(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0078890
(43) 공개일자 2023년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 307/52 (2006.01) *G01N 21/31* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 307/52 (2013.01)
G01N 21/314 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0165840
(22) 출원일자 2021년11월26일
심사청구일자 2021년11월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이준석
서울특별시 성북구 월곡로 14길 25, 109-1601
윤혜영
서울특별시 서초구 효령로77길 20, 603호
마무눌 하크
서울특별시 성북구 화랑로 90-5, 1층 (하월곡동)
(74) 대리인
위병갑

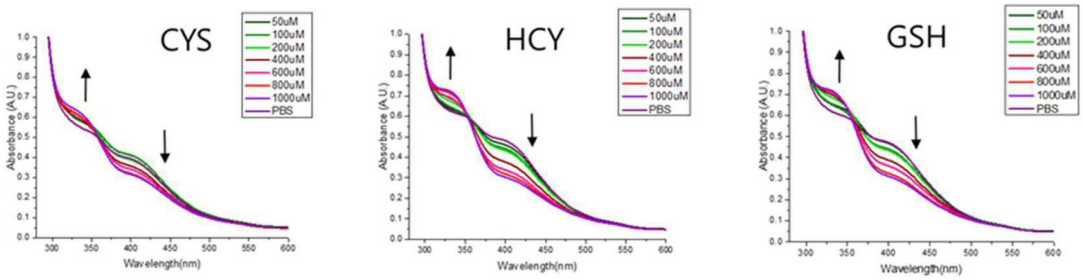
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **바이오티올 탐지를 위한 2-디시아노메틸렌-3-시아노-2,5-디하이드로퓨란 구조의 형광 프로브 화합물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 DCDHF 단위체 기반 화합물 및 이의 바이오티올 탐지 용도에 관한 것으로, 본 발명에서 새롭게 합성된 DCDHF 단위체 기반 화합물은 바이오티올을 특이적으로 표지(센싱)할 수 있으며, 티올과의 반응에 의하여 흡광 변화를 보이며 600 nm 이상의 발광 파장에서 최대 방출값을 가짐에 따라, 생체 외 또는 세포 내에서 바이오티올의 탐침, 시각화 및 정량화가 용이한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 21/6428 (2013.01)
G01N 33/52 (2013.01)
G01N 33/6815 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 711129351
과제번호 2018M3A9H4079286
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (원천)바이오의료기술개발사업
연구과제명 화학프로브 기반 숙주세포 단백체 프로파일링 기술개발 및 이를 활용한 AI 감염기전 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711106414
과제번호 2020R1A2C200442212
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)(유형1-2)중견연구
연구과제명 저분자 프로브를 이용한 RNA epigenetics profiling 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한국과학기술연구원
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

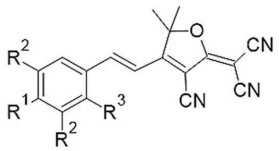
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에 있어서,

상기 R^1은 C_1-C_3의 아실, C_1-C_5의 알킬카보닐옥시 또는 C_2-C_{10}의 디알킬아민이고;

상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고;

상기 R^3은 H 또는 C_2-C_5의 알케닐카보닐옥시이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R^1은 알데하이드, 아세톡시 또는 디에틸아민이고;

상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 Cl이고;

상기 R^3은 H 또는 아크릴로일옥시인 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

1) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(4-포르밀페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란;

2) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란; 및

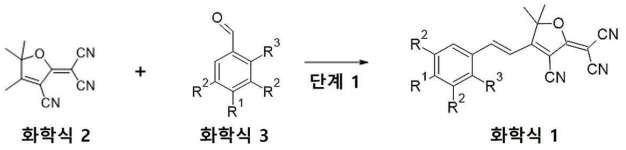
3) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란.

청구항 4

하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

유기용매에 화학식 2로 표시되는 화합물 및 화학식 3으로 표시되는 화합물을 용해하고 염기 용액을 첨가 및 환류(reflux)시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



화학식 2 화학식 3 화학식 1

(상기 반응식 1에 있어서,

상기 R^1은 C_1-C_3의 아실이고;

상기 R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 H이다).

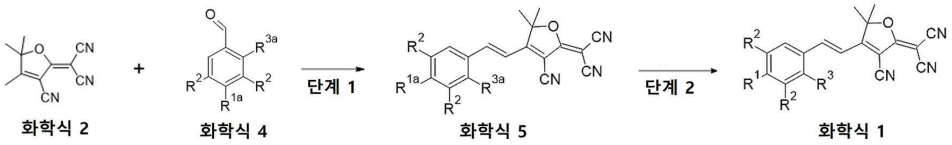
청구항 5

하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

유기용매에 화학식 2로 표시되는 화합물 및 화학식 4로 표시되는 화합물을 용해하고 염기 용액을 첨가 및 환류(reflux)시켜, 화학식 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1); 및

유기용매에 화학식 5로 표시되는 화합물을 용해 및 피리딘 또는 트리에틸아민을 첨가하고 냉각한 후, 카복실산 무수물 또는 카복실산 클로라이드를 첨가 및 교반시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 2);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 2]



화학식 2 화학식 4 화학식 5 화학식 1

(상기 반응식 2에 있어서,

상기 R^1은 C_1-C_5의 알킬카보닐옥시 또는 C_2-C_{10}의 디알킬아민이고;

상기 R^{1a}는 하이드록시 또는 C_2-C_{10}의 디알킬아민이고;

상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고;

상기 R^3은 H 또는 C_2-C_5의 알케닐카보닐옥시이고;

상기 R^{3a}는 H 또는 하이드록시이다).

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 단계 1 내지 단계 2의 유기용매는 독립적으로 에탄올, 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 디클로로메탄(DCM), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, 헥산, 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세톤 및 클로로벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 제조방법.

청구항 7

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 바이오티올(biothiol) 탐지용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 바이오티올(biothiol)은 시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy) 및 글루타티온(GSH)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 화합물은 바이오티올(biothiol)과 반응하여 400 내지 450nm의 흡광은 감소시키고, 320 내지 370nm의 흡광은 증가시키는 것인, 탐지용 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 화합물은 바이오티올(biothiol)과 반응하여 600 내지 650nm의 형광 방출을 증가시키는 것인, 탐지용 조성물.

청구항 11

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물을 바이오티올(biothiol)이 포함된 시료에 첨가하는 단계를 포함하는, 바이오티올의 탐지 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물이 첨가된 시료에서 흡광 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 바이오티올의 탐지 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물이 첨가된 시료에 500 내지 600 nm의 빛을 가하여 방출되는 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 바이오티올의 탐지 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 형광을 측정하는 단계는 공초점 형광 현미경, 이광자 형광 현미경, 광간섭성 단층 촬영기, 및 이광자 형광 현미경 및 광간섭성 단층 촬영기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 장치를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 바이오티올의 탐지 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 방법은 측정된 형광 값에 선형 판별 분석법(LDA)을 적용하여 특징데이터를 구축함으로써 탐지된 바이오티올 종류를 분류하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로하는, 바이오티올의 탐지 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오티올(biothiol) 탐지(센싱)을 위한 신규한 2-디시아노메틸렌-3-시아노-2,5-디하이드로퓨란(DCDHF) 단위체 기반 형광 프로브 화합물, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 건강 및 질병에 대한 관심이 높아지는 현 시점에서, 질병의 조기 진단을 통해 건강을 관리하고 치료비를 절감하는 효과가 있는 조기 진단이 주목을 받고 있다. 다양한 질병에 대한 진단 방법이 쏟아지는 가운데 간단한 방법으로 질병을 진단하고 즉시 결과를 알아볼 수 있는 몇 가지 진단 방법들이 개발되고 있다. 이 중 체외진단은 방법이 간단하고 결과 도출이 빠르다는 장점을 가지고 있으며, 나노센서 및 바이오칩의 활발한 연구에 힘입어 제품이 다양화되어 있으나, 주로 질량 측정법이 사용되며, 혈액시료를 효과적으로 신속하게 분석할 수 있는 산화·환원 진단 시스템에 대한 연구가 부족한 실정이다.

[0003] 세포 및 동물 질환 모델에서 산화·환원 관련 RCS의 검출 및 영상을 위한 형광 기반 분자센서의 기초 연구가 활발히 진행 중이며, 현재 활발히 연구되고 있는 체외진단 생체 분석 기술은 보통 수백 μL 수준의 96 개 반응 well들이 array 형태로 되어 있는 plate 기반에서 하나의 well에 하나의 특정 분석물질에 대한 테스트를 포함하는 형태를 이용한다. 일반적으로 이러한 플랫폼은 생체 지표를 포집하고 분석하기 위한 sandwich 형태의 분석 프로토콜을 사용하며, 분석 물질의 최종 검출 방법은 주로 형광(fluorescence), 흡광(UV-vis absorption), 혹은 화학발광(chemiluminscence)등의 광학적 분석법이 이용되고 있다.

[0004] 스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy) 및 글루타티온(GSH)과 같은 바이오티올(biothiols)은 생체 내에서 일어나는 산화 스트레스 제어, 항상성 유지, 신호전달 등 중요 작용에서 역할을 하는 산화환원 물질로 잘 알려져 있다. 이들의 혈청내 농도는 그 상황에 따라 다를 수 있어, 병리학적 이해와 치료진단에의 응용에 유용할 것으로 여겨지고 있다.

[0005] 형광 기반 탐침은 감도가 매우 높으며, 생체내외 타겟 물질의 시각화에도 용이하다. 기존에 발표된 티올(thiols) 탐지를 위한 단분자 형광탐침은 형광체에 티올과 반응할 수 있는 작용기를 도입하여 티올과 반응하였을 때 형광세기가 증가하거나 파장이 변하는 등의 방법으로 타겟 물질을 탐지하였다. 그러나 이들은 여러 종류의 티올에 대한 선택성이 낮거나, 복잡한 합성 과정, 발광 파장의 조절이 어려운 형태의 탐침들이다.

[0006] 한편, 2-디시아노메틸렌-3-시아노-2,5-디하이드로퓨란 (2-dicyanomethylene-3-cyano-2,5-dihydrofuran, DCDHF) 단위체는 전자받개 성질을 가지고 있으나, 그 자체로는 형광을 나타내고 있지는 않다. 그러나, 다양한 전자주개 구조와 컨쥬게이션을 이루면 다양한 광학적 성질을 나타내며, 이들을 수정하여 그 신호변화를 용이하게 유도할 수 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 간단한 합성 과정과 구조적 단순함, 최종 형광 파장의 조절이 용이한 티올 탐지용 형광 탐침을 개발하기 위하여 연구한 결과, DCDHF 단위체 기반 형광 프로브를 제조하였으며, 특정 바이오티올을 특이적으로 표지할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2015-0106702호

(특허문헌 0002) 대한민국공개특허 제10-2012-0128015호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 신규한 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 바이오티올(biothiol) 탐지용 조성물을 제공하는 것이다.

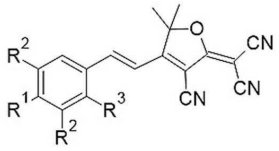
[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 이용한 바이오티올의 탐지 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0015] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0016] [화학식 1]

[0017] 

[0018] (상기 화학식 1에 있어서,

[0019] 상기 R^1은 C_1-C_3의 아실, C_1-C_5의 알킬카보닐옥시 또는 C_2-C_{10}의 디알킬아민이고;

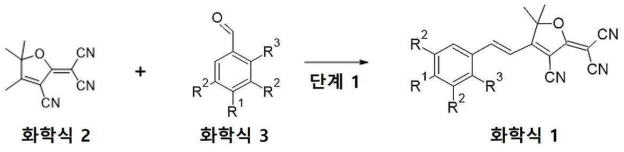
[0020] 상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고;

[0021] 상기 R^3은 H 또는 C_2-C_5의 알케닐카보닐옥시이다).

[0023] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0024] 유기용매에 화학식 2로 표시되는 화합물 및 화학식 3으로 표시되는 화합물을 용해하고 염기 용액을 첨가 및 환류(reflux)시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0025] [반응식 1]

[0026] 

[0027] (상기 반응식 1에 있어서,

[0028] 상기 R^1은 C_1-C_3의 아실이고;

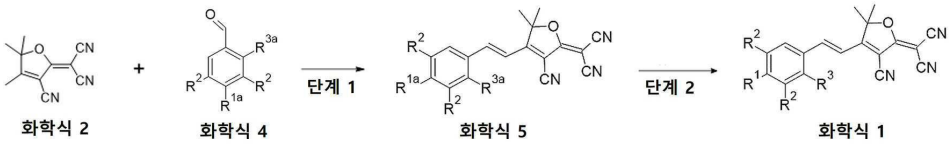
[0029] 상기 R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 H이다).

[0031] 나아가, 본 발명은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

[0032] 유기용매에 화학식 2로 표시되는 화합물 및 화학식 4로 표시되는 화합물을 용해하고 염기 용액을 첨가 및 환류(reflux)시켜, 화학식 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1); 및

[0033] 유기용매에 화학식 5로 표시되는 화합물을 용해 및 피리딘 또는 트리에틸아민을 첨가하고 냉각한 후, 카복실산 무수물 또는 카복실산 클로라이드를 첨가 및 교반시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 2);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0034] [반응식 2]

[0035] 

[0036] (상기 반응식 2에 있어서,

[0037] 상기 R^1은 C_1-C_5의 알킬카보닐옥시 또는 C_2-C_{10}의 디알킬아민이고;

[0038] 상기 R^{1a}는 하이드록시 또는 C_2-C_{10}의 디알킬아민이고;

[0039] 상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고;

[0040] 상기 R^3은 H 또는 C_2-C_5의 알케닐카보닐옥시이고;

[0041] 상기 R^{3a}는 H 또는 하이드록시이다).

[0043] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 바이오티올(biothiol) 탐지용 조성물을 제공한다.

[0045] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 바이오티올(biothiol)이 포함된 시료에 첨가하는 단계를 포함하는, 바이오티올의 탐지 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0047] 본 발명에서 새롭게 합성된 DCDHF 단위체 기반 화합물은 바이오티올을 특이적으로 표지(센싱)할 수 있는 효과가 있다. 또한, 상기 화합물은 간단한 합성 과정을 통하여 다양하게 구조적 변화를 유도할 수 있으며, 티올과의 반응에 의하여 흡광 변화를 보이므로 바이오티올의 생체외 탐지가 수월하게 하는 효과가 있고, 600 nm 이상의 발광 파장에서 최대 방출값을 가짐에 따라, 높은 조직 침투, 낮은 조직 광 손상 및 배경 간섭의 배제의 이점을 제공하는 효과가 있고, 세포 내에서 바이오티올의 시각화 및 정량화가 용이한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 화합물 1의 바이오티올에 대한 반응성을 확인하기 위한 흡광스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2는 화합물 2의 바이오티올에 대한 선택성을 확인하기 위한 형광 하기 위한 형광 변화와 호모시스테인 및 글루타티온의 농도에 따른 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3은 화합물 3의 바이오티올에 대한 선택성을 확인하기 위한 형광 변화와 글루타티온의 농도에 따른 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 화합물 1 내지 3의 선택성 패턴데이터를 이용한 티올 종류의 구별을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0051] 본 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0052] 본 명세서의 구조식에서, 원자 및/또는 치환기(group)를 결합하는 기호 "-"는 단일 결합, 기호 "="는 이중 결합을 의미할 수 있다. 상기 기호는 생략될 수 있으며, 결합 원자 또는 결합 위치를 특정하는 경우 등 필요한 경우 표시될 수도 있다.

[0053] 본 명세서에서 "치환되거나 비치환된"은 다른 기재가 없는 한 하나 또는 복수의 수소 원자가 다른 원자 또는 치환기로 치환되거나 치환되지 않은 것을 의미할 수 있다. 치환기는 예를 들어 할로겐, 하이드록시, 치환된 하이드록시, 아실옥시, 아미노, 치환된 아미노, 아미도, 시아노, 니트로, 구아니디노, 아미디노, 머캅토, 치환된 머캅토, 카복실, 설포닐옥시, 카보닐, 벤질옥시, 아릴, 헤테로아릴, 카보사이클릴, 헤테로사이클릴, 또는 보호기로 적절하게 보호될 수 있는 다른 작용기를 포함 할 수 있다.

[0054] 본 명세서에서, "알킬"은, 다른 기재가 없는 한, 치환되거나 비치환된 직쇄 또는 분지쇄의 비고리형; 고리형; 또는 이들이 결합된 포화 탄화수소를 의미할 수 있다. 또한, "C_n-C_m 알킬"은 탄소 원자를 n 내지 m개 포함하는 알킬을 의미할 수 있다. 비고리형 알킬은, 일 예로서, 메틸, 에틸, N-프로필, N-부틸, N-펜틸, N-헥실, N-헵틸, N-옥틸, 아이소프로필, 2급(sec)-부틸, 아이소부틸, 3급(tert)-부틸, 아이소펜틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸, 2,3-다이메틸부틸 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 고리형 알킬은, 일 예로서, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 또는 사이클로옥틸 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 비고리형과 고리형 알킬이 결합된 알킬은, 예를 들어, 메틸사이클로프로필, 사이클로프로필메틸, 에틸사이클로프로필, 사이클로프로필에틸, 메틸사이클로부틸, 사이클로부틸메틸, 에틸사이클로펜틸, 또는 사이클로펜틸메틸 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 명세서에서, "아실"은 카복시산의 카복시기 (-C(=O)-OH)에서 OH를 제거한 나머지 원자단 (-C(=O)-)의 총칭으로서, 방향족 잔기에 결합된 아실기일 때는 통상 알로일기라고도 한다. 일 예로서, 알데하이드(또는 '포르밀'이라고도 함), 아세틸, 프로피오닐, 말로닐, 벤조일, 에스터, 아크릴일 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 에스터, 케톤, 산클로라이드는 모두 아실기를 함유한다. 또한, "C_1-C_3의 아실"은 탄소 원자를 1 내지 3개 포함하는 아실을 의미할 수 있으며, 일 예로서, 예를 들어, 알데하이드(포르밀, -C(=O)H), 아세틸(-C(=O)CH_3), -C(=O)CF_3, -C(=O)CH_2OCH_3 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본 명세서에서, "알킬카보닐옥시"는 -(O-C(=O)-알킬)을 의미할 수 있으며, 여기서 알킬은 상기에서 정의된 바와 같다. 또한, "C_1-C_5의 알킬카보닐옥시"은 C_1-C_5의 알킬을 함유하는 카보닐옥시, 즉, -(O-C(=O)-(C_1-C_5알킬))을 의미할 수 있으며, 일 예로서, 메틸카보닐옥시(아세톡시, -(O-C(=O)-CH_3)), 에틸카보닐옥시, n-프로필카보닐옥시, 아이소-프로필카보닐옥시, n-부틸카보닐옥시, sec-부틸카보닐옥시, 아이소부틸카보닐옥시, tert-부틸카보닐옥시, 사이클로프로필카보닐옥시, 사이클로부틸카보닐옥시, 사이클로펜틸카르보닐옥시 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 명세서에서, "아민"은 암모니아의 유도체로서, 특별한 기재가 없는 한 수소 원자가 들어갈 자리에 알킬 등과 같은 치환기로 대체된 형태를 의미할 수 있고, 상기 암모니아에서 하나의 수소가 치환기로 대체된 경우를 1차 아민, 두 개의 수소가 치환기로 대체된 경우를 2차 아민, 세 개의 수소가 치환기로 대체된 경우를 3차 아민이라고 한다. 일 예로서, 메틸아민, 디메틸아민, 아닐린(aniline), 3-나이트로아닐린 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 명세서에서, "디알킬아민"은 디알킬을 함유하는 아민, -(N-(알킬)$_2$)을 의미할 수 있으며, 여기서 알킬은 상기에서 정의된 바와 같다. 또한, "C_2-C_{10}의 알킬카보닐옥시"은 C_2-C_{10}의 디알킬을 함유하는 카보닐옥시, 즉, -(N-(C_1-C_5알킬)$_2$)을 의미할 수 있으며, 디메틸아민, 디에틸아민, 디프로필아민, 디부틸아민 또는 디펜틸아민 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 명세서에서, "알케닐"은 다른 기재가 없는 한 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합(C=C)을 갖는 치환되거나 비치환된 직쇄, 분지쇄의 비고리형 또는 고리형의 탄화수소를 의미할 수 있다. 또한, "C_2-C_5 알케닐"은 탄소 원자를 2 내지 5개 포함하는 알케닐을 의미할 수 있으며, 일 예로서, 에테닐, 1-프로페닐, 프로프-2-엔-1-일[-(CH2-CH=CH2)], 2-부테닐, 아이소프로페닐, 3-부테닐, 4-펜테닐, 사이클로펜테닐, 사이클로펜타다이엔일 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 명세서에서, "알케닐카보닐옥시"는 -(O-C(=O)-알케닐)을 의미할 수 있으며, 여기서 알케닐은 상기에서 정의된 바와 같다. 또한, "C_2-C_5 알케닐카보닐옥시"는 C_2-C_5 알케닐을 함유하는 카보닐옥시, 즉, -(O-C(=O)-(C_2-C_5 알

케닐))을 의미할 수 있다.

[0061] 본 명세서에서, "시아노"는 -(CN)을 의미할 수 있다.

[0062] 본 명세서에서, "할로겐"은, 플루오로(F), 클로로(Cl), 브로모(Br) 또는 아이오도(I)를 의미할 수 있다.

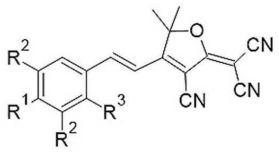
[0063] 본 발명에서, 용어 '프로브'는 '탐침', '센서'라고도 하며 생체 내/외 표적을 검출(탐지, 센싱)하거나, 표지, 영상화할 수 있는 것으로 정의된다. 일반적으로 영상화제, 조영제, 방사성 의약품 등의 용어로 대체하여 사용되고 있다.

[0064] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0066] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0068] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0069] [화학식 1]

[0070] 

[0071] (상기 화학식 1에 있어서,

[0072] 상기 R^1은 C_1-C_3의 아실, C_1-C_5의 알킬카보닐옥시 또는 C_2-C_{10}의 디알킬아민이고;

[0073] 상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고;

[0074] 상기 R^3은 H 또는 C_2-C_5의 알케닐카보닐옥시이다).

[0076] 바람직하게는, 상기 R^1은 C_1-C_2의 아실, C_1-C_3의 알킬카보닐옥시 또는 C_2-C_6의 디알킬아민이고; 상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고; 상기 R^3은 H 또는 C_2-C_4의 알케닐카보닐옥시인 것일 수 있다.

[0077] 더욱 바람직하게는, 상기 R^1은 알데하이드(formyl), 아세톡시 또는 디에틸아민이고; 상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 Cl이고; 상기 R^3은 H 또는 아크릴로일옥시인 것일 수 있다.

[0078] 특히 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다:

[0079] 1) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(4-포르밀페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란;

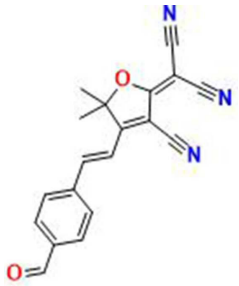
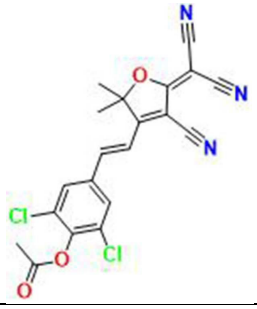
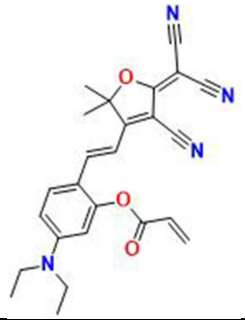
[0080] 2) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란; 및

[0081] 3) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란.

[0083] 본 발명의 일실시예에서는, DCDHF 단위체 기반 형광 프로브를 개발 연구한 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물로서, 신규한 화합물 1 내지 3(하기 표 1 참조)을 합성하였다.

표 1

[0084]

	화학구조	화합물명
화합물 1 (실시예 1)		2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(4-포르밀페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(4-formylphenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran]
화합물 2 (실시예 2)		2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(3,5-dichloro-4-acetoxyphenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran]
화합물 3 (실시예 3)		2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(2-acryloyloxy-4-diethylaminophenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran]

[0086] 본 발명의 상기 화합물은 바이오티올(biothiol)을 탐지(검출, 센싱)하기 위한 형광 프로브(형광 탐침)로서 유용하게 사용될 수 있고, 특히, 시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy) 및 글루타티온(GSH)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 바이오티올을 특이적(선택적)으로 표지(센싱)하는 것일 수 있다. 본 발명의 화합물은 간단한 합성 과정을 통하여 다양하게 구조적 변화를 유도할 수 있으며, 조직 또는 세포 내로 쉽게 투과되고, 세포에 대한 독성이 낮을 뿐 아니라, 빠른 시간 내에 글루타티온(GSH) 등의 바이오티올을 선택적으로 탐지할 수 있어 생체 내에서 바이오티올의 동적인 변화를 관찰하는 용도로 유리하게 사용될 수 있다. 또한, 바이오티올과의 반응에 의하여 흡광 변화를 보이므로 바이오티올의 생체외 탐지가 수월하게 하는 효과가 있으며, 600 nm 이상의 발광 파장에서 최대 방출값을 가짐에 따라, 높은 조직 침투, 낮은 조직 광 손상 및 배경 간섭의 배제의 이점을 제공하는 효과가 있고, 세포 내에서 바이오티올의 시각화 및 정량화가 용이한 효과가 있다.

[0088] 본 발명의 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 유효물질의 염기 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 유효물질의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설

폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔술폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

[0089] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

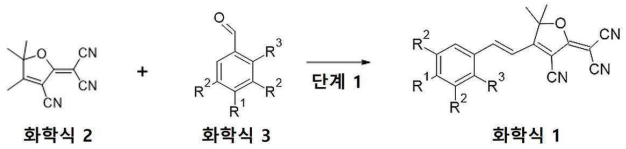
[0090] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예,질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0091] 나아가, 본 발명의 화합물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 이성질체, 광학 이성질체 등을 모두 포함한다.

[0093] 일 측면에서, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0094] 유기용매에 화학식 2로 표시되는 화합물 및 화학식 3으로 표시되는 화합물을 용해하고 염기 용액을 첨가 및 환류(reflux)시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0095] [반응식 1]

[0096] 

화학식 2 화학식 3 화학식 1

[0097] (상기 반응식 1에 있어서,

[0098] 상기 R^1은 C_1-C_3의 아실이고;

[0099] 상기 R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 H이다).

[0101] 상기 반응식 1에 있어서, 바람직하게는, 상기 R^1은 C_1-C_2의 아실이고; 상기 R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 H인 것일 수 있다.

[0102] 더욱 바람직하게는, 상기 R^1은 알데하이드이고; 상기 R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 H인 것일 수 있다.

[0103] 특히 바람직하게는, 상기 반응식 1에 나타난 바와 같은 제조방법에 의해 얻을 수 있는 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물인 것일 수 있다:

[0104] 1) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(4-포르밀페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란.

[0106] 상기 반응식 1에 있어서, 상기 단계 1의 유기용매는 에탄올, 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 디클로로메탄(DCM), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, 헥산, 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세톤 및 클로로벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0107] 바람직하게는 상기 단계 1의 유기용매는 에탄올, 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF) 및 디클로로메탄(DCM)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있고, 더욱 바람직하게는 디메틸포름아미드(DMF)인 것일 수 있다.

[0108] 상기 단계 1의 염기 용액은 트리메틸실릴클로라이드 (Trimethylsilyl chloride) 또는 암모니움 아세테이트(Ammonium acetate)일 수 있다.

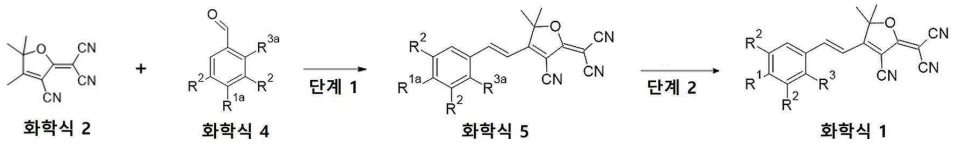
[0109] 상기 반응식 1에 있어서, 상기 단계 1은 환류 이후 용매/용액를 건조 또는 제거하는 단계; 반응후 잔여물을 세척하는 단계; 에틸아세테이트(EtOAc) 또는 디클로로메탄(DCM)으로 추출하는 단계; 및 컬럼 크로마토그래피 등을 이용하여 반응물을 정제하는 단계; 등을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0111] 또한, 본 발명은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

[0112] 유기용매에 화학식 2로 표시되는 화합물 및 화학식 4로 표시되는 화합물을 용해하고 염기 용액을 첨가 및 환류(reflux)시켜, 화학식 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 1); 및

[0113] 유기용매에 화학식 5로 표시되는 화합물을 용해 및 피리딘 또는 트리에틸아민을 첨가하고 냉각한 후, 카복실산 무수물 또는 카복실산 클로라이드를 첨가 및 교반시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계(단계 2);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0114] [반응식 2]

[0115] 

화학식 2 화학식 4 화학식 5 화학식 1

[0116] (상기 반응식 2에 있어서,

[0117] 상기 R^1은 C_1-C_3의 알킬카보닐옥시 또는 C_1-C_5의 디알킬아민이고;

[0118] 상기 R^{1a}는 하이드록시 또는 C_1-C_5의 디알킬아민이고;

[0119] 상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고;

[0120] 상기 R^3은 H 또는 C_2-C_5의 알케닐카보닐옥시이고;

[0121] 상기 R^{3a}는 H 또는 하이드록시이다).

[0123] 상기 반응식 2에 있어서, 바람직하게는, 상기 R^1은 C_1-C_3의 알킬카보닐옥시 또는 C_2-C_6의 디알킬아민이고; 상기 R^{1a}는 하이드록시 또는 C_2-C_6의 디알킬아민이고; 상기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 할로겐이고; 상기 R^3은 H 또는 C_2-C_4의 알케닐카보닐옥시이고; 상기 R^{3a}는 H 또는 하이드록시인 것일 수 있다.

[0124] 더욱 바람직하게는, 상기 R^1은 아세톡시 또는 디에틸아민이고; 상기 R^{1a}는 하이드록시 또는 디에틸아민이고; 상

기 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 Cl이고; 상기 R^3은 H 또는 아크릴로일옥시이고; 상기 R^{3a}는 H 또는 하이드록시인 것일 수 있다.

[0125] 특히 바람직하게는, 상기 반응식 2에 나타난 바와 같은 제조방법에 의해 얻을 수 있는 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다:

[0126] 2)
2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란;
및

[0127] 3) 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((*E*)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란.

[0129] 상기 반응식 2에 있어서, 상기 단계 1 내지 단계 2의 유기용매는 독립적으로 에탄올, 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 디클로로메탄(DCM), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, 헥산, 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세톤 및 클로로벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0130] 바람직하게는, 상기 단계 1 내지 단계 2의 유기용매는 독립적으로 에탄올, 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF) 및 디클로로메탄(DCM)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 단계 1의 유기용매는 디메틸포름아미드(DMF) 및 테트라하이드로퓨란(THF)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종이고, 단계 2의 유기용매는 테트라하이드로퓨란(THF) 및 디클로로메탄(DCM)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있다.

[0131] 상기 단계 1의 염기 용액은 트리메틸실릴클로라이드 (Trimethylsilyl chloride) 또는 암모니움 아세테이트(Ammonium acetate)일 수 있다.

[0132] 상기 단계 2의 카복실산 무수물 또는 카복실산 클로라이드는 각각 포화 카르복실 또는 불포화 카르복실의 무수물 또는 클로라이드 화합물을 의미하는 것일 수 있고, 포름산, 아세트산, 프로피온산, 부틸산, 아크릴산(acryloyl)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 무수물 또는 클로라이드일 수 있다. 바람직하게는, 카복실산 무수물은 아세트산 무수물, 프로피온산 무수물 및 n-부틸산 무수물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있고, 카복실산 클로라이드는 아세틸클로라이드, 프로피오닐 클로라이드, 부티릴 클로라이드, 부테노일 클로라이드 및 아크릴로일 클로라이드(아크릴산 클로라이드)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있다. 더욱 바람직하게는 아세트산 무수물 또는 아크릴로일 클로라이드일 수 있다. 이때, 상기 카복실산 무수물 또는 카복실산 클로라이드는 드롭(drop)방식으로 첨가되는 것일 수 있다.

[0133] 상기 반응식 2에 있어서, 상기 단계 1의 냉각은 -10 내지 10℃로 냉각하는 것일 수 있고, 바람직하게는 -5 내지 5℃로 냉각하는 것일 수 있고, 0℃로 냉각하는것이 특히 바람직하다.

[0134] 상기 반응식 2에 있어서, 상기 단계 1 및 단계 2는 각각 환류 및 교반 이후, 용매/용액를 건조 또는 제거하는 단계; 반응후 잔여물을 세척하는 단계; 에틸아세테이트(EtOAc) 또는 디클로로메탄(DCM)으로 추출하는 단계; 및 컬럼 크로마토그래피 등을 이용하여 반응물을 정제하는 단계; 등을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0136] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 바이오티올(biothiol) 탐지용 조성물에 관한 것이다.

[0138] 본 발명에서, 상기 바이오티올 탐지용 조성물은 바이오티올 검출(표지, 센싱)을 위한 프로브, 센서, 탐침을 의미하는 것일 수 있다.

[0139] 본 발명의 바이오티올 탐지용 조성물에 있어서, 상기 바이오티올(biothiol)은 시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy) 및 글루타티온(GSH)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0140] 본 발명의 바이오티올 탐지용 조성물에 있어서, 상기 화합물은 바이오티올(biothiol)과 반응하여 300 내지

500nm 또는 550 내지 800nm 범위의 형광을 방출하는 것인, 탐지용 조성물.

[0141] 본 발명의 바이오티올 탐지용 조성물에 있어서, 상기 화합물은 바이오티올(biothiol)과 반응하여 400 내지 450nm의 흡광은 감소시키고, 320 내지 370nm의 흡광은 증가시키는 것일 수 있다.

[0142] 본 발명의 바이오티올 탐지용 조성물에 있어서, 상기 화합물은 바이오티올(biothiol)과 반응하여 600 내지 650nm의 형광 방출을 증가시키는 것일 수 있다.

[0144] 본 발명의 상기 화합물은 간단한 합성 과정을 통하여 다양하게 구조적 변화를 유도할 수 있으며, 조직 또는 세포 내로 쉽게 투과되고, 세포에 대한 독성이 낮을 뿐 아니라, 빠른 시간 내에 글루타티온(GSH) 등의 바이오티올을 선택적으로 탐지할 수 있어 생체 내에서 바이오티올의 동적인 변화를 관찰하는 용도로 유리하게 사용될 수 있다. 또한, 바이오티올과의 반응에 의하여 흡광 변화를 보이므로 바이오티올의 생체외 탐지가 수월하게 하는 효과가 있으며, 600 nm 이상의 발광 파장에서 최대 방출값을 가짐에 따라, 높은 조직 침투, 낮은 조직 광 손상 및 배경 간섭의 배제의 이점을 제공하는 효과가 있고, 세포 내에서 바이오티올의 시각화 및 정량화가 용이한 효과가 있다.

[0146] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 바이오티올(biothiol)이 포함된 시료에 첨가하는 단계를 포함하는, 바이오티올의 탐지 방법에 관한 것이다.

[0148] 본 발명의 바이오티올의 탐지 방법에 있어서, 상기 바이오티올(biothiol)은 시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy) 및 글루타티온(GSH)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0149] 본 발명의 상기 바이오티올의 탐지 방법은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 첨가된 시료에서 흡광 변화를 측정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0150] 상기 흡광 변화를 측정하는 단계는, 바람직하게, 400 내지 450nm의 흡광은 감소되고, 320 내지 370nm의 흡광은 증가됨을 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0151] 본 발명의 상기 바이오티올의 탐지 방법은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 첨가된 시료에 500 내지 600nm, 바람직하게는 530 내지 570 nm, 특히 바람직하게는 550nm의 빛을 가하여 방출되는 형광을 측정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0152] 본 발명의 상기 바이오티올의 탐지 방법은, 300 내지 500nm 또는 550 내지 800nm 범위의 형광 방출량이 증가됨을 확인하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0153] 본 발명의 바이오티올의 탐지 방법에 있어서, 상기 형광을 측정하는 단계는 공초점 형광 현미경, 이광자 형광 현미경, 광간섭성 단층 촬영기, 및 이광자 형광 현미경 및 광간섭성 단층 촬영기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 장치를 이용하여 수행되는 것일 수 있다.

[0154] 본 발명의 바이오티올의 탐지 방법에 있어서, 상기 방법은 측정된 형광 값에 선형 판별 분석법(LDA)을 적용하여 특징데이터를 구축함으로써 탐지된 바이오티올 종류를 분류하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 특징데이터는 2차원 (2D) 또는 3차원 (3D) 그래프로 도시될 수 있다.

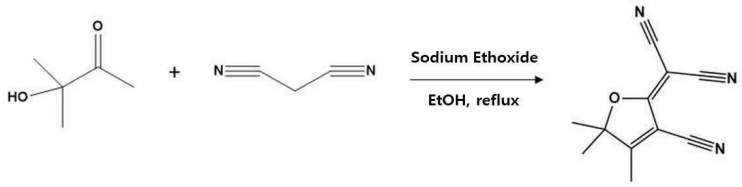
[0155] 본 발명의 바이오티올 탐지 방법에 있어서, 상기 방법은 바이오티올 부재시 측정된 형광 세기에 대한 바이오티올 존재시 측정된 형광 세기의 비율 값, 또는 바이오티올 존재시 측정된 형광 세기에 대한 바이오티올 부재시 측정된 형광 세기의 차이 값을 산출하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0156] 하나의 바이오티올에 대해 본 발명의 각 화합물은 특이적인 형광 흡광도 또는 형광 방출 세기를 가지므로, 표적하는 바이오티올, 혼합물 중에 함께 존재하는 다른 바이오티올, 또는 화합물의 성질에 따라 관찰되는 형광 흡광도 또는 세기가 다를 수 있다. 따라서, 분석에 용이한 결과 값을 얻을 수 있도록 적절한 정규화 방법을 선택하여 상기 방법에 적용할 수 있다.

[0158] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것

일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0160] **<준비예 1> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4,5,5-트리메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 1-1)의 제조**



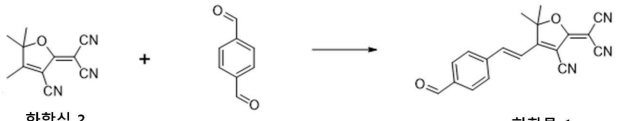
화학식 2
(화합물 1-1)

[0161]

[0162] 70mg(0.15당량)의 나트륨에톡시드(sodium ethoxide)를 700mg(1당량)의 3-하이드록시-3-메틸-2-뷰타온(3-hydroxy-3-methyl-2-butanone)과 에탄올 1ml에 용해되어 있는 928mg(2.05당량)의 말로노나이트릴(malononitrile)과 혼합하여 혼합물을 형성하고, 상기 혼합물을 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후, 2ml 에탄올을 추가적으로 첨가하고, 2시간 동안 환류(reflux) 상태로 90℃로 가열하고, 이후 상온으로 온도를 낮춘 뒤 결정화된 혼합물을 여과한 후 에탄올로 씻어내어, 상기 화학식 2로 표시되는 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4,5,5-트리메틸-2,5-디하이드로퓨란 (2-dicyanomethylene-3-cyano-4,5,5-trimethyl-2,5-dihydrofuran; 화합물 1-1)을 얻었다.

[0163] 상기 화합물 1-1을 하기 실시예 1 내지 3의 화합물의 제조에 사용하였다.

[0165] **<실시예 1> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(4-포르밀페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 1)의 제조**



화학식 2
(화합물 1-1)

화합물 1

[0166]

[0167] 상기 준비예 1의 방법으로 수득된 화학식 2로 표시되는 화합물(화합물 1-1)을 출발물질로 하여, 다음의 단계를 통해 최종 화합물 1을 제조하였다.

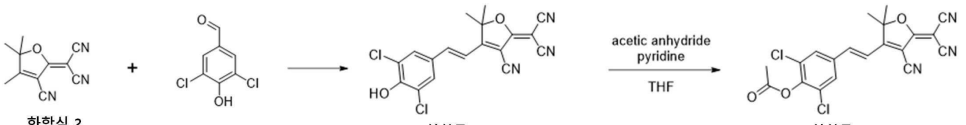
[0168] 먼저, 115mg(1당량)의 화합물 1-1을 3ml의 DMF에서 134 mg(1.1당량)의 테레프탈알데하이드(terephthalaldehyde)와 혼합하고, 이어 286uL(3당량)의 트리메틸실릴 클로라이드(Trimethylsilyl chloride)를 추가로 첨가한 후, 83℃에서 12시간 환류(reflux)시키고, 반응 생성물을 에틸아세테이트로 3회 추출하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 최종 화합물 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(4-포르밀페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(4-formylphenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran; 화합물 1]을 얻었다(수득률 70%).

[0169] 1H NMR ($CDCl_3$,400MHz): d = 10.11 (s, 1 H), 8.02 (d, J=8.3 Hz, 2 H), 7.83 (d, J=8.3 Hz, 2 H), 7.71 (d, J=16.6 Hz, 1 H), 7.16 (d, J=16.6 Hz, 1 H), 1.85 (s, 6 H).

[0170] 13C NMR ($CDCl_3$,101MHz): d = 191.0, 174.7, 172.6, 144.9, 138.9, 138.5, 130.5, 129.3, 117.6, 111.2, 110.4, 109.8, 102.0, 97.8, 26.4.

[0171] HRMS (m/z, ESI): calculated for $C_{19}H_{13}N_3O_2^+$ $[M+H]^+$: 316.10805, found: 316.10565.

[0173] **<실시예 2> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란(화합물 2)의 제조**



[0174]

[0175] 상기 준비예 1의 방법으로 수득된 화학식 2로 표시되는 화합물(화합물 1-1)을 출발물질로 하여, 다음의 단계를 통해 중간체 화합물(화합물 1-2-2) 및 최종 화합물(화합물 2)을 제조하였다.

[0177] <2-1> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(3,5-디클로로-4-하이드록시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 1-2-2)의 제조(단계 1)

[0178] 80mg(1당량)의 화합물 1-1을 3ml의 THF에서 64 mg(1.1당량)의 3,5-디클로로-4-하이드록시벤즈알데하이드(3,5-dichloro-4-hydroxybenzaldehyde)와 혼합하고, 이어 77 mg(3당량)의 암모니움 아세테이트를 추가로 첨가한 후, 70℃에서 12시간 reflux시키고, 반응 생성물을 에틸아세테이트로 3회 추출하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 중간체 화합물 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(3,5-디클로로-4-하이드록시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(3,5-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran; 화합물 1-2-2]을 얻었다(수득률 24%).

[0179] 1H NMR (Acetone-d_6 ,400MHz): d = 7.91 (d, J=15.3 Hz, 1 H), 7.81 (br. s., 2 H), 6.79 (d, J=15.5 Hz, 1 H), 1.82 (br. s., 6 H).

[0180] HRMS (m/z, ESI): calculated for $C_{18}H_{11}C_{12}N_3O_2^+$ $[M+H]^+$: 372.03010, found: 372.02756.

[0182] <2-2> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 2)의 제조(단계 2)

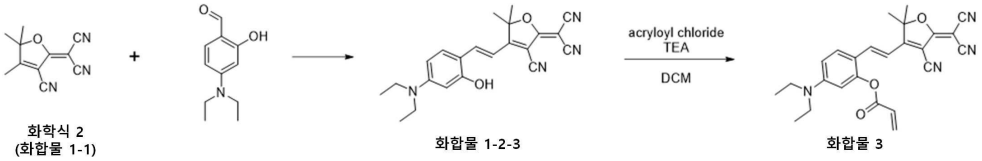
[0183] 상기 화합물 1-2-2(50mg, 1당량)를 2ml의 데드라하이드로퓨란(tetrahydrofuran)에 용해시키고, 19ul(1.5 eq.)의 무수아세트산(acetic anhydride)과 피리딘(pyridine, 3당량)을 첨가하고 1시간동안 반응시킨 후, 물을 넣어 남은 acetic anhydride를 제거 및 THF를 제거한 다음, EtOAc로 3회 추출한 후 컬럼 크로마토크래피로 정제하여, 최종 화합물 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(3,5-dichloro-4-acetoxyphenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran; 화합물 2]를 얻었다(수득률 18 %).

[0184] 1H NMR (Acetone-d_6 ,400MHz): d = 8.07 (s, 2 H), 7.87 (d, J=16.6 Hz, 1 H), 7.41 (d, J=16.6 Hz, 1 H), 2.37 (s, 3 H), 1.86 (s, 6 H).

[0185] 13C NMR (Acetone-d_6 ,101MHz): d = 173.9, 172.7, 166.7, 145.9, 142.9, 134.7, 129.5, 129.0, 118.3, 111.9, 111.1, 110.0, 102.1, 99.1, 24.9, 19.2.

[0186] HRMS (m/z, ESI): calculated for $C_{20}H_{13}C_{12}N_3O_3^+$ $[M+H]^+$: 414.04067, found: 414.03859.

[0188] **<실시예 3> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 3)의 제조**



[0189]

[0190] 상기 준비예 1의 방법으로 수득된 화학식 2로 표시되는 화합물(화합물 1-1)을 출발물질로 하여, 다음의 단계를

통해 중간체 화합물(화합물 1-2-3) 및 최종 화합물(화합물 3)을 제조하였다.

[0192] <3-1> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(2-하이드록시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 1-2-3)의 제조(단계 1)

[0193] 300mg(1당량)의 화합물 1-1를 3ml의 DMF에서 320 mg(1.1당량)의 4-디에틸아미노살리실알데하이드(4-(diethylamino)salicylaldehyde)와 혼합하고, 이어 573 uL(3당량)의 트리메틸실릴 클로라이드(Trimethylsilyl chloride)를 추가로 첨가한 후, 105℃에서 12시간 환류(reflux)시키고, 반응 생성물을 에틸아세테이트로 3회 추출하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 중간체 화합물 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(2-하이드록시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(2-hydroxy-4-diethylaminophenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran; 화합물 1-2-3]을 얻었다(수득률 16%).

[0194] 1H NMR (Acetone-d_6 ,400MHz): d = 8.13 (d, J=15.6 Hz, 1 H), 7.56 (s, 1 H), 6.95 (s, 1 H), 6.36 (s, 1 H), 6.18 (s, 1 H), 3.39 (q, J=7.0 Hz, 4 H), 1.67 (s, 6 H), 1.06 - 1.09 (m, 6 H).

[0195] HRMS (m/z, ESI): calculated for $C_{22}H_{22}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$: 375.18155, found: 375.18027.

[0197] <3-2> 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 3)의 제조(단계 2)

[0198] 상기 화합물 1-2-3(25mg, 1당량)을 2ml의 디클로로메탄(DCM)에 용해시키고, 47μL(2당량)의 트리에틸아민(Triethylamine, TEA)을 첨가하고 0℃로 냉각 한 후, DCM 2ml에 녹인 6.4 ul(1.2당량)의 아크릴로일 클로라이드(acryloyl chloride)를 drop하여 첨가하고, 상온으로 온도를 올리고 12시간 반응시킨 후, DCM으로 3회 추출한 후, 컬럼 크로마토크래피로 정제하여, 최종 화합물 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 [2-dicyanomethylene-3-cyano-4-((*E*)-2-(2-acryloyloxy-4-diethylaminophenyl)ethenyl)-5,5-diimethyl-2,5-dihydrofuran; 화합물 3]을 얻었다(수득률 79%).

[0199] 1H NMR ($CDCl_3$,400MHz): d = 7.73 (d, J=16.0 Hz, 1 H), 7.59 (d, J=9.2 Hz, 1 H), 6.63 - 6.66 (m, 1 H), 6.59 - 6.62 (m, 1 H), 6.56 (dd, J=9.2, 2.4 Hz, 1 H), 6.31 - 6.39 (m, 2 H), 6.08 (dd, J=10.5, 0.8 Hz, 1 H), 3.40 (q, J=7.1 Hz, 4 H), 1.61 (s, 6 H), 1.13 - 1.22 (m, 6 H).

[0200] 13C NMR ($CDCl_3$,101MHz): d = 176.3, 174.3, 163.9, 153.3, 152.8, 141.7, 134.4, 130.0, 127.1, 114.0, 112.7, 111.9, 111.5, 110.5, 109.1, 105.2, 96.8, 54.7, 45.2, 26.6, 12.6.

[0202] **<실험예 1> 화합물 1의 바이오티올에 대한 반응성 확인**

[0203] 분석 물질인 Cys, Hcy, GSH 각각을 PBS(pH=7.4) 버퍼에 녹여서 200uM 농도의 분석 용액을 형성하고, 화합물 1을 분석 용액에 20uM의 농도로 혼합하여 10분간 반응시키고, UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 측정하여, 흡광 스펙트럼 결과를 도 1에 나타내었다.

[0204] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(4-포르밀페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 1)은 Cys, Hcy, GSH와의 반응을 통하여, 420 nm의 흡광은 감소하는 반면, 350 nm의 흡광은 증가함을 보임으로써 티올을 센싱하고 있음을 확인하였다.

[0206] **<실험예 2> 화합물 2의 바이오티올에 대한 선택성과 이들의 농도에 대한 형광변화의 확인**

[0207] 분석 물질인 Cys, Hcy, GSH, GSSG, H2O2, OH, OCl-, O2 singlet, NaSH, NO 각각을 PBS(pH=7.4) 버퍼에 녹여서 200uM 농도의 분석 용액을 형성하고, 화합물 2를 분석 용액에 20uM의 농도로 혼합하여 30분간 반응시키고, 형광 분광계로 측정하여 그 세기를 도 2(좌측)에 나타내었다.

[0208] 분석 물질인 Hcy를 PBS(pH=7.4) 버퍼에 녹여서 서로 다른 농도(0uM 내지1000uM)의 분석 용액을 형성하고, 화합

물 2를 분석 용액에 10uM의 농도로 혼합하여 30분간 반응시키고, 형광분광계(530 nm에서 excitation시킴)를 이용하여 측정하여, 형광스펙트럼 결과를 도 2(중간)에 나타내었다.

[0209] 분석 물질인 GSH를 PBS(pH=7.4) 버퍼에 녹여서 서로 다른 농도(0uM 내지1000uM)의 분석 용액을 형성하고, 화합물 2를 분석 용액에 10uM의 농도로 혼합하여 30분간 반응시키고, 형광분광계(530 nm에서 excitation시킴)를 이용하여 측정하여, 형광스펙트럼 결과를 도 2(우측)에 나타내었다.

[0210] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 2-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(3,5-디클로로-4-아세톡시페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 2)은 여러 종류의 바이오티올 가운데 HCY 및 GSH에 대하여 특이적인 선택성을 나타냄을 확인하였으며, 620nm에서 티올과의 반응에 의해 형광 증가를 보이고 있으며, Hcy과 GSH에 대하여 농도에 따라 형광의 증가 정도가 달라짐을 확인함으로써, Hcy와 GSH를 선택적으로 센싱할 수 있음을 확인하였다.

[0212] **<실험예 3> 화합물 3의 바이오티올에 대한 선택성과 이들의 농도에 대한 형광변화의 확인**

[0213] 분석 물질인 Cys, Hcy, GSH, GSSG, H2O2, OH, OCl-, O2 singlet, NaSH, NO 각각을 PBS(pH=7.4) 버퍼에 녹여서 200uM 농도의 분석 용액을 형성하고, 화합물 3을 분석 용액에 20uM의 농도로 혼합하여 10분간 반응시키고, 형광분광계로 측정하여 그 세기를 도 3(좌측)에 나타내었다.

[0214] 분석 물질인 GSH를 PBS(pH=7.4) 버퍼에 녹여서 서로 다른 농도(0uM 내지1000uM)의 분석 용액을 형성하고, 화합물 3을 분석 용액에 10uM의 농도로 혼합하여 10분간 반응시키고, 형광분광계(460nm에서 excitation시킴)를 이용하여 측정하여, 형광스펙트럼 결과를 도 3(우측)에 나타내었다.

[0215] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 22-디시아노메틸렌-3-시아노-4-((E)-2-(2-아크릴로일옥시-4-디에틸아미노페닐)에테닐)-5,5-디메틸-2,5-디하이드로퓨란 (화합물 3)은 여러 종류의 바이오티올 가운데 GSH에 대하여 선택성이 높은 것으로 나타났고, 640nm에서 티올과의 반응에 의해 형광 증가를 보이고 있으며, GSH의 농도에 따라 형광의 증가정도가 달라짐을 확인함으로써, GSH를 선택적으로 센싱할 수 있음을 확인하였다.

[0217] **실험예 4. 화합물의 선택성 패턴데이터를 이용한 티올 종류의 구별**

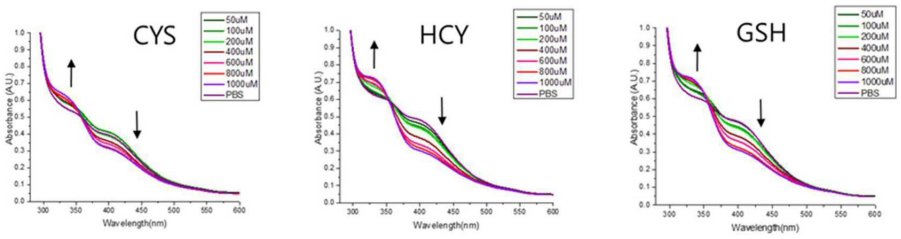
[0218] LDA 분석법은 선형판별분석법으로 불리며, 대상 집단 내의 분산에 대하여 대상 집단 간의 분산의 비율을 최대한으로 키우기 위한 분석법이다. 본 발명자들은 HCY, GSH 및 GSSG 각각의 바이오티올을 대상 집단으로 하여, 이들 집단에 대하여 상기 화합물 2 및 화합물 3의 신호변화 패턴을 이용하여 LDA 분석을 진행하였다. 상기 실시예 2 및 3에서 제조된 화합물 2 및 화합물 3 각각의 분석물질(바이오티올 3종 및 PBS)에 대한 신호변화데이터를 확보하고, 이 데이터를 통계 분석을 통해 2개의 분석인자로 축소시켜 그래프를 완성하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0219] LDA 분석을 통해 얻어진 그래프 위의 점은 분석대상에 따라 얻어지는 결과값의 구역이 확연하게 다르게 나타났으며, HCY, GSH 및 GSSG 분석대상별로 특정 구역내에서 중첩되지 않게 생성되었다. 여러 차례 반복 실험결과, 같은 구역내에서 같은 대상에 대한 결과가 나타남으로써, 본 발명의 화합물 2 및 화합물 3의 신호 변화 패턴을 통해 분석 집단간의 분산과 집단내 분산의 비율을 높여 선택적으로 센싱할 수 있음을 확인하였다.

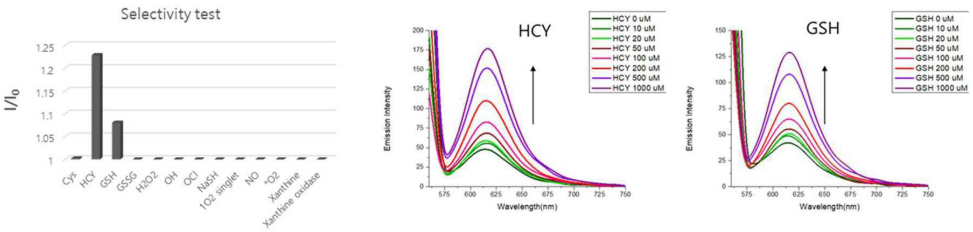
[0221] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특히 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

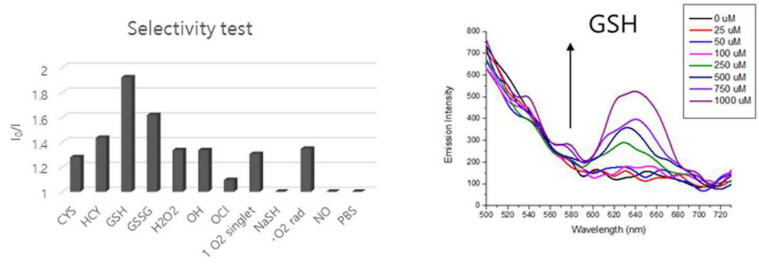
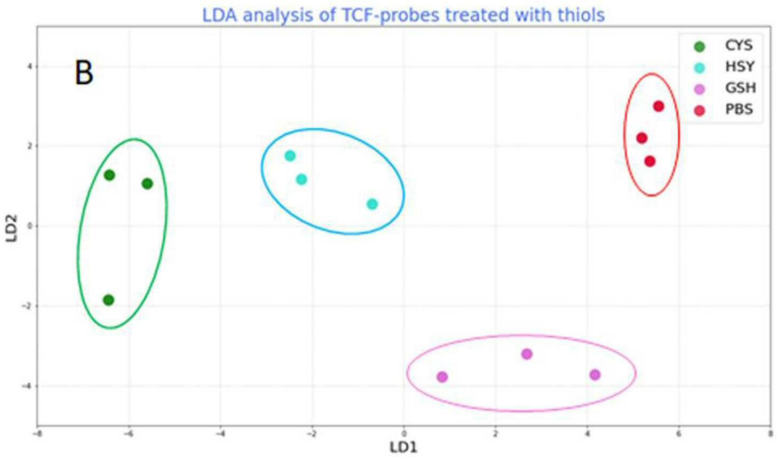
도면1



도면2



도면3



도면4