



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0085401
(43) 공개일자 2019년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/655 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/65522 (2013.01)
G01N 21/6486 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0003487
(22) 출원일자 2018년01월10일
심사청구일자 2018년01월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
선우경
서울특별시 서초구 신반포로 32, 68동 501호
상카프레사드 브호니아
암리타 센터 포 인터스트리얼 리서치 앤 이노베이션
암리타 스쿨 오브 엔지니어링 암리타 유니버시티,
코임바토르, 에티마다이, 인도 641112
김중승
경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 4 항

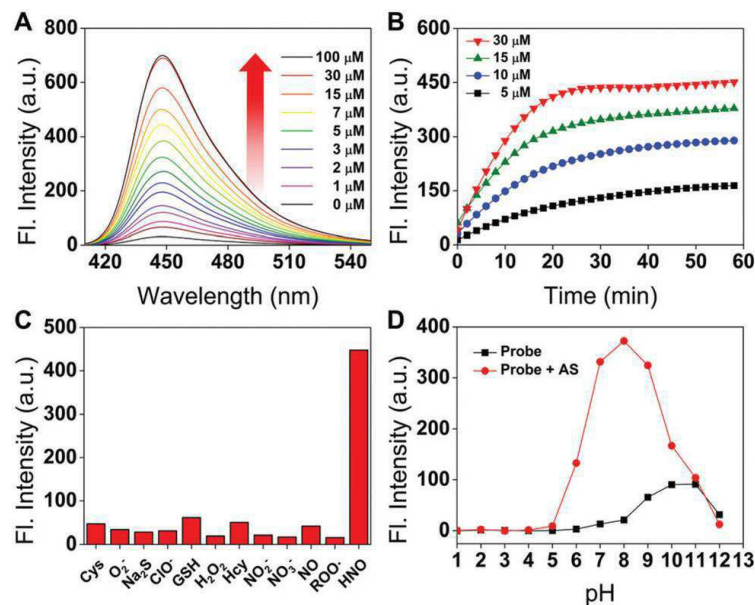
(54) 발명의 명칭 미토콘드리아에서 니트록실을 검출하기 위한 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 니트록실 검출 형광 센서

(57) 요약

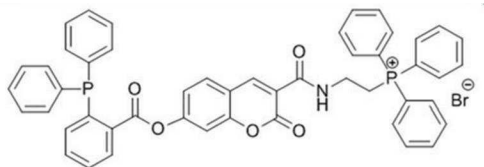
본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 니트록실 검출용 형광 프로브 화합물에 관한 것이다:

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



[화학식 1]



본 발명에 따른 니트록실 검출용 형광 프로브 화합물은 타 분석물 대비 니트록실에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 니트록실에 대해서 높은 검출 감도를 나타내는 바, 턴-온 방식에 의해서 니트록실을 단순하고 효과적으로 검출해낼 수 있어서, 생물학 및 환경 분야에서 매우 높은 효용성을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 니트록실 형광 프로브 화합물은 세포 외부에서 도입된 니트록실 뿐만 아니라 세포 내부에서 생성된 니트록실까지 감지할 수 있어 미토콘드리아 내의 니트록실 형성과정을 실시간으로 모니터링할 수 있도록 한다.

(52) CPC특허분류

G01N 2021/7786 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081566

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

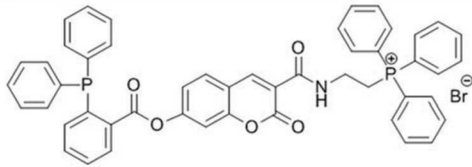
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 니트로실 검출용 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 니트로실과 반응하면 형광발광을 일으키는 것을 특징으로 하는 니트로실 검출용 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 니트로실은 미토콘드리아에 형성되는 것을 특징으로 하는 니트로실 검출용 형광 프로브 화합물.

청구항 4

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 니트로실 검출용 형광 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아에서 니트로실을 검출하기 위한 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 니트로실 검출 형광 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 니트로실 (NO/HNO)은 산화질소의 일-전자 환원된 (및 양성화된) 형태이다. 이러한 호환성이 있는 한 쌍은 신경 시스템에서 중추적인 역할을 한다(비특허문헌 1). HNO는 독특하고, 뚜렷하며 이의 산화된 유사체인 NO와 종종 반대의 약리학적 특성을 보인다(비특허문헌 2). 예를 들어, NO 공여체는 β -아드레날린작용성-유도된 수축성을 감소시켜 β -작용제의 사용을 최소화시키는 반면, HNO는 β -작용제 도부타민에 대한 첨가제로 사용된다(비특허문헌 3). HNO는 예컨대 중합효소, 구리 티올레이트 전사 인자 Ace1, 알데하이드 탈수소효소 및 징크 핑거 단백질 폴리(ADPribose) 등 티올을 포함하는 다양한 효소들의 활성을 억제한다(비특허문헌 4-6). 또한, 티올과의 결합을 통해 N-메틸-D-아스파르트산염 채널의 활성을 변화시킨다(비특허문헌 7). 또한, HNO는 생물학적 환경에서 다양한 중요 효소의 티올 잔기와 반응할 수 있다. 예를 들면, HNO는 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의 속도로 글루타티온 (GSH)과 반응하고, 세포 산화환원계에서 조절인자로서 GSH의 기능을 대폭 감소시킨다(비특허문헌 8-9). 질소계 산화물 및 초과산화물로부터의 전환 공정이 HNO 형성 경로의 예로서 보고되어 왔지만(도 6), 니트로실의 내생적 형성(endogenous formation)에 대해서는 주변 생체분자와의 높은 반응성으로 인해 여전히 불명확하게 남아있다.

[0003] 또한, HNO는 NO보다 세포독성이 있고 생체 내에서 잠재적으로 생성될 수 있으며, NO 및 퍼옥시나이트릴의 일부 형질과 생물학적 반응을 일으키기 때문에 HNO를 감지하는 것은 매우 중요하다. 종래기술로서, 형광 탐지체를 이

용해 HNO를 감지하기 위해 Cu^{2+} 로부터 Cu^{+} 또는 나이트록실사이드로부터 하이드록실아민의 환원을 이용하는 방법이 보고된바 있다(비특허문헌 10-11). 그러나, 이러한 탐지체들은 생체 시스템에서 몇몇의 매우 풍부한 생물학적 환원제, 예컨대 GSH 및 아스코르브산염에 의한 간섭을 받으며, 또한, 나이트록실의 탐지 한계가 평가되지 않았다는 문제가 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004]

(비특허문헌 0001) J. Hobbs, J. M. Fukuto and L. J. Ignarro, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1994, 91, 10992.

(비특허문헌 0002) D. A. Wink, K. M. Miranda, T. Katori, D. Mancardi, D. D. Thomas, L. Ridnour, M. G. Espey, M. Feelisch, C. A. Colton, J. M. Fukuto, P. Pagliaro, D. A. Kass and N. Paolocci, Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol., 2003, 285, H2264.

(비특허문헌 0003) N. Paolocci, T. Katori, H. C. Champion, M. E. John, Et., K. M. Miranda, J. M. Fukuto, D. A. Wink and D. A. Kass, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003, 100, 5537.

(비특허문헌 0004) M. Shinyashiki, K. T. Chiang, C. H. Switzer, E. B. Gralla, J. S. Valentine, D. J. Thiele and J. M. Fukuto, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 2491.

(비특허문헌 0005) H. T. Nagasawa, E. G. DeMaster, B. Redfern, F. N. Shiota and D. J. Goon, J. Med. Chem., 1990, 33, 3120.

(비특허문헌 0006) O. Sidorkina, M. G. Espey, K. M. Miranda, D. A. Wink and J. Laval, Free Radical Biol. Med., 2003, 35, 1431.

(비특허문헌 0007) W. K. Kim, Y. B. Choi, P. V. Rayudu, P. Das, W. Asaad, D. R. Arnette, J. S. Stamler and S. A. Lipton, Neuron, 1999, 24, 461.

(비특허문헌 0008) M. G. Espey, K. M. Miranda, D. D. Thomas and D. A. Wink, Free Radical Biol. Med., 2002, 33, 827.

(비특허문헌 0009) N. Paolocci, W. F. Saavedra, K. M. Miranda, C. Martignani, T. Isoda, J. M. Hare, M. G. Espey, J. M. Fukuto, M. Feelisch, D. A. Wink and D. A. Kass, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2001, 98, 10463.

(비특허문헌 0010) (a) J. Rosenthal and S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 5536; (b) M. Royzen, J. J. Wilson and S. J. Lippard, J. Inorg. Biochem., 2013, 118, 162; (c) Y. Zhou, K. Liu, Y. Y. Li, Y. Fang, T. C. Zhao and C. Yao, Org. Lett., 2011, 13, 1290; (d) A. T. Wrobel, T. C. Johnstone, A. D. Liang, S. J. Lippard and P. Livera-Fuentes, J. Am. Chem. Soc., 2014, 136, 4697.

(비특허문헌 0011) M. R. Cline and J. P. Toscano, J. Phys. Org. Chem., 2011, 24, 993.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

이에, 본 발명에서는 나이트록실 존재하는 조건하에서 턴-온(turn-on) 프로브 형광 반응을 일으킴으로써, 세포 내 미토콘드리아에서 형성되는 나이트록실을 선택적으로 검출하는 것이 가능한 나이트록실 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 나이트록실 검출용 형광 센서를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

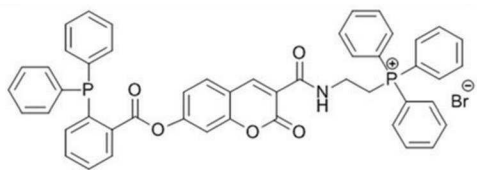
[0006]

본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0007]

하기 [화학식 1]로 표시되는 나이트록실 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다.

[0008] [화학식 1]



[0009]

[0010] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 니트로실과 반응하면 형광발광을 일으킬 수 있다.

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 니트로실은 미토콘드리아에 형성되는 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 니트로실 검출용 형광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 니트로실 검출용 형광 프로브 화합물은 타 분석물 대비 니트로실에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 니트로실에 대해서 높은 검출 감도를 나타내는 바, 턴-온 방식에 의해서 니트로실을 단순하고 효과적으로 검출해낼 수 있어서, 생물학 및 환경 분야에서 매우 높은 효용성을 나타낸다.

[0014] 또한, 본 발명에 따른 니트로실 형광 프로브 화합물은 세포 외부에서 도입된 니트로실 뿐만 아니라 세포 내부에서 생성된 니트로실까지 감지할 수 있어 미토콘드리아 내의 니트로실 형성과정을 실시간으로 모니터링할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1 본 발명에 따른 니트로실 형광 프로브 화합물(Mito-1)의 형광 반응을 나타낸 것으로, (A)는 Angeli's salt(AS)의 부존재 또는 존재하 pH 7.4 PBS 완충액 (0.5% DMSO) 중 Mito-1 (5.0 μ M)의 형광 스펙트럼을 나타낸다. AS와 함께 30분 동안 Mito-1을 인큐베이션 한 후에 스펙트럼을 기록하였다. (B)는 다양한 농도의 AS의 존재하에서 Mito-1의 (5.0 μ M)의 반응-시간 프로파일을 나타낸 것이다. pH 7.4 PBS 완충액 (0.5% DMSO) 중에서 452 nm에서의 형광 강도를 시간 간격을 두고 연속적으로 모니터링하였다. (C)는 pH 7.4 PBS 완충액 중에서 다양한 관련 종 (30 μ M)에 대한 Mito-1 (5.0 μ M)의 형광 반응을 나타낸다(Emission at 452 nm). (D)는 AS (30 μ M)의 부존재 및 존재하에서 다양한 pH 값에 따른 Mito-1 (5.0 μ M)의 형광 강도 의존성을 나타낸다.

도 2는 외생적(exogenous) HNO의 형광 이미지로, Mito-1 형광의 투여량 의존성을 공초점 현미경 이미지(배율, $\times 20$)로 나타낸 것이다(λ_{ex} 405 nm; λ_{em} 470-500 nm).

도 3은 외생적 HNO 감지 조건 하에서의 형광 및 공존 이미지를 나타낸 것이다. (A)는 세포기관 특이적 트래커 (미토콘드리아, 소포체 및 리소좀)를 지닌 Mito-1 (5.0 μ M)의 공초점 현미경 공존 이미지이다. (B)에서는 Z-영역 이미지를 사용하여 미토콘드리아에서 Mito-1 탐지체의 위치를 확인한 것으로, (a)는 세포의 Z-영역 이미지, (b)는 미토콘드리아 트래커 및 탐지체와의 공존, (c)는 공존 산점도(배율, $\times 63$)를 나타낸다(λ_{ex} 405 nm; λ_{em} 470-500 nm).

도 4는 탐지체 및 미토콘드리아 세포기관 트래커와 내생적 HNO의 공초점 현미경 공존 이미지를 나타낸 것으로, 공초점 레이저 주사 현미경의 Z-영역 이미지를 사용함으로써 미토콘드리아에 대한 Mito-1 (5.0 mM)의 공존을 확인하였다. (A)는 세포의 3D 이미지를 나타내고, (B)는 미토콘드리아 트래커 및 탐지체와의 공존을 나타내며, (C)는 공존 산점도를 나타낸다(λ_{ex} 405 nm; λ_{em} 470-500 nm).

도 5는 (A) HNO의 부재 하 및 (B) 외생적 HNO의 존재하에서 Mito-1 (10 μ M)의 이광자 형광 현미경 이미지이다(λ_{ex} 740 nm; λ_{em} 420-520 nm).

도 6은 세포 시스템에서의 니트로실 형성의 생화학적 경로를 도식화한 것이다(J. M. Fukuto, C. J. Cisneros and R. L. Kinkade, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **118**, 201).

도 7은 pH 7.4 PBS 완충액 중 AS (30 μ M)의 부존재 및 존재 하에서의 대조예 화합물 1 (10 μ M) 및 Mito-1 (10 μ M)의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸 것이다. 25 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션 한 후 데이터를 취득하였다.

도 8은 DMSO-PBS 완충액 (0.01 M, pH 7.4) (V/V= 2:98) 중 0에서 0.15 μ M으로 변화하는 HNO의 농도에 대한

450 nm에서 Mito-1 (2 μ M)의 형광 강도의 변화를 나타낸 것이다(슬릿폭 5/5 nm).

도 9는 종래 보고된 니트로실 탐지 한계를 나타낸 것이다.

도 10은 회귀 방정식을 적용하여 대조에 화합물 1과 니트로실 (HNO) 간 반응 속도 상수의 추정치를 나타낸 것이다.

도 11은 pH 7.4 PBS 완충액 중에서 AS (30 μ M/6eq) 및 고농도의 GSH (각각 1 mM/200eq, 2 mM/400eq) 존재하에서 Mito-1 탐지체 (5.0 μ M)의 형광 반응을 나타낸 것이다(Emission at 451 nm).

도 12는 Mito-1의 GSH 의존성 형광 변화를 나타낸 것으로, 탐지체를 AS 및 GSH와 함께 20분 동안 인큐베이션 한 후 AS (30 μ M) 및 다양한 농도의 GSH (0 μ M, 10 μ M, 20 μ M)를 갖는 pH 7.4 PBS 완충액 (0.5% DMSO)에서 탐지체 (5.0 μ M)의 형광 스펙트럼을 기록하였다.

도 13은 HNO (AS)로 처리된 Mito-1의 LC-MS 데이터를 나타낸 것이다.

도 14는 AS로 처리된 탐지체 Mito-1의 고해상도 질량 스펙트럼을 나타낸 것이다. HRMS (ESI): $C_{30}H_{24}NO_4P$ 에 대한 계산치=494.15, 실측치 m/z =494.050

도 15는 탐지체 및 다양한 세포기관 트래커를 지닌 내생적 HNO의 공초점 현미경 이미지, 세포기관 특이적 트래커 (미토콘드리아, 소포체 및 리소좀)를 지닌 탐지체의 공초점 현미경 공존 이미지를 나타낸다.

도 16은 세포 생존율 시험 결과를 나타낸 것이다. 96 웰 마이크로플레이트 (SPL Life Science, Gyeonggi-do, Korea) 상에 1×10^4 세포들을 뿌렸고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 다양한 조건으로 DMSO 및 탐지체로 5분 동안 세포들을 처리하였다. 세포 상의 탐지체의 세포독성을 분석하기 위해, SensoLyte® Cell Cytotoxicity Assay Kit (AnaSpec, Fremont, California)을 사용하여 세포독성 분석을 수행하였다. SPECTRA MAX GEMINI EM 마이크로플레이트 리더기 (Molecular Devices, Sunnyvale, California)를 사용하여 형광 수준을 분석하였다. 여기 및 방출 파장은 각각 544 nm 및 590 nm으로 설정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0018] 실험방법

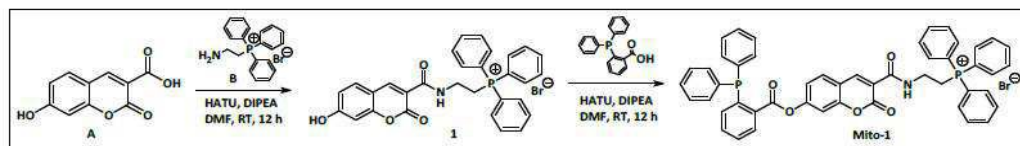
[0019] 재료, 방법 및 기기장치

[0020] 2,4-디하이드록시벤즈알데하이드 (TCI), 디에틸말로네이트 (Avra, India), 2-(디페닐포스포노) 벤조산 (Alfa-aesar), HATU (Alfa-aesar), DIPEA (Alfa-aesar), THF (Merck), 메탄올 (Merck), DMF (Aldrich), 디에틸 에테르 (Loba chem., India), 수산화나트륨 (Loba chem., India) 및 DCM (Loba chem. India)을 상업적으로 구매하였고 추가의 정제 없이 사용하였다. UV/Vis 및 형광 분광법을 위한 모든 재료, Angeli's salt (Cayman Chemical), L-시스테인(Acros), 초과산화 칼륨 (Aldrich), 황화 나트륨 (Aldrich), 차아염소산 나트륨 (Alfa Aesar), L글루타티온 (Aldrich), 과산화수소 (Samchun), 호모시스테인 (Aldrich), 아질산 나트륨 (Aldrich), 질산 나트륨 (Aldrich), DEA NONOate (Cayman Chemical), 2,2'-아조비스(2-메틸프로피온아미딘) 디하이드로클로라이드 (Aldrich), DMSO (J.T.Baker), 수산화나트륨 (Samchun)을 상업적 공급자로부터 구매하였고 추가의 정제 없이 사용하였다. 실리카 겔 (100-200 메쉬)을 사용하여 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였고 실리카 겔 60 (0.25 mm 두께로 사전 코팅된 시트)을 사용하여 분석 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 음이온 SpecHiResESI 질량 분광계 상에 질량 스펙트럼을 기록하였다. 400MHz 분광계 (Bruker, Germany) 상에 NMR 스펙트럼을 수집하였다.

[0022] [화학식 1]로 표시되는 화합물(Mito-1)의 합성

[0023] 하기 [합성 경로]에 표시된 방법에 따라, 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 화합물(Mito-1)을 합성하였다.

[0024] [합성 경로]



[0025]

[0027] (1) A의 합성

[0028] 종래 보고된 방법에 따라 화합물 A를 합성하였다(J. Liu, F. Wu, L. Chen, L. Zhao, Z. Zhao, M. Wang and S. Lei, *Food Chem.*, 2012, **135**, 2872.)

[0030] (2) B의 합성

[0031] 종래 보고된 방법에 따라 화합물 A를 합성하였다(B. E. Maryanoff, A. B. Reitz and B. A. Duhl-Emswiler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 217.)

[0033] (3) 화합물 1의 합성

[0034] 0°C DIPEA (5.22 mL, 29.13 mmol)에서 DMF (10 mL) 중 화합물 A (1 g, 4.855 mmol)의 용액에, 화합물 B (2.73 g, 5.825 mmol) 및 HATU (2.77 g, 7.282 mmol)를 첨가하였다. RT에서 12시간 동안 교반하여 반응을 계속하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응 완료 후에, 반응 혼합물을 물 (50 mL) 내로 붓고 에틸 아세테이트 (3 x 25 mL)로 추출하였다. 유기층을 물 (2 x 50 mL), 소금물 (1 x 50 mL)로 세척하였고, 무수 황산 나트륨을 통해 건조 및 감압하에서 농축시켰다. 용리제로서 DCM (1:9) 중의 메탄올을 사용하여 실리카 겔 (100-200 메쉬) 상에서 컬럼 크로마토그래피에 의해 미정제 생성물을 정제하여 옅은 노란색 고형물 (1.8 g; 64.47%)인 화합물 1을 수득하였다. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 11.10 (s, 1H); 8.96 (s, 1H); 7.89-7.74 (m, 11H); 7.73 (d, *J* = 2.80 Hz, 2H); 6.90 (q, 1H); 6.81 (d, *J* = 1.60 Hz, 1H); 3.87 (m, 2H); 3.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 164.35, 163.40, 160.09, 157.10, 149.09, 135.01, 134.10, 133.99, 130.25, 119.51, 115.20, 113.09, 111.25, 101.99; ESI- HRMS *m/z* (M+H): 계산치. 494. 15157, 실측치 494.15048.

[0036] (4) Mito-1의 합성

[0037] 0°C DIPEA (0.4 mL, 2.234 mmol)에서 DMF (10 mL) 중 2-(디페닐포스포노) 벤조산 (375 mg, 1.23 mmol)의 용액에, 화합물 1 (640 mg, 1.117 mmol) 및 HATU (640 mg, 1.675 mmol)를 첨가하였다. RT에서 12시간 동안 교반하여 반응을 계속하였고 반응을 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응 완료 후에, 반응 혼합물을 물로 희석하였고 15 분 동안 교반시켰다. 침전된 고형물을 여과하였고, 물로 세척하고, 진공 속에서 건조시켰다. 용리액으로서 DCM (0.5:9.5) 중 메탄올을 사용하여 실리카 겔 (100-200 메쉬) 상에서 컬럼 크로마토그래피에 의해 미정제 생성물을 정제하여 옅은 노란색 고형물 (320 mg; 33.20%)로서 본 발명에 따른 탐지체인 Mito-1을 수득하였다. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); 8.80 (s, 1H); 8.29 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); 8.02 (t, *J* = 2.04 Hz, 1H); 7.99-7.62 (m, 17H); 7.40-7.35 (m, 7H); 7.32-7.06 (m, 5H); 6.92 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H); 3.87 (t, 2H); 3.72 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 165.02, 162.15, 159.05, 154.05, 148.05, 141.02, 137.20, 135.10, 134.00, 132.50, 130.99, 129.60, 119.99, 118.50, 118.25, 117.59, 116.20, 110.79; ESI-MS *m/z* (M+H): 계산치. 782.22, 실측치 783.00; HRMS (M + 산소 부가생성물): 798.21234; HPLC~96.04%.

[0039] **UV/Vis 및 형광분석법(Fluorescence Spectroscopy)**

[0040] DMSO 중에 Mito-1을 용해시켜 Mito-1의 1×10^{-3} M 저장 용액을 제조하였다. 흡수 스펙트럼을 S-3100 (Scinco) 분광광도계 상에 기록하였고, 제논 램프가 갖춰진 RF-5301 PC 분광형광계 (Shimadzu)를 사용하여 형광 스펙트럼을 기록하였다. 형광 방출 스펙트럼을 398 nm의 여기 파장에서 기록하였고, 400-600 nm 범위의 파장 ($\text{em} = 452$ nm)을 통해 방출을 모니터링하였다. 증류수 중 Hcy, GSH, Cys, KO_2 , NaNO_2 , NaNO_3 , NaClO , H_2O_2 (1×10^{-3} M)의 저장 용액; NaOH (1×10^{-2} M) 중 DEA NONOate, Na_2S , Angeli's salt (1×10^{-3} M); DMSO 중 KO_2 (1×10^{-3} M)을 또한 제조하였다. 샘플들의 흡수 및 방출 측정 (4 mL 부피)을 위해 퀴츠 큐벳 (Quartz cuvettes)을 사용하였다. 생리적 조건의 pH (PBS 완충액, pH 7.4) 하에서 모든 분광학적 측정을 수행하였다.

[0042] **세포 배양**

[0043] 인간 자궁경부암 세포 (HeLa)의 세포 배양 및 데이터 분석은 Korean Cell Line Bank (Seoul, Republic of Korea)로부터 구매하였다. 37°C 5% CO_2 하에서, 10% 소태아 혈청 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Hyclone)이 보충된 고 글루코오스 (GE Hyclone, Logan, UT, USA)를 포함하는 더블코 수정 이글 배지에서 세포들을 배양하였다.

[0045] **이광자 형광 현미경**

[0046] Delta T Dishes (Bioprotechs) 상에 1×10^5 세포들을 뿌렸다. 70-85% 융합성을 갖는 세포들을 PBS로 세척하였고 37°C , 5% CO_2 하에서 5분 동안 탐지체 Mito-1 (PBS 중 $10 \mu\text{M}$)와 함께 배양하였다. 그 다음에, PBS 중에서 30분 동안 $50 \mu\text{M}$ AS로 세포들을 처리하였고 PBS로 세척하였다. $\times 100$ (NA = 1.30 OIL) 대물 렌즈를 지닌 스펙트럼 공초점 및 다광자 현미경 (Leica TCS SP2)로 탐지체 라벨링된 HeLa 세포들의 이광자 형광 현미경 이미지를 획득하였다. 740 nm 파장에서 설정된 모드-잠금된 티타늄-사파이어 레이저원 (Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)으로 탐지체를 여기시켜 DM IRE2 Microscope (Leica)으로 이광자 형광 현미경 이미지를 획득하였다. 420-520 nm 범위에서 이미지를 획득하기 위해, 내부 PMT를 사용하여 8 비트 무부호 512×512 픽셀 at 400 Hz 스캔 속도로 신호를 수집하였다.

[0048] **일광자 형광 현미경**

[0049] 동일한 조건으로 공초점 레이저 주사 현미경 (Carl-Zeiss LSM 700 Exciter, Oberko, Germany)을 사용하여 형광 이미지를 획득하였다. Si 레이저로 405 nm에서 형광 채널을 여기시켰고, 470-500 nm 밴드 패스 필터에 의해 방출을 수집하였다. 탐지체 위치를 추적하기 위해, Mito-Track Red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Lyso-Tracker Red (Invitrogen), 및 ER-Tracker Red (Invitrogen)를 사용하였다. 공초점 레이저 주사 현미경 (Carl Zeiss)을 사용하여 형광 이미지를 획득하였다.

[0051] **내생적 HNO 감지 조건**

[0052] DMEM 배지를 함유하는 35 mm-공초점 디쉬 (SPL Life Sciences, Seoul, Republic of Korea) 상에 1×10^5 세포들을 뿌렸고, 37°C , 5% CO_2 하에서 10시간 동안 배양하였다. 그 다음에, $200 \mu\text{M}$ DEA NONOate로 20시간 동안 세포들을 처리하였다. 세포들을 PBS로 세척하였고 DMEM 배지에서 0.03 mM NEM으로 처리하였으며, 37°C , 5% CO_2 하에서 10분 동안 배양하였다. NEM을 사전처리한 후에, 세포들을 PBS로 세척하였고, 탐지체 Mito-1 ($5 \mu\text{M}$)로 처리하였으며 5분 동안 배양하였다. LSM 700 공초점 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 세포 모폴로지를 획득하였다. NaAsc 처리된 군을 위해, 5분동안 탐지체 Mito-1 처리 후에, 세포들을 PBS로 세척하였고 1.5 mM NaAsc로 처리하였으며, 37°C , 5% CO_2 하에서 20분 동안 배양하였다. 그 다음에, 세포들을 세척하였고, 형광 현미경을 사용하여 분석하였다.

[0054] **외생적 HNO 감지 조건**

[0055] 35 mm-공초점 디쉬 (SPL Life Science) 상에 1×10^5 세포들을 뿌렸다. 70~85% 융합성을 갖는 세포들을 PBS로 세척하였고, DMEM 배지에서 0.03 mM NEM으로 10분 동안 처리하였다. 그 다음에, 5% FBS를 함유하는 PBS 중에서 탐지체 Mito-1 ($5 \mu\text{M}$)으로 5분 동안 세포들을 처리하였다. 탐지체의 처리 후에, 세포들을 PBS로 세척하였고, 현미경을 이용한 형광 이미지를 위해 PBS 중 300 μM Angeli's Salt를 30분 동안 첨가하였다.

[0057] **세포의 세포독성 시험**

[0058] 96 웰 마이크로플레이트 (SPL Life Science, Gyeonggi-do, Korea) 상에 대략 세포 1×10^4 를 뿌렸고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 다양한 조건으로 5분 동안 DMSO 및 탐지체로 세포들을 처리하였다. 세포 상의 탐지체의 세포독성을 분석하기 위해, SensoLyte® Cell Cytotoxicity Assay Kit (AnaSpec, Fremont, California)를 사용하여 세포독성 분석을 수행하였다. SPECTRA MAX GEMINI EM 마이크로플레이트 리더기 (Molecular Devices, Sunnyvale, California)를 사용하여 형광 수준을 분석하였다. 여기 및 방출 파장은 각각 544 nm 및 590 nm으로 설정하였다.

[0060] **선형 범위 및 검출 한계**

[0061] 검출 한계를 계산하기 위해 형광 적정(Fluorescence titration)을 사용하였다. 탐지체 Mito-1 (2.0×10^{-6} M)의 형광 방출 스펙트럼을 10회 측정하였고 공시료의 표준 편차를 획득하였다. 452 nm에서의 형광 강도를 HNO의 농도로 플롯팅하였다. 하기 식을 이용하여 검출 한계를 계산하였다.

[0062] 검출 한계 $3\sigma/k$:

[0063] 여기서, σ 는 공시료(blank measurement)의 표준 편차이고, k 는 형광 강도 vs. HNO 농도 간의 기울기이다.

[0065] **결과 및 고찰**

[0066] 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 니트로실 검출용 형광 프로브 화합물(Mito-1)은 상기 합성 경로에 표시된 바와 같이 아미드 형성 후 에스터화를 통한 2개의 연속 단계로 합성된다. 본 발명에서는 광학 관습을 극복하기 위해 높은 양자 수율 및 이광자 특성을 가진 쿠마린을 형광단으로 사용하였다.

[0067] 다음으로, 본 발명에 따른 Mito-1의 HNO에 대한 민감도를 측정하기 위해, 생리적 조건하에서 HNO 생성제로 잘 알려진 Angeli's salt (AS)의 존재하에서 Mito-1의 UV-흡수 및 형광 변화를 기록하였다. 도 7에 나타나는 바와 같이, Mito-1의 UV-흡수는 AS (3 eq.)의 존재 하 398 nm에서 ~30배 증가하였다. Mito-1의 λ_{em} 452 nm에서 형광 강도는 AS (0-100.0 mM)의 농도가 증가함에 따라 점차적으로 향상되었고, 그 다음에 포화에 도달하였다 (도 1A). 도 1A에 나타난 바와 같이 Mito-1의 형광 강도가 HNO (AS) (100.0 mM)의 존재하에서 ~45배 증가함을 확인하였다. 또한, 회귀 방정식을 적용한 결과, HNO에 대한 검출 한계가 18.0 nM (도 8)으로 계산되었으며, 이는 종래 보고된 탐지체들보다 상당히 낮은 수치이다(도 9).

[0068] 다음으로, AS의 처리와 함께 HNO의 존재하에서 Mito-1의 시간-의존적 형광 강도 변화를 기록하였다. 도 1B의 결과를 통해 HNO (30.0 mM)의 존재 하에서 Mito-1의 형광 강도가 20분 내로 최대치에 도달함을 확인하였다. Mito-1과 니트로실 간 반응의 속도 상수는 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (도 10)로 계산되었다. 이러한 결과는 Mito-1이 단기간 내에 세포 미세환경에서 HNO의 탐지를 가능하게 함을 시사하는 것이다.

[0069] 다음으로, 다른 생물학적으로 관련된 반응성 종, 예컨대 Cys, GSH, Hcy, Na_2S , H_2O_2 , NO, NO_3^- , NO_2^- , O_2^- , ROO^- , 및 ClO^- 로부터의 임의의 간섭 없이 Mito-1이 HNO와 반응할 수 있는지를 확인하였다. 이를 위해 전술한 피분석물과 함께 25 °C에서 20분 동안의 배양에 따른 Mito-1의 형광 강도의 변화를 모니터링하였다. 도 1C에 나타난 바와 같이, Mito-1의 형광 강도는 다른 생물학적으로 관련된 피분석물의 존재 하에서 거의 변함 없이 유지되었는

데 반해, Mito-1은 HNO (AS)의 존재 하에서만 형광 향상을 나타내었다.

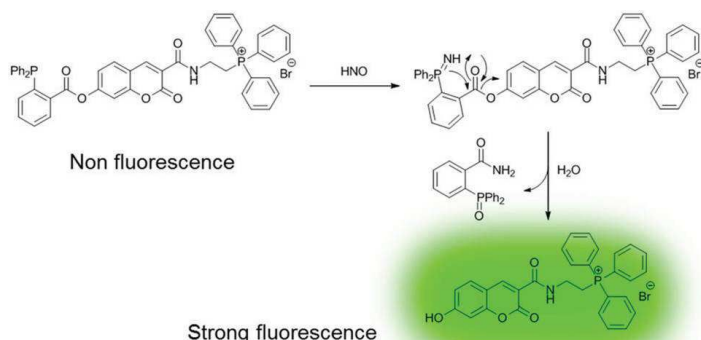
[0070] HNO가 GSH와 비교하여 훨씬 덜 발현된 생물학적 시스템에서 탐지체의 가능성을 입증하기 위해, 상당히 상이한 농도하에서 기질들을 시험하였다. 도 11은 400 eq.의 GSH 및 6 eq.의 HNO가 처리된 경우의 결과를 나타낸다. GSH가 Mito-1과 특정한 범위의 반응성을 나타내지만, HNO는 그의 상당히 낮은 농도에도 불구하고 우수한 형광 강도를 보여준다. 이러한 Mito-1의 정교한 민감성은 탐지체가 다른 단수명 화학적 개체의 존재 하에서조차 세포의 미소구획에서 HNO를 감지하기 위한 우수한 도구임을 시사하는 것이다.

[0071] 이러한 결과가 Angel' s salt의 다른 부산물 대신에 HNO로 인한 것이라는 것을 명확하게 하기 위해, GSH, HNO의 스캐빈저의 존재하에서 AS와 Mito-1의 반응을 수행하였다. GSH 농도가 0에서 20 mM로 증가함에 따라, 형광 강도는 예상한 대로, 감소하였고, 이를 통해 HNO가 형광 강도의 증가를 일으킨 것임을 확인하였다(도 12).

[0072] 다음으로, 다양한 pH 범위에서 Mito-1의 안정성과 HNO에 대한 반응성을 분석하였다. 도 1D의 결과는 Mito-1이 생리학적 pH 범위 (pH 4 ~ 8)에서 매우 안정적이며 HNO에 대한 반응성이 형광 강도가 최대에 도달 할 때 pH 8에서 최적화됨을 나타낸다. 미토콘드리아 매트릭스가 약간 알칼리성이기 때문에 (pH ~8), 본 발명에 따른 Mito-1이 미토콘드리아에서 내생적 HNO의 탐지를 가능하게 할 것으로 예상된다.

[0073] 세포 환경에서 외생적/내생적 HNO의 감지를 위한 Mito-1의 적용을 진행하기 전에, 하기 [Mito-1과 HNO의 반응 메커니즘]에서 나타난 바와 같이, Mito-1과 HNO의 반응 메커니즘을 평가하였다. 아세토니트릴 중에서 Mito-1로 처리된 Angeli' s salt (AS)에 대해 액체 크로마토그래피-질량 분석법 (LC-MS) 및 HR-MS 분석을 하였다. 도 13의 LC-MS 데이터는 2개의 주요한 성분들이 크로마토그램에 제공되었음을 나타낸다. 322.1 및 494.2에서의 피크는 부산물 (M + 1) 및 유리 형광단 1(화합물 1)과 각각 매칭된다. 또한, HR-MS 데이터 (도 14)에서 주요 피크가 형광단 (1)과 대응되는 494.05에서 나타났다. 이러한 결과는 분자내 스타우딩거 반응 메커니즘을 강력하게 입증하는 것이다.

[0074] [Mito-1과 HNO의 반응 메커니즘]



[0075]

[0076] 다음으로, Sensolyte® Cell Cytotoxicity Assay Kit를 사용하여 HeLa 세포에서 Mito-1의 세포독성을 평가하였으며, 측정 결과 10 mM에서 현저한 세포독성이 관찰되지 않았고, 이에 따라 Mito-1의 우수한 생체호환성을 확인하였다(도 16). Angeli' s salt-사전처리된 HeLa 세포를 가변적인 농도의 Mito-1과 함께 배양하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 세포라벨링의 범위는 투여량-의존적인 방식으로 증가하였다.

[0077] Mito-1로부터의 형광 신호를 모니터링함으로써 미토콘드리아에서 외생적 니트로실을 평가하였으며, 그 결과로도 3에 나타내었다. 이를 통해 다른 세포기관, 예컨대 소포체 (ER) 및 리소좀 (Lyso)과 비교하여 미토콘드리아에서 Mito-1이 대부분 국소화됨(localized)을 확인하였다. 또한, 공초점 Z-영역 이미지 및 공존 산점도는 Mito-1이 Mito-트래커와 잘 공존함을 의미한다. 이러한 결과는 Mito-1이 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 외생적 니트로실을 추적하는 능력이 있음을 시사하는 것이다.

[0078] 다음으로, Mito-1의 형광 변화를 모니터링함으로써 미토콘드리아에서 내생적 HNO 형성을 추적하였다. NO를 HNO로 전환할 수 있는 환원제로 알려진, 아스코르브산 나트륨의 존재하에서 HeLa 세포를 DEA NONOate (NO 공여체)로 처리하였다. 3-차원 공존 이미지는 Mito-1이 다른 세포기관, 예컨대 리소좀 (Lyso) 및 소포체 (ER)을 거쳐 미토콘드리아에 대부분 국소화됨(localized)을 암시하였다 (도 9 및 도 15). 이러한 결과는 Mito-1이 미토콘드리아에서 외생적 HNO 및 내생적 HNO 형성 둘 모두를 감지할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0079] 마지막으로, 세포 환경에서 유비쿼터스 생물학적 개체로부터의 형광 간섭을 극복하게 해주는 Mito-1의 이광자

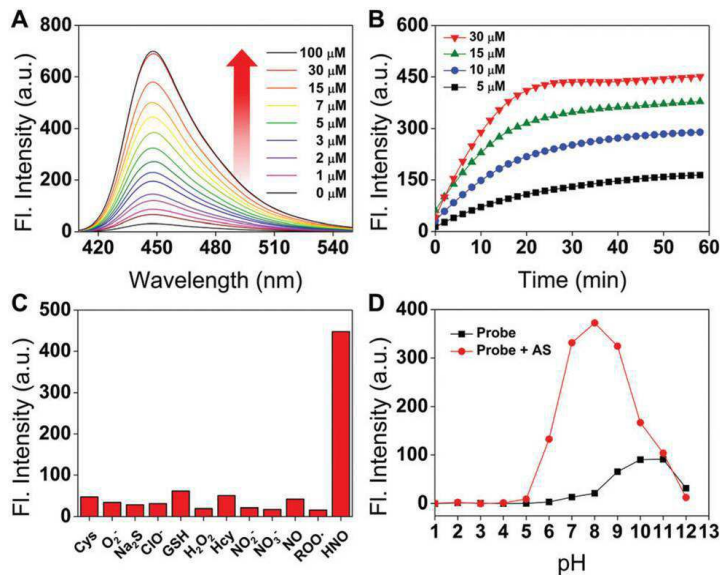
형광 특성을 평가하였다. 도 5에 나타난 바와 같이 HNO (AS) 전처리 된 HeLa 세포는 420-520 nm 범위에서 형광으로 표지되었으며, Mito-1의 존재하에 lex 740 nm에서 여기되었다. 이러한 결과는 Mito-1이 고유한 생물학적 개체로부터의 임의의 형광 간섭 없이 미토콘드리아의 내생적 및 외생적 HNO 형성을 보장하는 능력을 가짐을 암시하는 것이다.

[0081]

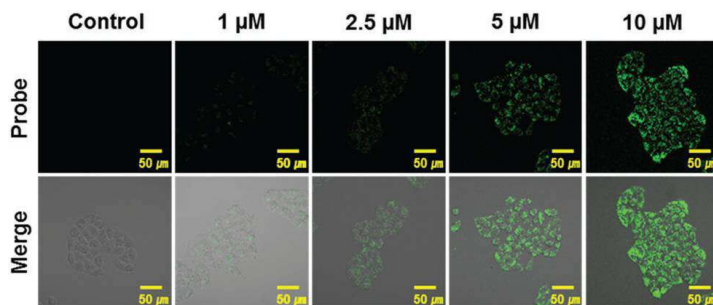
결론적으로, 본 발명에서는 미토콘드리아에서 니트로실 (HNO)을 감지하기 위한 무금속 화학도시미터 턴-온 형광 탐지체인 Mito-1을 제공한다. Mito-1의 λ_{abs} 398 nm에서의 UV 흡수 및 λ_{em} 452 nm에서의 형광 강도는 HNO (100 mM)의 존재하에서 ~25배 및 ~45배 향상되었다. 또한, 니트로실에 대한 Mito-1의 민감성은 18 nM 정도로 낮았으며, 생리적 pH 범위에서 매우 안정한 것으로 나타났다. 또한, Mito-1은 '턴-온' 형광 신호를 제공함으로써 미토콘드리아에 국소화된(localized) 내생적 및 외생적 니트로실의 시각화를 가능하게 한다. 이처럼, 본 발명에 따른 형광 탐지체의 살아있는 세포에서 HNO의 존재하에서 이광자 '턴-온' 형광 반응은 생체 시스템에서 편재하는 개체로부터의 간섭을 극복할 수 있게 하여, 미토콘드리아에서 니트로실을 탐지하는 유망한 도구가 될 것으로 예상된다.

도면

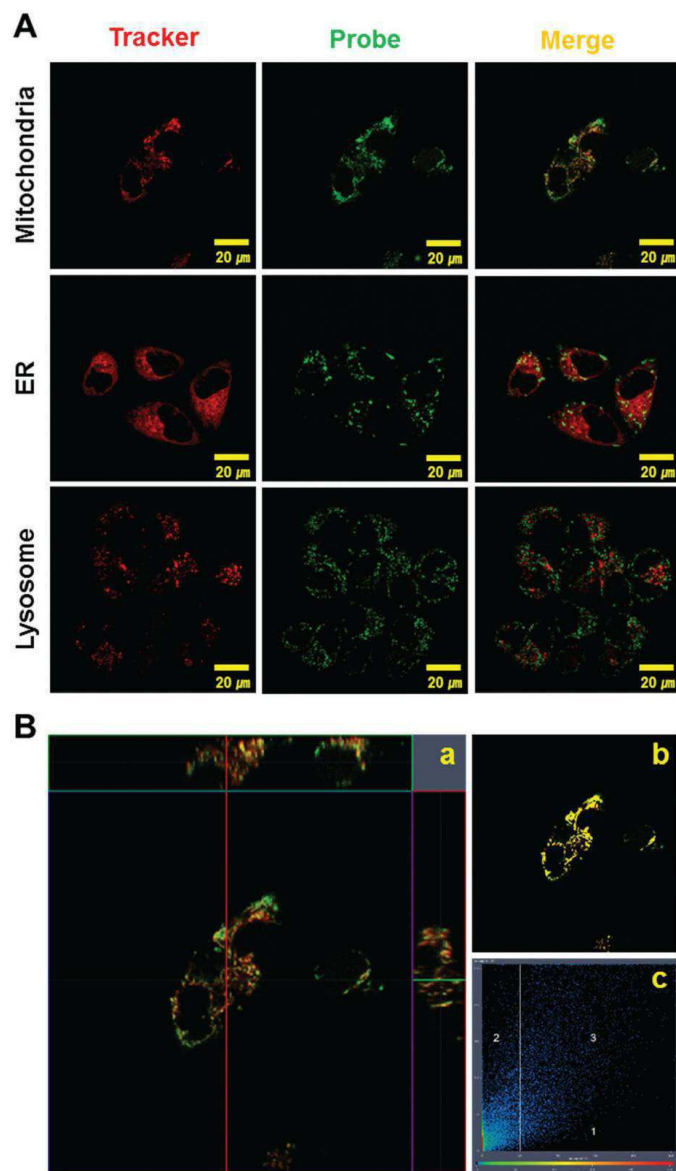
도면1



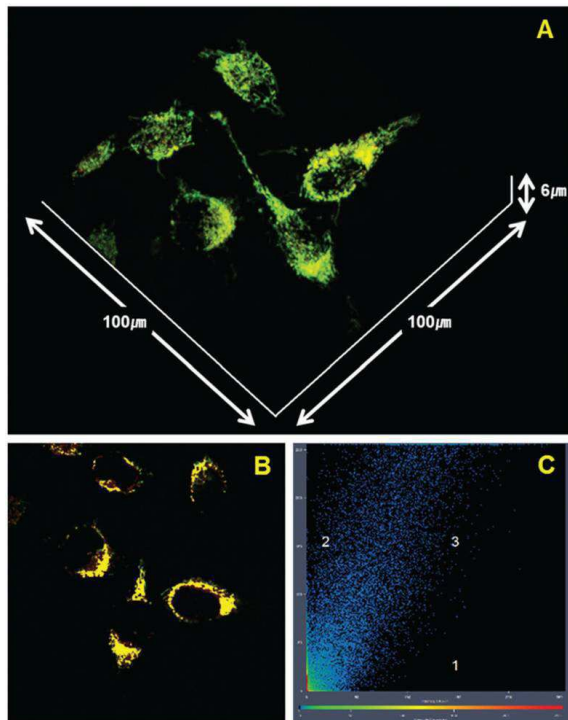
도면2



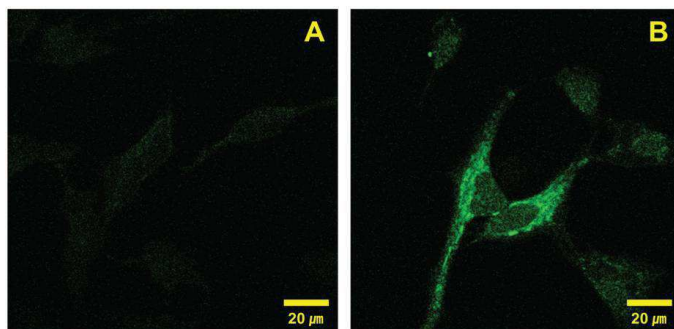
도면3



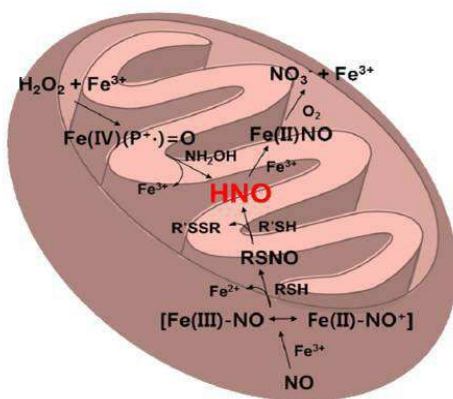
도면4



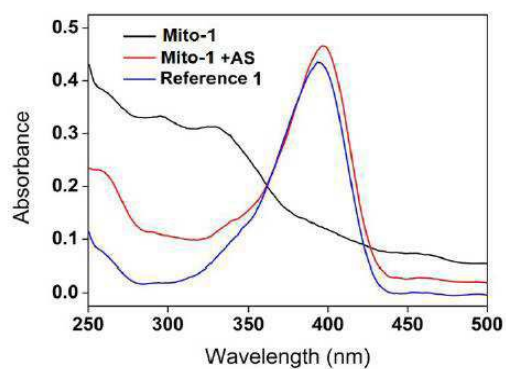
도면5



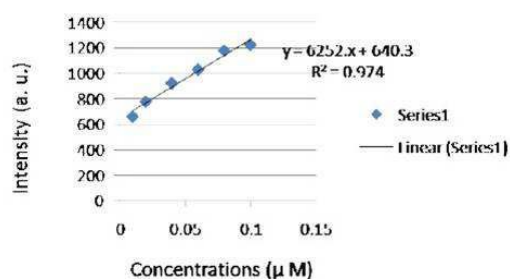
도면6



도면7



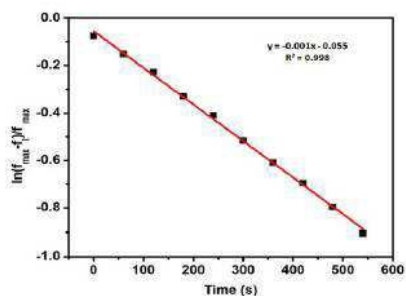
도면8



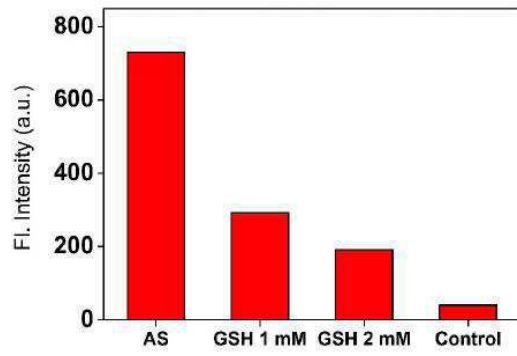
도면9

Previous reported work	Detection limit
C. Liu, H. Wu, Z. Wang, C. Shao, B. Zhu and X. Zhang, <i>Chem. Commun.</i> , 2014, 50 , 6013	0.5 μ M
G. J. Mao, X. B. Zhang, X. L. Shi, H. W. Liu, Y. X. Liu, H. Y. Zhou, W. Tan and R. Q. Yu, <i>Chem. Commun.</i> , 2014, 50 , 5790	0.02 μ M
Z. Miao, J. A. Reisz, S. M. Mitroka, J. Pan, M. Xian and S. B. King, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2015, 25 , 16	Not reported
K. Zheng, W. Lin, D. Cheng, H. Chen, Y. Liu and K. Liu, <i>Chem. Commun.</i> , 2015, 51 , 5754	0.59 μ M
K. N. Bobba, Y. Zhou, L. E. Guo, T. N. Zang, J. F. Zhang, S. Bhuniya, <i>RSC Adv.</i> , 2015, 5 , 84543	0.02 μ M
X. Zhu, M. Xiong, H.-W. Liu, G.-J. Mao, L. Zhou, J. Zhang, X.-B. Zhang and W. Tan, <i>Chem. Commun.</i> , 2016, 52 , 733	0.59 μ M

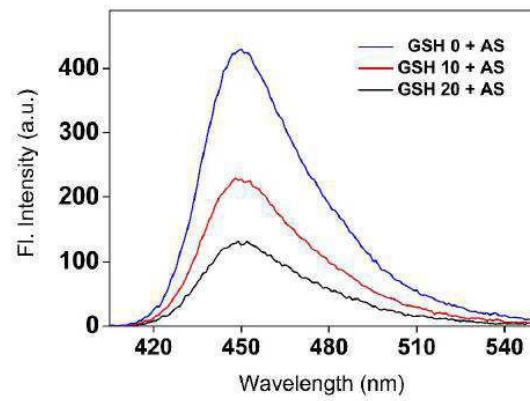
도면10



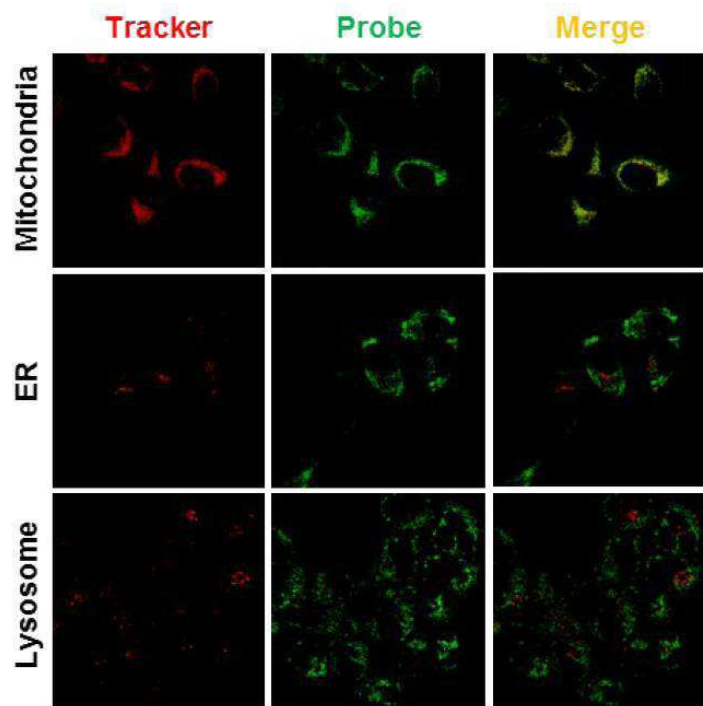
도면11



도면12



도면15



도면16

