



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0036462
(43) 공개일자 2016년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 403/14 (2006.01) A61K 31/497 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 403/14 (2013.01)
A61K 31/497 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0038035
(22) 출원일자 2015년03월19일
심사청구일자 2015년03월19일
(30) 우선권주장
1020140127887 2014년09월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울 서초구 잠원로14길 3, 207동 1703호 (잠원동, 롯데캐슬)
윤준
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이대 종합과학관 D동 501호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

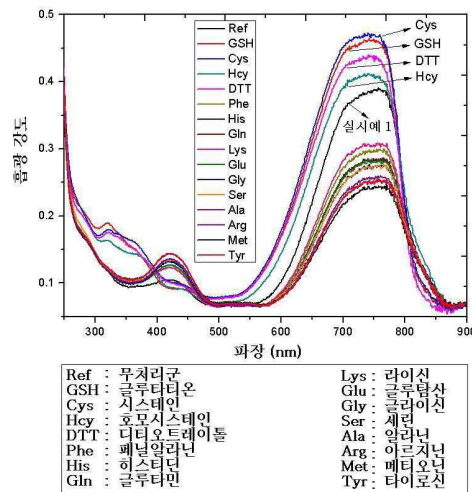
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 글루타티온을 선택적으로 검출하여 패혈증을 진단하기 위한 사이아닌 구조 기반의 화합물

(57) 요약

본 발명은 글루타티온을 선택적으로 검출하여 패혈증을 진단하기 위한 사이아닌 구조 기반의 화합물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 사이아닌 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 중에서, 또는 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온의 농도변화를 유발하는 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 31/22 (2013.01)

G01N 2800/26 (2013.01)

(72) 발명자

김경미

서울 강서구 강서로18마길 9

김다빈

경기 부천시 소사구 중동로71번길 39, 102동 1006호 (송내동, 뉴서울아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711001732

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원 유기소재 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2021.08.31

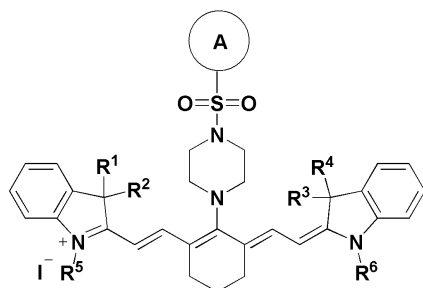
명세서

청구범위

청구항 1

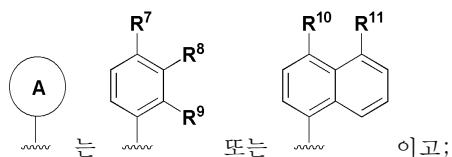
하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 -H, -OH, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;



상기 R^7 , R^8 및 R^9 는 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

상기 R^{10} 및 R^{11} 은 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR¹²R¹³이고,

상기 R^{12} 및 R^{13} 은 독립적으로 C_{1-5} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

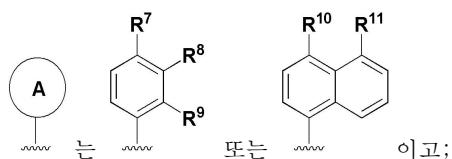
상기 R^{10} 및 R^{11} 은 이들이 연결된 탄소 원자들과 함께 연결됨과 동시에 이들이 연결된 두 개의 폐닐에 동시에 융합(fused)되는, N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 헤테로원자를 포함하는 비치환 또는 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬을 형성할 수 있고,

상기 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬은 -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, =O, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 및 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 -H, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;



상기 R^7 , R^8 및 R^9 는 독립적으로 -H, $-NO_2$, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

상기 R^{10} 및 R^{11} 은 독립적으로 -H, $-NO_2$, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 $-NR^{12}R^{13}$ 이고,

상기 R^{12} 및 R^{13} 은 독립적으로 C_{1-5} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

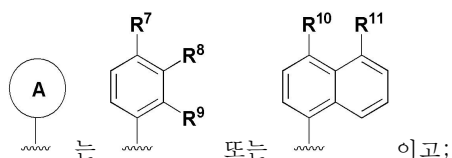
상기 R^{10} 및 R^{11} 은 이들이 연결된 탄소 원자들과 함께 연결됨과 동시에 이들이 연결된 두 개의 페닐에 동시에 융합(fused)되는, N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 헤테로원자를 포함하는 비치환 또는 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬을 형성할 수 있고,

상기 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬은 $-NO_2$, 할로젠, =O, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 및 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;



상기 R^7 , R^8 및 R^9 는 독립적으로 -H 또는 $-NO_2$ 이고;

상기 R^{10} 및 R^{11} 은 독립적으로 -H 또는 $-NR^{12}R^{13}$ 이고,

상기 R^{12} 및 R^{13} 은 독립적으로 C_{1-5} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

상기 R^{10} 및 R^{11} 은 이들이 연결된 탄소 원자들과 함께 연결됨과 동시에 이들이 연결된 두 개의 페닐에 동시에 융합(fused)되는, N을 하나 이상 포함하는 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬을 형성할 수 있고,

상기 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬은 =O 및 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

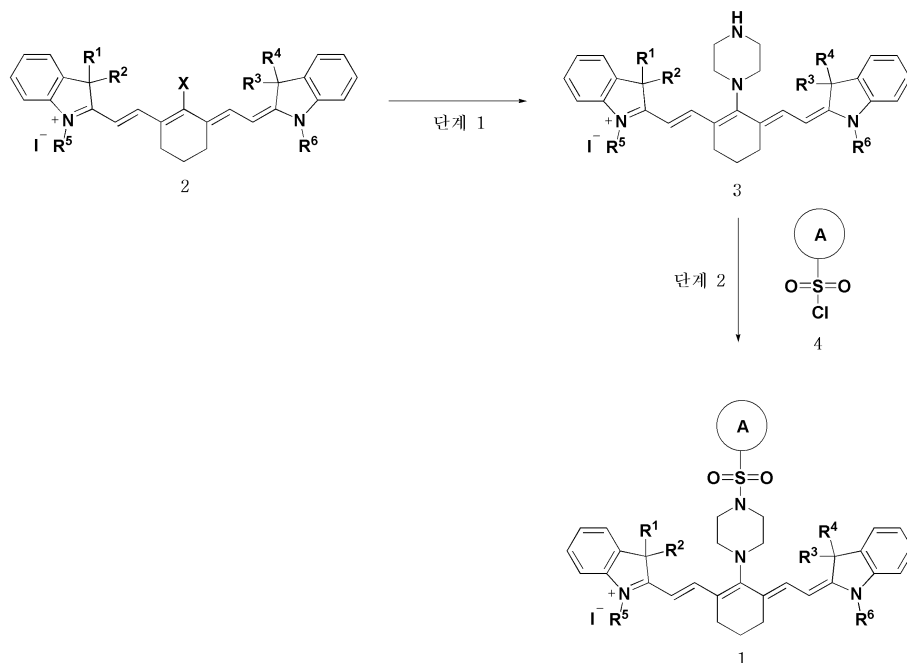
하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

화학식 2로 표시되는 화합물의 할로젠(X)을 피페라진으로 치환하여 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는

단계(단계 1); 및

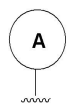
상기 단계 1에서 제조한 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

X는 할로젠이고;



, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ 및 R⁶은 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

청구항 5

제1항의 화합물을 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 싸이올기 함유 아미노산은 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 화학센서.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 싸이올기 함유 아미노산은 글루타티온(Glutathione)인 것을 특징으로 하는 화학센서.

청구항 8

제5항의 화학센서를 이용한 싸이올기 함유 아미노산의 검출방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 싸이올기 함유 아미노산은 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 싸이올기 함유 아미노산은 글루타티온(Glutathione)인 것을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 11

제1항의 화합물을 포함하는 세균성 질환의 진단용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 세균성 질환은 패혈증(Sepsis)인 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 진단용 조성물은 글루타티온 농도의 변화를 검출하는 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.

청구항 14

제11항의 진단용 조성물을 이용한 세균성 질환의 진단방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 세균성 질환은 패혈증(Sepsis)인 것을 특징으로 하는 진단방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 글루타티온을 선택적으로 검출하여 패혈증을 진단하기 위한 사이아닌 구조 기반의 화합물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들은 환원된 자유 싸이올(free thiol) 형태와, 산화된 디설파이드(disulfide) 형태 사이에서 평형을 유지하며 생체 내에서 산화-환원 항상성을 유지하는 중요한 역할을 수행하는 수많은 펩타이드들의 구성요소이다(비특허문헌 1).
- [0003] 비특허문헌 2에서는, 생체 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들의 비정상적인 수준(levels)은 간 손상, 암, 에이즈, 골다공증, 알츠하이머 병, 염증성 장질환, 심장혈관계 질병 등 특정 질병의 발생과 밀접하게 관련이 있음을 개시하고 있다. 즉, 생체 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올(Biothiol)의 수준을 평가한다면, 이와 관련된 몇몇 질병들에 대하여 조기 진단이 가능하게 될 것이다.
- [0004] 이에, 생체 내에서 다양한 아미노산들 중 선택적으로 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산을 검출하기 위한 다양한 형광 프로브(Fluorescent probes)가 개발되었다. 구체적으로, 비특허문헌 3에서는, 싸이올기가 독특한 친핵성 첨가 및 치환반응을 한다는 점을 사용한 프로브에 대하여 개시하고 있다. 하지만, 상기 프로브의 경우, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine), 글루타티온(Glutathione) 등 싸이올기를 포함하는 아미노산을 모두 검출하며 각각의 아미노산을 선택적으로 검출하지 못하는 한계가 있다.
- [0005] 상기 바이오싸이올 중에서 글루타티온(Glutathione)은 세포 내 산화환원 활성도(intracellular redox activity), 이물질 대사(xenobiotic metabolism), 세포 내 신호전달, 유전자 조절 등의 세포 기능과 관련이 있을 뿐만 아니라, 자유 라디칼 및 활성산소에 의하여 유발될 수 있는 세포 손상을 보호하는 아미노산으로 특히 중요하다. 보다 구체적으로, 글루타티온은 생체 내 산화물질과 반응하여 두 분자의 글루타티온이 디설파이드(-S-S-) 결합을 통해 연결되는 글루타티온의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)로 가역적으로 변하며, 상기 작용을 통해 생체 내의 산화-환원 전위를 조절한다.
- [0006] 상기 글루타티온을 선택적으로 검출하기 위하여, 유기 염료를 기반으로 한 몇몇 형광 프로브가 개발되었다. 예를 들면, 비특허문헌 4에서는 비스-스피로피란(bis-spiropyran) 구조에 기반을 둔 유망한 프로브에 관하여 개시하고 있다. 또한, 비특허문헌 5에서는 혈장(blood plasma) 내에서 글루타티온을 선택적으로 검출하기 위한 레조루핀(resorufin) 구조 기반의 프로브에 관하여 개시하고 있으며, 비특허문헌 6에서는 생 세포 내에서 글루타티온을 선택적으로 검출하기 위한 보디피(BODIPY) 구조 기반의 형광 센서에 관하여 개시하고 있다.
- [0007] 글루타티온이 세포 내의 환경에서 약 0.5-10 mM 농도로 존재하여, 주요한 내인성 항산화물질임을 고려할 때, 근-적외선(700-900 nm) 형광 프로브를 사용하여 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 것은, 생물학적 손상을 덜 발생시킴과 함께 상기 파장 영역에서 더 깊숙히 조직(tissue)을 투과할 수 있는 장점이 있다. 하지만, 상기 근-적외선을 사용하여 글루타티온을 검출하기 위하여 개발된 프로브들은 선택성이 우수하지 못한 문제점이 있다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 생체 내 글루타티온을 선택적으로 검출하기 위한 프로브를 개발하기 위하여 연구하던 중, 본 발명에 따른 사이아닌 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온의 농도변화를 유발하는 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L. B. Trends Biochem. Sci. 2003, 28, 32.
- (비특허문헌 0002) Herzenberg, L. A.; De Rosa, S. C.; Dubs, J. G.; Roederer, M.; Anderson, M. T.; Ela, S. W.; Deresinski S. C.; Herzenberg, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997, 94, 1967.
- (비특허문헌 0003) Yin, L.-L.; Chen, Z.-Z.; Tong, L.-L.; Xu, K.-H.; Tang, B. Chin. J. Anal. Chem. 2009, 37, 1073.
- (비특허문헌 0004) Shao, N.; Jin, J.; Wang, H.; Zheng, J.; Yang, R.; Chan, W.; Abliz, C. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 725.

(비특허문헌 0005) Guo, Y.; Yang, X.; Hakuna, L.; Barve, A.; Escobedo, J. O.; Lowry, M.; Strongin, R. M. Sensors 2012, 12, 5940.

(비특허문헌 0006) Niu, L.-Y.; Guan, Y.-S.; Chen, Y.-Z.; Wu, L.-Z.; Tung, C.-H.; Yang, Q.-Z. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 18928.

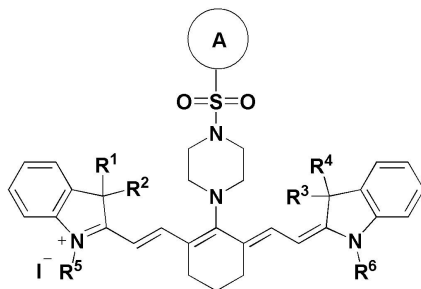
발명의 내용

해결하려는 과제

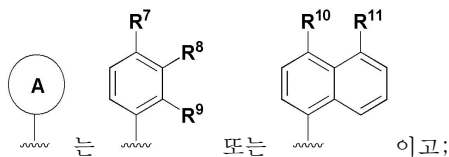
- [0010] 본 발명의 목적은 글루타티온을 선택적으로 검출하기 위한 사이아닌 구조 기반의 화합물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학센서를 이용한 싸이올기 함유 아미노산의 검출방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 세균성 질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 진단용 조성물을 이용한 세균성 질환의 진단방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.
- [0017] [화학식 1]

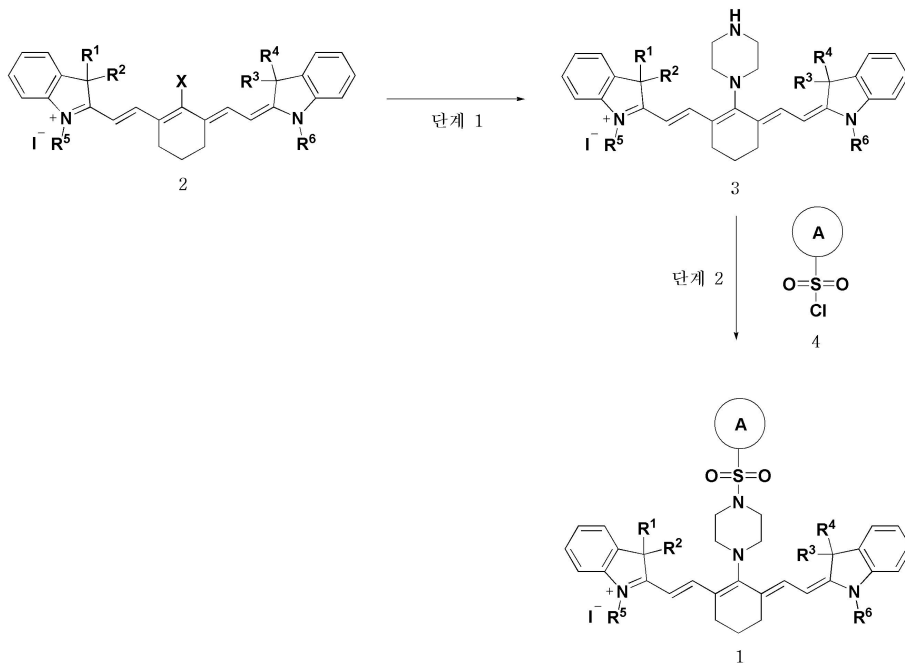


- [0018]
- [0019] 상기 화학식 1에서,
- [0020] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 -H, -OH, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;



- [0021] 는 또는 이고;
- [0022] 상기 R^7 , R^8 및 R^9 는 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;
- [0023] 상기 R^{10} 및 R^{11} 은 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR¹²R¹³ 이고,
- [0024] 상기 R^{12} 및 R^{13} 은 독립적으로 C_{1-5} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

- [0025] 상기 R^{10} 및 R^{11} 은 이들이 연결된 탄소 원자들과 함께 연결됨과 동시에 이들이 연결된 두 개의 폐닐에 동시에 융합(fused)되는, N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 헤테로원자를 포함하는 비치환 또는 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬을 형성할 수 있고,
- [0026] 상기 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬은 -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, =O, C₁₋₁₀의 직쇄 또는 측쇄 알킬 및 C₁₋₁₀의 직쇄 또는 측쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 6 원자 헤테로싸이클로알킬이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,
- [0028] 화학식 2로 표시되는 화합물의 할로젠(X)을 피페라진으로 치환하여 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및
- [0029] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:
- [0030] [반응식 1]



- [0031]
- [0032] 상기 반응식 1에서,
- [0033] X는 할로젠이고;
- [0034] , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.
- [0035] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 화학센서를 이용한 싸이올기 함유 아미노산의 검출방법을 제공한다.
- [0037] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 세균성 질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 이용한 세균성 질환의 진단방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명에 따른 사이아닌 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 시스템인, 호모시스테인

인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 중에서, 또는 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온의 농도변화를 유발하는 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040]

도 1은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰한 이미지이고,

도 2는 실시예 1에서 제조한 화합물과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰한 이미지이고,

도 3(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,

도 3(B)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 3(C)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 3(D)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 시스테인과 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 3(E)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 호모시스테인과 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 3(F)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 글루타티온과 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 4는 실시예 2에서 제조한 화합물과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각, 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰한 이미지이고,

도 5는 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온, 시스테인, 호모시스테인을 각각, 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 시간에 따른 736 nm 부근의 형광강도 증가량을 관찰한 이미지이고,

도 6은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-50 μ M로 서서히 적정하며 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이고,

도 7은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-50 μ M로 서서히 적정하며 나타나는 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이고,

도 8은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온을 첨가하여 시간 경과에 따라 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이고,

도 9는 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온을 첨가하여 시간 경과에 따라 나타나는 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이고,

도 10은 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물을 반응시킨 후, 매트릭스 보조된 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량 분석법(Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)을 통해 관찰한 결과를 나타내는 이미지이고,

도 11(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,

도 11(B)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 11(C)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 11(D)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 시스테인과 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 11(E)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 호모시스테인과 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 11(F)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 12(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,

도 12(B)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 12(C)는 과산화수소(H_2O_2)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 13(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 RAW 264.7 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,

도 13(B)는 RAW 264.7 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 13(C)는 RAW 264.7 세포에 산화제 특성을 갖는 페록시나이트라이트의 생성을 유도하여 글루타티온의 농도를 감소시킨 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하고 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 14(A)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 14(B)는 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 14(C)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 14(D)는 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 15(A)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 간(liver)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 15(B)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 신장(kidney)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 15(C)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 폐(lung)를 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 15(D)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서

제조한 화합물을 처리한 마우스의 비장(spleen)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 16(A)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 16(B)는 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 17(A)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 간(liver)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 17(B)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 신장(kidney)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 17(C)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 폐(lung)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 17(D)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 비장(spleen)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

도 18은 정상 마우스와 패혈증을 유도한 마우스의 복막 세포 내 호중구(neutrophil)를 채취하여 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting) 분석법을 통해 나타난 글루타티온 농도를 관찰한 이미지이고,

도 19는 마우스의 골수로부터 추출한 호중구에 녹색 형광 단백질이 태깅된 녹농균을 감염시키고, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 20은 실시예 2에서 제조한 화합물에 대하여, 피페라진을 포함하는 두 개의 조각으로 나눈 것을 나타내는 이미지이고,

도 21은 Gaussian 09 프로그램을 사용한 B3LYP/6-31G^{*} 레벨에서 분포 함수 이론(Density Function Theory, DFT)에 입각하여 실시예 1, 실시예 2, 조각 1 및 조각 2 화합물의 삼차원적인 구조를 나타내는 이미지이다. (A) 피페라진의 가능한 형태(Conformation); (B) 조각 1; (C) 조각 2; (D) 실시예 2; (E) 실시예 1; 화합물을 나타내고,

도 22는 Gaussian 09 프로그램을 사용한 B3LYP/6-31G^{*} 레벨에서 분포 함수 이론(Density Function Theory, DFT)에 입각하여 실시예 1, 실시예 2 및 조각 2 화합물의 밴드-갭을 측정한 이미지이다.

도 23은 실시예 3에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰한 이미지이다.

도 24는 실시예 3에서 제조한 화합물과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰한 이미지이다.

도 25는 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-100 μ M로 서서히 적정하며 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

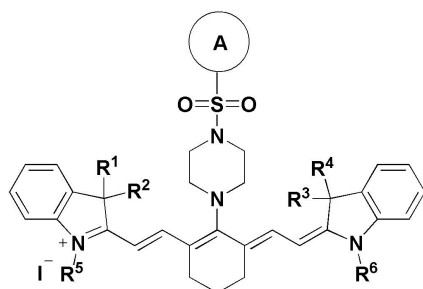
도 26은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-100 μ M로 서서히 적정하며 나타나는 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

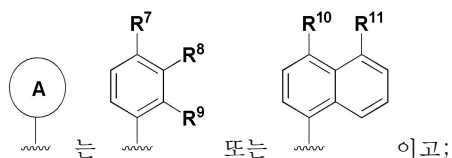
본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 -H, -OH, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;



상기 R^7 , R^8 및 R^9 는 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

상기 R^{10} 및 R^{11} 은 독립적으로 -H, -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 -NR¹²R¹³이고,

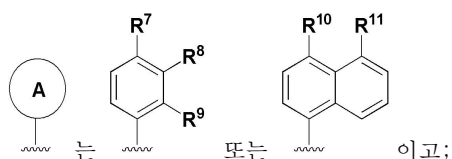
상기 R^{12} 및 R^{13} 은 독립적으로 C_{1-6} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

상기 R^{10} 및 R^{11} 은 이들이 연결된 탄소 원자들과 함께 연결됨과 동시에 이들이 연결된 두 개의 폐닐에 동시에 융합(fused)되는, N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 헤테로원자를 포함하는 비치환 또는 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고,

상기 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬은 -OH, -CN, -NO₂, 할로젠, =O, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 및 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬이다.

바람직하게는,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 -H, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;



상기 R^7 , R^8 및 R^9 는 독립적으로 -H, -NO₂, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

[0057] 상기 R^{10} 및 R^{11} 은 독립적으로 -H, $-NO_2$, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시 또는 $-NR^{12}R^{13}$ 이고,

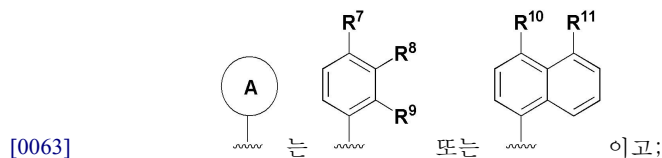
[0058] 상기 R^{12} 및 R^{13} 은 독립적으로 C_{1-5} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

[0059] 상기 R^{10} 및 R^{11} 은 이들이 연결된 탄소 원자들과 함께 연결됨과 동시에 이들이 연결된 두 개의 폐닐에 동시에 융합(fused)되는, N, O 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 헤테로사이클로알킬을 포함하는 비치환 또는 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고,

[0060] 상기 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬은 $-NO_2$, 할로젠, $=O$, C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬 및 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬이다.

[0061] 더욱 바람직하게는,

[0062] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;



[0064] 상기 R^7 , R^8 및 R^9 는 독립적으로 -H 또는 $-NO_2$ 이고;

[0065] 상기 R^{10} 및 R^{11} 은 독립적으로 -H 또는 $-NR^{12}R^{13}$ 이고,

[0066] 상기 R^{12} 및 R^{13} 은 독립적으로 C_{1-5} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

[0067] 상기 R^{10} 및 R^{11} 은 이들이 연결된 탄소 원자들과 함께 연결됨과 동시에 이들이 연결된 두 개의 폐닐에 동시에 융합(fused)되는, N을 하나 이상 포함하는 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고,

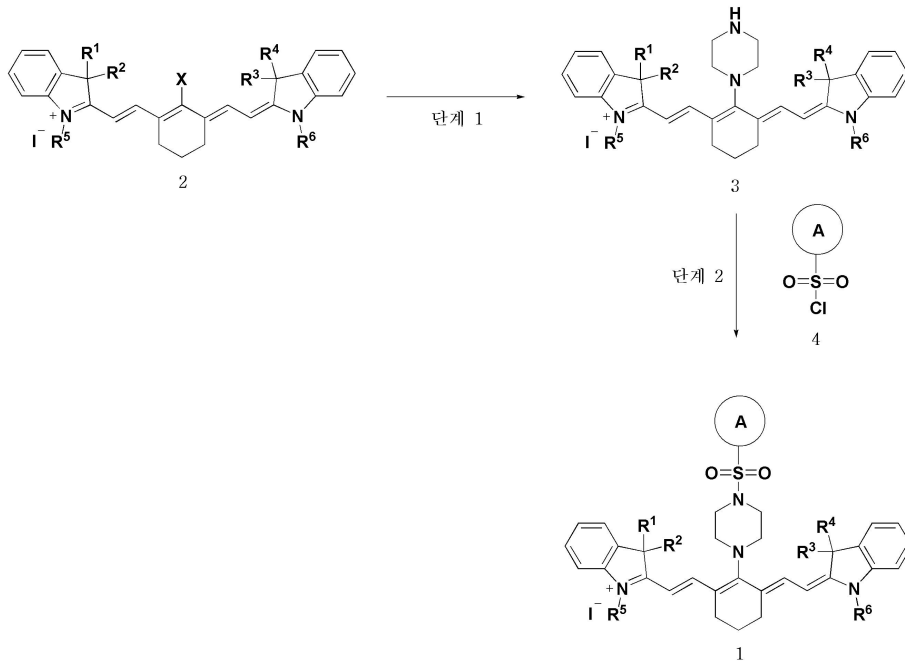
[0068] 상기 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬은 $=O$ 및 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 6 원자 헤테로사이클로알킬이다.

[0069] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0070] 화학식 2로 표시되는 화합물의 할로젠(X)을 피페라진으로 치환하여 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

[0071] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

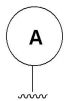
[0072] [반응식 1]



[0073]

[0074] 상기 반응식 1에서,

[0075] X는 할로젠이고;



[0076] , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

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

[0078] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 화학식 2로 표시되는 화합물의 할로겐(X)을 피페라진으로 치환하여 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이며, 보다 구체적으로는, 화학식 2로 표시되는 화합물을 용매에 용해시킨 후, 피페라진을 첨가하여 교반하고, 실리카겔 크로마토그래피를 통한 정제를 통해 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0079] 이때, 상기 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, 아세트나셀설포네이트, 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, 디메틸포름아미드(DMF)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0080] 또한, 반응온도는 0℃에서 용매의 비등점 사이에서 수행하는 것이 바람직하고, 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.

[0081] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 제조한 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이며, 보다 구체적으로는, 용매에 용해된 화학식 3으로 표시되는 화합물에 염기를 첨가하여 교반하고, 용매에 용해된 화학식 4로 표시되는 화합물을 방울 단위로 첨가하여 더 교반한 후, 실리카겔 크로마토그래피를 통한 정제를 통해 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0082] 이때, 상기 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, 아세토나젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시크레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만텔레이트 등을 사용할 수 있으며, 디클로로메탄을 사용하는 것이 바람직하다.

[0083] 또한, 상기 염기로는 트리에틸아민(TEA), 포타슘하이드록사이드(KOH), 소듐하이드록사이드(NaOH), 리튬하이드록사이드(LiOH), 세슘카보네이트(Cs_2CO_3) 등을 사용할 수 있으며, 트리에틸아민(TEA)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0084] 나아가, 반응온도는 0℃에서 용매의 비등점 사이에서 수행하는 것이 바람직하고, 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.

[0085] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서를 제공한다. 여기서 상기 싸이올기 함유 아미노산은 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 검출할 수 있으며, 글루타티온을 검출하는 것이 바람직하다.

[0086] 나아가, 본 발명은 상기 화학센서를 이용한 싸이올기 함유 아미노산의 검출방법을 제공한다. 여기서 상기 싸이올기 함유 아미노산은 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 검출할 수 있으며, 글루타티온을 검출하는 것이 바람직하다.

[0087] 상기 검출방법의 원리로는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물과 글루타티온이 반응할 때, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 치환되어 있던 설포닐-페닐 유도체가 떨어져 나가 자유 피페라진(free piperazine)을 갖는 사이아닌 유도체 화합물이 생성되고, 상기 떨어져 나간 설포닐-페닐 유도체 중, 페닐 유도체가 글루타티온 내 싸이올기와 연결된 화합물이 생성됨으로써 발생하는 흡광 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합함으로써 검출할 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 세균성 질환의 진단용 조성물을 제공한다. 여기서, 상기 세균성 질환은 패혈증(Sepsis)인 것을 특징으로 한다.

[0089] 나아가, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 이용한 세균성 질환의 진단방법을 제공한다. 여기서, 상기 세균성 질환은 패혈증(Sepsis)인 것을 특징으로 한다.

[0090] 일반적으로 패혈증에 걸리게 되면, 생체 내 백혈구의 일종인 호중구(neutrophil)가 산화스트레스(oxidative stress)를 받게 되어 과량의 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 발생시킨다. 이는 신경, 피부, 소화기 등의 계통에 장애를 유발한다. 생체 내에서 산화-환원 전위를 조절하는 항 산화물질인 글루타티온은 패혈증으로 인하여 발생한 과량의 활성산소종과 반응하여 두 분자의 글루타티온이 디설파이드(-S-S-) 결합을 통해 연결되는 글루타티온의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)로 가역적으로 변하게 된다. 따라서, 생체 내 글루타티온의 농도가 감소하게 되며, 상기 농도 감소를 관찰함으로써 패혈증을 진단할 수 있게 된다.

[0091] 상기 화학센서의 글루타티온 검출 원리인 흡광 또는 형광 특징의 변화와, 패혈증 진단능력을 증명하기 위하여 하기 일련의 실험을 수행하였다.

[0092] 먼저, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 생체시료 중에서 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산과 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하는 것으로 나타났다(실험예 1의 도 1 및 도 2 참조).

[0093] 또한, 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 1에서 제조한 화합물은 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산과 반응하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰시 강한 적색 형광이 발생하는 것으로 나타났다(실험예 2의 도 3 참조).

[0094] 나아가, 글루타티온(Glutathione, GSH)에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 실험

험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 생체시료 중에서 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼의 변화가 발생하는 것으로 나타났다(실험예 3의 도 4 및 도 5 참조).

[0095] 또한, 글루타티온(Glutathione, GSH)의 농도 변화에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온에 대하여 농도의존적으로 반응하는 것으로 나타났다(실험예 4의 도 6 및 도 7 참조).

[0096] 나아가, 글루타티온(Glutathione, GSH)과 실시예 2에서 제조한 화합물의 반응을 유도한 후, 시간 경과에 따른 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온과 반응하여 신속하게 흡광 및 형광 스펙트럼 변화가 발생하는 것으로 나타났다(실험예 5의 도 8 및 도 9 참조).

[0097] 또한, 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물의 반응 메커니즘을 이해하기 위하여 매트릭스 보조된 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량 분석법(Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)을 통해 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물을 반응시킨 후 관찰한 결과, 본 발명에 따른 사이아닌 구조 기반의 화합물이 글루타티온과 반응시 발생하는 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화는 도 10의 삽도에 표시된 반응으로 인한 것임을 확인하였다(실험예 6의 도 10).

[0098] 나아가, 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰시 강한 적색 형광이 발생하는 것으로 나타났다(실험예 7의 도 11 참조).

[0099] 또한, 산화제 존재에 따른 글루타티온의 농도변화 관찰하기 위하여 항 산화물질인 글루타티온을 함유하는 상기 실험예 2에서 준비한 HeLa 세포에 산화제인 과산화수소(H_2O_2) 100 μ M을 37°C에서 30분 동안 처리하여 글루타티온의 농도변화를 유도하고, 실시예 2에서 제조한 화합물 20 μ M을 37°C에서 20분 동안 함께 배양하였다. 이후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화한 결과(여기 파장은 635 nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다), 실시예 2에서 제조한 화합물은 관찰되는 적색 형광의 강도로부터 세포 내 글루타티온의 농도를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온(GSH)의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(GSSG)와는 반응하지 않으므로 글루타티온에 대한 선택성이 매우 우수한 것으로 나타났다(실험예 8의 도 12 참조).

[0100] 나아가, 산화제 존재에 따른 글루타티온의 농도변화를 관찰하기 위하여 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) 내 37°C 5% CO_2 환경에서 RAW 264.7 세포(대식 세포주, Korea Cell Line Bank)를 배양하였다. 상기 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 20분 동안 1 μ g/mL, 인터페론- γ 를 16시간 동안 50 ng/mL, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 20분 동안 20 μ M 처리하여 산화제 특성을 갖는 내인성 페록시나이트라이드의 생성을 유도하였다. 이후, 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10^5 세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed)하였다. 24시간 후, 실시예 2에서 제조한 화합물 20 μ M을 20분 동안 처리한 후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하고 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다(여기 파장은 635 nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 관찰되는 적색 형광의 강도로부터 세포 내 글루타티온의 농도를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온(GSH)의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(GSSG)와는 반응하지 않으므로 글루타티온에 대한 선택성이 매우 우수한 것으로 나타났다(실험예 9의 도 13 참조).

[0101] 또한, 마우스 모델을 사용하여, 실시예 2에서 제조한 화합물이 생체 내에서도 글루타티온을 검출하기 위하여 사용 가능한지 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 체내 활상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼으로부터 관찰되는 적색 형광의 강도로부터, 생체 내 글루타티온의 분포를 관찰하는데 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다(실험예 10의 도 14 및 도 15, 실험예 11의 도 16 및 도 17 참조).

조).

[0102] 또한, 실시예 2에서 제조한 화합물을 패혈증 진단에 사용할 수 있는지 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온의 농도 측정을 통해 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다(실험예 12의 도 18, 실험예 13의 도 19 참조).

[0103] 나아가, 글루타티온에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택성 원인을 분석하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택성은 글루타티온과 반응이 진행되는 활성부위(active site) 내 피페라진의 형태, 피페라진과 결합하고 있는 단실(dansyl) 기의 결합 형태, S-N 결합길이 및 밴드-갭 에너지로부터 발생하는 것임을 확인하였다(실험예 14의 도 20, 도 21 및 도 22 참조).

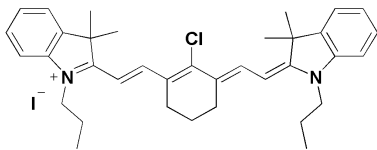
[0104] 또한, 글루타티온(Glutathione, GSH)에 대하여, 실시예 3에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 3에서 제조한 화합물은 생체시료 중에서 다양한 아미노산 중 오직 글루타티온과 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온을 검출하는데 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다(실험예 15의 도 23 및 24 참조).

[0105] 나아가, 글루타티온(Glutathione, GSH)의 농도 변화에 대하여, 실시예 3에서 제조한 화합물의 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 실시예 3에서 제조한 화합물은 다양한 아미노산들 중 오직 글루타티온에 대하여 농도 의존적으로 반응함을 확인하였다(실험예 16의 도 25 및 도 26 참조).

[0106] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0107] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

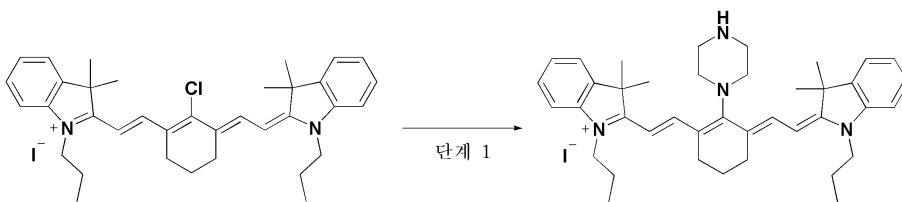
[0108] <제조예 1> 2-[2-[2-클로로-3-[(1,3-디하이드로-3,3-디메틸-1-프로필-2H-인돌-2-일리덴)에틸리덴]-1-싸이클로헥센-1-일]에테닐]-3,3-디메틸-1-프로필인돌륨 아이오다이드(IR-780 아이오다이드)의 제조



[0109] IR-780 아이오다이드를 Sigma-Aldrich사에서 구매하여 준비하였다.

[0111] <실시예 1> 2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리덴)에틸리덴)-2-(4-(2,4-디나이트로페닐설폰닐)피페라진-1-일)싸이클로헥스-1-엔일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조

[0112] 단계 1 : 2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리덴)에틸리덴)-2-(4-(2,4-디나이트로페닐설폰닐)피페라진-1-일)싸이클로헥스-1-엔일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조



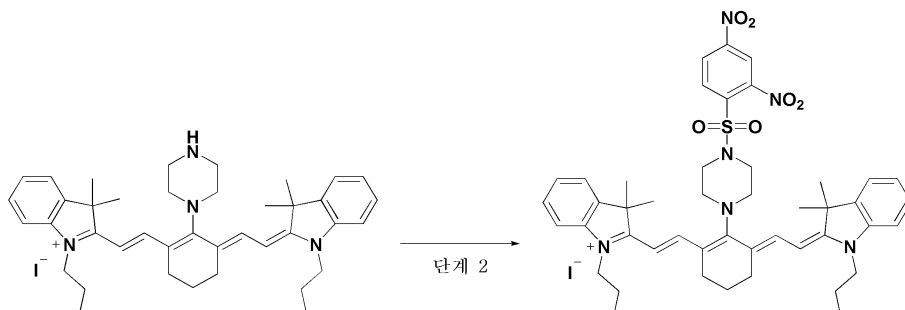
[0113] 아르곤 환경 내 무수 DMF(Dimethylformamide) 10 mL에 용해된 상기 제조예 1에서 제조한 화합물에 피페라진 69 mg을 첨가하였다. 85℃에서 4시간 동안 교반한 후, 상온으로 냉각하였다. 감압 하에서 용매를 제거하고, 이동상으로 디클로로메탄:메탄올(40:1)을 사용한 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 정제하여 목적 화합물 136 mg을 파란색 고체 형태로 얻었다(수득률 : 85%).

[0115] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (d, J = 15.0 Hz, 2H), 7.26-7.32 (m, 4H), 7.09 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 5.80 (d, J = 15.0 Hz, 2H), 3.88 (m, 8H), 3.26 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.44 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 1.84 (m, 6H), 1.68 (s, 12H), 1.02 (t, J = 6.0 Hz, 6H).

[0116] ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 169.1, 142.8, 141.0, 140.3, 128.3, 123.7, 123.5, 122.2, 109.4, 85.9,

55.3, 48.2, 47.2, 45.2, 29.2, 25.0, 21.8, 20.3, 11.8. ESI MS $m/z = 589.6 [M-I]^{+}$; calcd exact mass 716.3.

[0117] 단계 2 : 2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리텐)에틸리텐)-2-(4-(2,4-디나이트로페닐설폰)피페라진-1-일)사이클로헥스-1-엔일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조



[0118]

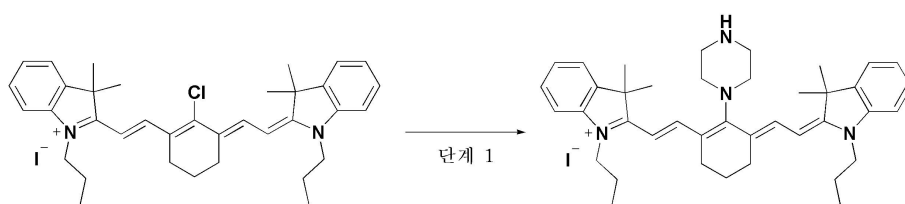
[0119] 아르곤 환경 내 무수 디클로로메탄 10 mL에 용해된 상기 단계 1에서 제조한 화합물에 Et_3N 30 mg을 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후, 디클로로메탄 5 mL에 용해된 2,4-디나이트로벤젠-1-설폰일 클로라이드 53 mg을 0℃에서 방울 단위로 첨가하였다. 상온에서 4시간 동안 더 교반한 후, 감압 하에서 용매를 제거하고, 이동 상으로 디클로로메탄:메탄올(30:1)을 사용한 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 정제하여 목적 화합물 167 mg을 파란색 고체 형태로 얻었다(수득률 : 75%).

[0120] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.77 (m, 2H), 8.52 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 15.0$ Hz, 2H), 7.35 (m, 4H), 7.21 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 5.95 (d, $J = 15.0$ Hz, 2H), 3.96 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.76 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.69 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.49 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 1.86 (m, 6H), 1.66 (s, 12H), 1.05 (t, $J = 6.0$ Hz, 6H).

[0121] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.4, 169.9, 149.8, 147.9, 142.5, 141.9, 140.5, 136.8, 134.9, 128.6, 127.8, 126.3, 124.5, 122.2, 119.4, 110.0, 98.2, 54.0, 48.6, 47.8, 45.6, 28.9, 25.3, 21.5, 20.6, 11.7. MALDI-TOF MS $m/z = 820.5 [M-I]^{+}$; calcd exact mass 946.3.

[0122] <실시예 2> 2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리텐)에틸리텐)-2-(4-(5-(디메틸아미노)나프탈렌-1-일설폰)피페라진-1-일)사이클로헥스-1-엔일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조

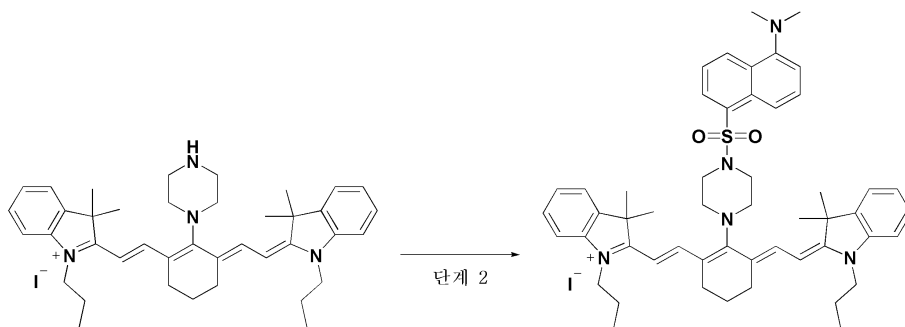
[0123] 단계 1 : 2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리텐)에틸리텐)-2-(피페라진-1-일)사이클로헥스-1-엔일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조



[0124]

[0125] 상기 실시예 1의 단계 1과 동일한 방법으로 수행하여 목적 화합물을 얻었다.

[0126] 단계 2 : 2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리텐)에틸리텐)-2-(4-(5-(디메틸아미노)나프탈렌-1-일설폰)피페라진-1-일)사이클로헥스-1-엔일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조



[0127]

[0128]

아르곤 환경 내 무수 디클로로메탄 10 mL에 용해된 상기 단계 1에서 제조한 화합물에 Et₃N 30 mg을 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후, 디클로로메탄 5 mL에 용해된 5-(디메틸아미노)나프탈렌-1-설폰일 클로라이드 53 mg을 0℃에서 방울 단위로 첨가하였다. 상온에서 4시간 동안 더 교반한 후, 감압 하에서 용매를 제거하고, 이동 상으로 디클로로메탄:메탄올(30:1)을 사용한 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 정제하여 목적 화합물 167 mg을 파란색 고체 형태로 얻었다(수득률 : 82%).

[0129]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.60 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.59-7.70 (m, 5H), 7.36 (m, 2H), 7.18-7.28 (m, 4H), 7.08 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 5.95 (d, J = 15.0 Hz, 2H), 3.99 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.55 (d, J = 6.0 Hz, 4H), 3.41 (d, J = 6.0 Hz, 4H), 2.96 (s, 6H), 2.47 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 1.83 (m, 6H), 1.29 (s, 12H), 1.02 (t, J = 6.0 Hz, 6H).

[0130]

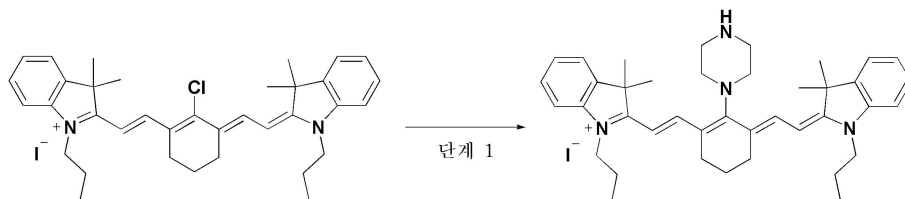
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 168.9, 152.0, 142.5, 141.7, 140.5, 132.0, 130.9, 130.1, 128.7, 128.6, 127.2, 124.4, 123.6, 122.0, 110.3, 98.8, 53.3, 48.3, 47.6, 45.8, 45.6, 28.2, 25.4, 21.5, 20.6, 11.7. MALDI-TOF MS m/z = 822.7 [M-I]⁺; calcd exact mass 949.4.

[0131]

<실시예 3> 2-((E)-2-((E)-2-(4-((2-부틸-1,3-디옥소-2,3-디하이드로-1H-벤젠아이소퀴놀린-6-일)설폰닐)피페라진-1-일)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리덴)에틸리덴)사이클로헥스-1-엔-1-일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조

[0132]

단계 1 : 2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리덴)에틸리덴)-2-(피페라진-1-일)사이클로헥스-1-엔일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조



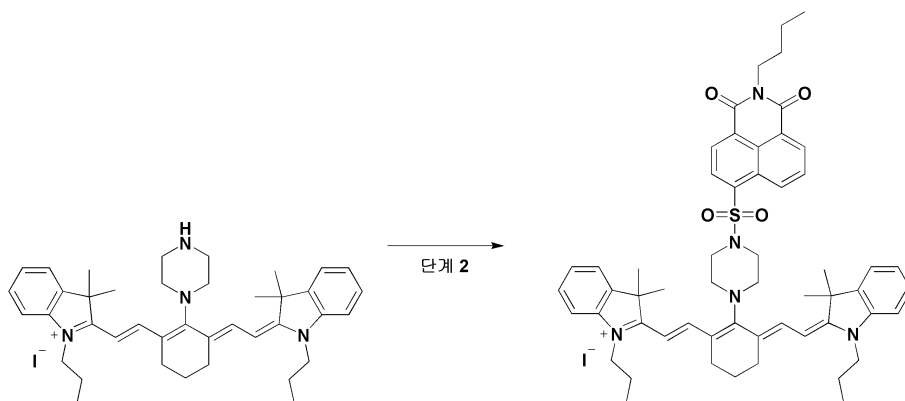
[0133]

[0134]

상기 실시예 1의 단계 1과 동일한 방법으로 수행하여 목적 화합물을 얻었다.

[0135]

단계 2 : 2-((E)-2-((E)-2-(4-((2-부틸-1,3-디옥소-2,3-디하이드로-1H-벤젠아이소퀴놀린-6-일)설폰닐)피페라진-1-일)-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌린-2-일리덴)에틸리덴)사이클로헥스-1-엔-1-일)바이닐)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌륨 아이오다이드의 제조



아르곤 환경 내 무수 디클로로메탄 10 mL에 용해된 상기 단계 1에서 제조한 화합물에 Et₃N 30 mg을 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후, 디클로로메탄 5 mL에 용해된 2-부틸-1,3-디옥소-2,3-디하이드로-1H-벤조아이스퀴놀린-6-설폰닐 클로라이드 53 mg을 0℃에서 방울 단위로 첨가하였다. 상온에서 4시간 동안 더 교반한 후, 감압 하에서 용매를 제거하고, 이동 상으로 디클로로메탄:메탄올(30:1)을 사용한 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 정제하여 목적 화합물 41.5 mg을 파란색 고체 형태로 얻었다(수득률 : 27%).

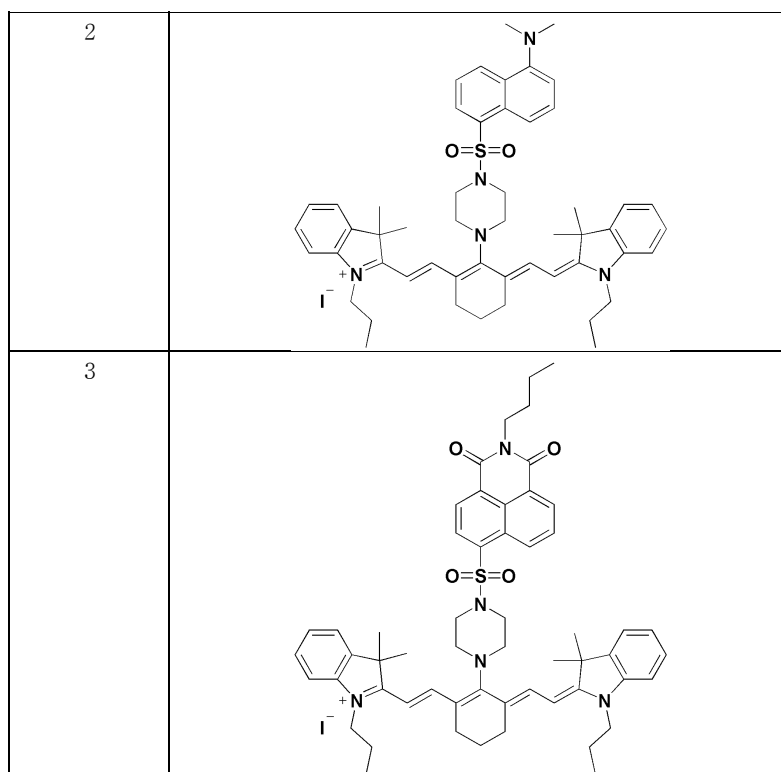
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.30(d, *J*= 8 Hz, 1H, Ar-H), 8.82 (t, *J*= 8 Hz, 2H, Ar-H), 8.55 (d, *J*= 8 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (t, *J*= 8 Hz, 1H, Ar-H), 7.63 (t, *J*= 12 Hz, 2H, Ar-H), 7.37-7.34 (m, 2H, Ar-H), 7.21 (d, *J*= 4 Hz, 4H, Ar-H), 7.07 (d, *J*= 8 Hz, 2H, CH₂=CH₂), 5.95(d, *J*= 16 Hz, 2H, CH₂=CH₂), 4.25(t, *J*= 8 Hz, 2H, CH₂), 4.0(t, *J*= 8 Hz, 4H, CH₂), 3.60(t, *J*= 8 Hz, 4H, CH₂), 3.46(t, *J*= 8 Hz, 4H, CH₂), 2.49(t, *J*= 8 Hz, 4H, CH₂), 1.85-1.80(m, 6H, CH₂), 1.75(t, *J*= 8 Hz, 2H, CH₂), 1.47(t, *J*= 8 Hz, 2H, CH₂), 1.36(s, 12H, CH₃), 1.04(t, *J*= 8 Hz, 6H, CH₃), 0.97(t, *J*= 8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (100MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.42, 169.03, 163.50, 162.92, 142.70, 141.79, 140.52, 129.87, 129.33, 128.89, 127.50, 127.40, 124.74, 122.11, 110.49, 99.12, 53.53, 48.51, 47.79, 46.03, 40.88, 30.36, 28.70, 25.64, 20.81, 20.54, 11.92. ESI m/z = 1031.78. [M]⁺; calculated exact mass = 1031.39. ESI m/z = 1031.78 [M]⁺; calculated exact mass = 1031.39.

하기 표 1에 실시예 1-3에서 제조한 화합물의 화학구조식을 정리하여 나타내었다.

표 1

실시예	화학구조식
1	



[0142]

<실험예 1> 바이오싸이올(Biothiol) 검출능력 평가

[0143]

싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0144]

<1-1> 흡광 스펙트럼 관찰

[0145]

실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라닌, 아르지닌, 메티오닌, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0146]

도 1은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰한 이미지이다.

[0147]

도 1에 나타난 바와 같이, 분자 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨)의 경우 750 nm 파장 대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되는 반면, 분자 내 싸이올기(R-SH)를 포함하지 않는 다른 아미노산들은 750 nm 파장 대에서 약한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0148]

<1-2> 형광 스펙트럼 관찰

[0149]

UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하는 대신에, RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 사용하여 형광 스펙트럼을 관찰하는 것을 제외하고 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 수행하였다(λ_{ex} =730nm, λ_{em} =736 nm, slit:10/10 nm). 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0150]

도 2는 실시예 1에서 제조한 화합물과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 형광 스펙

트럼을 관찰한 이미지이다.

- [0151] 도 2에 나타난 바와 같이, 분자 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨)의 경우 736 nm 파장 대에서 강한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되는 반면, 분자 내 싸이올기(R-SH)를 포함하지 않는 다른 아미노산들은 736 nm 파장 대에서 약한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0152] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 생체시료 중에서 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산과 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산을 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0153] <실험예 2> 세포 내 바이오싸이올(Biothiol) 검출능력 평가 1
- [0154] 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0155] 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) 내 37℃ 5% CO₂ 환경에서 HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 배양하였다. 싸이올 차단제로 알려져 있는 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM) 1mM을 20분 동안 전처리하거나 처리하지 않고, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온을 각각 100 μM 첨가한 후, RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10^5 세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed) 하였다. 24시간 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μM을 첨가하여 37℃에서 20분 동안 함께 배양하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 두 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다(여기 파장은 635 nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0156] 도 3(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,
- [0157] 도 3(B)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0158] 도 3(C)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0159] 도 3(D)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 시스테인과 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0160] 도 3(E)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 호모시스테인과 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0161] 도 3(F)는 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 글루타티온과 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0162] 도 3(A)와 도 3(B)에 나타난 바와 같이, 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 경우, 적색 형광 관찰되지 않았다. 하지만, HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 상기 세포 내 존재하는 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산과 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0163] 또한, 도 3(C)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, NMM으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산이 억제되어 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 아미노산이 존재하지 않게 되므로 적색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 하지만, 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온을 각각 더 첨가한 경우인 도 3(D), 도 3(E), 도 3(F)에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 수 있는 싸이올기(R-SH)를

포함하는 아미노산이 세포질 내로 첨가되어 반응하므로, 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0164] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산과 반응하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰시 강한 적색 형광이 발생하므로, 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산을 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0165] <실험예 3> 글루타티온에 대한 선택성 평가 1

[0166] 글루타티온(Glutathione, GSH)에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0167] 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)와 글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이틀, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라닌, 아르지닌, 메티오닌, 타이로신을 각각 100 μ M씩 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 2에서 제조한 화합물을 10 μ M 처리한 후, 25°C에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 사용하여 형광 스펙트럼을 관찰하였다(λ_{ex} =730nm, λ_{em} =736 nm, slit:10/10 nm). 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0168] 도 4는 실시예 2에서 제조한 화합물과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각, 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰한 이미지이고,

[0169] 도 5는 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온, 시스테인, 호모시스테인을 각각, 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 시간에 따른 736 nm 부근의 형광강도 증가량을 관찰한 이미지이다.

[0170] 도 4에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물은 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 736 nm 부근에서 강한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되는 반면, 글루타티온 이외의 다른 아미노산들은 736 nm 파장대에서 약한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0171] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물은 분자 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 736 nm 부근에서 높은 형광 강도 증가량을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0172] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 생체시료 중에서 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 형광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0173] <실험예 4> 글루타티온의 농도에 따른 흡광 및 형광 스펙트럼 관찰 1

[0174] 글루타티온(Glutathione, GSH)의 농도 변화에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0175] <4-1> 흡광 스펙트럼 관찰

[0176] 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M과 글루타티온을 0-50 μ M로 서서히 적정하며 25°C에서 UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0177] 도 6은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-50 μ M로 서서히 적정하며 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

[0178] 도 6에 나타난 바와 같이, 글루타티온을 적정하지 않은 경우 750 nm 파장대에서 약한 흡광 강도를 나타내는 것으로 나타나는 반면, 글루타티온을 0-50 μ M로 서서히 적정 하는 경우 750 nm 파장대에서 흡광 강도가 점점 강해지는 것으로 나타났다.

[0179] <4-2> 형광 스펙트럼 관찰

[0180] UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하는 대신

에, RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 사용하여 형광 스펙트럼을 관찰하는 것을 제외하고 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법으로 수행하였다($\lambda_{ex}=730\text{nm}$, $\lambda_{em}=736\text{ nm}$, slit:10/10 nm). 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0181] 도 7은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-50 μM 로 서서히 적정하며 나타나는 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

[0182] 도 7에 나타난 바와 같이, 글루타티온을 적정하지 않은 경우 736 nm 파장대에서 약한 형광 강도를 나타내는 것으로 나타나는 반면, 글루타티온을 0-50 μM 로 서서히 적정 하는 경우 736 nm 파장대에서 형광 강도가 점점 강해지는 것으로 나타났다.

[0183] 이로부터, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온에 대하여 농도 의존적으로 반응함을 알 수 있다.

[0184] <실험예 5> 시간에 따른 흡광 및 형광 스펙트럼 관찰

[0185] 글루타티온(Glutathione, GSH)과 실시예 2에서 제조한 화합물의 반응을 유도한 후, 시간 경과에 따른 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0186] <5-1> 흡광 스펙트럼 관찰

[0187] 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μM 과 글루타티온을 100 μM 첨가하고, 25°C에서 UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 시간 경과에 따라 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다(스펙트럼은 0.5분 단위로 촬영하였다).

[0188] 도 8은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온을 첨가하여 시간 경과에 따라 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

[0189] 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온을 첨가하였을 때 15분 안에 750 nm 파장대에서 최소 흡광 강도를 나타내는 것으로 나타났다.

[0190] <5-2> 형광 스펙트럼 관찰

[0191] UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하는 대신에, RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 사용하여 형광 스펙트럼을 관찰하는 것을 제외하고 상기 실험예 <5-1>과 동일한 방법으로 수행하였다($\lambda_{ex}=730\text{nm}$, $\lambda_{em}=736\text{ nm}$, slit:10/10 nm). 그 결과를 도 9에 나타내었다(스펙트럼은 0.5분 단위로 촬영하였다).

[0192] 도 9는 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온을 첨가하여 시간 경과에 따라 나타나는 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.

[0193] 도 9에 나타난 바와 같이, 상기 완충액에 실시예 2에서 제조한 화합물과 글루타티온을 첨가하였을 때 15분 안에 736 nm 파장대에서 최대 형광 강도를 나타내는 것으로 나타났다.

[0194] 이로부터, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온과 반응하여 신속하게 흡광 및 형광 스펙트럼 변화가 발생하는 것으로 나타났다.

[0195] <실험예 6> 글루타티온과 반응 메커니즘 관찰

[0196] 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물의 반응 메커니즘을 이해하기 위하여 매트릭스 보조된 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량 분석법(Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)을 통해 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물을 반응시킨 후 관찰하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0197] 도 10은 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물을 반응시킨 후, 매트릭스 보조된 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량 분석법(Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)을 통해 관찰한 결과를 나타내는 이미지이다.

- [0198] 도 10에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온과 반응하여, 실시예 2에서 제조한 화합물에 치환되어 있던 설포닐-N,N-디메틸나프탈렌-1-아민기가 떨어져 나가 자유 피페라진(free piperazine)을 갖는 사이아닌 유도체 화합물(A)이 생성되고(589.1 m/z), 또한 상기 떨어져 나간 설포닐-N,N-디메틸나프탈렌-1-아민기 분자구조중, N,N-디메틸나프탈렌-1-아민기가 글루타티온 내 싸이올기와 연결된 화합물(B)가 생성되는 것으로 나타났다(477.5 m/z).
- [0199] 이로부터, 본 발명에 따른 사이아닌 구조 기반의 화합물이 글루타티온과 반응시 발생하는 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화는 도 10의 삽도에 표시된 반응으로 인한 것임을 알 수 있다.
- [0200] <실험예 7> 세포 내 바이오싸이올(Biothiol) 검출능력 평가 2
- [0201] 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0202] 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) 내 37℃ 5% CO₂ 환경에서 HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 배양하였다. 싸이올 차단제로 알려져 있는 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM) 1mM을 20분 동안 전처리하거나 처리하지 않고, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온을 각각 100 μM 첨가한 후, RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10⁵ 세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed) 하였다. 24시간 후, 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μM을 첨가하여 37℃에서 20분 동안 함께 배양하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 두 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다(여기 파장은 635 nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0203] 도 11(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,
- [0204] 도 11(B)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0205] 도 11(C)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0206] 도 11(D)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 시스테인과 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0207] 도 11(E)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 호모시스테인과 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0208] 도 11(F)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0209] 도 11(A)와 도 11(B)에 나타난 바와 같이, 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 경우, 적색 형광 관찰되지 않았다. 반면, HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0210] 또한, 도 11(C)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, NMM으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산이 억제되어 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응할 아미노산이 존재하지 않게 되므로 적색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 또한, 시스테인과 호모시스테인을 첨가한 경우인 도 11(D)와 도 11(E)에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물은 싸이올기(R-SH)를 포함하는 시스테인 및 호모시스테인과 반응하지 않아 적색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, 글루타티온을 첨가한 경우인 도 11(F)에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물은 오직 글루타티온과 선택적으로 반응함에 따라 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

- [0211] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰시 강한 적색 형광이 발생하므로, 세포 내 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0212] <실험예 8> 산화제 존재에 따른 글루타티온의 농도변화 관찰 1
- [0213] 항 산화물질인 글루타티온을 함유하는 상기 실험예 2에서 준비한 HeLa 세포에 산화제인 과산화수소(H_2O_2) 100 μM 을 37℃에서 30분 동안 처리하여 글루타티온의 농도변화를 유도하고, 실시예 2에서 제조한 화합물 20 μM 을 37℃에서 20분 동안 함께 배양하였다. 이후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미징하였다(여기 파장은 635 nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [0214] 도 12(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,
- [0215] 도 12(B)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0216] 도 12(C)는 과산화수소(H_2O_2)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0217] 도 12(A)와 도 12(B)에 나타난 바와 같이, 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 HeLa 세포를 단독으로 관찰한 경우, 적색 형광 관찰되지 않았다. 반면, HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0218] 또한, 도 12(C)에 나타난 바와 같이, 과산화수소(H_2O_2)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 항 산화물질인 글루타티온은 산화제인 과산화수소(H_2O_2)에 의하여 산화되어 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응할 수 있는 글루타티온이 HeLa 세포 내 존재하지 않게 되므로 적색 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로, 글루타티온(GSH)은 생체 내 산화물질과 반응하여 두 분자의 글루타티온이 디설파이드(-S-S-) 결합을 통해 연결되는 글루타티온의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)로 가역적으로 변하며, 상기 작용을 통해 생체 내의 산화-환원 전위를 조절한다.
- [0219] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 관찰되는 적색 형광의 강도로부터 세포 내 글루타티온의 농도를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온(GSH)의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(GSSG)와는 반응하지 않으므로 글루타티온에 대한 선택성이 매우 우수함을 알 수 있다.
- [0220] <실험예 9> 산화제 존재에 따른 글루타티온의 농도변화 관찰 2
- [0221] 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) 내 37℃ 5% CO_2 환경에서 RAW 264.7 세포(대식 세포주, Korea Cell Line Bank)를 배양하였다.
- [0222] 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 또는 활성질소종(Reactive Nitrogen Species, RNS)을 발생시키는 특징을 갖는 RAW 264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 20분 동안 1 $\mu g/mL$, 인터페론- γ 를 16시간 동안 50 ng/mL, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)를 20분 동안 20 μM 처리하여 내인성 페록시나이트라이드의 생성을 유도하였다. 페록시나이트라이드는 세포 내 산화제 특성을 갖는다. 이후, 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10^5 세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed)하였다. 24시간 후, 실시예 2에서 제조한 화합물 20 μM 을 20분 동안 처리한 후, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세 차례에 걸쳐 세척하고 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미징하였다(여기 파장은 635 nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [0223] 도 13(A)는 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 RAW 264.7 세포를 단독으로 관찰한 형광 이미지이고,

- [0224] 도 13(B)는 RAW 264.7 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0225] 도 13(C)는 RAW 264.7 세포에 산화제 특성을 갖는 페록시나이트라이트의 생성을 유도하여 글루타티온의 농도를 감소시킨 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하고 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 촬영한 이미지이다.
- [0226] 도 13(A)와 도 13(B)에 나타난 바와 같이, 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 RAW 264.7 세포를 단독으로 관찰한 경우, 적색 형광 관찰되지 않았다. 반면, RAW 264.7 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 글루타티온과 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0227] 또한, 도 13(C)에 나타난 바와 같이, 산화제인 내인성 페록시나이트라이드가 유도된 RAW 264.7 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 항 산화물질인 글루타티온은 산화제인 페록시나이트라이트에 의하여 산화되어 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응할 수 있는 글루타티온이 RAW 264.7 세포 내 존재하지 않게 되므로 적색 형광이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로, 글루타티온(GSH)은 생체 내 산화물질과 반응하여 두 분자의 글루타티온이 디설파이드(-S-S-) 결합을 통해 연결되는 글루타티온의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)로 가역적으로 변하며, 상기 작용을 통해 생체 내의 산화-환원 전위를 조절한다.
- [0228] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 관찰되는 적색 형광의 강도로부터 세포 내 글루타티온의 농도를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온(GSH)의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(GSSG)와는 반응하지 않으므로 글루타티온에 대한 선택성이 매우 우수함을 알 수 있다.
- [0229] **<실험예 10> 마우스 모델을 사용한 글루타티온 검출능력 평가 1**
- [0230] 마우스 모델을 사용하여, 실시예 2에서 제조한 화합물이 생체 내에서도 글루타티온을 검출하기 위하여 사용 가능한지 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0231] C57BL/6 마우스(7-8주령 암컷, Jackson Laboratory)에, 싸이올 차단제로 알려져 있는 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM) 20 mM를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4) 200 μ L를 정맥 주사하였다. 20분 후, 실시예 2에서 제조한 화합물 50 mM을 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4) 200 μ L를 정맥 주사하였다. 20분 후, 675 nm 및 720 nm의 필터를 갖춘 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼(Caliper LifeSciences, USA)의 고형광(epifluorescence) 모드를 사용하여 마우스에서 관찰되는 형광 강도를 관찰하였다(형광 강도는 Living Image Software 4.3.1(Caliper Life Sciences, USA)를 사용하여 측정하였다). 그 결과를 도 14 및 15에 나타내었다.
- [0232] 도 14(A)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0233] 도 14(B)는 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0234] 도 14(C)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0235] 도 14(D)는 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0236] 도 15(A)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 간(liver)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0237] 도 15(B)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 신장(kidney)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼

을 사용하여 촬영한 이미지이고,

- [0238] 도 15(C)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 폐(lung)를 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0239] 도 15(D)는 아무 처리도 수행하지 않은 마우스, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스 및 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 비장(spleen)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이다.
- [0240] 도 14(A)와 도 14(B)에 나타난 바와 같이, 아무 처리도 수행하지 않은 마우스와 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스는 동일한 형광 강도 분포를 갖는 것으로 나타나 글루타티온의 농도변화 여부를 관찰할 수 없었다. 반면, 도 14(C)에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 경우 상기 화합물이 혈관을 타고 글루타티온이 존재하는 장기로 들어가 반응함으로써 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다. 아울러, 도 14(D)에 나타난 바와 같이 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 경우 NMM에 의하여 장기 내 존재하던 글루타티온이 억제되므로 적색 형광이 사라진 것을 확인할 수 있다.
- [0241] 또한, 도 15(A) 내지 도 15(D)에 나타난 바와 같이, 아무 처리도 수행하지 않은 마우스와 *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)를 처리한 마우스의 간, 신장, 폐, 비장은 동일한 형광 강도 분포를 갖는 것으로 나타나 글루타티온의 농도변화 여부를 관찰할 수 없었다. 반면, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 경우 상기 화합물이 혈관을 타고 간, 신장, 폐, 비장에 존재하는 글루타티온과 반응함으로써 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다. 아울러, *N*-메틸말레이미드 (*N*-methylmaleimide, NMM)와 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 간, 신장, 폐, 비장의 경우 NMM에 의하여 장기 내 존재하던 글루타티온이 억제되므로 적색 형광이 사라진 것을 확인할 수 있다.
- [0242] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼으로부터 관찰되는 적색 형광의 강도로부터, 생체 내 글루타티온의 분포를 관찰하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0243] **<실험예 11> 마우스 모델을 사용한 글루타티온 검출능력 평가 2**
- [0244] 마우스 모델을 사용하여, 실시예 2에서 제조한 화합물이 생체 내에서도 글루타티온을 검출하기 위하여 사용 가능한지 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0245] C57BL/6 마우스(7-8주령 암컷, Jackson Laboratory)에, 진통제로 알려져 있는 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP) 300 mg/kg를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4) 200 μ L를 정맥 주사하였다. 상기 APAP는 적정량을 사용할 경우 생체 내에서 진통제로서의 역할을 수행하지만, 과량 사용할 경우 생체 내 장기에 손상을 입힐 뿐만 아니라, 장기 내 글루타티온의 농도를 감소시킨다. 20분 후, 실시예 2에서 제조한 화합물 50 mM을 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4) 200 μ L를 정맥 주사하였다. 20분 후, 675 nm 및 720 nm의 필터를 갖춘 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼(Caliper LifeSciences, USA)의 고형광(epifluorescence) 모드를 사용하여 마우스에서 관찰되는 형광 강도를 관찰하였다(형광 강도는 Living Image Software 4.3.1(Caliper Life Sciences, USA)를 사용하여 측정하였다). 그 결과를 도 16 및 17에 나타내었다.
- [0246] 도 16(A)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0247] 도 16(B)는 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스를, 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0248] 도 17(A)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 간(liver)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,
- [0249] 도 17(B)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 신장(kidney)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙

트림을 사용하여 촬영한 이미지이고,

[0250] 도 17(C)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 폐(lung)를 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이고,

[0251] 도 17(D)는 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스와, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 비장(spleen)을 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼을 사용하여 촬영한 이미지이다.

[0252] 도 16(A)에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 경우 상기 화합물이 혈관을 타고 글루타티온이 존재하는 장기로 들어가 반응함으로써 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다. 반면, 도 16(B)에 나타난 바와 같이 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 경우 APAP에 의하여 장기 내 존재하던 글루타티온이 억제되므로 적색 형광이 사라진 것을 확인할 수 있다.

[0253] 또한, 도 17(A) 내지 도 17(D)에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 마우스의 경우 상기 화합물이 혈관을 타고 간, 신장, 폐, 비장에 존재하는 글루타티온과 반응함으로써 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다. 반면, 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP)과 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 간, 신장, 폐, 비장의 경우 APAP에 의하여 장기 내 존재하던 글루타티온이 억제되므로 적색 형광이 사라진 것을 확인할 수 있다.

[0254] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 체내 촬상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS) 스펙트럼으로부터 관찰되는 적색 형광의 강도로부터, 생체 내 글루타티온의 분포를 관찰하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0255] <실험예 12> 패혈증 진단능력 평가 1

[0256] 실시예 2에서 제조한 화합물을 패혈증 진단에 사용할 수 있는지 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0257] 문헌(J Vis Exp. 2011 May 7;(51). pii: 2860. doi: 10.3791/2860.)을 참조하여, C57BL/6 마우스(7-8주령 암컷, Jackson Laboratory)에 CLP(cecal ligation and puncture)를 수행하여 패혈증을 유도하였다. 8시간 후, 복막 세포(peritoneal cell)를 채취하고 원심분리를 한 후, 호중구 마커(neutrophil marker)인 Ly6G(eFluor® 450, eBioscience, Cat No. 48-5931)와 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M을 상온에서 붙였다. 25분 후, 3% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS) 1 mL를 첨가하고 5분 동안 3000 rpm으로 원심분리하여 세척하였다. 이후, 200 mL의 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 풀고 데이터 분석 소프트웨어인 플로우조(FlowJo)를 사용한 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting) 분석법을 통해 나타나는 피크(Peak)를 관찰하였다(Alexa flour 700 형광을 촬영하는 세팅을 사용하였다, BD FACSVerse™). 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0258] 도 18은 정상 마우스와 패혈증을 유도한 마우스의 복막 세포 내 호중구(neutrophil)를 채취하여 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting) 분석법을 통해 나타난 글루타티온 농도를 관찰한 이미지이다.

[0259] 도 18에 나타난 바와 같이, 정상 마우스의 경우와 비교하여 패혈증을 유도한 마우스의 경우 글루타티온의 농도가 감소한 것으로 나타났다. 일반적으로, 패혈증은 생체 내 호중구(neutrophil)에 산화스트레스(oxidative stress)를 가하여 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 과량으로 발생시켜 신경, 피부, 소화기 등의 계통에 장애를 유발한다. 이에, 생체 내의 산화-환원 전위를 조절하는 항 산화물질인 글루타티온은 패혈증이 유도된 마우스 내 과량으로 발생한 ROS와 반응하여 두 분자의 글루타티온이 디설파이드(-S-S-) 결합을 통해 연결되는 글루타티온의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)로 가역적으로 변하므로 패혈증을 유도한 마우스의 경우, 상기와 같은 GSH의 농도 감소가 관찰되는 것으로 확인되었다.

[0260] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온의 농도 측정을 통해 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0261] <실험예 13> 패혈증 진단능력 평가 2

[0262] 실시예 2에서 제조한 화합물을 패혈증 진단에 사용할 수 있는지 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0263] C57BL/6 마우스(7-8주령 암컷, Jackson Laboratory)의 골수에서 호중구(neutrophil)를 추출하였다. 그린 형광

단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)이 태깅(tagging)된 패혈증의 원인 세균인 녹농균(Pseudomonas Aeruginosa 01, PA01)을 상기 호중구에 감염시켰다. 24시간 후, 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M을 첨가하여 37℃에서 20분 동안 처리하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 두 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다(여기 파장은 635 nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0264] 도 19는 마우스의 골수로부터 추출한 호중구에 녹색 형광 단백질이 태깅된 녹농균을 감염시키고, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

[0265] 도 19에 나타난 바와 같이, 무처리군의 경우 적색 형광 채널과 그린 형광 채널에서 어떠한 형광도 관찰되지 않았다. 반면, 그린 형광 단백질을 태깅한 녹농균을 호중구에 감염시킨 경우 세균에 태깅된 그린 형광 단백질로 인하여 그린 형광 채널에서 강한 그린 형광이 관찰되는 것으로 나타났다. 또한, 그린 형광 단백질을 태깅한 녹농균을 감염시키지 않은 호중구에 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 경우 적색 형광 채널에서 강한 적색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0266] 그린 형광 단백질을 태깅한 녹농균을 호중구에 감염시킨 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 처리한 경우 녹농균에 의하여 호중구가 산화스트레스(oxidative stress)를 받게 되어 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)이 과량으로 발생하게 된다. 이에, 상기 실험에 12에 기재한 바와 같이, 글루타티온(Glutathione, GSH)이 ROS와 반응하여 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)을 생성함에 따라 글루타티온의 농도가 감소하게 되므로, 글루타티온의 농도를 나타내는 적색 형광 채널의 적색 형광의 강도가 감소하는 것으로 나타났다.

[0267] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 글루타티온의 농도 측정을 통해 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0268] <실험예 14> 화합물의 구조 및 밴드-갭(Band-gap) 측정

[0269] 글루타티온에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택성 원인을 분석하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0270] 먼저, 도 20에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 화합물은 피페라진을 포함하는 두 개의 조각(fragment)으로 분리하여 생각할 수 있다.

[0271] 도 20은 실시예 2에서 제조한 화합물에 대하여, 피페라진을 포함하는 두 개의 조각으로 나눈 것을 나타내는 이미지이다.

[0272] 도 20의 조각 1은 Kim, J.; Lim, S.-H.; Yoon, Y.; Thangadurai, T. D.; Yoon, S. Tetrahedron Lett. 2011, 52, 2645를 참조하여 제조하였고, 조각 2는 본 명세서 내 실시예 1 단계 1에서 제조한 화합물이다.

[0273] 실시예 2에서 제조한 화합물을 사용하는 대신에, 조각 1 또는 조각 2 화합물을 각각 사용하는 것을 제외하고 상기 실험예 3과 동일한 실험으로 수행한 결과, 상기 조각 1 및 조각 2 화합물은 글루타티온에 대하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하지 않는 것으로 나타났으며, 이로부터 실시예 2에서 제조한 화합물을 구성하는, 조각 1 또는 조각 2 화합물은 글루타티온에 대하여 검출 능력이 없다는 것을 알 수 있다. 이와 관련된 원인을 분석하기 위하여, 실시예 1, 실시예 2, 조각 1 및 조각 2 화합물의 삼차원적인 구조와 밴드-갭(Band-gap)을 측정할 필요성이 있다.

[0274] 상기 화합물들의 삼차원적인 구조와 밴드-갭을 측정하기 위하여, Gaussian 09 프로그램을 사용한 B3LYP/6-31G^{*} 레벨에서 분포 함수 이론(Density Function Theory, DFT)에 입각하여 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 21 및 도 22에 나타내었다.

[0275] 도 21은 Gaussian 09 프로그램을 사용한 B3LYP/6-31G^{*} 레벨에서 분포 함수 이론(Density Function Theory, DFT)에 입각하여 실시예 1, 실시예 2, 조각 1 및 조각 2 화합물의 삼차원적인 구조를 나타내는 이미지이다. (A) 피페라진의 가능한 형태(Conformation); (B) 조각 1; (C) 조각 2; (D) 실시예 2; (E) 실시예 1; 화합물을 나타내고,

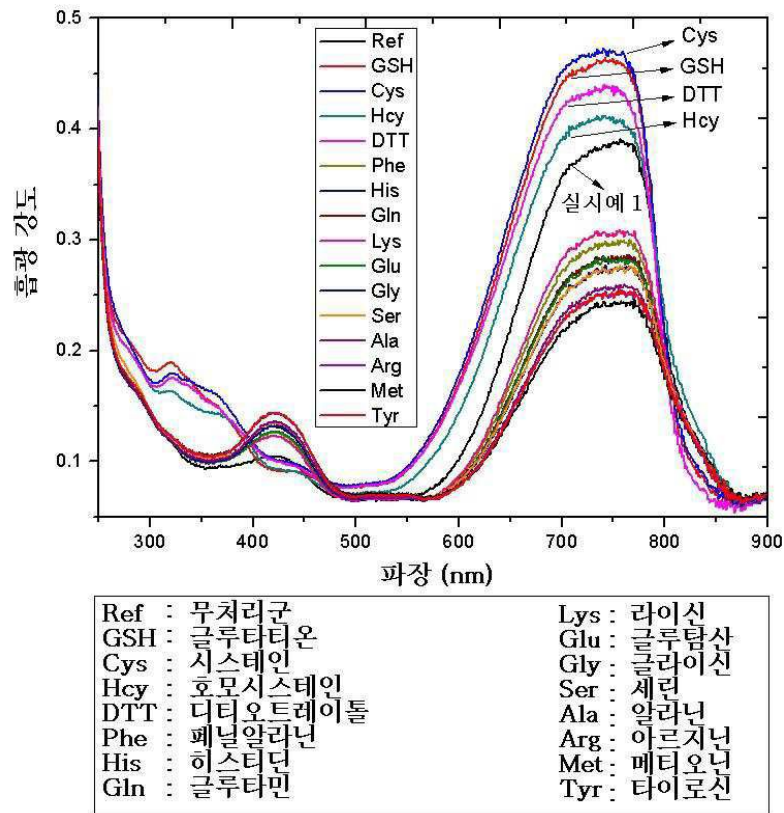
[0276] 도 22는 Gaussian 09 프로그램을 사용한 B3LYP/6-31G^{*} 레벨에서 분포 함수 이론(Density Function Theory, DFT)에 입각하여 실시예 1, 실시예 2 및 조각 2 화합물의 밴드-갭을 측정한 이미지이다.

- [0277] 도 21(A)에 나타난 바와 같이, 피페라진은 보트 형태(Boat conformation), 뒤틀린-보트 형태(Twist-boat conformation) 및 의자 형태(Chair conformation)로 존재할 수 있음을 확인할 수 있다. 도 21(B)로부터, 조각 1 화합물의 피페라진은 뒤틀린-보트 형태로 존재하고, 도 21(C)로부터, 조각 2 화합물의 피페라진은 의자 형태로 존재하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 21(D)로부터, 실시예 2에서 제조한 화합물의 피페라진은 조각 2 화합물과 같이 의자 형태로 존재하고, 도 21(E)로부터, 실시예 1에서 제조한 화합물의 피페라진은 조각 1 화합물과 같이 뒤틀린-보트 형태로 존재하는 것을 확인할 수 있다.
- [0278] 피페라진의 형태가 선택성에 큰 영향을 줄 것이라 기대와는 달리, 글루타티온에 대하여 선택성이 있는 실시예 2에서 제조한 화합물과, 글루타티온에 대하여 선택성이 없는 조각 2 화합물(실시예 1의 단계 1 화합물)의 피페라진 형태가 의자 형태로 동일한 것으로 확인되었다.
- [0279] 이에, 실시예 2에서 제조한 화합물이 글루타티온과 반응시 도 10의 삽도와 같이 반응이 진행됨에 따라, 반응이 진행되는 활성부위(active site)의 결합 형태를 관찰하였다. 그 결과, 조각 2 화합물(실시예 1의 단계 1 화합물)의 피페라진 내 -NH-의 수소 원자는 피페라진의 α -결합 형태로 존재하고, 실시예 2에서 제조한 화합물의 피페라진과 결합하고 있는 단실(dansyl) 기는 피페라진의 ϵ -결합 형태로 존재하는 것으로 나타났다.
- [0280] 또한, 실시예 1, 실시예 2 및 조각 1 화합물 내 S-N의 결합길이가 글루타티온의 선택성에 영향을 줄 것이라 기대되어 그 길이를 측정한 결과, 실시예 1 및 조각 1 화합물의 S-N 길이는 각각 1.667 Å, 1.660 Å인 것으로 확인되는 반면, 실시예 2에서 제조한 화합물의 S-N 길이는 1.727 Å인 것으로 확인되어 실시예 2에서 제조한 화합물의 결합에너지가 실시예 1 및 조각 1 화합물보다 더 작은 것으로 나타나 결합이 끊어지는데 더 용이할 것이라 예상되었다.
- [0281] 나아가, 도 22에 나타난 바와 같이, 실시예 1, 실시예 2 및 조각 2 화합물의 밴드-갭은 피페라진에 도입된 작용기(functional group)가 상이함에 따라 각각 2.14 eV, 2.13 eV, 2.22 eV인 것으로 나타났다. 상대적으로 작은 밴드-갭을 갖는 실시예 1 및 실시예 2 화합물의 경우 근-적외선 형광 염료로써 사용될 수 있을 것이라 예상되었다.
- [0282] 상기 결과를 종합하였을 때, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택성은 글루타티온과 반응이 진행되는 활성부위(active site) 내 피페라진의 형태, 피페라진과 결합하고 있는 단실(dansyl) 기의 결합 형태, S-N 결합길이 및 밴드-갭 에너지로부터 발생하는 것임을 확인하였다.
- [0283] **<실험예 15> 글루타티온에 대한 선택성 평가 2**
- [0284] 글루타티온(Glutathione, GSH)에 대하여, 실시예 3에서 제조한 화합물의 선택성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0285] <15-1> 흡광 스펙트럼 관찰
- [0286] 실시예 3에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(알라닌, 아르지닌, 시스테인, 글루탐산, 글라이신, 글루타티온, 호모시스테인, 히스티딘, 라이신, 메티오닌, 세린, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25°C에서 UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하였다. 그 결과를 도 23에 나타내었다.
- [0287] 도 23은 실시예 3에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰한 이미지이다.
- [0288] 도 23에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제조한 화합물은 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 830 nm 부근에서 약한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되는 반면, 글루타티온 이외의 다른 아미노산들은 830 nm 파장대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0289] <15-2> 형광 스펙트럼 관찰
- [0290] UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하는 대신에, RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 사용하여 형광 스펙트럼을 관찰하는 것을 제외하고 상기 실험예 <15-1>과 동일한 방법으로 수행하였다(λ_{ex} =730nm, λ_{em} =736 nm, slit:10/10 nm). 그 결과를 도 24에 나타내었다.

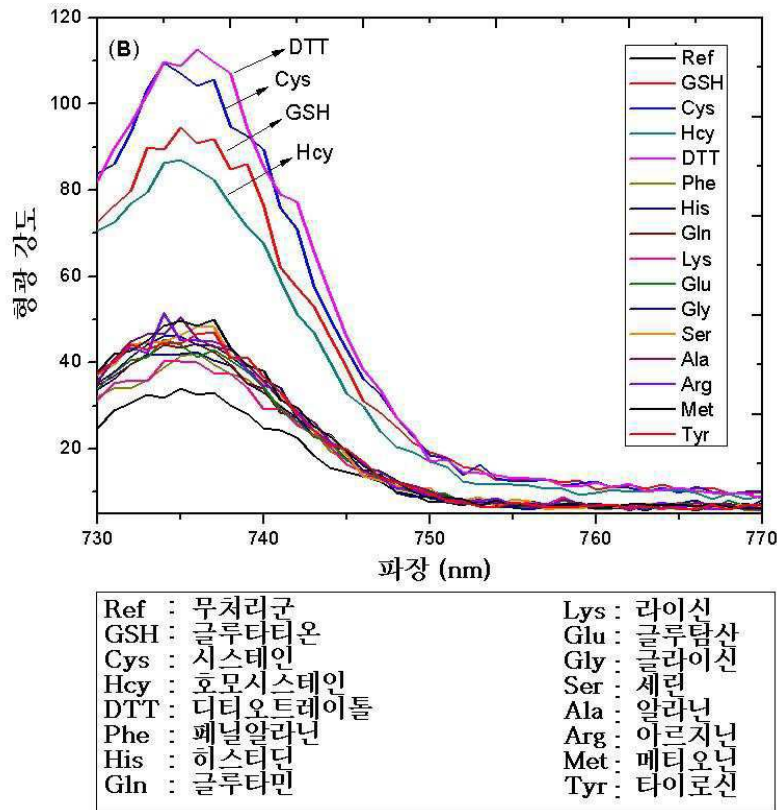
- [0291] 도 24는 실시예 3에서 제조한 화합물과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산들을 각각 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가하여 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰한 이미지이다.
- [0292] 도 24에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제조한 화합물은 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 780 nm 부근에서 강한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되는 반면, 글루타티온 이외의 다른 아미노산들은 780 nm 파장대에서 약한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0293] 따라서, 실시예 3에서 제조한 화합물은 생체시료 중에서 다양한 아미노산 중 오직 글루타티온과 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온을 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0294] **<실험예 16> 글루타티온의 농도에 따른 흡광 및 형광 스펙트럼 관찰 2**
- [0295] 글루타티온(Glutathione, GSH)의 농도 변화에 대하여, 실시예 3에서 제조한 화합물의 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0296] <16-1> 흡광 스펙트럼 관찰
- [0297] 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 3에서 제조한 화합물 10 μ M과 글루타티온을 0-100 μ M로 서서히 적정하며 25℃에서 UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰하였다. 그 결과를 도 25에 나타내었다.
- [0298] 도 25는 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-100 μ M로 서서히 적정하며 나타나는 흡광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0299] 도 25에 나타난 바와 같이, 글루타티온을 적정하지 않은 경우 830 nm 파장대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 나타나는 반면, 글루타티온을 0-100 μ M로 서서히 적정 하는 경우 830 nm 파장대에서 흡광 강도가 점점 약해지는 것으로 나타났다.
- [0300] <16-2> 형광 스펙트럼 관찰
- [0301] UV-vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하는 대신에, RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 사용하여 형광 스펙트럼을 관찰하는 것을 제외하고 상기 실험예 <16-1>과 동일한 방법으로 수행하였다(λ_{ex} =730nm, λ_{em} =736 nm, slit:10/10 nm). 그 결과를 도 26에 나타내었다.
- [0302] 도 26은 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)를 함유하는 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후, 글루타티온을 0-100 μ M로 서서히 적정하며 나타나는 형광 스펙트럼의 변화를 관찰한 이미지이다.
- [0303] 도 26에 나타난 바와 같이, 글루타티온을 적정하지 않은 경우 780 nm 파장대에서 약한 형광 강도를 나타내는 것으로 나타나는 반면, 글루타티온을 0-100 μ M로 서서히 적정 하는 경우 780 nm 파장대에서 형광 강도가 점점 강해지는 것으로 나타났다.
- [0304] 이로부터, 실시예 3에서 제조한 화합물은 글루타티온에 대하여 농도 의존적으로 반응함을 알 수 있다.

도면

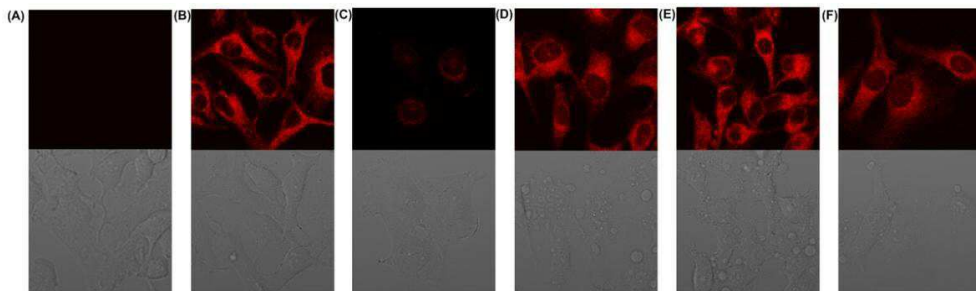
도면1



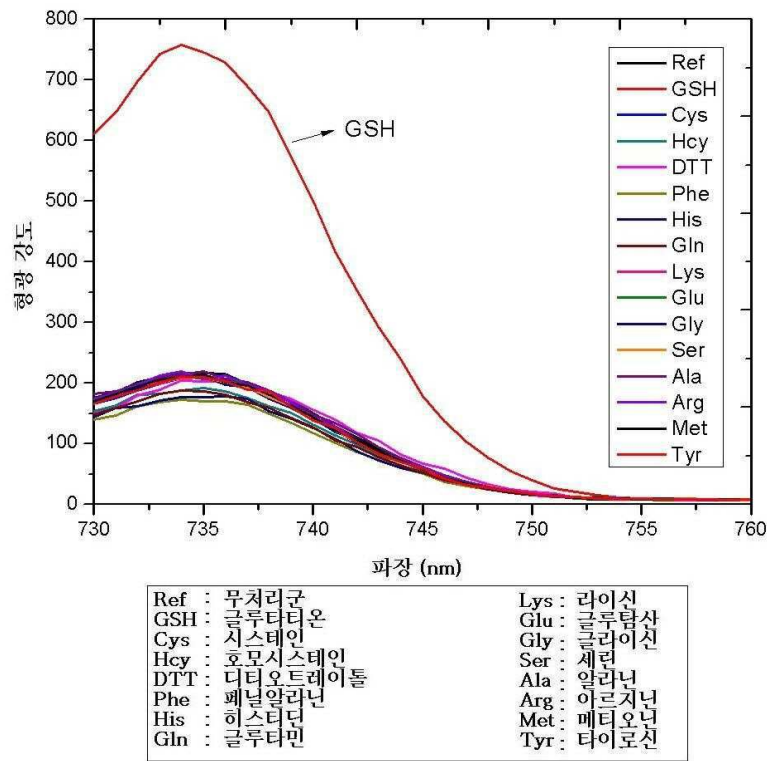
도면2



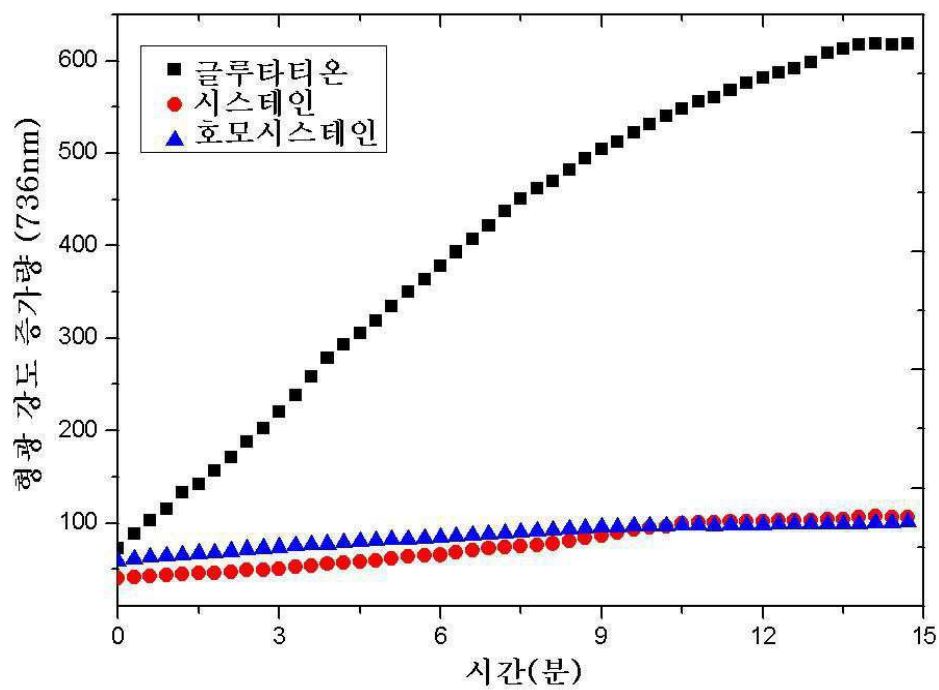
도면3



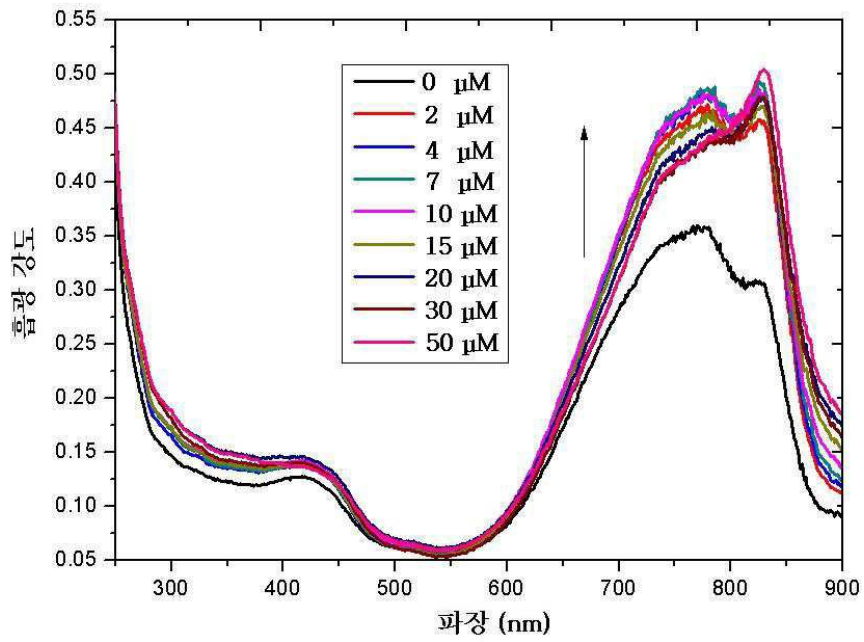
도면4



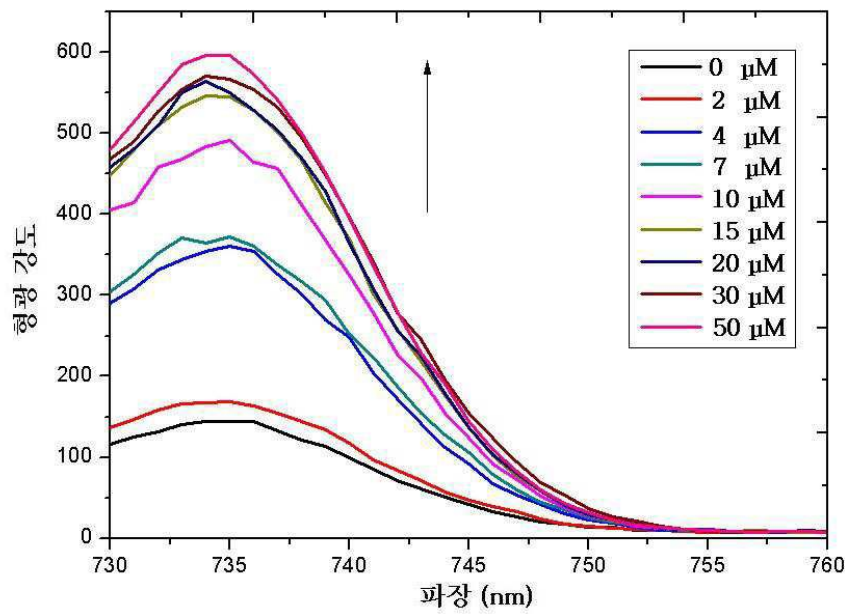
도면5



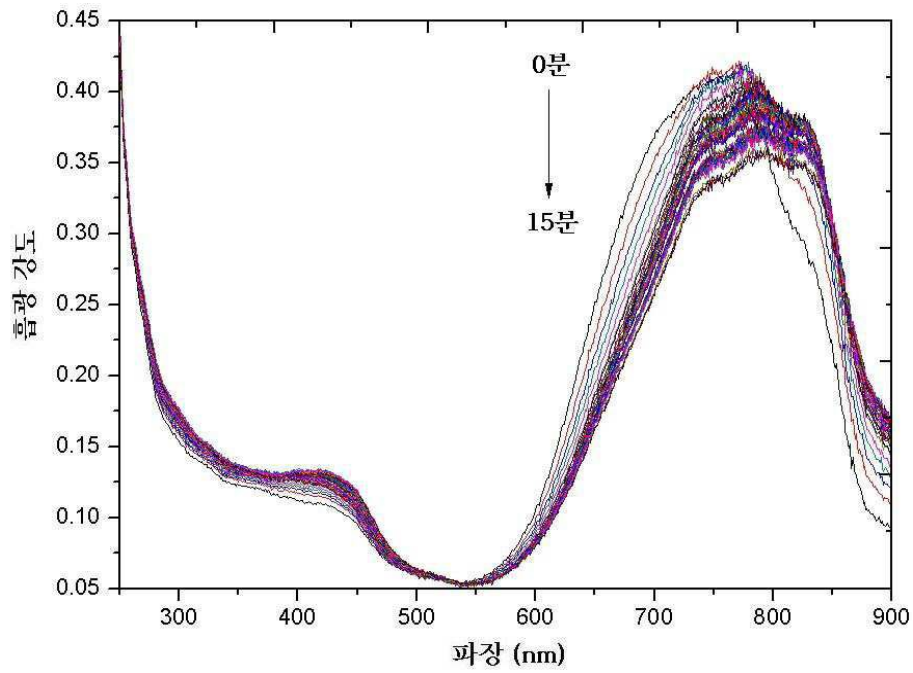
도면6



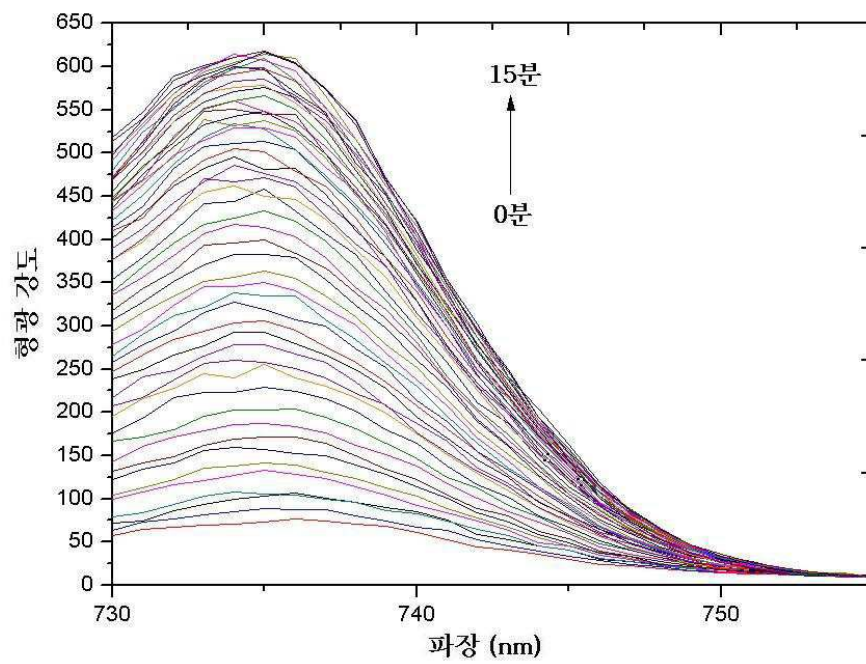
도면7



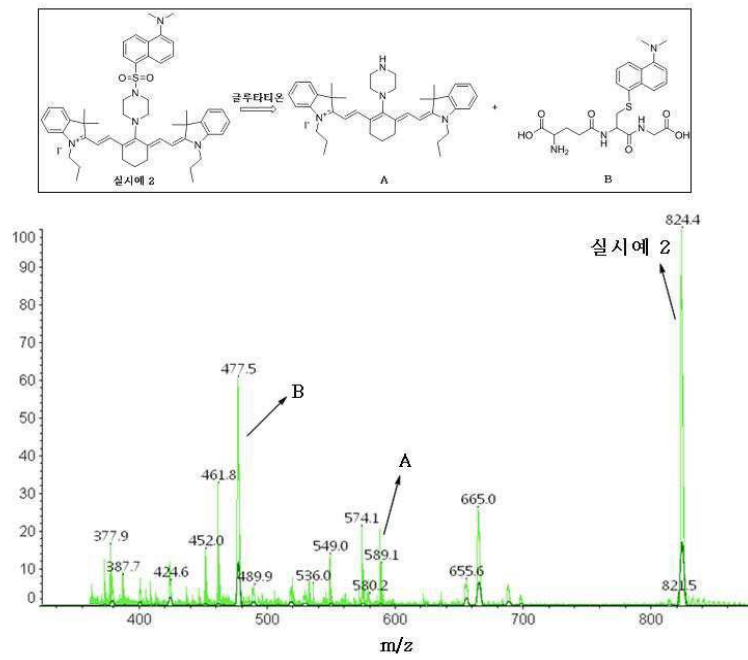
도면8



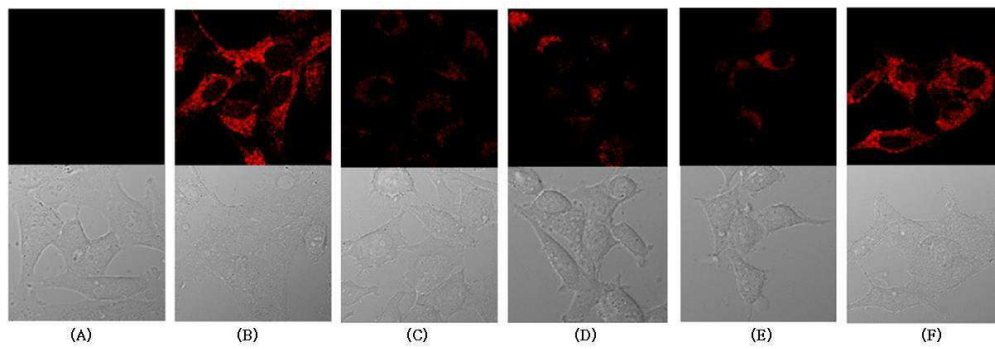
도면9



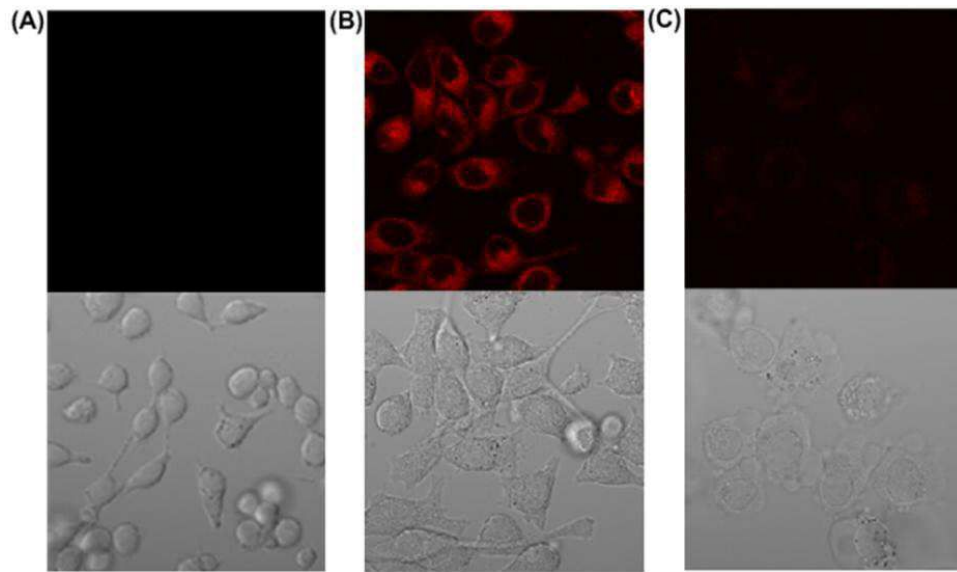
도면10



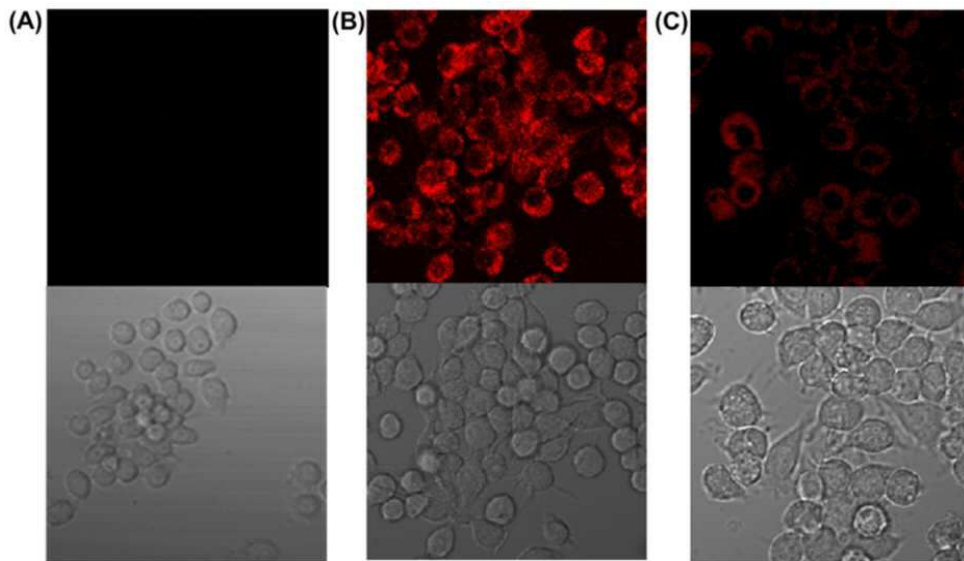
도면11



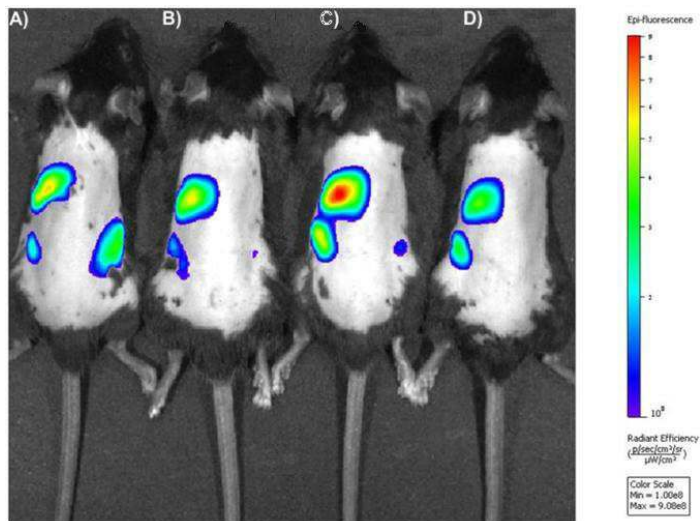
도면12



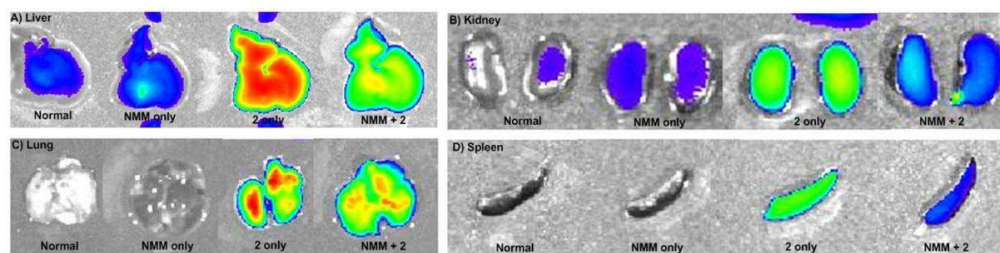
도면13



도면14

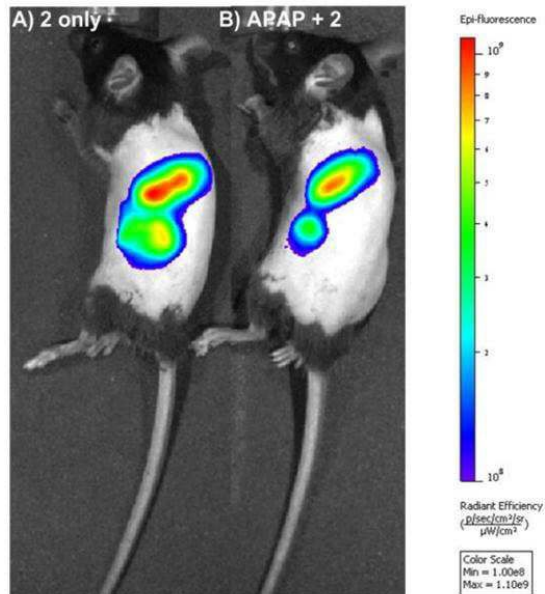


도면15



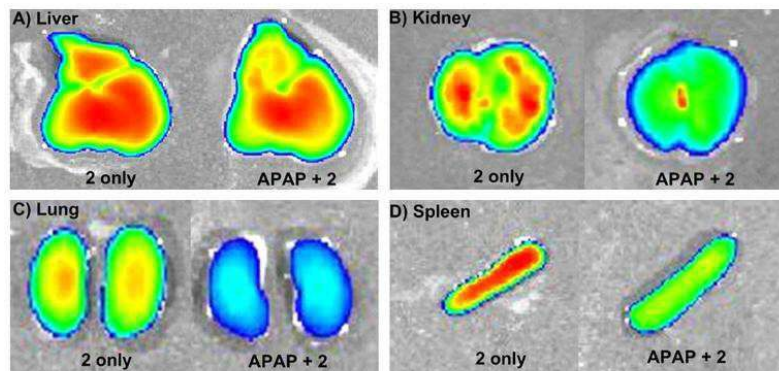
Normal : 무처리군
 NMM only : N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM) 처리군
 2 only : 실시예 2 화합물 처리군
 NMM+2 : N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM) + 실시예 2 화합물 처리군

도면16



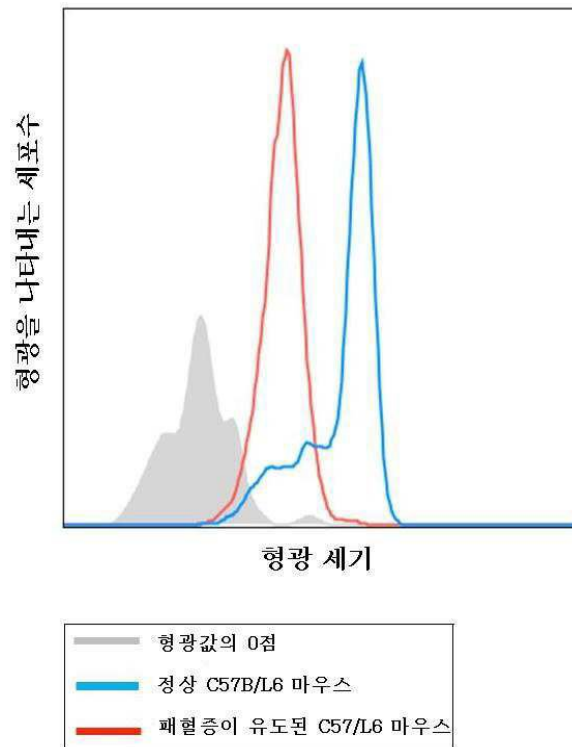
2 : 실시예 2 화합물
APAP : 아세트아미노펜(acetaminophen)

도면17



2 : 실시예 2 화합물
APAP : 아세트아미노펜(acetaminophen)

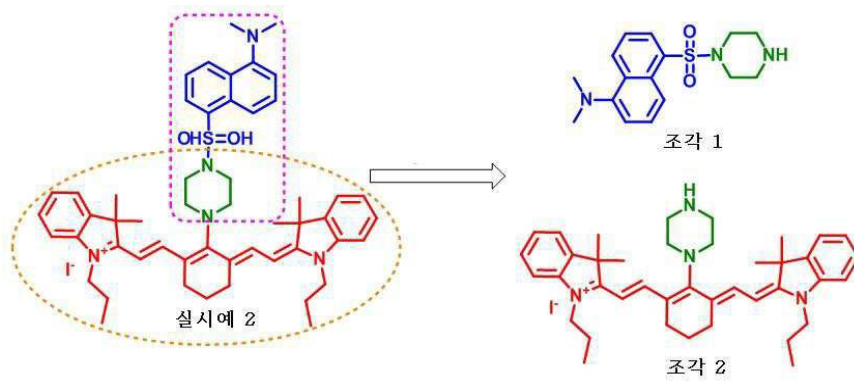
도면18



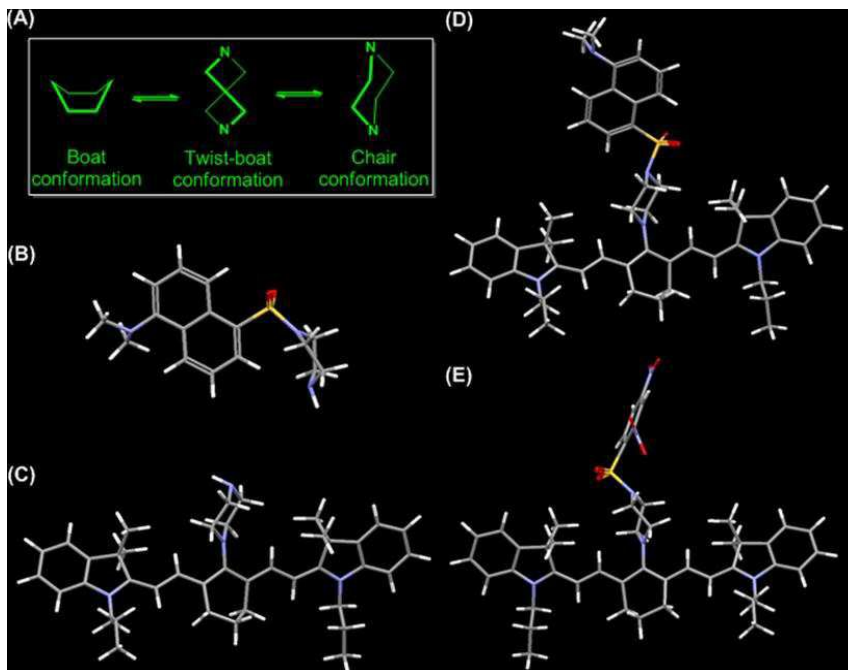
도면19

	미분간섭 채널	적색 형광 채널 (575-675 nm)	그린 형광 채널 (490-540 nm)	미분간섭 채널 + 적색 형광 채널 + 그린 형광 채널
무처리군				
그린 형광 단백질 태깅된 녹농균				
실시에 2 화합물				
그린 형광 단백질 태깅된 녹농균 + 실시에 2 화합물				

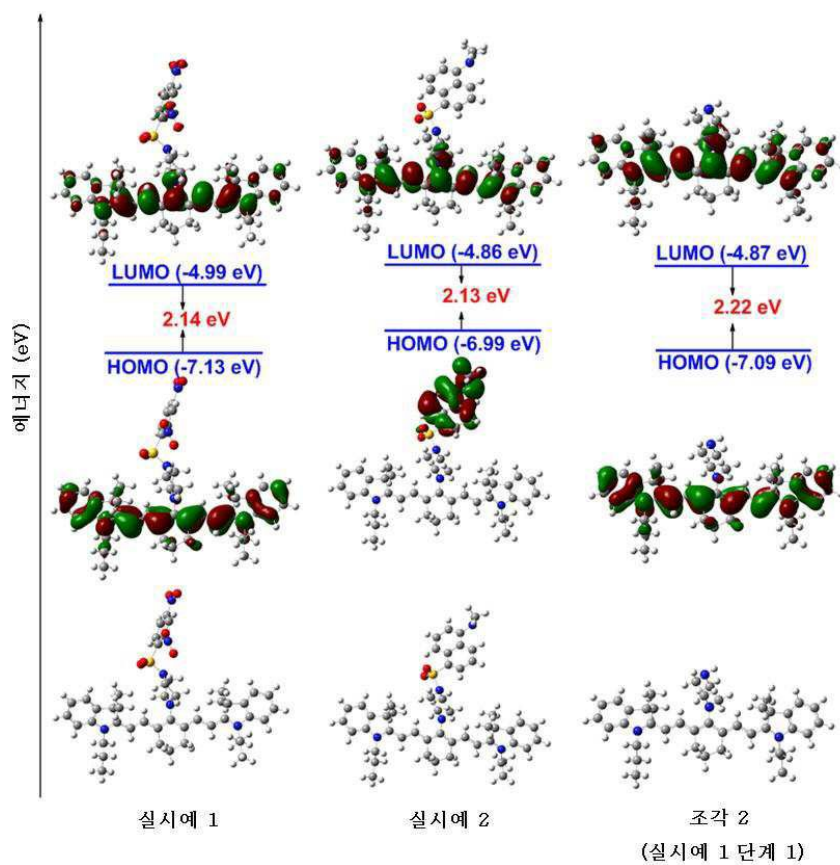
도면20



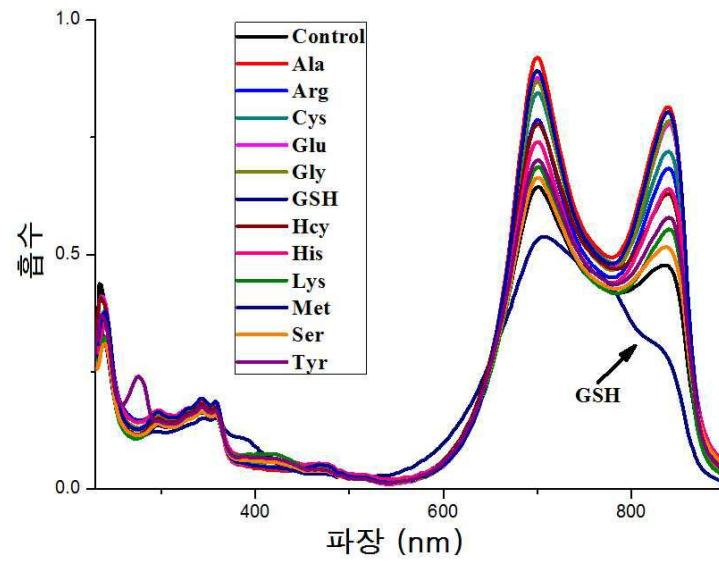
도면21



도면22

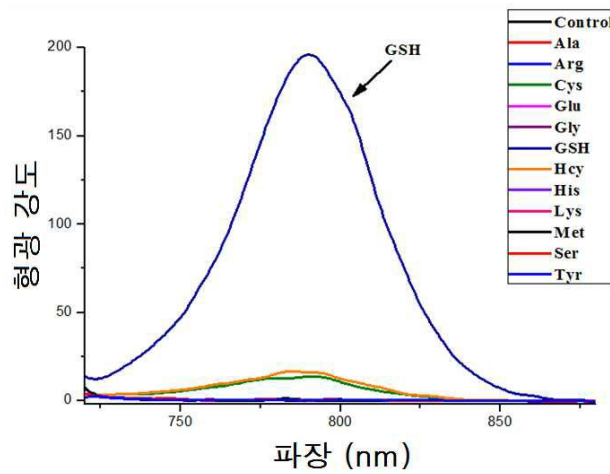


도면23



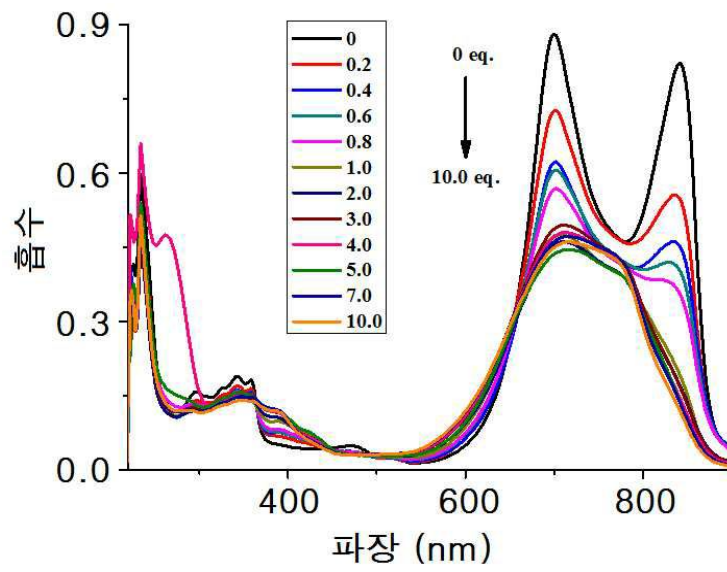
Control : 무처리군	Hcy : 호모시스테인
Ala : 알라닌	His : 히스티딘
Arg : 아르지닌	Lys : 라이신
Cys : 시스테인	Met : 메티오닌
Glu : 글루탐산	Ser : 세린
Gly : 글라이신	Tyr : 타이로신
GSH : 글루타티온	

도면24



Control : 무처리군	Hcy : 호모시스테인
Ala : 알라닌	His : 히스티딘
Arg : 아르지닌	Lys : 라이신
Cys : 시스테인	Met : 메티오닌
Glu : 글루탐산	Ser : 세린
Gly : 글라이신	Tyr : 타이로신
GSH : 글루타티온	

도면25



도면26

