(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0161270
(43) 공개일자 2023년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01) *G01N 21/76* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 21/76 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0061111
(22) 출원일자 2022년05월18일
심사청구일자 2023년05월16일

(71) 출원인
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
(72) 발명자
김범수
대구광역시 동구 메디밸리로 35 (사복동, 대구혁신엘에이치이노힐즈)
장영태
부산광역시 남구 유엔로108번길 9 (대연동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 9 항

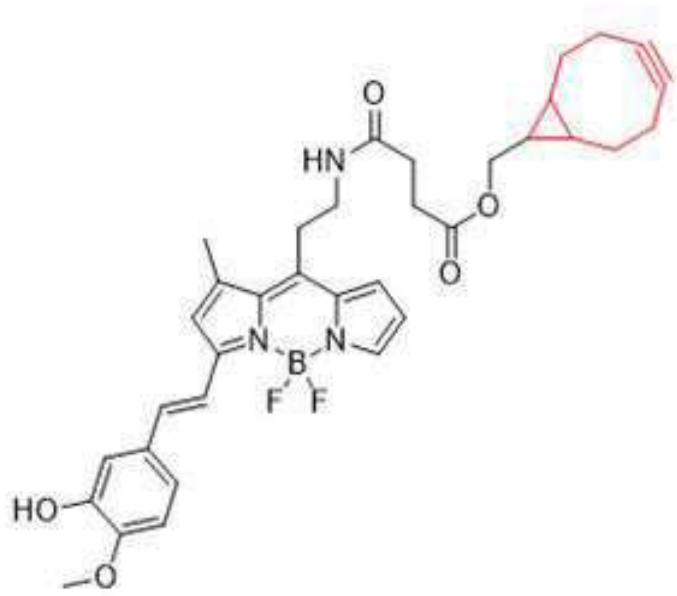
(54) 발명의 명칭 **활동 중인 뇌 신경망 내 미세아교세포의 세포 내 구조 분석을 위한 저분자 형광물질 및 이를 이용한 미세아교세포의 세포 내 구조 분석방법**

(57) 요 약

본 발명은 활동 중인 뇌 신경망 내 미세아교세포의 세포 내 구조 분석을 위한 저분자 형광물질 및 이를 이용한 미세아교세포의 세포 내 구조 분석방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 UGT1A7C(UDP glucuronosyltransferase 1 family)를 발현하는 세포를 특이적으로 표적화하기 위한 형광 프로브 화합물, 상기

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



형광 프로브 화합물을 포함하는 미세아교세포 검출용 조성물 및 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물에 관한 것이며, 또한 본 발명은 (1) 시험관 내의 세포에 세포 내 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 처리하는 단계; (2) 상기 (1) 단계의 화합물이 처리된 미세아교세포에 본 발명의 형광 프로브 화합물을 처리하여 클릭 반응(click reaction)을 유도하는 단계; 및 (3) 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 확인하는 단계를 포함하는 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

황영란
대구광역시 동구 율하동로23길 19-9 (율하동)

류샤오
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)

정민교
대구광역시 동구 첨단로 61 (신서동)

문지영
대구광역시 동구 첨단로 61 (신서동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711123413
과제번호	20-BR-01
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국뇌연구원
연구사업명	뇌신경망 구조, 기능 및 인지연구
연구과제명	뇌신경망 내 미세아교세포의 세포소기관 추적기술 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	한국뇌연구원
연구기간	2020.05.14 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711151514
과제번호	22-BR-01
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국뇌연구원
연구사업명	뇌신경망 구조, 기능 및 인지연구
연구과제명	신경회로 이상 뇌질환의 세포 미세구조 변화 및 분자기전 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	한국뇌연구원
연구기간	2020.05.14 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711134285
과제번호	IBS-R007-D1-2021-A00
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	기초과학연구원
연구사업명	기초과학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	복잡계 자기조립 연구와 분자 네트워크 시스템 및 발현물질에 대한 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	기초과학연구원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

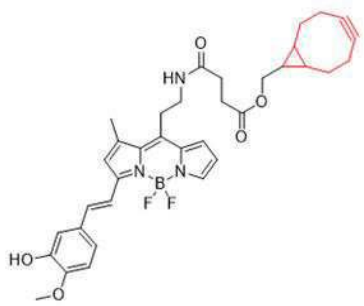
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 UGT1A7C(UDP glucuronosyltransferase 1 family)를 발현하는 세포를 표적화하기 위한 형광 프로브 화합물;

<화학식 1>



.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포는 미세아교세포인 것을 특징으로 하는, 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항의 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 검출용 조성물.

청구항 4

제1항의 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물은 세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질은, 라이소좀(lysosome) 타겟팅을 위한 모르폴린(morpholine), 골지체 타겟팅을 위한 세라마이드(ceramide), 콜린(choline) 및 AHA(azidohomoalanine)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물.

청구항 7

(1) 시험관 내의 미세아교세포에 세포 내 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 처리하는 단계;

(2) 상기 (1) 단계의 화합물이 처리된 미세아교세포에 제1항의 형광 프로브 화합물을 처리하여 클릭 반응(click reaction)을 유도하는 단계; 및

(3) 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 확인하는 단계를 포함하는,

미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질은, 라이소좀(lysosome) 타겟팅을 위한 모르폴린(morpholine), 골지체 타겟팅을 위한 세라마이드(ceramide), 콜린(choline) 및 AHA(azidohomoalanine)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 미세아교세포는 살아있는 미세아교세포인 것을 특징으로 하는, 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 활동 중인 뇌 신경망 내 미세아교세포의 세포 내 구조 분석을 위한 새로운 저분자 형광물질 및 이를 이용한 미세아교세포의 세포 내 구조 분석방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세아교세포(microglia)는 뇌 조직에 상주하는 특이적 대식세포 (tissue-resident macrophage)로 독특한 기능적 특성을 지닌다. 그러나 미세아교세포의 신경염증반응의 비정상적 반응은 치매, 다발성 경화증, 조현병, 자폐, 뇌졸중 등과 같이 광범위한 뇌질환의 주요 발병원인으로 작용하고 질병의 진행과정에서 매개자로서 작용함이 보고되면서 뇌질환 치료제 개발에 있어서 미세아교세포에 대한 연구 및 중요성이 부각되고 있다.

[0003] 특히 미세아교세포의 라이소좀의 기능저하는 퇴행성 뇌질환의 주요 원인으로 여겨지고 있고, 따라서 라이소좀의 기능 회복이 새로운 치료의 타겟이 되고 있다. 일반적으로 산성화된 라이소좀(lysosome)은 파고좀(phagosome)과 결합하여 라이소파고좀(lysophagosome)을 형성하여 내외부 물질에 소화성 효소를 적용시킴으로 대식작용을 나타내며, 뇌세포들 중 미세아교세포에서 활발히 발생한다.

[0004] 또한, 라이소좀은 손상받은 단백질, 세포 소기관 및 기타 세포의 구성요소를 자가 소화시키려는 오토파고좀(autophagosome)과도 결합하여 오토파지(autophagy) 작용을 완성시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 라이소좀의 기능이 감퇴되면서 나타나는 손상된 내부물질의 축적은 세포 내 부담으로 나타나게 되며, 세포의 수명이 긴 신경세포나 미세아교세포에서 특히 가중되어 나타나는 경향이 있다.

[0005] 이처럼 미세아교세포 내 특정 소기관인 라이소좀과 같은 특정 구조 및 생체분자의 연구는 뇌질환의 발병원인을 연구하고 효과적인 치료제를 개발함에 있어서 그 중요성이 더욱 증대되고 있다.

[0006] 한편, 특정 세포의 소기관을 추적하고 분석할 수 있는 종래 개발된 기술로는, 유전자 변형을 기반으로 하여 세포 특이성을 획득하는 방법, 세포 특이성 없이 특정 항체 기반 기술을 적용하여 소기관을 분리하여 연구하는 방법 및 특성 세포소기관에 반응하는 저분자 작용기를 적용하여 분석하는 방법이 개발된 바 있으나, 종래의 방법들은 비세포특이성을 지니고 있다는 한계가 있고, 많은 시간과 비용 및 기술의 복잡성이 요구되는 문제가 있을 뿐만 아니라 활동 중인 세포에서의 분석이 불가하다는 문제점이 있다.

[0007] 따라서 활동 중인 복잡한 신경회로망 내에서 나타나는 미세아교세포 내의 기능 및 구조의 변화를 정확하고 특이적으로 추적하고 분석할 수 있는 새로운 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-1427328

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 살아있는 미세아교세포의 특이적 소기관 및 생체분자를 표지하여 실시간으로 추적 및 분석할 수 있는 새로운 저분자 형광물질을 개발하였고, 이를 이용할 경우, 복잡한 신경회로망 내의 미세아교세포에서 세포 내 라이소좀, 콜린 및 신규합성 단백질을 가시적으로 용이하게 추적 분석할 수 있고, 미세아교세포와 뇌질환과의 관련성에 대한 연구 및 뇌질환 치료제 개발에도 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 UGT1A7C(UDP glucuronosyltransferase 1 family)를 발현하는 세포를 표적화하기 위한 형광 프로브 화합물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

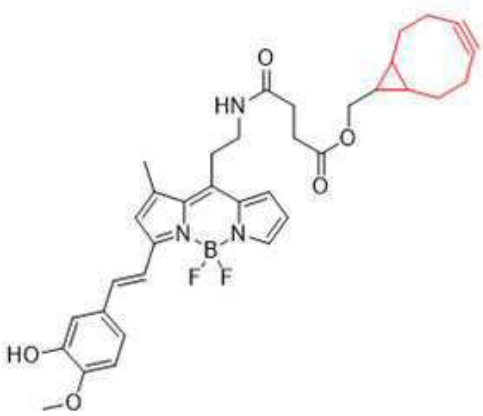
[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 형광 프로브 화합물을 이용하여 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 하기 화학식 1로 표시되는 UGT1A7C(UDP glucuronosyltransferase 1 family)를 발현하는 세포를 표적화하기 위한 형광 프로브 화합물을 제공한다.

[0015] <화학식 1>

[0016] 

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포는 미세아교세포일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형광 프로브 화합물은 UGT1A7C에 의해 글루쿠로나이드화(glucuronidation)되면서 형광을 나타내는 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명은 본 발명의 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 검출용 조성물을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은 본 발명의 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질은, 라이소

좀(lysosome) 타겟팅을 위한 모르폴린(morpholine), 골지체 타겟팅을 위한 세라마이드(ceramide), 콜린(choline) 및 AHA(azidohomoalanine)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0023] 나아가 본 발명은, (1) 시험관 내의 미세아교세포에 세포 내 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 처리하는 단계; (2) 상기 (1) 단계의 화합물이 처리된 미세아교세포에 본 발명의 형광 프로브 화합물을 처리하여 클릭 반응(click reaction)을 유도하는 단계; 및 (3) 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 확인하는 단계를 포함하는, 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형광 프로브 화합물은 미세아교세포에서 발현되는 UGT1A7C에 의해 글루쿠로나이드화(glucuronidation) 되면서 형광을 나타내는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질은, 라이소좀(lysosome) 타겟팅을 위한 모르폴린(morpholine), 골지체 타겟팅을 위한 세라마이드(ceramide), 콜린(choline) 및 AHA(azidohomoalanine)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세아교세포는 살아있는 미세아교세포일 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 조성물은 미세아교세포를 특이적으로 검출할 수 있는 효과가 있고, 특정 세포 소기관 또는 생체분자에 대한 특이적 형광분자에 클릭 반응으로 결합될 수 있어 세포 밖으로 빠져나가지 않은 상태로 지속적으로 형광 활성을 나타낼 수 있으므로, 살아있는 미세아교세포 내 특이적 세포 소기관 및 생체분자를 용이하게 실시간으로 추적 및 분석할 수 있다. 따라서 본 발명의 형광 프로브 화합물은 복잡한 신경회로망 내에서 미세아교세포에 대한 연구 및 신경 퇴행성 뇌질환의 치료제 발굴에도 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명에서 합성한 새로운 저분자 형광물질 CDr20-CO1 화합물의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 CDr20-CO1 화합물의 UGT1A7C에 대한 특이성을 분석한 결과로서, 2A는 UGT1A7C 과발현 N2A 세포주에 CDr20-CO1을 처리하여 형광 활성 여부를 유세포 분석기로 확인한 결과를 나타낸 것이고, 2B는 UGT1A7C-FLAG 과발현 N2A 세포주에서 FLAG 단백질이 발현되는 세포와 CDr20-CO1로 염색되는 세포가 동일한지를 관찰한 사진을 나타낸 것이다(Scale bar = 50 μm; ***, p<0.001).

도 3은 세포 내 특정분자와 azido 유기화합물 및 CDr20-CO1의 특이적 반응성을 이용한 미세아교세포의 세포소기관 타겟팅 작용을 모식도로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 CDr20-CO1 화합물을 이용한 미세아교세포 내 특정 소기관 및 생체분자의 추적관찰이 가능한지를 확인한 결과를 나타낸 것으로, 4A는 미세아교세포에서 라이소좀 마커(lysotrakcer deep red, 50 nM)와 morph-CDr20-CO1의 공동국소화 여부를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이고, 4B는 morph-Az(20 μM), choline-Az(400 μM) 및 AHA(40 μM)를 각각 40분, 48시간 및 4시간 처리(메티오닌 프리 배양액 사용) 후, CDr20-CO1(20 nM) 화합물을 1시간 처리하여 반응시킨 다음, 세포를 이미징 분석한 결과를 나타낸 것으로, 각 Az 화합물은 CDr20-CO1과 결합하여 미세아교세포의 특정 소기관(라이소좀) 및 생체 분자(콜린, AHA)를 염색하여 가시적으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 UGT1A7C-FLAG 과발현 N2A 세포주와 WT 세포주가 혼합된 배양 조건에서 morph-Az에 결합하는 CDr20-CO1과 CO-1의 염색 패턴을 비교한 결과로서, morph-Az(20 μM)를 40분 동안 처리 후 CDr20-CO1(20 nM) 및 CO-1(2 μM)를 배지에 처리하여 1시간 배양한 다음, 배양액 교체 후 클릭반응을 위해 다시 1시간이 경과한 다음 세포의 이미징 분석을 수행한 결과이다(Scale bar = 100 μm).

도 6은 CDr20-유도체들의 UGT1A7C 특이적 형광성 분석 결과를 나타낸 것으로, 6A는 SAR 분석을 위해 특정 부위가 변형된 CDr20-유도체들의 화학 구조식을 나타낸 것이고, 6B는 UGT1A7C 과발현된 N2A 세포와 WT 세포를 CDr20-유도체로 형광 염색하여 유세포 분석을 수행한 결과를 나타낸 것으로 파란색은 N2A WT 세포주를 나타낸 것이고, 붉은색은 UGT1A7C 과발현 N2A 세포주를 나타낸 것이며, MESO BD-132 제외한 모든 화합물의 excitation/emission = 561/614 nm, MESO BD-132 excitation/emission = 561/780 nm에서 수행한 결과이며, 6C는 유세포 분석을 통해 각 유도체 화합물별 중앙값 도출 및 미세아교세포에 대한 특이성 및 형광성을 잃지 않는

CDr20 내 가변 가능 부위를 확인한 결과를 나타낸 것이다(**, p<0.005; ***, p<0.001).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 활동 중인 뇌 신경망 내 미세아교세포의 세포 내 구조 분석을 위한 새로운 저분자 형광물질 및 이를 이용한 미세아교세포의 세포 내 구조 분석방법을 제공함에 특징이 있다.

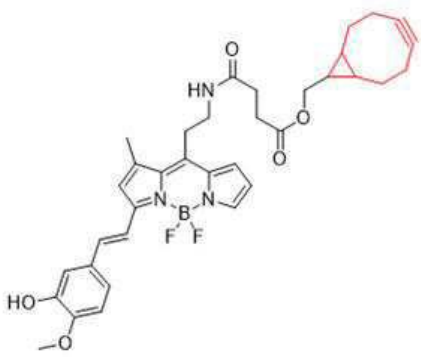
[0030] 뇌 신경망은 여러 뇌세포가 공존하는 복합적인 환경으로 조성되어 있으며, 최근 연구결과에 의하면 미세아교세포(microglia)는 치매, 파킨슨 등 다양한 신경퇴행성 뇌질환의 치료제 개발을 위한 주요한 타겟이 되고 있다.

[0031] 한편, 뇌 신경망 내에서 미세아교세포의 구조 및 기능 변화 등을 가시적으로 분석할 수 있는 방법은 부재한 실정이다.

[0032] 이에 본 발명자들은 살아있는 미세아교세포에서 세포 내 특정 소기관들의 구조와 생체분자를 실시간으로 가시적 관찰할 수 있는 형광 표지자를 개발하였다.

[0033] 따라서 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 UGT1A7C(UDP glucuronosyltransferase 1 family)를 발현하는 세포를 표적화하기 위한 형광 프로브 화합물을 제공한다.

[0034] <화학식 1>

[0035] 

[0036] 상기 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 형광 프로브 화합물은 종래 형광 프로브로 알려진 CDr20의 새로운 유도체 화합물로서, CDr20 화합물 보다 더 우수한 효능을 갖는 새로운 형광 프로브의 개발을 위해 CDr20의 화학구조식을 토대로 다양한 유도체 화합물들을 합성하였고, CDr20 유도체 화합물들 중에서 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이 UGT1A7C 효소와 특이적 반응을 나타내며 동시에 우수한 형광 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 상기 화학식 1의 구조식과 동일한 부분이 아닌 CDr20 유도체 화합물들은 UGT1A7C 효소와 특이적 반응이 미비하였고, 형광 활성도 미비한 것으로 나타났다.

[0037] 따라서 CDr20 화합물의 공통적인 백본 화학 구조식을 갖는다 할지라도 특정 부위가 변형된 다른 구조식을 갖는 화합물들의 특성 및 활성은 모두 상이하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0038] 이에 본 발명자들은 화학식 1의 구조식을 갖는 본원발명의 형광 프로브 화합물을 “CDr20-CO1”로 명명하였다.

[0039] 본 발명의 화학식 1의 구조식을 갖는 형광 프로브 화합물은 UGT1A7C(UDP glucuronosyltransferase 1 family)를 발현하는 세포를 특이적으로 표적화하여 형광을 나타내는 특징을 갖는데, 이는 본 발명의 형광 프로브 화합물이 UGT1A7C 효소가 반응할 수 있는 기질로 작용하여, UGT1A7C 효소에 의해 글루쿠로나이드화(glucuronidation)가 되면서 형광 활성을 나타내는 특징을 갖기 때문이다.

[0040] 따라서 본 발명의 형광 프로브 화합물은 UGT1A7C를 발현하는 세포를 특이적으로 검출할 수 있다.

[0041] 상기 UGT1A7C를 발현하는 세포는 본 발명의 형광 프로브 화합물을 이용하여 검출하고자 하는 목적 세포일 수 있으며, 상기 목적 세포는 UGT1A7C 단백질을 내재적으로 발현하는 세포일 수 있고 또는 UGT1A7C 단백질을 암호화하는 유전자를 외부로부터 세포 내로 도입시켜 UGT1A7C 단백질을 인위적으로 발현시킨 세포일 수 있다.

[0042] 바람직하게 상기 UGT1A7C를 발현하는 세포는 미세아교세포일 수 있다. 미세아교세포는 외부 유전자의 도입 없이 세포 내재적으로 UGT1A7C 단백질을 발현하는 유일한 신경세포이다.

[0043] 따라서 본 발명의 형광 프로브 화합물을 이용할 경우, 미세아교세포만을 특이적으로 검출할 수 있는 특징이 있

다.

[0044] 본 발명의 일실시예에서는 화학식 1의 구조식을 갖는 본 발명의 형광 프로브 화합물을 생쥐로부터 분리한 혼합된 일차아교세포 배양체(mixed primary glial cells)에 처리한 후, 형광 활성을 분석한 결과, 미세아교세포만을 특이적으로 염색하여 형광 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0045] 그러므로 본 발명은 상기 화학식 1의 구조식을 갖는 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 검출용 조성물을 제공할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 본 발명의 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는, 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물을 제공할 수 있다.

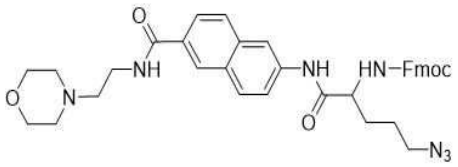
[0047] 상기 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자 검출용 조성물에는 본 발명의 형광 프로브 화합물과 함께 세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 더 포함할 수 있다.

[0048] 상기 물질은 검출하고자 하는 세포내 특정 소기관 또는 생체분자에 선택적으로 결합되거나 또는 축적될 수 있는 물질로서, 이에 제한되지는 않으나, 라이소좀(lysosome) 타겟팅을 위한 모르폴린(morpholine), 골지체 타겟팅을 위한 세라마이드(ceramide), 콜린(choline) 또는 AHA(azidohomoalanine)일 수 있다.

[0049] 또한, 상기 물질은 아자이드(azide) 화합물이 결합된 형태의 화합물로 상기 조성물에 포함될 수 있는데, 예컨대 라이소좀 소기관을 타겟팅 하는 경우에는 모르폴린(morpholine)에 아자이드 화합물이 결합된 morpholine-azide 화합물을 사용할 수 있고, 골지체 소기관을 타겟팅 하는 경우에는 세라마이드(ceramide)에 아자이드 화합물이 결합된 ceramide-azide 화합물을 사용할 수 있다.

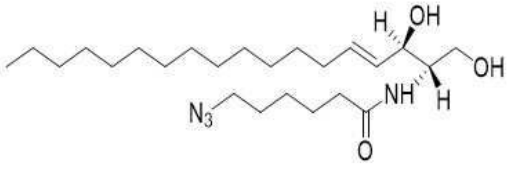
[0050] 또한, 검출하고자 하는 생체분자가 콜린일 경우에는 콜린에 아자이드 화합물이 결합된 choline-azide 화합물을 사용할 수 있고, 세포 내 신규합성 단백질을 검출하고자 하는 경우에는 AHA(azidohomoalanine)을 사용할 수 있다.

[0051] 구체적으로, morpholine-azide 화합물, ceramide-azide 화합물, choline-azide 화합물 및 AHA(azidohomoalanine) 화합물의 구조식은 하기와 같다.



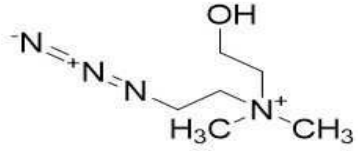
[0052]

[0053] <morpholine-azide 화합물 구조식>



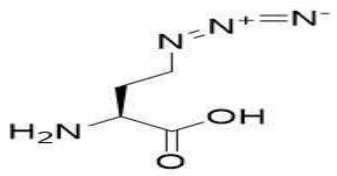
[0054]

[0055] <ceramide-azide 화합물 구조식>



[0056]

[0057] <choline-azide 화합물 구조식>



[0058]

[0059] <AHA(azidohomoalanine) 화합물 구조식>

[0060] 또한, 본 발명의 상기 조성물에는 본 발명의 형광 프로브 화합물 외에 혼합용액을 포함할 수 있다. 상기 혼합용액은 바람직하게, 물, 유기용매 및 이들의 혼합용액일 수 있으나, 이에 한정되지 않고 당업계에 알려진 형광 검출에 사용되는 완충용액을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명의 상기 조성물을 이용한 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자의 특이적 검출은, 본 발명의 형광 프로브 화합물과 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide)화합물이 결합된 화합물 간의 클릭 반응(click reaction)을 통해 이루어지는 특징이 있는데, 즉, N3(azide)을 포함하는 화합물(본 발명의 유기물질에 아자이드 화합물이 결합된 화합물)과 cycloalkyne을 포함하는 화합물(본 발명의 형광 프로브 화합물)이 만나 SPAAC(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition)을 일으키는 화학적 결합 반응(클릭 반응)을 유도하여 미세아교세포 내의 특정 생체분자와 선택된 기질의 결합이 이루어지도록 하였다.

[0062] 따라서 검출하고자 하는 세포 소기관 또는 생체분자에 대한 특이적인 표지자에 본 발명의 형광 프로브 화합물을 결합시켜 검출 목적의 세포 소기관 또는 생체분자를 형광 검출을 통해 추적 또는 분석할 수 있으며, 이러한 분석은 UGT1A7C(UDP glucuronosyltransferase 1 family)를 발현하는 살아있는 세포에서 수행될 수 있다.

[0063] 나아가 본 발명은 본 발명의 형광 프로브 화합물을 이용한 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하는 방법을 제공할 수 있다.

[0064] 상기 방법은, (1) 분석하고자 하는 세포에 세포 내 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 처리하는 단계; (2) 상기 (1) 단계의 화합물이 처리된 세포에 본 발명의 형광 프로브 화합물을 처리하여 클릭 반응(click reaction)을 유도하는 단계; 및 (3) 상기 형광 프로브 화합물로부터 발생하는 형광을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0065] 상기 방법은 시험관(in vitro) 내에서 분석하고자 하는 세포에, 세포 내 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 처리하여 수행할 수 있고, 또는 생체 내(in vivo)의 분석하고자 하는 세포에, 세포 내 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 투여하여 수행할 수 있다.

[0066] 상기 분석하고자 하는 세포는 미세아교세포일 수 있다.

[0067] 상기 방법에서 형광 프로브 화합물은 미세아교세포에서 발현되는 UGT1A7C에 의해 글루쿠로나이드화(glucuronidation) 되면서 형광을 나타내며, 상기 미세아교세포 내 세포 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질은, 라이소좀(lysosome) 타겟팅을 위한 모르폴린(morpholine), 골지체 타겟팅을 위한 세라마이드(ceramide), 콜린(choline) 및 AHA(azidohomoalanine)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0068] 그러므로 본 발명에서 제공하는 새로운 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 조성물은 미세아교세포를 특이적으로 검출할 수 있는 효과가 있고, 특정 세포 소기관 또는 생체분자에 대한 특이적 형광분자에 클릭 반응으로 결합될 수 있어 세포 밖으로 빠져나가지 않고 축적된 상태로 지속적으로 형광 활성을 나타낼 수 있으므로, 살아있는 미세아교세포 내 특이적 세포 소기관 및 생체분자를 용이하게 실시간으로 추적 및 분석할 수 있다.

[0069] 나아가 본 발명에서 제공하는 새로운 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 조성물은 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자를 실시간으로 분석하여 신경 퇴행성 뇌질환을 진단할 수 있는 진단방법을 제공할 수 있다.

[0070] 구체적으로, (1) 미세아교세포에 세포 내 소기관 또는 생체분자를 타겟팅 하는 물질에 아자이드(azide) 화합물이 결합된 화합물을 처리하는 단계; (2) 상기 (1) 단계의 화합물이 처리된 미세아교세포에 본 발명의 형광 프로브 화합물을 처리하여 클릭 반응(click reaction)을 유도하는 단계; 및 (3) 상기 형광 프로브 화합물로부터 발

생하는 형광을 확인하는 단계를 포함하는, 미세아교세포 내의 세포 소기관 또는 생체분자의 실시간 분석을 통한 신경 퇴행성 뇌질환의 진단방법을 제공할 수 있다.

[0071] 이처럼 본 발명의 형광 프로브 화합물은 복잡한 신경회로망 내에서 미세아교세포에 대한 연구 및 신경 퇴행성 뇌질환의 치료제 발굴에도 유용하게 사용될 수 있다.

[0073] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0074]

[0075] **<실험방법>**

[0076] ① Ugt1a7c 과발현된 Neuro2A 세포의 분리

[0077] 마우스 신경 세포주인 Neuro2A(N2A) 세포를 ATCC로부터 입수하여 표준 배양 배지(10%(v/v) FBS, 2mM 글루타민, 100U/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 함유한 DMEM 배지)에서 배양하였다. C-말단이 Flag-표지된 Ugt1a7c의 과발현은 LipofectaminTM 3000(ThermoFisher)을 사용하여 N2A 세포에 발현 플라스미드를 일시적 형질감염(pcDNA3.1-3xFlag 백본에 NM_201642 cDNA 서열이 클로닝된 플라스미드, NPT222707, NovoPro)시켜 수행하였다. 형질감염 3일 후, 세포를 분리하고 10분 동안 20nM의 CDr20으로 염색하여 형광 현미경(Eclipse Ti, Nikon)에서 Ugt1a7c 과발현에 의한 형광 턴온된 CDr20의 글루쿠론화(glucuronidated) 형태로의 전환을 확인하였다. Ugt1a7c-Flag 형질 감염된 N2A 세포는 야생형 N2A와 비교하여 CDr20-양성 집단을 포함하고 있다.

[0078] 또한, Ugt1a7c가 안정적으로 발현된 N2A 세포(N2A-Ugt1a7c)를 분리하기 위해, 형질감염된 세포를 분리하고 60μm 스트레이너로 여과시켜 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 세포를 표준 배양 배지에서 5분 동안 20nM의 CDr20으로 염색한 후, CDr20-양성 N2A 집단을 MoFlo Astrios(Beckman coulter)를 사용하여 FACS(fluorescence-activated cell sorting)로 분류하고 Ugt1a7c이 풍부하게 과발현된 N2A 세포를 분리하였다. FACS 분석은 더 많은 Ugt1a7c가 안정적으로 과발현되는 N2A 세포를 얻기까지 10회 반복 수행하였고, CDr20 유래의 형광에 대한 여기파장 및 방출파장은 각각 561 및 614 nm(53 nm band-pass)이다.

[0080] ② 유세포 분석

[0081] N2A 및 N2A-Ugt1a7c 세포를 100mm 배양 접시에 분주하고 2일 동안 배양하였다. 배양된 세포를 60μm 스트레이너를 사용하여 단일 세포로 분리하고 20nM의 CDr20, CDr20-CO1 또는 CDr20 유래의 형광 프로브를 상기 세포에 처리한 후, 표준 배양 배지에서 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 초기 게이팅은 세포 파편을 제외하기 위해 FSC-A/SSC-A 매개변수로 생성하였고, 살아있는 세포는 단일항 게이팅(singlets gating)을 위해 SSC-A/SSC-H 매개변수로 하위 게이트(sub-gated)하였으며, Attune NxT(ThermoFisher Scientific Messtechnik) 세포 분석기를 사용하여 20,000개의 단일 세포가 기록하였으며, 이때 카르복실-말단 CDr20(MesoBD132, 여기/방출 = 561/780 nm)을 제외한 흡수/방출 파장은 약 560/610nm 이었다. 각 살아있는 세포의 기록된 형광은 Flowjo 소프트웨어로 분석하였고, N2A 세포의 형광 신호의 중앙값은 각 프로브의 N2A-Ugt1a7c 세포의 형광 신호와 비교하였으며, 계산된 중앙값은 염색하지 않은 군의 값에 대한 백분율로 정규화하였다.

[0083] ③ 마우스의 일차 신경교세포 배양(Mouse primary glial culture)

[0084] 1차 신경교세포는 생후 1일 내지 3일째의 C57/BL6 마우스로부터 분리하여 사용하였다. 태아 마우스로부터 뇌를 분리하였고 피질은 정밀한 집게를 사용하여 조심스럽게 분리하였다. 피질은 Ca2+ 및 Mg2+ 이 없는 행크스의 균형 염 용액(HBSS; hanks' balanced salt solution)에서 다양한 크기의 화염이 좁은 파스퇴르 피펫(flame-narrowed Pasteur pipettes)으로 연속 분쇄하여 기계적으로 분리하였다. 해리된 세포를 표준 배양 배지와 함께 100mm 플레이트에 1×10^6 세포 밀도로 분주하였다. 혼합된 뇌세포는 37℃, 5% CO2 및 95% 공기 조건에서 배양하였고 5mL의 배양액을 주 1회 공급하였다. 배양된 1차 세포는 일부 희돌기아교세포/뉴런이 포함된 미세아교세포 및 성상교세포로 2-3주 이내에 배양 플레이트에 성장된다. 또한 이질적인(heterogeneous) 신경교세포는 추가 분석을 위해 1×10^5 cells/cm^2의 밀도로 배양 용기에 다시 분주하였다. 예상치 못한 염증 효과의 최소화를 위해

최소 24시간 배양된 1차 신경교세포를 사용하였다. 또한 본 연구에서 실험동물을 다루는 모든 절차는 한국뇌연구원 IACUC 위원회(KBRI, IACUC-20-00034)에서 검토 및 승인된 절차에 따라 수행하였다.

[0086] ④ 일차 신경교세포에서 세포 내 표지화(labeling) 및 공동지역화(colocalization)를 위한 클릭반응

[0087] 혼합 신경교세포를 표준 배양 배지에서 96웰 배양 플레이트(μClearTM, Greiner)에 분주하고, 2일 후 세포를 azido-morpholine(in-house; 20μM) 또는 azido-choline(CLK-065, Jena Bioscience; 400μM)으로 전처리하여 각각 40분 및 48시간 동안 라이소좀(lysosome) 또는 콜린(choline)을 표지하였다. 또한 새로 합성된 단백질의 표지를 위해 신경교세포를 10%(v/v) FBS, 2mM L-글루타민이 보충된 메티오닌이 없는 DMEM 배양 배지로 30분 동안 전배양 한 후, L-azidohomoalanine(C10102, Invitrogen 40 μM)을 첨가하고 추가로 4시간 동안 배양하였다. azido 화합물이 표지된 세포를 인산완충식염수(PBS)로 세척한 후, 세포를 CDr20-CO1(20nM, 5분) 또는 CO1(2μM, 1시간)과 함께 배양하여 클릭 반응을 시작하였다. 이후 배양액을 새로운 배지로 교환하고 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 분석하였다. 분석을 위해 PBS로 세포를 세척한 후, 공초점 현미경으로 신경교세포의 세포내 염색 패턴을 관찰하였고, 혼합된 신경교 배양에서 모든 세포의 라이소좀은 LysotrackerTM 딥 레드(L12492, Invitrogen, 50nM)로 표지하였다.

[0089] ⑤ 면역세포화학(Immunocytochemistry)

[0090] CDr20-CO1 및 Hoechst33342(14533, Sigma; 1μg/mL)로 염색된 살아있는 N2A-Ugt1a7c 세포를 4℃에서 30분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정한 후, PBS로 3회 세척하고 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS로 투과성화 시켰다. 이후 세포 표면을 5% 소혈청 알부민이 함유된 PBS로 30분 이상 블록킹 처리하고 토끼 항-Flag 항체(ab205606, Abcam; 1:1,000)로 4℃에서 밤새 배양하였다. 세포를 Alexa Fluor 488-접합된 anti-rabbit IgG(a11034, Invitrogen; 1:1,000)로 90분 동안 반응시킨 후, PBS로 실온에서 3회 세척하였다. 이후 CDr20-CO1의 라이브 형광 이미징과 Flag 태깅 면역 라벨링 이미지의 동일 부위를 epi-형광 현미경(Eclipse Ti, Nikon)을 사용하여 분석하였다.

[0092] ⑥ 공초점 이미징 분석(Confocal imaging)

[0093] 신경교세포를 공초점 현미경 스테이지(TI-RCP, Nikon)로 옮기고 40x 대물렌즈를 통해 관찰하였다. z-차원에서 20μm에 걸쳐 있는 여러 광학 섹션을 수집하였고(0.5μm 단계), 전체 광학 섹션이 압축된 z-스택으로 표시하였다. CDr20-CO1 및 CO-1 형광은 각각 561 nm 및 488 nm에서 여기 되었고, 595 nm 및 525 nm에서 방출된 결과를 수집하였다. LysotrackerTM 딥 레드 및 Hoechst33342의 흡수/방출은 각각 638/700 nm 및 405/450 nm에서 수행되었다.

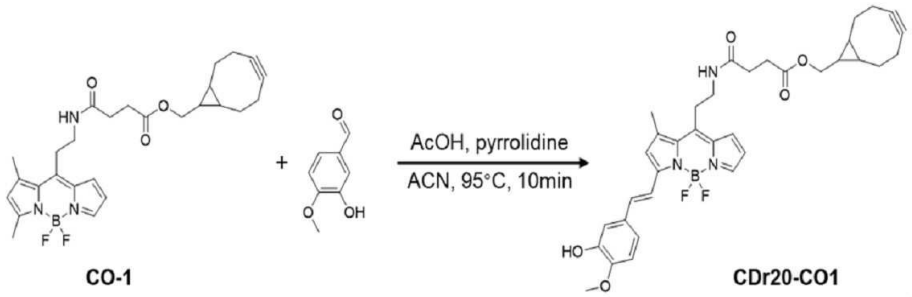
[0094]

[0095] **<실시예 1>**

[0096] **미세아교세포 특이적 저분자 형광물질인 CDr20-CO1 물질의 합성**

[0097] 본 발명자들은 미세아교세포 특이적 저분자 형광물질인 CDr20-CO1 물질을 다음과 같은 방법으로 합성하였다.

[0098] 먼저, CO-1 물질을 공지된 방법을 통해 합성하였다(Nat. Commun. 2016, 7, 11964). 이후 CO-1(12.7 mg, 25.6 μmol)이 용해된 무수 아세토니트릴 용액에 3-하이드록시-4-메톡시벤즈알데하이드(3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde, 15.6 mg, 102.4 μmol)를 첨가한 후, 피롤리딘(8.8 μL, 153.6 μmol) 및 AcOH(12.8 μL, 153.6 μmol)을 첨가하였다. 그런 뒤, 상기 용액을 95℃에서 10분간 환류시켰고, 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 진공 상태에서 농축시켰으며, HPLC(4.2 mg, 6.7 μmol) 수행을 통해 하기 구조식을 갖는 본 발명의 CDr20-CO1 화합물을 정제하였다. 또한 정제한 CDr20-CO1 화합물에 대한 NMR 분석을 수행하였고 그 결과는 다음과 같다.



[0099]

[0100] <CDr20-CO1 화합물의 합성 반응식>

[0102] ^{1}H NMR (850 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.63 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.18 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.94 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 3.61 - 3.52 (m, 2H), 3.24 - 3.15 (m, 2H), 2.71 - 2.62 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 2.47 - 2.39 (m, 2H), 2.29 (t, *J* = 12.4 Hz, 2H), 2.22 (t, *J* = 17.8 Hz, 4H), 1.58 - 1.52 (m, 2H), 1.41 - 1.33 (m, 1H), 0.96 (s, 2H).

[0104] ^{13}C NMR (214 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.00, 171.78, 157.66, 148.33, 145.92, 144.19, 140.06, 139.80, 137.37, 135.24, 134.30, 129.63, 123.11, 121.18, 119.81, 116.89, 115.85, 113.37, 110.66, 98.76, 62.80, 56.04, 41.41, 30.96, 29.54, 29.39, 29.02, 21.38, 20.17, 17.37, 16.47.

[0106] **<실시예 2>**

[0107] **Ugt1a7c 과발현된 신경세포주에서 본 발명의 CDr20-CO1 화합물의 형광활성 분석**

[0108] 본 발명자들은 실시예 1에서 합성한 본 발명의 저분자 형광물질인 CDr20-CO1 화합물이 신경세포주에서 형광활성을 보이는지 확인하기 위해, 상기 실험방법에서 분리한 Ugt1a7c가 안정적으로 발현된 N2A 세포(N2A-Ugt1a7c)에 CDr20-CO1 화합물을 처리한 후, 유세포분석기를 통해 N2A 세포에서의 형광 신호를 분석하였다. 이때 비교군으로는 Ugt1a7c를 과발현시키지 않은 N2A 세포를 대상으로 상기 실험을 수행하였다. 또한 상기 Ugt1a7c를 안정적으로 발현시킨 N2A 세포에서 Ugt1a7c는 Flag 태그된 형태로 존재한다.

[0110] 분석 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명에서 합성한 CDr20-CO1 화합물은 Ugt1a7c이 발현되는 신경세포주에서 Ugt1a7c 효소에 의해 글루쿠로나이드화 되면서 형광활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 반면, Ugt1a7c이 발현되지 않는 N2A 세포에서는 형광활성을 보이지 않는 것으로 나타났다(도 2a).

[0111] 또한, Ugt1a7c이 안정적으로 발현되는 세포와 CDr20-CO1의 형광염색된 세포가 동일한지 확인하기 위해 살아있는 세포를 대상으로 면역세포화학 분석을 수행한 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 CDr20-CO1 화합물에 의해 특이적으로 형광 염색되는 세포가 Flag 태그된 Ugt1a7c이 발현되는 신경세포주와 동일한 세포임을 확인할 수 있었다.

[0112] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명의 CDr20-CO1 화합물은 Ugt1a7c이 발현되는 신경세포주 특이적으로 형광활성을 보인다는 것을 알 수 있었다.

[0114] **<실시예 3>**

[0115] **본 발명의 CDr20-CO1 화합물을 이용한 미세아교세포 내 특정 소기관 및 생체분자 추적 관찰 가능성 분석**

[0116] 본 발명자들은 본 발명의 CDr20-CO1 화합물을 이용하여 미세아교세포 특이적으로 세포 소기관 및 생체분자에 대한 실시간 추적 분석이 가능한지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0117] 미세아교세포의 세포 내 구조 추적을 위해 클릭 반응(click reaction)을 적용하였다. 클릭 반응이란, N3(azide)와 사이클로알킨(cycloalkyne)이 만나 SPAAC(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition)을 일으키는 화학적 결합 반응으로 살아있는 세포 내에서 특정 생체분자와 선택된 기질의 결합을 허용하도록 한다.

[0118] 이를 위해, 본 발명자들은 일차 배양된 생쥐의 뇌세포 배양체를 대상으로 특정 세포 내 구조로 타겟팅이 가능한 유기물질에 azide 잔기가 결합된 화합물을 1차로 반응시킨 후, azide에 결합하는 기능기인 CO1(cycloalkyne)을 포함한 본 발명의 CDr20-CO1 화합물을 2차 반응시켜 미세아교세포 내 구조의 추적을 분석하였다.

[0119] 본 발명의 세포 내 특정분자와 azido 유기화합물과 CDr20-CO1의 특이적 반응성을 이용한 미세아교세포의 특정 세포 소기관 타겟팅 작용 모식도는 도 3에 나타내었다.

[0120] 구체적으로, 본 발명자들은 먼저 미세아교세포 내 타겟팅 가능한 소기관 및 생체 분자로서 라이소좀, 콜린 및 신규합성 단백질을 선택하고 이들을 각각 morpholine-azide(morph-Az), choline-azide(choline-Az), azidohomoalanine(AHA)를 사용하여 표지하였는데, Ugt1a7c이 발현되는 미세아교세포에 morph-Az(20 μM), choline-Az(400 μM), AHA(40 μM)를 각각 40분, 48시간, 4시간 처리(메티오닌 프리 배양액 사용)한 후, 본 발명의 CDr20-CO1(20 nM) 화합물을 1시간 처리하여 반응시킨 다음, 이미징 분석을 진행하였다.

[0121] 또한, CDr20-CO1 화합물을 이용할 경우, 세포 내 목적하는 특정 소기관의 분석이 가능한지를 확인하기 위해, 라이소좀 특이적 타겟 프로브인 morpholine-azide(morph-Az)를 처리한 morph-Az-CDr20-CO1 반응 세포군을 라이소좀 마커 처리군(lysotrakcer deep red, 50 nM)과 비교하여 공동국소화(colocalization) 여부를 관찰하였다.

[0123] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 미세아교세포 내 라이소좀에 특이적으로 타겟팅이 가능한 물질인 morpholine-azide(morph-Az)를 처리하고 이후 CDr20-CO1 화합물을 처리한 경우, 라이소좀 마커를 처리한 세포군과 동일한 부위에서 형광 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(도 4a).

[0124] 또한, 본 발명의 CDr20-CO1 화합물을 이용할 경우, 세포 내 특정 생체분자인 콜린 및 azidohomoalanine을 특이적으로 염색하여 관찰할 수 있음을 알 수 있었다(도 4b).

[0126] 뿐만 아니라 본 발명자들은 기존에 형광 프로브로 알려진 CO1 화합물과 본발명의 CDr20-CO1 화합물에 대한 미세아교세포 특이적 소기관 타겟팅의 정확도를 분석하였다. 이를 위해 UGT1A7C-FLAG 과발현 N2A 세포주와 WT 세포주가 혼합된 배양조건에서 먼저 morph-Az(20 μM)를 40분간 처리한 후, CDr20-CO1(20 nM), 및 CO-1(2 μM) 화합물을 각각 처리한 다음 1시간 동안 반응시킨 후, 형광염색된 세포 이미징을 분석하였다.

[0128] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, CO-1 화합물을 처리한 군에서는 UGT1A7C-FLAG 과발현 N2A 세포주 및 WT 세포주를 구별하지 않은 채 비특이적으로 형광을 보이는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 CDr20-CO1 화합물 처리군은 UGT1A7C-FLAG을 과발현하는 미세아교세포에서만 형광이 확인되는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명의 CDr20-CO1 화합물은 종래 형광표지자인 CO-1에 비해 세포 특이성을 갖는 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.

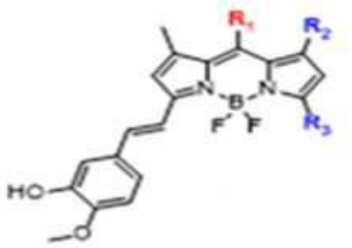
[0130] 이상의 결과를 통해 본 발명자들은 CDr20-CO1 화합물을 미세아교세포 특이적 형광분자에 클릭 반응시켜 살아있는 신경세포에서 특이적인 세포 소기관 및 생체분자를 실시간으로 추적 및 분석이 가능하다는 것을 알 수 있었고, 이러한 방법은 복잡한 신경회로망 내에서 미세아교세포의 뇌질환에 미치는 역할을 구체적으로 연구할 수 있는 분석 시스템으로 활용할 수 있으며, 알츠하이머 및 파킨슨 등의 뇌질환 치료제 개발에도 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0132] **<실시예 4>**

[0133] **CDr20 유도체 화합물들에 대한 미세아교세포 특이성 및 형광 활성 분석**

[0134] 나아가 본 발명자들은 CDr20의 고유의 특징인 UGT1A7C 특이적 효소 반응성을 유지하면서 기존 화학구조의 변형이 가능한 부위를 특정짓기 위해 SAR(structure-activity relationship) 분석을 수행하였고, 도 6a의 유도체 화합물들에 대한 UGT1A7C 효소 반응성을 UGT1A7C 과발현된 N2A 세포와 WT 세포에서 유세포 분석기를 통해 분석하였다.

[0135] <화학식 2>



[0136]

[0137] 그 결과, 상기 화학식 2의 화합물 구조식에서 R1 부분은 추가적인 화학구조의 변경에도 UGT1A7C 효소 특이적 반응성에는 영향을 미치지 않는 가변부위라는 것을 알 수 있었고, 반면, R2 및 R3 부분은 methyl기의 변형에도 UGT1A7C 효소 반응성이 사라질만큼 이들 부위의 구조가 변경될 경우에는 UGT1A7C 효소 특이적 반응성이 현저하게 감소 또는 사라지는 것을 확인할 수 있었다(도 6b 및 6c).

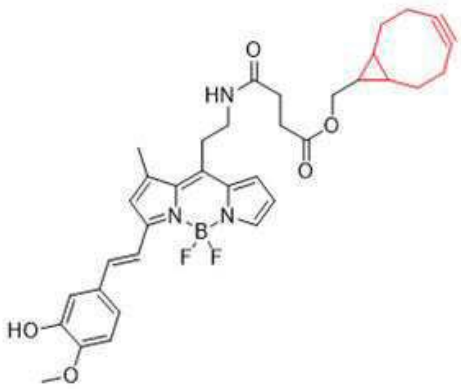
[0138] 한편, R1 부분을 변경시킨 다양한 유도체 화합물들 중에서 본 발명의 화학식 1로 표기되는 형광 프로브 화합물의 구조를 갖는 유도체 화합물이 다른 유도체 화합물들에 비해 UGT1A7C 효소 특이적 반응성이 가장 우수한 것으로 나타났다(도 6b 및 6c).

[0140] 이러한 결과는, CDr20 화합물의 공통적인 백본 화학 구조식을 갖는다 할지라도 특정 부위가 변형된 다른 구조식을 갖는 화합물들의 활성은 모두 상이하다는 것을 의미하며, 특히 본 발명의 화학식 1로 표기되는 형광 프로브 화합물이 미세아교세포 내 세포 소기관 및 생체분자를 높은 특이성 및 형광성으로 추적 및 검출하는데 가장 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

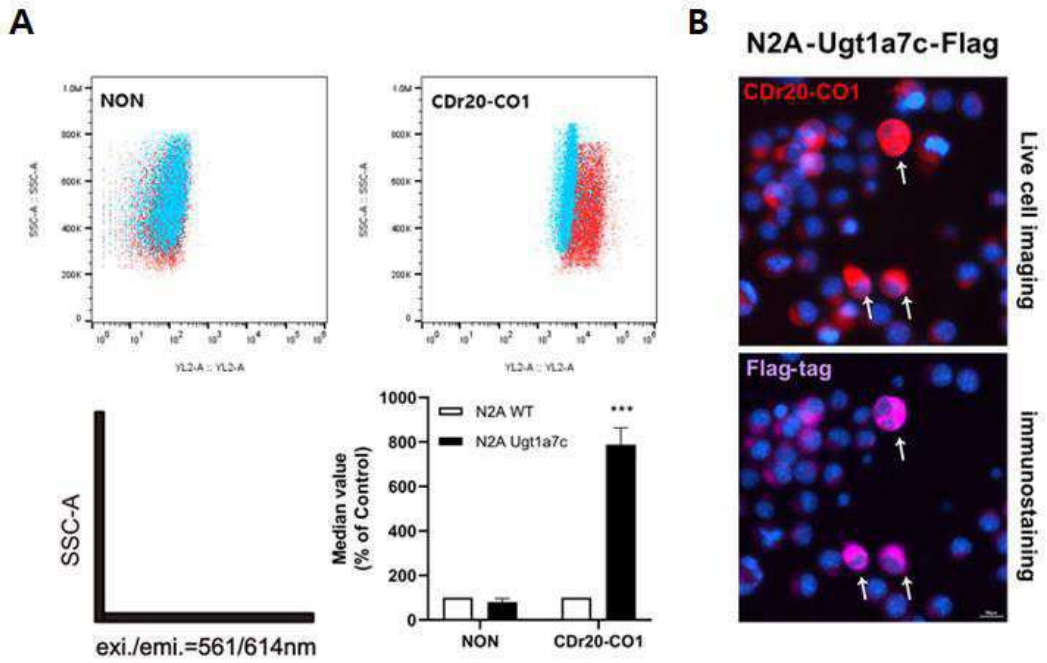
[0142] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

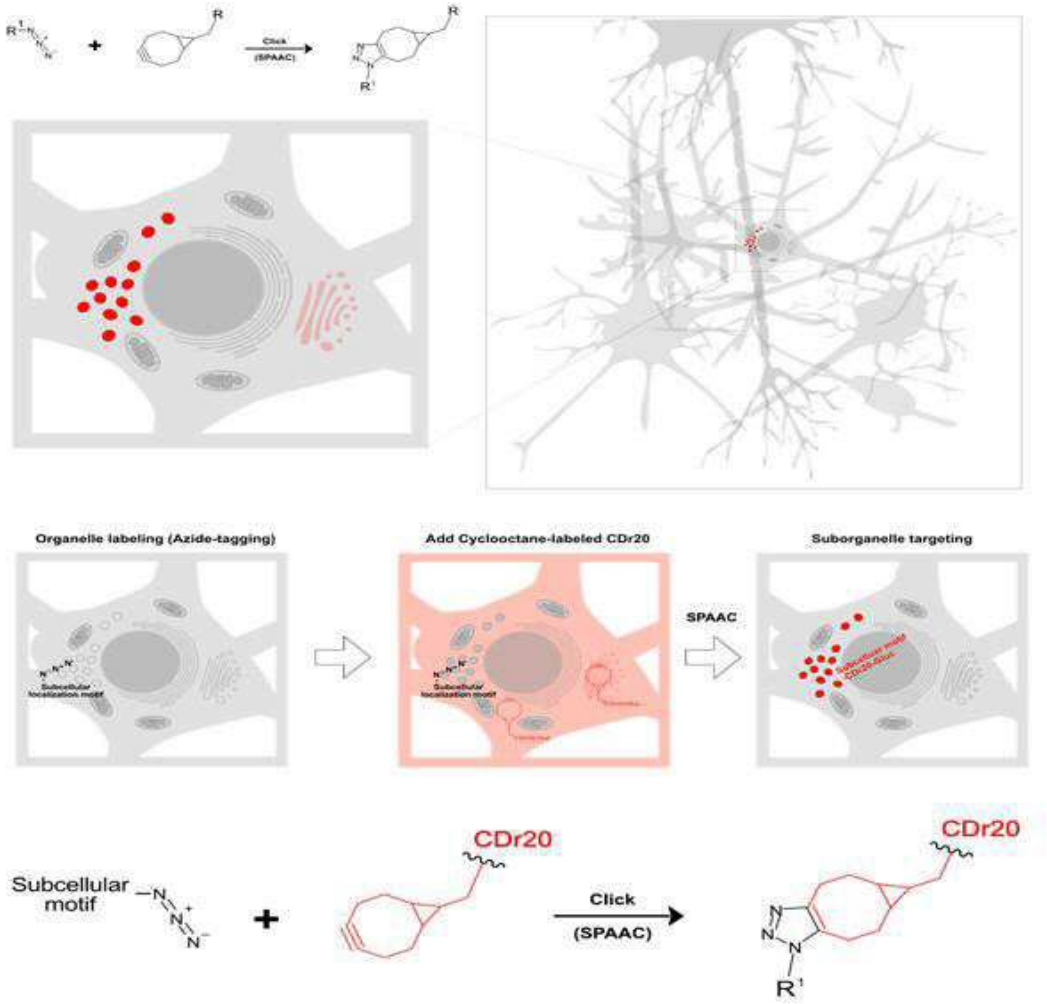
도면1


HN
O
O
O
N
B
N
F
F
HO
O

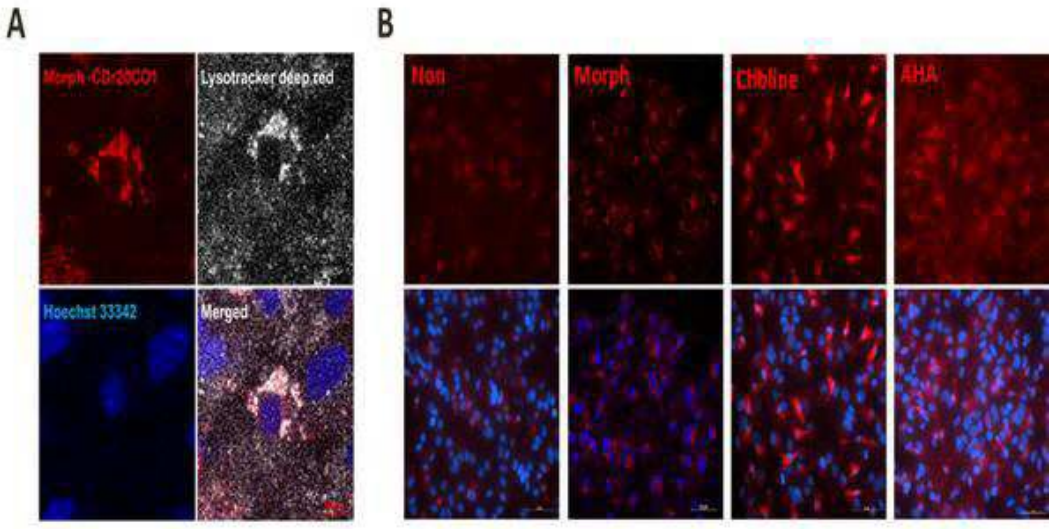
도면2


A
NON
CDr20-CO1
SSC-A
exi./emi.=561/614nm
N2A WT
N2A Ugt1a7c
***
Median value
(% of Control)
1000
800
600
400
200
0
NON
CDr20-CO1
B
N2A-Ugt1a7c-Flag
CDr20-CO1
Live cell imaging
Flag-tag
immunostaining

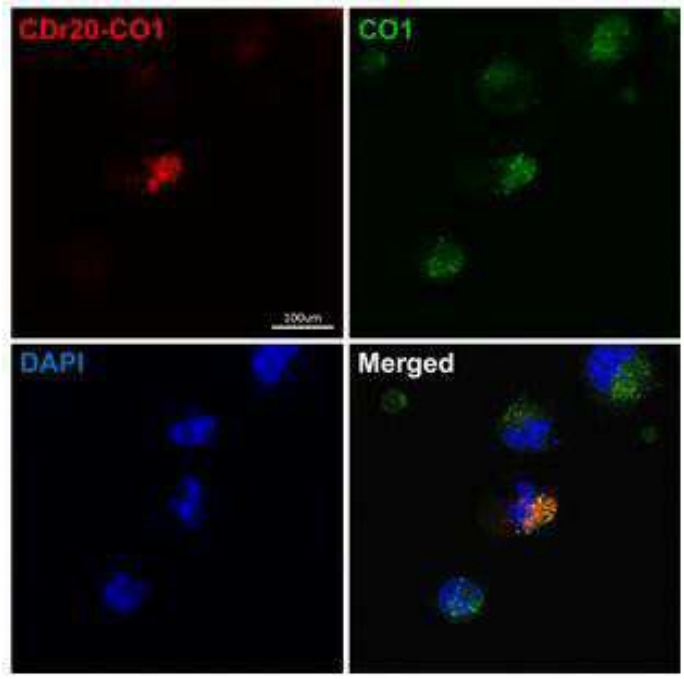
도면3


Click
(SPAAC)
Organelle labeling (Azide-tagging)
Add Cyclooctane-labeled CDr20
Suborganelle targeting
SPAAC
Subcellular localization motif
Subcellular motif
CDr20
Click
(SPAAC)
R'

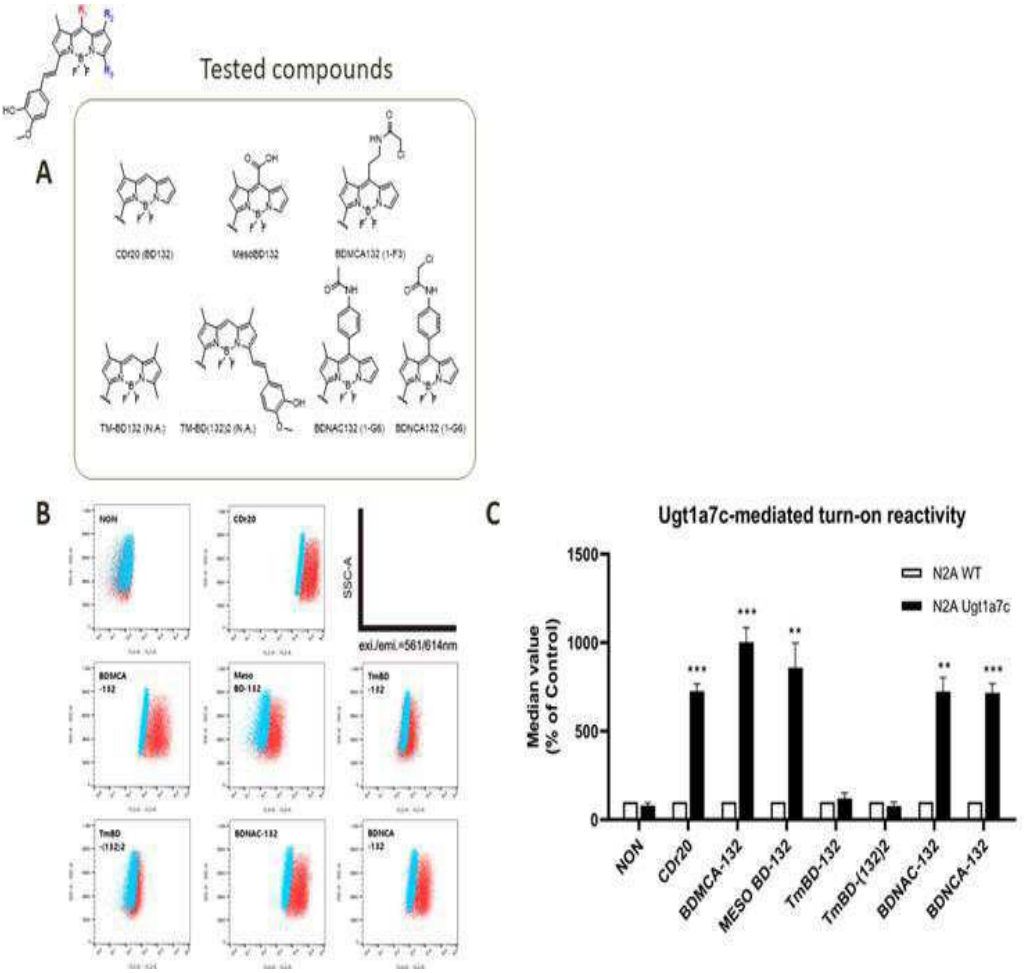
도면4


A
B
Lysotracker deep red
Hoechst 33342
Merged
Non
Morph
Choline
AHA

도면5


CDr20-CO1
CO1
DAPI
Merged

도면6


Tested compounds
A
B
C
Ugt1a7c-mediated turn-on reactivity
N2A WT
N2A Ugt1a7c
Median value (% of Control)
1500
1000
500
0
NON
CDr20
BDMCA-132
MESO BD-132
TmBD-132
TmBD-(132)2
BDNAC-132
BDNCA-132
SSC-A
exi./emi.=561/614nm