



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0107931
(43) 공개일자 2019년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 491/107 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07D 491/107 (2013.01)
G01N 33/56966 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0029275
(22) 출원일자 2018년03월13일
심사청구일자 2018년03월13일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호 (서빙고동, 신동아아파트)
이다영
서울특별시 서대문구 봉원사길 41-7, 110호 (대신동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

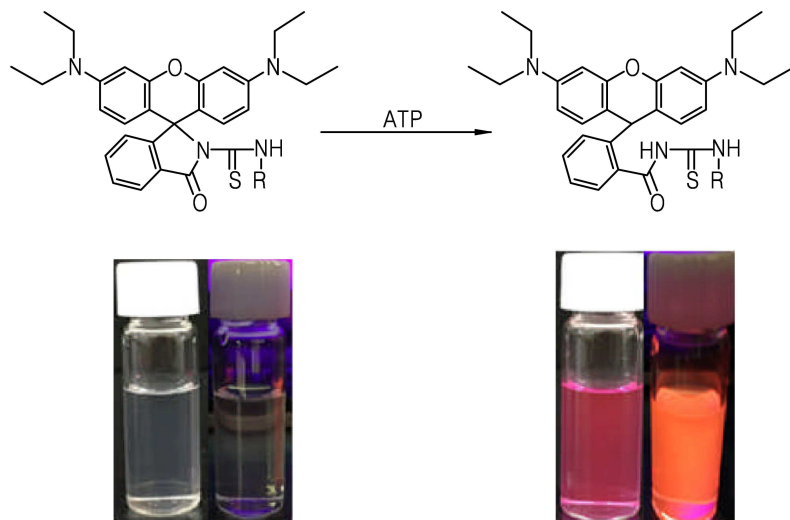
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **화합물, 상기 화합물을 포함하는 프로브 조성물, 상기 화합물의 제조방법, 및 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법**

(57) 요약

화합물, 상기 화합물을 포함하는 프로브 조성물, 상기 화합물의 제조방법, 및 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법을 개시한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

스와미 쿠네마디할리 마트하다 코트라이아
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관
D동 501호 (대현동)

류이판

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관
D동 501호 (대현동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A3A2048814

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원유기소재연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.06.30

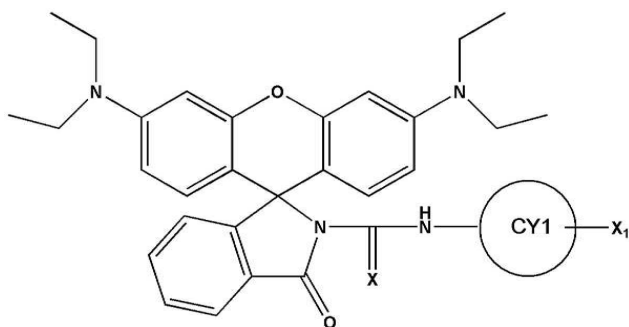
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서,

CY1은 탄소수 6 내지 40의 방향족 고리이며;

X는 산소 원자 또는 황 원자이며;

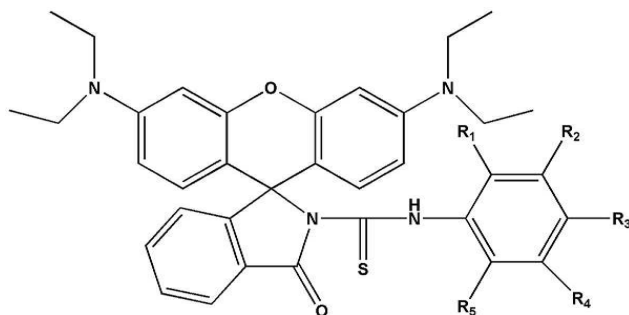
X₁은 수소 원자, 할로젠기, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미드기, -COR_a, -COOR_a, -CF₃, -CCl₃, -CBr₃, C1-C10의 알킬기, 또는 이들의 조합이고, 여기서 R_a는 수소, C1-C10의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물이 하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

<화학식 2>



상기 화학식 2에서,

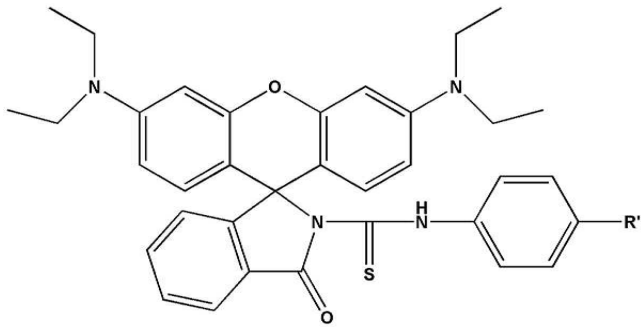
R₁, R₂, R₃, R₄, R₅는 서로 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미드기, -COR_a, -COOR_a, -CF₃, -CCl₃, -CBr₃, C1-C10의 알킬기, 또는 이들의 조합이고, 여기서 R_a는 수소, C1-C10의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기이다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물이 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물:

<화학식 3>



상기 화학식 3에서,

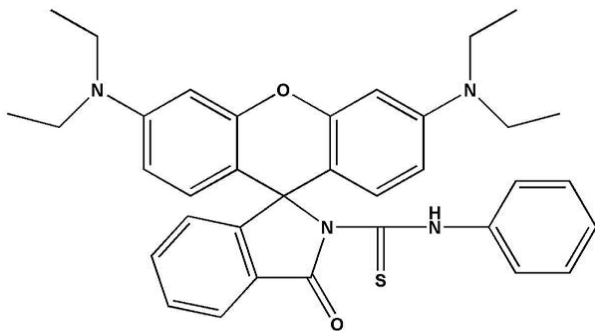
R'는 수소 원자, 할로젠 원자, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미드기, $-COR_a$, $-COOR_a$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, C1-C10의 알킬기, 또는 이들의 조합이고, 여기서 R_a 는 수소, C1-C10의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기이다.

청구항 4

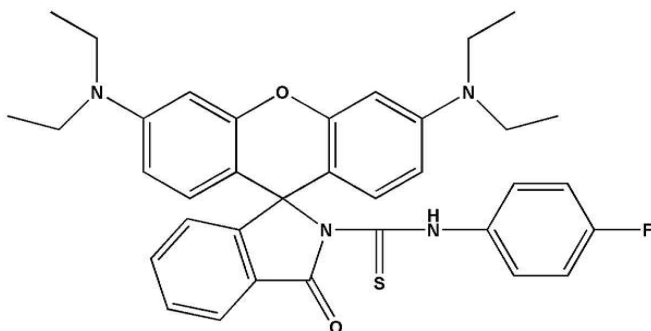
제1항에 있어서,

상기 화합물이 하기 화학식 4 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물:

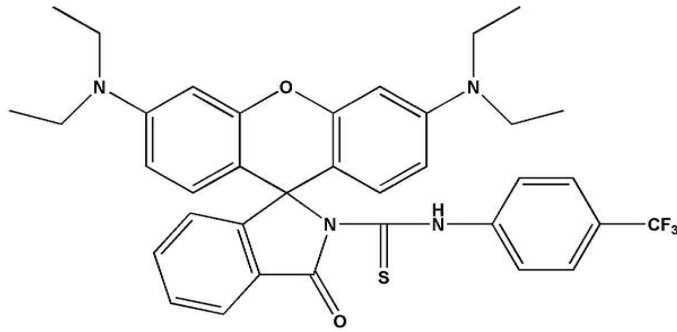
<화학식 4>



<화학식 5>



<화학식 6>



청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 프로브 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 조성물은 ATP, ADP, CTP 또는 이들 조합을 검출하기 위한 색변환(colorimetric) 및 형광 프로브 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,
상기 조성물은 미토콘드리아 내 ATP를 선택적으로 모니터링하기 위한 색변환(colorimetric) 및 형광 프로브 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,
상기 조성물은 미토콘드리아 내 ATP를 선택적으로 실시간 모니터링하기 위한 색변환(colorimetric) 및 형광 프로브 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,
상기 조성물은 ATP와 결합하여 550 내지 600 nm 파장에서 형광 강도가 증가하는 프로브 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서,
상기 조성물은 세포 내에서 1 내지 10 mM 농도의 ATP를 검출하는 프로브 조성물.

청구항 11

제5항에 있어서,
상기 조성물은 ATP와 결합되기 전의 형광 강도를 기준으로 하여 ATP와 결합된 후의 형광 강도가 50배 이상 증가된 프로브 조성물.

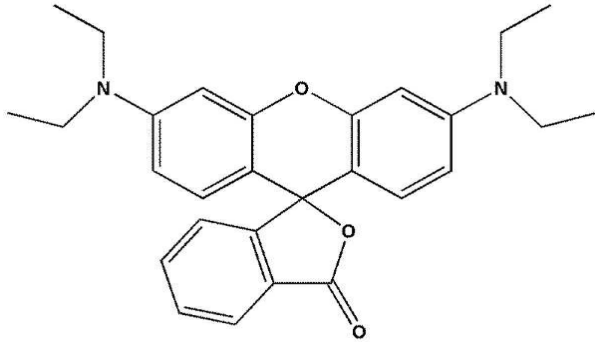
청구항 12

제5항에 있어서,
상기 조성물은 pH 4.0 내지 7.4 생리적 범위에서 ATP를 검출하는 프로브 조성물.

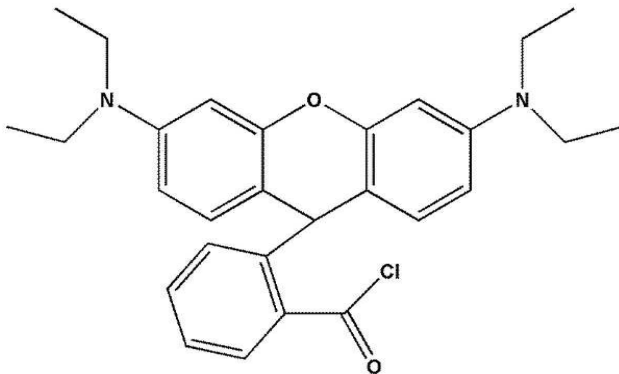
청구항 13

- A) 하기 화학식 7로 표시되는 화합물을 산염화물과 반응시켜 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;
- B) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물을 이소티오시아네이트와 반응시켜 하기 화학식 9로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및
- C) 상기 화학식 9로 표시되는 화합물을 1차 아민(R-NH₂)과 반응시켜 하기 화학식 10으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 화합물의 제조방법:

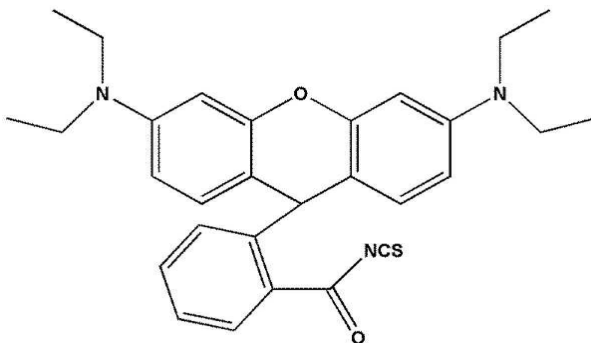
<화학식 7>



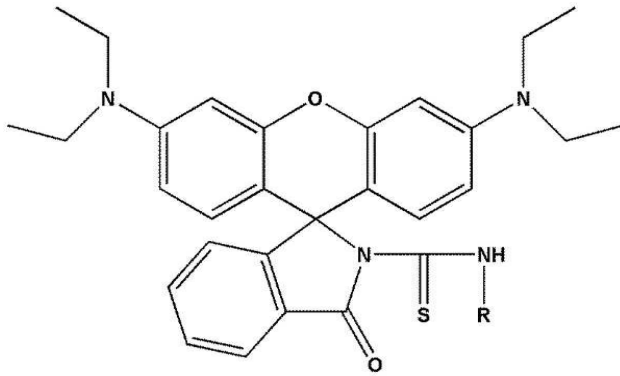
<화학식 8>



<화학식 9>



<화학식 10>



상기 화학식 10에서,

R은 페닐기, 할로겐으로 치환된 페닐기, 또는 트리플루오로메틸로 치환된 페닐기, 또는 이들의 조합이다.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 A) 내지 C) 단계를 원-팟(one-pot) 공정에 따라 제조한 화합물의 제조방법.

청구항 15

(a) 제5항에 따른 조성물을 세포에 주입하는 단계;

(b) 상기 주입된 조성물이 세포의 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 색변환(colorimetric) 및 형광을 나타내는 단계; 및

(c) 상기 색변환 및 형광을 육안 또는 형광 현미경으로 관측하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 화합물, 상기 화합물을 포함하는 프로브 조성물, 상기 화합물의 제조방법, 및 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] ATP는 리보오스 그룹, 아데닌 그룹, 및 포스페이트 그룹의 세 개의 구성요소로 이루어져 있으며 모든 살아있는 생물에 의해 공유되고 있다. ATP는 세포 기능을 위해 에너지를 저장하는 화학 전지와 같은 역할을 한다. 생물체 내에 에너지를 필요로 하는 경우, ATP 1몰이 가수분해되어 ADP 또는 AMP로 되면 약 30.5kJ 또는 45.6kJ의 에너지를 방출한다. 이와 반대로 생물체 내에 에너지가 필요하지 않는 경우, 인산기가 분자 내에 재부착된다.

[0003] 또한 ATP는 신경전달, 분자 이동의 조절 및 이온 채널을 위한 상징으로서 역할을 한다. 나아가 ATP 레벨의 감소는 저혈당증, 허혈 및 파킨슨병 등을 초래한다.

[0004] 따라서 세포 내의 ATP 레벨을 실시간 모니터링하는 것은 매우 중요하며, 세포 내, 예를 들어 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하기 위한 신규한 화합물, 상기 화합물을 포함하는 프로브 조성물, 상기 화합물의 제조방법, 및 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법에 대한 요구가 있다.

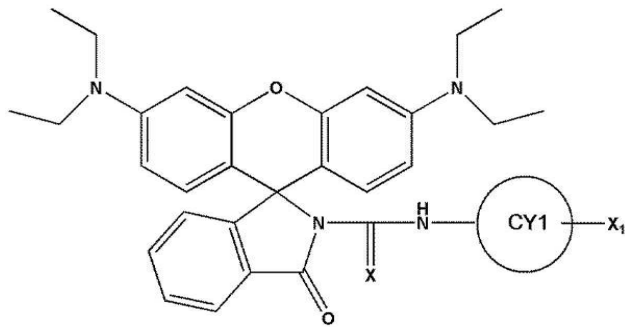
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 일 측면은 미토콘드리아 내 다양한 농도 범위에서 ATP를 선택적으로 또한 실시간 모니터링하기 위한 화합물을 제공하는 것이다.
- [0006] 다른 측면은 상기 화합물을 포함하는 색변환 및 형광 프로브 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 또다른 측면은 상기 화합물을 용이하게 제조하는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 또다른 측면은 ATP 감소에 따른 질병을 예방 및 진단하는데 사용 가능한 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법을 제공하는 것이다.

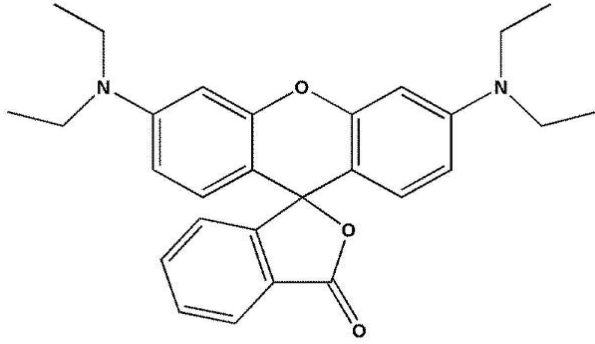
과제의 해결 수단

- [0009] 일 측면에 따라,
- [0010] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제공된다:
- [0011] <화학식 1>



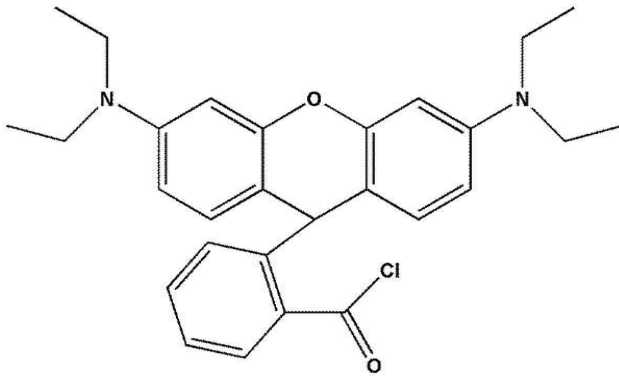
- [0012]
- [0013] 상기 화학식 1에서,
- [0014] CY1은 탄소수 6 내지 40의 방향족 고리이며;
- [0015] X는 산소 원자 또는 황 원자이며;
- [0016] X₁은 수소 원자, 할로젠기, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미드기, -COR_a, -COOR_a, -CF₃, -CCl₃, -CBr₃, C1-C10의 알킬기, 또는 이들의 조합이고, 여기서 R_a는 수소, C1-C10의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기이다.
- [0017] 다른 측면에 따라,
- [0018] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및
- [0019] 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 프로브 조성물이 제공된다.
- [0020] 또다른 측면에 따라,
- [0021] A) 하기 화학식 7로 표시되는 화합물을 산염화물과 반응시켜 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;
- [0022] B) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물을 이소티오시아네이트와 반응시켜 하기 화학식 9로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및
- [0023] C) 상기 화학식 9로 표시되는 화합물을 1차 아민(R-NH₂)과 반응시켜 하기 화학식 10으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 화합물의 제조방법이 제공된다:

[0024] <화학식 7>



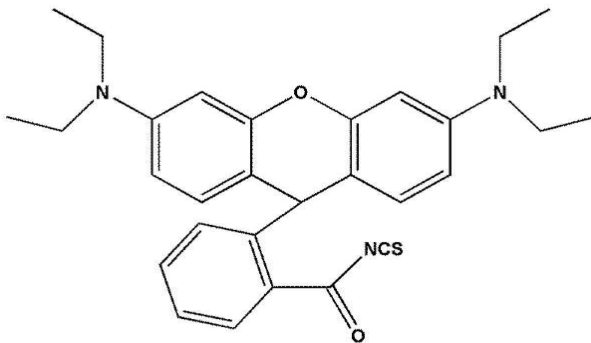
[0025]

[0026] <화학식 8>



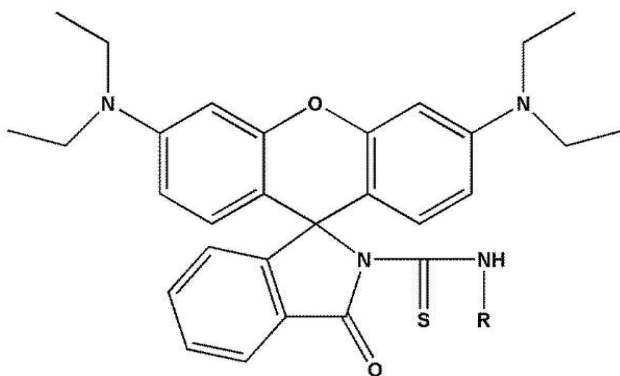
[0027]

[0028] <화학식 9>



[0029]

[0030] <화학식 10>



[0031]

[0032] 상기 화학식 10에서,

[0033] R은 페닐기, 할로겐으로 치환된 페닐기, 또는 트리플루오로메틸로 치환된 페닐기, 또는 이들의 조합이다.

- [0034] 또다른 측면에 따라,
- [0035] (a) 제5항에 따른 조성물을 세포에 주입하는 단계;
- [0036] (b) 상기 주입된 조성물이 세포의 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 색변환(colorimetric) 및 형광을 나타내는 단계; 및
- [0037] (c) 상기 색변환 및 형광을 육안 또는 형광 현미경으로 관측하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0038] 일 측면에 따른 화합물 및 상기 화합물을 포함하는 프로브 조성물은 미토콘드리아 내 다양한 농도 범위에서 ATP를 선택적으로 또한 실시간 모니터링하기 위한 색변환 및 형광 화합물 및 프로브 조성물을 제공할 수 있다. 상기 화합물 및 프로브 조성물은 세포에서 낮은 독성을 가지고 있어 생물학적 적용 가능성이 높다. 상기 화합물의 제조방법은 용이하며 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법은 ATP 감소에 따른 질병을 예방 및 진단하는데 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1a, 도 1b, 도 1c는 합성에 1의 프로브 조성물(1)용 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼, ^{13}C NMR 스펙트럼, 및 FAB 질량 스펙트럼을 각각 나타내며; 도 2a, 도 2b, 및 도 3c는 합성에 2의 프로브 조성물(2)용 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼, ^{13}C NMR 스펙트럼, 및 FAB 질량 스펙트럼을 각각 나타내며; 도 3a, 도 3b, 및 도 3c는 합성에 3의 프로브 조성물(3)용 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼, ^{13}C NMR 스펙트럼, 및 FAB 질량 스펙트럼을 각각 나타낸다.
- 도 4는 일 구현예에 따른 프로브 조성물용 화합물이 ATP와 결합시 반응하는 반응 메커니즘 및 상기 프로브 조성물에 ATP를 첨가하기 전·후의 색변환 분석 결과이다.
- 도 5a 및 도 5b는 각각 합성에 1 및 합성에 2의 화합물을 40% DMSO(dimethyl sulfoxide) 함유 PBS 버퍼액(Sigma-Aldrich사 제조)에 각각 용해한 프로브 조성물(1) 및 프로브 조성물(2) 10 μM 을 시험관에 넣고 ATP 저장액을 0 mM ~ 10.0 mM 농도로 첨가하여 UV-vis 흡수 스펙트럼 분석 실험을 수행한 결과이다.
- 도 6a 및 도 6b는 각각 합성에 1 및 합성에 2의 화합물을 40% DMSO(dimethyl sulfoxide) 함유 PBS 버퍼액(Sigma-Aldrich사 제조)에 각각 용해한 프로브 조성물(1) 및 프로브 조성물(2) 10 μM 을 시험관에 넣고 ATP 저장액을 0 mM ~ 10.0 mM 농도로 첨가하여 형광 스펙트럼 분석 실험을 수행한 결과이다.
- 도 7a 및 도 7b는 도 6a 및 도 6b의 형광 스펙트럼 분석 실험 결과로부터 얻은 프로브 조성물(1) 및 프로브 조성물(2) 각각의 Benesie-Hildebrand 플롯 결과이다.
- 도 8은 합성에 1의 화합물을 용해한 프로브 조성물(1) 30 μL 를 시험관에 넣고 상기 피분석물 1번~27번(ATP, ADP, AMP, CTP, CDP, CMP, GTP, GDP, GMP, UTP, UDP, UMP, HPO_4^{2-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, HSO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^- , PO_4^{3-} , CH_3COO^- , NO_3^- , HSO_4^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ 순번)의 저장액 각각을 첨가하여 얻은 피분석물 프로브 조성물(1)을 PBS 버퍼(pH 7.4) 및 40% DMSO 3 mL로 희석한 후 형광 스펙트럼($\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 591 \text{ nm}$, slit: 3 nm x 3 nm)을 이용하여 형광 응답 분석 실험을 수행한 결과이다.
- 도 9는 도 6a의 형광 스펙트럼 분석 실험 결과로부터 프로브 조성물(1)에 대하여 591 nm 방출 파장에서 형광 강도를 pH 1~9의 범위에서 분석 실험을 수행한 결과이다.
- 도 10a는 합성에 2의 화합물인 프로브 조성물(2)에 대하여 HeLa 셀 내 미토콘드리아에서의 co-localization 분석 실험 결과이다.
- 도 10b는 합성에 2의 화합물인 프로브 조성물(2)에 대하여 HeLa 셀에서의 미토콘드리아 내 ATP 변화에 대한 실시간 응답 분석 실험 결과이다.
- 도 11은 합성에 2의 화합물인 프로브 조성물(2)에 대하여 HeLa 셀에서의 MTT 어세이(assay)로 세포독성실험을 수행한 결과이다.

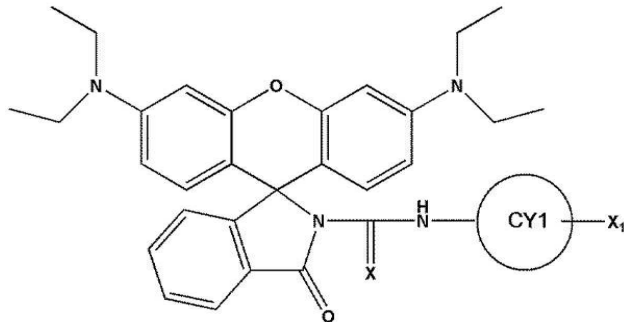
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 일 구현예에 따른 화합물, 상기 화합물을 포함하는 프로브 조성물, 상기 화합물의 제조방법, 및 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법에 관하여 상세히 설명하기로 한다. 이하는, 예시로서 제시되는 것으로서 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 특허청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0041] 본 명세서에서 "포함"이라는 용어는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개재할 수 있음을 나타내도록 사용된다.

[0042] 본 명세서에서 "이들의 조합"이라는 용어는 기재된 구성요소들 하나 이상과의 혼합 또는 조합을 의미한다.

[0043] 일 구현예에 따른 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:



[0044]

[0045] 상기 화학식 1에서,

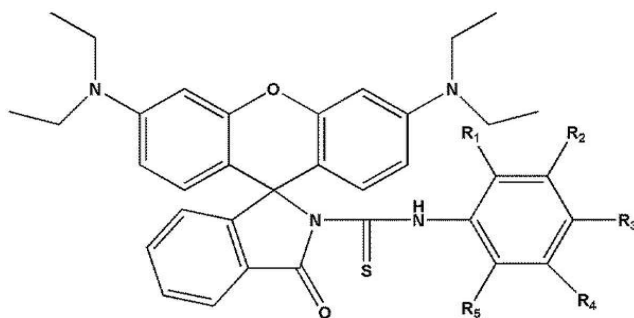
[0046] CY1은 탄소수 6 내지 40의 방향족 고리일 수 있으며;

[0047] X는 산소 원자 또는 황 원자일 수 있으며;

[0048] X₁은 수소 원자, 할로젠기, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미드기, -COR_a, -COOR_a, -CF₃, -CCl₃, -CBr₃, C1-C10의 알킬기, 또는 이들의 조합일 수 있고, 여기서 R_a는 수소, C1-C10의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기일 수 있다.

[0049] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다:

[0050] <화학식 2>



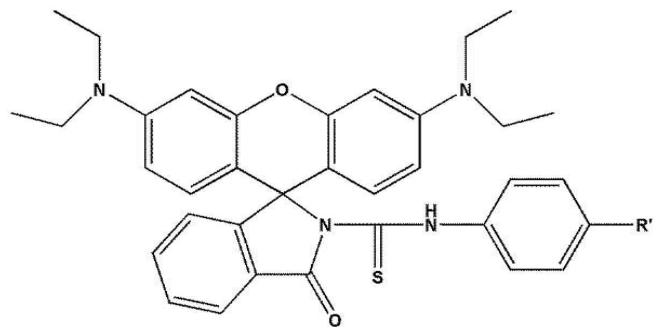
[0051]

[0052] 상기 화학식 2에서,

[0053] R₁, R₂, R₃, R₄, R₅는 서로 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미드기, -COR_a, -COOR_a, -CF₃, -CCl₃, -CBr₃, C1-C10의 알킬기, 또는 이들의 조합일 수 있고, 여기서 R_a는 수소, C1-C10의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기일 수 있다.

[0054] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 3으로 표시될 수 있다:

[0055] <화학식 3>



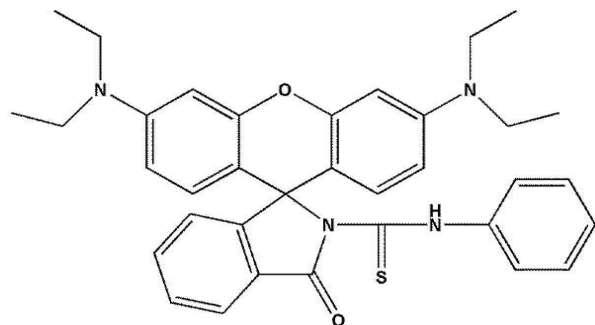
[0056]

[0057] 상기 화학식 3에서,

[0058] R'는 수소 원자, 할로겐 원자, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미드기, $-COR_a$, $-COOR_a$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, C1-C10의 알킬기, 또는 이들의 조합일 수 있고, 여기서 R_a 는 수소, C1-C10의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기일 수 있다.

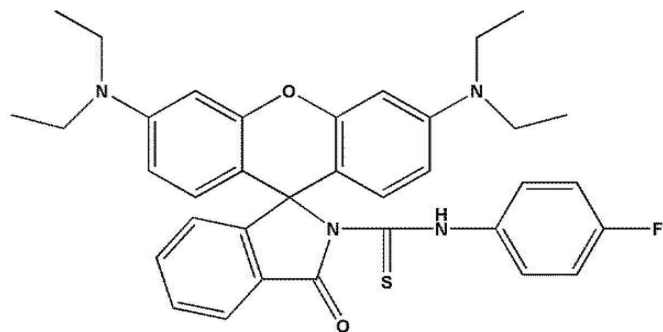
[0059] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 4 내지 화학식 6으로 표시될 수 있다:

[0060] <화학식 4>



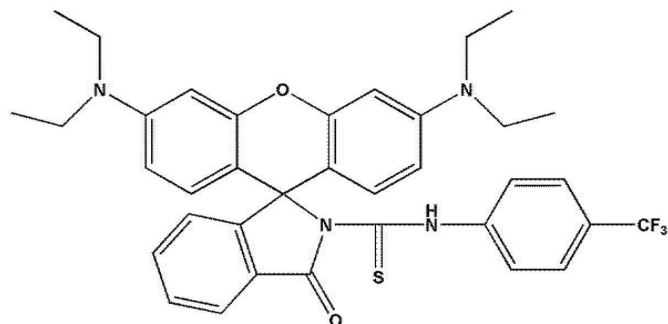
[0061]

[0062] <화학식 5>



[0063]

[0064] <화학식 6>

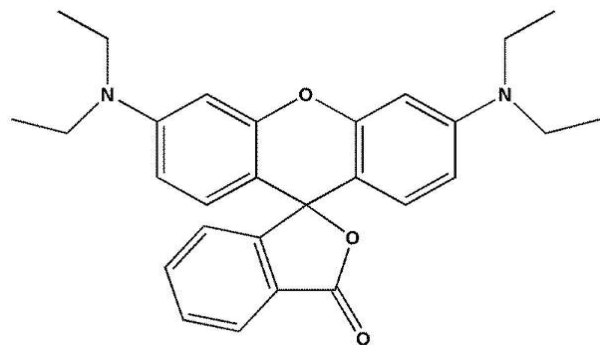


[0065]

- [0066] 화학식 1 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물은 로다민계 스피로라탐 유도체로서 장파장의 흡수 및 방출 스펙트럼을 나타내며, 큰 흡수계수(absorption coefficient), 높은 형광 양자효율, 제로 배경 시그널(zero-background signals), 및 셀 양립성(cell compatibility) 등의 특성을 가지고 있다.
- [0067] 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물은 도 4에서 보이는 바와 같이, ATP와 결합하여 스피로라탐 고리가 열리고 ATP와의 착체를 형성할 경우 형광 반응이 일어나지 않는다면 무색에서 연분홍색으로 점차 색변환이 발생함을 육안으로 관찰할 수 있다. 또한 365 nm의 UV 램프 조사시 무색에서 진한 분홍색으로 형광변환이 되어 가는 것을 육안으로 관찰할 수 있다. 따라서 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물은 세포 내의 ATP를 육안으로도 용이하게 검출할 수 있다.
- [0068] 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물이 ATP와 결합하여 스피로라탐 고리가 열리는 이유로는 로다민계 스피로라탐 고리에 연결된 우레아 또는 티오우레아의 바깥쪽 -NH의 수소원자가 ATP의 포스페이트 그룹의 산소원자와 수소결합을 하는 것에 기인하는 것으로 여겨진다. 상기 우레아 또는 티오우레아는 세포 내의 ATP를 검출하는 반응 영역의 역할을 한다.
- [0069] 상기 탄소수 6 내지 40의 방향족 고리는 ATP를 검출하는데 조력자로서의 역할을 한다. 상기 우레아 또는 티오우레아에 연결된 탄소수 6 내지 40의 방향족 고리는 치환기를 갖거나 또는 가지지 않을 수 있다. 이 때 치환기로서 전자끄는기를 갖는 경우 전자끄는기의 세기가 커짐에 따라 상기 우레아 또는 티오우레아와 ATP 사이의 결합력을 약화시킬 수 있다. 따라서 세포 내 ATP 검출 농도에 따라 상술한 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물에 기재된 치환기를 적절하게 선택할 수 있다.
- [0070] 다른 일 구현예에 따른 프로브 조성물은 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 또는 상기 조성물은 시료(sample)와 혼합될 수 있다. 상기 시료는 미생물(microorganism), 세포(cell), 및 조직(tissue) 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 생물학적 시료일 수 있으나, 반드시 이들로 한정되지 않으며 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.
- [0071] 상기 조성물은 ATP, ADP, CTP 또는 이들 조합을 검출하기 위한 색변환(colorimetric) 및 형광 프로브 조성물일 수 있다.
- [0072] 상기 조성물은 미토콘드리아 내 ATP를 선택적으로 모니터링하기 위한 색변환(colorimetric) 및 형광 프로브 조성물일 수 있다.
- [0073] 상기 조성물은 미토콘드리아 내 ATP를 선택적으로 실시간 모니터링하기 위한 색변환(colorimetric) 및 형광 프로브 조성물일 수 있다.
- [0074] 상기 조성물은 ATP 레벨의 감소와 관련 있는 저혈당증, 허혈 및 파킨슨병과 같은 질병을 예방 및 진단하는데 사용할 수 있다.
- [0075] 상기 조성물은 ATP와 결합하여 550 내지 600 nm 파장에서 형광 강도가 증가할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 ATP와 결합하여 560 내지 590 nm 파장에서 형광 강도가 증가할 수 있다.
- [0076] 상기 조성물은 세포 내에서 1 내지 10 mM 농도의 ATP를 검출할 수 있다. 상기 조성물은 다양한 농도의 범위의 ATP를 용이하게 검출할 수 있다.
- [0077] 상기 조성물은 ATP와 결합되기 전의 형광강도를 기준으로 하여 ATP와 결합된 후의 형광강도가 50배 이상 증가될 수 있고, 예를 들어 55배 이상, 60배 이상, 또는 65배 이상 증가될 수 있다.
- [0078] 상기 조성물은 pH 4.0 내지 7.4 생리적 범위에서 ATP를 검출할 수 있다. 상기 프로브 조성물은 세포와의 결합시 낮은 독성, 예를 들어 90% 이상의 세포 생존율을 나타내기에 생물학적 적용 가능성이 높다.
- [0079] 또다른 일 구현예에 따른 화합물의 제조방법은, A) 하기 화학식 7로 표시되는 화합물을 산염화물과 반응시켜 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;
- [0080] B) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물을 이소티오시아네이트와 반응시켜 하기 화학식 9로 표시되는 화합물을 제

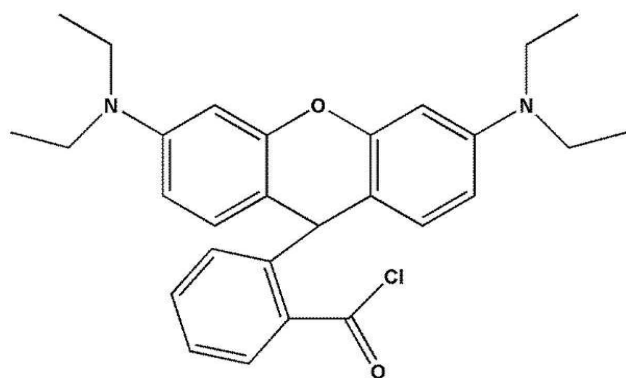
조하는 단계; 및 C) 상기 화학식 9로 표시되는 화합물을 1차 아민($R-NH_2$)과 반응시켜 하기 화학식 10으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0081] <화학식 7>



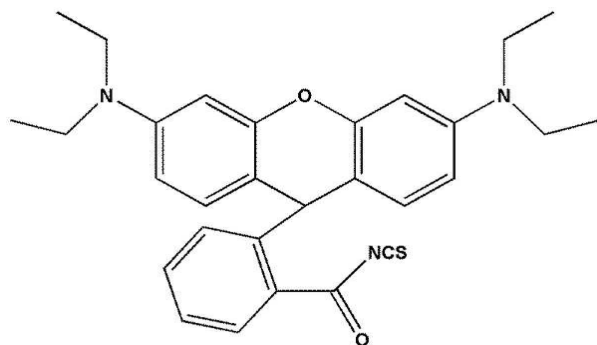
[0082]

[0083] <화학식 8>



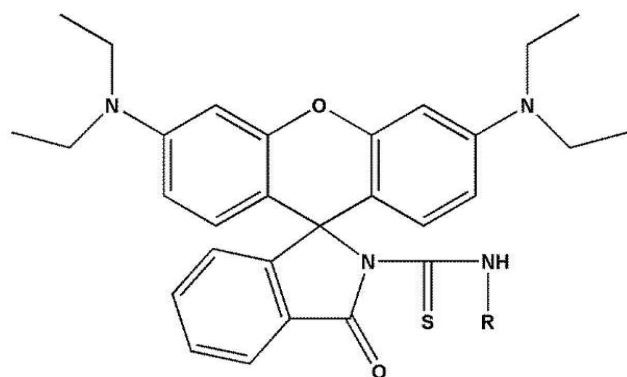
[0084]

[0085] <화학식 9>



[0086]

[0087] <화학식 10>



[0088]

- [0089] 상기 화학식 10에서,
- [0090] R은 페닐기, 할로젠으로 치환된 페닐기, 또는 트리플루오로메틸로 치환된 페닐기, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0091] 상기 A) 내지 C) 단계를 원-팟(one-pot) 공정에 따라 제조할 수 있다. 상기 화합물의 제조방법은 하나의 반응기에서 연속적으로 수행되어 안정하며 용이하게 제조할 수 있다. 상기 화합물의 제조방법의 일 구현예로서 후술하는 <반응 스킴 1>을 들 수 있다.
- [0092] 또다른 일 구현예에 따른 미토콘드리아 내 ATP를 모니터링하는 방법은 (a) 제5항에 따른 조성물을 세포에 주입하는 단계; (b) 상기 주입된 조성물이 세포의 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 색변환(colorimetric) 및 형광을 나타내는 단계; 및 (c) 상기 색변환 및 형광을 육안 또는 형광 현미경으로 관측하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0093] 본 명세서에서, 치환기는 치환되지 않는 모그룹(mother group)에서 하나 이상의 수소가 다른 원자나 작용기를 교환됨에 의하여 유도된다. 다르게 기재하지 않으면, 어떠한 작용기가 "치환된"것으로 여겨질 때, 그것은 상기 작용기가 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 2 내지 40의 알케닐기, 탄소수 2 내지 40의 알키닐기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알킬기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알케닐기, 탄소수 7 내지 40의 아릴기에서 선택된 하나 이상의 치환기로 치환됨을 의미한다. 작용기가 "선택적으로 치환된다"고 기재되는 경우에, 상기 작용기가 상술한 치환기로 치환될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0094] 본 명세서에서, "탄소수 6 내지 40의 방향족 고리"는 분자 내에 하나 이상의 고리형 콘주게이션을 갖는 방향족인 고리 화합물이다. 예를 들어, "탄소수 6 내지 40의 방향족 고리"는 벤젠, 나프탈렌, 페나렌(phenalene), 페난트렌, 또는 안트라센 등을 들 수 있다. 일 구현예에서 "탄소수 6 내지 40의 방향족 고리"는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0095] 본 명세서에서, "탄소수 a 내지 b"의 a 및 b는 특정 작용기(group)의 탄소수를 의미한다. 즉, 상기 작용기는 a부터 b까지의 탄소원자를 포함할 수 있다. 예를 들어, "탄소수 1 내지 4의 알킬기"는 1 내지 4의 탄소를 가지는 알킬기, 즉, CH_3- , CH_3CH_2- , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ and $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ 를 의미한다.
- [0096] 본 명세서에서, "알킬기"라는 용어는 분지된 또는 분지되지 않은 지방족 탄화수소기를 의미한다. 일 구현예에서 알킬기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 알킬기는 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 헥실기, 시클로프로필기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 포함하나 반드시 이들로 한정되지 않으며, 이들 각각은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 일 구현예에서 알킬기는 1 내지 6의 탄소원자를 가질 수 있다. 예를 들어, 탄소수 1 내지 6의 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 펜틸, 3-펜틸, 헥실 등일 수 있으나 반드시 이들로 한정되지 않는다.
- [0097] 본 명세서에서, "아릴기"라는 용어는 고리 골격이 오직 탄소만을 포함하는 방향족 고리, 고리 시스템(즉, 2개의 인접하는 탄소 원자들을 공유하는 2 이상의 융합된(fused) 고리), 또는 복수의 방향족 고리가 단일결합, -O-, -S-, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{Si}(\text{R}_a)(\text{R}_b)-(\text{R}_a$ 및 R_b 는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로젠으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 에 의하여 서로 연결된 고리를 의미한다. 상기 아릴기가 고리 시스템이면, 상기 시스템에서 각각의 고리는 방향족이다. 예를 들어, 아릴기는 페닐기, 비페닐기, 나프틸기, 페날트레닐기(phenanthrenyl), 나프타세닐기(naphthaceny1) 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0098] 본 명세서에서, "할로젠기"는 -F, -Cl, -Br, 또는 -I이다.
- [0099] 본 명세서에서, "히드록시기"는 -OH이다.
- [0100] 본 명세서에서, "니트로기"는 $-\text{NO}_2$ 이다.
- [0101] 본 명세서에서, "시아노기"는 -CN이다.
- [0102] 본 명세서에서, "아미드기"는 $-\text{CON}(\text{R}_b)(\text{R}_c)$ 이며, R_b , R_c 는 상술한 치환기에서 기재된 바와 같은 치환기일 수 있다.
- [0103] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일 실시예일뿐 본 발명이 하기

실시예에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

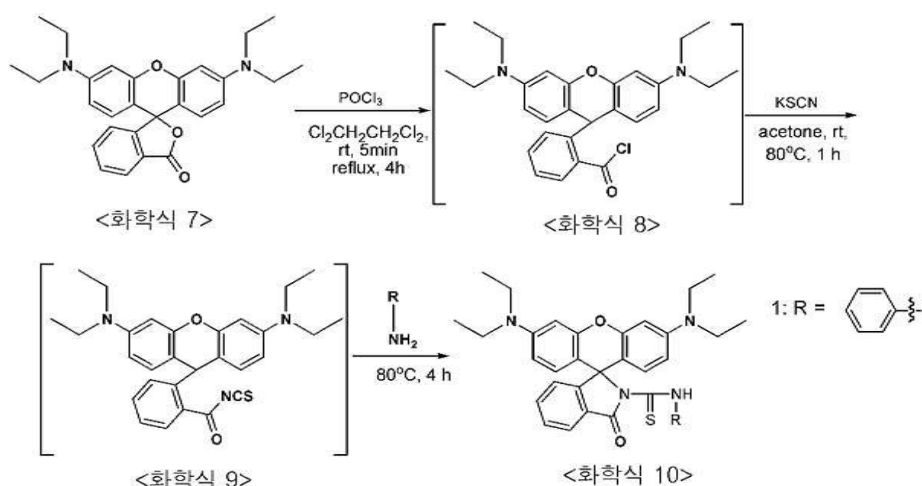
하기 합성에 및 분석예에 사용된 모든 재료들은 Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, Welgen 사 등으로 부터 구입하였다. 합성에 사용된 모든 유기 용매는 상업적으로 구입 가능한 분석용 등급이며 추가 정제를 하지 않고 사용하였다. 모든 반응들은 0.25 mm 실리카 겔 플레이트 (60F-254, Merck)로 UV 램프(254 nm) 하에 조사 한 박막 크로마토그래피(TLC)로 모니터링하였다. Millipore 실리카 겔(230-400 mesh, Merck)을 칼럼 크로마토그 래피 정제에 사용하였다. ^1H NMR 스펙트럼 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 내부 표준으로 테트라메틸실란을 사용하여 Bruker사 300 MHz 분광기로 기록하였다. 질량 스펙트럼은 JEOL사 JMS-HX 110A/110A Tandem 질량 분광기로 측정 하였다. 흡수 스펙트럼은 제조사에서 제공한 소프트웨어인 PC 시스템(Window 8) 조절 하에 10 x 10 mm 석영 큐 벳(quartz cuvettes, type number100-QS, HELIMA) 내에서 Thermo Fisher Scientific사 Evolution 201 UV/Visible 분광 광도계(spectrophotometry)로 기록하였다. 형광 스펙트럼은 10 x 10 mm 일회용 큐벳(type number101.650-QG, HELIMA) 내에서 제조사에서 제공한 PC(Windows XP)에 의해 조절된 Shimadzu 사 RF-5301/PC 스펙트럼 형광 광도계로 측정하였다.

합성예 1: 프로브 조성물(1)용 화합물

프로브 조성물(1)용 화합물은 원-팟(one-pot) 공정에 따라 다음과 같이 합성하였다. 다음 합성과 관련하여 하기 반응 스킴 1에 도시하였다.

염화포스포릴(POCl_3) 1.1g (6.9 mmol)를 1, 2-디클로로에탄 8.0 ml에 용해한 하기 화학식 7로 표시되는 화합물 용액 1.0 g(2.26 mmol)에 5분간에 걸쳐 적하한 후 4 시간 동안 환류하였다. 이후 반응 혼합물을 냉각하고 진공 하에 농축하여 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 얻었다. 상기 화학식 8로 표시되는 화합물을 무수 아세톤 15 mL에 용해한 용액에 티오시아나칼륨(KSCN, 2.71 mmol, 1.2 eq) 0.26g의 용액에 적가한 후 80 °C에서 1시간 동안 열처리하고 실온으로 냉각하여 하기 화학식 9로 표시되는 화합물을 얻었다. 상기 화학식 9로 표시되는 화합 물에 1차 아민($\text{R}-\text{NH}_2$, R은 페닐기)(1.2 eq)을 첨가하고 80 °C에서 4시간 동안 열처리한 후 실온으로 냉각하고 용매를 증발하여 잔류물을 얻었다. 상기 잔류물을 디클로로메탄-메탄올(95:5) 및 헥산-에틸 아세테이트(7:3)을 이용하여 실리카 플래시 칼럼(silica flash column)으로 정제하여 매우 옅은 노란색-오렌지색의 고체의 프로브 조성물(1)용 화합물을 합성하였다.

<반응 스킴 1>



상기 합성한 프로브 조성물(1)용 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼, ^{13}C NMR 스펙트럼, 및 FAB 질량 스펙트럼에 대해서는 도 1a, 도 1b, 도 1c와 함께 하기에 나타내었다.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 13.01 (s, 1H), 8.03 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.64 (m, 4H), 7.32 (t, 3H, $J = 8.7$ Hz), 7.17 (m, 2H), 6.48 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 6.42 (m, 4H), 3.37 (m, 8H), 1.20 (t, 12H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 176.85, δ 171.00, δ 154.87, δ 153.08, δ 148.46, δ 138.46, δ 135.24, δ

128.54, δ 128.43, δ 127.11, δ 126.95, δ 125.77, δ 124.77, δ 124.47, δ 123.99, δ 107.51, δ 97.96, δ 69.80, δ 44.50, δ 12.64. HRMS (FAB) calcd. for $[C_{35}H_{36}N_4O_2S]^-$ 576.2559, found 576.2561.

[0113] **합성예 2: 프로브 조성물(2)용 화합물**

[0114] 상기 화학식 9로 표시되는 화합물에 1차 아민(R- NH₂, R은 페닐기)(1.2 eq)에서 R이 페닐기 대신 4-플루오로페닐기를 적절하게 첨가하여 프로브 조성물(2)용 화합물을 합성한 것을 제외하고는, 합성예 1과 동일한 방법으로 합성하였다.

[0115] 상기 합성한 프로브 조성물(2)용 화합물의 ¹H NMR 스펙트럼, ¹³C NMR 스펙트럼, 및 FAB 질량 스펙트럼에 대해서는 도 2a, 도 2b, 도 2c와 함께 하기에 나타내었다.

[0116] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.93 (s, 1H), 8.03 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 7.60 (m, 4H), 7.12 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.01 (t, 2H, J = 8.4 Hz), 6.47 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 6.40 (m, 4H), 3.37 (m, 8H), 1.20 (t, 12H, J = 6.9 Hz). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 177.43, δ 171.08, δ 161.95, δ 158.70, δ 154.90, δ 153.15, δ 148.61, δ 135.32, δ 134.41, δ 128.58, δ 127.05, δ 126.96, δ 126.63, δ 126.52, δ 124.81, δ 123.99, δ 115.31, δ 115.01, δ 107.42, δ 97.80, δ 69.92, δ 60.43, δ 44.40, δ 12.67. HRMS (FAB) calcd. for $[C_{35}H_{35}FN_4O_2S]^-$ 594.2465, found 594.2462.

[0117] **합성예 3: 프로브 조성물(3)용 화합물**

[0118] 상기 화학식 9로 표시되는 화합물에 1차 아민(R- NH₂, R은 페닐기)(1.2 eq)에서 R이 페닐기 대신 4-트리플루오로메틸페닐기를 첨가하여 프로브 조성물(3)용 화합물을 합성한 것을 제외하고는, 합성예 1과 동일한 방법으로 합성하였다.

[0119] 상기 합성한 프로브 조성물(3)용 화합물의 ¹H NMR 스펙트럼, ¹³C NMR 스펙트럼, 및 FAB 질량 스펙트럼에 대해서는 도 3a, 도 3b, 도 3c와 함께 하기에 나타내었다.

[0120] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 13.28 (s, 1H), 8.03 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 7.85 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.62 (m, 4H), 7.12 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.47 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 6.28 (m, 4H), 3.38 (m, 8H), 1.20 (t, 12H, J = 6.9 Hz). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 176.56, δ 171.11, δ 154.80, δ 153.13, δ 148.51, δ 141.58, δ 135.48, δ 128.67, δ 126.95, δ 125.52, δ 124.82, δ 124.07, δ 123.77, δ 107.59, δ 97.94, δ 70.04, δ 44.53, δ 12.61. HRMS (FAB) calcd. for $[C_{36}H_{35}F_3N_4O_2S]^-$ 644.2433, found 644.2436.

[0121] **분석예 1: 색변환 분석**

[0122] 합성예 1의 화합물을 40% DMSO(dimethyl sulfoxide) 함유 PBS 버퍼액에 용해한 프로브 조성물(1) 10 μ M을 바이알에 넣고 ATP 저장액 10 mM를 첨가하여 색변환 분석 실험을 하였다. ATP 저장액은 2차 증류수(twice-distilled water)에 ATP를 상기 농도로 첨가하여 준비하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0123] 도 4를 참조하면, 상기 프로브 조성물(1)은 ATP와 반응하였을 때 무색에서 연분홍색으로 색변환이 되며, 365 nm의 UV 램프 조사시 무색에서 진한 분홍색으로 형광변환이 되어 가는 것을 육안으로 관찰할 수 있다. 이는 합성예 1의 프로브 조성물(1)용 화합물이 ATP와 결합하여 스피로락탐 고리가 열리고 ATP와의 착체를 형성함에 기인하는 것으로 여겨진다.

[0124] **분석예 2: UV-vis 흡수 스펙트럼 분석**

[0125] 합성예 1 및 합성예 2의 화합물을 40% DMSO(dimethyl sulfoxide) 함유 PBS 버퍼액(Sigma-Aldrich사 제조)에 각각 용해한 프로브 조성물(1) 및 프로브 조성물(2) 10 μ M을 시험관에 넣고 ATP 저장액을 0 mM ~ 10.0 mM 농도로 첨가하여 UV-vis 흡수 스펙트럼 분석 실험을 하였다. ATP 저장액은 2차 증류수(twice-distilled water)에 ATP를 상기 농도로 첨가하여 준비하였다. 그 결과를 각각 5a 및 도 5b에 나타내었다.

[0126] 도 5a를 참조하면, 프로브 조성물(1)은 ATP 저장액이 첨가된 이후 570 nm 파장에서 새로운 흡수 피크를 나타내

고 있으며, ATP 저장액 3.0 mM 농도에서 포화상태를 나타내고 있다.

[0127] 도 5b를 참조하면, 프로브 조성물(2)은 ATP 저장액이 첨가된 이후 상기 프로브 조성물(1)과 동일한 파장에서 흡수 피크를 나타내고 있으며, ATP 저장액 10.0 mM 농도까지 계속 흡수 강도가 증가하여 포화됨을 나타내고 있다.

[0128] 이로부터, 프로브 조성물(2)이 프로브 조성물(1)과 비교하여 다양한 농도의 ATP를 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0129] **분석예 3: 형광 스펙트럼 분석**

[0130] (1) 프로브 조성물의 형광 응답 분석

[0131] 합성에 1 및 합성에 2의 화합물을 40% DMSO(dimethyl sulfoxide) 함유 PBS 버퍼액(Sigma-Aldrich사 제조)에 각각 용해한 프로브 조성물(1) 및 프로브 조성물(2) 10 μ M을 시험관에 넣고 ATP 저장액을 0 mM ~ 10.0 mM 농도로 첨가하여 형광 스펙트럼 분석 실험을 하였다. ATP 저장액은 2차 증류수(twice-distilled water)에 ATP를 상기 농도로 첨가하여 준비하였다. 그 결과를 각각 6a 및 도 6b에 나타내었다.

[0132] 도 6a를 참조하면, 프로브 조성물(1)은 ATP 저장액이 첨가된 이후 550 내지 600 nm 파장에서 형광 강도가 증가하고 있으며, ATP 저장액 5.0 mM 농도에서 포화상태를 나타내고 있다. 프로브 조성물(1)은 ATP 저장액이 첨가되기 전의 형광 강도를 기준으로 하여 약 65배의 형광 강도를 나타내고 있다.

[0133] 도 6b를 참조하면, 프로브 조성물(2)은 ATP 저장액이 첨가된 이후 상기 프로브 조성물(1)과 동일하게 550 내지 600 nm 파장에서 형광 강도가 증가하고 있으며, ATP 저장액 10.0 mM 농도까지 계속 형광 강도가 증가하여 포화됨을 나타내고 있다.

[0134] 이로부터, 프로브 조성물(2)이 프로브 조성물(1)과 비교하여 다양한 농도의 ATP를 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0135] (2) 프로브 조성물과 ATP 사이의 결합 상수(K)

[0136] 상기 (1)의 형광 스펙트럼 분석 실험 결과로부터 프로브 조성물(1), 프로브 조성물(2), 및 프로브 조성물(3) 각각의 프로브 조성물과 ATP 사이의 결합 상수(K)를 Benesie-Hildebrand 플롯을 이용하여 구하였다. 그 결과를 도 7a, 도 7b와 함께 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0137]

구분	λ_{abs}^a (nm)	ϵ^b ($10^4 M^{-1} cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	결합 상수 (K, M^{-1})
프로브 조성물(1)	570	5.41	591	5947
프로브 조성물(2)	570	6.15	591	1730
프로브 조성물(3)	569	1.58	585	759

[0138] a: 프로브 조성물 10 μ M와 ATP 저장액 10.0 mM의 조합

[0139] b: 최대 흡수에서 분사 흡광 계수

[0140] 상기 [표 1], 도 7a, 및 도 7b를 참조하면, 프로브 조성물(1)과 ATP 사이의 결합 상수가 가장 크고, 프로브 조성물(2)과 ATP 사이의 결합 상수, 및 프로브 조성물(3)과 ATP 사이의 결합 상수의 순서로 점차 작아짐을 확인할 수 있다.

[0141] (3) 프로브 조성물의 피분석물에 대한 형광 응답 분석

[0142] DMSO에 합성에 1의 화합물을 용해한 프로브 조성물(1) 1 mM를 준비하였다. 증류수에 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , 및 K^+ 이온의 과염소산염의 금속 이온 저장액 10 mM의 피분석물 저장액을 준비하였다(피분석물 22번~27번). 2차 증류수에 HPO_4^{2-} , $P_2O_7^{4-}$, HSO_3^- , Cl^- , $H_2PO_4^-$, PO_4^{3-} , CH_3COO^- , NO_3^- , 및 HSO_4^- 의 나트륨염의 음이온 저장액 10 mM의 피분석물 저장액을 준비하였다(피분석물 13번~21번). 2차 증류수(twice-distilled water)에 ATP, ADP, AMP, CTP, CDP, CMP, GTP, GDP, GMP, UTP, UDP, 및 UMP 10 mM의 피분석물 저장액을 준비하였다(피분석물 1번~12번).

[0143] 상기 프로브 조성물(1) 30 μ L를 시험관에 넣고 상기 피분석물 1번~27번의 저장액 각각을 첨가하여 피분석물 프

로브 조성물(1)을 준비하였다. 상기 피분석물 프로브 조성물(1)을 PBS 버퍼(pH 7.4) 및 40% DMSO 3 mL로 희석한 후 형광 스펙트럼($\lambda_{ex} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 591 \text{ nm}$, slit: 3 nm x 3 nm)을 이용하여 형광 응답 분석 실험을 하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0144] 도 8에서 세로축 F/F₀는 591 nm 파장에서 형광 강도의 비를 나타내고 F₀는 피분석물 저장액이 포함되지 않은 초기 형광 강도를 나타내며, F는 각각의 피분석물 저장액이 포함된 형광 강도를 나타낸 것이다. 가로축은 피분석물 프로브 조성물(1)에 포함된 피분석물 번호를 1번~27번까지 나타낸 것이다.

[0145] 도 8을 참조하면, 합성에 1의 화합물을 용해한 프로브 조성물(1)은 ATP(1번), ADP(2번), 및 CTP(4번)에 대해서만 형광 응답을 보이며, 그 중에서도 ATP(1번)에 대하여 매우 뚜렷하게 형광 응답을 나타내고 있음을 확인할 수 있다.

[0146] (4) pH 의존성 실험 분석

[0147] 상기 (1)의 형광 스펙트럼 분석 실험 결과로부터 프로브 조성물(1)에 대하여 591 nm 방출 파장에서 형광 강도를 pH 1~9의 범위에서 분석 실험을 하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0148] 도 9에서 검은선은 ATP 저장액이 첨가되기 전의 프로브 조성물(1) 10 μM 인 경우를 나타내며, 빨간선은 프로브 조성물(1) 10 μM 에 ATP 저장액을 10.0 mM 농도로 첨가한 경우를 나타내는 것이다.

[0149] 도 9를 참조하면, 프로브 조성물(1)은 pH 4.0 내지 7.4 생리적 범위에서 응답 능력이 있음을 나타내고 있다.

[0150] 분석예 4: 세포에서의 Co-localization 실험

[0151] 합성에 2의 화합물인 프로브 조성물(2)에 대하여 HeLa 셀 내 미토콘드리아에서의 co-localization 분석 실험을 하였다. 그 결과를 도 10a에 나타내었다.

[0152] HeLa 셀에서의 co-localization 분석 실험을 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0153] HeLa 셀은 돌베코 수정 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium) (Welgene사에서 제조)에서 배양하고 37 °C에서 10% 소태아혈청(fetal bovine serum) 및 5% CO₂로 보충하였다. HeLa 셀을 피브로넥틴 10 $\mu\text{g/ml}$ 이 코팅된 유리 바닥의 디쉬에 배양하고 24시간 동안 두어 부착되도록 하였다. 먼저, HeLa 셀을 프로브 조성물(2) 3 μM 농도로 15분간 레드 채널에서 레드 형광을 나타내도록 예비 스테인(pre-stained)하였다. 그리고 나서, 상기 HeLa 셀을 PBS 버퍼액으로 두 번 세척한 후 무혈청 배양액(serum-free media)을 첨가하였다. 이후 Mito Tracker Green (Thermo Fisher Scientific사에서 제조)을 1 μM 농도로 15분간 그린 채널에서 그린 형광을 나타내도록 스테인하였다.

[0154] Co-localization 분석 실험 장치로는 공초점형 현미경(confocal microscope)은 Olympus사의 Fluoview 1200를 이용하였고, 프로브 조성물(2) 용으로 559 nm 여기 파장 및 575-675 nm 방출 파장을 이용하였고, Mito Tracker Green 용으로 473 nm 여기 파장 및 490-590 nm 방출 파장을 이용하였다.

[0155] 도 10a에서 (A) 프로브 조성물(2) 이미지, (B) Mito Tracker 이미지, (C) Merge 이미지, 및 (D) bright field 이미지를 나타낸다.

[0156] 도 10a를 참조하면, HeLa 셀에서 (A)-(D) 이미지는 모두 오버랩되어 동일한 위치에서 동일한 이미지를 나타내고 있음을 확인할 수 있다. 이로부터, 프로브 조성물(2)은 미토콘드리아 내 특정부분(ATP)에 선택적으로 분포함을 확인할 수 있다.

[0157] 분석예 5: 세포에서 미토콘드리아 내 ATP 변화에 대한 실시간 응답 분석

[0158] 합성에 2의 화합물인 프로브 조성물(2)에 대하여 HeLa 셀에서의 미토콘드리아 내 ATP 변화에 대한 실시간 응답 분석 실험을 하였다. 그 결과를 도 10b에 나타내었다.

[0159] HeLa 셀에서의 미토콘드리아 내 ATP 변화에 대한 실시간 응답 분석 실험을 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0160] HeLa 셀은 돌베코 수정 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium) (Welgene사에서 제조)에서 배양하고 37°C에서 10% 소태아혈청(fetal bovine serum) 및 5% CO₂로 보충하였다. HeLa 셀을 피브로넥틴 10 $\mu\text{g/ml}$ 이 코팅된 유리 바닥의 디쉬에 배양하고 24시간 동안 두어 부착되도록 하였다. 먼저, HeLa 셀을 프로브 조성물(2) 3 μM 농도로 레드 채널에서 레드 형광을 나타내도록 스테인하였다. 그리고 나서 아피라제(apyrase) (Sigma-

Aldrich사 제조) 0.5 U/mL로 (a) 0 분, (b) 5분, (c) 10분, (d) 15 분간 처리하였다. 이후 아피라제로 예비처리한 HeLa 셀을 ATP 저장액 10 mM으로 15 분간 배양하였다.

[0161] HeLa 셀에서의 미토콘드리아 내 ATP 변화에 대한 실시간 응답 분석 실험 장치로는 공초점형 현미경(confocal microscope)은 Olympus사의 Fluoview 1200를 이용하였고, 프로브 조성물(2) 용으로 559 nm 여기 파장 및 575-675 nm 방출 파장을 이용하였다.

[0162] 도 10b를 참조하면, (a)에서 (d) 이미지로 갈수록, 즉 아피라제 처리시간이 길어질수록 레드 형광이 점차 감소함을 보여주며, ATP 저장액으로 배양한 (e) 이미지는 레드 형광이 회복됨을 보여준다. 이로부터, 프로브 조성물(2)은 세포에서 미토콘드리아 내 ATP 농도 변화를 실시간 모니터링하는데 사용될 수 있음을 확인할 수 있다.

[0163] **분석예 6: 프로브 조성물의 세포독성 분석**

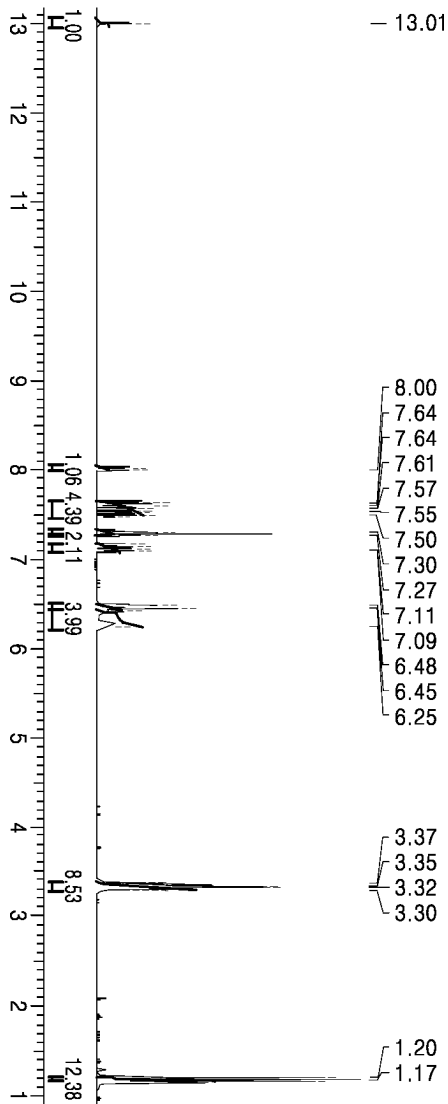
[0164] 합성예 2의 화합물인 프로브 조성물(2)에 대하여 HeLa 셀에서의 MTT 어세이(assay)로 세포독성실험을 하여 분석하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0165] 이때 사용된 MTT는 트리아졸 블루 테트라졸륨 브로마이드 분말(Sigma-Aldrich사 제조)을 PBS 버퍼액에 5mg/mL 농도로 용해한 용액이었다.

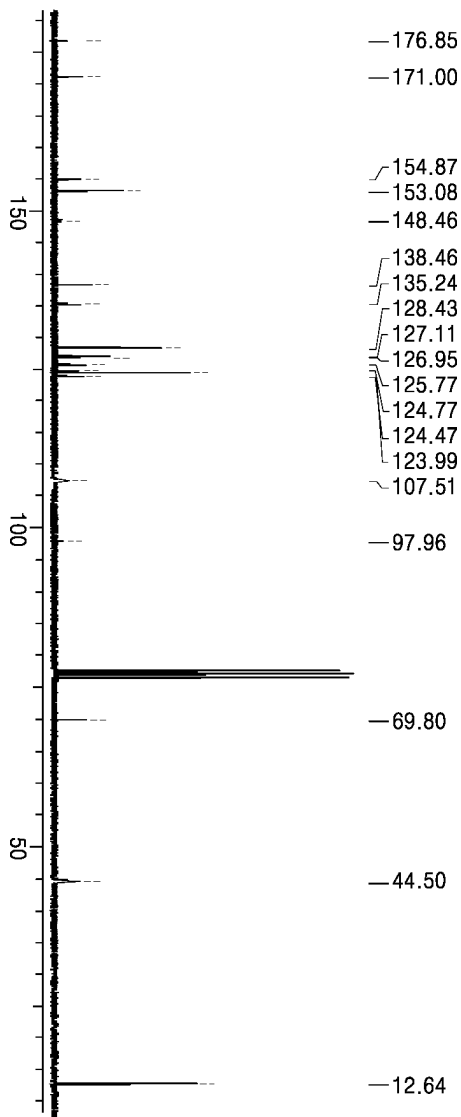
[0166] 도 11을 참조하면, 프로브 조성물(2)을 0 내지 30 μ M 농도에 노출시 약 90% 이상의 셀이 생존할 수 있었다. 이로부터, 프로브 조성물(2)은 배양된 셀에 대해 낮은 독성을 확인할 수 있으며, 생물학적 적용 가능성이 높음을 알 수 있다.

도면

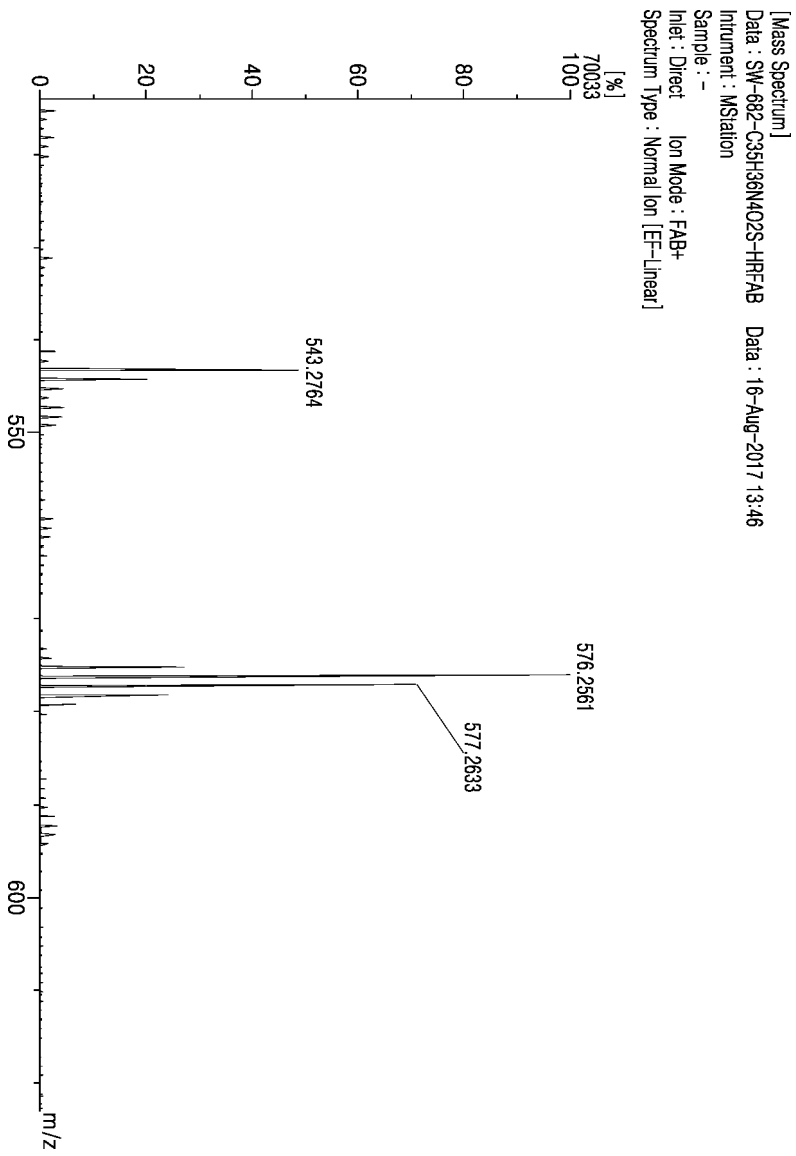
도면1a



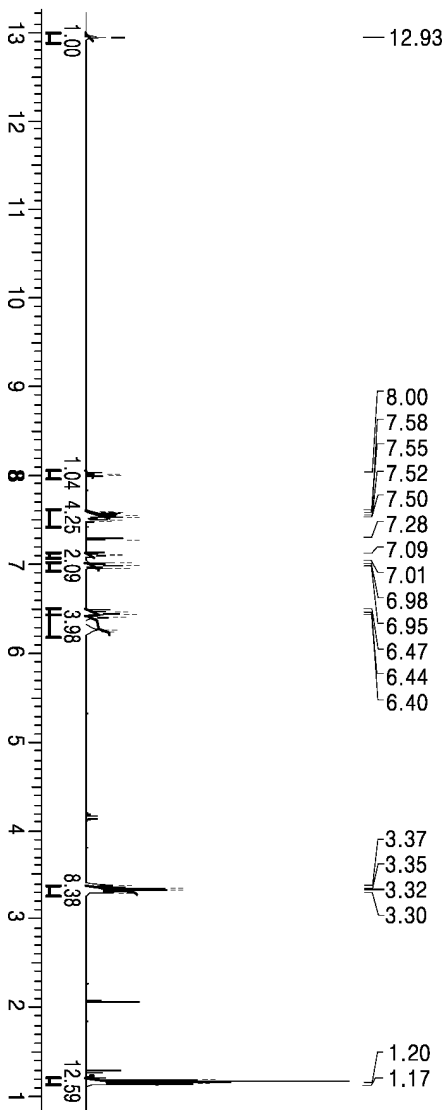
도면1b



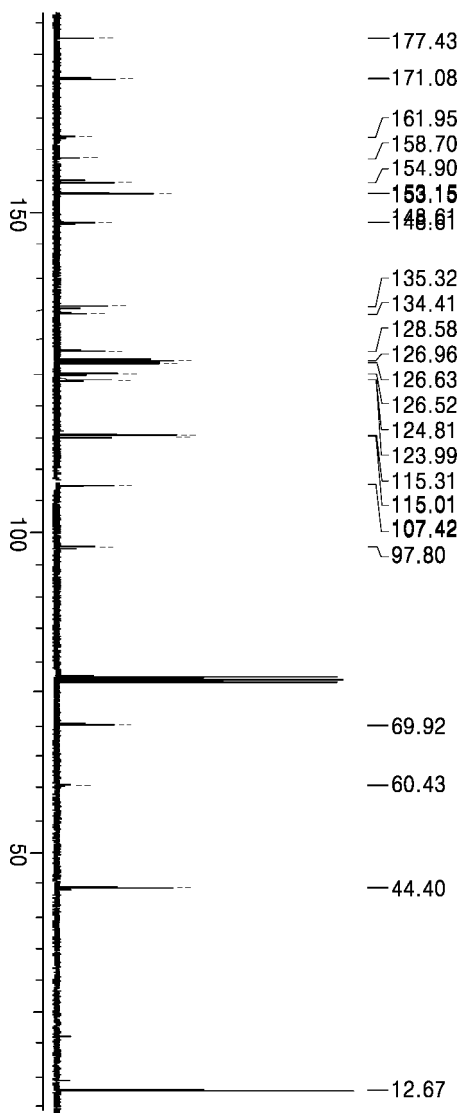
도면1c



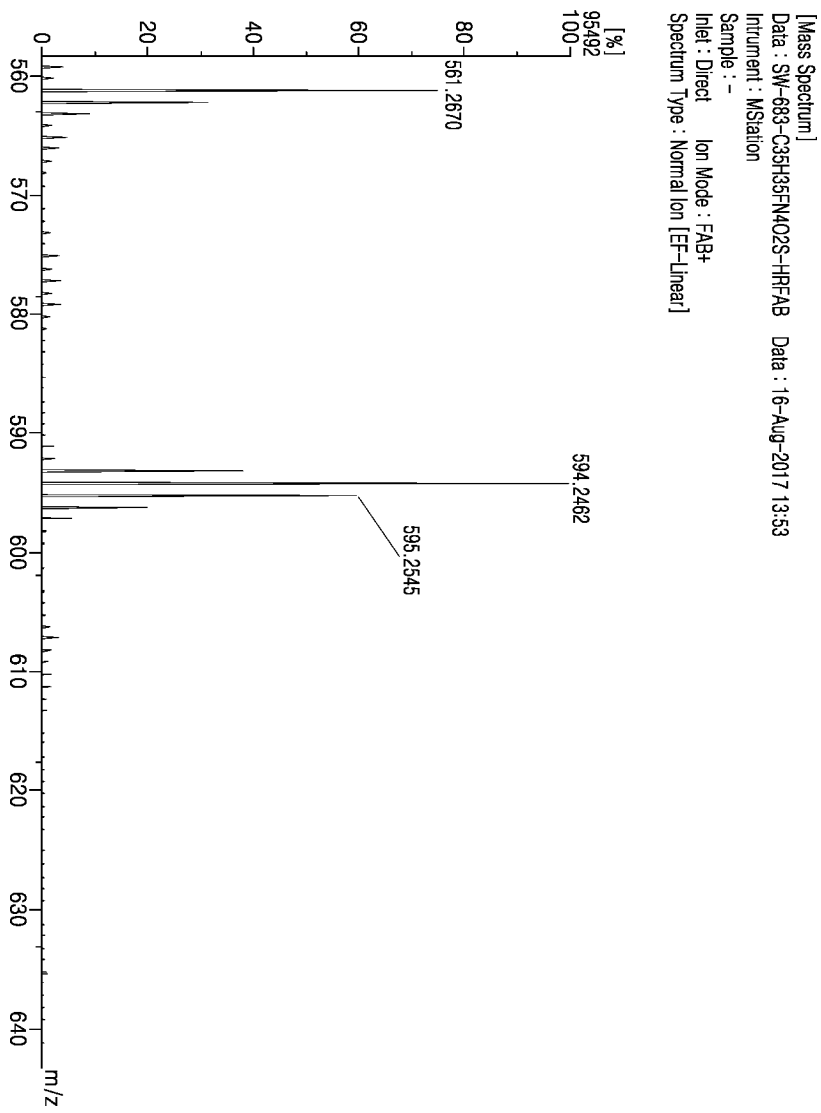
도면2a



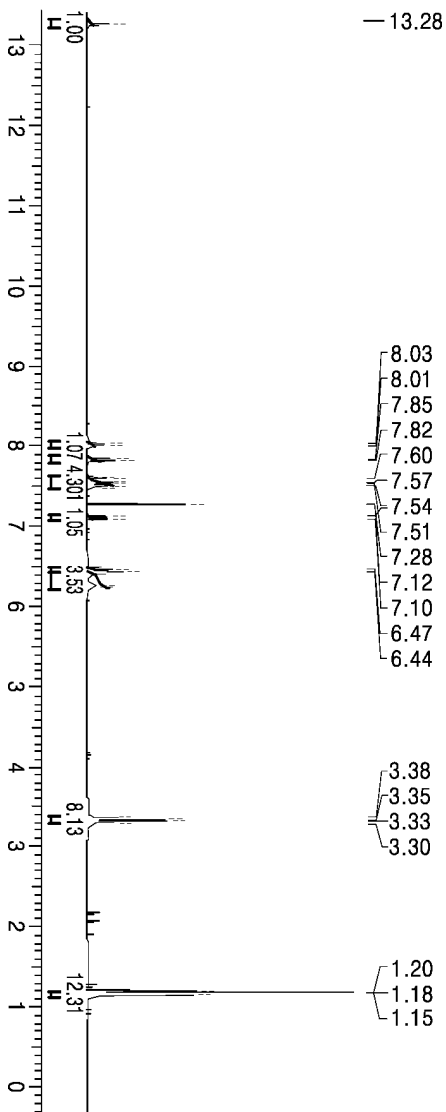
도면2b



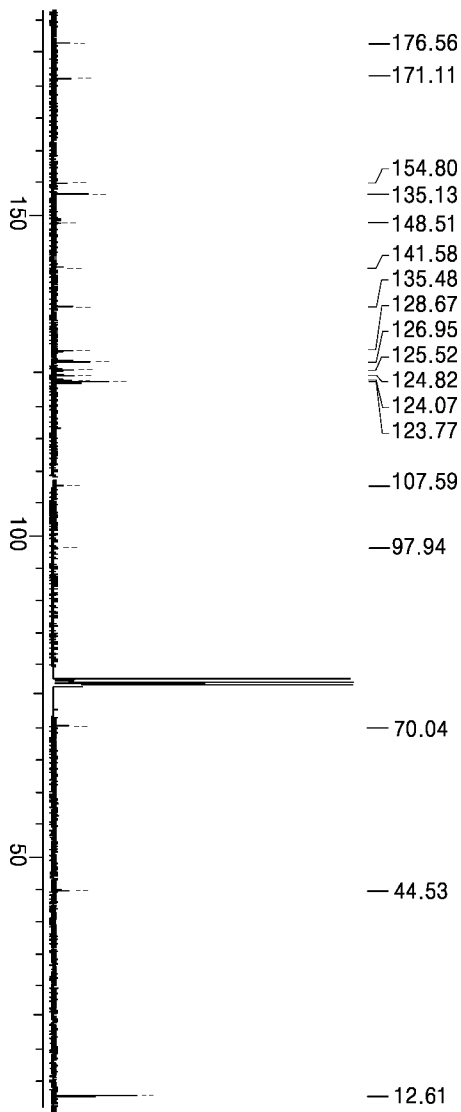
도면2c



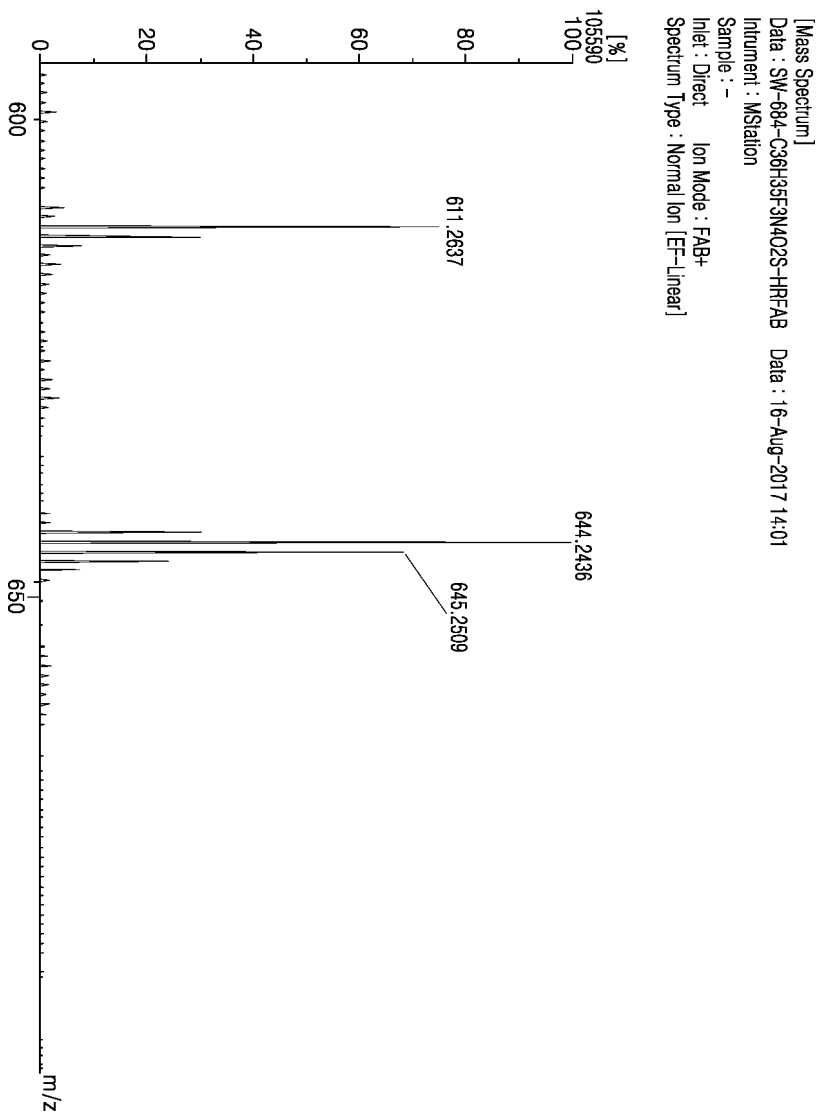
도면3a



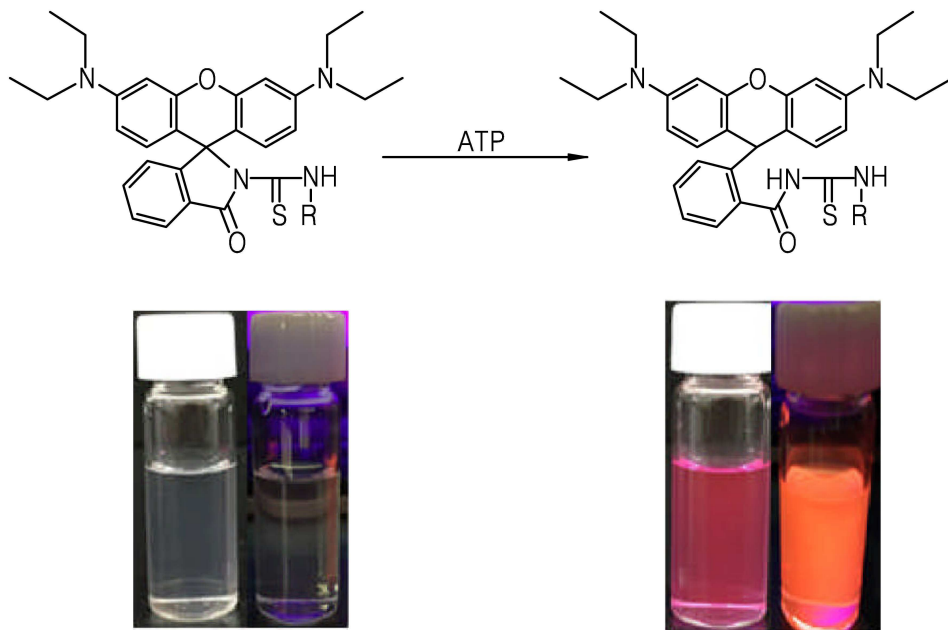
도면3b



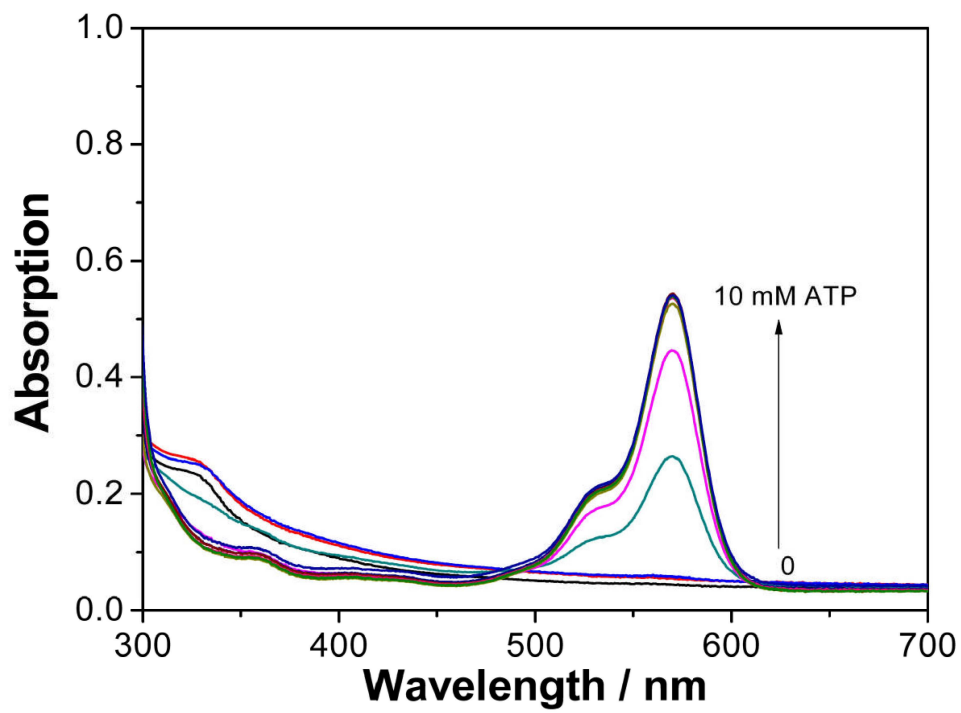
도면3c



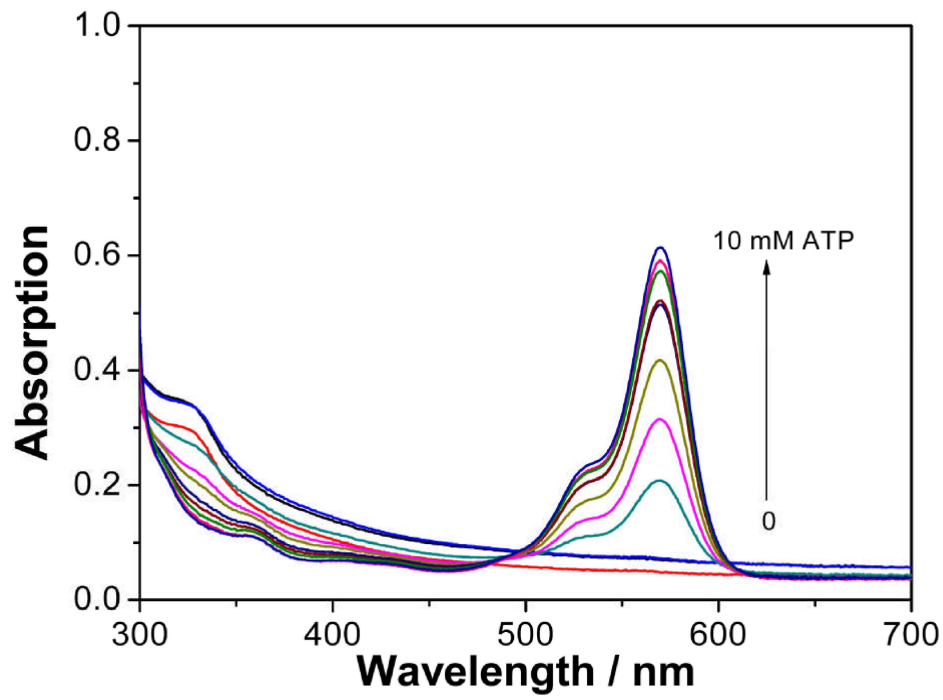
도면4



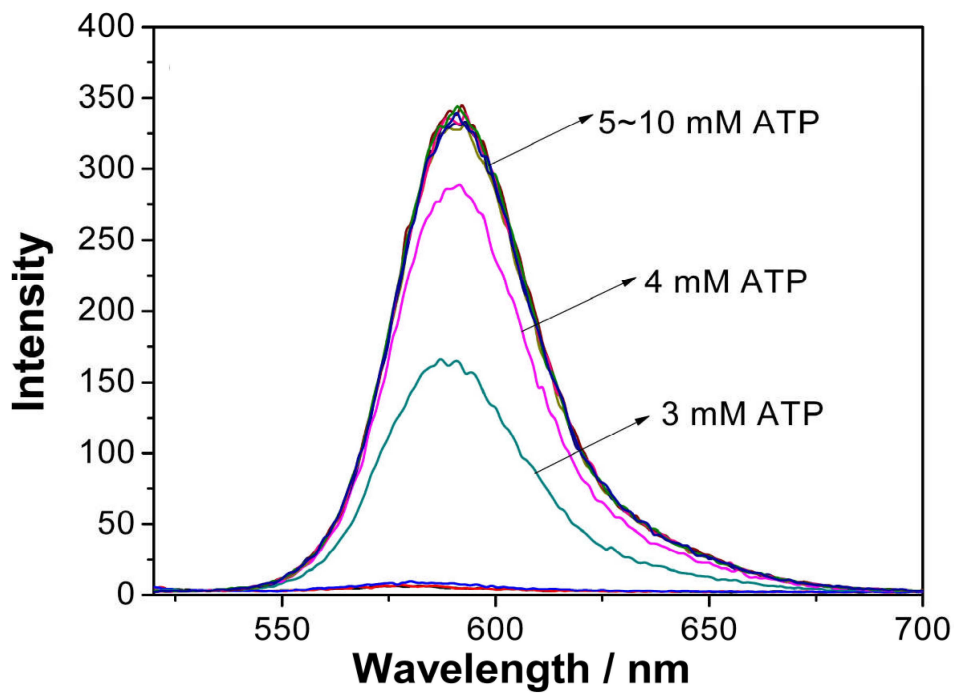
도면5a



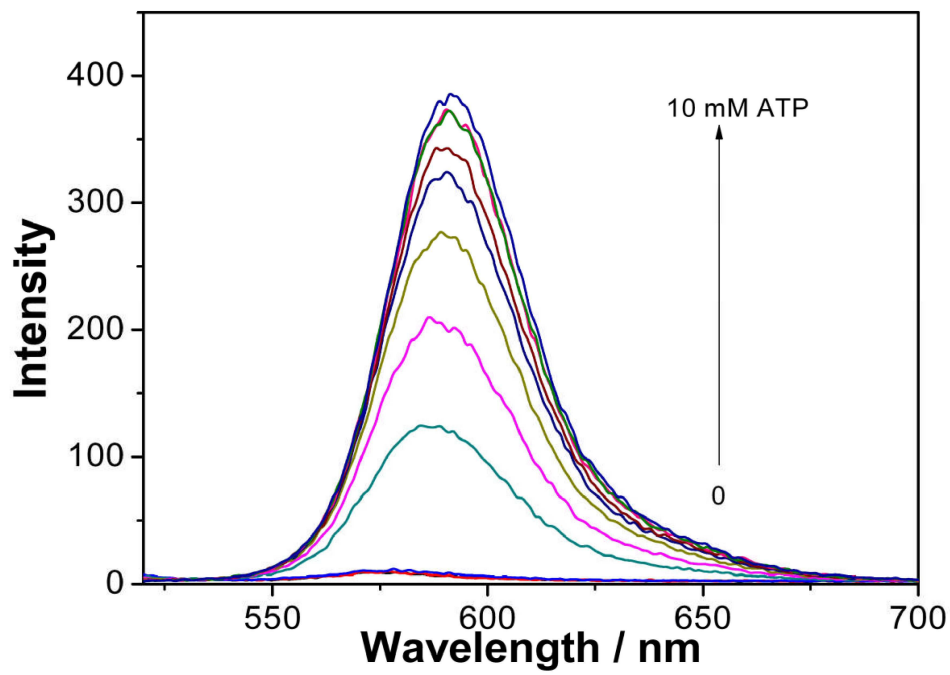
도면5b



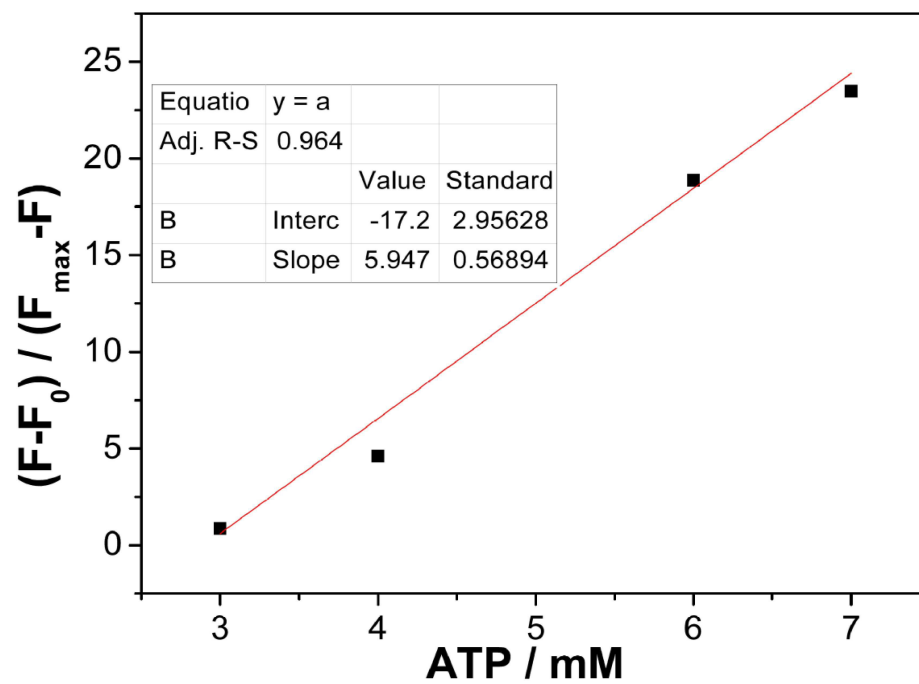
도면6a



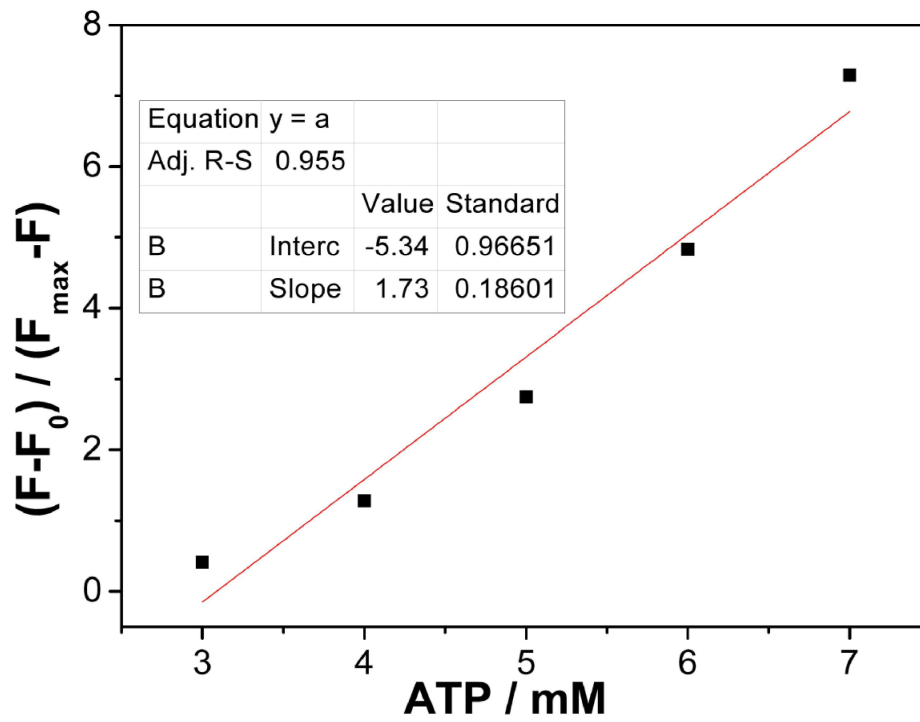
도면6b



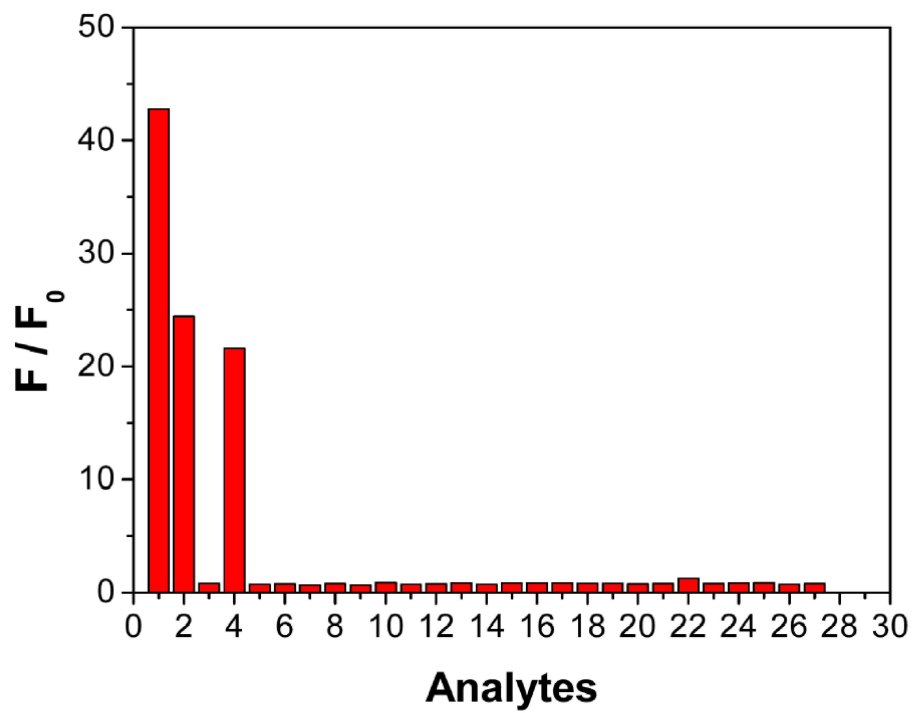
도면7a



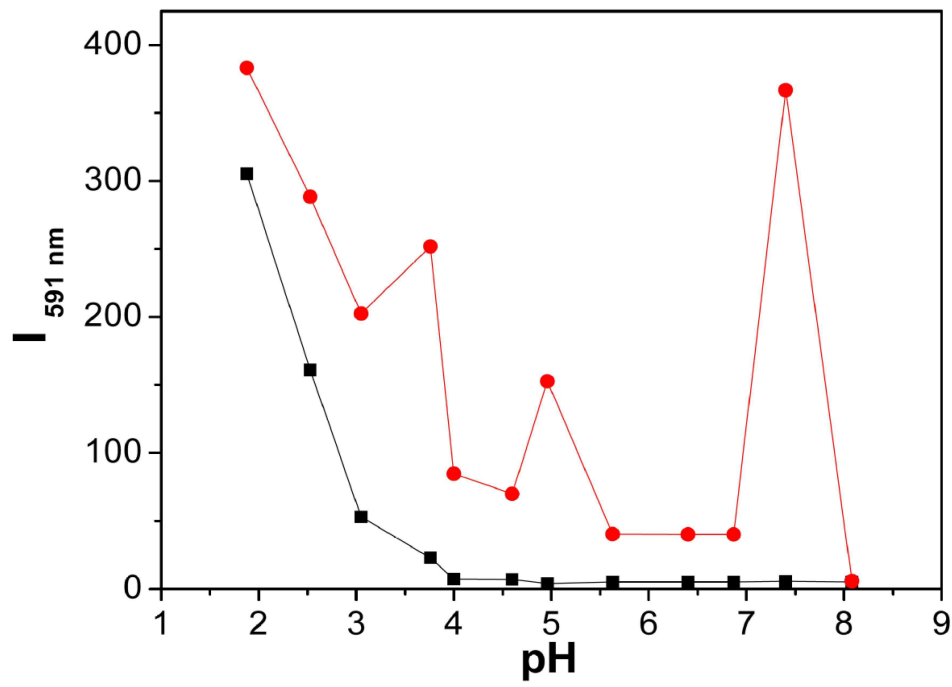
도면7b



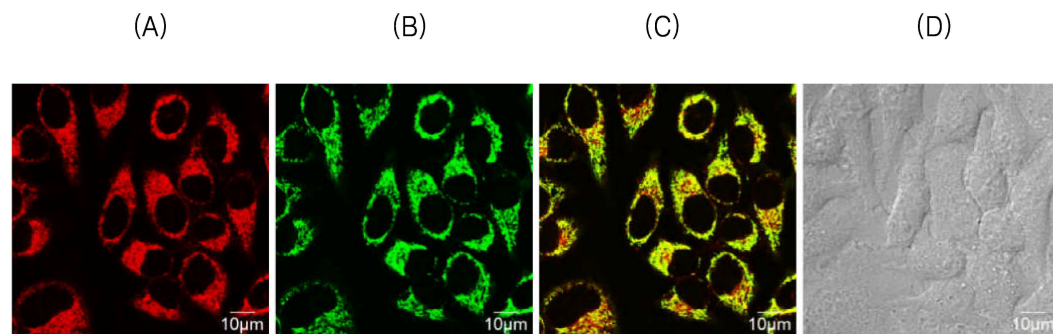
도면8



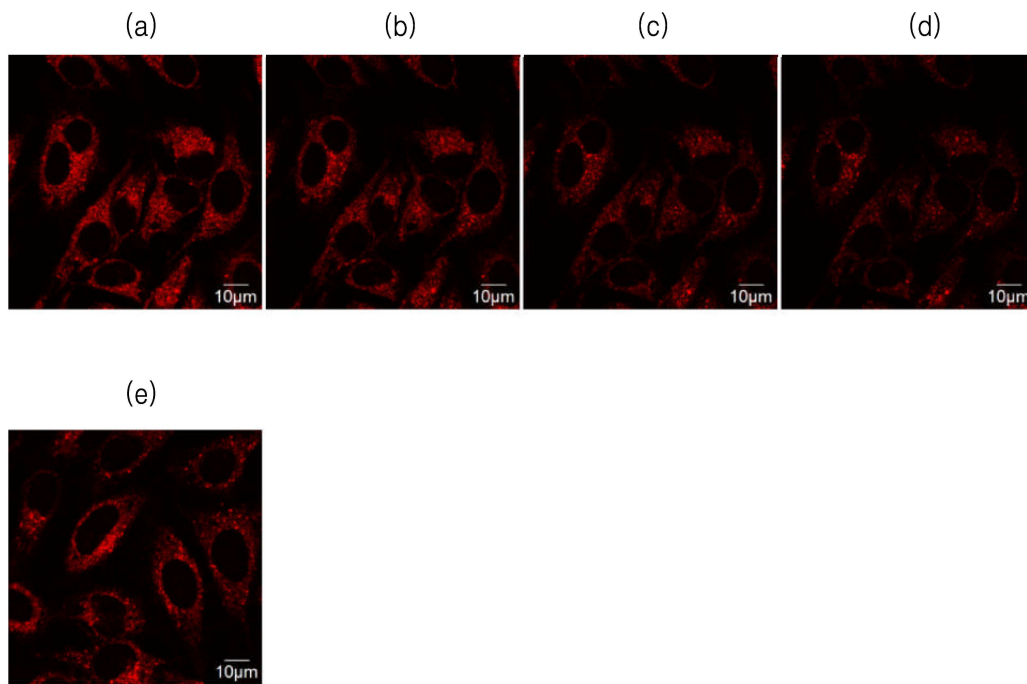
도면9



도면10a



도면10b



도면11

