

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0099956 (43) 공개일자 2016년08월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07D 487/04 (2006.01) C07D 235/04 (2006.01) C07D 241/36 (2006.01) G01N 31/22 (2006.01)		(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(52) CPC특허분류 C07D 487/04 (2013.01) C07D 235/04 (2013.01)		(72) 발명자 윤주영 서울특별시 서초구 잠원동50 롯데캐슬 207동 1703호
(21) 출원번호	10-2015-0022316	슈 령령 서울특별시 서대문구 대현동 이화여대 종합과학관D동 501호
(22) 출원일자	2015년02월13일	김경미 서울특별시 강서구 화곡8동 397-13
심사청구일자	2015년12월28일	(74) 대리인 이원희

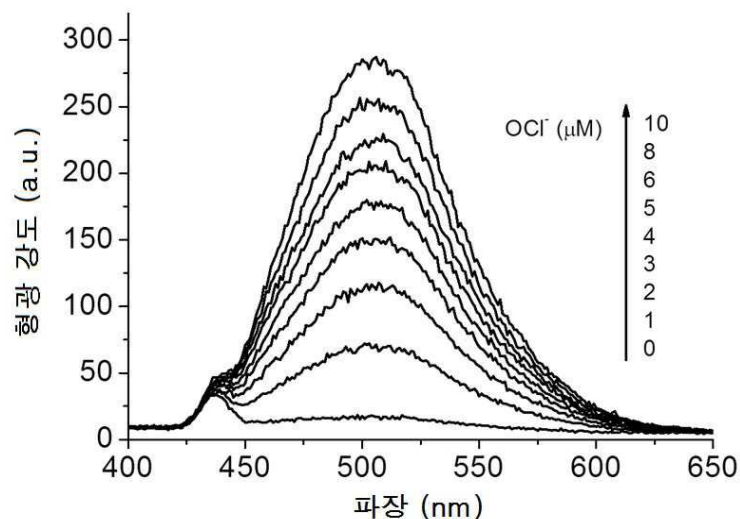
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 치아염소산을 선택적으로 검출하기 위한 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 프로브

(57) 요약

본 발명은 치아염소산을 선택적으로 검출하기 위한 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 프로브에 관한 것으로, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 또는 흡광 스펙트럼이 변화하므로, 세포 내에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07D 241/36 (2013.01)

G01N 31/22 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711020628

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원 유기소재 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2021.08.31

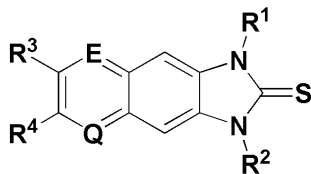
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^1 및 R^2 는 독립적으로 -H, -OH, 할로겐, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 $-(CH_2)_nR^5$ 이고,

여기서, 상기 R^5 는 N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 헤테로 원자를 하나 이상 포함하는 5-10원자의 헤테로고리이고, n은 1-10의 정수이고;

R^3 및 R^4 는 독립적으로 -H, -OH, 할로겐, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

여기서, 상기 R^3 및 R^4 는 이들이 연결된 원자들과 함께 C_{6-10} 의 아릴을 형성할 수 있고;

E 및 Q는 독립적으로 C 또는 N이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

R^3 및 R^4 는 독립적으로 수소이고;

여기서, 상기 R^3 및 R^4 는 이들이 연결된 원자들과 함께 C_{6-10} 의 아릴을 형성할 수 있고;

E 및 Q는 독립적으로 C 또는 N인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

R^1 및 R^2 는 독립적으로 메틸이고;

R^3 및 R^4 는 독립적으로 수소이고;

여기서, 상기 R^3 및 R^4 는 이들이 연결된 원자들과 함께 페닐을 형성할 수 있고;

E 및 Q는 독립적으로 C 또는 N인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

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

- (1) 1,3-디메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진-2(3H)-티온; 및
- (2) 1,3-디메틸-1H-나프토[2,3-d]이미다졸-2(3H)-티온.

청구항 5

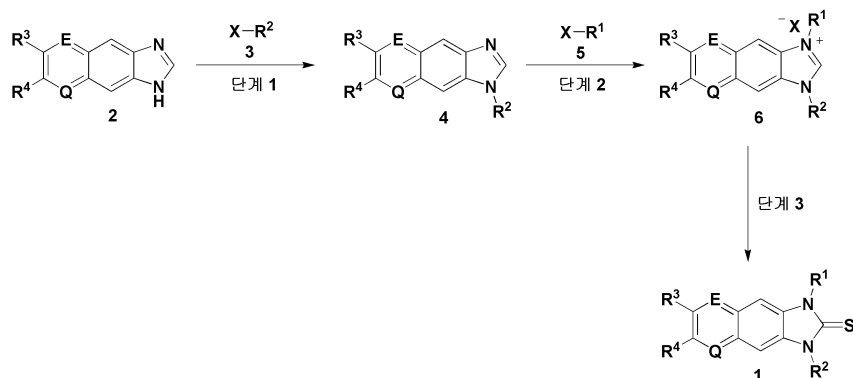
하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물에 황(sulfur)을 첨가하고 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에 있어서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , E 및 Q는 독립적으로 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같고;

X는 할로젠이다).

청구항 6

제1항의 화합물을 포함하는 치아염소산(OCl^-) 검출용 화학센서.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 화학센서는 생체시료 중에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 것을 특징으로 하는 화학센서.

청구항 8

시료에 제6항의 화학센서를 첨가하는 단계(단계 1);

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

형광 또는 흡광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 치아염소산(OCl^-)의 검출방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 검출방법은 생체시료 중에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 것을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 검출방법은 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 5각형 고리에 결합되어 있는 황(sulfur) 원자가 치아염소산(OCl^-)과 반응함으로써 산화되어 떨어져 나가, 양전하를 띄는 이미다졸리움이 생성됨으로써 발생하는 π -공액계(π -conjugation system) 변화에 기인하는 형광 또는 흡광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 것을 특징으로 하는 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치아염소산을 선택적으로 검출하기 위한 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 프로브에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)과 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)은 생리학(physiology)과 병리학(pathology)에서 매우 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(J. D. Lambeth, *Free. Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 332-347.). 일례로, 뇌는 상기 ROS의 과형성과 산화 방지제로 인하여 제공되는 상기 ROS 과형성에 대응하는 방어 사이에 균형이 무너질 때 잔여 신진대사 에너지의 약 20%를 소비하며 산화 스트레스(oxidative stress) 상태에 놓이게 된다.

[0005] 상기 ROS 종류들 중, 주요한 구성요소인 치아염소산(OCl^-)은 면역세포(immunocytes)에서 H_2O_2 와 Cl^- 의 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO) 촉매반응으로 인하여 주로 생산되며(N. M. Domigan, T. S. Charlton, M. W. Duncan, C. C. Winterbourn, A. J. J. Kettle, *Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16542-16548.), 침입한 세균을 조절하는데 주요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(S. L. Hazen, F. F. Hsu, K. Duffin, J. W. Heinecke, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23080-23088.).

[0007] 또한, 치아염소산(OCl^-)은 다양한 생체 분자(biomolecule)에 대하여 재빠르게 반응하는 것으로 알려져 있다(A.

Krasowska, G. W. Konat, *Brain Res.* **2004**, 997, 176-184.). 이에, 과량의 치아염소산(OCl^-)이 생산되는 경우, 세포와 주변 조직에 손상을 유발할 수 있기 때문에, 결과적으로 심혈관계 질환, 염증성 질환, 신경 질환 등의 다양한 장애와 관련지을 수 있다. 즉, 치아염소산(OCl^-)의 생리적 및 병리학적인 역할을 이해하기 위해서는 세포, 조직, 유기체 수준에서 치아염소산(OCl^-)의 위치와 존재 여부를 관찰하고 검출하는 것이 중요하다.

[0009] 검출 연구(imaging study)에서 저 분자 형광 프로브는 이의 낮은 입체장애, 빠른 라벨(labeling) 속도, 용이하게 조작 가능한 특성으로 인하여 유용하게 사용될 수 있다. 구체적으로, H_2O_2 , NO , ONOO^- , O_2 , $\cdot\text{O}_2$, OCl^- 를 검출하기 위한 형광 프로브가 개발되고 있다. 하지만, 상기 프로브들은 UV 내지 가시 범위에서 짧은 여기 파장으로 인하여 얇은 조직투과깊이(shallow tissue penetration depths), 자가 형광 autofluorescence) 및 인공 ROS 발생(artificial ROS generation)이 나타나는 문제점이 있다.

[0011] 한편, 두 개의 근 적외선(Near-IR)과 저 에너지 광자(low energy photons)를 여기 원(excitation source)으로써 사용하는 이-광자 현미경(Two-Photon Microscopy, TPM)은 살아있는 세포나 조직에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하기 위한 용도로 유용하게 사용된다. 일-광자 현미경(One-Photon Microscopy)과 비교하여, TPM은 더 깊은 조직투과깊이(>500 μm), 우수한 공간 해상도(spatial resolution), 낮은 광 독성(phototoxicity) 등 우수한 특성을 갖는다. 하지만, 살아있는 세포 및 조직에서 생산되는 내인성 치아염소산(OCl^-)을 직접적으로 검출하기 위한, TPM 기반 프로브는 알려진 바가 없다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 치아염소산(OCl^-)을 선택적으로 검출하기 위한 프로브를 개발하기 위하여 연구하던 중, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 프로브가 세포 내 다양한 활성 산소종 중에서 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 또는 흡수 스펙트럼 변화가 유도되어 용이하게 검출이 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 치아염소산을 선택적으로 검출하기 위한 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

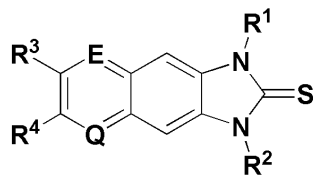
[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 치아염소산(OCl^-) 검출용 화학센서를 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학센서를 이용한 치아염소산(OCl^-)의 검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] 상기 화학식 1에서,

[0027] R^1 및 R^2 는 독립적으로 -H, -OH, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 $-(CH_2)_nR^5$ 이고,

[0028] 여기서, 상기 R^5 는 N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 헤테로 원자를 하나 이상 포함하는 5-10원자의 헤테로고리이고, n은 1-10의 정수이고;

[0030] R^3 및 R^4 는 독립적으로 -H, -OH, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

[0031] 여기서, 상기 R^3 및 R^4 는 이들이 연결된 원자들과 함께 C_{6-10} 의 아릴을 형성할 수 있고;

[0033] E 및 Q는 독립적으로 C 또는 N이다.

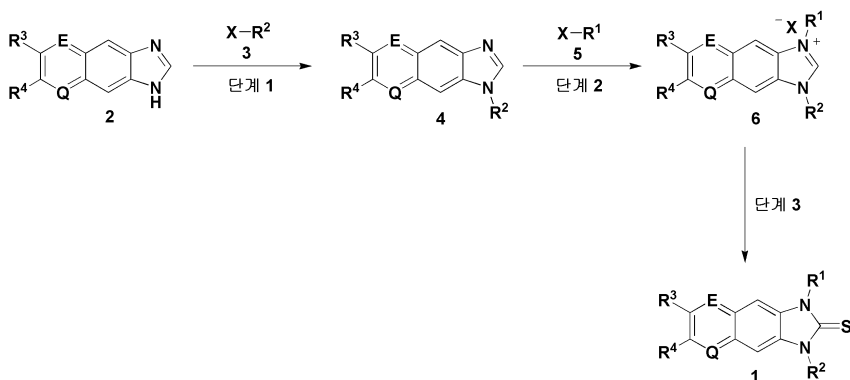
[0035] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0036] 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);

[0037] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2); 및

[0038] 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물에 황(sulfur)을 첨가하고 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0039] [반응식 1]



[0040]

[0041] 상기 반응식 1에 있어서,

[0042] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , E 및 Q는 독립적으로 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고;

[0043] X는 할로겐이다.

[0045] 나아가, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 치아염소산(OCl^-) 검출용 화학센서를 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 화학센서를 이용한 치아염소산(OCl^-)의 검출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 또는 흡광 스펙트럼이 변화하므로, 세포 내에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-10 μM)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 2는 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-30 μM)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 3은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 반응 메커니즘을 나타내는 이미지이다.

도 4는 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM)을 반응시킬 때 시간에 따른 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 5는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)을 각각 실시예 1에서 제조한 화합물과 반응시켰을 때 관찰되는 형광 스펙트럼(505nm 부근의 형광강도, a.u.)을 나타내는 이미지이다.

도 6은 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-50 μM)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 7은 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-30 μM)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 8은 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 반응 메커니즘을 나타내는 이미지이다.

도 9는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)을 각각 실시예 2에서 제조한 화합물과 반응시켰을 때 관찰되는 형광 스펙트럼(450nm 부근의 형광강도, a.u.)을 나타내는 이미지이다.

도 10은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-50 μM)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 11은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-100 μM)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 12는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)을 각각 실시예 1에서 제조한 화합물과 반응시켰을 때 관찰되는 형광 스펙트럼(493nm 부근의 형광강도, a.u.)을 나타내

는 이미지이다.

도 13은 헬라 세포(Hela cell)에 대한 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가한 결과를 나타내는 이미지이다.

도 14는 RAW 264.7 세포(대식세포주)에 대한 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포 독성을 평가한 결과를 나타내는 이미지이다.

도 15(a)는 헬라 세포(Hela cell)에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.

도 15(b)는 헬라 세포(Hela cell)에 NaOCl 100 μ M 및 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.

도 15(c)는 헬라 세포(Hela cell)에 NaOCl 200 μ M 및 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.

도 16(a)는 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.

도 16(b)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCl^-) 생성을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.

도 16(c)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoic acid hydrazide) 50 μ M을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.

도 16(d)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 FFA(flufenamic acid) 50 μ M을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.

도 17(a)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.

도 17(b)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCl^-) 생성을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.

도 17(c)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoic acid hydrazide) 50 μ M을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.

도 17(d)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 FFA(flufenamic acid) 50 μ M을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.

도 18(a)는 RAW 264.7 세포에 어떤 처리도 수행하지 않고 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence

Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 18(b)는 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 30분 동안 전처리하고, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 18(c)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCI^-) 생성을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 18(d)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoic acid hydrazide) 50 μ M을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 18(e)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 FFA(flufenamic acid) 50 μ M을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 18(f)는 형광을 나타내는 이미다졸리움을 포함하는 화합물(실시예 1의 단계 2 화합물) 10 μ M을, NaOCl 200 μ M로 전처리한 RAW 264.7 세포에 라벨한 후, 실험예 <10-1>에서 준비한 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 형광 이미지이다.

도 18(g)는 상기 도 18(a-f)에 해당하는 군의 형광 강도를 각각 측정한 그래프를 나타내는 이미지이다.

도 19(a)는 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 처리하지 않은 군의 형광 이미지이다.

도 19(b)는 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 처리한 군의 형광 이미지이다.

도 19(c)는 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 처리하지 않은 군[도 19(a)], 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M를 처리한 군[도 19(b)]에 대하여 TPEF(Two-Photon-Excited Fluorescence)의 변화를 관찰한 이미지이다.

도 20(a)는 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μ M을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA1 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

도 20(b)는 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCI^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μ M을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA1 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

도 20(c)는 해마 절편에 실시예 1 단계 2 화합물 100 μ M을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA1 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

도 20(d)는 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μ M을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA3 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

도 20(e)는 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCI^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μ M을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA3 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

도 20(f)는 해마 절편에 실시예 1 단계 2 화합물 100 μ M을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA3 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

도 20(g)는 해마 절편 CA1 및 CA3 부분의 명시야(bright-field) 이미지이다.

도 20(h)는 실험은 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μ M을 처리한

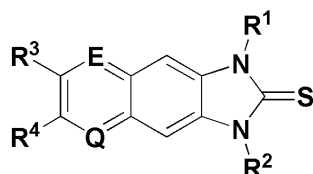
군[도 20(a), 도 20(d)], 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산 (OC1^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM 을 처리한 군[도 20(b), 도 20(e)], 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 실시예 1 단계 2 화합물 100 μM 을 처리한 군[도 20(c), 도 20(f)]의 형광 강도를 각각 측정한 그래프를 나타내는 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R^1 및 R^2 는 독립적으로 -H, -OH, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 $-(\text{CH}_2)_nR^5$ 이고,

여기서, 상기 R^5 는 N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 헤테로 원자를 하나 이상 포함하는 5-10원자의 헤테로고리이고, n은 1-10의 정수이고;

R^3 및 R^4 는 독립적으로 -H, -OH, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

여기서, 상기 R^3 및 R^4 는 이들이 연결된 원자들과 함께 C_{6-10} 의 아릴을 형성할 수 있고;

E 및 Q는 독립적으로 C 또는 N이다.

바람직하게는,

R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

R^3 및 R^4 는 독립적으로 수소이고;

여기서, 상기 R^3 및 R^4 는 이들이 연결된 원자들과 함께 C_{6-10} 의 아릴을 형성할 수 있고;

E 및 Q는 독립적으로 C 또는 N이다.

더욱 바람직하게는,

[0074] R^1 및 R^2 는 독립적으로 메틸이고;

[0076] R^3 및 R^4 는 독립적으로 수소이고;

[0077] 여기서, 상기 R^3 및 R^4 는 이들이 연결된 원자들과 함께 페닐을 형성할 수 있고;

[0079] E 및 Q는 독립적으로 C 또는 N이다.

[0081] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 예로는 하기의 화합물들을 들 수 있다.

[0082] (1) 1,3-디메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진-2(3H)-티온; 및

[0083] (2) 1,3-디메틸-1H-나프토[2,3-d]이미다졸-2(3H)-티온.

[0085] 상기 화합물은 세포 내 존재하는 $ONOO^-$, $\cdot NO$, $\cdot O_2$, H_2O_2 , OCl^- , $\cdot OH$, $t-BuOO\cdot$ 등의 활성 산소들 중, 오직 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCl^-)만을 선택적으로 검출하기 위한 용도로 사용할 수 있다.

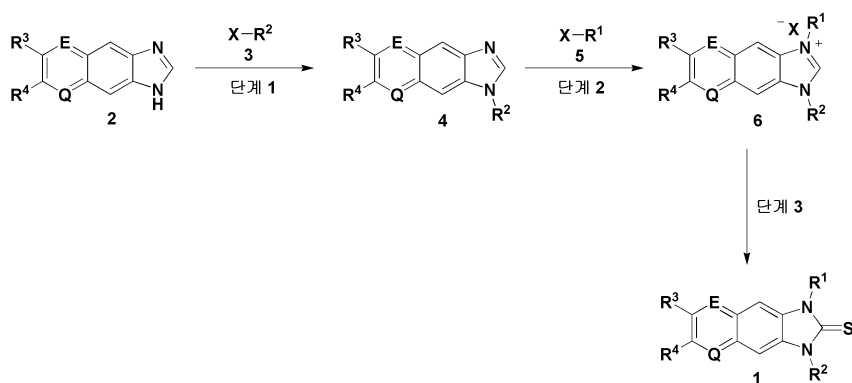
[0087] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0088] 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);

[0089] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2); 및

[0090] 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물에 황(sulfur)을 첨가하고 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0091] [반응식 1]



[0092]

[0093] 상기 반응식 1에 있어서,

[0094] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , E 및 Q는 독립적으로 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고;

[0095] X는 할로겐이다.

- [0097] 이하, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.
- [0099] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이며, 보다 구체적으로는 용매에 용해된 화학식 2로 표시되는 화합물에 광유(mineral oil)를 첨가 교반한 후, 화학식 3으로 표시되는 화합물을 첨가하고 추가로 교반하여 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0100] 이때, 상기 반응 용매로는 테트라하이드로퓨란; 다이옥산; 에틸에테르, 1,2-다이메톡시에탄 등을 포함하는 에테르용매; 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 포함하는 저급 알코올; 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄, 물, 아세트나이트릴, 아세트나젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시크레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 사용할 수 있으며, 테트라하이드로퓨란을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0101] 또한, 상기 광유(mineral oil)는 NaH를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0102] 나아가, 반응온도는 0℃에서 용매의 비등점 사이에서 수행하는 것이 바람직하고, 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.
- [0104] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜, 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0105] 이때, 상기 반응온도는 0℃에서 용매의 비등점 사이에서 수행하는 것이 바람직하고, 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.
- [0107] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물에 황(sulfur)을 첨가하고 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이며, 보다 구체적으로는 용매에 화학식 6으로 표시되는 화합물, 황(sulfur) 및 염기를 첨가하고 교반하여 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0108] 이때, 상기 반응 용매로는 테트라하이드로퓨란; 다이옥산; 에틸에테르, 1,2-다이메톡시에탄 등을 포함하는 에테르용매; 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 포함하는 저급 알코올; 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄, 물, 아세트나이트릴, 아세트나젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시크레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 사용할 수 있으며, 무수 메탄올을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0109] 또한, 상기 염기로는 포타슘 tert-부톡사이드, 포타슘하이드록사이드, 소듐하이드록사이드, 리튬하이드록사이드 등을 사용할 수 있으며, 포타슘 tert-부톡사이드를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0110] 나아가, 이때, 상기 반응온도는 0℃에서 용매의 비등점 사이에서 수행하는 것이 바람직하고, 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.
- [0112] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 치아염소산(OCl^-) 검출용 화학센서를 제공한다. 여기서, 상기 화학센서는 생체시료 중에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 것을 특징으로 한다.

- [0114] 나아가, 본 발명은 시료에 상기 화학센서를 첨가하는 단계(단계 1);
- [0115] 상기 단계 1에서 준비한 시료에 광원을 조사하는 단계(단계 2); 및
- [0116] 형광 또는 흡광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 치아염소산(OCl^-)의 검출방법을 제공한다.
- [0118] 이하, 본 발명에 따른 치아염소산(OCl^-)의 검출방법을 단계별로 상세히 설명한다.
- [0120] 본 발명에 따른 치아염소산(OCl^-)의 검출방법에 있어서, 상기 단계 1은 시료에 상기 화학센서를 첨가하는 단계이다. 여기서, 상기 시료는 생체시료인 것이 바람직하고, 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포인 것이 가장 바람직하다.
- [0122] 본 발명에 따른 치아염소산(OCl^-)의 검출방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 준비한 시료에 광원을 조사하는 단계이다. 여기서, 상기 광원은 형광 분광광도계 또는 UV 흡수 분광법을 사용하여 조사하는 것이 바람직하다.
- [0124] 본 발명에 따른 치아염소산(OCl^-)의 검출방법에 있어서, 상기 단계 3은 형광 또는 흡광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합하여 측정하는 단계이다. 즉, 구체적으로 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 5각형 고리에 결합되어 있는 황(sulfur) 원자가 치아염소산(OCl^-)과 반응함으로써 산화되어 떨어져 나가, 양전하를 띠는 이미다졸리움이 생성됨으로써 발생하는 π -공액계(π -conjugation system) 변화에 기인하는 형광 또는 흡광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합함으로써 치아염소산(OCl^-)을 검출할 수 있다.
- [0126] 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 또는 흡광 스펙트럼이 변화할 것이라 예상되었으며, 이를 증명하기 위하여 하기 일련의 실험을 수행하였다.
- [0128] 먼저, 중성 환경에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 스펙트럼의 505nm 부근의 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났다(실험예 <1-1>의 도 1 참조).
- [0130] 또한, 중성 환경에서 PBS(50 mM, pH 7.4)에 용해된 실시예 1에서 제조한 화합물($2\mu\text{M}$)과 치아염소산(OCl^-)이 반응하여 증가된 형광 강도가 시간에 따라 안정하게 유지되는지 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응하여 증가된 505nm 부근의 형광 강도는 2.5시간 동안 안정하게 유지되는 것으로 나타났으며, 실시예 1에서 제조한 화합물의 치아염소산(OCl^-)에 대한 검출하한(lower limit of detection) 농도값이 $0.071\mu\text{M}$ 이라는 것을 확인하였다(실험예 <1-1>의 도 4 참조).
- [0132] 나아가, 중성 환경에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 흡수 스펙트럼의 420nm 부근의 흡수 피크 강도가 감소하고, 378nm 부근의 흡수 피크 강도가 증가하는 것으로 나타났다(실험예 <1-2>의 도 2

참조).

- [0134] 또한, 중성 환경에서 형광 스펙트럼 변화를 통해 치아염소산(OCl^-)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 오직 치아염소산(OCl^-)과 반응하였을 때 505nm 부근의 형광강도가 증가하는 것으로 확인되었다(실험예 2의 도 5 참조).
- [0136] 나아가, 중성 환경에서 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 스펙트럼의 450nm 부근의 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났다(실험예 <3-1>의 도 6 참조).
- [0138] 또한, 중성 환경에서 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 흡수 스펙트럼의 342nm 부근의 흡수 피크 강도가 감소하고, 325nm 부근의 흡수 피크 강도가 증가하는 것으로 나타났다(실험예 <3-2>의 도 7 참조).
- [0140] 나아가, 중성 환경에서 형광 스펙트럼 변화를 통해 치아염소산(OCl^-)에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 오직 치아염소산(OCl^-)과 반응하였을 때 450nm 부근의 형광강도가 증가하는 것으로 확인되었다(실험예 4의 도 9 참조).
- [0142] 또한, 산성 환경에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 스펙트럼의 493nm 부근의 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났다(실험예 <5-1>의 도 10 참조).
- [0144] 나아가, 산성 환경에서 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 흡수 스펙트럼의 425nm 부근의 흡수 피크 강도가 감소하고, 376nm 부근의 흡수 피크 강도가 증가하는 것으로 나타났다(실험예 <5-2>의 도 11 참조).
- [0146] 또한, 산성 환경에서 형광 스펙트럼 변화를 통해 치아염소산(OCl^-)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 오직 치아염소산(OCl^-)과 반응하였을 때 493nm 부근의 형광강도가 증가하는 것으로 확인되었다(실험예 6의 도 12 참조).
- [0148] 나아가, 실시예 1에서 제조한 화합물의 헬라 세포(Hela cell)에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 0-20 μM 농도 범위에서 헬라 세포(Hela cell)에 대한 세포 독성이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 구체적으로, 실시예 1에서 제조한 화합물을 20 μM 농도로 처리한 경우에도 헬라 세포(Hela cell)의 생존도가 80% 이상인 것으로 나타나 살아있는 세포에 적용 가능함을 확인하였다(실험예 <7-2>의 도 13 참조).

- [0150] 또한, 실시예 1에서 제조한 화합물의 RAW 264.7 세포(대식세포주)에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 RAW 264.7 세포(대식세포주)에 대한 세포 독성이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 구체적으로, 실시예 1에서 제조한 화합물을 100 μ M로 처리한 경우 RAW 264.7 세포(대식세포주)의 생존도가 80% 이상인 것으로 나타나 살아있는 세포에 적용 가능함을 확인하였다(실험예 <7-3>의 도 14 참조).
- [0152] 나아가, 헬라 세포(Hela cell) 내 외인성 치아염소산(OCl^-)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력의 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 도 15(a)에 나타난 바와 같이, NaOCl을 처리하지 않고 헬라 세포(Hela cell)에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M만을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 15(b) 및 도 15(c)에 나타난 바와 같이, NaOCl의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났다. 이로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물이 헬라 세포(Hela cell)의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있을 뿐만 아니라, 실시예 1에서 제조한 화합물이 헬라 세포(Hela cell) 내에서 치아염소산(OCl^-)의 농도 변화에 따른 비율계량적인(ratiometric) 반응이 우수하다는 것을 확인할 수 있다(실험예 <8-1>의 도 15 참조).
- [0154] 또한, RAW 264.7 세포(대식세포주) 내 내인성 치아염소산(OCl^-)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력의 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 도 16(a)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하지 않고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 16(b)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되었다. 이로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물이 RAW 264.7 세포의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있다.
- [0156] 또한, 도 16(c) 및 도 16(d)에 나타난 바와 같이, MPO 억제제를 추가로 첨가한 경우 형광이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 이로부터, 치아염소산(OCl^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCl^-)으로 전환됨을 다시 확인하였다(실험예 <8-2>의 도 16 참조).
- [0158] 나아가, 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포를 공생-배양(co-culture)하며, 내인성 치아염소산(OCl^-)에 대하여 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력의 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 도 17(a)에 나타난 바와 같이, 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하지 않고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 17(b)에 나타난 바와 같이, 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되었다. 또한, 미분간섭 채널에 나타난 바와 같이 헬라 세포(Hela cell)와 RAW 264.7 세포는 서로 다른 모양인 것으로 확인하였다. 구체적으로, 축 모양 세포(빨간색 화살표)는 헬라 세포(Hela cell)를 나타내고, 둥근 모양 세포(파란색 화살표)는 RAW 264.7 세포를 나타낸다. 이로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물이 RAW 264.7 세포의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있다.
- [0160] 또한, 도 17(c) 및 도 17(d)에 나타난 바와 같이, MPO 억제제를 추가로 첨가한 경우 형광이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 이로부터, 치아염소산(OCl^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCl^-)으로 전환됨을 다시 확인하였다(실험예 9의 도 17 참조).

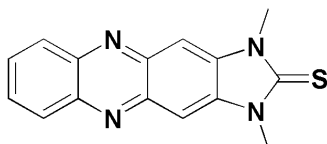
- [0162] 나아가, 이-광자 현미경(Two-Photon Microscopy, TPM)을 사용하여 실시예 1에서 제조한 화합물의 치아염소산 검출능력을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 도 18(a)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하지 않고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 18(b) 및 도 18(c)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μM 을 30분 동안 전처리하거나 RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되었다. 이로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물이 RAW 264.7 세포의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있다.
- [0164] 또한, 도 18(d) 및 도 18(e)에 나타난 바와 같이, MPO 억제제를 추가로 첨가한 경우 형광이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 이로부터, 치아염소산(OCl^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCl^-)으로 전환됨을 다시 확인하였다.
- [0166] 나아가, 도 18(f)에 나타난 바와 같이, 이미다졸리움을 포함하는 화합물(실시예 1의 단계 2 화합물) 10 μM 을, NaOCl 200 μM 로 전처리한 RAW 264.7 세포에 라벨한 경우 형광이 관찰되는 것으로 확인함으로써, 상기 형광 변화는, 상기 실험예 1의 도 3에서 확인한 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물의 5각형 고리에 결합되어 있는 황(sulfur) 원자가 치아염소산(OCl^-)과 반응함으로써 산화되어 떨어져 나가, 양전하를 띄는 이미다졸리움이 생성됨으로써 발생하는 π -공액계(π -conjugation system) 변화에 기인하는 것을 확인하였다.
- [0168] 또한, 도 18(g)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포에 NaOCl을 전처리하지 않거나[도 18(a)], MPO 억제제를 추가로 첨가하여 치아염소산(OCl^-)의 발생을 억제시킨 군[도 18(d), 도 18(e)]의 경우 형광 강도가 매우 약하게 관찰되었다. 이에 반하여, RAW 264.7 세포에 NaOCl을 전처리하거나[도 18(b)], 치아염소산(OCl^-)의 발생을 유도하거나[도 18(c)], 실시예 1의 화합물이 치아염소산(OCl^-)과 반응하여 형성되는 화합물(실시예 1의 단계 2 화합물)을 NaOCl로 전처리한 세포에 처리한 군[도 18(f)]의 경우 강한 형광 강도가 관찰되는 것으로 나타났다(실험예 10의 도 18 참조).
- [0170] 나아가, 실시예 1에서 제조한 화합물의 광 안정성(Photostability)를 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 도 19(a)에 나타난 바와 같이, NaOCl을 처리하지 않은 군은 형광이 관찰되지 않았으며, 도 19(b)에 나타난 바와 같이 NaOCl을 처리한 경우 형광이 관찰되는 것으로 나타났다. 또한, 상기 각 군에 대하여 TPEF(Two-Photon-Excited Fluorescence)의 변화를 관찰한 경우 약 1시간 동안 형광 강도가 유지되는 것으로 나타나 광 안정성(photostability)이 우수함을 확인하였다(실험예 11의 도 19 참조).
- [0172] 또한, 래트 해마 절편(rat hippocampal slice) 내 치아염소산 검출능력을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 도 20(a) 및 도 20(d)에 나타난 바와 같이, 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM 을 처리한 군에서 관찰 가능한 정도인 형광이 나타났다. 이와 비교하여, 도 20(b) 및 도 20(e)에 나타난 바와 같이, 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCl^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM 을 처리한 군에서는 보다 더욱 강한 형광이 관찰되었다. 또한, 도 20(c) 및 도 20(f)에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 화합물이 치아염소산(OCl^-)과 반응하여 형성되는 화합물(실시예 1의 단계 2 화합물) 100 μM 을 처리한 군에서도 강한 형광이 관찰되었다(실험예 12의 도 20 참조).
- [0174] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내에서도 그 구조가 유지되며, 외인성

또는 내인성 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 세포 내에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0176] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0177] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0179] <실시예 1> 1,3-디메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진-2(3H)-티온의 제조



[0180]

[0181] 단계 1 : 1-메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진의 제조

[0182] 얼음 조 하, 1H-이미다조[4,5-b]페나진 (2.0 g, 9.08 mmol) 및 테트라하이드로퓨란 (20 mL) 혼합물에 NaH (광유(mineral oil) 내 70%, 544.9 mg, 13.62 mmol)를 첨가하고, 상기 혼합물을 30초 동안 교반하였다. 이후, CH_3I (1 mL, 16.06 mmol)를 첨가하고 얼음 조를 제거한 후, 상기 혼합물을 상온에서 하루 동안 교반하였다. 용매를 제거한 후, 물을 첨가하고 CHCl_3 로 세척하였다. 유기층을 수집하고, 무수 MgSO_4 로 건조하였다. 이동상으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (30/1, v/v)를 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 표제 화합물을 노란색의 고체 형태로 제조하였다(1.161 g, 4.96 mmol, 54.6%).

[0183] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8.72 (d, 1H), 8.30-8.19 (m, 4H), 7.84-7.78 (m, 2H), 4.01 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 151.25, 148.01, 143.01, 142.74, 140.44, 140.11, 139.47, 130.15, 129.71, 129.68, 129.31, 118.14, 105.29, 31.51. FAB-MS: m/z = 234.0908 $[\text{M}]^+$, calc for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4$ =234.0905; m/z = 235.0982 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_4$ =235.0984.

[0185] 단계 2 : 1,3-디메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진-3-이움 아이오다이드의 제조

[0186] 봉인된 튜브(tube) 내에서, 상기 단계 1에서 제조한 1-메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진 (21.7 mg, 0.119 mmol) 및 CH_3I (200 μL)를 70°C에서 17시간 동안 교반하였다. 상온으로 냉각한 후, 상기 잔여물을, 이동상으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/1 내지 15/1, v/v)를 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 표제 화합물을 적색의 고체 형태로 제조하였다(12.8 mg, 0.034 mmol, 28.7%).

[0187] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8.05-7.98 (m, 2H), 7.63-7.58 (m, 2H), 6.19 (s, 2H), 6.10(s, 1H), 2.88(s, 6H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 145.29, 144.07, 140.22, 128.08, 127.18, 98.85, 93.47, 29.18. FAB-MS: m/z =249.1137 $[\text{M}]^+$, calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_4$ =249.1135.

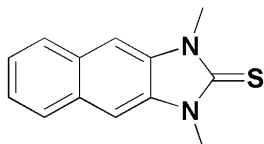
[0189] 단계 3 : 1,3-디메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진-2(3H)-티온의 제조

[0190] 상기 단계 2에서 제조한 1,3-디메틸-1H-이미다조[4,5-b]페나진-3-이움 아이오다이드(24.9 mg, 0.0662 mmol), 황(41.9 mg, 1.307 mmol) 및 무수 메탄올 (6 mL)에 용해된 포타슘 tert-부톡사이드(0.1479 g, 1.318 mmol)를 65°C에서 15시간 동안 교반하였다. 용매를 제거한 후, CH_2Cl_2 를 첨가하고 물로 세척하였다. 유기층을 수집하고, MgSO_4 로 건조하였다. 이동상으로서 에틸 아세테이트/헥산 (1/2, v/v)을 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 통해

정제하여 표제 화합물을 오렌지 색의 고체 형태로 제조하였다(11.4 mg, 0.0407 mmol, 61.5%).

[0191] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8.22-8.16 (m, 2H), 7.84-7.78 (m, 2H), 7.76 (s, 2H), 3.89 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 142.65, 141.32, 137.36, 130.02, 129.19, 103.95, 31.50. FAB-MS: m/z =281.0858 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{S}$ =281.0861.

[0193] <실시예 2> 1,3-디메틸-1H-나프토[2,3-d]이미다졸-2(3H)-티온의 제조



[0194]

[0195] 단계 1 : 1,3-디메틸-1H-나프토[2,3-d]이미다졸-3-이움 아이오다이드의 제조

[0196] 1-메틸-1H-나프토[2,3-d]이미다졸(107.7 mg, 0.591 mmol) 및 CH_3CN 에 용해된 CH_3I (150 μL , 2.409 mmol)를 환류 하 12시간 동안 교반하였다. 상온으로 냉각한 후, 용매를 제거하였다. 상기 잔여물은, 이동상으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (20/1 내지 15/1, v/v)를 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 표제 화합물을 흰색의 고체 형태로 제조하였다(0.1699 g, 0.524 mmol, 88.7%).

[0197] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ (ppm): 9.82 (s, 1H), 8.60 (s, 2H), 8.24-8.19 (m, 2H), 7.70-7.65 (m, 2H), 4.15 (s, 6H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 147.17, 13.88, 130.82, 128.23, 126.54, 110.71, 33.33. FAB-MS: m/z =197.1077 $[\text{M}]^+$, calc for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2$ =197.1073.

[0199] 단계 2 : 1,3-디메틸-1H-나프토[2,3-d]이미다졸-2(3H)-티온의 제조

[0200] 황(50 mg, 1.56 mmol), 상기 단계 1에서 제조한 1,3-디메틸-1H-나프토[2,3-d]이미다졸-3-이움 아이오다이드 (100.3 mg, 0.309 mmol) 및 소듐 메톡사이드 (83.6 mg, 1.55 mmol) 혼합물에 메탄올 (무수, 4 mL)를 첨가하였다. 하루 동안 교반한 후, 용매를 제거하였다. CH_2Cl_2 를 첨가하고, 물로 세척하였다. 유기층을 수집한 후, MgSO_4 로 건조하였다. 이동상으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{헥산}$ (1/1, v/v)를 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 표제 화합물을 흰색의 고체 형태로 제조하였다(65.6 mg, 0.278 mmol, 93.0%).

[0201] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.92-7.89 (q, 2H), 7.49 (s, 2H), 7.47-7.44 (q, 2H), 3.87 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 173.36, 132.50, 130.20, 127.60, 124.87, 104.54, 31.21. FAB-MS: m/z =228.0722 $[\text{M}]^+$, calc for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$ =228.0721; m/z =229.0799 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{S}$ =229.0799.

[0203] 하기 표 1에 실시예 1-2에서 제조한 화합물의 화학구조식을 정리하여 나타내었다.

표 1

실시예	화학구조식	실시예	화학구조식
1		2	

[0204]

[0206] <실험예 1> 치아염소산 농도에 따른 형광 및 흡수 스펙트럼 변화 평가 1

[0207] <1-1> 형광 스펙트럼 변화 평가

[0208] 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0210] PBS(Phosphate buffered saline) 완충액(pH 7.4) 50 mM 내 실시예 1에서 제조한 화합물 2.0 μM 에 치아염소산(OCl^-)을 0-10 μM 의 농도별로 첨가함에 따라 변화하는 형광 스펙트럼을 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계를 사용하여 측정하였으며 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0212] 도 1은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-10 μM)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

[0214] 도 1에 나타난 바와 같이, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 스펙트럼의 505nm 부근의 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났다.

[0216] 또한, PBS(50 mM, pH 7.4)에 용해된 실시예 1에서 제조한 화합물(2 μM)과 치아염소산(OCl^-)이 반응하여 증가된 형광 강도가 시간에 따라 안정하게 유지되는지 평가하기 위하여, 치아염소산(OCl^-)을 각각 0 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM 로 사용하여 시간에 따른 형광 스펙트럼을 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계를 통해 측정하였으며 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0218] 도 4는 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM)을 반응시킬 때 시간에 따른 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

[0220] 도 4에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응하여 증가된 505nm 부근의 형광 강도는 2.5시간 동안 안정하게 유지되는 것으로 나타났으며, 실시예 1에서 제조한 화합물의 치아염소산(OCl^-)에 대한 검출하한(lower limit of detection) 농도값이 0.071 μM 이라는 것을 확인하였다.

[0222] <1-2> 흡수 스펙트럼 변화 평가

[0223] 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0225] PBS(Phosphate buffered saline) 완충액(pH 7.4) 50 mM 내 실시예 1에서 제조한 화합물 2.0 μM 에 치아염소산(OCl^-)을 0-30 μM 의 농도별로 첨가함에 따라 변화하는 흡수 스펙트럼을 25℃에서, 1cm의 광행로 길이(optical path length) 셀을 사용하는 Scinco S-3100를 통해 UV 흡수 분광법 측정을 수행하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다.

- [0227] 도 2는 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-30 μM)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0229] 도 2에 나타난 바와 같이, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 흡수 스펙트럼의 420nm 부근의 흡수 피크 강도가 감소하고, 378nm 부근의 흡수 피크 강도가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0231] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 유도되는 형광 및 흡수 스펙트럼의 변화는 도 3과 같은 메커니즘을 통해 반응하여 양이온을 띄는 이미다졸리움이 형성됨으로써 유도되는 것으로 예상할 수 있다.
- [0233] 도 3은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 반응 메커니즘을 나타내는 이미지이다.
- [0235] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 중성 조건에서 치아염소산(OCl^-)과 반응하여 형광 및 흡수 스펙트럼이 변화하므로, 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0237] <실험예 2> 치아염소산 선택성 평가 1
- [0238] 형광 스펙트럼 변화를 통해 치아염소산(OCl^-)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0240] PBS(Phosphate buffered saline) 완충액(pH 7.4) 50 mM 내 실시예 1에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 치아염소산(OCl^-)을 0-10 μM 의 농도로 사용하는 대신에, 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS), 보다 구체적으로는 H_2O_2 (1mM), TBHP(1mM, tert-butyl hydroperoxide), $\text{NO}\cdot$ (1mM), $\text{ROO}\cdot$ [1mM, 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)디하이드로클로라이드인 AAPH(2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydro-chloride)로부터 $\text{ROO}\cdot$ (페록실 라디칼, peroxy radical)을 얻음], $\text{ONOO}\cdot$ (100 μM), $\cdot\text{OH}$ (200 μM), OCl^- (10 μM)를 사용하며 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0242] 도 5는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)을 각각 실시예 1에서 제조한 화합물과 반응시켰을 때 관찰되는 형광 스펙트럼(505nm 부근의 형광강도, a.u.)을 나타내는 이미지이다.
- [0244] 도 5에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 오직 치아염소산(OCl^-)과 반응하였을 때 505nm 부근의 형광강도가 증가하는 것으로 확인되었다.
- [0246] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 중성 조건에서 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

- [0248] <실험예 3> 치아염소산 농도에 따른 형광 및 흡수 스펙트럼 변화 평가 2
- [0249] <3-1> 형광 스펙트럼 변화 평가
- [0250] 실시예 1에서 제조한 화합물을 사용하는 대신에, 실시예 2에서 제조한 화합물을 사용하고; 치아염소산(OCl^-)을 0-10 μM 을 사용하는 대신에, 치아염소산(OCl^-)을 0-50 μM 로 사용하는 것을 제외하고; 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0252] 도 6은 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-50 μM)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0254] 도 6에 나타난 바와 같이, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 스펙트럼의 450nm 부근의 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0256] <3-2> 흡수 스펙트럼 변화 평가
- [0257] 실시예 1에서 제조한 화합물을 사용하는 대신에, 실시예 2에서 제조한 화합물을 사용하는 것을 제외하고 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0259] 도 7은 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-30 μM)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0261] 도 7에 나타난 바와 같이, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 흡수 스펙트럼의 342nm 부근의 흡수 피크 강도가 감소하고, 325nm 부근의 흡수 피크가 남아있는 것으로 나타났다.
- [0263] 상기 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 유도되는 형광 및 흡수 스펙트럼의 변화는 도 8과 같은 메커니즘을 통해 반응하여 양이온을 띄는 이미다졸리움이 형성됨으로써 유도되는 것으로 예상할 수 있다.
- [0265] 도 8은 실시예 2에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^-)이 반응할 때 반응 메커니즘을 나타내는 이미지이다.
- [0267] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 중성 조건에서 치아염소산(OCl^-)과 반응하여 형광 및 흡수 스펙트럼이 변화하므로, 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0269] <실험예 4> 치아염소산 선택성 평가 2
- [0270] 실시예 1에서 제조한 화합물을 사용하는 대신에, 실시예 2에서 제조한 화합물을 사용하는 것을 제외하고 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

- [0272] 도 9는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)을 각각 실시예 2에서 제조한 화합물과 반응시켰을 때 관찰되는 형광 스펙트럼(450nm 부근의 형광강도, a.u.)을 나타내는 이미지이다.
- [0274] 도 9에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물은 오직 치아염소산(OCl^-)과 반응하였을 때 450nm 부근의 형광강도가 증가하는 것으로 확인되었다.
- [0276] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 중성 조건에서 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0278] <실험예 5> 치아염소산 농도에 따른 형광 및 흡수 스펙트럼 변화 평가 3
- [0279] <5-1> 형광 스펙트럼 변화 평가
- [0280] 치아염소산(OCl^-)을 0-10 μM 을 사용하는 대신에, 치아염소산(OCl^-)을 0-50 μM 을 사용하고; PBS(Phosphate buffered saline) 완충액(pH 7.4)을 사용하는 대신에, KH_2PO_4 완충액(pH 5.0)을 사용하는 것을 제외하고; 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0282] 도 10은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-50 μM)이 반응할 때 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0284] 도 10에 나타난 바와 같이, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 스펙트럼의 493nm 부근의 형광강도가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0286] <5-2> 흡수 스펙트럼 변화 평가
- [0287] 치아염소산(OCl^-)을 0-30 μM 을 사용하는 대신에, 치아염소산(OCl^-)을 0-100 μM 을 사용하고; PBS(Phosphate buffered saline) 완충액(pH 7.4)을 사용하는 대신에, KH_2PO_4 완충액(pH 5.0)을 사용하는 것을 제외하고; 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0289] 도 11은 실시예 1에서 제조한 화합물과 치아염소산(OCl^- , 0-100 μM)이 반응할 때 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0291] 도 11에 나타난 바와 같이, 치아염소산(OCl^-)의 첨가 농도를 증가시킬수록 흡수 스펙트럼의 425nm 부근의 흡수 피크 강도가 감소하고, 376nm 부근의 흡수 피크 강도가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0293] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 산성 조건에서 치아염소산(OCl^-)과 반응하여 형광 및 흡수 스펙트럼이 변화하므로, 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0294]

[0295] <실험예 6> 치아염소산 선택성 평가 3

[0296] PBS(Phosphate buffered saline) 완충액(pH 7.4)을 사용하는 대신에, KH_2PO_4 완충액(pH 5.0)을 사용하는 것을 제외하고; 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0298] 도 12는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)을 각각 실시예 1에서 제조한 화합물과 반응시켰을 때 관찰되는 형광 스펙트럼(493nm 부근의 형광강도, a.u.)을 나타내는 이미지이다.

[0300] 도 12에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 오직 치아염소산(OCl^-)과 반응하였을 때 493nm 부근의 형광강도가 증가하는 것으로 확인되었다.

[0302] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 산성 조건에서 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0304] <실험예 7> 세포독성 평가

[0305] 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0307] <7-1> 세포 배양

[0308] 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포(대식세포주)는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)으로부터 얻었고, 37℃ 5% CO_2 환경하에서 10× 배양 배지[1% 프로티오스 펩톤(proteose peptone), 0.2% 글루코스, 0.1% 효모 추출물(yeast extract), 0.003% Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 페릭(ferric)소듐염] 내 유리 슬라이드(glass slide) 표면에서 배양하였다. 구체적으로, 세포들은 제조업자의 지시사항에 따라 6-웰 플레이트 내에 스크래핑(Scraping)하고 부착시켜 배양하였다.

[0310] <7-2> 세포독성 평가 1

[0311] 상기 실험예 <7-1>에서 준비한 헬라 세포(Hela cell)를 배양 배지에서 96-웰 플레이트에 시드(seeded)하였다. 24시간 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 각각 0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM 농도로 6시간 동안 상기 세포와 함께 배양하였다. 6시간 후, 상기 세포를 0.5 mg/ml MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide)를 함유하는 세포 배양 배지에서 3시간 동안 배양하고, 배지를 제거하였다. 생성된 포르마잔(formazan)을 0.1 ml의 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시키고, Spectramax Microwell plate reader를 사용하여 OD 650 nm를 측정하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0313] 도 13은 헬라 세포(Hela cell)에 대한 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가한 결과를 나타내는 이미지이다.

[0315] 도 13에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 0-20 μM 농도 범위에서 헬라 세포(Hela cell)에 대한 세포 독성이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 구체적으로, 실시예 1에서 제조한 화합물을 20 μM 농도로 처리한 경우에도 헬라 세포(Hela cell)의 생존도가 80% 이상인 것으로 나타나 살아있는 세포에 적용 가능함을 확인하였다.

- [0317] <7-3> 세포독성 평가 2
- [0318] 상기 실험예 <7-1>에서 준비한 RAW 264.7 세포(대식세포주)를 배양 배지에서 96-웰 플레이트에 시드(seeded)하였다. 24시간 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μ M을 2시간 동안 상기 세포와 함께 배양하였다. 이후 상기 실험예 <7-2>와 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 14에 나타내었다.
- [0320] 도 14는 RAW 264.7 세포(대식세포주)에 대한 실시예 1에서 제조한 화합물의 세포 독성을 평가한 결과를 나타내는 이미지이다.
- [0322] 도 14에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물은 RAW 264.7 세포(대식세포주)에 대한 세포 독성이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 구체적으로, 실시예 1에서 제조한 화합물을 100 μ M로 처리한 경우 RAW 264.7 세포(대식세포주)의 생존도가 80% 이상인 것으로 나타나 살아있는 세포에 적용 가능성을 확인하였다.
- [0324] <실험예 8> 생체세포 내 치아염소산 검출능력 평가 1
- [0325] 생체세포 내 외인성 및 내인성 치아염소산(OCl^-)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력의 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0327] <8-1> 생체세포 내 외인성 치아염소산(OCl^-) 검출능력 평가
- [0328] 상기 실험예 <7-1>에서 준비한 헬라 세포(Hela cell)에 NaOCl을 각각 0 μ M, 100 μ M, 200 μ M로 20분 동안 처리하고, DPBS(pH 7.4, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 세척한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리하였다. 20분 동안 배양한 후, DPBS로 세척하여 세포의 형광 이미지를 얻었다. 여기서 상기 세포의 형광 이미지는 공초점 현미경(confocal microscope)을 사용하였으며, 구체적으로 상기 공초점 현미경은 공초점 레이저 스캐닝 생물 현미경(confocal laser scanning biological microscope, Olympus, FV1200, Japan) 및 고해상도 STED 레이저 공초점 현미경(super resolution STED(stimulated emission depletion) laser confocal microscopy, Leica TCS SP8, Germany)을 사용하였다(여기 원 : 405nm 다이오드 레이저, 발광 : 490-590nm). 그 결과를 도 15에 나타내었다.
- [0330] 도 15(a)는 헬라 세포(Hela cell)에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.
- [0331] 도 15(b)는 헬라 세포(Hela cell)에 NaOCl 100 μ M 및 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.
- [0332] 도 15(c)는 헬라 세포(Hela cell)에 NaOCl 200 μ M 및 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.
- [0334] 도 15(a)에 나타난 바와 같이, NaOCl을 처리하지 않고 헬라 세포(Hela cell)에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M만을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 15(b) 및 도 15(c)에 나타난 바와 같이, NaOCl의 첨가 농도를 증가시킬수록 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났다. 이로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물이 헬라 세포(Hela cell)의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있을 뿐만 아니라, 실시예 1에서 제조한 화합물이 헬라 세포(Hela cell) 내에서 치아염소산(OCl^-)의 농도 변화에 따른 비율계량적 인(ratiometric) 반응이 우수하다는 것을 확인할 수 있다.
- [0336] <8-2> 생체세포 내 내인성 치아염소산(OCl^-) 검출능력 평가

- [0337] 헬라 세포(Hela cell)는 자체적으로 치아염소산(OCl^-)을 생산하는 것으로 알려져 있으나(H. Zhu, J. Fan, J. Wang, H. Mu, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12820-12823.), 그 농도가 매우 낮아(약 8.23 nM) 실시예 1에서 제조한 화합물로는 검출이 힘든 것으로 나타났다(실험예 <8-1>, 도 15(a) 참조). 이에, 내인성 치아염소산(OCl^-) 발생을 유도하기 용이한 RAW 264.7 세포를 사용하였다.
- [0339] RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCl^-) 생성을 유도하였다. 구체적으로, 상기 치아염소산(OCl^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCl^-)으로 전환된다. 이후, 상기 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 를 20분 동안 처리한 후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하고 상기 실험예 <8-2>에서 사용한 공초점 현미경을 사용하여 이미지화하였다(도 16(b)).
- [0341] 또한, 상기와 같이 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoic acid hydrazide), FFA(flufenamic acid)를 각각 50 μM 씩 처리하였다. 이후, 상기 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 를 20분 동안 처리한 후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하고 상기 실험예 <8-2>에서 사용한 공초점 현미경을 사용하여 이미지화하였다(도 16(c):4-ABAH 처리군, 도 16(d):FFA 처리군). 그 결과를 도 16에 나타내었다.
- [0343] 도 16(a)는 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.
- [0344] 도 16(b)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCl^-) 생성을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.
- [0345] 도 16(c)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoic acid hydrazide) 50 μM 을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.
- [0346] 도 16(d)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 FFA(flufenamic acid) 50 μM 을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 하부:미분간섭 채널]이다.
- [0348] 도 16(a)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하지 않고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 16(b)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되었다. 이로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물이 RAW 264.7 세포의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있다.

- [0350] 또한, 도 16(c) 및 도 16(d)에 나타난 바와 같이, MPO 억제제를 추가로 첨가한 경우 형광이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 이로부터, 치아염소산(OCl^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCl^-)으로 전환됨을 다시 확인하였다.
- [0352] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 세포 내에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0354] <실험예 9> 생체세포 내 치아염소산 검출능력 평가 2
- [0355] 종양 조직에서 대식세포는 TAMs(Tumor Associated Macrophages)라고 불리며, 전-종양형성(pro-tumorigenesis) 및 항-종양 활성(anti-tumor activity)을 갖는 것으로 알려져 있다. 즉, 종양 조직에서 암세포 및 TAMs와 연결되는 상호작용 네트워크(network)를 명확하게 하는 것이 필요하다. 이에, 상기 실험예 <7-1>에서 준비한 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포를 공생-배양(co-culture)하였으며, 이후 실험은 상기 실험예 <8-2>와 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.
- [0357] 도 17(a)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 $10\text{ }\mu\text{M}$ 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.
- [0358] 도 17(b)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml , 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml , 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCl^-) 생성을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 $10\text{ }\mu\text{M}$ 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.
- [0359] 도 17(c)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml , 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml , 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoicacid hydrazide) $50\text{ }\mu\text{M}$ 을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 $10\text{ }\mu\text{M}$ 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.
- [0360] 도 17(d)는 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml , 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml , 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 FFA(flufenamic acid) $50\text{ }\mu\text{M}$ 을 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 $10\text{ }\mu\text{M}$ 을 처리한 경우 관찰되는 이미지[상부:형광 채널, 중부:미분간섭 채널, 하부:형광 채널+미분간섭 채널]이다.
- [0362] 도 17(a)에 나타난 바와 같이, 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하지 않고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 17(b)에 나타난 바와 같이, 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCl^-)을 발생시키도록 유도하고 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되었다. 또한, 미분간섭 채널에 나타난 바와 같이 헬라 세포(Hela cell)와 RAW 264.7 세포는 서로 다른 모양인 것으로 확인하였다. 구체적으로, 축 모양 세포(빨간색 화살표)는 헬라 세포(Hela cell)를 나타내고, 둥근 모양 세포(파란색 화살표)는 RAW 264.7 세포를 나타낸다. 이로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물이 RAW 264.7 세포의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있다.

[0364] 또한, 도 17(c) 및 도 17(d)에 나타난 바와 같이, MPO 억제제를 추가로 첨가한 경우 형광이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 이로부터, 치아염소산(OCI^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 헬라 세포(Hela cell) 및 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCI^-)으로 전환됨을 다시 확인하였다.

[0366] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCI^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 세포 내에서 치아염소산(OCI^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0368] <실험예 10> 이-광자 현미경(Two-Photon Microscopy, TPM)을 사용한 치아염소산 검출능력 평가

[0369] 이-광자 현미경(Two-Photon Microscopy, TPM)을 사용하여 실시예 1에서 제조한 화합물의 치아염소산 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0371] <10-1> 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy) 준비

[0372] 프로브-라벨 세포 및 조직의 이-광자 형광 현미경 이미지는 분광 공초점(spectral confocal) 및 다광자 현미경(multiphoton microscopes, Leica TCS SP8 MP)을 사용하여 얻었다($\times 10$ dry, $\times 40$ oil 및 $\times 100$ oil objectives, 개구수(Numerical Aperture, NA):0.30, 1.30 및 1.30). 상기 이-광자 형광 현미경 이미지는 DMI6000B 현미경(Leica)와 함께, 상기 프로브를, 초점면(laser source)에서 대략 15 mW의 평균 전력에 대응하는 파장 800nm, 출력 전력 3110 mW으로 세팅한 모드-고정 티타늄-청옥 레이저원(mode-locked titanium-sapphire laser source, Mai Tai HP; Spectra Physics, 80 MHz pulse frequency, 100 fs pulse width)과 함께 여기(exciting) 시켜 얻었다. 400-500nm 범위의 이미지를 얻고, 400 Hz 스캔 속도(scan speed)에서 8비트 무부호(unsigned) 512 $\times$ 512 및 1024 $\times$ 1024 픽셀(pixels) 내 신호를 수집하기 위하여 내부 PMTs(Predetermined Motion Time system)를 사용하였다.

[0374] <10-2> 치아염소산 검출능력 평가

[0375] RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCI^-) 생성을 유도하였다. 구체적으로, 상기 치아염소산(OCI^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCI^-)으로 전환된다. 이후, 상기 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 를 20분 동안 처리한 후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하고 상기 실험예 <10-1>에서 준비한 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 형광 이미지와 형광 강도를 측정하였다.

[0377] 또한, 상기와 같이 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoic acid hydrazide), FFA(flufenamic acid)를 각각 50 μM 씩 처리하였다. 이후, 상기 RAW 264.7 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM 를 20분 동안 처리한 후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하고 상기 실험예 <10-1>에서 준비한 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 형광 이미지와 형광 강도를 측정하였다.

- [0379] 나아가, 상기 실험에 1의 도 3에서 확인한 바와 같이, 형광을 나타내는 이미다졸리움을 포함하는 화합물(실시에 1의 단계 2 화합물) 10 μ M을, NaOCl 200 μ M로 전처리한 RAW 264.7 세포에 라벨한 후, 실험에 <10-1>에서 준비한 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 형광 이미지와 형광 강도를 측정하였다. 그 결과를 도 18에 나타내었다.
- [0381] 도 18(a)는 RAW 264.7 세포에 어떤 처리도 수행하지 않고 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0382] 도 18(b)는 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 30분 동안 전처리하고, 실시에 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0383] 도 18(c)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하여 내인성 치아염소산(OCI^-) 생성을 유도한 후, 실시에 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0384] 도 18(d)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 4-ABAH(4-Aminobenzoic acid hydrazide) 50 μ M을 처리한 후, 실시에 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0385] 도 18(e)는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 16시간 동안 100 ng/ml, 인터페론- γ 를 4시간 동안 50 ng/ml, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 30분 동안 10 nM 처리하고, 추가적으로 MPO 억제제인 FFA(flufenamic acid) 50 μ M을 처리한 후, 실시에 1에서 제조한 화합물 10 μ M을 함께 배양한 후, 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0386] 도 18(f)는 형광을 나타내는 이미다졸리움을 포함하는 화합물(실시에 1의 단계 2 화합물) 10 μ M을, NaOCl 200 μ M로 전처리한 RAW 264.7 세포에 라벨한 후, 실험에 <10-1>에서 준비한 이-광자 형광 현미경(Two-Photon Fluorescence Microscopy)을 사용하여 형광 이미지이다.
- [0387] 도 18(g)는 상기 도 18(a-f)에 해당하는 군의 형광 강도를 각각 측정한 그래프를 나타내는 이미지이다.
- [0389] 도 18(a)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCI^-)을 발생시키도록 유도하지 않고 실시에 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여, 도 18(b) 및 도 18(c)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 30분 동안 전처리하거나 RAW 264.7 세포가 치아염소산(OCI^-)을 발생시키도록 유도하고 실시에 1에서 제조한 화합물을 처리한 경우 형광이 관찰되었다. 이로부터, 실시에 1에서 제조한 화합물이 RAW 264.7 세포의 세포질 내에 온전한 형태로 유지되는 것을 알 수 있다.
- [0391] 또한, 도 18(d) 및 도 18(e)에 나타난 바와 같이, MPO 억제제를 추가로 첨가한 경우 형광이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 이로부터, 치아염소산(OCI^-) 생성 유도는 PMA로 인하여 발생하는 H_2O_2 가 RAW 264.7 세포 내 존재하는 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)에 의한 촉매반응을 통해 치아염소산(OCI^-)으로 전환됨을 다시 확인하였다.
- [0393] 나아가, 도 18(f)에 나타난 바와 같이, 이미다졸리움을 포함하는 화합물(실시에 1의 단계 2 화합물) 10 μ M을,

NaOCl 200 μ M로 전처리한 RAW 264.7 세포에 라벨한 경우 형광이 관찰되는 것으로 확인함으로써, 상기 형광 변화는, 상기 실험에 1의 도 3에서 확인한 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물의 5각형 고리에 결합되어 있는 황(sulfur) 원자가 치아염소산(OCl^-)과 반응함으로써 산화되어 떨어져 나가, 양전하를 띠는 이미다졸리움이 생성됨으로써 발생하는 π -공액계(π -conjugation system) 변화에 기인하는 것을 확인하였다.

[0395] 또한, 도 18(g)에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포에 NaOCl을 전처리하지 않거나[도 18(a)], MPO 억제제를 추가로 첨가하여 치아염소산(OCl^-)의 발생을 억제시킨 군[도 18(d), 도 18(e)]의 경우 형광 강도가 매우 약하게 관찰되었다. 이에 반하여, RAW 264.7 세포에 NaOCl을 전처리하거나[도 18(b)], 치아염소산(OCl^-)의 발생을 유도하거나[도 18(c)], 실시예 1의 화합물이 치아염소산(OCl^-)과 반응하여 형성되는 화합물(실시예 1의 단계 2 화합물)을 NaOCl로 전처리한 세포에 처리한 군[도 18(f)]의 경우 강한 형광 강도가 관찰되는 것으로 나타났다.

[0397] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 세포 내에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0399] <실험예 11> 광 안정성(photostability) 평가

[0400] RAW 264.7 세포에서 실시예 1에서 제조한 화합물의 광 안정성은 프로브-라벨된 RAW 264.7 세포의 세 위치(three designated positions)에서 TPEF(Two-Photon-Excited Fluorescence)의 변화를 관찰함으로써 측정하였다. 구체적으로, xyt 모드를 사용하여 한시간 동안 2.00 sec 간격으로 디지털화된(digitized) 강도를 기록하였다. 상기 TPEF 강도는 펨토초(femto second, fs) 펄스(pulse)와 함께 400-500nm에서 수집하였으며, 800nm로 여기하였다(실험 반복횟수 $n = 3$).

[0402] 실험은 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 처리하지 않은 군[도 19(a)], 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M를 처리한 군[도 19(b)]으로 나누어 수행하였다. 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0404] 도 19(a)는 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 처리하지 않은 군의 형광 이미지이다.

[0405] 도 19(b)는 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 처리한 군의 형광 이미지이다.

[0406] 도 19(c)는 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M을 처리하지 않은 군[도 19(a)], 실시예 1에서 제조한 화합물이 라벨된 RAW 264.7 세포에 NaOCl 200 μ M를 처리한 군[도 19(b)]에 대하여 TPEF(Two-Photon-Excited Fluorescence)의 변화를 관찰한 이미지이다.

[0408] 도 19(a)에 나타난 바와 같이, NaOCl을 처리하지 않은 군은 형광이 관찰되지 않았으며, 도 19(b)에 나타난 바와 같이 NaOCl을 처리한 경우 형광이 관찰되는 것으로 나타났다. 또한, 상기 각 군에 대하여 TPEF(Two-Photon-Excited Fluorescence)의 변화를 관찰한 경우 약 1시간 동안 형광 강도가 유지되는 것으로 나타나 광 안정성(photostability)이 우수함을 확인하였다.

[0410] <실험예 12> 래트 해마 절편(rat hippocampal slice) 내 치아염소산 검출능력 평가

[0411] 래트 해마 절편(rat hippocampal slice) 내 치아염소산 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하

였다.

[0413] <12-1> 실험 준비

[0414] 해마 절편(hippocampal slice)을 30분 동안 PMA(10 ng/ml, Sigma)로 처리하였다. 이후, 상기 절편을 4% 포름알데하이드로 고정하고, PBS(Phosphate-buffered saline)에 용해된 0.2% 트리톤(Triton) X-100으로 투과하였다. 상기 절편을 Iba-1 항체(소교세포의 일차 항체, 1:200, Wako pure Chemical Industries)와 함께 25℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 절편은 Alexa Fluor 555(1:500, Invitrogen)으로 결합된 이차 항체와 함께 25℃에서 1시간 동안 배양하였다.

[0416] <12-2> 래트 해마 절편 내 치아염소산 검출능력 평가

[0417] 실험은 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군[도 20(a), 도 20(d)], 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCI^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군[도 20(b), 도 20(e)], 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 실시예 1 단계 2 화합물 100 μM을 처리한 군[도 20(c), 도 20(f)]으로 나누어 수행하였으며, 형광 이미지와 형광 강도는 상기 실험예 11과 동일한 방법으로 수행하여 측정하였다. 그 결과를 도 20에 나타내었다.

[0419] 도 20(a)는 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA1 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

[0420] 도 20(b)는 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCI^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA1 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

[0421] 도 20(c)는 해마 절편에 실시예 1 단계 2 화합물 100 μM을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA1 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

[0422] 도 20(d)는 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA3 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

[0423] 도 20(e)는 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCI^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA3 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

[0424] 도 20(f)는 해마 절편에 실시예 1 단계 2 화합물 100 μM을 처리한 군에 있어서, 상기 해마 절편의 CA3 부분의 형광을 관찰한 이미지이다.

[0425] 도 20(g)는 해마 절편 CA1 및 CA3 부분의 명시야(bright-field) 이미지이다.

[0426] 도 20(h)는 실험은 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군[도 20(a), 도 20(d)], 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCI^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군[도 20(b), 도 20(e)], 상기 실험예 <12-1>에서 준비한 해마 절편에 실시예 1 단계 2 화합물 100 μM을 처리한 군[도 20(c), 도 20(f)]의 형광 강도를 각각 측정한 그래프를 나타내는 이미지이다.

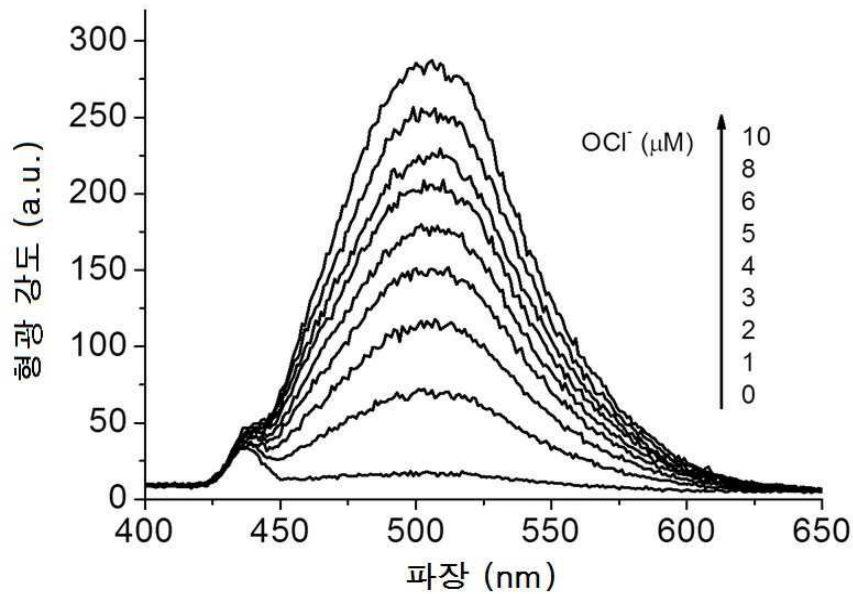
[0428] 도 20(a) 및 도 20(d)에 나타난 바와 같이, 해마 절편에 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군에서 관찰 가능한 정도인 형광이 나타났다. 이와 비교하여, 도 20(b) 및 도 20(e)에 나타난 바와 같이, 해마 절편에 PMA 10 ng/mL를 전처리하여 치아염소산(OCI^-) 발생을 유도한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 100 μM을 처리한 군에서는 보다 더욱 강한 형광이 관찰되었다. 또한, 도 20(c) 및 도 20(f)에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 화합물이 치아염소산(OCI^-)과 반응하여 형성되는 화합물(실시예 1의 단계 2 화합물) 100 μM을 처리한 군에서도 강

한 형광이 관찰되었다.

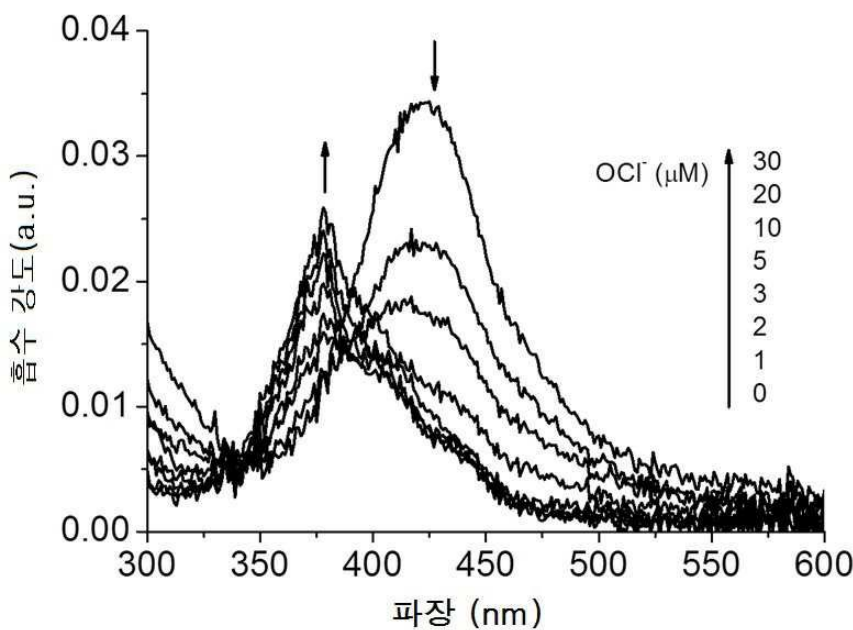
[0430] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸린-2-티온 구조 기반의 화합물은 세포 내에서도 그 구조가 유지되며, 외인성 또는 내인성 치아염소산(OCl^-)과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼이 변화하므로, 세포 내에서 치아염소산(OCl^-)을 검출하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

도면

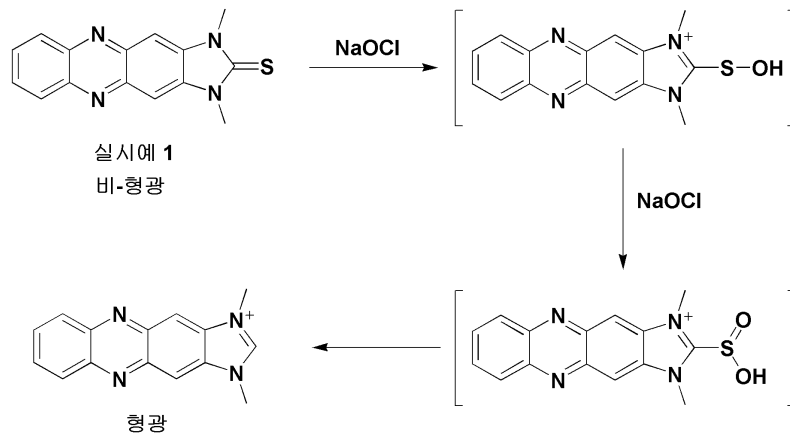
도면1



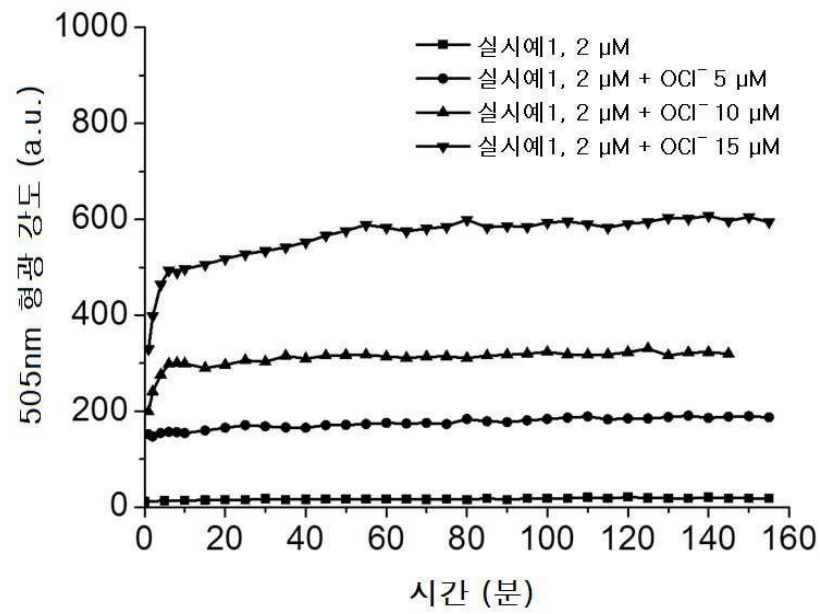
도면2



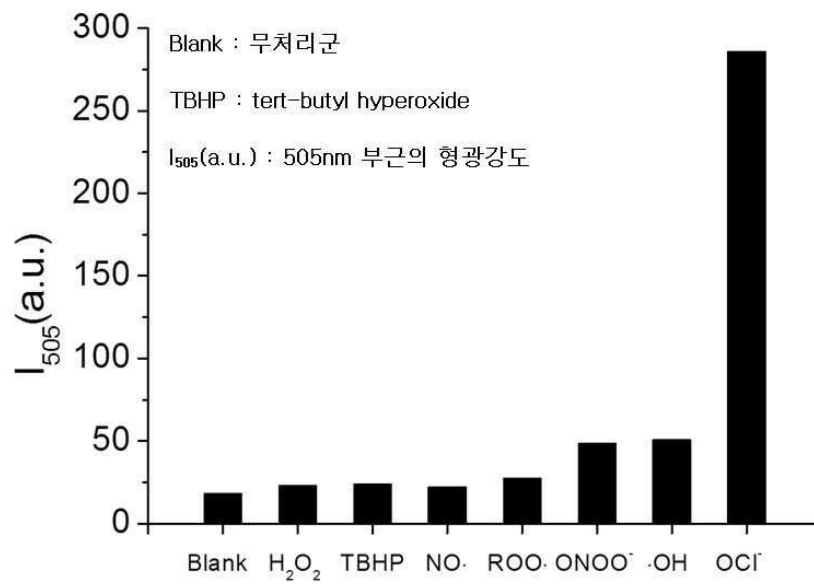
도면3



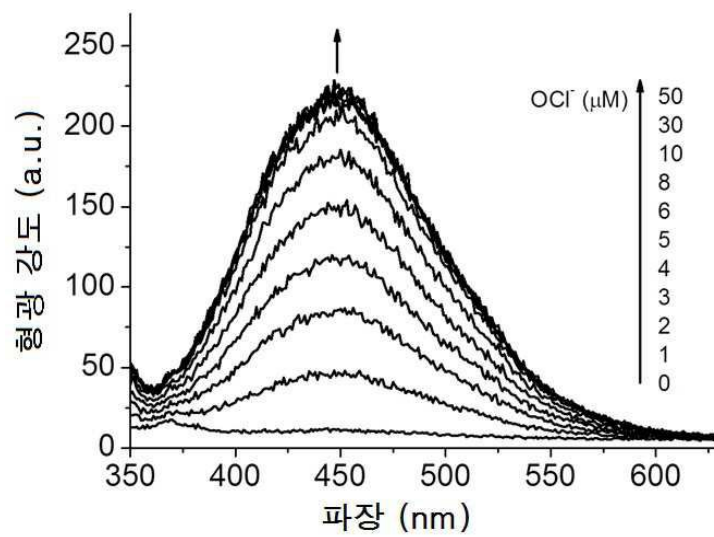
도면4



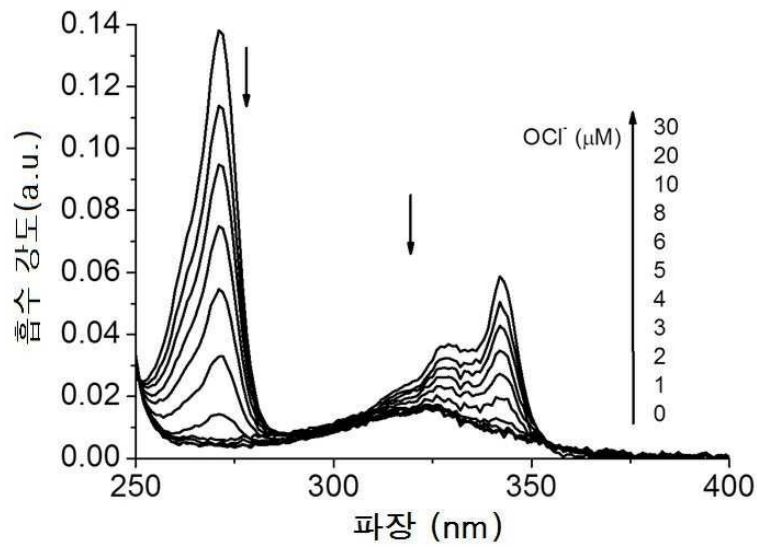
도면5



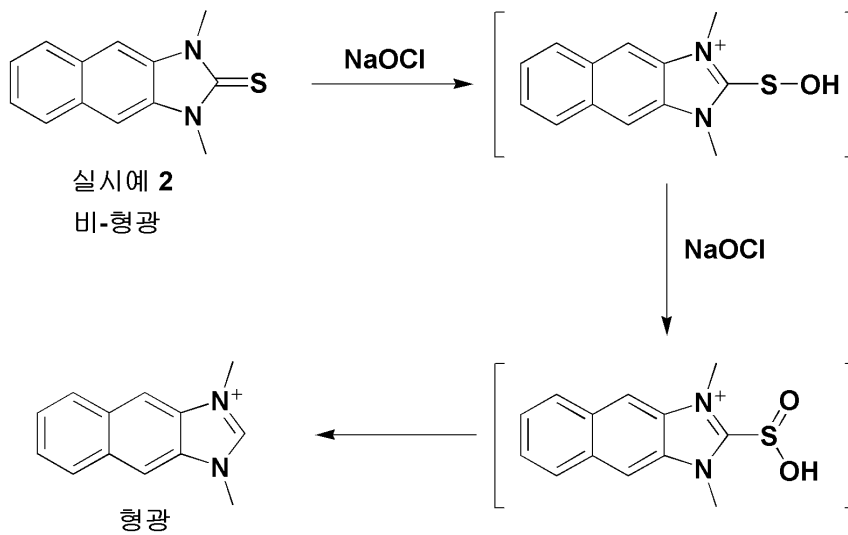
도면6



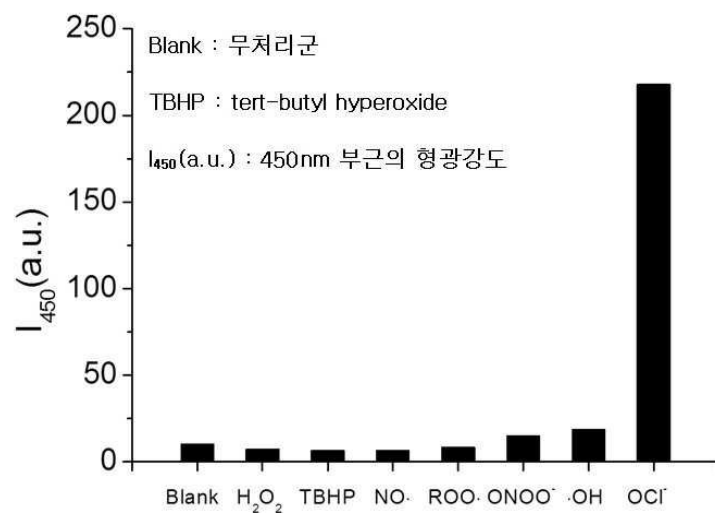
도면7



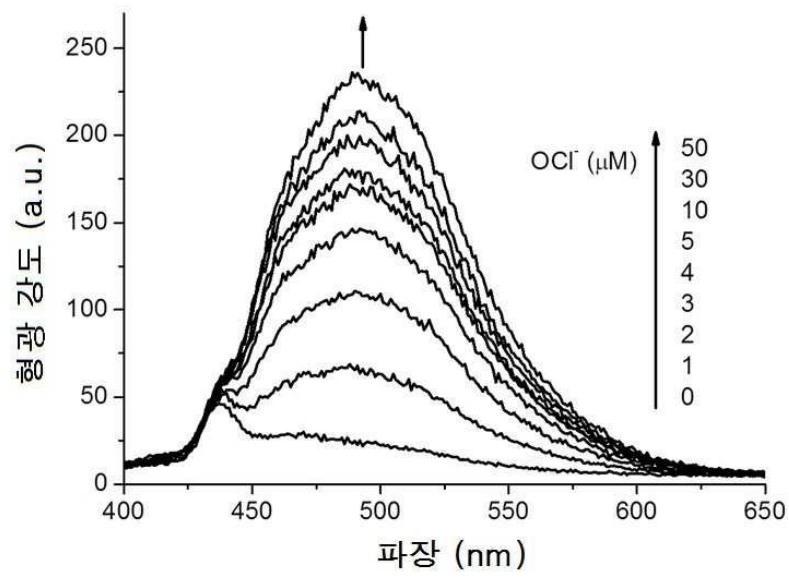
도면8



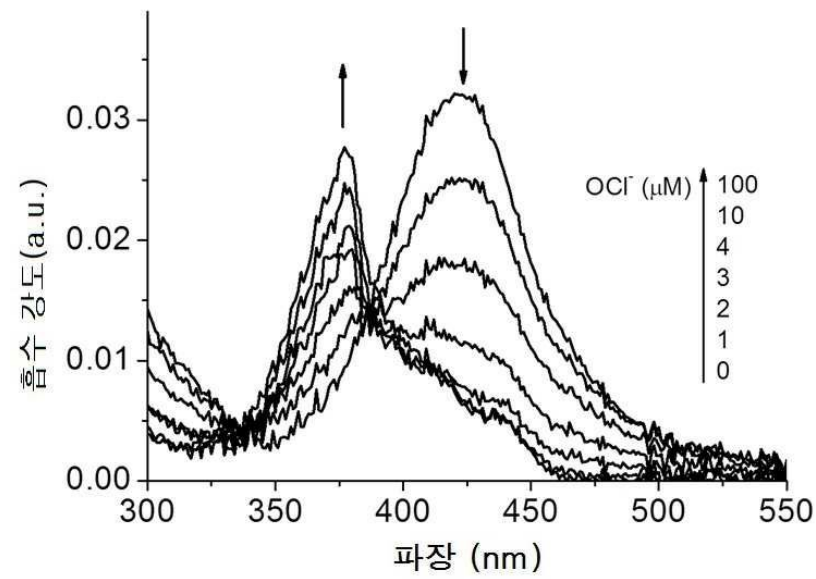
도면9



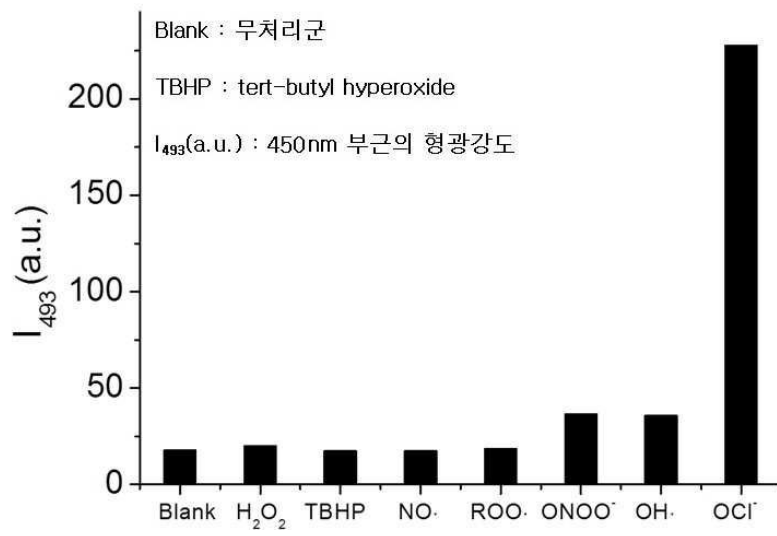
도면10



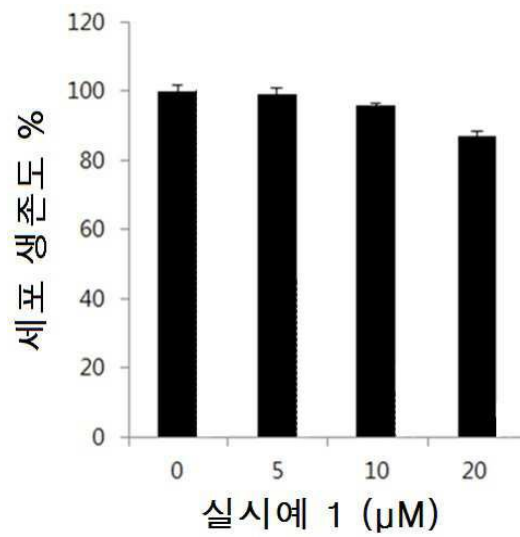
도면11



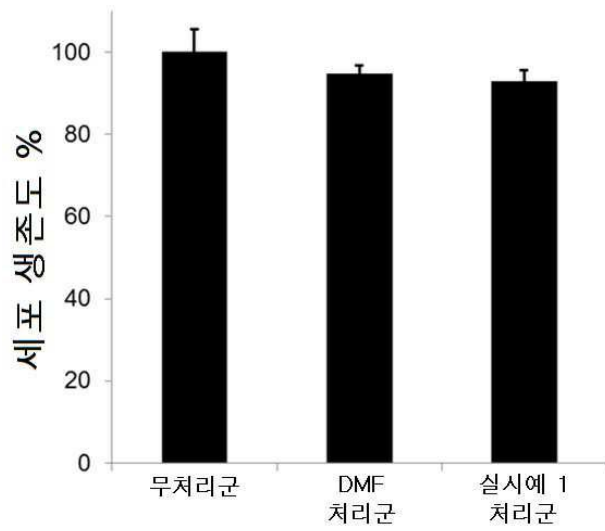
도면12



도면13

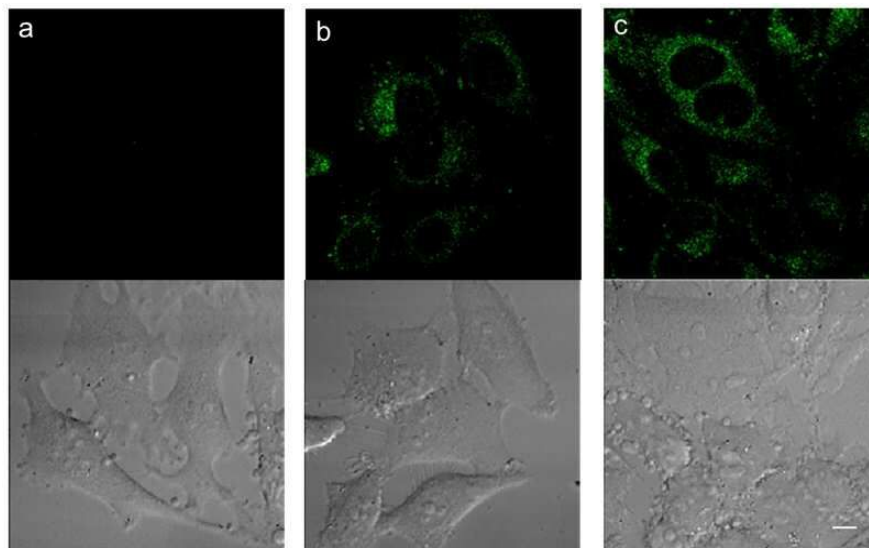


도면14



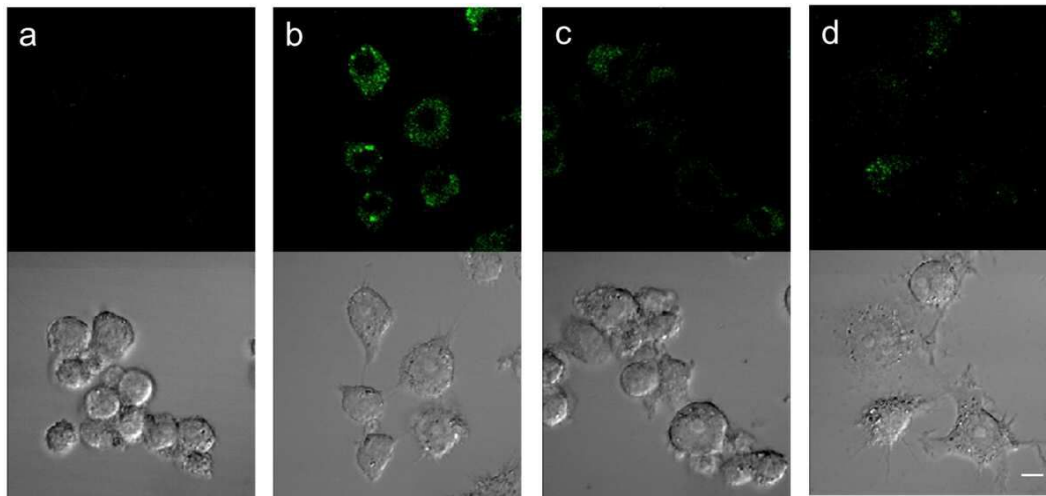
DMF : 디메틸포름아미드(Dimethylformamide)

도면15



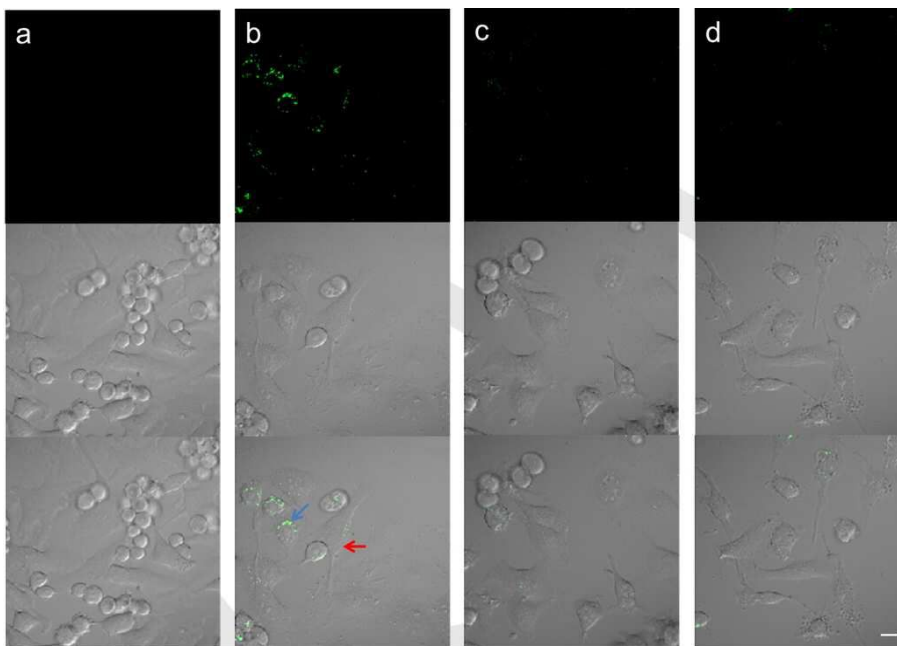
기준자(scale bar) : 10 μ m

도면16



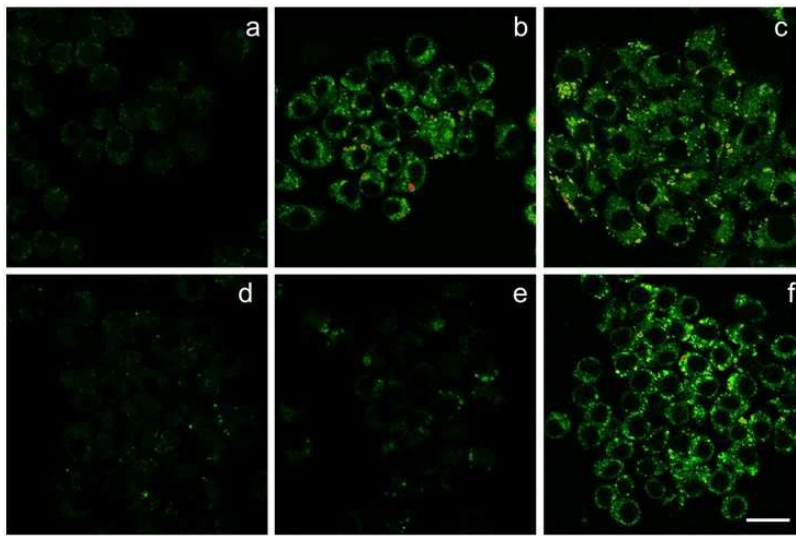
기준자(scale bar) : 10 μ m

도면17

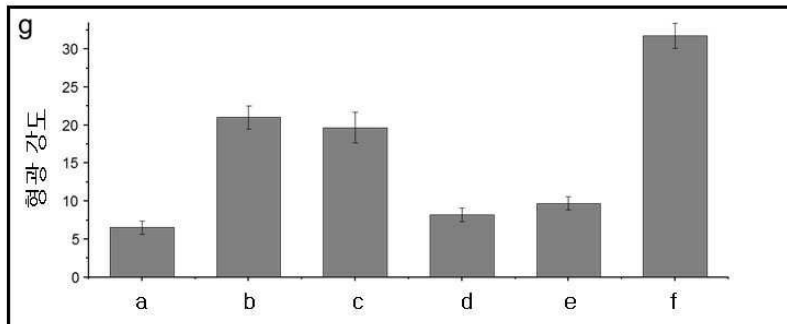


기준자(scale bar) : 10 μ m

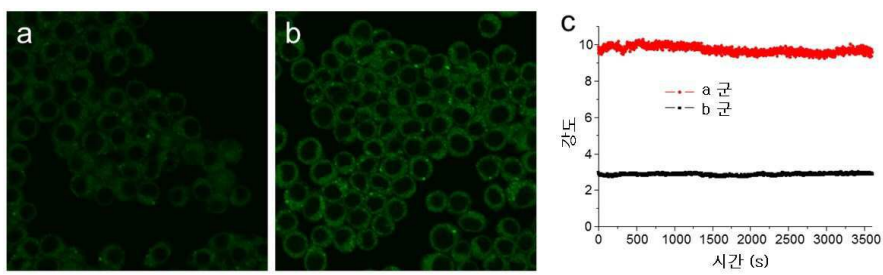
도면18



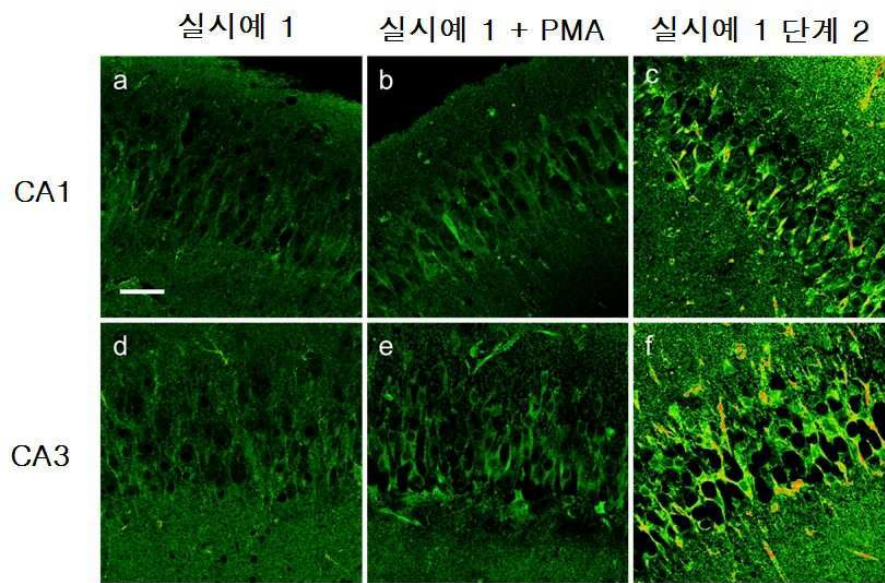
기준자(scale bar) : 20 μ m



도면19



도면20



기준자(scale bar) : 48 μ m

PMA : 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)

