



등록특허 10-2282950



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월27일

(11) 등록번호 10-2282950

(24) 등록일자 2021년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C09K 11/06 (2021.01)
G01N 33/582 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0009421

(22) 출원일자 2020년01월23일

심사청구일자 2020년01월23일

(56) 선행기술조사문헌
J. Am. Chem. Soc., Vol.137., pp.6781-6789
(2015)

KR1020130130254 A

Sensors, Vol.19(20), p.4525 (2019)

KR101578384 B1

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김도경

서울특별시 성북구 화랑로 214, 113동 402호(석관
동, 래미안석관)

정유나

서울특별시 양천구 신정로7길 75, 104동 508호(신
정동, 이든채)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이스스

전체 청구항 수 : 총 9 항

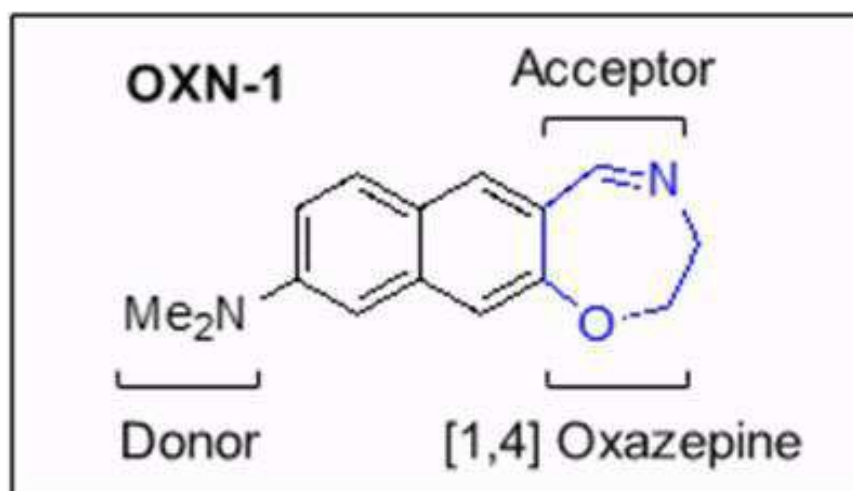
심사관 : 정현석

(54) 발명의 명칭 옥사제핀 기반의 새로운 형광체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 옥사제핀 기반의 새로운 형광체 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 형광체는 고리 내 이민 결합을 포함한 옥사제핀의 구조를 갖는 작은 유기 분자로 가수분해 안정성 및 광 안정성이 우수하며, 기존의 이민 결합을 가지는 수용액상에서의 불안정성을 해결하여 생체 내 영상화를 위한 형광체의 개발 한계점들을 극복하였다. 뿐만 아니라, 세포소기관인 리소좀를 탐지할 수 있고, 독성이 낮아 세포 및 조직의 일광자 및 이광자 영상화가 가능하므로, 세포 또는 조직의 영상화에 활용될 수 있다. 나아가 옥사제핀의 구조가 가지는 알려진 장점들을 바탕으로 해당 구조를 기반으로 하는 항암제, 항균제, 항염증제의 개발 등 여러 연구 분야와 관련되어 폭 넓게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C09K 2211/1011 (2013.01)

C09K 2211/1018 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345298131
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/일반연구자지원사업
연구과제명	알츠하이머병 내 아밀로이드-베타 응집체 분해 기능의 나노입자 개발
기 여 율	90/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20190480
부처명	한국연구재단(통합)
과제관리(전문)기관명	한국연구재단(학술진흥)
연구사업명	이공분야기초연구사업/중점연구소지원사업
연구과제명	이지바로[중점연구소(이공),2/3] 경희대학교 의과학 연구소 - 활성산소 조절을 통한
만성질환 예방 치료에 관한 연구	
기 여 율	10/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

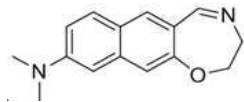
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물로 표시되는 세포 또는 조직 영상화(imaging)용 형광체:

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 형광체는 고리 내 이민 결합이 전자받개 그룹의 역할을 하고, 다이메틸아민이 전자주개 그룹의 역할을 하여 분자 내 전하이동 현상을 통해 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는 세포 또는 조직 영상화용 형광체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 형광체는 이광자 흡수 형광체인 것을 특징으로 하는, 세포 또는 조직 영상화용 형광체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 형광체는 세포 또는 조직 내의 리소좀(Lysosome)을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는, 세포 또는 조직 영상화용 형광체.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 형광체는 여기 파장이 800 내지 820 nm인 것을 특징으로 하는, 세포 또는 조직 영상화용 형광체.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 형광체는 세포 또는 조직을 황색의 형광으로 영상화하는 것을 특징으로 하는, 세포 또는 조직 영상화용 형광체.

청구항 7

제 1 항의 형광체를 세포 또는 조직에 처리하고 관측하는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 영상화 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 관측은 공초점 현미경(Confocal laser scanning microscopy) 또는 이광자 현미경(Two photon excitation microscopy)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는, 세포 또는 조직의 영상화 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 세포 또는 조직은 분리된 세포 또는 조직인 것을 특징으로 하는, 세포 또는 조직의 영상화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 옥사제핀 기반의 새로운 형광체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 형광체를 이용한 영상화는 외부에서 조사된 빛을 형광물질이 세포, 조직 그리고 생체 내에서 흡수하여 여기가 되고, 스톡 이동(stock shift)에 의해 여기 된 파장보다 긴 파장의 빛을 방출할 때 이를 통해 영상화하는 것을 의미한다(Photochem. Photobiol., 1997, 66, 523). 이러한 형광체를 이용한 영상화는 여러 분야의 연구자들에 의해서 다양한 연구가 수행되어 왔다.

[0003] 예를 들어, 형광물질을 이용하여 알츠하이머 질병에서 모노아민 옥시데이즈(monoamine oxidase)의 활성을 감지하거나, 약물에 의해 발생한 급성 신장 손상(Drug-induced acute kidney injury, AKI)을 초기에 감지하기 위한 형광체나 다양한 암을 진단하기 위한 형광체 등의 여러 연구결과들은 형광체를 진단의 도구로 사용될 수 있음을 지속적으로 보여주고 있다(ACS Central science, 2016, 2, 967; Nature Materials, 18, 1133; Chem. Soc. Rev., 2017, 46, 2237).

[0004] 이러한 선행연구들은 형광체를 이용한 생체영상화가 다양한 질병에 대한 조기 진단 및 치료의 도구로 사용이 가능하며, 기초연구에서부터 임상연구에 이르는 폭넓은 생물학적 연구범위를 포괄하는 중요한 소재로 활용될 수 있음을 보여준다.

[0005] 한편, 옥사제핀(Oxazepine)은 산소와 질소를 포함한 7개의 원자로 구성된 불포화 헤테로사이클고리(heterocyclic ring)구조이다(Organic Chemistry, 2015, 12, 345). 통상적으로 옥사제핀 구조는 아목사핀(Amoxapine), 록사핀(Loxapine), 나이트로옥사제핀(Nitroxazepine) 등과 같은 항암제, 항염증제, 항균제의 중심골격으로 잘 알려져 있으며, 주로 생물학적 그리고 제약산업에 있어서 독특한 특성을 보이기 때문에 산업적으로 매우 유용하게 사용되고 있다(Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15, 5474; Eur. J. Med. Chem. 1987, 22, 161; Drugs. 1982, 24, 1; Gen. Psychiatry, 2015, 14, 15).

[0006] 그러나, 옥사제핀 유도체들은 산업 및 기초과학 분야에서 널리 사용되고 있음에도 불구하고, 일반적으로 옥사제핀과 같이 이민($R_2C=NR$)구조를 가지는 화합물들은 물에 의하여 가수분해되거나, 바이오틴(biothiol) 등에 의해 그 구조가 쉽게 변하기 때문에, 생물학적 환경 내에서 안정성이 낮아, 생체 영상화 목적의 형광체로 아직 개발된 바 없다.

[0008] 본 발명자들은 비교적 간단한 합성법을 통해 생체 내 pH를 포함한 여러 pH조건에서의 구조적 안정성과 광 안정성이 높은 새로운 형광체를 개발하고, 이를 생체 내 세포 및 조직의 영상화에 안정적으로 활용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 *N,N*-다이메틸-2,3-다이하이드로나프토[2,3-f][1,4]옥사제핀-9-아민(*N,N*-dimethyl-2,3-dihydronaphtho[2,3-f][1,4]oxazepin)-9-amine)구조를 기반으로 한 세포 또는 조직 영상화(imaging)용 형광체를 제공하는 것이다.

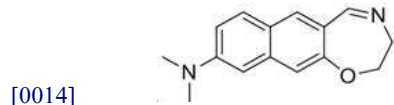
[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형광체를 이용한 세포 또는 조직의 영상화(imaging) 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물로 표시되는 세포 또는 조직 영상화(Imaging)용 형광체를 제공한다.

[0013] [화학식 1]



[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광체는 고리 내 이민 결합이 전자받개 그룹의 역할을 하고, 다이메틸아민이 전자주개 그룹의 역할을 하여 분자 내 전하이동 현상을 통해 형광을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광체는 이광자 흡수 형광체인 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광체는 세포 또는 조직 내의 리소좀(Lysosome)을 표적으로 하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광체는 여기 파장이 800 내지 820 nm인 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광체는 세포 또는 조직을 황색의 형광으로 영상화하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 형광체를 세포 또는 조직에 처리하고 관측하는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 영상화 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 또는 조직의 영상화 방법에서 관측은 공초점 현미경(Confocal laser scanning microscopy) 또는 이광자 현미경(Two photon excitation microscopy)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 세포 또는 조직의 영상화 방법은 상기 세포 또는 조직이 분리된 세포 또는 조직인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 옥사제핀 기반의 새로운 형광체는 고리 내 이민 결합을 포함한 옥사제핀의 구조를 갖는 작은 유기 분자로 가수분해 안정성 및 광 안정성이 우수하며, 기존의 이민 결합이 가지는 수용액상에서의 불안정성을 해결하여 생체 내 영상화를 위한 형광체의 개발 한계점들을 극복하였다. 뿐만 아니라, 세포소기관인 리소좀을 탐지할 수 있고, 독성이 낮아 세포 및 조직의 일광자 및 이광자 영상화가 가능하므로, 세포 또는 조직의 영상화에 활용될 수 있다. 나아가 옥사제핀의 구조가 가지는 알려진 장점들을 바탕으로 해당 구조를 기반으로 하는 항암제, 항염증제의 개발 등 여러 연구 분야와 관련되어 폭 넓게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에 따른 OXN-1의 흡수 및 형광 그래프를 각각 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 OXN-1의 구조를 구체적으로 구분한 모식도이다.

도 3은 용매 내에서 본 발명에 따른 OXN-1의 흡광 특성을 나타낸 것이다.

도 4는 용매 내에서 본 발명에 따른 OXN-1의 형광 특성을 각각 나타낸 것이다.

도 5는 액체 크로마토그래피(Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS, Agilent HP 1260 system)를 이용해 본 발명에 따른 OXN-1의 안정성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 OXN-1의 특정 완충액 상에서의 안정성을 형광 방출을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 OXN-1의 완충액 상에서의 안정성을 형광 방출을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다

도 8은 본 발명에 따른 OXN-1의 생체액 상에서의 최대 형광값을 표준화하여 플랏팅(plotting)한 형광 변화 그래프로 안정성을 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 OXN-1의 광 안정성을 평가하기 위해 일정 시간 동안 동일한 광량의 자외선을 조사해 형

광 세기의 변화량을 측정한 결과이다.

도 10은 본 발명에 따른 OXN-1의 생체분자인 고농도의 글루타치온 내에서의 안정성을 흡광 세기의 변화량을 통해 측정한 결과이다.

도 11은 본 발명에 따른 OXN-1의 생체분자인 고농도의 글루타치온 내에서의 안정성을 형광 세기의 변화량을 통해 측정한 결과이다.

도 12는 도 11의 그래프에서 최대 형광값을 플랏팅하여 표준화 시킨 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명에 따른 OXN-1의 세포독성을 실험한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명에 따른 OXN-1가 세포 내의 리소좀을 표적 할 수 있는지 확인한 결과를 나타낸 것이다.

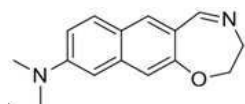
도 15는 본 발명에 따른 OXN-1이 시중에 판매되고 있는 리소좀 표적형광체(Lyso-Tracker)와 비교하여, 세포 내 리소좀을 표적하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명에 따른 OXN-1을 쥐로부터 얻어진 간, 폐, 신장, 뇌, 대장, 위 조직에 처리하여 이광자 현미경으로 조직내의 형광변화를 관측한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물로 표시되는 세포 또는 조직 영상화(imaging)용 형광체를 제공한다.

[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 본 발명의 일 구현예로, 상기 형광체는 이광자 흡수 형광체인 것을 특징으로 한다.

[0029] 본 발명의 일 구현예로, 상기 형광체는 고리 내 이민 결합이 전자받게 그룹의 역할을 하고, 다이메틸아민이 전자주게 그룹의 역할을 하여 분자 내 전하이동 현상을 통해 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는 세포 또는 조직 영상화용 형광체이다.

[0030] 본 발명의 일 구현예로, 상기 형광체는 세포 또는 조직 내의 리소좀(Lysosome)을 표적으로 하는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 일 구현예로, 상기 형광체는 여기 파장이 800 내지 820 nm이며, 바람직하게는 810 nm인 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명의 일 구현예로, 상기 형광체는 세포 또는 조직을 황색의 형광으로 영상화하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 형광체를 세포 또는 조직에 처리하고 관측하는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 영상화 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 일 구현예로, 상기 공초점 현미경(Confocal laser scanning microscopy) 또는 이광자 현미경(Two photon excitation microscopy)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 일 구현예로, 상기 세포 또는 조직은 분리된 세포 또는 조직인 것을 특징으로 한다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 형광체는 108 nm에 해당하는 큰 스톡 이동을 가지며 가수분해 환경 내에서 안정적으로 황색의 형광을 가진 형광체로 사용될 수 있음을 보였다(실시예 2).

[0037] 본 발명의 다른 일 실시예에서, 상기 형광체는 이민 결합을 구조 내에 포함하고 있지만 물을 포함한 용매 조건에서 황색의 형광을 보이며, 이는 기존에 알려진 이민 구조의 형광체의 특성과 달리 특이성을 가짐을 확인하였다(실시예 3).

[0038] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 상기 형광체는 상당한 가수분해 안정성(실시예 4), 생체액 안정성(실시예 5), 광 안정성(실시예 6) 및 글루타치온 안정성(실시예 7)을 가짐을 확인함으로써, 생체 내 환경에서 안정성이 우수함을 확인하였다.

[0039] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 상기 형광체는 세포 내 리소좀을 표적함을 확인하였다(실시예 8).

[0040] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 상기 형광체는 다양한 세포 또는 조직의 영상화용 형광체로 활용할 수 있음을 확인하였다(실시예 9).

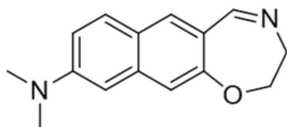
[0041] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물인 형광체는 세포 또는 조직의 영상화용 형광체 및 영상화 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1. OXN-1의 합성 및 구조 분석**

[0046] 본 발명자들은 나프탈렌 골격 구조에 옥사제핀 구조가 포함된 신규한 형광체를 개발하기 위해 연구한 결과, 하기 화학식 1의 형광체(OXN-1)를 개발하였다.

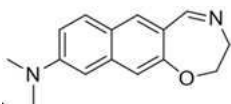
[0047] [화학식 1]



[0048]

[0049] 본 발명의 상기 OXN-1은 하기 도식 1에 따라 합성하였다.

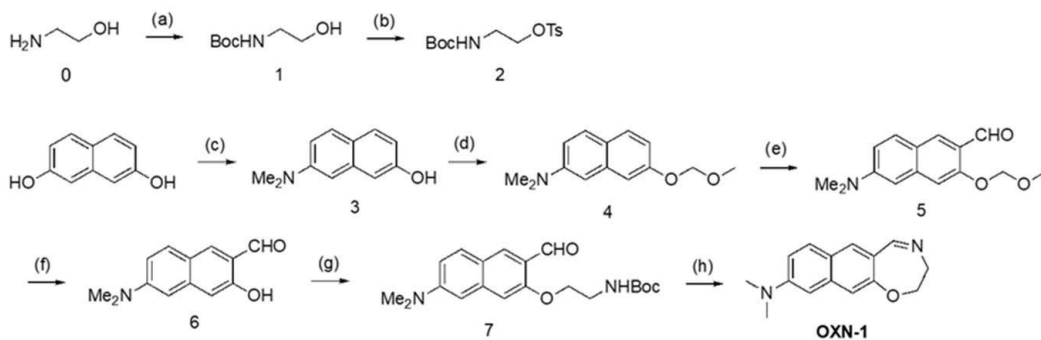
[0050] [도식1]



[0051]

[0052] 본 발명의 상기 OXN-1은 하기 도식 1에 따라 합성하였다.

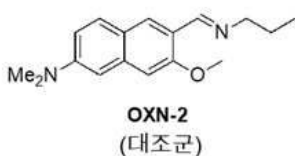
[0053] [도식1]



[0054]

[0055] 하기 화학식 2의 화합물은 본 발명의 OXN-1에 대한 대조군으로 이용한 화합물(OXN-2)이다.

[0056] [화학식 2]



[0057]

[0058] 본 발명자들은 다음의 과정을 통하여 본 발명의 OXN-1인 *N,N*-디메틸-2,3-디하이드로나프토[2,3-*f*][1,4]옥사제핀-9-아민(*N,N*-dimethyl-2,3-dihydronaphtho[2,3-*f*][1,4]oxazepin)의 합성을 수행하였다.

[0060] (1) *tert*-부틸(2-하이드록시에틸)카바메이트(*tert*-Butyl(2-hydroxyethyl) carbamate)의 합성

- [0061] 터트-부틸(2-하이드록시에틸)카바메이트(상기 도식 1에서 1번 화합물)를 수득 하기 위하여 에탄올아민(상기 도식 1에서 0번 화합물)(ethanolamine, 1.98 mL, 32.7 mmol)과 트리메틸아민(trimethylamine, 6.84 mL, 49.0 mmol)이 들어있는 둥근 플라스크에 디클로로메테인(DCM, 100 mL)을 넣어주었다. 그 다음, 0 °C 조건에서 디-터트-부틸 디카보네이트(di-*tert*-butyl dicarbonate, 8.26 mL, 36.0 mmol)를 천천히 첨가해주었고, 이 혼합물을 실온(25 °C으로 서서히 가온하면서 밤새 교반하였다. 반응의 종결을 확인한 후, 용기를 열어 에틸 아세테이트(ethyl acetate, 100 mL), 물(100 mL) 및 포화 소금물(30 mL)을 넣고 분별 깔때기를 이용하여 유기층을 추출하였다. 유기층을 무수황산나트륨(Na₂SO₄, 5 g)으로 건조하고, 흡기장비(aspirator)를 이용하여 농축시켰다. 이를 통해 얻어진 화합물은 실리카 겔(silica gel)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(column chromatograph)를 이용하여 분리(전개 액: 50% EtOAc/Hexane)하여 무색의 오일 성분인 상기 도식 1에서 1번 화합물(4.07 g, 77%)을 얻었다.
- [0062] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.45 (s, 9H), 3.03 (s, 1H), 3.28 (q, J = 4.0 Hz, 2H), 3.69 (q, J = 4.0 Hz, 2H), 5.12 (s, 1H);
- [0063] ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 28.3, 43.1, 62.4, 79.6, 156.8.
- [0064] HRMS (m/z): [M+Na]⁺ calcd for C₇H₁₅NNaO₃, 184.0944; found, 184.0947.
- [0066] (2) 2-터트-((부톡시카보닐)아미노)에틸 4-메틸벤젠설포네이트(2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-methylbenzenesulfonate) 의 합성
- [0067] 2-터트-((부톡시카보닐)아미노)에틸 4-메틸벤젠설포네이트(상기 도식 1에서 2번 화합물)을 수득 하기 위하여 아이스배스(ice-bath) 상에서 냉각시킨 터트-부틸(2-하이드록시에틸)카바메이트(상기 도식 1에서 1번 화합물)(1.0 g, 6.20 mmol)과 트리메틸 아민(1.99 mL, 14.3 mmol)이 들어있는 둥근 플라스크에 다이클로로메테인(DCM, 9 mL)에 넣어주었다. 이 혼합물은 다시 p-톨루엔 설프닐 클로라이드(1.30 g, 6.82 mmol)를 포함한 다이클로로메테인(DCM, 9 mL)에 한 방울씩 첨가해주었다. 최종 혼합물은 실온(25 °C의 조건에서 밤새 교반하였다. 반응의 혼합물을 0.1 M HCl과포화 소금물(30 mL), 황산마그네슘(MgSO₄)을 이용해 건조한 다음, 흡기장비(aspirator)를 이용하여 모든 휘발성 성분을 증발시켜주었다. 이를 통해 얻어진 화합물을 실리카 겔(silica gel)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(column chromatograph)를 이용하여 분리(전개 액: 30% EtOAc/Hexane)하여 백색의 고체인 2번 화합물을 수득하였다(1.54 g, 80%).
- [0068] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.39 (s, 9H), 2.43 (s, 3H), 3.37 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 4.87 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 2H);
- [0069] ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 21.6, 28.3, 39.7, 69.4, 79.8, 127.9, 129.9, 132.6, 145.0, 155.6.
- [0070] HRMS (m/z): [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₂₁NNaO₅S, 338.1033; found, 338.1035.
- [0072] (3) 터트-부틸(2-((7-(다이메틸아미노)-3-포밀나프탈레-2닐)옥시)에틸)카바메이트(*tert*-Butyl(2-((7-(dimethylamino)-3-formylnaphthalen-2yl)oxy)ethyl)carbamate)의 합성
- [0073] 상기 도식 1에서 3번 내지 6번 화합물은 기준에 보고된 합성법에 따라 제조하였다(Asian J. Org. Chem. 2012, 1, 60.)
- [0074] 터트-부틸(2-((7-(다이메틸아미노)-3-포밀나프탈레-2닐)옥시)에틸)카바메이트 (상기 도식 1에서 7번 화합물)를 합성하기 위하여 상기 도식 1에서 6번 화합물(50 mg, 0.23 mmol)을 0 °C에서 *N,N*-디메틸포름아마이드(DMF, 0.5 mL)에 녹여 수소화 나트륨(광유에 60% 분산된 형태, 11 mg, 0.26 mmol)이 녹아있는 *N,N*-디메틸포름아마이드(DMF, 0.5 mL) 현탁액에 첨가하였다. 이 혼합물을 둥근 플라스크 상에서 30분 동안 교반 한 후, *N,N*-디메틸포름아마이드(DMF, 0.1 mL)에 상기 도식 1에서 2번 화합물(88 mg, 0.28 mmol)을 녹여서 넣어주었다. 추가로 10분을 교반해 준 다음, 박막 크로마토그래피(TLC, thin layer chromatography)를 이용해 합성 시작물질이 사라질 때까지 실온(25 °C의 조건에서 교반하였다. 반응의 혼합물질을 염화암모늄(NH₄Cl) 용액으로 퀸칭(quenching)시키고, 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 희석시켰다. 이어서, 에틸 아세테이트(ethyl acetate, 100 mL), 물(100

mL), 포화 소금물(30 mL)을 넣고 분별 깔때기를 이용하여 유기층을 추출하였다. 유기층을 무수황산마그네슘(MgSO₄)으로 건조시키고, 유리 필터를 이용해 여과시켰다. 여과된 물질로부터 모든 휘발성 성분은 흡기장비를 이용해 진공상태에서 제거하였다. 컬럼 크로마토그래피(column chromatograph)를 이용하여 분리(전개 액: 10% EtOAc/Hexane)하였고 황색 고체의 화합물(상기 도식 1에서 7번 화합물)(41 mg, 50%)을 얻었다.

[0075] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.46 (s, 9H), 3.10 (s, 6H), 3.65 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 4.19 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 5.10 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.00 (dd, J = 5.0 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 10.42 (s, 1H);

[0076] ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 28.4, 40.1, 40.3, 67.6, 79.7, 104.0, 104.9, 114.4, 120.7, 121.9, 131.2, 131.7, 139.8, 150.8, 156.0, 157.3, 189.4.

[0077] HRMS (m/z): [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₂₆N₂NaO₄, 381.1785; found, 381.1783.

[0079] (4) *N,N*-다이메틸-2,3-다이하이드로나프토[2,3-*f*][1,4]옥사제핀-9-아민(*N,N*-dimethyl-2,3-dihydronaphtho[2,3-*f*][1,4]oxazepin-9-amine)의 합성

[0080] 본 발명자들은 *N,N*-다이메틸-2,3-다이하이드로나프토[2,3-*f*][1,4]옥사제핀-9-아민(상기 도식 1에서 OXN-1)의 합성을 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 25 mL 둥근 바닥 플라스크(round-bottom flask)에 상기 도식 1에서 7번 화합물(20 mg, 56 μmol)을 넣어준 후, 트리플루오로아세트산(trifluoroacetate)/다이클로로메테인(DCM, 1: 1, v/v, 0.8 mL) 용액에 용해시켰다. 이 혼합물은 실온에서 3시간 동안 교반하였고, 반응의 종료는 액체 크로마토그래피 질량분석(Liquid chromatography; LC-MS) 분석을 통해 분리하였다. 모든 휘발성 성분을 흡기장비를 이용해 감압하에 제거하였고, 붉은색 고체형태의 염 성분인 화합물1(OXN-1; 19 mg, 99%)로 얻었다.

[0082] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.21 (s, 6H), 4.19 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 4.46 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 4.0, 8.0 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 10.08 (s, 1H).

[0083] ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 40.4, 51.5, 66.9, 103.3, 112.1, 113.3, 115.4 (TFA, m), 115.8, 122.4, 132.4, 142.0, 145.4, 153.0, 156.4, 160.7 (TFA, m), 165.0. TFA: trifluoroacetic acid.

[0084] HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₇N₂O, 241.1335; found, 241.1336.

[0085] 이때, 본 발명에서 개발된 상기 *N,N*-다이메틸-2,3-다이하이드로나프토[2,3-*f*][1,4]옥사제핀-9-아민을 OXN-1이라 명명하였다.

[0087] 실시예 2. OXN-1의 흡수 및 형광 특성 확인

[0088] 본 발명자들은 증류된 물에서 OXN-1의 흡수 및 형광 그래프를 얻었고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0089] OXN-1의 흡수 및 방출 스펙트럼(UV/Vis absorption and emission spectra) 분석을 위해서 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer; Agilent Technologies Cary 8454, US)와 형광기(spectro-fluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 흡광과 형광 측정에 사용되는 유리큐벳(cuvette 혹은 cell)으로는 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영 셀(standard quartz cell; interanl volume= 0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 이용하였다.

[0090] 도 1의 그래프는 용매가 순수한 물일 때, OXN-1의 흡수 및 방출 형광 그래프를 나타낸 결과로, 해당 조건에서 OXN-1은 도 1 (a)와 같이 451 nm에서 최대 흡광도를 보였으며 도 1의 (b)와 같이 559 nm에서 황색의 최대 형광 세기를 보였다.

[0091] 이를 통해, OXN-1은 108 nm에 해당하는 큰 스톡 이동을 가지며 가수분해 환경 내에서 안정적으로 황색의 형광을 가진 형광체로 사용될 수 있음을 보였다.

[0093] 실시예 3. OXN-1의 용매 내 흡수 및 형광 특성 확인

- [0094] 본 발명자들은 OXN-1에 대해 다양한 용매조건(극성; polar과 극성이 아닌; non-polar) 하에서 흡수 및 형광의 특성을 확인하여, 그 결과를 도 2 내지 3에 나타내었다.
- [0095] 도 2는 OXN-1의 구조를 구체적으로 구분한 모식도이며, 도 3은 주어진 용매 내에서 OXN-1의 흡광 특성을 도 4는 OXN-1의 형광 특성을 각각 나타낸 것이다. OXN-1은 아세토나이트릴, 물 그리고 다이클로로메테인 용매 조건하에서 450-456 nm의 범위의 최대 흡광도를 보이며, 형광 스펙트럼은 532 - 559 nm의 범위를 가진다. 위 세 용매를 제외한 나머지 유기용매에서의 OXN-1의 흡수 스펙트럼은 353-362 nm 범위에서 최대 흡광도를 나타내며, 형광 스펙트럼의 경우 415 - 447 nm의 범위를 가지는 특성을 보였다. 도 4에 형광 세기를 표준화하여 각 용매에서의 형광 스펙트럼의 비교를 용이하게 하였다.
- [0096] 이를 통해, OXN-1은 이민 결합을 구조 내에 포함하고 있지만 물을 포함한 몇몇 용매조건에서 황색의 형광을 보이며, 이는 기존에 알려진 이민 구조의 형광체의 특성과 달리 특이성을 가짐을 보였다.
- [0098] **실시예 4. OXN-1의 가수분해 안정성 확인**
- [0099] 본 발명자들은 발명한 OXN-1의 구조를 수소 핵자기공명장치(hydrogen nuclear magnetic resonance; ^1H -NMR)와 탄소 핵자기공명장치(carbon nuclear magnetic resonance; ^{13}C -NMR), 및 고분해능 질량분석기(high resolution mass spectrometer)를 통해 일차적으로 확인하였다.
- [0100] 또한, 확인된 OXN-1의 구조가 실제 수용액 상에서 가수분해 안정성을 가지는지 검증하고자 액체 크로마토그래피(Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS, Agilent HP 1260 system)를 이용해 안정성 분석을 진행하였다.
- [0101] 구체적으로, OXN-1은 대조군과의 비교분석을 통해 안정성을 평가하였고, 대조군은 이민 결합을 포함한 옥사제핀의 고리구조가 열린 형태의 구조로 화학식 2(ONX-2)에 그 구조를 명시하였다. ONX-1(10 mM in DMSO)은 최종 농도가 50 μM 이 되도록 각각의 수용액에 즉시 희석시켜주었고, 실온의 조건에서 혼합물을 교반해주었다. 실험에 사용된 용매로는 pH 1, pH 4, pH 7.2, pH 9, pH 11 완충액(buffer solution)으로, 관측 시간은 10분에서부터 60분에 이르기까지 확인하였다. 계획한 교반 시간에 따라 최종 혼합물의 50 μL 를 메탄올 용액(methanol; 150 μL)에 희석시켜주었고, 해당 혼합물은 실린지 필터(0.45 μm)를 이용해 액체 크로마토그래피 상에서 분석되었다. 대조군(ONX-2)에 대한 실험도 OXN-1과 동일하게 진행되었다.
- [0102] 그 결과, 도 5와 같이 OXN-1은 8.27에서 보이던 화합물의 피크가 60분까지도 명시된 모든 pH 완충액조건에서 변화가 없어 안정함을 확인하였고, 반면 열린 구조의 형태로 이민 결합을 가진 대조군(ONX-2)에서는 시간이 지남에 따라 9.9에 해당하는 위치에 새로운 피크가 생성되는 것으로 보아 가수분해 진행되었음을 확인하였다. 이때, X 축은 시간(분), y 축은 pH에 따른 완충액에서의 각 피크를 나타낸다.
- [0103] 도 6과 7은 형광 방출을 통해서 OXN-1의 완충액 상에서의 안정성을 다시 한 번 검증해본 결과이다. 생물학적 pH인 7.4와 근접한 pH 7의 완충액에서 대조군인 ONX-2는 해당 용매에 약 1시간 동안 노출되자 가수분해되어 도 6에서와 같이 형광의 변화를 나타냈지만 본 발명에 따른 OXN-1의 경우, 시간이 지나도 정해진 pH 조건에서 안정함을 보였다.
- [0104] 나아가 도 7과 같이 산성에서 염기성에 이르기까지 넓은 폭의 pH 완충액을 실험해본 결과, 생체 내 pH인 pH 7.4를 포함한 모든 완충액에서 높은 안정성을 나타냈다. 즉, OXN-1은 대조군(ONX-2)과 비교하였을 때 상당한 가수분해 안정성을 가짐을 확인할 수 있다.
- [0106] **실시예 5. OXN-1의 생체액 안정성 확인**
- [0107] 본 발명자들은 OXN-1의 생체액 안정성을 확인하기 위해서 각각 쥐의 소변(urine; pH 5), 위액(gastric juice; pH 3), 그리고 사람의 혈청(human serum; pH 7.4)에서의 형광 세기 변화를 확인하였다.
- [0108] 구체적으로, OXN-1(5 μM)을 증류된 물에 일정 배율로 희석시킨 각각의 생체액(urine: DI H_2O = 1:2, gastric juice: DI H_2O = 1:5, human serum: DI H_2O = 1:10)에 첨가해준 후 60분간 실온의 조건에서 배양하였다. 형광의 측정은 각 생체액에 따라 452-455 nm에 해당하는 최대 흡수파장을 이용해 여기 된 형광의 세기를 10분 간격으로 측정하였고, 최대 형광파장에서의 형광세기를 플롯팅(plotting)하여 표준화된 형광 변화 그래프를 도 8에 나타내었다.
- [0109] 이를 통해, OXN-1이 서로 다른 pH를 가진 생체액에서 보이는 기본적인 형광 변화특성 및 안정성을 확인할 수 있

었다.

[0111] **실시예 6. OXN-1의 광 안정성 확인**

[0112] 본 발명자들은 OXN-1의 광 안정성을 평가하기 위해 일정 시간(1시간)동안 동일한 광량의 자외선을 조사해 형광 세기의 변화를 확인하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0113] 구체적으로, 순수한 증류수가 용매인 조건에서 OXN-1(5 μ M)과 대조군(5 μ M)을 60분간 25 $^{\circ}$ C 조건에서 각각 자외선등(365 nm, 6W)에 노출시켜주었고, 10분 간격으로 형광 세기 변화를 측정하였다. 측정에 사용한 형광장치와 큐벳은 상기 실시예 2에 제시한 조건과 동일하다.

[0114] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, OXN-1은 무시할 수 있을 만큼의 작은 형광 변화를 보였지만 대조군에서는 자외선 조사를 해주는 시간에 따라 형광의 세기가 강해지는 것을 확인하였다. 이는 열린 구조 내에서 이민 결합을 가지는 대조군이 가수분해되어 녹색의 형광을 발하는 형광구조로 변화하면서 형광의 효율이 증가해 보이는 결과로 확인하였다. 이를 통해, 고리 내에 이민 결합을 가진 OXN-1은 높은 광 안정성(photostability)를 가진다는 것을 확인하였다.

[0116] **실시예 7. OXN-1의 글루타치온 내 안정성 확인**

[0117] 본 발명자들은 OXN-1의 생체분자인 고농도의 글루타치온 내에서의 안정성을 평가하기 위해 1시간 동안 동일한 온도조건에서 형광 세기의 변화를 확인하였고, 그 결과를 도 10 내지 12에 나타내었다.

[0118] 구체적으로, 1X PBS 용액(pH 7.4)를 용매로 하는 조건에서 OXN-1(5 μ M)을 60분간 25 $^{\circ}$ C 조건에서 배양해주었고, 10분 간격으로 형광 세기 변화를 측정하였다. 측정에 사용한 형광장치와 큐벳은 실시예 2에 제시한 조건과 동일하다. 형광측정에 사용된 흡수파장은 450 nm로 도 10의 그래프는 흡광, 도 11의 그래프는 시간에 따른 형광 그래프이며, 도 12의 그래프는 도 11의 그래프에서 최대 형광값을 플랏팅하여 표준화 시킨 결과이다.

[0119] 그 결과, OXN-1은 무시할 수 있을 만큼 작은 폭의 형광 변화를 보여 글루타치온 내에서 안정성을 가짐을 확인하였다. 이를 통해, OXN-1은 실온의 조건에서 일정 시간 내에 고농도의 바이오싸이올(biothiol)인 글루타치온에 노출되어도 높은 안정성을 가진다는 것을 보았다.

[0120] 이를 통해, OXN-1을 이용해 생체 내 영상화 및 다른 응용 연구를 진행할 때, 바이오싸이올의 간섭이 없이 안정적인 형광 특성을 보일 수 있다는 것을 확인하였다.

[0122] **실시예 8. OXN-1의 세포독성 및 세포소기관 표적 능력 확인**

[0123] 본 발명자들은 본 발명에 따른 OXN-1의 세포독성 및 세포소기관 표적능력을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0124] 세포 독성 실험은 시중에서 판매중인 세포독성키트(Vybrant[®] MTT Cell Proliferation Assay Kit, ThermoFisher, US)를 사용하였으며, 실험의 순서는 해당 제품의 판매사에서 제공하는 프로토콜을 따라 진행하였다.

[0125] 구체적으로, 96 웰 플레이트(well plate, SPL, 30096)에 약 5×10^4 에 해당하는 세포를 검증에 필요한 만큼 동일하게 분주해준 다음, 24 시간 동안 37 $^{\circ}$ C 조건으로 5% CO₂를 유지하는 세포배양기(Thermo Scientific Forma Series3)에서 세포를 배양하였다. 24시간이 지난 후, 기존의 배양액을 제거해준 다음 혈청이 없는 배양액으로 바꿔주었고, 약 30 분간 37 $^{\circ}$ C, O₂ 배양기에서 배양하여 OXN-1을 농도별(0-100 μ M)로 처리해주었다. 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양조건에서 배양해준 후 배양액을 제거해주었고, 1X PBS를 이용해 1번의 세척과정을 거쳤다. 그 다음 각 웰(well)에 MTT용액을 처리하여 프로토콜에 따라 일정시간 배양해준 후, 550 nm에서 흡광값을 측정하였다. 흡광값은 마이크로플레이트 리더기(Microplate reader, Multiskan FC, Thermo Fisher)를 이용해 측정하였고, 세포 독성 백분율은 (샘플의 흡광값*100)/(대조군의 흡광값)으로 계산하였다. 이에 대한 결과는 도 13에 나타내었다.

[0126] 나아가 본 발명자들은 OXN-1의 다이메틸아민(dimethylamine) 작용기가 세포 내의 리소좀을 표적 할 수 있는지 확인하기 위해서 시중에 판매되고 있는 리소좀 표적형광체(Lyso-Tracker, Deep-Red 5 μ g/mL)를 구입하여 OXN-1과의 형광 신호 중첩여부를 확인하였고, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0127] 구체적으로, HeLa 세포를 공초점 접시(35-mm confocal dish, SPL)에 약 2×10^5 의 동일한 양으로 분주해준 후,

약 24시간 동안 37 °C, O₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 OXN-1을 20 μM의 농도로 처리하여 2시간 동안 37 °C, O₂의 배양기에서 배양하였다. 그 다음, 리소솜 표적형광체를 제조사에서 제공해주는 프로토콜대로 희석하여 10분 간 처리해주었다. 마지막으로 1X PBS 용액을 이용하여 남은 배양액을 세척해주었고, 4%의 파라포름알데하이드 용액(paraformaldehyde solution; 4% PFA)으로 30분간 고정한 뒤 공초점 레이저 현미경을 이용해 세포 영상화를 진행하였다. 사용된 세포와 배양액은 하기 명시한 바와 같다.

[0128] 세포정보; HeLa: Human cell derived from cervical cancer;

[0129] 배양액; Dulbecco's modified Eagle's media (Hyclone, US) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco).

[0130] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 OXN-1은 리소솜 표적형광체(Lyso-Tracker, Deep-Red 5 μg/mL)와 마찬가지로 세포 내 리소솜을 표적하는 것을 확인할 수 있다.

[0132] **실시예 9. OXN-1을 처리한 생체 내 조직에서의 이광자 형광 영상화 구현**

[0133] 본 발명자들은 OXN-1의 생체영상화로의 활용성을 확인하고자 쥐로부터 얻어진 각각의 조직 간, 폐, 신장, 뇌, 대장, 위에 OXN-1을 처리하여 이광자 현미경으로 조직내의 형광변화를 관측하였다.

[0134] 구체적으로, 실험에 사용된 쥐는 생후 8주자의 수컷 ICR mouse(Daehan Biolink Co. Ltd., Republic of Korea)를 사용하였으며, 해당 쥐로부터 각각 간(liver), 폐(lung), 신장(kidney), 뇌(brain), 대장(large intestine), 위(stomach)에 해당하는 여섯 종류의 조직들을 채취하였다. 각 조직들은 버퍼용액(pH 7.4, phosphate buffered saline)에 세 차례 세척하여 준비하였고, 추가 고정을 진행하지 않았다. 드라이아이스 위에 3분간 노출시켜 순간적으로 동결된 조직들을 11호 수술용 나이프(Reather safety razor Co., LTD, Japan)를 이용해 약 200 μm의 두께로 일정하게 절편하였다. 그 다음, 절편 된 조직들은 24-well plates(SPL, Rep. of Korea)에 놓아준 후 화합물1(OXN-1 50 μM, 100 μM)을 배지에 희석하여 처리해주었고, 37 °C에서 약 2시간 동안 배양해주었다. 이후, 배양된 조직을 1X PBS 용액에 세 차례 세척해주었고, 세척을 마친 각각의 조직들은 4% 파라포름알데하이드용액(PFA)으로 고정시켜주었다. 고정된 조직들은 슬라이드 글라스로 옮겨 커버 슬립을 덮어주고 슬립의 양쪽을 투명 테이프로 고정하여 영상화 샘플을 준비하였다. 조직의 영상화에 사용된 이광자 현미경은 LSM 7 MP (Carl Zeiss, Germany)으로 MaiTai HD DeepSee tunable laser(Spectra-Physics, US)를 포함하고 있다. 여기 파장은 810 nm으로 하였고, 이는 조직 내의 자가형광을 최소화하는데 적합하였다.

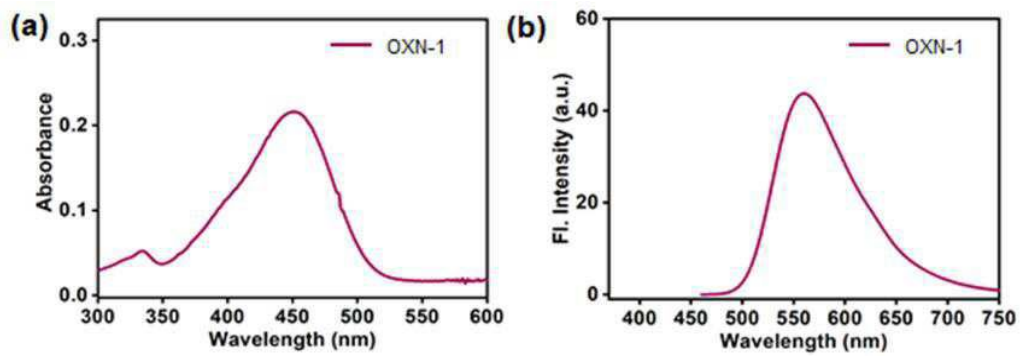
[0135] 그 결과, 도 16에 나타난 영상화 결과와 같이 OXN-1을 각 조직에 처리해주었을 때 황색의 형광으로 조직영상화가 되는 것을 확인할 수 있었다. 눈금 막대 바는 100 μm을 나타낸다.

[0136] 이를 통해, OXN-1이 생체 내로부터 수득한 각종 조직 내에서 황색의 형광을 나타내며 안정적으로 이광자 영상화가 되는 것을 보였고, 이에 따라 본 발명에 따른 OXN-1이 세포 또는 조직 영상화용 형광체로 활용 가능함을 알 수 있다.

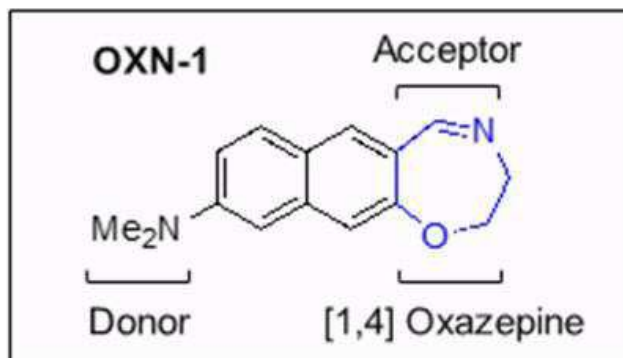
[0138] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

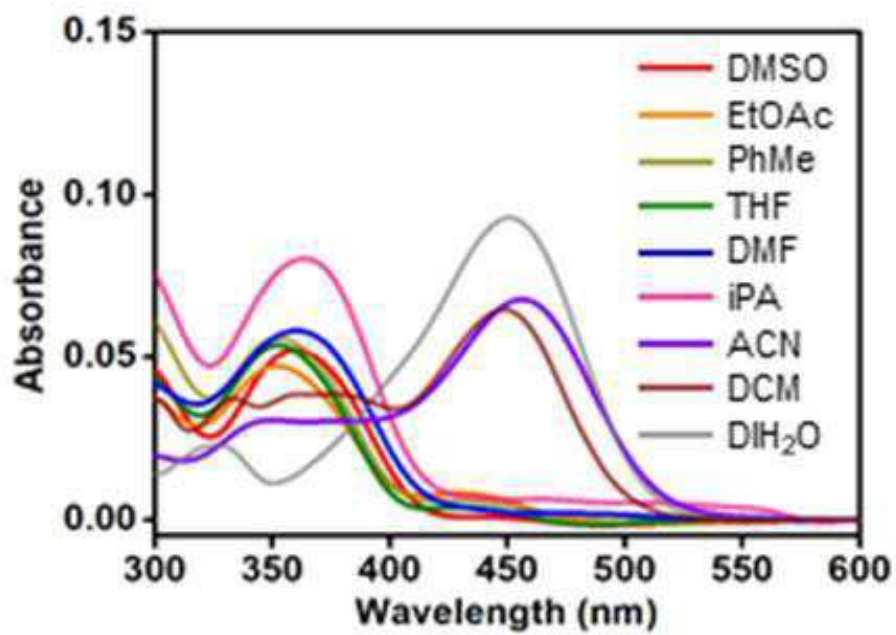
도면1



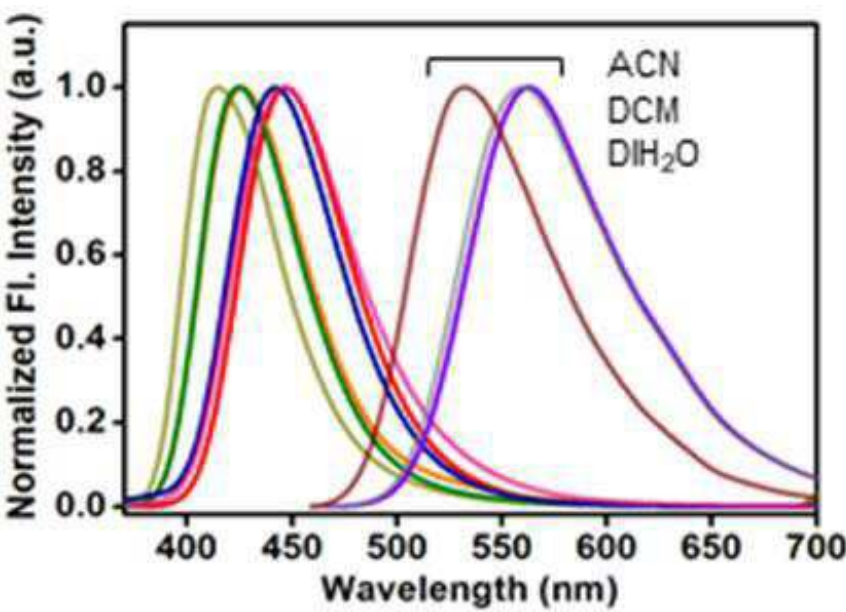
도면2



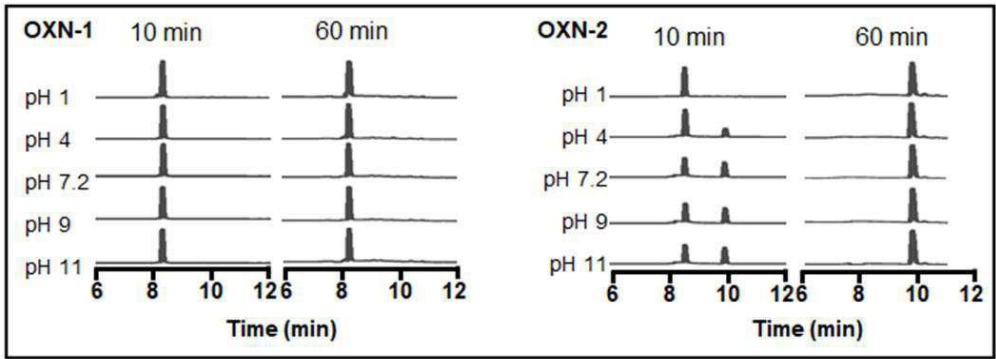
도면3



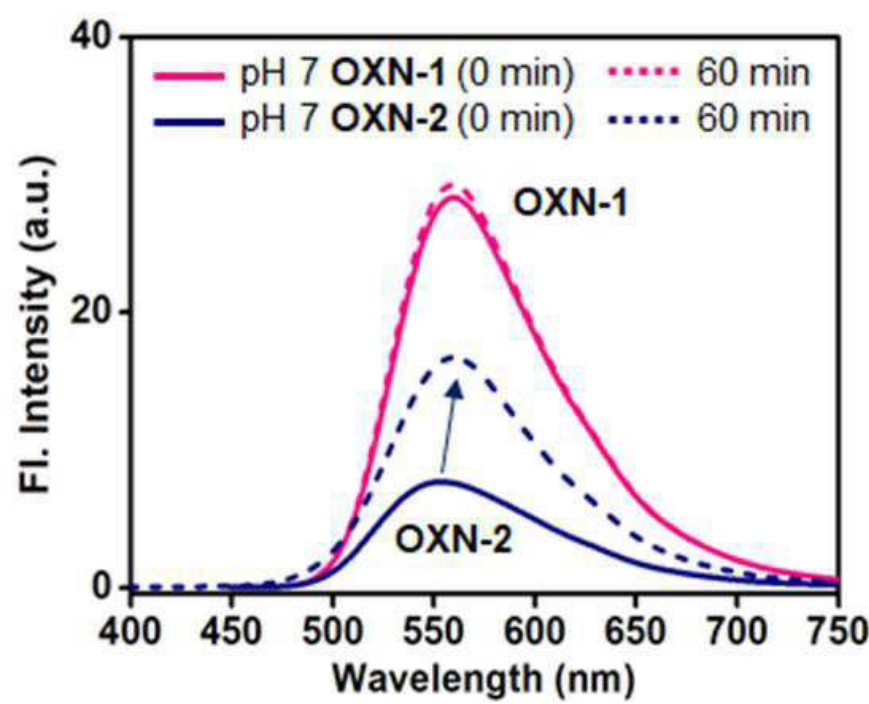
도면4



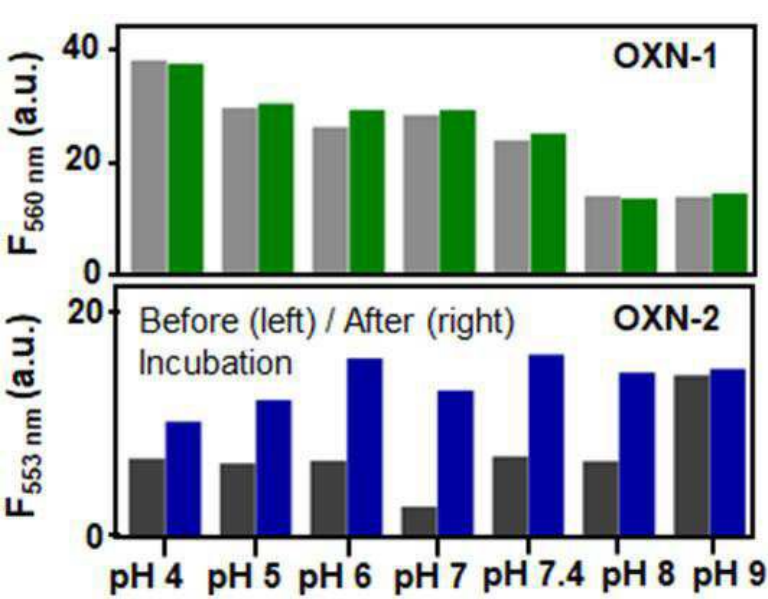
도면5



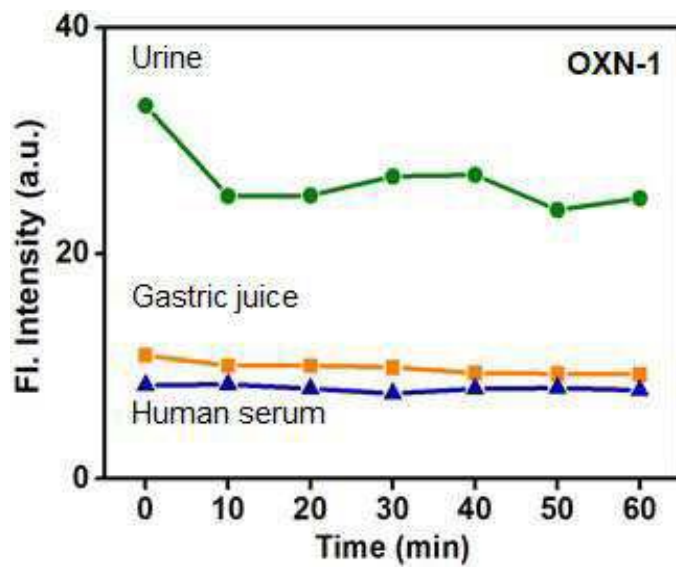
도면6



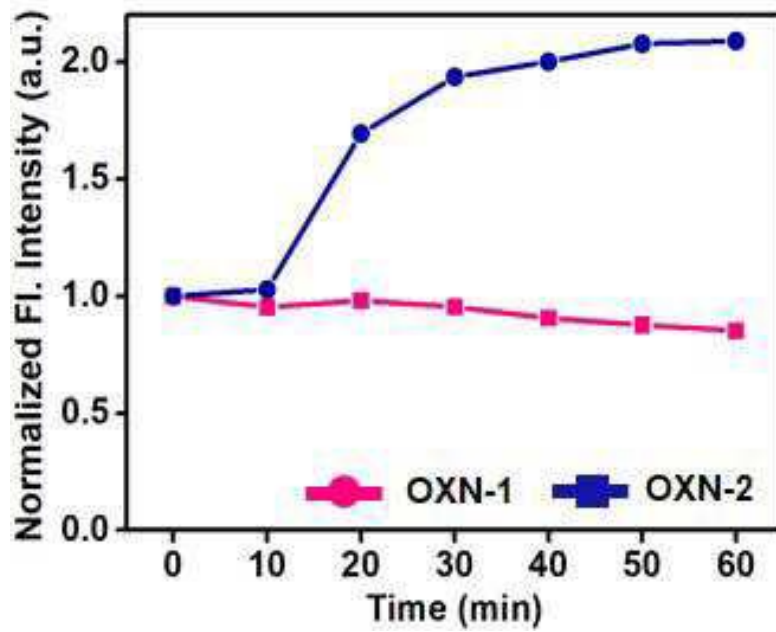
도면7



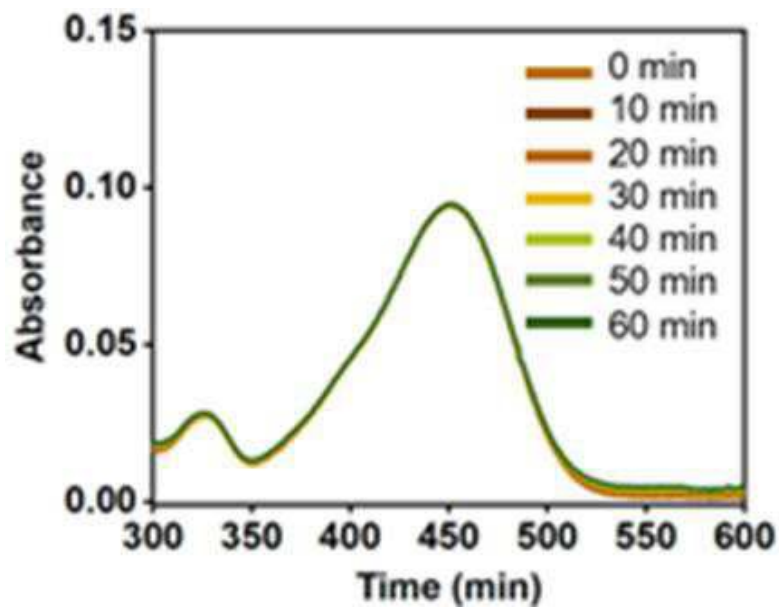
도면8



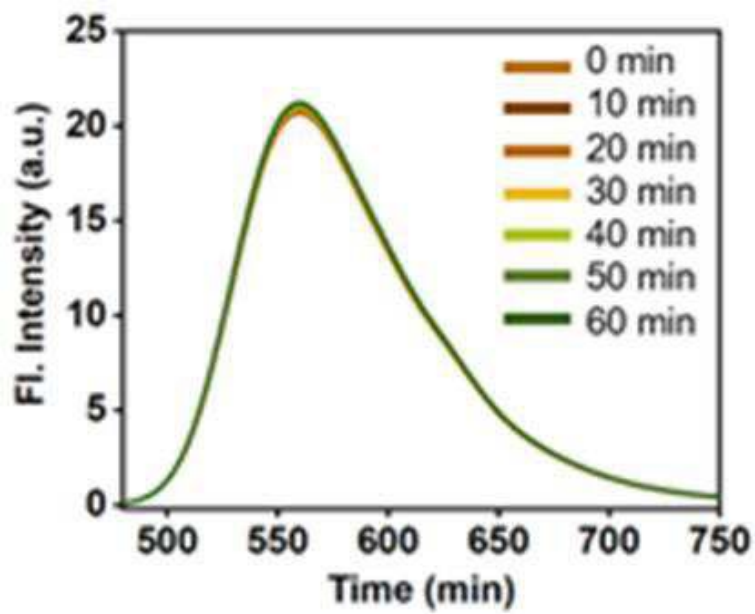
도면9



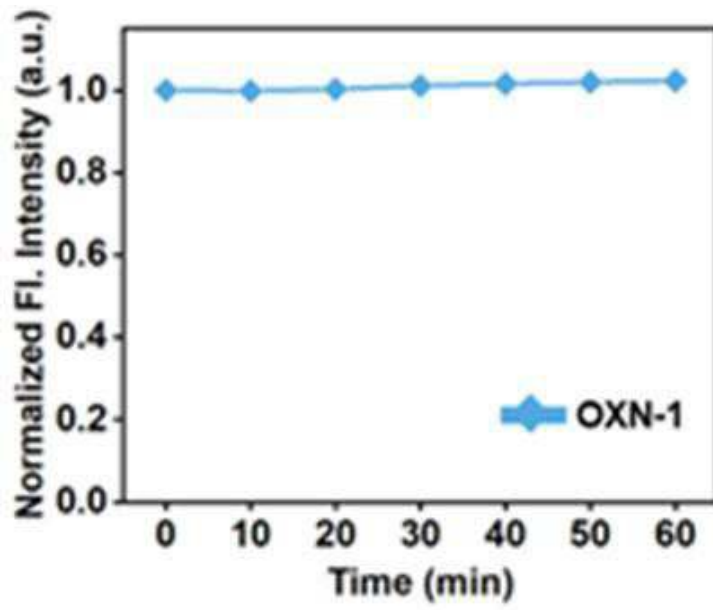
도면10



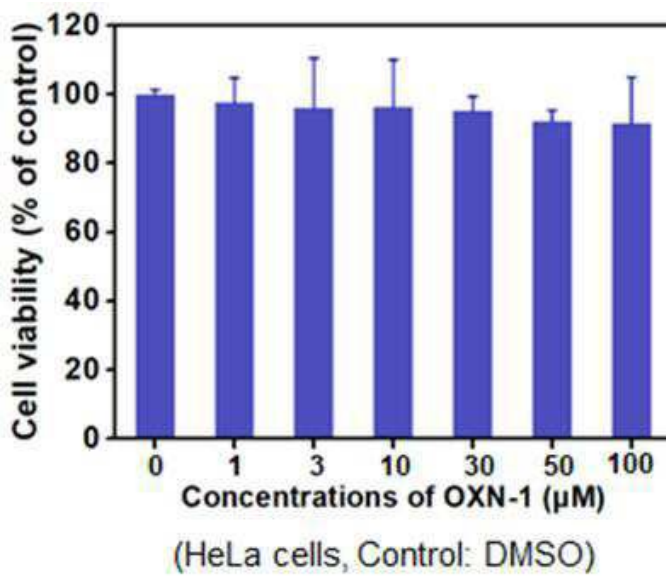
도면11



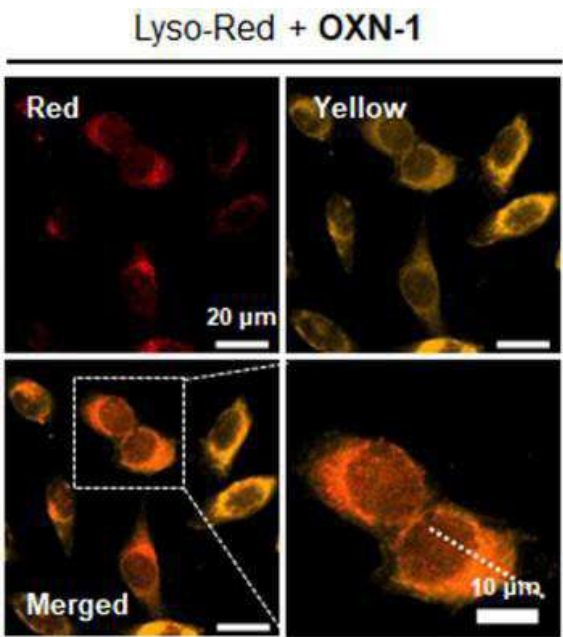
도면12



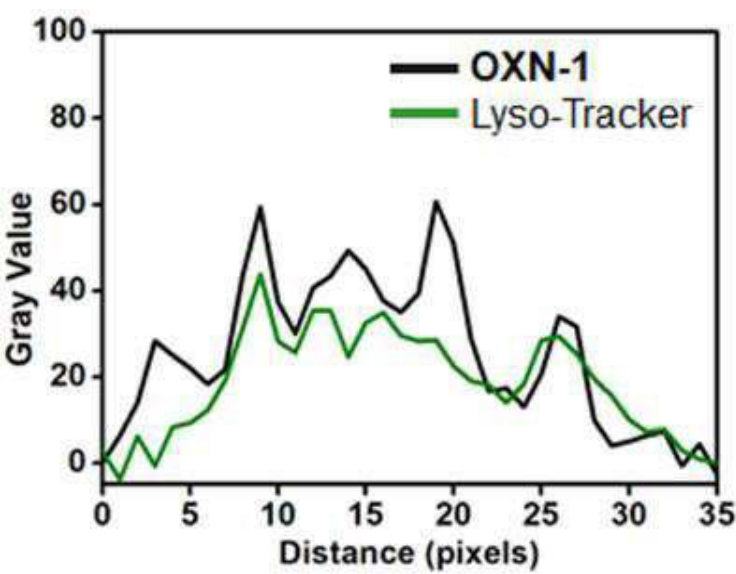
도면13



도면14



도면15



도면16

