 세포화학적 염색 연구((X-gal 및 X-fuc 분석)

[0089] PBS/0.1% 글루타르알데히드에 고정하고 PBS로 세척한 후, 3 μ M 페로시안화칼륨 및 3 μ M 페리시안화칼륨을 함유하는 지정된 완충액에서 특정 고유 기질을 사용하여, 가수분해효소 활성을 위해 37℃에서 24시간 동안 세포를 염색하였다. α -fuc는 4mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -L-fucopyranoside(X-fuc, BIOSYNTH)를 사용하는 McIlvaine phosphate-citrate buffer(pH 5.0)에서 검출되었다. β -galactosidase 활성을 결정하기 위해, 제조사의 지침에 따라 노화 β -galactosidase 염색 키트(Cell Signaling Technology)를 사용하였다. 고해상도 현미경 Axioscope(Carl Zeiss)를 사용하여 이미지를 얻었다.

[0091] α -fuc 활성의 형광 정량화(Fluorimetric quantification)

[0092] HCT116 세포를 96웰 마이크로플레이트에 3 $\times$ 10³로 시딩하고 적어도 24시간 동안 부착되도록 두었다. 그런 다음, 전술한 방법에 따라 ROS-, UVA-, 약물 유도 노화 세포를 생성하였다. 대조군 및 복제 노화 세포를 준비하기 위해 early passage (p10-11) 및 late passage (p20-25)의 HDF 세포를 96웰 마이크로플레이트에 3 $\times$ 10³로 시딩하였다. 세포를 적어도 24시간 동안 부착되도록 하였다. 그런 다음 RPMI1640 배지에서 30 μ M의 QM-NH α fuc 및 4-MU-fuc를 각 웰에 첨가하였다. 12시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 PBS로 세척하고, Multi-Detection Microplate Reader 시스템(HIDEX)을 사용하여 형광 강도를 측정하였다. QM-NH α fuc 형광은 535 nm에서 여기 및 575 nm 밴드 패스 필터를 이용하여 수득하였다. 4-MUFuc에 기인하는 형광은 360 nm에서 여기 및 450 nm 밴드 패스 필터를 이용하여 수득하였다.

[0094] 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR)

[0095] 세포주의 Total RNAs는 제조업체의 지침에 따라 PureLinkTM total RNA isolation kit(Invitrogen)로

분리되었다. iScript™cDNA 합성 키트(BioRad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA로의 역전사를 수행하였다. Real-Time PCR 연구에 사용된 모든 cDNA는 β-액틴으로 정규화되었다. 정량적 실시간 PCR은 iQTMSYBR Green Supermix(BioRad)를 사용하여 수행하였다. 유전자 발현은 delta-delta-CT 방법으로 정량하였고, 실시간 PCR은 CFX-96 열순환기(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 수행하였다. 각 유전자에 대한 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

GENES	5' sequences	3' sequences
FUCA1	GAAGCCAAGTTCGGGGTGTT	GGGTAGTTGTCGCGCATGA
FUCA2	TTGAGGTAGCCATTAGGAACAGA	GCCGCTTATGGAATGAACTGG
GLB1	TATACTGGCTGGCTAGATCACTG	GGCAAAATTGGTCCCACCTATAA
GUSB	GTC TGC GGC ATT TTG TCG G	CAC ACG ATG GCA TAG GAA TGG
P53	CAGCACATGACGGAGGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
21	TGTCCGTCAGAACCCATGC	AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC
P16	ATGGAGCCTTCGGCTGACT	GTAAC TATTCGGTGCGTTGGG
β-actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

웨스턴 블롯팅(Western blotting)

p53, p21 및 p16의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 측정하였다. 간략히, HCT116 세포를 60mm 접시에 3×10^5 세포 밀도로 시딩하고, 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 전술한 방법에 따라 ROS-, UVA-, 약물 유도 노화 세포를 생성하였다. 대조군 및 복제 노화 세포를 준비하기 위해 early passage (p10-11) 및 late passage (p20-25)의 HDF 세포를 60 mm 접시에 2×10^6 의 밀도로 시딩하였다. 세포를 적어도 24시간 동안 부착되도록 하였다. 인큐베이션 후 부착된 세포를 차가운 PBS로 3회 세척하고 긁어내어 세포 펠렛을 생성하였다. PBS를 제거한 후, 제조사(Biosesang)에서 제공한 프로테아제 억제제(protease inhibitor)를 포함하는 RIPA(radioimmunoprecipitation assay) 용해 완충액(lysis buffer)를 세포 펠렛에 첨가하여 단백질 용해물(protein lysate)을 수득하였다. 각 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하기 위해 Bradford 분석을 수행하였다. 그런 다음 단백질을 개별 밴드로 분리하기 위해 각 세포 용해물의 단백질($30 \mu\text{g}/\text{lane}$)을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis)에 로딩하였다. 분리된 단백질을 PVDF(Polyvinylidene difluoride) 멤브레인(Merck Millipore)으로 옮기고, p53 antibodies (Santa Cruz Biotechnology; SC-126, 1:1000), p21 antibodies (Santa Cruz Biotechnology; SC-397, 1:1000), p16 antibodies (Cell Signaling technology; #92803, 1:1000) and β-actin (Santa Cruz Biotechnology; SC-47778, 1:1000)과 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 생성된 멤브레인들을 Tween-20(TBS-T)을 포함하는 Tris 완충 식염수로 세척한 다음, 항-래빗 겨자무과산화효소 (HRP)-접합된 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology) 및 항-마우스 겨자무과산화효소(HRP)-접합된 이차 항체 (GeneTex)와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 면역 반응성 단백질 밴드를 감지하기 위해, 강화된 화학 발광 시약(Luminate, Merk Millipore)을 제조사의 지시에 따라 사용하였다.

인비트로(In vitro) 세포 독성 분석

HCT116 및 HDF 세포를 96웰 플레이트에 웰당 1×10^4 개 세포로 시딩하고 적어도 24시간 동안 부착되도록 하였다. 인큐베이션 후, 세포를 24시간 동안 QM-NH a fuc 또는 1% DMSO(대조군)로 처리하였다. 세포 독성 측정을 위해, CytoTox96@Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit(Promega)를 사용하여 세포 독성을 측정하였다. SpectraMax Gemini EM microplate reader(Molecular Devices)를 사용하여 490 nm에서 웰의 흡광도를 검출하였다. 세포 생존력 분석을 3회 수행하고, 세포독성을 대조군과 비교하여 처리된 세포에 대해 계산된 백분율로 기록하였다.

[0105] 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal laser scanning microscope, CLSM) 이미징

[0106] 노화 유도 HCT116 세포(2×10^5 cells), 대조군 세포(early passage 10) 및 복제 노화(late passage 25) HDF 세포(2×10^5 cells)를 유리 바닥 접시에 시딩하고, 적어도 24시간 동안 부착되도록 한 다음, 12시간 동안 QM-NH α fuc(30 μ M) 처리하였다. α -fuc 억제 분석을 위해 QM-NH α fuc 처리 전에 100 μ M의 데옥시푸코노지리마이신(deoxyfuconojirimycin, DFJ)으로 12시간 동안 전처리를 수행하였다. Co-localization 분석을 위해 QM-NH α fuc 처리된 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 리소좀을 500nM LysoTracker®Red DND-99(Invitrogen)로 30분 동안 염색하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 공초점 레이저 주사 현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 형광 이미지를 기록하였다(excitation: 488 nm, emission wavelengths: 520-600 nm for QMNH α fuc and excitation: 633 nm, emission wavelengths: 650-700 nm for the LysoTracker®).

[0108] 노화 마우스 모델(senescence mouse model)의 준비

[0109] 5주령의 면역결핍 누드 마우스(nu/nu)(Orient Bio, Inc.)를 멸균된 물과 식품 (Cat no:1314Fort; Altromin Spezialfutter GmbH & Co)에 자유롭게 접근할 수 있는 반복 제어 조명 조건(12 h dark; 12 h light)하의 가압 통풍 케이지에서 유지시켰다. 모든 동물 연구는 고려 대학교 동물 동물 관리위원회의 승인(#KUIACUC-2018-57)과 한국 동물 보호법에 따라 수행되었다. 50 μ L Matrigel®Basement Membrane Matrix(CORNING)와 함께 50 μ L PBS 중 HCT116 세포(1×10^6)를 각 누드 마우스의 양쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양이 감지 가능한 크기로 성장했을 때(약 10일), 마우스를 AZD1152-HQPA30 mg kg⁻¹, day/ single *i.p.* injection; senescence model) 또는 1% DMSO(대조군 모델)로 3일 동안 처리하였다.

[0111] 인비보(In vivo) 및 엑스비보(ex vivo) 진단 이미징

[0112] 대조군 및 노화 이중이식 마우스가 준비되었을 때, 마우스를 4개의 하위 그룹으로 나누었다: 1) 10% DMSO 처리한 대조군 마우스(n = 3), 2) QM-NH α fuc 처리한 대조군 마우스(n = 3), 3) 10% DMSO 처리한 노화 마우스(n = 3), 4) QM-NH α fuc 처리한 노화 마우스 (n = 3). QM-NH α fuc 샘플은 10% DMSO의 최종 농도를 함유하도록, QM-NH α fuc의 DMSO 스톱 용액을 10 mM PBS로 희석하여 제조하였다. QM-NH α fuc로 처리된 그룹의 경우, 8mg kg⁻¹의 QM-NH α fuc(100 μ L)를 단일 정맥 주사(*i.v* injection)로 투여하였다. 1일 후, Maestro2 기기(excitation: 488 nm, emission wavelengths: 560-750 nm)를 사용하여 생체 내(*in vivo*) 형광 이미지를 촬영하였다. 시간 의존적 형광을 모니터링하기 위해 Maestro2 기기(excitation: 488 nm, emission wavelengths: 560-750 nm)를 사용하여 그룹 4를 구성하는 마우스에서 QMNH α fuc 주입 후 0시간, 2시간, 6시간, 24시간 및 48시간에 이미지를 촬영하였다. 생체 외(*ex vivo*) 형광 이미지를 얻기 위해 동물을 CO₂ 질식을 통해 안락사시켰다. 이중이식 종양을 절제하고 사진을 찍었다. 대조군 및 노화 유도 마우스의 종양 및 기관의 생체외 형광 이미지를 Maestro2 기기(excitation: 488 nm, emission wavelengths: 560-750 nm)를 사용하여 정량화하였다. 그런 다음, 위의 기기(Maestro 소프트웨어 버전 2.4; CRi)와 함께 제공된 소프트웨어를 이용하여 다중 여기 스펙트럼 분석 기능을 사용하여 형광 이미지 및 자동 형광을 디컨벌루션하였다.

[0114] 혈액 독성 분석

[0115] 각 마우스의 혈액 샘플을 4℃에서 10분 동안 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 그런 다음 혈청 내 알라닌 아미노 전이효소(alanine amino-transferase, ALT), 아스파르테이트 아미노 전이효소(aspartate amino-transferase, AST) 및 크레아티닌(Creatinine)의 활성을 AST 및 ALT 활성 분석 키트(MAK055, MAK052; Sigma Aldrich) 및 크레아티닌 활성 분석 키트(MAK080; Sigma Aldrich)를 사용하여 분석하였다.

[0117] 면역조직화학(Immunohistochemistry)

[0118] 조직을 추출하고 동결 절편 화합물(Leica Microsystems AG)에 포매(embedding)하였다. Leica cryotome CM3050S를 사용하여 종양 절편(5 μ m 두께)을 생성하고, 슬라이드에 고정 후 -70℃에서 보관하였다. 면역조직화학을 위

해, anti-Ki-67(Abcam; ab15580;1:800), p53(Santa Cruz Biotechnology; sc-126; 1:100) 및 p21(Santa Cruz Biotechnology; sc-397; 1:100) 항체를 사용하였으며, Atlas Antibodies company(Atlas Antibodies AB)의 IHC 표준 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0120] 결과 및 고찰

[0121] 표준 세포 노화 모델(canonical cellular senescence model)에서 α -Fuc 발현

[0122] α -fuc이 노화 프로브 개발을 위한 좋은 표적인지 여부를 결정하기 위해, 복제 및 스트레스 유도 조기 노화 세포를 포함한 다양한 노화 모델에서 α -fuc의 발현을 테스트하였다. Early passage(p10-11) 및 late passage(p20-25)의 인간 진피 섬유아세포(HDF)를 각각 대조군 및 복제 노화 세포로 제조하였다(도 2A). 인간 대장암 HCT116 세포는 tert-butyl hydroperoxide (t-BHP; 30 μ M for 24 h), UVA (250 mJ cm⁻², 30 min), 또는 AZD (500 ng mL⁻¹ for 3 days)를 각각 처리하여 활성 산소종(ROS-), 자외선 A(UVA-) 및 약물 유도 노화 모델을 생성하는 데 사용되었다(도 2A). 대조군과 비교하여 각각의 노화 모델에서 p53, p21 및 p16에 해당하는 단백질 발현 및 mRNA의 상향 조절이 관찰되었다(도 2B 및 도 7). β -gal 과발현 및 확대된 세포 형태를 나타내는 X-gal을 갖는 청색 염색 패턴도 안정적인 노화 유도에 대해 예상대로 관찰되었다(도 8). 발색 X-fuc 분석 조건에서, 모든 유형의 노화 세포에서 α -fuc 과발현과 일치하는 강렬한 파란색 염색 패턴이 독점적으로 관찰되었다(도 2C). 또한, 실시간 중합효소 연쇄 반응 분석을 통해, 노화 세포에서 FUCA1 mRNA 레벨이 증가하는 것을 확인하였다(>6-fold; 도 2D). FUCA2의 경우에는 뚜렷한 차이가 보이지 않았다(도 9). 이를 바탕으로 FUCA2에 의해 암호화된 α -fuc의 교차 활성 가능성으로 인해, 아티팩트(artifacts)를 배제하였다. 특히, FUCA1에 비해 GLB1 및 GUSB(각각 β -gal 및 β -glucuronidase를 인코딩하는 유전자)의 전사 수준이 통계적으로 유의하게 낮음을 확인하였으며, 이를 통해, α -fuc가 β -gal보다 노화 식별을 위한 더 신뢰할 수 있고 민감한 마커라는 것을 확인할 수 있었다.

[0124] 새로운 노화 바이오마커로서의 α -fuc의 충실도(fidelity) 평가

[0125] 다음으로 세포 노화에 대한 바이오마커로서 β -gal 및 α -fuc의 충실도(fidelity)를 비교하였다. 먼저, 200 nmol의 β -gal siRNA와 α -fuc siRNA가 모의 처리된 세포(mock-treated cells)와 비교하여 노화 HCT116 세포에서 GLB1 및 FUCA1 mRNA 발현 수준을 약 80%만큼 감소시키기에 충분하다는 것을 확인하였다(도 10). 또한, 약물-유도된(drug-induced) 세포 노화 생성에 대한 GLB1 및 FUCA1 mRNA 발현 감소의 효과를 평가하였다(도 3A). 본 발명에서는 β -gal 결핍이 AZD로 인한 노화 유도를 방해하지 않는다는 것을 확인하였다. 예를 들어, 위와 같이 β -gal siRNA로 처리된 HCT116 세포는 여전히 극적으로 상향조절된 p53, p21, p16 및 FUCA1 mRNA 발현과 같은 전형적인 노화 특징과 확대된 형태를 보여주었다(도 3B 및 D). 반면에, 이러한 지표는 유전자 FUCA1 녹다운이 적용된 HCT116 세포에서 통계적으로 덜 널리 퍼져 있었고, 이는 α -fuc가 노화 유도에 필요함을 암시하는 것이다(도 3C 및 E). 또한, 예상치 못하게, 발색 X-fuc 분석에서 볼 수 있는 파란색 염색 패턴에서 입증된 바와 같이 β -gal-depletion 및 AZD 처리를 거친 노화 세포에서 α -fuc가 여전히 존재하는 것을 확인하였다(도 3D). 대조적으로, AZD로 처리된 다른 유사한 FUCA1 녹다운 세포에서는 β -gal이 관찰되지 않았다(도 3E). 도 3F에 요약된 바와 같이, α -fuc의 발현은 β -gal에 비해 노화 상태를 반영할 가능성이 더 높다. 이것은 α -fuc가 β -gal보다 노화 진행에 대한 더 정확한 바이오마커이고, α -fuc 반응성 형광성 프로브가 β -gal 발현이 결여된 세포에서도 노화를 감지하는 유용한 도구로 작용할 수 있다는 것을 암시하는 것이다.

[0127] QM-NH α fuc의 설계, 합성 및 특성화

[0128] 상기 [합성 경로] 및 방법에 따라 AIEgen QM-NH₂ 및 QM-NH α fuc를 합성하였다(도 1B). 합성된 화합물들을 ¹H NMR, ¹³C NMR, 및 ESI-MS를 통해 확인하였다.

[0129] QM-NH α fuc 및 QM-NH₂의 AIE 특성은 테트라히드로푸란(THF)/물 혼합 용매 시스템의 분광 변화를 수성 분획(fw)의 함수로 기록하는 것과 관련된 표준 방법을 사용하여 확인하였다(C. X. Shi et al., ACS Appl. Mater. Interfaces, 2013, 5, 192-198). 도 11에 나타난 바와 같이, QM-NH α fuc와 QM-NH₂는 모두 350~550nm 스펙트럼

범위에서 흡수가 확인되었다. 이 혼합 용매 시스템에서 물의 비율을 증가시키면 흡수 스펙트럼 특성의 변화가 거의 없다. 그러나 f_w 가 80%를 초과하면 AIE 시스템에서 예상되는 것처럼 QM-NH₂의 형광이 급격히 증가하고 586 nm를 중심으로 하는 최대 방출이 쉽게 관찰된다(도 4A). 대조적으로, QM-NH α fuc의 경우, f_w 가 95%에 도달한 경우에도 방출 특성이 변경되지 않은 상태로 유지되었는데, AIE에 기인하는 반응은 관찰되지 않았다(도 4B).

[0130] 다음으로, QM-NH₂ 및 QM-NH α fuc에 대해 DLS(dynamic light scattering) 및 SEM 측정을 수행하였다. QM-NH₂의 경우 수성 매질에서 단단히 패킹된 나노 응집체가 형성된 반면(평균 직경 76nm, 균일, 도 4C 및 도 12), 반면 QM-NH α fuc는 더 느슨한 응집체를 형성하였다(평균 직경 228nm, 불균일, 도 4D 및 도 12). 그런 다음 고체 상태에서 QM-NH₂ 분자 구조를 조사하였다. 단결정 X선 구조 분석을 통해 QM-NH₂에 대한 트랜스 구성(trans configuration)을 확인하였다(도 13).

[0131] QM 단위에 비해 N-에틸 그룹에 대해 큰 2면각(85.1°)이 보였다. QM-NH₂는 중심 에틸렌과 QM 단위 사이의 비틀림 각이 22.9°이고 중심 에틸렌과 페닐 고리 사이의 각이 11.0°인 꼬인 형태를 보인다. 이렇게 심하게 꼬인 구조는 아마도 고체 상태에서 응집 유도 소광(aggregation-induced quenching, ACQ)의 범위를 제한하는 대면 적층(face-to-face stacking)을 방지하는 역할을 할 것이다(도 13). QM-NH α fuc의 경우, (i) α -fuc 오피라노사이드 단위의 존재가 큰 내부 자유 부피를 갖는 느슨하게 패킹된 나노구조의 형성을 허용하고, (ii) α -fuc에 의한 활성화는 QM-NH α fuc에서 QM-NH₂를 방출하여 강렬한 AIE 형광을 특징으로 하는 단단히 패킹된 QM-NH₂ 나노 응집체의 형성을 허용하는 역할을 할 것임을 추론할 수 있다.

[0133] α -fuc-반응성 AIE 형광 프로브로서의 QM-NH α fuc의 평가

[0134] QM-NH α fuc(586 nm에서 모니터링됨)를 포함하는 용액의 형광은 37°C에서 α -fuc(2 U mL⁻¹)와 함께 배양 시 α -fuc가 없을 때 관찰된 것 대비(6시간 배양 후에도 스펙트럼 특징의 변화 없음, 도 4E 및 도 14), 약 16배 향상되었다(도 4E). 반응 정도와 시간 및 α -fuc 농도 사이에는 양의 상관관계가 있는 것으로 나타났다(도 4F). 또한, 586 nm에서의 형광 강도와 α -fuc 농도 사이의 우수한 선형 관계(R=0.99)는 0-1.75 U mL⁻¹ 범위를 유지하는 것으로 나타났다(도 15). α -fuc에 대한 QM-NH α fuc의 검출한계는 3s/slope 공식에 기초하여 1.0 X 10⁻² U mL⁻¹로 계산되었다. 이러한 결과를 통해, 시험관 내에서 QM-NH α fuc의 α -fuc에 대한 민감한 검출 능력을 확인하였다.

[0135] 다른 잠재적 유발 요인(potential triggers)에 대한 테스트 결과, α -fuc만이 다른 동일한 조건에서 형광 프로파일에서 상당한 변화를 유도한 것으로 나타났다(도 4G). 특히, QM-NH α fuc는 β -gal에 대해 뚜렷한 반응을 보이지 않았고, 이는 본 발명이 SA- β -gal을 기반으로 하는 프로브에 유용한 보완을 제공할 수 있음을 뒷받침하는 결과이다. 아미노산, 염 및 단백질과 같은 다양한 생물학적 물질로 보충된 세포 배양 배지는 QM-NH α fuc의 성능 거동에 영향을 미치지 않았다(도 16). 마찬가지로, 용액의 이온 강도는 QM-NH α fuc의 양친매성 성질에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(도 16).

[0136] HPLC 분석을 통해, 시험관 내에서 QM-NH α fuc로부터의 QM-NH₂의 생성을 확인하였다. 도 4h에 도시된 바와 같이, QM-NH α fuc가 α -fuc에 노출된 후 16.1분의 체류 시간(retention time)을 갖는 새로운 피크가 관찰되었다. 이 체류 시간은 QM-NH₂의 체류 시간과 동일하므로 α -fuc 매개 촉매 가수분해의 결과로 QM-NH₂가 QM-NH α fuc에서 유리된다는 전제를 뒷받침한다. 원자 수준에서 도킹 및 분자 역학(MD) 시뮬레이션은 QM-NH α fuc와 α -fuc의 활성 부위 사이의 열역학적으로 유리한 상호 작용을 지원한다(도 4I). 결합 자유 에너지는 61.9 kcal mol⁻¹로 계산되었다. α -fuc 도메인의 아미노산 잔기 Asp 224는 수소 결합을 통해 QM-NH α fuc에 있는 α -fucopyranoside의 C1과 상호작용한다. 이러한 결과는 α -fucopyranoside와 관련된 이전 결합 연구와 일치한다(K. Miura, T. Tsukagoshi, T. Hirano, T. Nishio and W. Hakamata, ACS Med. Chem. Lett., 2019, 10, 1309-1313). 더욱이, QM-NH α fuc는 최대 100 μ M의 농도에서도 대조군과 노화 세포 모두에서 본질적으로 무독성인 것으로 입증되었다(도 17). 종합적으로, 이러한 결과를 통해 QM-NH α fuc가 세포 노화 조건에서 α -fuc 활성을 모니터링할 수 있게 하는 효과적인 α -fuc 특이적 도구로 작용할 수 있음을 확인하였다.

[0138] 노화 세포의 인비트로 실시간 이미징

- [0139] α -fuc 발현에 기초한 노화 세포의 동정(Identification)은 QM-NH α fuc를 사용하여 시험하였다. 시판되는 α -fuc 키트(4-MU-fuc)를 양성 대조군으로 사용하였다. 예상한 바와 같이, 각 노화 유형에서 뚜렷한 형광 증가가 관찰되었으며(도 5A 및 B), 이를 통해 QM-NH α fuc가 상용 α -fuc 키트보다 노화 세포 식별에 더 효과적일 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 4-MU-fuc는 노화 세포에서 활성화되는 것으로 밝혀졌지만, 반응 민감도는 QM-NH α fuc보다 열등한 것으로 나타났다. 예를 들어, 복제 노화 세포(late passage, 그림 5A)에서 QM-NH α fuc는 4-MU-fuc보다 2.0배 더 밝은 형광을 나타내었다.
- [0140] 4-MU-fuc가 UV 스펙트럼 영역의 빛을 흡수하는 반면, QM-NH α fuc는 가시광선을 흡수한다; 이것은 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)을 사용하는 살아있는 노화 세포 이미징에 적합하다. 도 5C에 도시된 바와 같이, QM-NH α fuc와 12시간 동안 인큐베이션한 후, 턴온(turn-on) 형광이 복제 노화 세포에서 관찰되었다(4-fold; quantification provided in 도 18). 형광 신호의 유사한 턴온(강도의 6배 증가)이 ROS, UVA 및 약물 유도 노화 모델에서도 관찰되었다(도 5D 및 도 18). 그러나 비노화 세포(대조군)에서는 형광 시그니처의 변화가 보이지 않았다.
- [0141] 살아있는 노화 세포에서 볼 수 있는 향상된 형광 강도가 실제로 α -fuc에 의해 유발되었다는 추가 증거는 α -fuc 억제 분석에서 나왔다. 시판되는 α -fuc 억제제인 deoxyfuconojirimycin(DFJ)을 QM-NH α fuc 처리 전에 노화 세포(12시간 동안 100 μ M)와 함께 사전 인큐베이션 시켰다. 이러한 조건하에서, 세포 형광은 극적으로 감소하였고, 복제 노화 세포의 경우에는 실질적으로 거의 사라졌다(도 5C, D 및 도 18). 공동 국소화 분석 결과(colocalization assay)를 통해 세포에서 QM-NH α fuc에 의해 제공되는 형광 신호가 리소솜에 위치하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 리소솜 α -fuc에 의한 QM-NH α fuc의 활성화를 시사한다(Pearson's r : 0.89, 도 19).
- [0142] 그런 다음 도 5E에 표시된 대로 준비된 β -gal 또는 α -fuc 녹다운 모델에서 QM-NH α fuc의 형광 반응을 조사하였다. 위에서 설명한 바와 같이 β -gal siRNA 및 AZD 처리된 세포는 노화의 특징을 나타내는 반면 α -fuc siRNA 및 AZD 처리된 세포는 그렇지 않았다(도 3B-E). 도 5F에 도시된 바와 같이, β -gal 녹다운 노화 세포에서 밝은 형광이 관찰되었으며, 이러한 결과는 QM-NH α fuc가 β -gal 발현이 결여된 노화 세포를 추적하는 유용한 도구가 될 수 있음을 뒷받침한다. 특히, 노화의 징후를 보이지 않는 α -fuc 녹다운 세포에서는 형광 신호가 관찰되지 않았다.
- [0144] **마우스 모델에서 노화 세포의 시각화**
- [0145] 다음으로, 생체 내에서 QM-NH α fuc의 노화 세포 검출 능력을 확인하였다. 면역형광 염색을 통해 Ki-67이 감소하고 p53 및 p21 발현이 증가함을 확인함으로써, 생체 내 노화 유도를 확인할 수 있었다(도 6A). 생체 내 노화 모델 확립 후, QM-NH α fuc를 정맥 주사하고 Maestro 2 영상 장비를 사용하여 해당 생체 내 형광 신호를 감지하였다. 도 6B에 도시된 바와 같이, AZD를 처리한 병변에서 급격한 형광 증가가 관찰되었으며, 48시간 후에도 밝은 신호가 유지되어 장기간 형광 모니터링이 가능함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, QM-NH α fuc가 노화 세포의 형광 기반 이미징을 가능하게 하는 유용한 프로브라는 것을 확인할 수 있었다.
- [0146] 주입된 프로브가 없는 경우 AZD로 처리된 마우스는 식별 가능한 형광을 나타내지 않았다는 점에 유의하는 것이 중요하다. 이를 기반으로, 특히 노화 세포에서 발생할 수 있는 자동 형광(auto-fluorescence)과 관련된 아티팩트(artifacts)를 배제하였다(도 6C 및 도 20). 유사하게, AZD 처리되지 않은 대조군 마우스의 경우 프로브 QM-NH α fuc 투여 여부와 상관없이 형광이 거의 관찰되지 않았다(도 20). 노화 조직 및 기타 기관의 생체외 형광 이미징을 통해, QM-NH α fuc가 노화 세포를 밝게(light-up) 하는 데에만 작용한다는 것을 추가로 확인하였다(도 6D 및 도 21). 또한 간독성(hepatic toxicity)과 신장독성(renal toxicity)의 대표적인 바이오마커인 ALT(alanine transaminase), AST(aspartate transaminase), 혈청 크레아티닌(serum creatinine)의 활성도 정상 범위 내에서 유지됨을 확인하였다(도 22). 이러한 결과를 통해, QM-NH α fuc가 생체 내 노화 이미징 프로브로 사용하기에 안전할 것임을 확인하였다.
- [0148] **결론**
- [0149] 본 발명에서는 α -L-fucosidase(α -fuc)가 세포 노화에 대한 유용한 바이오마커임을 확인하고, α -fuc 반응성 분자 프로브(예를 들어 본 발명의 QM-NH α fuc)가 현재 사용 중인 노화 프로브의 대부분을 차지하고 있는 SA- β -gal 프로브를 보완할 수 있음을 확인하고자 하였다. α -fuc 활성화의 상향 조절은 복제, ROS, UVA 및 약물 유도

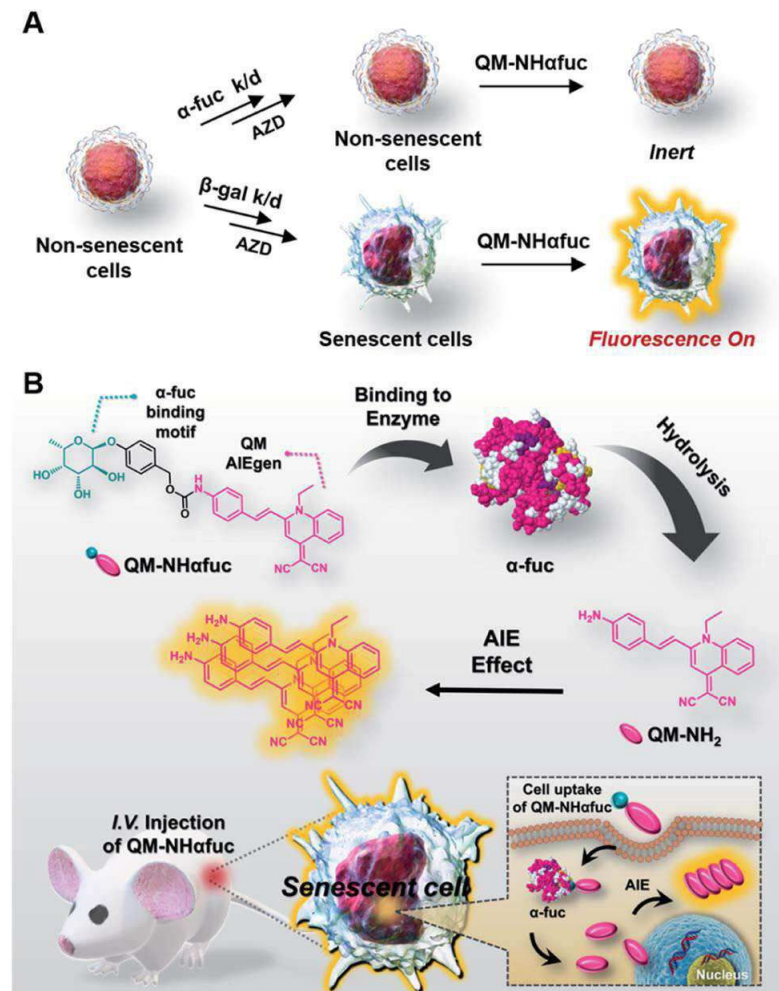
노화를 포함한 다양한 노화 모델에서 확인되었다. α -fuc의 사전 고갈은 β -gal이 아닌 노화 유도를 방해하는 것으로 밝혀졌다. 이것은 세포 노화의 분자 경로와 α -fuc의 밀접한 상관 관계와 일치하는 것이다. 따라서, 본 발명에서는 α -fuc 반응성 분자 프로브로서 QM-NH α fuc를 제공하며, 전술한 결과들을 통해, 시험관 내 및 생체 내에서 선택적 세포 노화 추적 능력이 있음을 확인하였다. 본질적으로 억제된 QM-NH α fuc의 AIE 특성은 α -L-fucopyranoside 단위의 효소 가수분해를 통해 회복되어 고형광성 나노 응집체의 제자리 생성(in-situ generation)을 가능하게 하였다. QM-NH α fuc의 α -fuc에 대한 민감하고 선택적이고 열역학적으로 선호되는 반응은 형광 방출, HPLC 및 분자 도킹 연구를 통해 확인하였다. QM-NH α fuc에서 관찰할 수 있는 형광 방출 강도의 증가(4-6배 증가)는 시험관 내 대조군 세포에서 복제, ROS, UVA 및 약물 유도 노화 세포를 효과적으로 구별할 수 있게 한다. QM-NH α fuc은 또한 β -gal 발현이 결여된 노화 세포를 식별하는 데 사용될 수 있다. 노화를 추적하는 QM-NH α fuc의 능력은 약물 유도 노화 이중이식 종양 모델을 통해서도 검증하였다. 결론적으로 본 발명에서는 α -fuc에 반응하는 분자 프로브 또는 시스템이 노화 세포 표적 제제 생성에 대한 새로운 접근 방식을 제공하거나 잠재적인 세놀리틱 약물(senolytic drugs)의 스크리닝에 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0151]

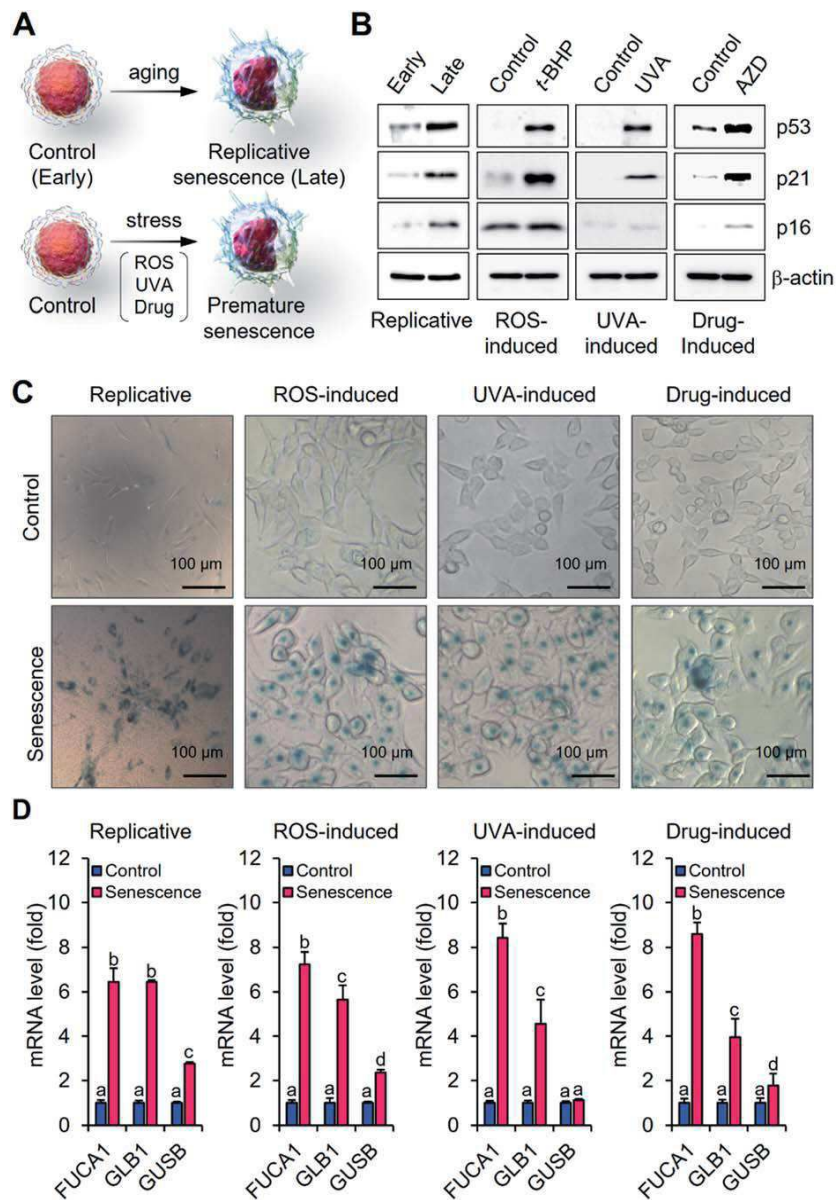
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

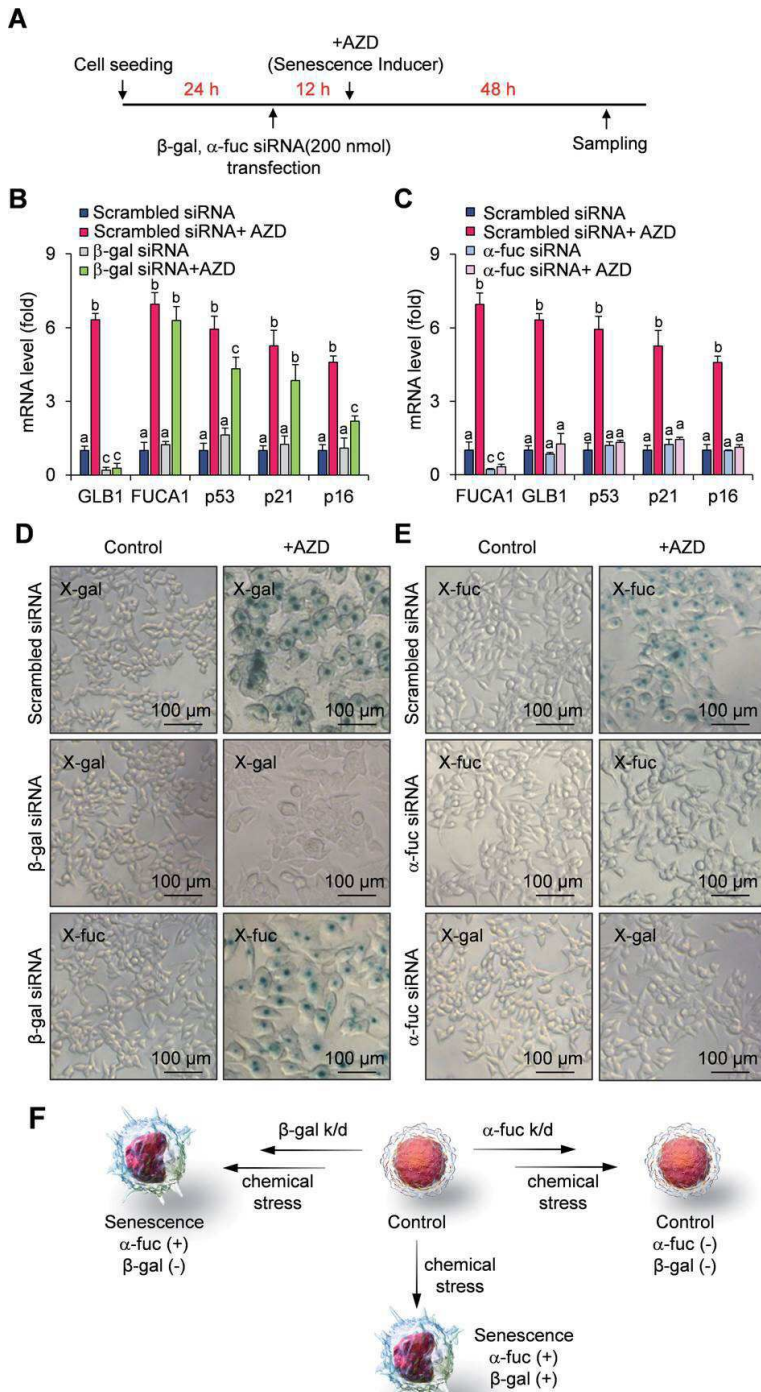
도면1



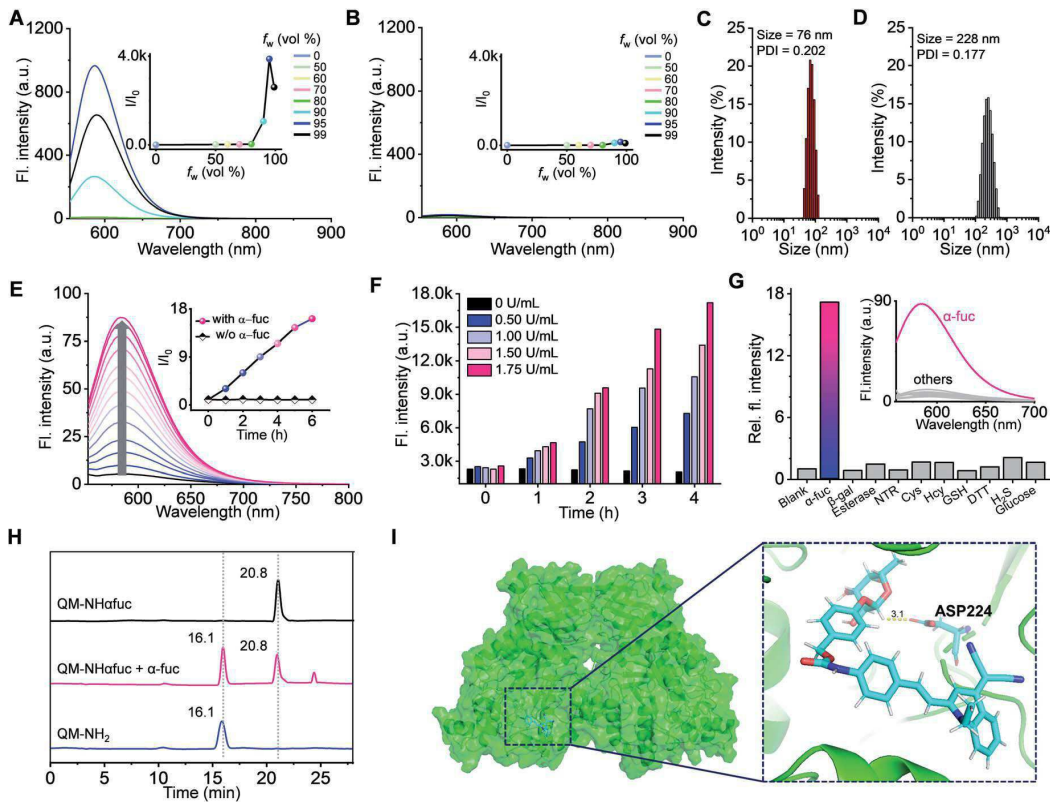
도면2



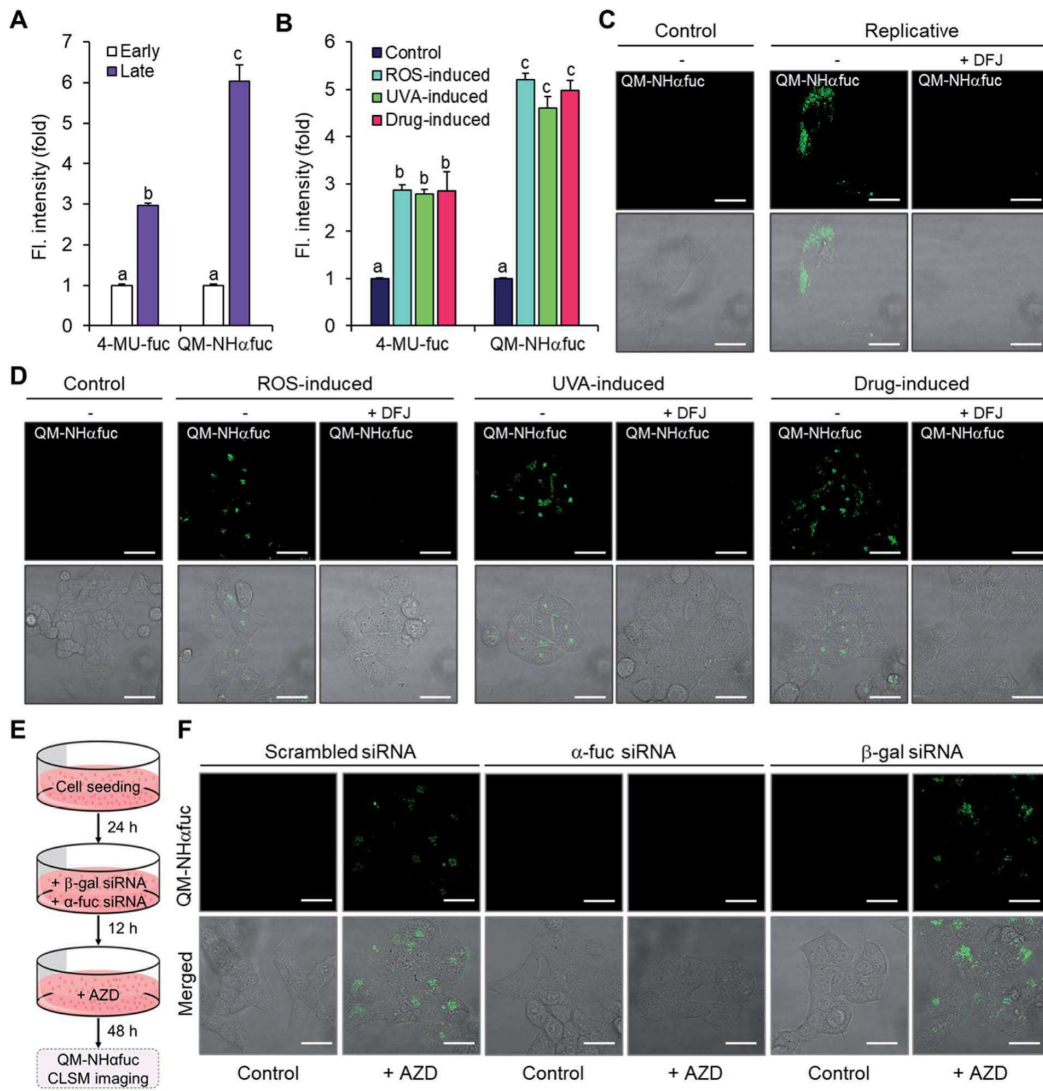
도면3



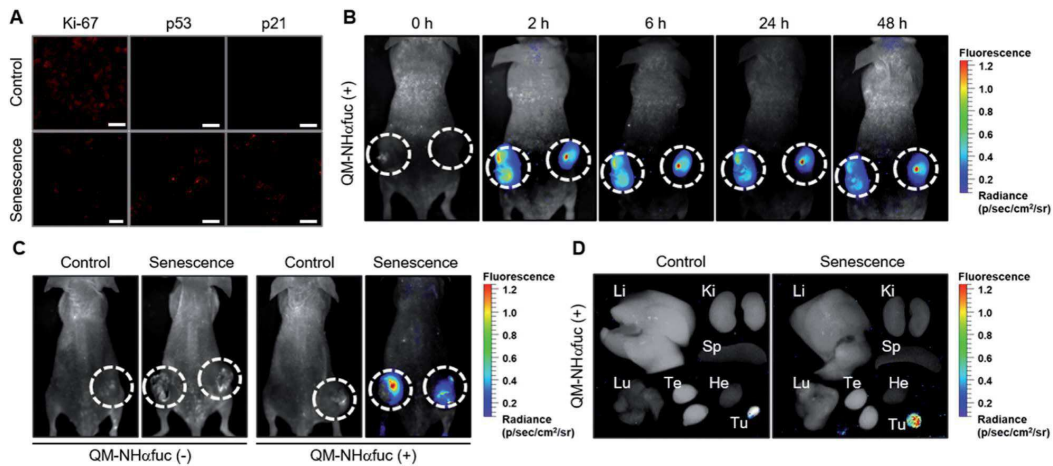
도면4



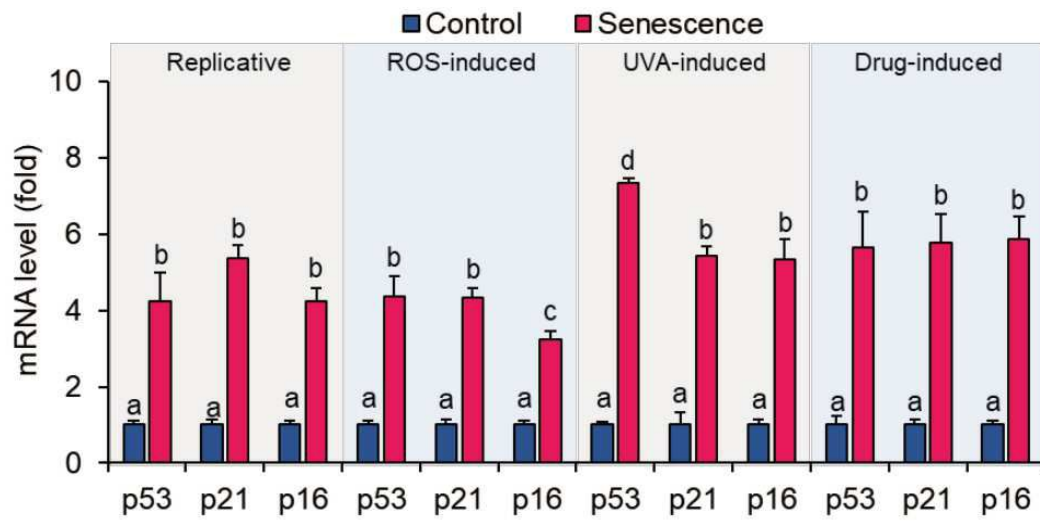
도면5



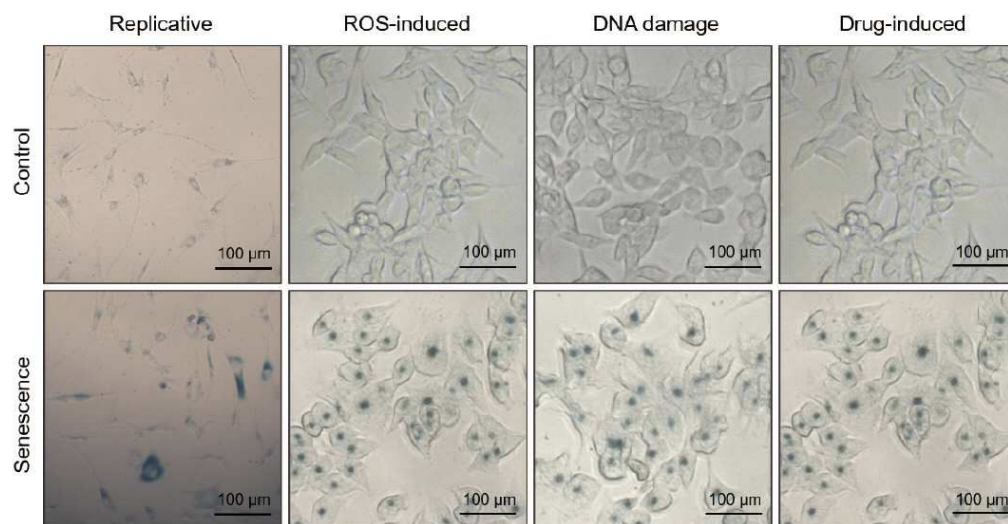
도면6



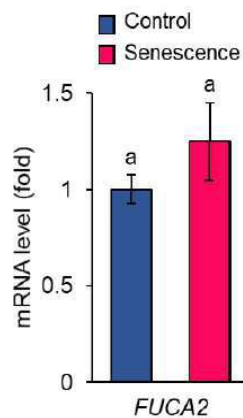
도면7



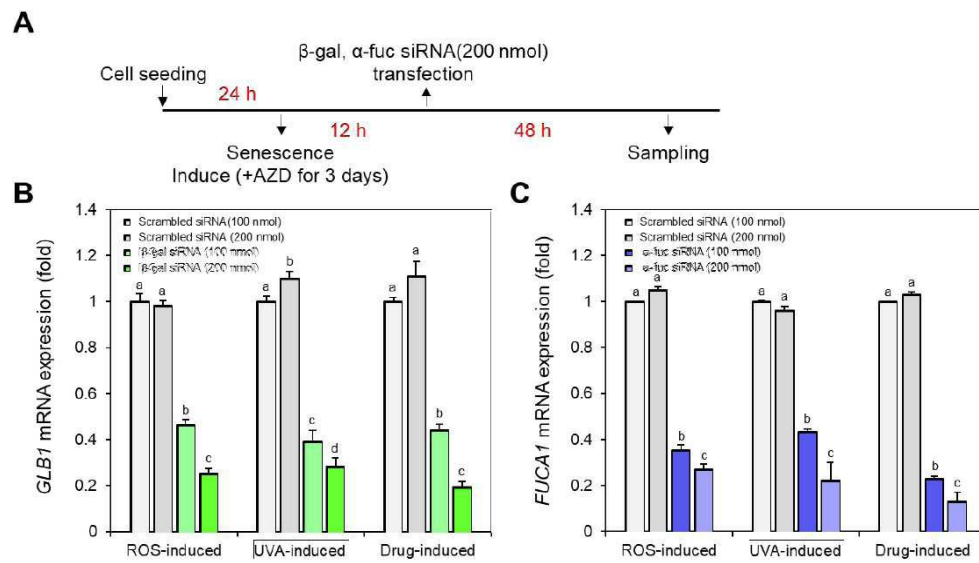
도면8



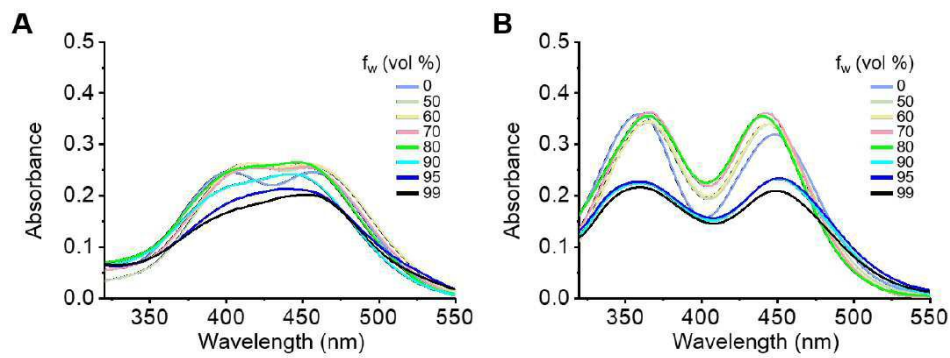
도면9



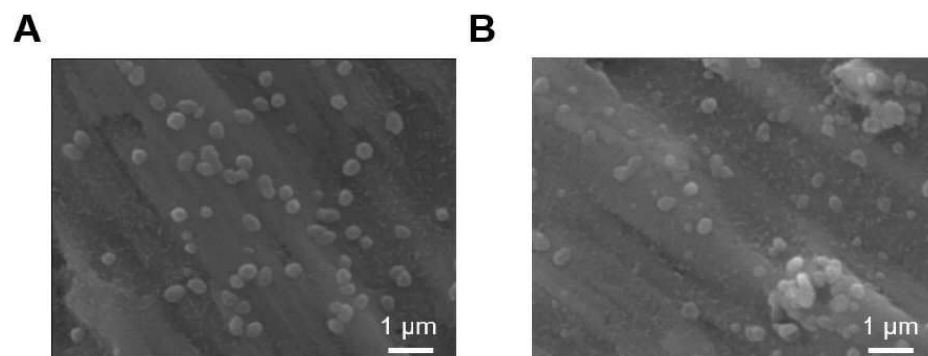
도면10



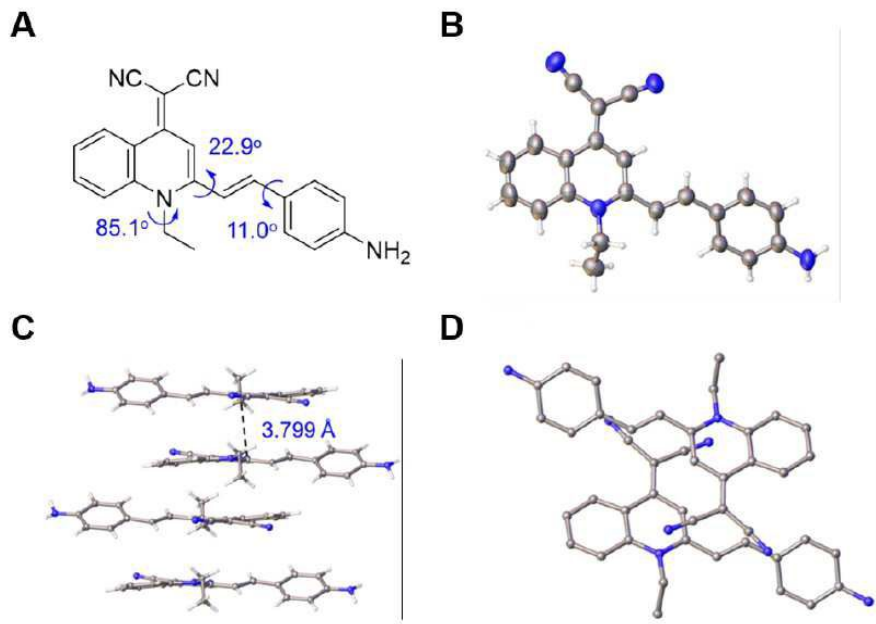
도면11



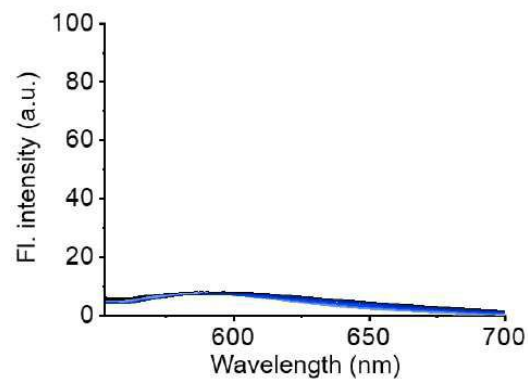
도면12



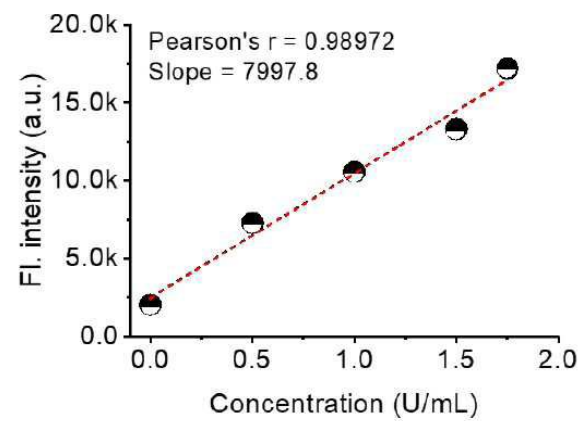
도면13



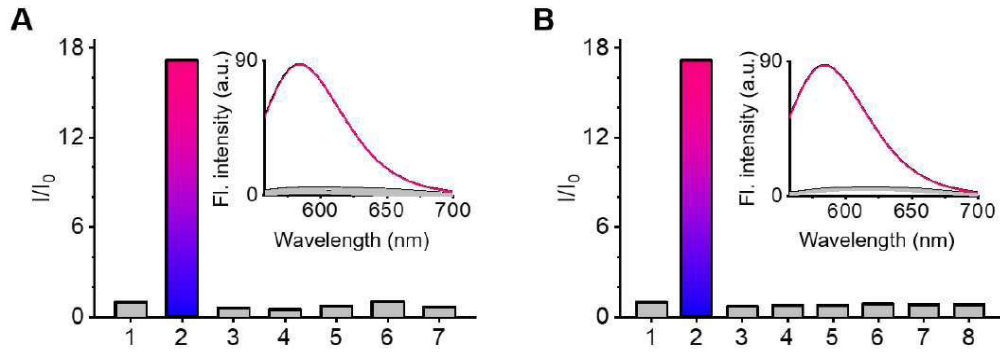
도면14



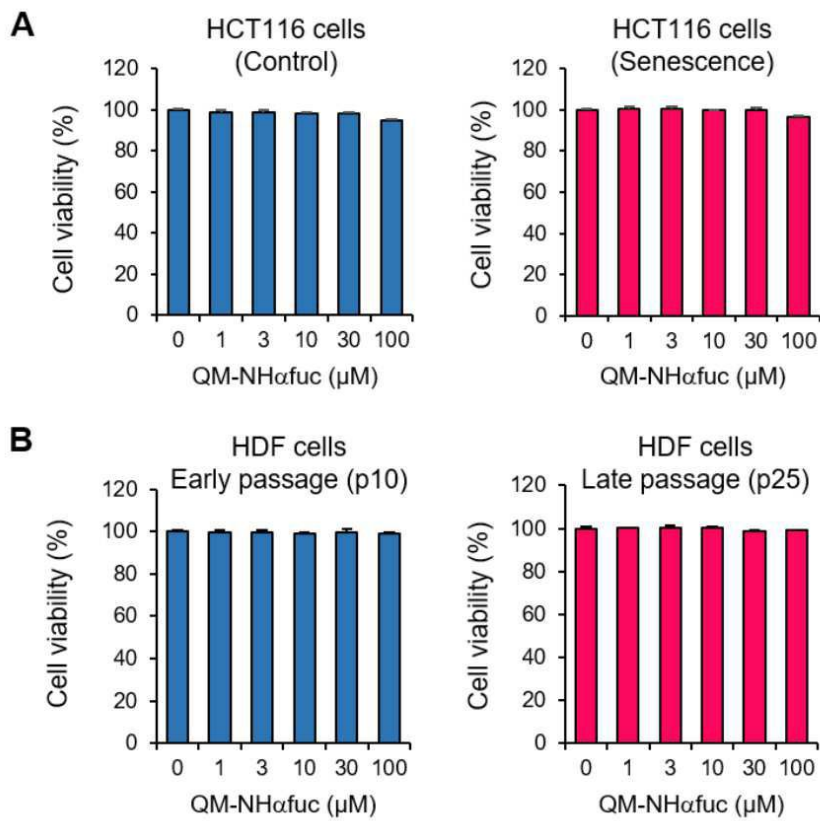
도면15



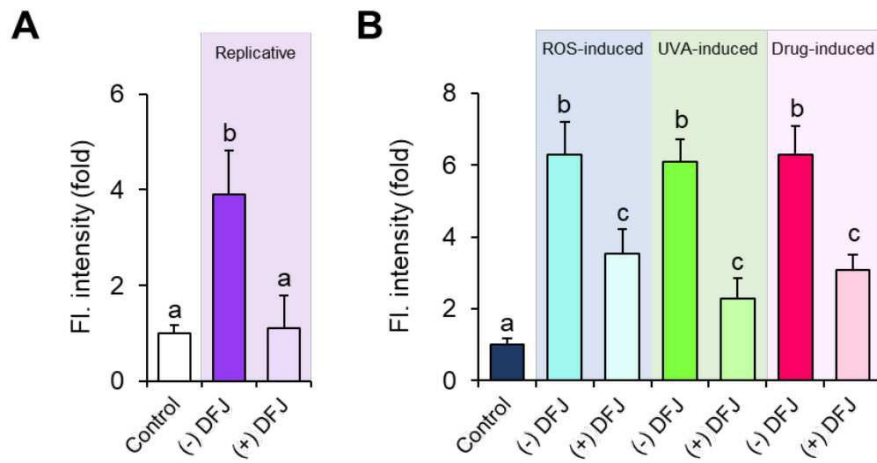
도면16



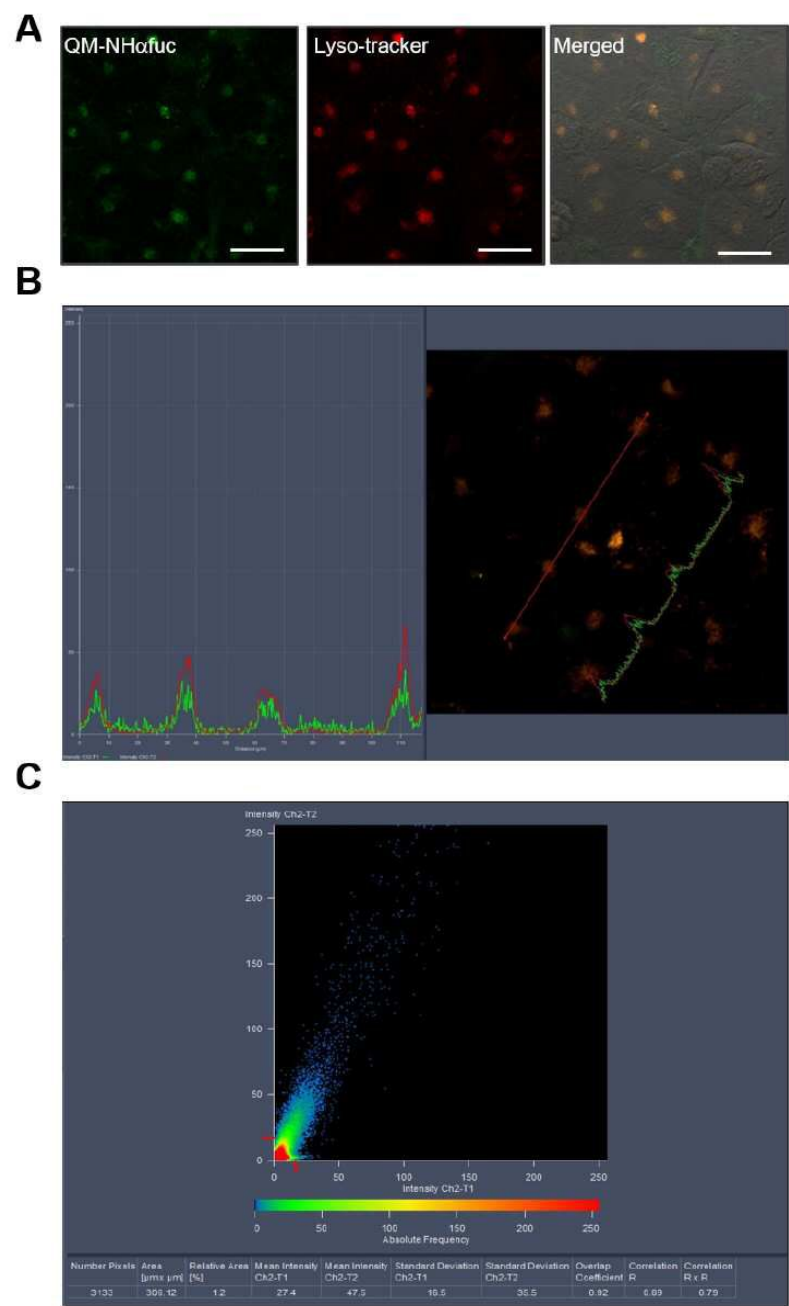
도면17



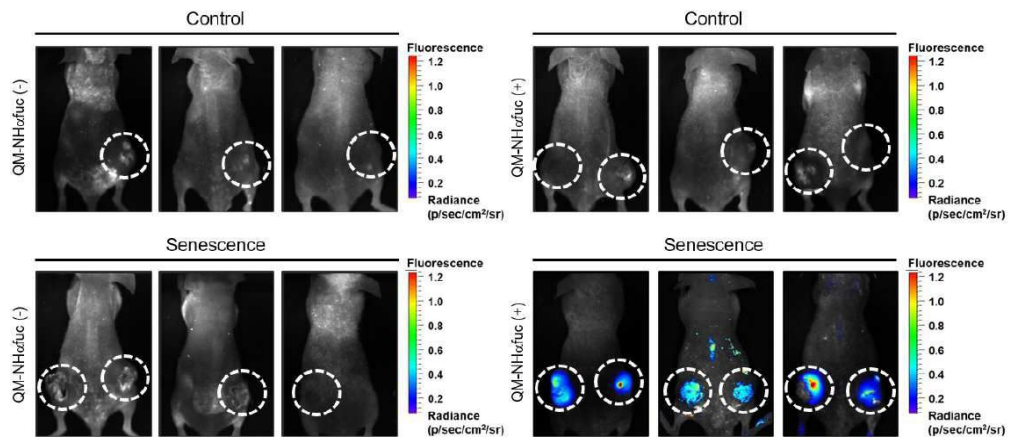
도면18



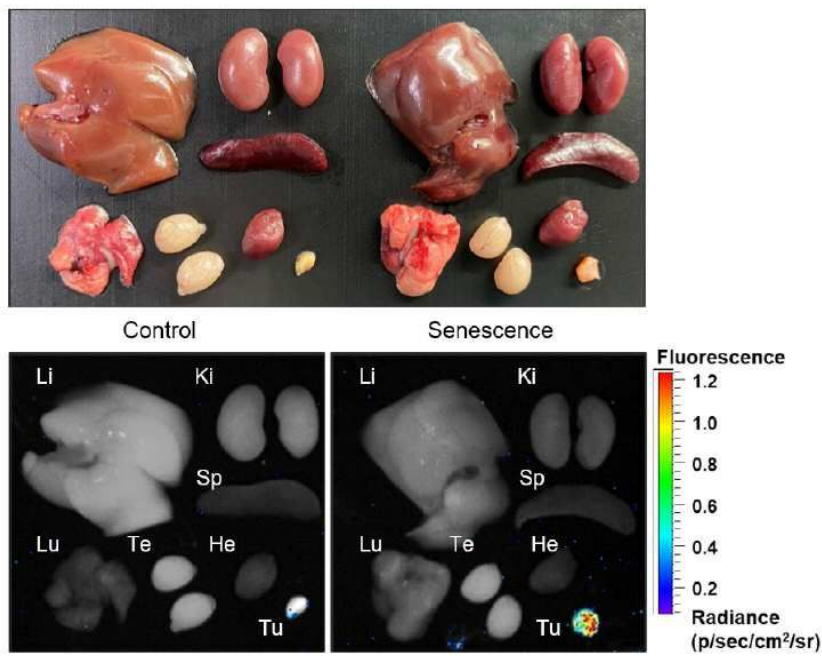
도면19



도면20



도면21



도면22

