



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0060103
(43) 공개일자 2018년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 69/76 (2006.01) C07C 67/32 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 69/76 (2013.01)
C07C 67/32 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0159208
(22) 출원일자 2016년11월28일
심사청구일자 2016년11월28일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 서빙고동 이촌로 347 신동아아파트 2동 501호
유지환
서울특별시 서대문구 연세로 50-1 에비슨의생명연구센터
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

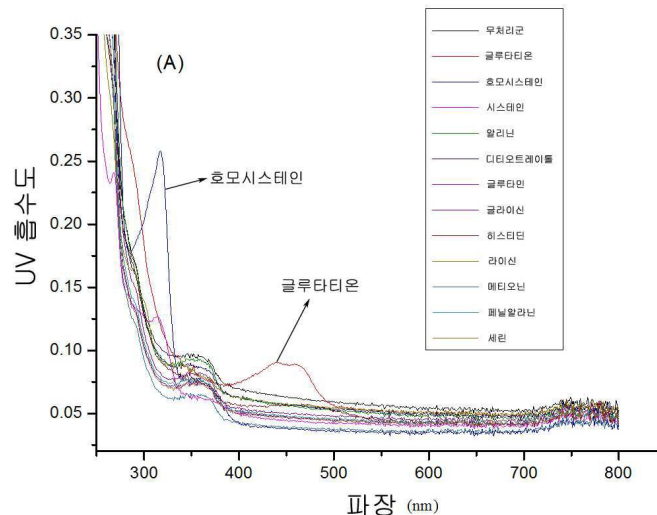
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서 및 이를 사용하는 패혈증의 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서 및 이를 사용하는 패혈증의 진단 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 나프탈렌 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 호모시스테인 또는 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 중에서, 또는 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온의 농도 변화를 유발하는 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/6815 (2013.01)

G01N 2800/26 (2013.01)

(72) 발명자

정경수

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 의과대학 내과학교실 301-11호

리준

서울특별시 서대문구 대현동 이화여대길 52 이화여자대학교 종합과학관 D동 501호

권영희

경기도 수원시 권선구 동수원로 146번길 70-7

이다영

서울특별시 서대문구 봉원사길 41-7, 110호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A3A2048814

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원 유기소재 연구

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9D5A01952415

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료기술개발사업-국가마우스표현형 분석사업

연구과제명 호흡기 질환 마우스 표현형 분석 기반 구축 및 병인 유전자 기능 규명

기 여 율 50/100

주관기관 연세대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2019.10.30

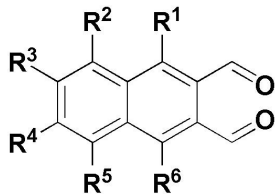
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H, -OH, -SH, -NO₂, -CN, 할로젠, -NR⁷R⁸, -(C=O)R⁹, -(C=O)NR⁹, -(C=O)OR⁹ 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₁₀ 알킬 또는 알콕시이고, 여기서, R^7 , R^8 및 R^9 은 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₃ 알킬이고,

또한, R^3 , R^4 및 R^5 는 이들이 결합된 탄소원자와 함께 N, O 및 S를 포함하는 10중 고리의 헤테로 사이클로 알킬을 형성할 수 있다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H, -F, -Cl, -Br, -I 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₅ 알킬 또는 알콕시인 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^6 는 -H이고,

R^4 는 -H, -F, 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₃ 알콕시인 화합물.

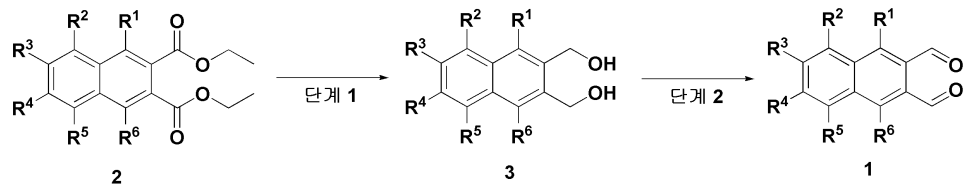
청구항 4

하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

화학식 2로 표시되는 화합물을 환원시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 제조된 화학식 3으로 표시되는 화합물을 산화시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 및 R^6 는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

청구항 5

제1항의 화합물을 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 싸이올기 함유 아미노산은 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서.

청구항 7

제5항의 화학센서와 검체를 접촉시켜 검체 내의 싸이올기 함유 아미노산을 검출하는 단계를 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 싸이올기 함유 아미노산은 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 싸이올기 함유 아미노산 검출방법.

청구항 9

제1항의 화합물을 포함하는 패혈증 진단용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 진단용 조성물은 호모시스테인 농도의 변화를 검출하는 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 진단용 조성물은 글루타티온 농도의 변화를 검출하는 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.

청구항 12

제9항의 진단용 조성물과 동물로부터 분리된 검체를 접촉시키는 단계를 포함하는 패혈증의 진단방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서 및 이를 사용하는 패혈증의 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들은 환원된 자유 싸이올(free thiol) 형태와, 산화된 디설파이드(disulfide) 형태 사이에서 평형을 유지하며 생체 내에서 산화-환원 항상성을 유지하는 중요한 역할을 수행하는 수많은 펩타이드들의 구성요소이다(비특허문헌 1). 비특허문헌 2에서는, 생체 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들의 비정상적인 수준(levels)은 간 손상, 암, 에이즈, 골다공증, 알츠하이머 병, 염증성 장질환, 심장혈관계 질병 등 특정 질병의 발생과 밀접하게 관련이 있음을 개시하고 있다. 즉, 생체 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올(Biothiol)의 수준을 평가한다면, 이와 관련된 몇몇 질병들에 대하여 조기 진단이 가능하게 될 것이다.

[0005] 이에, 생체 내에서 다양한 아미노산들 중 선택적으로 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산을 검출하기 위한 다양한 형광 프로브(Fluorescent probes)가 개발되었다. 구체적으로, 비특허문헌 3에서는, 싸이올기가 독특한 친핵성 첨가 및 치환반응을 한다는 점을 사용한 프로브에 대하여 개시하고 있다. 하지만, 상기 프로브의 경우, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine), 글루타티온(Glutathione) 등 싸이올기를 포함하는 아미노산을 모두 검출하며 각각의 아미노산을 선택적으로 검출하지 못하는 한계가 있다.

[0007] 상기 바이오싸이올 중에서 글루타티온(Glutathione)은 세포 내 산화환원 활성도(intracellular redoxactivity), 이물질 대사(xenobiotic metabolism), 세포 내 신호전달, 유전자 조절 등의 세포 기능과 관련이 있을 뿐만 아니라, 자유 라디칼 및 활성산소에 의하여 유발될 수 있는 세포 손상을 보호하는 아미노산으로 특히중요하다. 보다 구체적으로, 글루타티온은 생체 내 산화물질과 반응하여 두 분자의 글루타티온이 디설파이드(-S-S-) 결합을 통해 연결되는 글루타티온의 산화된 형태인 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)로 가역적으로 변하며, 상기 작용을 통해 생체 내의 산화-환원 전위를 조절한다.

[0009] 또한, 글루타티온은 세포 내의 환경에서 약 0.5-10 mM 농도로 존재하여, 주요한 내인성 항산화물질임을 고려할 때, 근-적외선(700-900 nm) 형광 프로브를 사용하여 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 것은, 생물학적 손상을 덜 발생시키며 상기 파장 영역에서 더 깊숙히 조직(tissue)을 투과할 수 있는 장점이 있다.

[0011] 이러한 글루타티온을 검출하기 위한 형광 프로브가 개발되고 있다. 예를 들면, 비특허 문헌 4에서는 비스-스피로피란(bis-spiropyran) 구조에 기반을 둔 프로브에 관하여 개시하고 있으며, 비특허 문헌 5에서는 레조루핀(resorufin) 구조 기반의 프로브에 관하여 개시하고 있고, 비특허문헌 6에서는 보디피(BODIPY) 구조 기반의 형광 센서에 관하여 개시하고 있다. 하지만, 상기 근-적외선을 사용하여 글루타티온을 검출하기 위하여 개발된 프로브들은 검출하고자 하는 물질에 대한 선택성이 우수하지 못한 문제점이 있다.

[0012]

[0013] 이에, 본 발명자들은 생체 내 글루타티온을 선택적으로 검출하기 위한 프로브를 개발하기 위하여 연구하던 중, 본 발명에 따른 나프탈렌 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 등 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 오직 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체시료 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온의 농도변화를 유발하는 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0015] (비특허문헌 0001) Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L. B. Trends Biochem. Sci. 2003, 28, 32.
- (비특허문헌 0002) Herzenberg, L. A.; De Rosa, S. C.; Dubs, J. G.; Roederer, M.; Anderson, M. T.; Ela, S. W.; Deresinski S. C.; Herzenberg, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997, 94, 1967.
- (비특허문헌 0003) Yin, L.-L.; Chen, Z.-Z.; Tong, L.-L.; Xu, K.-H.; Tang, B. Chin. J. Anal. Chem. 2009, 37, 1073.
- (비특허문헌 0004) Shao, N.; Jin, J.; Wang, H.; Zheng, J.; Yang, R.; Chan, W.; Abliz, C. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 725.
- (비특허문헌 0005) Guo, Y.; Yang, X.; Hakuna, L.; Barve, A.; Escobedo, J. O.; Lowry, M.; Strongin, R. M. Sensors 2012, 12, 5940.
- (비특허문헌 0006) Niu, L.-Y.; Guan, Y.-S.; Chen, Y.-Z.; Wu, L.-Z.; Tung, C.-H.; Yang, Q.-Z. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 18928.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은 싸이올기 함유 아미노산을 검출하기 위한 화합물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서를 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 다른 목적은 싸이올기 함유 아미노산의 검출방법을 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 목적은 패혈증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0026] 본 발명의 다른 목적은 패혈증의 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0028] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0029] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0030] [화학식 1]

[0031]

[0032] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H, -OH, -SH, -NO₂, -CN, 할로젠, -NR⁷R⁸, -(C=O)R⁹, -(C=O)NR⁹, -(C=O)OR⁹ 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₁₀ 알킬 또는 알콕시이고, 여기서, R^7 , R^8 및 R^9 은 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₃ 알킬이고,

[0033] 또한, R^3 , R^4 및 R^5 는 이들이 결합된 탄소원자와 함께 N, O 및 S를 포함하는 10중 고리의 헤테로 사이클로 알킬을 형성할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0036] 화학식 2로 표시되는 화합물을 환원시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

[0037] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 3으로 표시되는 화합물을 산화시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0038] [반응식 1]

[0039]

[0040] 상기 반응식 1에서,

[0041] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서를 제공한다.

[0045] 나아가, 본 발명은 상기 화학센서와 검체를 접촉시켜 검체내의 싸이올기 함유 아미노산을 검출하는 단계를 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출방법을 제공한다.

[0047] 더 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 패혈증의 진단용 조성물을 제공한다.

[0049] 더욱 나아가, 본 발명은 상기 진단용 조성물과 동물로부터 분리된 검체를 접촉시키는 단계를 포함하는 패혈증의 진단방법을 제공한다.

발명의 효과

[0051]

본 발명에 따른 나프탈렌 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 호모시스테인 또는 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체 시료 중에서, 또는 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온의 농도변화를 유발하는 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053]

도 1은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 실시예 2에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 실시예 3에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 4는 실시예 2에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 실시예 3에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 6은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 7은 531nm의 파장에서 시간에 따른 글루타티온, 시스테인 및 호모시스테인에 대한 NDA의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 8은 실시예 2에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 9는 531nm의 파장에서 시간에 따른 글루타티온, 시스테인 및 호모시스테인에 대한 실시예 2에서 제조한 화합물의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 10은 실시예 3에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 11는 531nm의 파장에서 시간에 따른 글루타티온, 시스테인 및 호모시스테인에 대한 실시예 2에서 제조한 화합물의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 12는 실시예 1에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 13은 531nm의 파장에서 실시예 1에서 제조한 화합물의 글루타티온 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 14는 실시예 2에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨

가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 15는 531nm의 파장에서 실시예 2에서 제조한 화합물의 글루타티온 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 16은 실시예 3에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 17는 531nm의 파장에서 실시예 3에서 제조한 화합물의 글루타티온 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 18은 실시예 2에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 호모시스테인을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 19는 531nm의 파장에서 실시예 2에서 제조한 화합물의 호모시스테인 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

도 20 (a)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 20 (b)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 20 (c)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 GSH-MEE를 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 21 (a)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 21 (b)는 HeLa 세포에 감마-글루타미르시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설폭시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 21 (c)는 HeLa 세포에 감마-글루타미르시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설폭시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 추가적으로 GSH-MEE를 첨가한 다음 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 21 (d)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 21 (e)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 21 (f)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 추가적으로 NAC를 첨가한 다음 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이다.

도 22 (a)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 22 (b)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 시스테인을 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 22 (c)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 호모시스테인을 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 22 (d)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 GSH-MEE를 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광

이미지이고,

도 22 (e)는 듀벨코 인산완충식염수(DPBS)로 세척한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 23 (a)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 23 (b)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M 을 처리한 후 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 23 (c)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M 을 처리한 후 추가적으로 GSH-MEE를 첨가한 다음 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 23 (d)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 23 (e)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 23 (f)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 추가적으로 NAC를 첨가한 다음 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이다.

도 24 (a)는 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 24 (b)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 24 (c)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 GSH-MEE를 처리한 후, 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

도 25 (a)는 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 25 (b)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M 을 처리한 후 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 25 (c)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M 을 처리한 후 추가적으로 GSH-MEE를 첨가한 다음 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 25 (d)는 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

도 25 (e)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

도 25 (f)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 추가적으로 NAC를 첨가한 다음 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이다.

도 26은 MTT 분석을 통해 측정된 MNDA 및 FNDA의 농도별 세포 생사율을 나타낸 그래프이다. (a)는 MNDA, (b)는 FNDA의 농도별 세포 생사율이다.

도 27은 본 발명에 따른 NDA의 HPLS-MS 데이터이다.

도 28 및 도 29는 본 발명에 따른 NDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.

도 30은 본 발명에 따른 MNDA의 HPLS-MS 데이터이다.

도 31 및 도 32는 본 발명에 따른 MNDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.

도 33 및 도 34는 본 발명에 따른 MNDA와 호모시스테인이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.

도 35는 본 발명에 따른 FNDA의 HPLS-MS 데이터이다.

도 36 및 도 37는 본 발명에 따른 FNDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.

도 38은 NDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 ^1H -NMR 데이터이다.

도 39는 NDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 ^{13}C -NMR 데이터이다.

도 40은 NDA와 글루타티온이 결합했을 때의 ~~~~ NMR 데이터이다.

도 41은 NDA와 글루타티온이 결합했을 때의 ~~~~ NMR 데이터이다.

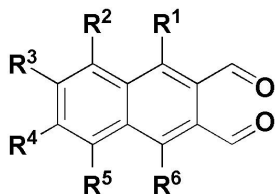
도 42는 NDA와 글루타티온이 결합했을 때의 ~~~~ NMR 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[화학식 1]



이때, 상기 화학식 1에서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H, -OH, -SH, -NO₂, -CN, 할로젠, -NR⁷R⁸, -(C=O)R⁹, -(C=O)NR⁹, -(C=O)OR⁹ 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₁₀ 알킬 또는 알콕시이고, 여기서, R⁷, R⁸ 및 R⁹은 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₃ 알킬이고,

또한, R³, R⁴ 및 R⁵는 이들이 결합된 탄소원자와 함께 N, O 및 S를 포함하는 10중 고리의 헤테로 사이클로 알킬을 형성할 수 있다.

또한, 상기 화학식 1에 있어서 R¹, R², R³, R⁴, R⁵ 및 R⁶는 서로 독립적으로 동일 또는 상이한 -H, -F, -Cl, -Br, -I 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₅ 알킬 또는 알콕시일 수 있다.

나아가, 상기 화학식 1에 있어서 R¹, R², R³, R⁵ 및 R⁶는 -H일 수 있고,

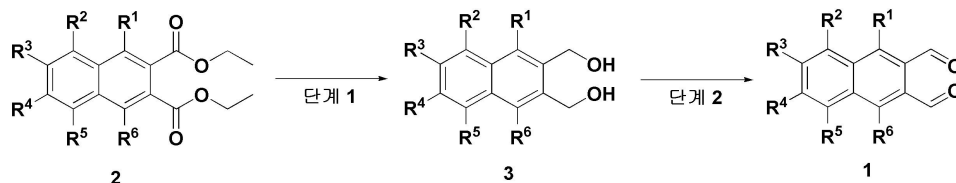
R⁴는 -H, -F, 또는 직쇄 또는 측쇄의 C₁-C₃ 알콕시일 수 있다.

[0068] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0069] 화학식 2로 표시되는 화합물을 환원제로 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

[0070] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 3으로 표시되는 화합물을 산화시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0071] [반응식 1]



[0072]

[0073] 이때, 상기 반응식 1에서,

[0074] R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 및 R^6 는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0076] 이하, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[0078] 먼저, 상기 단계 1은 화학식 2로 표시되는 화합물을 환원시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이며, 보다 구체적으로는, 화학식 2로 표시되는 화합물을 용매에 용해시킨 후 환원제가 포함된 용매를 첨가하여 교반하면서 반응시키고, 반응이 끝난 후, 혼합물을 분리 정제하여 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0079] 이때, 상기 환원제로는 리튬보로하이드라이드(LiBH_4), 소듐보로하이드라이드(NaBH_4), 리튬알루미늄 하이드라이드(LiAlH_4) 또는 디이소부틸알루미늄 하이드라이드(DIBAL)등을 사용할 수 있으며, 해당분야에서 통상적으로 사용되는 환원제라면 상기 환원제 종류에 제한되지 않고 사용할 수 있다.

[0080] 또한, 상기 용매로는 테트라하이드로퓨란; 다이옥산; 에틸에테르, 1,2-다이메톡시에탄 등을 포함하는 에테르용매; 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 포함하는 저급 알코올; 톨루엔, 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄, 아세트나절설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시크레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 사용할 수 있으며, 톨루엔을 사용하는 것이 바람직하다.

[0081] 나아가, 반응온도는 약 -40℃ 내지 -60℃가 바람직하며, 비활성 기체 하에서 수행하는 것이 바람직하다. 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.

[0083] 다음으로, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 제조한 화학식 3으로 표시되는 화합물을 산화시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로써, 보다 구체적으로는, 상기 화학식 3의 화합물과 산화제를 용매에 혼합하여 교반시키고, 반응이 끝난 후 정제 및 분리하여 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계이다.

[0084] 이때, 상기 산화제로는 피리디늄 술폭시드, 무수트리플루오로 아세트산, 트리에틸아민, 옥살릴 클로라이드, 디메틸 술폭시드 또는 트리에틸아민 등을 사용할 수 있으며, 해당분야에서 통상적으로 사용되는 산화제라면 상기 환원제 종류에 제한되지 않고 사용할 수 있다.

[0085] 또한, 상기 용매로는 테트라하이드로퓨란; 다이옥산; 에틸에테르, 1,2-다이메톡시에탄 등을 포함하는 에테르용매; 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 포함하는 저급 알코올; 염화메틸렌, 톨루엔, 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄, 아세토나젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시크레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트,

나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 사용할 수 있으며, 염화메틸렌 디메틸설폭사이드 혼합용액을 사용하는 것이 바람직하다.

[0086] 나아가, 반응온도는 약 -70°C 내지 -80°C 가 바람직하며 비활성 기체 하에서 수행하는 것이 바람직하다. 반응시간은 특별한 제약은 없으나, 0.5-10시간 동안 반응하는 것이 바람직하다.

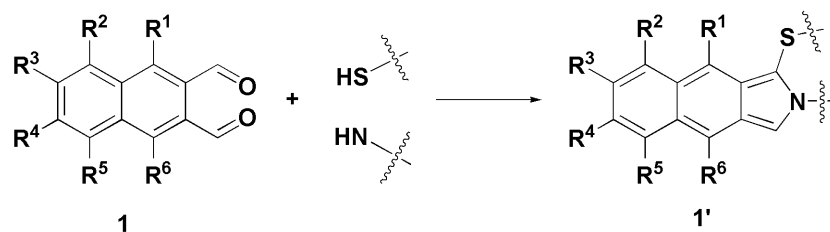
[0088] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서를 제공한다.

[0090] 본 발명에 따른 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서에 있어서, 검출할 수 있는 싸이올기 함유 아미노산은 호모시스테인(Homocysteine) 또는 글루타티온(Glutathione)일 수 있고, 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)의 혼합물 일 수 있으며, 바람직하게는 글루타티온(Glutathione)일 수 있다.

[0092] 이때, 본 발명에 따른 싸이올기 함유 아미노산 검출용 화학센서는 화학식 1로 표시되는 화합물의 디알데하이드 말단이 아미노산의 싸이올기 및 아민기와 함께 결합하여 형광발광 및 광흡수의 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0094] 보다 구체적으로, 상기 결합 반응의 특징은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이 화학식 1의 말단에 존재하는 두 개의 알데하이드기가 아미노산의 싸이올기 및 아민기와 동시에 결합하는 반응으로써, 아미노산의 아민기는 두 개의 알데하이드기와 함께 결합하여 질소 원자를 포함하는 5각 구조의 헤테로 싸이클로 알킬을 형성하며, 아미노산의 싸이올기는 상기 헤테로 싸이클로 알킬의 질소 원자 바로 옆의 탄소와 결합하여 싸이오에터(thioether) 결합을 형성한다.

[0095] [반응식 2]

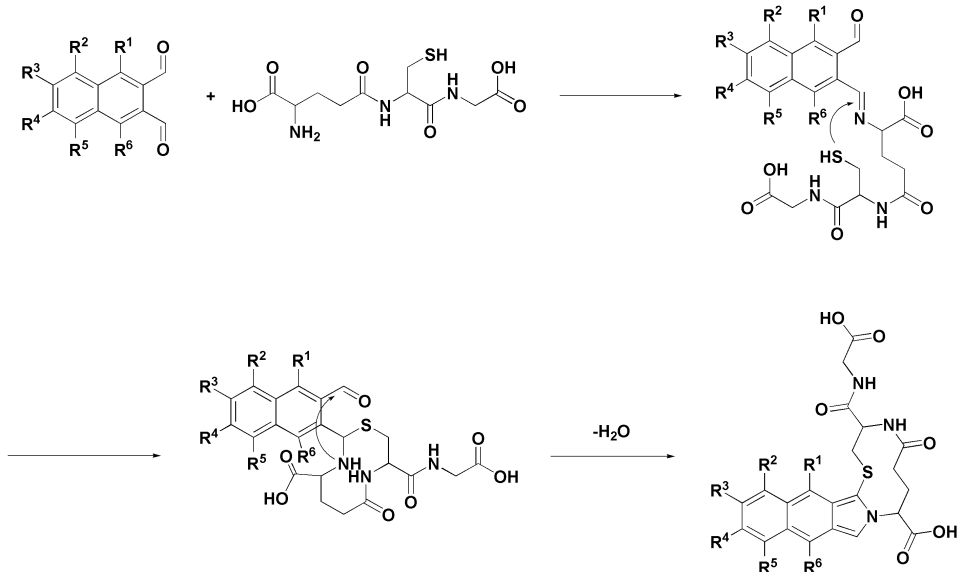


[0096]

[0097] 상기 반응식 2에서 화학식 1 및 화학식 1'의 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0099] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물이 글루타티온에 결합하는 반응 메커니즘을 하기 반응식 3에 나타내었다.

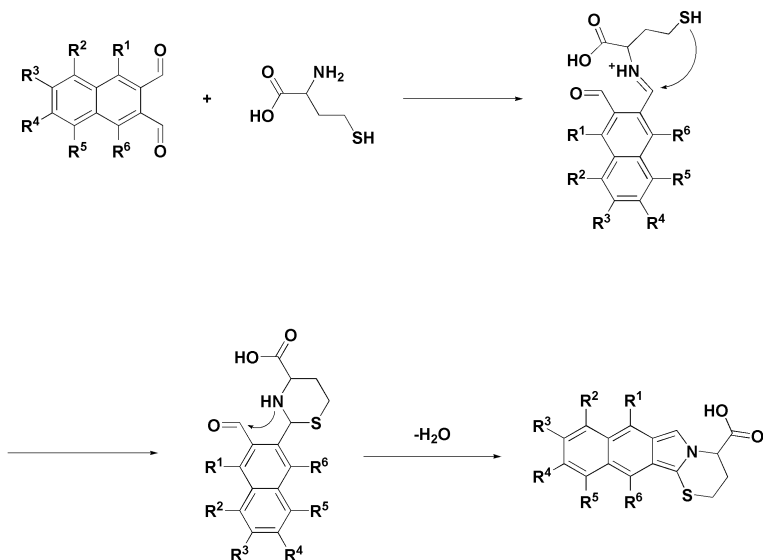
[0100] [반응식 3]



[0101]

[0102] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물이 호모시스테인에 결합하는 반응 메커니즘을 하기 반응식 4에 나타내었다.

[0103] [반응식 4]



[0104]

[0106] 상술한 바와 같은 메커니즘을 통하여 결합된 바이오 싸이올-형광 프로브는 특정 파장 영역에서 흡광도 또는 형광 강도를 나타내므로 화학식 1의 화합물을 통한 바이오싸이올의 검출이 가능하게 된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 화학센서는 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 호모시스테인 및 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하는 것으로 나타났다(실험예 1-12 참조).

[0107] 또한, 본 발명에 따른 화학센서는 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 호모시스테인 또는 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하는 것으로 나타났다(실험예 13-15 참조).

[0109] 따라서, 본 발명에 따른 나프탈렌 구조 기반의 화학센서는 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 호모시스테인 또는 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체 시료 중에서, 또는 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

- [0111] 또한, 본 발명은 상기 화학센서와 검체를 접촉시켜 검체 내의 싸이올기 함유 아미노산을 검출하는 단계를 포함하는 싸이올기 함유 아미노산 검출방법을 제공한다.
- [0113] 본 발명에 따른 싸이올기 함유 아미노산 검출방법에 있어서, 상기 싸이올기 함유 아미노산은 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 글루타티온(Glutathione)일 수 있다.
- [0115] 본 발명에 따른 싸이올기 함유 아미노산 검출방법에 있어서, 상기 검출방법의 원리로는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물과 글루타티온이 반응할 때, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 나프탈렌에 치환되어있는 α -디알데하이드 그룹이 글루타티온 또는 호모시스테인 내 싸이올기와 연결된 화합물이 생성됨으로써 발생하는 흡광 또는 형광 특징의 변화를 단독으로 또는 혼합함으로써 검출할 수 있다.
- [0117] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 패혈증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0118] 또한, 상기 진단용 조성물과 동물로부터 분리된 검체를 접촉시키는 단계를 포함하는 패혈증의 진단방법을 제공한다.
- [0120] 본 발명에 따른 패혈증 진단용 조성물 및 패혈증의 진단방법에 있어서, 일반적으로 패혈증에 걸리게 되면, 생체 내 백혈구의 일종인 호중구(neutrophil)가 산화스트레스(oxidativestress)를 받게 되어 과량의 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 발생시키며, 이는 신경, 피부, 소화기 등의 계통에 장애를 유발한다.
- [0121] 생체 내에서 산화-환원 전위 조절하는 항산화물질인 글루타티온은 패혈증으로 인하여 발생한 과량의 활성 산소종과 반응한다. 이때, 두 분자의 글루타티온이 디설파이드(-S-S-) 결합을 통해 연결되며, 글루타티온의 산화형체인 글루타티온 디설파이드(Glutathione disulfide, GSSG)를 형성하게 된다.
- [0122] 따라서, 글루타티온이 글루타티온 디설파이드의 형태로 변화하게 되면 생체내 글루타티온의 농도가 감소하게 되고, 생체 내 글루타티온의 농도가 감소하게 되었을 때의 농도 감소를 본 발명에 따른 패혈증 진단용 조성물을 사용하여 관찰함으로써 패혈증을 진단할 수 있게 된다.
- [0123] 상기 원리를 통해 본 발명에 따른 패혈증 진단용 조성물은 글루타티온의 농도의 변화를 선택적, 효과적으로 검출함으로써 패혈증을 빠른 시간 안에 진단할 수 있다는 특징을 가진다.
- [0125] 본 발명에 따른 화합물은 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 호모시스테인 및 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하는 것으로 나타났다(실험예 1-12 참조).
- [0126] 또한, 본 발명에 따른 화합물은 HeLa 세포에 스며들어 세포질 내 존재하는 시스테인(Cysteine), 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대하여, 호모시스테인 또는 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 및 형광 스펙트럼의 변화가 발생하는 것으로 나타났다(실험예 13-15 참조).
- [0127] 나아가, 본 발명에 따른 화합물은 패혈증 환자의 혈액 내의 글루타티온의 농도 측정을 효과적으로 수행하는 것을 확인하였다(실험예 16 참조).
- [0129] 따라서, 본 발명에 따른 나프탈렌 구조 기반의 화합물은 세포 내 환경에서도 그 구조가 유지되며 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산들 중 호모시스테인 또는 글루타티온과 선택적으로 반응하여 흡광 또는 형광 스펙트럼이 변화하므로, 생체 시료 중에서, 또는 생체 내에서 글루타티온을 검출하는 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 글루타티온의 농도변화를 유발하는 패혈증을 진단하는 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0131] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0132] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

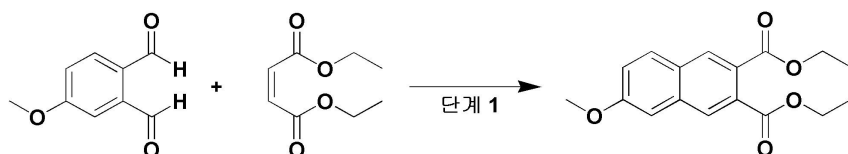
[0134] <실시예 1> 본 발명에 따른 나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드(NDA)의 제조

[0135] 시중에서 판매되는 NDA(시그마 알드리치)를 구입하여 준비하였다.

[0137] <실시예 2> 본 발명에 따른 6-메톡시나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드(MNDA)의 제조

[0138] 단계 1: 디에틸 6-메톡시나프탈렌-2,3-디카르복실레이트의 제조

[0139]

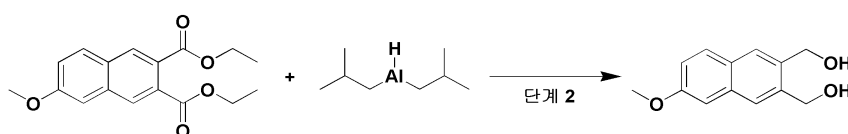


[0140] 말레산디에틸(2.6 mmol, 347 mg)의 염화메틸렌용액에 트리에틸포스핀(2.8 mmol, 330 mg)을 첨가한 후, 질소 대기하에서 0℃의 온도에서 교반하였다. 교반 후 혼합된 혼합물을 상온에서 30분 동안 더 교반 하였다. 이때의 혼합물을 6-메톡시프탈알데히드(2 mmol, 320 mg)의 염화메틸렌 용액에 드랍와이즈(dropwise) 첨가하였고 0℃의 온도에서 교반하였다. 그 후, DBU(1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, 0.2mmol, 31mg)를 혼합물에 첨가하여 5 시간 동안 교반하며 반응시켰다. 반응이 끝난 후 증류수로 세척하고 염화나트륨 용액을 사용하여 포화시켜 유기층을 분리하였다. 황산마그네슘 무수물로 분리한 유기층을 건조시켰다. 유기층의 용매를 제거한 후, 잔여물을 컬럼 크로마토그래피를 통해 정화시켜 무색 오일형태의 디에틸 6-메톡시나프탈렌-2,3-디카르복실레이트를 얻었다.

[0141] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 8.25 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.30-7.27 (m, 2H), 7.20 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 4.43 (q, J = 4.2 Hz, 4H), 3.96 (s, 3H), 1.40 (t, J = 4.2 Hz, 6H).

[0143] 단계 2: 6-메톡시나프탈렌-2,3-다이일디메탄올의 제조

[0144]

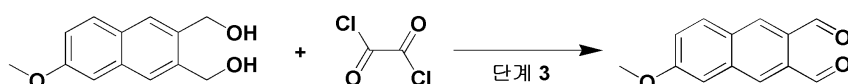


[0145] 6-메톡시나프탈렌-2,3-디카르복실레이트(1mmol, 301mg)의 톨루엔 용액에 디이소부틸알루미늄 하이드라이드의 톨루엔 용액(5ml)을 -50℃의 온도의 질소대기 하에서 천천히 첨가한 후 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 타르타르산 칼륨나트륨 포화용액을 첨가하였다. 그 다음, 황산마그네슘 무수물로 건조시킨 후, 반응 혼합물을 에틸아세테이트로 세 번 추출하였다. 감압대기 하에서 용매를 제거하여 흰색 고체상의 (6-메톡시나프탈렌-2,3-다이일)디메탄올을 얻었다.

[0146] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.80-7.77 (m, 3H), 7.28 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 3.0 Hz, 1H), 5.23-5.14 (m, 2H), 4.69-4.64 (m, 4H), 3.86 (m, 3H).

[0148] 단계 3: 6-메톡시나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드의 제조

[0149]



[0150] 옥살릴 클로라이드(3.5mmol, 441mg) 염화메틸렌용액에 DMSO 5mL와 염화메틸렌 10mL를 첨가하여 질소대기 하에서 -78℃에서 교반하였고 교반 용액을 30분 동안 추가로 더 교반하였다. 교반 후 혼합액에 DMSO 5mL와 염화메틸렌 5mL에 (6-메톡시나프탈렌-2,3-다이일)디메탄올을 섞은 용액을 드랍와이즈 방법으로 첨가하였다. 반응은 하루 동안 진행한 뒤 5mL의 Et₃N(triethylamine)을 첨가함으로써 반응을 종결하였다. 증류수를 첨가고 환산마그네슘 무수물로 건조시킨 뒤 염화메틸렌으로 혼합물을 추출하였다. 그 후 남은 용액을 제거하였으며, 잔여물을 컬럼 크로마토그래피로 정화하여 6-메톡시나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드(MNDA)를 얻었다.

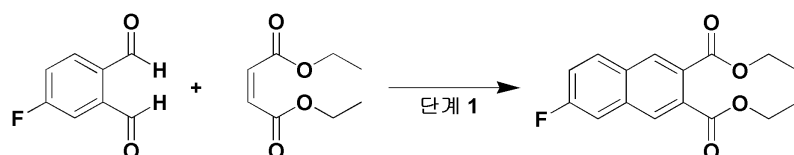
[0151] ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10.70 (s, 1H), 10.57 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 16.2 Hz, 2H), 7.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.41-7.34 (m, 2H), 4.00 (m, 3H).

[0152] ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 193.73, 193.25, 160.83, 136.47, 134.36, 133.77, 132.01, 131.81, 131.17, 129.61, 122.76, 108.57, 56.18.

[0153] HRMS calcd for [M+H]⁺: 215.0708, found: 215.0710.

[0155] <실시예 3> 본 발명에 따른 6-플루오로나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드(FNDA)의 제조

[0157] 단계 1: 디에틸 6-플루오로나프탈렌-2,3-디카르복실레이트의 제조

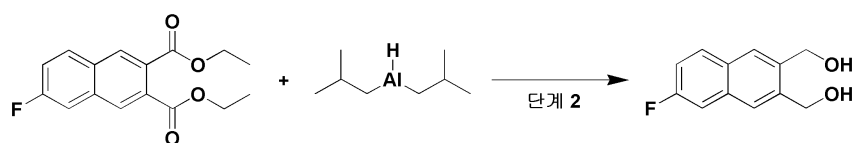


[0158]

[0159] 말레산디에틸(2.6 mmol, 447 mg)의 염화메틸렌용액에 트리에틸포스핀(2.8 mmol, 330 mg)을 첨가한 후, 질소 대기 하에서 0℃의 온도에서 교반하였다. 교반 후 혼합된 혼합물을 상온에서 30분 동안 더 교반 하였다. 이때의 혼합물을 6-플루오로프탈알데히드(2 mmol, 320 mg)의 염화메틸렌 용액에 드랍와이즈(dropwise)방법으로 첨가하였고 0℃의 온도에서 교반하였다. 그 후, DBU(1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, 0.2mmol, 31mg)를 혼합물에 첨가하여 5시간 동안 교반하며 반응시켰다. 반응이 끝난 후 증류수로 세척하고 염화나트륨 용액을 사용하여 포화시켜 유기층을 분리하였다. 황산마그네슘 무수물로 분리한 유기층을 건조시켰다. 유기층의 용매를 제거한 후, 잔여물을 컬럼 크로마토그래피를 통해 정화시켜 무색 오일형태의 디에틸 6-플루오로나프탈렌-2,3-디카르복실레이트를 얻었다.

[0160] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.93-7.89 (m, 1H), 7.53-7.50 (m, 1H), 7.41-7.34 (m, 1H), 4.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H).

[0162] 단계 2: (6-플루오로나프탈렌-2,3-다이일)디메탄올의 제조



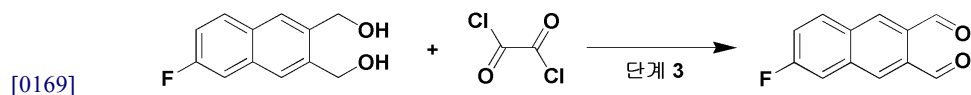
[0163]

[0164] 6-플루오로나프탈렌-2,3-디카르복실레이트(1mmol, 301mg)의 톨루엔 용액에 디이소부틸알루미늄 하이드라이드의 톨루엔 용액(5mL)을 -50℃의 온도의 질소대기 하에서 천천히 첨가한 후 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 타르타르산칼륨나트륨 포화용액을 첨가하였다. 그 다음, 황산마그네슘 무수물로 건조시킨 후, 반응 혼합물을 에틸아세테이트로 세 번 추출하였다. 감압대기 하에서 용매를 제거하여 흰색 고체상의 (6-플루오로나프탈렌-2,3-다이일)디메탄올을 얻었다.

[0165] ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.99–7.90 (m, 3H), 7.68 (dd, $J_1 = J_2 = 2.4$ Hz, 1H), 7.39–7.32 (m, 1H), 5.32–5.25 (m, 2H), 4.69 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H).

[0166] ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 161.95, 158.73, 139.93, 137.91, 137.88, 133.27, 133.15, 130.67, 130.55, 129.59, 125.36, 124.66, 124.59, 116.08, 115.75, 110.96, 110.69, 60.90, 60.87.

[0168] 단계 3: 6-플루오로나프탈레-2,3-디카르복스알데하이드의 제조



[0170] 옥살릴 클로라이드(3.5mmol, 441mg) 염화메틸렌용액에 DMSO 5mL와 염화메틸렌 10mL를 첨가하여 질소대기 하에서 -78℃에서 교반하였다. 교반 용액을 30분 동안 추가로 더 교반하였다. 교반 후 혼합액에 DMSO 5mL와 염화메틸렌 5mL에 (6-플루오로나프탈렌-2,3-다이일)디메탄올을 섞은 용액을 드랍와이즈 방법으로 첨가하였다. 반응은 하루 동안 진행한 뒤 5mL의 Et₃N(triethylamine)을 첨가함으로써 반응을 종결하였다. 증류수를 첨가고 환산마그네슘 무수물로 건조시킨 뒤 염화메틸렌으로 혼합물을 추출하였다. 그 후 남은 용액을 제거하였으며, 잔여물을 컬럼 크로마토그래피로 정화하여 6-플루오로나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드(FNDA)를 얻었다.

[0171] ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10.55 (s, 1H), 10.50 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.40–8.36 (m, 1H), 8.12–8.09 (m, 1H), 7.79–7.73 (m, 1H).

[0172] ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 193.53, 193.41, 164.28, 160.97, 135.87, 135.73, 134.21, 134.09, 133.45, 133.32, 132.85, 132.71, 132.64, 131.57, 120.71, 120.37, 113.68, 113.40.

[0173] HRMS calcd for $[M+H]^+$: 203.0508, found: 203.0504.

[0175] 하기 표 1에 실시예 1~3에서 제조한 화합물의 구조식을 정리하여 나타내었다.

丑 1

[0176]	실시예	화학구조식	화학식명
1			나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드 (NDA)
2			6-메톡시나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드 (MNDA)
3			6-플루오로나프탈렌-2,3-디카르복스알데하이드 (FNDA)

[0178] <실험예 1> 본 발명에 따른 NDA의 바이오타이올(Biothiol)에 대한 흡광도 측정 실험

[0179] 본 발명에 따른 화합물의 호모시스테인(Homocysteine) 또는 글루타티온(Glutathione)에 대한 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 생체 내 아미노산을 대상으로 UV-Vis 흡광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.

[0181] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라-

닌, 아르기닌, 메티오닌, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 UV-Vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0183] 도 1은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

[0185] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 경우 450nm 파장 대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되었고, 호모시스테인의 경우 350nm 파장 대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다. 반면, 글루타티온 및 호모시스테인 이외의 다른 아미노산들은 350nm 및 450nm 파장 대에서 약한 흡광도를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0187] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 중에서 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 글루타티온 또는 호모시스테인과 선택적으로 반응하여 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체 시료 내 글루타티온 또는 호모시스테인을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0189] <실험예 2> 본 발명에 따른 MNDA의 바이오싸이올(Biothiol)에 대한 흡광도 측정 실험

[0190] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대한 실시예 2 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 생체 내 아미노산을 대상으로 UV-Vis 흡광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.

[0192] 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이트, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라닌, 아르기닌, 메티오닌, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 UV-Vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하였다.

[0194] 도 2는 실시예 2에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

[0195] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 경우 450nm 파장 대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되었고, 호모시스테인의 경우 315-350nm 파장 대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다. 반면, 글루타티온 및 호모시스테인 이외의 다른 아미노산들은 315-350nm 및 450nm 파장 대에서 약한 흡광도를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0197] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 2의 MNDA 화합물은 생체시료 중에서 글루타티온 및 호모시스테인과 반응하여 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온 및 호모시스테인을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0199] <실험예 3> 본 발명에 따른 FNDA의 바이오싸이올(Biothiol)에 대한 흡광도 측정 실험

[0200] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 호모시스테인(Homocysteine) 및 글루타티온(Glutathione)에 대한 실시예 3 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 생체 내 아미노산을 대상

으로 UV-Vis 흡광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.

[0202] 실시예 3에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라닌, 아르기닌, 메티오닌, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진 -1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25°C에서 UV-Vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하였다.

[0204] 도 3은 실시예 3에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

[0205] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 경우 450nm 파장대에서 강한 흡광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다. 반면, 글루타티온 이외의 다른 아미노산들은 450nm 파장대에서 약한 흡광도를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0207] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 3의 FNDA 화합물은 생체시료 중에서 글루타티온과 반응하여 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0209] <실험예 4> 본 발명에 따른 MNDA의 글루타티온에 대한 농도별 흡광도 측정 실험

[0210] 글루타티온(Glutathione) 농도에 따른 실시예 2 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 농도의 글루타티온을 대상으로 UV-Vis 흡광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.

[0212] 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M과 글루타티온을 각각 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진 -1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25°C에서 UV-Vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하였다.

[0214] 도 4는 실시예 2에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.

[0215] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 농도가 10 μ M(1 당량) 이상일 경우 450nm 근방의 파장영역에서 강한 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있다.

[0217] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 2의 MNDA 화합물은 글루타티온의 농도가 약 1 당량(MNDA 농도 대비) 이상만 되어도 글루타티온에 대해 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 저농도의 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0219] <실험예 5> 본 발명에 따른 FNDA의 글루타티온에 대한 농도별 흡광도 측정 실험

[0220] 글루타티온(Glutathione) 농도에 따른 실시예 3 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 농도의 글루타티온을 대상으로 UV-Vis 흡광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.

- [0222] 실시예 3에서 제조한 화합물 10 μ M과 글루타티온을 각각 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진 -1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25°C에서 UV-Vis spectra(Scinco 3000 spectrophotometer, 1cm 석영셀)를 통해 나타나는 흡광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0224] 도 5는 실시예 3에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 UV 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0225] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 농도가 10 μ M(1 당량) 이상일 경우 450nm 근방의 파장영역에서 강한 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0227] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 3의 FNDA 화합물은 글루타티온의 농도가 약 1 당량(FNDA 농도 대비) 이상만 되어도 글루타티온에 대해 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 저농도의 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0229] <실험예 6> 본 발명에 따른 NDA의 바이오싸이올(Biothiol)에 대한 형광 스펙트럼 측정 실험
- [0230] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 글루타티온(Glutathione)에 대한 실시예 1 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 생체 내 아미노산을 대상으로 형광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.
- [0232] 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라닌, 아르기닌, 메티오닌, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진 -1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25°C에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 통해 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0234] 도 6은 실시예 1에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0235] 도 7은 531nm의 파장에서 시간에 따른 글루타티온, 시스테인 및 호모시스테인에 대한 NDA의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0237] 도 6에서도 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도가 약 531nm의 파장 근방의 영역에서 약 470a.u.까지 높아지는 것을 알 수 있다. 반면, 글루타티온 이외의 바이오싸이올은 모든 영역의 파장대에서 형광 흡수도가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0238] 또한, 도 7에서 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도는 시간에 따라 증가하는 것을 알 수 있으며, 약 1800초(30분) 이내에 형광 흡수도의 상승 값이 나타나는 것을 알 수 있다. 반면 시스테인 및 호모시스테인에 대해서는 형광 흡수도가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0240] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 1의 NDA 화합물은 생체시료 중에서 글루타티온과 반응하여 30분 이내로 특유 파장영역에서 형광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온을 선택적으로, 빠른 시간 내에 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

- [0242] <실험예 7> 본 발명에 따른 MNDA의 바이오싸이올(Biothiol)에 대한 형광 스펙트럼 측정 실험
- [0243] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 글루타티온(Glutathione)에 대한 실시예 2 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 생체 내 아미노산을 대상으로 형광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.
- [0245] 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라닌, 아르기닌, 메티오닌, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰익 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 통해 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0247] 도 8은 실시예 2에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰익 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0248] 도 9는 531nm의 파장에서 시간에 따른 글루타티온, 시스테인 및 호모시스테인에 대한 실시예 2에서 제조한 화합물의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0250] 도 8에서도 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도가 약 531nm의 파장 근방의 영역에서 약 470a.u.까지 높아지는 것을 알 수 있다. 반면, 글루타티온 이외의 바이오싸이올은 모든 영역의 파장대에서 형광 흡수도가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0251] 또한, 도 9에서 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도는 시간에 따라 증가하는 것을 알 수 있으며, 약 1800초(30분) 이내에 형광 흡수도의 상승 값이 나타나는 것을 알 수 있다. 반면 시스테인 및 호모시스테인에 대해서는 형광 흡수도가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0253] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 2의 MNDA 화합물은 생체시료 중에서 글루타티온과 반응하여 30분 이내로 특유 파장영역에서 형광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온을 선택적으로, 빠른 시간 내에 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0255] <실험예 8> 본 발명에 따른 FNDA의 바이오싸이올(Biothiol)에 대한 형광 스펙트럼 측정 실험
- [0256] 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 글루타티온(Glutathione)에 대한 실시예 3 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 생체 내 아미노산을 대상으로 형광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.
- [0258] 실시예 3에서 제조한 화합물 10 μ M과 생체 내 존재하는 다양한 아미노산(글루타티온, 시스테인, 호모시스테인, 디티오프레이톨, 페닐알라닌, 히스티딘, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 글라이신, 세린, 알라닌, 아르기닌, 메티오닌, 타이로신)들을 각각 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰익 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 통해 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0260] 도 10은 실시예 3에서 제조한 화합물과, 생체 내 존재하는 다양한 아미노산 각각을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰익 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나

타낸 그래프이다.

- [0261] 도 11는 531nm의 파장에서 시간에 따른 글루타티온, 시스테인 및 호모시스테인에 대한 실시예 2에서 제조한 화합물의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0263] 도 10에서도 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도가 약 531nm의 파장 근방의 영역에서 약 470a.u.까지 높아지는 것을 알 수 있다. 반면, 글루타티온 이외의 바이오싸이올은 모든 영역의 파장대에서 형광 흡수도가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0264] 또한, 도 11에서 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도는 시간에 따라 증가하는 것을 알 수 있으며, 약 1800초(30분) 이내에 형광 흡수도의 상승 값이 나타나는 것을 알 수 있다. 반면 시스테인 및 호모시스테인에 대해서는 형광 흡수도가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0266] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 3의 FNDA 화합물은 생체시료 중에서 글루타티온과 반응하여 30분 이내로 특유 파장영역에서 형광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 글루타티온을 선택적으로, 빠른 시간 내에 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0268] <실험예 9> 글루타티온 농도별 NDA의 형광 스펙트럼 측정 실험
- [0269] 글루타티온(Glutathione) 농도에 따른 실시예 1 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 농도의 글루타티온을 대상으로 형광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.
- [0271] 실시예 1에서 제조한 화합물 10 μ M과 글루타티온을 각각 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 통해 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0273] 도 12는 실시예 1에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0274] 도 13은 531nm의 파장에서 실시예 1에서 제조한 화합물의 글루타티온 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0276] 도 12에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 농도가 10 μ M(1 당량) 이상일 경우 531nm 근방의 파장영역에서 강한 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0277] 또한, 도 13에서 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도는 글루타티온 농도가 증가함에 따라 상승하여 선형관계를 이루는 것을 알 수 있으며, 검출한계는 약 6.4×10^{-8} M로 계산된다.
- [0279] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 1의 NDA 화합물은 글루타티온의 농도가 약 1 당량(NDA 농도 대비) 이상만 되어도 글루타티온에 대해 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하고, 높은 검출한계치를 가지므로 생체시료 내 저농도의 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0281] <실험예 10> 글루타티온 농도별 MNDA의 형광 스펙트럼 측정 실험

- [0282] 글루타티온 농도에 따른 실시예 2 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 농도의 글루타티온을 대상으로 형광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.

- [0284] 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M과 글루타티온을 각각 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 통해 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0286] 도 14는 실시예 2에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0287] 도 15는 531nm의 파장에서 실시예 2에서 제조한 화합물의 글루타티온 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0289] 도 14에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 농도가 10 μ M(1 당량) 이상일 경우 531nm 근방의 파장영역에서 강한 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0290] 또한, 도 15에서 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도는 글루타티온 농도가 증가함에 따라 상승하여 선형관계를 이루는 것을 알 수 있으며, 검출한계는 약 6.8×10^{-8} M로 계산된다.
- [0292] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 2의 MNDA 화합물은 글루타티온 농도가 약 1 당량(MNDA 농도 대비) 이상만 되어도 글루타티온에 대해 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 저농도의 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0294] <실험예 11> 글루타티온 농도별 FNDA의 형광 스펙트럼 측정 실험
- [0295] 글루타티온(Glutathione) 농도에 따른 실시예 3 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 농도의 글루타티온을 대상으로 형광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.
- [0297] 실시예 3에서 제조한 화합물 10 μ M과 글루타티온을 각각 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 통해 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0299] 도 16은 실시예 3에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 글루타티온을 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0300] 도 17는 531nm의 파장에서 실시예 3에서 제조한 화합물의 글루타티온 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.
- [0302] 도 16에서 확인할 수 있듯이, 글루타티온의 농도가 10 μ M(1 당량) 이상일 경우 531nm 근방의 파장영역에서 강한 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0303] 또한, 도 17에서 확인할 수 있듯이 글루타티온에 대한 형광 흡수도는 글루타티온 농도가 증가함에 따라 상승하여 선형관계를 이루는 것을 알 수 있으며, 검출한계는 약 1.3×10^{-7} M로 계산된다.
- [0305] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 3의 FNDA 화합물은 글루타티온의 농도가 약 1 당량(FNDA 농도 대비) 이상만 되어도 글루타티온에 대해 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 저농도의 글루타

티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0307] <실험예 12> 본 발명에 따른 MNDA의 호모시스테인에 대한 농도별 형광 스펙트럼 측정 실험

[0308] 호모시스테인 농도에 따른 실시예 2 화합물의 검출능력을 평가하기 위하여 다양한 농도의 호모시스테인을 대상으로 형광 스펙트럼 관찰 실험을 수행하였다.

[0310] 실시예 2에서 제조한 화합물 10 μ M과 호모시스테인을 각각 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M씩 10% 디메틸설폭사이드(DMSO) HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액(10 mM, pH = 7.4)에 첨가하여 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광광도계(1cm 석영셀)를 통해 나타나는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.

[0312] 도 18은 실시예 2에서 제조한 화합물과 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 80 μ M 및 100 μ M의 호모시스테인을 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)함유 HEPES(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄설포닉 엑시드) 완충액에 첨가했을 때의 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

[0313] 도 19는 531nm의 파장에서 실시예 2에서 제조한 화합물의 호모시스테인 농도별 형광 흡수도를 나타낸 그래프이다.

[0315] 도 18에서 확인할 수 있듯이, 호모시스테인의 농도가 10 μ M(1 당량) 이상일 경우 531nm 근방의 파장영역에서 강한 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있다.

[0316] 또한, 도 19에서 확인할 수 있듯이 호모시스테인에 대한 형광 흡수도는 호모시스테인 농도가 증가함에 따라 상승하여 선형관계를 이루는 것을 알 수 있으며, 검출한계는 약 6.3×10^{-8} M로 계산된다.

[0318] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 2의 MNDA 화합물은 호모시스테인의 농도가 약 1 당량(MNDA 농도 대비) 이상만 되어도 호모시스테인에 대해 특유 파장영역에서 흡광 스펙트럼의 변화가 발생하므로, 생체시료 내 저농도의 호모시스테인을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0320] <실험예 13> 본 발명에 따른 NDA의 세포 내 바이오싸이올 검출능력 평가

[0321] 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 글루타티온에 대하여, 실시예 1에서 제조한 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0323] 1. 싸이올기 차단제가 포함된 세포내 글루타티온 검출능력 평가

[0324] 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) 내 37℃ 5% CO₂ 환경에서 HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 배양하였다.

[0325] 싸이올 차단제로 알려져 있는 N-메틸말레이미드(N-methylmaleimide, NMM) 1mM을 30분 동안 전처리하거나 처리하지 않고, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 글루타티온을 100 μ M 첨가한 후, RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10⁵세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed)하였다.

[0326] 또한, NMM으로 전처리한 후 GSH-MEE 1mM을 추가로 첨가한 후 RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10⁵세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed)하였다.

[0327] 24시간 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 3 μ M을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 함께 배양하였다. Dulbecco's

Phosphate Buffered Saline(DPBS) 으로 두 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다(여기 파장은 635nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 20에 나타내었다.

- [0329] 도 20 (a)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0330] 도 20 (b)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0331] 도 20 (c)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 GSH-MEE를 처리한 후, 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0333] 도 20 (a)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 상기 세포 내 존재하는 글루타티온과 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0334] 도 20 (b)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, NMM으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온이 억제되어 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 아미노산이 존재하지 않게 되므로 적색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0335] 도 20(c)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하고, 다시 GSH-MEE를 추가로 첨가하여 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, GSH-MEE와 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0337] 2. 약물처리된 세포내의 글루타티온 검출능력 평가
- [0338] HeLa 세포에 NMM을 처리하는 대신에 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M과 시스플라틴(Cisplatin) 50 μ M을 각각 독립적으로 처리하고 추가적으로 GSH-MME 및 N-아세틸-1-시스테인(NAC)을 첨가하는 점을 빼고 상기 방법과 동일한 방법으로 세포 내의 글루타티온 검출능력을 평가하였다.
- [0340] 도 21 (a)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0341] 도 21 (b)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,
- [0342] 도 21 (c)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 추가적으로 GSH-MEE를 첨가한 다음 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,
- [0343] 도 21 (d)는 HeLa 세포에 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0344] 도 21 (e)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,
- [0345] 도 21 (f)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 추가적으로 NAC를 첨가한 다음 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이다.

- [0347] 도 21 (a)-(c)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 BSO 약물을 처리한 후 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, BSO로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온 생성이 억제되어 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 글루타티온이 존재하지 않게 되므로 녹색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, GSH-MEE를 추가로 첨가하였을 때, GSH-MEE와 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응하여 다시 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0348] 도 21 (d)-(f)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 시스플라틴 약물을 처리한 후 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, 시스플라틴으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온 생성이 억제되어 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 글루타티온이 존재하지 않게 되므로 녹색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, NAC를 추가로 첨가하였을 때, 세포 내에서 NAC가 GSH로 전환된 후 실시예 1에서 제조한 화합물과 반응하여 다시 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0350] 따라서, 실시예 1에서 제조한 화합물은 약물처리된 HeLa 세포에도 흡수되어 세포질 내 존재하는 글루타티온과 반응하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰시 강한 녹색 형광이 발생하므로, 약물 처리된 세포 내 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0352] <실험예 14> 본 발명에 따른 MNDA의 세포 내 바이오싸이올 검출능력 평가
- [0353] 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 글루타티온 및 호모시스테인에 대하여, 실시예 2에서 제조한 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0355] 1. 싸이올기 차단제가 포함된 세포내 글루타티온 검출능력 평가
- [0356] 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) 내 37°C 5% CO₂ 환경에서 HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 배양하였다.
- [0357] 싸이올 차단제로 알려져 있는 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM) 1mM을 30분 동안 전처리하거나 처리하지 않고, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 글루타티온을 100 µM 첨가한 후, RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10⁵세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed)하였다.
- [0358] 또한, NMM으로 전처리한 후 Cys 300 µM, Hcy 300 µM, GSH-MEE 1mM 각각을 추가로 첨가한 후 RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10⁵세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed)하였다.
- [0359] 24시간 후, 실시예 1에서 제조한 화합물 3 µM을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 함께 배양하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS) 으로 두 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다(여기 파장은 635nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 22에 나타내었다.
- [0361] 도 22 (a)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0362] 도 22 (b)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 시스테인을 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0363] 도 22 (c)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 호모시스테인을 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광

이미지이고,

[0364] 도 22 (d)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 GSH—MEE를 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

[0365] 도 22 (e)는 듀벨코 인산완충식염수(DPBS)로 세척한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.

[0367] 도 22 (a)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 상기 세포 내 존재하는 글루타티온과 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0368] 도 22 (b)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 시스테인을 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, NMM으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온이 억제되어 실시예 1에서 제조한 화합물이 반응할 아미노산이 존재하지 않게 되므로 적색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 또한, 청색 형광도 확인되지 않으므로 실시예 2의 화합물은 시스테인에 대해 형광반응을 보이지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0369] 도 22(c)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 호모시스테인을 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 호모시스테인과 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 청색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0370] 도 22(d)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 GSH—MEE를 처리한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, GSH-MEE와 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 청색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0371] 도 22(e)에 나타난 바와 같이, 듀벨코 인산완충식염수(DPBS)로 세척한 후, 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0373] 2. 약물처리된 세포내의 글루타티온 검출능력 평가

[0374] HeLa 세포에 NMM을 처리하는 대신에 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M과 시스플라틴(Cisplatin) 50 μ M을 각각 독립적으로 처리하고 추가적으로 GSH-MME 및 N-아세틸-1-시스테인(NAC)을 첨가하는 점을 빼고 상기 방법과 동일한 방법으로 세포 내의 글루타티온 검출능력을 평가하였다.

[0376] 도 23 (a)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

[0377] 도 23 (b)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

[0378] 도 23 (c)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 추가적으로 GSH-MEE를 첨가한 다음 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

[0379] 도 23 (d)는 HeLa 세포에 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

[0380] 도 23 (e)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 실시예 2에서 제조

한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,

[0381] 도 23 (f)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 추가적으로 NAC를 첨가한 다음 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이다.

[0383] 도 23 (a)-(c)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 BSO 약물을 처리한 후 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, BSO로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온 생성이 억제되어 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응할 글루타티온이 존재하지 않게 되므로 녹색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, GSH-MEE를 추가로 첨가하였을 때, GSH-MEE와 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응하여 다시 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0384] 도 23 (d)-(f)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 시스플라틴 약물을 처리한 후 실시예 2에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, 시스플라틴으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온 생성이 억제되어 실시예 2에서 제조한 화합물이 반응할 글루타티온이 존재하지 않게 되므로 녹색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, NAC를 추가로 첨가하였을 때, 세포 내에서 NAC가 GSH로 전환된 후 실시예 2에서 제조한 화합물과 반응하여 다시 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0386] 따라서, 실시예 2에서 제조한 화합물은 약물처리된 HeLa 세포에도 흡수되어 세포질 내 존재하는 글루타티온과 반응하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰시 강한 녹색 형광이 발생하므로, 약물 처리된 세포 내 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0388] <실험예 15> 본 발명에 따른 FNDA의 세포 내 바이오싸이올 검출능력 평가

[0389] 세포 내 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 바이오싸이올 중에서 글루타티온 및 호모시스테인에 대하여, 실시예 3에서 제조한 화합물의 선택적 검출능력을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0391] 1. 싸이올기 차단제가 포함된 세포내 글루타티온 검출능력 평가

[0392] 10% 열-비활성 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) 내 37℃ 5% CO₂ 환경에서 HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 배양하였다.

[0393] 싸이올 차단제로 알려져 있는 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM) 1mM을 30분 동안 전처리하거나 처리하지 않고, 싸이올기(R-SH)를 포함하는 아미노산인 글루타티온을 100 μM 첨가한 후, RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10⁴세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed)하였다.

[0394] 또한, NMM으로 전처리한 후 GSH-MEE 1mM을 추가로 첨가한 후 RPMI 1640 배지 내 디쉬 당(per dish) 3×10⁴세포 밀도로 35-mm 유리 바텀 디쉬(glass bottomed dishes)에 상기 세포를 시딩(seed) 하였다.

[0395] 24시간 후, 실시예 3에서 제조한 화합물 3 μM을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 함께 배양하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS) 으로 두 차례에 걸쳐 세척하여 잔여 화합물을 제거한 후, 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 이미지화하였다(여기 파장은 635nm, 밴드 패스(band-path, BP)가 655-755 nm인 방출 필터를 사용하였다). 그 결과를 도 24에 나타내었다.

[0397] 도 24 (a)는 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

[0398] 도 24 (b)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,

- [0399] 도 24 (c)는 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 GSH-MEE를 처리한 후, 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 다음 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이다.
- [0401] 도 24 (a)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, 상기 세포 내 존재하는 글루타티온과 실시예 3에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0402] 도 24 (b)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 경우, NMM으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온이 억제되어 실시예 3에서 제조한 화합물이 반응할 아미노산이 존재하지 않게 되므로 적색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0403] 도 24(c)에 나타난 바와 같이, 싸이올 차단제인 N-메틸말레이미드 (N-methylmaleimide, NMM)로 전처리한 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하고, 다시 GSH-MEE를 추가로 첨가하여 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, GSH-MEE와 실시예 3에서 제조한 화합물이 반응하여 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0405] 2. 약물처리된 세포내의 글루타티온 검출능력 평가
- [0406] HeLa 세포에 NMM을 처리하는 대신에 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M과 시스플라틴(Cisplatin) 50 μ 을 각각 독립적으로 처리하고 추가적으로 GSH-MME 및 N-아세틸-1-시스테인(NAC)를 첨가하는 점을 빼고 상기 방법과 동일한 방법으로 세포 내의 글루타티온 검출능력을 평가하였다.
- [0408] 도 25 (a)는 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0409] 도 25 (b)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,
- [0410] 도 25 (c)는 HeLa 세포에 감마-글루타미시스테인 합성 효소의 억제제로 알려진 부티오닌 설포시민(BSO) 100 μ M을 처리한 후 추가적으로 GSH-MEE를 첨가한 다음 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,
- [0411] 도 25 (d)는 HeLa 세포에 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가한 후 공초점 레이저 주사현미경을 사용하여 관찰한 형광 이미지이고,
- [0412] 도 25 (e)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이고,
- [0413] 도 25 (f)는 HeLa 세포에 GSH 감소제로 알려진 항암제 시스플라틴(Cisplatin)을 전처리한 후 추가적으로 NAC를 첨가한 다음 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 형광 이미지이다.
- [0415] 도 25 (a)-(c)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 BSO 약물을 처리한 후 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, BSO로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하는 글루타티온 생성이 억제되어 실시예 3에서 제조한 화합물이 반응할 글루타티온이 존재하지 않게 되므로 녹색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, GSH-MEE를 추가로 첨가하였을 때, GSH-MEE와 실시예 3에서 제조한 화합물이 반응하여 다시 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.
- [0416] 도 25 (d)-(f)에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에 시스플라틴 약물을 처리한 후 실시예 3에서 제조한 화합물을 첨가하여 공초점 레이저 주사현미경을 통해 관찰한 경우, 시스플라틴으로 인하여 HeLa 세포의 세포질 내 존재하

는 글루타티온 생성이 억제되어 실시예 3에서 제조한 화합물이 반응할 글루타티온이 존재하지 않게 되므로 녹색 형광이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, NAC를 추가로 첨가하였을 때, 세포 내에서 NAC가 GSH로 전환된 후 실시예 3에서 제조한 화합물과 반응하여 다시 강한 녹색 형광이 관찰되는 것으로 나타났다.

[0418] 따라서, 실시예 3에서 제조한 화합물은 약물처리된 HeLa 세포에도 흡수되어 세포질 내 존재하는 글루타티온과 반응하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰시 강한 녹색 형광이 발생하므로, 약물 처리된 세포 내 글루타티온을 선택적으로 검출하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0420] <실험예 16> 본 발명에 따른 NDA 및 FNDA의 패혈증 진단능력 평가

[0421] 실시예 1 및 실시예 3에서 제조한 화합물을 패혈증 진단에 사용할 수 있는지 평가하기 위하여 임상 실험을 수행하였다.

[0423] 112명의 실험자를 대상으로 혈액을 채취하여 혈장내의 글루타티온 농도의 증감 수치를 확인함으로써 패혈증 진단 능력을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 2에 정리하여 나타내었다.

표 2

		정상인 표본	패혈증 환자 표본	P-값
표본수		15	97	
평균연령		26	71	<0.001
성별	남성	9	70	0.369
	여성	6	27	
감염 경로	폐	-	60	
	간	-	9	
	위장	-	13	
	비뇨기	-	8	
	기타	-	7	
NDA의 형광강도		173.9(153.0-175.5)	97.7(79.7-113.2)	<0.001
FNDA의 형광강도		88.1(80.2-118.7)	63.6(47.2-72.5)	<0.001

[0426] 상기 표 2에서도 확인할 수 있듯이 정상인 표본에 비해 패혈증 환자 표본의 형광 강도 크기가 현저히 낮다는 것을 알 수 있다.

[0428] 또한, 상기 패혈증 환자 표본을 28일 후 생존한 집단과 28일 후 사망한 집단으로 구분하여 상기 방법과 동일하게 본 발명에 따른 NDA와 FNDA를 통한 패혈증 진단을 실시하였으며 그 결과를 하기 표 3에 정리하여 나타내었다.

표 3

		28일 후 생존집단	28일 후 사망집단	P-값
표본수		61	36	
연령		71	70.5	0.778
성별	남	46	24	0.415
	여	15	12	

감염 부위	폐	37	23	
	간	5	4	
	위장	9	4	
	비뇨기	7	1	
	기타	3	4	
NDA의 형광강도		103.8	80.8	<0.001
FNDA의 형광강도		66.3	48.7	<0.001

[0432] 상기 표 3에서도 확인할 수 있듯이 28일 후 생존한 표본에 비해 28일 후 사망한 표본의 형광 강도 크기가 현저히 낮다는 것을 알 수 있다.

[0434] 따라서, 본 발명에 따른 패혈증 진단용 화학센서는 세포 내 글루타티온을 선택적으로 검출하여 글루타티온 농도를 확인할 수 있으므로 글루타티온 농도수준을 통한 패혈증을 진단하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0436] <실험예 17> 본 발명에 따른 MNDA 및 FNDA의 세포내 독성 평가

[0437] 본 발명에 따른 실시예 2 및 실시예 3에서 제조한 화합물의 세포독성을 평가하기 위하여 HeLa세포를 대상으로 MNDA 및 FNDA의 다양한 농도별 표준 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석 실험을 수행하였다.

[0438] HeLa 세포(인간 상피선암 세포, Korea Cell Line Bank)를 96-웰 플레이트에 시딩(seed) 하였다. 하루 동안 배양한 후, 상기 세포를 MNDA 또는 FNDA (0 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M)와 함께 37°C에서 24시간 동안 함께 배양하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)로 세척한 후, MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma) 0.5 mg/mL를 37°C에서 4시간 동안 첨가하고, 생성되는 포르마잔(formazan)을 0.1 mL DMSO에 용해시킨 후, Spectramax Microwell plate reader를 사용하여 OD 650nm 부근을 읽었다. 그 결과를 도 26에 표기하였다.

[0440] 도 26은 MTT 분석을 통해 측정된 MNDA 및 FNDA의 농도별 세포 생사율을 나타낸 그래프이다. (a)는 MNDA, (b)는 FNDA의 농도별 세포 생사율이다.

[0442] 도 26에서도 확인할 수 있듯이 본 발명에 따른 화학센서의 세포내 농도가 증가하더라도 세포 생존율이 90%이상을 유지하는 것을 알 수 있다.

[0444] 따라서, 본 발명에 따른 화학센서는 세포 독성이 약하므로 혈액세포내 글루타티온 농도를 검출함으로써 패혈증의 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[0446] <실험예 18> 본 발명에 따른 화합물의 결합 구조 및 메커니즘 분석 실험

[0447] 본 발명에 따른 화합물 실시예 1-3의 화합물 NDA, MNDA, FNDA가 글루타티온 또는 호모시스테인과 결합할때의 구조 및 결합 메커니즘을 확인하기 위해 고속액체 크로마토그래피-질량분석법(HPLC-MS) 측정과 핵자기공명 분석법(NMR) 측정을 수행하였다.

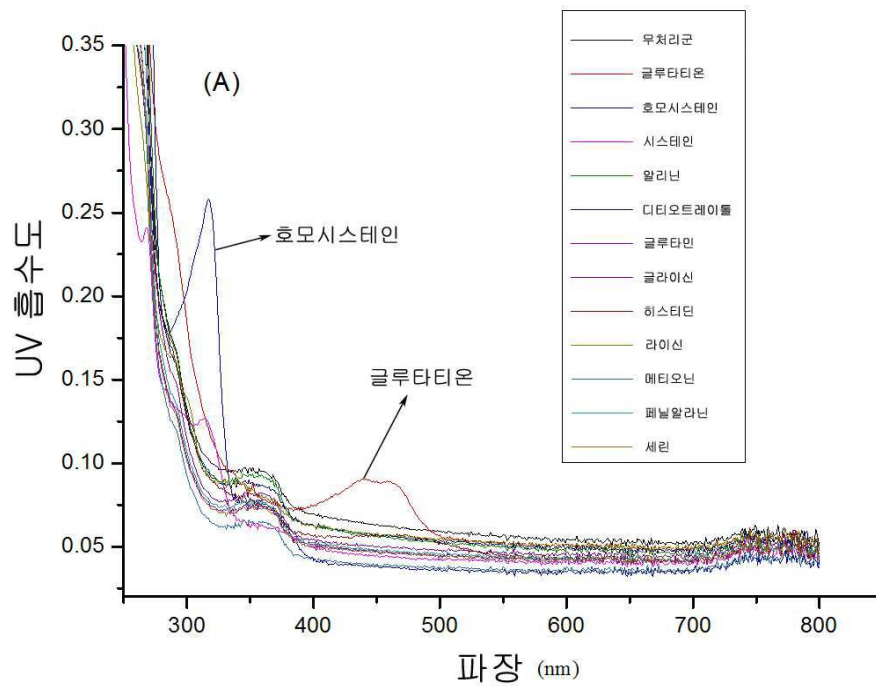
[0448] 1. HPLC-MS 측정 실험

[0449] 본 발명에 따른 화합물 NDA, MNDA, FNDA의 HPLS-MS 데이터와 NDA, MNDA, FNDA가 각각 글루타티온 또는 호모시스테인과 결합했을 때의 HPLS-MS 데이터를 측정하였으며 그 결과를 도 27 내지 도 37에 나타내었다.

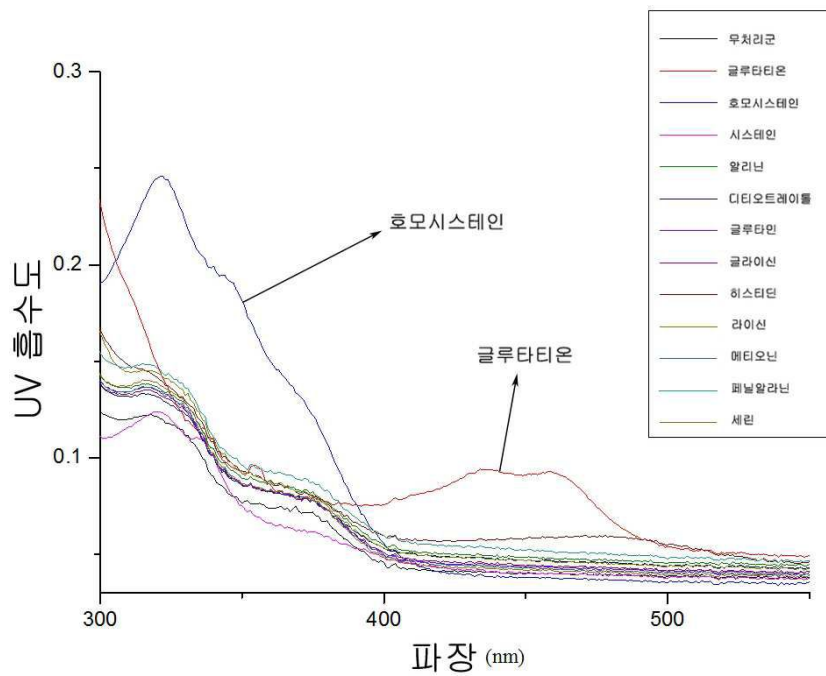
- [0451] 도 27은 본 발명에 따른 NDA의 HPLS-MS 데이터이다.
- [0452] 도 28 및 도 29는 본 발명에 따른 NDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.
- [0453] 도 30은 본 발명에 따른 MNDA의 HPLS-MS 데이터이다.
- [0454] 도 31 및 도 32는 본 발명에 따른 MNDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.
- [0455] 도 33 및 도 34는 본 발명에 따른 MNDA와 호모시스테인이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.
- [0456] 도 35는 본 발명에 따른 FNDA의 HPLS-MS 데이터이다.
- [0457] 도 36 및 도 37는 본 발명에 따른 FNDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 HPLS-MS 데이터이다.
- [0459] 1. NMR 측정 실험
- [0460] 본 발명에 따른 화합물 NDA가 글루타티온과 결합했을 때의 NMR 데이터를 측정하였으며 그 결과를 도 38 내지 도 42에 나타내었다.
- [0462] 도 38은 NDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 ^1H -NMR 데이터이다.
- [0463] 도 39는 NDA와 글루타티온이 결합한 화합물의 ^{13}C -NMR 데이터이다.
- [0464] 도 40은 NDA와 글루타티온이 결합했을 때의 ^1H - ^{13}C HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) NMR 데이터이다.
- [0465] 도 41은 NDA와 글루타티온이 결합했을 때의 ^1H - ^{13}C HSQC(Heteronuclear single quantum coherence) NMR 데이터이다.
- [0466] 도 42는 NDA와 글루타티온이 결합했을 때의 COSY(Correlation spectroscopy) 2D NMR 데이터이다.
- [0468] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 두 개의 알데하이드기가 아미노산의 사이올기 및 아민기와 동시에 결합하되, 아미노산의 아민기는 두 개의 알데하이드기와 함께 결합하여 질소 원자를 포함하는 5각 구조의 헤테로 사이클로 알킬을 형성하며, 아미노산의 사이올기는 상기 헤테로 사이클로 알킬의 질소 원자 바로 옆의 탄소와 결합하여 싸이오에터(thioether) 결합을 형성함을 알 수 있다.

도면

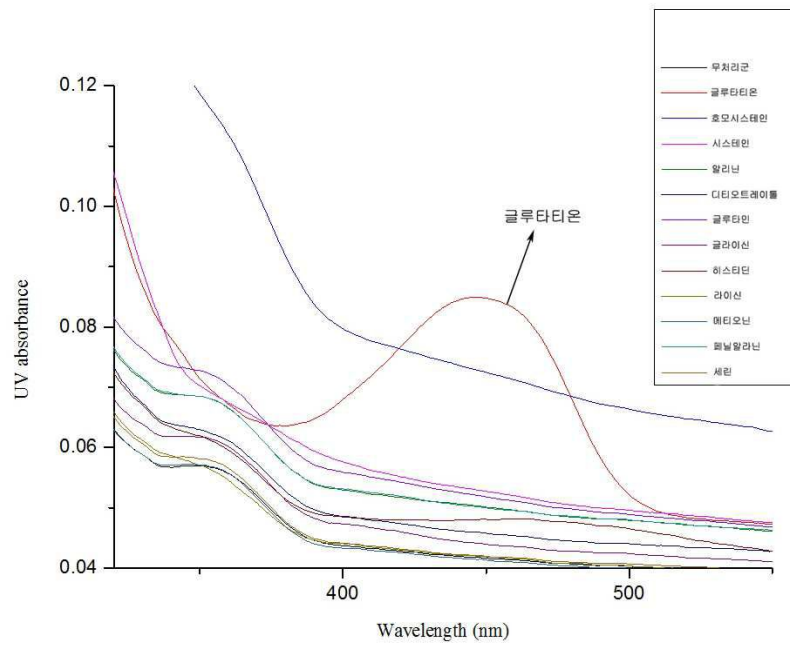
도면1



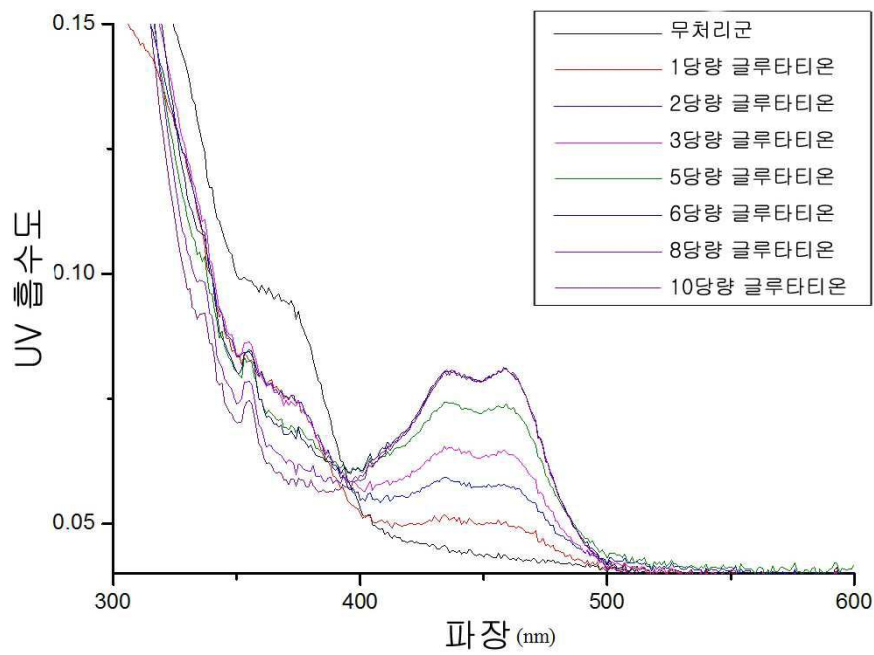
도면2



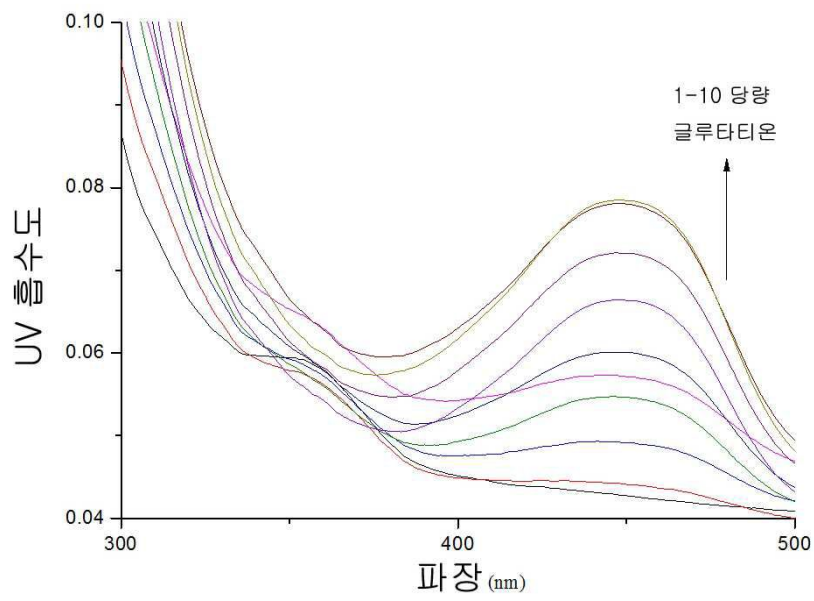
도면3



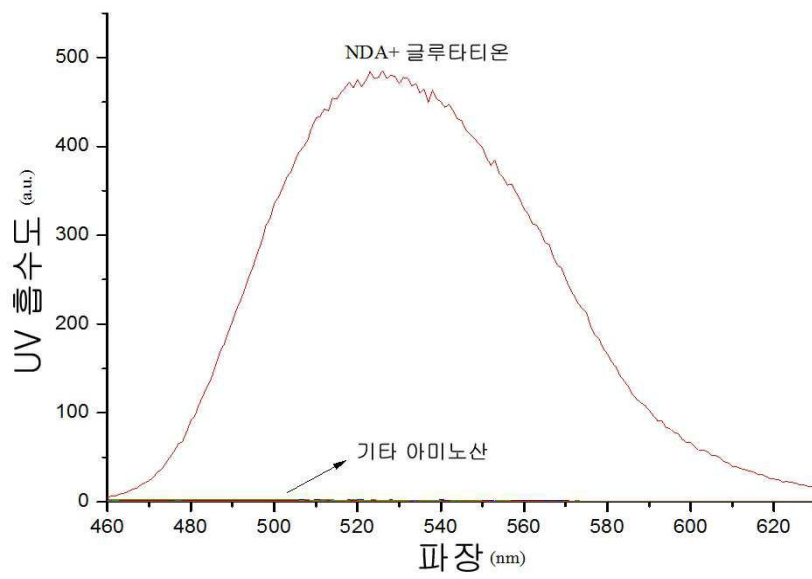
도면4



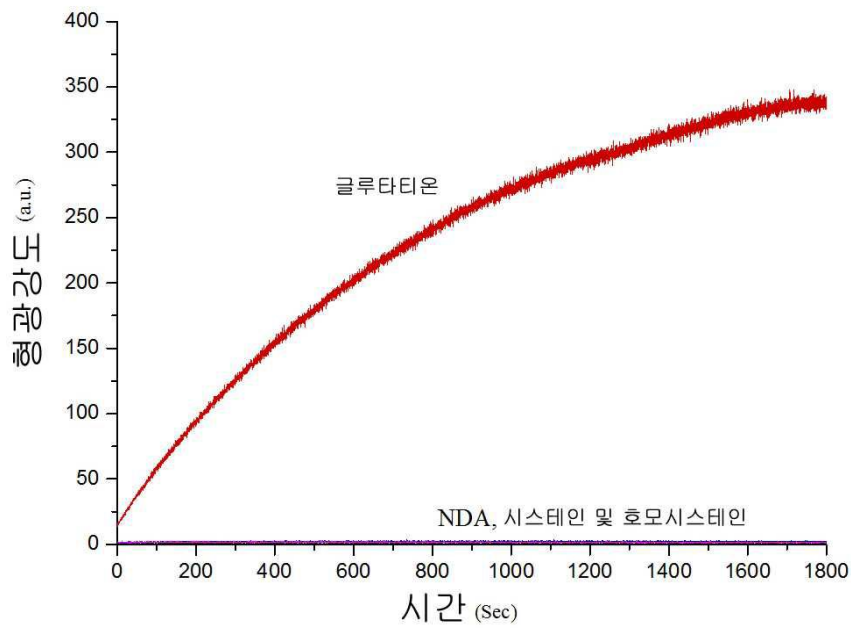
도면5



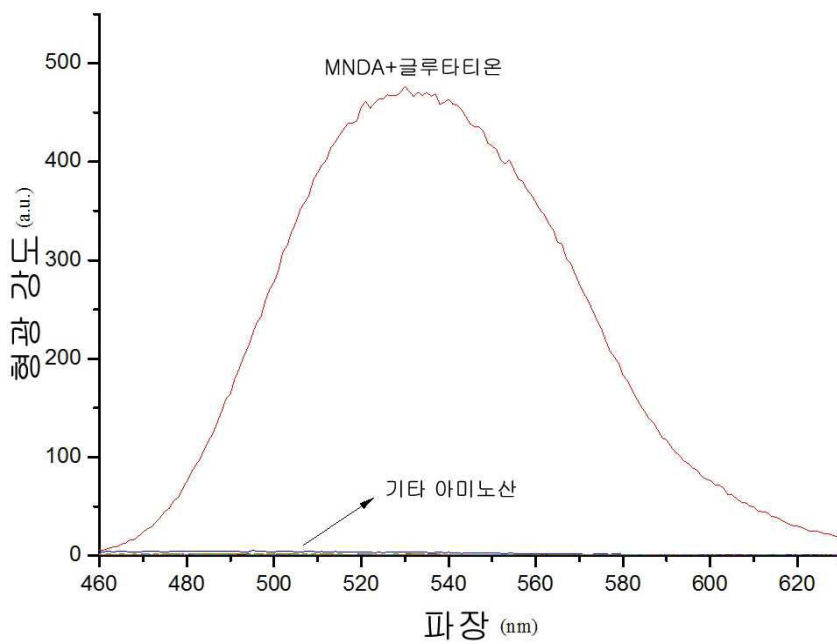
도면6



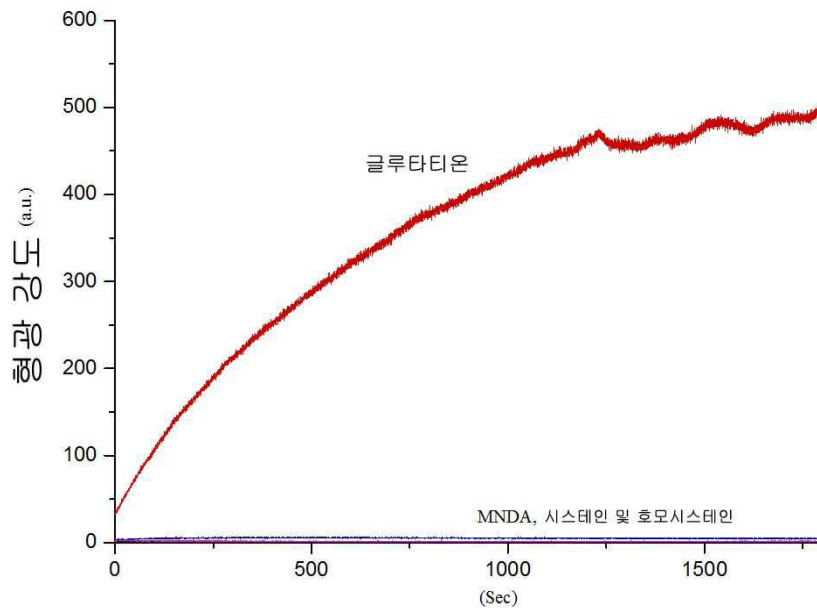
도면7



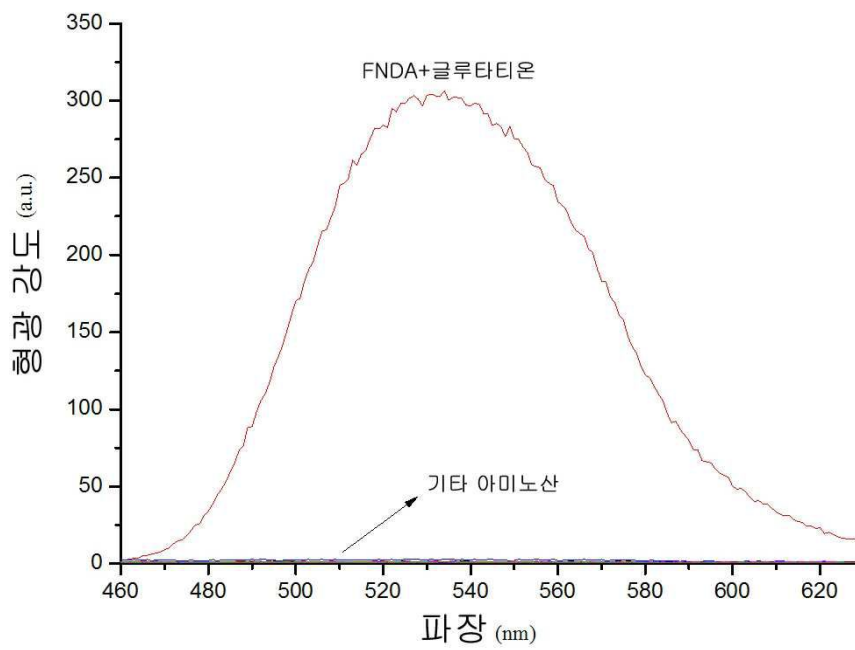
도면8



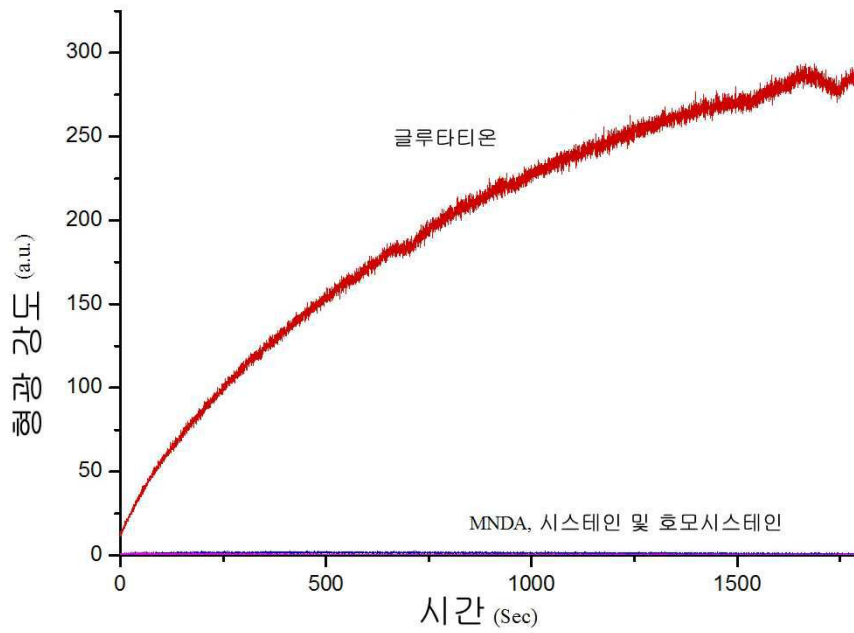
도면9



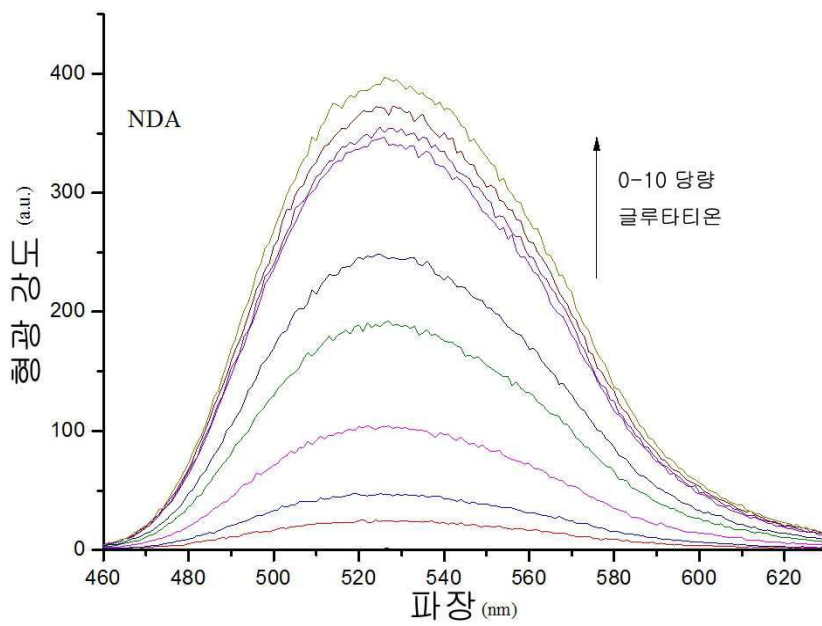
도면10



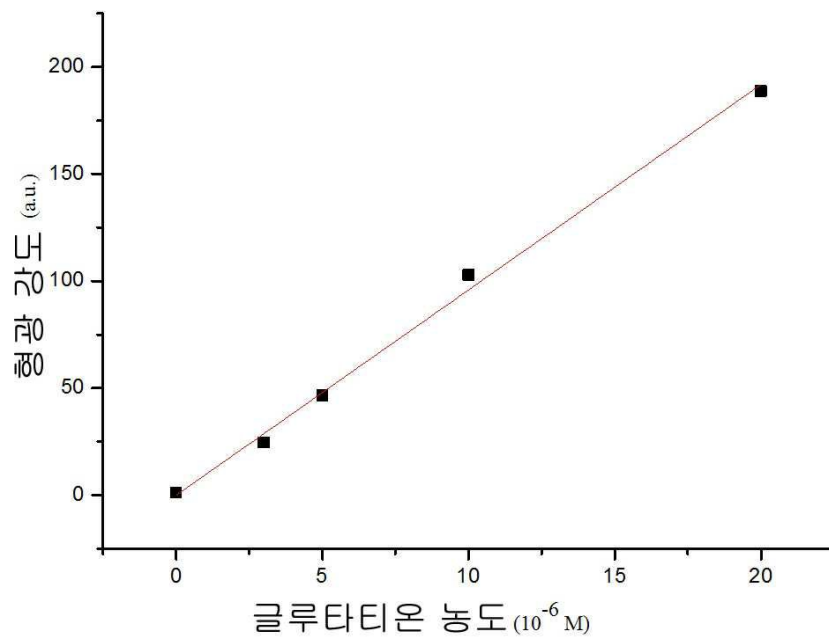
도면11



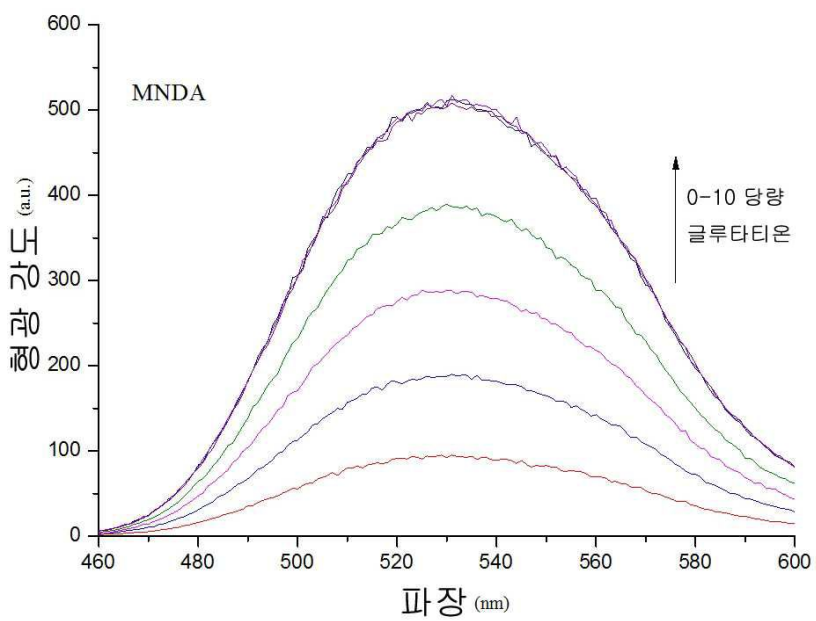
도면12



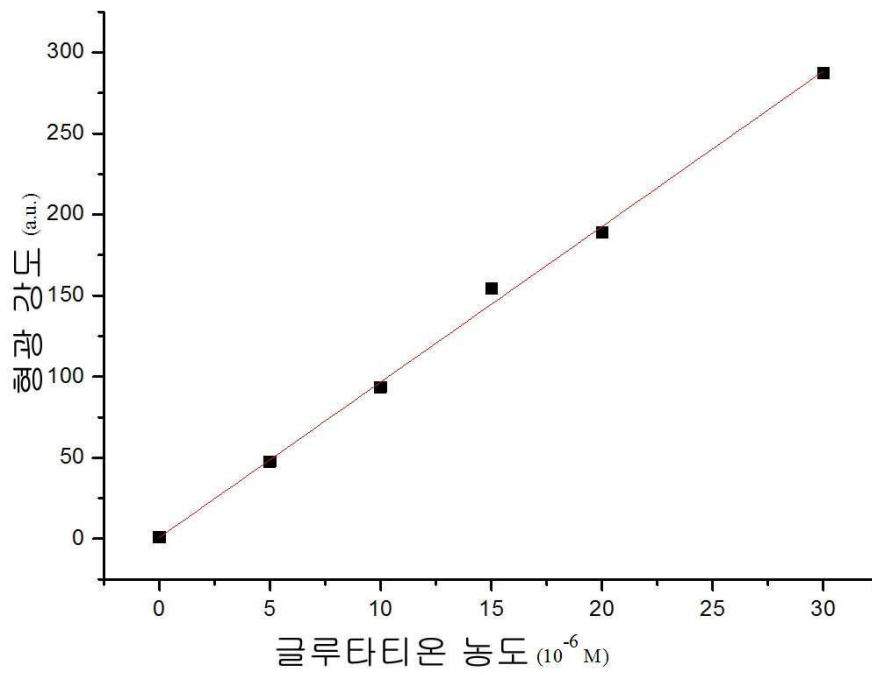
도면13



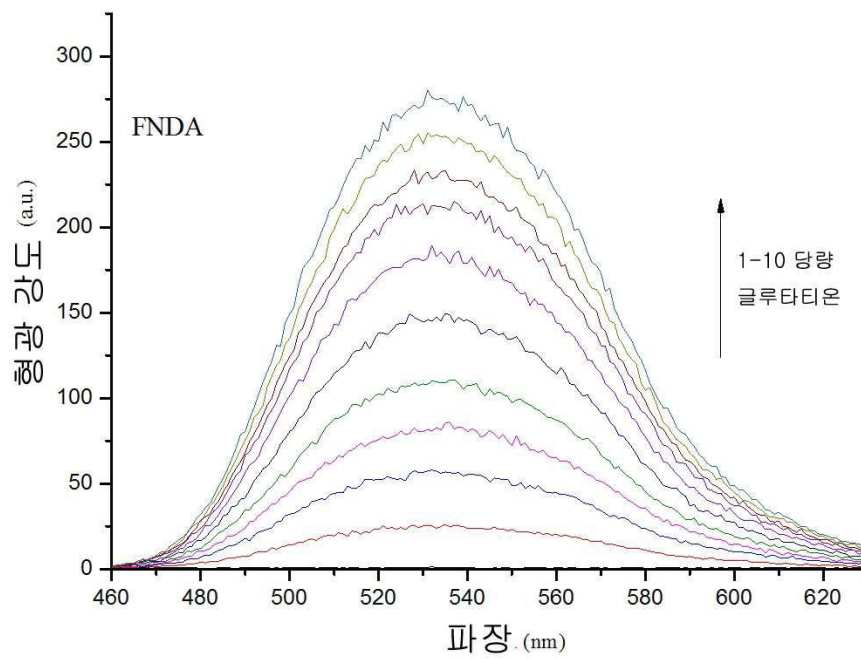
도면14



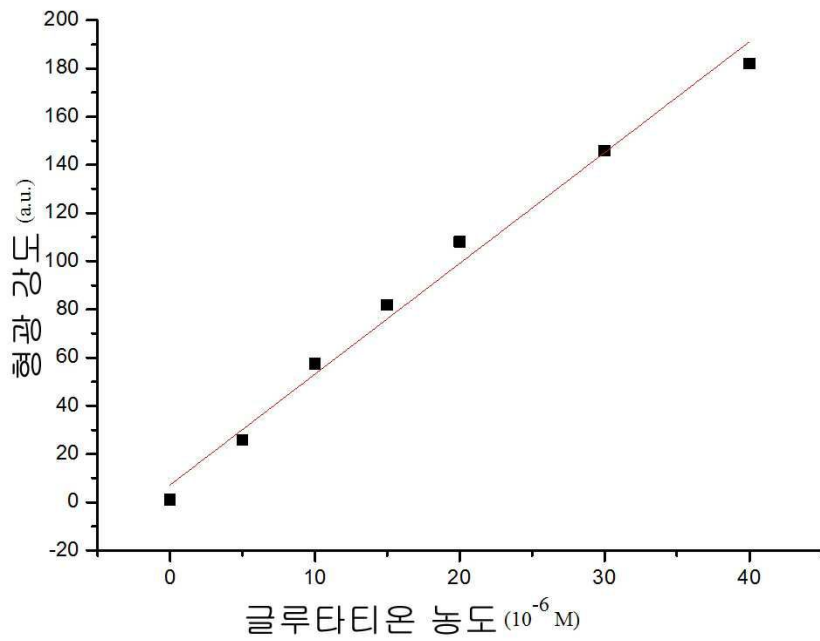
도면15



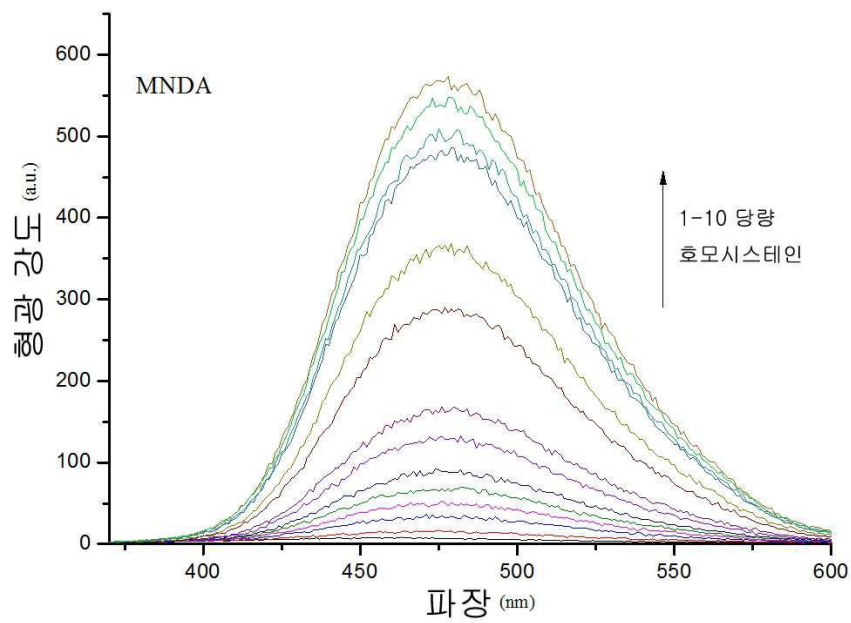
도면16



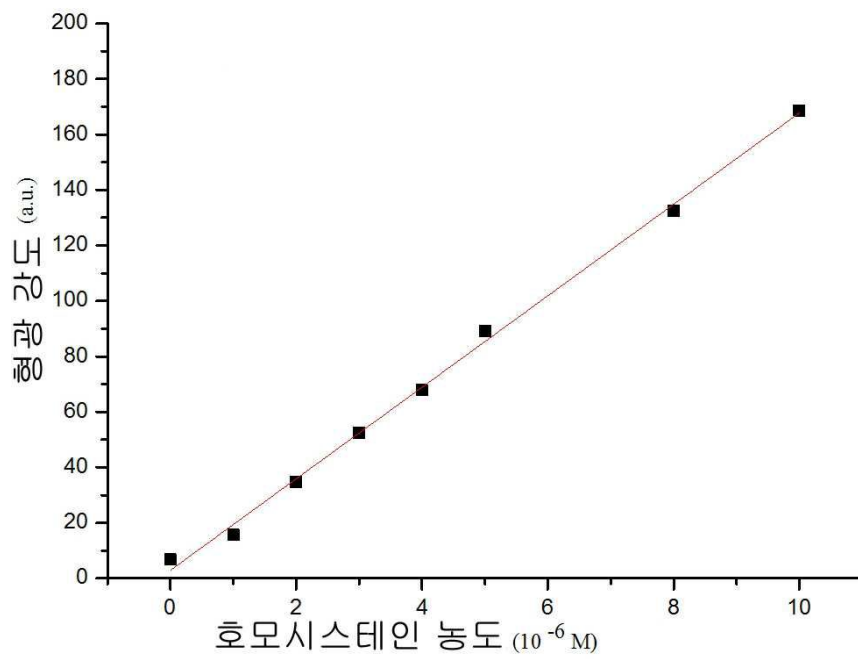
도면17



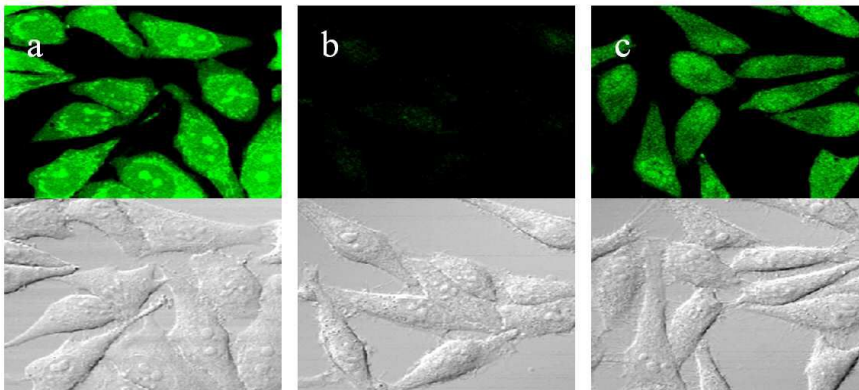
도면18



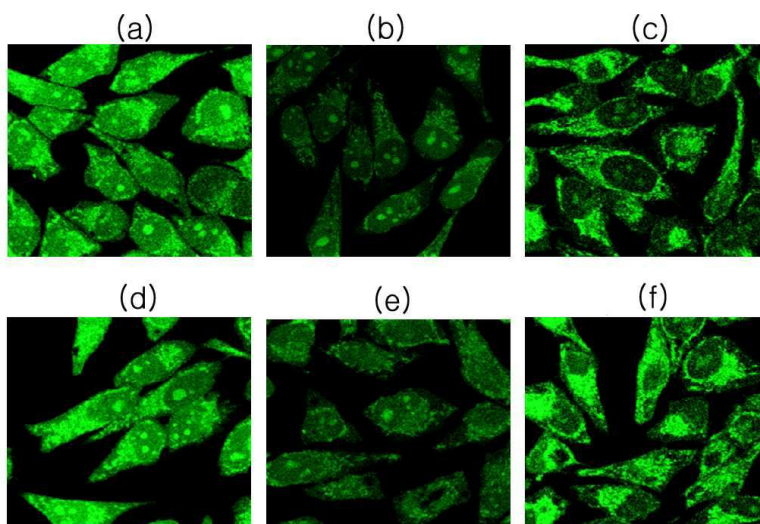
도면19



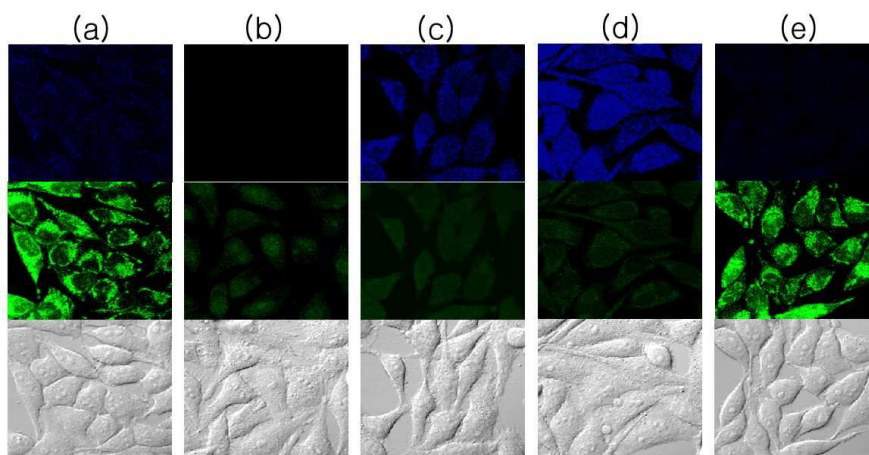
도면20



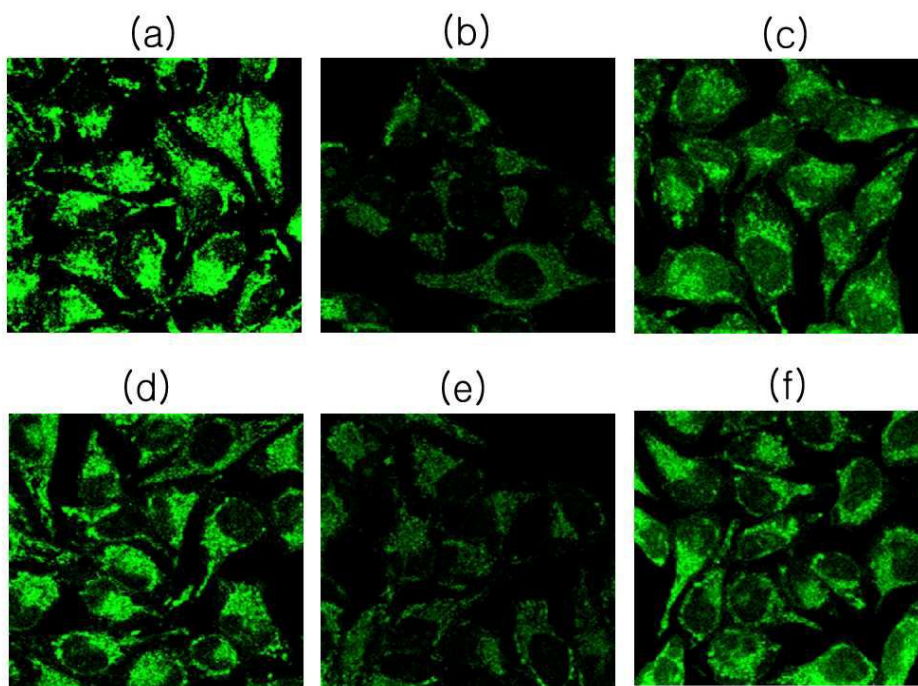
도면21



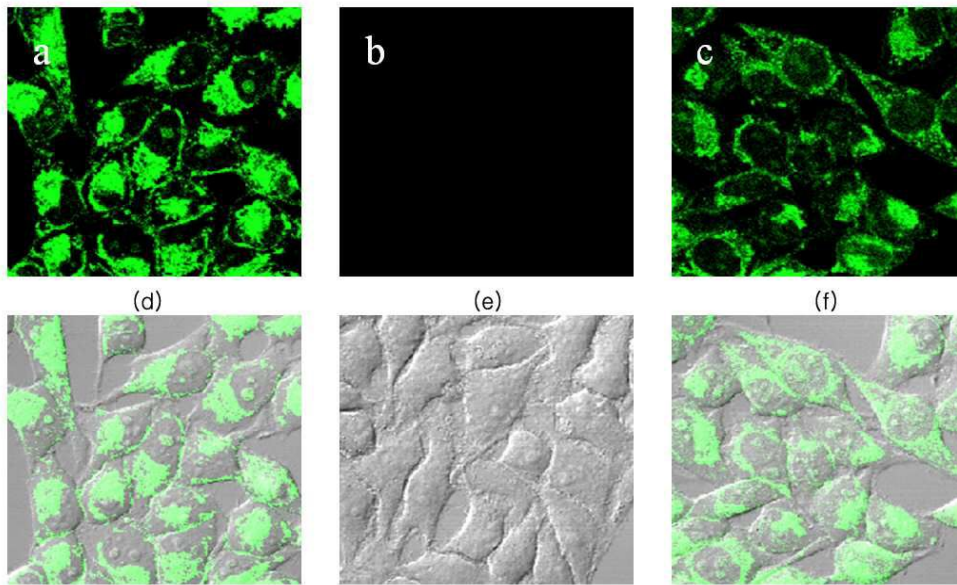
도면22



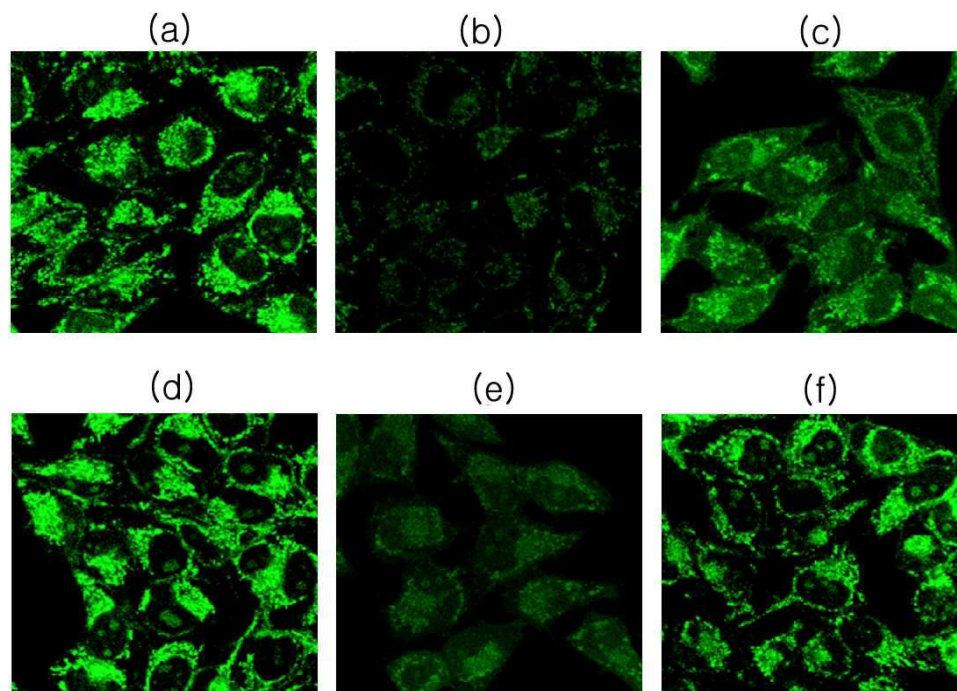
도면23



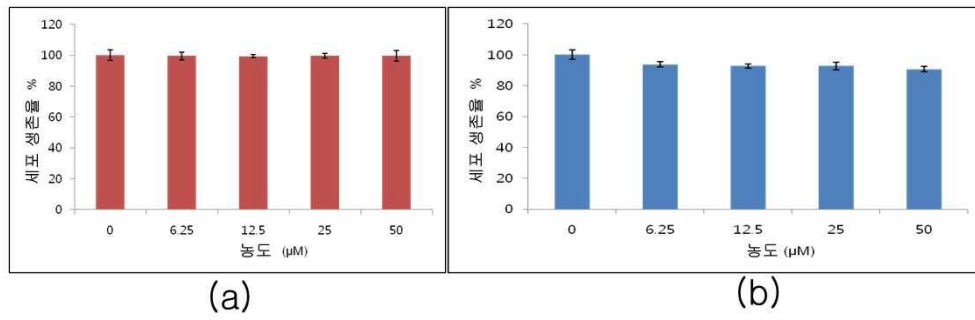
도면24



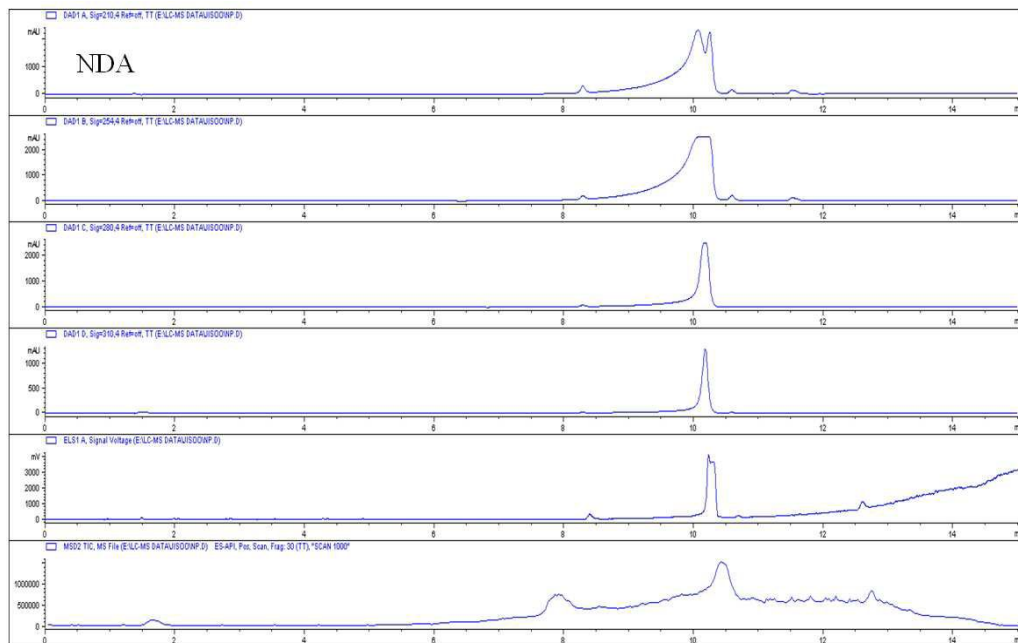
도면25



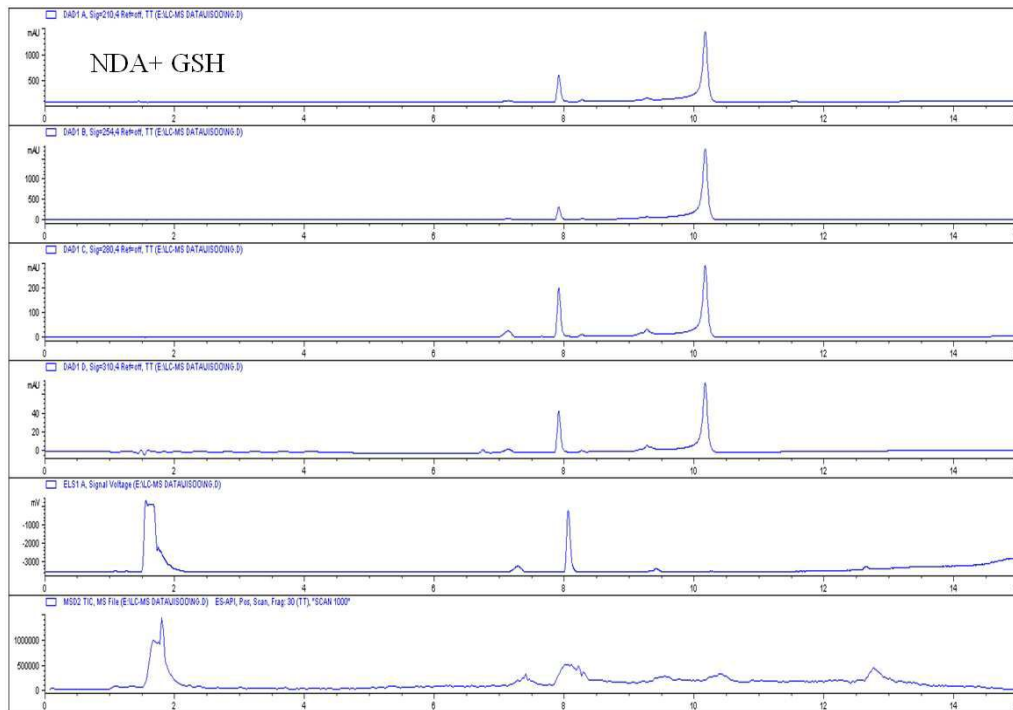
도면26



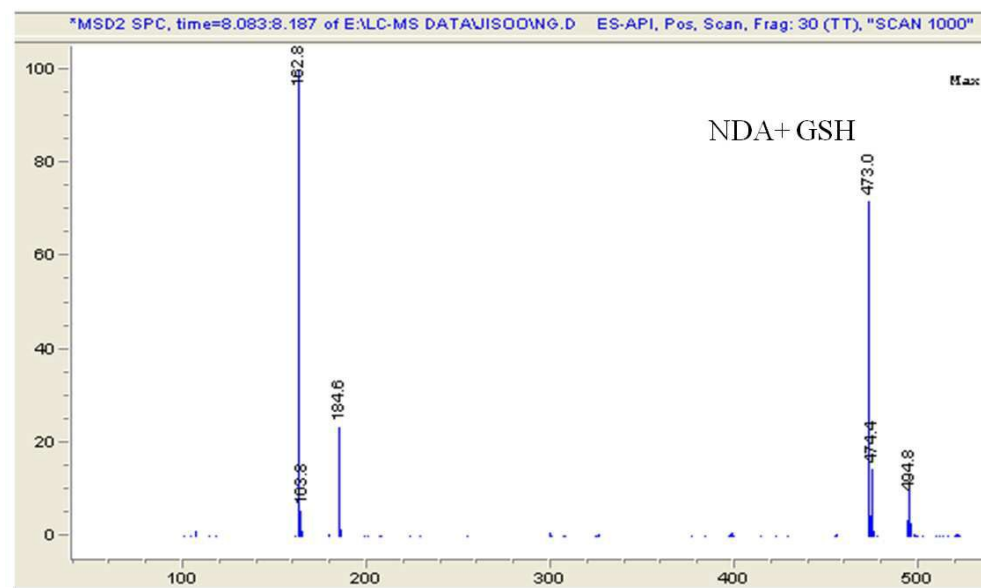
도면27



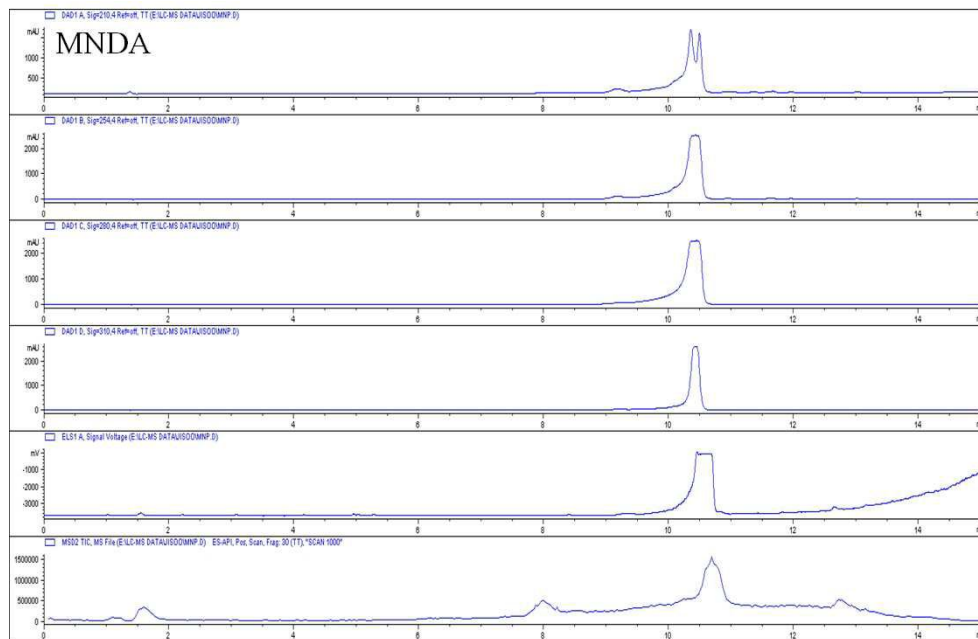
도면28



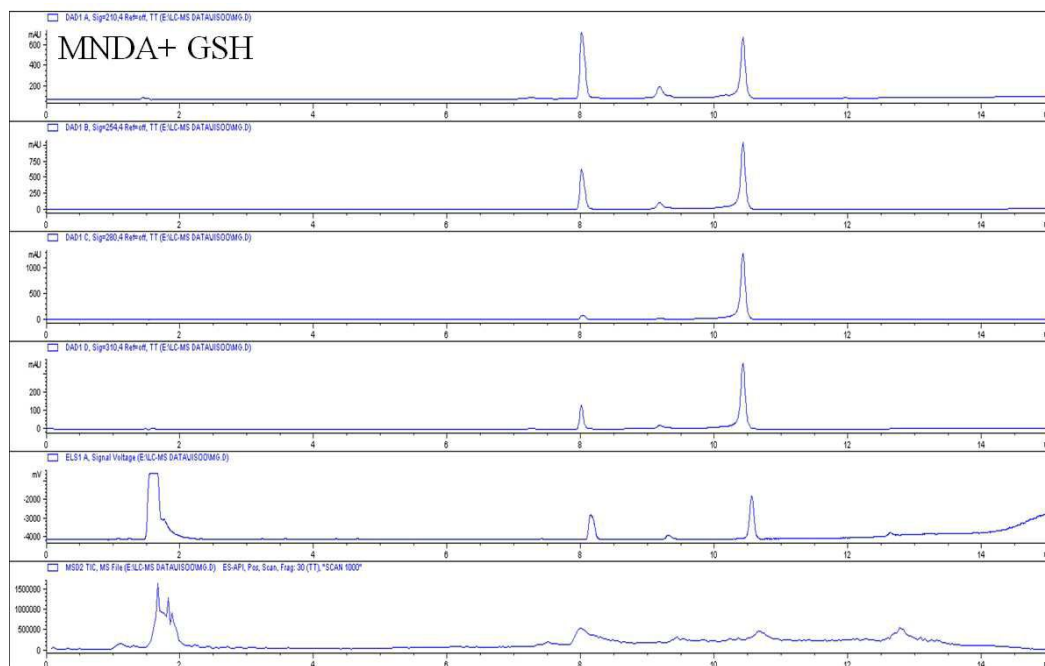
도면29



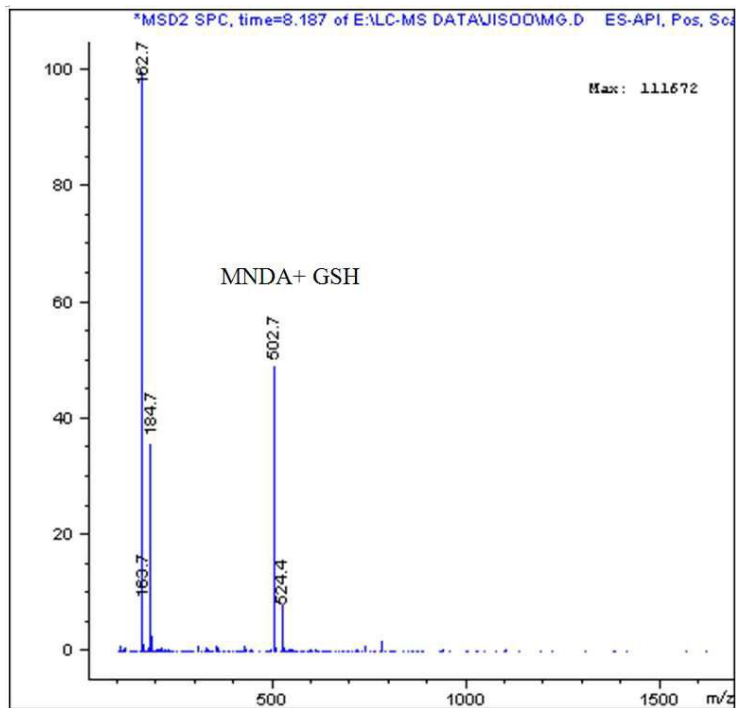
도면30



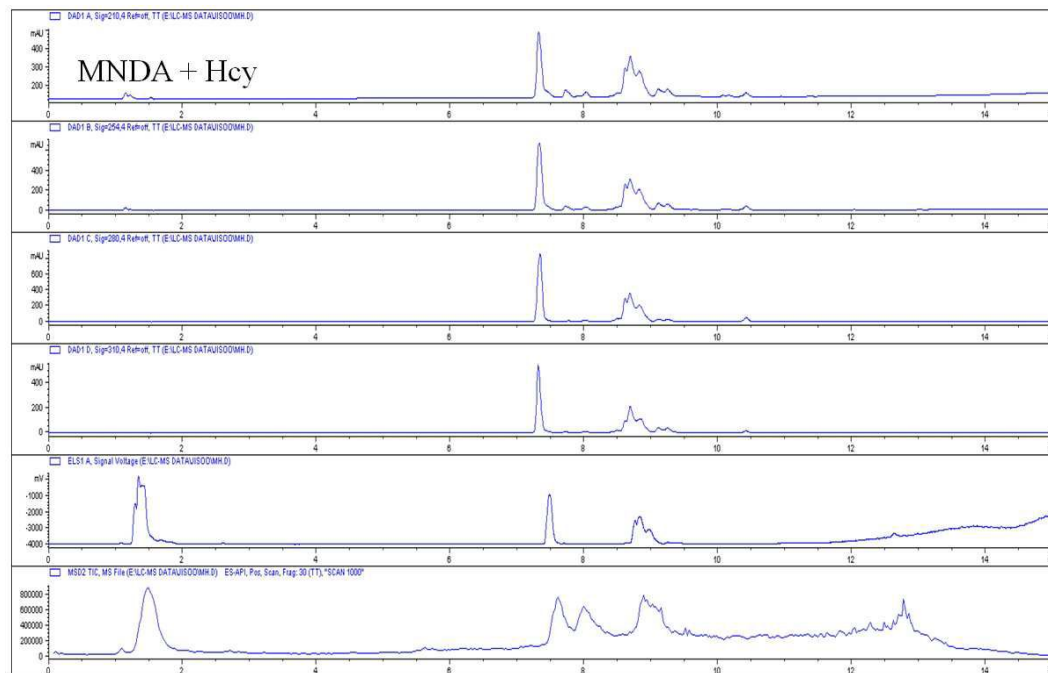
도면31



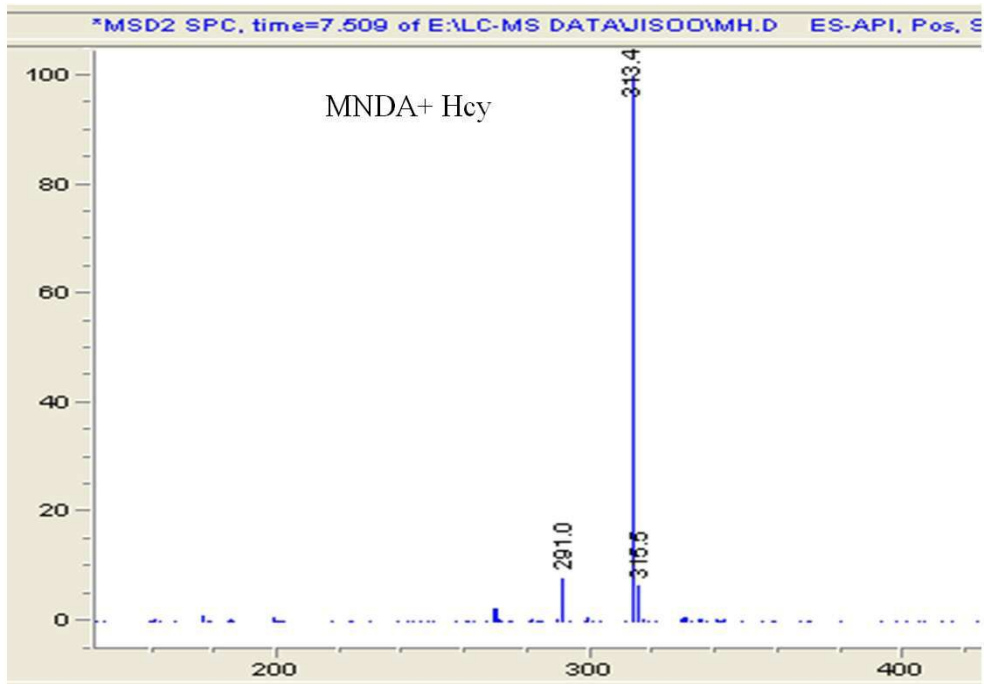
도면32



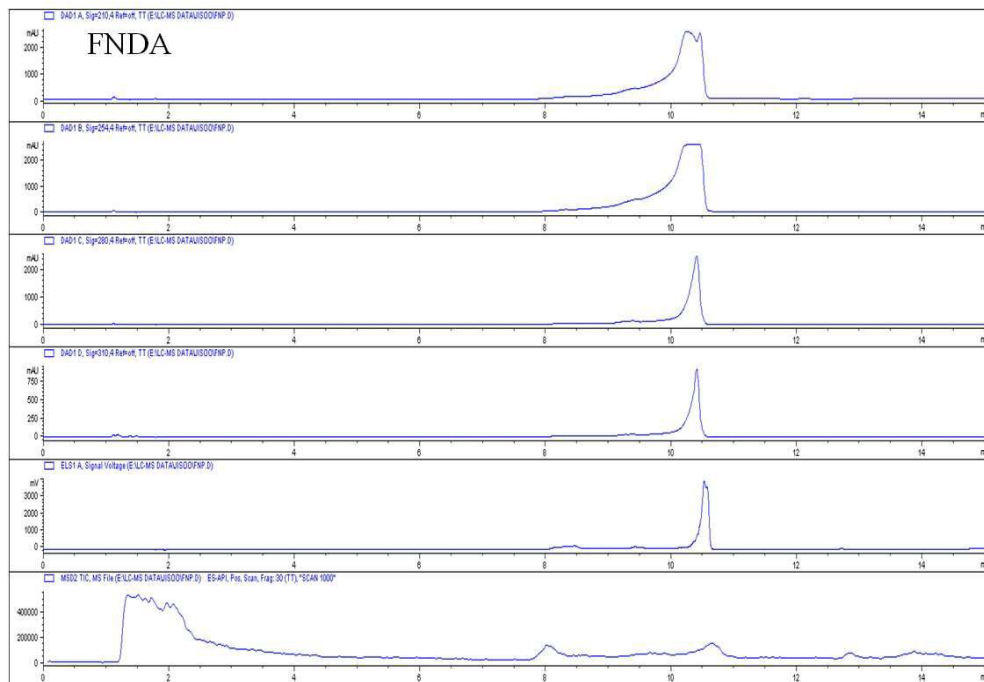
도면33



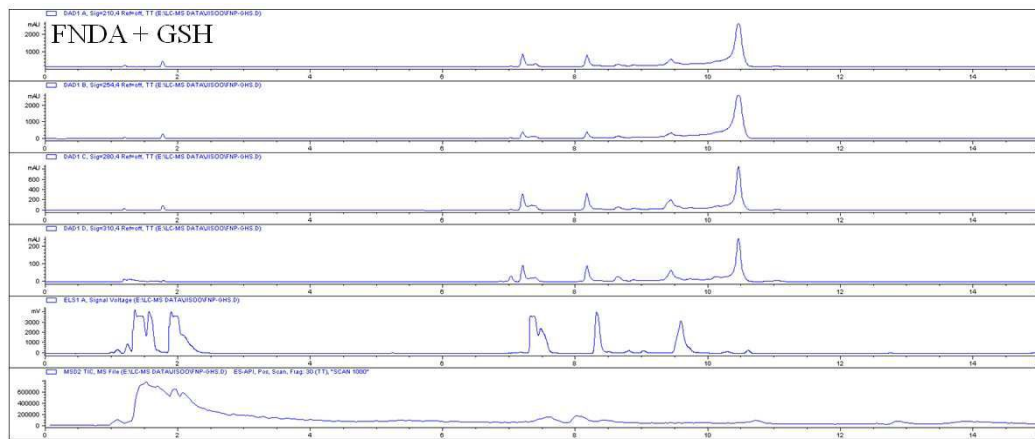
도면34



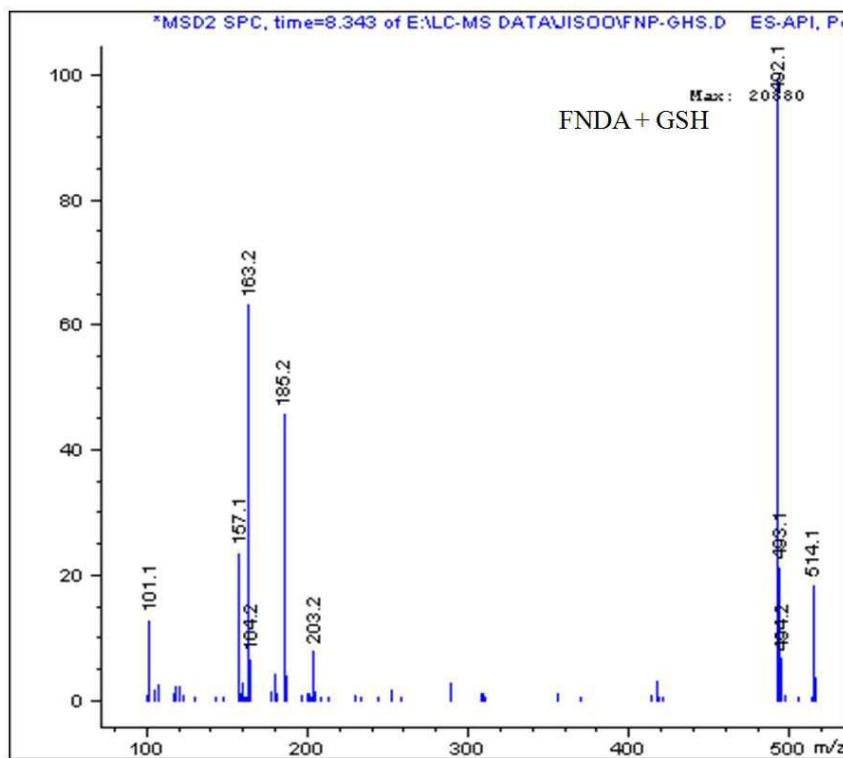
도면35



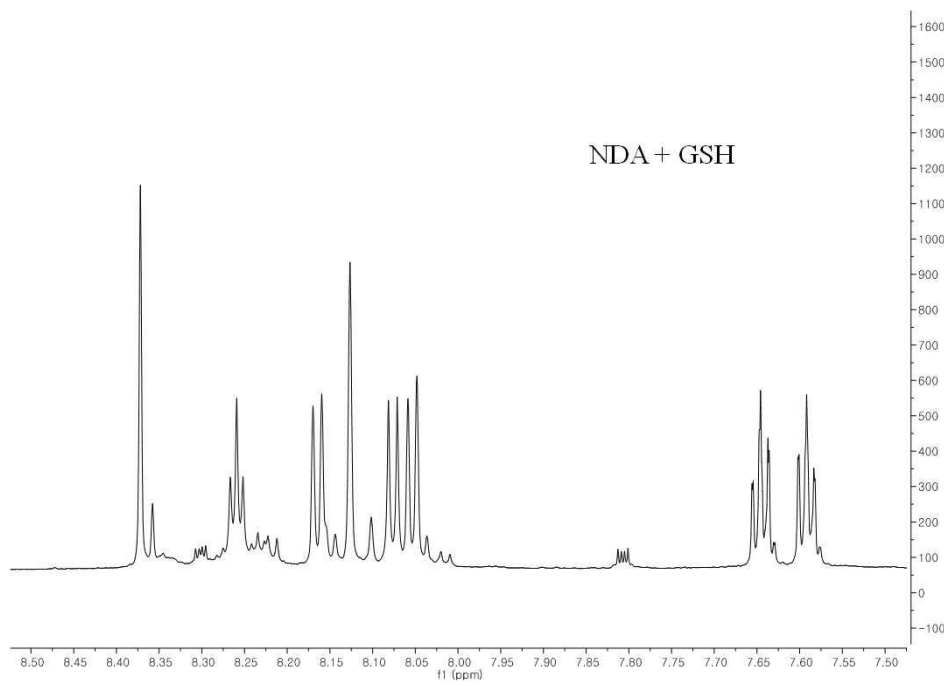
도면36



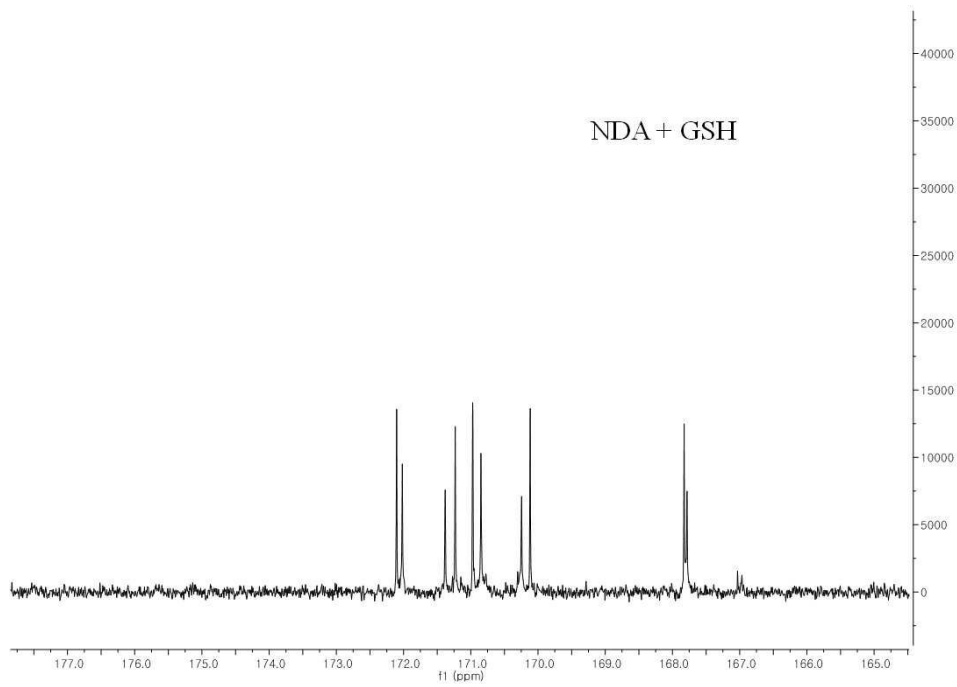
도면37



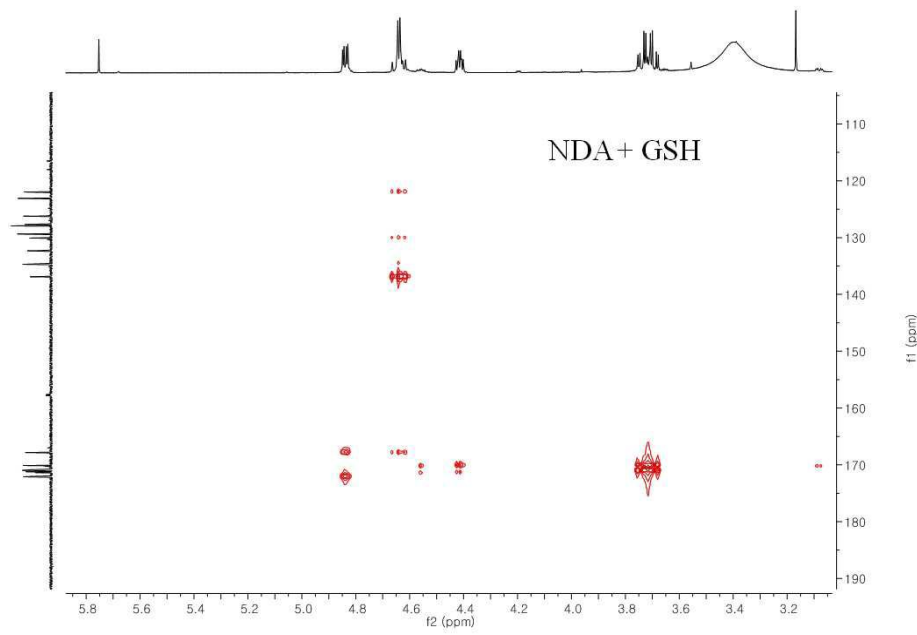
도면38



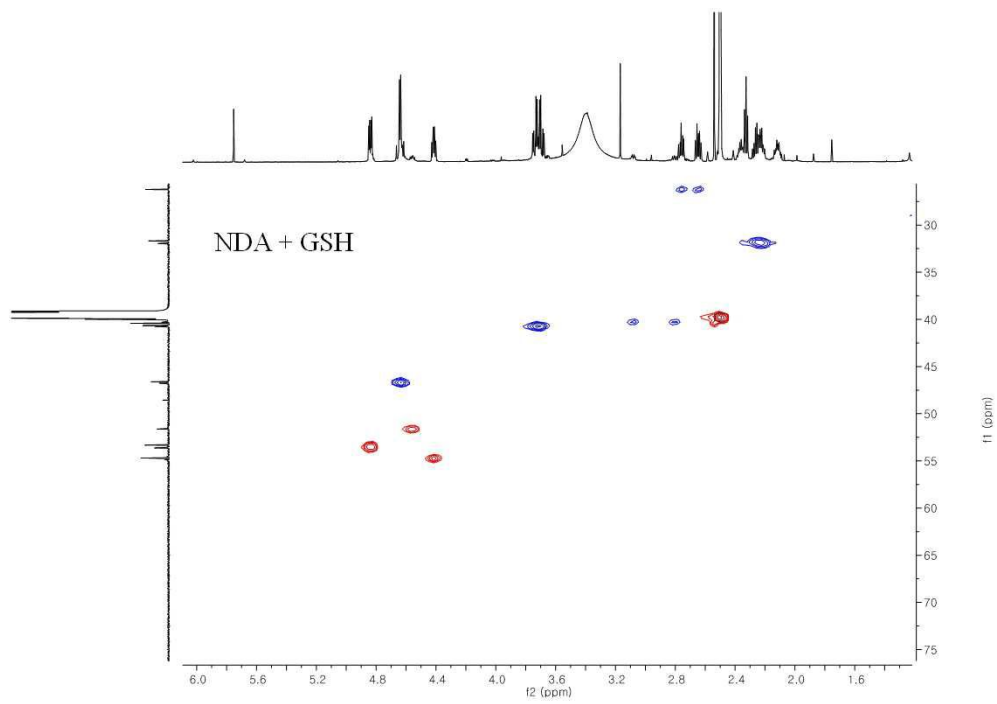
도면39



도면40



도면41



도면42

