



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0089491
(43) 공개일자 2013년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/52 (2006.01) C07D 221/14 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0010904

(22) 출원일자 2012년02월02일

심사청구일자 2012년02월02일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김중승

경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운롯데아파트
130-2402

(74) 대리인

특허법인충현

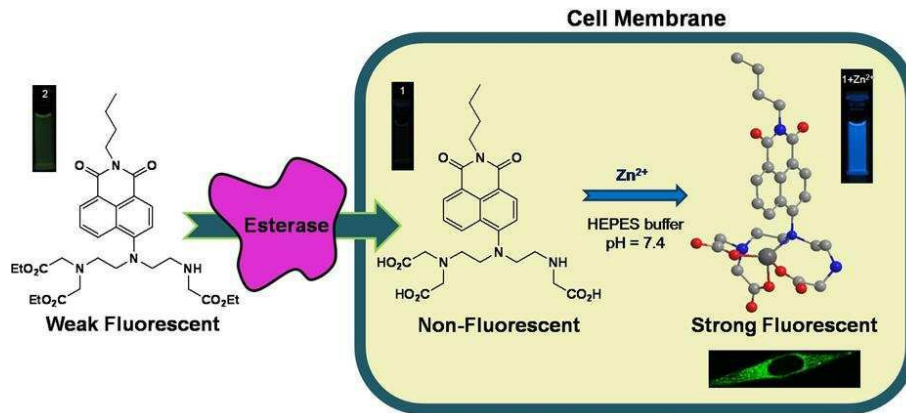
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명에 따른 Zn^{2+} 선택성을 갖는 형광 프로브는 다른 금속이온들에 대한 간섭현상 없이 Zn^{2+} 이온과 선택적으로 결합하며, 세포 투과성이 높아 생물학적 용도에 효과적인 세포 내 Zn^{2+} 이온의 영상화 탐침으로서 우수한 특성을 나타낸다.

대표도 - 도1

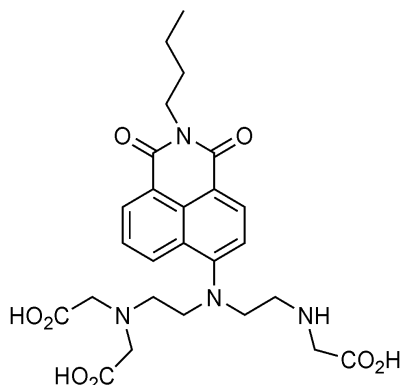


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브

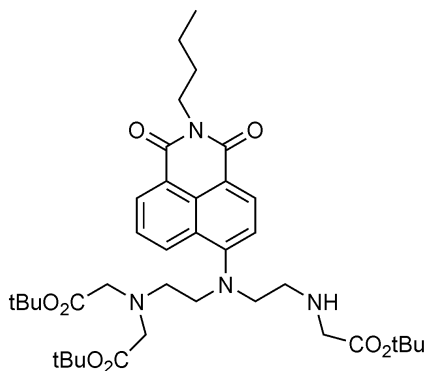
<화학식 1>



청구항 2

화학식 3의 화합물과 트리플루오로아세트 산을 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 것을 특징으로 하는 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 제조방법:

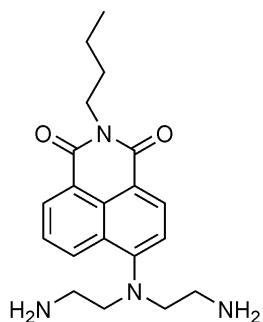
<화학식 3>



청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 화학식 3의 화합물은 화학식 4의 화합물을 t-부틸브로모아세테이트를 반응시킴으로써 제조하는 것을 특징으로 하는 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 제조방법:

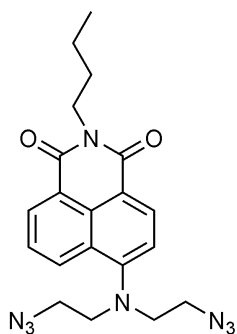
<화학식 4>



청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 화학식 4의 화합물은 화학식 5의 화합물과 트리페닐포스핀(PPh_3) 및 피리딘을 반응시킴으로써 제조하는 것을 특징으로 하는 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 제조방법:

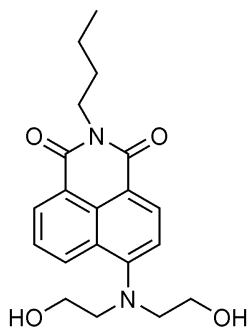
<화학식 5>



청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 화학식 5의 화합물은 화학식 6의 화합물과 트리페닐포스핀(PPh_3) 및 아자이드화 나트륨을 반응시킴으로써 제조하는 것을 특징으로 하는 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 제조방법:

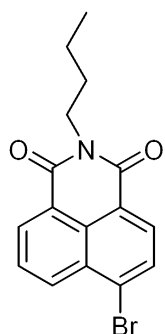
<화학식 6>



청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 화학식 6의 화합물은 화학식 7의 화합물과 2-메톡시에탄올 및 디에탄올아민을 반응시킴으로써 제조하는 것을 특징으로 하는 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 제조방법:

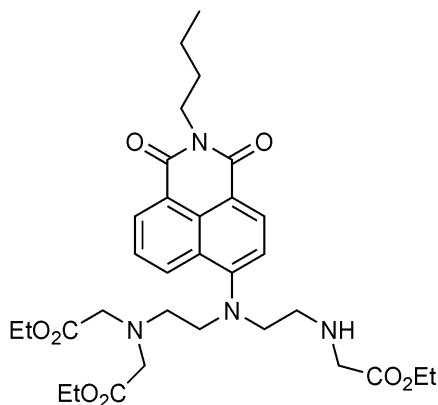
<화학식 7>



청구항 7

하기 화학식 2의 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 대응 에틸 에스테르 유도체:

<화학식 2>



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 Zn^{2+} 선택성을 갖는 형광 프로브 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 금속 킬레이팅기로 서 폴리아미노 카르복실레이트를 갖는 나프탈이미드계 수용성 Zn^{2+} 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 금속 이온은 생물학적 시스템에서 특이적 기능을 광범위하게 수행한다. 금속이온이 세포대사에 중요한 영향을 발휘하는 동안, 세포 및 국소 조직의 정교한 장치는 효소와 조인자 형태로 있는 금속 이온의 생물학적 활성을 적극적으로 제어한다. 따라서 금속이온의 농도 또는 활성을 오조절하게 되는 유전적 이상 또는 환경적 인자는 조직 또는 기관의 기능장애를 초래할 수 있다 [J.J.R. Frausto da Silva, R.J.P. Williams, The biological chemistry of the elements, Oxford University Press, Oxford, 1991].

[0003] 아연은 생물체 내에 가장 풍부한 2가 이온 금속 중 하나로서, 다수의 대사 효소와 전사 인자에 필수적인 조인자로 작용하며, 인간의 경우 생체 내에 평균적으로 2.3g 의 아연을 가지고 있다 [B.L. Vallee, D.S Auld, Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins, Biochemistry 29 (1990) 5647-5659]. 또한 무기염 형태로 있는 상기 필수 성분 요소는 치명적인 기관 장애를 일으키고 구리 결핍증을 유도한다고 알려져 있다 [M.S. Willis, S.A. Monaghan, M.L. Miller, R.W. McKenna, W.D. Perkins, B.S. Levinson, V. Bhushan, S.H. Kroft, Am. J. Clin. Pathol. 123 (2005) 125-131].

[0004] 현재까지 소수의 리간드가 수성매질에서 아연 이온을 인식하는 것으로 밝혀졌다 [Y. Zhou, H.N. Kim, J. Yoon, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 125-128]. 그러나 대부분의 경우 유기 용매와 계면 활성제가 수성 환경에서 리간드를 용해시키기 위해 사용되고 있어 체내·외에서 원하지 않는 세포독성을 나타내고 있는 문제점이 있다. 따라서 세포독성을 나타내지 않으면서도, 정확하고 선택적으로 생체 내 아연 이온을 선택적으로 검출할 수 있는 기술에 대한 요구가 증가하고 있다. 특히, 다른 금속이온이 존재하는 가운데 아연 이온에 대해 선택적이면서, 간단하고 효율적인 형광 탐침 개발에 대한 필요성이 높아지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 이루고자 하는 첫 번째 기술적 과제는, HEPES 완충액에서 Zn^{2+} 에 대해 선택적 결합 친화성을 나타내며, 다른 금속이온들에 대한 간섭 현상을 받지 않으며, 세포 투과성이 높아서 세포 내 Zn^{2+} 이온을 영상화할 수 있는 Zn^{2+} 이온 선택성을 갖는 형광 프로브를 제공하는 것이다.

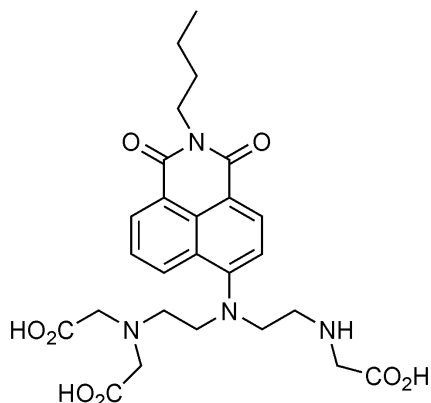
[0006] 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 형광 프로브의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 세 번째 기술적 과제는 Zn^{2+} 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 대응 에틸 에스테르 유도체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브를 제공한다:

[0009] <화학식 1>

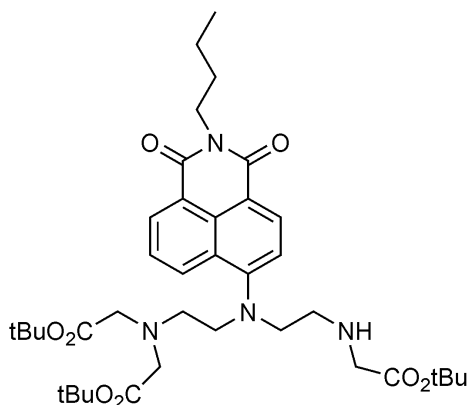


[0010]

[0011] 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

[0012] 하기 화학식 3의 화합물과 트리플루오로아세트 산을 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 제조방법을 제공한다:

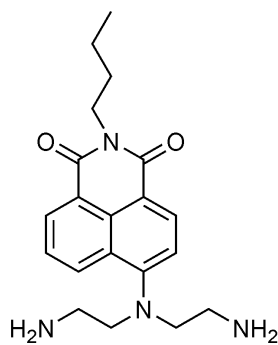
[0013] <화학식 3>



[0014]

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물과 t-부틸브로모아세테이트 혼합물을 유기 용매 중에서 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

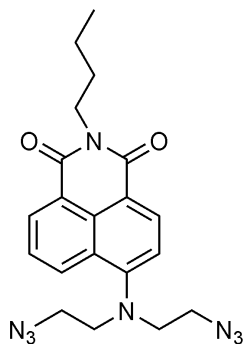
[0016] <화학식 4>



[0017]

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 4의 화합물은 하기 화학식 5의 화합물을 트리페닐포스핀 (PPh₃) 및 피리딘과 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

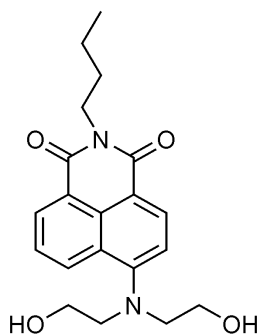
[0019] <화학식 5>



[0020]

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 5의 화합물은 하기 화학식 6의 화합물을 트리페닐포스핀 (PPh₃) 및 아자이드화 나트륨과 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

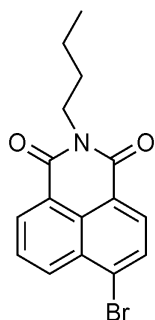
[0022] <화학식 6>



[0023]

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 6의 화합물은 하기 화학식 7의 화합물과 2-메톡시에탄올 및 디에탄올아민을 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

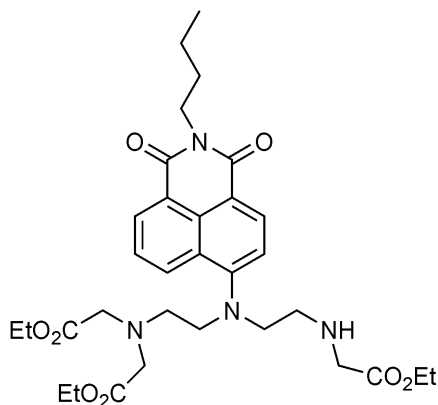
[0025] <화학식 7>



[0026]

[0027] 본 발명은 상기 세 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여, 하기 화학식 2의 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 대응 에틸 에스테르 유도체를 제공한다:

[0028] <화학식 2>



[0029]

[0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물과 에틸브로모아세테이트를 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 Zn^{2+} 선택성을 갖는 형광 프로브는 다른 금속이온들에 대한 간섭현상 없이 Zn^{2+} 이온과 선택적으로 결합하며, pH에 대해 불감수성을 나타낸다. 또한, 세포 투과성이 높아 생물학적 용도에 효과적인 세포 내 Zn^{2+} 이온의 영상화 탐침으로서 우수한 특성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 에스테르 분해 효소에 의해 가수분해되어, 화학식 1의 화합물로 변화되는 화학식 2의 화합물의 메카니즘이다.

도 2(a)는 HEPES 버퍼 (10 mM, pH = 7.4) 중 다양한 금속이온 (5equiv.)의 존재하에 1 ($\lambda_{ex} = 346$ nm)의 형광 스펙트럼이다. 도 2(b)는 HEPES 버퍼 (pH = 7.4) 중 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 1.0 mM 및 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 10 μ M 존재하에 (흰 막대) 10 μ M의 Zn^{2+} 를 첨가시 나타나는 (검정막대) 10 μ M 화학식 1의 상대 형광 강도이다.

도 3은 HEPES 버퍼 (10 mM, pH = 7.4) 중 다른 양의 Zn^{2+} 존재시 화학식 1 ($\lambda_{ex} = 346$ nm)의 형광스펙트럼이다. 삽입된 도는 447 nm에서 Zn^{2+} 의 발광 적정 그래프이다.

도 4는 이론의 B3LYP/6-31G(d) 레벨에서 계산된 1 및 $1+Zn^{2+}$ 의 최적화된 구조이며, 수소 원자는 명확함을 위해 생략되었다.

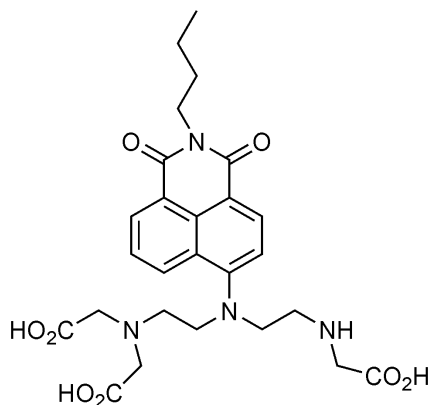
도 5(상단)은 1의 프론티어 분자 오비탈의 프로파일이다. 녹색 및 붉은 색은 HOMO와 LUMO에 대한 분자 웨이브 기능의 서로 다른 단계에 해당하며, 분류치는 0.02 a.u.이다. 도 5(하단)은 $1+Zn^{2+}$ 의 프론티어 분자 오비탈의 프로파일이다.

도 6(a)는 $\lambda_{ex} = 458$ nm에서 30분 동안 2 μ M 화학식 2로 배양한 HeLa 세포의 공초점 형광 이미지이다. (b)는 명시야상이다. (c)는 Zn^{2+} /pyrithione (20 μ M, 1:1 비율)로 40분 처리 후 이미지이다. (d)는 0.1 mM TPEN 첨가 후 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명은 하기 화학식 1의 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브를 제공한다:

[0034] <화학식 1>



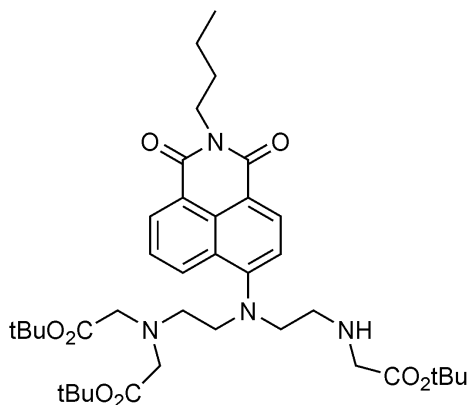
[0035]

[0036] 다양한 형광체 중에서도 1,8-나프탈이미드는 광안정성이 높고 스토크스 이동 (stokes shift)이 크며 양자 수율이 높아 형광체로서 흔히 사용되고 있다. 상기 화학식 1의 화합물은 금속 킬레이팅기로서 폴리아미노 카르복실레이트를 갖는 나프탈이미드계 수용성 Zn^{2+} 이온 센서로, Zn^{2+} 이온에 대한 선택적 결합 친화성을 나타내어 세포 내 Zn^{2+} 이온 영상화에 효과적으로 작용한다.

[0037] 양자계산 결과 킬레이팅기 내 전자밀도가 상기 화학식 1의 화합물 + Zn^{2+} 에서는 전혀 존재하지 않는 반면, 상기 화학식 1의 화합물의 킬레이팅기 내에서는 존재하였다. 또한, 에틸 에스테르 유도체인 화합물 2의 화합물로 배양한 HeLa 세포의 공초점 사진을 통해 상기 형광 센서는 에스테르 분해효소에 의해 가수분해되어 본발명의 화학식 1의 화합물이 되는 것을 밝혔으며 이를 도 1에 나타내었다. 세포 투과성이 높아 생물학적 용도에 효과적인 세포 내 Zn^{2+} 영상화 탐침으로서 특성을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

[0038] 본 발명은 또한 하기 화학식 3의 화합물과 트리플루오로아세트 산을 반응시킴으로 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 제조방법을 제공한다:

[0039] <화학식 3>

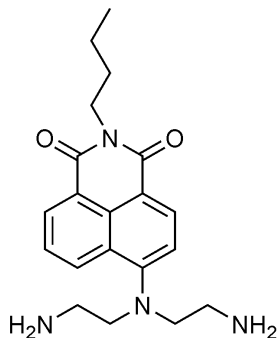


[0040]

[0041] 상기 반응은 화학식 3의 화합물과 트리플루오로아세트산을 메틸렌 클로라이드와 같은 유기 용매 중에서 교반시킴으로써 수행될 수 있다.

[0042] 바람직하게는, 상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물과 t-부틸브로모아세테이트 혼합물을 유기 용매 중에서 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

[0043] <화학식 4>

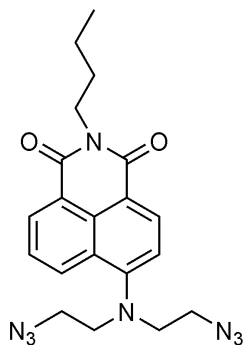


[0044]

[0045] 예를 들어, 상기 유기용매로는 디메틸포름아미드 (DMF)를 사용할 수 있으며, 상기 화학식 3의 화합물은 에틸아세테이트로 추출하고 수분 및 유기용매를 제거한 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 과정을 거쳐서 제조할 수 있다.

[0046] 바람직하게는, 상기 화학식 4의 화합물은 하기 화학식 5의 화합물을 트리페닐포스핀 (PPh₃) 및 피리딘과 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

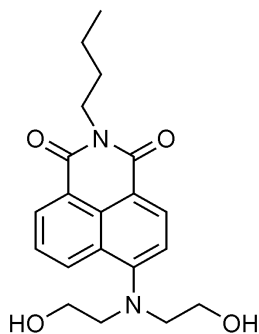
[0047] <화학식 5>



[0048]

[0049] 상기 화학식 5의 화합물은 하기 화학식 6의 화합물을 트리페닐포스핀 (PPh₃) 및 아자이드화 나트륨과 유기용매에서 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

[0050] <화학식 6>

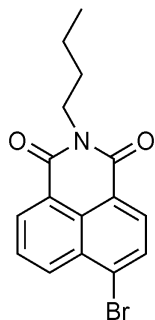


[0051]

[0052] 예를 들어, 상기 유기용매로는 디메틸포름아미드(DMF)를 사용할 수 있으며, 상기 화학식 5의 화합물은 상기 화학식 6의 화합물과 트리페닐포스핀 (PPh₃) 및 아자이드화 나트륨을 혼합한 용액의 온도를 0 ℃로 낮추고, 테트라브로모메탄 (CBr₄)을 한 방울씩 떨어뜨리며 천천히 추가하여 아지드로 전환시키고 추가로 스타우딩거 (Staudinger) 반응에 의해 아민으로 전환시켰으며, 에틸아세테이트로 추출하고 수분 및 유기용매를 제거한 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 과정을 거쳐서 제조할 수 있다.

[0053] 한편, 상기 화학식 6의 화합물은 하기 화학식 7의 화합물과 2-메톡시에탄올 및 디에타놀아민을 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

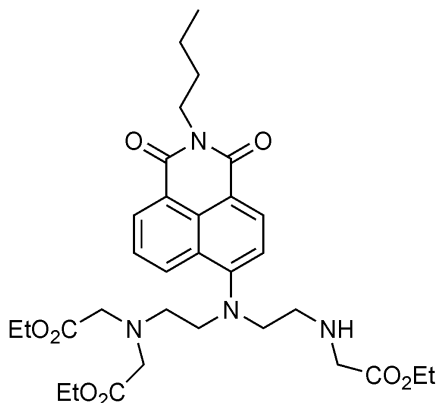
[0054] <화학식 7>



[0055]

[0056] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2의 아연 2가 이온 선택성을 갖는 형광 프로브의 대응 에틸 에스테르 유도체 및 이의 제조방법을 제공한다:

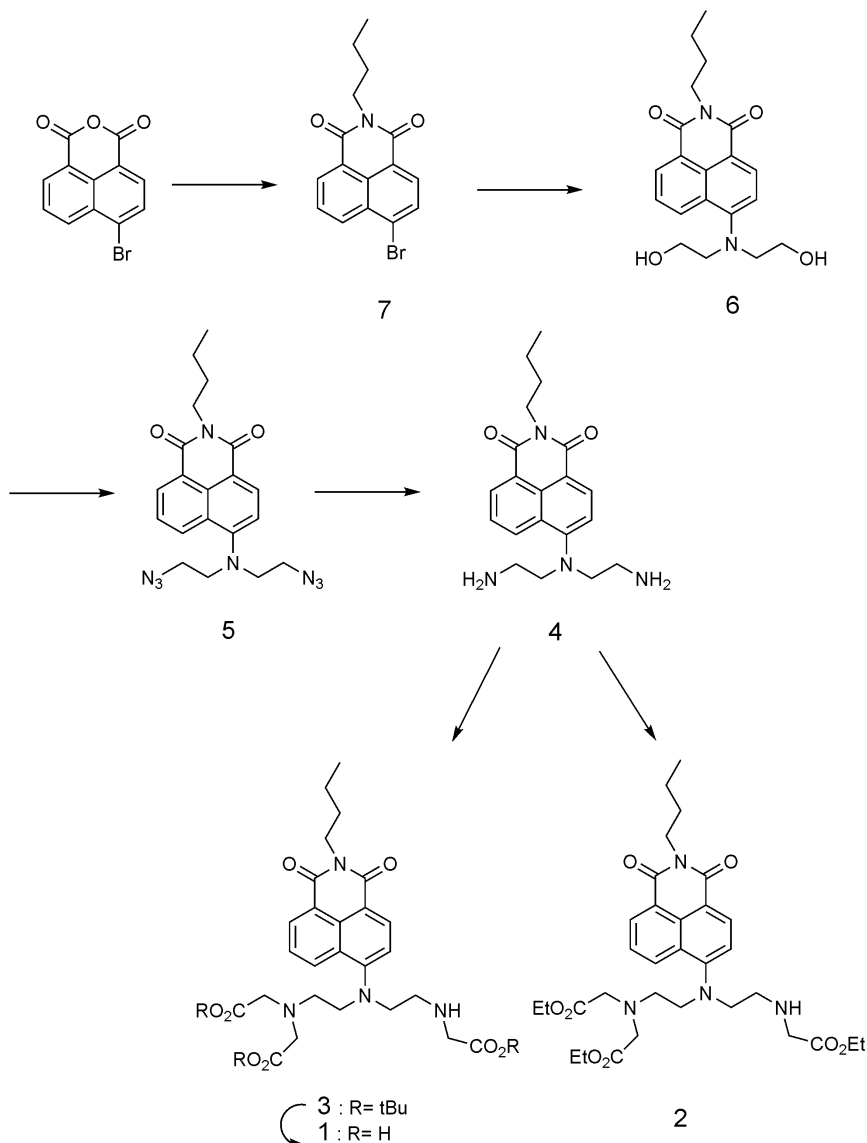
[0057] <화학식 2>



[0058]

[0059] 상기 화학식 2의 화합물은 상기 화학식 4의 화합물과 에틸브로모아세테이트를 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

[0060] 참고로 하기 반응식에는 4-브로모-N-부틸-1,8-나프탈이미드로부터, 화학식 1의 화합물 및 그의 대응 에틸에스테르인 화학식 2의 화합물을 제조하는 예시적인 개략 반응도를 나타내었다.



[0061]

[0062] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0063] 제조예 1. 화합물 6의 합성

[0064] 2-메톡시에탄올 (20 mL)에 디에타놀아민 (20 mL)과 화합물 7 (3.80 g, 11.4 mmol) 을 넣고 24 시간 동안 환류하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물에 물을 첨가하고 에틸아세테이트 50ml 로 4회 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 감압농축 하였다. 얻어진 크루드 화합물을 3-5%의 메탄올이 첨가된 메틸렌 클로라이드를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그램으로 분리한 후, 용매를 건조시켜 1.56g (수율 38.4 %)의 화합물 6을 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.87 (d, 1 H, J = 8.51 Hz); 8.46 (d, 1 H, J = 7.24 Hz); 8.41 (d, 1 H, J = 8.10 Hz); 7.62 (t, 1 H, J = 7.85 Hz); 7.34 (d, 1 H, J = 8.18 Hz); 4.11 (t, 2 H, J = 7.55 Hz); 3.86 (br s, 4 H); 3.61 (t, 4 H, J = 5.18 Hz); 3.09 (s, 2 H); 1.67 (m, 2 H); 1.42 (m, 2 H); 0.96 (t, 3 H, J = 7.34 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 164.5, 164.1, 154.7, 132.0, 131.3, 131.2, 130.3, 127.2, 125.6, 122.9, 117.0, 116.3, 59.8, 55.4, 40.3, 30.3, 20.5, 14.1 ppm.

[0065] 제조예 2. 화합물 5의 합성

[0066] 화합물 6 (200 mg, 0.56 mmol), PPh₃ (441 mg, 1.68 mmol) 및 NaN₃ (182 mg, 2.80 mmol) 을 무수 DMF(10 mL)에

녹인 후, 상기 용액을 0 °C로 낮추고 CBr₄ (558 mg, 1.68 mmol)를 10분에 걸쳐 한 방울씩 천천히 추가하였다. 그 후 반응물의 온도를 상온까지 올린 후 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 반응 혼합물에 물을 첨가하고 에틸아세테이트 50 mL로 4회 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 감압농축 하였다. 얻어진 크루드 화합물을 실리카겔 컬럼 크로마토그램 (용매; 1 : 9 = EA : Hexane)으로 분리하고, 용매를 건조시켜 198 mg (수율 87.0 %)의 화합물 5를 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.60 (d, 1 H, *J* = 7.34 Hz); 8.56 (d, 1 H, *J* = 8.47 Hz); 8.54 (d, 1 H, *J* = 8.02 Hz); 7.75 (t, 1 H, *J* = 7.88 Hz); 7.43 (d, 1 H, *J* = 7.99 Hz); 4.17 (t, 2 H, *J* = 7.53 Hz); 3.66 (t, 4 H, *J* = 5.80 Hz); 3.44 (t, 4 H, *J* = 5.75 Hz); 1.71 (m, 2 H); 1.45 (m, 2 H); 0.98 (t, 3 H, *J* = 7.34 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 164.5, 164.0, 152.5, 131.8, 131.7, 130.5, 130.3, 127.9, 126.6, 123.6, 118.9, 118.5, 53.5, 49.2, 40.3, 30.4, 20.6, 14.1 ppm.

[0067] 제조예 3. 화합물 4의 합성

[0068] 화합물 5 (190 mg, 0.467 mmol)와 PPh₃ (736 mg, 2.81 mmol)을 피리딘 5 mL에 녹여 상온에서 1시간 동안 정치하였다. 상기 용액에 진한 암모니아수 (1 mL)를 첨가한 후, 2시간 동안 상온에 두었다. 피리딘은 감압하여 제거한 후, 상기 반응 혼합물에 메틸렌 클로라이드와 1 N HCl을 넣어 분리하였다. 추가로 1 N HCl을 사용하여 유기층을 세척하고 물 층을 모아서 KOH로 중화시킨 후, 메틸렌 클로라이드로 3회 추출하였다. 물과 염수를 사용하여 추출된 유기층을 세척하고, 무수 황산 나트륨으로 물을 제거한 후, 용매를 건조시켜 120 mg (72.5 %)의 화합물 4를 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.52 (d, 1 H, *J* = 7.05 Hz); 8.40 (d, 1 H, *J* = 8.42 Hz); 8.18 (d, 1 H, *J* = 8.35 Hz); 7.56 (t, 1 H, *J* = 7.88 Hz); 6.63 (d, 1 H, *J* = 8.56 Hz); 4.15 (t, 2 H, *J* = 7.59 Hz); 3.43 (t, 2 H, *J* = 5.62 Hz); 3.08 (t, 2 H, *J* = 5.62 Hz); 2.88 (t, 2 H, *J* = 5.54 Hz); 2.76 (t, 2 H, *J* = 5.62 Hz); 1.70 (m, 2 H); 1.44 (m, 2 H); 1.25 (s, 2 H); 0.97 (t, 3 H, *J* = 7.31 Hz). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): 164.5, 164.0, 150.7, 134.2, 130.5, 129.3, 127.6, 123.9, 121.7, 120.2, 108.3, 103.6, 51.2, 47.3, 42.6, 40.6, 39.6, 30.1, 20.3, 13.1 ppm.

[0069] 제조예 4. 화합물 3의 합성

[0070] 화합물 4 (250 mg, 0.705 mmol)과 KHCO₃ (353 mg, 3.53 mmol)을 무수 DMF(10 mL)에 녹인 후, 상기 용액을 0 °C로 낮추고 DMF 5 mL에 희석시킨 t-부틸브로모아세테이트 (1.24 g, 3.53 mmol)를 20분에 걸쳐 천천히 추가하였다. 그 후 반응물의 온도를 상온까지 올린 후, 60시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 반응 혼합물에 물을 가하고 에틸아세테이트 50 mL로 4회 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 감압농축 하였다. 얻어진 크루드 화합물을 3-5%의 메탄올이 첨가된 메틸렌 클로라이드를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그램으로 분리한 후, 용매를 건조시켜 373 mg (수율 75.9 %)의 화합물 3을 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.60~8.56 (m, 2 H); 8.44 (d, 1 H, *J* = 8.30 Hz); 7.59 (t, 1 H, *J* = 7.83 Hz); 7.32 (s, 1 H); 6.61 (d, 1 H, *J* = 8.51 Hz); 4.17 (t, 2 H, *J* = 7.57 Hz); 3.42 (s, 6 H); 3.37 (br s, 2 H); 3.02 (br s, 2 H); 2.84 (m, 4 H); 1.72 (m, 2 H); 1.50 (s, 9 H); 1.45 (m, 2 H); 1.39 (s, 18 H); 0.97 (t, 3 H, *J* = 7.38 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 172.0, 170.7, 165.2, 164.5, 150.7, 134.9, 131.2, 130.2, 128.0, 124.4, 122.9, 120.8, 109.4, 104.0, 81.9, 81.3, 56.5, 56.4, 52.5, 52.2, 51.8, 41.4, 40.1, 30.6, 28.4, 28.3, 20.7, 14.1 ppm.

[0071] 제조예 5. 화합물 1의 합성

[0072] 건조시킨 메틸렌 클로라이드 (5.0 mL)에 화합물 3 (157 mg, 0.225 mmol)을 용해시키고 0 °C에서 트리플루오로아세트산 (2.0 mL)을 추가한 후, 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시킨 다음 디메틸 에테르로 다시 감압 증발시켰다. 잔여액을 디메틸 에테르로 고형화시켜 건조시켜 55 mg (수율 46.2 %)의 화합물 1을 수득하였다. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.54 (t, 2 H, *J* = 8.22 Hz); 8.24 (d, 1 H, *J* = 8.43 Hz); 7.89 (t, 1 H, *J* = 7.87 Hz); 7.83 (d, 1 H, *J* = 7.76 Hz); 4.05 (t, 2 H, *J* = 7.31 Hz); 3.54 (s, 6 H); 3.48 (br s, 2 H); 3.11 (br s, 2 H); 2.96 (br s, 2 H); 2.74 (br s, 2 H); 1.62 (m, 2 H); 1.35 (m, 2 H); 0.92 (t, 3 H, *J* = 7.31 Hz). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 173.3, 166.4, 163.9, 163.5, 145.3, 131.8,

131.7, 130.3, 128.9, 128.5, 127.1, 123.2, 122.4, 56.5, 56.1, 54.7, 50.6, 49.8, 49.3, 30.2, 20.4, 14.4 ppm.

[0073] 비교예. 화합물 2의 합성

[0074] 화합물 4 (520 mg, 1.47 mmol)과 KHCO_3 (735 mg, 7.34 mmol) 을 무수 DMF(10 mL) 녹인 후, 상기 용액을 0 °C로 낮추고 DMF 5 mL 에 희석시킨 에틸브로모아세테이트 (1.23 g 7.34 mmol) 를 20분에 걸쳐 천천히 추가하였다. 그 후 반응물의 온도를 상온까지 올린 후 60시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 반응 혼합물에 물을 가하고 에틸아세테이트 50ml 로 4회 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 감압농축 하였다. 얻어진 크루드 화합물을 3-5%의 메탄올이 첨가된 메틸렌클로라이드를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그램으로 분리한 후, 용매를 건조시켜 210 mg (수율 23.3 %) 의 화합물 2를 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.57 (d, 1 H, J = 7.19 Hz); 8.51 (d, 1 H, J = 8.31 Hz); 8.43 (d, 1 H, J = 8.38 Hz); 7.61 (t, 1 H, J = 7.86 Hz); 7.15 (s, 1 H); 6.60 (d, 1 H, J = 8.52 Hz); 4.24 (q, 2 H, J = 7.14 Hz); 4.17 (t, 2 H, J = 7.50 Hz); 4.06 (q, 4 H, J = 7.12 Hz); 3.54 (s, 6 H); 3.37 (br s, 2 H); 3.02 (br s, 2 H); 2.87 (m, 4 H); 1.72 (m, 2 H); 1.45 (m, 2 H); 1.30 (t, 3 H, J = 7.15 Hz); 1.18 (t, 6 H, J = 7.15 Hz); 0.97 (t, 3 H, J = 7.33 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 172.5, 171.3, 165.1, 164.4, 150.5, 134.8, 131.2, 130.1, 127.7, 124.6, 122.9, 120.7, 109.6, 104.1, 61.2, 60.7, 55.5, 55.4, 52.7, 52.2, 51.9, 41.2, 40.1, 30.5, 20.7, 14.4, 14.3, 14.1 ppm.

[0075] 실시예 1. 형광특성 분석

[0076] HEPES 완충액(10 mM, pH=7.4) 중 Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} 과 Ni^{2+} 를 포함하는 광범위한 금속이온의 염화물염 첨가시 나타나는 흡수 및 형광 변화를 조사하였으며, 그 형광변화를 도 2에 나타내었다.

[0077] 금속 킬레이팅기로써 카르복실레이트를 갖는 화합물 1의 100% 수용액에 Zn^{2+} 이온을 첨가하였더니 형광증강이 크게 유도되었다. 이와 대조적으로, 다른 금속이온을 첨가하였을 때는 차이를 식별할 만한 스펙트럼의 변화가 관찰되지 않았으며, 다른 금속 이온 존재하에서 화합물 1+ Zn^{2+} 의 형광특성을 조사하여 도 2(b)에 나타내었다. 생리적 조건에서의 이용률에 따라 10 μM 의 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 와 1.0 mM 의 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ 를 첨가하였을 때, 후속 첨가된 금속들은 화합물 1+ Zn^{2+} 의 형광 세기를 낮추지 않았는데, 이는 수성매질에서 다른 경쟁금속이온에 비해 Zn^{2+} 이온에 대한 화합물 1의 선택성이 높다는 것을 의미한다.

[0078] Zn^{2+} 농도 증가에 따른 화합물 1의 형광변화를 10 mM HEPES 완충액에서 측정하였으며, 이를 도 3에 나타내었다. 화합물 1은 생리학적 pH 범위에서 Zn^{2+} 첨가시 뛰어난 형광 증강을 나타내었다. 낮은 pH 값에서는 카르복실레이트가 보호되어 Zn^{2+} 에 대한 배위 능력이 약해질 수 있기 때문에 pH 3 미만에서는 주목할 만한 형광 변화가 없었지만, pH를 4에서 10으로 증가시켰을 때는 만족할 만한 Zn^{2+} 감지 능력을 나타내었다. 화합물 1의 형광발광 세기는 점차 증가하여 1.0 당량의 Zn^{2+} 이온을 화합물 1에 첨가하였을 때 포화되었다. 화합물 1과 Zn^{2+} 사이의 해리상수(K_d)를 형광적정곡선과 Job's 그래프 분석한 결과, 9.00×10^{-7} M 인 것으로 측정되었고, HEPES 완충액에서 화합물 1과 Zn^{2+} 사이의 화학양론비는 1:1 임을 확인하였다.

[0079] 실시예 2. DFT 및 TD-DFT 계산

[0080] 양자계산을 수행하여 화합물 1과 이의 아연 착화합물인 화합물 1+ Zn^{2+} 의 형광 변화를 확인하였다. Lee-Yang-Parr 구배 보정된 상관 범함수(B3LYP)와 기초 세트 6-31G*와 조합한 Becke's 3-파라미터 혼성 교환 범함수를 이용한 밀도 범함수 이론 (DFT : Density Functional Theory)을 이용하여 바닥상태에 대한 화합물 1과 화합물 1+ Zn^{2+} 의 구조를 최적화하였고, 이를 도 43에 나타내었다. 동일한 범함수와 기초 세트를 이용한 시간의존적 밀도 범함수이론 (TD-DFT : Time-dependent density functional theory)을 이용하여 전자전이 파장과 진동자 강도를 계산하였다. Zn^{2+} 이 존재하는 경우 화합물 1에 있는 3개의 카르복실기와 중심 질소(도 4의 N1)가 Zn^{2+} 와 배

위결합한다는 것을 확인하였다. 계산한 결합거리는 각각 2.02 Å (Zn-03), 2.08 Å (Zn-01), 2.09 Å (Zn-02) 및 2.10 Å (Zn-N1)이었다. 킬레이팅기 내 다른 2개의 질소 원자 중에서, N2는 상대적으로 약하게 결합하고 (2.27 Å), N3와 Zn²⁺의 상호작용은 매우 약하였다 (4.02 Å). TD-DFT 계산결과, 화합물 1에서는 바닥상태로부터 일중항 여기 상태로의 가장 낮은 3개의 전자전이(S₀→S₁, S₀→S₂ and S₀→S₃)에 점유 경계 궤도함수인 HOMO-3, HOMO-2, HOMO-1, HOMO와 비점유 경계 궤도함수인 LUMO가 수반함을 알 수 있다 (도 5, 상단). 이와 유사하게, 화합물 1+Zn²⁺에서는 HOMO-3, HOMO-1, HOMO가 점유 경계 궤도함수로서, LUMO와 LUMO+1이 비점유 경계 궤도함수로서(도 5, 하단), 3개의 최저 전자전이에 수반된다.

[0081] 화합물 1과 1+Zn²⁺의 점유 경계 궤도함수에서 주요 차이점은 PET이나 ICT 과정에 관여할 수 있는 킬레이팅기 내 가용 전자밀도가 화합물 1+Zn²⁺에는 전혀 존재하지 않는 반면에 화합물 1에는 존재한다는 점이다. 이러한 차이로 인해 화합물 1+Zn²⁺에서 PET나 ICT를 통한 형광 소광(quenching)이 일어날 가능성이 없게 된다. 1+Zn²⁺에서 진동자 강도가 0.01이 넘는(> 0.01) 최저 전자전이는 HOMO에서 LUMO+1 전이(계산파장은 379 nm)에 기여도가 큰 S₂ 여기 상태와 관련이 있다. 화합물 1에서 상기 전이는 0.01에 훨씬 못미치는(<< 0.01) 진동자 강도를 가지며 HOMO에서 LUMO 전이(계산파장은 366 nm)에 큰 기여를 한다.

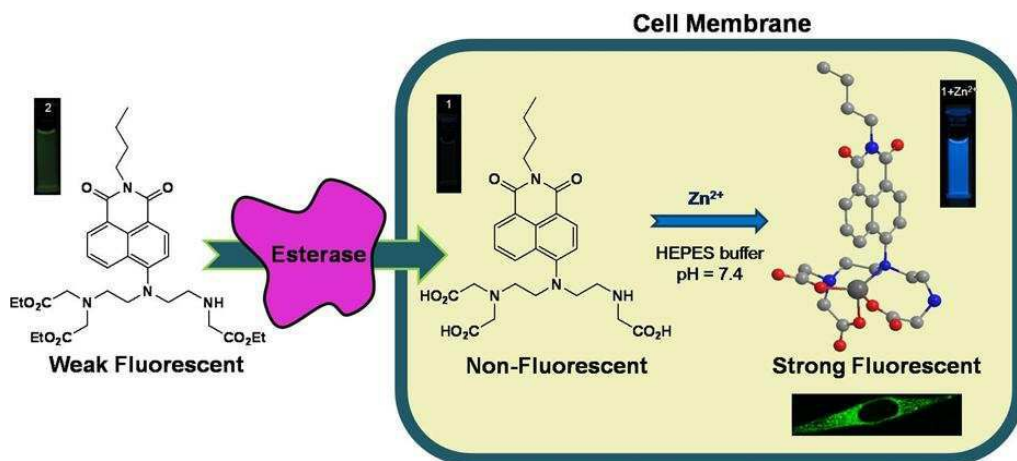
[0082] HOMO→LUMO 전이에서 알 수 있는 바와 같이 화합물 1에서 킬레이팅기로부터 형광체 부분으로 광-여기 전하이동(PICT)이 일어나 화합물 1에서 형광소광을 유발할 수 있다는 것은 주목할만하다. 그러나 1+Zn²⁺의 킬레이팅기에는 전자밀도가 결여되어 있어 1+Zn²⁺에서는 PICT가 일어나지 않으므로 1의 용액에 Zn²⁺를 첨가하면 1의 형광이 증강된다.

[0083] 실시예 3. 공초점 형광 이미지

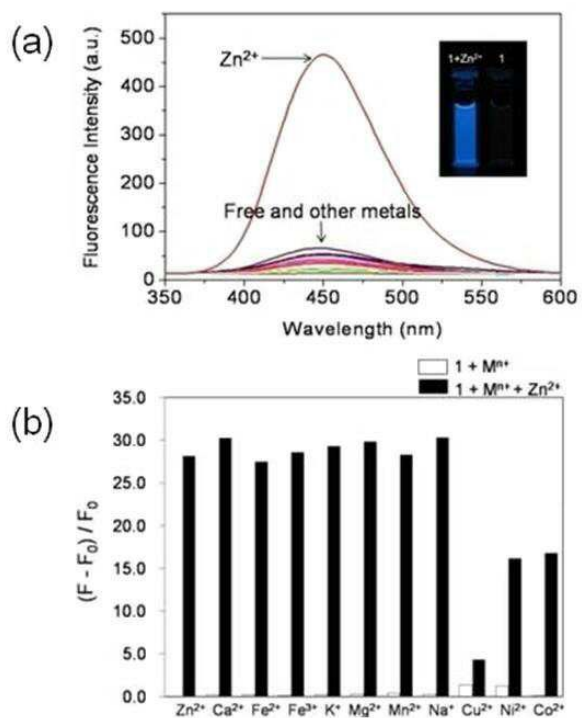
[0084] 본 발명의 탐침의 생물학적 용도로서 이온형성부인 피리티온(2-메르캅토피리딘-N-옥사이드)와 함께 외부로부터 Zn²⁺를 첨가한 후 배양 세포(HeLa 세포) 내 Zn²⁺의 형광 영상화에 대해 시험하였다. 초기 실험에서 화합물 1은 친수성이 있어 세포막에 명백하게 비투과성이라는 것을 발견하였다. 에스테르 작용기는 세포막 침투성이 좋고 에스테르 분해효소(esterase)의 작용에 의해 카복실레이트 센서 화합물 1로 변형된다는 사실에 입각하여 설계한 에틸 에스테르 유도체 화합물 2를 제조하였다. 2 μM의 에스테르 유도체 2로 배양한 HeLa 세포의 공초점 형광 이미지는 40분간 20 μM의 Zn²⁺/피리티온(1:1)로 처리하여 선명하게 얻었으며, 이를 도 6에 나타내었다. 세포-투과성인 강력한 금속이온 킬레이팅제인 N,N,N,N'-테트라키스(2-피리딜메틸)에틸렌디아민(TPEN)으로 장기간 처리하여 노출 시킨 세포의 형광 이미지는 처음의 세기로 회복되었으며, 이들 결과를 통해 화합물 1이 생물학적 용도에 효과적인 세포 내 Zn²⁺ 영상화 탐침임을 확인하였다.

도면

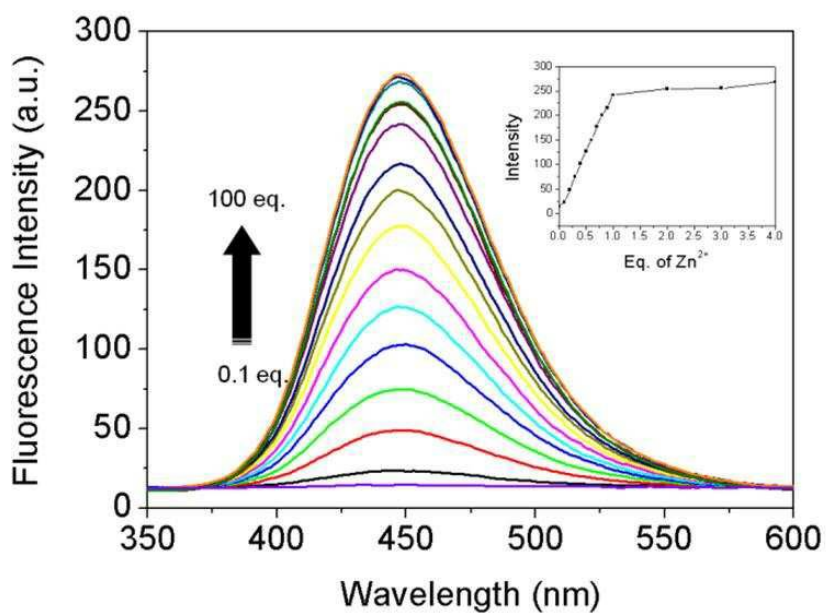
도면1



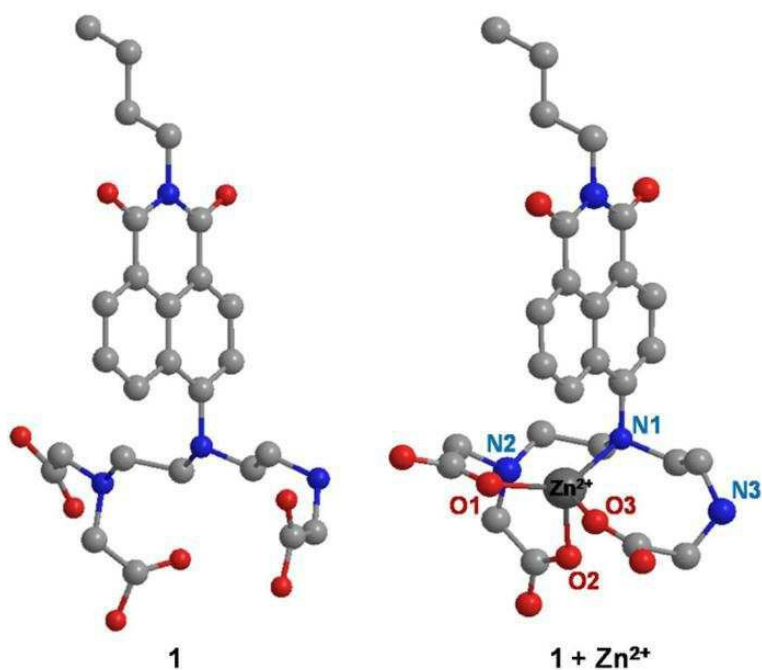
도면2



도면3



도면4



도면5

	HOMO-3	HOMO-2	HOMO-1	HOMO	LUMO	LUMO+1
1						
1+Zn²⁺						

도면6

