



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0044731
(43) 공개일자 2021년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 11/06 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09K 11/06 (2021.01)
G01N 21/6428 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0133702
(22) 출원일자 2020년10월15일
심사청구일자 2020년10월15일
(30) 우선권주장
1020190127505 2019년10월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김중승
서울특별시 성북구 안암로 145
피터 베르비스트
서울특별시 성북구 안암로 145
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

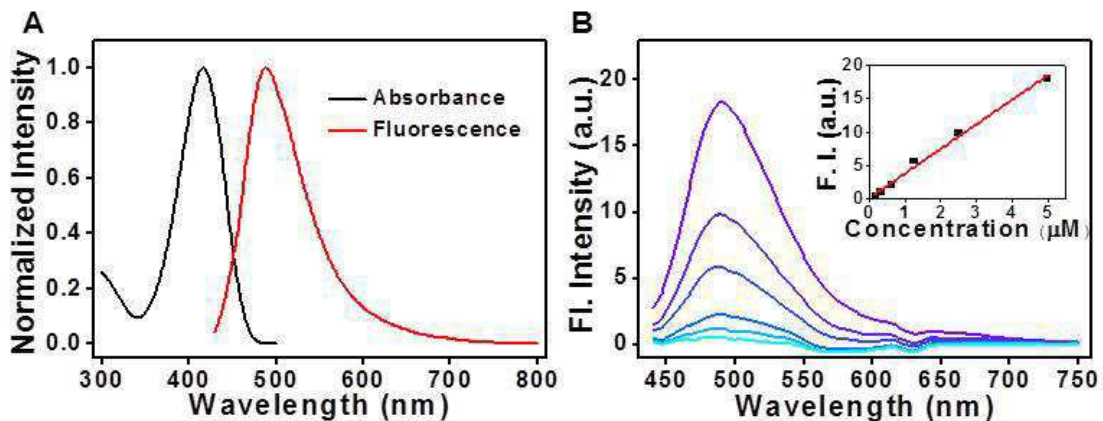
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 단백질 응집체 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 단백질 응집체 검출용 형광 센서

(57) 요약

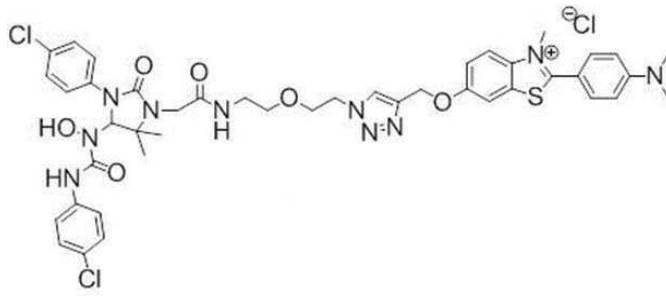
본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 단백질 응집체 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 단백질 응집
(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



체 검출용 형광 센서에 관한 것이다:

[화학식 1]



(52) CPC특허분류

G01N 33/68 (2013.01)

C09K 2211/1081 (2013.01)

(72) 발명자

선우경

서울특별시 성북구 안암로 145

강철훈

경기도 수원시 장안구 하물로30번길 22, 105동 704호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711074218
과제번호	2018R1A3B1052702
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명	정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711070365
과제번호	2016H1D3A1938052
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(교육인력)해외우수신진연구자유치사업
연구과제명	암과 알츠하이머 약물전달시스템의 난제 해결을 위한 단분자 진단치료제 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2018.12.31

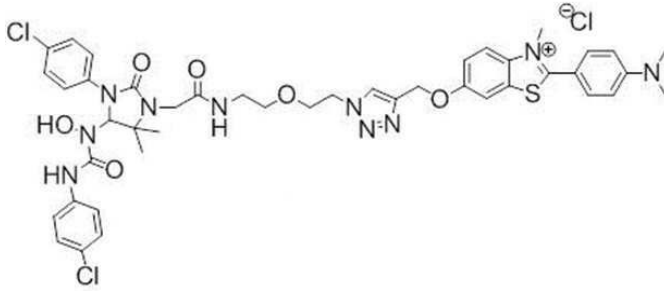
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 단백질 응집체 검출용 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형광 프로브 화합물은 소포체 내 단백질 응집체 선택적인 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

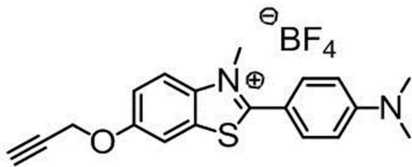
상기 단백질 응집체는 소포체 스트레스에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 4

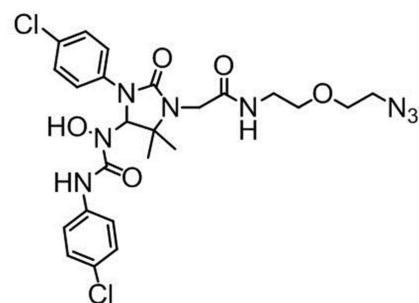
제1항에 있어서,

상기 형광 프로브 화합물은 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과, 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물 간의 구리-촉매화 클릭 반응에 의해 합성되는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물:

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 5

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 단백질 응집체 검출용 형광 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질 응집체 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 단백질 응집체 검출용 형광 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 및 조직 내부의 단백질 응집체는 미스폴딩 단백질 관련 질환, 신경퇴행성 질환과 같은 여러 다양한 질병에서 핵심적인 발병원인으로 지목되고 있다. 이들 질병에서, 몇몇 단백질들이 스트레스 조건하에서, 예를 들면 산화환원 환경에서 교란 및 이에 따른 동일 단백질의 다른 인접 분자의 미스폴딩 유발을 통해 올리고머 또는 고차 단백질 응집체를 형성할 수 있다. 결국, 단백질의 응집은 프리온과 유사한 행동에 따라 자가 증식 베타 시트 구조를 통해 매개될 가능성이 높다(비특허문헌 1).

[0003] 소포체(Endoplasmic reticulum, ER) 스트레스는 세포에서 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response, UPR)을 유도하는 광범위한 단백질 미스폴딩과 관련이 있다. 이 과정은 당뇨병, 심혈관 질환, 신경퇴행성 질환 및 암과 같은 여러 질병들과 연관성이 있으며, 몇몇 다른 질병들에도 관련되어 있다는 증거들이 보고되고 있다(비특허문헌 2). 샤페론(chaperone), 번역 후 변형 및 단백질 이동(protein trafficking)에 의해 초기 단백질(nascent protein)이 올바르게 접히는 것과 같은 정상적인 ER 기능이 방해받게 되면 ER 스트레스가 촉발된다. UPR은 ER 스트레스를 유도하는 조건을 극복하도록 작용하거나, 극복 불가능한 경우에 세포 자살하도록 지시하는 것을 의미한다. 이러한 과정은 IRE1, PERK 및 ATF6 경로 등 세 가지 주요 세포 반응 네트워크를 포함한다. 흥미롭게도, 세 가지 반응 모두의 활성화는 BiP, Ca^{2+} -의존 샤페론에 의한 ER 내 미접힘 단백질을 인식하는 것과 관련된다(비특허문헌 3). 현재, UPR에서의 단백질 응집체를 연구하기 위해, 두 가지 주된 접근법이 언급되고 있다. 먼저, 세포 용해물의 세제 내성(Detergent-resistant) 응집체가 분석될 수 있으며, 이는 UPR의 진행과정에서 유전자 발현 변화에 대한 상세 단백질체 분석을 통해 입증 가능하다. 다른 한편으로는, 살아있는 세포에서 ER 스트레스 하에 단백질 이동 동안에 새롭게 형성된 단백질의 축적이 관심 유전자가 표지된 녹색 형광 단백질에 의해 시각화될 수 있다. 그러나, ER 스트레스 하에 미접힘 단백질 또는 응집체의 구조는 근본적으로 환경에 의존하기 때문에, 세제-의존 방법(detergent-dependent method)은 일정부분 인위적인 결과를 가져올 수 있으며, 이와 유사하게 인공적으로 제어된 트랜스팩션 방법의 적용은 그 범위에 제한이 있다. 따라서, UPR-관련 질병들에 대한 이해 및 잠재적 치료법의 개발을 가속화하기 위해, 생체 시스템 내 단백질 응집체에 대한 선택적 이미징 기술의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Brundin, P.; Melki, R.; Kopito, R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010, 11, 301-307.

(비특허문헌 0002) Kaser, A.; Lee, A. H.; Franke, A.; Glickman, J. N.; Zeissig, S.; Tilg, H.; Nieuwenhuis, E. E.; Higgins, D. E.; Schreiber, S.; Glimcher, L. H.; Blumberg, R. S. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. Cell 2008, 134, 743-756.

(비특허문헌 0003) Coe, H.; Michalak, M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. Gen. Physiol. Biophys. 2009, 28, F96-F103.

발명의 내용

해결하려는 과제

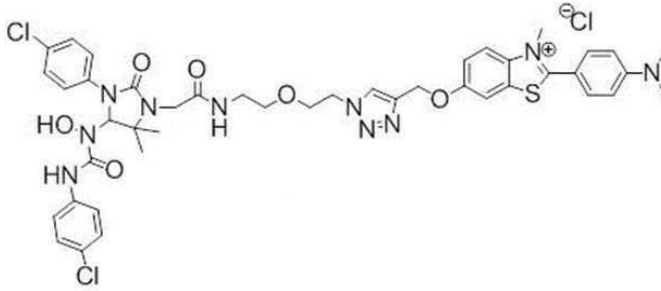
[0005] 본 발명에서는 단백질 응집체 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 단백질 응집체 검출용 형광 센서를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0007] 하기 [화학식 1]로 표시되는 단백질 응집체 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0008] [화학식 1]



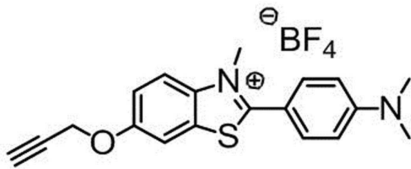
[0009]

[0010] 본 발명에 따르면, 상기 형광 프로브 화합물은 소포체 내 단백질 응집체 선택적인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 단백질 응집체는 소포체 스트레스에 의해 유발되는 것을 특징으로 할 수 있다.

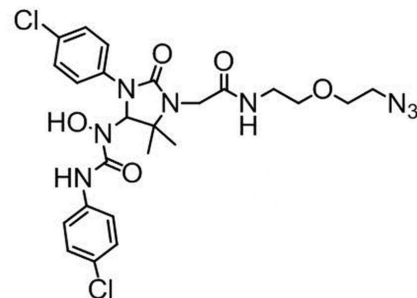
[0012] 본 발명에 따르면, 상기 형광 프로브 화합물은 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과, 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물 간의 구리-촉매화 클릭 반응에 의해 합성되는 것을 특징으로 할 수 있다:

[0013] [화학식 2]



[0014]

[0015] [화학식 3]



[0016]

[0017] 본 발명은 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 단백질 응집체 검출용 형광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물은 우수한 광물리적 특성과 단백질 응집체에 대해서 우수한 선택성을 가지고 있어, 소포체 스트레스에 의한 단백질 응집체를 효과적으로 검출할 수 있는바, 소포체 스트레스 조절물질, 약물 전구체 등 소포체 관련 약물 개발을 위한 스크리닝 도구로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 ACN에서 ER-ThT([화합식 1]로 표시되는 화합물)의 흡수 및 형광 특성을 나타낸다. (a)는 프로브(ER-ThT)(1 μ M)의 정규화된 흡수 스펙트럼 및 방출 스펙트럼, (b)는 1.0-5.0 μ M에서의 농도-의존적 형광 스펙트럼이다. 3/3 nm 슬릿폭 및 420 nm의 파장에서 여기시켜 스펙트럼을 기록하였다.

도 2는 수성 글리세롤 용액에서 ER-ThT (1 μ M) 형광 강도의 점도 의존성을 나타낸다. (a) 3/3 nm 슬릿폭 및 420 nm의 파장에서 여기시켜 형광 스펙트럼을 얻었다. 퍼센티지는 물에 대한 글리세롤의 비율(v/v)로 기재된다. (b)는 용액 점도에 대한 510 nm에서의 강도를 나타낸 것이다.

도 3은 단백질 응집체에 대한 ER-ThT의 형광 반응을 나타낸다. 프로브(1 μ M)의 스펙트럼을 37 $^{\circ}$ C에서 HEPES 버퍼(20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2) 중 10 μ M의 라이소자임(a) 및 BSA(b) 하에서 측정하였다. 시간은 천연 단백질을 함유한 용액에 10 mM DTT를 첨가한 후의 시간을 나타낸다. Inset은 DTT 첨가 후 배양 기간 대 510 nm에서의 형광 강도의 플롯을 나타낸다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 4는 리포솜의 존재하에 단백질 응집체 검출 결과를 나타낸다. (a)는 네이티브 리소자임(40 μ M) 단독, 리포솜(3 μ M; molar ratio 2:5:1:2, DOPC:DPPC:Chol:SM) 단독, 그리고 리포솜과 DTT(10 mM)를 포함하는 리소자임을 함유하는 버퍼 용액(20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2)의 형광 스펙트럼이다. (b)는 510 nm에서의 시간별 형광 강도를 나타낸 것이다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 5는 공초점 현미경 이미지(좌측) 및 DTT 처리된 헬라세포에서 ER-ThT로부터 발생한 세포 당 형광 강도(우측)를 나타낸다. 상기 도면에서의 시간은 세포에 DTT (2mM)를 첨가하고 난 후부터 이미지를 획득(475-525nm 필터를 사용하여 458nm에서 여기)한 시간을 의미한다. 획득 시간 전에 ER-ThT (1 μ M)을 30분 동안 처리하였고, 대조군 샘플은 DTT로 처리하지 않았다. 막대그래프는 세포 당 평균 형광 강도 ($n = 6$)를 나타낸다(* $P < 0.05$, *** $P < 0.01$).

도 6은 ER-스트레스 헬라세포에서 ER-ThT의 세포내 위치를 나타낸다. ER 스트레스 세포의 이미지 획득은 1시간 동안 5 μ M의 Thapsigargin으로 30분 동안 배양 후, 후속하여 ER-ThT 처리(1 μ M)하여 얻었다. 세포기관 선택적 추적체(tracker)인 MitoTracker, Red CMXRos (0.3 μ M), LysoTracker(0.3 μ M), Red DND-99 및 ER Tracker Red(1 μ M) 각각을 이미징 15분 전에 첨가하였다.

도 7. Brefeldin A와 Thapsigargin으로 처리한 HeLa 세포에서 ER-ThT의 형광 이미지와 세포 당 평균 형광 강도 ($n = 8$)를 나타낸 것이다. HeLa 세포를 Brefeldin A (100 μ M) 또는 Thapsigargin (5 μ M)과 함께 1.5 시간 동안 배양한 다음 ER-ThT (1 μ M에서 30분 동안)와 함께 배양하였다. 475-525 nm 밴드 패스필터, 458 nm의 여기 조건에서 이미지를 얻었다. 에러는 표준편차로 표시하였으며, 스튜던트 t-검정에 따라 유의성을 평가하였다(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

도 8은 Thapsigargin으로 처리 된 HeLa 세포에서 ER-ThT의 형광에 대한 화학적 샤페론들((TUDCA, TMAO 및 PBA)의 영향을 나타낸다. Thapsigargin, TUDCA, TMAO 및 PBA의 농도는 각각 5 μ M, 300 μ M, 100 mM, 1 mM이었다. 이미지 획득 전 배양 시간은 화학적 샤페론들의 경우 3시간이었으며, 탐시가르긴의 경우 2시간, 그리고 ER-ThT (1 μ M)의 경우 30분이었다. 475-525 nm 밴드 패스필터, 458 nm의 여기 조건에서 공초점 이미지를 수득하였다.

도 9는 물에서 측정한 ER-ThT의 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. (a)는 용도 의존적 형광 스펙트럼을 나타내고, (b)는 510 nm에서의 방출 강도 대 농도의 플롯을 나타낸 것이다. 방출 스펙트럼은 λ_{ex} = 420 nm 및 3/3 nm의 슬릿 폭에서 기록되었다.

도 10은 ER-ThT의 형광 스펙트럼에 대한 용매의 영향을 나타낸 것이다. (a)는 다양한 용매에서 ER-ThT (1 μ M)의 방출 스펙트럼을 나타낸다. 510 nm에서의 강도(b) 및 $\lambda_{max, em}$ (c)은 용매 유전 상수에 대해 플롯되었다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 5/5 nm.

도 11은 ER-ThT (1 μ M)의 형광 스펙트럼에 대한 pH의 영향을 나타낸 것이다. (a)는 다양한 pH 수준에서 ER-ThT의 방출 스펙트럼을 나타내고, (b)는 510 nm 대 pH 값에서의 강도 플롯을 나타낸 것이다. 용액의 완충 시약은 20 mM의 NaOAc, HEPES 및 보로네이트의 혼합물이었다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 12는 ER-ThT (1 μ M)의 형광 스펙트럼에 대한 점도의 영향을 나타낸 것이다. (a)는 글리세롤:글리콜 (v/v) 용액에서 ER-ThT의 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm. (b) 용액 점도에 대한 510

nm에서의 형광 강도 플롯을 나타낸 것이다.

도 13은 DTT 처리하에 510 nm에서 ER-ThT (1 μ M)의 시간 의존적 형광 반응에 대한 리소자임의 영향을 나타낸 것이다. 강도는 37 $^{\circ}$ C (20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2)에서 HEPES 완충액 중 리소자임 용액에 DTT (10mM)를 첨가하자마자 기록하였다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 14는 HEPES 버퍼 (20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2)에서 네이티브 리소자임 (10 μ M) 또는 BSA (10 μ M)의 존재하에 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) 510nm에서 ER-ThT에서 형광 강도의 시간 의존적 변화를 나타낸 것이다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm. 데이터는 37 $^{\circ}$ C에서 기록되었다.

도 15는 DTT에 대한 ER-ThT의 형광 반응을 나타낸 것이다. 프로브 (1 μ M)의 스펙트럼은 DTT (10mM) 처리하에 37 $^{\circ}$ C, HEPES 버퍼 (20mM, 150mM NaCl, pH 7.2)에서 측정하였다. 시간은 ER-ThT 공동 배양 기간을 나타낸다. Inset: 510 nm에서의 형광 강도 대 배양 시간. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 16은 계면 활성제 존재하에서 DTT 처리된 리소자임 및 BSA 샘플에 대한 ER-ThT의 형광 반응을 나타낸 것이다. 프로브 (1 μ M)의 스펙트럼은 10 mM의 DTT 및 0.1% (w/v)의 SDS를 함유한 HEPES 버퍼 (20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2)에서, 리소자임 (10 μ M) (a) 또는 BSA (10 μ M) (b)의 존재하, 37 $^{\circ}$ C에서 측정되었다. Inset: 510 nm에서의 형광 강도 대 배양 시간. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 17은 DTT에 의해 유도된 단백질 응집을 나타낸 것이다. Top row: 리소자임, Bottom row: BSA. 첫 번째 컬럼: 버퍼 용액(20 mM HEPES 및 150 mM NaCl, pH 7.2)에서의 단백질. 중간 컬럼: 10 mM DTT 첨가 후. 마지막 컬럼: 0.1% (w/v) SDS가 포함된 10mM DTT로 처리된 단백질. 이미지는 37 $^{\circ}$ C에서 배양 4시간 후에 촬영되었다.

도 18은 ER-ThT (1 μ M)의 형광 스펙트럼에 대한 리포솜 내 인지질의 극성 헤드 그룹(polar head groups of phospholipids)의 영향을 나타낸 것이다. 총 지질 농도: 9 μ M, λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 19는 ER-ThT (1 μ M)의 형광 스펙트럼에 대한 리포솜 내 인지질의 불포화 정도의 영향을 나타낸 것이다. 총 지질 농도: 9 μ M, λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 20은 ER-ThT (1 μ M)의 형광 스펙트럼에 대한 리포솜의 양이 미치는 영향을 나타낸 것이다. 완충 용액은 pH 7.2에서 20mM의 HEPES와 150 mM의 NaCl이다. 리포솜의 구성은 DPPC:DOPC:Chol:SM의 경우 5:2:1:2이다. λ_{ex} = 420 nm, 슬릿폭은 3/3 nm.

도 21은 ER 스트레스 마커의 발현에 대한 Thapsigargin 및 Brefeldin A의 영향을 나타낸 것이다. HeLa 세포 용해물은 RIPA 버퍼를 사용하여 세포 용해를 통해 준비하였고, 단백질을 10% SDS-PAGE 젤에서 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 세포는 5 μ M Thapsigargin으로, 또는 세포 용해 3시간 전 100 μ M Brefeldin A로 처리하였다.

도 22는 HeLa 세포의 ER 스트레스 마커에 대한 ER-ThT 처리 효과를 나타낸 것이다. 세포는 30분 동안 프로브 (1 μ M)로 처리하였다. 대조군으로는 Thapsigargin 처리 (3h)군을 사용하였다.

도 23은 HeLa 세포에서 Thapsigargin 매개 ER 스트레스 모델에서 ER-ThT의 시간적 모니터링 결과를 나타낸 것이다. (a)는 세포를 표시된 시간동안 Thapsigargin (5 μ M)으로 처리하고, 이미징 전에 30분 동안 ER-ThT (1 μ M)를 세포와 함께 배양한 세포에 대해 이미지를 촬영하였다. λ_{ex} = 458nm, λ_{ex} = 475-525nm (밴드패스 필터). (b)는 세포 당 평균 형광 강도 (n = 12)를 나타낸다(*P <0.05, **P <0.01).

도 24는 HeLa 세포에서 Brefeldin A 매개 ER 스트레스 모델에서 ER-ThT의 시간적 모니터링 결과를 나타낸 것이다. 세포를 표시된 시간동안 Brefeldin A (100 μ M)로 처리하고, 이미징 전에 30분 동안 ER-ThT (1 μ M)를 세포와 함께 배양한 세포에 대해 이미지를 촬영하였다. λ_{ex} = 458nm, λ_{ex} = 475-525nm (밴드패스 필터).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[실시예]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물

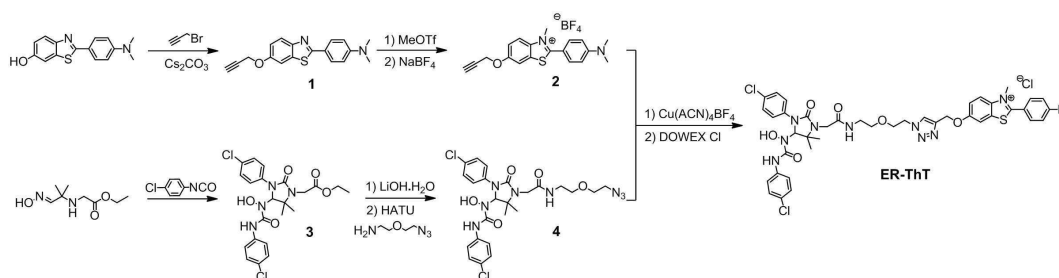
에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0023] 실험 방법

[0024] 화합물 합성

[0025] 하기 합성 경로에 따라 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물(ER-ThT)을 합성하였다.

[0026] [합성 경로]



[0027]

[0029] 화합물 1의 합성

[0030] 1.2g (4.44 mmol)의 2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-ol 및 10 mL 무수 DMF 중 4.8g (14.65mmol) Cs₂CO₃의 현탁액에 톨루엔 중 80 wt% 프로파길 브로마이드 용액 1.3 mL (8.88 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 100 mL의 DCM을 첨가하고 고체를 Celite®를 통해 여과하여 제거하였다. 여액을 물 (3 × 50mL) 및 염수 (1 × 50mL)로 세척하고 유기층을 Na₂SO₄로 건조시켰으며, 컬럼크로마토그래피 (실리카, DCM/메탄올 95/5 → 90/10)를 통해 250 mg(0.81mmol, 18%)의 화합물 1을 수득하였다.

[0031] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.13 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.6 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.78 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.08 (s, 6H), 2.58 (t, J = 2.4 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 167.15, 154.99, 152.03, 135.56, 128.65, 128.61, 122.75, 115.61, 111.79, 106.12, 104.40, 78.46, 77.82, 56.55, 40.24 ppm. MS(ESI): C₁₈H₁₆N₂OS [M + H]⁺, m/z calcd 309.11, found 309.05.

[0033] 화합물 2의 합성

[0034] 4 mL 무수 DCM 중 50 mg (0.16 mmol) 화합물 1의 용액에 70 μL (0.62 mmol) 메틸 트리플루오로메탄설포네이트를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 밤새 실온 및 암실에서 교반한 후, 50 mL의 DCM을 첨가하고 침전물을 진공 여과를 통해 분리하고 차가운 디에틸에테르 (2 × 20 mL)로 세척하고 진공 오븐에서 건조시켰다. 생성된 고체를 최소량의 MeOH에 재용해시킨 후 물 100mL를 첨가하였다. 생성된 용액에 과량의 NaBF₄를 첨가하고 침전물을 진공 여과를 통해 분리하고 진공 오븐에서 건조시켰다. 생성된 고체를 50 mL의 아세톤에 용해/현탁시키고 여과하였다. 여과액을 수집하고 증발시켜 41 mg (0.10 mmol, 63 %)의 화합물 2를 수득하였다.

[0035] ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.96 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.49 (dd, J = 9.3 Hz, J = 2.6 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.92 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.18 (s, 3H), 3.15 (s, 6H), 2.95 (t, J = 2.4 Hz, 1H) ppm. NMR (125 MHz, CD₃CN): δ 173.61, 158.09, 155.05, 136.64, 133.02, 130.71, 119.82, 118.41, 112.87, 111.74, 108.25, 78.57, 77.76, 57.48, 40.27, 39.05 ppm. MS(ESI): C₁₉H₁₉N₂OS [M]⁺, m/z calcd 323.12, found 323.00.

[0037] 화합물 3의 합성

[0038] 2mL 건조 THF 중 680 μ L (5.30 mmol) 4-클로로페닐 이소시아네이트 용액을 12 mL 건조 THF 중 500 mg (2.65 mmol)의 ethyl {[(2E)-2-(hydroxyimino)-1,1-dimethylethyl]amino}acetate 용액에 적가하였다. 생성된 용액을 밤새 실온에서 교반한 다음 감압하에 농축시켰다. 생성물을 디클로로메탄에서 결정화하고, 여과를 통해 수집하고, 디에틸에테르로 세척 후 건조시켜, 783 mg (1.58 mmol, 60%)의 화합물 3을 수득하였다.

[0039] ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.78 (br. s, 1H), 9.27 (br. s, 1H), 7.71-7.62 (m, 4H), 7.40-7.28 (m, 4H), 6.08 (s, 1H), 4.12 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 1.31 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 169.96, 157.04, 156.00, 138.52, 138.49, 128.82, 128.74, 126.90, 126.83, 120.59, 120.27, 74.81, 60.95, 59.16, 41.37, 26.94, 19.55, 14.54 ppm.

[0041] 화합물 4의 합성

[0042] 10 mL 1/1 MeOH/다이옥산(v/v) 중 85mg (0.17mmol)의 화합물 3의 교반된 용액에 5mL 물 중 30mg (0.68mmol) LiOH $\cdot$ H₂O를 첨가하고 생성된 용액을 밤새 교반하였다. 1N HCl 용액을 사용하여 용액의 pH를 2로 조정하고 DCM (5 $\times$ 30 mL)으로 추출하였다. 유기층을 합하고 Na₂SO₄로 건조하고 용매를 감압하에 제거하여 64mg (0.14mmol, 79%)의 카르복실 산을 얻었으며 추가 정제없이 사용하였다. 이렇게 수득된 화합물 64mg을 무수 DMF 2mL에 용해시키고 용액을 0 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 유지하면서 58mg (0.15mmol) HATU를 첨가하였다. 아이스 배스(ice bath)를 제거하고, 이어서 20mg 2-(2-azidoethoxy)ethanamine 및 70 μ L (0.45mmol) DIPEA를 첨가한 후, 용액을 어둠 속에서 밤새 실온에서 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 잔류물을 컬럼크로마토그래피 (실리카, DCM/메탄올 100/0 $\rightarrow$ 96/4)를 통해 정제하여 41mg(0.07mmol, 51%)의 화합물 4를 수득하였다.

[0043] ^1H NMR (500 MHz, CD₃CN + DMSO- d_6): δ 9.95 (br. s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.28 (br. t, J = 5.4 Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 4.00 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 3.65 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 3.62 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.54 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.46-3.29 (m, 4H), 1.36 (s, 3H), 1.30 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CD₃CN + DMSO- d_6): δ 170.67, 157.24, 157.10, 138.94, 138.31, 129.38 (X2), 128.41, 128.38, 122.29, 121.38, 75.39, 70.02, 69.81, 60.06, 51.23, 43.17, 39.73, 25.57, 19.20 ppm. MS(ESI): C₂₄H₂₈³⁵Cl₂N₆O₅ [M+Na]⁺, m/z calcd 601.15, found 601.05.

[0045] ER-ThT의 합성

[0046] 41 mg (0.07 mmol)의 화합물 4 및 30 mg (0.07 mmol)의 화합물 2를 2 mL 무수 DMF에 용해시키고, 30분 동안 아르곤 가스를 버블링하였다. 그 후, 10 mol% Cu (ACN)₄BF₄를 첨가하고, 생성된 혼합물을 밤새 40 $^{\circ}\text{C}$, 어두운 곳에서 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 잔류물을 컬럼크로마토그래피 (실리카, DCM/메탄올 96/4 $\rightarrow$ 90/10)를 통해 정제하였다. 생성된 BF₄⁻ 염을 MeOH에 용해시키고, Dowex® chloride 컬럼을 통해 천천히 용출시켜, ER-ThT의 상응하는 Cl⁻ 염 (13.6 mg, 14 mmol, 20%)을 수득하였다.

[0047] ^1H NMR (500 MHz, CD₃CN, BF₄⁻ salt): δ 9.22 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.86 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.71-7.66 (m, 5H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.42 (dd, J = 9.3 Hz, J = 2.6 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 7.10 (br. t, J = 5.5 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.17 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.52 (dt, J = 5.5 Hz, J = 5.0 Hz, 2H), 4.13 (s, 3H), 4.09 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 3.82 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.65 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 3.52-3.42 (m, 2H), 3.35-3.24 (m, 2H), 3.16 (s, 6H), 1.33 (s, 3H), 1.30 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CD₃CN, BF₄⁻ salt): δ 173.15, 171.23, 159.04, 157.50, 156.92, 155.08, 143.26, 138.91, 138.53, 138.27, 133.06, 130.73, 129.48, 129.45, 128.57, 128.42, 126.07, 122.06, 121.64,

119.89, 112.93, 111.77, 107.94, 75.49, 70.00, 69.63, 63.10, 60.03, 51.18, 43.00, 40.35, 39.91, 39.07, 25.63, 19.39 ppm. MS(ESI, Cl^- salt): $\text{C}_{43}\text{H}_{47}^{35}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_6\text{S} [\text{M}]^+$, m/z calcd 901.28, found 901.15.

[0049] 용액 내 ER-ThT의 분광 분석

[0050] DMSO에서 ER-ThT의 스톱 용액을 준비하고, 용액 실험을 위해 희석하였다. 흡수 및 방출 스펙트럼은 각각 UV-560 (JASCO) 분광 광도계 및 RF-5301PC 분광 형광 계 (Shimadzu)에서 기록하였다. 단백질을 포함하는 용액의 제조를 위해, 단백질 스톱 용액 (100 $\mu\text{g/mL}$)을 10mM HEPES (pH 7.4, 150mM NaCl)에서 희석하였다. 단백질의 환원적 변성을 위해 DTT용 스톱 용액 (1M)을 희석하여 10mM 인산 나트륨 완충액 (pH 7.0)에서 농도를 조정하였다.

[0052] 리포솜의 제조(Preparation of Liposomes)

[0053] 리포솜은 10 mL LIPEX® Thermobarrel Extruder (Transferra Nanosciences Inc., Burnaby, Canada)를 이용하는 압출 방법(extrusion method)을 기반으로 제조하였다. 간략히, 지질 혼합물을 클로로포름 (10 mL)에 용해시킨 다음 볼텍스(vortex)를 통해 혼합물을 균질화시켰다. 그런 다음 회전 증발기와 진공 펌프를 순차적으로 적용하여 용매를 제거하여 혼합물을 얇은 지질 필름으로 만들었다. 얻어진 필름에 10mL의 HEPES 완충액 (preheated, pH 7.2, 150 mM NaCl)을 첨가하고 3회 (각각 5초) 볼텍싱하였다. 예열된 온도는 Tc 값이 가장 높은 지질의 겔-지질 결정 전이 온도 (Tc) 이상으로 유지시켰다(DOPC, DPPC, 및 sphingomyelin 각각은 -17, 41, 및 50 °C). 생성된 에멀전을 압출기 장비에 로딩하고, 200psi에서 N_2 가스로 압력을 가하여 필터 세트 (2 sheets of polycarbonate filters 및 1 sheet of a polyester drain disk)를 통과시켰다. 압출은 10회 반복하였다. 회수된 용액의 최종 부피는 약 9mL였고, 실험 샘플을 만들기 위해 용액을 희석시켰다.

[0055] 세포 배양 및 공초점 현미경 분석

[0056] 인간 자궁 경부암 세포 (HeLa)를 10% 소 태아 혈청 (Gibco BRL), 페니실린 (100 U/mL) 및 스트렙토 마이신 (100 $\mu\text{g/mL}$)이 보충된 DMEM (WelGene Inc., Seoul, Korea)에서 배양하였다. 배양된 세포는 5% CO_2 가 포함된 가습 분위기에서 37 °C로 유지되었다. 세포 이미지는 공초점 현미경 (Zeiss model LSM 510)을 이용하여 획득하였다.

[0058] 웨스턴 블롯

[0059] 반-건식 블로터 (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA)를 웨스턴 블롯 실험에 사용하였다. 간략히, 단백질 샘플은 RIPA 버퍼(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin)를 사용하여 플레이트 상에서 수확하였다. 10% 폴리아크릴 아마이드 겔을 사용하여 전기영동을 수행하였으며, 웰 당 단백질 샘플의 양은 10 μg 이고, 블로팅 멤브레인은 니트로 셀룰로오스 멤브레인이었다. 멤브레인 블로킹을 위해 실온에서 1시간 배양시 무지방 분유(nonfat dried milk) 용액을 사용하였다. Anti-BiP, anti-phospho PERK, anti-PERK 및 anti-IRE1 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였다. Anti-phospho IRE1 항체, secondary HRP-conjugated anti-antibody 및 anti-ATF6 항체는 각각 Abcam, Santa Cruz Biotechnology 및 Novus에서 입수하였다. 내부 표준은 anti-b-actin (Santa Cruise Inc)을 사용하였다. 겔 상의 면역 반응성 단백질 밴드는 ATTO Corporation의 향상된 화학 발광 키트를 적용하여 시각화하였다.

[0061] 화학적 샤페론(Chemical chaperones), UPR 억제제(inhibitors) 및 소기관 트래커(organelle trackers)

[0062] Thapsigargin은 Abcam (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였고, PBA(odium 4-phenylbutyrate)는 BIOVISION (Milpitas, CA, USA)에서 구입하였으며, GSK2656157은 Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA, USA)에서 구입하였고, Brefendin A (Bref. A), tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), trimethylamine N-oxide (TMAO),

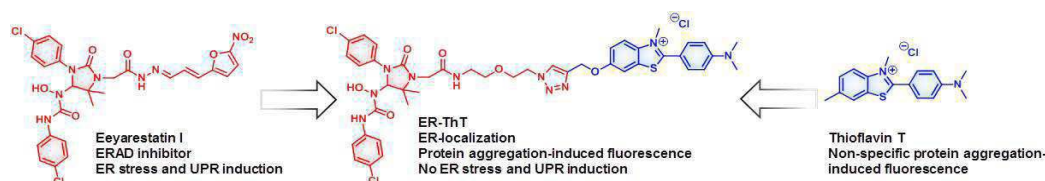
Ceapin-A7 및 Toyocamycin은 Sigma-Aldrich (Mo, USA)에서 구입하였으며, ER-Tracker Red®, Mito-tracker® 및 Lyso-tracker®는 Invitrogen (Oregon, USA)에서 구입하였다.

[0064] 결과 및 고찰

[0065] 설계 및 합성

[0066] 본 발명에 따른 단백질 응집체 검출용 형광 프로브 화합물 ER-ThT는 ER 안내 유닛(guiding unit) 및 단백질 응집체 감지 유닛으로 구성된다. ER 안내 유닛으로, ER-연관 분해과정(ERAD)에 관여하는 이야레스탄틴 I (ES_I)을 적용하였다 (Scheme 1 참조). 이러한 표적화 모이어티는 ERAD-연관 데를린(Derlin)-1 단백질과 공존하는 것으로 나타났지만, 5-니트로푸릴-아크롤레인 서브유닛이 없는 경우에 유의미한 억제 효과를 나타내지 못했다. 감지 유닛으로, 점도 및 단백질 응집 형광체인 티오플라빈 T(ThT)(Scheme 1 참조)를 선택하였다. 아자이드-치환 ES_I-안내 유닛 유사체(zide-substituted ES_I-guiding unit analogue)와 프로파르길-장식된 ThT-유사체(propargyl-decorated ThT-analogue) 간의 구리-촉매화 클릭 반응을 이용하여 ER-ThT를 합성하였으며, 합성 화합물의 존재 및 특성은 ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS를 통해 확인하였다.

[0067] [Scheme 1]



[0070] 광물리적 특성

[0071] 최대흡수 및 최대방출이 각각 418 nm 및 488 nm의 값을 보여주는 ER-ThT의 흡수 및 방출 스펙트럼을 ACN에서 검출하였고 (도 1A 참조), 이는 알콕시-치환 ThT 유사체에 대해 보고된 값과 일치한다(Qin, L.; Vastl, J.; Gao, J. Highly sensitive amyloid detection enabled by thioflavin T dimers. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 1791-1795). 도 1B 및 도 9에서는 ACN 및 PBS에서 ER-ThT 농도에 대한 형광 강도를 나타내었다. ACN에서의 형광은 농도에 따라 선형 의존도를 보였으며 (도 1B inset), 이는 ER-ThT이 5 μM까지 완전히 용해되었음을 의미한다. 반면, PBS 에서는, 임계 마이셀 농도가 대략 2 μM로 추정되는 고농도에서 마이셀(micelle)의 형성으로 인해 프로브 농도에 대한 형광 강도가 비선형 특성을 보였다(도 9). 따라서, 수성 매질을 사용한 모든 후속 실험에서, ER-ThT의 농도를 1 μM로 유지하였으며, 이를 통해 ER-ThT 자가-응집으로 인한 왜곡이 발생하지 않도록 하였다.

[0072] 상이한 용매에서의 ER-ThT 형광은 극성이 증가되면 작은 bathochromic solvatochromic 쉬프트가 나타나지만, 형광 세기와 극성 간의 명확한 연관성은 나타나지 않았다(도 10). 수성 매질에서, 염료의 형광은 pH 5.0 및 9.0 사이에서 비교적 일정하게 유지되었으며, 이는 ER에서 흔히 관찰되는 pH 수준에 따른 간섭이 없음을 나타낸다 (도 11).

[0073] 모체 ThT 화합물과 유사하게, ER-ThT의 방출 스펙트럼은 여기서 뒤틀린 분자 내 전하 이동 기반의 탈 여기 경로에 민감할 것으로 예상되며 용매 점도에 대한 강한 의존성을 보일 것으로 예상되었다. 따라서, 이러한 ER-ThT 형광의 점도 의존성을 물:글리세롤 두 성분의 혼합물에서 평가하였으며, 이를 통해 용매 점도와 형광 세기 간의 명확하고 직접적인 연관성이 있음을 관찰하였다(도 2B 참조). 또한, 등극성 이성분 용매 혼합물(에틸렌 글리콜:글리세롤)에서도 유사한 결과를 얻었다(도 12). 이러한 결과를 통해, ThT의 주요 분광 특성이 ER-ThT에서도 유지된다는 것을 확인하였다.

[0075] 용액에서 단백질 응집체에 대한 형광 반응

[0076] 네이티브 리소자임의 구조는 대부분 α-헬릭스로 구성되고, 분자 내 이황화 결합에 의해 안정화된다. DTT에 의해 이러한 이황화결합이 감소되면, 리소자임의 주된 이차 구조가 α-헬릭스로부터 β-플리트 시트(β-pleated sheet)로 변형되면서 불안정해지고 결과적으로 응집체가 형성된다. 이러한 β-시트-지배적 단백질성 아밀로이드

응집체는 이차 구조에 대한 형광단의 신호로 인해 ER-ThT에 의해 형광 검출이 가능할 것으로 기대된다.

[0077] 도 3A에서 나타난 바와 같이, 네이티브 리소자임에 대한 DTT의 첨가는 대략 30분의 지체시간 이후에 ER-ThT 형광의 극적인 증가를 유도하며, 이는 명백히 β -시트 풍부 리소좀을 검출하는데 ER-ThT의 능력이 우수함을 입증한다. 형광 향상은 리소자임 농도에 의존하였으며(도 13), 이는 방출이 부분적으로 비접힘된 리소자임이 아닌 응집된 단백질에 의한 것임을 확인시켜준다. 대조적으로, DTT의 부재는 어떠한 유의미한 형광 변화도 야기하지 않았다(도 14). 유사한 실험을 α -헬릭스가 우세한 이차 구조를 지닌 단백질인 소혈청알부민(BSA)에 적용하였다. 도 3B에 나타난 바와 같이, 용액에 대한 DTT의 첨가는 약간의 지체 상태 후에 극적인 형광 향상을 가져왔다. 무시할 수 없는 초기 형광은 ThT 모이어티에서 분자 내 이동을 부분적으로 제한하는 프로브와 BSA 상의 지방친화적 지방산-결합 부위 간의 상호작용의 결과인 것으로 보인다. 추가적인 실험을 통해 DTT만 존재하는 경우에는 형광이 없음을 확인한 반면(도 15), 계면 활성제를 첨가하여 변성된 단백질의 응집을 방지할 경우 ER-ThT 형광도 배제됨을 확인하였다(도 16-17).

[0079] 단백질 검출에 대한 지질이중층의 영향

[0080] 세포에서 ER 막과 형광 상호작용이 일어날 수 있기 때문에, 단백질 응집체의 ER-ThT 형광 감지에 대한 인지질막에 의한 잠재적 간섭여부를 리포솜으로 평가하였다. 도 4에 나타난 바와 같이, 리포솜의 존재하에, 전술한 BSA 실험과 유사하게 친유성 리포솜과 프로브와의 상호작용으로 인해 ER-ThT의 형광이 네이티브 리소좀 단독일 경우보다 약간 상승하였다. 그러나 형광 강도는 실험 동안 변하지 않았다. 또한, DTT 존재하에서, 리포솜의 첨가가 리소자임 응집체를 검출하는 프로브의 능력에 영향을 미치지 않음을 확인하였고, 이는 프로브가 ER 멤브레인에서 주요 간섭을 나타내지 않음을 암시한다.

[0081] 멤브레인에서의 주요 간섭이 없음을 추가적으로 확인하기 위해 발광에 대한 멤브레인 구성의 영향을 평가하였다. 가변적 헤드-그룹 전하를 지닌 리포솜의 존재 하에서 ER-ThT의 형광 스펙트럼(도 18), 및 리포솜 형성에서 다양한 비율의 경화 지방산의 결과로 생성되는 불포화도(도 19)를 측정하였으며, 이러한 결과를 통해 세포에서 ER-ThT의 형광 변화가 ER 막의 물리화학적 변화보다는 단백질 응집체의 형성으로 인한 것임을 확인하였다(도 20).

[0083] 살아있는 세포에서의 단백질 응집체 검출

[0084] 전술한 실험에서 입증된 바와 같이, 리포솜의 존재하에서도 ER-ThT의 발광은 단백질 응집 과정에 매우 민감함을 확인하였다. 이어서, DTT 처리 세포에 프로브 적용시에도 유사한 특성이 나타나는지를 실험하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 살아있는 세포에서 DTT에 의한 단백질의 환원적 변성은 두드러진 형광 증가를 유도하였고, DTT 사전 배양 시간과도 상당한 연관성이 있는 것으로 확인되었다. 단백질 접힘 부위인 ER 루멘이 대체로 산화적 환경을 유지함을 고려할 때, DTT 처리는 ER 내 프로세스에 혼동을 주어 단백질 응집을 유발하며, 결과적으로 ER-ThT 형광 향상으로 이어지는 것을 확인하였다.

[0086] HeLa 세포에서 ER-ThT의 세포하 분포

[0087] 단백질 응집체의 세포 내 위치를 파악하기 위해, ER 스트레스를 Thapsigargin(ER 내로의 칼슘이온 추출에 대한 강한 억제제)으로 유도하면서, 세포기관 선택적 마커를 사용하여 연속 공초점 현미경 분석을 HeLa 세포 내 ER-ThT를 대상으로 수행하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 프로브로부터 뚜렷한 방출이 세포에서 관찰되고, 이러한 이미지는 ER 트래커와 잘 중첩되었다. 따라서, 이러한 결과를 통해, 프로브가 ER 내에 위치하고 ER 스트레스 모델에서 단백질 응집체를 감지함을 명확하게 확인하였다. 또한, 이러한 결과는 ES₁의 ER 안내 유닛이 ThT 분자를 ER 내로 위치시킴을 나타낸다.

[0089] Brefeldin 및 Thapsigargin 매개 ER-스트레스 유도에 대한 단백질 응집체 검출 비교

[0090] ER 스트레스 유도체인 Brefeldin A 및 Thapsigargin을 이용하여 단백질 응집과 ER 스트레스의 잠재적 관련성을 평가하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, Brefeldin A와 Thapsigargin 처리는 모두 ER-ThT에서 형광 반응을 유도하였으며, 이는 이러한 ER 스트레스 조건에서 단백질 응집이 발생하였음을 암시한다. ER 스트레스의 유도는 웨

스턴 블롯팅을 사용하여 확인되었으며, 증가된 BiP 발현 및 ATF6 절단, PERK 및 IRE1의 인산화와 같은 UPR 마커의 전형적인 특징을 보여준 반면(도 21), ER-ThT 단독 처리는 유사한 조건에서 유의한 ER-스트레스 유도를 나타내지 않았다(도 22). 또한, 두 ER 스트레스 세포에 대한 강도를 일시적으로 모니터링 한 결과 (도 23 및 도 24) Brefeldin A 처리시 강도가 약 12시간 후 최대에 도달 한 반면 Thapsigargin 처리는 약 3시간에서 최대 강도를 나타내었으며, Brefeldin A 처리 세포의 상대적으로 약한 세기는 화학물질에 대한 ER 스트레스 도입 메커니즘상의 차이에 기인한 것일 수 있다(도 7). 그럼에도 불구하고, ER-ThT는 ER-스트레스 유도 메커니즘에 무관하게 형광을 강화시킴을 확인하였고, 이는 단백질 응집이 ER 스트레스 및 후속 UPR 동안 일어나는 본질적 과정임을 강력하게 암시한다.

[0092] 화학적 샤페론들에 의한 ER 스트레스 하 단백질 응집의 완화

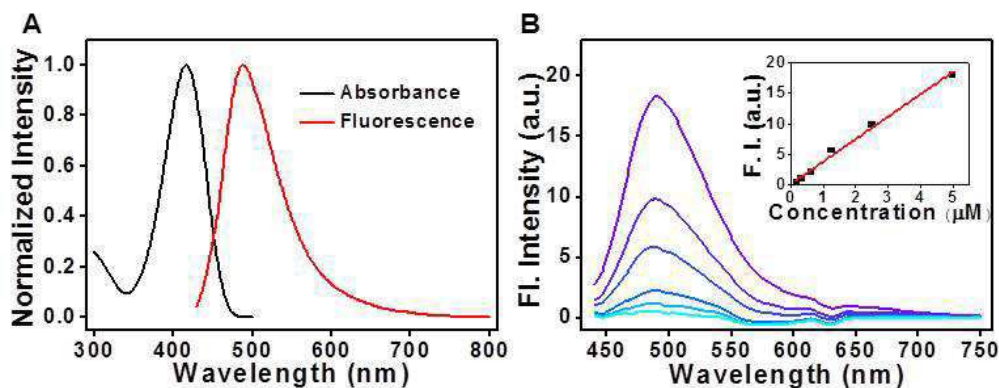
[0093] ER 스트레스 조건하에서 ER-ThT의 형광 단백질 응집 감지를 추가로 입증하고자, Thapsigargin 처리된 세포를 몇몇 ER 스트레스 완화제(화학적 샤페론)로 처리하였다. 본 실험에서, 타우로우르소디옥시콜릭산(TUDCA), 트리메틸아민 *N*-옥사이드(TMAO) 및 4-페닐부틸산(PBA)이 세포독성 UPR의 억제를 보여주었다. 도 8에 나타난 것처럼, ER-ThT의 형광 강도는 Thapsigargin 처리에 의해 극적으로 증가되었으며, ER 스트레스 세포에 대한 이러한 증가는 사용된 화학적 샤페론 처리로 인해 완전히 사라졌다. 이러한 결과는, 화학적 샤페론 처리에 따라 추정되는 약물학적 행동이 세포에서 ER-ThT의 방출에 의해 모니터링될 수 있음을 시사한다. 또한, 이러한 결과는 ER 스트레스에서 단백질 응집체가 관여하고 있고, ER-ThT에 의해 이러한 응집체의 가시화가 가능하다는 점을 지지한다.

[0095] 본 발명에서는 ER 스트레스 하에서 비접힘 단백질의 축적정도를 가시화할 수 있는 ER 표적화 단백질 응집체 형광 센서로서 ER-ThT를 제공한다. 본 발명에 따른 결과는 경로와 무관하게 ER 스트레스의 유도가 ER 루멘 내에 비접힘 단백질의 축적을 일으키고 아마도 비접힘 단백질의 적층형 β 시트 모티프를 통해 세포내 단백질 응집에 관여함을 제시한다. 결과적으로, 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물 ER-ThT는 우수한 광물리적 특성과 단백질 응집체에 대해서 우수한 선택성을 가지고 있어, 소포체 스트레스에 의한 단백질 응집체를 효과적으로 검출할 수 있는바, 소포체 스트레스 조절물질, 약물 전구체 등 소포체 관련 약물 개발을 위한 스크리닝 도구로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

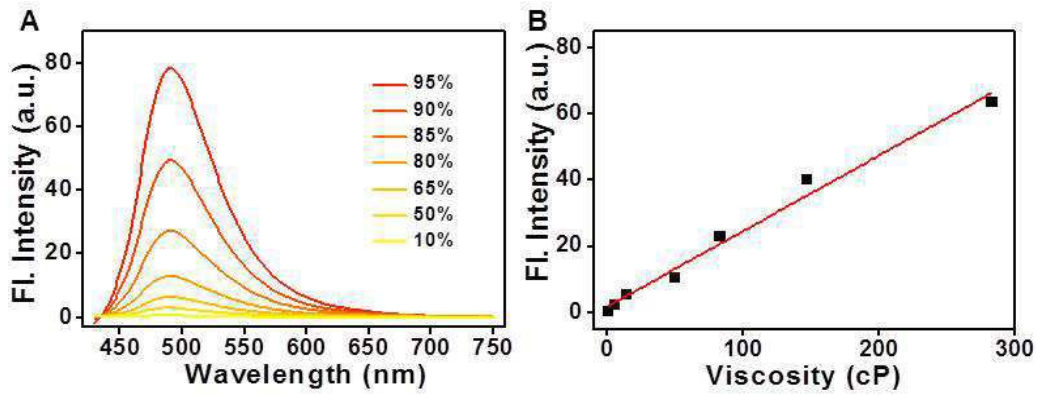
[0097] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

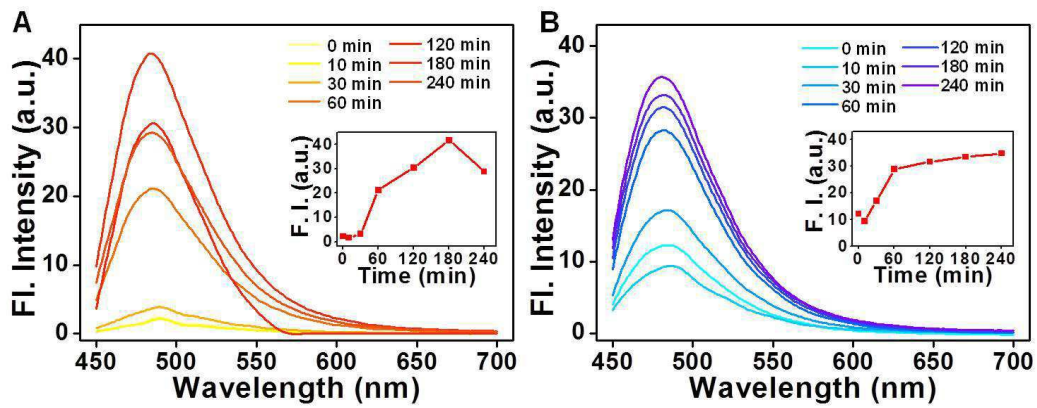
도면1



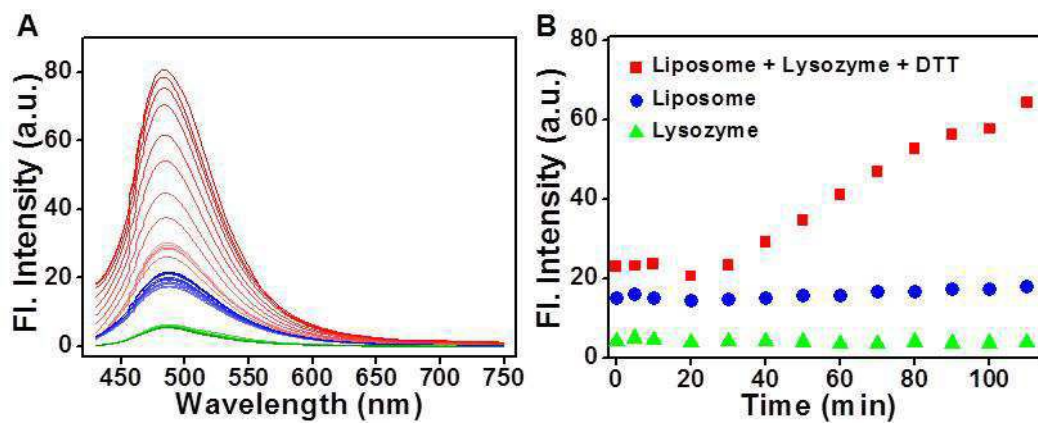
도면2



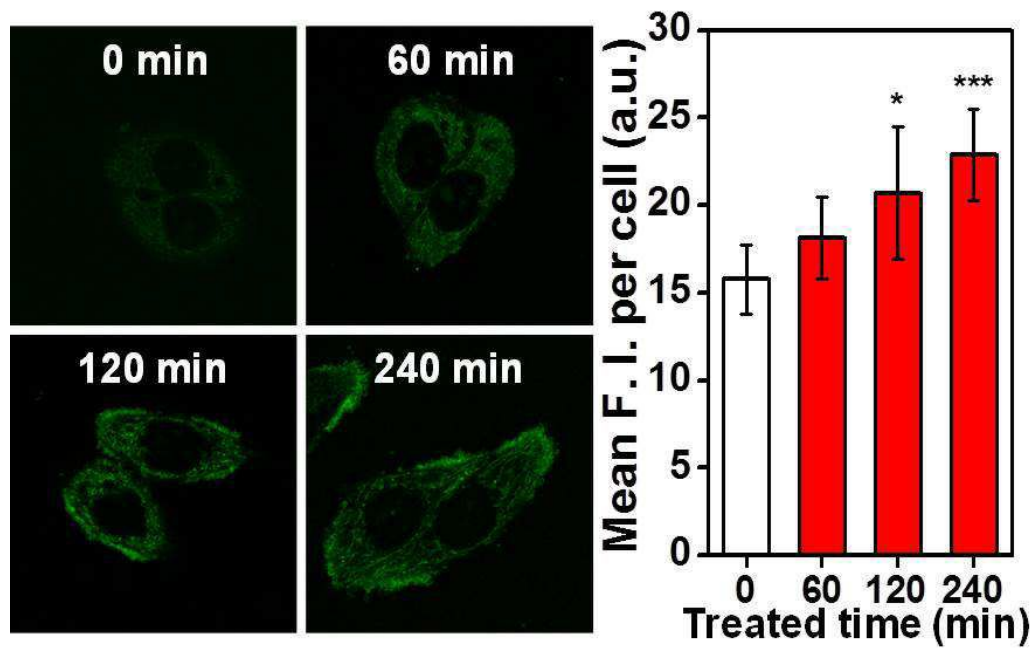
도면3



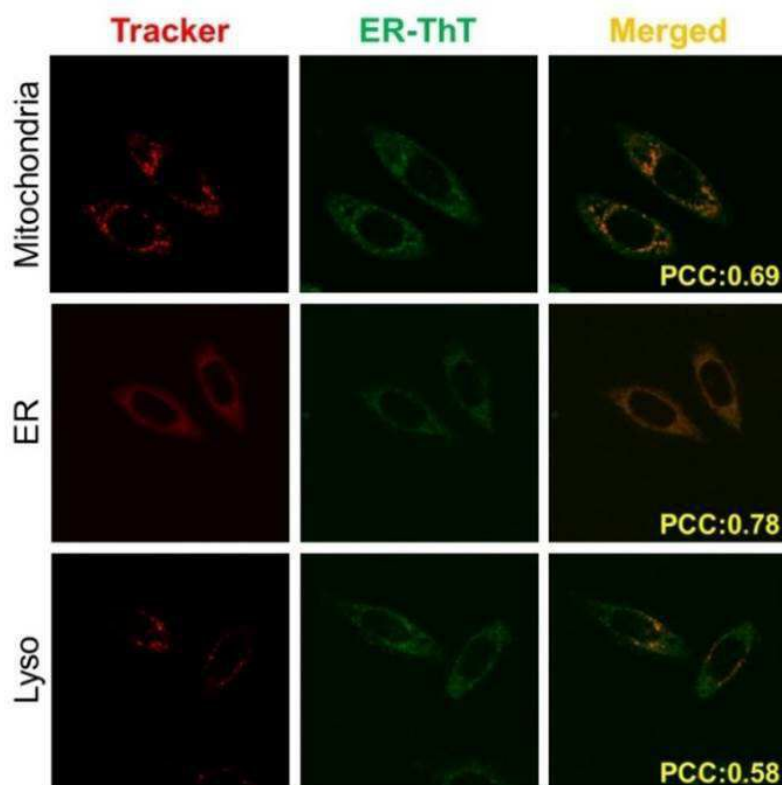
도면4



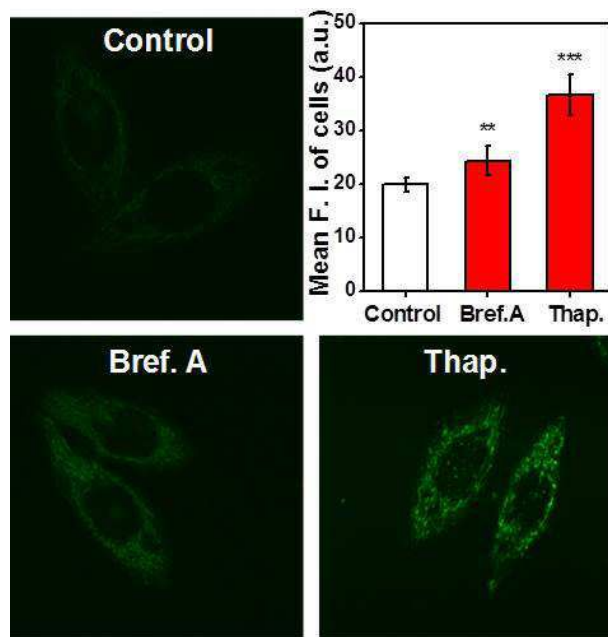
도면5



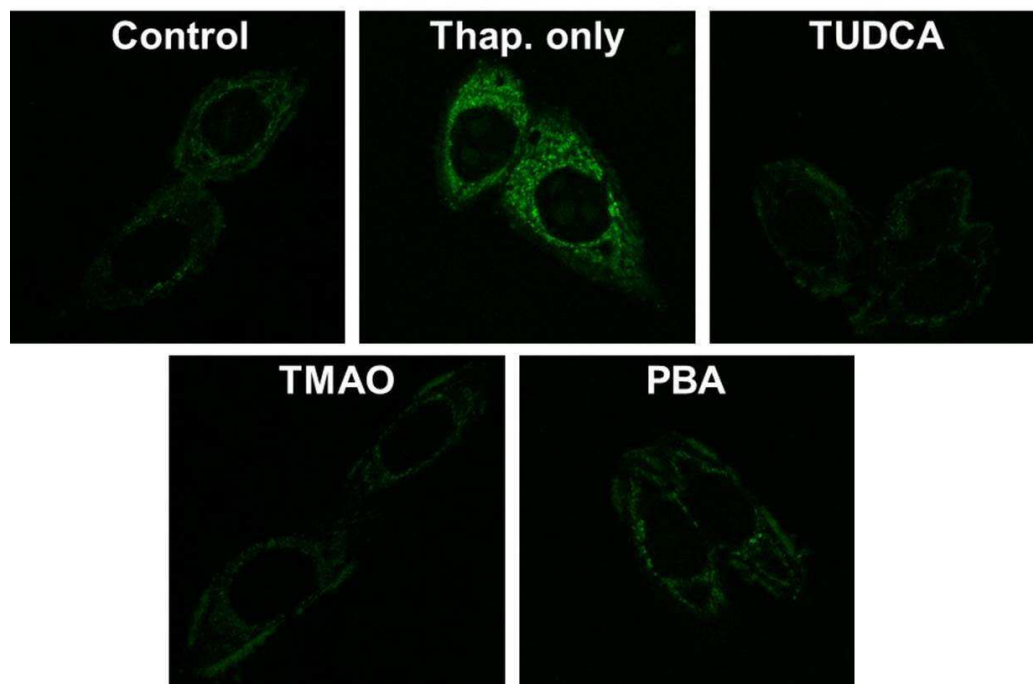
도면6



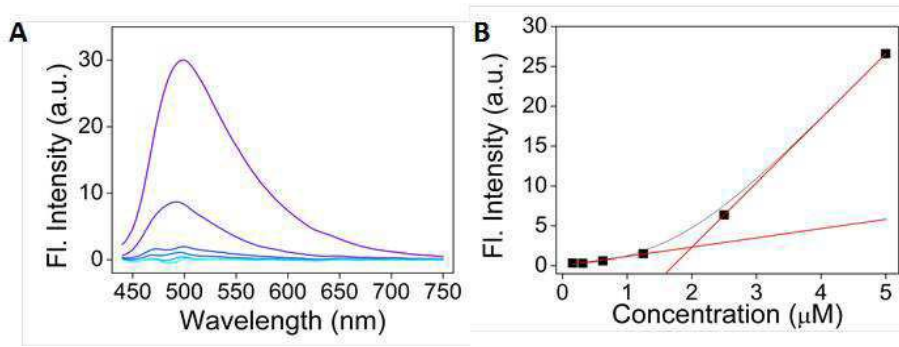
도면7



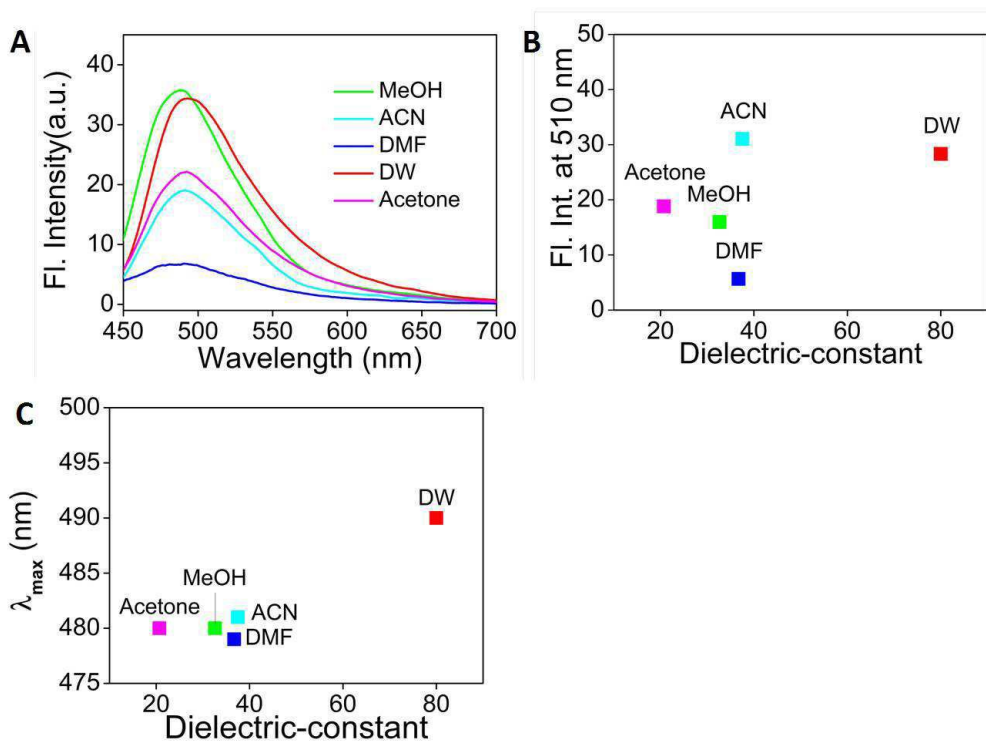
도면8



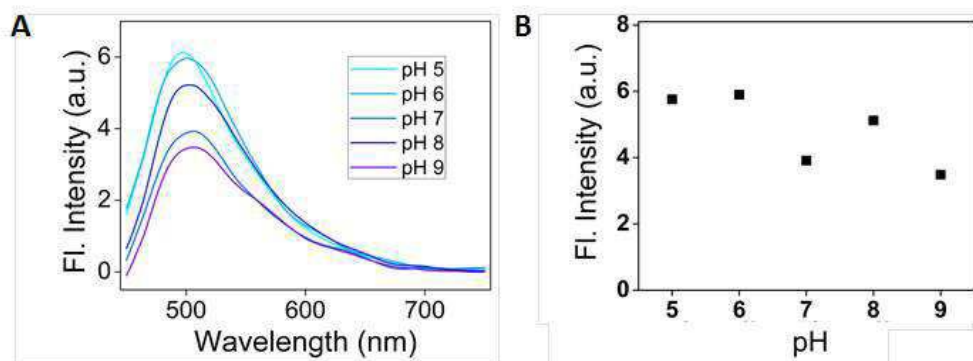
도면9



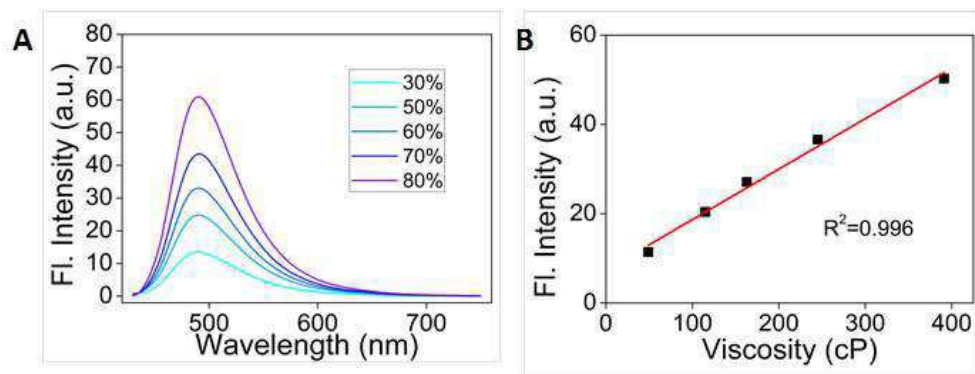
도면10



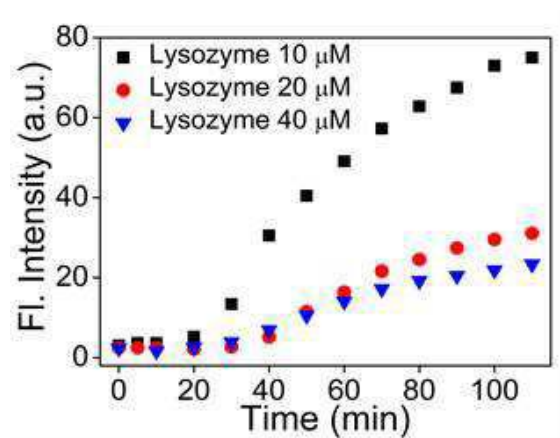
도면11



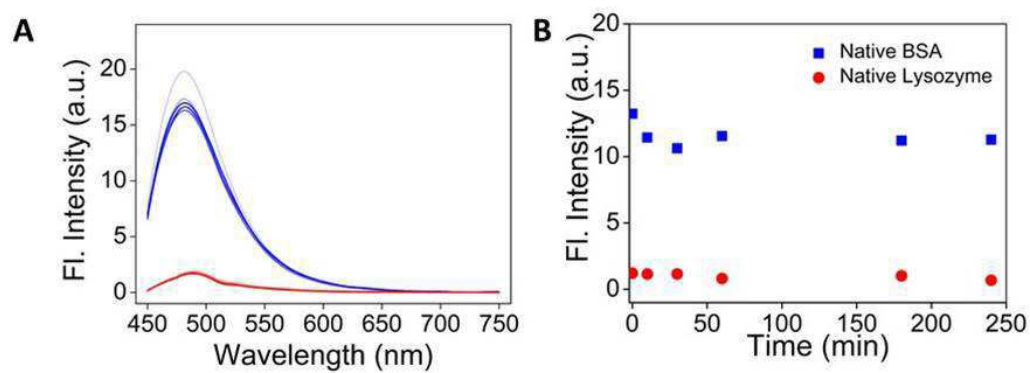
도면12



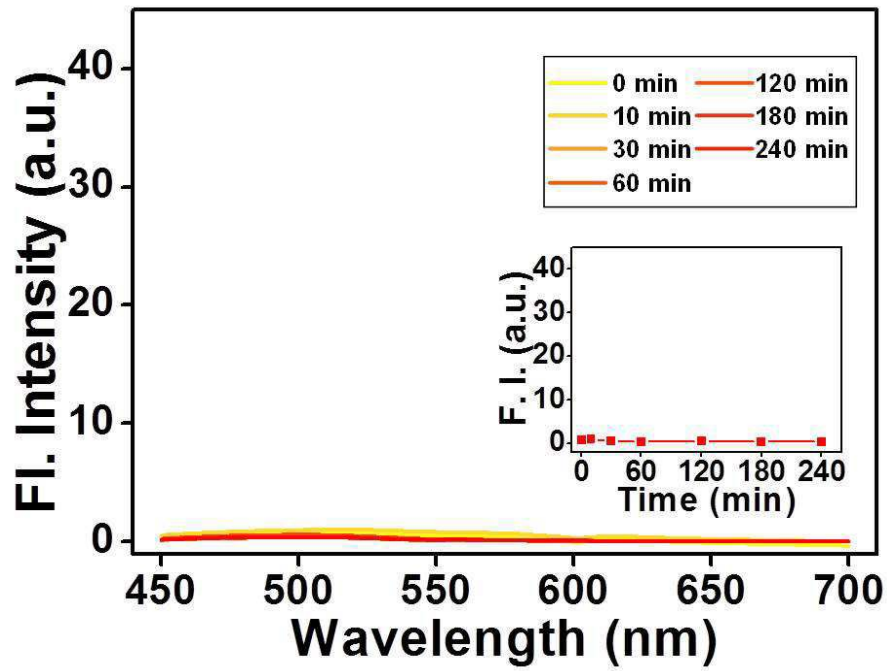
도면13



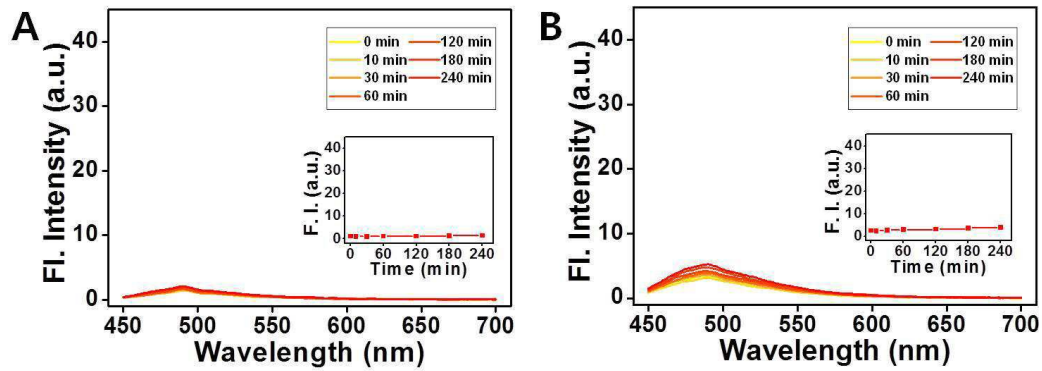
도면14



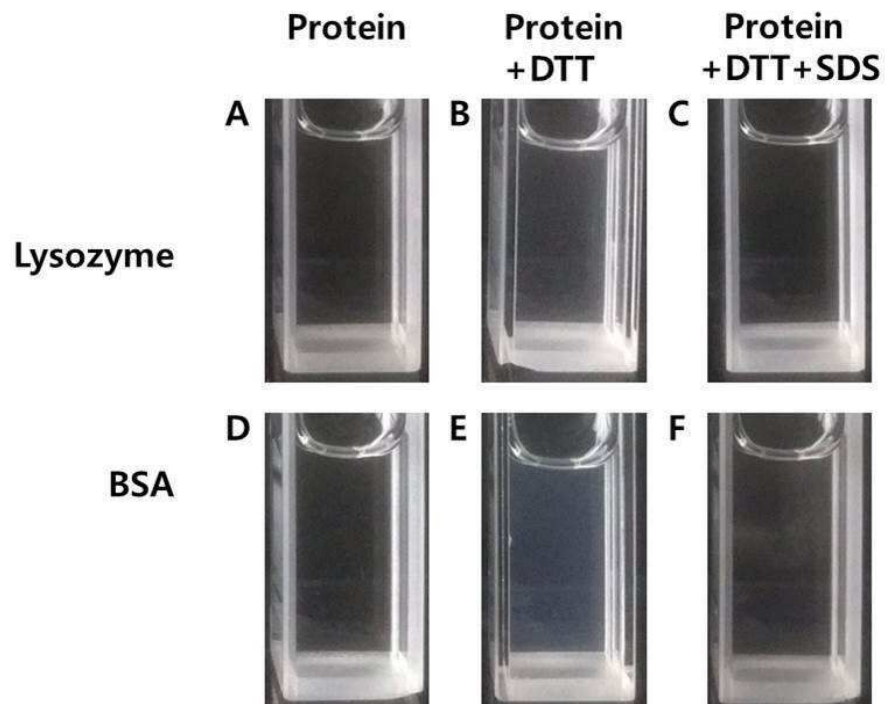
도면15



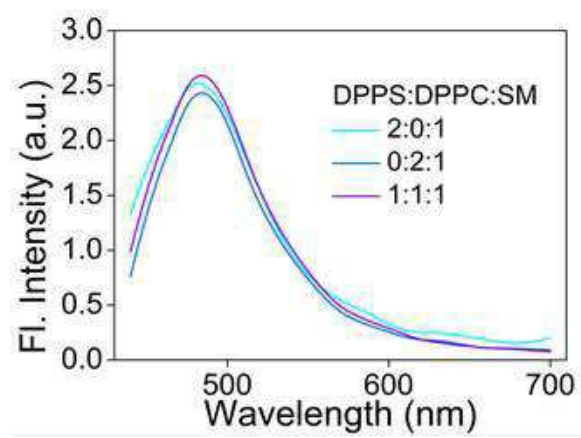
도면16



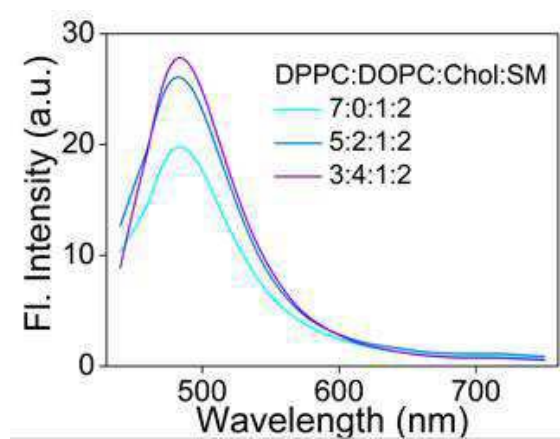
도면17



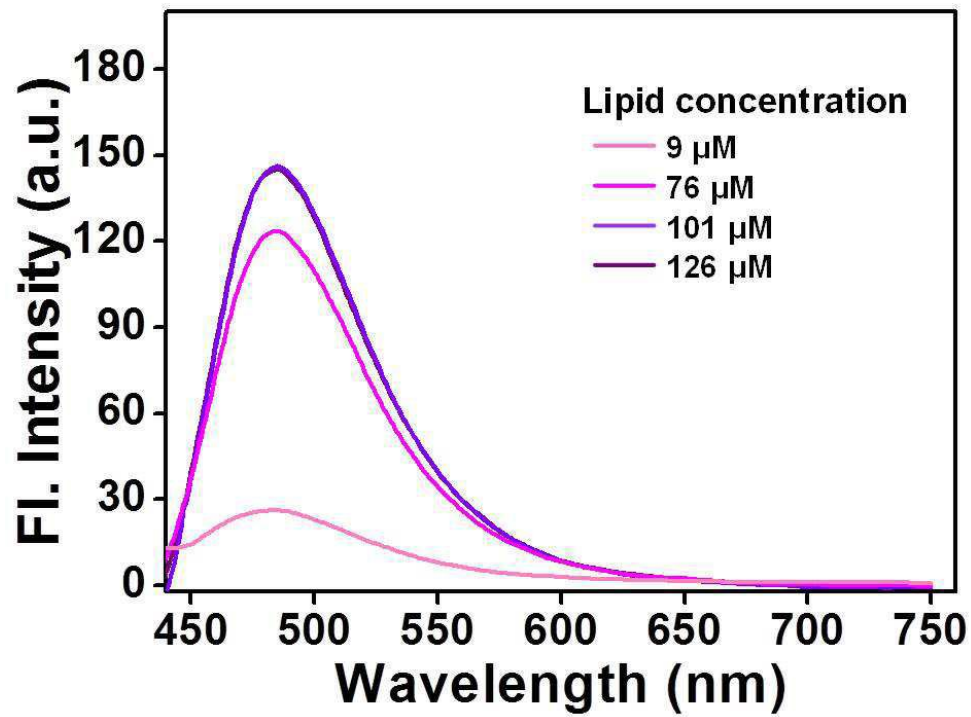
도면18



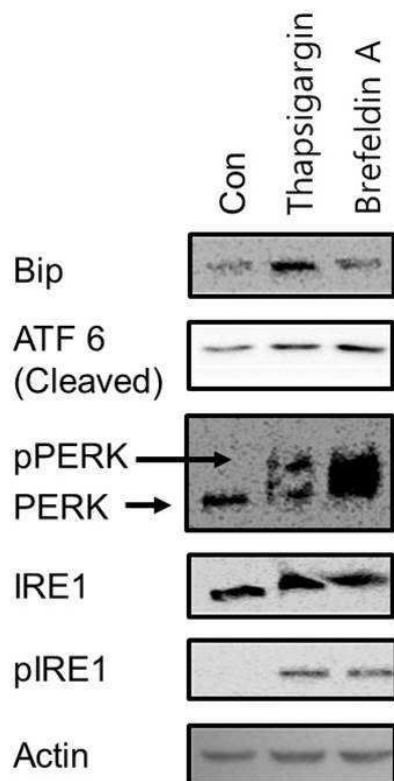
도면19



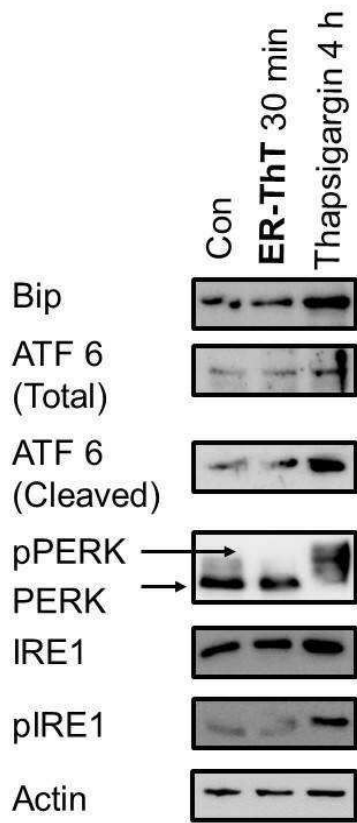
도면20



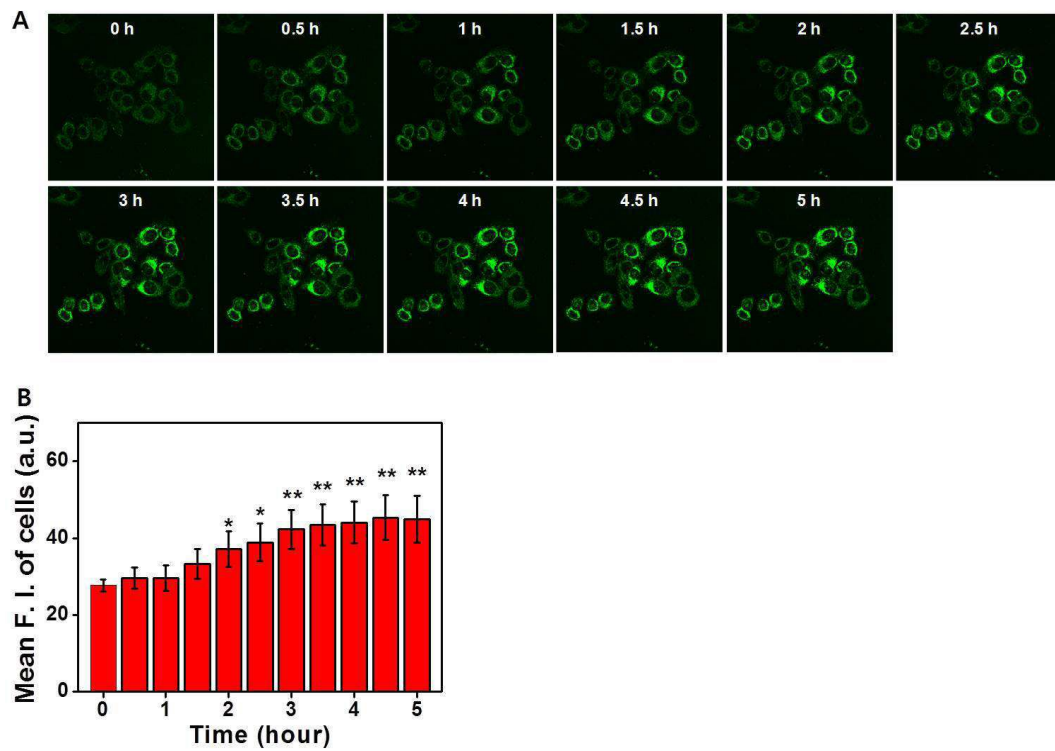
도면21



도면22



도면23



도면24

