(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0007240
(43) 공개일자 2019년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 21/6486 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0088420
(22) 출원일자 2017년07월12일
심사청구일자 2017년07월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호
피터 베르비스트
서울특별시 성북구 안암로 87, 202호
이윤학
서울특별시 노원구 노원로 569, 1동 605호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 2 항

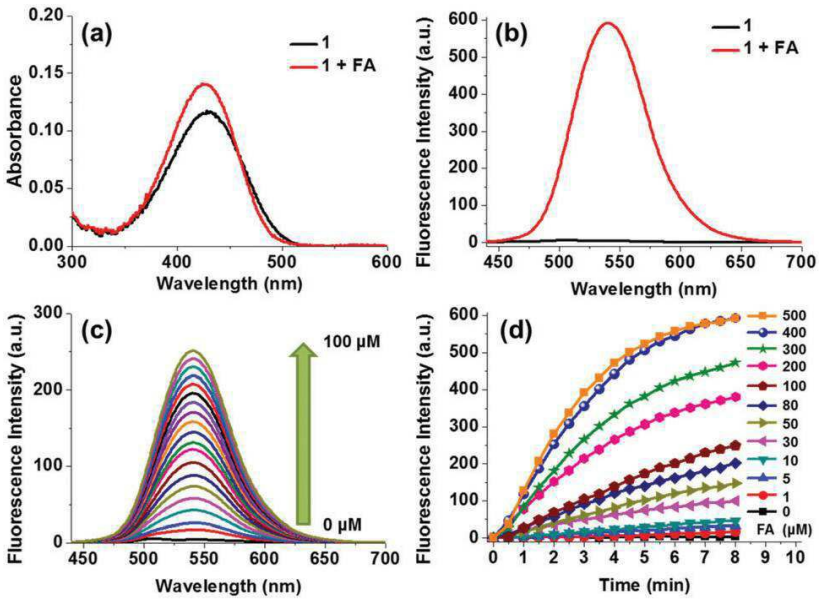
(54) 발명의 명칭 **포름알데하이드 검출용 프로브 화합물 및 이를 포함하는 포름알데하이드 검출 센서**

(57) 요 약

본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 포름알데하이드 검출용 프로브 화합물 및 이를 포함하는 포름알데하이드

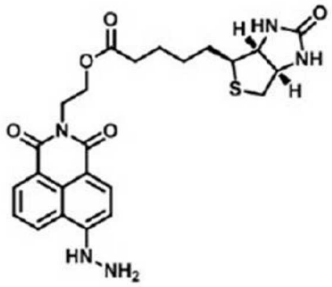
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



검출 센서에 관한 것이다.

[화학식 1]



(52) CPC특허분류
G01N 33/5308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016004821
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

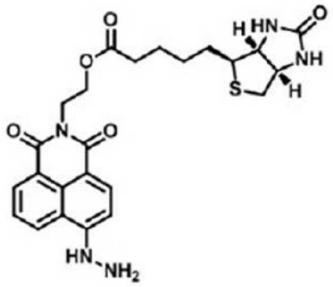
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 포름알데하이드 검출용 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 따른 프로브 화합물을 포함하는 포름알데하이드 검출 센서.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 포름알데하이드 검출용 프로브 화합물 및 이를 포함하는 포름알데하이드 검출 센서에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 포름알데하이드 (FA)는 단백질-단백질, 단백질-DNA 및 DNA-DNA의 분자간 가교 및 분자내 가교를 일으키는 성향으로 인해 과거에 강한 조직 방부제로 널리 사용되었다(J. Toth and M. D. Biggin, Nucleic Acids Res., 2000, 28, e4.). 또한, 휘발성 유기 화합물로서 FA는 접착제, 우레탄 분리 포말, 페인트, 방부제 및 소독약과 같은 건축 자재로부터 발생하는 환경적 요인(J. R. Beall and A. G. Ulsamer, J. Toxicol. Environ. Health, 1984, 14, 1-21.)과 함께, 강한 발암물질(V. J. Cogliano, Y. Grosse, R. A. Baan, K. Straif, M. B. Secretan and F. El Ghissassi, Environ. Health Perspect., 2005, 113, 1205-1208.)로 인식되어 왔다.

[0003] 한편, 형광 센서는 상대적으로 낮은 가격 및 간단한 적용으로 인해, 실내 환경에서 FA의 양을 모니터하기 위한 방법으로 널리 연구되어 왔다. 이러한 FA-기체 센서는 기판상에 증착된 박막으로 일반적으로 구성되어 있고, 감지 방법은 수소 결합 상호작용(T. H. Liu, G. He, M. N. Yang and Y. Fang, J. Photochem. Photobiol., A, 2009, 202, 178-184.), 효소 결합된 시료 중 기판으로 FA를 사용하는 고정된 효소(H. Kudo, Y. Suzuki, T. Gessei, D. Takahashi, T. Arakawa and K. Mitsubayashi, Biosens. Bioelectron., 2010, 26, 854-858., 6 H. Kudo, X. Wang, Y. Suzuki, M. Ye, T. Yamashita, T. Gessei, K. Miyajima, T. Arakawa and K. Mitsubayashi, Sens. Actuators, B, 2012, 161, 486-492.), 또는 하위-ppb 범위에서 민감도를 발생시키는 축합 및 차후의, 캡슐화된 플루오르-P(fluoral-P)과의 고리화(M. N. Descamps, T. Bordy, J. Hue, S. Mariano, G. Nonglaton, E. Schultz, T. H. Tran-Thi and S. Vignoud-Despond, Sens. Actuators, B, 2012, 170, 104-108.)에 기초한다.

[0004] 최근 FA는 세포 내에서 100 μM 내지 400 μM 범위의 농도로 건강한 조직에서 내인성(endogeneous)으로 발현되는 것으로 밝혀졌다(H. d' A. Heck, E. L. White and M. Casanova-Schmitz, Biol. Mass Spectrom., 1982, 9, 347-353., Z. Tong, C. Han, W. Luo, X. Wang, H. Li, H. Luo, J. Zhou, J. Qi and R. He, Age, 2013, 35, 583-596., H. d' A. Heck and M. Casanova, Regul. Toxicol. Pharmacol., 2004, 40, 92-106.). 유전자 활성의 활성화 및 억제에 중요한 DNA의 메틸화 및 탈메틸화에서(K. Huba, Mini-Rev. Med. Chem., 2003, 3, 175-192.), 이러한 작은 반응성 카보닐 종 (RCS)이 관여하기 때문에, FA 농도의 엄격한 제어는 기억 및 세포 증식과 같은 생명 활동에 있어서 중추적인 중요성을 갖는다. FA 농도 제어의 실패는 신경변성질환(Tulpule and R. Dringen,

J. Neurochem., 2013, 127, 7-21.), 당뇨병(P. H. Yu, in MAO—The Mother of all Amine Oxidases, ed. J. P. M. Finberg, M. B. H. Youdim, P. Riederer and K. F. Tipton, Springer Vienna, Vienna, 1998, pp. 201-216.), 암(Z. Tong, W. Luo, Y. Wang, F. Yang, Y. Han, H. Li, H. Luo, B. Duan, T. Xu, Q. Maoying, H. Tan, J. Wang, H. Zhao, F. Liu and Y. Wan, PLoS One, 2010, 5, e10234.)과 관련이 있으며, 암조직에서 최대 1000 μM의 농도를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 실시간으로 세포내의 FA를 감지하는 것은 병의 진행을 모니터하고 잠재적으로 악성 조직으로부터 건강한 조직을 구별하기 위한 중요한 도구가 될 수 있다.

[0005] 전술한 바와 같이, 시공간적 제어뿐만 아니라, 형광 탐지 방법의 고유한 이점으로 인하여 형광 이미징은 수용액, 세포 및 조직에서 다양한 세포내 종들을 시각화하는 방법으로 주목받고 있으며, 따라서 다양한 작은 분자 FA 선택적 형광 센서에 대한 연구가 진행되고 있다. 이러한 형광 센서는 일반적으로 두 개의 공정에 기초하는데, 제 1 공정은 광자-유발된 전자 이동 (PET) 공정의 중단, 간단한 축합 반응(H. Song, S. Rajendiran, N. Kim, S. K. Jeong, E. Koo, G. Park, T. D. Thangadurai and S. Yoon, Tetrahedron Lett., 2012, 53, 4913-4916., W. Zhou, H. Dong, H. Yan, C. X. Shi, M. M. Yu, L. H. Wei and Z. X. Li, Sens. Actuators, B, 2015, 209, 664-669., Y. Tang, X. Kong, A. Xu, B. Dong and W. Lin, Angew. Chem., Int. Ed., 2016, 55, 3356-3359.)을 거치거나, 초기 축합 반응 후 아자-코프 (aza-Cope) 자리옮김을 거쳐, 분자 내에 함유된 형광 코어의 형광 특성을 저장하는 것이다(T. F. Brewer and C. J. Chang, J. Am. Chem. Soc., 2015, 137, 10886-10889., A. Roth, H. Li, C. Anorma and J. Chan, J. Am. Chem. Soc., 2015, 137, 10890-10893., J.-B. Li, Q.-Q. Wang, L. Yuan, Y.-X. Wu, X.-X. Hu, X.-B. Zhang and W. Tan, Analyst, 2016, 141, 3395-3402., L. He, X. Yang, Y. Liu, X. Kong and W. Lin, Chem. Commun., 2016, 52, 4029-4032.). 제 2 메커니즘은 FA와 1차 알킬아민의 축합으로 생성된 알킬-메탄이미늄 모이어티의 반응성을 사용하여, 고리화 반응 및, 형광의 현저한 증가를 발생시키는(L. He, X. Yang, M. Ren, X. Kong, Y. Liu and W. Lin, Chem. Commun., 2016, 52, 9582-9585.), 로다민 유닛을 스피로로부터 고리-개방된 형태로의 변형을 일으키는 것이다.

[0006] 이처럼, 세포에서 FA를 감지하는 여러 탐침자들이 보고되고 있으나, 여전히 세포 및 조직에서 만족할만한 수준으로 FA 특이적이면서 효과적으로 FA를 검출하는 프로브 및 센서의 개발에 대해서는 거의 보고된바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

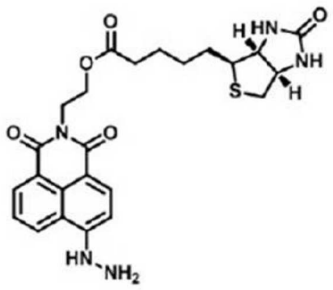
[0007] 본 발명에서는 암세포와 조직 내 포름알데하이드를 생체 농도하에서 선택적으로 검출할 수 있는 프로브 화합물 및 이를 포함하는 포름알데하이드를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0009] 하기 [화학식 1]로 표시되는 포름알데하이드 검출용 프로브 화합물을 제공한다:

[0010] [화학식 1]

[0011] 

.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 [화학식 1]에 따른 프로브 화합물을 포함하는 포름알데하디르 검출 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 포름알데하이드 검출용 프로브 화합물은 포름알데하이드와 반응하기 전과 후의 형광 세기 대비가 매우 크며, 높은 선택성과 낮은 검출 한계농도를 가질뿐만 아니라, 깊은 조직 침투성과 낮은 광-세포독성을 가지는바 암세포 및 암조직에서 포름알데하이드 검출을 위한 효율적인 도구로 활용할 수 있으며, 암진단, 암세

포에서 포름알데하이드의 생리학적 및 병리학적 역할에 대한 연구 등 다양한 생물학적 및 임상학적 응용 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1의 (a), (b)는 FA의 부존재(검정) 및 FA (500 μM)의 존재(적색) 하에서 (a) 프로브 화합물 1의 흡수 스펙트럼 (10 μM), 및 (b) 프로브 화합물 1의 형광 스펙트럼 (1.0 μM)이다. 스펙트럼은 37 ℃, 10 mM PBS 완충액 (pH 7.4, 1% DMSO)에서의 배양 후 8분 후에 얻어졌다. (c)는 PBS 완충액 (pH 7.4, 1% DMSO) 중 37 ℃에서 배양 8분 후 FA (0 내지 100 μM)의 다양한 농도에 따른 프로브 화합물 1 (1.0 μM)의 형광 반응 결과를 나타낸 것이고, (d)는 PBS 완충액 (pH 7.4, 1% DMSO) 중 37 ℃에서 FA의 상이한 농도 (0, 1, 5, 10, 30, 50, 80, 100, 200, 300, 400, 및 500 μM)를 사용한 541 nm에서 프로브 화합물 1 (1.0 μM)의 시간 의존성 형광 연구 결과를 나타낸 것이다. 모든 형광 데이터는 430 nm에서의 여기에 따라 기록되었다.

도 2는 일광자 및 이광자 모드에 의한 4T-1 및 3T3 세포 중 프로브 화합물 1 및 2에 의한 외인성(exogeneous) FA 탐지 결과를 이미지화한 것이다. (a)는 40 μM FA로 처리 후 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안 처리된 4T-1 세포; (b)는 40 μM FA로 처리 후 20 μM 프로브 화합물 2로 20분 동안 처리된 4T-1 세포; (c)는 40 μM FA로 처리 후 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안 처리된 3T3 세포를 나타낸다. 스케일바: 20 ㎛. (d)는 40 μM FA로 20분 및 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안; 40 μM FA로 20분 및 20 μM 프로브 화합물 2로 20분 동안 처리된 4T-1 세포의 정규화된 (normarlised) 평균 형광 강도 (F.I.)를 나타낸다. F.I.는 화합물 2에 대해 (vs.) 정규화되었고, 에러바는 SD, n=4를 표시한다.

도 3은 일광자 및 이광자 모드에 의한 4T-1 및 3T3 세포 중 프로브 화합물 1 및 2에 의한 내인성(endogeneous) FA 탐지 결과를 이미지화한 것이다. (a)는 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안 처리된 4T-1 세포; (b)는 20 μM 프로브 화합물 2로 20분 동안 처리된 4T-1 세포; (c) 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안 처리된 3T3 세포를 나타낸다. 스케일바: 20 ㎛. (d)는 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안; 20 μM 프로브 화합물 2로 20분 동안 처리된 4T-1 세포의 정상화된 평균 형광 강도 (F.I.)를 나타낸다. F.I.는 화합물 2에 대해 정규화되었고, 에러바는 SD, n=4를 표시한다. **P < 0.005.

도 4는 종양 조직 조각에서 이광자 형광 이미지화를 이용한 프로브 화합물 1에 의한 FA 탐지 결과를 나타낸 것이다. (a)는 37 ℃에서 1시간 동안 20 μM 프로브 화합물 1로 처리된 종양 조직 조각의 평면 이미지이다. 배율: 40×; (b)는 10-70 ㎛ 깊이에서 (a)의 3D 이미지; (c) 37 ℃에서 1시간 동안 20 μM 프로브 화합물 2로 로 처리된 종양 조직 조각의 평면 이미지이다. 배율: 40×. (d)는 10-70 ㎛ 깊이에서 (c)의 3D 이미지이다. 스케일바: 50 ㎛. (e)는 상이한 깊이에서, 각각 프로브 화합물 1 또는 2로 처리된 종양 조직 조각의 정규화된 평균 형광 강도 (F.I.)를 나타낸다. F.I.는 동일한 깊이에서 화합물 2에 대해 정규화되었다. 에러바는 SD, n=3을 표시한다. *P < 0.01.

도 5는 화합물 1의 FA에 대한 검출 한계를 나타낸 것으로, 상기 검출 한계는 FA의 가변적인 농도에 따른 형광의 정규화된 반응으로부터 계산되었다.

도 6의 (a)는 다양한 관련 피분석물에 따른 541 nm에서의 프로브 화합물 1(10 μM)의 형광 반응을 나타내고[(1) 프로브 화합물 1만; (2) 4-메톡시벤즈알데하이드; (3) 4-나이트로-벤즈알데하이드; (4) 아세트알데하이드; (5) 트리클로로아세트알데하이드; (6) 글루코오스; (7) 글리옥살; (8) H_2O_2; (9) GSH (10) $MgCl_2$; (11) $CaCl_2$; (12) Na_2S; (1) tert-부틸 하이드로퍼옥사이드; (14) $NaHSO_3$; (15) FA], (b)는 430 nm에서 여기에 따라 PBS 완충액 (pH 7.4, 1% DMSO) 중 37 ℃에서의 배양 15분 후 FA (100 μM)의 부재 (검정) 또는 존재 (적색) 하에서의 상이한 pH 값에 따른 프로브 화합물 1의 형광 반응을 나타낸다.

도 7은 경사 조건 (85 내지 100 % A로 17분, 그 후 100 % B로 3분 (A = H_2O + 0.5% TFA, B = 아세토나이트릴 + 0.5% TFA) 하에서 단일 파장 (430 nm)에서 유리된 (free) 화합물 1 (적색) 및 화합물 1-FA (청색)의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 세가지 상이한 조건, 탐침자만, 100 μM의 FA, 및 $NaHSO_3$ (300 μM)로 사전-처리된 100 μM의 FA 하에서 화합물 1 (10 μM)의 형광 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 24시간 동안의 세포 생존율 측정기법 (MTT assay)에 의한 (a) 4T-1 세포 및 (b) 3T3 세포 중 프로브 화합물 1 및 2의 세포 독성 결과를 나타낸 것이다. 각각의 농도는 5개의 병렬 시험 (parallel trial)으로 설정되

었고, 결과는 평균 ± 표준 편차 (SD)로 표현되었다.

도 10은 일광자 및 이광자 모드에 의한 4T-1 세포 중 프로브 화합물 1에 대해 바이오틴-경쟁적 결합을 가진 외인성 FA 탐지 결과를 이미지화한 것이다. (a)는 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안 처리된 4T-1; (b)는 400 μM 바이오틴으로 30분, 그 후 20 μM 프로브 화합물 2로 20분 처리된 4T-1. 스케일바: 20 ㎛. (c)는 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 또는 400 μM 바이오틴으로 20분 및 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안 처리된 4T-1 세포의 정규화된 평균 형광 강도 (F.I.)를 나타낸다. F.I.는 화합물 1+바이오틴에 대해 정규화되었다. 에러바는 SD, n-4를 표시한다. ***P<0.001.

도 11은 일광자 및 이광자 모드에 의한 4T-1 중 $NaHSO_3$의 억제제에 의한 프로브 화합물 1 및 2와의 억제 실험 (inhibitory experiment) 결과를 이미지화한 것이다. (a)는 50 μM $NaHSO_3$로 30분 동안 처리되고, 그 후 20 μM 프로브 화합물 1로 20분 동안 처리된 4T-1 세포; (b)는 50 μM $NaHSO_3$로 30분 동안 처리되고, 그 후 20 μM 프로브 화합물 2로 20분 배양된 4T-1 세포.

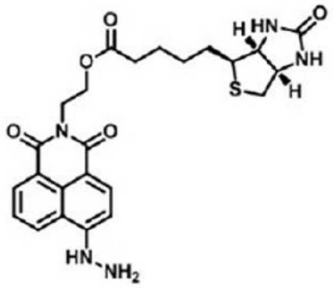
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명에서는 암세포와 조직 내 포름알데하이드를 생체 농도하에서 선택적으로 검출할 수 있는 프로브 화합물 및 이를 포함하는 포름알데하이드를 제공하고자 한다.

[0017] 따라서, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 포름알데하이드 검출용 프로브 화합물을 제공한다:

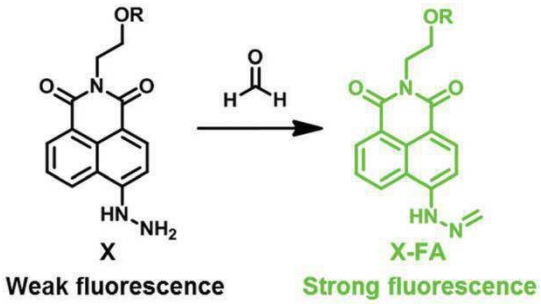
[0018] [화학식 1]



[0019] .

[0020] 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 하기 [포름알데하이드 검출 메커니즘]에 도시된 바와 같이, 포름알데하이드 존재하에서 하이드라존 형성에 따른 PET 효과의 억제를 통해 강한 형광을 나타내는 것을 특징으로 한다.

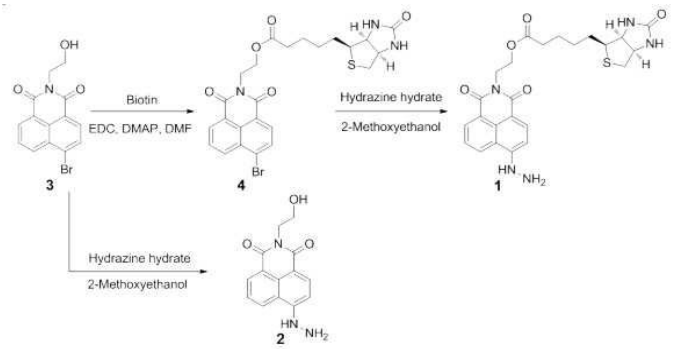
[0022] [포름알데하이드 검출 메커니즘]



[0023] X = **1** (R = Biotin), **2** (R = H)

[0025] 또한, 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 구체적인 제조방법은 하기 합성경로에 표시된 바와 같으며, 구체적인 내용은 하기 실시예에서 설명하기로 한다.

[0026] [합성 경로]



[0027]

[0029] 또한, 본 발명은 상기 [화학식 1]에 따른 프로브 화합물을 포함하는 포름알데하디르 검출 센서를 제공한다.

[0031] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0033] **실험방법 및 합성예**

[0034] 합성을 위한 재료 및 방법

[0035] 본 발명에 이용된 반응들은 화염-건조된 유리 제품으로 아르곤 분위기하에서 수행되었다. 컬럼 크로마토크래피를 위해 실리카 겔 60 (Merck, 70-230 메쉬)을 사용하였으며, 분석용 박층 크로마토그래피는 Merck 60 F254 실리카 겔 (사전-코팅된 시트, 0.25 mm 두께)를 사용하여 수행되었다. 모든 시약들은 Sigma-Aldrich로부터 구매하였고, 추가 정제없이 사용하였다. 모든 형광 및 UV/Vis 흡수 스펙트럼은 각각 Shimadzu RF-5301PC 및 Scinco S-3100 분광광도계로 기록하였으며, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 400 MHz 분석계 상의 DMSO-*d*6 중에서 수집하였다. 모든 화학적 변위들은 내부 기준으로서 TMS의 신호를 사용하여 ppm 값으로 보고되었다. ESI 질량 스펙트럼 분석은 LC/MS-2020 Series (Shimadzu)를 사용하여 수행하였다. 역상 HPLC 실험은 용매 A (0.1% *v*/*v* TFA를 지닌 물) 및 용매 B (0.1% *v*/*v* TFA를 지닌 아세토나이트릴)의 이원체 기울기로 구성된 이동상을 사용하여 1 mL/분의 유속에서 작동되는 VDSpher 100 C18-E 컬럼 (5 ㎛mm, 250 × 4.6 mm)을 갖춘 Young Lin HPLC 시스템 (YL9100)을 사용하여 수행하였다.

[0037] 분광학 데이터

[0038] 화합물 1(1.0 mM) 및 화합물 2 (1.0 mM)의 저장 용액을 다이메틸 설폭사이드 (DMSO) 중에서 제조하였다. 4-메톡시벤즈알데하이드, 4-나이트로벤즈알데하이드, 아세트알데하이드, 및 트리클로로아세트알데하이드의 저장 용액 (10.0 mM)을 DMSO 및 글루코오스, 글리옥살, H_2O_2, GSH, $MgCl_2$, $CaCl_2$, Na_2S, tert-부틸 하이드로퍼옥사이드 중에서 제조하였고, $NaHSO_3$ 를 두배로 증류된 물 중에서 제조하였다. 흡수 및 방출 측정을 위한 샘플들이 석영셀 (quartz cuvette) (4 mL 부피)에 함유되었다. 형광 스펙트럼의 모든 측정에 대해, 여기는 430 nm에서 있었고, 모든 여기 및 방출 슬릿 폭은 3.0 nm (10.0 μM의 화합물 1) 또는 5.0 nm (1.0 μM의 화합물 1)이었다. 모든 분광 측정은 생리적 조건 (1%의 DMSO를 함유하는 PBS 완충액, pH 7.4, 37 ℃) 하에서 수행되었다

[0040] 합성

[0041] 화합물 3의 합성

[0042] 종래 보고된 문헌을 참고하여 화합물 3을 제조하였다(X. Wan, T. Liu and S. Liu, Langmuir, 2011, 27,

4082.).

[0043] 화합물 4의 합성

[0044] 무수 DMF 중 바이오틴 (0.31 g, 1.3 mmol), EDC (0.74 g, 3.8 mmol), 및 DMAP (0.47 g, 3.8 mmol)의 혼합물을 실온에서 아르곤 분위기하에서 30분 동안 교반하였다. 다음으로, DMF 중 화합물 3 (1.21 g, 3.8 mmol)의 용액을 혼합물에 첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 용매의 제거 후에, 용리액으로서 CH_2Cl_2:MeOH (9/1 *v*/*v*)을 사용하여 실리카겔을 통해 미정제 생성물을 정제하여 백색 고형물 (0.49 g, 68%)로서 화합물 4을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-*d*6, 400 MHz): δ 8.55-8.50 (m, 2H), 8.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J1* = 7.3 Hz, *J2* = 1.1 Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.34 Hz (s, 1H), 4.30-4.27 (m, 4H), 4.25-4.22 (m, 1H), 4.01-3.97 (m, 1H), 2.87-2.83 (m, 1H), 2.74-2.70 (m, 1H), 2.51 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.40-1.36 (m, 2H), 1.34-1.26 (m, 2H), 1.18-1.12 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (DMSO-*d*6, 100 MHz): δ 173.5, 163.7, 163.7, 163.3, 133.5, 132.4, 132.1, 131.8, 130.5, 130.0, 129.6, 129.0, 123.3, 122.5, 61.6, 61.4, 59.8, 56.0, 40.7, 39.6, 33.9, 28.6, 28.5, 25.0 ppm. ESI-MS: *m/z* (M+Na+) 계산값 568.05, 실제값 568.05.

[0046] 화합물 2의 합성

[0047] 2-메톡시에탄올 중 화합물 3 (165 mg, 0.5 mmol)과 1.5 mL의 98% 하이드라진 수화물의 혼합물을 70 ℃에서 2시간 동안 가열하였다. 실온까지 냉각한 후에, 침전된 생성물을 여과하고, 에테르로 세척하고 건조시켜, 80% 수율로 오렌지색 고형물 (111 mg)로서 화합물 2를 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-*d*6, 400 MHz): δ 9.15 (s, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.65 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.84-4.80 (m, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.13 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.61-3.57 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (DMSO-*d*6, 100 MHz): δ 164.6, 163.7, 153.8, 134.9, 131.2, 130.0, 128.9, 124.8, 122.5, 119.1, 108.1, 104.6, 58.6, 42.0 ppm. ESI-MS: *m/z* (M-H+) 계산값 270.09, 실제값 269.75.

[0049] 화합물 1의 합성

[0050] 2-메톡시에탄올 중 화합물 4 (200 mg, 0.4 mmol)와 1.0 mL의 98% 하이드라진 수화물의 혼합물을 70 ℃에서 1시간 동안 가열하였다. 실온까지 냉각한 후에, 침전된 생성물을 여과하고, 에테르로 세척하고 건조시켜, 82% 수율로 오렌지색 고형물 (150 mg)로서 화합물 1을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-*d*6, 400 MHz): δ 8.90 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.77 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.28-4.25 (m, 1H), 4.10-4.06 (m, 2H), 3.56-3.51 (m, 2H), 3.07-3.02 (m, 1H), 2.80-2.76 (m, 1H), 2.53 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.57-1.53 (m, 2H), 1.47-1.40 (m, 2H), 1.28-1.21 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (DMSO-*d*6, 100 MHz): δ 172.2, 164.6, 163.7, 163.4, 153.8, 134.9, 131.2, 130.0, 128.9, 124.8, 122.5, 119.1, 108.1, 104.6, 61.7, 59.8, 58.6, 56.1, 42.0, 40.5, 33.9, 28.9, 28.7, 25.9 ppm. ESI-MS: *m/z* (M+K+) 계산값 536.66, 실제값 536.00.

[0052] 세포 배양

[0053] 4T-1(바이오틴-수용체 양성 세포), 마우스 유방암 세포계 및 NIH 3T3 (바이오틴-수용체 음성 세포), 마우스 배아 섬유아세포 세포주를 5% CO_2 및 95% 대기 환경 중 37 ℃에서 10% FBS (소태아혈청, Tianhang Biotechnology Co.,Ltd., Hangzhou, China)로 보충된 DMEM (둘베코수정이글배지, Gibico, Grand Island, USA)로 배양하였다.

[0054] 실험 전날에, 두 세포 모두를 각각의 접시에 대해 4×10^4의 밀도로 20 mm 유리 접시 (Nest, Nest Biotechnology Co., Ltd, Wuxi, China) 내로 뿌렸다. 24시간 후에, 세포 밀집도는 실험에 대해 최대 약 60% 였다.

[0056] 프로브 화합물 1 및 2에 의한 4T-1 및 NIH 3T3 세포 중 FA의 외인성 탐지

[0057] 실험 전에, PBS로 세포를 두 번 세척하였다. 40 μM FA를 세포 내로 첨가하였고 20분 동안 배양하고, 그 다음에 PBS로 세척하였으며, 20 μM 프로브 화합물 1 및 2를 세포 내로 넣었고 추가로 20분 동안 배양하였다. 탐지 전에, 세포를 PBS로 세척하였고, 40 × 대물렌즈를 지닌 Nikon 공초점 및 다광자 현미경 (Nikon A1 MP)으로 일광자 및 이광자 이미지화를 수행하였다. 일광자 이미지화에 대해, 여기 파장은 488 nm이었고, 검출창 (detection window)은 500-550 nm이었다. 이광자 이미지화에 대해, 여기 파장은 800 nm이었고, 검출창은 500-550 nm이었다.

[0059] 프로브 화합물 1 및 2에 의한 4T-1 및 NIH 3T3 세포 중 FA의 내인성 탐지

[0060] 실험 전에, 세포를 PBS로 두 번 세척하였다. 추가의 20분 동안의 배양을 위해 20 μM 프로브 화합물 1 및 2를 세포 내로 넣었고, 그 다음에 40 × 대물렌즈를 지닌 Nikon 공초점 및 다광자 현미경 (Nikon A1 MP)에 의한 이미지화를 위해 PBS로 두 번 세척하였다. 일광자 이미지화에 대해, 여기 파장은 488 nm이었고, 검출창은 500-550 nm이었다. 이광자 이미지화에 대해, 여기 파장은 800 nm이었고, 검출창은 500-550 nm이었다

[0062] 외인성 탐지를 위한 바이오틴과의 경쟁 실험

[0063] 실험 전에, 세포를 PBS로 두 번 세척하였다. 400 μM 바이오틴 (100% DMSO 중 10 mM 저장 용액)을 4T-1 내로 30분 동안 사전-배양하였고, 그 다음에 프로브 화합물 1 또는 2를 매질 내로 첨가하였고 추가로 20분 동안 배양하였다. 일광자 이미지화에 대해, 여기 파장은 488 nm이었고, 수집된 파장은 500-550 nm이었다. 이광자 이미지화에 대해, 여기 파장은 800 nm이었고, 검출창은 500-550 nm이었다

[0065] $NaHSO_3$에 의한 억제 실험

[0066] 실험 전에, 세포를 PBS로 두 번 세척하였다. 50 μM $NaHSO_3$를 30분 동안 세포로 사전-배양하였고, 그 다음에 세포를 PBS로 두 번 세척하였으며, 20 μM 프로브 화합물 1 및 2를 매질 내로 첨가하였고, 추가로 20분 동안 배양하였다. 탐지 전에, 세포를 PBS로 한 번 더 세척하였다. 40× 대물렌즈를 지닌 Nikon 공초점 및 다광자 현미경 (Nikon A1 MP)으로 일광자 및 이광자 이미지화를 수행하였다.

[0068] 동물 종양 모델 및 조직 조각 처리

[0069] 4주령의 Balb/c 암컷 마우스는 Shandong University Laboratory Animal Centre (Shandong, China)로부터 구매하였고, 받은 모든 동물들에 풍부한 양의 혼합 먹이 및 멸균 식수가 제공되었다. 종양 모델의 수립을 위해, 2×10^6의 4T-1 세포를 마우스의 우측 옆구리 내로 피하 주입하였다. 2주 이상이 지난 후에, 종양의 부피는 약 50 mm^3에 도달하였고, 종양 제거를 위해 마우스를 마취시켰다. 진동식 절편기 (vibrating-blade microtome)로 종양 조각을 500 ㎛ 두께로 절단하였고, 그 다음에 조각들을 37 ℃에서 1시간 동안 20 μM 탐침자로 배양하였다. 이미지화 전에, 탐침자로 처리된 조직 조각들을 PBS로 세 번 세척하였다.

[0071] 종양 조직 조각에서 FA를 탐지하기 위한 이광자 이미지화

[0072] 40× 대물렌즈를 지닌 Nikon 공초점 및 다광자 현미경 (Nikon A1 MP)으로 조직 조각에서 탐침자의 이광자 이미지화를 얻었다. 이광자 이미지화에 대해, 여기 파장은 800 nm이었고, 검출창은 500-550 nm이었다.

[0074] MTT에 의한 세포 독성 분석

[0075] MTT (Solabio Life Sciences, Beijing, China) 분석법에 의해 프로브 화합물의 독성을 검사하였다. 실험 전날에, 100 μL 배양조직 중 4×10^3의 4T-1 세포 및 6×10^3의 3T3 세포를 96 웰-플레이트(well-plates) 내로 뿌렸

다. 다음날에, 다양한 농도의 프로브 화합물 (0, 1, 5, 10, 20, 30 μM)이 함유된 100 μL 배양 조직을 이전의 배양 조직 대신에 세포 내로 첨가하였다. 24시간 동안의 배양 후에, 10 μL MTT (PBS 중 5 mg/mL)을 각각의 웰로 첨가하였고 추가로 4시간 동안 배양하였다. 그 다음에, 배양 조직을 제거하고 100 μL DMSO로 교체하였으며, 플레이트를 110 rpm의 셰이커 상에 20분 동안 놓아두어서 포르마잔 결정체를 용해시켰다. 흡수율은 570 nm에서 Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, USA)로 측정하였다. 세포 생존율 (%) = (OD570 (Experiments) - OD570 (Blank)) / (OD570 (Control) - OD570 (Blank)). OD570 (Experiments)는 다양한 농도의 탐침자로 처리된 세포를 표시하고; OD570 (Control)는 탐침자가 없는 세포를 표시하며; OD570 (Blank)는 동일한 OD570 (Control)로 처리된 세포가 없는 플레이트를 표시한다. 각각의 농도는 5개의 병렬 (parallel) 샘플로 수행되었고, 결과는 평균± 표준 편차 (SD)로 표현되었다.

[0077] **결과 및 고찰**

[0078] 본 발명에서는 암 표적화 모이어티로서, 바이오틴 펜던트를 지닌 FA 센서를 설계하였고 (화합물 1), 비-바이오틴 부착된 화합물(화합물 2)과 비교 실험을 진행하였다. 본 발명에 따른 화합물 1의 FA 검출 방법은 상기 [검출 메커니즘]에 도시된 바와 같이, 하이드라존의 형성에 따른 PET 효과의 억제에 기초하였다. 화합물들은 상기 [합성 경로]를 통해 합성하였으며, 모든 화합물은 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 및 ESI-MS를 통해 확인하였다.

[0079] FA에 대한 반응을 평가하기 위해, FA의 존재 및 부존재 하에서 화합물 1의 분광학적 특성을 평가하였다. 도 1a에 나타난 바와 같이, 과량의 FA를 화합물 1의 수성 PBS 완충 용액 내로 첨가하면, 428 nm 부근의 흡광도가 약간 증가한다(화합물 1에 대해 λ = 428 nm, ε = 11770 M^{-1} cm^{-1} 및 화합물 1-FA에 대해 λ = 424 nm, ε = 14075M^{-1} cm^{-1}). 반면에 화합물 1은 사실상 형광성을 나타내지 않고, FA와의 축합을 통해 541 nm에서 140배 이상의 현저한 형광 강도가 나타났다 (도 1b).

[0080] FA의 농도의 증가에 따른 화합물 1의 형광 적정 스펙트럼 및 운동 프로파일을 도 1c 및 d에 나타내었다. FA의 처리에 따라 화합물 1의 541 nm 주위에서의 형광 강도가 점차적으로 증가하여 430 nm에서 여기에 따른 생리적 조건하에서 약 8분 후에 포화에 다다른다. 형광 반응은 검출 한계의 측정값이 0.78 μM이 되게 하는, 최대 10 μM의 FA 농도와 신호 강도 사이의 선형 관계를 입증한다(도 5).

[0081] 생리적 조건하에서 다른 생물적으로 관련 있는 분자들, 예컨대 다른 반응성 카보닐 및 산소종, 금속 이온, 및 티올과 관련하여, FA에 대한 화합물 1(10 μM)의 형광 반응이 조사되었다 (도 6a). 이러한 결과들은 541 nm에서 화합물 1의 형광 강도가 FA의 존재하에서 오직 현저하게 강화되고, 이에 따라 탐침자가 고도로 선택적인 특성을 나타냄을 입증한다. 화합물 1과의 FA 반응에 대한 pH-의존성이 pH 4-10 범위에서 평가되었고, 이는 관찰된 모든 pH 값에서 FA의 부존재 하에서 화합물 1의 형광 결핍이 입증된 반면(도 6b), 화합물 1-FA의 형성이 모든 pH 값 하에서 관찰되었고, pH 4-7 범위에서 최적의 값을 가짐이 관찰되었다.

[0082] 화합물 1에서 화합물 1-FA로의 확실한 전환을 보여주는 반응 기반성 메커니즘이 HPLC 분석 (도 S3, ESI?)에 의해 평가되었고, 그 결과 화합물 1-FA는 하이드라존 형성에 따라 증가된 친유성과 일치하게, 소수성 컬럼 (11.03 분 vs. 8.40분) 상에서 증가된 체류 시간 (retention time)을 나타냈고, 두 개의 피크가 ESI-MS를 통해 모두 확인되었다. 화합물 1 및 FA의 반응 기반성 탐지 메커니즘은 FA와 효율적으로 반응하고 하이드라존 종에 대한 반응성을 제거하는, FA 퀜차 (quencher) (소듐 바이설파이트)와의 경쟁 실험에 의해 추가로 뒷받침되었다. 도 8에 나타나는 바와 같이, 소듐 바이설파이트로 FA를 전처리한 것은 비처리된 샘플에 비해 형광 강도의 엄청난 감소를 일으켰다.

[0083] 이러한 결과들은 화합물 1이 중성 및 산성 pH 환경에서 1 μM 염료의 존재 하에서 약 400 μM의 동적 범위 (dynamic range) 및 낮은 검출 한계를 갖는 반응 기반성 메커니즘을 통해 FA를 탐지할 수 있음을 의미한다. 이를 통해 본 발명에 따른 화합물 1은 암조직의 약 산성 환경에서 FA의 내인성 농도를 탐지하는데 이상적임을 확인할 수 있다.

[0084] 화합물 1 및 2가 살아있는 세포에서 탐사할 수 있도록, 본 발명자들은 먼저 MTT 분석법을 통해 세포 독성을 연구하였다. 4T-1 세포 (바이오틴 수용체 양성 세포계) 및 NIH 3T3 세포 (바이오틴 수용체 음성 세포계) 둘 모두를 프로브 화합물의 상이한 농도 (1, 5, 10, 20 및 30 μM) 하에서 24시간 동안 배양하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, 30 μM 농도에서 대략 80%의 세포 생존률이 나타났고, 화합물 1은 4T-1 및 3T3 세포 둘 모두에 대해 작은 독성을 나타내었다.

[0085] 다음으로, 화합물 1 및 2로 살아 있는 세포에서 형광 이미지화 실험을 하였다. 먼저, 탐침자의 외인성 FA를 탐지하는 잠재력을 평가하기 20분 전에, FA (40 μM)으로 전-배양된 바이오틴 수용체 양성 4T-1 세포에 프로브 화합물 1 (20 μM)을 첨가하였다. 프로브 화합물 1은 일광자 및 이광자 모드 둘다에서 유사한 환경 하에서 프로브 화합물 2보다 높은 형광 강도를 나타낸반면 (도 2a, b 및 d), 동일한 조건하에서 바이오틴 수용체 음성 NIH 3T3 세포를 사용한 동일한 실험은 일광자 및 이광자 여기 모드 둘다에서 무시해도 될 정도의 형광을 나타내었다 (도 2c). 이러한 결과들은 FA 보충 조건하에서 기준 탐침자인 화합물 2보다 밝은 형광을 잠재적으로 나타내는, 바이오틴 수용체 양성 세포와 음성 세포를 구별하기 위한 바이오틴 부착된 화합물 1의 잠재력을 명백히 설명한다.

[0086] 화합물 1의 조직 내 FA 함량을 검출할 수 있는 센서로 적용가능한지 여부를 확인하기 위해서는 탐침자가 FA의 내인성 양을 탐지할 수 있는 것이 중요하다. 따라서, 탐침자를 FA가 보충되지 않은 세포로 첨가하였다. 그 결과, 일광자 및 이광자 여기 모드 둘 다에서, 바이오틴 수용체 양성 세포주 중의 화합물 2 (도 3b 및 d) 및 바이오틴 수용체 음성 세포주 (도 3c)와 비교하여, 화합물 1은 바이오틴 수용체 양성 세포주에서 상대적으로 밝은 형광을 나타내었다 (도 3a).

[0087] 세포가 먼저 바이오틴으로 보충된, 내인성 조건을 사용한 경쟁 실험을 수행하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, 유리된 바이오틴에 의한 수용체 포화는 프로브 화합물 1의 세포내 형광의 현저한 감소를 일으켰고, 이는 바이오틴-매개된 흡입 공정을 확인시켜주었다. 또한, 내인성 조건하에서 화합물 1이 첨가된 세포의 형광이 다른 세포내 성분들이 아니라 화합물 1-FA 형성으로부터 발생함을 확인하기 위해, 화합물 1 또는 2의 첨가 전에, 4T-1 세포를 50 μM $NaHSO_3$로 30분 동안 배양하였다. 탐침자(화합물 1 또는 2)와의 배양 20분 후의 형광 강도는 대폭 감소하였으며(도 11), 이를 통해 포름알데하이드가 내인성 조건하에서 관찰된 증가된 형광의 원인임을 확인하였다.

[0088] 다음으로, 이광자 여기에 따른 종양 조직에서 내인성 FA 농도의 탐지에 대한 화합물 1의 적용 가능성을 조사하였다. 도 4a에 나타난 바와 같이, 37 ℃에서 1시간 동안 20 μM 화합물 1로 배양된 종양 조직 조각은 최대 70 ㎛ 깊이에서 강한 형광을 나타내었다. 도 4b에 묘사된 3차원적 이미지화는 동일한 조건하의 평면 이미지화 결과를 확실히 확인해준다.

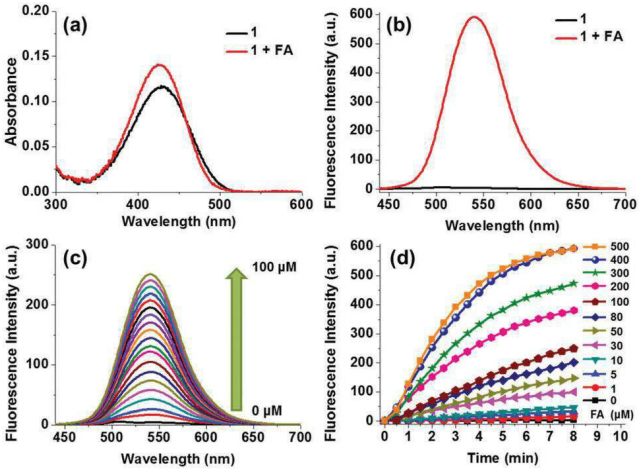
[0089] 화합물 2는 유사한 조건하에서 처리되었고 (도 4c 및 d), 형광 또한 유사한 조직 깊이에서 증가되었음을 확인하였다; 하지만, 화합물 1 처리된 조직의 신호 강도는 화합물 2 처리된 조직의 강도보다 동일한 깊이에서 높았다 (도 4e). 이러한 결과를 통해 본 발명에 따른 화합물 1이 이광자 여기시 종양 조직에서 높은 FA 선택성을 가짐을 확인하였다.

[0091] 결론적으로 전술한 실시예를 통해 측정된 광물리적 특성에 기초하여, 본 발명에 따른 화합물 1은 넓은 신호-대-잡음비, 낮은 검출 한계, 및 높은 선택성으로 인해 암세포 및 암조직에서 내인성 FA를 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하였다. 또한 인 비트로 바이오 이미징 실험을 통해 입증된 바와 같이 본 발명에 따른 화합물 1은 3T3 세포와 같은 음성 세포주를 넘어, 바이오틴 수용체-양성 4T-1 세포를 선택적으로 표적화할 수 있음을 확인하였다.

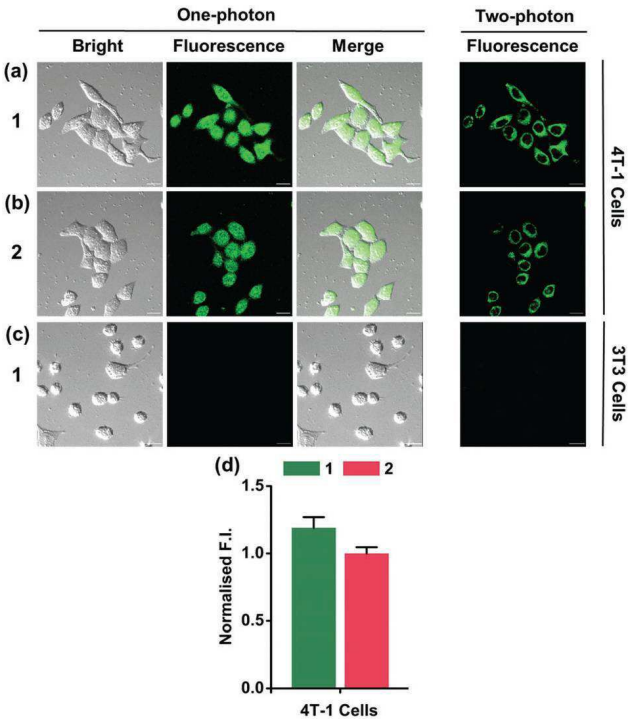
[0092] 따라서, 본 발명에 따른 포름알데하이드 검출용 프로브 화합물은 암세포 및 암조직에서 포름알데하이드 검출을 위한 효율적인 도구로 활용할 수 있으며, 암진단, 암세포에서 포름알데하이드의 생리학적 및 병리학적 역할에 대한 연구 등 다양한 생물학적 및 임상학적 응용 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

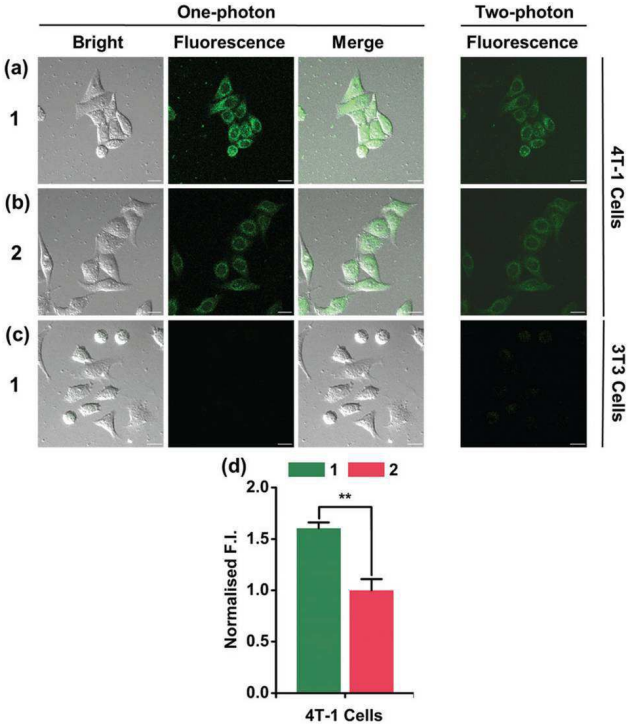
도면1


(a)
1
1 + FA
Absorbance
Wavelength (nm)
(b)
1
1 + FA
Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
(c)
100 μM
0 μM
Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
(d)
500
400
300
200
100
80
50
30
10
5
1
0
FA (μM)
Fluorescence Intensity (a.u.)
Time (min)

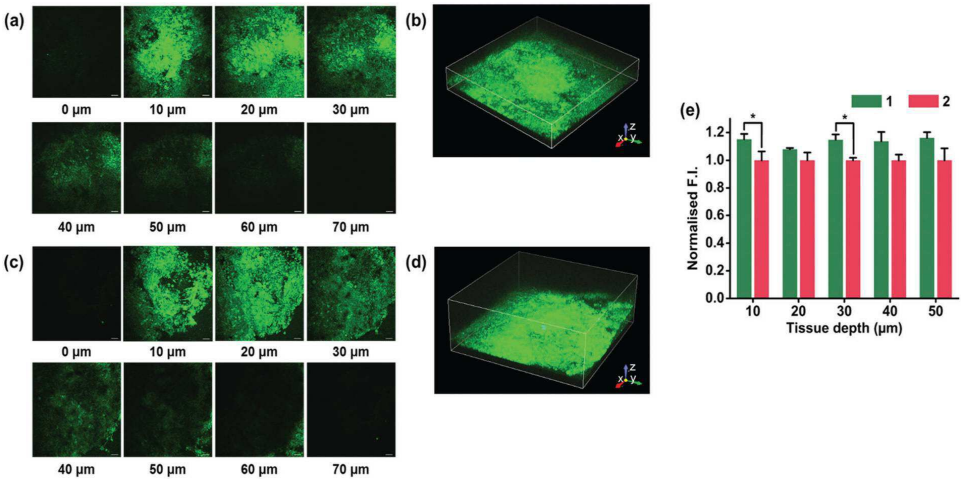
도면2


One-photon
Two-photon
Bright
Fluorescence
Merge
Fluorescence
(a)
1
(b)
2
(c)
1
4T-1 Cells
3T3 Cells
(d)
1
2
Normalised F.I.
4T-1 Cells

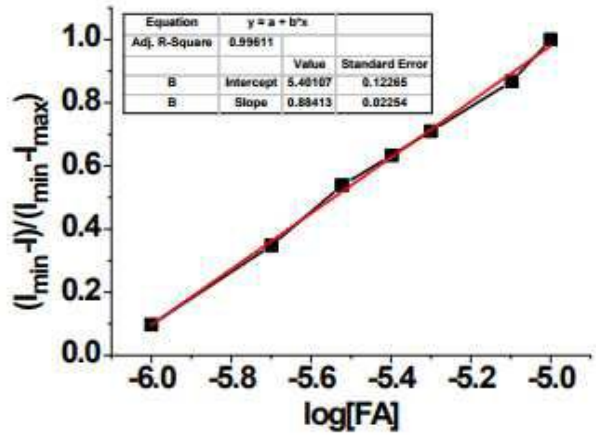
도면3


One-photon
Two-photon
Bright
Fluorescence
Merge
Fluorescence
(a)
1
(b)
2
(c)
1
4T-1 Cells
3T3 Cells
(d)
1
2
**
Normalised F.I.
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4T-1 Cells

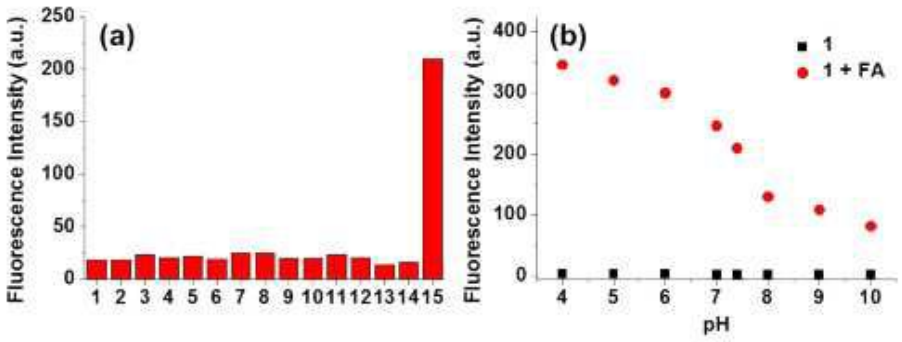
도면4


(a)
0 μm
10 μm
20 μm
30 μm
40 μm
50 μm
60 μm
70 μm
(b)
(c)
0 μm
10 μm
20 μm
30 μm
40 μm
50 μm
60 μm
70 μm
(d)
(e)
1
2
*
*
Normalised F.I.
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10
20
30
40
50
Tissue depth (μm)

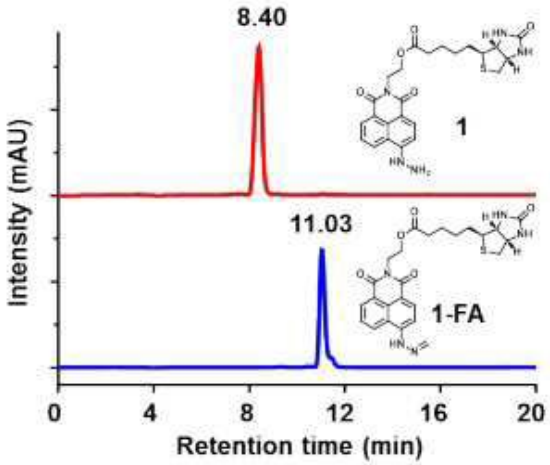
도면5


Equation
y = a + b*x
Adj. R-Square
0.99611
Value
Standard Error
B
Intercept
5.40107
0.12265
B
Slope
0.88413
0.02254
(Imin-I)/(Imin-Imax)
log[FA]

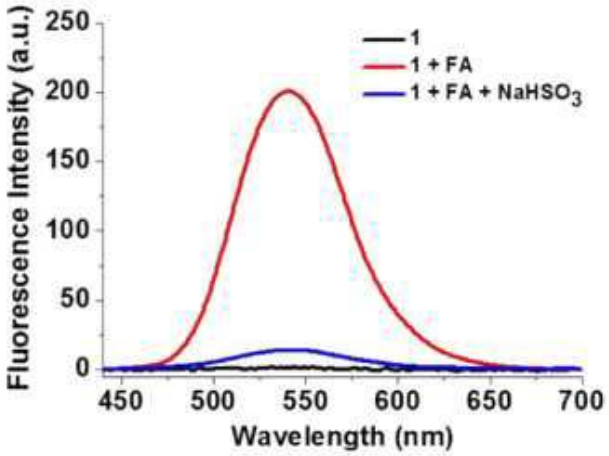
도면6


(a)
Fluorescence Intensity (a.u.)
(b)
1
1 + FA
pH

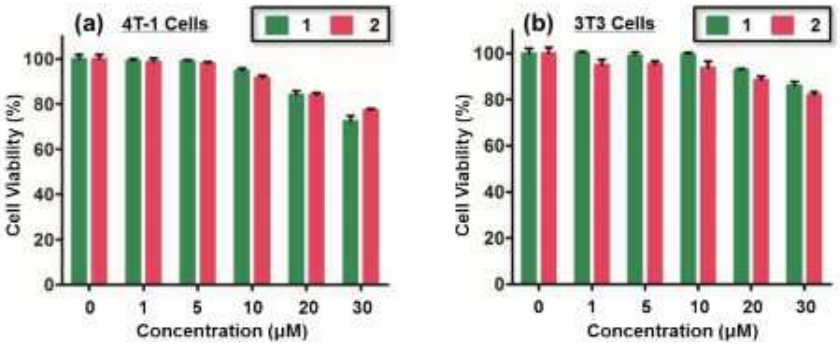
도면7


8.40
1
11.03
1-FA
Intensity (mAU)
Retention time (min)

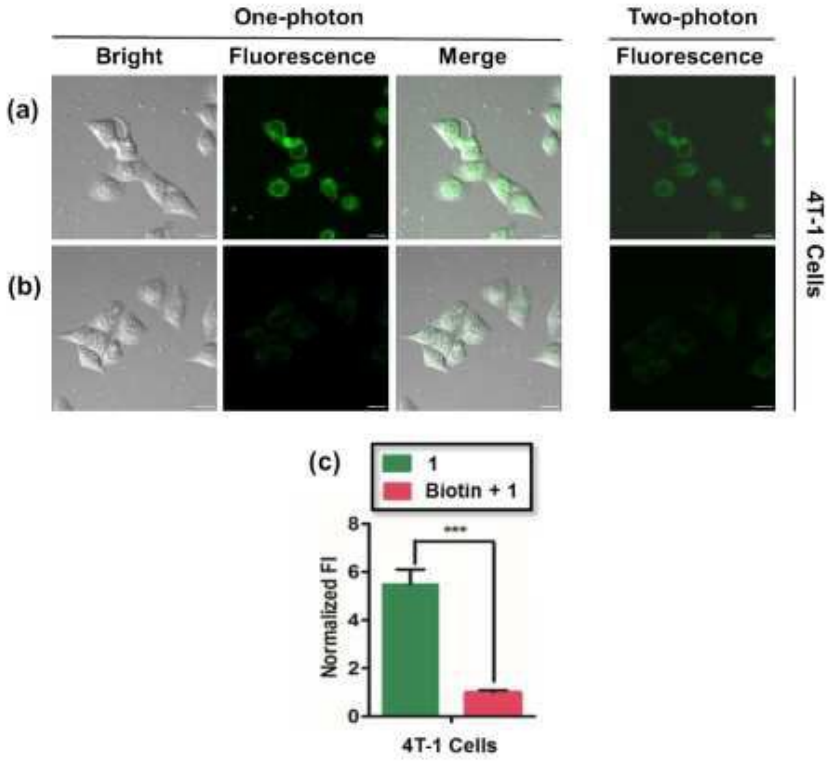
도면8


Fluorescence Intensity (a.u.)
250
200
150
100
50
0
450
500
550
600
650
700
Wavelength (nm)
1
1 + FA
1 + FA + NaHSO3

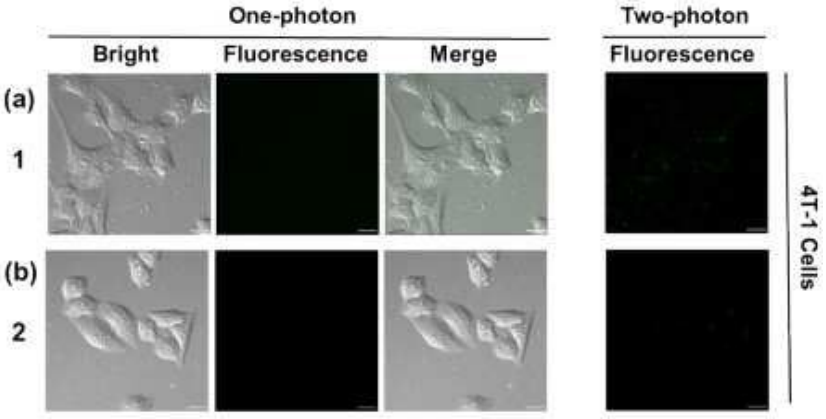
도면9


(a) 4T-1 Cells
1
2
Cell Viability (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
5
10
20
30
Concentration (μM)
(b) 3T3 Cells
1
2
Cell Viability (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
5
10
20
30
Concentration (μM)

도면10


One-photon
Two-photon
Bright
Fluorescence
Merge
Fluorescence
(a)
(b)
4T-1 Cells
(c)
1
Biotin + 1
***
Normalized FI
8
6
4
2
0
4T-1 Cells

도면11


One-photon
Two-photon
Bright
Fluorescence
Merge
Fluorescence
(a)
1
(b)
2
4T-1 Cells