



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0084499

(43) 공개일자 2015년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 49/06 (2006.01) A61K 49/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0004588

(22) 출원일자 2014년01월14일

심사청구일자 2014년01월14일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

경기도 성남시 분당구 내정로 152 130-2402(수내동, 파크타운롯데아파트)

장주희

서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가) 고려대학교 화학과

(74) 대리인

특허법인충현

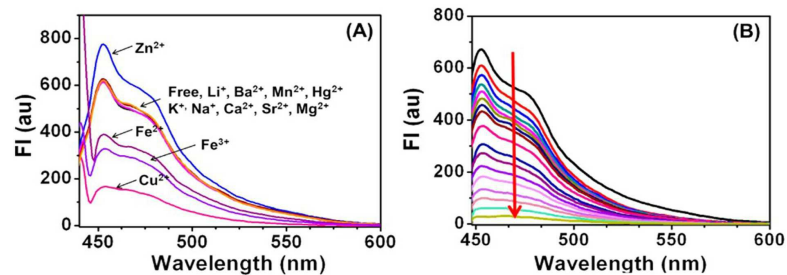
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브 및 이의 제조방법

(57) 요약

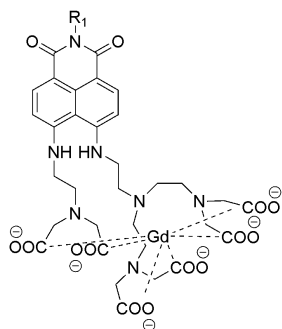
본 발명은 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브 및 이의 제조방법에 관한 것으로 하기 [화학식 1]로 표시되 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



고, 구리 이온과 반응하여 MR 신호는 증가하지만 광학 신호는 점차 감소한다.

[화학식 1]



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081566

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 리더연구자지원_창의적연구지원사업

연구과제명 발광센서재료연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

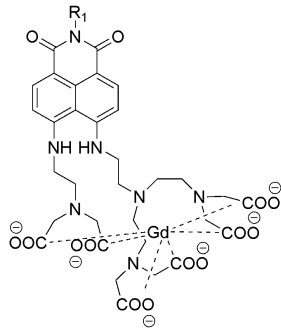
명세서

청구범위

청구항 1

광학/MRI 시스템에서 구리 이온에 반응하는 하기 [화학식 1]로 표시되는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브;

[화학식 1]

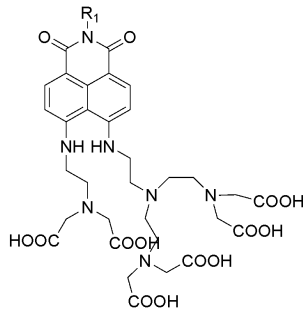


상기 [화학식 1]에서, R₁은 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 2 내지 30의 알릴기로 이루어진 군에서 선택됨.

청구항 2

하기 [화학식 2]로 표시되는 리간드;

[화학식 2]

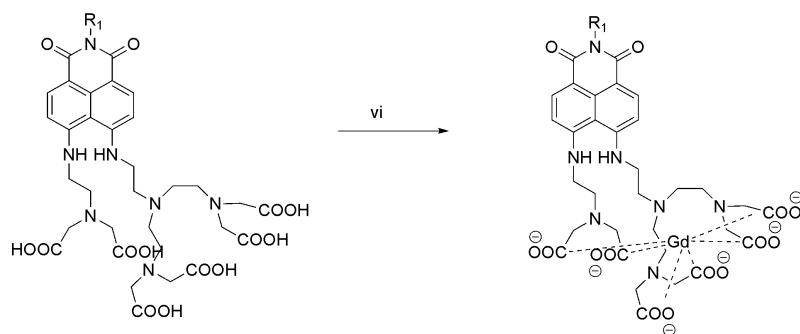


상기 [화학식 2]에서, R₁은 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 2 내지 30의 알릴기로 이루어진 군에서 선택됨.

청구항 3

하기 [반응식 1]에 따라 하기 [화학식 2]의 화합물을 이온교환수에 용해시키고 순차적으로 GdCl₃·H₂O 및 NaHCO₃를 첨가하여 반응함으로써 제조되는 하기 [화학식 1]로 표시되는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브를 제조하는 방법;

[반응식 1]



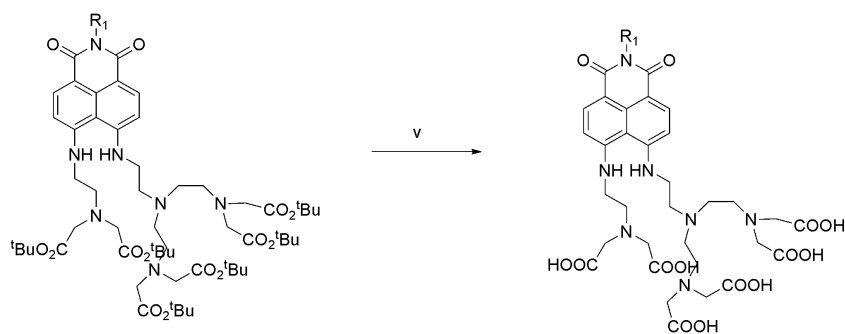
[화학식 2]

[화학식 1].

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 [화학식 2]의 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 하기 [화학식 3]의 화합물을 디클로로메탄(DCM)에 용해하고 트리플루오로아세트산을 첨가하여 반응함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브를 제조하는 방법;

[반응식 2]



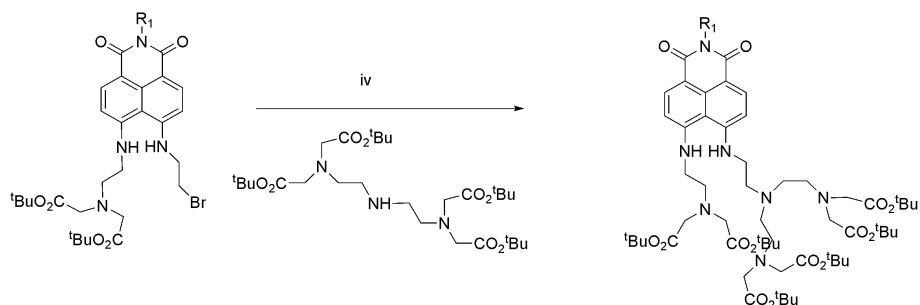
[화학식 3]

[화학식 2].

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 [화학식 3]의 화합물은 하기 [반응식 3]에 따라 아세트나이트릴하에서 하기 [화학식 4]의 화합물, 하기 [화학식 11]의 화합물 및 포타슘카보네이트의 반응에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브를 제조하는 방법;

[반응식 3]



[화학식 4]

[화학식 11]

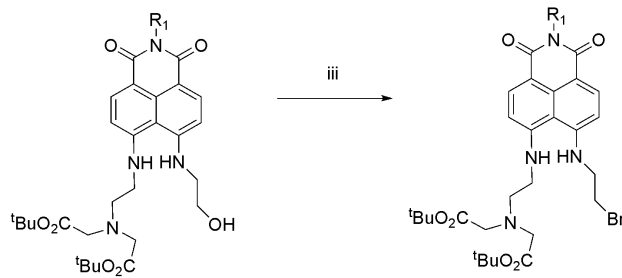
[화학식 3].

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 [화학식 4]의 화합물은 하기 [반응식 4]에 따라 하기 [화학식 5]의 화합물과 트리페닐포

스핀을 디클로로메탄에 용해시켜 냉각한 후 테트라브로모메탄을 첨가하여 반응함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브를 제조하는 방법;

[반응식 4]



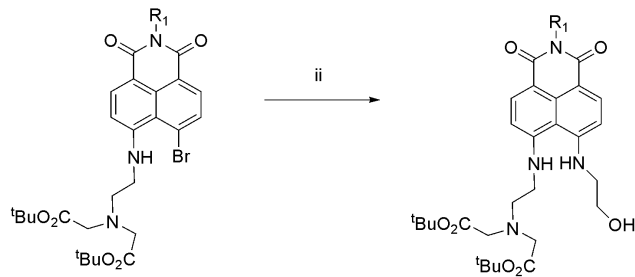
[화학식 5]

[화학식 4].

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 [화학식 5]의 화합물은 하기 [반응식 5]에 따라 하기 [화학식 6]의 화합물, 에탄올아민 및 아세트나이트릴의 반응에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브를 제조하는 방법;

[반응식 5]



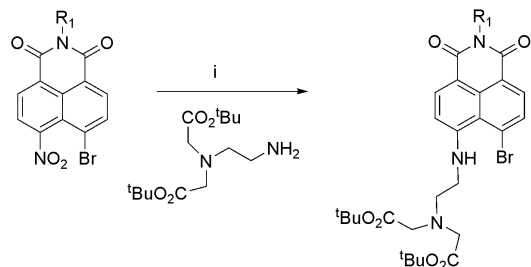
[화학식 6]

[화학식 5].

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 [화학식 6]의 화합물은 하기 [반응식 6]에 따라 하기 [화학식 7]의 화합물, [화학식 8]의 화합물 및 아세트나이트릴의 반응에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브를 제조하는 방법;

[반응식 6]



[화학식 7]

[화학식 8]

[화학식 6].

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 내에서 구리 이온(Cu^{2+})의 측정이 가능한 프로브에 관한 것으로서, 광학적 및 MRI에서 모두 측정이 가능한 이중모드 프로브에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 구리 이온은 인체 내에 존재하는 중금속 이온 중 세 번째로 그 양이 많으며, 인체 내에서 매우 필수적인 성분이고, 다양한 기관 및 대사 과정에서 중요한 기능을 수행한다. 그러나 모든 필수영양성분과 같이, 너무 많거나 적은 경우 체내 과다 또는 결핍으로 인하여 질병을 유발하게 된다. 인체 내에서 구리의 불균형은 신경질환과 매우 밀접한 관련을 갖고있다. 다수의 화학적 연구에 의하면, 구리 이온과 건강한 조직 및/또는 질환과의 상관관계를 보여주고 있다.

[0003] 구리와 관련된 세포 항상성의 변화는 멘케스 윌슨(Menkes and Wilson diseases), 유전성 경화, 알츠하이머 및 프리온(Prion diseases)과 같은 심각한 퇴행성 신경 질환과 연결된다. 구리의 독성 성질로 인해 세포는 세포 내의 구리 분포에 대해 엄격한 통제를 한다. 그럼에도 불구하고 세포 내 구리의 취이 및 방출은 속도론적으로 빨리 진행되어, 세포 내 구리 농도는 한 시간 내에 20배로 증가될 수 있다.

[0004] 세포질, 미토콘드리아, 소포체 효소 등은 산화환원 보조인자(cofactor)로써 구리를 필요로 하지만, 산소 및 반응성 산소종과 비조절된 구리 이온의 반응은 단백질, 핵산, 지질의 산화를 야기한다.

[0005] 이와 같이, 금속 이온들은 생체 내의 역할 혹은 환경적 측면으로 인해 그 농도를 손쉽게 정확하게 알아낼 필요가 있어 그 중요성 만큼이나 많은 연구가 진행되고 있으며, 환경학적으로 그 검출방법이 중요하다 할 수 있다.

[0006] 이와 관련하여 트랜스페린(transferrin)(C. Ka Luk, Biochemistry 1971, 10, 2838; J. Hirose 등, Biochim. Biophys. Acta 1996, 1296, 103)과 아밀로이드 단백질(amyloid precursor protein)(L. Hesse 등, FEBS Lett. 1994, 349, 109; R. Hassett 등, J. Biol. Chem. 1995, 270, 128; G. Muthaup 등, Science 1996, 71, 1406; F. H. Ruiz 등, J. Neurochem. 1999, 73, 1288; C. J. Maynard 등, Int. J. Exp. Path. 2005, 86, 147)의 구리 이온 결합에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0007] 최근에는 구리로 유도된 자기장 공명 이미징(MRI) 신호가 조직의 비침습적 3차원 영상화를 제공할 수 있기 때문에 많은 주목을 받고 있다. MRI 또는 광학적 영상화의 방식은 고유의 장점과 단점을 가지고 있으므로 이들의 상이하고 보충적인 시스템이 결합됨으로써 그 한계를 극복할 수 있을 것이다. 특히, 이러한 광학/MRI 영상화의 이중 방식은 비임상 및 임상적 적용이 가능하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제0387996호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제1022518호
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제0690199호

발명의 내용

해결하려는 과제

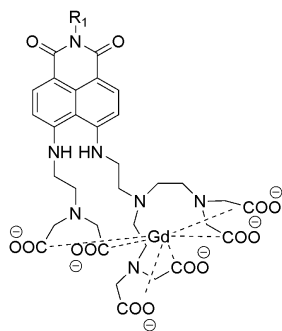
[0009] 본 발명의 목적은 생체 내에서 구리 이온(Cu^{2+})을 광학적 및 MRI로 측정할 수 있는 이중모드 프로브를 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 이중모드 프로브의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 광학/MRI 시스템에서 구리 이온에 반응하는 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브는 하기 [화학식 1]로 표시된다;

[0012] [화학식 1]

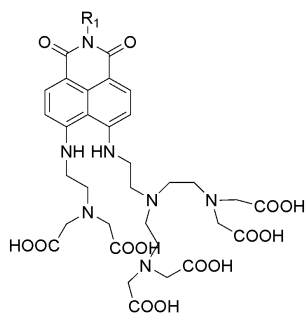


[0013]

[0014] 상기 [화학식 1]에서, R₁은 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 2 내지 30의 알릴기로 이루어진 군에서 선택된다.

[0015] 하기 [화학식 2]로 표시되는 리간드를 제공한다.

[0016] [화학식 2]

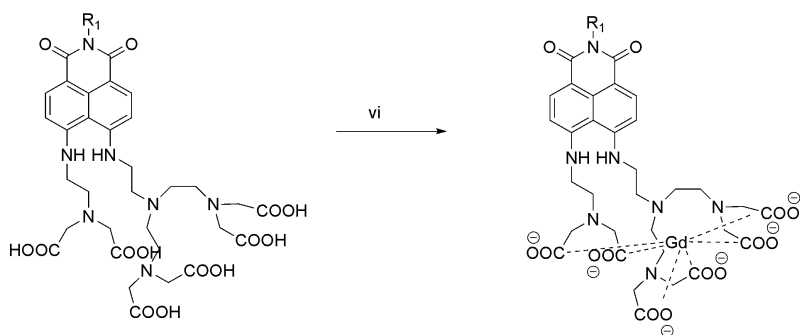


[0017]

[0018] 상기 [화학식 2]에서, R₁은 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 2 내지 30의 알릴기로 이루어진 군에서 선택된다.

[0019] 상기한 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 생체내 구리 이온 검출용 이중모드 프로브를 제조하는 방법은 하기 [반응식 1]에 따라 하기 [화학식 2]의 화합물을 이온교환수에 용해시키고 순차적으로 GdCl₃·H₂O 및 NaHCO₃를 첨가하여 반응함으로써 제조되는 것을 특징으로 한다;

[0020] [반응식 1]

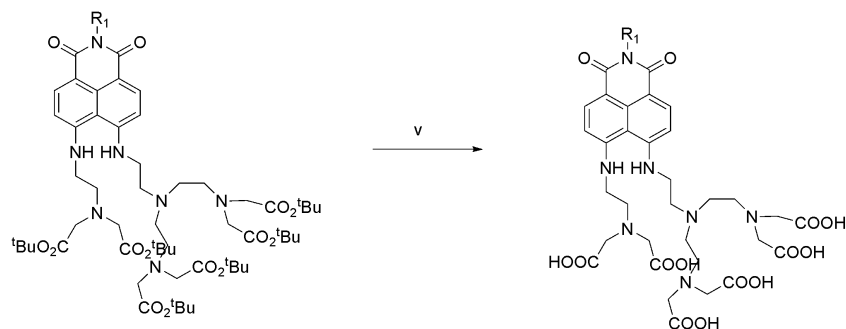


[0021]

[0022] [화학식 2] [화학식 1].

[0023] 상기 [화학식 2]의 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 하기 [화학식 3]의 화합물을 디클로로메탄(DCM)에 용해하고 트리플루오로아세트산을 첨가하여 반응함으로써 제조되는 것을 특징으로 한다;

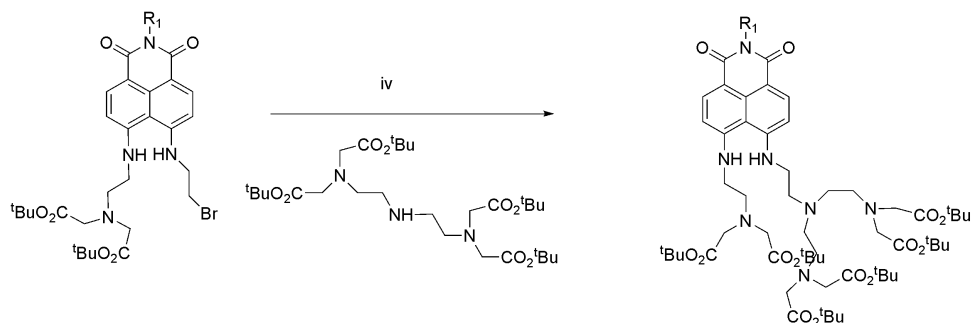
[0024] [반응식 2]



[화학식 3] [화학식 2].

상기 [화학식 3]의 화합물은 하기 [반응식 3]에 따라 아세트나이트릴하에서 하기 [화학식 4]의 화합물, 하기 [화학식 11]의 화합물 및 포타슘카보네이트의 반응에 의해 제조되는 것을 특징으로 한다;

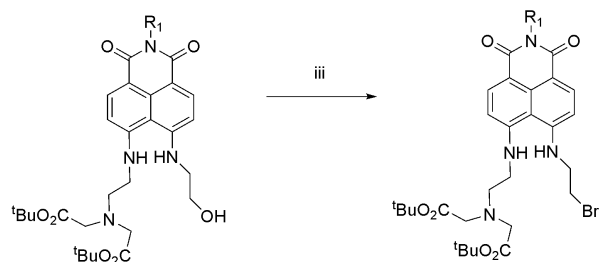
[반응식 3]



[화학식 4] [화학식 11] [화학식 3].

상기 [화학식 4]의 화합물은 하기 [반응식 4]에 따라 하기 [화학식 5]의 화합물과 트리페닐포스핀을 디클로로메탄에 용해시켜 냉각한 후 테트라브로모메탄을 첨가하여 반응함으로써 제조되는 것을 특징으로 한다;

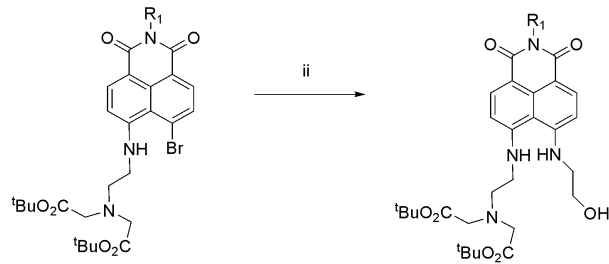
[반응식 4]



[화학식 5] [화학식 4].

상기 [화학식 5]의 화합물은 하기 [반응식 5]에 따라 하기 [화학식 6]의 화합물, 에탄올아민 및 아세트나이트릴의 반응에 의해 제조되는 것을 특징으로 한다;

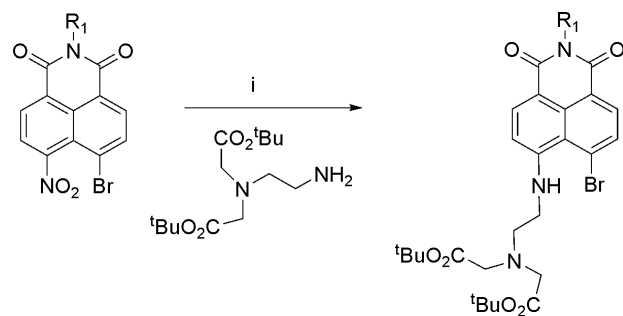
[반응식 5]



[화학식 6] [화학식 5].

상기 [화학식 6]의 화합물은 하기 [반응식 6]에 따라 하기 [화학식 7]의 화합물, [화학식 8]의 화합물 및 아세트나이트릴의 반응에 의해 제조되는 것을 특징으로 한다;

[반응식 6]



[화학식 7] [화학식 8] [화학식 6].

발명의 효과

본 발명의 이중모드 프로브는 구리 이온(Cu^{2+})이 다른 금속 이온들과 혼재되어 있는 경우에도 선택적으로 구리 이온(Cu^{2+})과 반응하여, 광학신호는 감소시키고 MR 신호는 증가시키므로 광학적 및 MRI에서 모두 측정이 가능하다. 또한, 무독성이므로 MRI 조영제로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1A는 HEPES 완충액(10 mM, pH 7.4)에서 다양한 금속 이온의 존재에 따른 [화학식 1-1] 화합물(5 μM , $\lambda_{\text{ex}}=440\text{ nm}$)의 형광 스펙트럼이다.

도 1B는 HEPES 완충액(10 mM, pH 7.4)에서 Cu^{2+} 이온(0-2500 μM)의 농도별 형광 스펙트럼이다.

도 2 HEPES 완충액(10 mM, pH 7.4)에서 다양한 금속 이온(10 당량)의 존재 하에서 Cu^{2+} 이온의 선택성을 확인한 형광 스펙트럼이다.

도 3A는 [화학식 1-1] 화합물의 다양한 농도(0-1 mM)에 따른 ^1H 이완도 그래프이다.

도 3B는 25 $^{\circ}\text{C}$ 및 60 MHz, 다양한 금속 이온(0-2mM)의 존재하에서 [화학식 1-1] 화합물(0.2 mM)에 대한 ^1H 이완도 그래프이다.

도 4는 Cu^{2+} 또는 Zn^{2+} 이온의 다양한 농도(0-1 mM)에 따른 [화학식 1-1] 화합물(0.2 mM)의 4.7 T에서 T1-weighted 팬텀 MR 이미지(위) 및 형광 팬텀 이미지(아래)이다.

도 5는 [화학식 1-1] 화합물과 임상적으로 사용되는 MRI T1 조영제로 표지된 RAW 264.7 세포주의 세포 독성 그래프이다.

도 6A는 [화학식 1-1] 화합물(12.5 μM)의 명시야(Bright-field)의 투과 이미지이다.

도 6B는 [화학식 1-1] 화합물(12.5 μM)의 형광 이미지이다.

도 6C는 RAW 264.7 세포주에서 1 당량의 Cu^{2+} 이온과 [화학식 1-1] 화합물(12.5 μM)의 명시야(Bright-field)의 전송 이미지이다.

도 6D는 RAW 264.7 세포주에서 1 당량의 Cu^{2+} 이온과 [화학식 1-1] 화합물(12.5 μM)의 형광 이미지이다($\lambda_{\text{ex}}=400-460\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=463\text{ nm}$).

도 7A는 [화학식 1-1] 화합물(12.5 μM) 및 Cu^{2+} 이온으로 표지된 RAW 264.7세포(각 1×10^7)의 T1-weighted MR 이미지에서 양성 대조이다.

도 7B는 Cu^{2+} 이온 농도에 따른 신호 강도를 나타낸 그래프이다.

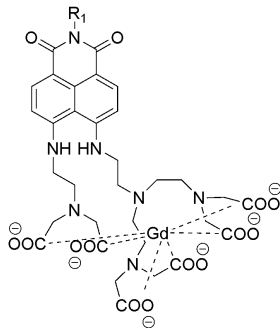
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 본 발명은 생체 내에서 구리 이온(Cu^{2+})측정이 가능한 프로브에 관한 것으로서, 광학적 및 MRI에서 모두 측정이 가능한 이중모드 프로브 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0046] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0047] 본 발명의 생체내 Cu^{2+} 검출용 이중모드 프로브는 하기 [화학식 1]로 표시된다. 상기 생체내 Cu^{2+} 검출용 이중모드 프로브는 기타경쟁적 양이온에 비하여 Cu^{2+} 의 농도를 생리학적인 광학 변화로 보여준다. 세포내 구리 이온 농도에 따라 광학 신호를 turning off 하면서, 3T에서 T1-weighted MR 신호가 증진되므로 본 발명에 따른 이중모드 프로브([화학식 1])가 세포의 구리 이온 유도된 이중 모드 영상을 위한 프로브임을 제안하고 있다.

[0048] [화학식 1]



[0049]

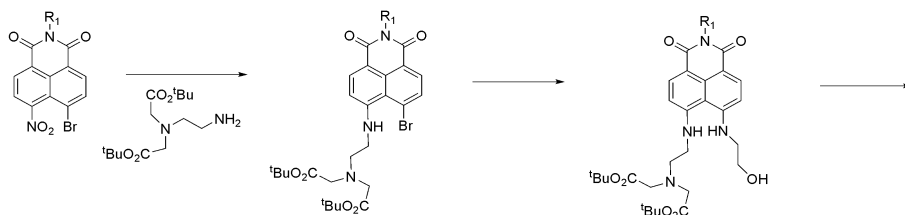
[0050] 상기 [화학식 1]에서, R_1 은 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 2 내지 30의 알릴기로 이루어진 군에서 선택된다.

[0051] 본 발명에 따른 [화학식 1]은 생체 안정성의 중요한 요소인 Gd^{3+} 착물에 대한 충분한 열역학적 안정성을 확보하기 위해서 디에틸렌트리아민 테트라아세트산(DTTA)를 포함하며, 형광 리포터로는 1,8-나트탈리미드를 포함하는 구조이다.

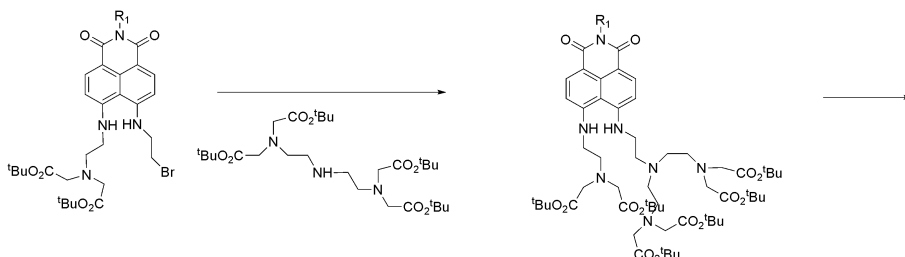
[0052] 또한, [화학식 1]은 살아있는 세포에서 구리 이온에 반응하여 MRI 양태는 강해지지만, 광학 신호는 점차 약화되는 이중모드 프로브이다. 구체적으로, [화학식 1]에 배위결합되는 물 분자의 총 수의 증가로 인하여 3T에서 T1-weighted MR 신호는 증가하고 형광 강도(광학 신호)는 구리 이온의 상자성 성질로 인하여 구리 이온의 존재하에서 약해진다. 또한, 상기 [화학식 1]의 이중모드 프로브는 세포내 유리 구리 이온에 따라 반응이 달라진다.

[0053] 상기 [화학식 1]의 화합물은 하기 [반응식 A]의 합성과정으로 합성된다.

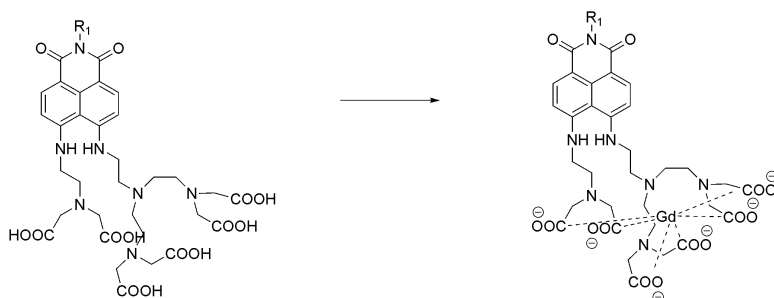
[0054] [반응식 A]



[0055] [화학식 7][화학식 8] [화학식 6] [화학식 5]



[0057] [화학식 4] [화학식 11] [화학식 3]



[0059] [화학식 2] [화학식 1]

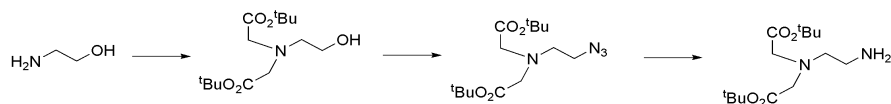
상기 이중모드 프로브인 [화학식 1]의 화합물은 [화학식 7]의 화합물과 [화학식 8]의 화합물을 아세트나이트릴 하에서 20 내지 30시간 동안 환류 교반하여 [화학식 6]의 화합물을 제조한 후, [화학식 6]의 화합물과 에탄올아민을 아세트나이트릴 하에서 20 내지 30시간 동안 환류 교반하여 [화학식 5]의 화합물을 제조한 다음, [화학식 5]의 화합물을 20 내지 30 °C에서 트리페닐포스핀(PPh₃) 및 테트라브로모메탄(CBr₄)으로 브롬화(용매: 디클로로메탄)하여 [화학식 4]의 화합물을 제조하고, 포타슘카보네이트(K₂CO₃) 및 아세트나이트릴 하에서 10 내지 30시간 동안 환류 교반함으로써 [화학식 11]의 화합물이 [화학식 4]의 화합물에 치환되어 [화학식 3]의 화합물을 제조한 후, 디클로로메탄 하에서 트리플루오로아세트산(TFA)을 첨가하여 20 내지 30 °C에서 10 내지 30시간 동안 교반하여 [화학식 3]의 tert-부틸 그룹을 제거(diprotection)함으로써 [화학식 2]의 화합물을 제조한 다음, pH 6.5의 탈이온수 하에서 [화학식 2]의 화합물을 GdCl₃·H₂O 및 탄산수소나트륨(NaHCO₃)과 20 내지 30 °C에서 3 내지 5일 동안 교반하여 [화학식 1]의 화합물을 제조하였다.

[0062] 이러한 화합물의 구조는 ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS 분석을 통하여 확인할 수 있다.

[0063] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0064] <제조실시예>

[0065] 합성에 1. [화학식 8]로 표시되는 화합물의 합성



[0066]

[0067]

[화학식 10]

[화학식 9]

[화학식 8]

[0068]

(1-1) [화학식 9]로 표시되는 화합물의 합성

[0069]

0 °C에서 에탄올아민 0.7 g, tert-부틸브로모아세테이트 5 g 및 디메틸포름아미드 50 mL을 혼합한 후 상온에서 22시간 동안 교반하여 [화학식 10]의 화합물을 제조하였다. 그 후 [화학식 10]의 화합물(3.12 g, 10.8 mmol), 소듐아자이드 (NaN₃, 2.11 g, 32.4 mmol) 및 트리페닐포스핀(PPh₃, 4.25 g, 16.2 mmol)을 디메틸포름아미드로 용해한 다음 0 °C로 냉각하여 테트라브로모메탄(CBr₄, 5.37 g, 16.2 mmol)을 첨가하고 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되면 상기 혼합물을 물 및 추출된 에틸아세테이트로 희석하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축시켰다. 농축물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피(hexanes/diethyl ether, 6:4, v/v)로 정제하여 [화학식 9]의 화합물 2.38 g(수율: 70.1%)을 얻었다.

[0070]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.48 (s, 4H); 3.41(t, 2H, J = 6.18 Hz); 2.98 (t, 2H, J = 6.18 Hz); 1.46 (s, 18H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 170.75, 84.44, 56.72, 53.65, 50.35, 28.36 ppm. ESI-MS m/z(M + Na⁺): calcd 337.37, found 337.0.

[0071]

(1-2) [화학식 8]로 표시되는 화합물의 합성

[0072]

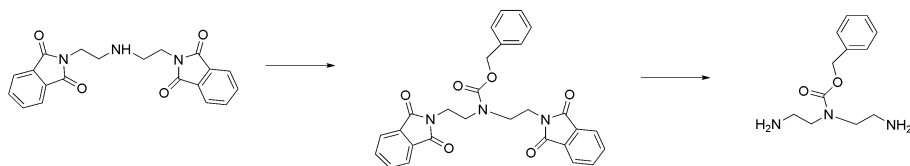
에탄올에 용해된 [화학식 9]의 화합물(2.58 g, 8.21 mmol) 용액을 질소가스로 탈기한 후 상기 용액에 팔라듐 숯(Palladium charcoal, 300 mg)을 첨가하고 수소 가스로 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되면 상기 반응물을 에탄올로 필터하고 용매를 제거하여 [화학식 8]의 화합물 1.87 g(수율: 78.8%)을 얻었다.

[0073]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.41 (m, 2H); 6.74 (t, 2H, J = 8.76 Hz); 4.13 (t, 2H, J = 7.41 Hz); 3.80 (m, 2H, J = 6.03 Hz); 3.45 (s, 4H); 3.28 (m, 2H); 3.12 (t, 2H, J = 6.03 Hz); 1.69 (m, 2H); 1.43 (s, 18H); 1.25 (m, 2H); 0.96 (t, 3H, J = 7.23 Hz). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 171.52, 81.78, 57.16, 51.72, 46.30 ppm. ESI-MS m/z (M +): calcd 288.38, found 288.9.

[0074]

합성에 2. [화학식 11]로 표시되는 화합물의 합성



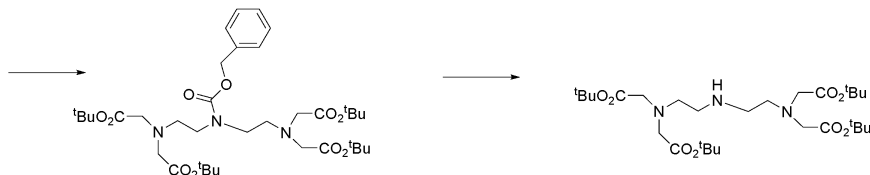
[0075]

[0076]

[화학식 15]

[화학식 14]

[화학식 13]



[0077]

[0078]

[화학식 12]

[화학식 11]

[0079]

(2-1) [화학식 14]로 표시되는 화합물의 합성

[0080]

[화학식 15]의 화합물(9.21g, 25.2 mmol)을 0 °C에서 교반하면서 80 mL의 디클로로메탄을 첨가하여 슬러리화 한

후 4-디메틸아미노피리딘(1.25g, 10.2 mmol) 및 디이소프로필에틸아민(4.85g, 37.5 mmol)을 첨가하여 슬러리를 제조하였다. 벤질클로로포메이트(5.12g, 30.0 mmol)를 30 mL의 디클로로메탄으로 용해시켜 상기 슬러리에 10분 동안 적가한 후 반응을 종료하였다. 상기 혼합액을 18시간 동안 교반시킨 다음 산성수(1M HCl로 pH 4 조정)(3 x 75 mL), 포화된 중탄산나트륨(1 x 75 mL)로 수회 세척한 후 마지막으로 초순수(1 x 75 mL)로 세척하였다. 상기 세척된 유기물을 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축하여 회백색 고체를 얻었으며, 상기 고체를 무수 디에틸에테르에서 슬러리화 시키고 필터한 후 200 mL의 에테르로 세척한 다음 회수하고 건조하여 [화합식 14]의 화합물 7.22 g(수율: 57.5%)을 얻었다.

[0081] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 3.62 (t, 4H), 3.91 (dt, 4H), 4.84 (s, 2H), 7.19 (d, 2H), 7.30 (m, 3H), 7.64 - 7.83 (m, 8H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 35.7, 45.8, 67.3, 123.3, 127.6, 127.7, 128.3, 131.8, 134.0, 136.2, 156.1, 168.2. ES-MS 양이온 모드: calculated m/z 520.148, [[화합식 14] + H^+]. Found m/z : 520.127.

[0082] (2-2) [화합식 13]으로 표시되는 화합물의 합성

[0083] [화합식 14]의 화합물(7.22g, 14.5 mmol)을 25 mL의 아세트나이트릴로 슬러리화한 후 히드라진 수화물(5.80g, 116 mmol)을 첨가하여 10분 동안 교반함으로써 반응을 종결하였다. 다음으로 혼합액을 4시간 동안 교반하여 침전물을 형성하고 24시간 반응을 수행하여 TLC를 통해 결정된 바와 같이 완료하였다. 상기 백색 침전물을 필터하고 아세트나이트릴로 세척하였다. 세척과 건조로 [화합식 13]의 화합물 3.20 g(수율: 95.1%)을 얻었다.

[0084] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 1.93 (bs, 4H), 2.91 (s, 4H), 3.38 (s, 4h), 5.13 (s, 2H), 7.37 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 38.4, 53.1, 67.3, 127.1, 127.6, 130.0, 136.1, 152.1. ES-MS 양이온 모드: calculated m/z 238.156, [[화합식 13] + H^+]. Found m/z : 238.120.

[0085] (2-3) [화합식 12]로 표시되는 화합물의 합성

[0086] [화합식 13]의 화합물(3.20g, 13.5 mmol)을 중탄산칼륨(7.02g, 70.1 mmol)이 함유된 22 mL의 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시켜 상온에서 교반한 후 tert-부틸브로모아세테이트(13.7g, 70.1 mmol)를 첨가하여 상온에서 48시간 동안 교반한 다음 추가로 60 °C에서 2시간 교반하였다. 상기 혼합액을 각각 50 mL의 디에틸에테르 및 포화된 중탄산나트륨으로 분리하고 5분 동안 교반하여 에테르층을 초순수로 세척하고(2 x 50 mL) 무수 황산나트륨으로 건조하며 농축하여 밝은 노란색 오일을 제조하였다. 상기 오일을 실리카겔 컬럼크로마토그래피($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 1:9 v/v)로 정제하여 [화합식 12]의 화합물 5.48g(수율: 58.5%)을 얻었다.

[0087] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 1.46 (s, 36H), 2.88 (m, 4H), 3.40 (s, 8H), 3.47 (m, 4H), 5.12 (s, 2H), 7.36 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 28.2, 46.5, 52.7, 56.1, 67.0, 80.9, 127.8, 127.9, 128.5, 137.1, 156.0, 170.6. ES-MS 양이온 모드: calculated m/z 694.428, [[화합식 12] + H^+]. Found m/z : 694.448.

[0088] (2-4) [화합식 11]로 표시되는 화합물의 합성

[0089] 용해된 O_2 (g)를 제거하기 위해 25 mL의 메탄올에 용해된 [화합식 12]의 화합물(3.34g, 4.8 mmol)을 함유한 50 mL 둥근바닥 플라스크를 Ar (g)으로 퍼지하고, Cbz그룹을 제거하기 위해 촉매(334 mg의 Pd/C)를 플라스크에 첨가하고 Ar (g)으로 다시 퍼지한다. 다음으로 H_2 (g)가 함유된 풍선에 장착된 실린지를 상온에서 혼합액에 통과시켜 버블을 발생시키고 12시간 동안 교반하였다. 상기 혼합액에서 촉매를 제거하기 위해 셀라이트로 필터하고 건조하여 [화합식 11]의 화합물 2.43g(수율: 90%)을 얻었다.

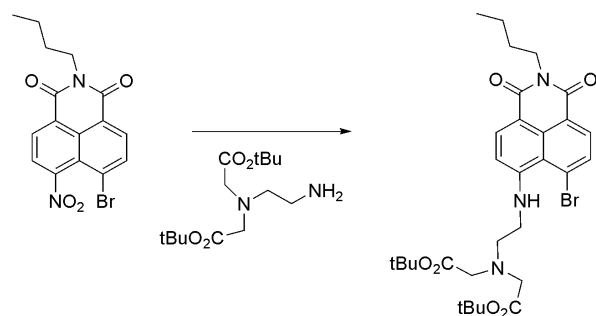
[0090] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 1.47 (s, 36H), 2.68 (t, 4H), 2.87 (t, 4H), 3.45 (s, 8H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 28.0, 47.9, 54.3, 56.3, 80.8, 170.8. ES-MS 양이온 모드: calculated m/z 560.390, [[화합식 11] + H^+]. Found m/z : 560.394.

<실시예>

합성예 3. [화학식 1-1]로 표시되는 화합물의 합성

(3-1) [화학식 6-1]로 표시되는 화합물의 합성

[반응식 7]



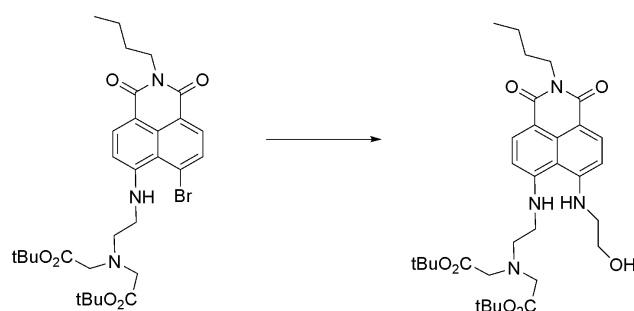
[화학식 7-1] [화학식 8] [화학식 6-1]

[화학식 7-1]의 화합물(500 mg, 1.33 mmol) 및 [화학식 8]의 화합물(345 mg, 1.20 mmol)을 아세트나이트릴(20 mL)에 용해시킨 후 24시간 동안 환류 교반하였다. 반응이 완료되면 혼합물을 물 및 추출된 에틸아세테이트로 희석하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축시켰다. 농축물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피(hexanes/ethyl acetate, 7:3, v/v)로 정제하여 [화학식 6-1]의 화합물 148 mg(수율: 18.0%)을 얻었다.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.47 (d, J = 8.64 Hz, 1H); 8.32 (d, J = 8.00 Hz, 1H); 7.82 (d, J = 8.00 Hz, 1H); 9.71 (d, J = 8.76 Hz, 1H); 4.15 (t, J = 7.45 Hz, 2H); 3.53 (s, 4H); 3.40 (br, 2H); 3.24 (t, J = 6.24 Hz, 2H); 1.69 (m, 2H); 1.44 (s, 20H); 0.98 (t, J = 7.32 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 170.32, 164.48, 164.02, 155.16, 150.85, 135.15, 132.74, 131.98, 131.35, 125.56, 122.56, 118.32, 109.86, 107.68, 106.29, 81.62, 55.36, 41.82, 40.28, 30.40, 29.92, 29.37, 20.64, 14.10 ppm. ESI-MS m/z ($M + \text{Na}^+$): calcd 640.33, found 640.35.

(3-2) [화학식 5-1]로 표시되는 화합물의 합성

[반응식 8]



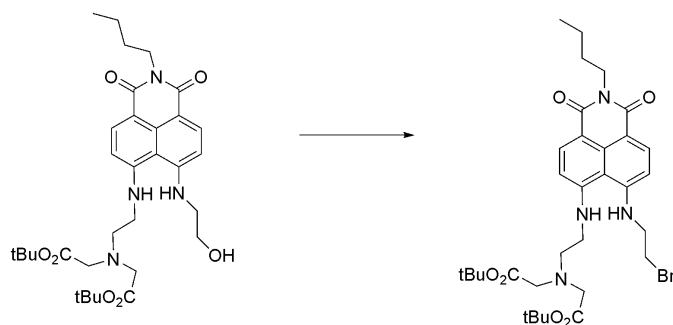
[화학식 6-1] [화학식 5-1]

[화학식 6-1]의 화합물(400 mg, 0.65 mmol)과 에탄올아민(1.0 g, 16.4 mmol)을 아세트나이트릴(20 mL)에 용해시킨 후 24시간 동안 환류 교반하였다. 반응이 완료되면 혼합물을 물 및 추출된 에틸아세테이트로 희석하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축시켰다. 농축물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피(hexanes/ethyl acetate, 1:1, v/v)로 정제하여 [화학식 5-1]의 화합물 260 mg(수율: 66.8%)을 얻었다.

[0104] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.27(m, 2H); 6.65 (d, J = 8.52 Hz, 1H); 6.52 (d, J = 8.52 Hz, 1H); 4.13 (t, J = 7.28 Hz, 2H); 3.97 (br, 2H); 3.48 (s, 4H); 3.44 (br, 2H); 3.19 (br, 2H); 3.16 (br, 2H); 1.67 (m, 2H); 1.39 (s, 20H); 0.97 (t, J = 7.28 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 171.17, 164.78, 152.85, 152.48, 133.67, 132.29, 111.17, 111.10, 110.83, 106.22, 106.09, 82.06, 60.29, 56.52, 46.50, 41.74, 39.86, 30.52, 29.86, 28.21, 20.65, 14.14 ppm. ESI-MS m/z ($M - H^+$): calcd 597.73, found 597.41.

[0105] (3-3) [화학식 4-1]로 표시되는 화합물의 합성

[0106] [반응식 9]



[0107]

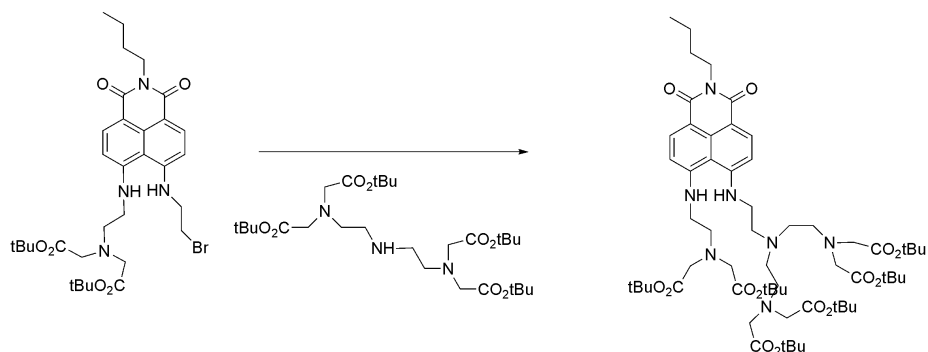
[0108] [화학식 5-1] [화학식 4-1]

[0109] [화학식 5-1]의 화합물(130 mg, 0.22 mmol)과 트리페닐포스핀(PPh_3 , 109 mg, 0.33 mmol)을 디클로로메탄에 용해시킨 후 0 $^{\circ}\text{C}$ 로 냉각한 다음 테트라브로모메탄(CBr_4 , 87 mg, 0.33 mmol)을 나누어 첨가하여 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 물 및 추출된 에틸아세테이트로 희석하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축시켰다. 농축물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피(hexanes/ethyl acetate, 3:2, v/v)로 정제하여 [화학식 4-1]의 화합물 130 mg(수율: 90.9%)을 얻었다.

[0110] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.41 (m, 2H); 6.74 (t, J = 8.76 Hz, 2H); 4.13 (t, J = 7.41 Hz, 2H); 3.80 (m, J = 6.03 Hz, 2H); 3.45 (s, 4H); 3.28 (m, 2H); 3.12 (t, J = 6.03 Hz, 2H); 1.69 (m, 2H); 1.43 (s, 18H); 1.25 (m, 2H); 0.96 (t, J = 7.23 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 170.71, 164.66, 164.62, 152.30, 151.59, 133.77, 133.60, 132.52, 111.89, 111.63, 111.08, 106.69, 105.81, 81.60, 56.12, 52.06, 45.50, 41.74, 39.86, 30.53, 30.38, 28.32, 20.66, 14.15 ppm. ESI-MS m/z (M^+): calcd 661.67, found 661.41.

[0111] (3-4) [화학식 3-1]로 표시되는 화합물의 합성

[0112] [반응식 10]



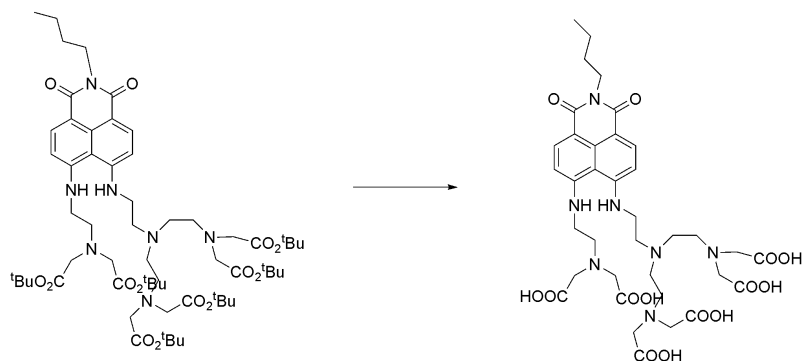
[0113] [화학식 4-1] [화학식 11] [화학식 3-1]

[0115] [화학식 4-1]의 화합물(380 mg, 0.57 mmol), [화학식 11]의 화합물(287 mg, 0.51 mmol) 및 포타슘카보네이트(K_2CO_3 , 236 mg, 1.71 mmol)를 아세트나이트릴에 용해시킨 후 12시간 동안 환류 교반하였다. 반응이 종결되면 혼합물을 필터하고 농축한 다음 실리카겔 컬럼크로마토그래피(5 % methanol in DCM)로 정제하여 [화학식 3-1]의 화합물 150 mg(수율: 22.8%)을 얻었다.

[0116] 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.43 (m, 1H); 6.72 (m, 3H); 4.13 (t, J = 7.41 Hz, 2H); 3.41 (m, 15H); 3.11 (m, 3H); 2.74 (m, 10H); 1.61 (m, 2H); 1.41 (m, 56 H); 0.93 (t, J = 4.13 Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 170.85, 170.74, 170.72, 164.96, 164.87, 152.96, 152.76, 133.96, 133.66, 132.65, 111.85, 111.38, 107.13, 106.64, 81.59, 81.15, 56.40, 53.16, 53.10, 52.48, 52.25, 52.24, 52.25, 42.58, 42.56, 39.90, 30.57, 30.57, 29.69, 28.39, 26.33, 20.08, 14.13 ppm. ESI-MS m/z ($M + H^+$): calcd 1140.71, found 1140.716; m/z ($M + Na^+$): calcd 1162.70, found 1162.69.

[0117] (3-5) [화학식 2-1]로 표시되는 화합물의 합성

[0118] [반응식 11]



[0119] [화학식 3-1] [화학식 2-1]

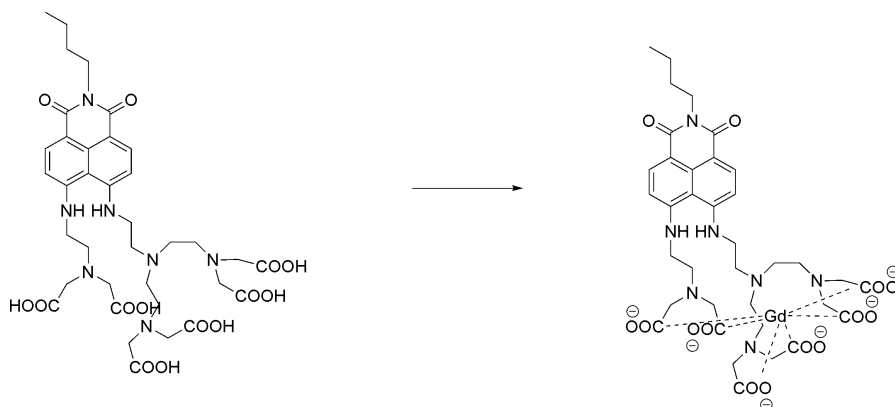
[0121] 디클로로메탄(DCM)에 용해된 [화학식 3-1]의 화합물(150 mg, 0.13 mmol)에 트리플루오로아세트산(TFA, 1.5 mL)을 0 °C에서 첨가한 후 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 상기 반응용매를 감압하에서 제거하고 디에틸에테르로 분말화한 후 분말을 증류수로 용해하고 필터한 다음 동결건조로 2일 동안 건조하여 [화학식 2-1]의 화합물 50 mg (수율: 47.7%)을 얻었다.

[0122] 1H -NMR (300 MHz, D_2O): δ 8.14 (m, 2H); 6.53 (m, 2H); 3.87 (m, 3H); 3.43-2.07 (m, 28H); 1.51 (m, 2H); 0.67 (m, 5H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 172.21, 161.87, 161.56, 152.56, 152.23, 131.23, 130.63,

129.73, 128.61, 112.71, 111.21, 110.03, 109.57, 102.23, 101.12, 61.37, 60.03, 57.72, 48.23, 48.12, 43.01, 34.51, 29.38, 29.21, 26.81, 14.78 ppm. ESIMS m/z (M^+): calcd 803.33, found 803.22; m/z ($M + 5H^+$): calcd 808.37, found 808.44.

[0123] (3-6) [화학식 1-1]로 표시되는 화합물의 합성

[0124] [반응식 12]



[0125]

[0126] [화학식 2-1] [화학식 1-1]

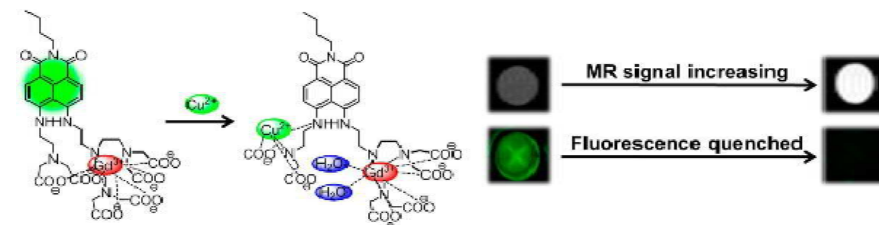
[0127] [화학식 2-1]의 화합물(50 mg, 0.062 mmol)을 5 mL의 이온교환수에 용해시키고 이온교환수(2 mL)에 용해된 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (gadolinium(III) chloride hexahydrate, 21 mg, 0.056 mmol)를 천천히 첨가한 후 탄산수소나트륨($NaHCO_3$)을 나누어 첨가하여 pH 6.5를 유지하고 5일 동안 교반하였다. 그 후 pH 7-8을 유지하기 위하여 탄산수소나트륨($NaHCO_3$)을 첨가하고 여과하며 미반응 Gd^{3+} 은 $Gd(OH)_3$ 로 침전시킨 다음 2일 동안 동결건조하여 [화학식 1-1]의 화합물 50 mg (수율: 92.8 %)을 얻었다.

[0128] ESI-MS m/z ($M + H_2O$): $^{155}Gd_{64}$: calcd 970.35, found 970.538; ($M + H_2O$; $^{156}Gd_{64}$): found 971.43; ($M + H_2O$; $^{157}Gd_{64}$): found 972.521.

[0129] 시험예.

[0130] 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 [화학식 1-1]의 화합물은 하기 [반응식 13]에서 보는 바와 같이, 구리 이온에 반응하여 [화학식 1-1]에 배위결합되는 물 분자의 총 수의 증가로 인하여 3T에서 T1-weighted MR 신호는 증가하고 형광 강도(광학 신호)는 구리 이온의 상자성 성질로 인하여 구리 이온의 존재하에서 약해진다.

[0131] [반응식 13]



[0132]

[0133] [화학식 1-1]

[0134] 다양한 금속 이온에 대해 [화학식 1-1]의 화합물의 킬레이트 능력을 증명하기 위하여, 구리 이온(Cu^{2+})을 포함하는 다양한 금속 이온의 존재하에서 [화학식 1-1]의 화합물의 형광변화를 관찰하였다(도 1A).

- [0135] [화학식 1-1] 화합물의 형광은 구리 이온의 상자성 성질 때문에 선택적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 형광 변화는 Zn^{2+} 이온을 제외한 금속 이온들에서 관찰되지 않았다. 상기 Zn^{2+} 이온이 [화학식 1-1] 화합물 용액에 첨가될 때, 형광 강도는 킬레이트 향상된 형광(CHEF)효과 때문에 구리 이온과 반대로 강화된다.
- [0136] 구리 이온 적정실험에서, 구리 이온에 대한 [화학식 1-1] 화합물의 결합상수는 HEPES 완충액 1:1 화학량론에 기초한 $9.30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 로 계산되었다(도 1B).
- [0137] 또한, 수성환경에서(aqueous milieu) Li^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , 및 Mg^{2+} 와 같은 다른 간섭 양이온의 존재하에서 [화학식 1-1] 화합물에 대한 Cu^{2+} 이온의 선택도를 시험한 결과, 형광 변화가 Zn^{2+} 이온을 포함하는 다른 금속 이온에 의해 바뀌지 않는 것을 확인하였다(도 2). 구체적으로, 붉은색 막대는 다양한 금속 이온(Li^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+})의 첨가시 [화학식 1-1] 화합물의 발광 강도를 나타낸 것이고, 검정색 막대는 다양한 금속 이온을 첨가한 후 Cu^{2+} 이온하에서의 발광 강도를 나타낸 것인데, Cu^{2+} 이온하에서는 발광강도가 낮아지는 것을 알 수 있다. 이는 다른 이온보다는 Cu^{2+} 이온과 [화학식 1-1] 화합물의 카르복실 그룹이 강하게 결합함으로써 Cu^{2+} 이온에 대해 높은 선택성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0138] 또한, [화학식 1-1] 화합물의 종 이완성(longitudinal relaxivity)을 조절하는 Cu^{2+} 이온의 능력은 60 MHz의 양성자(proton) 주파수에서 T_1 측정에 의해 결정된다(pH 7.4, HEPES buffer, at 37 °C)(도 3A, 도 3B). Cu^{2+} 이온이 없는 상태에서 [화학식 1-1] 화합물의 T_1 이완성은 $2.01 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이고, 2 당량의 Cu^{2+} 이온의 존재하에서는 $4.01 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 에 이르므로 Cu^{2+} 이온으로 조절되는 것으로 확인되었다. 이러한 2배 이상의 증가는 Cu^{2+} 이온에 대해 이전에 보고된 조영제에 비해 상당히 높은 것이다. 대조적으로, Zn^{2+} 이온에 대한 [화학식 1-1] 화합물의 이완성은 점차 감소한다.
- [0139] 생물학적으로 관련된 금속 이온에 대하여 Cu^{2+} 이온에 대한 [화학식 1-1] 화합물의 선택적 정량화를 위해, Gd^{3+} 이온에 배워된 물(water coordinated)의 양성자 이완도(relaxation rate, R_1)를 측정하였다(도 3B). 이완도는 농도에 따른 Cu^{2+} 이온에 대해 증가된다. 그러나 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , 및 Zn^{2+} 이온과 같은 다른 생물학적으로 관련된 금속 이온에서의 이완도는 그들의 변수 농도가 유지된다. 이는 [화학식 1-1] 화합물의 MR 신호가 Cu^{2+} 이온에 의해 선택적으로 향상되었다는 것을 확인한 것이다.
- [0140] 상기 [화학식 1-1] 화합물의 향상된 이완도 및 증가된 해상도에 대한 가능성을 직접적으로 가시화하기 위하여, MR 팬텀(phantom)은 [화학식 1-1] 화합물의 고정 농도에서 Cu^{2+} 이온의 농도를 증가시켜 4.7 T MRI 시스템(Bruker)을 사용하여 이미지화하였다(도 4). 상기 MR 팬텀 이미지는 Cu^{2+} 이온 농도의 증가에 의해 점차 밝아지지만, Zn^{2+} 이온의 경우는 그대로 유지된다.
- [0141] 따라서 [화학식 1-1] 화합물은 세포에서 해리된 Cu^{2+} 이온을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0142] -세포 독성 분석
- [0143] 세포 독성 분석은 [화학식 1-1]를 세포 안에 넣었을 때 세포가 얼마나 살아 있는지를 통해서 [화학식 1-1]의 독성이 있는지를 분석한다. Cu^{2+} 이온에 민감한 MRI/FI 세포 이미지 프로브인 [화학식 1-1] 화합물을 설명하기 위하여, 쥐의 대식 세포주(RAW 264.7)를 사용하여 생체적합성을 분석하였다.
- [0144] 도 5에 도시된 바와 같이, [화학식 1-1] 화합물로 처리된 세포주의 세포 생존율을 Gd^{3+} 이온의 100 μM 농도까지 통상 사용되는 Omniscan[®]와 비교하였다.
- [0145] 도 6에 나타난 바와 같이, 푸른 빛(400-460 nm)으로 여기된 60X 대물렌즈를 구비한 멀티프로톤(multiphoton) 공초점 레이저 주사 현미경 시스템(LSM510-Meta NLO, Karl Zeiss, Germany)을 기초로 한 형광 이미지를 획득한다. 12시간 동안 상온에서 [화학식 1-1] 화합물 12.5 μM 로 RAW 264.7 세포를 표지한 결과, 명백한 세포

내 녹색 형광을 확인하였으며(도 6B), 상기 [화학식 1-1] 화합물($12.5 \mu\text{M}$)로 표지된 세포를 1시간 동안 배양 배지에 있는 1 당량의 Cu^{2+} 이온으로 배양하고 세척될 때 형광 강도의 명백한 감소가 확인되었다(도 6D).

[0146] 이 결과는 살아있는 세포에 [화학식 1-1] 화합물이 스며들어 그들 내에서 Cu^{2+} 이온을 검출할 수 있다는 것을 의미한다.

[0147] 수용액에서, [화학식 1-1] 화합물은 세포환경에서 Cu^{2+} 이온이 유도된 턴-온(turn-on)의 MR 신호 변화 및 감소된 광학 변화를 보인다.

[0148] MRI에서 [화학식 1-1] 화합물의 가능한 응용을 입증하기 위하여, 3T 인간 MRI 스캐너를 이용하여 [화학식 1-1] 화합물로 표지된 RAW 264.7 세포 및 변동이 심한 Cu^{2+} 이온 농도의 T1-weighted MR 이미지를 검사하였다.

[0149] 도 7에 도시된 바와 같이, 마이크로 몰(μM) 수준으로 Cu^{2+} 이온 농도가 점차 상승하면서 대비가 뚜렷해진다. 구체적으로 도 7B에 도시된 바와 같이, MR 신호 강도는 Cu^{2+} 이온 농도로 증가한다.

[0150] 도 7A는 [화학식 1-1] 화합물($12.5 \mu\text{M}$) 및 Cu^{2+} 이온으로 표지된 RAW 264.7세포(각 1×10^7)의 T1-weighted MR 이미지에서 양성 대조로서, [화학식 1-1] 화합물로 표지된 세포는 1시간 동안 배지에서 가변적인(변동이 심한) Cu^{2+} 이온 농도로 배양되고 세척되며, 3 T 인간 MRI 스캐너는 TE/TR=13/200 ms로 사용된다.

[0151] 대뇌 유체에서 구리 이온의 농도는 마이크로 몰 수준에 속한다. 따라서 [화학식 1-1] 화합물은 특정 기관의 구리 저장고를 검출할 수 있다.

[0152] -측정 장비

[0153] 컬럼 크로마토그래피는 고정성으로서 실리카 겔 60(70-230 mesh)을 사용하여 실시하였으며, 분석용 박층 크로마토그래피(TLC)는 실리카 겔 60(두께 0.25 mm)을 사용하여 실시하였다.

[0154] 질량 스펙트럼(mass spectra)은 IonSpecHiResESI 질량 스펙트로미터로 수집할 수 있으며, NMR 스펙트럼은 300 및 400 MHz 스펙트로미터(AS300, AS400, Agilent, USA)로 수집할 수 있다.

[0155] -형광 측정

[0156] 모든 형광 및 UV/Vis 흡수 스펙트럼은 각각 RF-5301PC 및 S-3100 분광 광도계에 기록된다.

[0157] 금속 염화물의 스톡용액(0.01 M)은 탈이온수로 제조되며, [화학식 1-1] 화합물의 스톡용액은 HEPES 완충액(pH 7.4) 10 mM로 제조된다.

[0158] 여기(Excitation)는 여기 슬릿 폭이 방출 3 nm인 1.5로 440 nm에서 수행되고, 형광 및 적정 실험은 HEPES 완충액에서 [화학식 1-1] 화합물 $5 \mu\text{M}$ 용액, 및 탈이온수로 $50 \mu\text{M}$ 의 다양한 금속 이온 또는 CuCl_2 의 다양한 농도로 수행된다. 각 CuCl_2 용액의 농도는 변화되었지만, 총 부피는 4.0 mL로 고정된다.

[0159] -이완도 측정

[0160] [화학식 1-1] 화합물의 완충 수용액의 종 이완시간(T_1)은 60 MHz에서 자동화(mq60; Bruker, Germany)로 minispec bench-top 시스템에 표준 반전-복구 펄스 시퀀스로 측정된다. 각 경우에, 다섯 샘플은 농도가 20 mM HEPES 완충액(pH 7.2)으로 25 °C에서 0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5 mM Gd^{3+} 인 것을 따로 준비하였다.

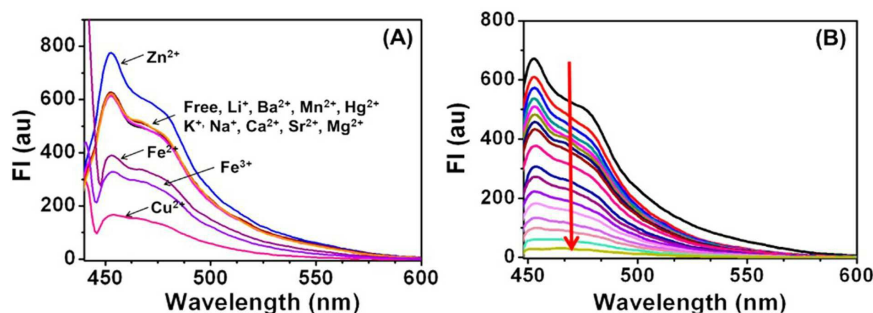
[0161] -다양한 금속 이온하에서 T_1 이완성 및 형광변화

[0162] [화학식 1-1] 화합물의 종 이완성을 조절하는 금속 이온(Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+)의 능력은 60 MHz에서 자동화(mq60; Bruker, Germany)로 minispec bench-top 시스템에 표준 반전-복구 펄스 시퀀스로 T_1 을 측정하고, MR 이미지는 하기와 같은 매개변수로 4.7 T 동물 MRI 시스템(Biospec 47/40; Bruker)에 스핀에코시퀀스(spin echo sequence)로 얻었다; TE/TR= 8/350 ms, $\theta = 90^\circ$, field of view = $50 \times 30 \text{ mm}^2$, scan matrix = 256×256 , reconstructed matrix = 256×256 , slice thickness = 1 mm, number of acquisition = 4.

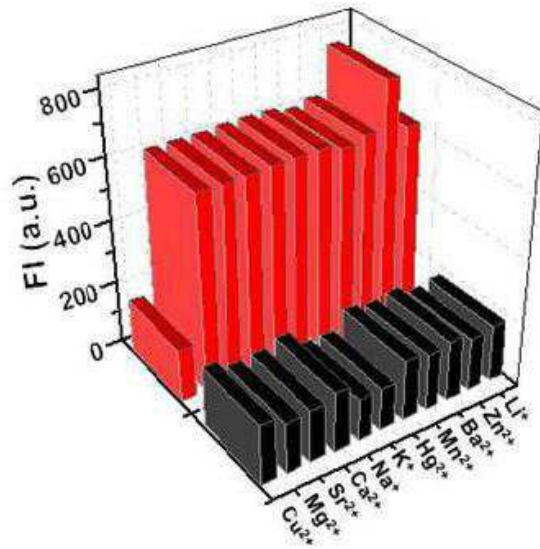
- [0163] Cu^{2+} 또는 Zn^{2+} 이온을 추가한 후 형광 이미지는 형광 이미지 시스템(Maestro II, CRi, USA) (ex/em = 500/540 nm)으로 얻었으며, 평균 강도는 전용 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.
- [0164] -표지된 세포의 형광 현미경 및 MR 이미지
- [0165] 형광 이미지는 푸른빛(400-460 nm)으로 여기된 $60\times$ 대물렌즈로 멀티-프로톤 공초점 레이저 주사현미경 시스템(multi-proton confocal laser scanning microscope system, LSM510-Meta NLO, Karl zeiss)으로 얻었다.
- [0166] 모든 이미지에 대해, 밝기, 콘트라스트 및 노출시간과 같은 현미경 설정은 세포의 Cu^{2+} 이온의 존재 및 부재하에서 상대 형광강도를 비교하여 일정하게 유지한다.
- [0167] Raw 264.7 세포는 10% 치명적 소혈청(FBS)(Invitrogen)으로 보충된 DMEM배지로 37°C 에서 배양하였다. 세포는 24-웰 평평한 바닥 접시에 씨드(seed)된다. 24시간 후, Raw 264.7세포는 37°C 에서 12시간 동안 [화학식 1-1] 화합물(배지 내) 0, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5 μM 농도로 배양되고, PBS로 3회 세척된다. 세포는 30분 동안 12.5 μM 의 [화학식 1-1] 화합물 및 1시간 동안 12.5 μM Cu^{2+} 로 배양되고 PBS로 3회 세척된다.
- [0168] 상기 Raw 264.7세포는 공초점 현미경(confocal microscope)으로 형광 이미지되었다.
- [0169] MRI는 전용 15 cm 수신전용 RF 코일(Sense 8-ch knee coil, Philips)을 사용하여 3 T 임상 MR 스캐너(Achieva; Philips, Netherlands)로 수행된다. 스핀에코이미지는 TE/TR = 13/200 ms, flip angle = 90° , field of view = $100\times 100\text{ mm}^2$, scan matrix = 256×256 , reconstructed matrix = 256×256 , slice thickness = 1 mm, number of acquisition = 2로 획득한다.
- [0170] -세포 독성 분석
- [0171] 임상적으로 사용된 Omniscan(Gd-DTPA-BMA, Amersham, USA)에 비하여 [화학식 1-1] 화합물에 대한 세포 독성 분석은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 사용하여 실시한다. [화학식 1-1] 화합물의 효과를 시험하기 위하여, 세포는 96 웰 플레이트에 1×10^4 cells/well로 씨드(seed)되었다.
- [0172] 실험에 대한 적절한 처리 후, 세포는 37°C 에서 24시간 동안 배양되고, 다음으로 미디어(media)가 제거된다. MTT용액(0.05 mg/mL)은 각 웰에 첨가되고, 포르마잔 결정을 형성하도록 37°C 에서 2시간 동안 배양된다. 상기 용액은 제거되고, 100 μL DMSO이 결정을 용해하기 위하여 각 웰당 첨가된다. 결정의 양은 마이크로플레이트 리더(VERSAMAX, Molecular Devices)를 사용하여 570 nm 흡광도에 기초하여 측정된다.

도면

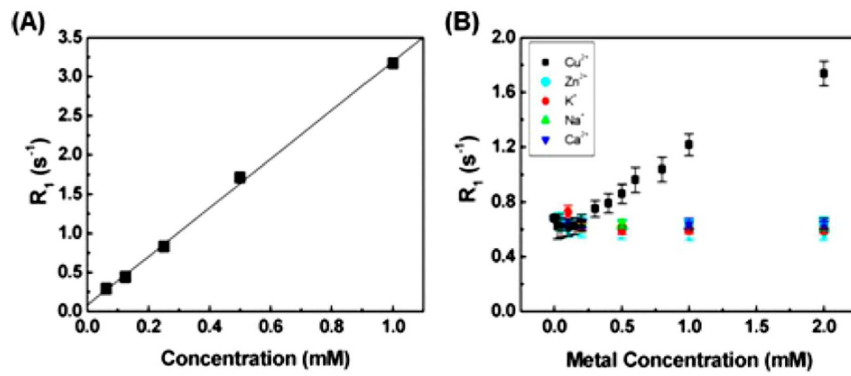
도면1



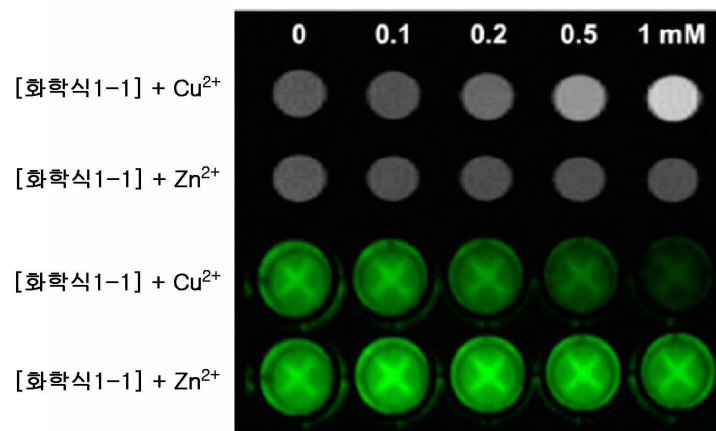
도면2



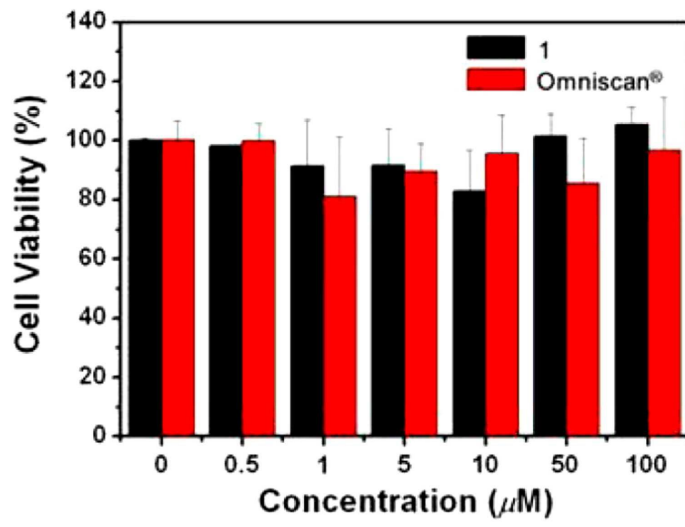
도면3



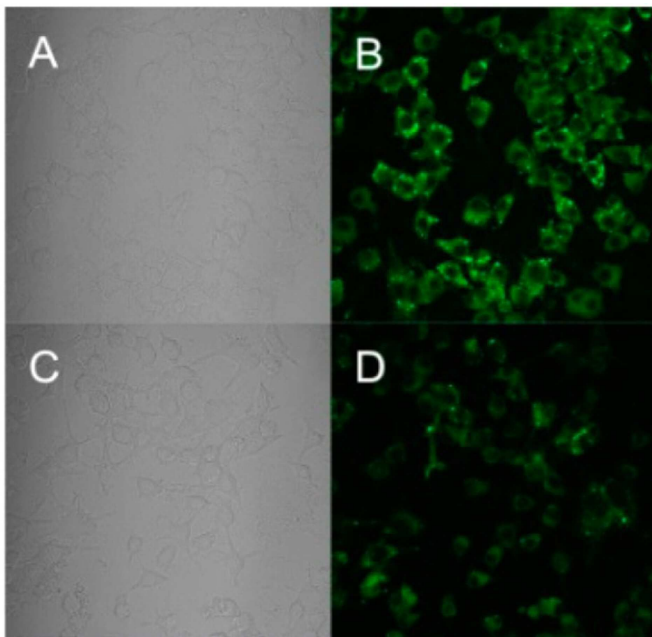
도면4



도면5



도면6



도면7

