(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0023362
(43) 공개일자 2023년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 311/04 (2006.01) *C12Q 1/44* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 311/04 (2013.01)
C12Q 1/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0105414
(22) 출원일자 2021년08월10일
심사청구일자 2021년08월10일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호(서빙고동, 신동아아파트)
우, 시아오핑
서울특별시 서대문구 봉원사길 8, 402호(대신동)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 17 항

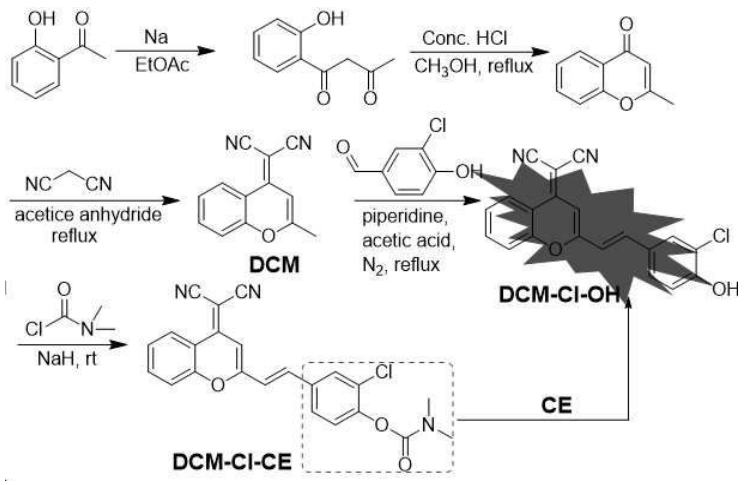
(54) 발명의 명칭 **화합물, 이를 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브**

(57) 요 약

화합물, 이를 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브가 개시된다. 상기

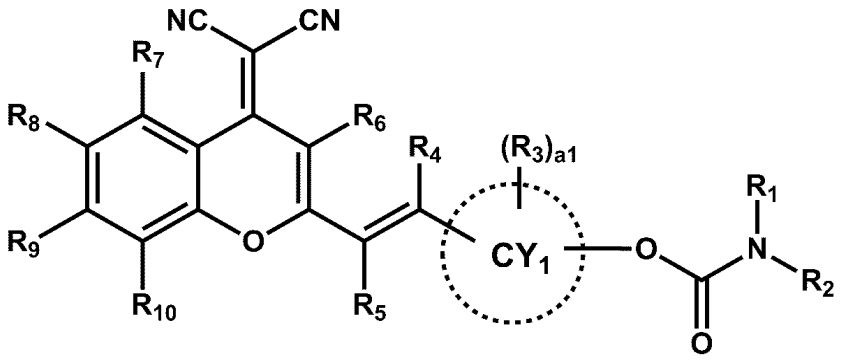
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

<화학식 1>



상기 화학식 1에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

(52) CPC특허분류
G01N 21/6428 (2013.01)
G01N 21/6486 (2013.01)
G01N 33/52 (2013.01)
C12Q 2334/00 (2013.01)
G01N 2021/6439 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113737
과제번호	2012R1A3A2048814
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	다차원 유기소재 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

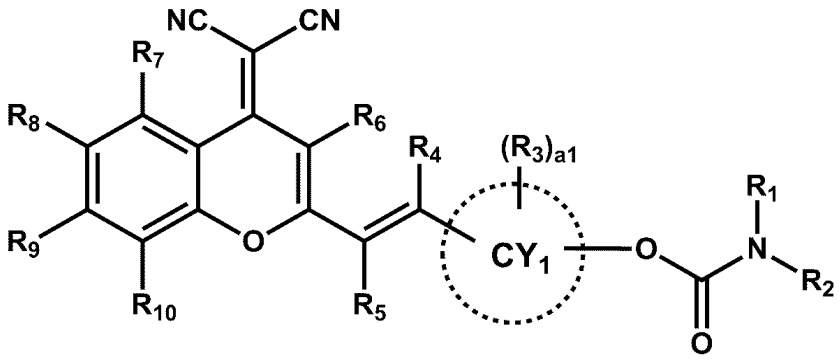
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는, 화합물:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서,

CY_1은 C_6-C_{60} 아릴렌기 또는 C_6-C_{60} 헤테로아릴렌기이고,

R_1 및 R_2는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알케닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알키닐기, 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알콕시기이고,

R_3은, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알케닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알키닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알콕시기, 또는 $-N(Q_1)(Q_2)$이고,

a1은 0 내지 10의 정수 중 하나이고, a1개의 R_3은 서로 동일하거나 상이하고,

R_4 내지 R_{10}는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기이고,

상기 R_{10a}는,

중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 $-N_3$;

중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$ 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기;

중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{21})(Q_{22})$, C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, C_1-C_{10} 알콕시기, C_3-C_{20} 시클로알킬기, C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_6-C_{30} 아릴렌기, C_6-C_{30} 헤테로아릴렌기, C_6-C_{30}아릴옥시기, C_6-C_{30}아릴티오기, 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_3-C_{20} 시클로알킬기, C_3-C_{20} 헤테로시클로알킬기, C_6-C_{30} 아릴렌기, C_6-C_{30} 헤테로아릴렌기, C_6-C_{30}아릴옥시기 또는 C_6-C_{30}아릴티오기; 또는

$-N(Q_{31})(Q_{32})$;이고,

상기 Q_1, Q_2, Q_{11}, Q_{12}, Q_{21}, Q_{22}, Q_{31}, 및 Q_{32}는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기이다.

청구항 2

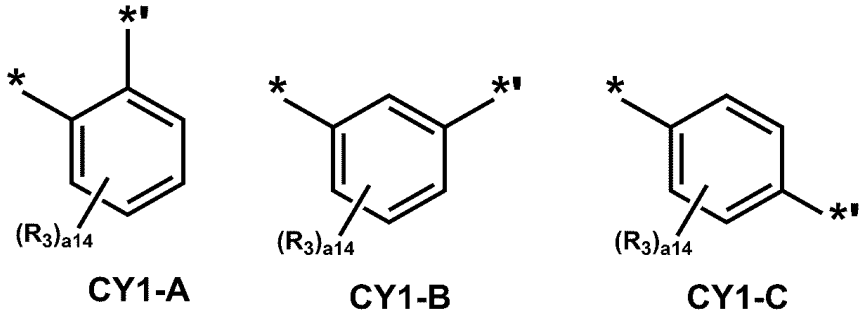
제1항에 있어서,

상기 CY_1은 페닐렌기 또는 나프탈렌기인, 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

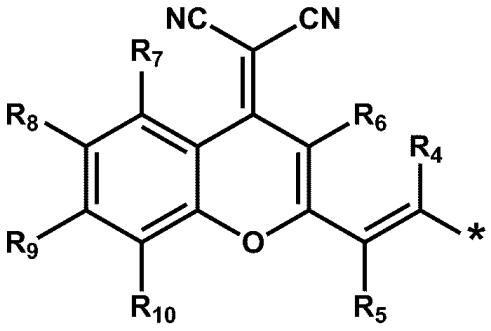
상기 CY_1은, 하기 화학식 CY1-A 내지 CY1-C로 표시되는 그룹 중 하나인, 화합물:

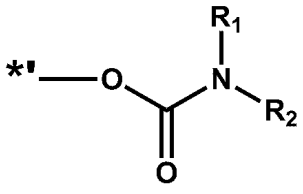


상기 화학식 CY1-A 내지 CY1-C 중,

R_3에 대한 설명은 제1항에 기재된 바를 참조하고,

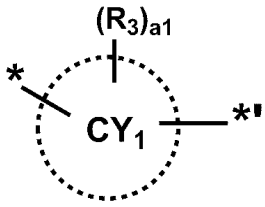
a14는 0 내지 4의 정수 중 하나이고,

*은 화학식 1 중  와의 결합 사이트이고,

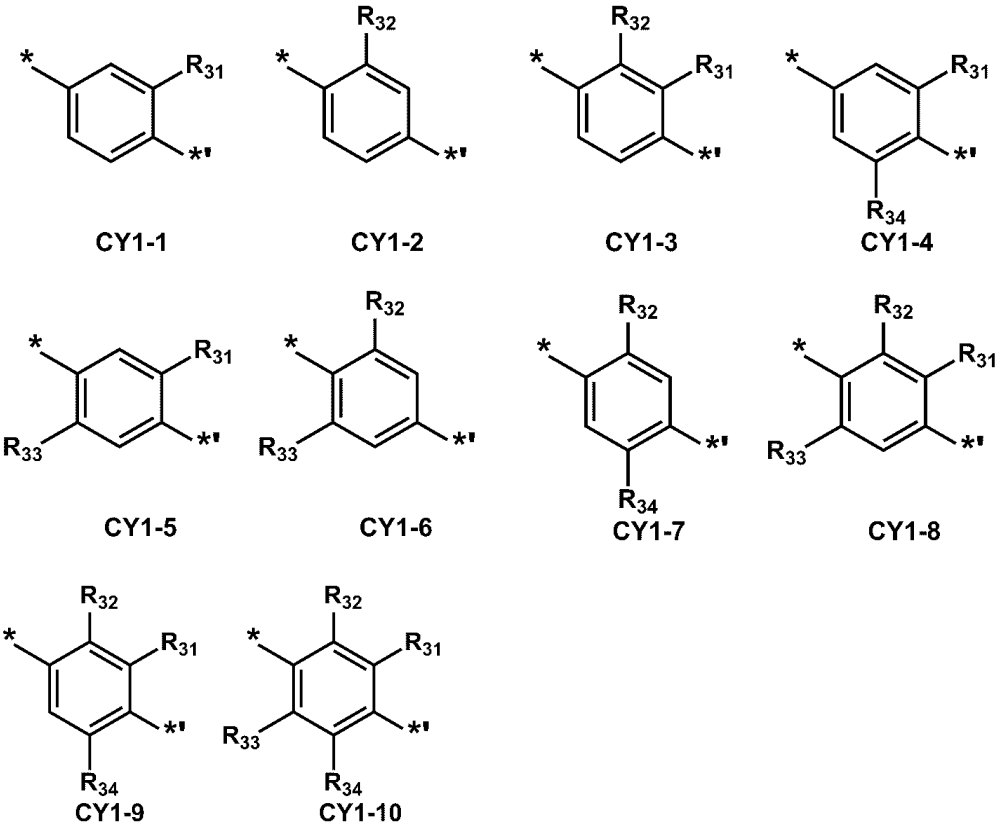
*'은 화학식 1 중  와의 결합 사이트이다.

청구항 4

제1항에 있어서,

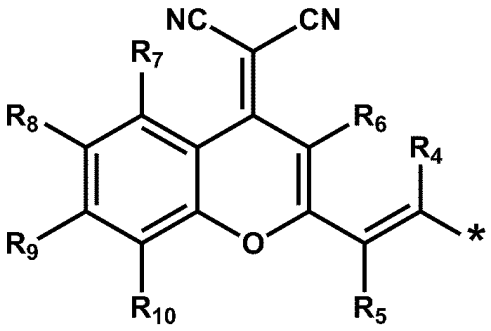


상기 화학식 1 중 로 표시되는 그룹은, 하기 화학식 CY1-1 내지 CY1-10으로 표시되는 그룹 중 하나인, 화합물:

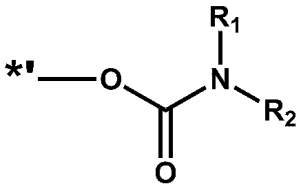


상기 화학식 CY1-1 내지 CY1-10 중,

R_{31} 내지 R_{34}는 각각 제1항에 기재된 R_3에 대한 설명을 참조하되, R_{31} 내지 R_{34}는 각각 수소가 아니고,



*은 화학식 1 중 와의 결합 사이트이고,



*'은 화학식 1 중 와의 결합 사이트이다.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 R_1 및 R_2는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 또는 시아노기; 또는

중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, 또는 C_1-C_{10} 알키닐기인, 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 R_1 및 R_2는 서로 동일한, 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 R_3는,

수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 $-N_3$;

중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$ 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기; 또는

$-N(Q_1)(Q_2)$;이고,

Q_1 및 Q_2에 대한 설명은 제1항에 기재된 바를 참조하는, 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 R_{10a}는,

중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 $-N_3$;

중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$ 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기; 또는

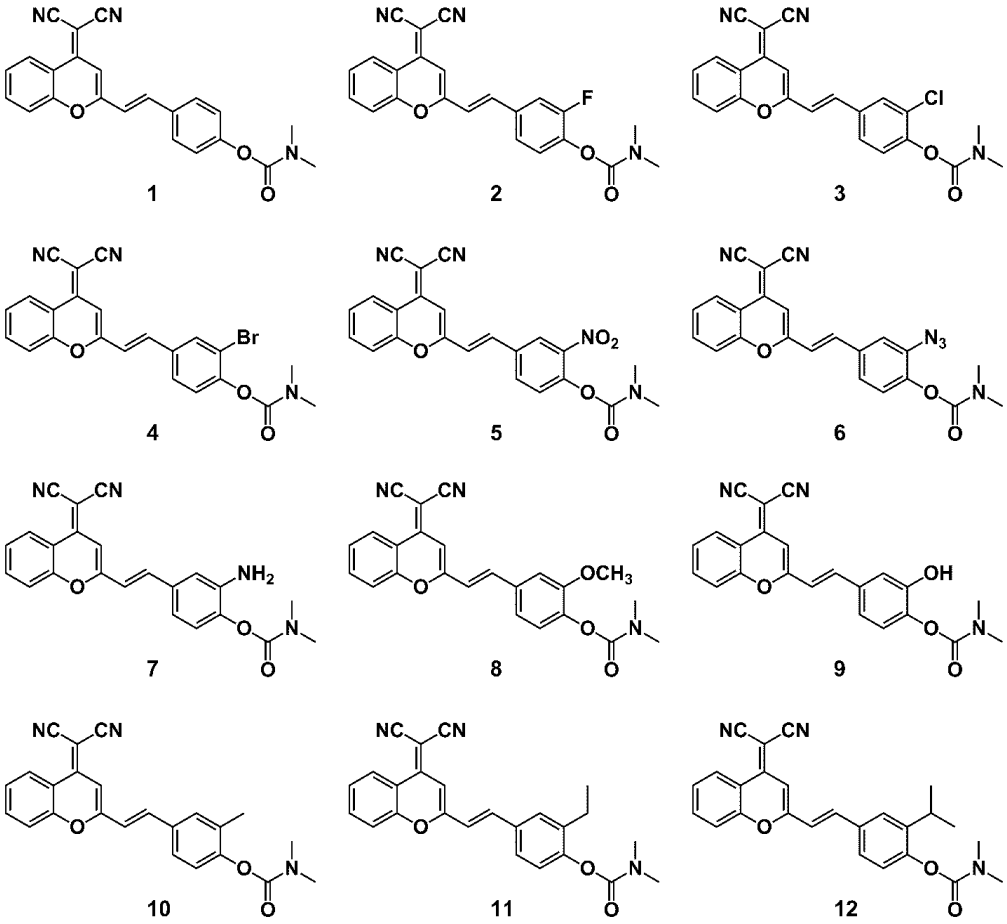
$-N(Q_{31})(Q_{32})$;이고,

상기 Q_{11}, Q_{12}, Q_{31}, 및 Q_{32}에 대한 설명은 제1항에 기재된 바를 참조하는, 화합물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 12 중 하나인, 화합물:



청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 암세포 검출용 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

대상체의 카르복실에스테라아제(carboxylesterase)와 반응하여 적색광을 방출하는, 암세포 검출용 약학 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

600 nm 이상 및 750 nm 이하의 방출 피크를 갖는, 암세포 검출용 약학 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

하기 식 1 및 2 중 적어도 하나를 만족하는, 암세포 검출용 약학 조성물:

<식 1>

△F(CE) > △F(BChE)

<식 2>

△F(CE) > △F(AChE),

상기 식 1 및 2 중,

△F(CE)는 상기 암세포 검출용 약학 조성물의 카르복실에스테라아제 첨가 전/후의 형광 강도의 차이 값이고,

△F(BChE)는 상기 암세포 검출용 약학 조성물의 부티릴콜린에스테라아제(butyrylcholinesterase) 첨가 전/후의 형광 강도의 차이 값이고,

△F(AChE)는 상기 암세포 검출용 약학 조성물의 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase) 첨가 전/후의 형광 강도의 차이 값이고,

상기 형광 강도는 형광분광광도계에 의해 측정한 값이다.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 암세포는, 유방암, 신장암, 고환암, 전립선암, 난소암, 자궁암, 질암, 난관암, 직장암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 소장암, 췌장암, 구강암, 흑색종, 또는 육종을 포함하는 세포인, 암세포 검출용 약학 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 형광 프로브.

청구항 16

제15항에 있어서,

근적외선을 발광하는 이광자 형광 프로브인, 형광 프로브.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 형광 프로브를 포함하는, 형광 센서.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 화합물, 이를 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 형광 이미징은 정확한 진단을 위한 생체 내 효소 활성도의 선택적 이미징 및 암 치료 및 해당 약물 치료의 평가를 위해 사용된다. 이는 형광 이미징은 감도 및 선택도가 우수하고, 원 위치(in situ) 및 실시간 검출이 가능하며, 우수한 시공간 해상도 및 비침입성 모니터링이 가능하기 때문이다. 특히, 근적외선 이광자 형광 이미징은 자발 형광을 감소시키고, 조직 침투력 및 해상도가 증가하므로 생체 내(in vivo) 효소 활성도의 이미징에 유리하다.

[0003] 암세포의 바이오 마커(예를 들어, 간암세포의 카르복실에스테라아제 (carboxylesterase, CE))를 형광 이미징할 수 있다면 암을 정확하게 진단하고, 약물 치료에 따른 치료 효과를 정확하게 판단할 수 있다. 바이오 마커의 형광 이미징에 있어서는 우수한 선택도가 요구되는데, 이는 바이오 마커에 결합될 수 있는 형광 프로브의 인식 부위가 영향을 미친다. 예를 들어, 카르복실에스테라아제의 형광 프로브는 인식 부위로 아세틸기의 에스테르 부분을 사용하고 있으나, 상기 인식 부위는 부티릴콜린에스테라아제 및 아세틸콜린에스테라아제의 인식 부위로도 사용할 수 있어, 형광 프로브의 선택도 및 정확도가 감소하는 문제가 있다.

[0004] 따라서, 이러한 문제를 해결하기 위하여 바이오 마커에 대한 선택도 및 정확도가 우수한 화합물, 이를 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브에 대한 요구가 여전히 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 측면은 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 측면은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또다른 측면은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 형광 프로브를 제공하는 것이다.

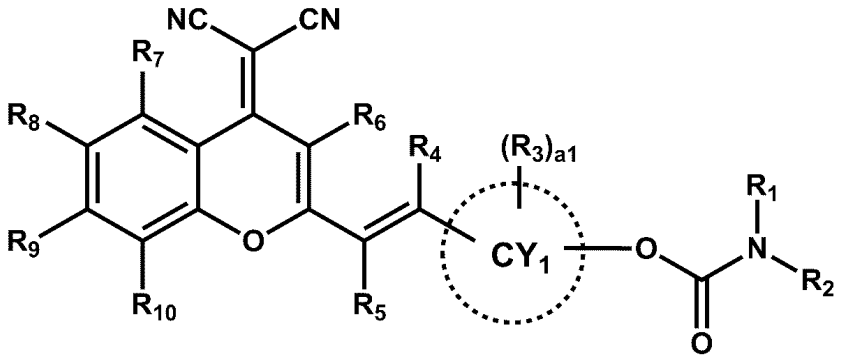
[0008] 또다른 측면은 상기 형광 프로브를 포함한 형광 센서를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 측면에 따라,

[0010] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제공된다:

[0011] <화학식 1>

[0012] 

[0013] 상기 화학식 1에서,

[0014] CY_1은 C_6-C_{60} 아릴렌기 또는 C_6-C_{60} 헤테로아릴렌기이고,

[0015] R_1 및 R_2는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알케닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알키닐기, 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알콕시기이고,

[0016] R_3은, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알케닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알키닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알콕시기, 또는 $-N(Q_1)(Q_2)$이고,

[0017] a1은 0 내지 10의 정수 중 하나이고, a1개의 R_3은 서로 동일하거나 상이하고,

[0018] R_4 내지 R_{10}는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기이고,

[0019] 상기 R_{10a}는,

[0020] 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 $-N_3$;

[0021] 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$ 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기;

[0022] 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{21})(Q_{22})$, C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, C_1-C_{10} 알콕시기, C_3-C_{20} 시클로알킬기, C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_6-C_{30} 아릴렌기,

C_6-C_{30} 헤테로아릴렌기, C_6-C_{30}아릴옥시기, C_6-C_{30}아릴티오기, 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_3-C_{20} 시클로알킬기, C_3-C_{20} 헤테로시클로알킬기, C_6-C_{30} 아릴렌기, C_6-C_{30} 헤테로아릴렌기, C_6-C_{30}아릴옥시기 또는 C_6-C_{30}아릴티오기; 또는

[0023] -N(Q_{31})(Q_{32});이고,

[0024] 상기 Q_1, Q_2, Q_{11}, Q_{12}, Q_{21}, Q_{22}, Q_{31}, 및 Q_{32}는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기이다.

[0025] 다른 측면에 따라, 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;을 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물이 제공된다.

[0026] 또 다른 측면에 따라, 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;을 포함하는 형광 프로브가 제공된다.

[0027] 또 다른 측면에 따라, 전술한 형광 프로브를 포함하는 형광 센서가 제공된다.

발명의 효과

[0028] 일 측면에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물인 신규한 화합물이 제공될 수 있다. 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물 및 형광 프로브는 암세포의 바이오마커와 반응하여 근적외선 영역에서 발광하고, 우수한 선택도를 가질 수 있다. 따라서 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 형광 프로브를 포함하는 형광 센서는, 암세포의 바이오마커에 대한 우수한 선택도, 정확도 및 안정성이 높아질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 일 구현예에 따른 화합물의 합성 경로 및 반응 경로이다.

도 2a는 비교예 1(CP)의 카르복실에스테라아제(carboxylesterase, CE), 부티릴콜린에스테라아제(butyrylcholinesterase, BChE), 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase, AChE)을 각각 첨가한 후의 정규화된 형광 강도이다. 도 2b는 합성예 1(DCM-C1-CE)의 용액에 CE, BChE 및 AChE을 각각 첨가한 전/후의 형광 강도의 차이를 측정한 값이다.

도 3은 합성예 1의 용액에 CE를 첨가한 전/후의 형광 스펙트럼이다.

도 4는 합성예 1의 용액의 CE의 농도에 따른 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 합성예 1의 용액에 저해종 1 내지 11을 각각 첨가한 후의 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 6은 합성예 1을 CE 및 각각 다른 농도의 비스(4-니트로페닐)포스페이트(bis(4-nitrophenyl)phosphate, BNPP)에 각각 첨가한 후의 형광 스펙트럼이다.

도 7은 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG), 합성예 1의 가수분해물(DCM-C1-OH) 및 합성예 1의 용액 각각의 시간에 따른 흡수 스펙트럼이다.

도 8은 합성예 1의 간암 세포(HepG2) 및 정상적인 간 세포(LO2) 각각에서 시간에 따른 일광자 형광 이미징 결과이다.

도 9은 도 8에서의 상대적인 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 10는 상업용 키트로 HepG2 및 LO2 각각에서 측정한 CE 수준을 나타낸 그래프이다.

도 11은 HepG2에서 합성예 1의 CE 활성도의 이미징 방법의 모식도이다.

도 12은 HepG2에서 CE활성도의 이광자 공초점 형광 이미징 결과이다.

도 13는 도 12에서의 상대적인 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 14은 HepG2에서 CE의 상대적인 수준을 측정한 결과로, a) 항암제(sorafenib)을 12시간 동안 처리한 경우 및 b) 항암제를 투여하지 않은 경우이다.

도 15는 HepG2-이종 이식된 쥐에 합성예 1의 종양 내 주사한 이후, 시간에 따른 CE 활성을 측정한 형광 이미징 결과이다.

도 16는 항암제를 처리한 쥐에서 합성예 1의 CE 활성도 이미징 측정에 대한 모식도이다.

도 17은 소라페닙 및 이중 이미징을 처리한 쥐의 타임라인이다.

도 18은 동소 종양이 있는 쥐를 소라페닙 및 합성예 1을 투여한 이후 CE 활성도를 측정한 형광 이미징 결과이다.

도 19은 도 18의 쥐에서 각각의 장기에 대한 형광 이미징 결과이다.

도 20는 도 19의 각 장기별 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 21은 동소 간 종양에서 각각 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색, Masson's 염색 및 regional terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling(TUNEL) 염색 결과이다.

도 22은 소라페닙 및 합성예 1을 동소 간 종양이 있는 쥐에 처리한 후, CE 활성도의 생체 내 3D 이미징 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 일 구현예에 따른 화합물, 이를 포함하는 암세포 검출용 약학 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브에 관하여 상세히 설명하기로 한다. 이하는, 예시로서 제시되는 것으로서 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 특허청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

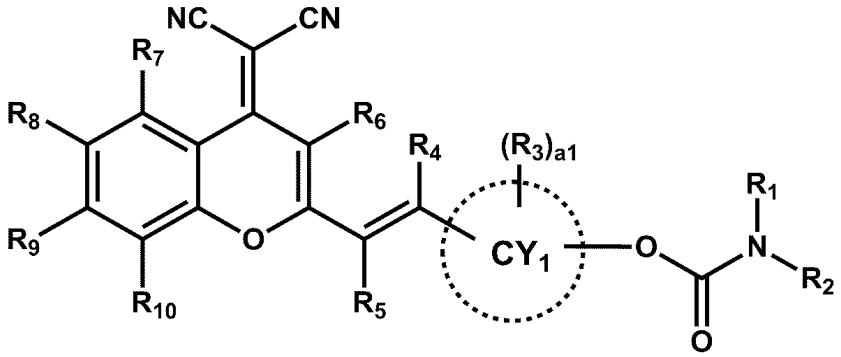
[0031] 본 명세서에서 "포함"이라는 용어는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개재할 수 있음을 나타내도록 사용된다.

[0032] 본 명세서에서 "이들의 조합"이라는 용어는 기재된 구성요소들 하나 이상과의 혼합 또는 조합되는 것을 의미한다.

[0033] 본 명세서에서 "약학적으로 허용가능한 염"은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1 등으로 표시되는 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, 메테인설폰산, 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 들어, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 바이벤제이트, 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 트리플루오로아세테이트일 수 있다.

[0034] 일 구현예에 따른 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

[0035] <화학식 1>

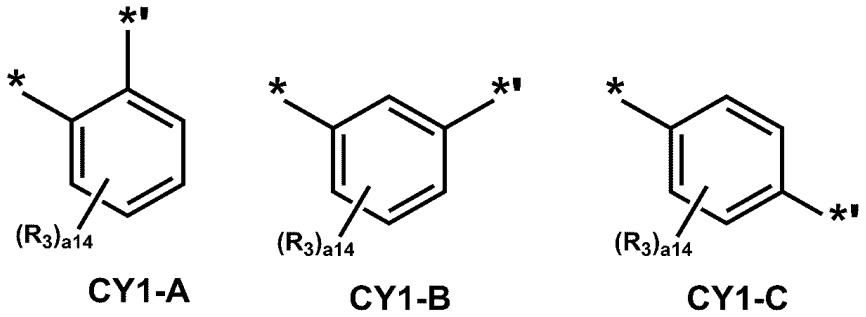


[0036]

[0037] 상기 화학식 1 중, CY_1은 C_6-C_{60} 아릴렌기 또는 C_6-C_{60} 헤테로아릴렌기일 수 있다.

[0038] 일 구현예에 따르면, 상기 CY_1은 페닐렌기 또는 나프탈렌기일 수 있다.

[0039] 일 구현예에 따르면, 상기 CY_1은, 하기 화학식 CY1-A 내지 CY1-C로 표시되는 그룹 중 하나일 수 있다:

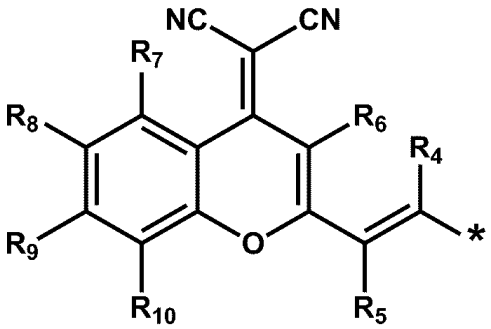


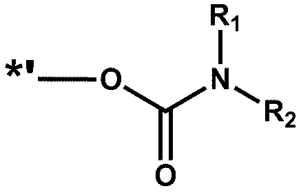
[0040]

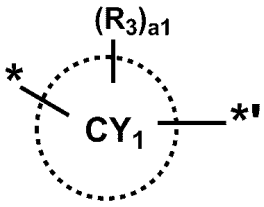
[0041] 상기 화학식 CY1-A 내지 CY1-C 중,

[0042] R_3에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조하고,

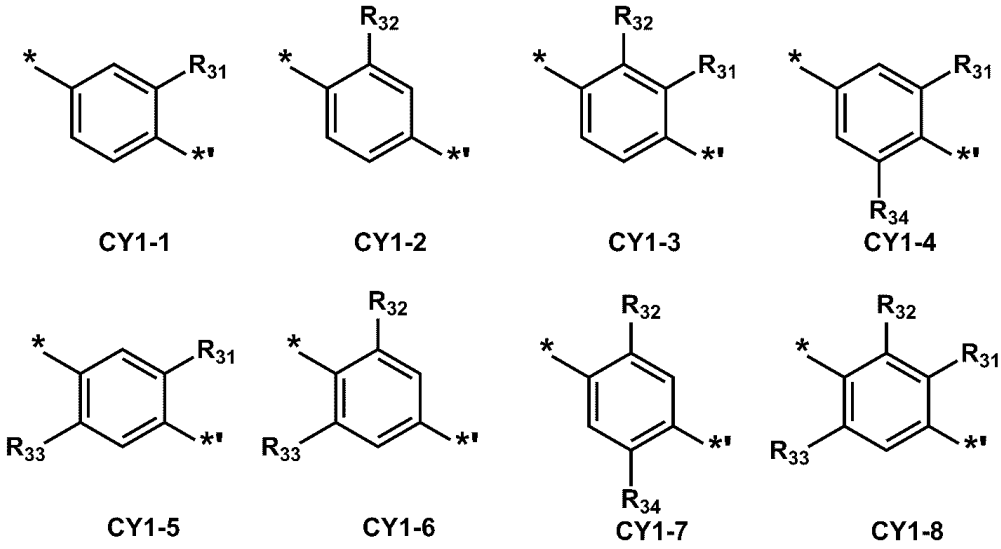
[0043] a14는 0 내지 4의 정수 중 하나이고,

[0044] *은 화학식 1 중  와의 결합 사이트이고,

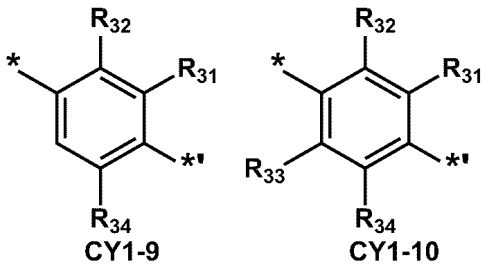
[0045] *'은 화학식 1 중  와의 결합 사이트이다.



[0046] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중 로 표시되는 그룹은, 하기 화학식 CY1-1 내지 CY1-10으로 표시되는 그룹 중 하나일 수 있다:



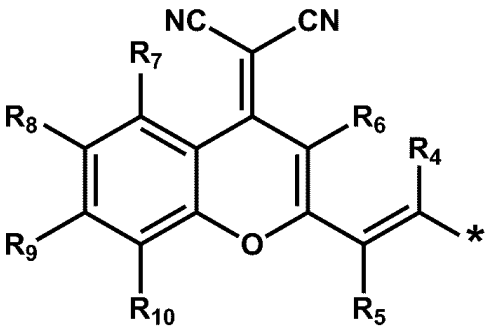
[0047]



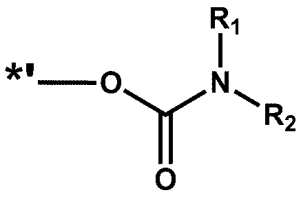
[0048]

[0049] 상기 화학식 CY1-1 내지 CY1-10 중,

[0050] R_{31} 내지 R_{34}는 각각 본 명세서에 기재된 R_3에 대한 설명을 참조하되, R_{31} 내지 R_{34}는 각각 수소가 아니고,



[0051] *은 화학식 1 중 와의 결합 사이트이고,



[0052] *'은 화학식 1 중 와의 결합 사이트이다.

[0053] 상기 화학식 1 중, R_1 및 R_2는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기,

적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알케닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알키닐기, 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알콕시기일 수 있다. R_{10a}에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0054] 일 구현예에 따르면, 상기 R_1 및 R_2는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 또는 시아노기; 또는

[0055] 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, 또는 C_1-C_{10} 알키닐기일 수 있다.

[0056] 일 구현예에 따르면, 상기 R_1 및 R_2는 서로 동일할 수 있다.

[0057] 상기 화학식 1 중, R_3은, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알케닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알키닐기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알콕시기, 또는 $-N(Q_1)(Q_2)$일 수 있다. R_{10a}, Q_1, 및 Q_2에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0058] 일 구현예에 따르면, 상기 R_3는, 수소, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 $-N_3$;

[0059] 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$ 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기; 또는

[0060] $-N(Q_1)(Q_2)$;일 수 있다. Q_1, 및 Q_2에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0061] 상기 화학식 1 중, a1은 0 내지 10의 정수 중 하나일 수 있다. a1개의 R_3은 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

[0062] 예를 들어, 상기 a1은 0 내지 4의 정수 중 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 상기 화학식 1 중 R_4 내지 R_{10}는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알킬기일 수 있다. R_{10a}에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0064] 일 구현예에 따르면, 상기 R_4 내지 R_{10}는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기일 수 있다. R_{10a}에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0065] 상기 화학식 1 중 R_{10a}는,

[0066] 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 $-N_3$;

[0067] 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$ 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기;

[0068] 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{21})(Q_{22})$, C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, C_1-C_{10} 알콕시기, C_3-C_{20} 시클로알킬기, C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_6-C_{30} 아릴렌기, C_6-C_{30} 헤테로아릴렌기, C_6-C_{30}아릴옥시기, C_6-C_{30}아릴티오기, 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_3-C_{20} 시클로알킬기, C_3-C_{20} 헤테로시클로알킬기, C_6-C_{30} 아릴렌기, C_6-C_{30} 헤테로아릴렌기, C_6-C_{30}아릴옥시기 또는 C_6-C_{30}아릴티오기; 또는

[0069] $-N(Q_{31})(Q_{32})$;일 수 있다. 상기 Q_{11}, Q_{12}, Q_{21}, Q_{22}, Q_{31}, 및 Q_{32}는 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0070] 일 구현예에 따르면, 상기 R_{10a}는,

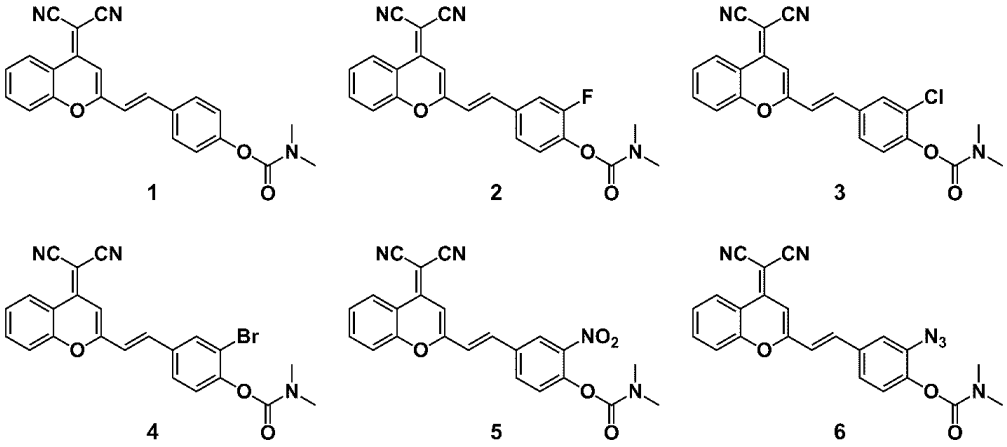
[0071] 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 $-N_3$;

[0072] 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, $-N_3$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$ 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기; 또는

[0073] $-N(Q_{31})(Q_{32})$;일 수 있다. 상기 Q_{11}, Q_{12}, Q_{31}, 및 Q_{32}에 대한 설명은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0074] 상기 화학식 1 중 Q_1, Q_2, Q_{11}, Q_{12}, Q_{21}, Q_{22}, Q_{31}, 및 Q_{32}는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D), C_1-C_{10} 알킬기, C_1-C_{10} 알케닐기, C_1-C_{10} 알키닐기, 또는 C_1-C_{10} 알콕시기이다.

[0075] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 12 중 하나일 수 있다:

[0076] 

[0077]

[0078] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 R_1 및 R_2로 치환된 카르바메이트기를 포함하므로, 상기 카르바메이트기가 인식 부위로 작용하여, 바이오마커에 대한 선택도가 증가할 수 있다.

[0079] 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 링커로서 R_3가 치환된 CY_1 모이어티를 포함하므로, 인식 부위와 형광단 간 입체적 장애를 감소할 수 있어, 정확도 및 형광 강도가 증가할 수 있다.

[0080] 따라서, 상기 화합물은 생체 내(in vivo) 및 원 위치(in situ)에서의 형광 이미징이 가능하여, 우수한 선택도, 정확도, 광학적 및 열적 안정성을 갖는 암 세포 검출용 약학 조성물, 형광 프로브 및 형광 센서에 사용될 수 있다.

[0081] 다른 측면에 따르면, 본 명세서에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 암세포 검출용 약학 조성물이 제공될 수 있다.

[0082] 일 구현예에 따르면, 상기 암세포 검출용 약학 조성물은 물, 버퍼용액, 또는 유기용매;를 더 포함할 수 있다.

[0083] 일 구현예에 따르면, 상기 암세포 검출용 약학 조성물은 대상체의 카르복실에스테라아제(carboxylesterase)와 반응하여 적색광을 방출할 수 있다. 여기서 대상체는 인간을 제외한 포유류를 의미한다.

[0084] 일 구현예에 따르면, 상기 암세포 검출용 약학 조성물은 600 nm 이상 및 750 nm 이하의 방출 피크를 가질 수 있다.

[0085] 예를 들어, 상기 암세포 검출용 약학 조성물은 600 nm 이상 및 750 nm 이하의 방출 피크을 가질 수 있다.

[0086] 일 구현예에 따르면, 상기 암세포 검출용 약학 조성물은 하기 식 1 및 2 중 적어도 하나를 만족할 수 있다:

[0087] <식 1>

[0088] △F(CE) > △F(BChE)

[0089] <식 2>

[0090] △F(CE) > △F(AChE),

[0091] 상기 식 1 및 2 중,

[0092] △F(CE)는 상기 암세포 검출용 약학 조성물의 카르복실에스테라아제 첨가 전/후의 형광 강도의 차이 값이고,

[0093] △F(BChE)는 상기 암세포 검출용 약학 조성물의 부티릴콜린에스테라아제(butyrylcholinesterase) 첨가 전/후의 형광 강도의 차이 값이고,

[0094] △F(AChE)는 상기 암세포 검출용 약학 조성물의 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase) 첨가 전/후의 형광 강도의 차이 값이고,

[0095] 상기 형광 강도는 형광분광광도계에 의해 측정한 값이다. 측정 방법은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

[0096] 일 구현예에 따르면, 상기 암세포 검출용 약학 조성물 중 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 가수분해물의 산해리 상수(pKa)는 7.00 이상 및 7.50 이하일 수 있다.

[0097] 예를 들어, 상기 산해리 상수(pKa)는 7.18일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다..

[0098] 일 구현예에 따르면, 상기 암세포 검출용 약학 조성물 중 상기 암세포는, 유방암, 신장암, 고환암, 전립선암, 난소암, 자궁암, 질암, 난관암, 직장암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 소장암, 췌장암, 구강암, 흑색종, 또는 육종을 포함하는 세포일 수 있다.

[0099] 예를 들어, 상기 암세포는 간암 세포일 수 있다.

[0100] 다른 측면에 따르면, 본 명세서 중 상기 화학식 1 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 형광 프로브가 제공될 수 있다.

[0101] 일 구현예에 따르면, 상기 형광 프로브는 근적외선을 발광하는 이광자 형광 프로브일 수 있다.

[0102] 다른 측면에 따르면, 상기 형광 프로브를 포함하는 형광 센서가 제공될 수 있다.

[0103] 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.

[0104] 본 명세서에서, "탄소수 a 내지 b" 또는 "C_a-C_b"의 a 및 b는 특정 작용기(group)의 탄소수를 의미한다. 즉, 상기 작용기는 a 부터 b까지의 탄소원자를 포함할 수 있다. 예를 들어, "탄소수 1 내지 4의 알킬렌기" 또는 "C_1-C_4의 알킬렌기"는 1 내지 4의 탄소를 가지는 알킬렌기, 즉, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-(CH_3)_2C-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ and $-(CH_3)_2C-$를 의미한다.

[0105] 본 명세서에서, "알킬"이라는 용어는 분지된 또는 분지되지 않은 지방족 탄화수소를 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.

[0106] 본 명세서에서, "알케닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 의미한다. 알케닐기의 비제한적인 예로는 비닐, 알릴, 부테닐, 이소프로페닐, 또는 이소부테닐 등을 들 수 있다.

[0107] 본 명세서에서, "알키닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 알키닐기의 비제한적인 예로는 에티닐, 부티닐, 이소부티닐, 이소프로피닐 등을 들 수 있다.

[0108] 본 명세서에서, "알콕시"라는 용어는, $-OA_1$(여기서, A_1은 알킬기임)의 화학식을 갖는 1가 그룹을 의미하며, 이의 구체예에는, 메톡시기, 에톡시기, 이소프로필옥시기 등이 포함된다.

[0109] 본 명세서에서, "시클로알킬"이라는 용어는 1가 포화 탄화수소 모노시클릭을 의미한다. 시클로알킬기의 비제한적인 예로는 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 들 수 있다.

[0110] 본 명세서에서, "헤테로시클로알킬"이라는 용어는 N, O, Si, P 및 S 중에서 선택된 적어도 하나의 헤테로 원자를 고리-형성 원자로서 포함한 1가 모노시클릭을 의미한다. 헤테로시클로알킬기의 비제한적인 예로는 1,2,3,4-옥사트리아졸리디닐기(1,2,3,4-oxatriazolidinyl), 테트라히드로퓨라닐기(tetrahydrofuranyl), 테트라히드로티오페닐기 등을 들 수 있다.

[0111] 본 명세서에서, "시클로알케닐"이라는 용어는 1가 모노시클릭으로서, 고리 내에 적어도 하나의 이중 결합을 가지거나, 방향족성(aromaticity)을 갖지 않는 것을 의미한다. 시클로알케닐기의 비제한적인 예로는 시클로펜테닐기, 시클로헥세닐기, 시클로헵테닐기 등을 들 수 있다.

[0112] 본 명세서에서, "헤테로시클로알케닐"이라는 용어는 N, O, Si, P 및 S 중에서 선택된 적어도 하나의 헤테로 원자를 고리-형성 원자로서 포함한 1가 모노시클릭으로서, 고리 내에 적어도 하나의 이중결합을 갖는 것을 의미한다. 헤테로시클로알케닐기의 비제한적인 예로는, 4,5-디히드로-1,2,3,4-옥사트리아졸일기, 2,3-디히드로퓨라닐기, 2,3-디히드로티오페닐기 등을 들 수 있다.

[0113] 본 명세서에서, "아릴"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-, -C(=O)-, $-S(=O)_2-$, $-Si(R_a)(R_b)-$(R_a 및 R_b는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로겐으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 -C(=O)-NH-에 의하여 서로 연결된 고리를 의미한다. 아릴기가 고리 시스템이면, 상기 시스템에서 각각의 고리는 방향족이다. 예를 들어, 아릴기는 페닐기, 비페닐기, 나프틸기, 페날트레닐기(phenanthrenyl), 나프타세닐기(naphthacenyl) 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0114] 본 명세서에서, "헤테로아릴"이라는 용어는 N, O, P 또는 S 중에서 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 나머지 고리원자가 탄소인 모노시클릭(monocyclic) 또는 바이시클릭(bicyclic) 유기 화합물을 의미한다. 상기 헤테로아릴기는 예를 들어 1-5개의 헤테로원자를 포함할 수 있고, 5-10 고리 멤버(ring member)를 포함할 수 있다. 상기 S 또는 N은 산화되어 여러가지 산화 상태를 가질 수 있다.

[0115] "헤테로아릴"의 비제한적인 예로는, 티에닐, 푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴기, 1,2,3-티아디아졸릴, 1,2,4-티아디아졸릴, 1,2,5-티아디아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 이소티아졸-3-일, 이소티아졸-4-일, 이소티아졸-5-일, 옥사졸-2-일, 옥사졸-4-일, 옥사졸-5-일, 이소옥사졸-3-일, 이소옥사졸-4-일, 이소옥사졸-5-일, 1,2,4-트리아졸-3-일, 1,2,4-트리아졸-5-일, 1,2,3-트리아졸-4-일, 1,2,3-트리아졸-5-일, 테트라졸릴, 피리드-2-일, 피리드-3-일, 2-피라진-2일, 피라진-4-일, 피라진-5-일, 2- 피리미딘-2-일, 4- 피리미딘-2-일, 또는 5-피리미딘-2-일 등을 들 수 있다.

[0116] 본 명세서에서, "아릴옥시" 라는 용어는 $-OA_2$(여기서, A_2는 아릴기임)를 가리키고, "아릴티오기(arylthio)"라는 용어는 $-SA_3$(여기서, A_3은 아릴기임)를 가리킨다.

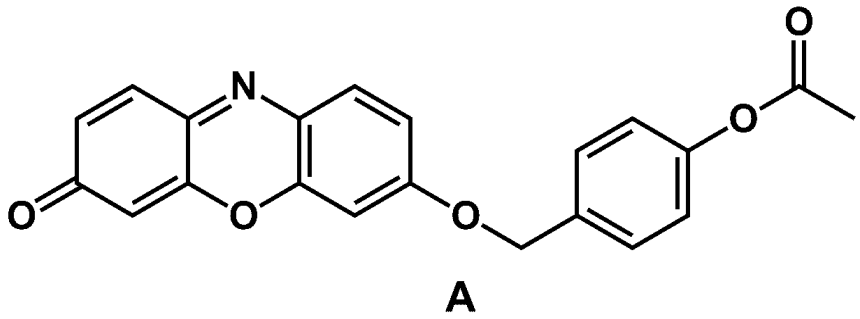
[0117] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일 실시예일뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0118] **[실시예]**

[0119] 모든 실험은 불활성 질소 분위기 하에 수행하였다. 무수-등급 용매(Aldrich), 분광강도-등급 용매 및 모든 상용되는 시약은 받은 그대로 사용하였다. ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼은 주변 온도에서 Bruker AM 300 (300.13 MHz for ^{1}H, 75.48 MHz for ^{13}C) 분광계로 기록하였다. Fast Atom Bombardment Mass Spetrum은 Jeol JMS 700을 사용하여 측정하였다. UV 흡수 스펙트럼은 Thermo Scientific Evolution 201 UV/VIS 스펙트로미터로 측정하였다. 형광 스펙트럼은 JASCO FP8500 및 Scinco FS-2를 사용하여 측정하였다. 공초점 현미경은 Zeiss LSM 880 NLO 이광자 레이저 스캐닝 공초점 현미경, Olympus FV3000 일광자 레이저 스캐닝 공초점 현미경 및 Perkinelmer IVIS Lumina XPMS Seires III In Vivo Imaging System으로 측정하였다. Cell counting kit-8(CCK-8)의 데이터는 카르복실에스테라아제(CE)의 세포 독성 및 상용 키트는 microplate reader(BIO-TEK Synergy HTX)에 기록하였다.

[0120] Bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA), alkaline phosphatase (ALP), β-glucosidase, CE, CES1, CES2, acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), xanthine oxidase, 감자로부터 얻은 아피라아제, monoamine oxidase A (MAO-A) 및 monoamine oxidase B (MAO-B)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. CE 수준 측정을 위한 상용화 키트는 NanJing JianCheng Bioengineering Institute (Nanjing, China)로부터 구입하였다. HepG2 및 LO2 세포는 KeyGEN BioTECH Co. LTD (Nanjing, China)로부터 구입하였다.

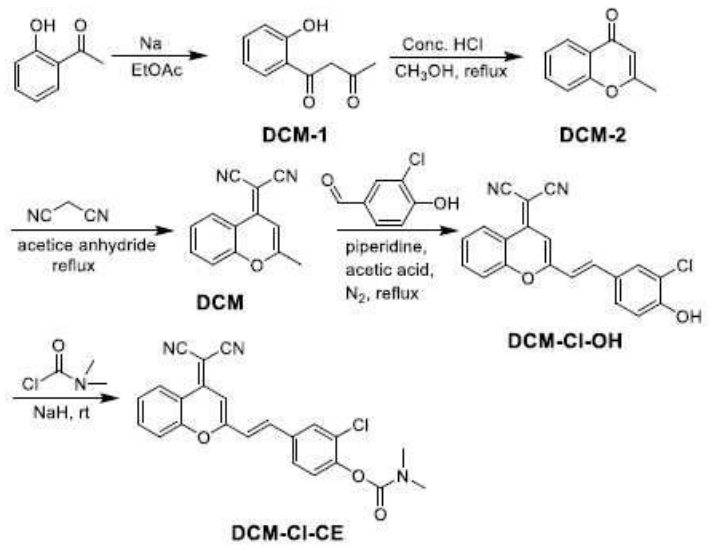
[0121] 합성예 1(DCM-Cl-CE, 화합물 3) 및 비교예 1에 사용된 하기 CP(화합물 A)는 각각 DMSO에 용해하여, 스톡용액(1.0 mM)으로 사용하였다.

[0122] 

A

[0123] 하기 합성예 1에 의해 제조된 화합물에 대한 반응스킴 1은 다음과 같다:

[0124] <반응스킴 1>

[0125] 

[0126] **<u>합성예 1: DCM-Cl-CE(화합물 3)의 합성</u>**

[0127] 1) DCM-1의 합성

[0128] 2-hydroxyacetophenone (5.0 g, 36.75 mmol)을 100 mL의 에틸 아세테이트에 용해시킨 후, 소듐(4.30 g, 0.19 mmol)을 첨가하였다. 반응 후 잔류한 소듐을 제거하기 위해 용액에 메탄올(5 mL)을 첨가하고, 상온에서 18시간

동안 교반하였다. 반응액이 검정색으로 변할 때까지 HCl (0.5 M, 50 mL)을 한 방울씩 첨가하고, 남은 HCl 용액을 전부 첨가하였다. 용액을 에틸 아세테이트로 추출하여 유기물을 얻었다. 상기 유기물을 Na_2SO_4로 건조, 여과 및 농축시켜 노란색 고체인, DCM-1(4.6g)을 얻었다.

[0129] 2) DCM-2의 합성

[0130] 농축된 염산(1.2 mL)를 메탄올(30 mL)에 용해한 DCM-1 (4.2 g, 24.0mmol) 용액에 천천히 첨가하였다. 환류를 위해 상기 혼합액을 4시간 동안 가열하였다. 용액은 감압 하에 증발시키고, 에틸아세테이트 및 포화 식염수로 추출하여 유기물을 얻었다. 상기 유기물을 회전 증발기로 농축시키고, 잔류물을 실리카 크로마토그래피(

[0131] CH_2Cl_2:CH_3OH (v/v, 200:1 내지 50:1))로 정제시켜 노란색 고체인, DCM-2(3.5 g, 92.7%)를 얻었다.

[0132] ^{1}H-NMR (300 MHz, 298 K, MeOD): δ 8.04-8.01 (m, 1H), 7.72-7.66 (m, 1H), 7.50-7.47 (m, 1H), 7.41-7.36 (m, 1H), 6.18 (d, J = 0.66 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H).

[0133] ^{13}C-NMR (75 MHz, 298 K, MeOD): δ 179.2, 168.3, 156.7, 134.0, 125.1, 124.7, 117.8, 113.1, 109.4, 19.1.

[0134] HR-ESI-MS: *m/z* calcd DCM-2 ($C_{10}H_9O_2$, [M+H]+), 160.0524; found, 160.0526.

[0135] 3) DCM의 합성

[0136] DCM-2 (3.3 g, 20.6 mmol) 및 malononitrile (1.58 g, 23.9 mmol)을 아세트산 무수물(30 Ml)에 용해하였다. 상기 용액을 14시간 동안 환류하고, 용매를 증발하였다. 탈이온수(100 mL)를 잔류물에 첨가하고 0.5시간 동안 환류한 후, CH_2Cl_2로 추출하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조 및 여과하였다. 수득된 생성물을 실리카 크로마토그래피로 정제하여 노란색 고체인 DCM (3.3 g, 77%)을 얻었다.

[0137] ^{1}H-NMR (300 MHz, 298 K, CDCl3): δ 8.92 (m, 1H), 7.77-7.71 (m, 1H), 7.50-7.43 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 2.46 (d, J = 0.51, 3H).

[0138] ^{13}C-NMR (75 MHz, 298 K, CDCl3): δ 161.9, 153.3, 152.9, 134.6, 126.0, 125.8, 118.7, 117.5, 116.6, 115.5, 105.5, 62.2, 20.5.

[0139] HR-ESI-MS: *m/z* calcd for DCM (C13H9N2O , [M+H]+), 209.0715; found, 209.0714.

[0140] 4) DCM-Cl-OH의 합성

[0141] DCM (0.42 g, 2.0 mmol) 및 3-chloro-4-hydroxybenzaldehyde (0.31 g, 2.0 mmol) 을 톨루엔(30 mL), piperidine (2 mL) 및 acetic acid (2 mL)에 질소 분위기 하 상온에서 용해하였다. 용액을 에틸 아세테이트로 추출하고 유기층은 Na_2SO_4로 건조, 여과 및 농축시켜 유기물을 얻었다. 상기 유기물을 실리카 크로마토그래피로 정제하여 진홍색의 DMC-Cl-OH (0.52 g, 75%)를 얻었다.

[0142] ^{1}H-NMR (300 MHz, 298 K, DMSO-d6): δ 10.93 (s, 1H), 8,72 (dd, J = 1.14, 1.17 Hz, 1H), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.84 (d, J = 1.92 Hz, 1H), 7.75-7.71 (m, 1H), 7.65-7.51 (m, 1H), 7.38 (d, J = 15.99 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.43 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H).

[0143] ^{13}C-NMR (75 MHz, 298 K, DMSO-d6): δ 158.8, 153.3, 152.4, 138.0, 135.8, 130.0, 129.4, 127.9, 126.6, 125.1, 121.1, 119.4, 118.0, 117.7, 117.6, 117.4, 116.4, 106.7, 60.2. HR-ESI-MS: *m/z* calcd for DCM-Cl-OH (C20H11N2O2NaCl, [M+Na]+), 369.0407; found, 369.0406.

[0144] 5) DCM-Cl-CE(화합물 3)의 합성

[0145] DCM-Cl-OH (0.35 g, 1.0 mmol), NaH (0.05 g, 2.0 mmol)을 ACN (30 mL)에 용해한 후, Me_2NCOCl (0.18 mL, 2 mmol)을 상온에서 첨가하였다. 상기 용액의 색깔이 검정색에서 녹색으로 변화였고, 용액을 12시간 동안 상온에서 교반하였다. 반응액을 증발시키고 실리카 젤 크로마토그래피(CH_3OH:CH_2Cl_2 (v/v, 0 내지 1:50))로 정제하여 노란색 고체의 DCM-Cl-CE (0.16 g, 38%)을 얻었다.

[0146] ^{1}H-NMR (300 MHz, 298 K, CDCl3): δ 8.95 (dd, J = 1.23, 1.29 Hz, 1H), 7.80-7.74 (m, 1H), 7.67 (d, J =

2.04, 1H), 7.59-7.45 (m, 4H), 6.89 (s, 1H), 6.81 (d, J = 15.93 Hz, 1H), 3.19 (s, sH), 3.07 (s, 3H).

[0147] ^{13}C-NMR (75 MHz, 298 K, CDCl3): δ 156.8, 153.4, 152.7, 152.3, 149.1, 136.5, 134.8, 133.1, 129.3, 128.0, 127.0, 126.1, 125.8, 124.8, 124.7, 119.8, 118.6, 117.8, 116.6, 115.5, 107.4, 63.5, 36.9, 36.6.

[0148] HR-ESI-MS: *m/z* calcd for DCM-Cl-CE (C23H16N3O3NaCl, [M+Na]+), 440.0778; found, 440.0779 .

[0149] **분석예 1: 분광 분석**

[0150] 1) 형광 강도 측정

[0151] 5mL 시험관에 비교예 1(CP)(0.0000018 g), 및 DMSO (0.5 %, v/v)를 포함하는 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS) (0.01 mL, pH 7.4) 혼합액에 CE / BChE / AChE(1 U/mL)을 각각 첨가한 후, 총 부피가 2mL가 되도록 PBS를 더 첨가하여 용액을 얻었다. 상기 용액을 0.5 시간 동안 37℃에서 배양한 후, 광학 길이 1cm의 석영 셀로 옮겨 여기 파장(λ_{ex}, 550 nm) 및 방출 파장(λ_{em}, 582 nm)에서 형광을 측정하였다. 슬릿 폭은 2.5 nm 였다.

[0152] 2mL 시험관에 합성예 1(DCM-Cl-CE)(0.0000021 g)및 DMSO (30 %, v/v)를 포함하는 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS) (0.005 mL, pH 7.4) 혼합액에 CE / BChE / AChE (1 U/mL)을 각각 첨가한 후, 총 부피가 2 mL가 되도록 PBS를 더 첨가하여 용액을 얻었다. 상기 용액을 5시간 동안 37℃에서 배양한 후, 광학 길이 1cm의 석영 셀로 옮겨 여기 파장(λ_{ex}, 540 nm) 및 방출 파장(λ_{em}, 685 nm)에서 형광을 측정하였다. 슬릿 폭은 10 nm 였다.

[0153] 2) 흡광도 측정

[0154] 흡광도 측정을 위해 합성예 1 및 비교예 1 각각의 상기 용액 3 mL을 사용하였다. 또한, CE / BChE / AChE가 없는 혼합액에서도 흡광도를 측정하였다.

[0155] 도 2a는 비교예 1(CP)의 용액에 카르복실에스테라아제(carboxylesterase, CE), 부티릴콜린에스테라아제(butyrylcholinesterase, BChE), 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase, AChE)을 각각 첨가한 후의 정규화된 형광 강도이다. 도 2b는 합성예 1(DCM-Cl-CE)의 용액에 CE, BChE 및 AChE을 각각 첨가한 전/후의 형광 강도의 차이를 측정한 값이다.

[0156] 도 2a를 참고하면, 비교예 1은 CE, AChE 및 BChE에 대해 동일한 형광 강도를 나타낸다. 반면, 도 2b를 참고하면, 합성예 1은 CE를 첨가한 반응 전/후의 형광 강도의 차이(△F) 값이 BChE 및 AChE 각각을 첨가한 반응 전/후의 △F 값보다 현저히 큼을 알 수 있다. 따라서, 합성예 1은 비교예 1 에 비해 CE에 대한 선택성이 우수함을 알 수 있었다.

[0157] 도 3은 합성예 1의 용액에 CE를 첨가한 전/후의 형광 스펙트럼이다.

[0158] 도 3을 참고하면, 540 nm에서 여기한 이후, 합성예 1의 용액의 CE를 첨가한 후 측정한 근적외선 형광 시그널(680 nm)은 DCM-Cl-OH의 방출 피크와 동일함을 알 수 있었다. 합성예 1은 그 자체로 400 nm의 파장을 가지나, CE와 반응하여 흡수에 의해 540 nm로 시프트되며, 이는 DCM-Cl-OH의 흡수 피크와 대략 일치한 것이다. 이 과정에서 노란색에서 진홍색으로의 색 변화도 있었다. 시간이 지남에 따라 측정한 형광 강도 스펙트럼에서도 5시간이 지난 후 685 nm에서 83배로 형광 강도가 커졌음을 알 수 있었다. 형광 강도는 약 37℃에서 배양된 경우 최댓값을 가짐을 알 수 있었다.

[0159] 도 4는 합성예 1의 용액의 CE의 농도에 따른 형광 강도를 나타낸 그래프이다. 상기 그래프는 선형성(F = 3381 × [CE의 활성도] + 55.2, 상관 계수 0.998)을 보인다. CE 검출의 한계는 0.013 U/mL로 이는 합성예 1의 CE에 대한 민감도가 우수함을 알 수 있었다.

[0160] 합성예 1에 대한 CE의 미하엘리스-멘텐 상수(K_m) 및 촉매 상수(k_{cat})는 각각 0.21 μM 및 0.91 s^{-1}으로, 촉매 효율(k_{cat}/K_m)은 4.52×10^6 M^{-1} s^{-1} 이다. 즉, 합성예 1은 CE에 대한 높은 친화성 및 반응성을 가짐을 알 수 있었다. 최대 이광자 흡수 단면적은 830 nm 에서 24.1GM인데, 이는 CE가 합성예 1에 의해 이광자 현미경에 의해 이미징할 수 있음을 나타낸다. 이광자 단면적은 하기 관계식에 의해 계산하였다.

[0161] $\delta = \delta r \times (Fs \times \phi r \times nr) / (Fr \times \phi s \times ns)$,

[0162] δ, F, ϕ 및 n 은 각각 이광자 단면적, 스펙트럼 적분 영역, 양자 수율 및 농도이다. s는 측정할 시료이고 r은 기준 시료이다. 기준 시료로 Fluorescein (aqueous, 10 μM, pH = 11)를 사용하였다.

[0163] **분석예 2: 저해능 측정**

[0164] 합성예 1의 CE에 대한 저해능을 측정하기 위해, 하기 물질 1 내지 10을 각각 첨가하고, CE를 첨가한 후(도 5 내 11로 표시) 형광 강도를 비교하였다.(도 5 참조) 또한, 각각 다른 농도의 비스(4-니트로페닐)포스페이트(bis(4-nitrophenyl)phosphate, BNPP)를 첨가한 후의 형광 스펙트럼도 비교하였다.(도 6 참조)

표 1

[0165]

	물질
1	-
2	β-glucosidases (10 U/mL)
3	xanthine oxidase (10 mU/mL)
4	tyrosinase (10 U/mL)
5	alkaline phosphatase (ALP) (10 U/mL)
6	monoamine oxidase-A(MAO-A) (10 μg/mL)
7	monoamine oxidase-B (MAO-B) (10 μg/mL)
8	trypsin (10 μg/mL)
9	human serum albumin (HAS) (10 μM)
10	bovine serum albumin (BSA) (10 μM)

[0166] 도 5는 합성예 1의 용액에 저해종 1 내지 10 및 CE(11)을 각각 첨가한 후의 형광 강도를 나타낸 그래프이다. 도 5를 참조하면, 합성예 1의 경우에만 강한 형광을 가짐을 알 수 있는데, 이는 합성예 1이 생체 시스템에서도 CE에 대한 선택성이 우수함을 나타낸다.

[0167] 도 6은 합성예 1을 CE 및 각각 다른 농도의 비스(4-니트로페닐)포스페이트(bis(4-nitrophenyl)phosphate, BNPP)에 각각 첨가한 후의 형광 스펙트럼이다. 도 6을 참조하면, CE의 저해물인 BNPP의 농도가 높아질수록, 형광 강도는 현저히 감소함을 알 수 있는데, 이는 CE와 합성예 1의 용액의 촉매 가수 분해 반응으로부터 형광이 발생한 것임을 알 수 있다.

[0168] **분석예 3: 안정성 측정**

[0169] 광학적 안정성을 측정하기 위해, 합성예 1(DCM-Cl-CE), 합성예 1의 가수분해물(DCM-Cl-OH) 및 ICG를 3 mL PBS 용액에 용해하였다. 샘플 튜브를 할로겐 램프 (25 mW/cm^2)에 노출시키고 램프에서 일정 거리를 유지하였다. 수용액이 장착 된 콜드 트랩을 램프와 샘플 튜브 사이에 배치하였다. 흡광도 스펙트럼은 1시간 동안 5분 간격으로 측정하였다.

[0170] 도 7은 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG), 합성예 1의 가수분해물(DCM-Cl-OH) 및 합성예 1(DCM-Cl-CE)의 용액 각각의 시간에 따른 흡수 스펙트럼이다. 빛에 1시간 동안 노출한 후, ICG를 포함한 용액은 흡수능이 약 61% 감소하여 39%의 ICG만이 존재함을 나타내나, 합성예 1의 가수분해물 및 합성예 1을 포함한 용액은 각각 약 100% 및 90% 존재함을 알 수 있었다.

[0171] 또한, 열적 안정성을 조사하기 위해 온도에 따른 영향을 조사하였는데, 각각 다른 온도(25, 30, 37 및 42 ℃) 및 37℃에서 장기간의 배양을 하더라도 합성예 1의 가수분해물 및 합성예 1의 용액에 영향은 없음을 알 수 있었다.

[0172] 즉, 합성예 1은 광학적 및 열적 안정성이 높으므로 생체 내에서 CE를 장기간 추적 가능할 수 있음을 알 수 있다.

[0173] **분석예 4: 세포에서의 CE 활성도 측정**

[0174] 합성예 1의 간암 세포에 대한 적용 가능성을 측정하기 위해, 간암 세포(HepG2) 및 정상적인 간 세포(LO2)에서 CE 활성도를 측정하였다.

[0175] 1) 세포 용해물의 준비

[0176] 세포를 원심 분리 후 잔류물에 NanJing JianCheng Bioengineering Institute (Nanjing, China)로부터 구매한

상용화 키트 중 시약 1을 첨가한 후 초음파 분해하였다. 그 후 원심 분리(12000 g, 30 분, 4℃)하여 세포 용해물로 상청액을 준비하였다.

[0177] 2) CE 활성도 측정

[0178] 상기 키트에 제시된 방법으로 준비한 후, CE의 활성도는 다음 식에 의해 계산하였다.

[0179] $CE\ 활성도(U/10^4\ cells) = 67 \times (\Delta A_{Test\ tube} - \Delta A_{Blank\ tube}) \div 10^4\ cells/mL$

[0180] $\Delta A_{Test\ tube} = A_4 - A_3$ 이고, A_3 및 A_4는 각각 시료 및 세포 용해물을 포함한 용액의 10초 및 190초에서 흡수값이다.

[0181] $\Delta A_{Blank\ tube} = A_2 - A_1$ 이고, A_1 및 A_2는 각각 시료 및 증류수를 포함한 용액의 10초 및 190초에서 흡수값이다.

[0182] 도 8은 합성예 1의 간암 세포(HepG2) 및 정상적인 간 세포(LO2) 각각에서 시간에 따른 일광자 형광 이미징 결과이다. 도 9은 도 8에서의 상대적인 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

[0183] 도 8 및 9를 참조하면, 합성예 1의 용액에서 상기 세포들을 배양한 후, HepG2 세포에서는 형광 강도가 점차적으로 증가한 반면, LO2 세포에서는 거의 변화가 없음을 알 수 있다. 즉, HepG2 세포에서의 CE 수준은 LO2 세포에서의 CE 수준보다 더 높음을 알 수 있다.

[0184] 도 10는 상업용 키트로 HepG2 및 LO2 각각에서 측정한 CE 수준을 나타낸 그래프이다. 도 10을 참조하면, HepG2의 CE 수준이 LO2보다 높음을 알 수 있는데, 이는 합성예 1의 용액은 간의 상태를 나타낼 수 있는 바이오마커로 사용될 수 있는 가능성을 나타낸다. HepG2 세포 내에서 CE 활성도 이미징을 위한 이광자 형광 발광도 알 수 있다.

[0185] 상기 HepG2 및 LO2 세포에 합성예 1의 용액 외 BNPP도 첨가하여 저해능을 측정하였는데, 합성예 1의 용액만 첨가한 경우가 높은 형광 강도를 가짐을 알 수 있었다. 이는 형광은 합성예 1의 용액과 CE가 반응함으로써 발생한 것임을 나타낸다.

[0186] **분석예 5: 항암제 투여한 간암 세포에서 CE 활성도 측정**

[0187] HepG2 세포는 항암제 (sorafenib)로 서로 상이한 시간 (0, 2, 4, 8, 12, 24 및 48 시간) 동안 전처리 한 후 DCM-C1-CE (10 μM)와 함께 5 시간 동안 배양하였다. 오일 대물 렌즈 60 배의 이광자 레이저 스캐닝 공초점 현미경 (Zeiss LSM 880 NLO, 여기 파장 830nm 및 집합 범위 650-750nm) 및 오일 대물 렌즈 60 배의 일광자 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Olympus FV3000, 여기 파장 540 nm 및 수집 범위 650-750 nm)을 사용하여 세포의 공초점 이미지를 얻었다.

[0188] 도 11은 항암제 투여한 HepG2에서 합성예 1의 CE 활성도의 이미징 방법의 모식도이다. 도 12은 HepG2에서 CE활성도의 이광자 공초점 형광 이미징 결과이다. 도 13는 도 12에서의 상대적인 형광 강도를 나타낸 그래프이다. 도 14은 HepG2에서 CE의 상대적인 수준을 측정한 결과로, a) 항암제(sorafenib)을 12시간 동안 처리한 경우 및 b) 항암제를 투여하지 않은 경우이다.

[0189] 도 12 내지 14을 참조하면, 시간이 지날수록 형광 강도는 감소함을 알 수 있다. 이는 합성예 1의 용액으로 CE 활성도의 변화를 선택적으로 관찰할 수 있고, 항암제 투여 후 활성 과정 동안 간암 세포의 상태를 이미징할 수 있음을 나타낸다.

[0190] **분석예 6: 쥐의 CE 활성도 측정**

[0191] 쥐를 대상으로 수행한 모든 실험은 1996년 개정된 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 국립 보건원 가이드 (NIH 간행물 번호 80-23) 및 하이난 의과 대학의 기관 동물 관리 및 사용위원회에서 승인한 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0192] 1) HepG2-이종 이식된 쥐에서 CE 활성도의 형광 이미징

[0193] HepG2 세포 (1x106 세포)를 선택하여 약 15-20g 암컷 누드 BABL/c 쥐의 겨드랑이 아래에 이식하였다. 15일 이후, 종양-이종 이식된 쥐를 마취하고 종양 내 주사를 통해 DMSO-식염수(1:99 v/v, 0.1 mL) 및 합성예 1(DCM-C1-CE)의 용액(10 μM, 0.01 mL)의 혼합액을 투여하였다. Perkinelmer IVIS Lumina XRMS Series III In Vivo Imaging System(여기 파장 540 nm, 수집 범위 650nm ~ 750nm)에 의해 서로 다른 시간(0, 0.5, 1.5, 2.5 및 5 시간)에서 이미지를 촬영했다.

[0194] 2) 항암제 투여한 동소 간 종양이 있는 쥐에서 CE 활성도의 형광 이미징

[0195] 설정 누드 BABL/c 쥐를 마취하고 중간선 절개로 개방하여 간을 노출하였다. HepG2 세포 현탁액 (1x107 세포/mL)을 쥐의 왼쪽 간엽에 천천히 주입하고, 처리 된 생균을 복강으로 돌려 보냈다. 3일 후, 각 누드쥐에 0.1 mL의 1 % 페니실린-스트렙토 마이신을 주입하여 감염을 예방하였다. 3주 간 수유 및 양육 후 플루오 레세인나트륨염을 복강 내 주사하여 종양 형성을 확인하였다.

[0196] 상기 쥐에 항암제 (sorafenib)를 0, 7, 14, 21, 28일 동안 정맥 주사로 주입 하였다. 그 후, 5개의 병렬 그룹의 쥐에 DCM-Cl-CE(10 μM, 0.1 mL) 및 DMSO-saline (1:99, v/v)의 혼합액을 정맥 주사로 투여한 후 각각의 쥐의 형광 이미지를 위와 같은 방법으로 촬영하였다.

[0197] 상기 쥐의 각각 분리된 기관(심장, 간, 비장, 폐 및 신장)에서 CE의 2차원 생체 외 이미징도 위와 같은 방법으로 촬영하였다

[0198] 상기 쥐의 3차원 형광 분자 단층 촬영(fluorescence molecular tomographic, FMT) 이미징은 확산 단층 촬영 알고리즘을 통해 재구성하였다.

[0199] 도 15는 HepG2-이종 이식된 쥐에 합성예 1의 종양 내 주사한 이후, 시간에 따른 CE 활성을 측정한 형광 이미징 결과이다.

[0200] 도 15을 참조하면, HepG2-이종 이식된 쥐에서 CE에 대한 형광 강도가 향상되었음을 알 수 있어, 합성예 1은 생체 내 간 종양에서 CE 활성도를 이미징할 수 있음을 나타낸다.

[0201] 도 16는 항암제를 처리한 쥐에서 합성예 1의 CE 활성도 이미징 측정에 대한 모식도이다. 도 17은 소라페닙 및 이중 이미징을 처리한 쥐의 타임라인이다. 도 18은 동소 종양이 있는 쥐를 소라페닙 및 합성예 1을 투여한 이후 CE 활성도를 측정한 형광 이미징 결과이다. 도 19은 도 18의 쥐에서 각각의 장기에 대한 형광 이미징 결과이다. 도 20는 도 19의 각 장기별 형광 강도를 나타낸 그래프이다. 도 21은 동소 간 종양에서 각각 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색, Masson's 염색 및 regional terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling(TUNEL) 염색 결과이다. 도 22은 소라페닙 및 합성예 1을 동소 간 종양이 있는 쥐에 처리한 후, CE 활성도의 생체 내 3D 이미징 결과이다.

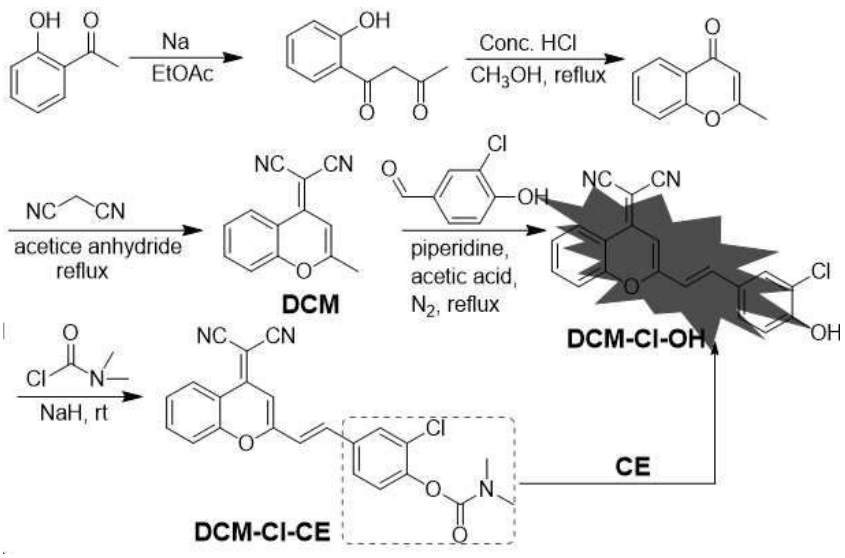
[0202] 도 18을 참조하면, 시간이 지난 후, 형광 강도는 점차적으로 감소하여 CE의 활성도는 감소했음을 알 수 있다. 이는 소라페닙으로 처리된 HepG2 세포의 형광 변화와 일치한다.(도 13 및 14 참조) 즉, 합성예 1이 간에서 CE를 선택적 이미징할 수 있음을 나타낸다.

[0203] 도 19 및 20을 참조하면, 형광 영역은 종양 부위이므로, 합성예 1은 간 종양에 대해 표적화할 수 있음을 나타낸다.

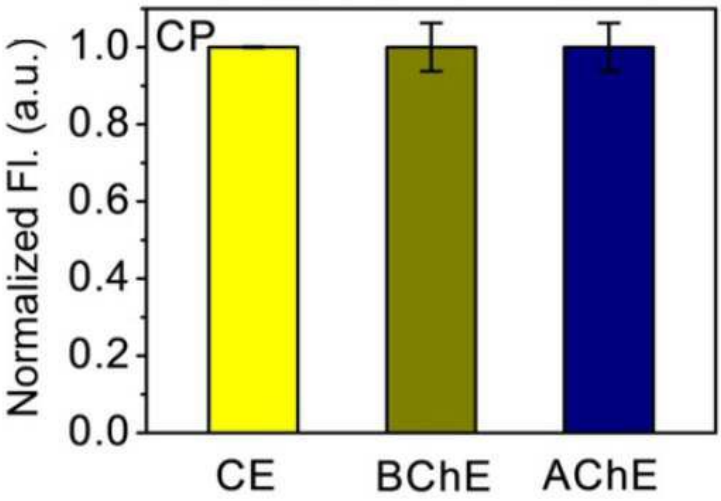
[0204] 도 21 및 22를 참조하면, 시간이 지날수록 세포 괴사 또는 세포 사멸로 종양 조직이 느슨해졌고, 괴사 면적이 점차 증가했으므로, 합성예 1의 종양 표적화 능력을 알 수 있었다. 또한 도 22의 3D 형광 이미징을 통해 합성예 1의 실제 적용 가능성을 입증할 수 있었다.

도면

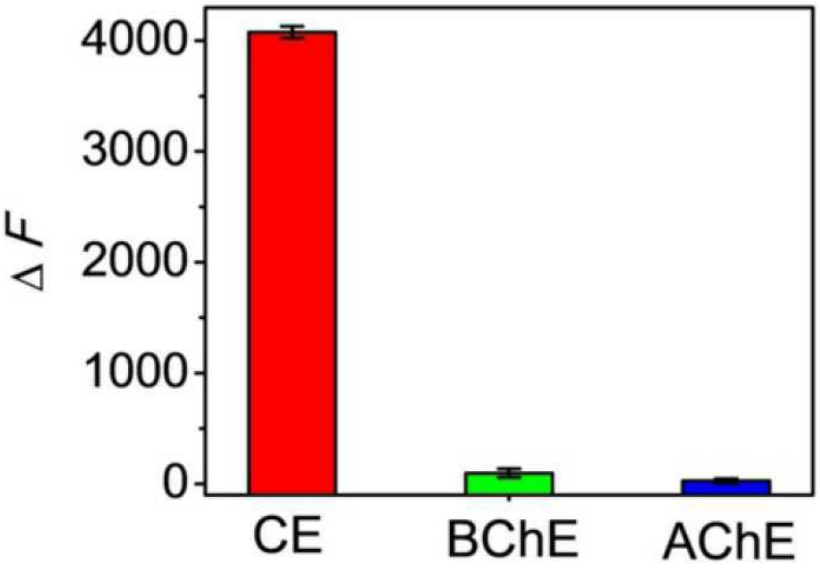
도면1


Na
EtOAc
Conc. HCl
CH3OH, reflux
acetice anhydride
reflux
DCM
piperidine,
acetic acid,
N2, reflux
DCM-Cl-OH
NaH, rt
DCM-Cl-CE
CE

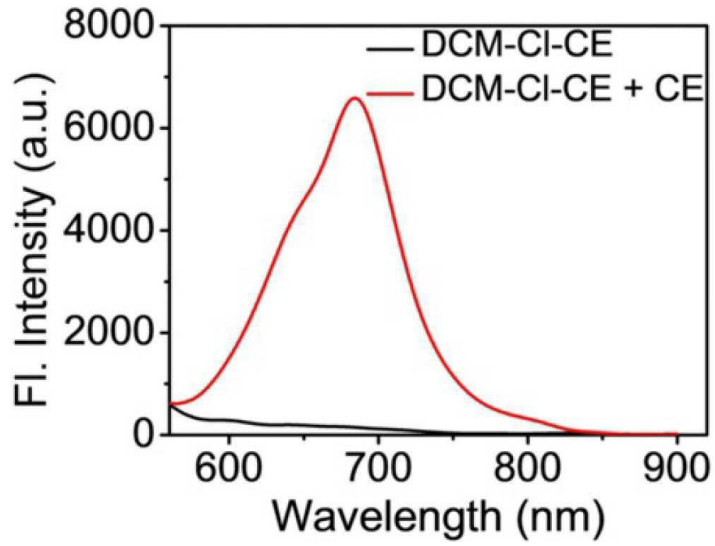
도면2a


CP
Normalized Fl. (a.u.)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CE
BChE
AChE

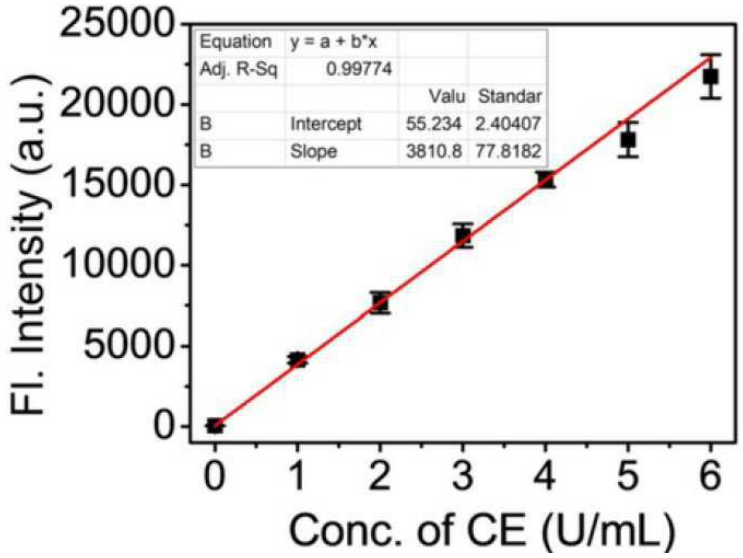
도면2b


4000
3000
2000
1000
0
ΔF
CE
BChE
AChE

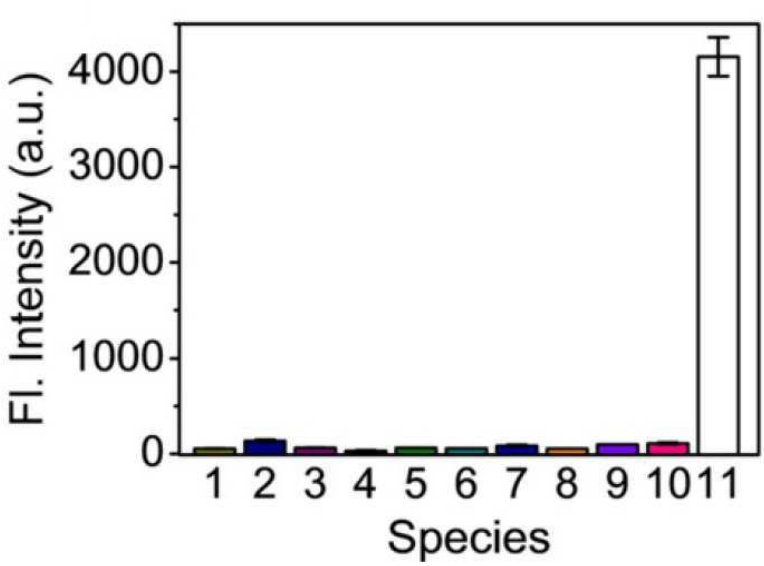
도면3


8000
6000
4000
2000
0
Fl. Intensity (a.u.)
DCM-Cl-CE
DCM-Cl-CE + CE
600
700
800
900
Wavelength (nm)

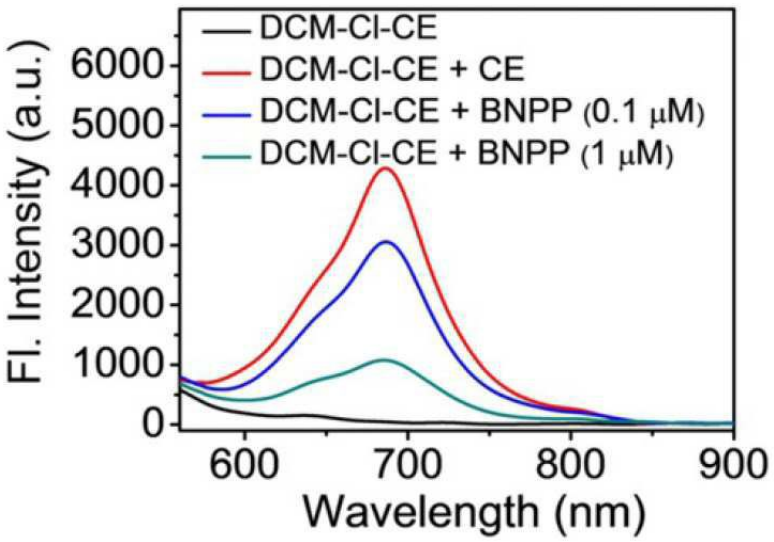
도면4


Equation y = a + b*x
Adj. R-Sq 0.99774
Valu Standar
B Intercept 55.234 2.40407
B Slope 3810.8 77.8182
Fl. Intensity (a.u.)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0 1 2 3 4 5 6
Conc. of CE (U/mL)

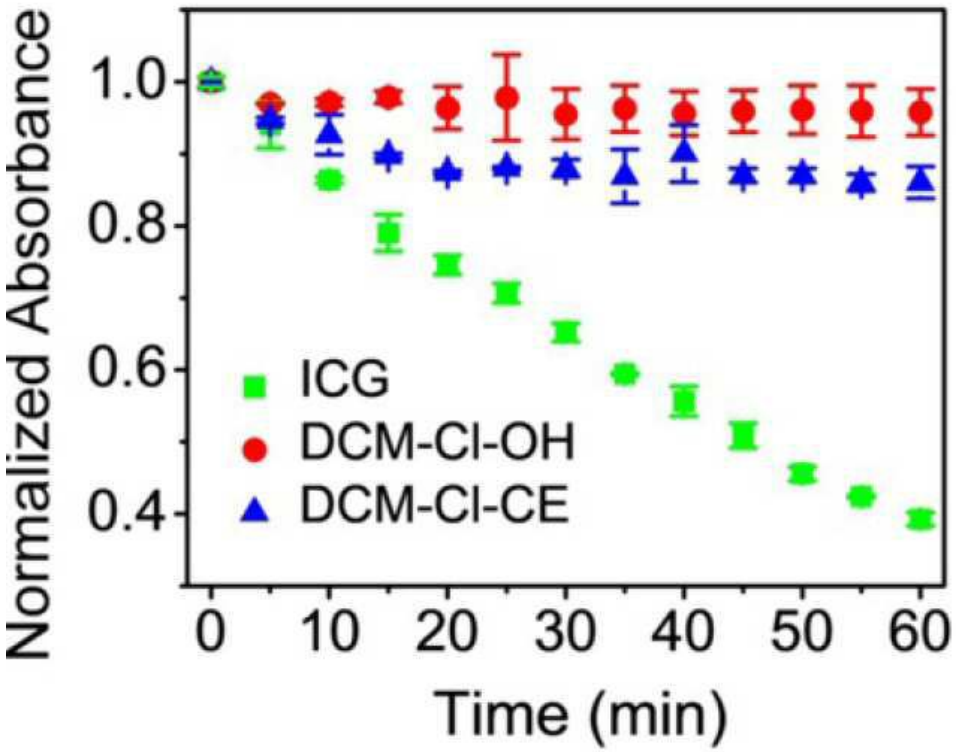
도면5


Fl. Intensity (a.u.)
4000
3000
2000
1000
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Species

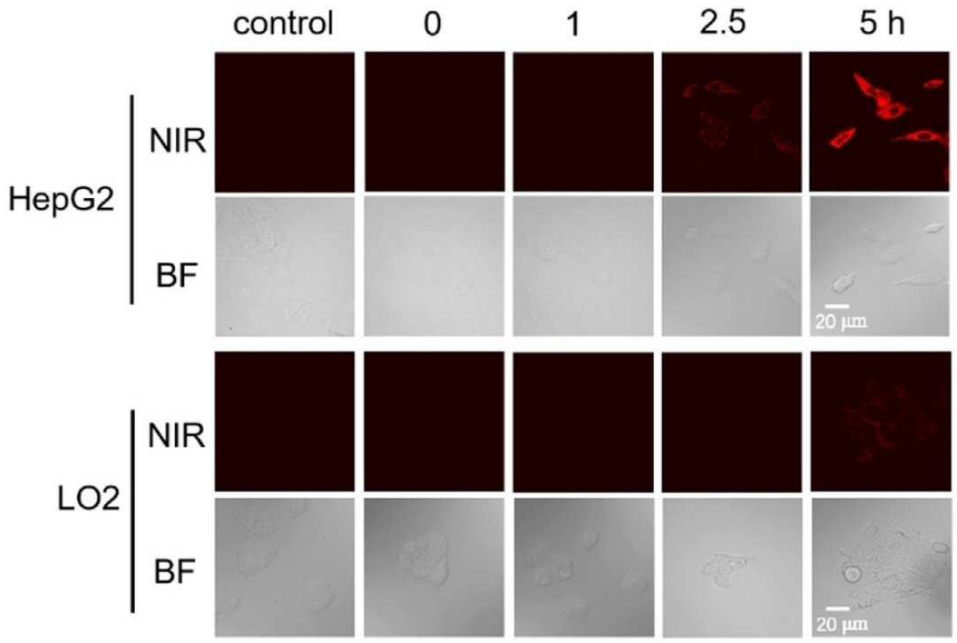
도면6


DCM-Cl-CE
DCM-Cl-CE + CE
DCM-Cl-CE + BNPP (0.1 μM)
DCM-Cl-CE + BNPP (1 μM)
Fl. Intensity (a.u.)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
600
700
800
900
Wavelength (nm)

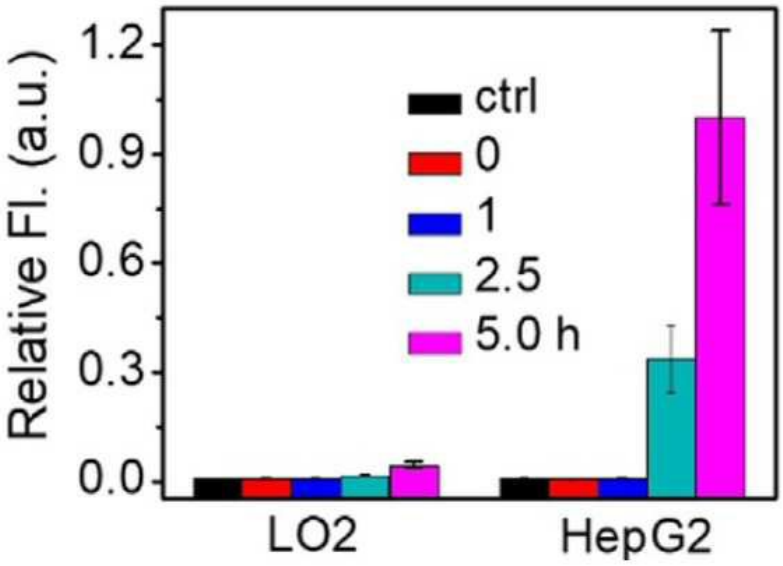
도면7


Normalized Absorbance
1.0
0.8
0.6
0.4
ICG
DCM-Cl-OH
DCM-Cl-CE
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)

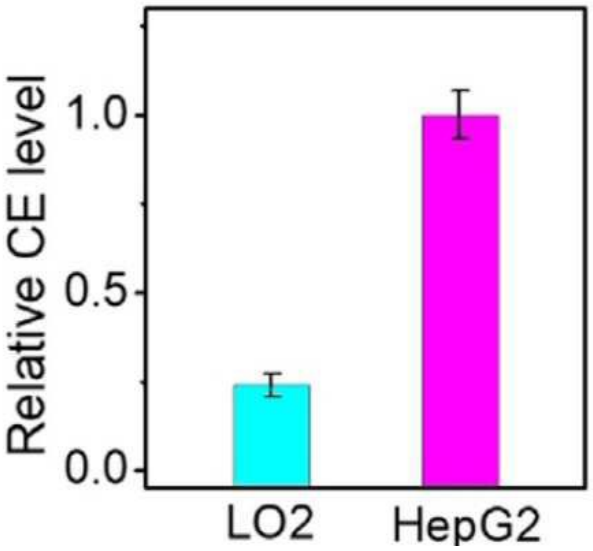
도면8


control
0
1
2.5
5 h
HepG2
NIR
BF
LO2
NIR
BF
20 μm
20 μm

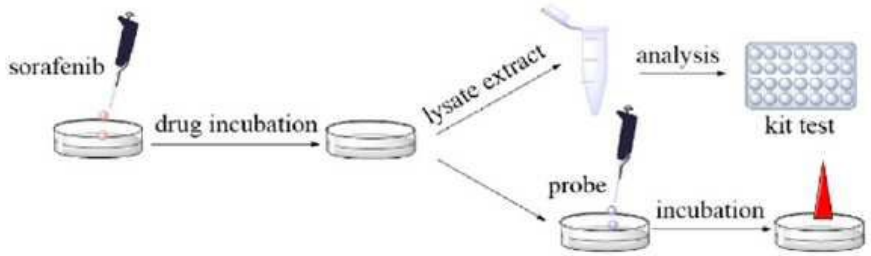
도면9


Relative Fl. (a.u.)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
ctrl
0
1
2.5
5.0 h
LO2
HepG2

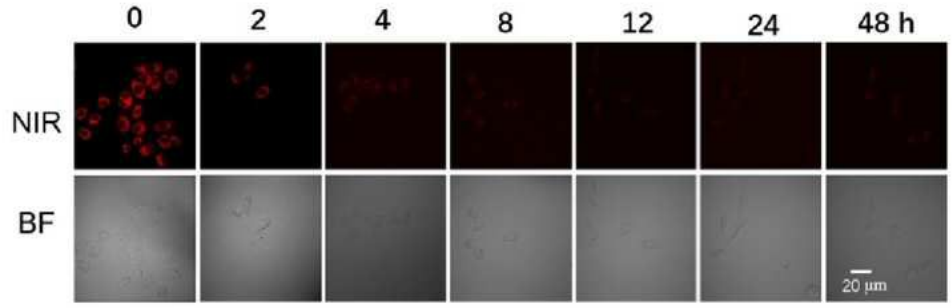
도면10



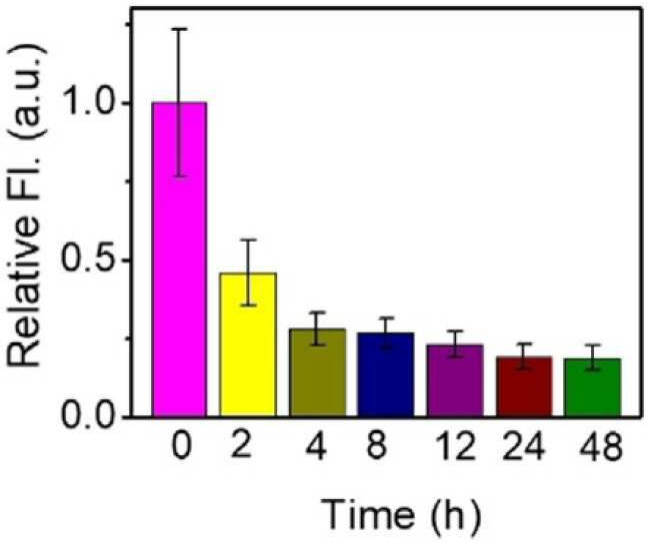
도면11



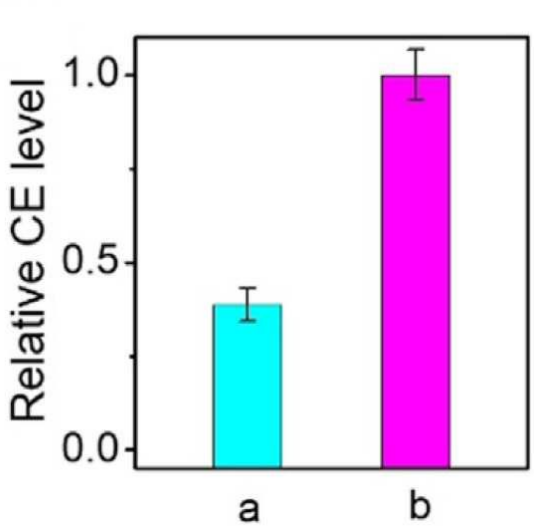
도면12



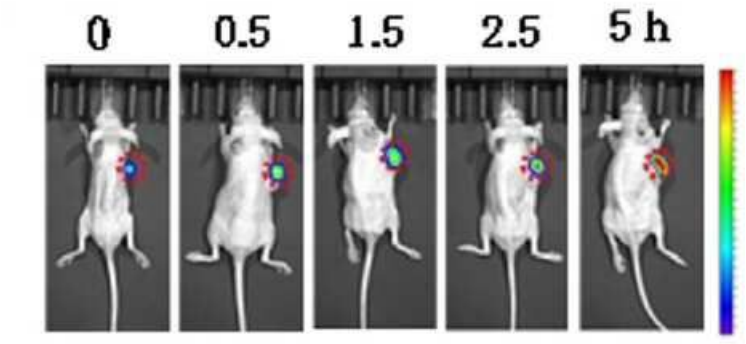
도면13



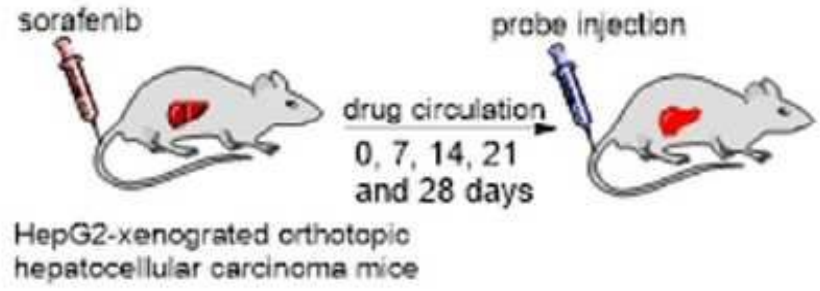
도면14



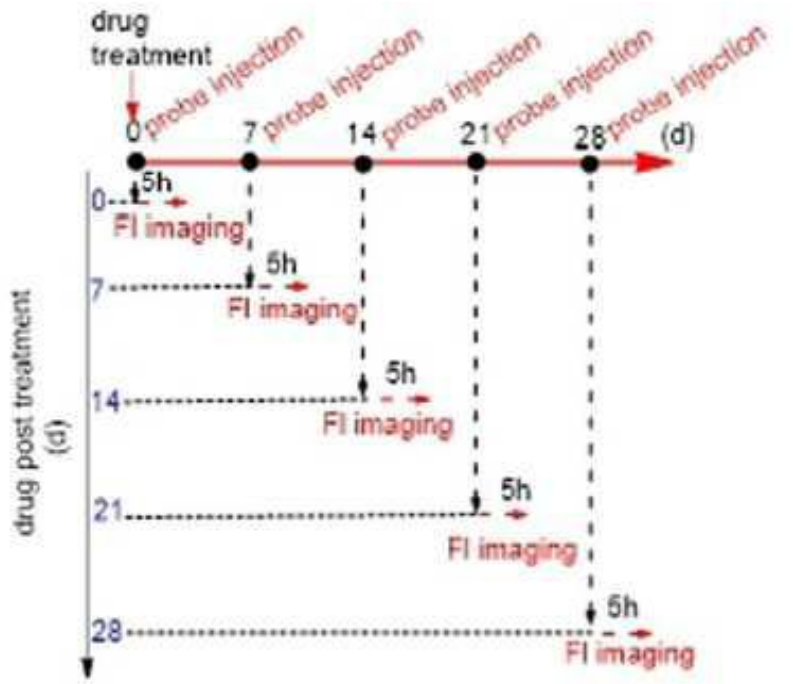
도면15



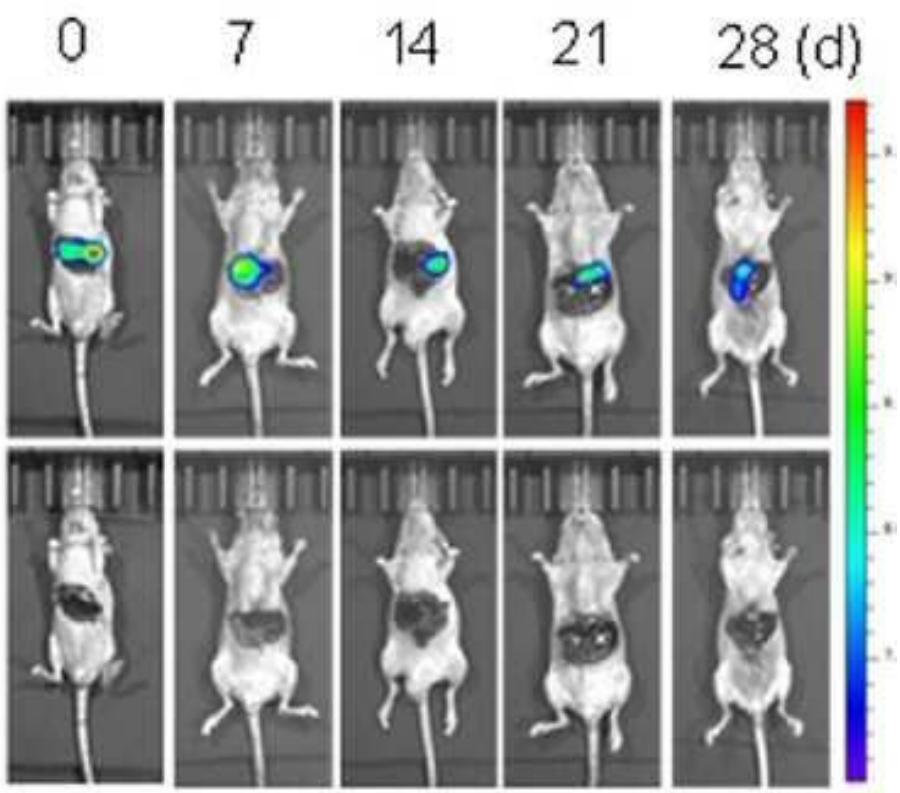
도면16


sorafenib
probe injection
drug circulation
0, 7, 14, 21
and 28 days
HepG2-xenograted orthotopic
hepatocellular carcinoma mice

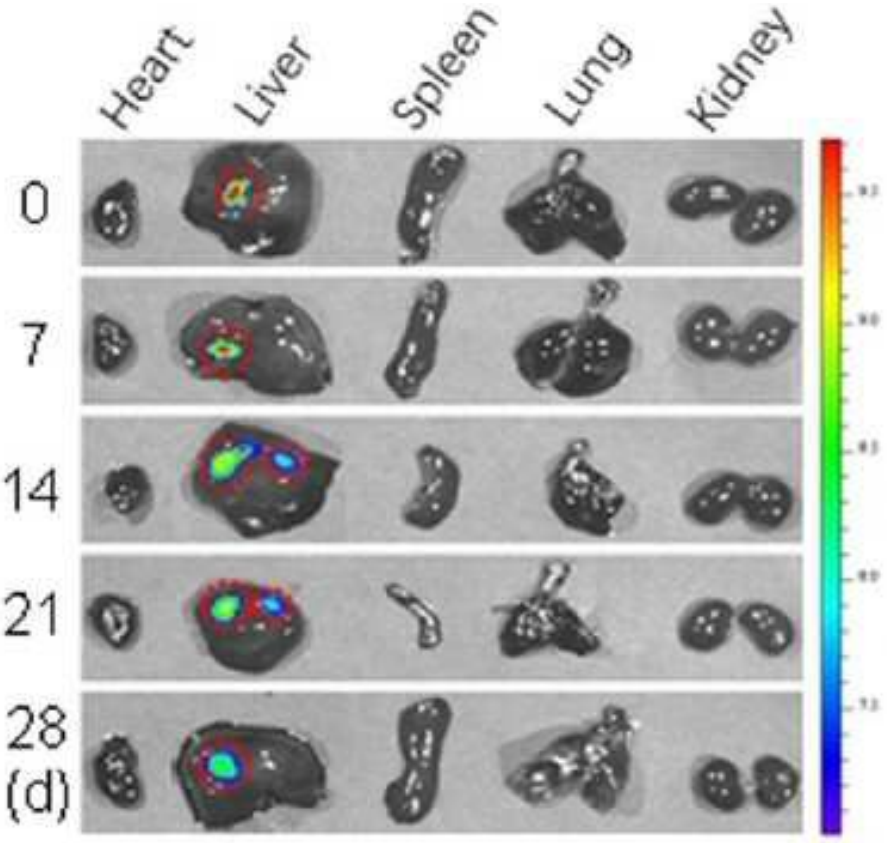
도면17


drug
treatment
0 probe injection
7 probe injection
14 probe injection
21 probe injection
28 probe injection
(d)
drug post treatment
(d)
0
7
14
21
28
5h
FI imaging

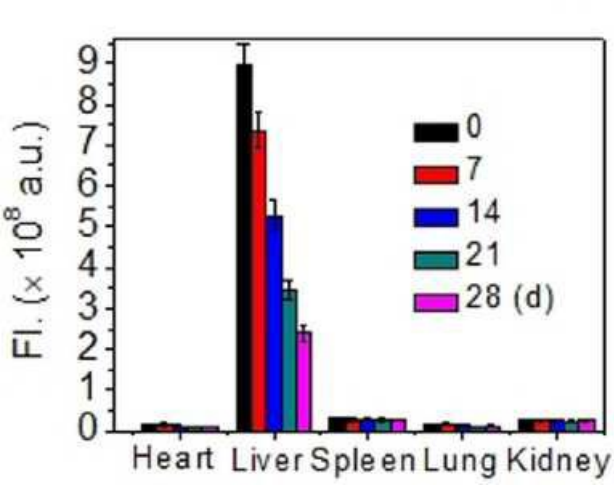
도면18



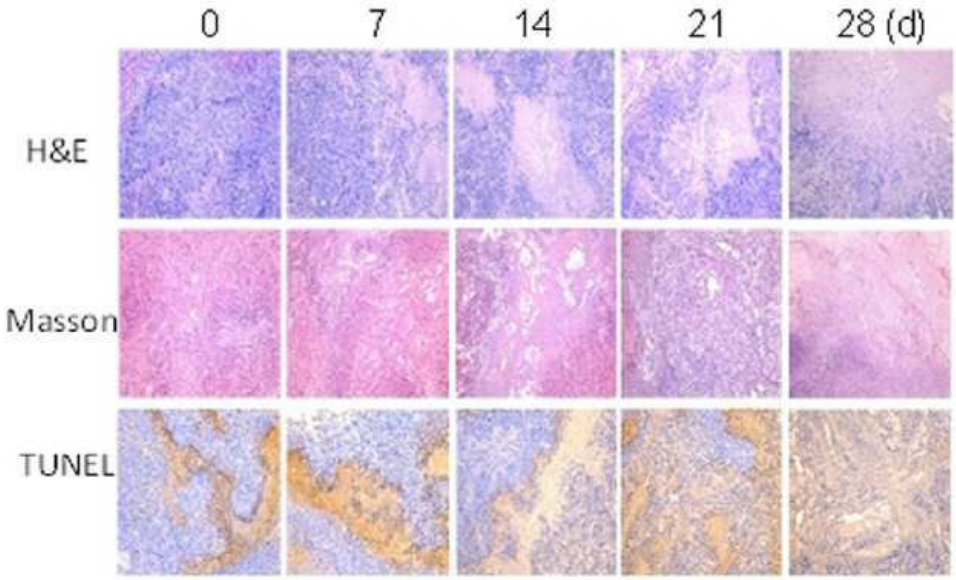
도면19



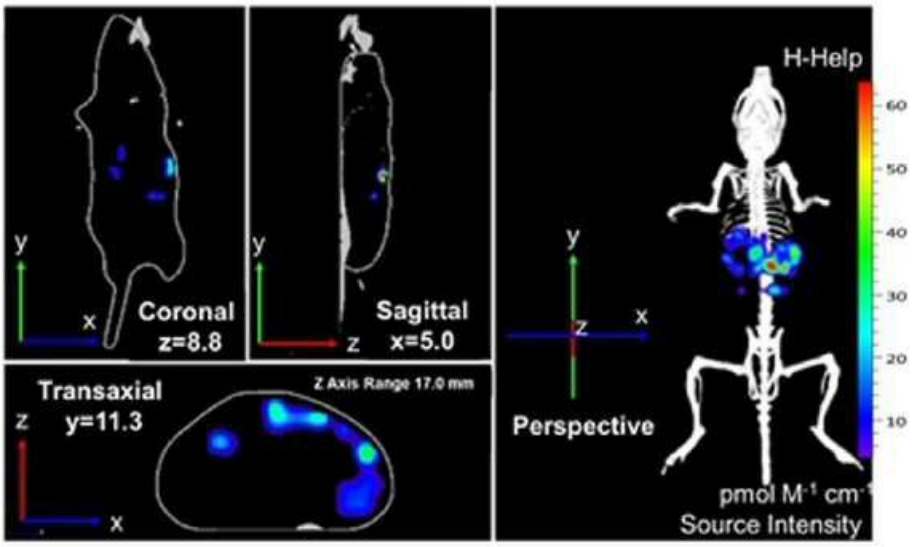
도면20


Fl. (× 10^8 a.u.)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
7
14
21
28 (d)
Heart
Liver
Spleen
Lung
Kidney

도면21


0
7
14
21
28 (d)
H&E
Masson
TUNEL

도면22


Coronal
z=8.8
Sagittal
x=5.0
Transaxial
y=11.3
Z Axis Range 17.0 mm
H-Help
Perspective
pmol M-1 cm-1
Source Intensity
60
50
40
30
20
10